

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM



*Ocena parametrów ADME-Tox nowych ligandów receptorów
serotoninowych 5-HT₆ i 5-HT₇*

Autoreferat

GNIEWOMIR LATACZ

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Kraków 2020

Spis treści

1) Imię i nazwisko.....	2
2) Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	2
3) Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	2
4) Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.....	2
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego.....	2
4.2 Wykaz cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.....	2
4.3 Omówienie celu naukowego i wyników opisanych w cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.....	5
4.3.1 Wprowadzenie.....	5
4.3.2 Cel naukowy badań.....	7
4.3.3 Wyniki i dyskusja.....	8
4.3.3.1 Antagoniści 5-HT ₇	8
4.3.3.2 Stereoizomery związku MF-8.....	15
4.3.3.3 Agoniści 5-HT ₇ R.....	21
4.3.3.4 Ligandy 5-HT ₆ R.....	25
4.3.3.5 Inne ligandy 5-HT ₆ R i 5-HT ₇ R.....	32
4.3.4 Podsumowanie.....	32
5) Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	34
6) Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	36
7) Informacje dotyczące kariery zawodowej (oprócz kwestii wymienionych w pkt.1-6)....	38
7.1 Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych.....	38
7.2 Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych.....	39
7.3 Nagrody i wyróżnienia.....	43
Piśmiennictwo.....	43

1. Imię i nazwisko: Gniewomir Latacz**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

2011 – dyplom doktora nauk farmaceutycznych z wyróżnieniem, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, tytuł pracy doktorskiej: *Badania nad otrzymywaniem enancjomerów nienaturalnych aminokwasów metodą hydantoinazową*

2002 – dyplom magistra farmacji, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, tytuł pracy: *Próba określenia specyficzności substratowej D-hydantoinaz*

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

Od 2015: Adiunkt w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ CM

2010-2015: Asystent w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ CM

2004-2009: Doktorant w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ CM

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.**4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego**

„Ocena parametrów ADME-Tox nowych ligandów receptorów serotoninowych 5-HT₆ i 5-HT₇”

4.2 Wykaz cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

* - autorstwo lub współautorstwo korespondencyjne habilitanta

† - autorzy byli w równym stopniu zaangażowani w przygotowanie publikacji

IF - impact factor

cyt. - liczba cytowań wg Web of Science z dn. 17.12.2020

MNiSW - punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

H1	Latacz G*, Lubelska A, Jastrzębska-Więsek M, Partyka A, Sobiło A, Olejarz A, Kucwaj-Brysz K, Satała G, Bojarski AJ, Wesołowska A, Kieć-Kononowicz K, Handzlik J. <i>In the search for a lead structure among series of potent and selective hydantoin 5-HT₇R agents: The drug-likeness in vitro study.</i> Chem Biol Drug Des. 2017;90(6):1295-1306. IF = 2,328; Cyt. = 22; MNiSW = 25;
-----------	---

H2	Latacz G*, Lubelska A, Jastrzębska-Więsek M, Partyka A, Kucwaj-Brysz K, Wesołowska A, Kieć-Kononowicz K, Handzlik J. <i>MF-8, a novel promising arylpiperazine-hydantoin based 5-HT₇ receptor antagonist: In vitro drug-likeness studies and in vivo pharmacological evaluation.</i> Bioorg Med Chem Lett. 2018;28(5):878-883. IF = 2,448; Cyt. = 20; MNiSW = 30;
H3	Kucwaj-Brysz K†, Latacz G†, Podlewska S, Żesławska E, Handzlik J, Lubelska A, Satała G, Nitek W, Handzlik J. <i>The relationship between stereochemical and both, pharmacological and ADME-Tox, properties of the potent hydantoin 5-HT₇R antagonist MF-8.</i> Bioorg Chem. 2020; w druku, DOI:10.1016/j.bioorg.2020.104466. IF = 4,831; Cyt. = 0; MNiSW = 100;
H4	Latacz G*†, Hogendorf AS†, Hogendorf A, Lubelska A, Wierońska JM, Woźniak M, Cieślik P, Kieć-Kononowicz K, Handzlik J, Bojarski AJ. <i>Search for a 5-CT alternative. In vitro and in vivo evaluation of novel pharmacological tools: 3-(1-alkyl-1H-imidazol-5-yl)-1H-indole-5-carboxamides, low-basicity 5-HT₇ receptor agonists.</i> MedChemComm. 2018;9:1882-1890. IF = 2,394; Cyt. = 11; MNiSW = 30;
H5	Lubelska A, Latacz G, Jastrzębska-Więsek M, Kotańska M, Kurczab R, Partyka A, Marć MA, Wilczyńska D, Doroż-Płonka A, Łażewska D, Wesołowska A, Kieć-Kononowicz K, Handzlik J. <i>Are the hydantoin-1,3,5-triazine 5-HT_{6R} ligands a hope to find new procognitive and anti-obesity drug? Considerations based on primary in vivo assays and ADME-Tox profile in vitro.</i> Molecules 2019;24(24):4472. IF = 3,267; Cyt. = 2; MNiSW = 100;

H6	Latacz G, Lubelska A, Jastrzębska-Więsek M, Partyka A, Marć MA, Satała G, Wilczyńska D, Kotańska M, Więcek M, Kamińska K, Wesołowska A, Kieć-Kononowicz K, Handzlik J. <i>The 1,3,5-triazine derivatives as innovative chemical family of 5-HT₆ serotonin receptor agents with therapeutic perspectives for cognitive impairment.</i> Int J Mol Sci. 2019;20(14):3420. IF = 4,556; Cyt. = 6; MNiSW = 140;
-----------	---

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą mojego ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, stanowi cykl sześciu (**H1-H6**) powiązanych tematycznie prac oryginalnych, o sumarycznym **IF = 19,824** i łącznej punktacji **MNiSW = 425 pkt**.

Znajdujące się w tym cyklu prace **H1** oraz **H2** mają charakter badań farmakologicznych wykonanych metodami *in vitro* oraz *in vivo* z dominującą, opracowaną i opisaną przeze mnie, częścią *in vitro*. Mój udział w powstaniu tych publikacji polegał na przygotowaniu koncepcji artykułów, zaplanowaniu badań ADME-Tox *in vitro* (w tym przeprowadzeniu optymalizacji i walidacji wszystkich testów), wykonaniu wszystkich eksperymentów ADME-Tox z udziałem eukariotycznych linii komórkowych oraz większości testów przy użyciu mikrosomów wątrobowych, nadzorowaniu eksperymentów wykonywanych przez studenta i doktorantów, analizie i interpretacji otrzymanych wyników, przygotowaniu tabel i rycin oraz edycji manuskryptu. Byłem jedynym autorem całej treści poświęconej badaniom ADME-Tox oraz współautorem wstępu, dyskusji i podsumowania w obu artykułach. Ponadto, jako współautor korespondencyjny artykułów **H1** oraz **H2**, byłem odpowiedzialny za przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Artykuł **H3** ma charakter chemiczny, z rozbudowaną częścią farmakologiczną *in vitro*. W przygotowanie tej publikacji byłem w równym stopniu zaangażowany wraz z naukowcem odpowiedzialnym za syntezę chemiczną. Mój udział w powstaniu tej publikacji polegał na przygotowaniu koncepcji badań parametrów ADME-Tox *in vitro*, przeprowadzeniu optymalizacji i walidacji zaplanowanych testów, wykonaniu prawie wszystkich eksperymentów ADME-Tox otrzymanych związków (z wyjątkiem wpływu związków na CYP3A4 i 2D6), sporządzeniu tabel i rycin oraz analizie, interpretacji i opisanu otrzymanych wyników parametrów ADME-Tox. Ponadto byłem współautorem fragmentu wstępu w niniejszym artykule.

Artykuł **H4** jest pracą zawierającą wyniki syntezy chemicznej i badań farmakologicznych otrzymanych metodami *in vitro* oraz *in vivo*, przygotowaną przeze mnie w równym stopniu z naukowcem odpowiedzialnym za część chemiczną. Mój udział w powstaniu tej publikacji polegał na przygotowaniu koncepcji badań ADME-Tox *in vitro*, przeprowadzeniu optymalizacji i walidacji zaplanowanych eksperymentów, wykonaniu większości badań parametrów ADME-Tox otrzymanych związków (z wyjątkiem wpływu związków na CYP3A4 i 2D6 oraz testu mutagenności), analizie wyników, jak również pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego. Ponadto byłem zaangażowany w sporządzenie tabel i rycin, przygotowanie, napisanie i edycję manuskryptu, z wyjątkiem fragmentu wstępu oraz części dotyczących eksperymentów chemicznych i farmakologicznych *in vivo*.

Artykuły **H5** i **H6** są pracami farmakologicznymi opisującymi wyniki badań otrzymanych metodami *in vitro* oraz *in vivo*. W przypadku artykułu **H5** mój udział obejmował przygotowanie

koncepcji badań ADME-Tox *in vitro*, przeprowadzenie optymalizacji i walidacji zaplanowanych eksperymentów, wykonanie testów z zastosowaniem linii Caco-2, nadzorowanie badań wykonanych przez doktorantów i analizę otrzymanych wyników. Ponadto przygotowałem opis i dyskusję wyników badań parametrów ADME-Tox oraz byłem odpowiedzialny za edycję manuskryptu.

Mój udział w powstaniu publikacji **H6** polegał na przygotowaniu koncepcji badań ADME-Tox *in vitro*, przeprowadzeniu optymalizacji i walidacji zaplanowanych eksperymentów, wykonaniu testów parametrów ADME-Tox z zastosowaniem mikrosomów oraz linii komórkowej HEK-293, nadzorowaniu badań wykonanych przez doktorantów, sporządzeniu tabel i rycin wyników parametrów ADME-Tox oraz napisaniu i edycji manuskryptu, z wyjątkiem dyskusji wyników badań farmakologicznych *in vivo*, części wstępu oraz analizy struktura – aktywność badanych związków.

4.3 Omówienie celu naukowego i wyników opisanych w cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

4.3.1 Wprowadzenie

Droga od identyfikacji związku chemicznego wykazującego właściwości lecznicze do jego zarejestrowania jako lek jest niezwykle długa i kosztowna. Na podstawie przeprowadzonych badań, w których analizowano wydatki poniesione w latach 2009–2018 przez 47 firm farmaceutycznych w celu opracowania 63 leków, oszacowano medianę kosztów wprowadzenia leku na rynek na 985 milionów dolarów, a średni koszt tego procesu na 1,3 miliarda dolarów¹. Długi okres prowadzonych prac oraz stosunkowo wysoki wskaźnik niepowodzeń to najważniejsze przyczyny tak wysokich sum – średni czas opracowania nowego leku wynosi od 10 do 15 lat, a wskaźnik sukcesu został oszacowany na od 8 do 24%². W trakcie tej długiej drogi badań nad nowym lekiem potencjalny kandydat może zawieść z wielu powodów. Aktywność farmakologiczna, ADME (absorpcja, dystrybucja, metabolizm, eliminacja) oraz toksyczność (Tox) są kluczowymi czynnikami decydującymi o walorach kandydata na lek i odpowiedzialnymi za tzw. „właściwości lekopodobne”. Według światowej sławy profesora Ch.A. Lipńskiego, zajmującego się zagadnieniami z dziedziny chemii medycznej, aktywny biologicznie związek wykazuje cechy lekopodobieństwa, jeśli posiada na tyle akceptowalne parametry ADME-Tox, że gwarantują one pomyślne wyniki w I fazie badań klinicznych³. Dlatego też w nowoczesnym podejściu do opracowania nowego leku zaleca się, aby badania mające na celu oszacowanie parametrów ADME-Tox prowadzone były na jak najwcześniejszym etapie, równolegle z określeniem aktywności farmakologicznej nowej cząsteczki^{4, 5}.

Metody *in vitro*, będące alternatywą dla testów prowadzonych na zwierzętach, są coraz częściej stosowane do określenia parametrów ADME-Tox. Pozwalają one nie tylko na zaoszczędzenie czasu i funduszy przeznaczonych na rozwój nowego leku, ale również przyczyniają się do zmniejszenia liczby zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych do badań, zgodnie z ogólnie przyjętymi normami etycznymi oraz regulacjami wprowadzonymi na terenie Unii Europejskiej. Najważniejszą z nich jest Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych, wprowadzająca 10 lat temu nowy aksjologiczny standard wykonywania badań na zwierzętach. Wprowadzone zasady są zgodne ze sformułowaną w 1959 r. przez zoologów Williama Russella oraz Rexa Burcha zasadą 3R (ang. *replacement, reduction, refinement*), czyli zastąpienia, zmniejszenia i doskonalenia eksperymentów z wykorzystaniem zwierząt, która określiła po raz pierwszy ramy etyczne służące poprawie dobrostanu zwierząt laboratoryjnych na całym świecie⁶.

Receptor serotoniny 5-HT₆ (5-HT₆R) jest znanym potencjalnym celem terapeutycznym do opracowania innowacyjnej terapii chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN)⁷. Wysoki poziom ekspresji 5-HT₆R potwierdzono w obszarach mózgu odpowiedzialnych za procesy poznawcze i pamięciowe, tzn.: w części grzbietowej hipokampu, prążkowie oraz korze przedczołowej⁸. Kora przedczołowa to kluczowy obszar w kontekście prawidłowego funkcjonowania procesów poznawczych, takich jak uwaga, impulsywność, kontrola emocji, planowanie, podejmowanie decyzji, pamięć robocza, uczenie się lub przywoływanie wspomnień. W tej części mózgu receptory 5-HT₆ zlokalizowane są w komórkach piramidowych oraz interneuronach GABAergicznym (wykorzystujących jako główny przekaźnik kwas gamma-aminomasłowy – GABA) i uważa się, że są one odpowiedzialne za regulację systemu neuroprzekaźników zaangażowanych w procesy poznawcze. Dlatego też ligandy 5-HT₆R wydają się odpowiednią grupą związków, dzięki którym możliwe będzie opracowanie skutecznej terapii zaburzeń poznawczych występujących w chorobie Alzheimera czy też związanych z wiekiem^{9, 10}. Ponadto badania prowadzone w modelach zwierzęcych potwierdziły obiecującą aktywność przeciwdepresyjną oraz przeciwlękową antagonistów 5-HT₆R. Wykazano także korzystne efekty *in vivo* świadczące o ich możliwym zastosowaniu w leczeniu otyłości^{11, 12}. Co istotne, istnieje szereg dowodów świadczących o podobnej do antagonistów 5-HT₆R aktywności farmakologicznej agonistów tego receptora^{7, 13}.

Od roku 1993, kiedy to odkryto 5-HT₆R, udało się otrzymać jego wielu ligandów. Niestety, wciąż nie udało się wprowadzić na rynek skutecznego leku działającego selektywnie przez ten receptor. Najbardziej zaawansowanymi ligandami 5-HT₆R, które badano pod kątem zastosowania w terapii choroby Alzheimera, były SUVN-502 (masuperdyna), intepirdyna oraz idalopirdyna. Związki te znalazły się, co prawda, w badaniach klinicznych, ale prace nad większością z nich zostały zarzucone¹⁴.

Receptor 5-HT₇ (5-HT₇R) jest najmłodszym członkiem rodziny receptorów serotoniny¹⁵⁻¹⁷, który został scharakteryzowany jako obiecujący cel terapeutyczny w leczeniu chorób OUN, takich jak zaburzenia rytmów okołodobowych, lęk, depresja oraz zaburzenia poznawcze w schizofrenii^{18, 19}. Wyniki licznych badań wskazują, że antagoniści 5-HT₇R podawani indywidualnie lub w kombinacji z selektywnymi inhibitorami wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRIs) mogą być wykorzystani w strategii leczenia chorób afektywnych^{20, 21}. Badania farmakologiczne wykazały również, że inaktywacja na poziomie genetycznym lub blokada farmakologiczna 5-HT₇R wywołuje potencjalny efekt przeciwdepresyjny w zwierzęcych modelach depresji – w teście wymuszonego pływania (ang. *forced swimming test*, FST), znanym również jako test Porsolta, oraz w teście zawieszenia za ogon (ang. *tail suspension test*, TST)²²⁻²⁵. Antagoniści 5-HT₇R są już dostępni na rynku farmaceutycznym, ale w postaci związków działających nieselektywnie i wielokierunkowo, tak jak np. worioksetyna, zatwierdzona przez FDA w 2013 roku w leczeniu depresji^{26, 27}. Ponadto za działanie przeciwdepresyjne znanych leków antypsychotycznych, np. aripirazolu, amisulprydu czy lurasidonu, również częściowo może odpowiadać efekt antagonistyczny wobec 5-HT₇R²⁸⁻³⁰.

Znalezienie selektywnego antagonisty 5-HT₇R, którego efektywność zostałaby potwierdzona w modelach *in vivo*, pozostaje jednak wciąż wielkim wyzwaniem dla nauk farmaceutycznych. Do tej pory tylko jeden selektywny ligand 5-HT₇R, mianowicie związek JNJ-18038683, znalazł się w zaawansowanym etapie badań klinicznych, a dokładniej w II fazie (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02466685*, ostatnia aktualizacja: lipiec 2019)³¹.

Badania w modelach zwierzęcych wskazują również na możliwe zastosowanie terapeutyczne nie tylko antagonistów, ale również agonistów 5-HT₇R. Potwierdzono korzystne efekty aktywacji 5-HT₇R w mysich modelach chorób genetycznych, takich jak zespół Retta czy zespół łamliwego

chromosomu X^{32, 33}. Ponadto wśród agonistów 5-HT₇R zaobserwowano również efekt prokognitywny oraz antynocyceptywny³⁴.

Niedostateczne właściwości lekopodobne były jednym z powodów dyskwalifikacji na wczesnych etapach rozwoju leku wielu ligandów receptorów 5-HT₆ oraz 5-HT₇. Na przykład badania nad wieloma obiecującymi i aktywnymi antagonistami 5-HT₆R zostały zawieszone m.in. ze względu na takie nieakceptowalne parametry ADME-Tox, jak ograniczona biodostępność, słaba przenikalność przez barierę krew-mózg czy wysoki klirens³⁵. Jeśli chodzi o antagonistów 5-HT₇R, idealnym przykładem jest związek SB-269970, bardzo często wykorzystywany jako narzędzie badawcze w badaniach nad receptorem 5-HT₇. Związek ten wykazał w badaniach przedklinicznych bardzo wysoką wartość klirensu w krwi szczura ($Cl_b = 140 \text{ mL/min/kg}$), najprawdopodobniej ze względu na obecność w strukturze grupy fenolowej, biorącej aktywny udział w reakcjach II fazy metabolizmu. W związku z tym faktem, pomimo silnego powinowactwa do 5-HT₇R, SB-269970 został wycofany z badań i nie przekazany do bardziej zaawansowanych etapów klinicznych³⁶.

Wymienione przykłady pokazują zatem, że udowodniona wysoka aktywność i selektywność związku względem receptora nie jest wystarczająca, aby kandydat na lek pomyślnie przeszedł badania kliniczne i przedkliniczne. Potwierdza to zasadność stosowania, na jak najwcześniejszym etapie badań nad lekiem, metod *in vitro* do oszacowania lekopodobieństwa badanych ligandów, celem wyeliminowania nieperspektywicznych związków i wyłonienia struktur wiodących, posiadających właściwości gwarantujące duże prawdopodobieństwo pomyślnego przejścia kolejnych etapów rozwoju leku.

Tak więc cykl sześciu powiązanych tematycznie prac oryginalnych, będących podstawą mojego ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, opisuje zastosowanie alternatywnych metod *in vitro* do oceny parametrów ADME-Tox nowych ligandów receptorów serotoninowych 5-HT₆ i 5-HT₇. Badane ligandy zostały zsyntetyzowane i dostarczone przez chemików z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (UJ CM) w Krakowie oraz z Zakładu Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk (PAN) w Krakowie.

4.3.2 Cel naukowy badań

Celem moich badań była ocena parametrów ADME-Tox nowo zsyntetyzowanych ligandów receptorów serotoninowych 5-HT₆ oraz 5-HT₇. Przed rozpoczęciem właściwych eksperymentów przeprowadziłem przegląd literaturowy dostępnych metod *in vitro* pozwalających na określenie parametrów ADME-Tox. Następnie dokonałem selekcji oraz wyboru najodpowiedniejszych testów i na podstawie protokołów pozyskanych od producentów lub informacji zawartych w części eksperymentalnej artykułów naukowych przeprowadziłem ich walidację i optymalizację pod kątem wiarygodności i powtarzalności w warunkach pracowni, w której prowadziłem badania.

Do testów przekazano mi następujące grupy związków:

- jedenastu antagonistów receptora 5-HT₇: związki **KKB-12**, **KKB-15**, **KKB-16**, **KKB-36**, **KKB-40**, **KKB-41** oraz związek **MF-8** i jego cztery stereoizomery **MF-8A**, **MF-8B**, **MF-8C**, **MF-8D**
- trzech agonistów receptora 5-HT₇: **AH-494**, **AGH-282** oraz komercyjnie dostępny referencyjny, nieselektywny agonista **5-CT**
- sześciu ligandów receptora 5-HT₆: **TR-12**, **TR-37**, **KB-61**, **MST-4**, **KMP-10** oraz **DJ-8**

W celu określenia parametrów ADME-Tox zaplanowałem następujące testy *in vitro*:

Absorpcja

- transport bierny przez błony biologiczne
- transport przez nabłonkowy w modelu Caco-2
- określenie substratów glikoproteiny P

Dystrybucja

- wiązanie z białkami osocza, w tym wyznaczenie stałej dysocjacji K_D oraz całkowitej frakcji związanej f_b

Metabolizm/Eliminacja

- stabilność metaboliczna, w tym wyznaczenie okresu biologicznego półtrwania ($t_{1/2}$) *in vitro*, a następnie klirensu wewnętrznego (Cl_{int}) oraz określenie ścieżek metabolicznych

Toksyczność

- oszacowanie prawdopodobieństwa interakcji międzylekowych poprzez zbadanie wpływu związków na aktywność trzech najważniejszych izoform cytochromu P-450 (CYP) 3A4, 2D6 i 2C9
- badanie cytotoksyczności
- badanie hepatotoksyczności
- badanie mutagenności

4.3.3 Wyniki i dyskusja

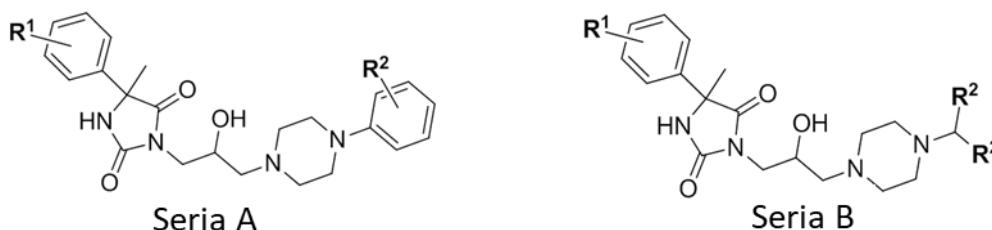
Związki do moich badań zostały wybrane z grupy arylopiperazynowych pochodnych hydantoiny (antagoniści 5-HT₇R), pochodnych imidazolo-indoli (agoniści 5-HT₇R) oraz metylopiperazyno-1,3,5-triazyny (ligandy 5-HT₆R), ze względu na wysokie powinowactwo i selektywność względem danego receptora oraz aktywność wewnętrzną, które zostały oszacowane *in vitro* przez badaczy z Zakładu Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie.

4.3.3.1 Antagoniści 5-HT₇R

Siedmiu antagonistów 5-HT₇R zostało przekazanych do badań parametrów ADME-Tox w ramach mojej współpracy z chemikami z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM. Związki wyselekcjonowano w oparciu o wcześniejsze prace opisujące syntezę chemiczną oraz wyniki badań radioreceptorowych i aktywności wewnętrznej serii arylopiperazynowych pochodnych hydantoiny^{37, 38}. Badania te wykonano w ramach grantu przyznanego dr Katarzynie Kucwaj-Brysz przez Narodowe Centrum Nauki (NCN, 2014/15/N/NZ7/03072) oraz w ramach aktywności statutowej prof. dr hab. Jadwigi Handzlik (K/ZDS/006134 i K/ZDS/005593). Wyselekcjonowane ligandy **KKB-12** (numer 11 w artykule **H1**), **KKB-15** (numer 12 w artykule **H1**), **KKB-16** (numer 13 w artykule **H1**), **KKB-36** (numer 14 w artykule **H1**), **KKB-40** (numer 15 w artykule **H1**) oraz **KKB-41** (numer 16 w artykule **H1**) posiadają bardzo wysokie powinowactwo do receptora 5-HT₇ ($K_i = 9 - 89$ nM) oraz selektywność względem receptora serotoninowego 5-HT_{1A}. Ponadto testy funkcjonalne wykonane dla związków **KKB-12**, **KKB-15** oraz **KKB-16** potwierdziły aktywność antagonistyczną tych pochodnych względem 5-HT₇R (Tabela 1). Parametry ADME-Tox tych sześciu pochodnych zostały wyznaczone w celu wyselekcjonowania z tej grupy najbardziej obiecującego i bezpiecznego kandydata do badań *in vivo* (publikacja **H1**). Odrębny manuskrypt (**H2**) poświęcono pochodnej **MF-8** (numer 2 w artykule **H2**), posiadającej najwyższe powinowactwo względem receptora 5-HT₇ ($K_i = 3$ nM) spośród otrzymanych

arylopiperazynowych pochodnych hydantoiny, jak również potwierdzoną w testach funkcjonalnych aktywność antagonistyczną (Tabela 1)³⁸.

Tabela 1 Struktury i aktywność farmakologiczna arylopiperazynowych pochodnych hydantoiny.



Związek	Seria	R ¹	R ²	5-HT ₇ K _i [nM]	5-HT _{1A} K _i [nM]	D ₂ K _i [nM]	5-HT ₇ cAMP IC ₅₀ [μM]
MF-8	A	4-F	2-OMe	3	121	715	0,350
KKB-12	A	4-F	2,5-diMe	56	1304	1814	1,01
KKB-15	A	4-F	2-OEt	10	98	127	0,081
KKB-16	B	4-F	Phe	79	5570	261	1,81
KKB-36	A	4-Cl	2-CN	9	303	1285	NT
KKB-40	A	4-F	2-Cl	42	397	838	NT
KKB-41	A	4-F	3-OMe	89	2969	7589	NT

NT – nie testowano

Dla grupy antagonistów 5-HT₇R wykonano następujące testy parametrów ADME-Tox: określenie transportu biernego przez błony biologiczne w teście PAMPA (ang. *parallel artificial membrane permeability assay*); badanie stabilności metabolicznej przy użyciu ludzkich mikrosomów wątrobowych (ang. *human liver microsomes*, HLMS), w tym wyznaczenie parametrów Cl_{int} , $t_{1/2}$ oraz najbardziej prawdopodobnych ścieżek metabolicznych; oszacowanie toksyczności przy zastosowaniu panelu testów bezpieczeństwa, w tym wpływu związków na aktywność izoform CYP 3A4 i 2D6 w celu oszacowania potencjalnych interakcji międzylekowych, określenie cytotoksyczności i hepatotoksyczności w modelach eukariotycznych linii komórkowych oraz mutagenności w teście Ames. Otrzymane wyniki zostały podsumowane w tabeli 2.

Do wyznaczenia parametru absorpcji antagonistów 5-HT₇R zastosowano test PAMPA bazujący na sztucznej membranie imitującej błony biologiczne, która umożliwia oszacowanie transportu biernego badanych związków. Do badań wykorzystano *Pre-coated PAMPA Plate System Gentest™* opracowany przez firmę Corning® (Tewksbury, MA, USA). Innowacyjność wybranego testu PAMPA polega na zastosowaniu przez producenta nowatorskiej, trójwarstwowej membrany lipidowo-olejowo-lipidowej, umiejscowionej wewnątrz porów porowatego filtra, zapewniającej wysoką przewidywalność, korelującą z komórkowymi modelami absorpcji³⁹. Przed przystąpieniem do badań wyznaczono krzywe kalibracyjne wszystkich antagonistów 5-HT₇R przy zastosowaniu systemu elektroforezy kapilarnej P/ACE MDQ firmy Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), które pozwoliły na wyliczenie stężeń związków po obu stronach sztucznej membrany po 5 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej. W ten sposób wyznaczono transport bierny danego związku przez błony biologiczne, który został obliczony na podstawie wzorów dostarczonych przez producenta testu³⁹ i wyrażony wartością współczynnika przepuszczalności *Pe*. Otrzymane wyniki porównano następnie do wartości *Pe* obliczonych doświadczalnie dla leków referencyjnych – słabo

przepuszczalnej norfloksacyny (**NFX**) oraz dobrze penetrującej przez błony biologiczne kofeiny (**CFN**). Na podstawie wykonanych testów wykazano różnice w wartościach Pe badanych związków. Najwyższy współczynnik przepuszczalności $Pe = 2,30 \times 10^{-6}$ cm/s wykazał związek **MF-8**, będący 2-metoksyfenylową pochodną, a najniższy, $Pe = 0,84 \times 10^{-6}$ cm/s, związek **KKB-15**, będący jego 2-etoksyfenylowym analogiem. Wartość Pe związku **MF-8** była najbliższa wynikowi otrzymanemu dla dobrze przepuszczalnej **CFN**, $Pe = 3,61 \times 10^{-6}$ cm/s. Wprowadzenie podstawnika difenylometylowego (benzhydrylowego) do pierścienia piperazyny (**KKB-16**), jak również 2-cyjano (**KKB-36**) i 2-chloro (**KKB-40**) do pierścienia fenylu w fenylopiperazynie utrzymało satysfakcjonujące wartości Pe , ponieważ były one powyżej rekomendowanej przez producenta wartości granicznej dla związków przepuszczalnych, wynoszącej $Pe = 1,5 \times 10^{-6}$ cm/s. Wyznaczona dla pochodnej z podstawnikiem 2,5-dimetylofenylowym (**KKB-12**) wartość $Pe = 1,46 \times 10^{-6}$ cm/s była nieznacznie poniżej tej granicy³⁹.

Farmakokinetykę antagonistów 5-HT₇R badano przy użyciu dostępnych komercyjnie ludzkich mikrosomów HLMs, które umożliwiły wyznaczenie, według procedury i wzorów opisanych w literaturze⁴⁰, dwóch istotnych parametrów – okresu biologicznego półtrwania *in vitro* ($t_{1/2}$), a następnie ludzkiego klirensu wewnętrznego (Cl_{int}). Otrzymane wyniki wskazują na wyróżniający się stabilnością metaboliczną związek **KKB-16** z niepoliczalnym w warunkach prowadzonego eksperymentu parametrem $t_{1/2}$. Analiza chromatograficzna UPLC po 120 minutach inkubacji **KKB-16** z HLMs wykazała obecność śladowej ilości tylko jednego metabolitu otrzymanego w reakcji dehydrogenacji (Rycina 2 w artykule **H1**). W odniesieniu do innych badanych pochodnych wynik ten wskazuje, że wprowadzenie podstawnika difenylometylowego do pierścienia piperazyny zwiększa znacząco stabilność metaboliczną w badanej grupie związków. Wniosek ten pozostaje w zgodności z opisanymi przez Lacivita i wsp. wynikami badań⁴¹, w których wykazano, że wprowadzenie zbliżonego budową układu bifenyłu wpłynęło pozytywnie na stabilność metaboliczną antagonistów 5-HT₇R z grupy pochodnych arylopiperazyny. Najbardziej podobne do siebie strukturalnie pochodne **MF-8**, **KKB-15** oraz **KKB-41**, wszystkie posiadające podstawniki alkoksylowe, wykazały również satysfakcjonujące parametry farmakokinetyczne *in vitro*. Wyznaczone dla nich wartości klirensu wewnętrznego Cl_{int} mieściły się w literaturowym zakresie $Cl_{int} < 8,6$ ml/min/kg, przypisującym je do grupy związków o niskim klirensie i stabilnych metabolicznie⁴². Najwyższe wartości Cl_{int} zostały wyznaczone dla pochodnych **KKB-36** ($Cl_{int} = 16,56$ ml/min/kg) oraz **KKB-40** ($Cl_{int} = 14,04$ ml/min/kg) z podstawnikami odpowiednio 2-cyjano i 2-chloro w pierścieniu fenylowym. Należy jednak podkreślić, że wartości Cl_{int} obu tych pochodnych były nadal niższe od wyznaczonego eksperymentalnie przy użyciu HLMs Cl_{int} niestabilnego leku referencyjnego werapamilu (**VL**, $Cl_{int} = 26,8$ ml/min/kg).

Dokładne przestudiowanie chromatogramów UPLC mieszanin reakcyjnych, a także widm masowych MS oraz fragmentacyjnych MS/MS, otrzymanych dzięki systemowi LC/MS ACQUITY™ TQD firmy Waters (Milford, MA, USA), pozwoliło na określenie najbardziej prawdopodobnych ścieżek metabolicznych (Tabela 3). Badania te były wspierane *in silico* przez oprogramowanie MetaSite (Molecular Discovery Ltd, Hertfordshire, Wielka Brytania), pozwalające na predykcję struktur otrzymanych metabolitów oraz najbardziej narażonych na przemiany metaboliczne miejsc w badanej cząsteczce. Wykazano, że związki **KKB-12** oraz wspomniany powyżej **KKB-16** metabolizowały do zaledwie jednego metabolitu. Na podstawie analizy widm MS stwierdzono, że związek **KKB-12** uległ reakcji hydroksylacji (masa molowa metabolitu wzrosła o 16 Da), natomiast **KKB-16** reakcji dehydrogenacji (masa molowa metabolitu zmniejszyła się o 2 Da). W przypadku związku **KKB-36** znaleziono 4 metabolity otrzymane na drodze reakcji hydroksylacji i dehydrogenacji. Związek **KKB-41** również metabolizował do 4 produktów, głównie na drodze

reakcji hydroksylacji i dodatkowo na drodze demetylacji (masa molowa zmniejszyła się o 14 Da). Związki **MF-8**, **KKB-15** oraz **KKB-40** uległy biotransformacji do dwóch metabolitów, a ich wspólną ścieżką metaboliczną była hydroksylacja. Ponadto dla związku **MF-8** stwierdzono reakcję demetylacji, dla **KKB-16** deetylacji, a dla **KKB-40** dehydrogenacji. Zaobserwowano również brak korelacji pomiędzy ilością metabolitów a wartościami Cl_{int} . Dla przykładu: związek **KKB-16**, zidentyfikowany jako najbardziej stabilna metabolicznie pochodna spośród testowanych ligandów, metabolizował do jednego produktu, podobnie jak dużo bardziej podatna na reakcje biotransformacji pochodna **KKB-12**, z wyznaczoną wartością $Cl_{int} = 11,7$ ml/min/kg. Ponadto związek **KKB-41**, charakteryzujący się bardzo niskim klirensiem wewnętrznym $Cl_{int} = 2,61$ ml/min/kg, oraz związek **KKB-36**, o najwyższej w badanej serii wartości Cl_{int} , zostały zmetabolizowane do tej samej ilości 4 metabolitów. Szczególną uwagę zwraca to, że pochodne **MF-8** oraz **KKB-15** metabolizowały do jednego, takiego samego metabolitu, otrzymanego na drodze dealkilacji ($m/z = 443,15$; czas retencji 3,77 min). Ogólnie rzecz biorąc, z wyjątkiem związku **KKB-16**, najczęstszą i główną ścieżką metaboliczną w tej grupie związków była hydroksylacja. Analiza fragmentacyjna MS/MS oraz predykcja *in silico* wskazały na podstawnik fenyłowy w ugrupowaniu fenylopiperazynowym jako najbardziej prawdopodobne miejsce obserwowanych hydroksylacji („Supporting information” artykułu **H1**, „Supplementary data” artykułu **H2**, „Supplementary materials” artykułu **B1**).

Oszacowanie prawdopodobieństwa interakcji międzylekowych antagonistów 5-HT₇R przeprowadzono poprzez zbadanie wpływu tych związków na aktywność dwóch najważniejszych izoform CYP, tj. 3A4 oraz 2D6, które odpowiadają razem za metabolizm od 40% do 50% wszystkich dostępnych na rynku leków⁴². Do tego celu zastosowano luminescencyjne, komercyjne testy P450-Glo™ firmy Promega® (Madison, WI, USA), oparte na biokonwersji odpowiedniej pochodnej D-lucyferyny do D-lucyferyny, katalizowanej przez daną izoformę CYP. Luminescencję, modulowaną w obecności potencjalnego aktywatora lub inhibitora CYP, mierzono przy użyciu wielofunkcyjnego czytnika płytek EnSpire firmy PerkinElmer (Waltham, MA, USA). Otrzymane dla badanych antagonistów 5-HT₇R wyniki porównano do odpowiednich związków referencyjnych – inhibitora CYP3A4 ketokonazolu (**KE**) oraz inhibitora CYP2D6 chinidyny (**QD**) (Rycina 3 w artykule **H1**, Rycina 2B oraz 2C w artykule **H2**).

Najsilniejszy efekt hamowania aktywności CYP3A4 zaobserwowano dla pochodnych **KKB-36** oraz **KKB-12** z wyliczonymi wartościami IC₅₀ wynoszącymi odpowiednio 3,75 oraz 6,09 μM. Wykazano jednak, że obserwowany dla tych związków efekt był nawet 25-krotnie słabszy od referencyjnego inhibitora CYP3A4 **KE**, dla którego wyznaczona eksperymentalnie wartość IC₅₀ wynosiła 0,14 μM. Ponadto wartości IC₅₀ dla tych związków mieściły się w przedziale między 3 μM a 10 μM, który wg danych literaturowych jest przypisany umiarkowanym inhibitorom CYP⁵. Do tej grupy zaliczono również związek **KKB-41** z wartością IC₅₀ wynoszącą 8,63 μM. W obecności związku **KKB-16** nie zaobserwowano zmiany aktywności cytochromu, a otrzymane dla pochodnych **MF-8**, **KKB-15** oraz **KKB-40** wartości IC₅₀ powyżej 10 μM wskazywały na bardzo słabą interakcję tych związków z CYP3A4.

W przypadku izoformy CYP2D6 zaobserwowano efekt hamujący prawie wszystkich badanych związków, a obliczone wartości IC₅₀ mieściły się w zakresie 1,62 – 6,76 μM. Jedynym wyjątkiem była pochodna **MF-8**, dla której nieznaczny efekt hamujący CYP2D6 wykazano tylko w najwyższym badanym stężeniu 25 μM. Najsilniejszą inhibicję wykazał związek **KKB-16** (IC₅₀ = 1,62 μM). Wartość ta mieściła się w zakresie IC₅₀ < 3 μM, przypisanym wg danych literaturowych⁵ silnym inhibitorom CYP, aczkolwiek była ona wciąż dużo wyższa od wyznaczonej eksperymentalnie wartości referencyjnego inhibitora **QD** (IC₅₀ = 0,01 μM).

Testy *in vitro* oparte na barwieniu pożywki pochodnymi formazanu, takie jak MTT, MTS oraz EZ4U, mierzą aktywność dehydrogenaz w żywych komórkach i są powszechnie stosowane do określenia cytotoksyczności związków⁵. W tym celu badani antagoniści 5-HT₇R byli inkubowani przez 48 godzin w obecności komórek ludzkiej embrionalnej nerki (HEK-293), pozyskanej z kolekcji *American Type Culture Collection* (ATCC® CRL-1573™), a następnie do hodowli dodano test EZ4U firmy Biomedica (Wiedeń, Austria). Intensywność zabarwienia hodowli mierzono poprzez pomiar absorbancji wielofunkcyjnym czytnikiem płytek EnSpire. Otrzymane wyniki żywotności komórek posłużyły do obliczenia wartości IC₅₀ związków, które następnie zostały porównane do wyznaczonej eksperymentalnie aktywności cytostatycznej referencyjnego leku doksorubicyny (**DX**) IC₅₀ = 0,46 μM. Związki **KKB-12**, **KKB-16** oraz **KKB-36** wykazały zbliżony, niewielki w porównaniu do referencyjnej **DX**, efekt na żywotność komórek HEK-293, z obliczonymi wartościami IC₅₀ w zakresie 32,04 - 42,47 μM. Dla reszty ligandów z badanej grupy wartości te wynosiły powyżej 100 μM. Szczególnie bezpieczne okazały się związki **MF-8** oraz **KKB-41**, których efekt na żywotność komórek stwierdzono jedynie w najwyższym zastosowanym stężeniu 250 μM (Rycina 4 w artykule **H1**, Rycina 2D w artykule **H2**).

Potencjalny wpływ antagonistów 5-HT₇R na dysfunkcję mitochondriów w komórkach wątroby został przebadany na linii ludzkiego wątrobiaka HepG2 po dwugodzinnej ekspozycji na badaną substancję. Linia HepG2 pozyskana została z kolekcji ATCC® (CRL-1573™) i jest powszechnie stosowanym modelem *in vitro* do określenia hepatotoksyczności. W badaniach wykorzystano test ToxGlo™ (Promega®, Madison, WI, USA) oparty na bioluminescencyjnym pomiarze poziomu ATP w komórkach. Otrzymane wyniki porównano do efektu wywołanego przez referencyjną toksynę mitochondrialną – 3-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu (**CCCP**), która w stężeniu 10 μM obniżała poziom komórkowego ATP do 78,52% kontroli. Ogólnie rzecz biorąc, żaden z badanych związków nie wywołał w stężeniu 10 μM istotnego statystycznie efektu na poziom ATP w porównaniu do kontroli negatywnej. Związki **KKB-12**, **KKB-15** oraz **KKB-16** obniżyły istotnie statystycznie (p <0,01 oraz p <0,001) poziom ATP w komórkach do około 75% kontroli, ale tylko w najwyższym zastosowanym stężeniu 100 μM. Dla związków **MF-8**, **KKB-36**, **KKB-40** oraz **KKB-41** nie zaobserwowano jakiegokolwiek efektu, nawet w stężeniu 100 μM (Rycina 5 w artykule **H1**, Rycina 2E w artykule **H2**).

Test Ames jest uważany za „złoty standard” do oceny zdolności związków do wywołania mutacji DNA. Do określenia mutagenności antagonistów 5-HT₇R zastosowano zmodyfikowany test Ames, oparty na metodzie fluktuacyjnej w formacie mikropłytkowym. Do badań użyto szczepu bakterii *Salmonella* Typhimurium TA100, umożliwiającego detekcję mutacji par zasad. Ekspozycja tego szczepu na potencjalny mutagen powoduje, że kolejne generacje bakterii (rewertantów) są w stanie wzrastać na pożywce bez suplementacji histydyną. Wzrost bakterii jest mierzony kolorymetrycznie, poprzez zmianę koloru pożywki odzwierciedlającej spadek pH. Następnie wyliczana jest tzw. wartość kontrolna linii bazowej pożywki (ang. *medium control baseline*, MCB), będąca średnią liczbą rewertantów w kontroli negatywnej, powiększoną o odchylenie standardowe. Ponad dwukrotny wzrost wartości MCB w obecności badanej substancji jest uznawany za alert mutagenności. Otrzymane wyniki badań wykazały, że żaden z badanych antagonistów 5-HT₇R nie osiągnął wartości progowej 2×MCB, podczas gdy dla referencyjnego mutagenu *N*-tlenku 4-nitrochinoliny (**NQNO**), w stężeniu 0,5 μM, stwierdzono obecność 40 rewertantów oraz 5,84-krotny wzrost wartości MCB (Rycina 6 w artykule **H1**, Rycina 2F w artykule **H2**).

- *Antagoniści 5-HT₇R – podsumowanie*

Większość z badanych związków z tej grupy wykazała akceptowalne właściwości lekopodobne. Pamiętając, że niska przepuszczalność oraz słaba stabilność metaboliczna były jedną z przyczyn przerwania w przeszłości badań nad ligandami 5-HT₇R, należy zwrócić szczególną uwagę na korzystne wyniki badań tych parametrów *in vitro*, zwłaszcza w przypadku pochodnych **KKB-16** and **KKB-41**. Nie do przecenienia jest również wykazany wysoki profil bezpieczeństwa badanych związków. Dla trzech pochodnych **MF-8**, **KKB-40** oraz **KKB-41** nie stwierdzono znaczącego efektu na żywotność komórek HEK-293, dla pozostałych związków natomiast wpływ ten określono jako niewielki, w porównaniu do referencyjnego cytostatyku **DX**. Zaobserwowano również bardzo niskie prawdopodobieństwo wystąpienia hepatotoksyczności. Badane pochodne, z wyjątkiem **KKB-16**, nie wykazały również wysokiego ryzyka wystąpienia interakcji międzylekowych. Ponadto żaden testowany ligand nie był mutageny w teście Ames.

Biorąc pod uwagę zarówno wyniki wiązania do receptorów, jak również wyznaczone *in vitro* parametry ADME-Tox, zdecydowano poświęcić szczególną uwagę dwóm antagonistom 5-HT₇R z badanej grupy. Związek **MF-8** wykazał najwyższą aktywność względem 5-HT₇R oraz doskonałe właściwości lekopodobne w testach *in vitro*, natomiast dla związku **KKB-16** stwierdzono wyjątkową, wysoką stabilność metaboliczną oraz najwyższą selektywność względem 5-HT₇R w badanej grupie. Ponadto, poza dość silną interakcją z CYP2D6, ogólna ocena profilu bezpieczeństwa związku **KKB-16** wypadła korzystnie, dlatego związek ten został wyselekcjonowany z grupy pochodnych opisanych w artykule **H1** i skierowany do badań *in vivo* razem z najaktywniejszym wobec 5-HT₇R związkiem **MF-8**. Wykonane w ramach współpracy przez farmakologów z Zakładu Farmacji Klinicznej UJ CM testy behawioralne (FST) na myszach wykazały dla obu związków potencjalne efekty antydepresyjne (Rycina 7 w artykule **H1**, Rycina 3A w artykule **H2**). Co zaskakujące, najsilniejszego działania *in vivo* nie stwierdzono dla związku **MF-8**, posiadającego najwyższe powinowactwo do 5-HT₇R, ale dla najbardziej stabilnego metabolicznie i najselektywniejszego względem 5-HT_{1A} **KKB-16**. Należy również podkreślić, że stwierdzona dla obu badanych pochodnych potencjalna aktywność przeciwdepresyjna była silniejsza od referencyjnego antagonisty 5-HT₇R – SB-269970 oraz referencyjnego leku przeciwdepresyjnego imipraminy. Co ważne, działanie to zostało potwierdzone dla związku **MF-8** również w badaniu na szczurach (Rycina 3B w artykule **H2**).

Tabela 2 Parametry ADME-Tox pochodnych **KKB-12, KKB-15, KKB-16, KKB-36, KKB-40, KKB-41, MF-8** oraz związków referencyjnych.

Związek	<i>Pe</i> [10 ⁻⁶ cm/s] ±SD	<i>Cl_{int}</i> [ml/min/ kg]	CYP 3A4 <i>IC₅₀</i> [μM] ±SD	CYP 2D6 <i>IC₅₀</i> [μM] ±SD	HEK-293 <i>IC₅₀</i> [μM] ±SD	HepG2 poziom ATP (% kontroli) ±SD ^a	AMES Średnia pozytywnych dolków ±SD/ krotność powyżej MCB ^b
CCCP	-	-	-	-	-	78,52±1,32	-
CFN	3,61±0,11	-	-	-	-	-	-
DX	-	-	-	-	0,46±0,08	-	-
KE	-	-	0,14±0,07	-	-	-	-
NFX	0,95±0,13	-	-	-	-	-	-
QD	-	-	-	0,01±0,002	-	-	-
VL	-	26,8 ^c	-	-	-	-	-
NQNO	-	-	-	-	-	-	40,00±1,50/ 5,84
MF-8	2,3±0,39	8,2	>10 ^d	>10	>100	89,97±5,2	14,00±2,65/ 1,26
KKB-12	1,46±0,14	11,7	6,09±3,24	3,77±2,33	32,04±5,06	75,85±6,55	4,67±2,52/ 0,68
KKB-15	0,84±0,09	5,85	21,15±9,7	4,29±3,69	>100	72,65±6,52	6,00±3,46/ 0,88
KKB-16	1,78±0,17	NP	BE	1,62±0,25	45,13±7,81	73,63±7,10	7,33±2,08/ 1,07
KKB-36	2,01±0,33	16,56	3,75±0,88	5,56±3,93	42,47±5,79	96,49±1,53	5,67±3,06/ 0,84
KKB-40	1,86±0,21	14,04	21,9±12,7	5,78±2,06	>100	93,15±4,91	7,00±2,65/ 1,02
KKB-41	1,92±0,27	2,61	8,63±3,65	6,76±2,19	>100	86,52±9,12	3,33±1,15/ 0,49

SD - odchylenie standardowe; NP - niepoliczalne; BE - brak efektu; MCB - wartość kontrolna linii bazowej pożywki; skróty związków referencyjnych: CCCP, 3-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu; CFN, kofeina; DX, doksorubicyna; KE, ketokonazol; NFX, norfloksacyna; QD, chinidyna; NQNO, N-tlenek 4-nitrochinoliny; VL, werapamil

^areferencyjna toksyna CCCP była testowana w stężeniu 10 μM, antagonistów 5-HT₇R testowano w stężeniu 100 μM

^befekt mutageny NQNO badano w stężeniu 0,5 μM, wynik dla MF-8 przedstawiono w stężeniu 1 μM, natomiast KKB-12, KKB-15, KKB-16, KKB-36, KKB-40 oraz KKB-41 w stężeniu 10 μM

^cwartość *Cl_{int}* dla VL opublikowano w artykule H5; ^dwyniki wpływu MF-8 na aktywność CYP3A4 opublikowano w B1

Tabela 3 Ścieżki metaboliczne antagonistów 5-HT₇R wyznaczone po 120 min inkubacji z HLMs.

Substrat [m/z]	Ilość metabolitów	Czas retencji [min]	Masa molowa metabolitu [m/z]	Ścieżki metaboliczne*
MF-8 ^a 457,24	2	3,40 3,77	473,19 443,22	hydroksylacja demetylacja
KKB-12 455,18	1	3,99	471,20	hydroksylacja
KKB-15 471,20	2	3,77 3,77	487,22 443,15	hydroksylacja deetylacja
KKB-16 517,19	1	5,37	515,13	dehydrogenacja
KKB-36 468,14	4	4,12 4,87 4,63 4,44	484,09 466,15 484,16 482,10	hydroksylacja dehydrogenacja hydroksylacja hydroksylacja/dehydrogenacja
KKB-40 461,09	2	3,96 4,93	477,11 459,10	hydroksylacja dehydrogenacja
KKB-41 457,17	4	3,42 3,56 3,82 4,44	473,19 443,15 473,12 473,19	hydroksylacja demetylacja hydroksylacja hydroksylacja

^aścieżki metaboliczne MF-8 wyznaczone przy pomocy HLMs opublikowano w artykule B1

*główną ścieżkę metaboliczną zaznaczono pogrubioną czcionką

4.3.3.2 Stereoizomery związku MF-8

Stereochemia jest bardzo ważnym zagadnieniem w chemii medycznej ze względu na możliwe i bardzo często znaczące różnice we właściwościach farmakodynamicznych i farmakokinetycznych poszczególnych stereoizomerów związku o potencjale leczniczym. Stereoizomery mogą oddziaływać *in vivo* z wieloma białkami na różne sposoby i w zależności od konfiguracji absolutnej wywoływać pożądane i niepożądane działania^{5, 43}. Chiralność wpływa również na indywidualne parametry ADME-Tox stereoizomerów. Zaobserwowano m.in. różnice w wiązaniu poszczególnych stereoizomerów z pompami wyrzutu leków, jak również białkami transportowymi typu „uptake”, determinujące wartości parametrów absorpcji. Ponadto specyficzna orientacja przestrzenna każdego stereoizomeru względem centrum aktywnego izoform CYP może istotnie wpływać na różnice w ich stabilności metabolicznej, a także na prawdopodobieństwo wystąpienia interakcji międzylekowych. Jeśli chodzi o parametr dystrybucji, wiązanie się chiralnych leków z białkami osocza również wykazuje stereoselektywność, co wpływa na różnice w profilu farmakologicznym i farmakokinetycznym poszczególnych stereoizomerów. Chiralność nieodłącznie związana jest również z różnym nasileniem efektu toksyczności. Talidomid jest sztandarowym przykładem leku z diametralnymi różnicami w działaniu toksycznym obu możliwych enancjomerów. W tym przypadku brak uwzględnienia stereochemii na podstawowym etapie badań i rozwoju tego leku spowodował tragiczne skutki⁴⁴. Ważnym przykładem są również kanały potasowe hERG (ang. *human ether-à-go-go-related gene*), które mogą być w różnym stopniu blokowane przez poszczególne stereoizomery, zwiększając lub zmniejszając prawdopodobieństwo wystąpienia kardiotoxyczności⁵.

Opisany powyżej w rozdziale 4.3.3.1 związek **MF-8** posiada dwa centra stereogeniczne, tj. w pozycji 5 hydantoiny oraz w pozycji 2 linkera 2-hydroksypropylowego, i dlatego jest mieszaniną czterech stereoizomerów (**MF-8rac**). Z tego powodu został wybrany do badań, które miały na celu przeprowadzenie syntezy chemicznej każdego stereoizomeru oddzielnie oraz oszacowanie ich właściwości farmakologicznych i parametrów ADME-Tox. Poszczególne stereoizomery **MF-8A**, **MF-8B**, **MF-8C** i **MF-8D** otrzymano w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ MC, a następnie przekazano badaczom z Zakładu Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w celu określenia ich powinowactwa oraz aktywności względem 5-HT₇R. Wyniki uzyskane dla **MF-8rac** posłużyły do dyskusji i badań porównawczych. Tak jak podejrzewano, stwierdzono istotne różnice w powinowactwie do 5-HT₇R pomiędzy badanymi stereoizomerami, z których najwyższą wartość K_i stwierdzono dla stereoizomeru **MF-8A** (3 nM), a najniższą dla **MF-8D** (366 nM). Ponadto, co istotne, wszystkie izomery optyczne zachowały pożądaną selektywność względem receptora 5-HT_{1A} (Tabela 4). Testy funkcjonalne, w których mierzono zdolność badanych stereoizomerów do obniżenia wewnątrzkomórkowego cAMP, wykazały korelację z badaniami radioreceptorowymi. Aktywności stereoizomerów wzrastały analogicznie w obu testach, w następującym porządku: **MF-8D** < **MF-8B** < **MF-8C** < **MF-8A**. Ponadto stwierdzono bardzo silną aktywność antagonistyczną **MF-8A** (K_b = 24 nM), dużo korzystniejszą niż w przypadku racematu **MF-8rac** (K_b = 58 nM) (Tabela 4).

Tabela 4. Aktywność farmakologiczna **MF-8rac** i poszczególnych stereoizomerów.

Związek/ee* (%)	5-HT _{1A} <i>K_i</i> [nM]	5-HT ₇ <i>K_i</i> [nM]	5-HT ₇ <i>K_b</i> [nM]
MF-8rac (-)	121	3	58
MF-8A (100)	832	3	24
MF-8B (92)	1433	44	585
MF-8C (100)	427	26	397
MF-8D (98)	2370	366	99230

*nadmiar enancjomeryczny

Dla **MF-8rac** i stereoizomerów wykonano następnie następujące testy parametrów ADME-Tox: oszacowanie biodostępności w teście PAMPA, przy zastosowaniu modelu linii komórkowej Caco-2 pozyskanej z kolekcji ATCC® (HTB-37™) oraz przy użyciu testu luminescencyjnego określającego związki będące substratami P-glikoproteiny (Pgp); badanie stabilności metabolicznej przy użyciu mysich mikrosomów wątrobowych (ang. *mouse liver microsomes*, MLMs), w tym wyznaczenie parametrów Cl_{int} , $t_{1/2}$ oraz najbardziej prawdopodobnych ścieżek metabolicznych; oszacowanie toksyczności przy zastosowaniu panelu testów bezpieczeństwa, w tym wpływu związków na aktywność izoform CYP 3A4, 2D6 i 2C9 w celu przewidzenia interakcji międzylekowych, oraz badanie hepatotoksyczności w modelu linii komórkowej ludzkiego wątrobiaka HepG2. Otrzymane dla stereoizomerów **MF-8A**, **MF-8B**, **MF-8C** i **MF-8D** wyniki zostały porównane do **MF-8rac**, jak również do odpowiednich związków referencyjnych, i podsumowane w tabeli 5.

Do określenia stężeń pochodnej **MF-8rac** i stereoizomerów w testach PAMPA oraz Caco-2 zastosowano, w przeciwieństwie do opisanego w artykułach **H1** i **H2** systemu elektroforezy kapilarnej, bardziej miarodajną i czułą metodę UPLC-MS z zastosowaniem standardu wewnętrznego. Wyliczone w ten sposób w teście PAMPA wartości Pe dla związków referencyjnych **NFX** oraz **CFN** wynosiły odpowiednio $0,56 \times 10^{-6}$ cm/s oraz $15,1 \times 10^{-6}$ cm/s. Ogólnie rzecz biorąc, badane stereoizomery wykazały wysoką przepuszczalność przez błony biologiczne w porównaniu do zastosowanych referencji, przy obliczonych wartościach Pe w zakresie $4,1 - 8,9 \times 10^{-6}$ cm/s. Najniższą zdolność pasywnego transportu zaobserwowano dla stereoizomeru **MF-8C**, a najwyższą dla stereoizomeru **MF-8D**. Co interesujące, wartość Pe dla **MF-8rac**, wynosząca $6,1 \times 10^{-6}$ cm/s, była uśrednioną wartością Pe wszystkich stereoizomerów.

Wpływ **MF-8rac** i stereoizomerów na aktywność pompy wyrzutu Pgp określono za pomocą testu Pgp-Glo™ firmy Promega® (Madison, WI, USA), dzięki któremu luminescencyjnie mierzy się poziom ATP niezbędnego do funkcjonowania tego białka. Zwiększenie zużycia ATP wskazuje, że dany związek jest substratem tej znajdującej się w nabłonku jelita, jak również w barierze krew-mózg, pompy wyrzutu leków. Wyniki porównano do tzw. aktywności podstawowej Pgp, którą wyliczono jako różnicę w konsumpcji ATP między próbkami nietraktowanymi i traktowanymi 100 μ M stężeniem silnego inhibitora Pgp, tj. Na_3VO_4 . Werapamil (**VL**) zastosowano jako związek referencyjny, będący znanym substratem Pgp, który w niniejszym badaniu stymulował aktywność pompy, osiągając 192,8% aktywności podstawowej w stężeniu 200 μ M. Otrzymane wyniki badań wykazały istotny statystycznie wzrost konsumpcji ATP przez Pgp powyżej 135% wartości podstawowej w obecności 100 μ M trzech stereoizomerów: **MF-8A**, **MF-8B** ($p < 0,001$) oraz **MF-8D** ($p < 0,05$), podczas gdy zarówno **MF-8rac**, jak i **MF-8C** nie wykazały istotnego statystycznie wpływu na aktywność tego białka (Rycina 7 w artykule **H3**).

Caco-2 to nieśmiertelna linia komórkowa ludzkiego gruczołka okrężnicy, która jest najlepszym znanym modelem badawczym służącym do określenia przepuszczalności związków *in vitro*, zarówno na drodze transportu biernego, jak i aktywnego. Według danych literaturowych⁵, jeśli obliczony w tym modelu współczynnik przepuszczalności P_{app} jest niższy od 2×10^{-6} cm/s, świadczy to o słabej przepuszczalności testowanej substancji, jeśli mieści się w zakresie od 2×10^{-6} do 20×10^{-6} cm/s, jest to przepuszczalność umiarkowana, natomiast wartości P_{app} powyżej 20×10^{-6} cm/s świadczą o wysokiej przepuszczalności. Wyliczona eksperymentalnie wartość P_{app} dla dobrze penetrującego przez błony biologiczne związku referencyjnego kofeiny (CFN) wyniosła $P_{app} = 22,04 \times 10^{-6}$ cm/s. Z tym wynikiem porównano następnie obliczone dla **MF-8rac** i stereoizomerów wartości P_{app} . Stwierdzono, że otrzymane wyniki różnią się pomiędzy badanymi stereoizomerami i korelują z wynikami otrzymanymi w teście Pgp. Stereoizomer **MF-8C**, który nie wykazywał wpływu stymulującego na aktywność białka Pgp, był związkiem najsilniej absorbowanym przez monowarstwę komórek Caco-2, z wartością $P_{app} = 29,9 \times 10^{-6}$ cm/s. Kolejne stereoizomery, **MF-8A**, **MF-8B** oraz **MF-8D**, które istotnie statystycznie stymulowały konsumpcję ATP przez pompę wyrzutu Pgp, były absorbowane w umiarkowany sposób (P_{app} w zakresie od $16,4$ do $19,6 \times 10^{-6}$ cm/s). Związek **MF-8rac** natomiast, który nie miał istotnego wpływu na aktywność Pgp, również wykazał wysoką przepuszczalność, z obliczoną wartością P_{app} wynoszącą $25,6 \times 10^{-6}$ cm/s. Warto też podkreślić, że w teście transportu biernego PAMPA **MF-8rac** wykazał niższą przepuszczalność niż CFN, podczas gdy wyniki w teście Caco-2 wskazywały na zbliżoną absorpcję obu tych związków. Co interesujące, źródła literaturowe wskazują, że CFN jest transportowana przez błony biologiczne tylko na drodze transportu biernego oraz nie jest substratem Pgp⁴⁵. Dlatego też, biorąc pod uwagę powyższe wyniki z testów PAMPA, Caco-2 i Pgp, wydaje się, że obserwowane różnice w przepuszczalności związku **MF-8rac** względem CFN w testach Caco-2 i PAMPA są prawdopodobnie spowodowane zaangażowaniem transporterów typu „uptake” w aktywną absorpcję tego związku w modelu Caco-2.

Ocenę stabilności metabolicznej oraz identyfikację ścieżek metabolicznych **MF-8rac** i stereoizomerów przeprowadzono z wykorzystaniem MLMs oraz analiz UPLC-MS. Analiza chromatogramu mieszaniny reakcyjnej zawierającej związek **MF-8rac** po dwugodzinnej inkubacji z MLMs wykazała, że związek ten metabolizował do jednego głównego metabolitu M1 o masie $m/z = 473,26$ oraz śladowych ilości dwóch innych metabolitów M2 ($m/z = 443,23$) oraz M3 ($m/z = 342,06$) (Tabela 6). Co ciekawe, obecność metabolitów M2 oraz M3 zaobserwowano jedynie w mieszaninie reakcyjnej po inkubacji MLMs ze stereoizomerem **MF-8B**, natomiast **MF-8A**, **MF-8C** oraz **MF-8D** metabolizowały tylko do jednego metabolitu M1 (Rycina 8 w artykule **H3**). Stwierdzono więc, że za obecność M2 oraz M3 w mieszaninie reakcyjnej zawierającej **MF-8rac** odpowiadają ścieżki metaboliczne tylko jednego stereoizomeru **MF-8B**. Ponadto czasy retencji t_R oraz masy m/z M1 i M2 odpowiadają otrzymanym we wcześniejszych badaniach metabolitom po inkubacji **MF-8rac** z mikrosomami ludzkimi HLMs (artykuły **H2** i **B1**), co sugeruje, że ścieżki metaboliczne w obu gatunkach są zbliżone. Reakcje prowadzące do otrzymania tych metabolitów zidentyfikowano jako hydroksylację (M1) oraz demetylację (M2). Masa molowa otrzymanego tylko po inkubacji z MLMs trzeciego metabolitu M3 ($m/z = 342,06$) wskazuje na rozkład związku macierzystego, po którym nastąpiła podwójna hydroksylacja. Najbardziej prawdopodobna struktura metabolitu M3 została umieszczona na rycinie 9 w artykule **H3**.

Właściwości farmakokinetyczne **MF-8rac** i stereoizomerów zostały oszacowane na podstawie wyliczonych wartości Cl_{int} w obecności MLMs. Otrzymane wyniki wykazały zróżnicowane wartości Cl_{int} stereoizomerów, w zakresie od $35,7$ do $54,8$ ml/min/kg. Stwierdzono, że **MF-8D**, z najniższą wartością Cl_{int} , był najbardziej stabilny metabolicznie, podczas gdy najwyższe Cl_{int}

zaobserwowano dla stereoizomeru **MF-8C**. Ponadto, podobnie jak w przypadku przeprowadzonego testu PAMPA, wynik dla **MF-8rac**, wynoszący $Cl_{int} = 44,2$ ml/min/kg, okazał się średnią wszystkich Cl_{int} obliczonych dla poszczególnych stereoizomerów. Zgodnie z literaturowymi ramami, klasyfikującymi wartości Cl_{int} związków otrzymane w testach mikrosomalnych ($>47,0$ ml/min/kg)⁴², **MF-8C** wykazał wysoką wartość klirensu, podczas gdy **MF-8rac** i pozostałe stereoizomery wartość umiarkowaną, mieszczącą się w przedziale pomiędzy 8,6 i 47,0 ml/min/kg.

Przewidywanie potencjalnych interakcji międzylekowych wykonano przy użyciu testów luminescencyjnych P450-Glo™ 3A4, 2D6 i 2C9. Wpływ **MF-8rac** i stereoizomerów na odpowiednie izoformy CYP badano w stężeniu 10 μ M i porównano z 1 μ M stężeniem odpowiedniego silnego inhibitora CYP – **KE** (3A4), **QD** (2D6) oraz sulfafenazolu (**SE**, 2C9).

Istotnie statystyczny ($p < 0,01$, $p < 0,001$) efekt hamujący CYP3A4 zaobserwowano dla wszystkich związków, przy czym aktywność ta różniła się pomiędzy badanymi stereoizomerami. Najsilniejszą inhibicję CYP3A4 stwierdzono dla stereoizomeru **MF-8D**, który zmniejszył aktywność kontrolną CYP3A4 do 59,7%, a najslabszą dla **MF-8A**, gdzie efekt ten wynosił 83,7%. Wykazano również, że aktywność hamująca CYP3A4 przez **MF-8rac** była uśrednioną wartością efektów hamujących stwierdzonych dla poszczególnych stereoizomerów (Rycina 10a w artykule **H3**).

W przypadku izoformy CYP2D6 nie wykazano wpływu **MF-8rac** oraz stereoizomerów na jej aktywność (Rycina 10b w artykule **H3**).

Zaobserwowano natomiast bardzo interesujący efekt oddziaływania na CYP2C9. Stereoizomer **MF-8C** silnie aktywował ($p < 0,001$) tę izoformę aż do 302,6% aktywności kontrolnej, stereoizomer **MF-8D** istotnie statystycznie ($p < 0,05$) hamował aktywność do 82,7% kontroli, podczas gdy dla **MF-8A** oraz **MF-8B** nie stwierdzono jakiegokolwiek efektu. Podobnie jak w przypadku badań z izoformą CYP3A4, aktywność **MF-8rac** wobec CYP2C9 była średnią wyników otrzymanych dla poszczególnych stereoizomerów (Rycina 10c w artykule **H3**).

Linie komórkową ludzkiego wątrobiaka HepG2 wykorzystano do oszacowania hepatotoksyczności **MF-8rac** i stereoizomerów. Do badań zastosowano kolorymetryczny test MTS firmy Promega® (Madison, WI, USA) mierzący aktywność dehydrogenaz w żywych komórkach. Na podstawie otrzymanych wyników nie stwierdzono, we wszystkich badanych stężeniach, istotnie statystycznego wpływu badanych stereoizomerów na żywotność komórek HepG2 po 72 godzinach inkubacji (Rycina 11 w artykule **H3**).

- *Stereoizomery związku **MF-8** - podsumowanie*

Uzyskane wyniki potwierdziły stereochemiczną zależność wpływu poszczególnych stereoizomerów związku **MF-8** na wybrane parametry ADME-Tox. Stwierdzono m.in. różnice w indukowaniu aktywności Pgp, korelujące z wartościami P_{app} w modelu Caco-2, różny profil farmakokinetyczny *in vitro*, dodatkowe ścieżki metaboliczne stereoizomeru **MF-8B** oraz istotne różnice w aktywności izomerów CYP3A4 i CYP2C9 w obecności badanych stereoizomerów. Kompleksowe wyniki badań radioreceptorowych oraz testów parametrów ADME-Tox pozwoliły wyłonić stereoizomer o najkorzystniejszym profilu **MF-8A**, który wykazał najwyższe powinowactwo do 5-HT₇R, jedną z najniższych wartości Cl_{int} oraz brak ryzyka interakcji międzylekowych. Do głównych wad tego stereoizomeru należą istotna statystycznie aktywacja białka Pgp, najniższa wartość przepuszczalności P_{app} w modelu Caco-2 i jedna z najniższych Pe w modelu PAMPA wśród badanych stereoizomerów. Mimo to wyniki testów absorpcji **MF-8A** są satysfakcjonujące, gdy się je porówna do dobrze przepuszczalnego związku referencyjnego **CFN**. Dlatego też stereoizomer **MF-8A** został wybrany i przekazany do dalszych badań *in vivo* pod kątem określenia aktywności przeciwdepresyjnej na gryzoniach.

Tabela 5 Parametry ADME-Tox związku **MF-8rac**, jego stereoizomerów oraz związków referencyjnych.

Związek	PAMPA (<i>P_e</i>) [10 ⁻⁶ cm/s] ±SD	Caco-2 (<i>P_{app}</i>) [10 ⁻⁶ cm/s] ± SD	Pgp (% aktywności podsta- wowej) ^a	<i>Cl_{int}</i> [ml/ min/ kg]	CYP 3A4 (% kontroli) ±SD ^b	CYP 2D6 (% kontroli) ±SD ^b	CYP 2C9 (% kontroli) ±SD ^b	Żywotność HepG2 (% kontroli) ±SD ^c
CFN	15,1±0,40	22,04±0,38	-	-	-	-	-	-
DX	-	-	-	-	-	-	-	40,5±1,8
KE	-	-	-	-	3,0±0,5	-	-	-
NFX	0,56±0,13	-	-	-	-	-	-	-
QD	-	-	-	-	-	4,4±0,7	-	-
SE	-	-	-	-	-	-	9,5±0,3	-
VL	-	-	192,8±14,8	NT	-	-	-	-
MF-8rac	6,1±3,2	25,6±0,7	121,5±28,1	44,2	75,4±2,2	98,7±3,4	165,7±16,1	90,6±6,5
MF-8A	5,9±0,4	16,4±0,04	155,5±14,6	40,3	83,7±5,6	90,4±0,6	107,1±0,5	89,2±6,4
MF-8B	8,0±3,0	19,6±0,1	166,1±9,6	45,4	66,6±3,5	93,0±3,5	111,3±0,8	88,3±7,4
MF-8C	4,1±0,8	29,9±0,1	112,2±6,7	54,8	80,9±2,7	95,7±0,5	302,6±5,4	103,1±9,4
MF-8D	8,9±0,2	17,5±0,01	139,7±4,0	35,7	59,7±1,9	97,7±4,2	82,7±1,6	95,0±13,7

SD - odchylenie standardowe; NT - nie testowano; skróty związków referencyjnych: **CFN**, kofeina; **DX**, doksorubicyna; **KE**, ketokonazol; **NFX**, norfloksacyna; **QD**, chinidyna; **SE**, sulfafenazol; **VL**, werapamil

^areferencyjny induktor aktywności Pgp **VL** testowano w stężeniu 200 µM, **MF-8rac** i stereoizomery testowano w stężeniu 100 µM

^breferencyjne inhibitory CYP **KE**, **QD** oraz **SE** testowano w stężeniu 1 µM, wyniki dla **MF-8ac** i stereoizomerów zamieszczono dla stężenia 10 µM

^creferencyjny cytostatyk **DX** testowano w stężeniu 1µM, wyniki dla **MF-8rac** i stereoizomerów zamieszczono dla stężenia 100 µM

Tabela 6 Ścieżki metaboliczne **MF-8rac** i stereoizomerów wyznaczone po 120 min inkubacji z MLMs.

Substrat [m/z]	Ilość metabolitów	Czas retencji [min]	Masa molowa metabolitu [m/z]	Ścieżki metaboliczne*
MF-8rac 457,31	3	3,41	473,26	hydroksylacja
		3,77	443,28	demetylacja
		3,95	342,06	rozpad/hydroksylacje
MF-8A 457,31	1	3,50	473,32	hydroksylacja
MF-8B 457,31	3	3,51	473,32	hydroksylacja
		3,84	443,28	demetylacja
		4,00	342,06	rozpad/hydroksylacje
MF-8C 457,31	1	3,42	473,26	hydroksylacja
MF-8D 457,31	1	3,47	473,26	hydroksylacja

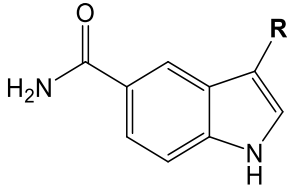
*główną ścieżkę metaboliczną zaznaczono pogrubioną czcionką

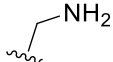
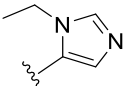
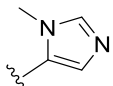
4.3.3.3 Agoniści 5-HT₇R

5-karboksyamidotryptamina (5-CT) ze względu na bardzo wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT₇, 5-HT_{1A}, 5-HT_{5A} oraz w pewnym stopniu również 5-HT₆ jest powszechnie stosowaną sondą molekularną w badaniach związanych z układem serotonergicznym. Brak selektywności, a także niesatysfakcjonująca przepuszczalność przez barierę krew-mózg są głównymi wadami 5-CT jako narzędzia farmakologicznego do badań receptorów serotoninowych. W związku z tym nadal istnieje duże zapotrzebowanie na „doskonałego” selektywnego agonistę 5-HT₇R, który mógłby zastąpić 5-CT i być wykorzystany między innymi do badań nad 5-HT₇R. Mając to na uwadze, badacze z Zakładu Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN zsyntetyzowali z sukcesem serię pochodnych imidazolo-indoli, które okazały się pierwszym przykładem niskozasadowych silnych agonistów 5-HT₇R. Część tych związków otrzymano w ramach projektu finansowanego przez NCN (2017/25/B/NZ7/0929) pod kierownictwem prof. dr. hab. Andrzeja J. Bojarskiego, w którym miałem okazję uczestniczyć jako wykonawca. W wyniku przeprowadzonych badań dwie pochodne z tej grupy, **AGH-107** i **AGH-192**, zostały wyselekcjonowane jako potencjalne sondy molekularne o silnym powinowactwie i działaniu agonistycznym do receptora 5-HT₇, potwierdzonym działaniem prokognitywnym i antynocyceptywnym *in vivo*, oraz wykazanych w moich testach *in vitro* korzystnych właściwościach lekopodobnych. Wyniki tych obiecujących badań zostały opisane w artykułach **B2** oraz **B3**. Kolejne związki z tej serii, mianowicie **AH-494** oraz **AGH-282**, zostały zaprojektowane jako bardzo bliskie analogi strukturalne 5-CT (Tabela 7). W związku z tym nasza uwaga skupiła się na porównaniu właściwości biologicznych tych pochodnych z 5-CT w celu oszacowania możliwości ich wykorzystania jako alternatywy w badaniach nad układem serotoninowym. Zaplanowano w tym celu badania selektywności i powinowactwa do receptorów 5-HT, określenie parametrów ADME-Tox *in vitro* oraz oszacowanie aktywności *in vivo*.

W wyniku przeprowadzonych przez badaczy z Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN testów radioreceptorowych stwierdzono nie tylko wysokie powinowactwo **AH-494** i **AGH-282** do 5-HT₇R, ale również cenną, wysoką selektywność względem receptora 5-HT_{1A} (Tabela 7). Wykonano również następujące testy *in vitro* parametrów ADME-Tox: oszacowanie biodostępności w teście PAMPA oraz przy zastosowaniu testu określającego potencjalne substraty Pgp; badanie stabilności metabolicznej oraz ścieżek metabolicznych przy użyciu mikrosomów wątrobowych pochodzących z różnych gatunków – człowieka (HLMs), myszy (MLMs) oraz szczura (ang. *rat liver microsomes*, RLMs); oszacowanie toksyczności przy zastosowaniu panelu testów bezpieczeństwa, w tym wpływu związków na aktywność izoform CYP 3A4, 2D6 i 2C9 w celu przewidzenia interakcji międzylekowych, badanie cytotoksyczności, hepatotoksyczności oraz neurotoksyczności na liniach komórkowych odpowiednio HEK-293, HepG2 i ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y (ATCC®, CRL-2266™) oraz określenie mutagenności w teście Ames. Otrzymane wyniki badań zostały podsumowane w tabeli 8.

Tabela 7 Struktury i aktywność farmakologiczna **5-CT** oraz pochodnych indolu-imidazolu.



Związek	R	5-HT _{1A} K _i [nM]	5-HT _{2A} K _i [nM]	5-HT _{5A} K _i [nM]	5-HT ₆ K _i [nM]	5-HT ₇ K _i [nM]	D ₂ K _i [nM]
5-CT		0,3	5012	20	720	0,4	NT
AH-494		123	>10000	NT	>10000	5	>10000
AGH-282		220	>10000	NT	6910	6	5561

NT – nie testowano

W pierwszej kolejności wykonano test PAMPA, w którym, podobnie jak w przypadku metodologii opisanej w artykułach **H1** i **H2**, do oszacowania stężeń badanych substancji, niezbędnych do wyliczenia współczynnika przepuszczalności Pe , wykorzystano system elektroforezy kapilarnej. Testowane związki **5-CT** i **AH-494** wykazały bardzo dobrą przepuszczalność na drodze transportu biernego przez błony biologiczne w porównaniu do związków referencyjnych **CNF** i **NFX**, przy czym obliczona dla **5-CT** wartość $Pe = 3,54 \times 10^{-6}$ cm/s była nieznacznie wyższa od tej dla **AH-494** ($Pe = 2,78 \times 10^{-6}$ cm/s).

Związki **5-CT** i **AH-494** wykazały również porównywalne, istotne statystycznie ($p < 0,01$, $p < 0,001$) działanie hamujące konsumpcję ATP przez białko Pgp w badanych stężeniach 100 μ M. Obserwowano spadek poziomu ATP w mieszaninach reakcyjnych odpowiednio do około 26% i 19% aktywności podstawowej. W przypadku związku **AGH-282** stwierdzono podobny efekt, ale nie był on istotny statystycznie (Rycina 3 w artykule **H4**).

Badane związki były również inkubowane z HLMs, MLMs oraz RLMs przez 120 min w temperaturze 37°C celem zdefiniowania ich stabilności metabolicznej. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabelach 8 i 9. Analiza chromatograficzna UPLC mieszaniny reakcyjnej otrzymanej po reakcji **5-CT** z HLMs wykazała, że około 26% tego związku przereagowało do dwóch metabolitów, M1 oraz M2. Niestety, ze względu na niejednoznaczne w interpretacji widmo MS metabolitu M1 udało się zidentyfikować jedynie masę molową metabolitu M2 ($m/z = 219,11$). Stwierdzony wzrost masy o 14 Da oraz wyniki przewidywania programem MetaSite najbardziej prawdopodobnych miejsc metabolizmu wskazały na utlenienie do grupy karbonylowej podstawnika 2-aminoetylowego jako ścieżkę metaboliczną **5-CT** prowadzącą do metabolitu M2 („*Supplementary information*” w artykule **H4**).

Analiza UPLC mieszanin reakcyjnych **AH-494** i **AGH-282**, po inkubacji z HLMs, wykazała ich doskonałą stabilność metaboliczną, ponieważ nie stwierdzono obecności metabolitów („*Supplementary information*” w artykule **H4**).

Modele zwierzęce (MLMs i RLMs) wykazały podobieństwo w ścieżce metabolicznej **5-CT**, ponieważ w mieszaninach reakcyjnych z MLMs jak i RLMs stwierdzono obecność jednego metabolitu o identycznym, w obu przypadkach, czasie retencji ($t_R = 1,62$). Niestety, nie udało się zidentyfikować masy tego metabolitu ze względu na trudne w interpretacji widma MS, aczkolwiek porównanie czasu retencji metabolitu **5-CT**, znalezione w modelach MLMs i RLMs, z metabolitem M1 otrzymanym po inkubacji z HLMs ($t_R = 1,61$) wskazywało, że może to być ta sama cząsteczka. Należy również wspomnieć, że dokładna analiza UPLC wykazała wyższą stabilność **5-CT** w obecności MLMs (2% zmetabolizowanego związku) niż RLMs (około 20% zmetabolizowanego związku) („*Supplementary information*” w artykule **H4**).

Chromatogramy UPLC oraz widma MS mieszanin reakcyjnych po inkubacji **AH-494** z RLMs i MLMs potwierdziły w obu modelach badawczych obecność tego samego metabolitu o zbliżonym czasie retencji około 1,60 min i masie molowej $m/z \sim 271$. Wzrost masy cząsteczkowej tego metabolitu względem **AH-494** o 16 Da sugerował, że doszło do reakcji hydroksylacji, która, zgodnie z analizą fragmentacyjną MS/MS i przewidywaniami *in silico*, przypuszczalnie wystąpiła przy podstawniku *N*-etylowym. Ponadto **AH-494** wydawał się nieco bardziej stabilny w obecności RLMs niż w MLMs, ponieważ uległo metabolizmowi odpowiednio 7% i 14% tego związku („*Supplementary information*” w artykule **H4**).

Wyniki uzyskane dla **AGH-282** po inkubacji z RLMs były identyczne z tymi po inkubacji z HLMs, ponieważ również nie znaleziono żadnych metabolitów. Analiza UPLC-MS mieszaniny reakcyjnej po inkubacji **AGH-282** z MLMs wykazała natomiast obecność jednego metabolitu o masie cząsteczkowej $m/z = 274,14$. Stwierdzono ponadto, że metabolizmowi uległo około 9% związku **AGH-282**. Zgodnie z analizą fragmentacyjną MS/MS i danymi *in silico* najbardziej prawdopodobną ścieżką metaboliczną tego związku była podwójna hydroksylacja („*Supplementary information*” w artykule **H4**).

Badania ryzyka interakcji międzylekowych wykazały bardzo silną inhibicję CYP3A4 przez związek **AH-494**. Obliczona wartość IC_{50} wynosiła 0,31 μM , a obserwowana w 10 μM stężeniu aktywność tego cytochromu zaledwie 2,9% w odniesieniu do kontroli negatywnej. Otrzymane wartości były zbliżone do wyników dla referencyjnego inhibitora **KE** ($IC_{50} = 0,14 \mu M$). Inhibicję CYP3A4 zaobserwowano również w obecności **AGH-282**, z wyliczoną wartością $IC_{50} = 3,53 \mu M$ oraz obserwowaną aktywnością cytochromu wynoszącą 29,4% w obecności 10 μM tego związku. Co ciekawe, **5-CT** nie wpłynął w jakikolwiek sposób na aktywność CYP3A4 w żadnym z badanych stężeń (Rycina 4A w artykule **H4**).

Inhibicję wywołaną przez związki **AH-494** oraz **AGH-282** stwierdzono również w przypadku izoformy CYP2D6. Obliczone dla tych związków wartości IC_{50} wynosiły 7,47 oraz 27,60 μM , a obserwowana redukcja aktywności tego cytochromu w stężeniu 10 μM odpowiednio 43,4% i 55,0%. W przypadku **5-CT** natomiast zaobserwowano jedynie nieznaczną aktywację CYP2D6 w najwyższych badanych stężeniach (Rycina 4B w artykule **H4**).

Jeśli chodzi o izoformę CYP2C9, stwierdzono jej inhibicję do około 40% aktywności w odniesieniu do kontroli negatywnej jedynie w najwyższym badanym stężeniu związku **AGH-282** podczas gdy dla **AH-494** i **5-CT** nie zauważono istotnego statystycznie efektu (Rycina 4C w artykule **H4**).

Podsumowując, otrzymane dla nowo zsyntetyzowanych agonistów 5-HT₇R wyniki wskazują na wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia interakcji międzylekowych. Odpowiedzialna za

interakcje z CYP3A4 i CYP2D6 wydaje się obecność *N*-podstawionego imidazolu w strukturach związków **AH-494** i **AGH-282**, jako że imidazol jest wspólną cechą budowy wielu znanych inhibitorów CYP⁴⁶.

Cytotoksyczność, hepatotoksyczność, neurotoksyczność oraz mutagenność związków **5-CT**, **AH-494** i **AGH-282** przetestowano przy zastosowaniu linii komórkowych HEK-293, HepG2, SH-SY5Y oraz szczepu bakterii *Salmonella* Typhimurium TA100. Istotny statystycznie ($p < 0,001$) wpływ **AH-494** i **AGH-282** na żywotność badanych komórek zaobserwowano w przypadku tylko jednej linii komórkowej HepG2. Zastosowany w eksperymencie test MTS wykazał niewielkie, do około 80% kontroli, obniżenie żywotności komórek HepG2 w najwyższym badanym stężeniu związków wynoszącym 100 μ M (Rycina 5 w artykule **H4**).

Nie stwierdzono również działania mutagennego **5-CT**, **AH-494** oraz **AGH-282** w teście Ames, ponieważ żaden z tych związków nie zaindukował wzrostu ilości rewertantów bakterii *Salmonella* Typhimurium TA100 do progu uznawanego za alert mutagenności (Rycina 7 w artykule **H4**).

- *Agoniści 5-HT₇R – podsumowanie*

W przeprowadzonych badaniach radioreceptorowych wykazano istotną zaletę związków **AH-494** i **AGH-282** względem **5-CT** w postaci silnego powinowactwa do 5-HT₇R w połączeniu z wysoką selektywnością wobec 5-HT_{1A}. Ponadto porównanie oszacowanych testami *in vitro* parametrów ADME-Tox wszystkich trzech badanych agonistów 5-HT₇R wskazało na szereg podobieństw pomiędzy tymi związkami. Zarówno **5-CT** jak i **AH-494** posiadały bardzo dobrą zdolność do biernej dyfuzji przez błony biologiczne w teście PAMPA, a także znacząco hamowały aktywność Pgp. Stwierdzono również doskonałą stabilność metaboliczną **5-CT**, **AH-494**, a w szczególności związku **AGH-282**, dla którego nie zaobserwowano żadnych metabolitów po inkubacji z HLMs i RLMs. Znaczące różnice w wynikach przeprowadzonych testów *in vitro* pomiędzy **5-CT** i badanymi nowymi agonistami 5-HT₇R stwierdzono jedynie w przypadku określenia wpływu na aktywność izoform CYP, aczkolwiek w przypadku związków **AH-494** i **AGH-282** spodziewano się silnego efektu inhibicji, po pierwsze ze względu na obecność pierścienia imidazolu w ich strukturach, a po drugie przez obserwowaną wcześniej, i opisaną w artykułach **B2** oraz **B3**, silną inhibicję CYP3A4 innych związków z tej grupy. Należy podkreślić, że w przeprowadzonych testach nie stwierdzono toksyczności i mutagenności związków **5-CT**, **AH-494** oraz **AGH-282**.

Aktywność *in vivo* związku **AH-494** została potwierdzona w eksperymentach behawioralnych na myszach, przeprowadzonych przez badaczy z Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN. Związek **AH-494** był aktywny w teście rozpoznawania nowego obiektu (NOR), co wskazało na jego potencjał w poprawianiu krótkotrwałej pamięci roboczej, a pośrednio potwierdziło również zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg (Rycina 8 w artykule **H4**). Ponadto obserwowany dla **AH-494** efekt wystąpił przy jego stosunkowo niskiej dawce 1 mg/kg, wykazując podobieństwo z wcześniejszymi wynikami literaturowymi uzyskanymi dla **5-CT**⁴⁷. Podsumowując, opisane w artykule **H4** związki **AH-494** i **AGH-282** zostały przedstawione jako bardzo obiecująca alternatywa dla **5-CT**, ze względu na wysokie powinowactwo do receptora 5-HT₇R, wyższą od **5-CT** selektywnością wobec 5-HT_{1A}R oraz podobnymi parametrami ADME-Tox *in vitro*, z jedną tylko wadą wynikającą z ich możliwego działania niepożądanego związanego z hamowaniem izoform CYP.

Tabela 8 Parametry ADME-Tox 5-CT, AH-494, AGH-282 oraz związków referencyjnych.

Związek	<i>Pe</i> [10 ⁻⁶ cm/s] ±SD	<i>Pgp</i> (% aktywności podstawowej) ^a ±SD	Metabolizm (% zmetabolizowanego substratu) przez: (A) HLMs; (B) MLMs; (C) RLMs	CYP 3A4 (% kontroli) ±SD ^b	CYP 2D6 (% kontroli) ±SD ^b	CYP 2C9 (% kontroli) ±SD ^b	Żywot- ność HepG2 (% kontroli) ±SD ^c	Żywot- ność HEK-293 (% kontroli) ±SD ^c	Żywot- ność SH-SY5Y (% kontroli) ±SD ^c	AMES Średnia pozytywnych dolków ±SD/ krotność powyżej MCB ^d
CFN	3,61±0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DX	-	-	-	-	-	-	40,5±1,8	12,0±5,4	26,0±1,8	-
KE	-	-	-	3,0±0,5	-	-	-	-	-	-
NFX	0,95±0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NQNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47,67±0,5/ 5,96
QD	-	-	-	-	4,4±0,7	-	-	-	-	-
SE	-	-	-	-	-	9,5±0,3 ^g	-	-	-	-
VL		178,9± 25,8	(A) 69 ^e (B) NT (C) 63 ^f	-	-	-	-	-	-	-
5-CT	3,54±8,2	26,3±12,0	(A) 26 (B) 2 (C) 20	95,7±1,4	108,3±2,6	78,7±1,6	101,3±3,8	105,3±7,0	91,0±5,7	4,0±2,9/ 0,5
AH-494	2,78±9,2	19,3±12,3	(A) 0 (B) 14 (C) 7	2,9±0,8	43,4±0,8	104,2±15,8	78,7±3,8	78,7±16,8	106,7±3,5	5,6±1,2/ 0,79
AGH-282	NT	60,0±16,0	(A) 0 (B) 9 (C) 0	29,4±2,2	55,0±9,7	37,2±21,1	82,2±5,7	112,2±5,2	88,4±7,1	12,3±1,5/ 1,03

SD - odchylenie standardowe; NT - nie testowano; MCB - wartość kontrolna linii bazowej pożywki; skróty związków referencyjnych: CFN, kofeina; DX, doksorubicyna; KE, ketokonazol; NFX, norfloksacyna; NQNO, N-tlenek 4-nitrochinoliny; QD, chinidyna; SE, sulfafenazol; VL, werapamil

^areferencyjny induktor aktywności *Pgp* VL testowano w stężeniu 200 µM; 5-CT, AH-494 oraz AGH-282 testowano w stężeniu 100 µM

^bwyniki dla inhibitorów CYP KE, QD i SE podano w stężeniu 1 µM; efekt 5-CT, AH-494 oraz AGH-282 na CYP3A4 i 2D6 podano dla stężenia 10 µM, na CYP2C9 dla stężenia 25 µM

^creferencyjny cytostatyk DX testowano w stężeniu 1 µM, wyniki dla 5-CT, AH-494 oraz AGH-282 podano dla stężenia 100 µM

^dmutagenność NQNO testowano w stężeniu 0,05 µM, wyniki dla 5-CT, AH-494 oraz AGH-282 podano w stężeniu 10 µM

^e% zmetabolizowanego VL po 120 min inkubacji z HLMs opublikowano w artykule B49; ^f% zmetabolizowanego VL po 120 min inkubacji z RLMs opublikowano w artykule B51

^gefekt SE na CYP2C9 opublikowano w artykule H3

Tabela 9 Ścieżki metaboliczne agonistów 5-HT₇R wyznaczone po 120 min inkubacji z HLMs, MLMs RLMs.

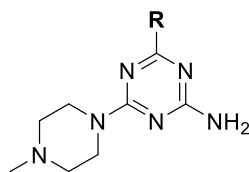
Substrat (m/z)	Ilość metabolitów	Czas retencji (min)	Masa molowa metabolitu (m/z)	Ścieżki metaboliczne*
5-CT 205,09	(A) 2	1,61	NZ	NZ
		2,19	219,11	oksydacja
	(B) 1	1,61	NZ	NZ
	(C) 1	1,61	NZ	NZ
AH-494 255,24	(A) 0	-	-	-
	(B) 1	2,45	271,15	hydroksylacja
	(C) 1	2,42	271,21	hydroksylacja
AGH-282 241,11	(A) 0	-	-	-
	(B) 1	2,16	274,14	podwójna hydroksylacja
	(C) 0	-	-	-

NZ – nie zidentyfikowano; (A) HLMs; (B) MLMs; (C) RLMs; *główną ścieżkę metaboliczną zaznaczono pogrubioną czcionką

4.3.3.4 Ligandy 5-HT₆R

Ligandy 5-HT₆R zostały wyselekcjonowane do badań parametrów ADME-Tox przez chemików z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Lecznictwa UJ CM ze względu na silne powinowactwo i selektywność w stosunku do 5-HT₆R. Wybrana grupa reprezentuje nową klasę chemiczną związków aktywnych wobec 5-HT₆R, należących do pochodnych metylopiperazyno-1,3,5-triazyny. Wykonanie testów parametrów ADME-Tox było współfinansowane z dwóch grantów NCN, w których miałem okazję uczestniczyć jako wykonawca: pod kierownictwem prof. dr hab. Jadwigi Handzlik (2018/31/B/NZ7/02160) oraz pod kierownictwem mgr Annamarii Lubelskiej (2016/21/N/NZ7/03265). Dwa związki z tej grupy, **DJ-18** i **KMP-10**, to opisane w artykule **H5** pochodne metylopiperazyno-1,3,5-triazyny zawierające cykliczny hydantoinowy łącznik pomiędzy ugrupowaniami aromatycznymi, dwie kolejne pochodne **TR-37** (numer 1 w artykule **H6**) i **KB-61** (numer 2 w artykule **H6**) zawierają podstawnik fenyłowy z odpowiednio chlorem lub metylem w pozycji *meta*, **TR-12** (numer 3 w artykule **H6**) zawiera ugrupowanie 3-indolu, natomiast **MST-4** (numer 4 w artykule **H6**), to związek zawierający ugrupowanie tymolu, który został zsyntetyzowany podczas poszukiwania aktywnych diuretyków kilkadziesiąt lat temu⁴⁸.

Pochodne metylopiperazyno-1,3,5-triazyny zostały poddane szeregowi testów radioreceptorowych przez współpracujących badaczy z Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w celu oszacowania ich powinowactwa i selektywności względem receptorów serotoninowych 5-HT₆, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇ oraz dopaminowego D_{2L}. Otrzymane wyniki wskazywały na bardzo wysokie powinowactwo obu pochodnych fenyłowych oraz 3-indolowej i tymolowej do 5-HT₆R ($K_i = 11 - 29$ nM), podczas gdy pochodne z łącznikiem hydantoinowym pomiędzy ugrupowaniami aromatycznymi, wykazały mniejsze, ale nadal istotne powinowactwo w zakresie od 87 do 127 nM. Ponadto stwierdzono istotną selektywność wszystkich badanych pochodnych względem receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇ oraz D_{2L} (Tabela 10).

Tabela 10 Struktury i aktywność farmakologiczna pochodnych metylopiperazyno-1,3,5-triazyny.

Związek	R	5-HT ₆ <i>K_i</i> [nM]	D _{2L} <i>K_i</i> [nM]	5-HT _{1A} <i>K_i</i> [nM]	5-HT _{2A} <i>K_i</i> [nM]	5-HT ₇ <i>K_i</i> [nM]
DJ-18		127	4098	23300	NT	3711
KMP-10		87	4247	14160	17170	514
TR-37		28	838	4954	272	8710
KB-61		29	1192	10220	329	16160
TR-12		22	1946	9453	1757	16790
MST-4		11	1094	12530	430	11950

Wybrane ligandy 5-HT₆R przebadano w celu określenia ich parametrów ADME-Tox następującymi testami *in vitro*: biodostępność wszystkich związków określono metodą PAMPA oraz testem definiującym substraty Pgp, dodatkowo w modelu komórkowym Caco-2 przebadano jedną pochodną **KMP-10**; badanie stabilności metabolicznej, w tym określenie parametrów farmakokinetycznych Cl_{int} , $t_{1/2}$ oraz określenie ścieżek metabolicznych przeprowadzono przy użyciu HLMS; panel zastosowanych testów bezpieczeństwa obejmował badanie wpływu związków na aktywność izoform CYP 3A4 i 2D6 w celu oszacowania potencjalnych interakcji międzylekowych, określenie cytotoksyczności i hepatotoksyczności w modelach eukariotycznych

linii komórkowych HEK-293 i HepG2 oraz badania mutagenności w teście Ames; wykonano również test wiązania do białek osocza w celu określenia parametru dystrybucji związku **KMP-10**. Otrzymane wyniki zostały podsumowane w tabeli 11.

W pierwszej kolejności przeprowadzono badania ligandów 5-HT₆R testem PAMPA. Stężenia pochodnych metylopiperazyno-1,3,5-triazyny, po 5h inkubacji, zostały oszacowane przy pomocy analizy UPLC-MS z zastosowaniem standardu wewnętrznego. Wyliczone wartości P_e wykazały doskonałą przepuszczalność na drodze transportu biernego przez błony biologiczne większości badanych związków. Wybitną wartość P_e , wyższą od tej obliczonej dla dobrze przepuszczalnego związku referencyjnego **CFN**, wyznaczono dla grupy pochodnych **DJ-18**, **TR-37**, **KB-61** oraz **TR-12**. Najlepszą przepuszczalność, z wartością $P_e > 20 \times 10^{-6}$ cm/s, stwierdzono dla związków posiadających atom chloru, tj. **DJ-18** oraz **TR-37**. Zbliżoną do **CFN** wartość P_e wyliczono dla związku **MST-4** ($12,3 \times 10^{-6}$ cm/s). W przeciwieństwie do dobrze przepuszczalnej pochodnej **DJ-18** kolejny badany związek zawierający pierścień hydantoiny, **KMP-10**, wykazał umiarkowaną zdolność do przenikania przez błony biologiczne, z czterokrotnie niższą wartością P_e od **CFN**, odpowiednio $3,76 \times 10^{-6}$ oraz $15,1 \times 10^{-6}$ cm/s. Umiarkowany wynik przepuszczalności **KMP-10** w teście PAMPA potwierdzono następnie w badaniu przy zastosowaniu modelu komórkowego Caco-2. Otrzymana w tej metodzie wartość P_{app} dla **KMP-10** wynosiła $6,27 \times 10^{-6}$ cm/s, co według określonych w literaturze norm dla modelu Caco-2 klasyfikowało tę pochodną do związków średnio przepuszczalnych (P_{app} pomiędzy 2×10^{-6} a 20×10^{-6} cm/s)⁵. W przeprowadzonym teście Caco-2 również zastosowano **CFN**, jako dobrze przepuszczalny związek referencyjny, z obliczoną eksperymentalnie wartością $P_{app} = 22,04 \times 10^{-6}$ cm/s. Co ciekawe, porównanie wyników uzyskanych dla **KMP-10** w obu testach przepuszczalności, PAMPA i Caco-2 wykazało, że związek ten miał 4-krotnie niższą od **CFN** wartość P_e w teście PAMPA, natomiast wykazał nieco lepszy wynik w modelu Caco-2, z tylko 3-krotnie słabszą wartością P_{app} od **CFN**. Jak już wspomniano wcześniej, wg źródeł literaturowych absorpcja **CFN** przez błony biologiczne odbywa się na drodze transportu biernego, dlatego można podejrzewać, że zaobserwowane różnice w testach PAMPA i Caco-2 mogą wynikać z zaangażowania aktywnych transporterów typu „uptake” w transport związku **KMP-10** przez komórki Caco-2.

Badanie wpływu pochodnych metylopiperazyno-1,3,5-triazyny na konsumpcję ATP przez Pgp wykazało nieznaczny i nieistotny statystycznie wzrost aktywności podstawowej tego białka w obecności pochodnych **TR-37**, **TR-12** i **MST-4** w stężeniu 100 µM. Związki te można uznać zatem za bardzo słabe substraty Pgp. Z drugiej strony, w obecności pochodnej zawierającej podstawnik 3-metylofenylowy **KB-61** stwierdzono silną inhibicję aktywności podstawowej Pgp ($p < 0,001$), porównywalną do tej wyznaczonej dla silnego referencyjnego inhibitora Pgp, tj. Na₃VO₄, badanego w stężeniu 100 µM (Rycina 3 w artykule **H6**). Stwierdzono również nieistotną statystycznie, bardzo słabą inhibicję aktywności podstawowej Pgp w obecności pochodnych **DJ-18** i **KMP-10** (Rycina 4 w artykule **H5**).

Wiązanie z białkami osocza (ang. *plasma protein binding*, PPB) jest istotnym parametrem, który powinien być badany na wczesnych etapach procesu odkrywania leku, ponieważ za jego efekt farmakologiczny odpowiada jedynie niezwiązana z białkami frakcja (f_u), która jest w stanie przeniknąć przez błony komórkowe i dotrzeć do celu molekularnego. Wiele leków, zwłaszcza związki o charakterze lipofilowym, wiąże się z białkami osocza, takimi jak ludzka albumina osocza (ang. *human serum albumin*, HSA), α₁-kwaśna glikoproteina (ang. *α₁-acid glycoprotein*, AGP) oraz globuliny i lipoproteiny⁴⁹. HSA i AGP to białka, które są w największym stopniu odpowiedzialne za wiązanie leków i zmniejszenie ekspozycji na ich działanie terapeutyczne. Do oceny wiązania

z białkami osocza pochodnej **KMP-10** zastosowano komercyjny test TRANSIL^{XL} PPB (Sovicell, Lipsk, Niemcy), zawierający immobilizowane białka HSA i AGP. Test ten naśladuje warunki fizjologiczne panujące w osoczu, w którym HSA i AGP występują w stosunku 24:1. Jako kontrolę pozytywną zastosowano warfarynę (**WAR**), która jest lekiem silnie wiążącym się z białkami osocza. W rezultacie przeprowadzonych badań oszacowano frakcję związaną (f_b) z HSA i AGP związku referencyjnego **WAR**, wynoszącą 98,5%. Wynik ten okazał się zbliżony do wartości literaturowych⁴⁹. Badana pochodna triazyny **KMP-10** wykazała znacznie korzystniejszy wynik od **WAR**, gdyż jej (f_b) obliczono na 84,5%.

Stabilność metaboliczną badanych ligandów 5-HT₆R oszacowano przy użyciu HLMs. Po wykonaniu testów stwierdzono, że wszystkie badane związki były stabilne metabolicznie w odniesieniu do referencyjnego leku **VL** i wykazały wartości Cl_{int} mieszczące się w zakresie sugerowanym w literaturze dla związków o niskim klirensie ($Cl_{int} < 8,6$ ml/min/kg)⁴². Spośród badanych związków pochodna 3-indolowa (**TR-12**) wykazała najwyższą stabilność metaboliczną, z wyliczonym klirensem wewnętrznym $Cl_{int} = 2,34$ ml/min/kg, podczas gdy najmniej stabilna okazała się pochodna 3-chlorofenyłowa **TR-37** ($Cl_{int} = 7,56$ ml/min/kg). Ponadto wartości Cl_{int} wewnętrznego, w zakresie 3,74 – 6,30 ml/min/kg, wykazały pochodne **KB-61**, **MST-4** oraz związki zawierające łącznik hydantoinowy między ugrupowaniami aromatycznymi **KMP-10** i **DJ-18**.

Przy wsparciu oprogramowania MetaSite określono również najbardziej prawdopodobne szlaki metaboliczne ligandów 5-HT₆R w obecności HLMs. Badania *in silico* wskazały na podstawnik metylowy w ugrupowaniu *N*-metylopiperazynowym jako najbardziej prawdopodobne miejsce metabolizmu większości związków z tej grupy. Tylko w przypadku **KB-61** oraz **MST-4** program wskazał inne podstawniki metylowe, znajdujące się odpowiednio w ugrupowaniu fenyłowym, a także tymolowym (grupa metylowa znajdująca się bezpośrednio przy pierścieniu benzenu), jako najbardziej podatne na przemiany metaboliczne, aczkolwiek wysokie prawdopodobieństwo przemian w obrębie podstawnika metylowego w ugrupowaniu *N*-metylopiperazynowym zostało utrzymane (Rycina 5 w artykule **H5**, Rycina 4 w artykule **H6**). Istotnie, w badaniach *in vitro* potwierdzono dla wszystkich badanych ligandów 5-HT₆R wystąpienie reakcji demetylacji w obrębie ugrupowania *N*-metylopiperazynowego. Ponadto reakcja ta była główną ścieżką metaboliczną związków **DJ-18**, **KMP-10** oraz **MST-4**, podczas gdy w przypadku pochodnych **TR-37**, **KB-61** oraz **TR-12** stwierdzono, że była to hydroksylacja (Tabela 12).

Ogólnie rzecz biorąc, wszystkie związki z badanej grupy metabolizowały do więcej niż jednego metabolitu. Na podstawie chromatogramów UPLC mieszanin reakcyjnych z HLMs stwierdzono, że metabolizm związków **TR-37** i **KB-61** przebiegał do dwóch metabolitów, związku **TR-12** do trzech, podczas gdy związków **DJ-18**, **KMP-10** oraz **MST-4** do czterech (Rycina 6 w artykule **H5**, Rycina 5 w artykule **H6**). Większość z otrzymanych metabolitów to były hydroksylowe pochodne. Zastosowana analiza fragmentacyjna MS/MS pozwoliła ustalić najbardziej prawdopodobne miejsca hydroksylacji związków. Wykazano, że główna ścieżka metabolizmu pochodnej **TR-37** prowadziła do hydroksylacji w obrębie pierścienia piperazynowego, **TR-12** w obrębie ugrupowania 3-indolowego, podczas gdy **KB-61** 3-metylofenyloвого („*Supplementary material*” w artykule **H6**). Ponadto biorąc pod uwagę wynik *in silico* predykcji metabolizmu otrzymany dla związku **KB-61**, hydroksylacji uległ najprawdopodobniej podstawnik metylowy (Rycina 4 w artykule **H6**). Oprócz głównego, hydroksylowanego metabolitu pochodnej **TR-12** stwierdzono dodatkową hydroksylację tego związku w pierścieniu piperazyny. Dwie reakcje hydroksylacji związku **MST-4** zidentyfikowano w obrębie ugrupowania tymolowego oraz jedną w pierścieniu piperazyny („*Supplementary material*” w artykule **H6**). Jeśli chodzi o związki **DJ-18**, **KMP-10**, oprócz

stwierdzonej głównej reakcji demetylacji, kolejne ścieżki metaboliczne obejmowały hydroksylację, a w przypadku **KMP-10**, również dehydrogenację. Prawdopodobne miejsca hydroksylacji tych dwóch pochodnych nie zostały jednak określone. Ponadto stwierdzono również obecność metabolitów, które powstały najprawdopodobniej w wyniku dalszej hydroksylacji głównych, demetylowanych metabolitów **DJ-18** oraz **KMP-10** (Tabela 12).

Potencjalne ryzyko interakcji międzylekowych wybranych ligandów 5-HT₆R zbadano przy pomocy testów P450-Glo™ 3A4 i 2D6. Uzyskane wyniki nie wykazały wpływu pochodnych **KB-61**, **TR-12** i **MST-4** na aktywność CYP3A4 w odniesieniu do reakcji kontrolnej. Stwierdzono jedynie niewielki efekt aktywacji tej izoformy do ~115% aktywności kontrolnej w wysokich stężeniach 10 i 25 μM pochodnej **TR-37** oraz w stężeniu 25 μM związku **KMP-10**. Pochodna **DJ-18** była jedynym związkiem z badanej grupy ligandów 5-HT₆R ze stwierdzonym działaniem hamującym aktywność CYP3A4. Wykazano, że aktywność tej izoformy została obniżona do około 57,5% aktywności kontrolnej w obecności 10 μM stężenia tego związku (Rycina 7A w artykule **H5**, Rycina 6A w artykule **H6**).

W przypadku izoformy CYP2D6 zaobserwowano efekt aktywacji występujący w obecności 10 μM stężenia większości badanych związków. Najwyższy efekt aktywujący, sięgający około 148% aktywności kontrolnej CYP2D6, zaobserwowano w obecności 3-metylofenylowej pochodnej **KB-61**. Co ciekawe, w przypadku najwyższego użytego stężenia 25 μM związków **TR-12** oraz **MST-4**, stwierdzono przeciwny, słaby efekt hamujący CYP2D6 do około 75% aktywności kontrolnej (Rycina 7B w artykule **H5**, Rycina 6B w artykule **H6**).

Cytotoksyczne i hepatotoksyczne działanie ligandów 5-HT₆R badano po 72 godzinach inkubacji tych związków z liniami komórkowymi HEK-293 oraz HepG2. W badanej grupie najbardziej toksyczny okazał się związek **MST-4**. Stwierdzono istotny statystycznie ($p < 0,001$) wpływ tego związku na żywotność komórek HEK-293 w stężeniach 10 i 100 μM, przy czym w stężeniu 100 μM **MST-4** żywotność komórek zmniejszyła się radykalnie aż do 14,2% kontroli. Pomimo to stwierdzony dla **MST-4** efekt toksyczny był dużo słabszy od związku referencyjnego **DX**, który obniżał żywotność HEK-293 do 11,9% kontroli w stężeniu zaledwie 1 μM. Istotnie statystyczny ($p < 0,001$) efekt na komórki HEK-293 stwierdzono również w obecności związku **TR-37**, który obniżał ich żywotność w stężeniu 100 μM do 42,6% wartości kontrolnej, jak również w obecności **KB-61** ($p < 0,05$), który nieznacznie obniżył żywotność tych komórek do 86,7% (Rycina 7 w artykule **H6**). Podobny wynik do **TR-37** zaobserwowano dla pochodnej **DJ-18**, natomiast jej analog **KMP-10** nie obniżał żywotności HEK-293, nawet w najwyższym stężeniu 100 μM (wyniki dla **DJ-18** oraz **KMP-10** opisano w artykule **B4**).

Najsilniejszy efekt hepatotoksyczny obserwowany wobec linii HepG2, podobnie jak w przypadku HEK-293, wykazała pochodna **MST-4**, która w najwyższym badanym stężeniu 100 μM obniżyła praktycznie całkowicie żywotność komórek do 1,1% kontroli. Dla reszty badanych ligandów 5-HT₆R nie stwierdzono działania hepatotoksycznego (Rycina 9 w artykule **H5**, Rycina 8A w artykule **H6**).

Nie zaobserwowano również aktywności mutagennej ligandów 5-HT₆R w teście Ames z użyciem szczepu *Salmonella* Typhimurium TA100. Liczba rewertantów, które pojawiły się w obecności badanych związków, nie osiągnęła poziomu uważanego za alert mutagenności (Rycina 8 w artykule **H5**, Rycina 9 w artykule **H6**).

- *Ligandy 5-HT₆R – podsumowanie*

Wyniki kompleksowych badań *in vitro* parametrów ADME-Tox potwierdziły obiecujące właściwości lekopodobne wszystkich badanych ligandów 5-HT₆R z grupy pochodnych metylopiperazyno-1,3,5-triazyny. Przeprowadzone testy wykazały doskonałą przepuszczalność badanych pochodnych (z wyjątkiem wyznaczonej umiarkowanej przepuszczalności związku **KMP-10**), niskie wartości Cl_{int} oraz wysoki profil bezpieczeństwa, w tym: znikome prawdopodobieństwo wywołania efektów cytotoksycznych, hepatotoksycznych i mutagennych, jak również wystąpienia interakcji międzylekowych. Niewielki efekt hepatotoksyczny zaobserwowano jedynie dla pochodnej **MST-4**. Co ciekawe, należy podkreślić, że znakomitą przepuszczalność zaobserwowano dla dwóch związków z badanej grupy, tj. **DJ-18** i **TR-37**, w których strukturach występuje atom chloru. Podstawnik ten należy zatem uznać za kluczowy w kontekście efektywności transportu biernego badanej grupy pochodnych przez błony biologiczne.

Testy *in vivo*, przeprowadzone przez badaczy z Zakładu Farmacji Klinicznej oraz Katedry Farmakodynamiki UJ MC i opisane w artykule **H6**, wyłoniły z badanej grupy związki **TR-12** i **MST-4** jako posiadające najbardziej obiecujący profil farmakologiczny. Dla tych pochodnych wykazano znaczące działanie prokognitywne oraz potencjalny efekt przeciwlękowy w testach behawioralnych. Ponadto badania wpływu **MST-4** na przyrost masy ciała zwierząt wykazały korzystne, istotne statystyczne wyniki w grupie zwierząt karmionych dietą wysokokaloryczną. Kompleksowe testy behawioralne wykonano również dla związku **KMP-10**. Pomimo stwierdzonej umiarkowanej przepuszczalności *in vitro* pochodna ta wykazała wiele korzystnych aktywności związanych z funkcjonowaniem OUN, w tym znaczące, potencjalne działanie przeciwlękowe, przeciwdepresyjne oraz efekt prokognitywny. Ponadto stwierdzono również korzystny wpływ **KMP-10** na metabolizm i masę ciała szczurów karmionych dietą wysokokaloryczną.

Tabela 11 Parametry ADME-Tox pochodnych **DJ-18**, **KMP-10**, **TR-37**, **KB-61**, **TR-12**, **MST-4** oraz związków referencyjnych.

Związek	PAMPA <i>Pe</i> [10 ⁻⁶ cm/s] ±SD	Caco-2 <i>P_{app}</i> [10 ⁻⁶ cm/s] ±SD	Pgp (% aktywności podstawo- wej) ^a	PPB <i>f_b</i> [%] ±SD	<i>Cl_{int}</i> [ml/min/ kg]	CYP 3A4 (% kontroli) ±SD ^b	CYP 2D6 (% kontroli) ±SD ^b	Żywotność HepG2 (% kontroli) ±SD ^c	Żywotność HEK-293 (% kontroli) ±SD ^c	AMES Średnia pozytywnych dółków ±SD/ <i>krotność powyżej MCB^d</i>
CFN	15,1 ± 0,40	22,04±0,38	-	-	-	-	-	-	-	-
DX	-	-	-	-	-	-	-	39,9±1,7	11,9±2,6	-
KE	-	-	-	-	-	3,0±0,5	-	-	-	-
NFX	0,56 ± 0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NQNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46,0±2,3/ 5,41
QD	-	-	-	-	-	-	4,4±0,7	-	-	-
VL	-	-	>175	-	26,76	-	-	-	-	-
WAR	-	-	-	98,5±2,10	-	-	-	-	-	-
DJ-18	24,9 ± 0,45	NT	89,1±25,4	NT	4,32	57,5±1,5	113,4±0,7	92,9±9,5	42,4±3,4 ^e	8,3±0,6/ 1,0
KMP-10	3,76 ± 0,76	6,27± 0,30	52,9±44,2	84,5±6,04	3,74	102,9±9,5	112,3±6,5	99,9±8,7	87,8±19,7 ^e	7,7±3,0/ 0,9
TR-37	23,6±2,14	NT	134,4±14,2	NT	7,56	115,9±7,6	124,1±7,0	98,4±10,6	42,6±4,7	7,0±1,7/ 0,9
KB-61	19,9±2,68	NT	8,1±6,5	NT	3,96	103,1±2,8	148,5±5,1	96,8±2,4	86,7±6,7	9,7±3,5/ 1,1
TR-12	17,9±5,76	NT	140,1±22,0	NT	2,34	91,0±18,5	99,4±8,02	95,9±6,1	100,8±7,6	4,3±2,9/ 0,5
MST-4	12,3±1,98	NT	133,9±40,1	NT	6,30	97,9±13,9	120,2±11,4	1,1±0,7	14,2±1,6	4,0±1,0/ 0,5

SD - odchylenie standardowe; NT - nie testowano; skróty związków referencyjnych: MCB - wartość kontrolna linii bazowej pożywki; CFN, kofeina; DX, doksorubicyna; KE, ketokonazol; NFX, norfloksacyna; NQNO, N-tlenek 4-nitrochinoliny; QD, chinidyna; VL, werapamil; WAR, warfaryna

^areferencyjny induktor aktywności Pgp VL testowano w stężeniu 200 µM; ligandy 5-HT₆R testowano w stężeniu 100 µM

^breferencyjne inhibitory CYP KE oraz QD testowano w stężeniu 1 µM; wyniki dla ligandów 5-HT₆R podano dla stężenia 10 µM

^creferencyjny cytostatyk DX testowano w stężeniu 1 µM; wyniki dla ligandów 5-HT₆R podano dla stężenia 100 µM

^dmutagenność NQNO testowano w stężeniu 0,05 µM, wyniki dla 5-HT₆R podano dla stężenia 10 µM

^eefekt związków DJ-18 oraz KMP-10 na żywotność komórek HEK-293 opisano i opublikowano w artykule B4

Tabela 12 Ścieżki metaboliczne ligandów 5-HT₆R wyznaczone po 120 min inkubacji z HLMs.
Główne metabolity pogrubiono.

Substrat [m/z]	Ilość metabolitów	Czas retencji [min]	Masa molowa metabolitu [m/z]	Ścieżki metaboliczne*
DJ-18 459,3	4	3,99	445,34	demetylacja
		4,21	475,38	hydroksylacja
		4,42	461,36	demetylacja/ hydroksylacja
		3,40	475,38	hydroksylacja
KMP-10 447,27	4	3,45	433,25	demetylacja
		3,65	463,22	hydroksylacja
		3,82	449,26	demetylacja/ hydroksylacja
		4,26	461,23	hydroksylacja/ dehydrogenacja
TR-37 319,13	2	3,27	335,08	hydroksylacja
		2,88	305,11	demetylacja
KB-61 299,19	2	2,96	315,14	hydroksylacja
		2,57	285,10	demetylacja
TR-12 324,18	3	1,61	340,33	hydroksylacja
		2,10	310,18	demetylacja
		2,47	340,13	hydroksylacja
MST-4 357,21	4	4,50	343,19	demetylacja
		3,46	373,23	hydroksylacja
		4,82	373,23	hydroksylacja
		3,16	373,23	hydroksylacja

*główną ścieżkę metaboliczną zaznaczono pogrubioną czcionką

4.3.3.5 Inne ligandy 5-HT₆R i 5-HT₇R

Wybrane parametry ADME-Tox kolejnych ligandów 5-HT₆R i 5-HT₇R, należących do opisanych powyżej grup chemicznych, zostały określone metodami *in vitro* i opisane również w artykułach **B1-B7**. Wyniki te nie zostały jednak włączone do cyklu publikacji stanowiącego osiągnięcie naukowe ze względu na mój mniejszy udział autorski. Bardziej szczegółowe informacje na temat badanych związków i powiązanych z nimi artykułów zawarto w rozdziale 7.

4.3.4 Podsumowanie

Przeprowadzone przeze mnie badania *in vitro* pozwoliły na kompleksową charakterystykę parametrów ADME-Tox aktywnych i selektywnych ligandów receptorów 5-HT₆ i 5-HT₇ dostarczając istotnych informacji na temat ich bezpieczeństwa oraz potencjalnego losu po podaniu *in vivo*. Pozyskane dane pozwoliły ponadto na wyłonienie spośród badanych związków najbardziej obiecujących struktur wiodących nie tylko o udowodnionej aktywności farmakologicznej, ale także o potwierdzonych, satysfakcjonujących właściwościach lekopodobnych. Tym samym wyniki badań opisanych w cyklu powiązanych tematycznie artykułów H1-H6 składających się na osiągnięcie naukowe będące podstawą mojego wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego, pogłębiają wiedzę na temat nowych ligandów receptorów 5-HT₆ i 5-HT₇ oraz możliwości ich wykorzystania w schorzeniach OUN.

Przeprowadzone eksperymenty na wybranych antagonistach 5-HT₇R z grupy arylopiperazynowych pochodnych hydantoiny pozwoliły na wyłonienie dwóch związków – pochodnej benzhydrylowej **KKB-16**, o wyjątkowo wysokiej stabilności metabolicznej i selektywności względem 5-HT_{1A}R, a także związku **MF-8**, pochodnej 2-metoksyfenylowej, o korzystnych cechach związanych z bardzo wysokim powinowactwem do 5-HT₇R oraz doskonałymi właściwościami lekopodobnymi. Oba związki, **KKB-16** i **MF-8**, potwierdziły aktywność farmakologiczną w testach behawioralnych *in vivo*. W teście Porsolta na myszach zaobserwowano ich znaczący, potencjalny efekt antydepresyjny, wyższy od zastosowanych związków referencyjnych – komercyjnego antagonisty 5-HT₇R SB-269970 oraz leku przeciwdepresyjnego imipraminy. **KKB-16** i **MF-8** można zatem uznać za nowe, bardzo obiecujące struktury wiodące w poszukiwaniu leków przeciwdepresyjnych działających poprzez 5-HT₇R.

Biorąc pod uwagę fakt, że badania nad chiralnością cząsteczek są przykładem nowoczesnego podejścia do procesu odkrywania leków, zsyntetyzowane zostały cztery stereoizomery związku **MF-8** (**MF-8A**, **MF-8B**, **MF-8C**, **MF-8D**), celem przebadania i porównania ich aktywności farmakologicznych, jak również określenia lekopodobieństwa. Otrzymane w badaniach *in vitro* dane doświadczalne dla wszystkich stereoizomerów potwierdziły, w porównaniu do racematu, istotny wpływ stereochemii nie tylko na powinowactwo i działanie antagonistyczne wobec 5-HT₇R, ale także wybrane parametry ADME-Tox. Przeprowadzone oddzielnie dla każdego stereoizomeru i dla racematu testy wykazały różnice w oddziaływaniu na: aktywność Pgp, parametry przepuszczalności w modelu Caco-2 i PAMPA, stabilność metaboliczną i szlaki metaboliczne, a także na aktywność CYP3A4 i CYP2C9. Na podstawie uzyskanych wyników badań do zaplanowanych testów *in vivo* wybrano stereoizomer **MF-8A**, który wykazywał najwyższe powinowactwo do 5-HT₇R oraz satysfakcjonujące właściwości lekopodobne.

Kompleksowe badania *in vitro* porównujące nowo zsyntetyzowanych agonistów 5-HT₇R z grupy pochodnych indolu-imidazolu **AH-494** i **AGH-282** z powszechnie wykorzystywanym jako sonda molekularna w badaniach nad receptorami serotoninowymi związkiem **5-CT** wykazały, że badani agoniści mogą znaleźć zastosowanie jako nowe, alternatywne narzędzia do badań receptora 5-HT₇R. Oprócz wysokiej aktywności wobec 5-HT₇R wszystkie trzy związki posiadały zbliżone parametry ADME-Tox *in vitro*. Podstawową różnicę zaobserwowano jedynie w badaniu wpływu na aktywność cytochromów P-450, gdzie obecność ugrupowania imidazolu w strukturach związków **AH-494** i **AGH-282** skutkowałą silnym efektem inhibicji. Z drugiej strony, nowych agonistów 5-HT₇R cechowała dużo wyższa od **5-CT** pożądana selektywność względem 5-HT_{1A}R. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że związek **AH-494** wykazał podobną do **5-CT** aktywność prokognitywną w testach behawioralnych *in vivo*.

Pochodne metylopiperazyno-1,3,5-triazyny są nową, obiecującą grupą chemiczną, która wykazała wysokie powinowactwo i selektywność do 5-HT₆R. Dlatego naturalnym kolejnym krokiem badań tych pochodnych było określenie ich parametrów ADME-Tox. Wyniki przeprowadzonych testów *in vitro* pozwoliły stwierdzić, że wszystkie badane związki posiadały satysfakcjonujące właściwości lekopodobne. Ponadto przeprowadzone testy behawioralne *in vivo* wyłoniły z badanej grupy pochodne **MST-4** i **KMP-10**, które posiadały najbardziej obiecujący profil farmakologiczny, przejawiający się potencjalnym działaniem przeciwdepresyjnym, przeciwłękowym, właściwościami prokognitywnymi oraz dodatkowym efektem świadczącym o możliwości ich zastosowania w leczeniu otyłości. W związku z powyższym oba te dwa związki zaproponowano jako nowe, obiecujące i bezpieczne struktury wiodące do szerszych badań farmakologicznych w poszukiwaniu nowych leków działających przez 5-HT₆R.

Należy również wspomnieć, że ocena parametrów ADME-Tox i oszacowanie właściwości lekopodobnych ligandów 5-HT₆R i 5-HT₇R było możliwe dzięki zoptymalizowanym testom *in vitro*, sprawdzonym pod względem powtarzalności i niezawodności w warunkach pracowni, w której prowadziłem moje badania. Tym samym udało mi się wdrożyć w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ MC kompleksową platformę skринingowych badań parametrów ADME-Tox *in vitro*, która pozwala obecnie na rutynowe badania różnych związków pod kątem oceny ich lekopodobieństwa.

Możliwość wykonania w naszej Katedrze wstępnej oceny właściwości lekopodobnych związków spotkała się dotychczas z dużym zainteresowaniem, które zaowocowało wieloma projektami w ramach współpracy krajowej i międzynarodowej, a także wykonaniem zleceń dla przedstawiciela polskiej branży farmaceutycznej. Ogromna potrzeba przeprowadzenia takich badań wiąże się z nowoczesnym trendem w podejściu do procesu odkrywania leków, w którym zaleca się, aby oszacowanie aktywności terapeutycznej nowych związków chemicznych oraz ich właściwości lekopodobnych było przeprowadzone równolegle na jak najwcześniejszym etapie badań. Ponadto stosowanie technik *in vitro*, bez udziału zwierząt, jest również istotne z powodów etycznych, naukowych, prawnych i ekonomicznych w kontekście zasady 3R. Tym samym opracowana platforma skринingowa badań *in vitro* parametrów ADME-Tox okazała się właściwą odpowiedzią na zapotrzebowanie badaczy z dziedziny chemii medycznej, prowadzących nowoczesne badania w kierunku odkrywania nowych leków.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Od 20 czerwca do 15 lipca 2011 r. oraz od 22 czerwca do 15 lipca 2012 r. miałem okazję uczestniczyć w dwóch krótkoterminowych misjach naukowych STSM (ang. *Short Term Scientific Mission*) w ramach programu BM0806 COST ACTION (ang. *European Cooperation in Science and Technology*). Podczas obu pobytów STSM realizowałam projekty naukowe w Pracowni Biochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Arystotelesa w Salonikach w Grecji, pod kierunkiem prof. Dimitrios A. Kyriakidisa.

Tematem badań podczas mojego pierwszego pobytu w Grecji była ocena wpływu ligandów receptorów histaminowych na bakteryjny, dwuskładnikowy (ang. *two-component system*, TCS) układ transdukcji sygnału AtoSC (AtoS – sensorowa kinaza histydynowa, AtoC – regulator odpowiedzi). Transdukcja sygnału AtoSC TCS indukuje ekspresję operonu *atoDAEB*, modulując w ten sposób różnorodne procesy zachodzące w bakteriach, takie jak metabolizm kwasów tłuszczowych, regulacja wewnątrzkomórkowego środowiska kationowego, ruchliwość komórek i chemotaksja⁵⁰. Znaczenie powyższych procesów dla homeostazy i ruchliwości bakterii jest kluczowe, dlatego prowadzone są poszukiwania związków organicznych wpływających na transdukcję sygnału AtoSC TCS mające na celu poszerzenie wiedzy na temat nowych sposobów leczenia chorób bakteryjnych. Ponieważ jednym z opisanych dotychczas modulatorów wpływających na funkcje AtoSC TCS jest histamina⁵⁰, w ramach projektu zaplanowano badania potencjalnego wpływu ligandów receptorów histaminowych H₄ (H₄R) na AtoSC TCS. Badane związki należały do serii pochodnych *N*-metylopiperazyny otrzymanych w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM.

W pierwszym etapie badań oszacowano działanie przeciwbakteryjne związków. Stwierdzono, że pochodne *N*-metylopiperazyny wykazują działanie przeciwbakteryjne wobec szczepu bakterii

Gram- (*E. coli* BW25113), jednak nie wpływają na szczep bakterii Gram+ *Bacillus subtilis*. W przypadku wymienionego szczepu *E. coli*, stężenie związków wynoszące 2 mM prowadziło do śmierci bakterii, podczas gdy w zakresie 0,1 - 1,0 mM obserwowano działanie bakteriostatyczne. Następnie badano wpływ badanych związków, w wybranych, nietoksycznych dawkach, na transdukcję sygnału AtoSC TCS. W tym celu posłużono się szczepami bakterii *E. coli* transformowanymi plazmidem zawierającym promotor *atoDAEB* w połączeniu z genem *lacZ* kodującym β -galaktozydazę. Zmodyfikowane w ten sposób szczepy *E. coli* umożliwiły określenie wpływu badanych związków na AtoSC TCS, poprzez pośrednie, kolorymetryczne oznaczenie ekspresji tego promotora. Zaobserwowano, że badane związki w stężeniu 75 μ M, które nie wpływało na wzrost stosowanych w teście bakterii *E. coli*, nie powodują zmian w poziomie transkrypcji operonu *atoDAEB*. Stwierdzono również, że badane pochodne *N*-metylopiperazyny nie modyfikują ruchliwości szczepów *E. coli* z ekspresją systemu AtoSC TCS. Otrzymane wyniki badań nie zostały dotychczas opublikowane.

Celem moich badań przeprowadzonych podczas drugiego pobytu w laboratorium prof. Kyriakidisa było oszacowanie powinowactwa ligandów H₄R, należących do grupy analogów silnego i selektywnego antagonisty H₄R JNJ7777120 oraz pochodnych 1,3,5-triazyny, do promotorów genów związanych z anabolizmem i katabolizmem histaminy. Do badań wybrano promotory następujących genów: a) *hdc*, kodującego dekarboksylazę histydynową, b) *dao*, kodującego oksydazę diaminową oraz c) *hnmt*, kodującego *N*-metylotransferazę histaminową. Ponadto przebadano także wpływ na promotor genu *PTEN*, kodującego przeciwnowotworowe białko PTEN.

W pierwszej kolejności zaprojektowano dla każdego promotora specyficzne startery do reakcji amplifikacji metodą PCR. Przetestowano również różne polimerazy DNA oraz warunki prowadzenia reakcji PCR, aby zoptymalizować proces amplifikacji poszczególnych promotorów. Do właściwych badań zastosowano test opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej (ang. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) w celu określenia potencjalnych interakcji pomiędzy badanymi związkami a uzyskanym w reakcji PCR DNA odpowiedniego promotora. Jeśli chodzi o DNA promotorów genów *hdc*, *dao* i *hnmt*, nie zaobserwowano interakcji z badanymi ligandami H₄R. W przypadku DNA promotora genu *PTEN* w grupie badanych analogów JNJ7777120 dwa związki wykazywały bardzo wysoką interakcję, jeden związek umiarkowane oddziaływanie, natomiast nie zaobserwowano żadnego wpływu dla czterech kolejnych, w tym samego JNJ7777120. Stwierdzono również, że jeden z badanych związków wytrącił się w warunkach prowadzonego testu. W grupie pochodnych 1,3,5-triazyny zaobserwowano niską lub umiarkowaną interakcję z DNA promotora *PTEN*. Następnie wybrane związki, wykazujące interakcję z DNA promotora genu *PTEN*, zostały przebadane w celu określenia potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Nie stwierdzono jednak korelacji pomiędzy interakcją związków z DNA promotora *PTEN* a efektem przeciwnowotworowym względem linii komórkowej ludzkiej neuroblastomy IMR-32. Otrzymane wyniki badań zaprezentowano na trzech międzynarodowych konferencjach (załącznik 4, sekcja II.7, pozycje 26, 27 oraz 33), a także zostały opisane w jednej oryginalnej publikacji (artykuł B8). Kopie dokumentów potwierdzających odbycie niniejszych staży naukowych, w tym: potwierdzenia przyznania grantów STSM, zaświadczenie prof. Kyriakidisa dotyczące zakresu badań wykonanych podczas mojego pobytu w 2011 roku oraz publikację zawierającą wyniki badań wykonanych przeze mnie podczas pobytu w 2012 roku, dołączyłem do mojego wniosku w wersji elektronicznej.

Kolejną moją aktywnością naukową, o której chciałem wspomnieć w niniejszym rozdziale autoreferatu, jest intensywna współpraca z zagranicznymi instytucjami naukowymi, dzięki której

miałem okazję przetestować aktywność biologiczną oraz wybrane parametry ADME-Tox związków syntetyzowanych i dostarczonych przez następujących badaczy:

- prof. Rob Leurs, Amsterdam Institute for Molecules, Medicines and Systems (AIMMS), Division of Medicinal Chemistry, Faculty of Science, Vrije Universiteit Amsterdam, Holandia
- prof. Claus Jacob, Institute of Bioorganic Chemistry, Department of Pharmacy, Saarland University, Niemcy
- prof. Oriana Tabarini, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Włochy
- prof. Vladimir Savic, Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia
- prof. Roman Lesyk, Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraina

Do tej pory wymieniona powyżej współpraca naukowa zaowocowała artykułami **B9-B14**.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Od 2004 roku, w którym rozpocząłem studia doktoranckie, biorę udział w prowadzeniu zajęć laboratoryjnych z przedmiotu „*Biotechnologia farmaceutyczna*” dla studentów kierunku Farmacja, a od 2020 roku także wykładów. Od 2004 roku do dziś jestem również zaangażowany w prowadzenie seminarium „*Synteza i technologia środków leczniczych*” dla studentów kierunku Farmacja. W latach 2010-2012 prowadziłem również zajęcia laboratoryjne „*Biotechnologia w kosmetologii*” dla studentów kierunku Kosmetologia.

Uczestniczę lub uczestniczyłem również w nauczaniu wielu przedmiotów fakultatywnych, w tym:

- Od 2012 – „*Od DNA do firmy biotechnologicznej*” dla studentów kierunku Analityka medyczna (od 2019 roku jako koordynator przedmiotu)
- Od 2014 – „*Przemysłowe aspekty biotechnologicznej produkcji leków*” dla studentów kierunku Farmacja (od 2019 roku jako koordynator przedmiotu)
- Od 2017 – „*Metody komputerowe w racjonalnym projektowaniu leków*” dla studentów kierunku Farmacja
- Od 2014 do 2018 – „*Leki generyczne – metodyka badań*” dla studentów kierunku Farmacja

Przygotowałem również sylabusy, a od 2019 roku koordynuję następujące przedmioty fakultatywne, poświęcone aspektom tatuażu dekoracyjnego:

- Od 2017 – „*Tatuaż ozdobny z punktu widzenia kosmetologa*” dla studentów kierunku Kosmetologia
- Od 2019 – „*Tatuaż ozdobny – zagrożenia, powikłania, pielęgnacja oraz aspekty historyczne i artystyczne*” dla studentów kierunku Farmacja

W latach 2014-2020 prowadziłem seminarium z przedmiotu „*Metodologia badań naukowych*” dla doktorantów. W 2020 roku wygłosiłem również wykład dla studentów studiów podyplomowych „*Farmacja przemysłowa*”.

Brałem również czynny udział w organizacji anglojęzycznych studiów magisterskich II stopnia „*Drug Discovery and Development*”, które rozpoczęły się na naszym Wydziale w roku akademickim 2018/2019. W ramach tego kierunku przygotowałem sylabus i koordynuję przedmiot „*Biological Drugs*”. Ponadto, jestem zaangażowany w prowadzenie następujących przedmiotów na kierunku „*Drug Discovery and Development*”:

- „*Biology in pharmaceutical sciences*”
- „*Translational medicine and biomarkers*”
- „*Introduction to drugs safety and toxicology*”
- „*Principles of clinical trials*”
- „*Molecular ADME and in vivo pharmacokinetics*”
- „*Model informed drug development*”
- „*Introduction to drugs safety and toxicology*”
- „*Medicinal chemistry*”.

W 2013 roku zostałem koordynatorem Studenckiego Koła Naukowego Biotechnologii Medycznej. Do tej pory moi podopieczni otrzymali 4 nagrody za prezentacje ustne lub posterowe podczas międzynarodowych konferencji studentów kierunków medycznych. Ponadto jeden z moich studentów otrzymał grant badawczy przyznany przez Studenckie Towarzystwo Naukowe UJ CM.

W latach 2012–2020 byłem promotorem 22 prac magisterskich, w tym:

- 11 prac studentów kierunku Farmacja
- 6 prac studentów kierunku Kosmetologia
- 3 prac studentów kierunku Analityka medyczna
- 2 prac studentów kierunku Biotechnologia na Wydziale Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (na podstawie umowy międzyuczelnianej)

Zostałem również poproszony o recenzję 6 prac magisterskich oraz uczestniczyłem w 3 obronach dyplomowych jako członek komisji egzaminujący magistranta z przedmiotu „*Biotechnologia farmaceutyczna*”.

Byłem też promotorem pomocniczym trzech prac doktorskich, w tym dwóch obronionych – dr Małgorzaty Marć i dr Karoliny Witek oraz jednej będącej tuż przed obroną – mgr Annamarii Lubelskiej.

Ponadto byłem opiekunem naukowym następujących stażystów:

- 4 studentów zagranicznych w ramach wakacyjnych pobytów ISEP (ang. *International Student Exchange Program*)
- 8 studentów Biotechnologii UJ w ramach letnich praktyk
- magistra Biotechnologii Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (6-miesięczny staż naukowy w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego)
- doktorantki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (5-miesięczny staż naukowy)
- 8 studentów programu Erasmus (jeden pobyt powyżej 6 miesięcy)

W 2018 r. zostałem poproszony o współprowadzenie i współorganizację sesji naukowej pt. „*Metabolic activation of xenobiotics - therapeutic target and drug monitoring*” podczas konferencji *3rd Congress of Polish Biosciences BIO2018*, Gdańsk, 18-21 września 2018.

Byłem również członkiem komitetów organizacyjnych następujących konferencji:

1. V Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Kraków, 3-5 lipca 2015
2. The Meeting Bio-Selenium People in Europe, 1-3 września 2016
3. 48th Annual Meeting of the European-Histamine-Research-Society (EHRS), Kraków, 15-18 maja 2019

Od 2018 r. biorę również czynny udział w pracach Zespołu, zajmującego się konsultacją merytoryczną projektów pracowni badawczych mających powstać w ramach planowanego Centrum

Rozwoju Terapii Chorób Cywilizacyjnych i Związanych z Wiekami (CDT-CARD) na Kampusie Medycznym UJ CM. W ramach tej działalności współtworzyłem m.in. wniosek o dofinansowanie infrastruktury badawczej dla CDT-CARD w ramach konkursu POIR 4.2 (Program Operacyjny Inteligentny Rozwój 2014-2020 działanie 4.2). Przygotowany przez nasz Zespół projekt dofinansowano kwotą 39 997 636 PLN.

7. Informacje dotyczące kariery zawodowej (oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6).

Aktualnie mój dorobek naukowy obejmuje 77 publikacji naukowych, w tym 71 pełnotekstowych publikacji oryginalnych angielskojęzycznych, w recenzowanych czasopismach posiadających IF, 2 pełnotekstowe publikacje oryginalne bez IF w języku polskim, 3 prace poglądowe (w tym jedna z IF) oraz 1 rozdział w monografii polskiej. Jestem autorem lub współautorem 106 doniesień i komunikatów zjazdowych, z czego 89 międzynarodowych i 17 krajowych. Zostałem również ujęty jako współtwórca 5 zgłoszeń patentowych.

Summaryczny współczynnik oddziaływania IF publikacji recenzowanych wynosi 281,551, co odpowiada 5426 punktom w klasyfikacji MNiSW. Całkowita liczba cytowań wynosi 516 (z wyłączeniem autocytowań 376), a indeks Hirscha jest równy 14 (dane na podstawie Bibliografii UJ CM oraz baz *Web of Science Core Collection* i *Journal Citation Reports* z dnia 17.12.2020 r.).

7.1 Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

W 1997 roku rozpocząłem studia farmaceutyczne na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM. Pracę magisterską pt. „*Próba określenia specyficzności substratowej D-hydantoinaz*” obroniłem w 2002 roku, uzyskując dyplom magistra farmacji. Promotorem mojej pracy magisterskiej była prof. dr hab. Elżbieta Pękała. Dwa lata później rozpocząłem studia doktoranckie w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Kieć-Kononowicz.

Badania, które prowadziłem w trakcie studiów doktoranckich, dotyczyły projektowania i syntezy organicznej substratów przekształcanych następnie, na drodze biotransformacji przy użyciu enzymów natywnych lub rekombinowanych w bakterii *E. coli*, do D-enancjomerów nienaturalnych pochodnych fenyloalaniny. W pracy doktorskiej opisałem również możliwości zastosowania metody elektroforezy kapilarnej w monitorowaniu reakcji enzymatycznych. Realizację wyżej wymienionych celów naukowych umożliwił mi grant promotorski Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego N N405 251833 przyznany na realizację projektu pt. „*Badania nad otrzymywaniem nienaturalnych α -aminokwasów metodą hydantoinazową*”. Od października 2006 do września 2007 otrzymywałem również stypendium finansowane z funduszy UE i budżetu państwa w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego pt. „*Akademicka Innowacyjność dla Małopolski – program stypendialny dla najlepszych doktorantów UJ*”. Mój projekt, zatytułowany „*Escherichia coli – mała fabryka białek na usługach badacza*”, został opisany w rozdziale monografii pt. „*Nauka i biznes: innowacyjne projekty doktorantów UJ: nauka dla rozwoju Małopolski*”, w której przedstawiono wszystkie nagrodzone w ramach tego stypendium projekty (rozdział w monografii naukowej M1). Ponadto wszechstronne zastosowanie metody elektroforezy kapilarnej w moich badaniach umożliwiły mi następujące szkolenia: sfinansowany w ramach programu Leonardo da Vinci staż szkoleniowo-badawczy pt. „*High Performance Capillary Electrophoresis in monitoring of the enzymatic reactions*”, który odbyłem w dniach 30 stycznia – 31 marca 2006 r. w CNRS Research Center on Artificial Biopolymers, Montpellier we Francji oraz szkolenie

sfinansowane przez firmę Beckmann, dotyczące aparatury i oprogramowania do elektroforezy kapilarnej, które odbyłem w styczniu 2008 r. w Beckmann Training Center w Paryżu we Francji.

Swoją wiedzę z zakresu prowadzenia i monitorowania reakcji enzymatycznych poszerzyłem również w ramach prowadzonego pod kierownictwem prof. dr hab. Elżbiety Pękali w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM projektu, dotyczącego zastosowania szczepów *Saccharomyces cerevisiae* w bio redukcji propentofiliny do jej enancjomerycznie czystej hydroksylowanej pochodnej. Uzyskane wyniki opublikowane zostały w artykule **A1**.

W trakcie studiów doktoranckich brałem również udział w projekcie realizowanym we współpracy z krakowską firmą farmaceutyczną IBSS BIOMED SA, poświęconym badaniom nad acelularną, rekombinowaną szczepionką przeciwko patogenowi wywołującemu krztusiec, czyli bakterii *Bordetella pertussis*. Nasz zespół badawczy był odpowiedzialny za identyfikację i uzyskanie rekombinowanych antygenów tej bakterii, odpowiednich do opracowania szczepionki. Otrzymane wyniki były poufne i nie zostały opublikowane.

Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych obejmuje trzy artykuły (w tym dwa mojego pierwszego autorstwa) opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych (**A1-A3**) oraz rozdział w monografii (**M1**) o przyznanej sumarycznej punktacji **MNiSW** = **16** punktów.

Rozprawę doktorską pt. „*Badania nad otrzymywaniem nienaturalnych α -aminokwasów metodą hydantoinazową*” obroniłem 23 lutego 2011 r. Praca ta została wyróżniona przez Radę Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. Wyniki, które zamieściłem w rozprawie doktorskiej, zostały opisane w serii czterech artykułów, w których byłem pierwszym autorem, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Seria artykułów obejmowała jedną pracę przeglądową (**A2**), jedną oryginalną pracę opublikowaną przed uzyskaniem tytułu doktora (**A3**) oraz dwie oryginalne prace opublikowane po uzyskaniu tytułu doktora (**B15, B16**), o łącznym **IF** = **2,297** i przyznanej punktacji **MNiSW** = **47** punktów.

7.2 Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

W październiku 2010 roku zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM. Moje zainteresowania naukowe od początku skupiły się na alternatywnych do badań na zwierzętach testach *in vitro* i ich zastosowaniu do określania aktywności biologicznej oraz parametrów ADME-Tox nowo zsyntetyzowanych związków organicznych. Początkowo swoją wiedzę w prowadzeniu i monitorowaniu reakcji enzymatycznych, zdobytą w okresie studiów doktoranckich, wykorzystałem do wdrożenia metod *in vitro*, które umożliwiły oszacowanie stabilności metabolicznej i najbardziej prawdopodobnych ścieżek metabolicznych badanych związków. Następnie jako kierownik projektu, finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2013–2014 w ramach dotacji celowej dla młodych naukowców (K/DSC/001407) pt. „*Ocena cytotoksyczności związków biologicznie czynnych wobec komórek eukariotycznych in vitro metodą EZ4U*”, rozpocząłem badania toksyczności związków dostarczonych do badań przez chemików z naszego Wydziału. W międzyczasie rozpocząłem wykonywanie kolejnych testów *in vitro* celem kompleksowego określenia kluczowych parametrów ADME-Tox. Zdobytą wiedzę i doświadczenie pozwoliły mi na rutynowe rozpoczęcie testowania i identyfikacji właściwości lekopodobnych oraz aktywności biologicznej związków należących do następujących grup farmakologicznych:

- *Ligandy receptorów histaminowych H_3 i H_4*

Ligandy receptorów histaminowych H_3 i H_4 były pierwszą grupą związków, które miałem okazję testować pod kątem oceny parametrów ADME-Tox. Związki te zostały otrzymane m.in. w ramach następujących projektów badawczych, w których uczestniczyłem jako wykonawca: COST ACTION BM0806 „*Recent advances in histamine H_4 receptor research*”, koordynowanego przez prof. Ekaterini Tiligadę, oraz kierowanego przez prof. dr hab. Katarzynę Kieć-Kononowicz i finansowanego przez NCN, pt. „*Receptory histaminowe H_3/H_4 atrakcyjnym celem poszukiwań substancji biologicznie czynnych*” (2011/02/A/NZ4/00031). Projekt BM0806 COST ACTION umożliwił mi również uczestnictwo w dwóch stażach naukowych STSM, opisanych dokładnie w rozdziale 5 autoreferatu, których rezultatem było opublikowanie artykułu **B8**. Podsumowując, do tej pory udało mi się określić parametry ADME-Tox dla związków z grupy ligandów receptorów histaminowych H_3 i H_4 , zsyntetyzowanych i dostarczonych przez: dr hab. Dorotę Łażewską, dr. Kamila Kudera, dr Katarzynę Szczepańską i mgr Katarzynę Kamińską z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM oraz prof. Roba Leursa z Vrije Universiteit Amsterdam. Uzyskane wyniki zostały opisane i opublikowane w artykułach **B10**, **B17-B36**.

- *Ligandy receptorów adenozynowych z grupy pochodnych ksantyn*

Jako wykonawca kolejnego projektu przyznanego przez NCN i kierowanego przez prof. dr hab. Katarzynę Kieć-Kononowicz, pt. „*Poszukiwanie nowych ligandów receptorów adenozynowych o właściwościach lekopodobnych*” (2012/04/M/NZ4/00219), miałem możliwość oceny właściwości lekopodobnych grupy pochodnych ksantyn będących ligandami receptorów adenozynowych. Badałem również związki o budowie ksantynowej otrzymane w ramach innych projektów badawczych i dostarczone przez dr Michała Załuskiego oraz dr Kamila Kudera z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM. Uzyskane wyniki zostały opisane i opublikowane w artykułach **B37-B40**.

- *Związki o aktywności przeciwdrgawkowej i antynocyceptywnej*

Moja współpraca z dr. hab. Krzysztofem Kamińskim, prof. UJ, z Katedry Chemii Leków UJ CM zaowocowała udziałem, jako wykonawcy, w dwóch projektach badawczych NCN pt. „*Poszukiwanie nowych substancji o działaniu przeciwdrgawkowym i przeciwbólowym wśród związków hybrydowych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu*” (2015/18/E/NZ7/00509) oraz „*Nowi antagoniści receptora waniloidowego typu 1 (TRPV1) w poszukiwaniu substancji o szerokim spektrum aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej w badaniach przedklinicznych*” (2017/27/B/NZ7/00249). Do tej pory wyniki badań właściwości lekopodobnych związków dostarczonych przez dr. hab. Krzysztofa Kamińskiego, prof. UJ i jego grupę badawczą zostały opisane w artykułach **B41-B48** oraz zamieszczone w czterech zgłoszeniach patentowych (Zał. 4, sekcja III.3, pozycje **1-4**).

- *Ligandy receptorów serotoninowych (w tym wyniki badań ligandów 5-HT₆R i 5-HT₇R nie uwzględnione w cyklu artykułów **H1-H6**)*

Poszukiwanie nowych ligandów receptorów serotoninowych jest jednym z głównych nurtów badawczych na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM oraz w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie. Z tego powodu miałem możliwość uczestniczenia, jako wykonawca, w kilku projektach badawczych poświęconych syntezie i określeniu aktywności biologicznej nowych ligandów 5-HT₆R i 5-HT₇R. Wyniki, otrzymane w ramach następujących trzech projektów finansowanych przez NCN: „*Opracowanie unikalnych sond molekularnych: niskozasadowi agoniści do badania funkcji receptora 5-HT₇*” (2017/25/B/NZ7/0929), kierowanego przez prof. dr. hab. Andrzeja J. Bojarskiego, „*Ocena parametrów ADME-Tox in vitro dla potencjalnych kandydatów na lek OUN działających jako silne i selektywne ligandy receptorów serotoninowych 5-HT₆*”

(2016/21/N/NZ7/03265), kierowanego przez mgr Annamarię Lubelską oraz „*Nieindolowe i niesulfonowe ligandy receptora 5-HT₆ z grupy tymolowych pochodnych 1,3,5-triazyny jako starter w poszukiwaniu innowacyjnej terapii zaburzeń pamięci i nastroju*” (2018/31/B/NZ7/02160), kierowanego przez prof. dr hab. Jadwigę Handzlik, zostały opisane w trzech artykułach (**H4-H6**), wchodzących w skład mojego osiągnięcia naukowego. W ramach powyższych projektów dokonałem również oceny parametrów ADME-Tox kolejnych ligandów 5-HT₆R i 5-HT₇R, a wyniki tych badań opisałem w artykułach **B1-B7**, które nie zostały włączone do cyklu publikacji stanowiącego osiągnięcie naukowe ze względu na mój mniejszy udział autorski:

- 1) ligandy receptorów serotoninowych, dostarczone przez badaczy z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM, w tym antagonistę 5-HT₇R **MF-8** (badania wstępne stabilności metabolicznej przy użyciu HLMs oraz inhibicji CYP3A4 opisane w artykule **B1**) oraz **KKB-47**, **KKB-51** i dualny ligand 5-HT₇R/5-HT_{1A}R **KKB-118**, których wyniki badań parametrów ADME-Tox opisano w artykule **B5**;
- 2) agoniści 5-HT₇R, dostarczeni przez badaczy z Zakładu Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, w tym **AGH-44**, **AGH-107** oraz **AGH-192**, których wyniki badań parametrów ADME-Tox opisano w artykułach **B2** oraz **B3**;
- 3) ligandy 5-HT₆R, dostarczone przez badaczy z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM, w tym **KMP-10**, **DJ-8** (tylko cytotoksyczność wobec komórek HEK-293 opisana w artykule **B4**) oraz **LW-5**, **LW-15**, **WA-13**, **WA-15**, dla których wyniki badań parametrów ADME-Tox opisane zostały w artykułach **B6** i **B7**.

Jako wykonawca brałem również udział w projekcie: „*Nowe ligandy wielofunkcyjne hamujące cholinoesterazy i blokujące receptory 5-HT₆ – projektowanie, synteza i badania farmakologiczne związków o potencjalnym działaniu prokognitywnym*” finansowanym przez NCN (2016/23/D/NZ7/01328) i kierowanym przez dr hab. Annę Więckowską. Do tej pory w ramach tego projektu zostałem współautorem jednej publikacji (**B49**). Ponadto określiłem parametry ADME-Tox ligandów receptorów serotoninowych dostarczonych w ramach współpracy z następującymi badaczami: prof. dr hab. Marcinem Kołaczekowskim, dr hab. Grażyną Chłoń-Rzepą oraz mgr Agnieszką Jankowską z Katedry Chemii Leków UJ CM, dr hab. Magdaleną Jastrzębską-Więsek z Zakładu Farmacji Klinicznej UJ CM; dr Jolantą Jańskowską i mgr. Damianem Kułagą z Instytutu Chemii i Technologii Organicznej Politechniki Krakowskiej. Współpraca ta zaowocowała dotychczas artykułami **B50-B53**.

- *Inhibitory MAO-B*

W ramach badań prowadzonych pod kierownictwem dr hab. Anny Więckowskiej określiłem również parametry ADME-Tox kilku inhibitorów monoaminooksydazy B (MAO-B). Wyniki tych badań zostały opisane i opublikowane w artykule **B54**.

- *Związki o działaniu przeciwbakteryjnym oraz inhibitory bakteryjnych pomp wyrzutu*

W swojej pracy miałem również okazję przetestować grupę związków organicznych i nieorganicznych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, a także inhibitorów bakteryjnych pomp wyrzutu zaprojektowanych do walki z wielolekoopornością bakteryjną. Związki zostały dostarczone do badań przez chemików z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM – prof. dr hab. Jadwigę Handzlik oraz mgr Anetę Kaczor; z Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Pedagogicznego im. KEN w Krakowie – dr. hab. Waldemara Tejchmana; jak również jako efekt współpracy międzynarodowej z prof. Clausem Jacobem, Institute of Bioorganic Chemistry, Department of Pharmacy, Saarland University oraz prof. Orianą Tabarini, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia. Wykonane prace badawcze zaowocowały

artykułami **B9-B14** oraz **B55-B59**. Oprócz oceny parametrów ADME-Tox, testowałem również aktywność biologiczną wybranych związków z tej grupy, w tym wpływ na poziom wolnych rodników tlenowych w komórkach bakterii (artykuły **B12-B14**) oraz zdolność hamowania pompy wyrzutu Msr(A) w szczepie *Staphylococcus epidermidis*, opisaną w artykule **B55**.

- *Inhibitory pomp wyrzutu w komórkach nowotworowych*

W Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM prowadzone są badania nie tylko nad inhibitorami bakteryjnych pomp wyrzutu, ale również nad związkami mogącymi zmniejszyć lekooporność komórek nowotworowych. W tym celu przebadalem metodami *in vitro* serię inhibitorów nowotworowych pomp wyrzutu leków pod kątem określenia wybranych parametrów ADME-Tox, a także przede wszystkim celem oszacowania efektu modulacji aktywności pompy wyrzutu Pgp. Związki do badań zostały przekazane przez prof. dr hab. Jadwigę Handzlik, mgr Anetę Kaczor, dr Katarzynę Szczepańską oraz dr. Wesama Alego z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM. Otrzymane wyniki zostały opisane i opublikowane w artykułach **B60-B62**.

Moje zainteresowania naukowe obejmują również poszukiwanie metodami *in vitro* potencjalnych neuroprotektantów, przy zastosowaniu linii komórkowych ludzkiej neuroblastomy SY-SH5Y oraz IMR-32. Prowadzone do tej pory badania związków dostarczonych przez dr Magdalenę Kurnik-Łucką z Katedry Patofizjologii UJ CM oraz dr hab. Ewę Szymańską z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Leków UJ CM zaowocowały dwoma opublikowanymi artykułami **B63** i **B64**. Oszacowanie neuroprotektynnej aktywności liganda receptora H₃, dostarczonego przez dr hab. Dorotę Łażewską, opisano również w artykule **B21**. Ponadto od listopada 2019 roku jestem kierownikiem grantu NCN przyznanego w ramach naboru MINIATURA za projekt pt. „*Określenie działania antyoksydacyjnego i neuroprotektynnego silnych ligandów receptorów adenylinowych A1 i A2A o potencjalnym zastosowaniu w terapii chorób Alzheimera i Parkinsona*” (2019/03/X/NZ7/00180).

W latach 2010–2012 prowadziłem zajęcia dydaktyczne dla studentów kierunku Kosmetologia, w tym byłem promotorem sześciu prac magisterskich związanych z zastosowaniem biotechnologii w kosmetologii. Zaowocowało to opublikowaniem jednej pracy przeglądowej i jednego artykułu oryginalnego w recenzowanych czasopismach (artykuły **B65** i **B66**).

W ramach współpracy z dr hab. Sebastianem Polakiem, prof. UJ z Pracowni Farmakoepidemiologii i Farmakoekonomiki UJ CM brałem udział w projekcie mającym na celu oszacowanie aktywności terapeutycznej metabolitów antazoliny. Moim zadaniem było określenie dokładnej struktury aktywnego metabolitu tego leku. Wyniki tych badań opublikowano w artykule **B67** oraz są przedmiotem zgłoszenia patentowego (Załącz. 4, sekcja III.3, pozycja 5).

Ponadto nie zostały jeszcze opublikowane wyniki moich badań prowadzonych w ramach wykonywania poniższych projektów:

- „*Receptor sierocy GPR18. Poszukiwanie niezbędnych narzędzi do badań nad GPR18 jako potencjalnym celem terapeutycznym*” Grant NCN (2013/11/B/NZ7/04865) kierowany przez prof. dr hab. Katarzynę Kieć-Kononowicz
- „*Funkcjonalnie selektywni odwrotni agoniści receptora 5-HT₆ oraz podwójne inhibitory 5-HT₆/MAO-B – w poszukiwaniu nowych podejść terapeutycznych do leczenia choroby Alzheimera*”. Grant NCN (2016/21/B/NZ7/01742) kierowany przez prof. dr. hab. Pawła Zajdla
- Inkubator Innowacyjności+ (MNISW/2017/DIR/II+) kierowany przez prof. dr. hab. Pawła Zajdla

- „Układy przesycane jako uniwersalna platforma do rozwiązywania problemu trudnej rozpuszczalności substancji leczniczych”. Grant NCN (2019/34/E/NZ7/00245) kierowany przez dr hab. Annę Krupę
- „Ligandy wielofunkcyjne szansą na zatrzymanie błędnego koła tauopatii i procesów neurozapalnych w chorobie Alzheimerera: poszukiwanie dualnych inhibitorów kinaz GSK-3 β i IKK- β ”. Grant NCN (2019/34/E/NZ7/00090) kierowany przez dr hab. Annę Więckowską

7.3 Nagrody i wyróżnienia

1. 2006-2007 Stypendium finansowane z funduszy UE i budżetu państwa w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego pt. „Akademicka Innowacyjność dla Małopolski – program stypendialny dla najlepszych doktorantów UJ”
2. 2011 Wyróżnienie pracy doktorskiej przez Radę Wydziału Farmaceutycznego
3. 2015 Nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego za osiągnięcia naukowe
4. 2018 Nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego za osiągnięcia naukowe
5. 2018 Nagroda Rektora UJ za indywidualne osiągnięcia dydaktyczne
6. 2019 Nagroda Rektora UJ za indywidualne osiągnięcia naukowe
7. Nagrody za prezentacje posterowe:
 - „In vitro and in silico metabolic stability studies of H3 receptor ligands” – VI Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, Poland, 2014 (pierwszy autor)
 - „Activity profile and drug likeness properties of the most potent (4-methylpiperazin-1-yl)-1,3,5-triazin-2-amine styryl derivatives”, EHRS 44st Annual Meeting – Malaga, Spain, 2015 (współautor)
8. Nagrody dla członków koordynowanego przeze mnie Studenckiego Koła Biotechnologii Medycznej:
 - 4 wyróżnienia za prezentacje ustne lub posterowe podczas międzynarodowych konferencji studentów kierunków medycznych.
 - 1 przyznany grant studencki

Piśmiennictwo

1. Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2020;323(9): 844-853.
2. Adelman B. Opening up drug development to everyone. *ASH Education Program Book*. 2013;2013(1): 311-315.
3. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000;44(1): 235-249.
4. Wang J, Urban L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. *Drug Discovery World*. 2004;5(4): 73-86.
5. Kerns E, Di L. *Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*; Academic Press; 2010.
6. Micińska-Bojarek M. Europejski standard doświadczeń na zwierzętach. Aspekty humanitarno-prawne. *Przegląd Prawa Ochrony Środowiska*. 2012(3): 111-127.
7. Yun H-M, Rhim H. The serotonin-6 receptor as a novel therapeutic target. *Experimental neurobiology*. 2011;20(4): 159-168.
8. Mitchell ES, Neumaier JF. 5-HT₆ receptors: a novel target for cognitive enhancement. *Pharmacology & Therapeutics*. 2005;108(3): 320-333.

9. Nikiforuk A. The procognitive effects of 5-HT₆ receptor ligands in animal models of schizophrenia. *Reviews in the Neurosciences*. 2014;25(3): 367-382.
10. Ferrero H, Solas M, Francis PT, Ramirez MJ. Serotonin 5-HT₆ Receptor Antagonists in Alzheimer's Disease: Therapeutic Rationale and Current Development Status. *Cns Drugs*. 2017;31(1): 19-32.
11. Wesolowska A. Potential role of the 5-HT₆ receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data. *Pharmacological Reports*. 2010;62(4): 564-577.
12. Heal DJ, Smith SL, Fisas A, Codony X, Buschmann H. Selective 5-HT(6) receptor ligands: Progress in the development of a novel pharmacological approach to the treatment of obesity and related metabolic disorders. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008;117(2): 207-231.
13. Karila D, Freret T, Bouet V, Boulouard M, Dallemagne P, Rochais C. Therapeutic Potential of 5-HT₆ Receptor Agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;58(20): 7901-7912.
14. Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2020;6(1): e12050.
15. Lovenberg TW, Baron BM, Delecea L, et al. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*. 1993;11(3): 449-458.
16. Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylyl-cyclase. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(31): 23422-23426.
17. Ruat M, Traiffort E, Leurs R, et al. Molecular-cloning characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(18): 8547-8551.
18. Wesolowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K, Tatarczyńska E. Effect of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology*. 2006;51(3): 578-586.
19. Nikiforuk A, Kos T, Fijał K, Holuj M, Rafa D, Popik P. Effects of the Selective 5-HT₇ Receptor Antagonist SB-269970 and Amisulpride on Ketamine-Induced Schizophrenia-like Deficits in Rats. *Plos One*. 2013;8(6).
20. Mnie-Filali O, Faure C, Lambas-Senas L, et al. Pharmacological Blockade of 5-HT₇ Receptors as a Putative Fast Acting Antidepressant Strategy. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(6): 1275-1288.
21. Wang SM, Han C, Lee SJ, Patkar AA, Masand PS, Pae CU. Five potential therapeutic agents as antidepressants: a brief review and future directions. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2015;15(9): 1015-1029.
22. Guscott M, Bristow L, Hadingham K, et al. Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT₇ receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology*. 2005;48(4): 492-502.
23. Hedlund PB, Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. 5-HT₇ receptor inhibition and inactivation induce antidepressant-like behavior and sleep pattern. *Biological Psychiatry*. 2005;58(10): 831-837.
24. Sarkisyan G, Roberts AJ, Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. *Behavioural Brain Research*. 2010;209(1): 99-108.
25. Wesolowska A, Tatarczyńska E, Nikiforuk A, Chojnacka-Wojcik E. Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT₇ receptor antagonist in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology*. 2007;555(1): 43-47.
26. Bang-Andersen B, Ruhland T, Jorgensen M, et al. Discovery of 1-(2-(2,4-Dimethylphenylsulfanyl)phenyl) piperazine (Lu AA21004): A Novel Multimodal Compound for the Treatment of Major Depressive Disorder. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;54(9): 3206-3221.
27. Loebel A, Citrome L. Lurasidone: a novel antipsychotic agent for the treatment of schizophrenia and bipolar depression. *Bjpsych Bulletin*. 2015;39(5): 237-241.
28. Abbas AI, Hedlund PB, Huang XP, Tran TB, Meltzer HY, Roth BL. Amisulpride is a potent 5-HT₇ antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. *Psychopharmacology*. 2009;205(1): 119-128.
29. Ishibashi T, Horisawa T, Tokuda K, et al. Pharmacological Profile of Lurasidone, a Novel Antipsychotic Agent with Potent 5-Hydroxytryptamine 7 (5-HT₇) and 5-HT_{1A} Receptor Activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010;334(1): 171-181.
30. Berman RM, Fava M, Thase ME, et al. Aripiprazole Augmentation in Major Depressive Disorder: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study in Patients with Inadequate Response to Antidepressants. *Cns Spectrums*. 2009;14(4): 197-206.
31. Bonaventure P, Dugovic C, Kramer M, et al. Translational Evaluation of JNJ-18038683, a 5-Hydroxytryptamine Type 7 Receptor Antagonist, on Rapid Eye Movement Sleep and in Major Depressive Disorder. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2012;342(2): 429-440.

32. De Filippis B, Chiodi V, Adriani W, et al. Long-lasting beneficial effects of central serotonin receptor 7 stimulation in female mice modeling Rett syndrome. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2015;9.
33. Costa L, Spatuzza M, D'Antoni S, et al. Activation of 5-HT7 Serotonin Receptors Reverses Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Synaptic Plasticity in Wild-Type and Fmr1 Knockout Mice, a Model of Fragile X Syndrome. *Biological Psychiatry*. 2012;72(11): 924-933.
34. Nikiforuk A. Targeting the Serotonin 5-HT7 Receptor in the Search for Treatments for CNS Disorders: Rationale and Progress to Date. *Cns Drugs*. 2015;29(4): 265-275.
35. Liu KG, Robichaud AJ. 5-HT6 Antagonists as Potential Treatment for Cognitive Dysfunction. *Drug Development Research*. 2009;70(2): 145-168.
36. Forbes IT, Douglas S, Gribble AD, et al. SB-656104-A: A novel 5-HT7 receptor antagonist with improved in vivo properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2002;12(22): 3341-3344.
37. Handzlik J, Bojarski AJ, Satala G, et al. SAR-studies on the importance of aromatic ring topologies in search for selective 5-HT7 receptor ligands among phenylpiperazine hydantoin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;78: 324-339.
38. Kucwaj-Brysz K, Warszycki D, Podlewska S, et al. Rational design in search for 5-phenylhydantoin selective 5-HT7R antagonists. Molecular modeling, synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;112: 258-269.
39. Chen X, Murawski A, Patel K, Crespi CL, Balimane PV. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharmaceutical research*. 2008;25(7): 1511-1520.
40. Obach RS. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 1999;27(11): 1350-1359.
41. Lacivita E, De Giorgio P, Patarnello D, et al. Towards metabolically stable 5-HT7 receptor ligands: a study on 1-arylpiperazine derivatives and related isosters. *Experimental Brain Research*. 2013;230(4): 569-582.
42. Nassar AF. *Drug metabolism handbook: concepts and applications*: John Wiley & Sons; 2009.
43. Sekhon BS. Exploiting the power of stereochemistry in drugs: an overview of racemic and enantiopure drugs. *J Mod Med Chem*. 2013;1: 10-36.
44. Stephens TD, Bunde CJW, Fillmore BJ. Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. *Biochemical Pharmacology*. 2000;59(12): 1489-1499.
45. Smetanova L, Stetinova V, Kholova D, Kvetina J, Smetana J, Svoboda Z. Caco-2 cells and Biopharmaceutics Classification System (BCS) for prediction of transepithelial transport of xenobiotics (model drug: caffeine). *Neuroendocrinology Letters*. 2009;30: 101-105.
46. Zhang WJ, Ramamoorthy Y, Kilcarslan T, Nolte H, Tyndale RF, Sellers EM. Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002;30(3): 314-318.
47. Freret T, Paizanis E, Beaudet G, et al. Modulation of 5-HT7 receptor: effect on object recognition performances in mice. *Psychopharmacology*. 2014;231(2): 393-400.
48. Guioea V. New triazines and their diuretic activity. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. 1973;31(4): 283-292.
49. Rosengren AM, Karlsson BCG, Nicholls IA. Monitoring the Distribution of Warfarin in Blood Plasma. *Acs Medicinal Chemistry Letters*. 2012;3(8): 650-652.
50. Kyriakidis DA, Tiligada E. Signal transduction and adaptive regulation through bacterial two-component systems: the Escherichia coli AtoSC paradigm. *Amino Acids*. 2009;37(3): 443-458.