

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Farmakodynamiki**



Patrycja Magdalena Kleczkowska

**„Synteza i analiza potencjału terapeutycznego
hybryd peptydowych o zróżnicowanych
farmakoforach składowych“**

**Autoreferat
(Załącznik 2)**

Warszawa 2019

1. Imię i Nazwisko: Patrycja Magdalena Kleczkowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- 2014** uzyskanie stopnia Doktora Nauk Medycznych (*SUMMA CUM LAUDAE*),
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska
Tytuł rozprawy: „*Analogi hybrydowe opioid-neurotensyna jako nowe
potencjalne analgetyki w leczeniu bólu ostrego*”
- 2009-2014** studia doktoranckie w Instytucie Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa,
Polska (Zakład Neuropeptydów)
- 2004** uzyskanie tytułu Magistra Biotechnologii, Politechnika Gdańska, Wydział
Chemii, Gdańsk
Tytuł rozprawy: „*Porównanie przebiegu enzymatycznej hydrolizy oleju
rzepakowego i strukturyzowanych lipidów bogatych w kwas kaprynowy
(C10)*”.
- 2002-2004** studia magisterskie w Politechnice Gdańskiej, Wydział Chemii,
Specjalizacja: Chemia, Technologia i Biotechnologia Żywności
- 2002** uzyskanie tytułu Inżyniera Biotechnologii, Politechnika Gdańska, Wydział
Chemii, Gdańsk
Tytuł rozprawy: „*Wykorzystanie produktów ubocznych i odpadowych
z rafinacji tłuszczów*”.
- 1998-2002** studia inżynierskie w Politechnice Gdańskiej, Wydział Chemii,
Specjalizacja: Technologia i Analiza Żywności

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

- 2015 – obecnie** Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Zakład Farmakodynamiki – stanowisko: adiunkt – pracownik badawczo-dydaktyczny
- 2014 – 2015** Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (Zakład Neuropeptydów) – stanowisko specjalisty badawczo-technicznego
- 2005 – 2009** Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (Zakład Neuropeptydów) – stanowisko specjalisty
- 2005** Instytut Chemii Przemysłowej w Warszawie (Zakład Biotechnologii) – stanowisko specjalisty

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. 2016 r. Poz. 882 ze zm. W dz. U. Z 2016 r. Poz. 1311.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

„Synteza i analiza potencjału terapeutycznego hybryd peptydowych o zróżnicowanych farmakoforach składowych“

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą do sformułowania wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego, stanowi jednotematyczny cykl 7 publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach posiadających współczynnik oddziaływania *Impact Factor* i znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR).

Sumaryczna liczba publikacji, stanowiących całość osiągnięcia naukowego: 7

Łączny *Impact Factor* (według roku wydania prac): 27,452

Łączna liczba punktów MNiSW: 220

b) monotematyczny cykl publikacji zawiera następujące publikacje naukowe (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, współczynnik wpływu *Impact Factor* IF oraz punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - MNiSW):

H1. Kleczkowska P, Nowicka K, Bujalska-Zadrozny M, Hermans E. Neurokinin 1 receptor-based bivalent drugs in pain management - the journey to nowhere? *Pharmacol. Ther.* 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.11.007. (IF₂₀₁₇ = 10,376; MNiSW = 45) (praca przeglądowa)

H2. Kleczkowska P[✉], Kowalczyk A, Lesniak A, Bujalska-Zadrozny M. The discovery and development of drug combinations for the treatment of various diseases from patent literature (1980-present). *Curr. Top. Med. Chem.* 2017, 17: 875-894 (IF₂₀₁₇ = 3,374; MNiSW = 30) (praca przeglądowa)

H3. Kleczkowska P[✉], Hermans E, Kosson P, Kowalczyk A, Lesniak A, Pawlik K, Bojnik E, Benyhe S, Nowicka B, Bujalska-Zadrozny M, Misicka A, Lipkowski AW. Antinociceptive effect induced by a combination of opioid and neurotensin moieties vs. their hybrid peptide [Ile⁹]PK20 in an acute pain treatment in rodents. *Brain Res.* 2016, 1648: 172-180 (IF₂₀₁₆ = 2,746; MNiSW = 25) (praca oryginalna)

H4. Kowalczyk A, Kleczkowska P[✉], Rękawek M, Kulik K, Lesniak A, Erdei A, Borics A, Martin C, Pawlik K, Lipkowski AW, Benyhe S, Makulska-Nowak H, Ballet S, Bujalska-Zadrozny M. Biological evaluation and molecular docking studies of AA3052, a compound containing a μ -selective opioid peptide agonist DALDA and *D*-Phe-Phe-*D*-Phe-Leu-Leu-NH₂, a substance P analogue. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016, 93: 11-20 (IF₂₀₁₆ = 3,756; MNiSW = 35) (praca oryginalna)

H5. Kowalczyk A, Kleczkowska P[✉], Konop M, Kasarello K, Czuwara J, Pekala M, Sosnowski P, Sacharczuk M, Cudnoch-Jedrzejewska A, Rudnicka L, Bujalska-Zadrozny M. Determination of the anti-inflammatory properties and analgesic activity of the AA3052 chimeric peptide against CFA-induced inflammatory pain. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2018, 36: 219-240 (IF₂₀₁₇ = 0,710; MNiSW = 25) (praca oryginalna)

H6. Kleczkowska P[✉], Kawalec M, Bujalska-Zadrozny M, Filip M, Zablocka B, Lipkowski AW. Effects of the hybridization of opioid and neurotensin pharmacophores on cell survival in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurotox. Res.* 2015, 28: 352-360 (IF₂₀₁₅ = 3,140; MNiSW = 25) (praca oryginalna)

H7. Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M, Kleczkowska P, Lipkowski AW. Role of neurotensin and opioid receptors in the cardiorespiratory effects of [Ile⁹]PK20, a novel antinociceptive chimeric peptide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014, 63:8-13 (IF₂₀₁₄ = 3,350; MNiSW = 35) (praca oryginalna)

*Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 6.

✉ - autor korespondencyjny

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Od lat politerapia, jak również polipragmazja są nieodłącznym elementem życia wielu pacjentów, głównie w wieku podeszłym, cierpiących na kilka schorzeń jednocześnie. Obydwa terminy wiążą się ściśle z zażywaniem nadmiernej liczby leków, niekiedy bez wyraźnej potrzeby [1, 2]. Stąd owa niewłaściwa ordynacja substancji leczniczych może w konsekwencji doprowadzić do pojawienia się różnego rodzaju interakcji np. typu lek-lek [2]. Charakter tych oddziaływań może być zarówno farmakodynamiczny, jak również farmakokinetyczny. Podczas, gdy interakcje farmakokinetyczne jawią się najczęściej w formie zaburzeń wchłaniania, wydalania czy chociażby zwiększonej kumulacji jednego z zażytych leków, to w przypadku interakcji farmakodynamicznych skala zaburzeń wydaje się być równie poważna. Wynika to z faktu, iż obok obserwowanego wzmocnienia (addycja/synergizm) czy osłabienia (inhibicja) aktywności biologicznej, a tym samym i efektu terapeutycznego leku, niejednokrotnie może dojść do powstania zupełnie nowej aktywności. To z kolei może skutkować wzrostem toksyczności danego leku. Ponadto zastosowane substancje lecznicze objawiające się zupełnie nową aktywnością mogą wpływać na funkcjonowanie innych układów fizjologicznych człowieka, które były pierwotnie niewrażliwe na działanie każdego leku z osobna.

Wprawdzie w literaturze można odnaleźć informacje jakoby prawidłowo stosowana politerapia niosła ze sobą przede wszystkim korzyści, to jednak w rzeczywistości uzyskanie zadowalających efektów bez szkody dla zdrowia pacjenta jest niezwykle trudne do osiągnięcia. Rozsądne przyjmowanie kilku leków/substancji leczniczych w tym samym czasie wymaga bowiem od lekarza ordynującego znajomości nie tylko farmakokinetyki i farmakodynamiki oraz charakterystyki zastosowanych leków, ale także szczegółowego wniknięcia w historię choroby pacjenta, w jego nawyki żywieniowe czy styl życia. Co więcej, pojawienie się niebezpiecznych dla zdrowia pacjenta skutków ubocznych, wynikających z niewłaściwego stosowania leków może być również spowodowane różnicami osobniczymi.

Do czynników biologicznych wewnątrzustrojowych determinujących „zachowanie się” leku w organizmie zaliczyć można m.in.: płeć, wiek, stan fizjologiczny, np. ciążę, jak również stany czynnościowe organizmu i jego zmiany, zarówno wrodzone, jak i nabyte. Co ważne, wiek jest jednym z kluczowych czynników, które w sposób istotny wpływają na losy leku w

ustroju. To, ile mamy lat w trakcie trwania terapii farmakologicznej (noworodek, małe dziecko, osoba > 65 r.ż.) jest związane z wieloma zachodzącymi zmianami w organizmie ludzkim w związku ze starzeniem się organizmu i poszczególnych narządów. Modyfikacje te pociągają za sobą istotne zmiany niektórych właściwości substancji leczniczych (Tabela 1).

Tabela 1. Zmiany fizjologiczne u osób starszych i ich wpływ na niektóre parametry farmakodynamiczne i farmakokinetyczne leku [3].

ZMIANY ZWIĄZANE Z WIEKIEM	PARAMETR FARMAKOKIENCYCZNY/ FARMAKODYNAMICZNY	EFEKT FARMAKOKIENCYCZNY/ FARMAKODYNAMICZNY
↑ tkanki tłuszczowej ↓ wody całkowitej i pływu wewnątrzkomórkowego	Objętość dystrybucji	↑ objętość dystrybucji leków lipofilnych (opóźniony efekt działania i ryzyko kumulacji) ↓ objętość dystrybucji leków hydrofilnych (skrócenie czasu działania i wzrost toksyczności)
↓ albumin ↑ kwaśnej α-1 glikoproteiny	Stopień wiązania leku z białkami	↑ wolnej frakcji leku o charakterze kwaśnym (nasilenie działania) ↓ wolnej frakcji leku o charakterze zasadowym (osłabienie działania)
↓ przepływu krwi przez wątrobę (≈ 30%) ↓ masy wątroby (≈ 20-30%) ↓ aktywności enzymów I fazy biotransformacji	Metabolizm wątrobowy	↓ klirensu wątrobowego ↑ czasu połowicznego rozpadu leku $T_{1/2}$ ↑ akumulacji niezmetabolizowanych leków
↓	Liczba neuronów i poziom neuroprzekaźników w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) Np. pogorszenie (upośledzenie) funkcjonowania układu nerwowego	↑ działania leków hamujących OUN ↓ działania leków pobudzających OUN ↓ neuroprzekaźników w OUN ↓ farmakokinetyki i farmakodynamiki leków u osób starszych
↓	Rezerwy homeostazy Np. trudnione utrzymanie homeostazy	↑ ryzyka wystąpienia polekowych działań niepożądanych

↑ - wzrost

↓ - spadek

klirens leku – objętość osocza krwi, która w jednostce czasu zostaje całkowicie oczyszczona z leku w wyniku wydalniczej czynności nerek, wątroby, płuc, skóry oraz innych narządów

Na metabolizm konkretnego leku mogą w istotny sposób wpłynąć także czynniki genetyczne, np. niedobór bądź brak układu enzymatycznego lub wzrost aktywności enzymatycznej czy ostatecznie nadmiar aktywności hormonalnej. Niezwykle ważnym czynnikiem jest istnienie tzw. polimorfizmu genetycznego enzymów wątrobowych (np. izoenzymy cytochromu P-450, w tym CYP2D6 czy CYP3A4), biorących udział w biotransformacji znacznej liczby dostępnych substancji leczniczych.

Wydaje się jednak, że świadomość społeczeństwa co do roli większości z prezentowanych czynników biologicznych, wpływających na metabolizm leków w ustroju, jest znikoma bądź nawet żadna. Stąd też niejednokrotnie, pomimo najlepszych chęci i zaangażowania w proces terapeutyczny zarówno lekarza, jak i pacjenta - skuteczność politerapii staje pod ogromnym znakiem zapytania.

Celem zminimalizowania efektów ubocznych, wynikających ze stosowania kilku leków jednocześnie, ale również mając na uwadze istniejące ryzyko przepisywania niewłaściwych substancji leczniczych przez wielu lekarzy, do chwili obecnej wprowadzono kilka potencjalnych rozwiązań.

Jednym z proponowanych rozwiązań jest zastosowanie nowych kryteriów takich jak: STOPP/START, Beers czy lista leków Priscus [4, 5]. Przy czym na szczególną uwagę zasługuje kryterium STOPP/START (narzędzie przesiewowe do oceny leków osoby starszej/narzędzie przesiewowe do rozpoczynania odpowiedniego leczenia, ang. *Screening Tool of Older Person's potentially inappropriate Prescriptions/Screening Tool to Alert doctors to the Right Treatment*). Kryteria STOPP obejmują kilkadziesiąt istotnych klinicznie przypadków nieprawidłowego kojarzenia leków i przepisywania ich pacjentom geriatrycznym, wliczając w to zarówno interakcje typu lek-lek, jak również lek-choroba czy dublujące się terapie jako efekt jednoczesnego leczenia chorego przez kilku specjalistów. Z kolei kryteria START zawierają szereg przypadków lekceważenia przez lekarza leków potencjalnie korzystnych w terapii określonego schorzenia/jednostki chorobowej, pomimo istnienia fragmentarycznej dokumentacji, dotyczącej korzystnego ich działania [6, 7].

Przeprowadzona niedawno meta-analiza badań randomizowanych z grupą kontrolną stosującą kryteria STOPP/START wykazała, że wykorzystanie tego typu kryterium korzystnie wpłynęło na czas hospitalizacji chorego, odstępy pomiędzy wizytami lekarskimi oraz same koszty leczenia [8]. Wszystko to świadczy o skuteczności programu STOPP/START w praktyce klinicznej. Dodatkowo stwierdzono, iż kryterium STOPP pozwoliło zidentyfikować znacznie więcej leków związanych z wystąpieniem niekorzystnych efektów niż w przypadku wersji Beers w 2002 r. [4]. To jednak wydaje się niedostateczne

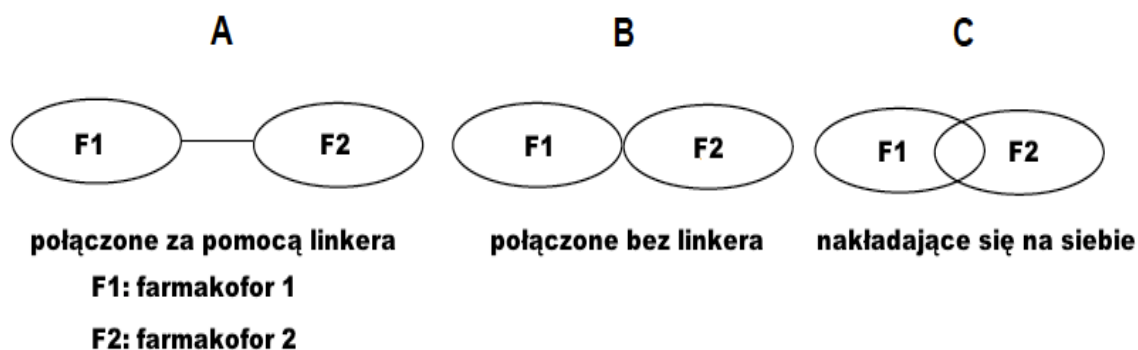
i wciąż mało skuteczne, zwłaszcza mając na uwadze wysoce indywidualny profil starszych pacjentów.

Stosowanie dwóch substancji aktywnych (leków) w postaci jednej tabletki (tzw. leki wieloskładnikowe, ang. *multicomponent drugs*) jest kolejną propozycją złagodzenia możliwych interakcji, głównie typu lek-lek [9]. Wydaje się, że tego typu leczenie skojarzone jest już regułą w terapii takich chorób, jak niektóre zakażenia bakteryjne, stany bólowe, itp.

Prezentowana forma leku nie ogranicza jednak ryzyka wystąpienia działań niepożądanych jako rezultat interakcji lek-lek, ale jest udoskonaleniem terapii poprzez zmniejszenie liczby zażywanych lekarstw, a tym samym ulepszeniem współpracy między pacjentem a lekarzem [10]. Tzw. „*compliance*” jest niezwykle istotny zwłaszcza w przypadku pacjentów, którzy nie do końca przestrzegają zaleceń lekarzy. Wśród tych osób wyróżniamy zarówno pacjentów świadomie modyfikujących terapię farmakologiczną, jak i chorych z deficytami pamięci.

Wymuszone stosowanie coraz większej liczby leków, które jest związane zwłaszcza z istnieniem wielochorobowości, jak również fakt występowania szeregu efektów niepożądanych, przybierających na sile zwłaszcza w wyniku nieprawidłowego kojarzenia leków, skłoniły naukowców do poszukiwania wielocelowych leków (ang. *multitarget drugs*, *MTD*) [H1, H2]. W praktyce, powyższe związki utworzone na podstawie tzw. techniki hybrydyzacji, określane również mianem: hybryd, chimer, bifunkcyjnych leków, leków wielofunkcyjnych (ang. *multifunctional drugs*), zaprojektowanych wielokrotnych ligandów (ang. *designed multiple ligands*, *DML*) etc., mogą stać się właściwym rozwiązaniem dla wielu chorych cierpiących również na jeden rodzaj choroby o etiologii wieloczynnikowej. Wspomniane bifunkcyjne leki dają możliwość jednoczesnego wpływu na kilka istotnych mechanizmów, biorących udział w patomechanizmie danej choroby.

Związki tworzone metodą hybrydyzacji – w przeciwieństwie do popularnych leków wieloskładnikowych – stanowią jedną chemiczną cząsteczkę, w której elementy składowe (farmakofory) mogą być ze sobą połączone z wykorzystaniem jednego z trzech podstawowych typów sprzęgania (Ryc. 1).



Ryc. 1. Klasyfikacja ligandów hybrydowych (chimer) w zależności od sposobu łączenia ich farmakofoforów [11, H2].

Sposób związania ze sobą farmakofoforów w określonym związku bifunkcyjnym może w znacznym stopniu wpływać na jego stabilność tak konformacyjną, jak i enzymatyczną, a tym samym odgrywać jedną z kluczowych ról w końcowym efekcie farmakologicznym. Istotnie, z punktu widzenia rozwoju farmaceutycznego degradacyjne działanie proteaz na białka i peptydy stanowi główną przeszkodę w otrzymywaniu potencjalnych substancji farmakologicznie aktywnych. Jest to związane z faktem, iż oporność na działanie licznych enzymów proteolitycznych warunkuje długotrwałe działanie substancji leczniczej w organizmie [12, 13]. To z kolei w połączeniu z natychmiastowym rozpoczęciem działania jest wysoce pożądane przez większość pacjentów, niezależnie od występującej u nich choroby.

Nieco inaczej przedstawia się sytuacja w przypadku posiadania przez cząsteczkę związku/substancji leczniczej sztywnej konformacji przestrzennej (konformacji o najniższej energii potencjalnej). Z reguły ligandy są „giętkimi” molekułami, stąd konformacja w jakiej łączą się z białkiem receptorowym bądź innym celem molekularnym, nie jest do końca znana [14, 15]. Jednakowoż spotykane jest stwierdzenie, iż posiadanie stabilnej struktury trzeciorzędowej warunkuje specyficzną funkcję związku zgodnie z paradygmatem: sekwencja – stabilna konformacja przestrzenna – określona funkcja biologiczna oraz niezmienność właściwości fizykochemicznych substancji [16]. Ponadto istnienie struktury trzeciorzędowej ułatwia prognozowanie na temat potencjalnego mechanizmu działania wynikającego z oddziaływania substancji aktywnej biologicznie z właściwym dla siebie celem (miejscami wiązania, centrami reakcji enzymatycznych). Jej brak natomiast pozwala skonstruowanej cząsteczce bez przeszkód przyjmować odmienne stany konformacyjne w odpowiedzi na zmianę warunków środowiska, czy na skutek oddziaływania z różnorodnymi partnerami [16]. Jednocześnie owa giętkość konformacyjna i możliwość wiązania się molekuly z różnymi

receptorami daje szansę uzyskania pożądaných efektów terapeutycznych także w leczeniu innych jednostek chorobowych niż ta, dla których pierwotnie związek został zaprojektowany.

Przewaga związków o charakterze hybrydowym nad popularną terapią kombinowaną wynika zatem z faktu, iż z racji swojej wyjątkowej budowy ligandy takie mają możliwość oddziaływania z różnymi targetami/celami molekularnymi. Stąd też, tak zaprojektowane potencjalne substancje lecznicze mogą okazać się skuteczne w terapii różnorodnych schorzeń występujących jednocześnie [17-20 oraz prace własne **H3, H6, 4, 5, 18**]. Ponadto związki o wspomnianych właściwościach mogą wykazywać znacznie ulepszone parametry farmakokinetyczne i farmakodynamiczne, a w tym zwiększoną oporność na działanie licznych enzymów [20]. Nie bez znaczenia jest również fakt, iż tego typu nowe substancje może cechować zdolność przenikania przez szereg barier fizjologicznych, w tym przez selektywną barierę krew-mózg (BBB), stanowiącą główną przeszkodę dla związków przed ich przeniknięciem do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [21, 22].

Dodatkowo, mimo braku istnienia jakichkolwiek dowodów, w literaturze przedmiotu można znaleźć wiele sugestii jakoby ligandy wielofunkcyjne wykazywały udoskonalony profil bezpieczeństwa znacznie odpowiadający naszym wymaganiom, w porównaniu z politerapią złożoną z pojedynczych elementów składowych chimery. Istotnie wnioskuje się, iż zastosowanie hybryd skutkuje bądź redukcją ilości efektów niepożądanych, bądź osłabieniem ich intensywności [11, 23].

Wart zauważenia jest fakt, iż zdecydowaną większość nowo tworzonych potencjalnych substancji terapeutycznych o charakterze hybrydowym stanowią struktury peptydowe, co z kolei wynika z licznych korzyści jakie niesie ze sobą stosowanie peptydów. Wprawdzie mimo istnienia już na rynku farmaceutycznym leków peptydowych (np. insulina, cyklosporyna czy oktreotyd będący analogiem somatostatyny), to rola zarówno endogennych peptydów, jak i ich analogów strukturalnych tworzonych na drodze syntezy, dopiero teraz uległa spektakularnemu rozwojowi.

Jak powszechnie wiadomo peptydy są obecne w organizmie każdego człowieka, gdzie pełnią niejednokrotnie wiele ważnych funkcji, począwszy od roli neuroprzekaźników/neuromodulatorów do roli naturalnych antybiotyków [24-26]. Ich niewątpliwą zaletą jest wysoka selektywność przy stosunkowo niskiej dawce niezbędnej do wywołania efektu biologicznego. Ponadto, jak ma to miejsce w przypadku endogennych peptydów opioidowych ważnych w aspekcie przewodzenia i inhibicji sygnału bólowego, sekwencja aminokwasowa posiada tzw. domenę „*message*” oraz „*address*” względem receptora, dzięki znajomości których istnieje możliwość wpływania na powinowactwo i

aktywność liganda. Sugeruje się, iż element sekwencji stanowiącej „*message*” jest cechą wspólną dla peptydów opiodowych (*N*-końcowa Tyr¹) i bierze on udział w transdukcji sygnału, podczas gdy komponent adresowy (domena „*address*”; *N*-końcowa Phe⁴ w łańcuchu węglowym opiodu) jest specyficzny dla każdego liganda i odpowiada za selektywność względem danego typu receptora opiodowego [27]. Korzyścią wypływającą z przedstawionej powyżej budowy związków peptydowych, zsyntetyzowanych w oparciu o struktury endogennych cząsteczek, jest możliwość przewidzenia oraz udoskonalenia tak aktywności biologicznej, możliwości i stopnia interakcji z właściwym miejscem wiążącym celu molekularnego, jak również profilu bezpieczeństwa w aspekcie toksyczności. Tworzone związki peptydowe cechują się niejednokrotnie niewspółmiernie wyższą efektywnością działania w niższych stosowanych dawkach, a tym samym ograniczonym ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych, w tym przedawkowania, w porównaniu z wieloma lekami natury organicznej.

Nie bez znaczenia jest jednak stosunkowo niewielka biodostępność peptydów oraz istniejących leków peptydowych związana z ich krótkim okresem półtrwania czy wysoką wrażliwością na działanie enzymów proteolitycznych. Ponadto związki takie wykazują zazwyczaj znikomą zdolność do generowania ośrodkowego efektu farmakologicznego po podaniu obwodowym. Niemniej, parametry te nie są stałe, bowiem opracowano szereg metod poprawiających właściwości peptydowych leków/substancji farmakologicznie czynnych bez wpływu na ich aktywność biologiczną (np. poprzez zastąpienie wiązań amidowych bioizosterycznymi odpowiednikami, cyklizację łańcucha peptydowego, czy wreszcie utworzenie koniugatów z polimerami itp.) [28].

Cel pracy

Wychodząc na przeciw powszechnemu stwierdzeniu jakoby regułą było, iż cząsteczki hybrydowe posiadają wysoką skuteczność i wymagany profil bezpieczeństwa w porównaniu z innymi lekami, zwłaszcza mając na uwadze mieszaninę leków, celem badawczym przedstawionego cyklu habilitacyjnego było:

1. Zdefiniowanie związków o charakterze peptydów hybrydowych w kontekście możliwych efektów terapeutycznych płynących z ich zastosowania [**H1-H7**].
2. Wstępne określenie możliwych działań niepożądanych i ewentualnych jednostek chorobowych, w których hybryda wykazuje brak bądź znikomy efekt terapeutyczny [**H3-H5, H7**].

3. Zaproponowanie peptydowych struktur hybrydowych jako cząsteczek potencjalnie skutecznych w farmakoterapii schorzeń innych niż te, dla których pierwotnie były one zaprojektowane [H6, H7].

Omówienie uzyskanych wyników

Substancje lecznicze będące strukturalnym połączeniem dwóch aktywnych składników są już od pewnego czasu obecne na rynku farmaceutycznym mimo, iż większość społeczeństwa okazuje się być zupełnie nieświadoma korzyści płynących z ich zażywania. Takim przykładem może być chociażby zyprazydon, stanowiący połączenie zmodyfikowanej cząsteczki dopaminy i cząsteczki 1-(naftalen-1-ylo)piperazyny [29], który jest stosowany jako neuroleptyk II generacji w leczeniu objawów schizofrenii oraz choroby afektywnej dwubiegunowej. I choć obserwując i słuchając natłoku informacji zamieszczanych w mediach stwierdza się, iż w kwestii farmakoterapii królują przede wszystkim leki wieloskładnikowe, np. Griplex® czy Metafen®, to jednak można zauważyć również, że pojawia się zainteresowanie związkami o budowie hybrydowej. Zatem należy podkreślić fakt, iż zarówno hybrydy, jak i potencjalne możliwości wynikające z ich stosowania są ostatnio tematem zainteresowania naukowców, dysponujących narzędziami do ich projektowania i otrzymywania oraz badania ich aktywności w warunkach *in vivo*. Owe zaabsorbowanie techniką hybrydyzacji przedstawiłam w pracach przeglądowych **H1: Kleczkowska P, Nowicka K, Bujalska-Zadrozny M, Hermans E. Neurokinin 1 receptor-based bivalent drugs in pain management - the journey to nowhere? *Pharmacol. Ther.* 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.11.007** oraz **H2: Kleczkowska P[✉], Kowalczyk A, Lesniak A, Bujalska-Zadrozny M. The discovery and development of drug combinations for the treatment of various diseases from patent literature (1980-present). *Curr. Top. Med. Chem.* 2017, 17: 875-894.**

Pierwsza z wyżej wspomnianych prac, tj. praca **H1** stanowi niejako podsumowanie ponad 20-letniej podróży jaka została przebyta w kierunku opracowania silnych przeciwbólowych związków hybrydowych obejmujących farmakofory opioidowe i neurokininowe, pozbawionych zdolności indukowania niepożądanych skutków ubocznych. Natomiast publikacja **H2** to z kolei obszernie kompendium opierające się na materiałach patentowych (przyznane patenty oraz zgłoszenia patentowe), dotyczące wszystkich nowych i wysoce zróżnicowanych związków hybrydowych (w aspekcie charakteru farmakoforów je tworzących), z okresu od 1980 roku do chwili obecnej. Należy podkreślić, że praca ta nie

opiera się wyłącznie na oryginalnych publikacjach naukowych, ukazujących przypuszczalnie istotnie większe zainteresowanie omawianym typem cząsteczek, a weryfikuje je - porównując z rzeczywistą ilością dokumentów patentowych.

Pierwszy rozdział pracy **H2** poświęciłam strukturom hybrydowym wykazującym aktywność przeciwzapalną. Biorąc pod uwagę fakt, iż najczęściej stosowanymi lekami wykorzystywanymi w terapii stanów zapalnych są niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), znaczna większość chimer jest „tworem“ wynikającym z połączenia NLPZ-u z innym typem cząsteczki posiadającym odmienną aktywność biologiczną. Doskonałym przykładem jest patent z 2014 roku (WO 2014/138343) przedstawiający połączenie znanych leków przeciwzapalnych, np. indometacyny z elementem strukturalnym o właściwościach bakteriobójczych (np. chloramfenikol, tobramycyna) [30]. Tak skonstruowane potencjalne leki hybrydowe mogą mieć zastosowanie w leczeniu nie tylko stanu zapalnego, będącego skutkiem działania nierzadko różnego rodzaju bakterii, ale również – dzięki obecności w składzie antybiotyku – mogą zadziałać u źródła toczącego się procesu chorobowego.

Obok NLPZ-ów, modulujący wpływ na szereg różnych mediatorów stanu zapalnego (np. cytokin, chemokin, etc.) posiadają kortykosterydy [31-34]. Prawdą jest bowiem, iż na poziomie komórkowym użycie kortykosterydów skutkuje redystrybucją granulocytów, a tym samym zwiększa się recyrkulacja granulocytów i następuje hamowanie ich napływu do miejsca reakcji alergicznej [35]. Dodatkową cechą jest zdolność kortykosterydów do ochrony mięśnia sercowego przed uszkodzeniem niedokrwinnym [36-38]. Szereg innych równie korzystnych właściwości tej grupy leków spowodowało, iż zostały one także zaproponowane jako jedne z elementów składowych związków wielofunkcyjnych. Stało się to mimo świadomości wystąpienia działań niepożądanych wynikających z ich stosowania, zwłaszcza w sposób przewlekły i niejednokrotnie w dużych dawkach.

Jak wspomniano uprzednio jednym z podstawowych celów kompozycji hybrydowych jest redukcja efektów ubocznych indukowanych każdym z farmakoforów z osobna. Zatem sprzęganie kortykosterydów z tlenkiem azotu (NO), który stanowi ważny endogenne czynnik w ochronie układu naczyniowo-sercowego [39], może okazać się dużym sukcesem.

Obok struktur o potencjale przeciwzapalnym w omawianej pracy przeglądowej opisałam również cząsteczki wykazujące właściwości przeciwnowotworowe czy neuroprotektoryjne. Warto podkreślić, że olbrzymia część pracy została poświęcona hybrydom o aktywności przeciwbólowej (analgetycznej). Ów bezmiar informacji dotyczący nowych hybrydowych analgetyków jest wysoce uzasadniony. Jak wiadomo ból stanowi jeden z najpopularniejszych nieprzyjemnych doznań, który dotyka zdecydowaną większość pacjentów i to w każdym wieku.

Niekiedy można nawet powiedzieć, iż „rodzimy się i umieramy w bólu“, bo przecież nie tylko poród nacechowany jest bólem. Cierpienie kobiety jest oczywiste, ale prawdopodobnie również dziecko odczuwa jakiś rodzaj bólu w chwili przechodzenia przez kanał rodny, będąc odizolowanym od-, i wręcz wyrwanym z jedyne go znanego mu i bezpiecznego miejsca jakim jest łono matki. Także śmierć często zawiera komponentę bólową – cierpienie, które towarzyszy chorobie, a nie jest jedynie związane z poczuciem nadchodzącej straty obcowania z najbliższymi.

Istnieje wiele czynników mających wpływ na powstanie bólu bądź bezpośredniego indukujących. Wnioskuje się, iż urazy są główną przyczyną powstającego odczucia, ale ból może wynikać również z rozwijającego się w naszym organizmie procesu chorobowego. Może towarzyszyć także różnorodnym stanom psychicznym, takim jak: depresja lub nawet może mieć miejsce w przypadku braku rozpoznawalnego induktora. Jednak fakt mówiący o tym, że w rzeczywistości ból jest niejednokrotnie efektem jakiegoś schorzenia czy stanu patologicznego, skłania do stwierdzenia, że otrzymanie związków wykazujących co najmniej dwójakie działanie poprzez interakcje z odmiennymi celami biologicznymi, jest w tym konkretnym przypadku wysoce pożądane.

Wśród wymienionych w pracy przeglądowej **H2** typów struktur znajdują się głównie połączenia, w których jedną ze składowych jest fragment opioidowy; i obejmują one związki będące: 1) agonistą receptora opioidowego - agonistą/antagonistą receptora neurokininowego NK-1; 2) agonistą receptora opioidowego - agonistą receptora neurotensynowego NTS; 3) agonistą receptora opioidowego - antagonistą receptora NMDA, oraz 4) agonistą receptora opioidowego - agonistą receptora kanabinoidowego CB1. Wybór takich ligandów budulcowych proponowanych związków biwalentnych wynika ze znajomości właściwości przeciwbólowych obydwu faramkoforów, ale również z ich dodatkowej, korzystnej aktywności w różnych jednostkach chorobowych, w których ból jest nieodłącznym elementem.

Innym typem hybryd, którym poświęca się obecnie dużo uwagi, są czasteczki wykazujące zdolność redukowania masy ciała i poziomu glukozy [40, 41]. Takie rozwiązanie wydaje się niezwykle istotne zwłaszcza w dobie panującej otyłości, która sprzyja rozwojowi cukrzycy typu 2.

Jak zatem można zauważyć, idea tworzenia związków hybrydowych jest wciąż „żywa“ mimo, iż jej początek przypada na lata osiemdziesiąte ubiegłego wieku. Wprawdzie nie stanowi ona obecnie nowatorskiej metody, to wciąż za nowatorskie uznaje się możliwe połączenia, które często są dla nas zaskoczeniem. Co więcej wydaje się, że istnieje

zdecydowanie większe przekonanie społeczeństwa co do słuszności i korzyści dotyczących stosowania tak skonstruowanych substancji leczniczych.

Mimo nieprzerwanie spotykanej w literaturze naukowej informacji jakoby stosowanie związków hybrydowych w porównaniu z popularną politerapią wiązało się ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych czy ulepszonymi właściwościami fizykochemicznymi, brak jest jakichkolwiek dowodów owego fenomenu. Istnienie z kolei substancji leczniczej, charakteryzującej się wymaganym profilem bezpieczeństwa jest niezwykle istotne w terapii wielu, niekiedy bardzo skomplikowanych jednostek chorobowych, w tym bólu o różnym podłożu. Jak wiadomo najskuteczniejsze leki przeciwbólowe stanowią opioidy i ich pochodne [42], czego przykładem jest wciąż uważana za „złoty standard” morfina. Jednakże długotrwałe stosowanie opioidów obarczone jest ryzykiem pojawienia się działań niepożądanych, jak np. wymioty, senność, zaparcia czy depresja ośrodka oddechowego [43-46].

Wydawałoby się, iż rodzaj wymienionych efektów zażywania leków opioidowych nie odbiega od tego, który jest spotykany w przypadku większości innych leków. Ekspozycja organizmu na tego typu substancje wiąże się również z rozwojem tolerancji, prowadzącej w konsekwencji do uzależnienia tak fizycznego, jak i psychicznego [47, 48]. To natomiast stanowi podstawowy aspekt prowadzący do zaniechania przez pacjentów zalecanej farmakoterapii. Ponadto mając na uwadze, że część populacji nadużywa na dużą skalę narkotyków opioidowych, nierzadko są to osoby wysoko sytuowane, znakomicie ukrywające swój nałóg (tzw. anonimowi narkomani), identyfikacja takich pacjentów poszukujących dostępu do leku pod pozorem choroby nastrocza lekarzom i farmaceutom wielu problemów, i jest niekiedy powodem do odmówienia zastosowania tej konkretnej terapii. Obecnie podkreśla się, że obawa przed skutkami wielokrotnego/częstego stosowania leków opioidowych jest wysoce nieuzasadniona, zwłaszcza w Polsce. Zdanie zaczerpnięte z jednego z artykułów internetowych poświęconych tematyce skuteczności opioidów, tj. *„Pacjenci w naszym kraju na razie są uzależnieni od niewiedzy i opioidofobii lekarzy”* [49], jest najlepszym na to dowodem.

Bez względu na to, czy zażywanie/niezażywanie leków opioidowych jest sprawą dyskusyjną, to potencjał uzależniający opioidów stał się już faktem. Stąd zastosowanie technik hybrydyzacji skutkującej powstaniem związku o aktywności opioidowej, ale również innej, łagodzącej niektóre z właściwości opioidu, a wynikającej z istnienia dodatkowego

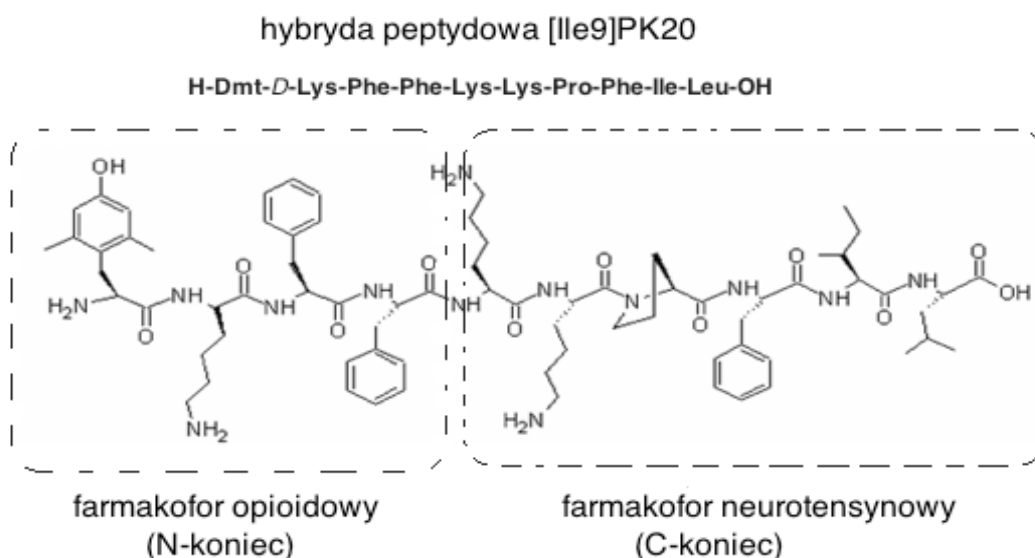
farmakoforu (często skonstruowanego na bazie endogennego neuroprzekaźnika), wydaje się doskonałym rozwiązaniem istniejącego problemu.

Istotnie, ligandy hybrydowe, w oparciu o charakterystykę których sformułowany jest niniejszy autoreferat, zaprojektowałam (poza niektórymi wyjątkami) i zsyntetyzowałam celem późniejszego określenia ich właściwości przeciwbólowych. Dlatego też podstawowym elementem budulcowym wszystkich omawianych w pracy struktur jest farmakofor opioidowy.

Mając z kolei na uwadze wyżej wspomniane ograniczenia wynikające ze stosowania opioidów, jak i sugestie co do istnienia deklasujących politerapię i leki wieloskładnikowe właściwości leków-hybryd, celem prac **H3: Kleczkowska P[☒], Hermans E, Kosson P, Kowalczyk A, Lesniak A, Pawlik K, Bojnik E, Benyhe S, Nowicka B, Bujalska-Zadrozny M, Misicka A, Lipkowski AW. Antinociceptive effect induced by a combination of opioid and neurotensin moieties vs. their hybrid peptide [Ile⁹]PK20 in an acute pain treatment in rodents. *Brain Res.* 2016, 1648: 172-180** oraz **H4: Kowalczyk A, Kleczkowska P[☒], Rękawek M, Kulik K, Lesniak A, Erdei A, Borics A, Martin C, Pawlik K, Lipkowski AW, Benyhe S, Makulska-Nowak H, Ballet S, Bujalska-Zadrozny M. Biological evaluation and molecular docking studies of AA3052, a compound containing a μ -selective opioid peptide agonist DALDA and *D*-Phe-Phe-*D*-Phe-Leu-Leu-NH₂, a substance P analogue. *Eur. J. Pharmacol. Sci.* 2016, 93: 11-20** było dostarczenie wyników potwierdzających bądź zaprzeczających przedstawione informacje.

Pierwsza z publikacji, tj. **H3: Kleczkowska P[☒], Hermans E, Kosson P, Kowalczyk A, Lesniak A, Pawlik K, Bojnik E, Benyhe S, Nowicka B, Bujalska-Zadrozny M, Misicka A, Lipkowski AW. Antinociceptive effect induced by a combination of opioid and neurotensin moieties vs. their hybrid peptide [Ile⁹]PK20 in an acute pain treatment in rodents. *Brain Res.* 2016, 1648: 172-180** opisuje pracę, w której za cel postawiono porównanie aktywności biologicznej (tu przeciwbólowej) nowo zsyntetyzowanej przeze mnie hybrydy [Ile⁹]PK20 z mieszaniną jej farmakoforów imitującą środek wieloskładnikowy. Podobnie jak w przypadku szeregu innych konstrukcji hybrydowych, mogących mieć zastosowanie w leczeniu bólu, obok farmakofora opioidowego zastosowano inny składnik wykazujący działanie analgetyczne w wyniku interakcji (np. antagonistycznej lub agonistycznej) z odpowiednim dla siebie receptorem białkowym. Omawianą częścią składową jest neurotensyna (NT), która uśmierza odczuwany ból niezależnie od pobudzenia układu opioidergicznego [50-52]. Stąd badany 10-cio aminokwasowy peptyd jest kombinacją opioidu (endomorfyny-2) i aktywnego fragmentu neurotensyny NT(8-13), które poddano

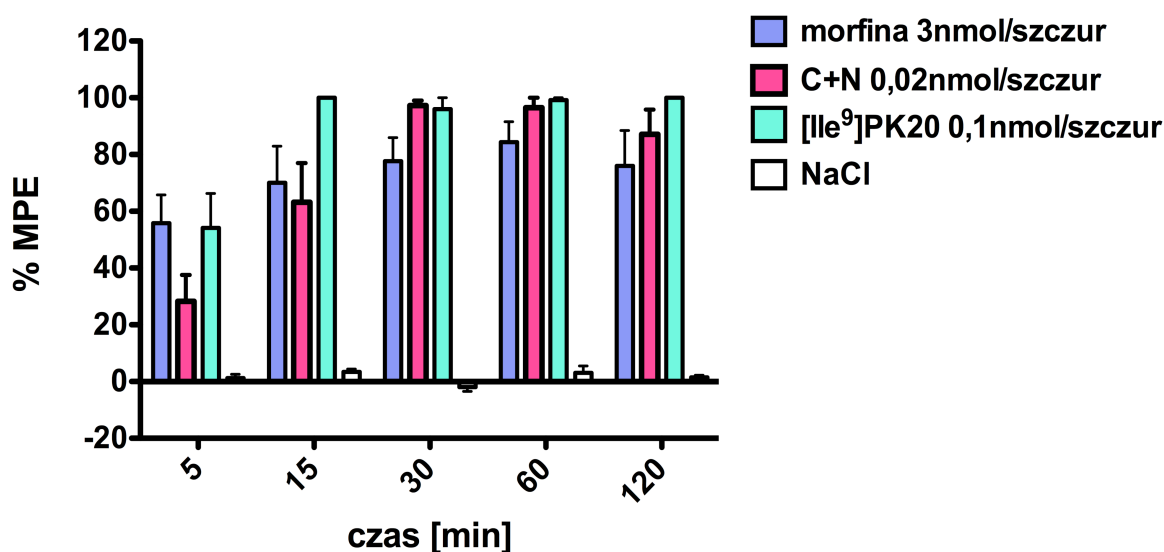
modyfikacjom strukturalnym mającym warunkować poprawę potencjału przeciwbólowego i niektórych właściwości, w tym np. stabilności enzymatycznej (Ryc. 2).



Ryc. 2. Budowa związku hybrydowego [Ile⁹]PK20 z zaznaczeniem jego elementów składowych.

Powyższy związek, podobnie jak i mieszaninę jego części składowych, podawano zwierzętom laboratoryjnym (szczury o wadze 220 g) nardzeniowo (podpajęczynówkowo, i.t.) w trzech różnych dawkach i określano: 1) stopień odczucia bólu na skutek zastosowanego bodźca termicznego, oraz 2) koordynację motoryczną.

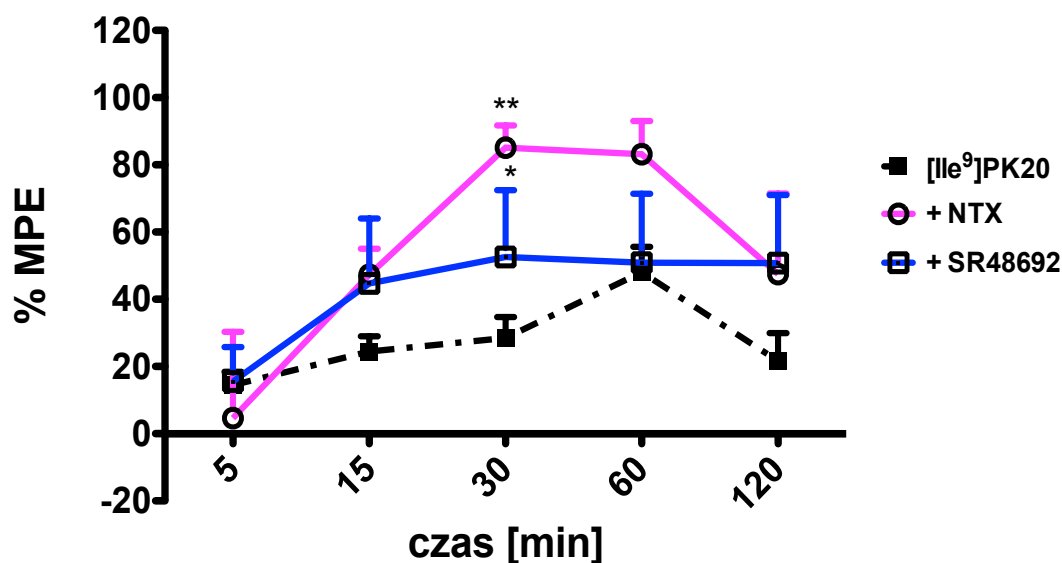
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, iż zarówno badana chimera, jak i mieszanina farmakofofora opioidowego wraz z neurotensyną, indukuje silny, dawko-zależny i długotrwały efekt antynocyceptywny. Jak się okazało w obu przypadkach obserwowane wyraźne działanie redukujące ból odpowiadało aktywności przeciwbólowej morfiny podanej zwierzętom w dawce odpowiednio 30- i 150-cio krotnie większej niż badane formy peptydów (Ryc. 3). Niemniej jednak, nardzeniowe podanie hybrydy [Ile⁹]PK20 skutkowało istotnie mniejszym potencjałem analgetycznym w porównaniu z mieszaniną w zakresie badanych stężeń. Faktem jest bowiem, iż omawiana chimera dopiero w dawce 0,1 nmol/zwierzę (szczur o podanej powyżej masie ciała) wykazywała niemal identyczne działanie jak ko-iniekcja dwóch farmakofoforów w dawce 0,02 nmol/zwierzę.



Ryc. 3. Odpowiedź przeciwbólowa indukowana nardzeniowym podaniem hybrydy peptydowej [Ile⁹]PK20 (0,1 nmol/szczur) oraz mieszaniny jej farmakoforów (0,02 nmol/szczur) vs. morfina (3 nmol/szczur). Test dwuczynnikowy Two-way ANOVA wraz z zastosowanym testem post-hoc Bonferroniego nie wykazały istnienia żadnych istotnych statystycznie różnic między poszczególnymi związkami [H3].

Obserwowana różnica w odpowiedzi przeciwbólowej może być związana z różnymi rodzajami interakcji występującymi między dwiema częściami badanego związku; zarówno, gdy podaje się je w postaci mieszaniny farmakoforów, jak i w postaci hybrydy. W rzeczywistości, w trakcie badań, których celem była próba odwrócenia efektu farmakologicznego poprzez zastosowanie antagonistów receptora opioidowego i neurotensynowego hybrydy [Ile⁹]PK20 oraz innych analogów związku macierzystego PK20, nie uzyskano istotnego statystycznie spadku antynocypcji w porównaniu z „czystą” (bez blokerów) hybrydą; obserwowany jest wręcz wzrost efektu przeciwbólowego. To z kolei może świadczyć o aktywacji przez cząsteczkę zupełnie innych celów molekularnych, które również odgrywają pewną rolę w transmisji sygnału bólowego (Ryc. 4). Z drugiej strony stwierdziłam, że część C-końcowa (tj. farmakofor neurotensynowy hybrydy [Ile⁹]PK20) może modulować farmakofor opioidowy w sposób zależny od dawki w chwili podawania związku w postaci mieszaniny.

Ponadto wydaje się, że ma on kluczowe znaczenie dla osiągnięcia wysokiego poziomu antynocypcji indukowanej lekiem podanym w tej formie (**dane niepublikowane**).

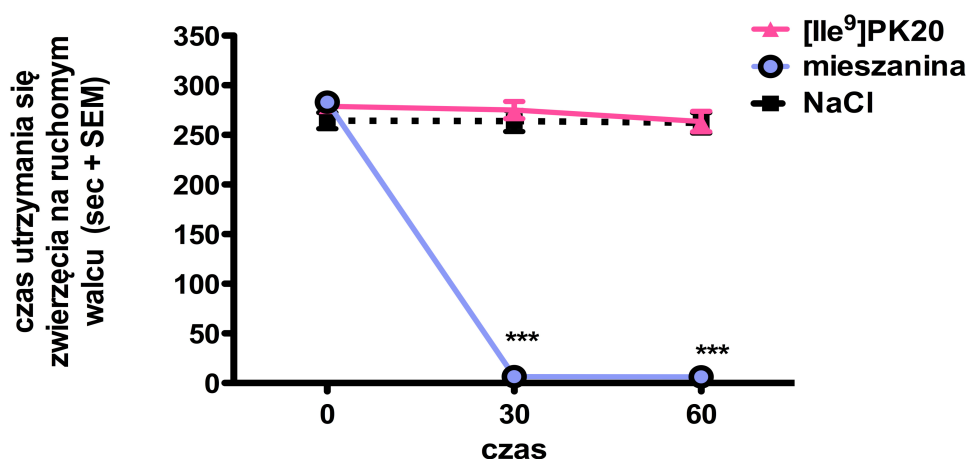


Ryc. 4. Wpływ obecności antagonisty opioidowego (naltrekson, NTX) oraz neurotensynowego (SR48692) na efekt przeciwbólowy hybrydy [Ile⁹]PK20 (podanie nardzeniowe w dawce 0,02 nmol/szczur). Antagonistów odpowiednich receptorów podawano 15 min przed podaniem właściwego związku, w dawce 10 µg/szczur (i.t.). Różnice w działaniu między hybrydą vs. hybrydą z antagonistą uznano za istotne statystycznie dla $p < 0,05$ (*) oraz $p < 0,01$ (**) [H3].

Potwierdzeniem zmiany aktywności przeciwbólowej, będącej wynikiem hybrydyzacji farmakofora opioidowego z neurotensynowym są badania radioreceptorowe (praca H3). Chemiczne połączenie obu fragmentów, tworząc ostatecznie jedną cząsteczkę, spowodowało znaczne osłabienie powinowactwa związku do receptora opioidowego ($pEC_{50} = 5,91 \pm 0,1$) kosztem – wydawałoby się – zachowania względnie wysokiego powinowactwa do receptora neurotensynowego NTS1 ($pEC_{50} = 7,40 \pm 0,21$). Z kolei w przypadku zastosowania mieszaniny opioidu i neurotensyny obserwowana była wyraźna interakcja z receptorem opioidowym ($pEC_{50} = 9,13 \pm 0,23$). Natomiast powinowactwo względem receptora NTS1 uległo redukcji, sugerując tym samym, iż efekt analgetyczny wywołany nardzeniowym podaniem tej kombinacji wynika głównie z aktywności części opioidowej aniżeli obydwu cząsteczek jednocześnie. Stąd - zachowując wciąż silne oddziaływanie z receptorem opioidowym i mimo zdecydowanie zadowalającego efektu farmakologicznego w postaci silnego uśmierzania bólu - aplikacja dwóch związków jednocześnie nie jest obciążona ryzykiem pojawienia się zaburzeń aktywności lokomotorycznej czy rozwoju tolerancji.

Powyższy efekt farmakologiczny jest szczególnie ważny w przypadku zażywania owej mieszaniny przez dłuższy czas (nawet przez kilkanaście czy kilkadziesiąt dni).

Morfina czy DAMGO ($[D\text{-Ala}^2, N\text{-MePhe}^4, \text{Gly-ol}]$ -enkefalina), stanowiące jedne z licznych ligandów o charakterze agonisty receptora mu-opioidowego, są doskonałym przykładem związków powodujących nadaktywność ruchową [53-55]. Prezentowana informacja jest spójna z otrzymanymi wynikami wskazującymi na fakt, iż zastosowanie będącej przedmiotem pracy części opioidowej hybrydy w formie mieszaniny substancji bądź jako związek wieloskładnikowy może nie udoskonalać takiej terapii w kwestii potencjalnych efektów ubocznych. Dopiero sprzężenie elementu opioidowego ze składową neurotensyny, dając związek biwalentny, spowodowało istotną poprawę tej właściwości (Ryc. 5).



Ryc. 5. Wpływ podopieczynówkowego (nardeniowego) podania hybrydy peptydowej opioid-neurotensyna (0,02 nmol/szczur) i mieszaniny jej składowych farmakoforów (0,02 nmol/szczur każdy) na aktywność lokomotoryczną zwierząt, mierzoną w teście Rotarod. Two-way ANOVA wraz z testem Bonferroniego wykazał różnice statystycznie istotne ($p < 0,001$) pomiędzy badaną hybrydą a użytą kombinacją [H3].

Podobne korzyści wynikające z zastosowania hybrydy peptydowej zaobserwowałam w przypadku wyników eksperymentów opisanych w pracach H4: Kowalczyk A, Kleczkowska P[☐], Rękawek M, Kulik K, Lesniak A, Erdei A, Borics A, Martin C, Pawlik K, Lipkowski AW, Benyhe S, Makulska-Nowak H, Ballet S, Bujalska-Zadrozny M. Biological evaluation and molecular docking studies of AA3052, a compound containing a μ -selective opioid peptide agonist DALDA and *D*-Phe-Phe-*D*-Phe-Leu-Leu-NH₂,

a substance P analogue. *Eur. J. Pharmacol. Sci.* 2016, 93: 11-20 oraz H5: Kowalczyk A, Kleczkowska P[☒], Konop M, Kasarello K, Czuwara J, Sosnowski P, Sacharczuk M, Cudnoch-Jedrzejewska A, Rudnicka L, Bujalska-Zadrozny M. Determination of the anti-inflammatory properties and analgesic activity of the AA3052 chimeric peptide against CFA-induced inflammatory pain. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2018, 36: 219-240.

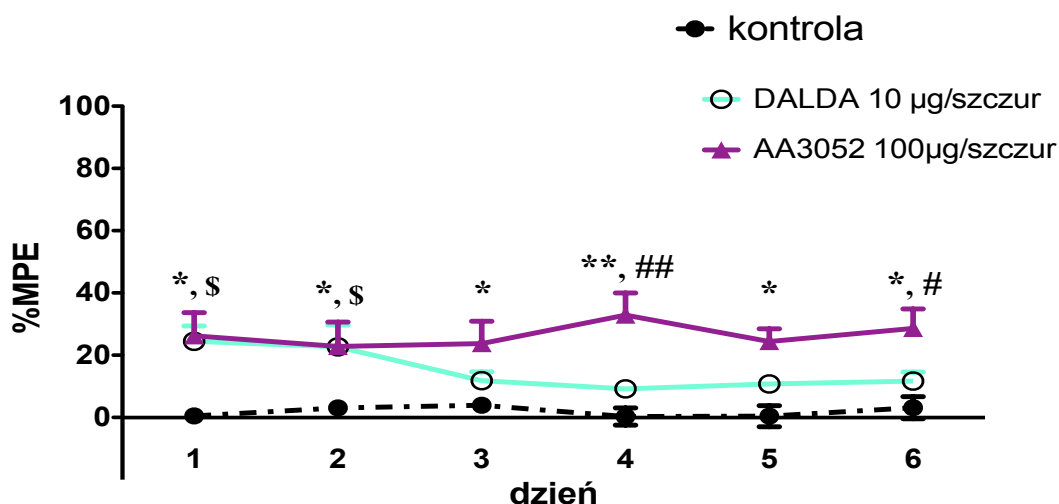
W pracach tych do badań wykorzystano związek stanowiący połączenie opioidu z farmakoforem strukturalnie odpowiadającym receptorowi neurokininowemu-1 (NK-1).

Podczas, gdy wybór opioidu jako elementu budulcowego hybrydy jest oczywisty i wynika z niekwestionowanej efektywności opioidów w kontekście ograniczania powstawania i percepcji impulsu bólowego [56-58], dobór liganda o budowie opartej o sekwencję aminokwasową substancji P (SP) również nie stanowi zaskoczenia. Faktem jest bowiem, iż SP włącznie z receptorami tachykininowymi (zwłaszcza receptorem neurokininowym-1, NK-1) odgrywają znaczącą rolę w modulacji, przewodzeniu i odbiorze sygnału bólowego [59-61 oraz praca H1]. Co więcej, co zostało opisane w pracy przeglądowej H1: Kleczkowska P, Nowicka K, Bujalska-Zadrozny M, Hermans E. Neurokinin 1 receptor-based bivalent drugs in pain management - the journey to nowhere? *Pharmacol. Ther.* 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.11.007, uzasadnieniem tworzenia takich struktur bifunkcyjnych jest udokumentowana kolokalizacja receptorów opioidowych i NK-1 w strukturach nerwowych biorących udział w transmisji nocyceptywnej. Przykładowo wysokie dawki SP skutkują pojawieniem się hiperalgezji, a także zachowań typu drapanie i gryzienie, którym mogą zapobiegać agoniści opioidowi. Wiadomo również, że opioidy hamują uwalnianie SP zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Z kolei zwiększone uwalnianie SP w rdzeniu kręgowym obserwowane po podaniu naloksonu, antagonisty receptora opioidowego, koreluje z nasileniem bólu w drugim etapie testu formalinowego. Z tego też względu struktury zawierające w swoim składzie tak farmakofor opioidowy, jak i farmakofor o aktywności wewnętrznej wskazującej bądź na agonistyczne, bądź antagonistyczne interakcje z receptorem NK-1, są od lat 80-tych przedmiotem intensywnych badań [62-65]. Jednak z racji zdecydowanie korzystniejszych efektów w aspekcie ograniczania bólu, indukowanych zastosowaniem środka blokującego receptor NK-1, prace nad skutecznym lekiem przeciwbólowym o budowie hybrydowej do niedawna skupiały się na cząsteczkach z farmakoforem antagonisty receptora NK-1 [66-68].

Przedmiotem pracy zawartej w publikacji H4 i H5 była również chimera, której składowe wykazywały aktywność agonisty opioidowego (DALDA, H-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-

NH₂) [69] oraz antagonisty receptora NK-1 (zmodyfikowany fragment SP₇₋₁₁ w oparciu o sekwencję opublikowaną przez Lipkowskiego i Misterek [70]).

Jak przedstawiono w pracy **H4**, sprzężenie wiązaniem amidowym obu fragmentów w jedną cząsteczkę spowodowało otrzymanie związku (AA3052), który charakteryzowała nieco odmienna aktywność względem omawianych receptorów aniżeli wynikało to w chwili, gdy rozpatrywane były one teoretycznie jako oddzielne elementy. Niemniej, analizowana hybryda okazała się wykazywać działanie antynocyceptywne u zwierząt doświadczalnych po podaniu ośrodkowym (dokomorowym, i.c.v.), aczkolwiek słabsze w porównaniu z jej aktywnym farmakoforem opioidowym, tj. DALDA. Co istotne, ów efekt nie wynikał z aktywacji układu opioidergicznego, co z kolei stanowiło zaprzeczenie badań dynamiki molekularnej. Jednak ten zastanawiający brak zaangażowania fragmentu opioidowego spowodował w konsekwencji, iż wielodniowa aplikacja szczurom chimery AA3052 nie skutkowała rozwojem tolerancji (Ryc. 6).



Ryc. 6. Wpływ wielodniowego dokomorowego (i.c.v.) podawania hybrydy AA3052 vs. jej farmakoforu opioidowego (DALDA) na efekt przeciwbólowy w odpowiedzi na zastosowany bodziec mechaniczny w teście Randall-Selitto. Odpowiedzi przeciwbólne rejestrowano codziennie, 30 min po podaniu badanych związków. Analiza dwuczynnikowa two-way ANOVA wraz z testem post-hoc Newman-Keuls wykazały różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$, $p < 0,01$ oraz $p < 0,001$) między DALDA a hybrydą AA3052 (#), DALDA a kontrolą (\$) oraz AA3052 a kontrolą (*) w tym samym punkcie czasowym. Kontrolę stanowiły zwierzęta, którym podawano H₂O (i.c.v.) [**H4**].

Podobnie zdecydowanie większą skuteczność jak również potencjalnie lepsze korzyści wynikające z zastosowania hybrydy AA3052 w porównaniu z jej składowym elementem DALDA, zostały wykazane w pracy **H5: Kowalczyk A, Kleczkowska P[✉], Konop M, Kasarello K, Czuwara J, Sosnowski P, Sacharczuk M, Cudnoch-Jedrzejska A, Rudnicka L, Bujalska-Zadrozny M. Determination of the anti-inflammatory properties and analgesic activity of the AA3052 chimeric peptide against CFA-induced inflammatory pain. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2018, 36: 219-240.** Tu jednak przedmiotem badań był rodzaj bólu o znacznie bardziej złożonym patomechanizmie aniżeli wspomniany wyżej ból ostry. Dodatkowo podjęto próby określenia aktywności przeciwzapalnej chimery. Wprawdzie uzyskane wyniki jasno wskazują, iż zarówno sama hybryda, jak i jej główny element strukturalny (DALDA) stanowią silne immunomodulatory, to jednak AA3052 okazała się nie indukować tak poważnych zmian histopatologicznych w tkance objętej stanem zapalnym, jak zaobserwowano to w przypadku peptydu DALDA. Ponadto działanie antynocyceptywne cząsteczki AA3052 w odpowiedzi na zastosowany bodziec mechaniczny, jak również termiczny w omawianym zwierzęcym modelu bólu zapalnego okazało się być silniejsze w porównaniu z efektem przeciwbólowym indukowanym w modelu bólu ostrego (praca **H4**). Co ważne, wynik ten jest potwierdzeniem istotnej roli SP w stanach bólowych o charakterze przewlekłym, zwłaszcza w bólu związanym ze stanem zapalnym lub uszkodzeniami nerwów, tj. w warunkach, w których receptor NK-1 ulega nadmiernej ekspresji [61]. Stąd wydaje się, iż chimera AA3052 mogłaby stanowić obiecujące narzędzie farmakologiczne w klinice, mimo iż – jak obszernie zaprezentowano w pracy **H1: Kleczkowska P, Nowicka K, Bujalska-Zadrozny M, Hermans E. Neurokinin 1 receptor-based bivalent drugs in pain management - the journey to nowhere? *Pharmacol. Ther.* 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.11.007** – ligandy receptora neurokininy w badaniach na ludziach systematycznie wykazywały brak skuteczności, zmniejszając ogólne zainteresowanie tą klasą leków; owa nieefektywność obserwowana jest jednak przede wszystkim w badaniach dotyczących ostrych stanów bólowych.

Uzyskane i opisane w pracach **H4** i **H5** wyniki badań pozwalają stwierdzić co następuje: i) badania z zastosowaniem techniki modelowania molekularnego, w tym dokowania, nie stanowią w tym przypadku wiarygodnej metody, na której należy opierać dalsze “być albo nie być” nowo zaprojektowanego związku chemicznego; ii) technika hybrydyzacji nie do końca pozwala przewidzieć aktywność biologiczną nowo-skonstruowanego związku mimo doskonałej znajomości profilu fragmentów (farmakoforów) go tworzących. To z kolei

stanowi silne potwierdzenie wcześniejszej informacji o istnieniu zupełnie nowej aktywności związków o charakterze hybrydowym.

Wielofunkcyjność oznacza możliwość zastosowania czegoś w różnych aspektach życia bądź nauki. Również w przypadku chimer nie sprowadza się to jedynie do interakcji nowo-otrzymanego związku z właściwymi dla swojej struktury celami molekularnymi. Jest to także wykazywanie wielokierunkowego działania, a tym samym aktywności i efektu [19, 71], który swobodnie można nazwać efektem plejotropowym; aczkolwiek termin ten według niektórych źródeł jest wciąż ściśle zarezerwowany dla genów [72, 73].

Związki wielofunkcyjne, popularne chimery, hybrydy, czy związki biwalentne, mogą istotnie okazać się skutecznymi narzędziami w walce z szeregiem licznych schorzeń czy chorób. Dotyczy to nie tylko możliwości zadziałania takiego liganda u źródła i ostatecznie zahamowania efektu końcowego, czego doskonałym przykładem jest zaproponowana przez Quadro w 1991 roku [74] cykliczna struktura hybrydowa paracetamol-aspiryna, która okazała się niwelować zarówno stan zapalny, jak i jego skutki (w tym obrzęk i ból). Odnosi się to również do potencjalnego zastosowania takiego związku w terapii chorób, dla których pierwotnie nie był on przeznaczony.

Stąd, mając na uwadze powyższe, celem prac **H6: Kleczkowska P[☒], Kawalec M, Bujalska-Zadrozny M, Filip M, Zablocka B, Lipkowski AW. Effects of the hybridization of opioid and neurotensin pharmacophores on cell survival in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurotox. Res.* 2015, 28: 352-360 oraz H7: Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M, Kleczkowska P, Lipkowski AW. Role of neurotensin and opioid receptors in the cardiorespiratory effects of [Ile9]PK20, a novel antinociceptive chimeric peptide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014, 63: 8-13** było zaprezentowanie wielokierunkowego działania związków hybrydowych o udowodnionej uprzednio aktywności przeciwbólowej [21].

Przedstawiona przeze mnie w 2010 r. nowa hybryda peptydowa opioid-neurotensyna (PK20, H-Dmt-D-Lys-Phe-Phe-Lys-Lys-Pro-Phe-Tle-Leu-OH) [21] okazała się być doskonałym potencjalnym kandydatem do walki z bólem ostrym. Jej zdolność redukowania bólu indukowanego bodźcem termicznym była obserwowana już w dawkach 0,02 nmol/szczur i – mając na uwadze siłę działania analgetycznego – dorównywała aktywności morfiny podanej w dawce kilkudziesięciokrotnie wyższej (3 nmol/szczura o masie ciała 220 g). Ponadto, mimo braku badań dotyczących możliwych działań niepożądanych wynikających z przewlekłej terapii związkiem PK20, wykazałam, że chimera

jest aktywna obwodowo. To z kolei stanowi kolejne potwierdzenie wspomnianego tu wielokrotnie fenomenu posiadania przez tak skonstruowane związki nowej aktywności biologicznej i ulepszonych właściwości farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych.

Istotnie, informacje jakoby neurotensyna (NT) nie wykazywała zdolności przechodzenia przez barierę krew-mózg BBB [75, 76] oraz fakt, iż endomorfina-2, której zmodyfikowana sekwencja aminokwasowa odgrywająca w tym przypadku rolę farmakofora opioidowego, nie posiada w pełni rozwiniętej możliwości przejścia przez BBB [77], skłaniały do przypuszczeń, że również połączenie tych cząsteczek w jedną całość będzie skutkowało brakiem powyższej właściwości.

Podobnie analizując mechanizm działania neurotensyny w kontekście udziału w rozwoju chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, można wyraźnie zauważyć przewagę roli uznanej wcześniej jako “niekorzystna”.

Wiadomo, iż u podstaw wielu chorób neurodegeneracyjnych (np. niedokrwienny udar mózgu, stwardnienie rozsiane, choroba Parkinsona, stan padaczkowy), leży proces ekscytotoksyczności często indukowany aktywacją receptora *N*-metylo-*D*-asparaginowego, NMDA [78-81]. Z kolei zarówno neurotensyna, jak i jej receptor NTS1 biorą udział w modulacji układu glutaminergicznego, co w rezultacie przekłada się na zwiększoną aktywność receptora NMDA [82, 83]. Inaczej rysuje się sytuacja w przypadku opioidów, co do neuroprotektoryjnego działania których nie ma wątpliwości. Faktycznie literatura przedmiotu donosi, iż aktywacja receptorów opioidowych, zwłaszcza receptora delta i kappa opioidowego, powoduje zahamowanie wyrzutu naturalnego liganda receptora NMDA - glutaminianu [84-86]. Jednak mimo powyższych informacji dotyczących roli opioidów, potraktowanie hybrydy PK20 jako potencjalnego skutecznego związku mogącego wykazywać aktywność redukującą bądź hamującą neurotoksyczność kwasu *N*-metylo-*D*-asparaginowego (NMDA), wydawałaby się znikoma. Potwierdzeniem tego przypuszczenia, obok niekorzystnego charakteru neurotensyny, jest przede wszystkim fakt, że omawiana cząsteczka stanowi całkowitego agonistę receptora mu-opioidowego z niewielką tendencją do aktywowania receptorów delta i kappa [87].

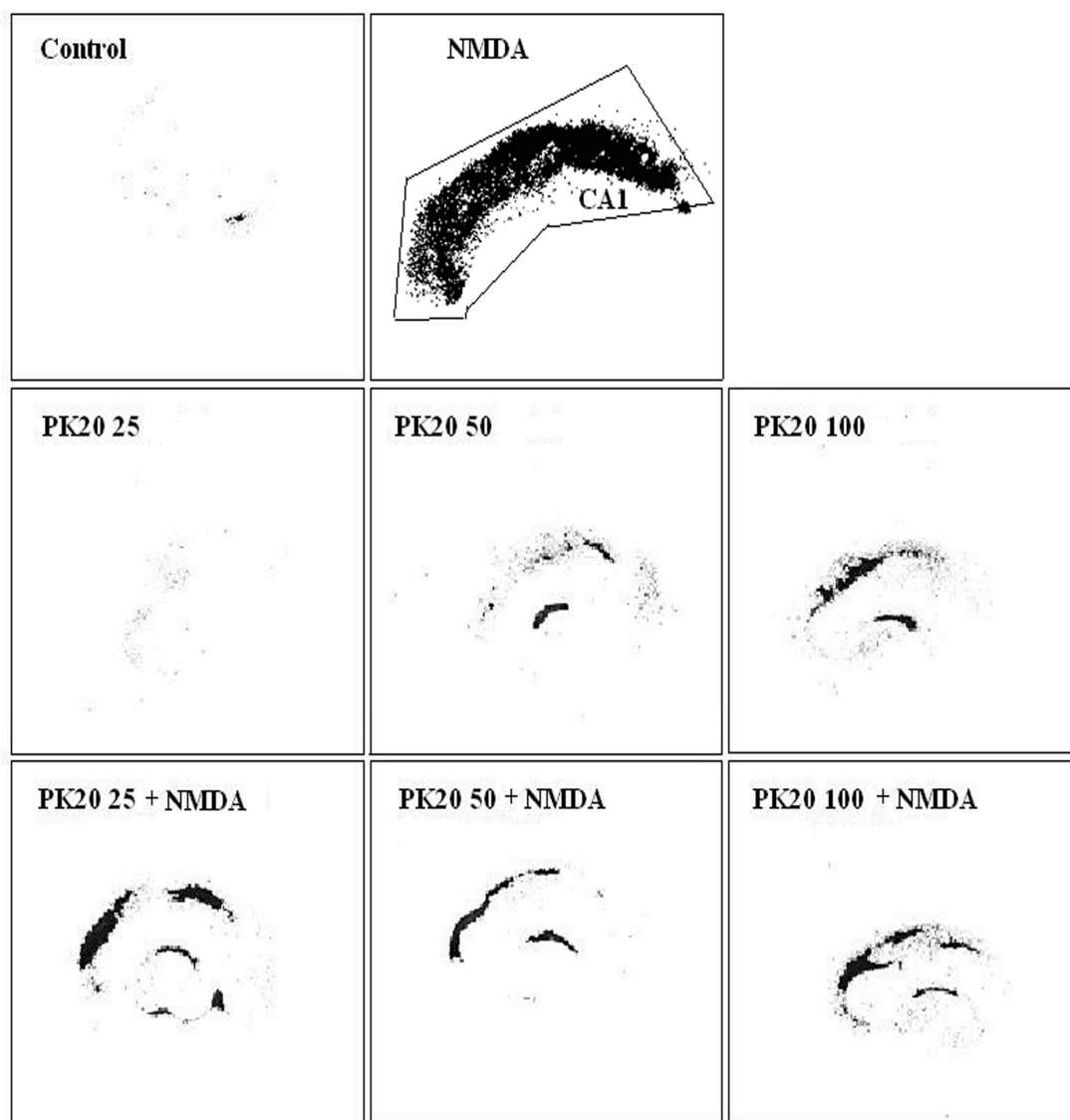
Tymczasem na podstawie otrzymanych wyników opisanych w pracy **H6: Kleczkowska P[☒], Kawalec M, Bujalska-Zadrozny M, Filip M, Zablocka B, Lipkowski AW. Effects of the hybridization of opioid and neurotensin pharmacophores on cell survival in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurotox. Res.* 2015, 28: 352-360**, stanowiącej jednocześnie rezultat badań prowadzonych w ramach grantu NCN, którego byłam inicjatorem i kierownikiem, można stwierdzić, iż podjęta decyzja co do próby określenia skuteczności

hybrydy PK20 w aspekcie ograniczenia ekscytotoksyczności indukowanej NMDA, okazała się być słuszną.

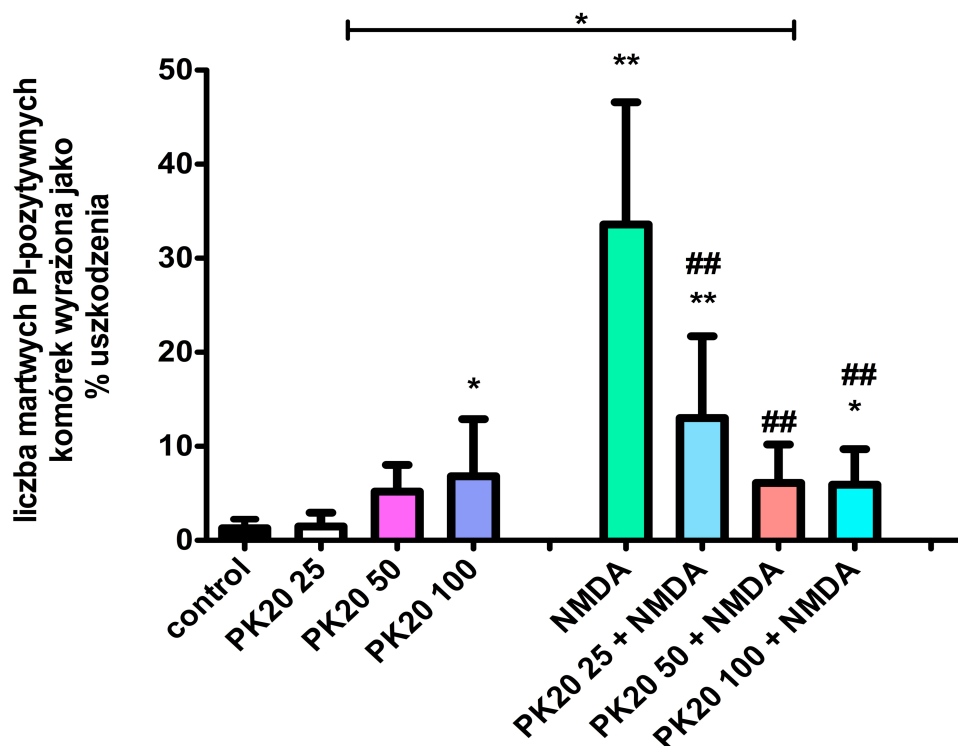
Dzięki przeprowadzeniu badania aktywności neuroprotekcyjnej hybrydy peptydowej opioid-neurotensyna (PK20) w szczurzym modelu ekscytotoksycznego uszkodzenia hipokampa w hodowli organotypowej stwierdziłam, iż wykazuje ona wysoki potencjał hamujący działanie NMDA we wszystkich badanych dawkach, tj. 25, 50 i 100 ng/ml (Ryc. 7 i Ryc. 8).

Aplikacja chimery w dawce 25 ng/ml nie skutkowała wystąpieniem jakiegokolwiek różnicy w stopniu uszkodzenia skrawków hipokampa w porównaniu z grupą kontrolną, o czym świadczył niewielki procent komórek PI-pozytywnych (oceny uszkodzenia dokonywano przez obserwację w mikroskopie po uprzednim dodaniu jodku propidyny PI, który trwale barwił martwe komórki), wynoszący $1,47\% \pm 1,2$.

Wprawdzie wyższe dawki PK20 zastosowane w badaniu okazały się tylko nieznacznie zwiększać uszkodzenie regionu CA1 hipokampa (w przypadku dawki 50 ng/ml PK20 procent komórek PI-pozytywnych osiągnął wartość równą $5,18\% \pm 2,84$, z kolei dla dawki 100 ng/ml liczba martwych komórek PI-pozytywnych to $6,82\% \pm 6,08$), to stopień degradacji komórek hipokampa przez PK20 był znacznie niższy niż ten wywołany podaniem 1 mM NMDA ($33,6\%$) i nieznacznie różnił się od wartości kontrolnej ($1,28\% \pm 0,99$). Z kolei jednoczesne naniesienie na skrawki NMDA wraz z określonym stężeniem badanej hybrydy pociągnęło za sobą istotny statystycznie spadek liczby komórek martwych stale barwiących się jodkiem propidyny w porównaniu z liczbą komórek PI-pozytywnych uzyskanych działaniem samego NMDA.



Ryc. 7. Neuroprotekcjne działanie hybrydy peptydowej PK20 w trzech badanych dawkach 25, 50 i 100 ng/ml w obecności i bez udziału *N*-metylo-*D*-asparaginianu (NMDA) [H6].



Ryc. 8. Statystyczne zestawienie uzyskanych wyników, mając na uwadze liczbę martwych PI-pozytywnych komórek $\pm$ SD z 6-22 skrawków hipokampa analizowanych dla poszczególnych warunków doświadczalnych. Różnice w wartościach, mierzone jednoczynnikowym testem ANOVA wraz z testem Bonferroniego, uznano za istotne statystycznie dla $*p < 0,05$ i $**p < 0,0001$ vs. kontrola oraz $##p < 0,0001$ vs. NMDA. Ponadto, test t-Studenta wykazał istotnie statystyczną różnicę ($*p < 0,01$) pomiędzy PK20-50 a PK20-50 + NMDA [H6].

Dodatkowo stwierdziłam, iż efekt neuroprotekcyny wywołany podaniem hybrydy PK20 wynika z jednoczesnej aktywacji zarówno układu opioidowego, jak i neurotensynowego. Świadczy o tym fakt, iż blokowanie części neurotensynowej przy pozostawieniu w dalszym ciągu aktywnego farmakofora opioidowego (i odwrotnie) nie skutkowało pojawieniem się efektu podobnego do tego, który obserwowany był w przypadku zastosowania NMDA. To z kolei wskazuje na istnienie silnego synergizmu pomiędzy dwoma farmakoforami badanej hybrydy.

Nie bez znaczenia jest również fakt, że – jak jasno wskazują wyniki uzyskanych badań – dualistyczne działanie neurotensyny jest wysoce zależne od wykorzystanego modelu uszkodzenia hipokampa. Działanie neurotensyny indukujące uszkodzenie komórek

hipokampa jest zauważalne w przypadku zastosowania modelu ischemii (ograniczenie dopływu tlenu/glukozy), podczas, gdy w modelu nadmiernego synaptycznego uwalniania glutaminianu (ekscytotoksyczność indukowana NMDA) neurotensyna wykazuje dawko-zależne działanie neuroprotektoryjne. Stąd, publikacja **H6** stanowi jedyną jak dotąd pracę naukową świadczącą o złożonym charakterze neurotensyny w aspekcie działania neuroprotektoryjnego.

Korzystne działanie hybrydy PK20 zostało również odnotowane w zwierzęcym modelu wrażliwości na kontakt z alergenem (ang. *contact allergen sensitivity*); publikacja nr **5** (załącznik nr 4): **Kaczyńska K, Kogut E, Zając D, Jampolska M, Andrzejewski K, Sulejczak D, Lipkowski AW, Kleczkowska P. Neurotensin-based hybrid peptide's anti-inflammatory activity in murine model of a contact sensitivity response. *Eur. J. Pharmacol. Sci.* 2016, 93: 84-89** (publikacja ta nie stanowi części cyklu rozprawy habilitacyjnej). Podobnie jak w przypadku aktywności neuroprotektoryjnej, także i w tym przypadku wynik okazał się być zakaskujący, gdyż nie korelował z danymi literaturowymi. Większość z tych danych jasno przedstawia neurotensynę jako silnego immunomodulatora oddziałującego na leukocyty czy makrofagi i powodującego uwalnianie cytokin oraz zjawisko chemotaksji [88, 89]. Tymczasem chemiczne sprzężenie analogu neurotensyny z farmakoforem opioidowym spowodowało, iż tak zaprojektowana cząsteczka została pozbawiona niekorzystnych właściwości modulujących istniejący stan zapalny indukowany 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenem (DFNB). Co więcej, efekt terapeutyczny hybrydy PK20 obserwowano po jej lokalnym naniesieniu na uszy zwierząt doświadczalnych, w postaci mieszaniny z hydrofilowym kremem. Efekt ten porównywano z uchem traktowanym jedynie kremem, i obejmował on: 1) redukcję opuchlizny ucha; 2) obniżenie poziomu infiltracji komórek zapalnych widocznych w preparatach histopatologicznych tkanek ucha; 3) redukcję liczby cytokin pro-zapalnych (IL-1 α , IL-1 β , KC, MCP-1 oraz TNF- α) mierzoną z wykorzystaniem homogenatów tkanek ucha, jak również 4) spadek średniej wartości stężenia produktów peroksydacji lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Charakter uzyskanych wyników sugeruje, iż rozpatrywany tu związek biwalentny – PK20 może stanowić doskonałe narzędzie również w innych zaburzeniach związanych z procesem zapalnym (np. zapalenie jelit, zapalenie stawów, itp.).

W przeciwieństwie do wyżej wspomnianych prac, publikacja **H7: Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M, Kleczkowska P, Lipkowski AW. Role of neurotensin and opioid receptors in the cardiorespiratory effects of [Ile9]PK20, a novel antinociceptive chimeric peptide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014, 63: 8-13**

podobnie jak publikacja nr 4 (załącznik nr 4): **Kaczyńska K, Wojciechowski P, Jampolska M, Lipkowski AW, Kleczkowska P. Cardiovascular and respiratory activity of PK20, opioid and neurotensin hybrid peptide in anesthetized and awake rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2017, 797: 20-25** przedstawiają omawiany typ hybrydy (połączenie typu opioid-neurotensyna) za nieskuteczny u szczurów. Wykorzystane w tym przypadku chimery peptydowe – odpowiednio [Ile⁹]PK20 oraz jej prototyp PK20 – okazały się indukować istotnie znamienne spadki ciśnienia krwi u badanych zwierząt po podaniu dożylnym. To z kolei świadczy o tym, iż – mimo znacznej redukcji niektórych opioidowych efektów niepożądanych przez przedstawiony typ chimery peptydowej wykazanych np. w pracy **H3** – pewne działania (w tym hipotensja; praca **H7**) wynikające jedynie z aktywności farmakofora neurotensynowego zostały zachowane.

Podsumowanie

Potencjał nowych związków hybrydowych, opisany w każdej z przedstawionych prac, pozwala nieco inaczej niż dotychczas spojrzeć na związki wielofunkcyjne. Jak można zauważyć, ich wielozadaniowość zdecydowanie wychodzi poza ustalone granice. Uzyskane wyniki wskazują bowiem na fakt, iż sprzężenie chemiczne dwóch elementów o aktywności przeciwbólowej nie będzie skutkowało jedynie powstaniem silnego analgetyku, doskonale łagodzącego stan bólu, zachowując przy tym wymagany profil bezpieczeństwa. Warto w tym momencie zwrócić uwagę, że z racji interakcji z właściwymi dla siebie receptorami, które są zlokalizowane nie tylko w strukturach mózgu biorących udział w modulacji i percepcji sygnału bólowego, ale także w rejonach odgrywających olbrzymią rolę w innych, często bardzo skomplikowanych jednostkach chorobowych, takie związki mogą wykazywać dodatkową aktywność biologiczną. Można wręcz stwierdzić, że pod względem eksponowanej aktywności hybrydy przypominają ośmiornicę, której każde z 6 „ramion” (dwa pozostałe stanowią „nogi”) może nadawać nowe funkcje a – tym samym – i możliwości. Takie cechy są nam – ludziom – znane. Wystarczy wspomnieć Giambattiste della Porta, który intelektualnie stanowił wspomnianego głowonoga. Był dramaturgiem, kryptografem, filozofem, wykazującym również zainteresowanie meteorologią czy też ogrodnictwem.

Wśród substancji hybrydowych o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu na próżno jednak szukać informacji opisującej efektywność takiej cząsteczki w różnych stanach patologicznych organizmu. Istotnie, związki hybrydowe o potencjale analgetycznym są badane jedynie w bólu oraz w różnych jego rodzajach (np. ból ostry, neuropatyczny,

nowotworowy, itp.). Nie są natomiast badane w odmiennych niż ból schorzeniach. Dodatkowo mimo, iż w aspekcie działania przeciwbólowego zdecydowana liczba badań odnosi się do chimer o budowie agonisty receptora opioidowego i antagonisty receptora neurokininowego NK-1, to w świetle ostatnich doniesień tego typu struktury mogą okazać się ostatecznie nieskuteczne u ludzi.

Ryzyko nieskuteczności hybryd stanowiących połączenie liganda opioidowego i neurokininowego oraz próba odpowiedzi na pytanie „*czy jest sens tworzenia takich cząsteczek?*” stanowią temat pracy przeglądowej **H1: Kleczkowska P, Nowicka K, Bujalska-Zadrozny M, Hermans E. Neurokinin 1 receptor-based bivalent drugs in pain management - the journey to nowhere? *Pharmacol. Ther.* 2018, doi.10.1016/j.pharmthera.2018.11.007.**

Stwierdzono, że ligandy wykazujące antagonizm względem receptora NK-1, umiejętnie hamujące ból u zwierząt doświadczalnych, zaprezentowały się jako zupełnie nieaktywne u ludzi [90-93]. To z kolei – w dalszej perspektywie – może świadczyć o braku uzyskania pożądanego efektu nawet w przypadku zastosowania takiej cząsteczki w formie struktury biwalentnej. Ponadto sama idea łączenia elementów posiadających charakter agonisty tak receptora opioidowego i neurokininowego-1 wydaje się być pozbawiona większego sensu. Nieczęsto bowiem w wyniku takiego sprzężenia udaje się uzyskać hybrydę, której aplikacja nie skutkowałaby amplifikacją odczuwanego bólu. Jednak, mając świadomość nowej aktywności biologicznej tak skonstruowanych cząsteczek, szanse biwalentnych ligandów receptora opioidowego i neurokininowego-1 w kontekście terapii ludzi mogą jawić się równie optymistycznie.

Przeciwnie do wyżej wspomnianych wydaje się, iż zarówno neurotensyna, jak i jej analogi stanowiące chemiczne połączenie z innym farmakoforem, mogą dawać bardziej przewidywalne efekty również u ludzi.

Potwierdzeniem tego stwierdzenia jest fakt, iż zastosowanie syntetycznej neurotensyny bądź jej analogów u *homo sapiens* determinowało zdecydowanie mniej zaskakujące rezultaty aniżeli te, obserwowane dla antagonistów receptora NK-1. Ściślej rzecz ujmując, charakter efektu wywołanego podaniem zwierzętom agonisty bądź antagonisty NTR nie odbiegał znacząco od efektu odnotowanego u ludzi. Przykładem jest udział neurotensyny w rozwoju wielu typów nowotworu. Istotnie, zwiększony poziom ekspresji receptora neurotensynowego NTS1, który jest ściśle związany ze złym rokowaniem u pacjentów z rakiem piersi, płaskonabłonkowym rakiem szyi i głowy, czy z niedrobnokomórkowym nowotworem płuc [94-96] został również opisany w badaniach prowadzonych na zwierzętach doświadczalnych

[97, 98]. Podobnie, agoniści receptora NTS1 okazali się być skutecznymi analgetykami w warunkach przedklinicznych oraz klinicznych [98-100].

Powyższe doniesienia pozwalają stwierdzić, iż obawa użycia związków hybrydowych opioid-neurotensyna, które charakteryzuje pożądana aktywność biologiczna w warunkach *in vivo*, może być bezzasadna i podobnych rezultatów należy spodziewać się również u gatunku ludzkiego.

Wracając do wspomnianego fenomenu wielofunkcyjności i wielocelowości, jest to właściwość wysoce wymagana wśród substancji mogących w przyszłości mieć zastosowanie w leczeniu klinicznym. Pożądanie takiego terapeutyku jest tym większe, im krótsza jest lista możliwych działań ubocznych wynikających z jego aplikacji.

Przedstawione w pracy hybrydy PK20 i jej analog strukturalny [Ile⁹]PK20 są typowym przykładem nietuzinkowych chimer wykazujących, zależną od istniejącej choroby, aktywność biologiczną. Ten charakter „doskonałego transformera“ zobrazowany został poprzez wykazane właściwości przeciwbólowe, a nawet neuroprotektoryjne. Jednak, jak wykazano w pracy H7: **Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M, Kleczkowska P, Lipkowski AW. Role of neurotensin and opioid receptors in the cardiorespiratory effects of [Ile⁹]PK20, a novel antinociceptive chimeric peptide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014, 63: 8-13**, zastosowanie tej konkretnej cząsteczki w przypadku osób uskarżających się na choroby układu naczyniowo-sercowego, może wpływać niekorzystnie na przebieg choroby poprzez wywołanie znacznego niedociśnienia. Taka informacja, mimo iż negatywna, pozwala jednocześnie stworzyć profil skuteczności takiego liganda, nie ograniczając się jedynie do jego korzystnego działania. Wszakże równie ważne są dane dotyczące nie tylko efektów ubocznych wynikających ze stosowania danej substancji, ale również dotyczące jednostki chorobowej, w której obecność „leku” nie jest zalecana, a niekiedy jest wręcz zakazana.

Z kolei rozpatrując działanie hybrydy PK20 w kontekście ograniczenia ekscytotoksyczności indukowanej działaniem NMDA, uzyskane wyniki zmuszają nas do podjęcia działań w kierunku określenia wpływu związku na inne procesy, w których NMDA odgrywa ważną rolę.

Powszechnie wiadomo, iż spadek poziomu NMDA sprzyja powstaniu schizofrenii [101, 102]. Podczas, gdy antagonizm receptora NMDA (np. poprzez zastosowanie memantyny) daje pożądaną efekt w leczeniu otępienia w przebiegu choroby Alzheimera [103]. Wiadomości te sugerują, że ordynacja związku PK20 może indukować powstanie objawów psychotycznych na drodze hamowania aktywności receptora *N*-metylo-*D*-asparaginowego. Jednak doniesienia literaturowe wskazują, że efekt powstający w wyniku interakcji liganda z

receptorem NMDA jest wysoce zależny zarówno od jego podjednostki, jak i jego lokalizacji. Wykazano bowiem, iż synaptyczne NMDAR mają charakter neuroprotektoryjny, podczas gdy nadmierna aktywacja tych receptorów – występujących jednak poza synapsą – powoduje utratę potencjału błonowego mitochondriów i śmierć komórki [104]. Dlatego też określenie mechanizmu działania badanej hybrydy peptydowej opioid-neurotensyna jest niezwykle istotne także z punktu widzenia innych jednostek chorobowych, w których dany związek może okazać się skutecznym.

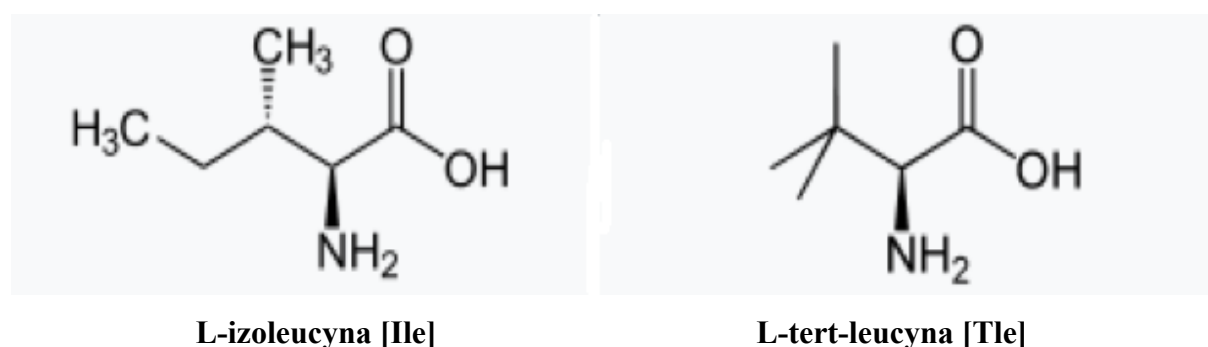
Mając na uwadze z kolei implikacje jakoby układ dopaminergiczny odgrywał istotne znaczenie w powstaniu i rozwoju szeregu zaburzeń neuropatologicznych czy chorób psychicznych, jak np. choroba Parkinsona i schizofrenia, oraz znajomość charakteru oddziaływań mających miejsce między neurotensyną a limbicznym układem dopaminergicznym [105, 106], wielce prawdopodobne jest to, że związki o strukturze opartej na sekwencji aminokwasowej tego endogenego peptydu (NT) mogą być niezwykle ważne zarówno w etiologii, jak i patogenezie wspomnianych chorób.

Stąd wyniki dotyczące właściwości biologicznych struktur łączących w sobie opioid i neurotensynę mogą stanowić doskonałe prelude do szerszego zakresu badań skupiających się na tym konkretnym typie sprzężenia. Wydaje się to o tyle ważne, iż jak dotąd wspomniane tu PK20 i [Ile⁹]PK20 są jedynymi na świecie związkami hybrydowymi opioid-neurotensyna, którym poświęcono uwagę.

Jednocześnie rezultaty uzyskane w przypadku chimery AA3052 (praca H4: **Kowalczyk A, Kleczkowska P[☒], Rękawek M, Kulik K, Lesniak A, Erdei A, Borics A, Martin C, Pawlik K, Lipkowski AW, Benyhe S, Makulska-Nowak H, Ballet S, Bujalska-Zadrozny M. Biological evaluation and molecular docking studies of AA3052, a compound containing a μ -selective opioid peptide agonist DALDA and D-Phe-Phe-D-Phe-Leu-Leu-NH₂, a substance P analogue. *Eur. J. Pharmacol. Sci.* 2016, 93: 11-20 oraz H5: **Kowalczyk A, Kleczkowska P[☒], Konop M, Kasarello K, Czuwara J, Sosnowski P, Sacharczuk M, Cudnoch-Jedrzejska A, Rudnicka L, Bujalska-Zadrozny M. Determination of the anti-inflammatory properties and analgesic activity of the AA3052 chimeric peptide against CFA-induced inflammatory pain. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2018, 36: 219-240)** wskazują, iż nie należy poddawać dyskredytacji żadnej cząsteczki biwalentnej, zwłaszcza kiedy te w warunkach *ex vivo* okazują się nie oddziaływać z przypuszczalnie właściwymi dla siebie celami molekularnymi. Z racji struktury, która niejednokrotnie nie posiada stabilnej energetycznie konformacji, charakter „transformera” nabiera realnych**

kształtów. Takie związki mogą wywoływać pożądany efekt poprzez interakcje z zupełnie innymi receptorami, dopasowując się do odpowiedniego ich miejsca wiązania.

Omawiane zachowanie zostało również zauważone w przypadku hybrydy [Ile⁹]PK20 (praca H3: Kleczkowska P[✉], Hermans E, Kosson P, Kowalczyk A, Lesniak A, Pawlik K, Bojnik E, Benyhe S, Nowicka B, Bujalska-Zadrozny M, Misicka A, Lipkowski AW. **Antinociceptive effect induced by a combination of opioid and neurotensin moieties vs. their hybrid peptide [Ile⁹]PK20 in an acute pain treatment in rodents. *Brain Res.* 2016, 1648: 172-180**), w przypadku której blokowanie receptorów opioidowych nie spowodowało się do redukcji efektu antynocyceptywnego (Ryc. 4), sugerując tym samym zaangażowanie odmiennego układu. Wydawałoby się to przewidywalne gdyby nie fakt, iż jedyną cechą odróżniającą ten peptyd od związku macierzystego PK20 jest zamiana tert-leucyny z hydrofobowym, nieelastycznym tert-butylovym łańcuchem bocznym na jej izomer – izoleucynę (w [Ile⁹]PK20) (Ryc. 9). Prawdopodobnie owo wydłużenie łańcucha bocznego reszty aminokwasowej izoleucyny spowodowało istotny wpływ na konformację cząsteczki, a dalej na „włączenie do działania” innego typu receptora bądź układów receptorowych, odpowiadających strukturą swojej kieszeni wiążącej na strukturę molekuly.



Ryc. 9. Porównanie budowy izoleucyny z tert-leucyną.

Mając na uwadze powyższe, zarówno wyniki pracy H3, H4, jak i pracy H6 w sposób jasny świadczą o konieczności rozważenia – w aspekcie aktywności biologicznej i interakcji z celem molekularnym – nie tylko całej badanej cząsteczki i charakteru jej składowych farmakoforów. Niezwykle ważne staje się również rozpatrywanie możliwych interakcji analizując cząsteczkę fragmentarycznie, element (tu reszta aminokwasowa) po elemencie. Ponadto określenie mechanizmu działania związków o budowie opartej na technice

hybrydyzacji jest krytyczne dla zrozumienia ich oddziaływania na inne jednostki chorobowe. Niewykluczone jest, iż te nowe struktury cechuje nie jeden a kilka mechanizmów działania zależnie od rozpatrywanej choroby. Możliwe jest nawet, że obserwowany efekt wynika z uruchomienia kompleksu mechanizmów.

Wnioski

W przedstawionych pracach stanowiących cykl habilitacyjny wykazałam, że:

1. Peptydowe struktury hybrydowe o zróżnicowanej budowie farmakoforów składowych cieszą się obecnie wśród naukowców ogromnym zainteresowaniem. Może mieć to przełożenie na wzrost świadomości społecznej co do korzyści płynących ze stosowania potencjalnych leków w postaci jednostkowej (chimer) w porównaniu z popularną politerapią. Ma to olbrzymie znaczenie zwłaszcza w sytuacji znacznej liczby efektów niekorzystnych występujących podczas stosowania tej ostatniej (prace **H1** i **H2**).
2. Związki hybrydowe wykazują wielofunkcyjność, która nie wynika jedynie z aktywacji odrębnych układów receptorowych w celu osiągnięcia tego samego efektu (np. przeciwbólowego), ale jest związana ze zdolnością takich cząsteczek do bycia aktywnymi w leczeniu innych niż pierwotnie zakładane, zupełnie odmiennych jednostek chorobowych, u podłoża których leżą odmienna etiologia oraz mechanizmy. Stanowi to potwierdzenie stwierdzenia, iż chimery stanowią całkowite zaprzeczenie paradygmatu “jeden lek – jeden cel – jedna choroba” (prace **H1**, **H3-H7**).
3. Zastosowanie techniki hybrydyzacji skutkuje zrównoważeniem niepożądanych efektów ubocznych pochodzących od poszczególnych składowych molekuły. Umożliwia to osiągnięcie celu terapeutycznego przy znacznym zminimalizowaniu niekorzystnych efektów ubocznych (prace **H1**, **H3** i **H4**).
4. Aplikacja dwóch aktywnych biologicznie fragmentów w formie jednej cząsteczki (hybryda) korzystnie wpływa na parametry farmakokinetyczne związku, co w konsekwencji umożliwia jego dotarcie do właściwego miejsca działania i jednoczesnego uruchomienia obydwu układów receptorowych, dla których strukturalnie jest on dopasowany. Poprawia to znacznie rokowania terapeutyczne (prace **H1** i **H3**).

Dotychczas twierdzenie zawarte w punkcie 3 i 4 nie było poparte żadnymi wynikami badań - publikacja **H3** jest pierwszym tego dowodem.

5. Znajomość aktywności biologicznej oraz właściwości pojedynczych składowych chimery, a tym samym możliwego efektu przez nie indukowanego, jak również prognozowanie w/wsp. na podstawie badań dynamiki molekularnej, nie przekłada się ostatecznie na charakter i aktywność tych składowych, rozpatrywanych w formie jednostkowej (tj. hybrydy). Dane te wskazują na ciągłą konieczność prowadzenia badań przed- i klinicznych (nawet w wypadku negatywnego wyniku badań prognostycznych) oraz dalszego doskonalenia technik prognozowania (praca **H4**).
6. Brak interakcji związku hybrydowego z celami molekularnymi (receptorami), dla których pierwotnie struktura ta została zaprojektowana, nie jest tożsamy z brakiem możliwości osiągnięcia pożądanego efektu, który może zostać zrealizowany na drodze uruchomienia innej ścieżki sygnałowej przez hybrydę (praca **H4**).
7. Struktury biwalentne (chimery, hybrydy) powinny być zaprojektowane z wielką rozważą i precyzją, mając na uwadze zwłaszcza możliwe interakcje między różnymi elementami budulcowymi. Ocena tego typu potencjalnych oddziaływań ma fundamentalne znaczenie dla końcowego efektu farmakologicznego oraz właściwości fizykochemicznych hybrydy (praca **H1 i H4**).
8. Zastosowanie związków o budowie hybrydowej nie jest pozbawione ryzyka wystąpienia działań niepożądanych i może okazać się nieskuteczne w terapii wielu chorób. To z kolei skłania do stwierdzenia, iż - wbrew panującemu przeświadczeniu – związki wielofunkcyjne nie stanowią przysłowiowego panaceum (praca **H1, H4, H5 i H7**).

Dysponując jednak niezaprzeczalnymi dowodami co do przewagi hybryd nad politerapią w szerokim aspekcie ich stosowania i właściwości, nie należy zaprzestać prac nad tego typu potencjalnymi substancjami leczniczymi.

Spis literatury:

- [1] Stefanacci RG, Khan T. Can managed care manage polypharmacy? *Clin. Geriatr. Med.* 2017, 33: 241-255
- [2] Merel SE, Paauw DS. Common Drug side effects and drug-drug interactions in elderly adults in primary care. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2017; 65: 1578-1585
- [3] Woroń J. Niekorzystne interakcje lek.w w farmakoterapii geriatrycznej. *Terapia* 2009; 1: 10-16
- [4] Hill-Taylor B, Sketris I, Hayden J, Byrne S, O’Sullivan D, Christie R. Application of the STOPP/START criteria: a systemic review of the prevelance of potentially inappropriate prescribing in older adults, and evidence of clinical, humanistic and economic impact. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2013, 38: 36-372
- [5] Gómez Aguirre N, Caudevilla Martínez A, Bellostas Muñoz L, Crespo Avellana M, Velilla Marco J, Díez-Manglano J. Polypathology, polypharmacy, medication regimen complexity and drug therapy appropriateness. *Rev. Clin. Esp.* 2017, doi 10.1016/j.rce.2016.12.013
- [6] Spandel L, Joško-Ochojska J, Batko-Szwaczka A. Polypharmacy as a risk factor of neuropsychological disorders in elderly patients. *Farmakoter. Psychiatr Neurol.* 2015, 31: 251-260
- [7] Blanco-Reina E, Rosa García-Merino M, Ocaña-Riola R, Aguilar-Cano L, Valdellós J, Bellido-Estévez I, Ariza-Zafra G. Assessing potentially inappropriate prescribing in community-dwelling older patients using the updated version of STOPP-START criteria: a comparison of profiles and prevalences with respect to the original version. *PLoS One* 2016, e0167586
- [8] Hill-Taylor B, Walsh KA, Stewart S, Hayden J, Byrne S, Sketris IS. Effectiveness of the STOPP/START (Screening Tool of Older Persons' potentially inappropriate Prescriptions/Screening Tool to Alert doctors to the Right Treatment) criteria: systematic review and meta-analysis of randomized controlled studies. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2016; 41: 158-169
- [9] Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nature Rev. Drug Discov.* 2005, 4: 71-78
- [10] Haynes RB, McDonald HP, Garg AX. Helping patients follow prescribed treatment. Clinical applications. *JAMA* 2002; 288: 2880-2883

- [11] Kleczkowska P, Lipkowski AW, Tourwé D, Ballet S. Hybrid opioid/non-opioid ligands in pain research. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19: 7435-7450
- [12] Adessi C, Soto C. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr. Med. Chem.* 2002; 9: 963-978
- [13] Werle M, Bernkop-Schnurch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids* 2006; 30: 351-367
- [14] Jorgensen WL. Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. *Science* 1991; 254: 954-955
- [15] Boström J, Norrby PO, Liljefors T. Conformational energy penalties of protein-bound ligands. *J. Comput-Aided Mol. Des.* 1998; 12: 383-396
- [16] Dziedic-Letka A, Ożyhar A. Intrinsically disordered proteins. *Post. Biochem.* 2012; 58: 100-109
- [17] Decker M. Hybrid molecules incorporating natural products: applications in cancer therapy, neurodegenerative disorders and beyond. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18: 1464-1485
- [18] Fuji H. Twin and triple drugs in opioid research. *Top Curr. Chem.* 2011; 299: 239-275
- [19] Morphy R, Rankovic Z. Fragments, network biology and designing multiple ligands. *Drug Discov. Today* 2007; 12: 156-160
- [20] Morphy R, Rankovic Z. Designed multiple ligands: an emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.* 2005; 48: 6523-6543
- [21] Kleczkowska P, Kosson P, Ballet S, et al. PK20, a new opioid-neurotensin hybrid peptide that exhibits central and peripheral antinociceptive effects. *Mol. Pain* 2010; 6: 86
- [22] Lipkowski AW, Misicka A, Carr DB, Rosinska G, Kosson D, Maszczyńska Boney I. Neuropeptide mimetics for pain management. *Pure Appl. Chem.* 2004; 76: 941-950
- [23] Largent-Milnes TM, Yamamoto T, Nair P, et al. Spinal or systemic TY005, a peptidic opioid agonist/neurokinin 1 antagonist, attenuates pain with reduced tolerance. *Br. J. Pharmacol.* 2010; 161: 986-1001
- [24] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 710-720
- [25] Zaiou M, Galla RL. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J. Mol. Med. (Berl)* 2002; 80: 549-561
- [26] Froehlich JC. Opioid peptides. *Alcoh. Health Res. World* 1997; 21: 132-136
- [27] Chavkin C, Goldstein A. Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure-activity relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1981; 78: 6543-6547

- [28] Sewald N, Jakubke H-D. Peptides: Chemistry and Biology, 2nd Edition. Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2009.
- [29] Seeger TF, Seymour PA, Schmidt AW, et al. Ziprasidone (CP-88,059): a new antipsychotic with combined dopamine and serotonin receptor antagonist activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 275: 101-113
- [30] Shina SC, Chow K, Bhat SS, et al. Antibiotic conjugates with nonsteroidal antiinflammatory drugs. World Patent 2014/138343, 12 wrzesień, 2014
- [31] Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Price Lecture 2005. *Br. J. Pharmacol.* 2006; 148: 245-254
- [32] Kirwan JR. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 142-146.
- [33] Greaves MW. Anti-inflammatory action of corticosteroids. *Postgrad. Med. J.* 1976; 5: 631-633
- [34] Scudeletti M, Lanza L, Monaco E, et al. Immune regulatory properties of corticosteroids: prednisone induces apoptosis of human T lymphocytes following the CD3 down-regulation. *Ann. NY Acad. Sci.* 1999; 876: 164-179
- [35] Skubitz KM, Craddock PR, Hammerschmidt DE, et al. Corticosteroids block binding of chemotactic peptide to its receptor on granulocytes and cause disaggregation of granulocyte aggregates in vitro. *J. Clin. Invest.* 1981; 68: 13-20
- [36] Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, et al. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 2002; 8: 473-479
- [37] Libby P, Maroko PR, Bloor CM, et al. Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. *J. Clin. Invest.* 1973; 52: 599-607
- [38] Spath JA Jr, Lane DL, Lefer AM. Protective action of methylprednisolone on the myocardium during experimental myocardial ischemia in the cat. *Circ. Res.* 1974; 35: 44-51
- [39] Loscalzo J. Nitric oxide and vascular disease. *N. Eng. J. Med.* 1995; 333: 251-253
- [40] Schaffer L, Kruse T. Derivatized hybrid peptides of aylin and salmon calcitonin. World Patent 2009/156473, 30 Grudzień, 2009
- [41] Levy OE, Hanley MR, Jodka CM, et al. GIP analog and hybrid polypeptides with selectable properties. World Patent 2006/086769, 17 Sierpień, 2006

- [42] DeHaven-Hudkins, D.L., L.C. Burgos, J.A Cassel, et al. Loperamide (ADL 2-1294), an opioid antihyperalgesic agent with peripheral selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 289: 494-502
- [43] Lewis AB, Ferry DA, Sadeghi M. Fetal cardiovascular and breathing movement responses to endogenous opiates. *Biol. Neonate* 1986; 50: 278-287
- [44] Pattison KTS. Opioids and the control of respiration. *Br. J. Anaesth.* 2008; 100: 747-758
- [45] Porreca F, Ossipov MH. Nausea and vomiting side effects with opioid analgesics during treatment of chronic pain: mechanisms, implications, and management options. *Pain Med.* 2009; 10: 654-662
- [46] Webster LR, Camilleri M, Finn A. Opioid-induced constipation: rationale for the role of norbuprenorphine in buprenorphine-treated individuals. *Subst. Abuse Rehab.* 2016; 7: 81-86
- [47] Benyamin R, Trescot AM, Datta S, et al. Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 2008; 11: S105-120
- [48] Harned M, Sloan P. Safety concerns with long-term opioid use. *Expert Opin. Drug Saf.* 2016; 15: 955-962
- [49] <http://biotechnologia.pl/farmacja/artykuly/leki-opioidowe-w-terapii-bolu-przewleklego-wiecej-szkody-niz-korzysci,15022>
- [50] Clineschmidt BV, McGuffin JC, Bunting PB. Neurotensin: antinociceptive action in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 1979; 54: 129-139
- [51] Dobner PR. Neurotensin and pain modulation. *Peptides* 2006; 27: 2405-2414
- [52] Al-Rodhan NR, Richelson E, Gilbert JA, et al. Structure-antinociceptive activity of neurotensin and some novel analogues in the periaqueductal gray region of the brain stem. *Brain Res.* 1991; 557: 227-235
- [53] Kamei J, Ohsawa M, Saitoh A, et al. Modification of μ -opioid agonist-induced locomotor activity and development of morphine dependence in diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 274: 700-706
- [54] Kitanaka N, Kitanaka J, Takemura M. Modification of morphine-induced hyperlocomotion and antinociception in mice by clorgyline, a monoamine oxidase-A inhibitor. *Neurochem. Res.* 2006; 31: 829-837
- [55] Lu Z, Xu J, Rossi GC, et al. Mediation of opioid analgesia by a truncated 6-transmembrane GPCR. *J. Clin. Invest.* 2015; 125: 2626-2630
- [56] Russo MA, Santarelli DM. Effectiveness and tolerability of tapentadol sustained release in the Australian setting. *J. Opioid Manag.* 2016; 12: 187-196
- [57] van Niel JC, Schneider J, Tzschentke TM. Efficacy of full μ -opioid receptor agonists

is not impaired by concomitant buprenorphine or mixed opioid agonists/antagonists - preclinical and clinical evidence. *Drug Res. (Stuttg)* 2016; 66: 562-570

[58] Wiffen PJ, Wee B, Derry S, et al. Opioids for cancer pain - an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 7: CD012592.

[59] Henry JL. Substance P and pain: an updating. *Trends Neurosci.* 1980; 3: 95-97

[60] Khasabov SG, Wang JC, Simone DA, et al. A role for neurokinin-1 receptor neurons in the rostral ventromedial medulla in the development of chronic postthoracotomy pain. *Pain* 2017; 158: 1332-1341

[61] Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids* 2014; 46: 1727-1750

[62] Lei SZ, Lipkowski AW, Wilcox GL. Opioid and neurokinin activities of substance P fragments and their analogs. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 193: 209-215

[63] Lipkowski AW, Osipiak B, Gumulka WS. An approach to the self-regulatory mechanism of substance P actions: II. Biological activity of new synthetic peptide analogs related both to enkephalin and substance P. *Life Sci.* 1983; 33: 141-144

[64] Maszczyńska Bonney I, Foran SE, Marchand JE, et al. Spinal antinociceptive effects of AA501, a novel chimeric peptide with opioid receptor agonist and tachykinin receptor antagonist moieties. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 488: 91-99

[65] Tumati S, Largent-Milnes TM, Keresztes A, et al. Tachykinin NK1 receptor antagonist co-administration attenuates opioid withdrawal-mediated spinal microglia and astrocyte activation. *Eur. J. Pharmacol.* 2012; 684: 64-70

[66] Giri AK, Apostol CR, Wang Y, et al. Discovery of novel multifunctional ligands with μ/δ opioid agonist/neurokinin-1 (NK1) antagonist activities for the treatment of pain. *J. Med. Chem.* 2015; 58: 8573-8583

[67] Guillemyn K, Kleczkowska P, Lesniak A, et al. **Synthesis and biological evaluation of compact, conformationally constrained bifunctional opioid agonist - neurokinin-1 antagonist peptidomimetics.** *Eur. J. Med. Chem.* 2015; 92: 64-77

[68] Starnowska J, Costante R, Guillemyn K, et al. Analgesic properties of opioid/NK1 multitarget ligands with distinct in vitro profiles in naive and chronic constriction injury (CCI)-mice. *ACS Chem. Neurosci.* 2017; 8: 2315-2324

[69] Schiller PW, Nguyen TM, Chung NN, et al. Peripheral antinociceptive effect of an extremely μ -selective polar dermorphin analog (DALDA). *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990; 328: 53-56

- [70] Lipkowski AW, Misterek K. Bifunctional pharmacophores. biological activities of the peptide analog containing both casomorphine-like and substance P antagonist-like active elements. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 1992; 44: 25-32
- [71] Bansal Y, Silakari O. Multifunctional compounds: Smart molecules for multifactorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* 2014; 76: 31-42
- [72] Paaby AB, Rockamn MV. The many faces of pleiotropy. *Trends Genet.* 2013; 29: 66-73
- [73] Remold S. Understanding specialism when the Jack of all trades can be the master of all. *Proc. Biol. Sci.* 2012; 279: 4861-4869
- [74] Quadro G. 3-methyl-3-(4-acetylaminophenoxy)-2,4-dioxabenzocyclohexanone-1 and pharmaceutical composition containing the same. U.S. Patent 5,055,488, 08 Październik, 1991
- [75] Nemeroff CB, Bissette G, Prange AJ, et al. Neurotensin: central nervous system effects of a hypothalamic peptide. *Brain Res.* 1977; 28: 485-496
- [76] Rossi GC, Matulonis JE, Richelson E, Barbut D, Pasternak GW. Systemically and topically active antinociceptive neurotensin compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010; 334: 1075-1079
- [77] Fichna J, Janecka A, Costentin J, do Rego JC. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol. Rev.* 2007; 59: 88-123
- [78] Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988; 1: 623-634
- [79] Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA (red.). Neurochemical aspects of excitotoxicity. Springer, New York 2008, pp. 1-290.
- [80] Hynd MR, Scott HL, Dood PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 2004; 45: 583-595
- [81] Windblad B, Möbius HJ, Stöfler A. Glutamate receptors as a target for Alzheimer's disease--are clinical results supporting the hope? *J. Neurol. Transm. Suppl.* 2002; 62: 217-225
- [82] Antonelli T, Ferraro L, Fuxe K, et al. Neurotensin enhances endogenous extracellular glutamate levels in primary cultures of rat cortical neurons: involvement of neurotensin receptor in NMDA induced excitotoxicity. *Cereb. Cortex* 2004; 14: 466-473
- [83] St-Gelais F, Jomphe C, Trudeau LE. The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J. Psychiatry Neurosci.* 2006; 31: 229-245
- [84] Chen TY, Goyagi T, Tooung TJK, et al. Prolonged opportunity for ischemic neuroprotection with selective κ -Opioid receptor agonist in rats. *Stroke* 2004; 35: 1180-1185
- [85] Pinnock RD. A highly selective kappa-opioid receptor agonist, CI-977, reduces

- excitatory synaptic potentials in the rat locus coeruleus *in vitro*. *Neurosci.* 1992; 47: 87-94
- [86] Zhang J, Haddad GG, Xia Y. δ -, but not μ - and κ -, opioid receptor activation protects neocortical neurons from glutamate-induced excitotoxic injury. *Brain Res.* 2000; 885: 143-153
- [87] Kleczkowska P, Bojnik E, Lesniak A, et al. Identification of Dmt-D-Lys-Phe-Phe-OH as a highly antinociceptive tetrapeptide metabolite of the opioid-neurotensin hybrid peptide PK20. *Pharmacol. Rep.* 2013; 65: 836-846
- [88] Lemaire I. Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages. *J. Immunol.* 1988; 140: 2983-2988
- [89] Miller LA, Cochrane DE, Carraway RE, Feldberg G. Blockade of mast cell histamine secretion in response to neurotensin by SR-48692, a nonpeptide antagonist of the neurotensin brain receptor. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 114: 1466-1470
- [90] Block GA, Rue D, Panebianco D, et al. The substance P receptor antagonist L-754-030 (MK-0869) is ineffective in the treatment of postherpetic neuralgia. *Neurology* 1998; 50: A225
- [91] Goldstein DJ, Wang O. Lanepitant, an NK-1 antagonist, in painful diabetic neuropathy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1999; 65: 119
- [92] Hill R. NK1 (substance P) receptor antagonists-why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol. Sci.* 2000; 21: 244-246
- [93] Herbert MK, Holzer P. Why are substance P (NK1)-receptor antagonists ineffective in pain treatment? *Anaesthetist.* 2002; 51: 308-319
- [94] Alifano M, Souazé F, Dupouy S, et al. Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 4401-4410
- [95] Shimizu S, Tsukada J, Sugimoto T, et al. Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int. J. Cancer* 2008; 123: 1816-1823
- [96] Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, et al. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS ONE* 2009; 4: e4223.
- [97] Allen AE, Carney DN, Moody TW. Neurotensin binds with high affinity to small cell lung cancer cells. *Peptides* 1988; 9: 57-61
- [98] Craig AG, Norberg T, Griffin D, et al. Contulakin G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 13752-13759
- [99] Dore-Savard L, Tetreault P, Roux M, et al. Analgesic effects of neurotensin agonists in a rat bone cancer pain model. *bioRxiv* 089169; doi: <https://doi.org/10.1101/089169>

- [100] Sang CN, Barnabe KJ, Kern SE. Phase IA clinical trial evaluating the tolerability, pharmacokinetics, and analgesic efficacy of an intrathecally administered neurotensin analogue in central neuropathic pain following spinal cord injury. *Clin. Pharmacol. Drug Develop.* 2016; 5: 250-258
- [101] Kristiansen LV, Huerta I, Beneyto M, Meador-Woodruff JH. NMDA receptors and schizophrenia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2007; 7: 48-55
- [102] Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psych. Res.* 1999; 33: 523-533
- [103] Zhang Y, Li P, Feng J., et al. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol. Sci.* 2016; 37: 1039
- [104] Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013; 14: 383-400
- [105] Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, Nemeroff CB. Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 453-486
- [106] Boules M, Fredrickson P, Richelson E. Neurotensin agonists as an alternative to antipsychotics. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2005; 14: 359-369

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Szczegółowe informacje o dorobku naukowym, dydaktycznym, współpracy z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi oraz działalności popularyzującej naukę zawarte są w Załączniku nr 4.

6. Analiza bibliometryczna

		PRACE NIE WŁĄCZONE DO HABILITACJI						PRACE STANOWIĄCE PODSTAWĘ HABILITACJI		
		Przed doktoratem			Po doktoracie					
		liczba	IF	Punkty MNiSW	liczba	IF	Punkty MNiSW	liczba	IF	Punkty MNiSW
Oryginalne pełnotekstowe prace anglojęzyczne		5	13,542	92	8	22,296	235	5	13,702	145
Oryginalne pełnotekstowe prace polskojęzyczne		1	-	3	-	-	-	-	-	
Artykuły przeglądowe	Polsko-języczne	1	-	-	-	-	-	-	-	
	Anglo-języczne	2	5,972	65	2	5,884	50	2	13,75	75
Liczba streszczeń ze zjazdów międzynarodowych	Prezent. ustna	1	-	-	2	-	-	-	-	
	Prezent. w formie plakatu	15	-	-	9	-		4	-	
Liczba streszczeń ze zjazdów krajowych	Prezent. ustna	3	-		-	-		-	-	
	Prezent. w formie plakatu	14	-		6	-		1	-	
Sumaryczny IF			19,514	160		28,18	285		27,452	220
Ogólna liczba publikacji		9			10			7		

Sumaryczny Impact Factor wynosi **75,146** (według Journal Citation Reports JCR, zgodnie z rokiem opublikowania);

KBN/MNiSW = **665**

Liczba cytowani: według Web of Science (Core Collection) = **154**, bez autocytowań = **131**

Wskaźnik H: według Web of Science (Core Collection) – **6**

7. Ogólna charakterystyka działalności naukowej

W roku 1998 rozpoczęłam studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. W trakcie trwania studiów, początkowo inżynierskich a następnie magisterskich, skupiałam się na otrzymywaniu popularnych wówczas olejów strukturyzowanych oraz biopaliw. Doskonała znajomość syntezy tych ostatnich pozwoliła mi w 2005 roku podjąć pracę pod opieką Prof. Andrzeja W. Lipkowskiego w Zakładzie Biotechnologii Instytutu Chemii Przemysłowej im. Prof. I. Mościckiego (IChP) w Warszawie. Umiejętność przeprowadzenia wysokowydajnej reakcji transestryfikacji prowadzącej do uzyskania znacznej ilości estrów metylowych kwasów tłuszczowych, połączyłam wówczas z intensywną nauką metod wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC i kolumnowej. Po 3 miesiącach pracy w IChP rozpoczęłam pracę w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (IMDiK PAN), również pod kierownictwem Prof. Andrzej W. Lipkowski.

Od kwietnia 2005 roku moja praca związana była początkowo głównie z opracowaniem i walidacją metody HPLC pozwalającej na efektowny rozdział kwasów tłuszczowych (KT) i sprzężonego kwasu linolowego (CLA) w produktach mlecznych oraz w izomeryzowanym oleju lnianym. Efekt tej pracy został zaprezentowany w formie komunikatu w ramach V Multidyscyplinarnej Konferencji Nauki o Leku (załącznik nr 4). Jednocześnie, w tym samym okresie zostałam zaangażowana do realizacji dwóch projektów. W pierwszym z nich opracowałam i zwalidowałam metodę pozwalającą na chromatograficzną analizę ilościową sylimaryny z bielma ostropestu plamistego. Wyniki prowadzonych badań zostały zaprezentowane w publikacji oryginalnej, zatytułowanej *“Technological propositions for obtaining preparations from Sylibum marianum for production antioxidant additives for lubricants used in food industry”* (Szczucińska A, Kurzepa K, **Kleczkowska P**, Lipkowski AW. *Oilseed Crops* 2006, XXVII-2: 357-366). Drugi projekt dotyczył analizy jakościowej i ilościowej składników peptydowych zawartych w wytloku, jak i soku wyciśniętego z owoców kaliny czerwonej (*Viburnum opulus*) oraz opisanie substancji aktywnej biologicznie. Tytuł projektu: *„Izolacja i charakterystyka nowego preparatu o aktywności przeciwwirusowej na wirusy herpes, HSV-1”*.

Na rok 2005 przypada również okres, kiedy rozpoczęłam swoją pracę nad syntezą peptydów; miało to miejsce w trakcie trwania zagranicznego stażu naukowego w Vrije Univeriteit Brussel w Belgii. Początkowo praca związana była z syntezą aktywnych analogów angiotensynowych. Możliwości wielokrotnych wyjazdów do wyżej wspomnianej placówki

(w latach 2005-2011) zainicjowały jednak nowe zainteresowania, które w późniejszym okresie okazały się stanowić temat pracy doktorskiej. Mimo trwającego wówczas procesu klarowania się tematyki doktoratu, zostałam zaangażowana w szereg innych projektów (np. związanych z fibronektyną; praca nr **19** w załączniku 4), jak również stałam się aktywnym członkiem naukowej współpracy Polsko-Belgijskiej i Polsko-Węgierskiej, czego efektem są liczne prace (**H4, 8, 10-14, 16-18, 20**). Istotnie, dzięki odbytemu stażowi w Węgierskiej Akademii Nauk zdobyłam wiedzę dotyczącą radiochemicznego znakowania trytem związków chemicznych, które w takiej postaci mogą dalej zostać wykorzystane w badaniach biodostępności, zdolności aktywacji właściwego celu molekularnego, przenikalności bariery krew-mózg czy czasu retencji w organizmie. Dodatkowo dzięki trwającej wówczas współpracy z Prof. Gezą Tóth moje zainteresowania naukowe skoncentrowały się na poszerzeniu wiedzy na temat wpływu różnych związków na układ neurotensynergiczny. Skupiłam się wówczas na scharakteryzowaniu interakcji (w aspekcie wiązania typu receptor-ligand) między receptorem neurotensyny a neuropeptydem pochodzącym od tego samego prekursora co neurotensyna, aczkolwiek wykazującym odmienny efekt farmakologiczny. Współpraca ta zaowocowała opublikowaniem w roku 2016 pracy zatytułowanej „*Synthesis and binding characteristics of [³H]neuromedin N, a NTS2 receptor ligand*” (Tóth F, Mallareddy JR, Tourwé D, Lipkowski AW, Bujalska-Zadrozny M, Benyhe S, Ballet S, Tóth G, **Kleczkowska P**[✉]. *Neuropeptides* 2016, 57: 15-20; załącznik nr 4).

W latach 2009-2014 odbywałam w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk studia doktoranckie pod opieką naukową Prof. Lipkowskiego. Tu głównym nurtem moich zainteresowań stało się tworzenie i badanie cząsteczek wykazujących właściwości antynocyceptywne. Co ważne, związki którymi zajmuję się do dnia dzisiejszego stanowią chimery, tj. połączenia dwóch niezależnie działających elementów (często opartych o strukturę endogennych neuroprzekazników).

Wyniki mojej pracy zostały przedstawione w formie licznych publikacji, jak również komunikatów zjazdowych (załącznik nr 4). Wśród najistotniejszych wyróżnić mogę:

- **Kleczkowska P**, Bojnik E, Leśniak A, Kosson P, Van den Eynde I, Ballet S, Tourwé D, Benyhe S, Lipkowski AW. Identification of Dmt-D-Lys-Phe-Phe-OH as a highly antinociceptive metabolite of the opioid-neurotensin hybrid peptide PK20. *Pharmacol. Rep.* 2013, 65: 835-846

- **Kleczkowska P**, Lipkowski AW. Neurotensin and neurotensin receptors: characteristic, structure-activity relationship and pain modulation - a review. *Eur. J. Pharmacol.* 2013, 716: 54-60
- **Kleczkowska P**, Lipkowski AW, Tourwé D, Ballet S. Hybrid opioid/non-opioid ligands in pain research. *Curr. Pharm. Des.* 2013, 19: 7435-7450
- **Kleczkowska P**, Kosson P, Ballet S, Van den Eynde I, Tsuda Y, Tourwé D, Lipkowski AW. PK20, a new opioid-neurotensin hybrid peptide that exhibits central and peripheral antinociceptive effects. *Mol. Pain* 2010, 6: 86-92

Wart uwagi jest fakt, iż hybrydy peptydowe stanowiące przedmiot mojej pracy doktorskiej były pierwszymi otrzymanymi tego typu związkami w kwestii rodzaju ich elementów składowych. Istotnie, jestem pomysłodawcą struktury aminokwasowej zdecydowanej większości zsyntetyzowanych przeze mnie hybryd peptydowych opioid-neurotensyna (poza niektórymi wyjątkami, jak np. PK20, którą zaprojektował Prof. Dirk Tourwé). Ponadto informacje o efektach wynikających ze stosowania ligandów łączących fragment opioidowy i neurotensynowy przypisane są tylko jednej grupie badawczej, której obecnie jestem przedstawicielem. Wszystkie nazwy tego typu hybryd OP-NT, tj. PK20, [Ile⁹]PK20 czy związki obecnie opracowywane PK7 i PK23, stanowią inicjały mojego imienia i nazwiska.

Co ważne, w okresie tym zainicjowałam również współpracę naukową z Prof. Emmanuelem Hermensem z Université Catholique de Louvain, z którym jest ona kontynuowana do dnia dzisiejszego. Efektem tej współpracy są liczne publikacje, tj. prace **H1**, **H3**, **2** oraz doniesienia zjazdowe (załącznik nr 4).

Mimo, iż moja dotychczasowa działalność naukowa dotyczyła głównie związków hybrydowych, zarówno ich syntezy i analizy chemicznej, jak również określenia aktywności biologicznej, to jednak brałam czynny udział w innych pracach. W trakcie trwania studiów doktoranckich opracowałam oraz zwalidowałam metodę HPLC jakościowego oznaczania znakowanej elementem fluorescencyjnym bifaliny z homogenatu szczurzego mózgu. Uzyskane wyniki stanowiły istotny element opublikowanej w 2013 roku pracy, zatytułowanej: „*Role of the blood-brain barrier in differential response to opioid peptides and morphine in mouse lines divergently bred for high and low swim stress-induced analgesia*” (Kosson A, Krizbai I, Lesniak A, Beresewicz M, Sacharczuk M, Kosson P, Nagyoszi P, Wilhelm I, **Kleczkowska P**, Lipkowski AW. *Acta Neurobiol. Exp.* 2014, 74: 1-7).

W tym samym czasie rozpoczęłam również naukę szeregu zupełnie odmiennych technik, których znajomość wykorzystałam celem późniejszej analizy właściwości biologicznych i fizykochemicznych skonstruowanych struktur biwalentnych. Część nowej wiedzy została nabyta w Środowiskowym Laboratorium Rezonansu Magnetycznego w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Kierownik Prof. Andrzej Ejchart). Obejmowała ona metodę magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), w tym analizę i prawidłowy opis widm (dwuwymiarowe widma COSY i TOCSY jako wynik spinowo-spinowych sprzężeń homojądrowych, HSQC w przypadku spinowo-spinowych sprzężeń heterojądrowych w 2D oraz NOE, NOESY i ROESY jako wynik dipolarnego sprzężenia homojądrowego), które to są skutecznym narzędziem w ustalaniu możliwych konformacji związków chemicznych. Wyniki ówczesnej współpracy zostały przedstawione w formie komunikatu na Międzynarodowym Sympozjum Peptydowym w Helsinkach (**Kleczkowska P**, Ruszczyńska-Bartnik K, Kaczorowska E, Ejchart A, Tourwé D, Kosson P, Lipkowski AW. *Chimeric opioid-neurotensin ligands as new prospective analgesics in chronic pain*. Peptides 2008. Chemistry of Peptides in Life Science Technology and Medicine (Proceeding of the 30th European Peptide Symposium). Edited by: Lankinen H., Vallivirta J., Strandin T., Hepojoki J.; FIPS, Helsinki: 538-539; załącznik nr 4).

Nauka techniki NMR zainicjowana w Zakładzie Prof. Ejcharta pchnęła mnie w kierunku modelowania molekularnego. Teoretyczne podstawy modelowania cząsteczek chemicznych, jak również symulacji ich zachowania się w określonych warunkach nabyłam w trakcie stażu naukowego w Węgierskiej Akademii Nauk. Obecnie, dzięki rozpoczętej współpracy z Dr. hab. n. farm. Dariuszem Pisklakiem (Zakład Chemii Fizycznej WUM), kontynuuję prace umożliwiające odtworzenie bądź przewidywanie/generowanie struktury cząsteczki i jej zachowania (oddziaływań).

Pod koniec okresu trwania studiów doktoranckich rozpoczęłam równocześnie prace w kierunku określenia efektywności związków wielofunkcyjnych w innych niż ból schorzeniach. W roku 2012 byłam pomysłodawcą i inicjatorem projektu grantowego NCN: „*Badanie neuroprotektoryjnego potencjału oraz mechanizmu działania hybryd peptydowych opioid-neurotensyna w modelu ekscytotoksycznego uszkodzenia hipokampa w hodowli organotypowej*”. Projekt ten przewidywał określenie nowej, poza przeciwbólową, aktywności wyselekcjonowanych i zsyntetyzowanych przeze mnie hybryd peptydowych opioid-neurotensyna (hybrydy z rodziny PK, tj. PK20, PK7 oraz [Ile9]PK20). Ponadto wymagał on również opanowania niektórych technik wykorzystywanych w biologii molekularnej, w tym techniki zakładania i utrzymania hodowli tkankowej. Na potrzeby uzyskanego grantu

odbyłam także potwierdzone certyfikatem szkolenie z zakresu obsługi mikroskopu konfokalnego w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych w IMDiK PAN.

Na ostatnie miesiące odbywanych przeze mnie studiów doktoranckich w IMDiK PAN przypada również okres, w którym podjęłam współpracę z Zakładem Fizjologii Oddychania kierowanym obecnie przez Dr hab. n. med. Katarzynę Kaczyńską. Podobnie jak wyżej, także i w tym przypadku praca skupiła się na zbadaniu aktywności i tym samym efektywności hybryd OP-NT w innych niż ból chorobach. W uzyskaniu odpowiedzi na wiele stawianych sobie wówczas pytań pomocnym okazał się uzyskany na lata 2015-2016 grant NCN, zatytułowany: *„Wpływ PK20, chimery peptydowej opioid-neurotensyna na proces zapalny w mysim modelu nadwrażliwości kontaktowej i astmy nieatopowej - porównanie z działaniem neurotensyny i analogiem endomorfiny 2”*. Co ważne, byłam jednym z pomysłodawców i głównych wykonawców wspomnianego projektu.

W marcu 2014 roku obroniłam z wyróżnieniem pracę doktorską, za którą uzyskałam Nagrodę Prezesa Rady Ministrów Rzeczypospolitej Polskiej.

Rok po uzyskaniu stopnia doktora w 2015 roku rozpoczęłam pracę w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Tu w dalszym ciągu kontynuuję badania dotyczące nowych związków hybrydowych. Projektowane obecnie przeze mnie chimery posiadają unikalną budowę, łącząc w sobie jak dotąd niekojarzone elementy. Część pracy prowadzona jest w ramach Studenckiego Koła Naukowego, którego jestem opiekunem (od 2018 roku). Obejmuje ona również współpracę z innymi jednostkami naukowym, dzięki pomocy których możliwa będzie nie tylko znajomość/określenie właściwości przeciwbólowych skonstruowanych i zsyntetyzowanych nowych cząsteczek wielofunkcyjnych, ale także ich aktywności biologicznej w innych stanach chorobowych (np. w zakażeniach bakteryjnych itp.) czy profilu działań niepożądanych.

Synteza i analiza hybryd peptydowych jako nowych potencjalnych substancji leczniczych w aspekcie ich możliwego potencjału przeciwbólowego stanowi(ła) także temat dwóch prac doktorskich, w przypadku których pełniłam bądź dalej pełnię rolę promotora pomocniczego. Co ważne, wyniki jednej ze wspomnianych prac doktorskich, tj. pracy zatytułowanej *„Badanie aktywności nowego peptydowego związku hybrydowego będącego połączeniem DALDA i związku wykazującego powinowactwo do receptora neurokininowego NK-1”* zostały uwzględnione w cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe będące podstawą do sformułowania wniosku o nadanie tytułu doktora habilitowanego (prace **H4** i **H5**).

Wstępna charakterystyka mechanizmu działania zaprojektowanej i zsyntetyzowanej przeze mnie hybrydy peptydowej opioid-neurotensyna (chimera PK23) była również zasadniczym celem prowadzonej przeze mnie pracy magisterskiej Pani Anny Gorzelak, zatytułowanej *„Określenie udziału układu tachykininowego w przeciwbólowym działaniu hybrydy peptydowej o zróżnicowanych farmakoforach składowych”*. Praca ta została wysoko oceniona w konkursie Prac Magisterskich wykonywanych na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzonych badań stwierdzono, iż – obok udziału receptora opioidowego i neurotensynowego – zarówno substancja P (SP), jak i selektywny antagonistą względem receptora neurokininowego-1 (spantide I) odgrywają istotną rolę w indukowanym przez hybrydę PK23 efekcie antynocyceptywnym. Ponadto nardzeniowe podanie badanego związku biwalentnego nieznacznie modyfikuje (nasila) wywołane substancją P zjawiska drapania się i czyszczenia pyszczka u zwierząt doświadczalnych w porównaniu z grupą szczurów traktowanych samą chimerą czy SP. Z kolei zgodnie z danymi literaturowymi wskazującymi, iż za drapanie się odpowiedzialni są agoniści receptora NK-1, ale także tlenek azotu (NO) bądź – uwalniana pod wpływem SP – histamina, ostatnie wyniki sugerują udział wyżej wspomnianych mediatorów w aktywności biologicznej PK23; nie wyklucza się jednak prawdopodobieństwa, iż w rezultacie zastosowania omawianej w pracy hybrydy substancja P (użyta w dawce przeciwbólowej 50 µg/szczur i.t.) uległa konwersji dając ostatecznie efekt właściwy działaniu agonisty receptora NK-1.

Obok tematyki związków hybrydowych moja obecna praca dotyczy również badania istoty uzależnienia, jak również poszukiwania potencjalnych skutecznych leków w terapii uzależnień substancjami psychoaktywnymi. Doskonałym przykładem jest tu projekt grantowy finansowany przez Narodowe Centrum Nauki NCN w ramach konkursu SONATA, którego byłam kierownikiem (okres trwania projektu przypada na lata 2015-2018); tytuł: *„Efekty i potencjalne mechanizmy działania disulfiramu i nepikastatu w uzależnieniu od morfiny u zwierząt doświadczalnych”*; (2014/15/D/NZ7/01821).

W ostatnich latach odkryto, że stosowany w uzależnieniu od etanolu disulfiram (DSF) jest skuteczny w leczeniu uzależnienia od kokainy, za co prawdopodobnie odpowiada blokowanie aktywności β -hydroksylazy dopaminowej (DBH). Związkiem będącym selektywnym inhibitorem DBH jest nepikastat (NEP). Wyniki badań przedklinicznych wskazują, że nepikastat jest także skuteczny w zmniejszaniu objawów zależności kokainowej. Niestety w piśmiennictwie brak danych na temat wpływu DSF oraz nepikastatu na uzależniające działanie opioidów oraz na rozwój tolerancji. Stąd celem prowadzonego

projektu była ocena działania DSF oraz NEP na rozwój zależności fizycznej oraz psychicznej po wielokrotnym podawaniu morfiny, a także na rozwój tolerancji na działanie przeciwbólowe morfiny.

Wprawdzie uzyskane wyniki wydają się obiecujące, gdyż zarówno nepikastat, jak i disulfiram okazały się istotnie zwiększać działanie antynocyceptywne morfiny wraz z osłabieniem i opóźnieniem rozwoju tolerancji przez nią indukowanej. Dodatkowo DSF oraz NEP zmniejszały efekty nagradzające morfiny i wykazywały działanie hamujące w odniesieniu do efektów poszukiwawczych morfiny. Jednak koiniekcja disulfiramu i morfiny skutkowała pojawieniem się szeregu działań niepożądanych, w tym silnej hepatotoksyczności.

Owe pozytywne i negatywne skutki działania mieszaniny obu leków stanowiły temat prowadzonej przeze mnie kolejnej z prac magisterskich, zatytułowanej: *„Disulfiram – potencjalny lek uzupełniający w przeciwbólowej terapii morfinowej”*. Jednocześnie prezentacja wyżej przedstawionych wyników została nagrodzona na Międzynarodowej Konferencji o Lekach „International Conference on Pharmaceutical Drugs” w 2017 roku w Dubaju (załącznik nr 4).

