



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

Grażyna Chłoń-Rzepa

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej
Zakład Chemii Leków

Kraków 2016

SPIS TREŚCI

1. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego	3
2. Prezentacja osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji	6
2.1. Wykaz prac stanowiących podstawę habilitacji	6
2.2. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji	9
2.2.1. Wprowadzenie oraz cel naukowy prowadzonych badań	9
2.2.2. Charakterystyka chemiczno-farmakologiczna 8-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, z podstawnikami o charakterze lipofilowym w położeniu 7, jako wieloreceptorowych ligandów 5-HT _{1A} /5-HT _{2A} /5-HT ₇	17
2.2.3. Wielofunkcyjne ligandy receptorów 5-HT _{1A} /5-HT _{2A} /5-HT ₇ oraz dopaminowych D ₂ w grupie 7-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, ze zróżnicowanymi podstawnikami alkoksylowymi w położeniu 8 – profil funkcjonalny oraz aktywność psychotropowa	21
2.2.4. Aktywność receptorowa i właściwości psychotropowe 7-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu z alifatycznym, aryloalifatycznym lub cyklicznym ugrupowaniem aminowym w położeniu 8	25
2.2.5. 7-Arylopiperazynyloalkilowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu z niepodstawioną pozycją 8, jako ligandy receptora 5-HT _{1A} ze zróżnicowaną funkcją ago/antagonistyczną i silnymi właściwościami przeciwdepresyjnymi i anksjolitycznymi	31
2.2.6. Ocena wpływu zastąpienia układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu strukturą 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu oraz tricyklicznym układem dihydro[1,3]oksazolo[2,3-f]purynodionu w badanych arylopiperazynyloalkilowych pochodnych, na powinowactwo do receptorów 5-HT _{1A} /5-HT _{2A} /5-HT ₆ /5-HT ₇ i D ₂	35
2.2.7. Badania krystalograficzne dla wybranych arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu o właściwościach wieloreceptorowych ligandów 5-HT i/lub D ₂	38
2.2.8. Analiza sposobu wiązania ligandów z grupy arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu do receptora serotoninowego 5-HT _{1A} oraz dopaminowego D ₂ , przy użyciu metod modelowania molekularnego	41
2.2.9. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji	44
3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych oraz najbliższych planów naukowych	46
3.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora	46
3.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora	48
3.3. Najbliższe plany naukowe	54
4. Piśmiennictwo	57

1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA DOROBKU NAUKOWEGO

Prezentowane przeze mnie prace naukowe dotyczą obszaru badań chemii medycznej i stanowią poszukiwania nowych związków o aktywności biologicznej, głównie psychotropowej, lecz także przeciwbólowej, przeciwyrtmicznej i/lub hipotensyjnej; o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym, m.in. w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego i układu krążenia. Badania te mają charakter multidyscyplinarny. Zasadniczą część stanowi projektowanie oraz synteza chemiczna, metodami klasycznymi, wielu serii związków, w większości pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (teofiliny). W dalszym etapie prowadzone są badania przesiewowe aktywności farmakologicznej, analiza struktura-aktywność oraz wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych związków, jako nowych potencjalnych kandydatów na leki.

Zainteresowania naukami ścisłymi rozwijałam już w Liceum Ogólnokształcącym uczęszczając do klasy o profilu matematyczno-fizycznym.

W roku 1980 rozpoczęłam studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej im. M. Kopernika w Krakowie, które ukończyłam w roku 1985, otrzymując dyplom z wyróżnieniem.

W okresie studiów systematycznie pogłębiałam swoją wiedzę farmaceutyczną, dotyczącą zwłaszcza chemii leków i farmakologii. Zainteresowania naukami farmaceutycznymi rozwijałam także w kole naukowym przy Katedrze Technologii Postaci Leków i Biofarmacji, pod kierunkiem Prof. dr hab. Renaty Jachowicz.

Pracę magisterską pt. „Działanie przeciwyrtmiczne nowych pochodnych aminoalkoholi” wykonałam w Katedrze Farmakodynamiki, kierowanej przez Prof. dr hab. Jolantę Krupińską, pod opieką dr Marii Michny. Z Katedrą Farmakodynamiki związana jestem do dziś przez współpracę naukową. Pracę magisterską referowałam na Ogólnopolskim Konkursie Prac Magisterskich, uzyskując I nagrodę. Wyniki tej pracy zostały opublikowane w czasopiśmie naukowym z moim współautorstwem.

Bezpośrednio po ukończonych studiach, zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej im. M. Kopernika w Krakowie, kierowanej przez Prof. dr hab. Alfreda Zejca. Oprócz pracy dydaktycznej podjęłam prace badawcze dotyczące syntezy chemicznej nowych związków o potencjalnej aktywności biologicznej.

Początkowo, przedmiotem moich badań było poszukiwanie związków o przewidywanej aktywności na ośrodkowy układ nerwowy (przeciwdrgawkowej oraz przeciwbólowej) w grupie pochodnych difenylohydantoiny i difenyloimidazolidyn-4-onu a także przeciwyrtmicznej i hipotensyjnej w grupie pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (teofiliny) i ksantonu. Poszukiwania w grupie 7 oraz 7,8-dipodstawionych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, zawierających ugrupowania 2-hydroksy-3-aminopropylowe oraz pirydylometyloaminowe, związków o ukierunkowanej aktywności krążeniowej (przeciwartmicznej i/lub hipotensyjnej) oraz stabilizującej mastocyty, stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej pt. „Synteza oraz właściwości farmakologiczne piperazynowych i pirydylowych pochodnych teofiliny”, której promotorem był Prof. dr hab. Alfred Zejc. Pracę tą obroniłam w roku 1996 na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (UJCM) uzyskując stopień doktora nauk farmaceutycznych.

W związku z rozwijaniem w tym czasie obszarem badań, jakim było poszukiwanie ligandów receptorów serotoninowych, zwłaszcza 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, zostałam włączona w tą tematykę badawczą.

W latach 1994-1995 odbyłam staż naukowy w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie pod opieką naukową Prof. dr hab. Jerzego L. Mokrosza oraz dr Sijki Charakchievej-Minol. Z Zakładem tym, kierowanym obecnie przez Prof. dr hab. Andrzeja J. Bojarskiego, jestem związana do dziś przez współpracę naukową.

Badania chemiczno-farmakologiczne nad ligandami receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} prowadziłam w tym czasie w grupie pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu oraz tricyklicznych układów purynowych. Oprócz syntezy chemicznej ligandów receptorowych (głównie typu 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}) z tych grup chemicznych, wykonywałam również badania radioizotopowe *in vitro* określające powinowactwo i selektywność wobec tych podtypów receptorów. Część tych badań została włączona do mojej rozprawy doktorskiej. Poznanie tej tematyki badawczej, także od strony warsztatu eksperymentalnego, było cennym doświadczeniem w budowaniu moich kompetencji w poszukiwaniu ligandów receptorów monoaminergicznych, którymi zajmuję się do chwili obecnej.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, od 1 października 1996 roku, zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM kierowanej przez Prof. dr hab. Alfreda Zejca, a od 1999 roku przez Prof. dr hab. Macieja Pawłowskiego. Od 2005 roku kontynuuję pracę w tej Katedrze na stanowisku starszego wykładowcy.

Moje prace badawcze, po uzyskaniu stopnia doktora, związane były głównie z projektowaniem i syntezą pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu m.in. o potencjalnej aktywności krążeniowej (przeciwwarytmicznej i/lub hipotensyjnej), a także o potencjalnych właściwościach przeciwbólowych i przeciwzapalnych. Badania te realizowałam w latach 1997-2015 w ramach szeregu projektów subsydiowanych przez UJCM, których byłam kierownikiem.

Trzeci, zasadniczy kierunek moich badań, stanowiło projektowanie i synteza nowych ligandów receptorów monoaminergicznych, głównie serotoninowych i dopaminowych, w grupie pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, o potencjalnym działaniu psychotropowym. Ten temat badawczy prowadziłam w ramach projektów finansowanych przez UJCM, których byłam kierownikiem, jak również kilku projektów KBN/MNiSW/NCN w latach 2000-2013, w których uczestniczyłam jako wykonawca lub główny wykonawca. Część badań przeprowadzonych w ramach tych projektów stała się przedmiotem prac stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego. Wpływ na moje doświadczenie w tej dziedzinie badawczej miał mój udział jako wykonawcy zadania syntetycznego w projekcie realizowanym w latach 2008-2013 przez konsorcjum naukowo-przemysłowe, koordynowanym przez firmę Adamed i współfinansowanym przez NCBiR, dotyczącym opracowania innowacyjnego leku w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego.

Aktualnie, mój dorobek naukowy obejmuje 29 publikacji naukowych, w tym 23 publikacje oryginalne w angielsko-języcznych, recenzowanych czasopismach, posiadających impact factor, 1 pracę angielsko-języczną posiadającą punktację MNiSW, 2 prace angielsko-języczne nieposiadające punktacji MNiSW, 1 angielsko-języczną pracę popularno-naukową oraz 2 polsko-języczne prace poglądowe posiadające punktację MNiSW.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (impact factor) publikacji recenzowanych wynosi 30,391, co odpowiada punktacji KBN/ MNiSW = 361. Opublikowane prace były cytowane 109 razy, a odpowiadający im indeks Hirscha wynosi 5.

Jestem także współautorem 55 doniesień zjazdowych, prezentowanych na międzynarodowych i krajowych konferencjach i sympozjach naukowych.

Ponadto jestem współautorem I, II, i III wydania podręcznika akademickiego pod redakcją Prof. dr hab. farm. Alfreda Zejca i Prof. dr hab. farm. Marii Gorczycy pt. „Chemia leków” oraz współautorem I i II wydania podręcznika dla studentów Wydziału Farmaceutycznego UJCM pt. „Ćwiczenia z chemii leków” pod redakcją Prof. dr hab. Marii Gorzycowej i Prof. dr hab. Alfreda Zejca.

Do chwili obecnej brałam/biorę udział łącznie w 16 projektach naukowych, w tym 1 finansowanym przez NCBiR i firmę farmaceutyczną Adamed - jako wykonawca, 6 grantach KBN/MNiSW/NCN, jako wykonawca (w 4 grantach) lub główny wykonawca (w 2 grantach) oraz 9 projektach własnych finansowanych przez UJCM, w 8 jako kierownik projektu, w 1 jako wykonawca.

Projekty te zostały zamieszczone w „Wykazie opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych” w punkcie II.H.

2. PREZENTACJA OSIĄGNIĘĆ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

WYNIKAJĄCE Z ART. 16, UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 ROKU O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595, Z PÓŹN ZM.)

Przedmiotem przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego, będącego podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego jest **monotematyczny cykl publikacji**, zatytułowany „**Arylopiperazynyloalkilowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu jako wielofunkcyjne ligandy receptorów monoaminergicznych 5-HT/D₂ o potencjalnej aktywności psychotropowej**”.

Cykl prac obejmuje 8 oryginalnych, pełnotekstowych prac naukowych, opublikowanych w latach **2007-2015** w angielsko-języcznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, posiadających *impact factor* i opisujących zwarte tematycznie badania z zakresu chemii medycznej. Zgodnie z analizą bibliometryczną, sumaryczny współczynnik IF prezentowanego cyklu wynosi **16,544** a odpowiadająca mu punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to **180**.

W 5 pracach jestem pierwszym autorem oraz w 2 pracach autorem korespondencyjnym. We wszystkich pracach jestem autorem, który zrealizował badania nad syntezą, poddanych następnie testom biologicznym, związków.

2.1. Wykaz prac stanowiących podstawę habilitacji

H1. G. Chłoń-Rzepa, P. Żmudzki, P. Zajdel, A.J. Bojarski, B. Duszyńska, A. Nikiforuk, E. Tatarczyńska, M. Pawłowski: 7-Arylopiperazynylalkyl and 7-tetrahydroisoquinolinyalkyl derivatives of 8-alkoxy-purine-2,6-dione and some of their purine-2,6,8-trione analogs as 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₇ serotonin receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 5239-5250.

IF₂₀₀₇ = 2.662, KBN/MNiSW 20

H2. G. Chłoń-Rzepa, P. Żmudzki, G. Satała, B. Duszyńska, A. Partyka, D. Wróbel, M. Jastrzębska-Więsek, A. Wesołowska, A.J. Bojarski, M. Pawłowski, P. Zajdel: New 8-aminoalkyl derivatives of purine-2,6-dione with arylalkyl, allyl or propynyl substituents in position 7, their 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₇ receptor affinity and pharmacological evaluation. *Pharmacol. Rep.* **2013**, 65, 15-29.

IF₂₀₁₃ = 2.165, KBN/MNiSW 25

H3. M. Zygmunt, J. Sapa, **G. Chłoń-Rzepa**, A. Zagórska, A. Siwek, M. Pawłowski, G. Nowak: 7-3-Chlorophenylpiperazynylalkyl derivatives of 8-alkoxy-purine-2,6-dione as a serotonin receptor ligands with potential antidepressant activity. *Pharmacol. Rep.* **2014**, 66, 505-510.

IF₂₀₁₄ = 1.928, KBN/MNiSW 25

H4 G. Chłoń-Rzepa, P. Żmudzki, M. Pawłowski, A. Wesołowska, G. Satała, A. J. Bojarski, M. Jabłoński, J. Kalinowska-Tłuścik: New 7-arylpiperazynylalkyl-8-morpholin-4-yl-purine-2,6-dione derivatives with anxiolytic activity – Synthesis, crystal structure and structure-activity study. *J. Mol. Struct.* **2014**, 1067, 243-251.

IF₂₀₁₄ = 1.602, KBN/MNiSW 20

H5. A. Partyka, G. Chłoń-Rzepa, A. Wasik, M. Jastrzębska-Więsek, A. Bucki, M. Kołaczkowski, G. Satała, A.J. Bojarski, A. Wesołowska: Antidepressant- and anxiolytic-like activity of 7-phenyl-piperazynylalkyl-1,3-dimethyl-purine-2,6-dione derivatives with diversified 5-HT_{1A} receptor functional profile. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 212-221.

IF₂₀₁₅ = 2.793, KBN/MNiSW 30

H6. P. Żmudzki, G. Chłoń-Rzepa, A.J. Bojarski, M. Zygmunt, G. Kazek, B. Mordyl, M. Pawłowski: Structure 5-HT receptor affinity relationship in a new group of 7-arylpiperazynylalkyl and 7-tetrahydro-isoquinolinyalkyl derivatives of 8-amino-1,3-dimethyl-1*H*-purine-2,6(3*H*,7*H*)-dione. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2015**, 348, 229-241.

IF₂₀₁₅ = 1.531, KBN/MNiSW 20

H7. G. Chłoń-Rzepa, A. Zagórska, A. Bucki, M. Kołaczkowski, M. Pawłowski, G. Satała, A.J. Bojarski, A. Partyka, A. Wesołowska, E. Pękala, K. Słoczyńska: New arylpiperazynylalkyl derivatives of 8-alkoxy-purine-2,6-dione and dihydro[1,3]oxazolo[2,3-*f*]purinedione targeting the serotonin 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ and dopamine D₂ receptors. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2015**, 348, 242-253.

IF₂₀₁₅ = 1.531, KBN/MNiSW 20

H8. G. Chłoń-Rzepa, A. Bucki, M. Kołaczkowski, A. Partyka, M. Jastrzębska-Więsek, G. Satała, A.J. Bojarski, J. Kalinowska-Tłuścik, G. Kazek, B. Mordyl, M. Głuch-Lutwin A. Wesołowska,: Arylpiperazynylalkyl derivatives of 8-amino-1,3-dimethylpurine-2,6-dione as novel multitarget 5-HT/D receptor agents with potential antipsychotic activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2015**, DOI:10.3109/14756366.2015.1088844.

IF₂₀₁₅ = 2.332, KBN/MNiSW 20

Badania będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego wykonano w następujących ośrodkach badawczych:

Syntezę wszystkich związków opisanych w pracach **H1 – H8** wykonano w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (UJCM).

Badania modelowania molekularnego (prace **H5**, **H7** i **H8**) były prowadzone w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJCM przy użyciu oprogramowania Small-Molecule Drug Discovery Suite (Schrödinger, Inc).

Badania krystalograficzne (prace **H4** i **H8**) zostały wykonane w Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego (UJ).

Badania powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ i D₂ *in vitro* (prace **H1** - **H8**) zostały wykonane w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk (IF PAN) w Krakowie.

Badania profilu funkcjonalnego *in vitro* zostały wykonane w firmie Cerep w Celle l'Evescault we Francji (praca **H7**) oraz w Zakładzie Farmakobiologii UJCM (prace **H6** i **H8**).

Badania farmakologiczne *in vivo* zostały wykonane w Zakładzie Badań Nowych Leków IF PAN (praca **H1**), w Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych Katedry Farmakodynamiki UJCM (praca **H3**) oraz w Zakładzie Farmacji Klinicznej UJCM (prace **H2**, **H4**, **H5**, **H7** i **H8**).

Badania stabilności metabolicznej *in vitro* (praca **H7**) zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJCM.

2.2. PREZENTACJA WYNIKÓW STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

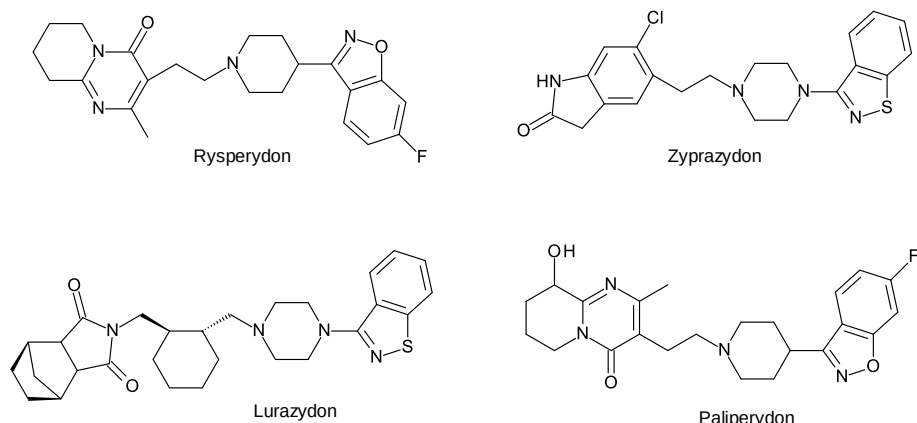
2.2.1. Wprowadzenie oraz cel naukowy prowadzonych badań

Choroby psychiczne, w szczególności schizofrenia, depresja, zespoły lękowe a także zaburzenia psychotyczne, występujące w demencji, stanowią poważny problem medyczny i socjoekonomiczny [1-4]. Według danych epidemiologicznych, liczba chorych dotkniętych tymi zaburzeniami gwałtownie wzrasta. Tylko na schizofrenię, uważaną za najcięższą chorobę psychiczną, cierpi około 1% populacji [5], natomiast rozpowszechnienie demencji ocenia się na około 3,9% populacji w wieku powyżej 60 roku życia [6]. Przyczyn wzrastającej zachorowalności na zaburzenia psychiczne można dopatrywać się m.in. w postępującym starzeniu się populacji ludzkiej, szybkim tempie życia, uwarunkowaniach socjoekonomicznych, wzroście wykrywalności zaburzeń ośrodkowych oraz zwiększającej się świadomości lekarzy i pacjentów. Coraz częściej, obecnie zwraca się uwagę na poprawę jakości życia oraz korektę zaburzeń poznawczych towarzyszących schorzeniom psychotycznym. Stąd obok pozytywnych i negatywnych objawów, występujących np. w przebiegu schizofrenii, bierze się również pod uwagę deficyty poznawcze, a także towarzyszące objawy depresyjne i lękowe [7-9].

W ciągu ponad 50 lat badań, dokonał się istotny postęp w zakresie zrozumienia złożoności etiologii i patofizjologii chorób psychicznych oraz poznania ich patomechanizmu na poziomie molekularnym, w tym roli systemów neuroprzekaźnikowych, głównie serotoninowego, dopaminowego, GABA-ergicznego i systemów aminokwasów pobudzających. Ogólnie uznawany jest fakt, że objawy depresji związane są z zaburzeniami w przewodnictwie monoaminergicznym oraz funkcjonalnym upośledzeniem plastyczności mózgu. Obecne podejście biologii systemów, traktuje schorzenia psychiczne jako choroby złożone a tzw. podejście sieciowe, uwzględnia całościowe spojrzenie na chorobę [10]. Molekularną etiologię tych chorób próbuje się opisać skomplikowaną siecią oddziaływań pomiędzy różnymi białkami i cząsteczkami sygnałowymi [11].

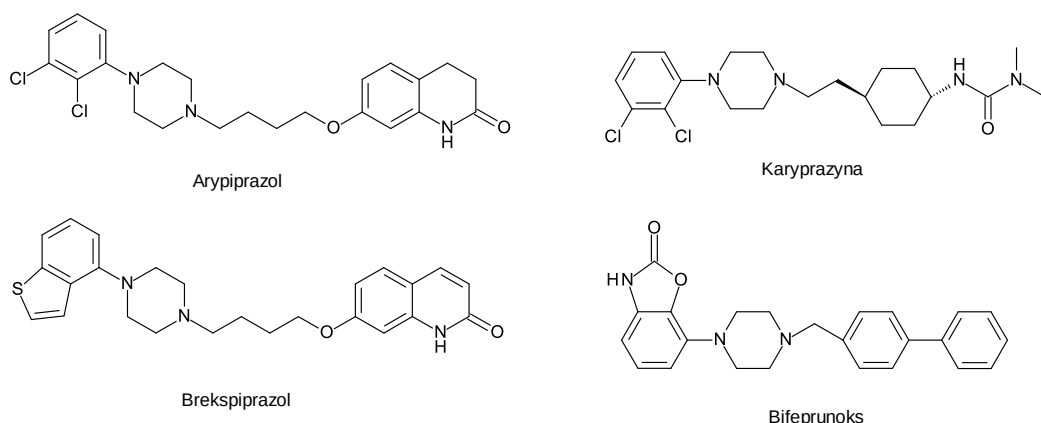
Postęp w zakresie neuropsychofarmakologii, doprowadził do zmiany przyjętej w latach 50-tych ubiegłego wieku, dopaminergicznej koncepcji schizofrenii [12]. Obok neuroleptyków pierwszej generacji, których mechanizm związany jest głównie z blokowaniem receptorów dopaminowych D_2 (chlorpromazyna, haloperidol), efektem pojawienia się teorii neuroprzekaźnikowej, uwzględniającej obok D_2 silniejszy antagonizm $5-HT_{2A}$ receptorowy, było wprowadzenie do terapii atypowych leków przeciwpsychotycznych, takich jak: kłozapina, olanzapina, kwetiapina czy rysperydon, zyprazydon, paliperydon czy luraszadon (**Rycina 1**) [13].

Leki te, z uwagi na wieloreceptorowy mechanizm działania, zmniejszają częstość występowania objawów pozytywnych (urojenia, halucynacje), działają na negatywne objawy schizofrenii oraz zmniejszają ilość niepożądanych efektów pozapiramidowych. Natomiast nie likwidują w pełni zaburzeń poznawczych oraz wykazują negatywne efekty metaboliczne, powodując przyrost masy ciała (olanzapina) [14] lub zwiększając ryzyko arytmii (rysperydon, zyprazydon) [15].



Rycina 1. Wzory strukturalne atypowych leków neuroleptycznych, pochodnych arylopiperazyny lub arylopiperydydy, jako ligandów receptorów monoaminergicznych

Trzecią generację leków przeciwpsychotycznych, stanowią tzw. „stabilizatory dopaminy”, reprezentowane przez aripiprazol oraz znajdujące się w badaniach klinicznych, m.in. brekspiprazol, karyprazynę i bifeprunoks (**Rycina 2**) [16, 17].



Rycina 2. Wzory strukturalne neuroleptyków trzeciej generacji, pochodnych arylopiperazyny, jako ligandów receptorów monoaminergicznych

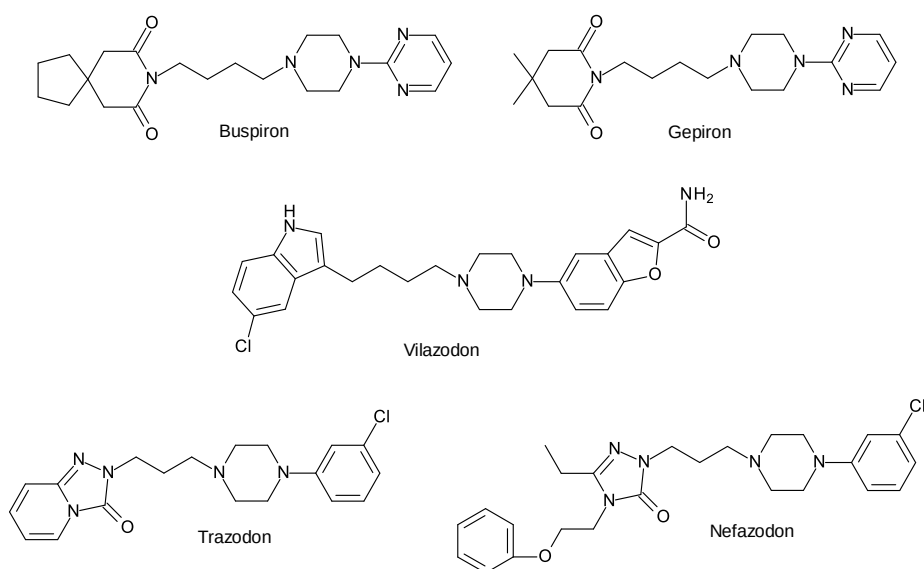
Leki te wykazują profil częściowych agonistów D_2 receptorowych, częściowych agonistów receptorów $5-HT_{1A}$ oraz antagonistów receptorów $5-HT_{2A}$ i $5-HT_7$ [18, 19]. Częściowy agonizm $5-HT_{1A}$ receptorowy rekompensuje efekty lokomotoryczne wywołane blokadą postsynaptycznych receptorów $5-HT_{2A}$ i dodatkowo wpływa na procesy poznawcze. Ten złożony mechanizm, odpowiedzialny jest za korzystne cechy kliniczne atypowych neuroleptyków trzeciej generacji, w schizofrenii z towarzyszącymi objawami depresyjnymi czy lękowymi. Aripiprazol stosowany jest ponadto w leczeniu napadów manii w chorobie dwubiegunowej oraz jako lek wspomagający w terapii depresji [19, 20].

Badania przedkliniczne wskazują na receptory $5-HT_{1A}$, jako cel terapeutyczny dla rozwoju bardziej skutecznych leków przeciwpsychotycznych. Ponadto, znany jest postulat łączący pobudzenie

receptorów 5-HT_{1A} z efektami przeciwlękowymi i przeciwdepresyjnymi, poprawą procesów poznawczych i ograniczeniem objawów negatywnych, także obniżeniem nasilenia objawów pozapiramidowych – w schizofrenii [21, 22]. Dodatkowo, ze względu na obserwowane zaburzenie transmisji glutaminianergicznej w schizofrenii, oraz zmniejszenie uwalniania glutaminianu przez aktywację receptorów 5-HT_{1A} – postsynaptyczny agonizm 5-HT_{1A} receptorowy może wywierać znaczący wpływ na terapeutyczne efekty leków przeciwpsychotycznych [23]. Znane są również korzyści ze sprzężenia agonizmu 5-HT_{1A} receptorowego z antagonizmem 5-HT_{2A} receptorowym [23]. W tym świetle, aktywność antagonistyczna ligandów receptorów 5-HT_{2A} wskazuje na ich potencjalne działanie przeciwdepresyjne i przeciwpsychotyczne, zwłaszcza na tle teorii wieloprzeźnikowej schizofrenii, zwracającej uwagę na silniejszy antagonizm 5-HT_{2A} niż D₂ receptorowy (atypowe neuroleptyki).

Pomimo zwiększającej się częstości występowania depresji i zespołów lękowych, wiedza na temat patomechanizmu tych zaburzeń jest ciągle niewystarczająca. Wyniki badań przedklinicznych, wiążą pobudzenie receptorów 5-HT_{1A} z efektem antydepresyjnym i/lub anksjolitycznym.

Agoniści receptorów 5-HT_{1A}; buspiron i gepiron (**Rycina 3**), poprzez swój mechanizm serotoninergetyczny, mają zastosowanie zarówno w terapii lęku jak i depresji. Analiza związków będących w badaniach klinicznych, wskazuje na zainteresowanie agonistami receptorów 5-HT_{1A} (PRX-00023, OPC 14523) oraz związkami wykazującymi równocześnie cechy agonistów receptorów 5-HT_{1A} i inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny (vilazodon) (**Rycina 3**), jako bardziej efektywnych rozwiązań terapeutycznych w leczeniu depresji, umożliwiających szybszą odpowiedź na zastosowaną terapię.



Rycina 3. Wzory strukturalne leków przeciwdepresyjnych i przeciwlękowych, pochodnych arylopipezyny, jako ligandów receptorów monoaminergicznych

Ośrodkowe receptory 5-HT_{2A} modulują neurotransmisję GABA-ergiczną i glutaminianergiczną [24]. Receptory te zaangażowane są w mechanizm leków stosowanych w chorobach psychicznych m.in., depresji i lęku. Wiele leków antypsychotycznych należy do odwróconych agonistów lub antagonistów tych receptorów [25, 26]. Pochodne arylopiperazyny nefazodon i trazodon (**Rycina 3**) stosowane są, m.in. w leczeniu depresji, a ich działanie przeciwdepresyjne wiąże się, m.in. z antagonizowaniem receptorów 5-HT_{2A} [27, 28].

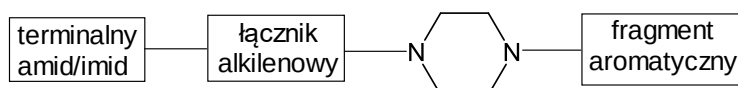
W ostatnich latach, receptory 5-HT₆ i 5-HT₇ pojawiły się, jako nowy, potencjalny cel terapeutyczny dla leków, m.in. o działaniu przeciwdepresyjnym, przeciwlękowym oraz przeciwpsychotycznym [29-34]. Przemawia za tym wyjątkowa lokalizacja receptorów 5-HT₆ w ośrodkowym układzie nerwowym (głównie w prążkowiu, układzie limbicznym, korze mózgu) oraz wysokie powinowactwo do tych miejsc wiążących, atypowych neuroleptyków. Zarówno agoniści jak i antagoniści receptorów 5-HT₆, wykazują aktywność w zwierzęcych modelach chorób psychicznych. Dostępne wyniki badań wskazują, że blokada tego typu receptorów wpływa korzystnie na zaburzenia poznawcze oraz poprawia procesy uczenia się i pamięci. Z kolei, lokalizacja receptorów 5-HT₇ we wzgórzu i podwzgórzu, w szczególności ich zagęszczenie w jądrze nadskrzyżowaniowym, oraz wyniki badań przeprowadzonych z zastosowaniem modelowych antagonistów tych receptorów (SB-269970 i SB-656104), wskazują na udział w regulacji snu, którego zaburzenia są charakterystyczne dla stanów depresyjnych i schizofrenicznych [32, 33]. Wiele atypowych neuroleptyków wykazuje cechy antagonistów receptorów 5-HT₇ a (prawdopodobnie) efekty poprawy terapii przeciwdepresyjnej są efektem blokady receptorów 5-HT₇ [31]. Doniesienia literaturowe wskazują ponadto na potencjalne zaangażowanie receptorów 5-HT₇ w regulację stanów lękowych [32, 33]. Działanie takie wydaje się szczególnie ważne w aspekcie współistnienia zaburzeń lękowych i depresyjnych. Antagoniści receptorów 5-HT₇ wydają się być obiecującą grupą dla opracowania nowej generacji leków przeciwdepresyjnych, przewyższających skutecznością aktualnie dostępne leki, oraz niemających ograniczeń związanych z początkiem działania [34].

W świetle powyższych doniesień, wskazujących na zaangażowanie struktur o właściwościach psychotropowych w transmisję serotonergiczną i dopaminergiczną, poprzez równoczesne powinowactwo do różnych typów receptorów serotoninowych, głównie 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ oraz dopaminowych D₂, poszukiwanie wielofunkcyjnych ligandów tych receptorów jest wciąż aktualne i uzasadnione. Koncepcja ta jest zgodna z aktualnym podejściem w projektowaniu leków, uwzględniających złożoność chorób psychicznych i „przesuwających” proces terapeutyczny w kierunku leków oddziałujących na wiele celów biologicznych (polifarmakologia) [35-38].

Jak przedstawiono na wybranych przykładach (**Rycina 1 - 3**), leki stosowane w terapii schorzeń psychicznych, zaliczane do wielofunkcyjnych ligandów receptorów monoaminergicznych, pod względem strukturalnym należą do pochodnych 1-arylopiperazyny.

Z chemicznego punktu widzenia, pochodne 1-arylopiperazyny są jedną z najszerzej badanych klas ligandów receptorów 5-HT. Modyfikacje strukturalne tego farmakoforu prowadzą do 4-podstawionych pochodnych z giętym łącznikiem alifatycznym o różnej długości (najczęściej 3-5 węglowym) określanych jako długołańcuchowe arylopiperazyny (LCAPs). W strukturze tych ligandów, fragment

arylopiperazyloalkilowy połączony jest z terminalnym fragmentem o charakterze cyklicznego ugrupowania amidowego lub imidowego (**Rycina 4**). Wpływ modyfikacji, polegających na wprowadzeniu różnego rodzaju podstawników do pierścienia fenyłowego, we fragmencie arylopiperazyny, na powinowactwo i selektywność do poszczególnych typów i podtypów receptorów serotoninowych, został dokładnie określony, natomiast rola farmakoforowego, terminalnego fragmentu, nie jest do końca poznana. Na podstawie szerokich badań wiadomo, że w strukturach ligandów receptorów serotoninowych i dopaminowych z grupy analogów LCAPs, terminalny fragment cyklicznego amidu ma wpływ na stabilizację kompleksu ligand-receptor, powinowactwo oraz agonizm/antagonizm receptorowy.



Rycina 4. Ogólna struktura ligandów receptorów serotoninowych z grupy długołańcuchowych arylopiperazyn

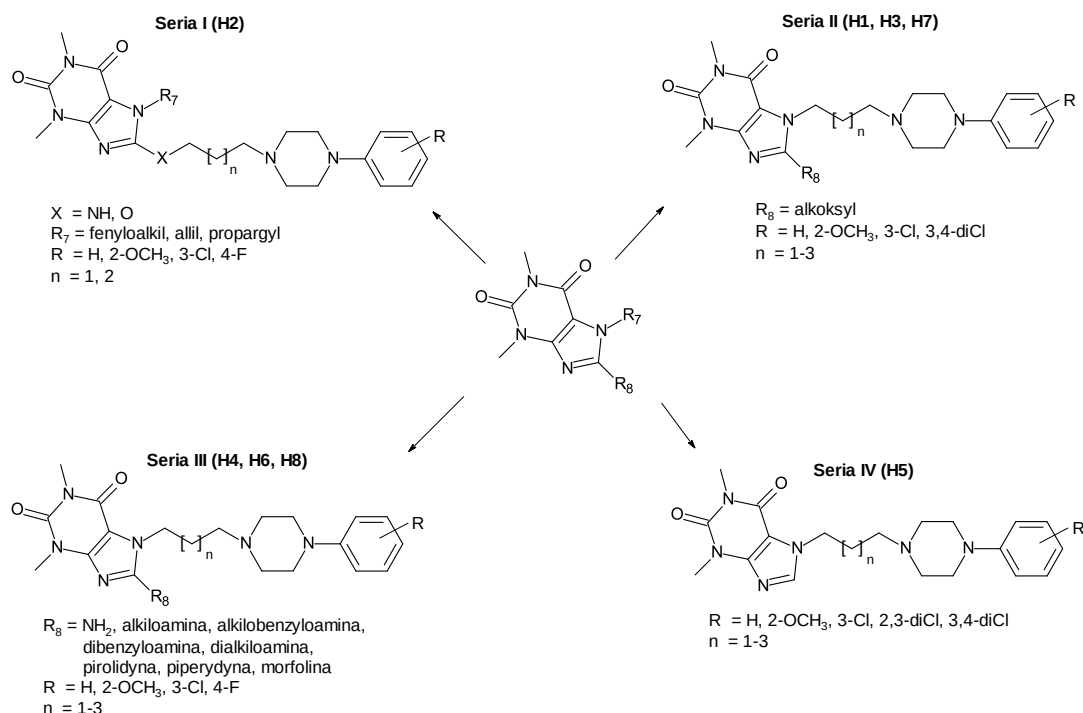
Biorąc pod uwagę budowę ligandów z grupy LCAPs, oraz uzyskane wyniki badań własnych, wskazujące na możliwość znalezienia wśród długołańcuchowych pochodnych arylopiperazyny, zawierających jako terminalny fragment układ 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, ligandów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} [39-41] (publikacje **D6 – D8**), podjęłam szersze badania w tej klasie związków. W tym celu zaprojektowałam bibliotekę nowych, potencjalnych ligandów receptorów monoaminergicznych, serotoninowych (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇) oraz dopaminowych D₂, obejmującą kilka serii pochodnych (**Rycina 5 i 6**).

Założyłam, że w strukturach zaplanowanych związków (seria I – IV; **Rycina 5**) fragment arylopiperazyny, jako element farmakoforowy, będzie odpowiedzialny za wiązanie się cząsteczki z miejscem aktywnym receptora monoaminergicznego (serotoninowego oraz dopaminowego), natomiast 1,3-dimetylopuryno-2,6-dion będzie pełnił rolę terminalnego, cyklicznego amidu.

Farmakoforowy układ 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, pod względem chemicznym jest pochodną 7*H*-imidazo-[4,5-*d*]pirymidyny i stanowi podstawę budowy naturalnych alkaloidów purynowych, teofiliny (1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu) oraz kofeiny (1,3,7-trimetylopuryno-2,6-dionu). Naturalne metyloksantyny, kofeina, słabiej teofilina – pobudzają OUN wykazując właściwości analeptyczne (pobudzenie ośrodków autonomicznych) i psychostymulujące (nasilenie aktywności psychicznej, przyspieszenie i usprawnienie procesów myślowych, zniesienie uczucia zmęczenia i senności). Przedstawione, izomeryczne metyloksantyny, mają możliwość występowania w dwóch formach tautomerycznych, enolowej i ketonowej. Reagując w formie ketonowej, tworzą pochodne o większej trwałości.

W zaplanowanych modyfikacjach, wzięłam pod uwagę fakt, że farmakoforowa struktura 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu daje możliwość wprowadzenia podstawników w pozycje 7 i 8. Jak wynika z szerokiego przeglądu doniesień literaturowych, dotyczących 7,8-dipodstawionych tego układu, obejmującego także badania własne – właściwości i rodzaj podstawników w tych położeniach, mogą prowadzić do pochodnych o ukierunkowanej aktywności biologicznej [39-47] (publikacje **D6-D12, D17, D20**).

Zaplanowane modyfikacje polegały na wprowadzeniu farmakoforowego fragmentu długołańcuchowej arylopiperazyny w położenie 8 (seria I) lub 7 (seria II – IV) układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (**Rycina 5**).



Rycina 5. Arylopiperazyloalkilowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (serie I – IV), otrzymane przez wprowadzenie podstawników w pozycje 7 i/lub 8, będące przedmiotem prac **H1 – H8**, stanowiących podstawę habilitacji

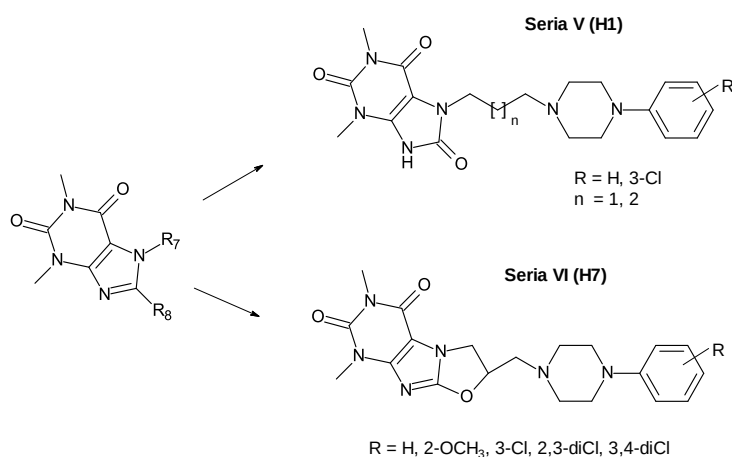
Mając na uwadze wpływ cyklicznego amidu na stabilizację kompleksu ligand-receptor, powinowactwo oraz agonizm/antagonizm receptorowy, w strukturach ligandów receptorów serotoninowych i dopaminowych z grupy analogów LCAPs, w zaplanowanych związkach; właściwości układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, jako terminalnego fragmentu amidowego, były dodatkowo modyfikowane podstawnikami w położeniu 7 (seria I) lub 8 (seria II i III) o zróżnicowanej strukturze i różnych właściwościach lipofilowych i elektro-donorowych w tworzeniu wiązania wodorowego.

Modyfikacje układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, polegały na wprowadzeniu dodatkowo w położenie 7 (seria I) lub 8 (serie II i III) zróżnicowanych strukturalnie ugrupowań; aryloalkilowych, nienasyconych alkilowych, alkoksylowych oraz aminowych o różnym charakterze chemicznym, oraz

właściwościach lipofilowych i donorowo-akceptorowych (**Rycina 5**). Dla oceny roli tego typu podstawników, zaprojektowano także 8 niepodstawione analogi serii II i III stanowiące serię IV (**Rycina 5**).

Układ 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, jako wspólny element strukturalny, połączony został przez łącznik 3-, 4- i 5-węglowy z fragmentem arylopiperazyny, zawierającym zasadowy atom azotu. Modyfikacje w obrębie fragmentu arylopiperazyny, dotyczyły wprowadzenia różnych podstawników do pierścienia fenyłowego (**Rycina 5**). Fragment arylopiperazyny zastał także zastąpiony przez bioizosteryczne ugrupowanie 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (THIQ).

Ponadto, kierunki modyfikacji obejmowały także zastąpienie terminalnego fragmentu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, układem 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu (seria V) z dodatkową funkcją kwasową w postaci ugrupowania enolowego, oraz tricyklicznym układem 1,3-dimetylo-6,7-dihydro [1,3]oksazolo[2,3-*f*]puryno-2,4-dionu, powstałym przez dobudowanie do 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, dodatkowego pierścienia oksazolowego (seria VI) (**Rycina 6**).



Rycina 6. Kierunki modyfikacji układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu w badanych arylopiperazylo-alkilowych pochodnych (serie V i VI), przedstawione w pracach **H1** i **H7**, stanowiących podstawę habilitacji

Założono, że badania powinowactwa receptorowego *in vitro* oraz profilu funkcjonalnego *in vitro* i *in vivo*, zróżnicowanej strukturalnie biblioteki zaplanowanych związków, określa wpływ zaproponowanych modyfikacji strukturalnych na powinowactwo oraz aktywność wewnętrzną (agonizm/antagonizm receptorowy), do wykazujących bliską homologię strukturalną, receptorów monoaminergicznych, serotoninowych (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇) oraz dopaminergicznych D₂. Badania receptorowe, wzbogacone o modelowanie molekularne, pozwolą także na wyciągnięcie wniosków dotyczących roli układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu w tworzeniu kompleksów aktywnych ligand-receptor. Natomiast testy behawioralne *in vivo*, dla najaktywniejszych związków, dadzą odpowiedź odnośnie ich profilu aktywności psychotropowej tj. potencjalnych właściwości przeciwdepresyjnych, przeciwlękowych oraz przeciwpowietecznych, co w perspektywie może dać szansę na znalezienie, wśród nowych związków, skutecznych leków psychotropowych i/lub substancji narzędziowych.

Zaprojektowane serie I – VI (**Rycina 5 i 6**), obejmujące łącznie **169 związków**, stały się przedmiotem szerokich, multidyscyplinarnych badań chemiczno-farmakologicznych przedstawionych w pracach **H1 – H8**, będących podstawą habilitacji i omówionych w podrozdziałach 2.2.2. – 2.2.8.

Prowadzone badania były związane z realizacją w latach 2009-2013, projektów badawczych finansowanych przez KBN/MNiSW/NCN, pt. „Poszukiwanie nowych związków biologicznie aktywnych o potencjalnym działaniu psychotropowym w grupie ligandów receptorów monoaminergicznych” oraz „Poszukiwanie związków biologicznie aktywnych wśród ligandów receptorów serotoninowych, szczególnie 5-HT₇ i dopaminowych, o potencjalnym działaniu psychotropowym”, w których brałam udział, jako wykonawca oraz główny wykonawca.

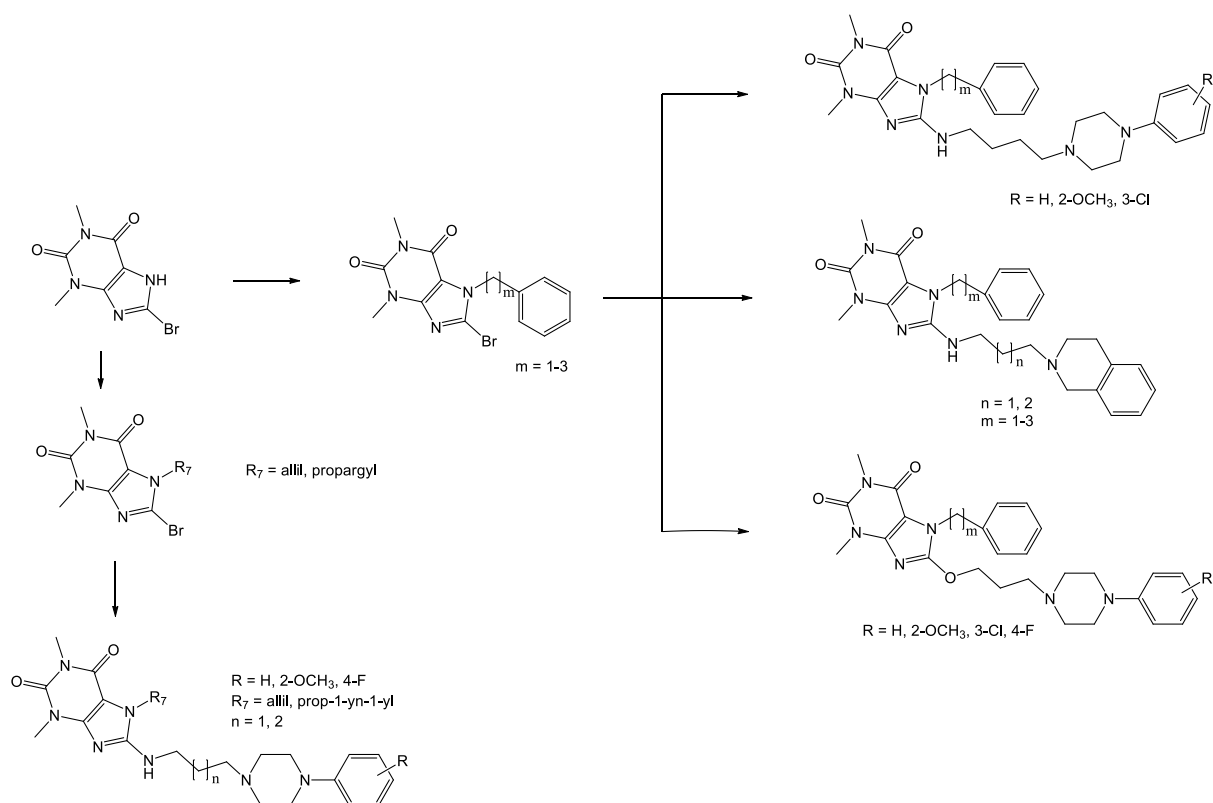
2.2.2. Charakterystyka chemiczno-farmakologiczna 8-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, z podstawnikami o charakterze lipofilowym w położeniu 7, jako wieloreceptorowych ligandów 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇

Przesłanką skłaniającą do podjęcia badań w grupie 8-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu były prowadzone przeze mnie, wcześniejsze badania serii 8-arylopiperazynyloalkiloaminowych pochodnych z podstawnikami aryloalkilowymi w położeniu 7 tego układu [40, 41] (publikacje **D7**, **D8**). W grupie tej uzyskano ligandy receptorów 5-HT_{1A} o znaczącym powinowactwie (K_i = 8-50 nM), wykazujące w modelach zwierzęcych *in vivo* cechy postsynaptycznych antagonistów tych receptorów [40] (publikacja **D7**). Ponadto, związki tej serii charakteryzowały się umiarkowanym powinowactwem do receptorów 5-HT_{2A} (K_i = 115-550 nM). Analiza zależności struktura-aktywność, wykazała korzystny wpływ podstawnika aryloalkilowego o podwyższonej aromatyczności i lipofilowości w położeniu 7 układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, na powinowactwo do badanych receptorów w porównaniu do ich 7 podstawionych analogów z ugrupowaniem alkilowym lub o charakterze estrów kwasów alifatycznych [39] (publikacja **D6**).

Celem przedstawionych w **pracy H2** badań chemiczno-farmakologicznych była zaprojektowana seria I (**Rycina 5**) obejmująca **28 pochodnych**, jako potencjalnych ligandów receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5HT₆ i 5HT₇ o przewidywanej aktywności psychotropowej. Pod względem strukturalnym były to 8-arylopiperazynyloalkiloaminowe, 8-tetrahydroizochinolinyloalkiloaminowe oraz 8-arylopiperazynylopropoksyłowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu z podstawnikami o wysokiej lipofilowości i gęstości elektronowej w położeniu 7. W celu zwiększenia aktywności receptorowej w porównaniu do badanych wcześniej 8-arylopiperazynylopropyloaminowych pochodnych, wydłużono łącznik alkilenowy pomiędzy układem 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu i fragmentem arylopiperazyny – do tetrametylenowego. Modyfikowano także podstawnik w położeniu 7, wprowadzając oprócz podstawnika aryloalkilowego, o różnej długości łańcucha alkilowego, także mniejsze sterycznie ugrupowania π elektronowe (allil, prop-1-yn-1-yl), różniące się swobodą konformacyjną oraz hybrydyzacją atomu węgla (sp^2 i sp). Kolejną modyfikacją było zastąpienie podstawnika 8-arylopiperazynyloalkiloaminowego w położeniu 8, fragmentem arylopiperazynylopropoksyłowym. Modyfikacja ta miała dać odpowiedź; w jaki sposób zastąpienie grupy aminowej o właściwościach donorowo-akceptorowych, w tworzeniu wiązania wodorowego, atomem tlenu pełniącego rolę akceptora tego wiązania, wpłynie na powinowactwo i selektywność do badanych receptorów. Należy nadmienić, że obecność w strukturze tych związków ugrupowania propoksyłowego, nawiązuje do struktury aripiprazolu, atypowego neuroleptyka trzeciej generacji, z komponentą przeciwlękową i przeciwdepresyjną (**Rycina 2**). Analizę zależności struktura-aktywność prowadzono także w obrębie fragmentu arylopiperazynyloвого, zastępując go 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliną (THIQ). Fragment ten jest znanym z doniesień literaturowych bioizosterem 1-arylopiperazyny [48].

Wieloletową syntezę zaprojektowanej serii I przedstawiono na **Rycinie 7**. Związek wyjściowy do syntezy serii stanowił 8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dion, otrzymany w wyniku oksydacyjnego bromowania 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu [49], który alkilowano przy użyciu dwukrotnego nadmiaru molowego, odpowiedniego halogenku aryloalkilowego (bromku allilu lub bromku propargylu),

w układzie dwufazowym ciecz-ciało stałe, w środowisku acetonu, w obecności TEBA (chlorek *N,N,N*-trietylobenzyloamoniowy) jako katalizatora międzyfazowego oraz bezwodnego K_2CO_3 jako akceptora wydzielającego się chloro- lub bromowodoru; według metody literaturowej [50], otrzymując odpowiednie 7 podstawione pochodne. Pierwszorzędowe aminy: arylopiperazynyloalkiloaminy oraz tetrahydroizochinolinyloalkiloaminy, jako substraty do syntezy zaplanowanych związków otrzymano wg metody Gabriela z niewielkimi modyfikacjami [40; (**D7**), 51]. 7-Aryloalkilowe, 7-allilowe oraz 7-prop-1-yn-1-yłowe pochodne 1,3-dimetylo-8-[4-(arylopiperazyn-1-ylo)alkiloamino]puryno-2,6-dionu oraz 1,3-dimetylo-8-[(1,2,3,4-tetrahydroizocholin-2-ylo)alkiloamino]puryno-2,6-dionu uzyskano w wyniku nukleofilowej substytucji bromu w 8-bromo-7-aryloalkilowych, 7-allilowych lub 7-prop-2-yn-1-yłowych (propargylowych) pochodnych z 10% molowym nadmiarem odpowiedniej pierwszorzędowej aminy. Substraty ogrzewano w temperaturze wrzenia w środowisku butan-1-olu w obecności bezwodnego K_2CO_3 . W opisanych warunkach, w przypadku pochodnych z podstawnikiem prop-2-yn-1-yłowym (propargylowym) ma miejsce przegrupowanie sigmatropowe, prowadzące do uzyskania, w miejsce zaprojektowanych pochodnych, związków zawierających w położeniu 7 ugrupowanie prop-1-yn-1-yłowe. Serię 7-aryloalkilo-8-(4-arylopiperazyn-1-ylo)propoksylowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu otrzymano przez ogrzewanie w toluenie 7-aryloalkilo-8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionów z 10% nadmiarem uzyskanych uprzednio odpowiednich 3-[(4-arylo)piperazyn-1-ylo]propan-1-oli [52], w obecności nadmiaru sproszkowanego KOH.



Rycina 7. Etapy syntezy 8-arylopiperazynyloalkilowych oraz 8-tetrahydroizochinolinyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu - seria I

Analiza zależności struktura-aktywność receptorowa wykazała, że wydłużenie łącznika alkilenowego do 4 węglowego, doprowadziło do uzyskania, zwłaszcza wśród 2-metoksyfenylo-piperazyńowych pochodnych (**18**, **19** i **20**), silnych dualnych ligandów 5-HT_{1A}/5HT₇ (5-HT_{1A}: K_i = 4,3-4,4 nM; 5HT₇: K_i = 10-40 nM) (Tab. 1, praca **H2**) o umiarkowanym powinowactwie do receptorów 5-HT_{2A}. Z kolei 3-chlorofenylopiperazyńlobutyloaminowa pochodna z podstawnikiem benzylovym w położeniu 7 (**21**), okazała się mieszanym ligandem 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ (Tab.1, praca **H2**). Zastąpienie podstawnika aryloalkilowego w pozycji 7 ugrupowaniem alilowym, zachowało powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}, w przeciwieństwie do sztywnych analogów prop-1-yn-1-ylowych. Na uwagę zasługuje fakt, że w badanej serii, niektóre pochodne 3-chlorofenylo-piperazyńowe i 4-fluorofenylopiperazyńowe wykazały także powinowactwo do receptorów 5-HT₆ (K_i = 98-958 nM). Modyfikacja polegająca na zastąpieniu fragmentu 2-metoksyfenylopiperazyń bioizosterycznym ugrupowaniem THIQ nie wpłynęła na zwiększenie powinowactwa do badanych receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i 5-HT₇ (Tab.1, praca **H2**).

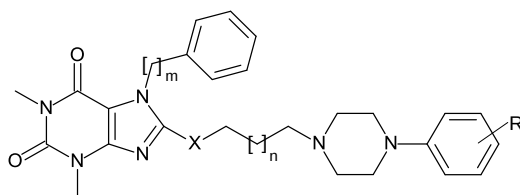
W celu oceny profilu funkcjonalnego do badań farmakologicznych *in vivo* zostały wybrane związki **21** oraz **42**. Związek **21**, o właściwościach wieloreceptorowego liganda 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ (Tab. 1, praca **H2**), w modelach zwierzęcych *in vivo* (test opadnięcia dolnej wargi szczura oraz test potrząsania głową u myszy), wykazał cechy słabego postsynaptycznego agonisty receptorów 5-HT_{1A} i post-synaptycznego antagonisty 5-HT_{2A} receptorowego. Natomiast związek **42**, dualny ligand 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}, okazał się postsynaptycznym antagonistą tych receptorów (Tab. 4, praca **H2**).

Związek **21** w testach behawioralnych; depresji (test wymuszonego pływania) i lęku (test czterech płytek), wykazał istotne działanie przeciwdepresyjne i przeciwłękowe. W dawkach 20 i 30 mg/kg istotnie skracał czas bezruchu myszy (o 33%), oraz w dawce 20 mg/kg zwiększał liczbę karanych przejść myszy (o 59%) w teście czterech płytek (Tab. 5 i 6, praca **H2**). W porównaniu do związków referencyjnych tj. imipraminy i diazepam, silniej hamował ruchliwość spontaniczną u myszy, tym samym wykazał silniejsze działanie sedatywne.

Natomiast związek **42** o właściwościach dualnego liganda 5-HT_{1A}/5HT₇ receptorowego (K_i = 34 nM oraz 63 nM), wykazujący umiarkowane powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A} i 5HT₆ oraz odmienny profil funkcjonalny (postsynaptyczny antagonist receptorów 5HT_{1A} i 5-HT_{2A}), w dawce 20 mg/kg nieznacznie skracał czas bezruchu myszy w teście wymuszonego pływania oraz nie wykazał działania w teście czterech płytek. Brak istotnej aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej w testach behawioralnych może być spowodowany odmiennym profilem funkcjonalnym w stosunku do receptorów 5-HT_{1A} w porównaniu do aktywnego połączenia **21**.

Podsumowanie rezultatów przeprowadzonych badań farmakologicznych przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Profil funkcjonalny oraz aktywność psychotropowa wyselekcjonowanych związków **21** i **42** serii I.

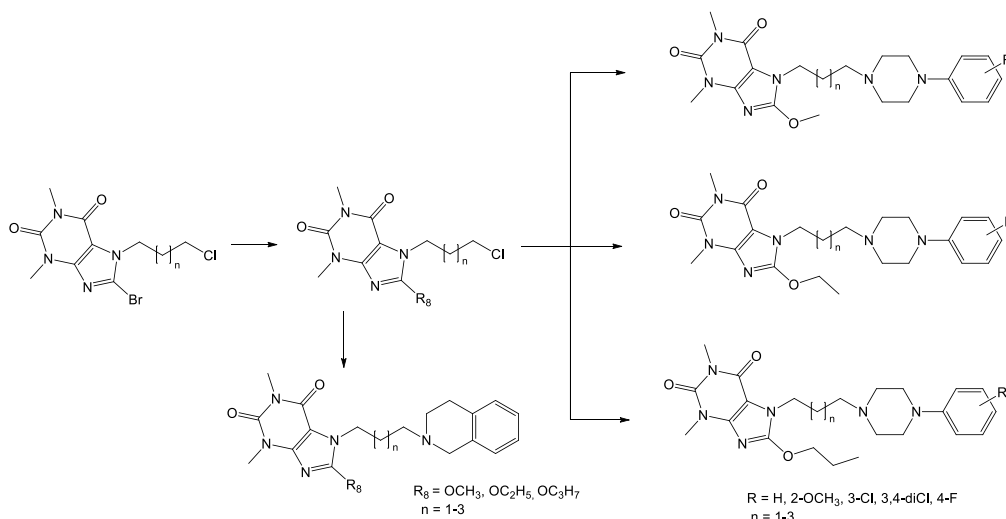


Nr	R	X	m	n	Profil funkcjonalny		Aktywność psychotropowa
					5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	
21	3-Cl	NH	1	2	agonista postsynaptyczny	antagonista postsynaptyczny	przeciwłękowa przeciwdepresyjna
42	4-F	O	3	1	antagonista postsynaptyczny	antagonista postsynaptyczny	

2.2.3. Wielofunkcyjne ligandy receptorów 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ oraz dopaminowych D₂ w grupie 7-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, ze zróżnicowanymi podstawnikami alkoksylowymi w położeniu 8 – profil funkcjonalny oraz aktywność psychotropowa

Badania nad syntezą i analizą zależności struktura-aktywność receptorowa w grupie długołańcuchowych arylopiperazyn, zawierających jako fragment terminalny układ 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, prowadziłam także w serii II zaprojektowanych arylopiperazynyloalkilowych oraz tetrahydroizochinolinylloalkilowych pochodnych tego układu, zawierających w położeniu 8 podstawnik alkoksylowy o różnej długości łańcucha alifatycznego. Seria ta obejmowała bibliotekę **31 związków** opisanych w **pracach H1, H3 i H7**. W porównaniu do badanych pochodnych przedstawionych w pracy **H2**, modyfikacje strukturalne polegały na przesunięciu fragmentu arylopiperazynyloalkilowego z położenia 8 w pozycję 7 układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, natomiast wprowadzony w położenie 8 fragment alkoksylowy (metoksylowy, etoksylowy i propoksylowy) o zróżnicowanych właściwościach lipofilowych, stanowił o podobieństwie do fragmentu propoksylowego, występującego w strukturze 8-arylopiperazynylopropoksylowych pochodnych 7-aryloalkilopuryno-2,6-dionu (praca **H2**). Wpływ przedstawionych, strukturalnych modyfikacji w kompleksie fragmentu cyklicznego amidu, na powinowactwo do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ oraz dopaminowych D₂, był analizowany dla klasycznych arylopiperazyn z niepodstawionym lub podstawionym (2-OCH₃, 3-Cl, 3,4-diCl, 4-F) pierścieniem fenylowym oraz dla pochodnych THIQ. W badanych połączeniach, łącznik alifatyczny pomiędzy układem 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu i grupą aminową był 3-5 węglowy.

Zaplanowane związki otrzymałam w wyniku syntezy przedstawionej na **Rycinie 8**. Otrzymane opisaną wcześniej metodą [53] 7- ω -chloroalkilo-8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-diony stanowiły substraty do uzyskania odpowiednich 7- ω -chloroalkilo-8-alkoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionów. W syntezie tej zastosowałam, opracowaną przeze mnie, metodę polegającą na preferencyjnej substytucji nukleofilowej bromu w położeniu 8 w odpowiednim 7- ω -chloroalkilo-8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionie z zachowaniem fragmentu chloroalkilowego w położeniu 7. Substraty ogrzewano w temp. wrzenia przez 6 godzin z odpowiednim alkoholem sodu, tj. metanolanem, etanolanem i propoksylenem sodu w środowisku odpowiedniego alkoholu. W ten sposób otrzymane związki pośrednie, w reakcji substytucji nukleofilowej przy użyciu 1-fenylopiperazyny, jej pochodnych oraz 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny, prowadziły do otrzymania zaprojektowanych, finalnych połączeń (prace **H1, H3 i H7**). Reakcję prowadzono ogrzewając substraty w temp. wrzenia przez 30 godzin w obecności K₂CO₃ w środowisku propan-1-olu. Z uwagi na mniejszą trwałość, w środowisku propan-1-olu pochodnych 8-metoksylowych, w porównaniu do ich wyższych homologów, reakcję otrzymywania 8-metoksylowych pochodnych prowadzono w bezwodnym toluenie (praca **H7**). Przemiany pochodnych 8-metoksylowych w propan-1-olu prowadziły do odpowiednich pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu (rozdział 2.2.6.)



Rycina 8. Etapy syntezy 7-arylopipezynyloalkilowych i 7-tetrahydroizochinolinylloalkilowych pochodnych 8-alkoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu – seria II

Na podstawie wyników badań radioizotopowych *in vitro* stwierdzono, że przesunięcie fragmentu arylopipezynyloalkilowego z położenia 8 w pozycję 7 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, daje związki zachowujące silne powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} ($K_i = 4\text{-}19 \text{ nM}$) i równocześnie powoduje zwiększenie powinowactwa do receptorów 5-HT_{2A} ($K_i = 15\text{-}28 \text{ nM}$) (Tab. 1, praca **H1** oraz Tab. 1, praca **H7**). Wykazano silny, korzystny wpływ podstawnika alkoksylowego w położeniu 8, w porównaniu do pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu, zawierających w tym położeniu grupę karbonylową, oraz do tricyklicznego układu dihydrooksazolo[2,3-f]purynodionu, w którym grupa metoksyłowa wbudowana jest w heterocykliczny układ oksazolu (zależności te opisano w rozdziale 2.2.6.). Natomiast wpływ długości łańcucha alifatycznego w podstawniku alkoksylowym o zróżnicowanych właściwościach lipofilowych, na powinowactwo do badanych receptorów nie był jednoznacznie określony. W przedstawionej serii związków, szczególnie interesujące w aspekcie aktywności do badanych receptorów, były pochodne zawierające 4 lub 5 węglowy fragment alkilenowy. Wydłużenie łącznika z 3- do 4- i 5-węglowego, było szczególnie korzystne dla powinowactwa do receptorów 5-HT₇ oraz D₂ dopaminowych. Również zastąpienie fragmentu arylopipezyny przez bioizosteryczne ugrupowanie tetrahydroizochinolinowe, zwiększyło powinowactwo do receptorów 5-HT₇ (Tab. 1, praca **H1** oraz Tab. 1, praca **H7**). Wprowadzenie grupy metoksyłowej w położenie 2 pierścienia fenyłowego, zwiększyło powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}, w porównaniu do ich analogów niepodstawionych, natomiast podstawienie elektroakceptorowego atomu chloru w położenie 3 było preferowane dla wiązania się z receptorami 5-HT_{2A}. Pochodne z niepodstawionym pierścieniem fenyłowym zachowały silne powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A}. Wprowadzenie fragmentu 3,4-dichlorofenyłowego było natomiast szczególnie korzystne dla powinowactwa do receptorów 5-HT₆. Spośród badanych analogów, tylko pochodne z podstawnikiem 3,4-diCl w pierścieniu fenyłowym wykazały umiarkowane powinowactwo do tego typu receptorów ($K_i = 262\text{-}719 \text{ nM}$; Tab. 1, praca **H7**). W badanej serii II uzyskano dualne ligandy receptorów 5-HT_{1A}/

5-HT₇ (**17**, praca **H1** oraz **14**, praca **H7**), dualne ligandy 5-HT_{1A}/5-HT_{2A} (**21**, praca **H1**), wieloreceptorowe ligandy 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ (**18**, praca **H1**), wieloreceptorowe ligandy 5-HT_{1A}/5-HT₇/D₂ (**15**, **20**, **23**, praca **H7**), a także selektywne ligandy 5-HT_{2A} (**12**, **13**, **15**, **19**, praca **H1**). Przedstawione, wieloreceptorowe ligandy (**17**, **18**, **20**, **21**) miały silniejsze lub zbliżone do buspironu powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i równocześnie silniejsze od buspironu powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A} i 5-HT₇. (Tab. 1, praca **H1**).

Badane związki **17** i **21** (praca **H1**) wykazały w testach funkcjonalnych *in vivo* (hipotermia u myszy oraz test opadnięcia dolnej wargi szczura), różną aktywność wewnętrzną w stosunku do receptorów 5-HT_{1A}. Związek **17** o strukturze 7-{4-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-yl]butylo}-8-etoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu miał cechy pre- i post-synaptycznego agonisty receptorów 5-HT_{1A}, natomiast jego 3-chlorofenyłowy analog z podstawnikiem propoksyłowym w położeniu 8 (**21**) został sklasyfikowany jako częściowy, postsynaptyczny agonista tych receptorów (praca **H1**). Z kolei 8-alkoksyłowe pochodne 7-(3-chlorofenylo)piperazynylopropylo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (**4** i **5**) jako ligandy receptorów 5-HT_{2A} (Tab. 1, praca **H3**), znacząco zapobiegały wzrostowi ciśnienia krwi u szczurów wywołanego podaniem serotoniny, w drugiej fazie testu – co wskazywało na ich efekt antagonistyczny w stosunku do receptorów 5-HT_{2A} (praca **H3**).

W grupie 7-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 8-metoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu; związek z podstawnikiem 2-metoksyfenyłowym (**15**, praca **H7**) w badaniach funkcjonalnych *in vitro*, określających wpływ badanych związków na poziom wewnątrzkomórkowego cAMP, wykazał profil silnego antagonisty receptorów 5-HT_{1A} i D₂ oraz słabego antagonisty 5-HT₇ receptorowego, natomiast jego analog 3-chlorofenyłowy (**16**) cechy ago/antagonisty receptorów 5-HT_{1A} oraz słabego antagonisty 5-HT_{2A} i 5-HT₇ (Tab. 2, praca **H7**).

Zarówno wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} oraz 5-HT₇, jak i przedstawiony profil funkcjonalny ligandów z serii II, skłaniał do podjęcia oceny ich potencjalnego działania psychotropowego *in vivo*. Do badań w tym kierunku wybranych zostało łącznie 6 związków. Związek **17** o właściwościach dualnego liganda 5-HT_{1A}/5-HT₇ (K_i = 11 nM i K_i = 54 nM) i profilu agonisty 5-HT_{1A} receptorowego, wykazał w dawkach 5 i 10 mg/kg znaczący efekt przeciwdepresyjny w teście wymuszonego pływania u myszy (Tab. 6B, praca **H1**) oraz działanie przeciwlękowe w dawce 5 mg/kg, zwiększając liczbę karanych przejść myszy o 70% (Tab. 6A, praca **H1**). Brak aktywności w wyższych dawkach może być wynikiem silniejszego działania sedatywnego badanego związku w porównaniu do związków referencyjnych tj. imipraminy i diazepamu.

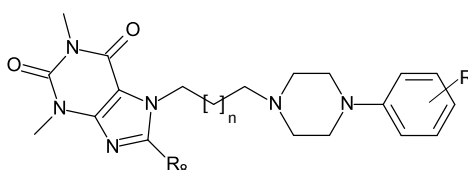
Badane 8-alkoksyłowe pochodne z podstawnikiem 7-(3-chlorofenylo)piperazynylopropylenowym **4** i **5** (praca **H3**) o właściwościach selektywnych ligandów 5-HT_{2A} i cechach antagonistów tych receptorów, wykazały działanie przeciwdepresyjne. W dawkach 10, 20 i 30 mg/kg istotnie skracały czas bezruchu myszy o 33-48% (Tab. 2, praca **H3**). Działanie to było silniejsze od mianseryny, użytej jako związek referencyjny.

W grupie 8-metoksyłowych analogów; związek **15** (Tab.1, praca **H7**) o właściwościach wieloreceptorowego liganda 5-HT_{1A}/5-HT₇/D₂ (K_i = 4 nM, K_i = 12 nM, K_i = 24 nM) oraz profilu funkcjonalnym antagonisty tych receptorów, nie wykazał aktywności w zwierzęcych modelach lęku i depresji. Badany w kierunku aktywności przeciwpyschotycznej nie obniżał hiperaktywności u myszy

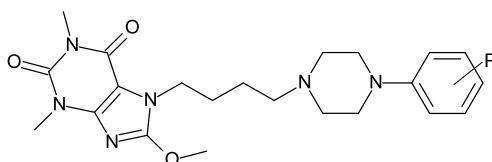
wywołanej d-amfetaminą, nie wykazując tym samym działania przeciwpsychotycznego. Brak aktywności psychotropowej związku **15** w porównaniu do jego analogu 8-etoksyowego (**17**, praca **H1**) o podobnym powinowactwie, ale odmiennym profilu funkcjonalnym (agonista 5-HT_{1A}) wskazuje, że rodzaj podstawnika alkoksylowego w położeniu 8 może wpływać na agonizm/antagonizm receptorowy oraz właściwości psychotropowe. Jak wykazały badania stabilności metabolicznej związku **15** z użyciem mikrosomów wątrobowych myszy, brak aktywności *in vivo* związku **15** może być spowodowany silnym efektem I-go przejścia (praca **H7**)

Podsumowanie rezultatów przeprowadzonych badań farmakologicznych przedstawiono w **Tabeli 2**.

Tabela 2. Profil funkcjonalny oraz aktywność psychotropowa wyselekcjonowanych związków **4**, **5** oraz **15-17** i **21** serii II.



Nr	R ₈	R	n	Profil funkcjonalny		Aktywność psychotropowa
				5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	
4	OC ₂ H ₅	3-Cl	1		antagonista	przeciwdepresyjna
5	OC ₃ H ₇	3-Cl	1		antagonista	przeciwdepresyjna
17	OC ₂ H ₅	2-OCH ₃	2	agonista pre- i post-synaptyczny		przeciwdepresyjna
21	OC ₃ H ₇	3-Cl	2	częściowy agonista postsynaptyczny		przeciwłękowa



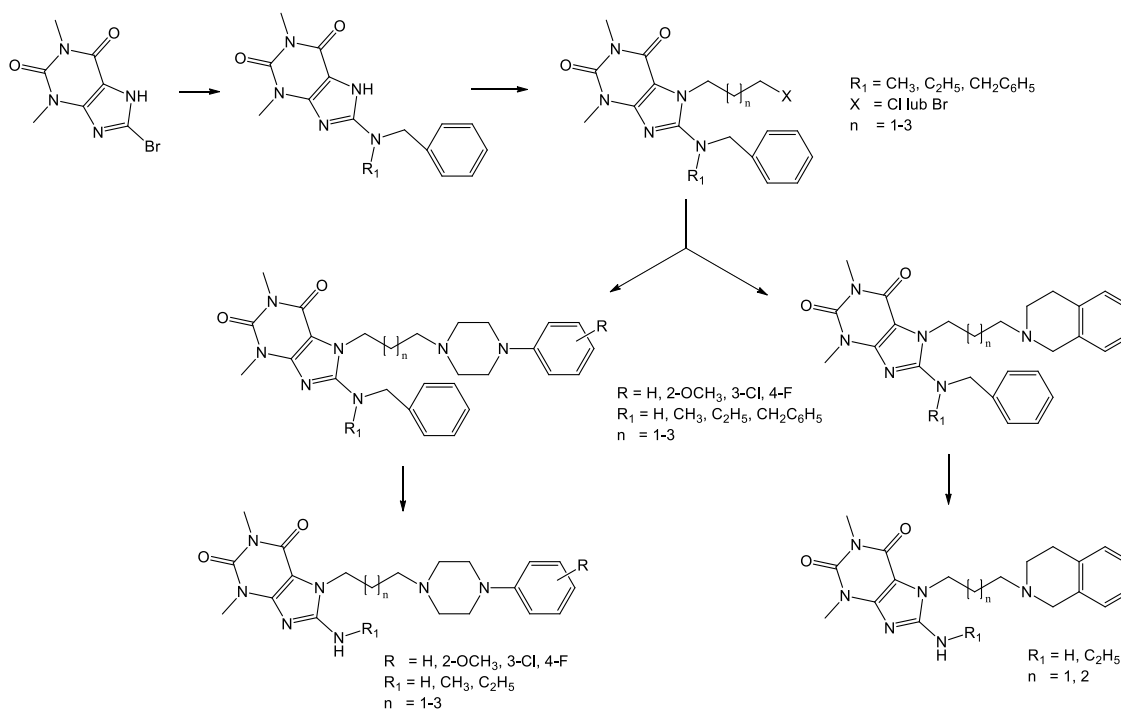
Nr	R	Profil funkcjonalny			
		5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₇	D ₂
15	2-OCH ₃	antagonista		antagonista	antagonista
16	3-Cl	częściowy agonista	antagonista	antagonista	

2.2.4. Aktywność receptorowa i właściwości psychotropowe 7-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu z alifatycznym, aryloalifatycznym lub cyklicznym ugrupowaniem aminowym w położeniu 8

Mając na uwadze fakt, że (4-arylopiperazyn-1-yl)alkilowe pochodne, zawierające jako fragment cyklicznego amidu układ 8-alkoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, w badaniach *in vitro* wykazały cechy wieloreceptorowych ligandów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇ i D₂ receptorowych oraz aktywność psychotropową w testach *in vivo*, postanowiłam prowadzić dalsze badania nad zależnością pomiędzy strukturą a aktywnością receptorową w tej klasie związków. Przedstawione w pracy **H6** badania chemiczno-farmakologiczne, dotyczyły modyfikacji podstawnika w położeniu 8 układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu. W położenie to wprowadzone zostało ugrupowanie I-, II- lub III-rzędowej aminy, pełniące rolę akceptora wiązania wodorowego. Podstawnik aminowy, o różnej lipofilowości i budowie sterycznej, stanowiły ugrupowania: dibenzyloaminowe, *N*-alkilobenzyloaminowe (*N*-metylobenzyloaminowe, *N*-etylobenzyloaminowe), alkiloaminowe (metyloaminowe, etyloaminowe), lub niepodstawiona grupa aminowa.

Ocenę zależności pomiędzy strukturą a powinowactwem receptorowym zaprojektowanych 8-aminowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, prowadzono dla biblioteki **48 związków**, obejmujących pochodne arylopiperazyny lub 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny z łącznikiem 3-5 węglowym, stanowiące serię III A (**Rycina 5**).

Zaprojektowane związki otrzymano w wyniku wieloetapowej syntezy przedstawionej na **Rycinie 9**.



Rycina 9. Etapy syntezy 7-arylopiperazynyloalkilowych oraz 7-tetrahydroizochinolinyloalkilowych pochodnych 8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu – seria III A

Wyjściowe 8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-diony uzyskano w reakcji 8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu z odpowiednią aminą (alkilobenzylaminą lub dibenzylaminą) przez ogrzewanie substratów przez 20 godzin w środowisku 2-(2-metoksyetoksy)etanolu (MeDigolu) według metody opisanej w literaturze [54]. Związki te alkilowano następnie nadmiarem odpowiedniego dihalogenoalkanu w układzie dwufazowym w obecności K_2CO_3 oraz TEBA w środowisku acetonu, otrzymując odpowiednie 7- ω -halogenoalkilo-8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-diony (praca **H6**). Zaprojektowane 7-arylopiperazyloalkilowe oraz 7-tetrahydroizochinolinoalkilowe pochodne 8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, otrzymano w reakcji substytucji nukleofilowej 7- ω -halogenoalkilo-8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionów z równomolową ilością odpowiedniej arylopiperazyny lub THIQ, ogrzewając substraty przez 40 godzin w środowisku propan-1-olu i w obecności K_2CO_3 jako czynnika wiążącego wydzielający się halogenowodór (praca **H6**).

Badania powinowactwa receptorowego *in vitro* pozwoliły zidentyfikować związki będące ligandami receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} lub 5-HT₇ a także dualnymi ligandami 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptorowymi (Tab. 1, praca **H6**). Analiza zależności struktura-aktywność wykazała, że powinowactwo do badanych receptorów uzależnione jest od rodzaju podstawnika w położeniu 8. Najbardziej preferowanym podstawnikiem było ugrupowanie *N*-etylobenzylaminowe. Zmniejszenie lipofilowości i wielkości podstawnika, zmniejszało powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i 5-HT₇ w następujący sposób: *N*-metylobenzylamina > metylamina > etylamina > amina $\approx$ dibenzylamina. Wyjątek stanowiły pochodne 8-dibenzylaminowe, które pomimo wysokiej lipofilowości, wykazywały niskie powinowactwo. Tego typu obserwacja wskazuje na fakt, że nie tylko lipofilowość, ale również wielkość podstawnika, odgrywają istotną rolę w wiązaniu się z badanymi receptorami. Wpływ preferowanych, lipofilowych podstawników np. *N*-metylobenzylaminowego i *N*-etylobenzylaminowego w położeniu 8 układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu na powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇, był szczególnie widoczny w przypadku pochodnych tetrahydroizochinolino-*butylo*wych. W badanej serii związków, wydłużenie łącznika alkilenowego do 4 i 5 atomów węgla, zwiększało powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇. Wpływ sposobu podstawienia w pierścieniu aromatycznym na powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} był charakterystyczny dla pochodnych arylopiperazyn (2-metoksyfenylo)piperazyna > (3-chlorofenylo)piperazyna > (4-fluorofenylo)piperazyna). W przypadku receptorów 5-HT_{2A} większe powinowactwo wykazywały analogi z podstawnikami elektroakceptorowymi (3-chlorofenylowym i 4-fluorofenylowym). Wyselekcjonowane, arylopiperazyloalkilowe pochodne badanej serii III A, ze zróżnicowanymi podstawnikami w położeniu 8, wykazały w badaniach funkcjonalnych *in vivo*, cechy antagonistów tych receptorów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że będące przedmiotem pracy **H1**, pochodne zawierające w tym położeniu grupę alkoksylową o różnej długości łańcucha alkilowego (etoksylową i propoksylową), zostały sklasyfikowane jako agoniści lub częściowi agoniści receptorów 5-HT_{1A}, co może sugerować wpływ ugrupowań donorowych lub akceptorowo-donorowych w tworzeniu wiązania wodorowego w układzie 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, jako terminalnego amidu, na aktywność wewnętrzną. Natomiast w badanej serii związków, zastąpienie fragmentu arylopiperazyny ugrupowaniem THIQ, zmienia aktywność wewnętrzną – z antagonisty na częściowego agonistę receptorów 5-HT_{1A} (Tab. 3, praca **H6**).

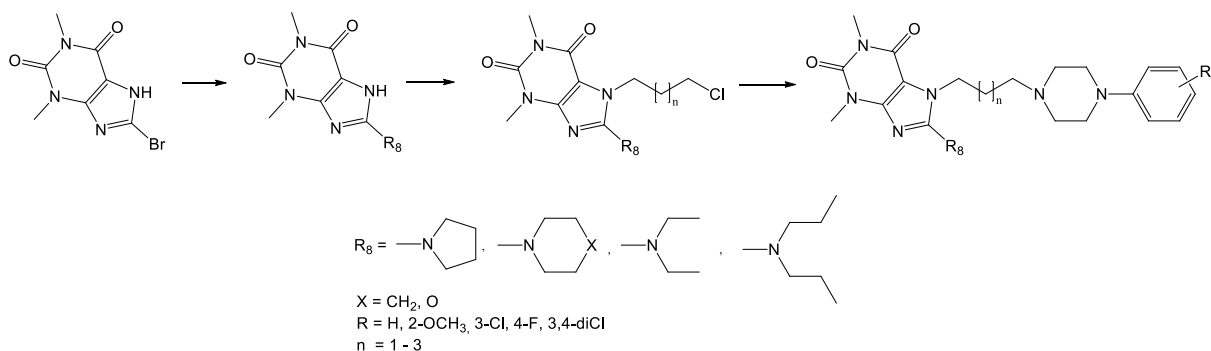
Poszukiwanie związków o wieloreceptorowym (5-HT/D₂) mechanizmie działania i potencjalnej aktywności psychotropowej, kontynuowano w grupie długołańcuchowych arylopiperazynowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, zawierających w położeniu 8 III-rzędowe ugrupowanie aminowe, spełniające rolę akceptora wiązania wodorowego, które stanowiły cykliczne aminy (pirolidyna, piperydyna, morfolina) lub alifatyczne ugrupowania aminowe (*N,N*-dietyloamina, *N,N*-dipropyloamina) (praca **H8**). Modyfikacje te zaplanowano w oparciu o wyniki badań powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, i 5-HT₇, dla serii pochodnych 8-aminowych, zawierających I-, II- i III-rzędowe ugrupowanie aminowe – alkiloaminowe, alkilobenzylaminowe, dibenzylaminowe, o różnej wielkości i lipofilowości, które wskazały na istotną rolę podstawnika aminowego o zwiększonej lipofilowości dla powinowactwa do badanych receptorów (praca **H6**). Stwierdzono również, że zbyt duży objętościowo podstawnik np. dibenzylaminowy, nie jest preferowany dla wiązania się z tymi typami receptorów. Wykazano również korzystny wpływ III-rzędowego ugrupowania aminowego np. *N*-etylobenzylaminowego dla powinowactwa do badanych receptorów. Potwierdza to fakt, że nie tylko właściwości lipofilowe, ale również steryczne, cyklicznego amidu, odgrywają rolę w modyfikowaniu powinowactwa receptorowego długołańcuchowych arylopiperazyn.

Zaprojektowane modyfikacje, będące przedmiotem **pracy H8** wchodziły w skład serii III B i obejmowały bibliotekę **30 związków**. Stanowiły one kontynuację badań nad zależnością struktura-aktywność receptorowa, w grupie 8-aminowych pochodnych 7-arylopiperazynyloalkilo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, omówionych w pracy **H6**.

Różnice dotyczyły nie tylko lipofilowości ale także swobody konformacyjnej podstawnika w położeniu 8. Podstawniki *N,N*-dietyloaminowe oraz *N,N*-dipropyloaminowe można traktować, w pewnym przybliżeniu, jako otwarte analogi cyklicznej pirolidyny oraz piperydyny. Z kolei układ morfoliny, posiada nie tylko bardziej hydrofilowe właściwości, ale dodatkowy akceptor wiązania wodorowego w postaci atomu tlenu.

W badanej serii, analizę zależności struktura-aktywność prowadzono dla pochodnych ze zróżnicowanym 3-5 węglowym łącznikiem alkilenowym. Fragment arylopiperazyny, analogicznie jak w innych badanych seriach, stanowiło ugrupowanie klasycznej arylopiperazyny (R = H, 2-OCH₃, 3-Cl, 4-F). Ponadto, do pierścienia fenyłowego wprowadzono także podstawniki 2,3-dichloro- oraz 3,4-dichloro- o silniejszym charakterze elektronoakceptorowym.

Zaplanowane związki, otrzymano w wyniku kilkietapowej syntezy przedstawionej na **Rycinie 10**. W pierwszym etapie, w reakcji 8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu z odpowiednimi cyklicznymi (pirolidyna, piperydyna, morfolina) i alifatycznymi (*N,N*-dietyloamina, *N,N*-dipropyloamina) aminami, według metody literaturowej [55], otrzymano odpowiednie pośrednie 8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-diony (w tym także związki nieopisane w literaturze). Związki te następnie alkilowano w układzie dwufazowym ciecz-ciepło stałe przy użyciu 2-krotnego, molowego nadmiaru odpowiednich chlorobromoalkanów [56] otrzymując odpowiednie 7-chloroalkilowe pochodne, z których większość stanowi nieopisane w literaturze pośrednie 7- ω -halogenoalkilo-8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-diony, które w reakcji substytucji nukleofilowej z równomolową ilością odpowiedniej arylopiperazyny prowadzą do uzyskania zaprojektowanych, finalnych połączeń (praca **H8**).



Rycina 10. Etapy syntezy 7-arylopipezynyloalkilowych pochodnych 8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu – seria III B

W celu zweryfikowania wpływu powyższych modyfikacji na powinowactwo receptorowe, oraz sprawdzenie wieloreceptorowego mechanizmu działania, dla nowej serii III B, rozszerzono panel badań receptorowych o miejsca wiążące receptorów 5-HT₆ i D₂.

Badania powinowactwa *in vitro* potwierdziły wieloreceptorowy profil 5-HT/D₂ badanej serii – najsilniej zaznaczony w przypadku pochodnych 8-piperydylowych. Związki zawierające ten podstawnik oraz łącznik tetrametylenowy lub pentametylenowy, były silnymi ligandami 5-HT/D₂, co może wskazywać, że ten układ cyklicznej aminy jest preferowany do uzyskania wieloreceptorowego działania.

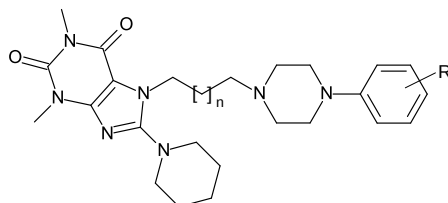
Wśród analizowanych analogów, pochodna **32**, zawierająca fragment 3,4-dichlorofenyl-piperazynylobutyłowy wykazała podobne do aripiprazolu powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A} ($K_i = 36$ nM), 5-HT₆ ($K_i = 72$ nM), 5-HT₇ ($K_i = 73$ nM), D₂ ($K_i = 5$ nM). Podobne właściwości, wieloreceptorowego liganda, wykazał analog **31** z podstawnikiem 3-chlorofenylowym (Tab. 1; praca **H8**). Wydłużenie łącznika alifatycznego do 5-węglowego, było szczególnie korzystne dla zwiększenia powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT₇ i D₂. Zastąpienie 6-członowego pierścienia piperydiny, heterocyklicznym układem morfoliny o mniejszej lipofilowości ale większej gęstości elektronowej, zachowało wieloreceptorowy profil działania w stosunku do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i 5-HT₇, w przypadku pochodnych 3-chlorofenylpiperazynyloowych i 3-metoksyfenylpiperazynyloowych z łącznikiem 3- i 4- węglowym. Podobne zależności były obserwowane dla opisanych w **pracy H4, 8 pochodnych** z podstawnikiem 8-morfolinowym oraz łącznikiem trimetylenowym i tetrametylenowym. Elektroakceptorowy podstawnik 3-chloro- w pierścieniu fenylowym, znacząco zwiększał powinowactwo do receptorów 5-HT₆, w przypadku pochodnej **11** z 4-węglowym łącznikiem alkilenowym. (Tab. 2; praca **H4**). Podobnie jak w przypadku pochodnych 8-piperydylowych, wydłużenie łańcucha alifatycznego do 5-węglowego, było korzystne dla powinowactwa do receptorów D₂, także dla analogów zawierających w tym położeniu pierścień morfoliny (Tab. 1; praca **H8**). Natomiast zastąpienie piperydiny 5-członowym układem pirolidyny, zmniejszało powinowactwo do badanych receptorów (praca **H8**). Z kolei, wprowadzenie ugrupowania *N,N*-dipropyloaminowego w położenie 8 układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, o zwiększonej lipofilowości, zachowało wysokie – nanomolarne powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ i D₂. Podstawnik ten był

szczególnie korzystny dla powinowactwa do receptorów 5-HT₆, co wskazuje, że zwiększenie lipofilowości i objętości podstawnika w położeniu 8, miały istotny wpływ na powinowactwo do tych miejsc wiążących. Dodatkowym poparciem dla tego typu wniosku, był fakt, że zastąpienie ugrupowania *N,N*-dipropylaminowego podstawnikiem *N,N*-dietyloaminowym, znacznie zmniejsza powinowactwo do receptorów 5-HT₆, podczas gdy do innych, badanych receptorów, pozostaje ono na podobnym poziomie.

Dla 11 wyselekcjonowanych, w oparciu o wyniki badań powinowactwa receptorowego związków z badanej serii pochodnych 8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (seria III B), określono profil funkcjonalny do badanych receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ i D₂ metodą *in vitro* badając wpływ na poziom cAMP. Badania te pozwoliły wyselekcjonować związki **34**, **41** i **45**, wykazujące silny antagonizm D₂ receptorowy (IC₅₀ = 2,9-6,8 nM), porównywalny do chlorpromazyny (IC₅₀ = 1,59 nM), oraz równocześnie cechy agonistów receptorów D₂ (IC₅₀ = 45,5 - 105 nM) (Tab.3, praca **H8**). Związki **34** i **41** wykazały ponadto profil częściowych agonistów 5-HT_{1A} receptorowych (Tab. 4 i 5, praca **H8**). Szereg związków wykazało także cechy antagonistów 5-HT_{2A} receptorowych (Tab. 5, praca **H8**). Mechanizmy te brane są pod uwagę w działaniu nowych generacji neuroleptyków o zmniejszonych właściwościach kataleptogennych i większej skuteczności w likwidowaniu objawów negatywnych psychozy. Z kolei, związki **43** i **46** okazały się antagonistami 5-HT₆ receptorowymi (IC₅₀ = 676 i 847 nM) (Tab. 5, praca **H8**), co jest szczególnie istotne z uwagi na udział antagonistów tych receptorów w poprawie funkcji poznawczych w schizofrenii. Szczególnie interesujący był fakt, że szereg związków z badanej serii wykazało profil częściowego agonisty D₂ receptorowego, częściowego agonisty 5-HT_{1A} receptorowego oraz antagonisty 5-HT_{2A} receptorowego, charakterystyczny dla aripiprazolu (Tab. 3-5; praca **H8**). Ten wielofunkcyjny profil, skłaniał do zweryfikowania czy związki te mają właściwości psychotropowe, charakterystyczne dla nowej generacji neuroleptyków, które przez swój wieloreceptorowy mechanizm działania, oprócz aktywności przeciwpsychotycznej, dają inne, korzystne efekty np. przeciwlękowy, przeciwdepresyjny czy prokognitywny. Do badań w kierunku działania przeciwpsychotycznego *in vivo* wybrane zostały dwa związki z podstawnikiem 8-piperydylowym: 7-{4-[4-(3,4-dichlorofenyl)piperazyn-1-yl]butyl}-1,3-dimetylo-8-(1-piperydylo)puryno-2,6-dion (**32**) i 7-{5-[4-(2-metoksyfenyl)piperazyn-1-yl]pentyl}-1,3-dimetylo-8-(1-piperydylo)puryno-2,6-dion (**34**) wykazujące odpowiednio cechy – antagonisty lub częściowego agonisty receptora D₂.

Oba związki wykazały silny efekt przeciwpsychotyczny. Związek **32** w dawce 20 mg/kg o 77%, natomiast związek **34** w dawkach 10 i 20 mg/kg o 80 i 90% - silnie obniżały hiperaktywność wywołaną d-amfetaminą u myszy. Efekt ten, w przypadku związku **32** był specyficzny; w dawkach efektywnych związek ten nie wpływał na ruchliwość spontaniczną. Podsumowanie badań farmakologicznych przedstawiono w **Tabeli 3**.

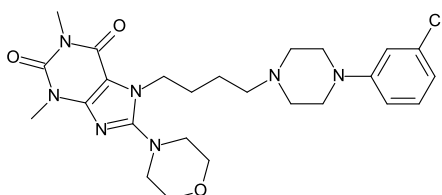
Tabela 3. Profil funkcjonalny oraz aktywność psychotropowa wyselekcjonowanych związków **32** i **34** serii III.



Nr	R	n	Profil funkcjonalny				Aktywność psychotropowa
			5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₇	D ₂	
32	3,4-diCl	2	agonista	antagonista		antagonista	przeciw-psychotyczna
34	2-OCH ₃	3	częściowy agonista		antagonista	częściowy agonista	przeciw-psychotyczna

Z badanej serii 7-arylopiperazinyloalkilo-8-morfolinylo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionów, do badań farmakologicznych w kierunku działania przeciwlękowego i przeciwdepresyjnego, wybrane zostały dwie pochodne 7-(4-arylopiperazyn-1-ylo)butylo-8-morfolin-4-ylo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu z podstawionym grupą 2-metoksyową (**10**) lub atomem chloru (**11**) w pozycji 3 pierścieniem fenylowym, o właściwościach ligandów receptorów 5-HT_{1A} i/lub 5-HT_{2A} oraz umiarkowanym powinowactwie do receptorów 5-HT₇ (Tab. 2, praca **H4**). W testach behawioralnych lęku i depresji, analog z podstawnikiem 3-chlorofenylopiperazynylowym, dualny ligand 5-HT_{1A}/5-HT_{2A} wykazujący umiarkowane powinowactwo do receptorów 5-HT₆ i 5HT₇, w dawce 5 mg/kg znacząco (o 46%) zwiększał liczbę karanych przejść w teście czterech płytek u myszy, wykazując w ten sposób efekt przeciwlękowy. Równocześnie, związek ten, w teście wymuszonego pływania, nie wykazał działania przeciwdepresyjnego. Ograniczeniem dla dalszych badań był silny efekt sedatywny badanego związku (praca **H4**) [44; **D17**]. Podsumowanie wyników badań farmakologicznych przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Powinowactwo receptorowe oraz aktywność psychotropowa wyselekcjonowanego związku **11** serii III



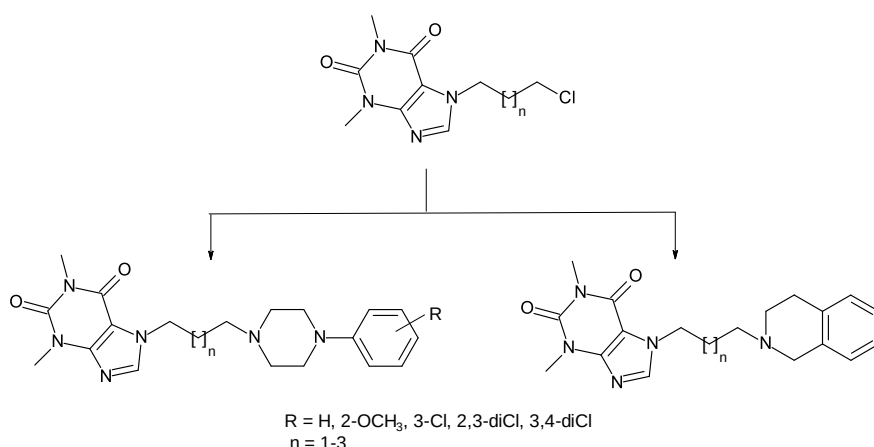
Nr	K _i [nM]				Aktywność psychotropowa
	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT ₇	
11	22	21	207	112	przeciwlękowa

Reasumując, przedstawiona seria 7-arylopiperazinyloalkilo-8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionów, z uwagi na wieloreceptorowy profil działania oraz aktywność psychotropową; przeciwpsychotyczną oraz przeciwlękową, stwarza szansę na znalezienie związków o zastosowaniu w terapii zaburzeń psychicznych.

2.2.5. 7-Arylopiperazynyloalkilowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu z niepodstawioną pozycją 8, jako ligandy receptora 5-HT_{1A} ze zróżnicowaną funkcją ago/antagonistyczną i silnymi właściwościami przeciwdepresyjnymi i anksjolitycznymi

Analizując wpływ modyfikacji układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, jako terminalnego amidu w ligandach pochodnych długolańcuchowych arylopiperazyn, w **pracy H5** przedstawiłam badania chemiczno-farmakologiczne serii IV (**Rycina 5**) obejmującej 14 zaprojektowanych 7-arylopiperazynyloalkilowych oraz tetrahydroizochinolinyloalkilowych pochodnych tego układu, nie zawierających podstawnika w położeniu 8. Związki tego typu stanowią 7-podstawione analogi arylopiperazynyloalkilowych oraz tetrahydroizochinolinyloalkilowych pochodnych ze zróżnicowanym podstawnikiem alkoksylowym (prace **H1**, **H3** i **H7**) lub aminowym (prace **H4**, **H6** i **H8**) w położeniu 8. W porównaniu do 7,8-dipodstawionych pochodnych, w przypadku tej grupy ligandów, rolę akceptora wiązania wodorowego może przejąć atom azotu w położeniu 9 układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, ze względu na posiadaną przez niego wolną parę elektronową. Istotny był również fakt, że w związkach tego typu zachowany został charakter aromatyczny imidazolu. Przedstawiona modyfikacja służyła ocenie, w jaki sposób brak podstawnika w położeniu 8 wpłynie na profil receptorowy oraz funkcjonalny w obrębie badanych receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ i D₂. Analogicznie jak w poprzednich seriach związków, analizowano wpływ długości łącznika alifatycznego, który również w związkach tej serii był 3-5 węglowy. Podobnie jak w przypadku 8-podstawionych analogów, fragment aminowy stanowiła niepodstawiona lub podstawiona w pierścieniu fenylowym arylopiperazyna lub 1,2,3,4-tetrahydroizochinolina.

Zaplanowane 7-aryloalkilopiperazynyloalkilowe oraz 7-tetrahydroizochinolinyloalkilowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu serii IV, otrzymano w reakcji uzyskanych uprzednio 7- ω -chloroalkilo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionów [57] z odpowiednimi aminami, w środowisku propan-1-olu, w obecności bezwodnego K₂CO₃, zgodnie z metodyką opisaną w pracy **H1** (**Rycina 11**).

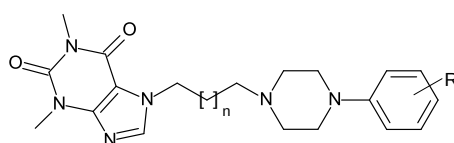


Rycina 11. Synteza 7-arylopiperazynyloalkilowych oraz 7-tetrahydroizochinolinyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu – seria IV

Wyniki badań powinowactwa receptorowego *in vitro* wykazały, że modyfikacja polegająca na eliminacji podstawnika w położeniu 8 prowadzi, w przypadku pochodnych arylopiperazynyloalkilowych, do zwiększenia powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A}, przy równoczesnym zmniejszeniu powinowactwa do receptorów 5-HT_{2A}, 5-HT₇ i D₂. Jedynie w przypadku związków zawierających podstawnik 3-chlorofenyłowy zostało zachowane wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A}. Wydłużenie łańcucha alkilenowego było korzystne dla powinowactwa do receptorów 5-HT₇. W grupie pochodnych 7-tetrahydroizochinolinyloalkilowych, badane związki, w stosunku do ich analogów z podstawnikiem alkoksylowym lub aminowym w położeniu 8, zachowały podobne powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}, natomiast nie wykazywały powinowactwa w stosunku do receptorów 5-HT_{2A}, 5-HT₇ i D₂. W przypadku tych pochodnych, różnice w długości łańcucha alkilenowego nie wpływały znacząco na powinowactwo do badanych receptorów. W wyniku przeprowadzonych modyfikacji, w obrębie arylopiperazynylowych pochodnych z łańcuchem tetrametylenowym i pentametylenowym, uzyskano silne ligandy receptorów 5-HT_{1A} (K_i = 1-23 nM; Tab. 1, praca **H5**) o umiarkowanym powinowactwie do receptorów 5-HT_{2A}, 5-HT₇ i D₂.

Wyselekcjonowane pochodne **9**, **12**, **13** i **14** o najwyższym powinowactwie do receptorów 5-HT_{1A}, w testach funkcjonalnych *in vivo* (hipotermia u myszy, test opadnięcia dolnej wargi szczura), wykazały zróżnicowany profil aktywności ago/antagonistycznej w stosunku do tego typu receptorów. Związek **9** został sklasyfikowany jako pełny agonista receptorów 5-HT_{1A}, **12** jako częściowy agonista receptorów 5-HT_{1A}, **13** jako postsynaptyczny agonista receptorów 5-HT_{1A}, natomiast **14** jako postsynaptyczny antagonist receptorów 5-HT_{1A} (**Tabela 5**). Hipotermia wywołana związkami **13** i **14** nie była znoszona specyficznym antagonistą receptorów 5-HT_{1A} tj. WAY100635, co sugeruje, że nie był to efekt związany wyłącznie z receptorami 5-HT_{1A}. Ponadto dla 7-[4-[4-(3-chlorofenilo)piperazyn-1-yl]butylo]-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (**9**) oraz jego homologu (**14**) z łącznikiem 5-węglowym, wykazujących równocześnie powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A}, wykazano ich właściwości antagonistyczne do tego typu receptorów, w teście potrząsania głową u myszy.

Tabela 5. Profil funkcjonalny oraz aktywność psychotropowa wyselekcjonowanych związków **9**, **12-14** serii IV.



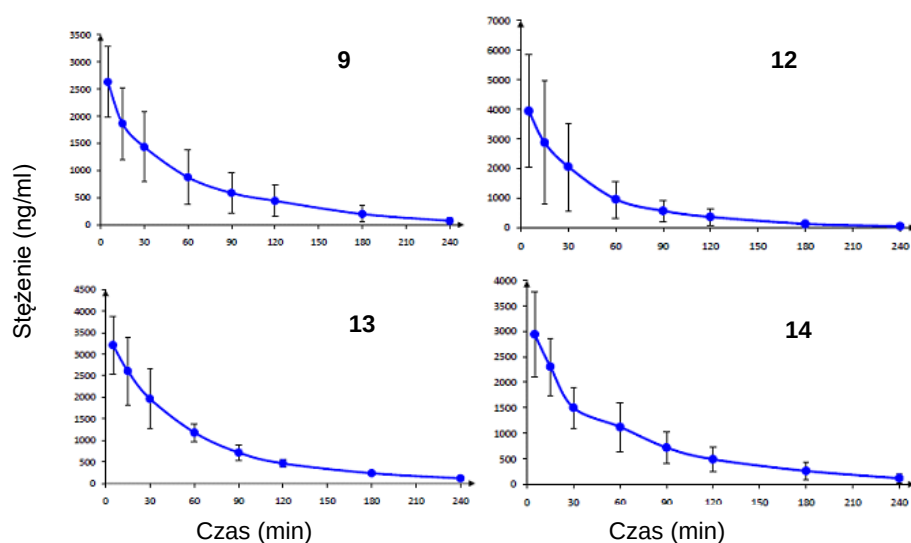
Nr	R	n	Profil funkcjonalny		Aktywność psychotropowa
			5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	
9	3-Cl	2	agonista pre- i post-synaptyczny	antagonista	przeciwłękowa i przeciwdepresyjna
12	H	3	presynaptyczny i częściowy agonista postsynaptyczny		przeciwłękowa
13	2-OCH ₃	3	agonista postsynaptyczny		przeciwdepresyjna
14	3-Cl	3	antagonista postsynaptyczny	antagonista	przeciwłękowa

Z danych przedstawionych w literaturze wiadomo, że ligandy receptorów 5-HT_{1A} o cechach agonistów, częściowych agonistów tych receptorów, jak również, o właściwościach kombinowanych antagonistów 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}, wykazują *in vivo* aktywność przeciwdepresyjną i/lub przeciwlękową [58-61].

Biorąc pod uwagę, zarówno powinowactwo receptorowe jak i aktywność wewnętrzną, wyselekcjonowanych pochodnych **9**, **12**, **13** i **14** określono ich właściwości psychotropowe w testach behawioralnych depresji (test wymuszonego pływania) i lęku (test czterech płytek). Badania pozwoliły wyselekcjonować związki o silnych właściwościach przeciwlękowych. Związki **9**, **12** oraz **14**, odpowiednio w dawkach 20 mg/kg (**9**), 2,5 mg/kg (**12**) oraz 0,625 mg/kg i 0,312 mg/kg (**14**) wykazały znaczącą aktywność w teście czterech płytek, zwiększając liczbę karanych przejść odpowiednio o 57%, 50% oraz 71% i 57% (Ryc. 3; praca **H5**). Aktywność ta była zbliżona lub silniejsza od diazepam użytego jako związek odniesienia w dawkach 1,25 - 5 mg/kg (Ryc. 3; praca **H5**). Ponadto związki **9** i **13** wykazały właściwości przeciwdepresyjne. Związek **9** w dawkach 5 i 10 mg/kg oraz związek **13** w dawkach 0,625 i 1,25 mg/kg istotnie skracały czas bezruchu myszy odpowiednio o 37%, 30% (**9**) oraz 30% i 35% (**13**). Efekt ten był silniejszy od imipraminy, użytej jako związek referencyjny, która wykazywała działanie w wyższych dawkach (10 i 20 mg/kg). Ponadto, podobnie jak imipramina, badane związki nie wpływały na ruchliwość spontaniczną.

Reasumując, w badanej grupie pochodnych, uzyskano silne ligandy receptorów 5-HT_{1A} o zróżnicowanym profilu ago/antagonistycznym, wykazujące porównywalną lub silniejszą od związków odniesienia, diazepam i imipraminy, aktywność przeciwlękową (**12** i **14**), przeciwdepresyjną (**13**) lub przeciwlękową i przeciwdepresyjną (**9**) (Tabela 5).

Ze względu na obiecujące wyniki badań farmakologicznych, związki **9**, **12**, **13** i **14** zostały przekazane do badań farmakokinetycznych *in vivo* na szczurach rasy Wistar. Zwierzęta, po uprzedniej kaniulacji żyły szyjnej, otrzymywały badane związki w dawce 5 mg/kg do żyły ogonowej. Próbkę krwi do oznaczeń pobierano z kaniuli, w różnych czasach od chwili podania, do 240 min.



Rycina 12. Wykresy zależności średnich stężeń ($\pm$ SD) badanych związków **9**, **12**, **13** i **14** w osoczu szczura od czasu po jednorazowym, dożylnym podaniu w dawce 5 mg/kg (n = 3)

Stężenia badanych związków w osoczu oznaczano metodą LC/MS/MS z wykorzystaniem kolumny XTerra™ C18 (3 mm x 50 mm, 5 µm). Fazę ruchomą stanowił 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu. Profile średnich stężeń związków **9**, **12**, **13** i **14** w funkcji czasu przedstawiono na **Rycinie 12**.

W oparciu o uzyskane wyniki, oszacowano parametry farmakokinetyczne badanych związków. Stosując analizę bezmodelową w programie Phoenix WinNonlin obliczono nachylenie końcowego fragmentu krzywej stężenie-czas (λ_z), będące miarą szybkości ich eliminacji, biologiczny okres półtrwania ($t_{0,5 \lambda_z}$), wyznaczony z zależności $\ln 2/\lambda_z$, objętość dystrybucji (V_z), klirens (CL), średni czas przebywania związku w ustroju (MRT) oraz pole pod krzywą stężenie-czas mierzone w przedziale czasu od 0 do 240 min (AUC_{0-240}), (**Tabela 6**).

Tabela 6. Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych (średnie geometryczne) związków **9**, **12**, **13** i **14**, po jednorazowym, dożylnym podaniu w dawce 5 mg/kg

Parametr	9	12	13	14
λ_z (min ⁻¹)	0,015	0.019	0.012	0,013
$t_{0,5 \lambda_z}$ (min)	45,19	36,65	59,06	51,77
V_z (ml/kg)	2152,15	1535,24	1986.44	1985,49
CL (ml/min/kg)	33,01	29,04	23,31	26,58
MRT (min)	55,43	44,80	58,46	59,93
AUC_{0-240} (ng·min/ml)	146993,59	170397,03	201479.90	180142,24

Stosując metodę ultrafiltracji, wyznaczono także ułamek wiązania badanych związków z białkami osocza. Wyniki tych badań wykazały, że związki **9** i **14** w znacznym stopniu wiążą się z białkami (odpowiednio w 92 i 94%), natomiast związki **12** i **13** w około 70%.

W oparciu o przeprowadzone badania farmakokinetyczne można stwierdzić, że wszystkie badane związki cechują się korzystnym profilem farmakokinetycznym. Duża wartość objętości dystrybucji, znacznie przewyższająca objętość krwi krążącej u szczura, świadczy o znacznym przenikaniu badanych związków przez błony biologiczne i ich efektywnej dystrybucji do wielu narządów i tkanek, w tym do OUN. Biologiczny okres półtrwania mieszczący się w zakresie 36,65 – 59,06 min jest, w odniesieniu do szczura, stosunkowo długi i po przeskalowaniu na człowieka może osiągnąć wartość rzędu kilku godzin. Powinno to umożliwić podawanie tych związków raz lub dwa razy na dobę.

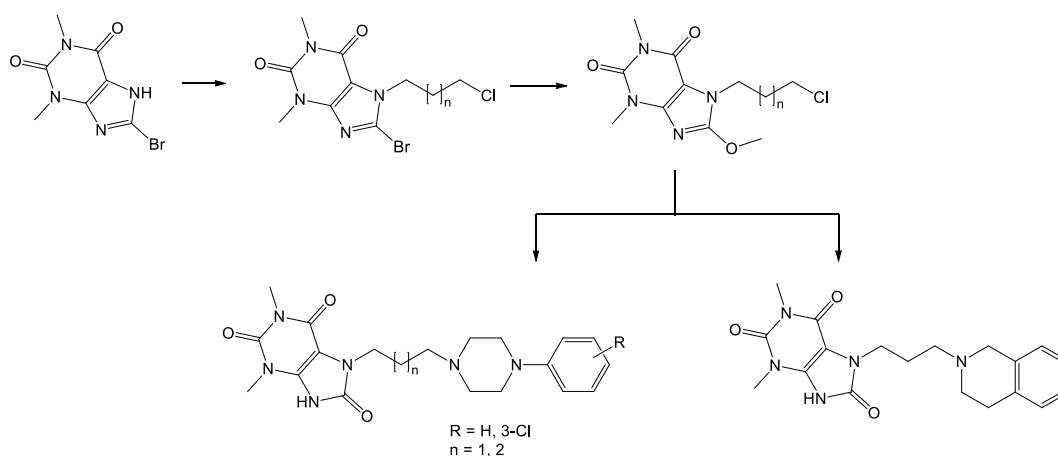
Badania farmakokinetyczne są kontynuowane, a uzyskane wyniki będą prezentowane w przygotowywanej publikacji.

2.2.6. Ocena wpływu zastąpienia układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu w badanych 7-arylo-piperazynyloalkilowych pochodnych, strukturą 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu oraz tricyklicznym układem dihydro[1,3]oksazolo[2,3-f]purynodionu, na powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₆/5-HT₇ i D₂

Biorąc pod uwagę istotną rolę terminalnego fragmentu cyklicznego amidu w modyfikowaniu powinowactwa receptorowego długołańcuchowych arylopiperazyn, zbadano także wpływ zastąpienia układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu strukturą 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu (seria V; **Rycina 6**). W zmodyfikowanym układzie, obok cyklicznych ugrupowań amidowych, występujących w pirymidyno-dionie, występuje dodatkowe ugrupowanie amidowe w pierścieniu imidazolu, mające możliwość występowania w dwóch formach tautomerycznych tj. w formie enolowej i ketonowej (**praca H1**). W porównaniu do układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, przedstawiona modyfikacja prowadzi do utraty aromatycznego charakteru pierścienia imidazolu w badanym układzie 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu.

Zaprojektowane związki serii V stanowiły 8-okso analogi 7-arylopiperazynyloalkilowych oraz 7-tetrahydroizochinolinyloalkilowych pochodnych 8-alkoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, w których w miejsce ugrupowania alkoksylowego w położeniu 8 występuje grupa karbonylowa (**praca H1**). W przeciwieństwie do 8-alkoksylowych pochodnych, w których rolę akceptora wiązania wodorowego pełni atom tlenu, w związkach tej serii rolę akceptora wiązania wodorowego może przejąć atom azotu w położeniu 9, ze względu na posiadaną wolną parę elektronową. W odróżnieniu od długołańcuchowych arylopiperazynowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, proponowane pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu nie posiadają w swej strukturze układów aromatycznych ani lipofilowych w pobliżu ugrupowania będącego akceptorem i donorem wiązania wodorowego (układ imidazolinonu).

Związki tej serii otrzymano w wyniku kilkietapowej syntezy, otrzymując pośrednie 7- ω -chloroalkilo-8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-diony [53], a następnie opisaną w pracy **H1** metodą – 7- ω -chloroalkilo-8-metoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-diony (**Rycina 13**).



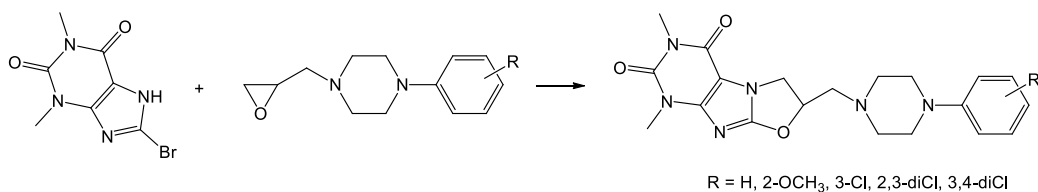
Rycina 13. Etapy syntezy 7-arylopiperazynyloalkilowych oraz 7-tetrahydroizochinolinyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu – seria V

W kolejnym etapie, w reakcji 7- ω -chloroalkilo-8-metoksy-1,3-dimetylo-puryno-2,6-dionów z odpowiednią aminą w środowisku propan-1-olu w obecności K_2CO_3 , nietrwałe ugrupowanie metoksykowe w położeniu 8 ulega hydrolizie, prowadząc do otrzymania odpowiednich 7-arylopiperazynyloalkilowych oraz 7-tetrahydrochinolinyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu.

Analiza zależności struktura-powinowactwo receptorowe wykazała, że 7-arylopiperazynyloalkilowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu miały 3-20 krotnie mniejsze powinowactwo do receptorów $5-HT_{1A}$ oraz 14-77 krotnie mniejsze do $5-HT_7$, w porównaniu do pochodnych 8-alkoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, natomiast zachowały wysokie powinowactwo do receptorów $5-HT_{2A}$ (Tab. 1 i 2; praca **H1**). Związki **27** i **29**, mające w swej strukturze odpowiednio; fragment 3-chlorofenylopiperazynylopropylowy oraz 3-chlorofenylopiperazynylobutylowy, okazały się selektywnymi ligandami receptorów $5-HT_{2A}$ ($K_i = 58$ i 60 nM). Można stąd wnioskować, że dla wiązania się z receptorami $5-HT_{2A}$ tego typu ligandów, istotną rolę mogą odgrywać oddziaływania hydrofobowe oraz π -elektronowe, a także oddziaływania typu jonowego, natomiast obecność ugrupowania tworzącego wiązanie wodorowe, niezbędnego w przypadku ligandów receptora $5-HT_{1A}$, nie była konieczna dla wiązania się z receptorem $5-HT_{2A}$. Zastąpienie fragmentu arylopiperazyny układem tetrahydroizochinoliny (**30**) w badanej grupie pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu, prowadzi do zaniku aktywności w stosunku do wszystkich badanych podtypów receptorów serotoninowych (Tab. 2, praca **H1**).

Kolejną modyfikację terminalnego amidu w badanych arylopiperazynyloalkilowych pochodnych stanowiła seria VI (**Rycina 6**) opisana w **pracy H7**. Terminalny, diheterocykliczny układ 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, w związkach tej serii, został zastąpiony tricyklicznym układem 1,3-dimetylo-6,7-dihydro-1,3-oksazolo[2,3-*f*]puryno-2,4-dionu. Połączenia tej serii można traktować jako analogi 7-arylopiperazynyloalkilo-8-alkoksylowych pochodnych, w których grupa metoksylova oraz łącznik alkilenowy, zostały wbudowane w pierścień oksazolu (praca **H7**).

Związki serii VI zsyntetyzowano w reakcji otrzymanych uprzednio, odpowiednich arylopiperazynyloalkilowych z 8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionem w środowisku propan-1-olu, w obecności katalitycznych ilości pirydyny (**Rycina 14**).



Rycina 14. Synteza 7-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych dihydro[1,3]oksazolo-[2,3-*f*]purynodionu – seria VI

W badaniach powinowactwa receptorowego *in vitro*, 7-arylopiperazynyloalkilowe pochodne dihydro-[1,3]oksazolo[2,3-*f*]purynodionu nie wykazały powinowactwa do badanych receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ i D₂. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazywały, że zmiana chemicznego charakteru cyklicznego amidu wpływa na wiązanie się z badanymi receptorami. Niekorzystny wpływ tricyklicznego układu dihydro[1,3]oksazolo[2,3-*f*]purynodionu na powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i D₂ w porównaniu do diheterocyklicznej struktury 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, został dodatkowo potwierdzony badaniami modelowania cząsteczkowego (rozdział 2.2.8.).

2.2.7. Badania krystalograficzne dla wybranych arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu o właściwościach wieloreceptorowych ligandów 5-HT i/lub D₂

Wyniki rentgenowskiej analizy strukturalnej pozwalają na ustalenie preferowanych konformacji cząsteczek w środowisku kryształu. Konformacja cząsteczki ma kluczowe znaczenie w procesie tworzenia się oddziaływań międzycząsteczkowych, w tym również pomiędzy receptorem i ligandem. Preferowane, przestrzenne ułożenie fragmentów liganda, niejednokrotnie decyduje o selektywnym wiązaniu się do danego receptora. Analiza oddziaływań międzycząsteczkowych w kryształach pozwala na wyciągnięcie wniosków dotyczących właściwości elektronowych poszczególnych grup funkcyjnych cząsteczki. Może wskazać na potencjalne fragmenty donorowe/akceptorowe wiązań wodorowych, jak również ustalić możliwości powstawania innych, słabszych oddziaływań hydrofobowych, mających ogromne znaczenie w procesie stabilizacji liganda w miejscu wiążącym receptora.

Mając powyższe na uwadze, przeprowadzono badania krystalograficzne dla wybranych arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu o właściwościach wieloreceptorowych ligandów 5-HT i/lub D₂. Z danych literaturowych wynika, że kryształy długociągu arylopiperazyn są bardzo trudne do otrzymania z uwagi na dużą niestabilność konformacyjną w roztworze, która skutkuje częstym „zeszkleniem” preparatu lub uzyskaniem kryształów niskiej jakości [62].

Badania krystalograficzne przeprowadzono dla związków, dla których uzyskano kryształy umożliwiające badania rentgenostrukturalne. Większość badanych pochodnych LCAP krystalizowała w postaci soli. Były to chlorowodorki 7-arylopiperazynylobutylo-8-morfolin-4-yl-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionów (**9**, **10** i **11**; **praca H4**), obejmujące 4 struktury krystaliczne (dwie odmiany polimorficzne dla związku **11**) [63] oraz 2 struktury krystaliczne chlorowodorków 7-{4-[4-(3,4-dichlorofenyl)piperazyn-1-yl]butyl}-1,3-dimetylo-8-morfolin-4-ylpuryno-2,6-dionu (**37**; **praca H8**) oraz 7-{3-[4-(3,4-dichlorofenyl)piperazyn-1-yl]propyl}-8-(dipropylamino)-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (**44**; **praca H8**). Wspólnym fragmentem strukturalnym w związkach **9**, **10**, **11** i **37** był podstawnik 8-morfolinowy oraz łącznik 4-węglowy, natomiast różnica dotyczyła podstawników w pierścieniu aromatycznym fragmentu arylopiperazyny.

Badania krystalograficzne umożliwiły potwierdzenie struktury badanych związków i pozwoliły na szczegółową analizę konformacyjną. Wszystkie badane związki krystalizowały w postaci chlorowodorków, z kationem zlokalizowanym na atomie azotu N15 piperazyny (Ryc.1, **praca H4**, Ryc. 2, **praca H8**). Umożliwiło to powstanie silnego oddziaływania o charakterze wiązania wodorowego, dodatkowo wspomaganego ładunkiem. Oddziaływanie N⁺-H...Cl⁻ naśladuje obserwowane w dokowanych pochodnych arylopiperazynyloalkilowych, oddziaływanie z Asp32 [64] (rozdział 2.2.8).

Strukturę badanych związków można podzielić na trzy zasadnicze części: fragment arylopiperazyny, aromatyczny układ 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu oraz łączący oba fragmenty łącznik alifatyczny. Najbardziej konformacyjnie zmiennym fragmentem jest łańcuch alifatyczny, który dla większości prezentowanych związków przyjmuje konformację rozciągniętą. Jest to najczęściej spotykana konformacja dla większości czterowęglowych łańcuchów pochodnych LCAPs [65-68]. Postuluje się, że łącznik tetrametylenowy w rozciągniętej konformacji trans-trans-trans (anti-anti-anti) występuje w strukturach krystalicznych pochodnych o najwyższej aktywności względem receptorów monoaminergicznych. Taka długość łańcucha gwarantuje optymalną, wzajemną odległość układów pierścieniowych ligandów, umożliwiając lepsze dopasowanie cząsteczki do kieszeni wiążącej receptora. W przypadku łańcuchów krótszych (propylenowych), obserwowana jest konformacja rozciągnięta (trans-trans) jak i zgięta (trans-*gauche*) (związek **44**). Nawet w przypadku konformacji rozciągniętej łącznika trójwęglowego, odległość pomiędzy układami aromatycznymi nie gwarantuje stworzenia optymalnych oddziaływań z receptorem, co uwidaczniają badania *in vitro*; słabsza wiązalność tych ligandów do wybranych receptorów. Z kolei dłuższy łańcuch (pentametylenowy), wykazuje znaczącą labilność konformacyjną, nawet w cieple stałym, przyjmując najczęściej konformację zgiętą (dane będą zawarte w przygotowywanej publikacji).

W przypadku wszystkich analizowanych struktur, pierścień piperazyny przyjmuje konformację krzeselkową, z podstawnikami: alifatycznym i aromatycznym, w pozycjach ekwatorialnych. Ułożenie takie pozwala na w pełni rozciągniętą budowę cząsteczki.

Duży wpływ na aktywność/selektywność liganda może mieć rodzaj i pozycja podstawnika w pierścieniu aromatycznym fragmentu arylopiperazyny, który determinuje wzajemną orientację obu pierścieni, co może wpływać na preferowane oddziaływanie z różnymi typami receptorów (selektywność). Szczególne znaczenie może mieć podstawnik 2-metoksyłowy w pierścieniu aromatycznym, dla którego obserwowane jest zachowane ułożenie kątowe obu pierścieni układu arylopiperazyny, w porównaniu z podstawnikiem 3-chloro- lub niepodstawionym pierścieniem aromatycznym. W przypadku podstawnika 3-chloro- istnieje więcej niż jedno energetycznie korzystne, wzajemne ułożenie obu pierścieni, podczas gdy niepodstawiony pierścień aromatyczny gwarantuje dużą zmienność rotacyjną. Biorąc pod uwagę pierścień dipodstawiony 3,4-dichloro-, obecność dwóch podstawników zmienia własności π -elektronowe pierścienia fenyłowego. Zdolność przesuwania chmury π -elektronowej w kierunku podstawnika wydaje się być zależna od wzajemnego, kątowego ułożenia pierścieni w układzie arylopiperazyny. Bardziej płaska geometria, zwiększa elektroujemność podstawnika chlorowego w pozycji *para*, czyniąc go atrakcyjnym akceptorem słabych wiązań wodorowych. Kątowe, wzajemne ułożenie pierścieni arylopiperazyny, zmniejsza efekt elektroindukcyjny podstawników, umożliwiając łatwiejsze tworzenie oddziaływań typu π - π w strukturze kryształu. Obserwacje strukturalne i wnioski z nich wynikające wymagają potwierdzenia dla większej liczby struktur tego typu pochodnych.

Pierścień morfoliny w położeniu **8** przyjmuje konformację krzeselkową, dla wszystkich opisanych pochodnych z tym podstawnikiem. Ten heteroatomowy pierścień ma częściowy charakter polarny. W związku z tym posiada on właściwości donorowo-akceptorowe w tworzeniu wiązania wodorowego. W strukturze krystalicznej obserwowane są słabe wiązania wodorowe z udziałem tego

fragmentu, głównie typu C-H...O. W przypadku pochodnej z podstawnikiem dipropyloaminowym w położeniu 8 (związek **44**) z krótszym, 3-węglowym łącznikiem alifatycznym, fragment dipropyloaminowy wykazuje tendencję do tworzenia oddziaływań hydrofobowych, co uwidoczniło się w strukturze krystalicznej w postaci warstwowej [001] architektury kryształu, z wyraźnymi obszarami apolarnymi i polarnymi. Obserwowana możliwość powstawania oddziaływań hydrofobowych, może dodatkowo pozwolić na stabilizację cząsteczki liganda w apolarnych wnękach kieszeni wiążącej receptora. Próby krystalizacji homologów zw. **44** z łącznikiem butylenowym, jak również innych pochodnych LCAPs z układem 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, są nadal prowadzone.

2.2.8. Analiza sposobu wiązania ligandów z grupy arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu do receptora serotoninowego 5-HT_{1A} oraz dopaminowego D₂, przy użyciu metod modelowania molekularnego

Przyjęte cele biologiczne, receptor serotoninowy 5-HT_{1A} i dopaminowy D₂ należą do grupy receptorów metabotropowych, sprzężonych z białkiem G (GPCR), których struktura III-rzędowa (przestrzenna) nie została dotąd opracowana eksperymentalnie. Z tego powodu, w analizie oddziaływań ligand-receptor zastosowano modele homologiczne białek tych receptorów. Modele homologiczne powstają w wyniku komputerowego nałożenia sekwencji aminokwasowej badanych białek na strukturę krystaliczną białka homologicznego [69]. W przypadku analizowanych receptorów zastosowano jako matrycę struktury receptora β_2 -adrenergicznego (w modelu receptora 5-HT_{1A}) oraz dopaminergicznego D₃ (model receptora D₂). Budowane modele optymalizowano przy użyciu struktur przestrzennych ligandów o wysokim powinowactwie do badanych receptorów. Efektem tego etapu było uzyskanie zestawów modeli homologicznych o zoptymalizowanych konformacjach łańcuchów bocznych aminokwasów miejsca wiążącego. Różnorodność modeli naśladuje swobodę konformacyjną białka, jaka ma miejsce w środowisku naturalnym [70]. Oryginalne struktury były dokowane do modeli homologicznych i oceniane pod względem przyjmowanej konformacji, jak i obecności charakterystycznych oddziaływań z aminokwasami miejsca wiążącego. Powyższe postępowanie miało na celu ustalenie sposobu wiązania ligandów o danym chemotypie, w receptorze będącym celem biologicznym dla projektowanej serii związków. Umożliwia to analizę wymagań sterycznych i elektronowych, jakie muszą spełniać związki chemiczne, by efektywnie wiązać się w miejscu aktywnym danego układu biologicznego. Brane pod uwagę są zarówno oddziaływania polarne (jonowe, wodorowe), aromatyczne (typu π - π , CH- π oraz kation- π), jak i hydrofobowe (w kieszeniach zbudowanych z aminokwasów o takim charakterze). Analiza tego typu umożliwia zdefiniowanie fragmentów struktury niezbędnych dla aktywności biologicznej, grup funkcyjnych, których modyfikacja może korzystnie na nią wpłynąć oraz rejonów, w których niedopuszczalna jest rozbudowa cząsteczki. Znając położenie w przestrzeni i charakter chemiczny aminokwasów miejsca wiążącego, można rozwijać struktury ligandów, w celu zapewnienia komplementarności oddziaływań z receptorem, co może, z dużym prawdopodobieństwem, skutkować poprawą parametrów farmakodynamicznych projektowanych cząsteczek.

Mając powyższe na uwadze, dla wybranych ligandów z badanych serii arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, zaproponowano sposób wiązania w receptorach serotoninowych 5-HT_{1A} (prace **H5**, **H7**, **H8**) i dopaminowych D₂ (praca **H8**).

Analiza sposobu wiązania w miejscu wiążącym receptora 5-HT_{1A} prowadzona w grupie 7-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, dla wyselekcjonowanych najaktywniejszych ligandów tego receptora tj. 7-{4-[4-(3-chlorofenilo)piperazyn-1-ylo]butylo}-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (**9**) (K_i = 1 nM) oraz 7-{5-[4-(3-chlorofenilo)pentilo]-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (**14**) (K_i = 5 nM) oraz ich analogu 3-chlorofenilopiperazynylopropylowego (**6**) o znacznie niższym powinowactwie (K_i = 182 nM), pozwoliła na scharakteryzowanie występujących oddziaływań ligand-receptor (praca **H5**).

Cząsteczki analizowanych związków przyjmują rozciągniętą strukturę konformacyjną, obejmującą dwa główne fragmenty farmakoforowe: arylopiperazynę oraz 1,3-dimetylopuryno-2,6-dion, co powoduje oddziaływanie z oboma kieszeniami miejsca wiążącego receptora 5-HT_{1A}. Fragment 3-chlorofenylopiperazyny zajmuje głębiej zlokalizowaną, bardziej zakonserwowaną sekwencyjnie kieszeń, znajdującą się pomiędzy transmembranowymi helisami (ang. transmembrane helices; TMHs) 3-6. Fragment ten, poprzez protonowany w warunkach fizjologicznych atom azotu, oddziałuje z kwasem asparaginowym (Asp3.32; wiązanie wodorowe wzmocnione ładunkiem), stanowiącym główny punkt zakotwiczenia ligandów w procesie wiązania do receptorów monoaminergicznych, a także z aminokwasami aromatycznymi helisy 6, szczególnie z fenyloalaniną (Phe6.52). Natomiast fragment 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu penetruje bardziej eksponowaną do środowiska zewnętrznego i mniej zakonserwowaną kieszeń pomiędzy transmembranowymi helisami 1, 2 i 7, tworząc w przypadku analizowanych, silnych ligandów **9** i **14** bardzo korzystne wiązanie wodorowe z asparaginą (Asn7.39) (Ryc. 2, praca **H5**). Na podkreślenie zasługuje fakt, że tego typu interakcji nie obserwowano w przypadku analogu **6** z krótszym łącznikiem (propylenowym). Ta obserwacja może tłumaczyć wyższe powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} pochodnych z 4- i 5-węglowym łańcuchem alkilenowym, w porównaniu do ich analogów z łącznikiem 3- węglowym. Badania przewidywania sposobu wiązania przy użyciu modelowania molekularnego, ligandów receptora 5-HT_{1A} z grupy 7-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, prowadzono także dla 8-metoksy-1,3-dimetylo-7-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]propylo}-puryno-2,6-dionu (**11**), o właściwościach liganda receptora 5-HT_{1A} (Tab. 1; praca **H7**). Dla porównania, do badań wybrano także jego analog **31**, zawierający dihydro[1,3]oksazolo[2,3-f]purynodion jako fragment terminalny, nieposiadający powinowactwa do receptorów serotoninowych, w tym do 5-HT_{1A}, w którym grupa alkoksylowa oraz łańcuch alifatyczny, zostały wbudowane w pierścień oksazolu (praca **H7**).

W następstwie dokowania obu związków, do zestawu modeli homologicznych receptora 5-HT_{1A}, który naśladuje swobodę konformacyjną tego białka receptorowego, określono oddziaływanie ligand-receptor, różnicujące ich powinowactwo receptorowe. Fragment 2-metoksyfenylopiperazynowy, wspólny dla struktury obu związków, wykazuje istotne oddziaływanie z Asp3.32 (wiązanie wodorowe, wzmocnione ładunkiem), jak również z obszarem aromatycznym, szczególnie z fenyloalaniną Phe6.52 (oddziaływanie typu π - π) i lizyną Lys111 (π -kation) (Ryc. 3; praca **H7**). Fragment 8-metoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu nawiązuje dodatkową, stabilizującą interakcję z tyrozyną (Tyr2.64; oddziaływanie typu π - π) i glutaminą (Gln2.65; wiązanie wodorowe). Te korzystne oddziaływania nie występowały w przypadku pochodnych dihydro[1,3]oksazolo[2,3-f]purynodionu. Ponadto, niekorzystna konformacja cząsteczki, spowodowana dobudowaniem pierścienia oksazolu do rdzenia 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, powodowała zawadę przestrzenną w miejscu wiążącym niektórych modeli homologicznych. Powyższe różnice mogą odzwierciedlać korzystny wpływ układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu na wiązanie się z receptorem 5-HT_{1A}, w porównaniu do układu dihydro[1,3]oksazolo[2,3-f]purynodionu, nie wykazującego (*in vitro*) powinowactwa do tych receptorów.

Analizę sposobu wiązania do receptorów 5-HT_{1A} i D₂ przy użyciu modelowania komputerowego, przeprowadzono także dla reprezentanta 7-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, opisanych w pracy **H8**.

W tym celu wybrany został 7-{5-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]pentylo}-1,3-dimetylo-8-(1-piperydylo)puryno-2,6-dion o właściwościach silnego liganda receptorów 5-HT_{1A} (K_i = 8 nM) oraz D₂ (K_i = 3 nM), posiadający także wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A} i 5-HT₇ (**34**; praca **H8**). W następstwie dokowania związku **34** do modeli homologicznych receptora 5-HT_{1A} stwierdzono, że cząsteczka przyjmuje spójny sposób wiązania. Protonowany pierścień piperazyny jest donorem wiązania wodorowego dla grupy karbonylowej kwasu asparaginowego (Asp3.32; wiązanie wodorowe wzmocnione ładunkiem), natomiast pierścień fenyloy oddziałuje z fenyloalaniną Phe6.52 (oddziaływanie typu π - π) i lizyną Lys191 (oddziaływanie π -kation). Analiza sposobu wiązania do receptora 5-HT_{1A}, potwierdza szczególnie korzystną rolę podstawnika 2-metoksyowego w pierścieniu fenyloyowym, ponieważ umożliwia utworzenie wiązania wodorowego z lizyną (Lys191) i nie koliduje z innymi łańcuchami aminokwasów budującymi kieszeń wiążącą. Fragment 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu stabilizuje kompleks ligand-receptor w wyniku oddziaływań typu π - π z tyrozyną (Tyr2.64) podczas gdy podstawnik piperydyloy w położeniu 8 tego układu zajmuje niespecyficzną kieszeń poniżej drugiej, zewnątrzkomórkowej pętli (ECL 2). Podstawnik piperydyloy w położeniu 8 nie wpływa na powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}, ale może odgrywać rolę w aktywności w stosunku do innych podtypów receptorów serotoninowych np. 5-HT₆, co zostało zaobserwowane w przypadku związków tej serii. Zagadnienie to wymaga jednak dalszych, szczegółowych analiz.

Rezultaty badań uzyskane za pomocą modelowania molekularnego, korespondują z wynikami badań rentgenowskich omówionymi w rozdziale 2.2.7. np. dotyczącymi krzesłkowej konformacji pierścienia piperazyny, która jest podstawiona ekwatorialnie, rozciągniętej konformacji alifatycznego łącznika oraz podstawionej ekwatorialnie konformacji krzesłkowej heterocyklicznego podstawnika w pozycji 8 układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu. Arylopiperazynyloalkilowe pochodne 8-amino-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu wykazały wysokie powinowactwo do receptorów D₂ (K_i = 2-11 nM), co związane jest z obecnością w cząsteczce uprzywilejowanego ugrupowania arylopiperazynowego (praca **H8**). W badaniach funkcjonalnych, szereg związków tej serii wykazało cechy częściowych agonistów tych receptorów. Analiza zależności pomiędzy strukturą a aktywnością receptorową w klasie ligandów receptorów D₂ sugeruje, że za ten profil aktywności wewnętrznej może odpowiadać terminalny układ cyklicznego amidu [71, 72]. W badaniach modelowania cząsteczkowego, dla reprezentatywnego związku **34** wykazano, że fragment arylopiperazyny oddziałuje z receptorem D₂ wiążąc się z kwasem asparaginowym (Asp3.32) oraz fenyloalaninami (Phe6.51/6.52), podobnie jak opisano w przypadku wiązania z receptorem 5-HT_{1A}, podczas gdy układ 8-piperydylo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu zajmuje mniej zakonserwowaną kieszeń, tworząc interakcje aromatyczne z tyrozyną (Tyr7.35) oraz wiązanie wodorowe z seryną (Ser7.36) (Ryc. 3, praca **H8**). Ten sposób wiązania do receptora D₂, przypomina oddziaływanie w miejscu wiążącym arypiprazolu, który wykazuje, podobnie jak związek **34**, częściowy agonizm do receptora D₂. Dokowanie związku **34** i arypiprazolu, wykazało ich podobny sposób wiązania z receptorem D₂. Zarówno fragmenty arylopiperazyny, które przyjmują tą samą pozycję w kieszeni ortosterycznej, jak i fragmenty 8-piperydylo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (**34**) oraz 3,4-dihydroizochinolin-2-onu (arypiprazol), oddziałują w podobny sposób, tworząc wiązanie wodorowe z grupą hydroksylową seryny (Ser7.36) i w tej części miejsca wiążącego zajmują przestrzeń umiarkowanie hydrofobową, pomiędzy helisami (THMs) 2 i 7 (Ryc. 3C, praca **H8**). Przypuszczalnie, takie oddziaływanie powodują zmiany konformacyjne prowadzące do aktywacji receptora D₂.

2.2.9. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji

Reasumując, przeprowadzone multidyscyplinarne badania pozwoliły zweryfikować założoną hipotezę badawczą, wskazującą na celowość zastosowania farmakoforowego układu 1,3-dimetylo-puryno-2,6-dionu, jako bioizosteru terminalnego fragmentu amidowego, w strukturze ligandów badanych receptorów monoaminergicznych 5-HT/D₂.

Zaprojektowanie i synteza zróżnicowanych strukturalnie, we fragmencie terminalnego amidu, szeregu serii arylopiperazynyloalkilowych oraz tetrahydroizochinolinylloalkilowych pochodnych, obejmująca 169 związków, dała możliwość oceny zależności struktura-aktywność oraz wyselekcjonowanie licznych, silnych ligandów receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇ i D₂ oraz wieloreceptorowych ligandów 5-HT/D₂.

Analiza zależności struktura-aktywność receptorowa w poszczególnych grupach związków, pozwoliły sformułować następujące wnioski ogólne:

- 1) Wprowadzenie do struktury 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, połączonego przez łącznik alkilenowy, farmakoforowego fragmentu arylopiperazyny w położeniu 7 lub 8 tego układu – w obu przypadkach prowadzi do uzyskania ligandów receptorów monoaminergicznych 5-HT i /lub D₂.
- 2) Modyfikacje w obrębie układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, polegające na wprowadzeniu, obok fragmentu arylopiperazynyloalkilowego, dodatkowych podstawników o zróżnicowanych właściwościach lipofilowych, sterycznych oraz donorowo-akceptorowych (w tworzeniu wiązania wodorowego), wpływają zarówno na powinowactwo do badanych receptorów 5-HT/D₂ jak i profil funkcjonalny (agonizm/antagonizm).
- 3) W badanych seriach arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, uzyskano wielofunkcyjne ligandy o zróżnicowanym profilu funkcjonalnym (ago/antagonistycznym) w stosunku do receptorów 5-HT_{1A} (pełny agonista pre- i post-synaptyczny, częściowy agonista postsynaptyczny, agonista postsynaptyczny, antagonist postsynaptyczny), a także o cechach antagonistów receptorów 5-HT_{2A} i antagonistów receptorów 5-HT₇ oraz antagonistów bądź częściowych agonistów receptorów D₂.
- 4) Na podstawie przeprowadzonych badań behawioralnych *in vivo*, dla 11 wyselekcjonowanych ligandów, stwierdzono ich właściwości psychotropowe (przeciwłękowe i/lub przeciwdepresyjne a także przeciwpsychotyczne).
- 5) Zastąpienie aromatycznego układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu w strukturze badanych ligandów, diheterocyklicznym układem 1,3-dimetylopuryno-2,6,8-trionu, zmniejszało powinowactwo do badanych receptorów, zwłaszcza 5-HT_{1A} i 5-HT₇, natomiast wprowadzenie jako terminalnego fragmentu triheterocyklicznego układu dihydro[1,3]oksazolo[2,3-*f*]purynodionu spowodowało utratę aktywności receptorowej.

Analiza sposobu wiązania, przy pomocy modelowania cząsteczkowego, ligandów o strukturze długołańcuchowych arylopiperazyn, zawierających jako terminalny cykliczny amid układ 1,3-dimetylo-puryno-2,6-dionu, tłumaczy (na poziomie molekularnym) ich wysokie powinowactwo w badaniach biologicznych; do analizowanych miejsc wiążących receptora serotoninowego 5-HT_{1A} i dopaminowego D₂. Potwierdza również celowość zastosowania układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu jako

bioizosteru terminalnego fragmentu amidowego, w strukturze ligandów badanych receptorów monoaminergicznych.

Uzyskane informacje mogą mieć znaczenie dla poszerzenia wiedzy w zakresie określenia wpływu modyfikacji cyklicznego amidu na powinowactwo i aktywność wewnętrzną do receptorów 5-HT_{1A} i D₂, ligandów, które przez swoje oddziaływania np. steryczne, jonowe, hydrofobowe; mogą wywierać agonizm/antagonizm receptorowy.

Obserwowane efekty psychotropowe: przeciwłękowe, przeciwdepresyjne oraz przeciwpsychotyczne, obserwowane w badaniach behawioralnych u zwierząt, dla szeregu arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, a także korzystne efekty farmakokinetyczne – świadczą o potencjale tej klasy wielofunkcyjnych ligandów, jako kandydatów na nowoczesne leki wielocelowe, w terapii schorzeń psychiatrycznych.

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych oraz najbliższych planów naukowych

3.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Od początku zatrudnienia w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJCM moje prace badawcze związane były z tematyką poszukiwania substancji aktywnych biologicznie i dotyczyły syntezy chemicznej połączeń o potencjalnej aktywności, m.in. krążeniowej i przeciwdrgawkowej.

Pierwszym moim tematem badawczym była synteza chemiczna związków o spodziewanych właściwościach przeciwaritmicznych. Wprowadzając do układu 5,5-difenylohydantoiny (fenytoiny) fragment 3-amino-1-propanolu, występujący w strukturze leków przeciwaritmicznych, uzyskano związki o aktywności antyarytmicznej silniejszej od macierzystej struktury [73] (publikacja **D1**).

Syntezę połączeń o spodziewanym działaniu na układ krążenia, prowadziłam także w grupie 7,8-dipodstawionych pochodnych teofiliny (1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu) z chiralnymi lub achiralnymi 1,2-aminoalkoholami w położeniu 8, czego wynikiem było otrzymanie połączeń o aktywności przeciwaritmicznej lub hipotensyjnej i równocześnie niskiej toksyczności [74] (publikacja **D2**). Przeprowadzone badania wykazały, że przez modyfikację farmakoforowego układu fenytoiny czy teofiliny, polegającej na wprowadzeniu do ich struktur określonych podstawników, charakterystycznych dla związków o właściwościach krążeniowych, można wpływać na profil działania farmakologicznego. Połączeń cechujących się aktywnością krążeniową, poszukiwałam także w grupie aminoalkoholowych pochodnych 2-metyloksantonu. Wyniki badań farmakologicznych wykazały ich słabsze działanie przeciwaritmiczne od chinidyny, użytej jako związek referencyjny, ale jednocześnie niższą toksyczność [75] (publikacja **D5**).

Drugim nurtem moich prac badawczych było poszukiwanie związków o potencjalnej aktywności farmakologicznej w grupie pochodnych kwasów difenylomidazolidyno-2,4-diono- oraz difenylomidazolidyno-4-ono- octowego i propionowego. Pozwoliły one wyselekcjonować w badanej grupie kwas 1-benzylo-5,5-difenylo-3-imidazolidyno-2,4-dionooctowy o właściwościach przeciwdrgawkowych, przeciwdepresyjnych i przeciwlękowych [76] (publikacja **D3**).

W związku z rozwojem w kraju, w latach dziewięćdziesiątych, obszaru badań, jakim było poszukiwanie ligandów receptorów serotoninowych, zwłaszcza 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, zostałam włączona w tą tematykę badawczą. Szczególnie istotne znaczenie, dla wzbogacenia mojego doświadczenia w dziedzinie badań receptorowych, miał staż naukowy, który odbyłam w latach 1994-1995 w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, pod kierunkiem Prof. dr hab. Jerzego L. Mokrosza i opieką dr Sijki Charakchievej-Minol. Prowadzone przeze mnie badania, oprócz syntezy chemicznej ligandów receptorów serotoninowych, głównie typu 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, dotyczyły także badań farmakologicznych i polegały na określaniu powinowactwa i selektywności wobec receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, związków z różnych grup chemicznych, techniką radioizotopową *in vitro*. Poznanie tej tematyki badawczej, także od strony warsztatu eksperymentalnego, dało mi lepsze zrozumienie obszaru badań nad ligandami receptorów monoaminergicznych.

Pierwsze moje badania syntetyczne, związane z poszukiwaniem ligandów receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, dotyczyły pochodnych 1-arylopiperazyny, zawierających jako terminalny fragment heterocykliczny układ pirymidopuryny lub 1,3-diazepinopuryny, oraz łącznik tri- lub tetrametylenowy [77] (publikacja **D4**). W badanej grupie związków, otrzymano silne ligandy receptorów 5-HT_{1A} o zróżnicowanej selektywności względem receptorów 5-HT_{2A}. Budowa anelowanego do układu puryny pierścienia heterocyklicznego, miała wpływ na powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}. Pochodne pirymidynopuryny z łącznikiem 4-węglowym były preferowane dla powinowactwa do tego typu receptorów. W testach funkcjonalnych *in vivo* (syndrom behawioralny po podaniu 8-OH-DPAT (2-di-*n*-propyloamino)tetraliny) u rezerpinowanych szczurów, test opadnięcia dolnej wargi szczura, indukowana 8-OH-DPAT hipotermia u myszy), selektywne ligandy wykazały cechy postsynaptycznych antagonistów lub częściowych, postsynaptycznych agonistów receptorów 5-HT_{1A} [77] (publikacja **D4**).

Również na tym etapie pracy naukowej, moje badania skupiły się wokół 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (teofiliny), wykazującej, wśród pokrewnych metyloksantyn, najwyższą aktywność farmakologiczną. Pochodne tego układu są przedmiotem moich zainteresowań badawczych do chwili obecnej. Mając na uwadze wielokierunkowy mechanizm działania farmakologicznego teofiliny, a także liczne przykłady wskazujące na możliwość uzyskania, w wyniku modyfikacji jej struktury, głównie przez wprowadzenie różnego rodzaju podstawników w położenie 7 lub 7,8, związków o ukierunkowanym działaniu krążeniowym, bronchospazmolitycznym i przeciwhistaminowym – podjęłam syntezę jej nowych pochodnych. W projektowaniu tych związków brałam pod uwagę wyniki wcześniejszych badań chemiczno-farmakologicznych prowadzonych w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM w grupie 7-(2-hydroksy-3-piperazylo)propylowych oraz 7-dihydroksypropylo-8-aminowych pochodnych teofiliny, w wyniku których uzyskano szereg aktywnych krążeniowo połączeń [78, 79]. Otrzymane 7-fenoksypiperazylopropylowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu oraz 8-pirydyloaminoamino pochodne, ze zróżnicowanymi podstawnikami aminowymi we fragmencie 3-amino-2-propanolu w położeniu 7 tego układu były badane w kierunku ich aktywności przeciwartymicznej i hipotensyjnej *in vivo*, oraz działania stabilizującego mastocyty *in vitro*. Pozwoliło to na wyselekcjonowanie dichlorowodoru 7-[2-hydroksy-3-(4-fenoksyetylopiiperazylo)propylo]-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (CH-1) o aktywności hipotensyjnej oraz przeciwartymicznej. Dla przedstawionych serii związków, wykonałam badania receptorowe, określając powinowactwo i selektywność do ośrodkowych receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. Badania te, wykonane podczas odbywanego stażu w Instytucie Farmakologii, wzbogaciły moją pracę doktorską. Przedstawione powyżej badania syntetyczne oraz badania receptorowe, stały się przedmiotem mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Synteza oraz właściwości farmakologiczne piperazynowych i pirydylowych pochodnych teofiliny”, której promotorem był Prof. dr hab. Alfred Zejc. Pracę tą obroniłam w marcu 1996 roku, uzyskując stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Nawiązaną współpracę naukową z Zakładem Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, kierowanym wówczas przez Prof. dr hab. Jerzego L. Mokrosza. oraz Zakładem Badań Nowych Leków IF PAN, kierowanym przez Prof. dr hab. Ewę Chojnacką-Wójcik, kontynuowałam po uzyskaniu stopnia doktora.

Byłam także wykonawcą grantu finansowanego przez KBN/MNiSW i wykonawcą projektu naukowego subsydiowanego przez UJCM.

3.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, moja aktywność naukowa związana była całościowo z projektowaniem i syntezą nowych 7-podstawionych lub 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu (teofiliny) o zróżnicowanej aktywności biologicznej.

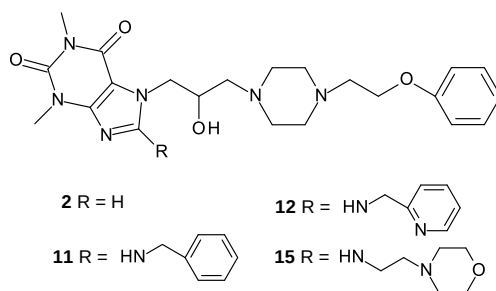
Badania te prowadziłam w trzech głównych grupach tematycznych:

1. Poszukiwania nowych połączeń o potencjalnej aktywności krążeniowej (przeciwyrtmicznej i/lub hipotensyjnej) w grupie 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu.
2. Badania chemiczno-farmakologiczne w grupie 8-alkoksylowych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, ze zróżnicowanymi podstawnikami (o charakterze kwasu, estru, amidu oraz hydrazynu) w położeniu 7, o przewidywanym działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym.
3. Poszukiwania ligandów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} w grupie 8-arylopiperazynyloalkiloaminowych pochodnych 7-podstawionego 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu.

Ad1.

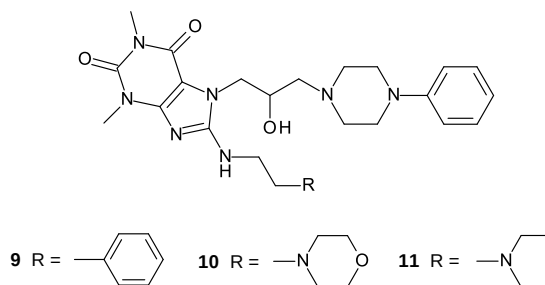
Wyniki badań farmakologicznych dla zsyntetyzowanych w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, wskazujące na możliwość znalezienia wśród 7,8-dipodstawionych tego układu związków o ukierunkowanej aktywności krążeniowej [78, 79] skłaniały do podjęcia dalszych badań w tej grupie połączeń. W wyniku przemian 7-(2-hydroksy-3-chloro)propylo-8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu otrzymałam serię pochodnych z ugrupowaniem fenoksyetylopiperazynylohydroksypropylowym w położeniu 7 i podstawnikiem o charakterze różnie podstawionej aryloalkiloaminy lub aminoalkiloaminy (lub I-rzędowej aminy) w położeniu 8. Połączenia te, w postaci chlorowodorków, badano w kierunku ich wpływu na przepływ wieńcowy, EKG, aktywność przeciwyrtmiczną i hipotensyjną; oznaczono również powinowactwo do receptorów α_1 - i α_2 -adrenergicznych [42] (publikacja **D9**). Chcąc zoptymalizować rodzaj podstawnika w położeniu 8, zaprojektowaną serię 7,8-dipodstawionych testowano w odniesieniu do analogu 8-niepodstawionego, zawierającego identyczny podstawnik w położeniu 7.

7-Monopodstawiona (**2**) oraz jej analog z podstawnikiem morfolinyloetyloaminowym w położeniu 8 (**15**), wykazały bardzo silne profilaktyczne działanie antyarytmiczne w eksperymentalnej arytmii u zwierząt (ED_{50} = 3,5 oraz 3,6 mg/kg), natomiast pochodne 8-benzyloaminowa (**11**) oraz 8-pirydyloetyloaminowa (**12**), działały hipotensyjnie (**Rycina 15**). Badane związki nie wykazały znaczącego powinowactwa do receptorów adrenergicznych [42] (publikacja **D9**).



Rycina 15. Wzory strukturalne pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu o aktywności krążeniowej [42] (publikacja **D9**)

Kontynuację moich zainteresowań badawczych, związanych z poszukiwaniem związków o potencjalnym działaniu krążeniowym, stanowiły badania nad zależnością pomiędzy strukturą a aktywnością krążeniową w grupie 7,8-dipodstawionych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, w których fragment fenoksyetylowy podstawnika w położeniu 7 został zastąpiony pierścieniem fenylovym, ugrupowaniem benzylovym lub hydroksyetylovym. Inną modyfikację stanowiły pochodne, w których fenoksyetylopiperazyna została zastąpiona alifatycznym ugrupowaniem 2-dietyloaminoetyloaminowym występującym m.in. w strukturze prokainamidu, znanego leku przeciwaritmicznego [43] (publikacja **D10**). Analogicznie jak w związkach opisanych w publikacji **D9** [42] podstawnik w położeniu 8 stanowiły różnie podstawione ugrupowania aryloalkiloaminowe lub aminoalkiloaminowe. Dla przedstawionej serii związków, określono wpływ na EKG, właściwości przeciwaritmiczne (w arytmii adrenalinowej i barowej), hipotensyjne, oraz powinowactwo do receptorów α_1 - i α_2 -adrenergicznych. Profilaktyczną aktywność przeciwaritmiczną w arytmii adrenalinowej wykazały pochodne **9-11** z podstawnikiem 7-[2-hydroksy-3-(4-fenylpiperazylo)propylovym (**Rycina 16**). Aktywność ta była najsilniej zaznaczona w przypadku analogu z podstawnikiem morfolinyloetyloaminowym w położeniu 8 ($\text{ED}_{50} = 3,9 \text{ mg/kg}$; $\text{TI} = 59,8$), co może wskazywać, że ten podstawnik jest preferowany dla aktywności przeciwaritmicznej. Analog z podstawnikiem 8-(2-dietyloamino)etyloaminowym (**11**) wykazywał również efekt hipotensyjny. Aktywne przeciwaritmiczne związki **9-11** wykazały umiarkowane lub słabe powinowactwo do receptorów α_1 ($K_i = 0,143\text{-}0,383 \text{ }\mu\text{M}$) oraz α_2 -adrenergicznych ($K_i = 0,38\text{-}2,7 \text{ }\mu\text{M}$) [43] (publikacja **D10**).



Rycina 16. Wzory strukturalne pochodnych 1,3-dimetylo-puryno-2,6-dionu o aktywności krążeniowej [43] (publikacja **D10**)

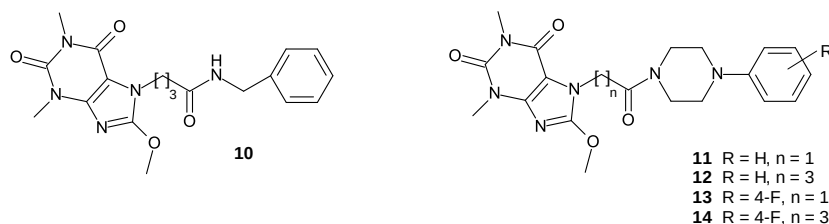
Przeprowadzone badania wykazały, że modyfikacja układu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, przez wprowadzenie określonych podstawników w położenia 7 i 8, może prowadzić do związków o bardziej ukierunkowanym działaniu i korzystnych parametrach, wpływających na funkcję układu sercowo-naczyniowego.

Ad 2.

Drugim obszarem moich zainteresowań badawczych, po uzyskaniu stopnia doktora, było poszukiwanie w grupie 7,8-dipodstawionych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, związków o aktywności przeciwbólowej i/lub przeciwzapalnej, zbliżonej do niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Przesłanką dla tego typu badań chemiczno-farmakologicznych, były wcześniejsze doniesienia literaturowe, wskazujące na aktywność przeciwbólową 4-arylopiperazynyloalkilowych pochodnych różnych układów heterocyklicznych np. benzoksazolinonu [80], oksazolopirydynonu [81, 82], pirolo-3,4-dikarboksamidu [83] oraz izotiazolopirydyny [84]. Także 7-(4-arylopiperazynylo)alkilowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu wykazały w testach *in vivo*, silne działanie przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i przeciwzapalne [85]. Powyższe dane literaturowe a także struktura leków z grupy NLPZ, które są pochodnymi różnych układów heterocyklicznych i aromatycznych, mających w swej budowie wolną grupę karboksylową/enolową lub ugrupowania o charakterze prekursorów grupy karboksylowej (estry, amidy), stanowiły punkt wyjścia do zaprojektowania struktury nowych związków.

Związki te mają strukturę estrów i amidów (benzyloamidów i 4-fenylpiperazynoamidów) kwasów 1,3-dimetylopuryno-2,6-dion-7-yl- octowego i masłowego. W wyniku przemian estrów etylowych kwasów 8-bromo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dion-7-yl- octowego i masłowego, opisaną przeze mnie w pracy **H1** metodą, uzyskano odpowiednie 8-metoksyłowe pochodne, a w wyniku dalszych przemian chemicznych, kolejne związki badanej serii. Aktywność przeciwbólową określono *in vivo* w dwóch testach: „przeciągania się” i formalinowym, u myszy. W celu zbadania wpływu podstawnika metoksyłowego w położeniu 8, serię testowano w odniesieniu do pochodnej 8-okso-puryno-2,6-dionu z dodatkową funkcją kwasową w formie tautomerycznego ugrupowania keto-enolowego, a także pochodnych 8-metoksyłowych z wolną grupą karboksylową [86] (publikacja **D13**). W tym samym celu zsyntetyzowano także 8-alkoksyłowe (metoksyłowe, etoksyłowe, propoksyłowe) analogi 7-metylo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu o różnej długości łańcucha alkilowego.

Najwyższą aktywność przeciwbólową, silniejszą niż kwas acetylosalicylowy (ASA), użyty jako związek referencyjny (do 23 razy w teście „przeciągania się” i do 36 razy w teście formalinowym), miały pochodne amidowe **10 – 14 (Rycina 17)** [86] (publikacja **D13**)



Rycina 17. Wzory strukturalne pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu o aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej [86, 87] (publikacje **D13**, **D22**)

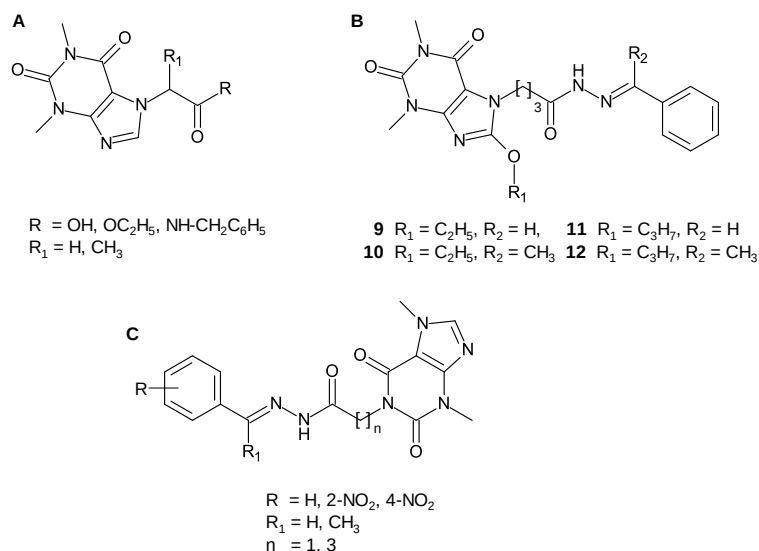
Badane związki były aktywne w II fazie testu formalinowego i tym samym wykazały działanie przeciwzapalne, charakterystyczne dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu ich działania przeciwbólowego i przeciwzapalnego, badając wpływ na aktywność fosfodiesterazy *in vitro*, przez oznaczenie hamowania rozkładu cAMP w homogenacie wątroby szczura (Lonce cAMP test). Niektóre z aktywnych przeciwbólowo związków, silniej niż teofilina, stosowana jako związek odniesienia, hamowały aktywność fosfodiesterazy, co może sugerować, że ten mechanizm może być brany pod uwagę w wyjaśnieniu mechanizmu ich działania przeciwbólowego [86] (publikacja **D13**). W toku kolejnych badań farmakologicznych, opisanych w publikacji [87] (publikacja **D22**), dla aktywnych związków powyższej serii, zbadano ich działanie przeciwzapalne w testach *in vivo* (karageninowy, zapalenie otrzewnej wywołane zymozanem), a także określono hamujący wpływ na poziom TNF- α u szczura z endotoksemią [87; **D22**]. Przeprowadzone badania potwierdziły silne działanie przeciwzapalne związków z ugrupowaniem benzyloamidowym oraz 4-fenylopiiperazynoamidowym. Wykazały również, że badane 8-alkoksyłowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu mogą stanowić nową klasę związków o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym [86, 87] (publikacje **D13**, **D22**).

Połączeń o aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej poszukiwałam także w grupie kwasów 1,3-dimetylo-2,6-dioksopuryn-7-ylo-octowego oraz 2-propionowego, także ich pochodnych o charakterze estrów etylowych lub benzyloamidów (A; **Rycina 18**) [46] (publikacja **D11**). Związki te, pod względem strukturalnym, stanowiły 8-niepodstawione analogi opisanej w publikacji **D13** serii 8-alkoksyłowych pochodnych. Aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną oceniono w kilku testach *in vivo* („przeciągania się” u myszy, formalinowym, karageninowym oraz zapalenia otrzewnej wywołanym zymozanem). Badane związki wykazały wyraźne działanie przeciwzapalne, silniejsze od ketoprofenu, użytego jako związek referencyjny (test karageninowy). Najwyższą aktywność wykazał kwas 1,3-dimetylo-2,6-dioksopuryn-7-ylo-octowy, który działał silniej od ASA w teście „przeciągania się” u myszy. Związek ten najsilniej hamował aktywność fosfodiesteraz (PDE) i był silniejszym od rolipramu, inhibitorem PDE4B [46] (publikacja **D11**).

Interesujące wyniki przeprowadzonych badań chemiczno-farmakologicznych, wskazujące na wysoką aktywność przeciwbólową amidowych pochodnych kwasów 1,3-dimetylopuryno-2,6-diokso-7-alkilowych, uzasadniały kontynuację poszukiwań w tej grupie związków. Zaprojektowałam serię 8-alkoksy-1,3-dimetylo-2,6-dioksopuryn-7-ylo podstawionych aceto- i butyrylohydrazydów [88] (publikacja **D16**). Przesłanką dla podjęcia tych badań były także doniesienia literaturowe, wskazujące na aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną hydrazydowych pochodnych różnych układów aromatycznych i heterocyklicznych. W porównaniu do opisanych w publikacjach [86, 87] (publikacje **D13**, **D22**) pochodnych, fragment amidowy zastąpiono hydrazydowym lub *N*-arylidenohydrazydowym (*N*-benzylidenohydrazydowym lub *N*-fenetyloetylidenohydrazydowym). Różnica dotyczyła także podstawnika w położeniu 8. W przypadku pochodnych tej serii, ugrupowanie metoksyłowe zastąpiono bardziej lipofilowym ugrupowaniem etoksyłowym i propoksyłowym. Analogicznie jak w poprzednich seriach związków, aktywność przeciwbólową testowano *in vivo* w testach „przeciągania się” i formalinowym u myszy. Zastąpienie fragmentu amidowego ugrupowaniem hydrazydowym, zachowało aktywność przeciwbólową w przypadku związków **9-12** z podstawionym ugrupowaniem

N-arylideno-hydrazidowym (B; **Rycina 18**). Wśród tego typu związków, otrzymano pochodne o silniejszej od ASA aktywności przeciwbólowej. Brak efektów w teście gorącej płytki, potwierdziło ich obwodowy mechanizm działania przeciwbólowego. Dla reprezentantów tej serii określono wpływ na poziom TNF- α u szczura z endotoksemią. Wyniki potwierdziły ich aktywność w tym teście, zbliżoną do teofiliny [88] (publikacja **D21**).

Fragment poszukiwań związków o aktywności przeciwbólowej stanowią także pochodne kwasów 3,7-dimetylo-2,6-dioksopuryn-1-ylo-octowego i masłowego o charakterze estrów, benzyloamidów, niepodstawionych lub podstawionych ugrupowaniami aryldenowymi hydrazidów [47] (publikacja **D12**). Większość związków wykazała silniejszą od ASA aktywność przeciwbólową w teście „przeciągania się” u myszy. Dla najbardziej aktywnych związków (C; **Rycina 18**) ED₅₀ mieściła się w granicach 2,3-8,7 mg/kg (ED₅₀ dla ASA wynosiła 39,1 mg/kg). Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać istotną rolę ugrupowania *N*-arylideno-hydrazidowego dla aktywności przeciwbólowej, w porównaniu do pochodnych z ugrupowaniem estrowym, benzyloamidowym, niepodstawionym fragmentem hydrazidowym lub wolną grupą karboksylową [47] (publikacja **D12**).



Rycina 18. Wzory strukturalne pochodnych 1,3-dimetylo- oraz 3,7-dimetylo-puryno-2,6-dionu o aktywności przeciwbólowej: A [46; **D11**], B [88; **D16**], C [47; **D12**]

Ad 3.

Kolejnym tematem moich badań były prace, prowadzone w ramach grantów finansowanych przez KBN/MNiSW w latach 1994-1997 oraz 2000-2002, dotyczące poszukiwania nowych ligandów receptorów serotoninowych w grupie 8-arylopiperazynyloalkilaminowych pochodnych 1,3-dimetylo-puryno-2,6-dionu z podstawnikiem o zróżnicowanej lipofilowości w położeniu 7. Podstawnik ten stanowiły ugrupowania alkilowe o różnej długości łańcucha alifatycznego lub podstawniki o charakterze estrów kwasów alifatycznych [39] (publikacja **D6**). Związki te można traktować jako otwarte analogi ligandów receptorów 5-HT_{1A} w grupie arylopiperazynylowych pochodnych 1,3-diazepinopuryny [77] (publikacja **D4**).

Obecność w strukturach badanych połączeń cyklicznego amidu, połączonego poprzez łącznik alkilenowy z fragmentem 1-arylopiperazyny, obecnym m.in. w strukturze buspironu czy ipsapironu – silnych ligandów receptorów 5-HT_{1A} o właściwościach przeciwlękowych i przeciwdepresyjnych, stanowiła podstawę do badania tego typu pochodnych w kierunku ich powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. Wykazano również, że układ cyklicznego amidu/imidu w ligandach 5-HT_{1A}, wzorowanych na strukturze buspironu, bierze udział w stabilizacji kompleksu ligand-receptor, zarówno poprzez oddziaływania π -elektronowe jak i typu dipol-dipol.

W przeprowadzonych badaniach radioizotopowych *in vitro* wykazano, że pochodne te charakteryzują się umiarkowanym lub niskim powinowactwem do receptorów 5-HT_{1A} (K_i w granicach 100-457 nM) jak i 5-HT_{2A} (K_i w granicach 179-1010 nM). Najwyższe powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} wykazał związek z lipofilowym podstawnikiem n-butylovym [39] (publikacja **D6**).

Mając to na uwadze, w dalszych badaniach postanowiono modyfikować podstawnik w położeniu 7 przez wprowadzenie prostych lub rozgałęzionych podstawników aryloalkilowych o różnej długości łańcucha alkilowego [40] (publikacja **D7**). Ponadto, modyfikowano fragment arylopiperazyny przez wprowadzenie podstawników 2-metoksy- lub 3-chloro- do pierścienia fenyłowego. W grupie tej uzyskano silne ligandy receptorów 5-HT_{1A} (K_i = 8-50 nM) o równocześnie umiarkowanym powinowactwie do receptorów 5-HT_{2A} (K_i = 115-449 nM), które w badaniach funkcjonalnych *in vivo* wykazały profil antagonistów postsynaptycznych receptorów 5-HT_{1A}. Badania te wskazywały również na korzystny wpływ podstawników o zwiększonej aromatyczności i lipofilowości, na powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} [40] (publikacja **D7**).

Omówione powyżej związki, jako jedno z wielu arylopiperazynyloalkilowych pochodnych różnych układów heterocyklicznych, zostały użyte do opracowania chromatograficznego modelu, z zastosowaniem faz stacjonarnych impregnowanych syntetycznymi peptydami, służącego do wstępnej oceny powinowactwa do receptora 5-HT_{1A} [41] (publikacja **D8**). Badania te oparto na założeniu, że ten sam rodzaj podstawowych oddziaływań międzycząsteczkowych (jonowych, hydrofobowych, wiązań wodorowych) warunkuje zachowanie substancji chemicznej, zarówno w układzie biologicznym jak i chromatograficznym [89]. Uzyskane wyniki badań pozwoliły wysunąć hipotezę, że opracowany model TLC z fazami impregnowanymi syntetycznym peptydem ADVL, może stanowić narzędzie do wstępnej selekcji potencjalnych ligandów receptorów 5-HT_{1A} [41] (publikacja **D8**).

Jednym z ostatnich moich tematów badawczych, związanych z projektowaniem i syntezą nowych ligandów receptorów monoaminergicznych (serotoninowych i dopaminowych), były badania w grupie N-4-arylopiperazynyloalkiloamidowych pochodnych kwasów 1,3-dimetylo-2,6-dioksopuryn-7-ylo-octowego oraz 3,7-dimetylo-2,6-dioksopuryn-1-ylo-octowego, jako potencjalnych ligandów receptorów serotoninowych 5-HT₆, 5-HT₇ oraz dopaminowych D₂ [90] (publikacja **D19**). Badania te oparto na założeniu, że związki wykazujące mieszany profil; 5-HT₆/5-HT₇/D₂ receptorowy, mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób psychicznych (schizofrenii, depresji), oraz wykazywać równocześnie korzystne efekty prokognitywne. Analiza zależności struktura-powinowactwo receptorowe, dotyczyła długości łańcucha alkilowego pomiędzy zasadowym atomem azotu piperazyny a atomem azotu ugrupowania amidowego, oraz rodzaju fragmentu aminowego, który podobnie jak

w aripiprazolu czy zyprazydonie, stanowiła 2,3-dichlorofenylopiiperazyna lub benzoizotiazolo-piperazyna. W badanej grupie uzyskano mieszane ligandy receptorów 5-HT₆/D₂ (K_i = 14-22 nM) oraz ligandy D₂ receptorowe. Dla aktywności 5-HT₆/D₂ istotny był 3-węglowy łącznik alkilenowy oraz podstawnik 2,3-dichlorofenylopiiperazynowy, natomiast rodzaj terminalnego fragmentu 1,3-dimetylo- lub 3,7-dimetylopuryno-2,6-dionu, nie był tak jednoznacznie określony [90] (publikacja **D14**).

Równolegle do prowadzonych prac badawczych w latach 2008-2013 byłam wykonawcą zadania syntetycznego w projekcie współfinansowanym przez firmę farmaceutyczną Adamed i NCBIr, którego celem było „Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – schizofrenii, depresji, lęku”. Udział w tym projekcie wzbogacił moje doświadczenie w zakresie wiedzy syntetycznej oraz farmakologii OUN. Szczególną rolę w tym względzie odegrała współpraca naukowa z Zakładem Farmacji Klinicznej UJCM, kierowanym przez Prof. dr hab. Annę Wesołowską, którą kontynuowałam w projektach badawczych będących przedmiotem osiągnięć stanowiących podstawę habilitacji [publikacje **H2, H4, H5, H7 i H8**].

3.3. Najbliższe plany naukowe

Aktualnie, moje plany naukowe związane są przede wszystkim z realizacją dwóch grantów naukowych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki.

Pierwszy, znajdujący się w trakcie realizacji projekt, w którym uczestniczę jako wykonawca, dotyczy poszukiwań nowych związków o potencjalnej aktywności psychotropowej w grupie mono-, di- i tri-heterocyklicznych pochodnych azolowych, jako kombinowanych ligandów receptorowych i inhibitorów fosfodiesteraz. Postawiona hipoteza badawcza dotyczy możliwości otrzymania w grupie związków, których struktura cząsteczki stanowi hybrydę dwóch układów farmakoforowych – ligandów o wielocelowym działaniu psychotropowym, łączącym receptory 5-HT_{1A} i 5-HT₇ (zaangażowane w działanie leków antydepresyjnych i atypowych neuroleptyków) z hamowaniem izoenzymów fosfodiesterazy 4 i 10 (PDE4, PDE10). Ze względu na występowanie PDE4 i PDE10 w rejonach mózgu kojarzonych z miejscem działania leków psychotropowych, postuluje się, że ich inhibitory mogą mieć znaczenie terapeutyczne w leczeniu schorzeń psychicznych. Jedną z zaplanowanych serii związków, są syntetyzowane przeze mnie 8-alkoksylowe pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu z fragmentem arylopiiperazynyloalkilowym lub bicykloaminoalkilowym w położeniu 7. Przedmiotem szerokich badań chemiczno-farmakologicznych jest określenie zależności pomiędzy strukturą badanych związków a zaobserwowanym profilem aktywności farmakologicznej (powinowactwo receptorowe, aktywność wobec enzymów, aktywność w zwierzęcych modelach schizofrenii, depresji i lęku).

W ciągu najbliższych lat, będę również zaangażowana, jako główny wykonawca, w projekt pt. „Nowe dualne inhibitory PDE4 i PDE7 w grupie pochodnych puryny i deazapuryny – perspektywa dla terapii chorób o podłożu autoimmunologicznym”. W ramach projektu planowane jest zweryfikowanie hipotezy dotyczącej możliwości opracowania nowych inhibitorów fosfodiesterazy 4 i 7 (PDE4/7), zawierających w swej strukturze układ puryny i deazapuryny, które będą posiadać zdolność hamowania produkcji TNF- α i wykazywać skuteczność w eksperymentalnych modelach chorób

zapalnych i autoimmunologicznych. Leczenie tych chorób, do których zalicza się m.in. stwardnienie rozsiane, łuszczycę, reumatoidalne zapalenie stawów, jest obecnie głównie objawowe. Z uwagi na brak skutecznej terapii tych schorzeń, selektywne inhibitory specyficznych dla cAMP fosfodiesteraz 4 i 7, zwiększające poziom tego nukleotydu w komórkach immunologicznych, stanowią obiecującą opcję terapeutyczną.

Do tej pory, istnieje niewiele danych na temat dualnych inhibitorów PDE4/7, zwłaszcza w grupie analogów puryn. Stąd próba opracowania tego typu związków, w oparciu o struktury puryny i deazapuryny, jest podejściem innowacyjnym z punktu widzenia chemii medycznej. Co więcej, brak jest danych eksperymentalnych na temat właściwości farmakologicznych takich związków w testach *in vivo*. Jak wynika z danych literaturowych, zarówno inhibitory PDE4 jak i PDE7 charakteryzują się zazwyczaj słabą rozpuszczalnością, stąd także dane na temat ich właściwości farmakokinetycznych są ograniczone. Natomiast informacje te są istotne z punktu widzenia wyboru dawki do badań farmakologicznych, pozwalającej uzyskać odpowiednie stężenia tych związków w miejscu działania. Zarówno selektywne inhibitory PDE7 jak i dualne PDE4/7 stanowią nową grupę związków biologicznie aktywnych, wymagającą głębszego poznania pod względem istotnych elementów farmakoforowych oraz mechanizmów ich oddziaływania z celem molekularnym, jak również pod kątem ich właściwości farmakokinetycznych.

Związki będą badane *in vitro* w kierunku hamowania produkcji TNF- α w stymulowanej LPS krwi szczurzej, oraz pod kątem hamowania fosfodiesterazy 4 i 7, także innych, zależnych od cAMP izoenzymów PDE (PDE3, PDE10), celem oceny selektywności. Najaktywniejsze pochodne będą badane w testach *in vivo*, w modelach dwóch chorób z autoagresji, takich jak: zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego, odpowiadające ludzkiemu stwardnieniu rozsianemu, oraz indukowane kolagenem zapalenie stawów u szczura, jako model reumatoidalnego zapalenia stawów u ludzi. Prowadzone będą także badania toksykologiczne. Ponadto, ocenie zostanie poddana farmakokinetyka tych związków po podaniu doustnym i dootrzewnowym. Badania te będą wykonywane przy współpracy z Zakładem Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej UJCM kierowanym przez Prof. UJ dr hab. Elżbietę Wyskę. Projekt jest multidyscyplinarny i w pierwszym etapie obejmuje zaprojektowanie i syntezę szeregu serii związków, z których znaczną część stanowią pochodne puryno-2,6-dionu lub puryno-2,6,8-trionu, ze zróżnicowanymi podstawnikami w pozycji 7 i 8. Zaplanowane, oraz będące wynikiem optymalizacji, modyfikacje strukturalne, dostarczą nowej wiedzy na temat roli układu imidazopirydyny oraz rodzaju podstawników (np. o właściwościach hydrofobowych, sterycznych, czy charakterze donorów/ akceptorów wiązań wodorowych) w oddziaływaniach z miejscem wiążącym PDE4/7.

Kierunkiem badań, który również planuję kontynuować w ciągu najbliższych lat, jest poszukiwanie związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii bólu, w tym neuropatycznego. Przesłanką dla zaprojektowanych, nowych związków, były prowadzone przeze mnie wcześniejsze badania kilku serii 7,8-dipodstawionych pochodnych 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, wskazujące na możliwość znalezienia w tej grupie szeregu aktywnych przeciwbólowo połączeń [46, 47, 86, 87, 88, 91] (publikacje **D11**, **D12**, **D13**, **D22**, **D16**, **D15**). Badane pochodne wykazały działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne, m.in. w teście formalinowym, w którym efekt bólowy wiąże się z aktywowaniem

kanałów związanych z receptorami przejściowego potencjału – TRP (ang. Transient Receptor Potential), głównie podtypu TRPA1. Antagoniści tych kanałów są obiektem badań, jako potencjalne leki w terapii bólu neuropatycznego i zapalnego. W fazie badań klinicznych znajdują się pochodne 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, m.in. HC030031 (2-(1,3-dimetylo-2,6-dioxo-4,5-dihydropuryn-7-yl)-N-(4-izopropylfenylo)-acetamid), w którego strukturze występuje ugrupowanie o charakterze anilidowym.

Celem projektu jest otrzymanie nowych, anilidowych oraz *N*-benzyloamidowych pochodnych 8-alkoksy-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu, stanowiących pod względem strukturalnym, bliskie analogi związku HC030031, które mogą wykazywać aktywność przeciwbólową w modelu formalinowym.

Planowane badania farmakologiczne nowej serii związków, dotyczyć będą także określenia właściwości antagonizowania kanałów TRPA1. Ponadto, z uwagi na podobieństwo strukturalne zaplanowanych związków do pochodnych metyloksantyn teofiliny i pentoksyfiliny (1-(5-oksoheksylo)-teobrominy), które są znanymi inhibitorami TNF- α , dla zaprojektowanej serii określona zostanie zdolność hamowania produkcji TNF- α jako głównego markera procesu zapalnego.

Grażyna Cholewa-Rzepa

4. Piśmiennictwo

1. W. Rossler, H.J. Salize, J. van Os, A. Riecher-Rossler: Size of burden of schizophrenia and psychotic disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2005, 15, 399-409.
2. P. Willner, J. Scheel-Kruger, C. Belzung: The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2013, 37, 2331-2371.
3. I. Mahar, F.R. Bambico, N. Mechawar, J.N. Nobrega: Stress, serotonin and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2014, 38, 173-192.
4. S. Carson, M.S. McDonagh, K. Peterson: A systematic review of the efficacy and safety of atypical antipsychotics in patients with psychological and behavioural symptoms of dementia. *J. Am. Geriatr.* 2006, 54, 354-361.
5. C.P. Ferri, M. Prince, C. Brayne et al.: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 2005, 366, 2112-2117.
6. T.R. Insel: Rethinking schizophrenia. *Nature*, 2010, 468, 187-193.
7. M.A. Morozova, T.A. Lepilkina, G.E. Rupchev et al.: Add-on clinical effects of selective antagonist of 5-HT₆ receptors AVN-214 (CD-008-0173) in patients with schizophrenia stabilized on antipsychotic treatment: pilot study. *CNS Spectr.* 2013, 17, 1-8.
8. D.C. Goff, M. Hill, D. Barch: The treatment of cognitive impairment in schizophrenia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2011, 99, 245-253.
9. P.F. Buckley, B.J. Miller, D.S. Lehler et al.: Psychiatric comorbidities and schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 2009, 35, 383-402.
10. J-U. Peters: Polypharmacology – foe or friend? *J. Med. Chem.* 2013, 56, 8955-8971.
11. A.L. Hopkins: Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* 2008, 4, 682-690.
12. H.Y. Meltzer, S. Matsubara, J.C. Lee: Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin 2 pKi values. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 8, 631-641.
13. N. Divac, M. Prostran, I. Jakovcevski, N. Cerovac: Second-generation antipsychotic and extrapyramidal adverse effects. *Biomed Res. Int.* 2014, 656370.
14. J. Geddes, N. Freemantle, P. Harrison, P. Bebbington: Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia systematic overview and meta-regression analysis. *Br. Med. J.* 2000, 321, 1371-1376.
15. S. Butini, S. Gemma, G. Campiani et al.: Discovery of a new class of potential multifunctional atypical antipsychotic agents targeting dopamine D₃ and serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors: design, synthesis and effects on behavior. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 151-169.
16. M-L.G. Wadenberg: Bifeprunox: a novel antipsychotic agent with partial agonist properties at dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Future Neurol.* 2007, 2, 153-165.

17. A. Newman-Tancredi, M.S. Kleven: Comparative pharmacology of antipsychotics possessing combined dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{1A} receptor properties. *Psychopharmacology*, 2011, 216, 451-473.
18. Y. Tadori, T. Miwa, K. Tottori et al.: Aripiprazole's low intrinsic activities at human dopamine D_{2L} and D_{2S} receptors render it a unique antipsychotic. *Eur. J. Pharmacol.* 2005, 515, 10-19.
19. J.K. McGawin, K.L. Goa: Aripiprazole. *CNS Drugs*, 2002, 16, 779-786.
20. P. Zajdel, A. Partyka, K. Marciniak et al.: Quinoline- and isoquinoline-sulfonamide analogs of aripiprazole: novel antipsychotic agents? *Future Med. Chem.* 2014, 6, 57-75.
21. M.J. Millan: Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin 5-HT_{1A} receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 295, 853-861.
22. O. Agid, S. Kapur, G. Remington: Emerging drugs for schizophrenia. *Expert Opin. Emerging Drugs*, 2008, 13, 479-495.
23. H.Y. Meltzer, T. Sumiyoshi: Does stimulation of 5-HT_{1A} receptors improve cognition in schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 2008, 195, 98-102.
24. J.E. Leysen: 5-HT_{2A} receptors. *Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord.* 2004, 3, 11-26.
25. D.M. Weiner, E.S. Burstein, N. Nash et al.: 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptor inverse agonists as antipsychotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 299, 268-276.
26. H.Y. Meltzer: The role of serotonin in antipsychotics drug action. *Neuropsychopharmacology*, 1999, 21, 106-115.
27. J.J. Balsara, S.A. Jadhav, R.J. Gaorkan et al: Effects of the antidepressant trazodone, a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist, on dopamine-dependent behaviors in rats. *Psychopharmacology*, 2005, 179, 597-605.
28. W.D. Horst, S.H. Preskorn: Mechanism of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. *J. Affect. Disord.* 1998, 51, 23-254.
29. A. Wesołowska: Potential role of the 5-HT₆ receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data. *Pharmacol. Rep.* 2010, 62, 564-577.
30. B.G. Sundar, T.R. Bailey, D.D. Dunn et al.: Novel brain penetrant benzofuropiperidine 5-HT₆ receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 120-123.
31. L.S. Nandam, D. Jhaveri, P. Bartlett: 5-HT₇, neurogenesis and antidepressants: a promising therapeutic axis for treating depression. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007, 34, 546-551.
32. A. Wesołowska, A. Nikiforuk, K. Stachowicz: Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 after intrahippocampal administration to rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2006, 553, 185-190.
33. A. Wesołowska, E. Tatarczyńska, A. Nikiforuk, E. Chojnacka-Wójcik: Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT₇ receptor antagonist in the forced swimming test in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2007, 555, 43-47.
34. O. Mnie-Filali, L. Lambras-Senas, L. Zimmer, N. Haddjeri: 5-HT₇ receptor antagonists as a new class of antidepressants. *Drug News Perspect*, 2007, 20, 613-618.
35. W.K. Kroeze, B.L. Roth: Polypharmacological drugs: Magic shotguns for psychiatric diseases. In *Psychopharmacology in Drug Discovery*, J-U. Peters Ed., Wiley: Hoboken, 2012, 135-148.

36. A. Anighoro, J. Bajorath, G. Rastelli: Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 7874-7887.
37. B.L. Roth, D.J. Sheffler, W.K. Kroeze: Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2004, 3, 353-359.
38. Polypharmacology in drug discovery, edited by Jens-Uwe Peters, John Wiley & Sons, 2012.
39. **D6**: M. Pawłowski, G. Chłoń, J. Obniska, A. Zejc, S. Charakchieva-Minol, M.J. Mokrosz, Synthesis 5HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor affinity of new 1-phenylpiperazinypropyl derivatives of purine-2,6- and pyrrolidine-2,5-diones. *Il Farmaco*, 2000, 55, 461-468.
40. **D7**: G. Chłoń, M. Pawłowski, B. Duszyńska, A. Szaro, E. Tatarczyńska, A. Kłodzińska, E. Chojnacka-Wójcik: Synthesis, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor activity of new 1-phenylpiperazinypropyl derivatives with arylalkyl substituents in position 7 of purine-2,6-dione. *Pol. J. Pharmacol.* 2001, 53, 359-368.
41. **D8**: P. Zajdel, A. Bojarski, H. Byrtus, G. Chłoń-Rzepa, J. Obniska, P. Chevallet, J. Martinez, M. Pawłowski: Preliminary studies on application of impregnated synthetic peptide TLC stationary phases for pre-screening of the 5-HT_{1A} ligands. *Biomed. Chromatogr.* 2003, 17, 312-317.
42. **D9**: G. Chłoń-Rzepa, M. Pawłowski, M. Zygmunt, B. Filipek, D. Maciąg: Synthesis and cardiovascular activity of new 8-alkylamino-1,3-dimethyl-7-(2-hydroxy-3-piperazinopropyl)-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-diones. *Pol. J. Pharmacol.* 2004, 56, 755-766.
43. **D10**: G. Chłoń-Rzepa, P. Żmudzki, M. Pawłowski, M. Zygmunt, B. Filipek. Structure-cardiovascular activity relationships in a group of new 8-alkylamino-1,3-dimethyl-7-(2-hydroxy-3-aminopropyl)-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-diones. *Pharmacol. Rep.* 2011, 63, 476-486.
44. **D17**: M. Jastrzębska-Więsek, A. Partyka, G. Chłoń-Rzepa, D. Wróbel, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, A. Wesołowska: Potential anxiolytic, but not antidepressant activity of new 7-aryl-piperazinybutyl-8-morpholinyl-purine-2,6-dione analogs in mice. *Acta Biol. Cracov. Ser. Zool.* 2011, 53, 31-37.
45. **D20**: J. Sapa, M. Zygmunt, Ł. Krawczyk, M. Bednarski, J. Knutelska, M. Dudek, L. Nowiński, G. Chłoń-Rzepa, M. Pawłowski: Antiarrhythmic and hypotensive activity of new analogues of theophylline. *Med. Int. Rev.* 2013, 25a, 129-136.
46. **D11**: M. Zygmunt, G. Chłoń-Rzepa, J. Sapa: Analgesic and antiinflammatory activity of 7-substituted purine-2,6-dione. *Pharmacol. Rep.* 2014, 66, 996-1002.
47. **D12**: M. Zygmunt, P. Żmudzki, G. Chłoń-Rzepa, J. Sapa, M. Pawłowski: Synthesis and analgesic activity of 3,7-dimethylpurine-2,6-dione-1-yl derivatives of acetic and butanoic acid. *Lett. Drug Des. Discov.* 2014, 11, 1204-1213.
48. M.J. Mokrosz, A.J. Bojarski, B. Duszyńska et al.: 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline derivatives: A new class of 5-HT_{1A} receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 1999, 7, 287-295.
49. M. Eckstein, M. Gorczyca, A. Zejc: About the oxidative bromination of methylxanthines. *Acta Pharm. Yugoslav.* 1972, 22, 133-136.

50. A. Drabczyńska, J. Karolak-Wojciechowska, K. Kieć-Kononowicz: Structure and activity studies of glycine receptor ligands. Part 4. N-[(7-arylalkyl,7-aryloxyalkyl)-8-theophyllyl]-glycines. *Pol. J. Chem.* 1999, 5, 783-792.
51. R.A. Glennon, N.A. Naiman, R.A. Lyon, M. Titeler: Arylpiperazine derivatives as high affinity 5-HT_{1A} serotonin ligands. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 1968-1971.
52. K. Feldolfi, A. Molnar, J. Apjok et al.: Chemistry of 1,3-bifunctional compounds. 27. Preparation of 4-N-substituted piperazinyl-1-propyl esters. *Acta Phys. Chem.* 1982, 28, 225-244.
53. S. Rockitt, R. Warthow, H. Dudeck, A. Drabczyńska, K. Kieć Kononowicz: Modes of xanthine complexation to dirhodium tetrakis [(R)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)-phenylacetate] in solution and in the solid state. *Z. Naturforsch. B.J. Chem. Sci.* 2001, 56b, 319-324 .
54. M. Pawłowski: Synthesis of 7-(β -hydroxyphenethyl)-8-(benzylamino)theophylline and some of its derivatives. *Pol. J. Chem.* 1983, 57, 461-465.
55. M. Gorczyca, E. Mogilnicka, C. Wantuch: Synthesis of 1 and 7- β -hydroxypropyl-8-cycloalkylamino-dimethylxanthines. *Dissert. Pharm.* 1970, 22, 403-407.
56. K.H. Klinger: *Arzneimittelforschung* 1977, 27, 4.
57. A. Drabczyńska, M. Eckstein: *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 1976, 28, 95.
58. A. Wesołowska, M.H. Paluchowska, K. Golembiowska, E. Chojnacka-Wojcik: Pharmacological characterization of MP349, a novel 5-HT_{1A}-receptor antagonist with anxiolytic-like activity, in mice and rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2003, 53, 533-543.
59. J. De Vry: 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology*, 1995, 121, 1-26.
60. B.-J Cao, R.J. Rodgers: Anxiolytic-like profile of p-MPPI, a novel 5HT_{1A} receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 1997, 129, 365-371.
61. G. Griebel, D.C. Blanchard, M.-C. Rettori et al.: Preclinical profile of the mixed 5-HT_{1A}/5-HT_{2A} receptor antagonist S 21357. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996, 54, 509-516.
62. J. Karolak-Wojciechowska, A. Mrozek, A. Fruziński, M. Szczesio, P. Kowalski, T. Kowalska: H-bond pattern in arylpiperazine structures. Structures of *cis* and *trans* 2-[4-[4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl]but-2-enyl]isoindoline-1,3-diones and their hydrochloride salts. *J. Mol. Struct.* 2010, 979, 144-151.
63. G. Chłoń-Rzepa, P. Żmudzki, M. Pawłowski, A. Wesołowska, G. Satała, A. J. Bojarski, M. Jabłoński, J. Kalinowska-Tłuścik: CCDC 928727, CCDC 928728, CCDC 928729, CCDC 928730: Experimental Crystal Structure Determination. Cambridge Structural Database, DOI: <http://dx.doi.org/10.5517/cc105dyj>, dx.doi.org/10.5517/cc105dzk, dx.doi.org/10.5517/cc105f0m, dx.doi.org/10.5517/cc105fln.
64. M.Y.S. Kalani, N Vaidehi, S.E. Hall et al.: The predicted 3D structure of the human D₂ dopamine receptor and the binding site and binding affinities for agonists and antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101, 3815-3820.
65. H. Paluchowska, A.J. Bojarski, S. Charakchieva-Minol, A. Wesołowska: Active conformation of some arylpiperazine postsynaptic 5-HT_{1A} receptor antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* 2002, 37, 273-283.

66. M.L. Lopez-Rodrigues, M.J. Morcillo, T.K. Rovat et al.: Synthesis and Structure–Activity Relationships of a New Model of Arylpiperazines. 4. 1-[ω-(4-Arylpiperazin-1-yl)alkyl]-3-(diphenylmethylene)-2,5-pyrrolidinediones and -3-(9H-fluoren-9-ylidene)-2,5-pyrrolidinediones: Study of the Steric Requirements of the Terminal Amide Fragment on 5-HT_{1A} Affinity/Selectivity. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 36-49.
67. A.J. Bojarski, B. Duszyńska, M. Kołaczkowski et al.: The impact of spacer structure on 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptor affinity in the group of long-chain arylpiperazine ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 5863-5866.
68. W. Lewgowd, A.J. Bojarski, M. Szczesio et al.: Synthesis and structural investigation of some pyrimido[5,4-c]quinolin-4(3H)-one derivatives with a long-chain arylpiperazine moiety as potent 5-HT_{1A/2A} and 5-HT₇ receptor ligands. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 3348-3361.
69. C.N. Cavasotto, S.S. Phatak: Homology Modeling in drug discovery: current trends and applications. Current trends and applications. *Drug Discov. Today* 2009, 14, 676-683.
70. M. Kołaczkowski, A. Bucki, M. Feder, M. Pawłowski: Ligand- Optimized homology models of D₁ and D₂ dopamine receptors: Application for virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* 2013, 53, 638-648.
71. J. Shonberg, C.K. Herenbrink, A. Christopoulos, P.J. Scammels et al.: A structure activity analysis of biased agonism at the dopamine D₂ receptor. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 9199-9221.
72. M. Kołaczkowski, M. Marcinkowska, A. Bucki, J. Śniecikowska, M. Pawłowski et al. Novel 5-HT₆ receptor antagonists/D₂ receptor partial agonists targeting behavioral and psychological symptoms of dementia. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 92, 221-235.
73. **D1**: K. Kieć-Kononowicz, A. Zejc, G. Chłoń, E. Stypuła, J. Krupińska, B. Cebo: Synthesis of 1-(3-amino-2-propanolo)-5,5-diphenylhydantoin derivatives as potential antiarrhythmic agents. *Acta Pharm. Jugoslav.* 1987, 37, 123-130.
74. **D2**: A. Drabczyńska, B. Cebo, J. Krupińska, M. Michna, G. Chłoń, K. Zębala: The effect of some 8-aminoalkanol derivatives of theophylline on cardiovascular-system. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 1988, 40, 321-329.
75. **D5**: H. Marona, J. Krupińska, B. Cebo, G. Chłoń: Synteza i właściwości biologiczne niektórych aminoalkoholowych pochodnych ksantonu. *Acta Polon. Pharm.* 1989, 64, 227-231.
76. **D3**: A. Zejc, K. Kieć-Kononowicz, G. Chłoń, Z. Kleinrok, K. Kolasa, T. Pietrasiewicz, G. Czechowska: Synthesis and pharmacological properties of diphenylimidazolidine acetic and propionic acids derivatives. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 1989, 41, 483-493.
77. **D4**: E. Chojnacka-Wójcik, A. Kłodzińska, A. Drabczyńska, M. Pawłowski, S. Charakchieva-Minol, G. Chłoń, M. Gorczyca: A new putative 5-HT_{1A} receptor antagonist of the 1-arylpiperazine class of ligands. *Eur. J. Med. Chem.* 1995, 30, 587-592.
78. M. Pawłowski, M. Gorczyca: Synthesis and properties of 7-hydroxyalkyl and 7-hydroxyalkylamino-8-benzylaminotheophylline derivatives. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 1980, 32, 779-788.
79. M. Gorczyca, M. Pawłowski, A. Mrozikiewicz, T. Kozłowska, A. Wasik: Chemical and pharmacological properties of some 7-β-hydroxy-γ-piperazinopropyl-8-benzylaminotheophyllines *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 1986, 38, 85-90.

80. E. Palaska, S. Unlu, F. Özkanli, et al.: 3-substituted piperazinomethyl benzoxazolinones. Analgesic and anti-inflammatory compounds inhibiting prostaglandin E2. *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* 1995, 45, 693-696.
81. C. Flouzat, Y. Bresson, A. Matio et al.: Novel nonopioid non-antiinflammatory analgesics: 3-(aminoalkyl)- and 3-[(4-aryl-1-piperazinyl)alkyl]oxazolo[4,5-b]pyridin-2(3H)-ones *J. Med. Chem.* 1993, 36, 497-503.
82. M.C. Viaud, P. Jamoneau, C. Fouzat et al.: N-Substituted Oxazolo[5,4-b]pyridin-2(1H)-ones: A New Class of Non-Opiate Antinociceptive Agents. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 1278-1286.
83. W. Malinka, M. Kaczmarz, A. Redzicka, et al.: Synthesis and analgesic action of N-(substituted-ethyl)pyrrole-3,4-dicarboximides. *II Farmaco*, 2005, 60, 15-22.
84. W. Malinka, P. Świątek, B. Filipek et al.: Synthesis, analgesic activity and computational study of new isothiazolopyridines of Mannich base type. *II Farmaco*, 2005, 60, 961-968.
85. T. Kaneko, S. Ozaki, K. Takizawa et al.: Pat. Appl. Publ. US 1985, 4, 543,254.
86. **D13**: M. Zygmunt, G. Chłoń-Rzepa, J. Sapa, M. Pawłowski: Analgesic activity of new 8-methoxy-1,3-dimethyl-2,6-dioxo-purin-7-yl derivatives with carboxylic, ester or amide moieties. *Pharmacol. Rep.* 2015, 67, 9-16.
87. **D22**: M. Zygmunt, G. Chłoń-Rzepa, E. Wyska, K. Pociecha, J. Sapa: Anti-inflammatory and antioxidant activity of 8-methoxy-1,3-dimethyl-2,6-dioxopurin-1-yl derivatives with terminal carboxylic, ester or amide moieties in animal models. *Acta Polon. Pharm. – Drug Res.* 2016, 73, 3.
88. **D16**: G. Chłoń-Rzepa, A. W. Jankowska, M. Zygmunt, K. Pociecha, E. Wyska: Synthesis of 8-alkoxy-1,3-dimethyl-2,6-dioxo-purin-7-yl-aceto- and butane-hydrazides as analgesic and anti-inflammatory agents. *Heterocycl. Commun.* 2015, 21, 273-278.
89. Y. Zhang, Y. Xiao, K. Kellar et al.: Immobilized nicotinic receptor stationary phase for on-line chromatographic determination of drug-receptor. *Anal. Biochem.* 1998, 264, 22-25.
90. **D14**: P. Żmudzki, G. Satała, G. Chłoń-Rzepa, A.J. Bojarski, P. Popik, P. Zajdel: N-(4-Arylpiperazinoalkyl)acetamide derivatives of 1,3- and 3,7-dimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-diones and their 5-HT₆, 5-HT₇ and D₂ receptors affinity. *Heterocycl. Commun.* 2015, 21, 13-18.
91. **D15**: M. Zygmunt, G. Chłoń-Rzepa, J. Sapa: The effect of serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptor ligands, ketoProfen and their combination in models of induced pain in mice. *Acta Polon. Pharm. – Drug Res.* 2015, 72, 579-585.