

Autoreferat

**Receptor H₃ histaminowy jako jeden z punktów uchwytu
ligandów wielocelowych w terapii schorzeń ośrodkowego
i obwodowego układu nerwowego**

Dr Katarzyna Szczepańska



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

Kraków 2024

Spis treści

1	Imię i nazwisko	2
2	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	2
3	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	2
4	Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	3
4.1	Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2	Zestawienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	3
4.3	Opis wkładu własnego w publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	4
4.4	Omówienie celu naukowego przedstawionego osiągnięcia naukowego oraz otrzymanych wyników	6
4.4.1	Wprowadzenie	6
4.4.2	Cel badawczy	12
4.4.3	Omówienie wyników badań	14
4.4.4	Podsumowanie	33
4.4.5	Bibliografia	34
5	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	41
5.1	Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora	41
5.1.1	Podsumowanie dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora ..	44
5.2	Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	45
5.2.1	Podsumowanie dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	49
5.3	Prezentowanie sumarycznego dorobku działalności naukowo-badawczej (2016-2024) (dotyczy wszystkich publikacji)	49
6	Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	49
6.1	Działalność dydaktyczna	49
6.2	Działalność popularyzacyjna	50
6.3	Działalność organizacyjna	50
7	Pozostałe informacje	51
7.1	Udział w projektach badawczych	51
7.1.1	Kierowanie projektami badawczymi	51
7.1.2	Uczestnictwo w projektach badawczych w charakterze wykonawcy	51
7.2	Udział w konferencjach naukowych i sympozjach o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym	52
7.3	Nagrody i wyróżnienia	53

1 Imię i nazwisko

Katarzyna Szczepańska

2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

30.06.2020

Doktor nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Tytuł rozprawy doktorskiej: *The search for novel histamine H₃ receptor ligands in the group of piperazine derivatives*

Promotor: Prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz

Rozprawie doktorskiej przyznano wyróżnienie

25.06.2014

Magister farmacji

Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Tytuł pracy magisterskiej: *Poszukiwanie nowych ligandów receptorów H₃ histaminowych w grupie pochodnych (cyklo)alkilofenonów*

Promotor: Prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz

3 Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2020 – obecnie

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, Zakład Chemii Leków, stanowisko: asystent (08.02.2022 – 06.02.2023 – urlop macierzyński, rodzicielski)

01.01.2021 – obecnie

Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, stanowisko: wykonawca badań statutowych

01.06.2020 – 28.02.2021

Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego
Collegium Medicum, Katedra Chemii Farmaceutycznej,
stanowisko: specjalista

4 Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Receptor H₃ histaminowy jako jeden z punktów uchwytu ligandów wielocelowych w terapii schorzeń ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego

4.2 Zestawienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Przedstawione osiągnięcie naukowe wynikające z art. 219, ust. 1, pkt. 2b ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce stanowi cykl 6 powiązanych tematycznie artykułów naukowych, z których 5 stanowią prace oryginalne, natomiast 1 artykuł jest publikacją przeglądową. Prace te zostały opublikowane w latach 2020–2023. Sumaryczny wskaźnik cytowań (Impact Factor, IF) prac składających się na osiągnięcie naukowe wynosi **31,351**, natomiast łączna liczba punktów MNiSW wynosi **750**. Pozostałe osiągnięcia naukowe zostały omówione w rozdziałach 5.1 oraz 5.2.

Zestawienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Lp.	Dane bibliograficzne publikacji	Punktacja (w roku wydania)	
		IF	MNiSW
H1	Szczepańska K, Kincses A, Vincze K, Szymańska E, Latacz G, Kuder KJ, Stark H, Spengler G, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K. N-Substituted piperazine derivatives as potential multitarget agents acting on histamine H ₃ receptor and cancer resistance proteins. <i>Bioorg Med Chem Lett.</i> 2020 Nov 15;30(22):127522.	2,823	70
H2	Szczepańska K, Kuder KJ, Kieć-Kononowicz K. Dual-targeting Approach on Histamine H ₃ and Sigma-1 Receptor Ligands as Promising Pharmacological Tools in the Treatment of CNS-linked Disorders. <i>Curr Med Chem.</i> 2021 ;28(15):2974-2995.	4,740	100
H3	Szczepańska K, Pockes S, Podlewska S, Höring C, Mika K, Latacz G, Bednarski M, Siwek A, Karcz T, Nagl M, Bresinsky M, Mönnich D, Seibel U, Kuder KJ, Kotańska M, Stark H, Elz S, Kieć-Kononowicz K. Structural modifications in the distal, regulatory region of histamine H ₃ receptor antagonists leading to the identification of a potent anti-obesity agent. <i>Eur J Med Chem.</i> 2021 Mar 5;213:113041.	7,088	140
H4	Szczepańska K†, Podlewska S†, Dichiaro M, Gentile D, Patamia V, Rosier N, Mönnich D, Ruiz Cantero MC, Karcz T, Łażewska D, Siwek A, Pockes S, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H, Rescifina A, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Structural and Molecular Insight into Piperazine and Piperidine Derivatives as	5,000	100

	Histamine H ₃ and Sigma-1 Receptor Antagonists with Promising Antinociceptive Properties. <i>ACS Chem Neurosci.</i> 2022 Jan 5;13(1):1-15.		
H5	Szczepańska K †, Karcz T†, Dichiara M, Mogilski S, Kalinowska-Tłuścik J, Pilarski B, Leniak A, Pietruś W, Podlewska S, Popiołek-Barczyk K, Humphrys LJ, Ruiz-Cantero MC, Reiner-Link D, Leitzbach L, Łażewska D, Pockes S, Górka M, Zmysłowski A, Calmels T, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Dual Piperidine-Based Histamine H ₃ and Sigma-1 Receptor Ligands in the Treatment of Nociceptive and Neuropathic Pain. <i>J Med Chem.</i> 2023 Jul 27;66(14):9658-9683.	7,300	200
H6	Szczepańska K *, Bojarski AJ, Popik P, Malikowska-Racia N. Novel object recognition test as an alternative approach to assessing the pharmacological profile of sigma-1 receptor ligands. <i>Pharmacol Rep.</i> 2023 Oct;75(5):1291-1298.	4,400	140

† – równorzędny wkład; * – autor korespondencyjny

Badania zrealizowane przez habilitantkę, które zostały przedstawione w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego finansowano z następujących źródeł:

- *Pochodne piperazyny jako aktywne ligandy receptorów H₃ histaminowych - modelowanie molekularne, synteza, ewaluacja farmakologiczna* – Narodowe Centrum Nauki: PRELUDIUM nr 2016/23/N/NZ7/00469, wysokość dofinansowania: 141 600 PLN, okres realizacji: 01.09.2017 – 28.02.2021, charakter udziału habilitantki: kierownik projektu [**H1**, **H2**].
- *Dualne ligandy receptorów H₃ histaminowych oraz sigma-1 jako nowe narzędzia farmakologiczne w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego ze szczególnym uwzględnieniem bólu neuropatycznego* – Narodowe Centrum Nauki: SONATINA nr 2020/36/C/NZ7/00284, wysokość dofinansowania: 1 081 987 PLN, okres realizacji: 10.09.2020 – obecnie, charakter udziału habilitantki: kierownik projektu [**H3** – **H6**].

4.3 Opis wkładu własnego w publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

H1. Szczepańska K, Kincses A, Vincze K, Szymańska E, Latacz G, Kuder KJ, Stark H, Spengler G, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K. N-Substituted piperazine derivatives as potential multitarget agents acting on histamine H₃ receptor and cancer resistance proteins. *Bioorg Med Chem Lett.* **2020 Nov 15;30(22):127522.**

Mój wkład w publikację polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz wyselekcjonowaniu związków do przetestowania ich wpływu na aktywność pompy ABCB1, właściwości cytotoksycznych i antyproliferacyjnych z biblioteki ligandów H₃R. Bibliotekę tę zsyntetyzowałam w poprzednich badaniach. Ponadto, przeprowadziłam analizę otrzymanych wyników, przygotowałam tekst publikacji, wstępną wersję manuskryptu, suplement, figurę 1 oraz wybrane odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H2. Szczepańska K, Kuder KJ, Kieć-Kononowicz K. Dual-targeting Approach on Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Ligands as Promising Pharmacological Tools in the Treatment of CNS-linked Disorders. *Curr Med Chem.* 2021;28(15):2974-2995.

Moją rolą w przedstawionej pracy było dokonanie przeglądu literaturowego w zakresie właściwości farmakologicznych ligandów receptorów H₃ histaminowych oraz sigma-1, jak również analiza ich budowy chemicznej. Co więcej, omówiłam potencjalne korzyści terapeutyczne wynikające z jednoczesnego oddziaływania związków na te dwa cele biologiczne. Brałam również udział w przygotowaniu tekstu publikacji, wstępnej wersji manuskryptu (jestem autorką następujących figur: 1, 4, 5, 6, 7, 8) oraz wybranych odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H3. Szczepańska K, Pockes S, Podlewska S, Höring C, Mika K, Latacz G, Bednarski M, Siwek A, Karcz T, Nagl M, Bresinsky M, Mönnich D, Seibel U, Kuder KJ, Kotańska M, Stark H, Elz S, Kieć-Kononowicz K. Structural modifications in the distal, regulatory region of histamine H₃ receptor antagonists leading to the identification of a potent anti-obesity agent. *Eur J Med Chem.* 2021 Mar 5;213:113041.

Mój wkład w publikację polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz dokonaniu analizy zależności struktura-aktywność w grupie 12 ligandów receptorów H₃ histaminowych otrzymanych podczas ostatniego roku studiów doktoranckich, których synteza oraz charakterystyka właściwości farmakologicznych nie były dotąd publikowane, zatem nie zostały one ujęte w cyklu 3 pierwszoautorskich publikacji eksperymentalnych stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej. Ponadto, dla związków omawianych w publikacji **H3** przetestowałam ich powinowactwo do pozostałych podtypów receptorów histaminowych (H₁, H₂, H₄) oraz scharakteryzowałam profil aktywności funkcjonalnej w teście rekrutacji białka mini-G. Badania te przeprowadziłam podczas stażu na Uniwersytecie w Regensburgu. Po złożeniu pracy doktorskiej, asystowałam także w badaniach wpływu testowanych związków na aktywność cytochromu P450 (izofорма 3A4). Dokonałam analizy wszystkich otrzymanych wyników, wyselekcjonowałam strukturę wiodącą do badań *in vivo*, przygotowałam tekst publikacji oraz wstępną wersję manuskryptu, suplement, część figur (abstrakt graficzny, fig. 1, schemat 1), jak również wybrane odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H4. Szczepańska K[‡], Podlewska S[‡], Dichiaro M, Gentile D, Patamia V, Rosier N, Mönnich D, Ruiz Cantero MC, Karcz T, Łażewska D, Siwek A, Pockes S, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H, Rescifina A, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Structural and Molecular Insight into Piperazine and Piperidine Derivatives as Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Antagonists with Promising Antinociceptive Properties. *ACS Chem Neurosci.* 2022 Jan 5;13(1):1-15.

W publikacji **H4** pełniłam rolę koordynatora projektu, brałam udział w opracowaniu koncepcji badań oraz wyselekcjonowałam 20 ligandów H₃R do oznaczenia ich powinowactwa względem

receptorów sigma-1 oraz sigma-2. Związki te zostały przeze mnie zsyntetyzowane w poprzednich badaniach. Dokonałam analizy zależności struktura-aktywność oraz wyselekcjonowałam struktury wiodące do badań *in vitro* oraz *in vivo*. Przygotowałam tekst publikacji, wstępną wersję manuskryptu, suplement, część figur (abstrakt graficzny, fig. 1, fig. 4) oraz wybrane odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H5. Szczepańska K[‡], Karcz T[‡], Dichiara M, Mogilski S, Kalinowska-Tłuścik J, Pilarski B, Leniak A, Pietruś W, Podlewska S, Popiołek-Barczyk K, Humphrys LJ, Ruiz-Cantero MC, Reiner-Link D, Leitzbach L, Łażewska D, Pockes S, Górka M, Zmysłowski A, Calmels T, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Dual Piperidine-Based Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Ligands in the Treatment of Nociceptive and Neuropathic Pain. *J Med Chem.* **2023 Jul 27;66(14):9658-9683.**

W publikacji **H5** pełniłam rolę koordynatora projektu, zaprojektowałam oraz zsyntetyzowałam serię dualnych ligandów receptorów H₃ histaminowych oraz sigma-1, jak również wyjściowych aminoalkoholi testowanych w badaniach miareczkowania potencjometrycznego. Co więcej, asystowałam w badaniach przenikalności związków przez sztuczną błonę biologiczną w teście PAMPA oraz aktywności wewnętrznej w teście akumulacji cyklicznego AMP. Dokonałam analizy zależności struktura-aktywność oraz pozostałych wyników, po czym wyselekcjonowałam struktury wiodące do badań *in vivo*. Przygotowałam tekst publikacji, wstępną wersję manuskryptu, suplement, część figur (abstrakt graficzny, fig. 1, fig. 2, schemat 1, fig. 4, fig. 8) oraz wybrane odpowiedzi na uwagi recenzentów.

H6. Szczepańska K^{*}, Bojarski AJ, Popik P, Malikowska-Racia N. Novel object recognition test as an alternative approach to assessing the pharmacological profile of sigma-1 receptor ligands. *Pharmacol Rep.* **2023 Oct;75(5):1291-1298.**

W publikacji **H6** pełniłam rolę koordynatora projektu oraz brałam udział w opracowywaniu koncepcji badań. Zsyntetyzowałam ewaluowany w pracy związek KSK100, przeanalizowałam otrzymane wyniki, przygotowałam tekst publikacji, wstępną wersję manuskryptu oraz część figur (abstrakt graficzny, fig. 1, fig. 2). Ponadto, prowadziłam korespondencję z edytorem czasopisma *Pharmacological Reports* oraz przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów.

4.4 Omówienie celu naukowego przedstawionego osiągnięcia naukowego oraz otrzymanych wyników

4.4.1 Wprowadzenie

Ligandy wielofunkcyjne, jako alternatywna strategia dla leków selektywnych w terapii schorzeń o złożonej etiopatologii

W ostatnich latach zmieniało się podejście do projektowania leków, które wynika z ciągłego poszerzania się wiedzy na temat molekularnych podstaw funkcjonowania żywych organizmów. Chemia medyczna ze względu na swój interdyscyplinarny charakter podlega dynamicznemu rozwojowi, ale jednocześnie staje przed coraz trudniejszymi wyzwaniami, wśród których wymienić można poszukiwanie leków na choroby o złożonej etiologii oraz konieczność zapewnienia bezpieczeństwa farmakoterapii.

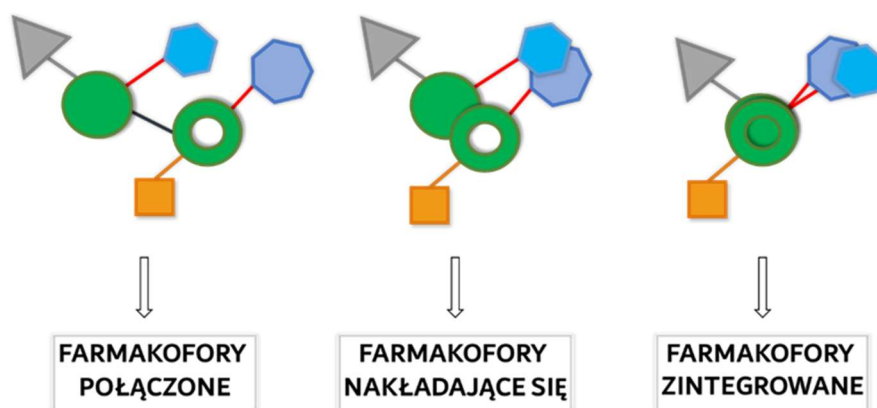
Filozofia „jedna cząsteczka – jeden cel – jedna choroba” była dominującym podejściem w chemii medycznej przez kilka dziesięcioleci aż do końca XX wieku¹. Strategia ta opierała się na identyfikacji i optymalizacji małych cząsteczek zdolnych do selektywnego rozpoznania jednego celu, uważanego za w pełni odpowiedzialny za jedną określoną chorobę. Celem podejścia „jeden lek – jeden cel” (ang. *single-target agent*) było znalezienie związków bioaktywnych obdarzonych ograniczonym ryzykiem działania na inne cele, często odpowiedzialnych za skutki uboczne leków. Tego typu strategia okazała się skuteczna, ale tylko w przypadku chorób o prostej etiologii, gdzie cel biologiczny był wyraźnie określony (receptor, enzym) i dodatkowo, znana była struktura krystaliczna farmakofora². Niestety, często na dalszych etapach badań okazywało się, że racjonalnie zaprojektowany lek lub kandydat na lek, oprócz oddziaływania z głównym celem biologicznym, oddziałuje także z innymi strukturami (ang. *off-targets*)³. Wykazano, że często jest to przyczyną działań niepożądanych lub wręcz obserwowanej toksyczności. Co więcej, związki o zdefiniowanym, selektywnym wpływie na jeden z celów biologicznych, mogą uruchomić jednocześnie kilka układów receptorowych lub enzymatycznych⁴. W stanach chorobowych, dodatkowo dochodzi do zaburzenia równowagi oraz sekwencji, w jakiej te procesy następują. W przypadku schorzeń psychiatrycznych, których etiologia jest złożona, regulowana jednocześnie przez kilka układów receptorowych lub enzymatycznych, tworzących niejednokrotnie rozległą siatkę połączeń, strategia selektywności nie sprawdziła się⁵. W konsekwencji, z punktu widzenia skuteczności terapii, usiłuje się oddziaływać na kilka celów biologicznych, poprzez stosowanie polipragmazji lub też przyjmowanie jednej postaci leku, która stanowi preparat złożony z kilku substancji aktywnych⁴.

Chemia medyczna zaproponowała rozwiązanie, stawiając sobie za cel możliwość zaprojektowania związku, który w swojej strukturze zawiera elementy umożliwiające oddziaływanie z kilkoma celami biologicznymi, istotnymi z terapeutycznego punktu widzenia. Taki przypadek określa się mianem „zaprojektowanej nieselektywności” lub „selektywnej nieselektywności” (ang. *designed nonselectivity* lub *selective nonselectivity*). Ponieważ zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego charakteryzują się różnorodnymi dysfunkcjami fizjologicznymi i deregulacją złożonej sieci szlaków sygnałowych, optymalne leki wielokierunkowe powinny jednocześnie i wybiórczo modulować wybrane grupy celów biologicznych⁶. To założenie dało początek polifarmakologii – nowej dziedzinie naukowej skoncentrowanej na odkrywaniu, rozwoju i badaniu farmakologicznym zaprojektowanych ligandów wielofunkcyjnych (ang. *Multitarget-Directed Ligands*, MTDLs), zdolnych do jednoczesnej modyfikacji

aktywności kilku wzajemnie oddziałujących celów farmakologicznych^{7,8}. Choć ich identyfikacja od dawna jest wynikiem przypadku, obecnie zadania chemii medycznej skupiają się na projektowaniu pożądanej polifarmakologii.

Potencjalne korzyści wynikające z opracowania nowych leków opartych o wielocelowy mechanizm działania sprawiają, że podejmuje się coraz więcej prób implementacji tej strategii przy projektowaniu nowych leków. Niemniej jednak stanowi to wyzwanie dla naukowców zajmujących się chemią medyczną, ponieważ proces optymalizacji struktur wiodących wymaga równoczesnej analizy zależności struktura-aktywność wobec kilku celów biologicznych. Ponadto, ważne jest uzyskanie struktur o odpowiednio zbalansowanej aktywności i selektywności. Ligandy wielocelowe natomiast, z racji swojego odmiennego, a zarazem synergistycznego mechanizmu działania mogą prezentować różne aktywności dla poszczególnych punktów uchwytu, której zakres często wyznaczany jest dopiero po wynikach badań przedklinicznych.

Morphy i Rankovic, w pracy dotyczącej pozyskiwania ligandów wielofunkcyjnych, opisują dwie zasadnicze strategie; oparte na wiedzy i wykorzystujące badania przesiewowe⁴. Strategia oparta na wiedzy (ang. *knowledge-based approach* lub *framework combination*), wykorzystuje znajomość aktywności biologicznej określonych związków. Polega na wybraniu dwóch selektywnych ligandów, z których każdy oddziałuje z innym celem biologicznym, a następnie połączeniu ich w jedną cząsteczkę. Niezbędna jest tutaj jednak znajomość farmakoforów obu selektywnych ligandów, gdyż gwarantują aktywność każdego z ligandów wobec określonego celu biologicznego i muszą być obecne w projektowanym ligandzie wielofunkcyjnym⁹. Dzięki temu może wykazywać aktywność podobną do cząsteczek wyjściowych, na bazie których został stworzony. Farmakofory, w cząsteczce liganda wielofunkcyjnego, mogą zostać połączone ze sobą w sposób umożliwiający ich późniejszy rozdział, mogą nakładać się wzajemnie – częściowo lub całkowicie, wskutek ich strukturalnego podobieństwa (**Rysunek 1**). W przypadku ligandów o wyraźnie oddzielonych grupach farmakoforowych, stosowane łączniki mogą być, w warunkach metabolizmu ustrojowego, trwałe lub podlegać procesom metabolicznym prowadzącym do uwolnienia dwóch cząsteczek, mogących działać następnie niezależnie od siebie na odrębne cele biologiczne. Jako trwałe łączniki stosuje się łańcuchy alkilowe lub fragmenty arylowe, które mogą również być elementem odpowiedzialnym za dodatkową lub zwiększoną aktywność całej cząsteczki. Łączniki „degradowalne” najczęściej opierają się na wiązaniu estrowym, które w warunkach ustrojowych jest łatwo hydrolizowane przez obecne w osoczu esterazy^{4,10}. Ligandy, częściowo nakładające się, można traktować jako hybrydy dwóch układów farmakoforowych, natomiast w przypadku ligandów wysoko zintegrowanych, elementy farmakoforów nakładają się na siebie całkowicie. Otrzymanie związków hybrydowych pozwala nie tylko poprawić ich aktywność, ale także korzystnie wpłynąć na parametry farmakokinetyczne, zbliżone do wykazywanych przez stosowane w terapii leki⁴.



Rysunek 1. Strategia łączenia farmakoforów (opracowano na podstawie [9]).

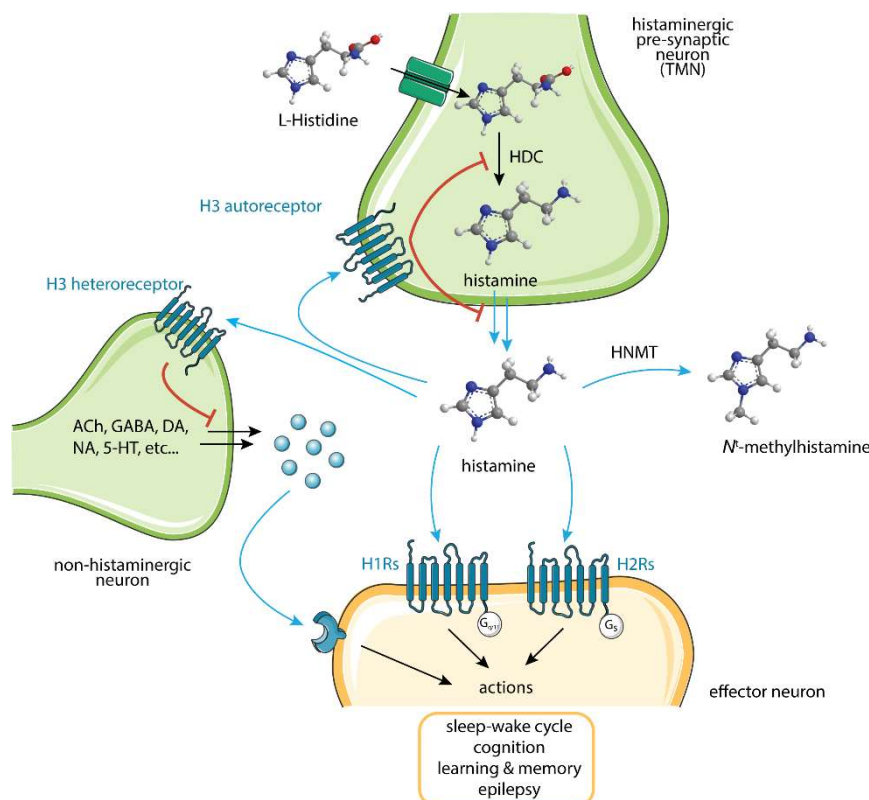
W strategii wykorzystującej badania przesiewowe, biblioteki związków są poddawane testom oceniającym ich aktywność wobec wybranych celów biologicznych, co pozwala na znalezienie odpowiedniego kandydata, cechującego się pożądanym profilem farmakologicznym. Badaniu przesiewowemu można poddać bibliotekę składającą się z dużej liczby bardzo różnorodnych, wcześniej zsyntetyzowanych związków. Poszukiwanie związków aktywnych prowadzi się w oparciu o wysokosprawne badanie przesiewowe (ang. *high-throughput screening*, HTS) wobec wybranych celów biologicznych, po czym związki porządkuje się zgodnie z ich aktywnością⁹.

Receptory H₃ histaminowe – budowa i funkcje biologiczne oraz charakterystyka farmakologiczna ich ligandów

Aktywność biologiczna histaminy jest wynikiem jej oddziaływań z receptorami histaminowymi. Aktualnie znane są cztery typy receptorów histaminowych (H₁, H₂, H₃ i H₄), umiejscowionych w różnych tkankach i występujących z różną gęstością. Receptory histaminowe należą do receptorów błonowych sprzężonych z białkami G (ang. *G-protein-coupled receptors*, GPCRs)¹¹.

Receptory H₃ (H₃R) zidentyfikowano w 1983 roku w ośrodkowym układzie nerwowym, potem ich obecność stwierdzono także w nerwach obwodowych, w sercu, płucach, przewodzie pokarmowym oraz skórze i śródbłonku naczyń¹². Działają one za pośrednictwem białek G_i, powodując obniżenie stężenia cyklicznego adenylozomonofosforanu (cAMP). Receptory H₃ histaminowe pierwotnie zdefiniowane jako presynaptyczne autoreceptory hamujące, modulujące syntezę i uwalnianie histaminy, występują również jako postsynaptyczne heteroreceptory modulujące uwalnianie szeregu neuroprzekaźników i peptydów, takich jak: noradrenalina, acetylocholina, kwas γ -aminomasłowy, serotonina, substancja P¹³ (**Rysunek 2**). Liczne doniesienia literaturowe potwierdzają użyteczność ligandów H₃R w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego, takich jak narkolepsja, demencja, padaczka i otyłość. Mogą mieć także zastosowanie w terapii bólu, bezsenności, migreny i niepokoju^{14,15}.

Od lat w poszukiwaniach aktywnych ligandów tych receptorów zaangażowanych jest wiele ośrodków naukowych oraz firm farmaceutycznych. Intensywne prace syntetyczne doprowadziły do otrzymania dużej liczby zróżnicowanych strukturalnie związków. Część z nich dotarła do badań klinicznych, ale jak na razie tylko pitolisant został wprowadzony na rynek farmaceutyczny jako lek pod



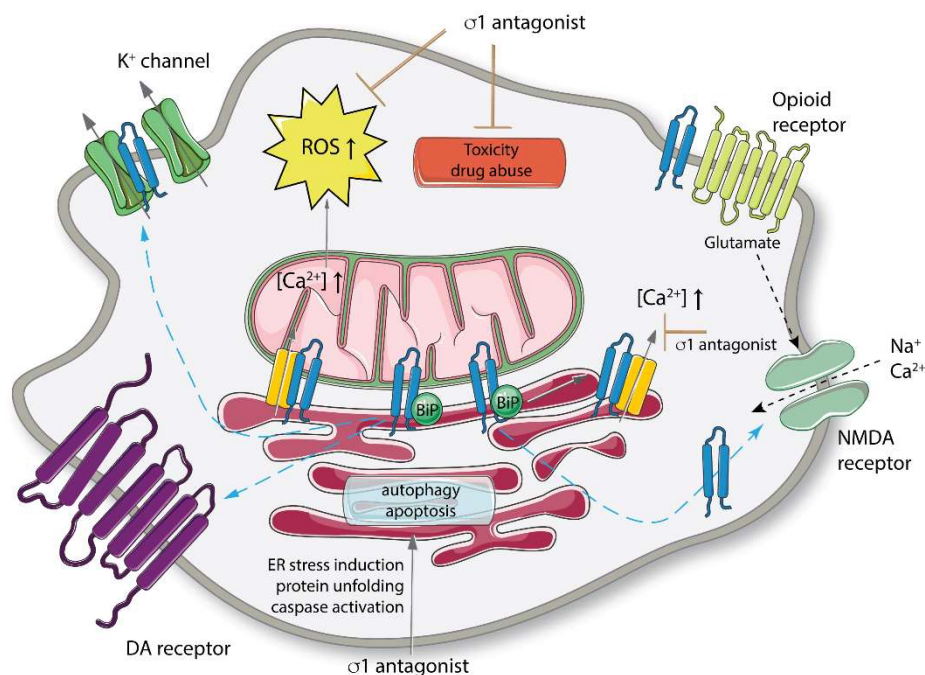
Rysunek 2. Schemat możliwych efektów farmakologicznych antagonistów H₃R (ACh: acetylocholina, GABA: kwas γ -aminomasłowy, DA: dopamina, NA: noradrenalina, 5-HT: serotonina, TMN: jądro guzowo-suteczkowate, HDC: dekarboksylaza histydynowa, HNMT: N-metylotransferaza histaminowa).

nazwą *Wakix* i jest stosowany w terapii narkolepsji z katapleksją lub bez^{16,17}. Trwają badania kliniczne nad możliwością zastosowania pitolisantu w innych chorobach ośrodkowego układu nerwowego, m.in. w demencji, schizofrenii i nadpobudliwości ruchowej (ADHD).

Receptory sigma-1 jako odrębna klasa wewnątrzkomórkowych białek oraz charakterystyka farmakologiczna ich ligandów

Receptory sigma stanowią enigmatyczną grupę białek o stosunkowo słabo poznanej funkcji, które początkowo błędnie klasyfikowano jako jeden z typów receptorów opioidowych¹⁸. Opisano dwa rodzaje tych białek, sigma-1 (σ_1 R) oraz sigma-2 (σ_2 R). Sigma-1 jest przebłonowym białkiem chaperonowym siateczki śródplazmatycznej, kodowanym u człowieka przez gen *SIGMAR1* (**Rysunek 3**)¹⁹. Podlega on ekspresji w różnych tkankach, szczególnie w ośrodkowym układzie nerwowym. Największą gęstość σ_1 R stwierdzono w mózdku, jądrze półleżącym i korze²⁰. Rola receptora σ_1 polega na wewnątrzkomórkowej modulacji sygnału pomiędzy organellami¹⁹. Jak dotąd nie zidentyfikowano endogennego liganda σ_1 R, natomiast wykazano, że powinowactwo do tych receptorów wykazują pochodne tryptaminy i niektóre neurosteroidy^{21,22}.

Udział receptorów sigma-1 badany jest aktualnie w patogenezie wielu schorzeń takich jak choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne, ból towarzyszący procesowi zapalnemu i ból neuropatyczny²³. Antagoniści σ_1 R, jak na przykład E-52862²⁴, badani są pod kątem właściwości przeciwbólowych^{25,26}. Agonizm wobec receptorów sigma-1 skutkuje działaniem przeciwdepresyjnym,



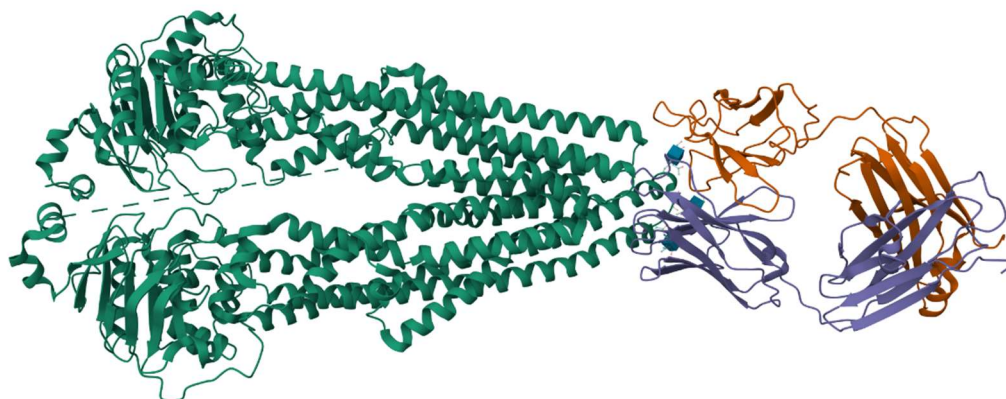
Rysunek 3. Aktywność σ_1 R w wewnątrzkomórkowej modulacji sygnału między organellami oraz możliwe efekty farmakologiczne jego antagonistów (ROS: reaktywne formy tlenu, BiP: białko szoku ciepłego, ER: retikulum endoplazmatyczne).

o czym świadczy skuteczność fluwoksaminy w leczeniu objawów depresji psychiatrycznej²⁷. Ponadto, agoniści σ_1 R w badaniach na zwierzętach wykazują działanie kardioprotekcyjne²⁸ i neuroprotekcjne.

Ekspresja i funkcja glikoproteiny P oraz jej rola w zjawisku oporności wielolekowej

Oporność wielolekowa (ang. *multidrug resistance*, MDR) jest zjawiskiem opartym na jednoczesnym występowaniu oporności na kilka lub kilkanaście leków odmiennych pod względem mechanizmów działania, jak i budowy chemicznej. W kontekście komórek nowotworowych cecha ta może być nabyta lub posiadać pierwotne pochodzenie²⁹.

Większość białek oporności wielolekowej należy do dużej nadrodziny ABC (ang. *ATP-binding cassette*)³⁰. Spośród tych białek najlepiej poznanym jest glikoproteina P (ang. *P-glycoprotein*, P-gp), produkt ekspresji genu *ABCB1*, odpowiedzialna m.in. za usuwanie ksenobiotyków i leków poza obszar komórki. P-gp to przez błonowe białko zbudowane z 1280 aminokwasów, pełniące funkcję ATP-zależnej pompy (**Rysunek 4**)³⁰. Podczas przyłączenia substratu dochodzi do zmian w konformacji glikoproteiny P, a energia niezbędna do przeprowadzenia tego procesu pochodzi z hydrolizy ATP. Białko traci wtedy powinowactwo do ATP oraz substratu, a przyłączony wcześniej substrat zostaje uwolniony do zewnętrznej części błony, skąd może odzyskać przestrzeń pozakomórkową. Na kolejnym etapie białko wraca do swojej wyjściowej konformacji, wykorzystując energię z hydrolizy drugiej cząsteczki ATP³¹. Dzięki temu glikoproteina P ma zdolność do usuwania z wnętrza komórki związków o potencjalnie kancerogennym działaniu i tym samym chroni komórkę przed transformacją nowotworową³².



Rysunek 4. Struktura glikoproteiny P (PDB ID: 6QEX).

Glikoproteina P fizjologicznie występuje w nabłonku jelita cienkiego i grubego, nadnerczach, wątrobie, łożysku, naczyniach krwionośnych, jądrach oraz mózgu. W barierze krew-mózg i krew-jądra chroni te narządy poprzez usuwanie ksenobiotyków i leków. Ponadto glikoproteina P zmniejsza wchłanianie substratów z jelit i zwiększa usuwanie/wydalenie ich z moczem, dzięki czemu redukuje toksyczne działanie ksenobiotyków na organizm/komórki^{33,34}.

Zarówno obecność, jak i zwiększona aktywność glikoproteiny P przyczynia się do rozwoju oporności wielolekowej, w wyniku której komórki po ekspozycji na jeden lek/związek nabywają oporności na związki o innej budowie oraz odmiennym mechanizmie działania (tzw. oporność krzyżowa)³⁰.

W związku z powyższym, obecność glikoproteiny P może sprzyjać gorszej odpowiedzi na terapię przeciwnowotworową, a tym samym korelować z szybszym rozwojem choroby i stopniem jej zaawansowania, co w efekcie wiąże się z gorszym rokowaniem^{35,36}.

4.4.2 Cel badawczy

Głównym celem badawczym prac wchodzących w skład dzieła habilitacyjnego była identyfikacja serii połączeń chemicznych o spodziewanej aktywności farmakologicznej względem receptorów H₃ histaminowych oraz innych wybranych celów biologicznych, takich jak glikoproteina P oraz receptory sigma-1. Związki do badań zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane, jak również wyselekcjonowane z istniejącej biblioteki ligandów H₃R otrzymanej przeze mnie w toku dotychczasowej pracy naukowej.

Ponadto, celem badawczym prac było przeprowadzenie skriningu farmakologicznego *in vitro* oraz analizy zależności struktura-aktywność (SAR) wzbogaconej badaniami modelowania molekularnego oddziaływań białko-ligand. Co więcej, celem badawczym była również charakterystyka wybranych parametrów lekopodobieństwa struktur wiodących metodami *in vitro* oraz sprawdzenie ich aktywności farmakologicznej w wybranych modelach zwierzęcych.

Badania opisane w rozprawie habilitacyjnej mają charakter interdyscyplinarny i wymagały współpracy wielu osób. Prace syntetyczne, niektóre badania farmakologiczne *in vitro* (profil aktywności

wewnętrznej względem H₃R) czy badania dodatkowe (np. wpływ na aktywność cytochromu P450, przenikalność przez błony biologiczne, modelowanie i dokowanie do wybranych celów biologicznych) zostały wykonane w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk (IF PAN) oraz w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych (KTiBŚL) Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (UJ CM). Pozostałe prace zostały wykonane we współpracy z badaczami z następujących ośrodków w kraju i zagranicą:

- dr Gabriellą Spengler oraz jej zespołem w składzie: dr Annamaria Kincses, Klaudia Vincze z Uniwersytetu w Szegedzie (badania wpływu związków na aktywność P-gp, charakterystyka ich właściwości cytotoksycznych i antyproliferacyjnych),
- prof. Holgerem Starkiem i jego grupą badawczą w składzie: dr Stefanie Hagenow, dr David Reiner-Link, Luisa Leitzbach z Uniwersytetu Heinricha Heinego w Düsseldorfie (oznaczenie powinowactwa związków do H₃R),
- dr. Steffenem Pockesem i jego zespołem w składzie: dr Carina Höring, dr Merlin Bresinsky, dr Niklas Rosier, dr Laura J. Humphrys, Denise Mönnich, Ulla Seibel-Ehlert, Martin Nagl z Uniwersytetu w Regensburgu (oznaczenie powinowactwa związków do pozostałych podtypów receptorów histaminowych, charakterystyka funkcjonalna ligandów względem H₃R),
- prof. Emanuele Amata, prof. Antonio Rescifiną oraz badaczami z ich zespołów w składzie: dr Maria Dichiaro, Davide Gentile, dr Vincenzo Patamia z Uniwersytetu w Katanii (oznaczenie powinowactwa związków do σ_1R i σ_2R , modelowanie i dokowanie do σ_1R),
- prof. Enrique J. Cobosem oraz M. Carmen Ruiz-Cantero z Uniwersytetu w Granadzie (charakterystyka profilu aktywności wewnętrznej wybranych ligandów względem σ_1R *in vivo*),
- prof. dr. hab. Piotrem Popikiem oraz dr Natalią Malikowską-Racia z Zakładu Badań Nowych Leków IF PAN (charakterystyka profilu aktywności wewnętrznej wybranych ligandów względem σ_1R *in vivo*),
- dr hab. Justyną Kalinowską-Tłuścik, prof. UJ z Zakładu Krystalochemii i Krystalofizyki Wydziału Chemii UJ (badania krystalograficzne),
- dr hab. Magdaleną Kotańską, dr. Markiem Bednarskim oraz dr. Kamilem Miką z Zakładu Wstępnych Badań Farmakologicznych Katedry Farmakodynamiki UJ CM (badania właściwości anorektycznych związków *in vivo*, charakterystyka funkcjonalna względem H₃R *in vitro*),
- dr. Szczepanem Mogilskim z Katedry Farmakodynamiki UJ CM (badania farmakologii bezpieczeństwa oraz właściwości przeciwbólowych związków *in vivo*),
- dr Katarzyną Popiołek-Barczyk z Zakładu Neurochemii IF PAN (badania właściwości przeciwbólowych związków *in vivo*),

- dr. Bogusławem Pilarskim z firmy Cerko Sp. z o.o. Sp. k (miareczkowanie potencjometryczne),
- dr. Michałem Górką, dr. Adamem Zmysłowskim oraz Arkadiuszem Leniakem z firmy Celon Pharma S.A. (badania stabilności w surowicy, wykonanie analiz NMR w środowisku o zmiennym pH).

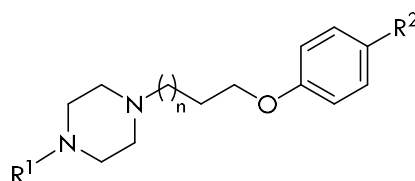
4.4.3 Omówienie wyników badań

H1 Szczepańska K, Kincses A, Vincze K, Szymańska E, Latacz G, Kuder KJ, Stark H, Spengler G, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K. N-Substituted piperazine derivatives as potential multitarget agents acting on histamine H₃ receptor and cancer resistance proteins. *Bioorg Med Chem Lett*. **2020** Nov 15;30(22):127522.

Udział histaminy w procesie rozwoju nowotworów jest niewątpliwie ogromny. Jednak liczne przykłady jej działania zarówno przyspieszającego, jak i hamującego proliferację komórek *in vitro* czy też różny wpływ na progresję guzów nowotworowych *in vivo* są niekiedy trudne do wyjaśnienia. Może być to związane z niejednakową syntezą tej aminy w różnych typach nowotworów, a tym samym różnym jej stężeniem w mikrośrodowisku guza, wpływem na syntezę i wydzielaniem cytokin promujących i hamujących rozwój nowotworów lub działaniem przez różne typy receptorów histaminowych³⁷. Badania *in vitro* sugerują, że antagoniści receptora H₃ hamują proliferację niektórych linii komórkowych³⁸.

Biorąc pod uwagę rolę glikoproteiny P w zjawisku oporności wielolekowej, jak również fakt, iż MDR jest główną przyczyną niepowodzenia chemioterapii nowotworów, poszukiwanie modulatorów P-gp mogących zahamować wyrzut leków z komórek nowotworowych stało się celem badań wielu ośrodków naukowych na świecie. Zasadnym wydaje się zatem sprawdzenie wpływu antagonistów H₃R na aktywność P-gp, co może zaowocować identyfikacją związków o podwójnym mechanizmie działania – antyproliferacyjnym oraz hamującym wyrzut leków z komórek nowotworowych.

Mając na uwadze powyższe doniesienia literaturowe, w publikacji **H1** zbadano i opisano zdolność 18 ligandów H₃R do hamowania aktywności glikoproteiny P w teście akumulacji rodaminu 123 (modelowego substratu dla P-gp będącego jednocześnie barwnikiem fluorescencyjnym). Związki do badań zostały wyselekcjonowane z biblioteki ligandów H₃R otrzymanej uprzednio w KTiBŚL (**Tabela 1**)^{39,40}. Ponadto, scharakteryzowano właściwości cytotoksyczne i antyproliferacyjne wszystkich testowanych związków w teście MTT. Jest on oparty na zdolności enzymu – dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania pomarańczowej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy) do nierozpuszczalnego formazanu, będącego ciemnoniebieskim produktem powyższej reakcji. Po rozpuszczeniu kryształów formazanu w DMSO lub izopropanolu, powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie w zakresie długości fal 492–570 nm. Ilość barwnego zredukowanego MTT jest

Tabela 1. Struktura i aktywność ligandów H₃R badanych w publikacji **H1** (numeracja zgodna z opisem w publikacji).

Lp.	n	R ¹	R ²	hH ₃ R K _i [nM] x̄ [CI 95%]	Lp.	n	R ¹	R ²	hH ₃ R K _i [nM] x̄ [CI 95%]
1	1	pirydyn-2-yl		315 [132; 754] ^a	10	1	pirymidyn-2-yl		3827 [752; 19484] ^b
2	1	pirydyn-4-yl		10,2 [3,6; 29.0] ^a	11	2	pirymidyn-2-yl		883 [221; 3527] ^b
3	1	pirymidyn-2-yl		2316 [940; 5707] ^a	12	2	pirazyn-2-yl		5477 [1034; 29027] ^b
4	1	tetrahydrofuroil	acetyl	4889 [800; 29862] ^a	13	2	pirydyn-2-yl	tert-butyl	2957 [688; 12720] ^b
5	2	pirydyn-2-yl		3697 [2563; 5332] ^a	14	2	pirydyn-3-yl		3420 [1540; 7598] ^b
6	2	pirydyn-3-yl		908 [230; 3582] ^a	15	2	tetrahydrofuroil		> 10 000 ^b
7	2	pirymidyn-2-yl		1230 [377; 4021] ^a	16	2	pirymidyn-2-yl		2264 [787; 6510] ^b
8	1	pirymidyn-2-yl	propionyl	3390 [1528; 7521] ^a	17	2	pirazyn-2-yl	tert-pentyl	683 [305; 1532] ^b
9	1	pirazyn-2-yl		1720 [802; 3687] ^a	18	2	pirydyn-3-yl		> 10 000 ^b

^a Dane opublikowane w [39]. ^b Dane opublikowane w [40].

proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji. Oceny aktywności cytotoksycznej, antyproliferacyjnej oraz wpływu na białkową pompę lekooporności nowotworowej ABCB1 dokonano wobec dwóch linii komórkowych mysiego chłoniaka z limfocytów T o zróżnicowanym poziomie ekspresji pompy ABCB1, jakimi są: linia referencyjna L5178 (PAR) oraz linia wielolekooporna L5178Y (MDR).

Badania pozwoliły zidentyfikować cztery pochodne piperazyny (**13**, **14**, **17**, **18**), spośród osiemnastu testowanych ligandów H₃R, które wykazały wysoką skuteczność hamowania aktywności pompy ABCB1 z jednoczesnym działaniem cytotoksycznym i antyproliferacyjnym w mysich komórkach chłoniaka T. Najbardziej aktywny ligand **18** w stężeniu 2 μM wykazał działanie inhibitora P-gp na

poziomie referencyjnego werapamilu, który testowany był w dziesięciokrotnie wyższym stężeniu (20 μM). Analizując otrzymane wyniki dla związków testowanych w stężeniu 20 μM , ligandy **5** oraz **11-18** hamowały aktywność P-gp od 1,6 do 13,9 razy silniej niż werapamil. Działanie cytotoksyczne pochodnych piperazyny zostało ocenione względem dwóch związków referencyjnych – umiarkowanie toksycznej tiorydazyny (PAR IC_{50} = 12,7 μM , MDR IC_{50} = 7,4 μM) oraz słabo toksycznego werapamilu (PAR IC_{50} > 100 μM , MDR IC_{50} = 47,9 μM) zarówno w linii referencyjnej, jak i wielolekoopornej. Najbardziej aktywne związki (**14**, **17**, **18**) wykazały właściwości cytotoksyczne na poziomie tiorydazyny (odpowiednio: PAR IC_{50} = 11,7 μM , MDR IC_{50} = 10,5 μM ; PAR IC_{50} = 12,6 μM , MDR IC_{50} = 12,8 μM ; PAR IC_{50} = 9,2 μM , MDR IC_{50} = 7,6 μM). Co więcej, związki **14**, **15**, **17** oraz **18** wykazały najsilniejsze właściwości antyproliferacyjne spośród wszystkich testowanych ligandów w obydwu liniach komórkowych (odpowiednio: PAR IC_{50} = 5,5 μM , MDR IC_{50} = 6,0 μM ; PAR IC_{50} = 9,0 μM , MDR IC_{50} = 11,8 μM ; PAR IC_{50} = 9,6 μM , MDR IC_{50} = 9,5 μM ; PAR IC_{50} = 3,2 μM , MDR IC_{50} = 3,7 μM).

Dla najbardziej aktywnych związków **13**, **14**, **17**, **18** przeprowadzono analizę ich możliwego mechanizmu działania na poziomie molekularnym w testach *in vitro* oraz *in silico*. Wpływ ligandów na aktywność glikoproteiny P zbadano przy użyciu komercyjnego testu Pgp-Glo™ firmy Promega zgodnie z wcześniej opisanym protokołem⁴¹. Dokonano w nim pomiaru hydrolizy ATP przez P-gp w obecności badanych ligandów oraz związków referencyjnych – werapamilu i kofeiny w stężeniach odpowiednio 200 i 100 μM . Werapamil pełni rolę modulatora glikoproteiny P, który jako jej substrat nasila hydrolizę ATP. Kofeina natomiast stanowi kontrolę negatywną, ponieważ nie oddziałuje z P-gp. Ilość ATP zmierzono techniką luminescencyjną, w której zależny od P-gp spadek luminescencji odzwierciedla ilość ATP zużytego przez pompę. Za aktywność podstawową P-gp uważa się różnicę pomiędzy sygnałem luminescencyjnym próbki traktowanej ortowanadanem sodu (silnym i selektywnym inhibitorem P-gp) oraz sygnałem pochodzącym z próbki nietraktowanej Na_3VO_4 . Inhibitory glikoproteiny P obniżają aktywność podstawową pompy, natomiast stymulatory/substraty powodują wzrost aktywności ATPazowej powyżej poziomu podstawowego. Wszystkie testowane związki w stężeniu 100 μM powodowały istotny statystycznie wzrost aktywności podstawowej glikoproteiny P, silniejszy niż w przypadku werapamilu. Wyniki te sugerują, że najbardziej prawdopodobny mechanizm hamowania aktywności P-gp w teście akumulacji rodaminu 123 przez badane ligandy polega na konkurencyjnym wypieraniu substratu w miejscu wiążącym. Wyniki komputerowego modelowania molekularnego z zastosowaniem modelu homologicznego białka ABCB1 również potwierdziły wyżej wymieniony mechanizm działania badanych pochodnych piperazyny.

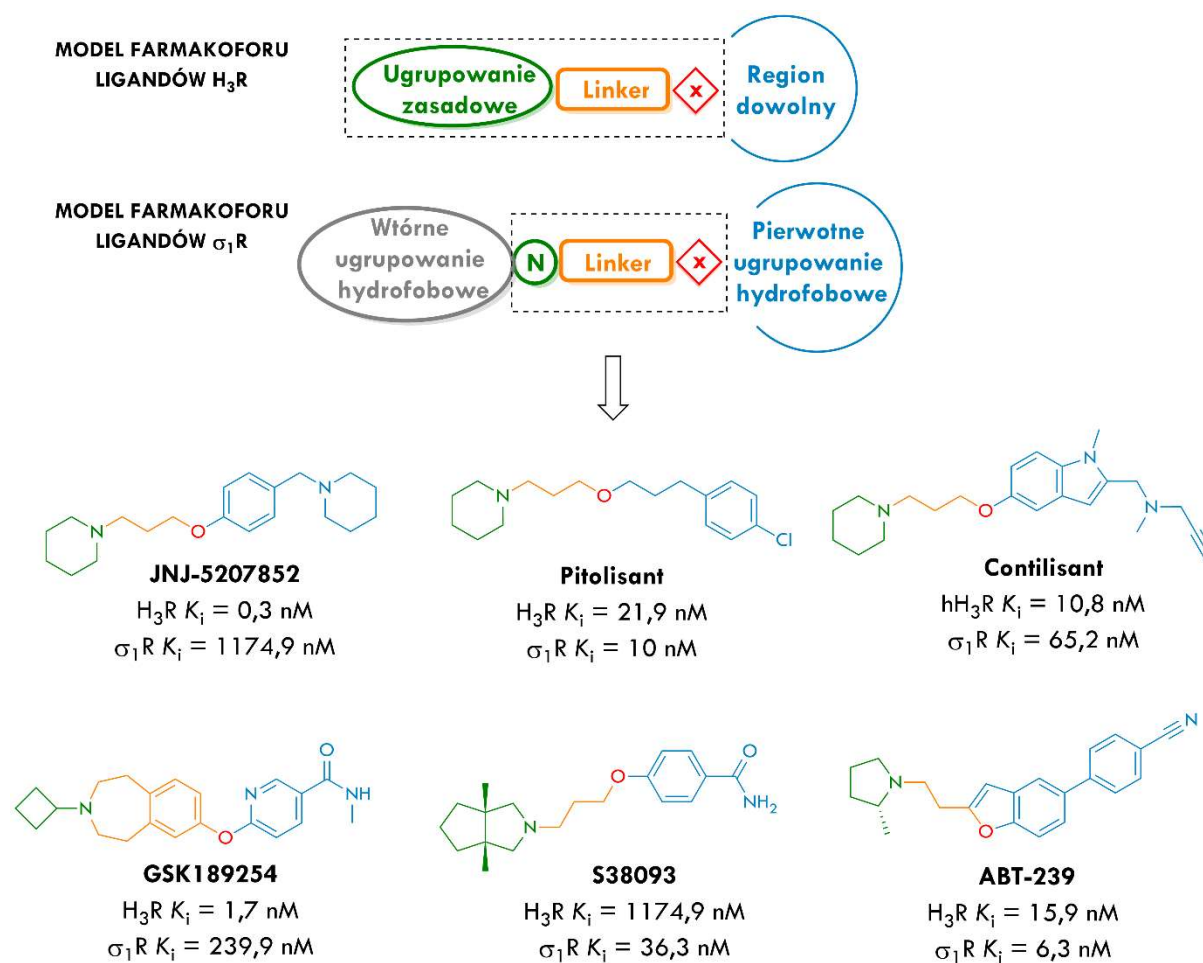
Biorąc pod uwagę budowę chemiczną związków **13**, **14**, **17** oraz **18** można wnioskować, że grupy *tert*-butylowa i *tert*-pentyłowa bezpośrednio przyłączone do pierścienia aromatycznego odgrywają kluczową rolę w oczekiwanym hamowaniu aktywności pompy ABCB1. Choć ligandy te posiadają stosunkowo słabe powinowactwo do receptorów H_3 histaminowych stanowią one cenne narzędzia farmakologiczne w poszukiwaniu nowych cząsteczek o działaniu przeciwnowotworowym.

H2 Szczepańska K, Kuder KJ, Kieć-Kononowicz K. Dual-targeting Approach on Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Ligands as Promising Pharmacological Tools in the Treatment of CNS-linked Disorders. *Curr Med Chem.* **2021**;28(15):2974-2995.

Badania opublikowane w 2019 przez Riddy'ego i współpracowników wykazały, że niektórzy antagoniści receptora H₃ histaminowego znajdujący się w badaniach klinicznych mają silne, nanomolowe powinowactwo do receptorów sigma-1, co może mieć wpływ na ich ogólną skuteczność i tłumaczyć zróżnicowany profil aktywności farmakologicznej (**Rysunek 5**)⁴². To odkrycie jest przełomem w badaniach nad mechanizmem działania ligandów H₃R i odkrywa nowy obszar badawczy w poszukiwaniu leków.

W pracy przeglądowej **H2**, wykorzystując dane literaturowe, zebrano informacje na temat możliwego działania farmakologicznego w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym ligandów receptorów H₃ histaminowych oraz sigma-1. Omówiono także zależność struktura-aktywność dla poszczególnych efektów farmakologicznych, zwracając uwagę na elementy farmakoforowe w strukturze dyskutowanych ligandów, które mogą być wspólne dla obydwu celów biologicznych oraz przypuszczalnie decydować o korzystnym profilu aktywności związków. W wyniku tej analizy zaobserwowano, że farmakofory ligandów H₃R oraz σ₁R mają elementy wspólne, takie jak: ugrupowanie zasadowe połączone linkerem o zmiennej długości, z opcjonalnym w przypadku ligandów σ₁R heteroatomem (lub grupą heteroatomów), który następnie połączony jest z tzw. „obszarem dowolnym” najczęściej o charakterze hydrofobowym (**Rysunek 5**). Jest to niewątpliwie przykład farmakoforów zintegrowanych (**Rysunek 1**), a synteza tak zaprojektowanych ligandów stanowi najbardziej obiecującą strategię poszukiwania związków biologicznie aktywnych w chemii medycznej. W ten sposób zaprojektowane cząsteczki mogą mieć prostszą budowę, mniejszą masę cząsteczkową, a także korzystniejsze parametry fizykochemiczne oraz farmakokinetyczne.

Przegląd wyników badań przedklinicznych i klinicznych z zastosowaniem ligandów H₃R oraz σ₁R pozwolił scharakteryzować szereg schorzeń ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, w których wysoką skuteczność terapeutyczną wykazali zarówno antagoniści H₃R, jak i związki o zróżnicowanym profilu aktywności wewnętrznej względem receptorów sigma-1. W przypadku agonistów σ₁R są to głównie choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona⁴³⁻⁴⁶. Contilisant (**Rysunek 5**) jest przykładem dualnego antagonisty H₃R oraz agonisty σ₁R o dodatkowej zdolności hamowania monoaminoooksydaz i cholinoesteraz i wysokiej skuteczności terapeutycznej w leczeniu choroby Alzheimera na poziomie badań przedklinicznych *in vivo*⁴⁷. Ligandy o działaniu antagonistycznym względem σ₁R wykazały pożądaną efekt terapeutyczny w leczeniu bólu neuropatycznego²⁵, uzależnienia⁴⁸ oraz otyłości⁴⁹. Interesującym przykładem związku o aktywności przeciwbólowej w modelu bólu neuropatycznego wywołanego chirurgicznie, jak również w przebiegu neuropatii wywołanej zakażeniem wirusowym, jest GSK189254 (**Rysunek 5**)⁵⁰. Ligand ten oddziałuje



Rysunek 5. Porównanie modeli farmakoforów ligandów H₃R oraz σ₁R. Struktura i aktywność biologiczna antagonistów H₃R wykazujących dodatkowe powinowactwo do σ₁R (opracowano na podstawie [40]).

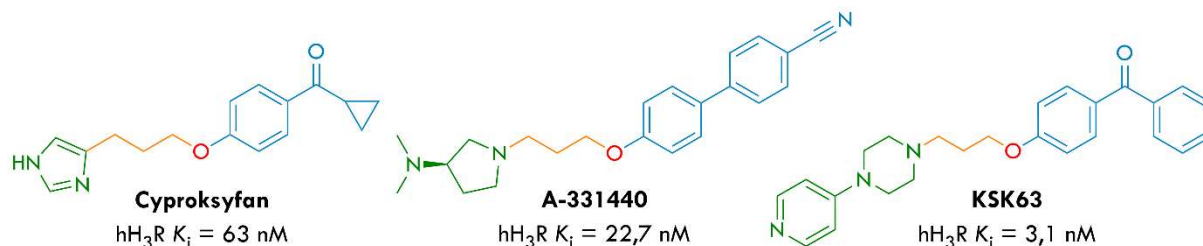
zarówno z receptorami H₃, jak i σ₁, jednak siła jego wiązania do H₃R jest ponad 140-krotnie większa. Niestety, słabo poznane szlaki sygnałowe związane z aktywacją σ₁R, a co za tym idzie brak kanonicznych testów funkcjonalnych *in vitro*, które pozwoliłyby ocenić profil agonisty/antagonisty ligandów tych receptorów, znacznie utrudnia projektowanie nowych klas związków. Profil funkcjonalny ligandów σ₁R najczęściej oceniany jest na podstawie wyników testów behawioralnych *in vivo* głównie w modelach bólu⁵¹.

Podsumowując, zarówno receptory H₃ histaminowe, jak i sigma-1 mają jednakowo wysoką ekspresję w ośrodkowym układzie nerwowym i mogą stanowić potencjalne cele terapeutyczne w rozwoju badań nad terapią licznych chorób ludzkich. Identyfikacja nowych narzędzi farmakologicznych o wysokim powinowactwie do tych dwóch celów biologicznych, może zaowocować opracowaniem innowacyjnych leków o korzystniejszym profilu bezpieczeństwa i efektywności terapeutycznej, niż ma to miejsce w przypadku ligandów selektywnych.

H3 Szczepańska K, Pockes S, Podlewska S, Höring C, Mika K, Latacz G, Bednarski M, Siwek A, Karcz T, Nagl M, Bresinsky M, Mönnich D, Seibel U, Kuder KJ, Kotańska M, Stark H, Elz S, Kieć-Kononowicz K. Structural modifications in the distal, regulatory region of histamine H₃ receptor

antagonists leading to the identification of a potent anti-obesity agent. *Eur J Med Chem.* **2021** Mar 5;213:113041.

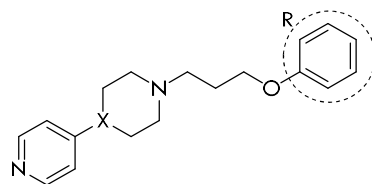
W publikacji **H3** zaprojektowano i zsyntetyzowano serię 12 nowych ligandów H₃R w oparciu o struktury znanych związków aktywnych, takich jak cyproksyfan, A-331440 oraz otrzymany uprzednio w KTiBŚL ligand KSK63 (**Rysunek 6**)⁵². Co ciekawe, związek A-331440 charakteryzował się wysoką skutecznością redukcji masy ciała w zwierzęcym modelu otyłości, jednak ze względu na właściwości genotoksyczne firma Abbott zaprzestała jego dalszej ewaluacji⁵³.



Rysunek 6. Struktury i aktywności wybranych antagonistów H₃R: cyproksyfanu, A-331440 oraz KSK63 (kolory zgodne z poszczególnymi elementami farmakoforu ligandów H₃R przedstawionego na Rysunku 5).

Zaprojektowane związki zostały otrzymane głównie w wyniku 2-etapowych reakcji zgodnie z wcześniej zoptymalizowaną ścieżką syntetyczną^{39,40,52}. W 1-etapie przeprowadzono alkirowanie komercyjnie dostępnych fenoli 1,3-dibromopropanem w roztworze propanolanu sodu. W przypadku analogów cyproksyfanu **2** i **3**, ze względu na brak dostępności handlowej cyklopropylo-*p*-hydroksyfenylo ketonu, otrzymano go w reakcji cyklizacji ogrzewając keton chloropropylo-*p*-hydroksyfenylo z nadmiarem wodorotlenku sodu. Aby otrzymać pochodne chlorobifenylu **6** i **7**, zarówno 4'-chloro-[1,1'-bifenyl]-4-ol jak i 3'-chloro-[1,1'-bifenyl]-4-ol zostały zsyntetyzowane w wyniku reakcji sprzęgania metodą Suzuki. W 2- lub 3-etapie reakcji, związki finalne zostały otrzymane wskutek *N*-alkirowania powstałych bromków aminami cyklicznymi (4-pirydylopiperydyną lub 4-pirydylopiperazyną), a następnie przeprowadzone w sole kwasu szczawiowego.

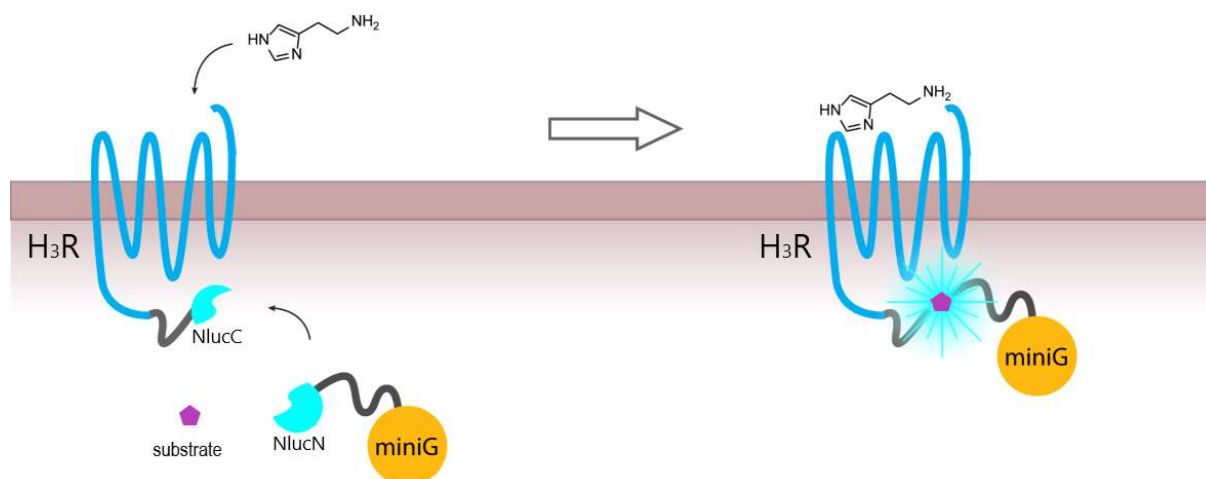
W badaniach wiązania do H₃R wykorzystano testy radioreceptorowe z użyciem linii ludzkich komórek HEK239 z trwałą, stałą nadekspresją receptorów H₃ histaminowych. Jako radioligand stosowano [³H] *N*- α -metylohistaminę, zgodnie z dostępnym w literaturze protokołem⁵⁴. Struktury związków finalnych oraz wartości ich powinowactwa do H₃R przedstawiono w **Tabeli 2**. Wszystkie otrzymane ligandy charakteryzowały się zdolnością silnego wiązania z omawianym celem biologicznym ($hH_3R K_i < 140 \text{ nM}$), a dla najbardziej aktywnego związku **3** odnotowano wartość powinowactwa K_i równą 3,17 nM. Jego piperidynowy analog **2**, także wykazał wysoką zdolność wiązania z H₃R ($K_i = 7,70 \text{ nM}$). Pochodne chlorobifenylowe **6** i **7** charakteryzowały się natomiast najslabszym powinowactwem do receptorów H₃ (odpowiednio: $hH_3R K_i = 139,74 \text{ nM}$, $hH_3R K_i = 109,06 \text{ nM}$). Możliwe interakcje białko-ligand w kieszeni wiążącej H₃R zostały scharakteryzowane za pomocą technik modelowania molekularnego i dynamiki molekularnej.

Tabela 2. Struktura i aktywność ligandów H₃R zaprojektowanych i otrzymanych w publikacji **H3** (numeracja zgodna z opisem w publikacji).

Lp.	R	X	hH ₃ R K _i [nM] x̄ [CI 95%]	Lp.	R	X	hH ₃ R K _i [nM] x̄ [CI 95%]
2		CH	7,70 [3,62; 16,38]	8			60,67 [44,36; 82,99]
3		—	3,17 [2,56; 3,91]	9			7,86 [2,82; 21,90]
4			22,98 [12,44; 42,43]	10			8,43 [4,53; 15,69]
5		N	5,84 [3,35; 10,19]	11		N	17,63 [7,27; 42,73]
6			139,74 [67,39; 289,78]	12			20,28 [6,75; 60,91]
7			109,06 [26,18; 454,30]	13			67,19 [31,82; 141,89]

Otrzymane związki poddano dalszej ewaluacji *in vitro*, w wyniku której oznaczono ich powinowactwo do pozostałych podtypów receptorów histaminowych (H₁, H₂, H₄)^{55,56} oraz zbadano aktywność wewnętrzną względem H₃R w trzech testach: rekrutacji białka mini-G⁵⁷, akumulacji cyklicznego adenosynomonofosforanu (cAMP) oraz mobilizacji jonów wapnia w komórce⁵⁸. Białka mini-G to użyteczne substytuty białek G, które umożliwiają badania aktywacji GPCR w komórkach⁵⁹. Test rekrutacji białka mini-G został przeprowadzony z użyciem linii komórkowej HEK239 ze stabilną nadekspresją H₃R, gdzie fragment C-końcowy receptora został połączony z małym fragmentem NanoLuc, a białko mini-Gi oznaczono na końcu N dużym fragmentem NanoLuc. Po aktywacji H₃R, białko mini-G zostało zrekrutowane do receptora, umożliwiając fragmentom NanoLuc utworzenie

funkcjonalnej lucyferazy, która katalizując reakcję utleniania substratu – furimazyny, dała sygnały luminescencji zależne od stężenia. Ich intensywność dostarczyła informacji na temat siły działania i skuteczności testowanych związków (**Rysunek 7**). Pomiaru poziomu cAMP pokonano techniką TR-FRET (ang. *time-resolved fluorescence resonance energy transfer*) z użyciem komórek CHO ekspresjonowanych H₃R, natomiast pomiaru wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia metodą Aequoscreen w komórkach hH₃R/CHO-K1 z ekspresją mitochondrialną białka sygnalizacyjnego apoekworyny, Gα16 oraz ludzkiego receptora H₃ histaminowego (PerkinElmer). Metoda ta bazuje na mobilizacji jonów wapnia w komórce po zaktywowaniu receptora metabotropowego i uruchomieniu ścieżki sygnalizacyjnej, związanej z fosfolipazą C. We wszystkich przeprowadzonych testach aktywności wewnętrznej uzyskano wyniki wskazujące na właściwości antagonistyczne badanych związków wobec receptorów H₃ histaminowych (**Tabela 3**). Powstała rozbieżność w uzyskanych wartościach K_b, można tłumaczyć między innymi różnicami w metodyce zastosowanych oznaczeń, w szczególności rodzajem linii komórkowych wykorzystanych w teście rekrutacji białka mini-G (linia HEK239), a oznaczeniach poziomu cAMP i zależnego od apoekworyny przepływu wapnia (linia CHO). Testowane ligandy okazały się selektywne względem H₃R i nie oddziaływały z pozostałymi podtypami receptorów histaminowych (**Tabela 3**).



Rysunek 7. Schematyczna ilustracja zasady testu rekrutacji białka mini-G. H₃R jest C-końcowo połączony z NlucC (11 aminokwasów), podczas gdy białko mini-G jest N-końcowo połączony z NlucN (159 aminokwasów). Aktywacja H₃R przez agonistę prowadzi do rekrutacji białka mini-G i utworzenia funkcjonalnej lucyferazy, dając sygnał luminescencji zależny od stężenia. Intensywność luminescencji dostarczyła informacji na temat siły działania i skuteczności testowanych związków.

W celu oceny potencjalnego ryzyka interakcji lekowych, zbadano wpływ wszystkich 12 ligandów na aktywność cytochromu P450 izoformy 3A4 przy użyciu komercyjnego testu CYP3A4 P450-Glo™ firmy Promega opartego o technikę luminescencyjną⁴¹. Związki testowane były w stężeniu 10 μM względem referencyjnego ketokonazolu o stężeniu 1 μM. Pomiar aktywności CYP3A4 wykazał umiarkowaną zdolność badanych ligandów do hamowania aktywności enzymów mikrosomalnych, a analogi cyproksyfanu **2** i **3** okazały się być najsłabszymi inhibitorami CYP3A4.

Tabela 3. Wyniki testów powinowactwa związków do pozostałych podtypów receptorów histaminowych oraz aktywności wewnętrznej względem H₃R.

Lp.	K _i [nM] \bar{x} [CI 95%]			K _b [nM] \bar{x} [CI 95%]		
	hH ₁ R	hH ₂ R	hH ₄ R	mini-G	cAMP	Aequoscreen
2	> 10 000	> 10 000	> 100 000	18,84 [3,96; 89,60]	0,94 [0,53; 1,62]	0,38 [0,14; 0,94]
3	> 10 000	> 100 000	> 100 000	9,56 [2,94; 31,10]	0,41 [0,24; 0,69]	0,74 [0,21; 2,28]
4	6860 [2719; 17311]	> 10 000	> 10 000	37,01 [16,43; 83,37]	0,25 [0,10; 0,59]	0,33 [0,12; 0,82]
5	> 10 000	> 10 000	> 10 000	12,42 [2,96; 52,04]	0,12 [0,06; 0,24]	0,15 [0,02; 0,69]
6	4086 [3442; 4852]	6897 [4316; 11021]	> 10 000	55,85 [39,39; 79,18]	2,51 [2,38; 2,64]	2,18 [0,65; 6,43]
7	1988 [301; 13143]	5487 [5075; 5933]	> 10 000	44,87 [11,04; 182,34]	2,37 [1,60; 3,45]	2,00 [0,91; 4,14]
8	3690 [796; 17095]	7459 [4565; 12188]	> 10 000	53,05 [3,87; 726,65]	0,94 [0,14; 4,80]	0,55 [0,19; 1,41]
9	2897 [1526; 5500]	> 10 000	> 10 000	6,87 [2,11; 22,31]	0,007 [0,004; 0,012]	0,004 [0,001; 0,012]
10	4217 [2803; 6345]	9441 [3666; 24311]	> 10 000	2,02 [1,20; 3,40]	0,66 [0,15; 2,37]	3,25 [1,10; 8,59]
11	4236 [2995; 5995]	> 10 000	> 10 000	2,85 [0,52; 15,54]	0,27 [0,06; 1,01]	0,13 [0,04; 0,35]
12	4574 [4334; 4829]	6541 [4802; 8911]	> 10 000	12,89 [0,68; 244,74]	0,05 [0,02; 0,12]	0,04 [0,01; 0,12]
13	7419 [3372; 16323]	> 10 000	> 10 000	44,60 [17,13; 116,11]	5,02 [2,49; 9,65]	5,53 [2,61; 11,08]

W kolejnym etapie przeprowadzono wstępne badania farmakologiczne *in vivo*, aby zbadać potencjalne właściwości anorektyczne związku **9** w zwierzęcym modelu otyłości. Ligand ten został wybrany do badań ze względu na podobieństwo strukturalne do związku A331440, który charakteryzował się obiecującym profilem aktywności w modelu otyłości⁵³ (**Rysunek 6**). Ligand **9**, podawany dootrzewnowo w dawce 10 mg/kg m.c./dzień, znacznie zmniejszył masę ciała i ilość kalorii spożywanych przez zwierzęta (począwszy od pierwszego tygodnia eksperymentu) w porównaniu z grupą kontrolną, którą stanowiły szczury otyłe z dostępem do karmy preferencyjnej. Ponadto, w tej dawce istotnie statystycznie zredukował ilość tłuszczu trzewnego u badanych zwierząt oraz poprawił parametry metaboliczne znacznie obniżając stężenie glukozy, poziom triglicerydów i cholesterolu całkowitego w osoczu, jak również podwyższając poziom frakcji HDL (tzw. „dobrego” cholesterolu). Co więcej, w dawce efektywnej związek **9** nie wpływał na aktywność spontaniczną u badanych zwierząt.

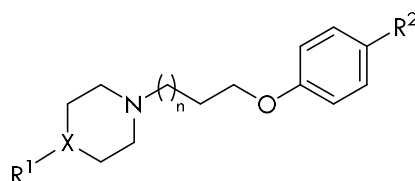
Wybrane ligandy z tej serii poddano dalszej ewaluacji, w której zbadano ich powinowactwo do receptorów sigma, w celu opracowania nowej klasy związków wielocelowych. Otrzymane wyniki opisano w publikacji **H4**.

H4 Szczepańska K, Podlewska S, Dichiaro M, Gentile D, Patamia V, Rosier N, Mönnich D, Ruiz Cantero MC, Karcz T, Łażewska D, Siwek A, Pockes S, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H, Rescifina A, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Structural and Molecular Insight into Piperazine and Piperidine Derivatives as Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Antagonists with Promising Antinociceptive Properties. *ACS Chem Neurosci*. **2022** Jan 5;13(1):1-15.

Mając na uwadze fakt, że niektórzy klinicznie testowani antagoniści H₃R mają zdolność interakcji z receptorami sigma-1, co może tłumaczyć ich zróżnicowane właściwości farmakologiczne⁴², w publikacji **H4** wyselekcjonowano 20 ligandów receptorów H₃ otrzymanych uprzednio w KTiBŚL^{39,40,52,60}, a następnie sprawdzono ich powinowactwo do obydwu podtypów receptorów sigma. W badaniach tych użyto homogenatu mózgu świnki morskiej (w przypadku σ_1 R) oraz wątroby szczura (dla σ_2 R) i odpowiednich radioligandów – [³H](+)-pentazocyny dla σ_1 R oraz [³H]DTG dla σ_2 R⁶¹. Struktury badanych związków oraz uzyskane wartości powinowactwa przedstawiono w **Tabeli 4**. Analizując otrzymane wyniki, prawie wszystkie testowane związki (poza pochodną acetylową **15**) wykazały mniej lub bardziej znaczącą siłę wiązania z obydwoma podtypami receptorów sigma. Ponadto, tylko 6 związków charakteryzowało się wyższym powinowactwem do σ_1 R niż σ_2 R, z najniższymi wartościami K_i odnotowanymi dla ligandów **5**, **11** i **12** (odpowiednio: σ_1 R K_i = 3,64 nM, σ_1 R K_i = 4,41 nM oraz σ_1 R K_i = 14,8 nM). Co ciekawe, wszystkie te związki mają wspólną cechę strukturalną, jaką jest ugrupowanie piperydyny w części zasadowej cząsteczki. Najprawdopodobniej jest to kluczowy element budowy chemicznej dualnych ligandów H₃/ σ_1 R, co można zaobserwować porównując wartości powinowactwa otrzymane dla dwóch analogów **4** i **5**, które różnią się od siebie jedynie ugrupowaniami piperazyny i piperydyny w części zasadowej (wartości powinowactwa odpowiednio: hH₃R K_i = 3,17 nM, σ_1 R K_i = 1531 nM oraz hH₃R K_i = 7,70 nM, σ_1 R K_i = 3,64 nM). Co więcej, zastąpienie pierścienia piperazyny piperydyną, nie wpłynęło znacząco na siłę wiązania z H₃R, co również można zaobserwować porównując wartości K_i dla związków **4** i **5**. Ligand **11** wykazał najwyższą selektywność względem σ_2 R spośród wszystkich badanych związków. Analizując wpływ podstawników w dystalnym regionie „dowolnym” cząsteczki na powinowactwo do σ_1 R, niewątpliwie konieczne są dalsze badania. Wszystkie testowane związki, dla których indeks selektywności σ_2 R/ σ_1 R był większy niż 1, miały różne grupy funkcyjne w tym obszarze, zatem można wnioskować, że podstawniki takie jak: *tert*-butyl, cyklopropylometanon, fenyl, benzyl i acetyl są dobrze tolerowane w kieszeni wiążącej σ_1 R.

Mając na uwadze fakt, że tak niewielka zmiana w strukturze liganda jaką jest obecność pojedynczego atomu azotu w części zasadowej, tak znacząco wpływa na jego powinowactwo do receptorów sigma-1, wydaje się oczywiste, że zjawisko to jest związane ze zmianą stanu lub stanów protonacji w fizjologicznym pH. W kolejnym etapie badań, używając technik *in silico*¹, obliczono zatem procentowy udział poszczególnych form protonacji związków **4** i **5** w pH 7,4 (**Rysunek 8**). Otrzymane

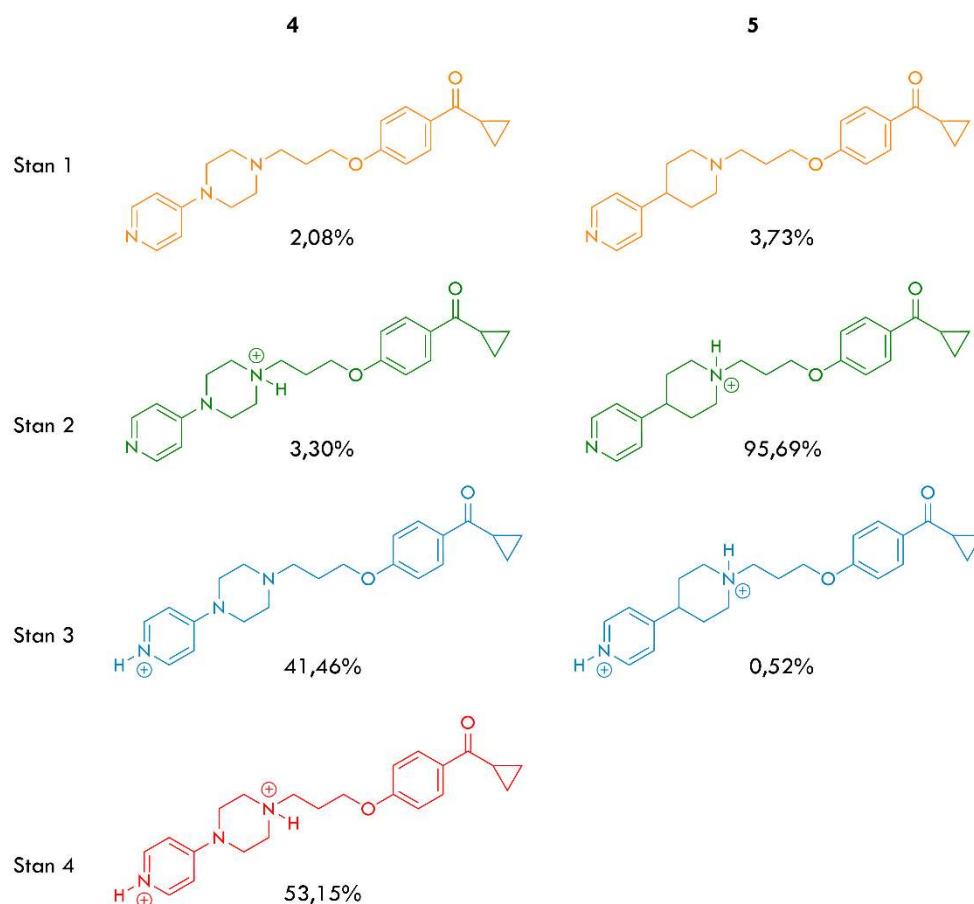
¹ Dane obliczone w programie Marvin Sketch (18.24, ChemAxon Ltd., Budapeszt, Węgry).

Tabela 4. Struktura i aktywność ligandów H₃R badanych w publikacji **H4** (numeracja zgodna z opisem w publikacji).

Lp.	n	X	R ¹	R ²	K _i [nM] \bar{x} [CI 95%]			σ_2/σ_1
					hH ₃ R	σ_1 R	σ_2 R	
1				etyl	40,4 [17,1; 95,9] ^a	592 [281; 1246]	64,3 [22,3; 185]	0,1
2				<i>tert</i> -butyl	16,0 [8,1; 31,7] ^b	112 [77; 164]	130 [97,8; 172]	1,2
3		N		acetyl	10,2 [3,6; 29,0] ^c	1409 [480; 4137]	247 [117; 522]	0,2
4				cyklopropylo- menanon	3,17 [2,56; 3,91] ^d	1531 [652; 3593]	101 [49,3; 205]	0,1
5		CH		cyklopropylo- menanon	7,70 [3,62; 16,38] ^d	3,64 [1,81; 7,30]	22,4 [9,36; 53,8]	6,2
6			pyridin-4-yl	fenyl	21,1 [3,8; 116] ^a	638 [260; 1566]	108 [46,7; 250]	0,2
7	1			4-cyjanofenyl	7,86 [2,82; 21,90] ^d	2958 [629; 13904]	75,2 [33,1; 171]	< 0,1
8		N		benzoil	3,12 [0,66; 14,60] ^a	726 [219; 2413]	29,2 [22,2; 38,5]	< 0,1
9				4- chlorobenzoil	23,0 [12,4; 42,4] ^d	641 [340; 1209]	32,4 [19,9; 52,6]	0,1
10				4- fluorobenzoil	5,84 [3,35; 10,19] ^d	1309 [373; 4599]	164 [59,2; 454]	0,1
11		CH	H	fenyl	6,20 [1,90; 20,40]	4,41 [2,62; 7,40]	67,9 [41,0; 112]	15,4
12				benzoil	22,0 [6,0; 83,0]	14,8 [8,28; 26,3]	96,2 [47,1; 196]	6,5
13				<i>tert</i> -butyl	37,8 [24,0; 59,4] ^b	51,8 [22,5; 119]	175 [67,0; 459]	3,4
14	2			<i>tert</i> -pentyl	120 [63; 230] ^b	285 [123; 659]	101 [40,5; 251]	0,4
15				acetyl	115 [26,8; 493] ^c	> 10 000	1795 [579; 5564]	< 0,2
16		N	pyridin-4-yl	acetyl	12,7 [4,4; 36,9] ^a	37,8 [20,9; 69,6]	151 [65,9; 345]	4,0
17	4			propionyl	16,9 [8,0; 36,0] ^a	248 [140; 439]	110 [56,4; 215]	0,4
18				<i>tert</i> -butyl	397 [220; 715] ^a	255 [104; 626]	179 [87,9; 363]	0,7
19				acetyl	40,5 [12,3; 134] ^a	408 [104; 1598]	59,7 [24,3; 147]	0,1
20	6			propionyl	38,9 [9,5; 159] ^b	274 [138; 544]	65,9 [30,1; 144]	0,2

^a Dane opublikowane w [52]. ^b Dane opublikowane w [40]. ^c Dane opublikowane w [39]. ^d Dane opublikowane w **H3** [60].

wyniki wyraźnie wskazują, że pochodna piperazyny **4** występuje w roztworze w niemalże równych ilościach dwóch form: monoprotowanej (stan 3) i diprotowanej (stan 4). Co ciekawe, pochodna piperydyny **5** występuje prawie wyłącznie w formie monoprotowanej (stan 2). Protonowanie atomu azotu pirydyny w związku **4** można łatwo wytłumaczyć obecnością elektronodonorowej grupy aminowej w położeniu *para* pierścienia aromatycznego. Następuje efekt uwalniania elektronów, który



Rysunek 8. Możliwe stany protonacji związków **4** i **5** oraz procentowy udział ich poszczególnych form w roztworze o fizjologicznym pH.

ma dwie konsekwencje: zwiększa zasadowość atomu azotu w pierścieniu pirydyny, a tym samym zmniejsza charakter zasadowy atomu azotu piperazyny połączonego bezpośrednio z łańcuchem alkilowym. Wysoka zasadowość tego atomu azotu (co ma miejsce w przypadku pochodnej piperydyny **5**), jest konieczna do wytworzenia kluczowego dla wysokiej aktywności biologicznej mostka solnego z kwasem glutaminowym 172 w kieszeni wiążącej σ_1R . Wnioski te zostały potwierdzone w badaniach modelowania molekularnego i dynamiki molekularnej.

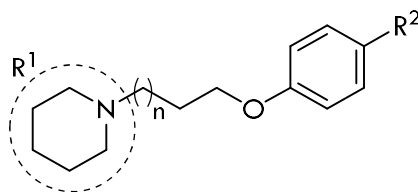
Związki **5** i **11** zostały wyselekcjonowane jako struktury wiodące do dalszych badań, w których oceniono powinowactwo **11** do pozostałych podtypów receptorów histaminowych^{55,56} oraz scharakteryzowano jego aktywność wewnętrzną względem H_3R w teście rekrutacji białka mini-G⁵⁷. Parametry te dla związku **5** opisano w publikacji **H3** (Tabela 3, numer związku 2)⁶⁰. Ligand **11**, podobnie jak **5**, nie wykazał powinowactwa do pozostałych podtypów receptorów histaminowych ($hH_1R K_i > 10\ 000$ nM, $hH_2R K_i > 100\ 000$ nM, $hH_4R K_i > 10\ 000$ nM) oraz okazał się silnym antagonistą H_3R ($hH_3R K_b = 11,38$ nM).

W ostatnim etapie badań dokonano oceny aktywności przeciwbólowej struktur wiodących **5** i **11** w mysim modelu bólu nocycetywnego⁵¹. Liczne dane literaturowe sugerują potencjalne zastosowanie terapeutyczne antagonistów σ_1R w leczeniu stanów bólowych, w tym bólu neuropatycznego, zapalnego i trzewnego, również jako środków wspomagających leczenie opioidami⁶². Z tego względu,

sprawdziliśmy wpływ ligandów **5** i **11** na antynocycepcję wywołaną podskórnym podaniem agonisty obwodowych receptorów opioidowych – loperamidu w dawce 4 mg/kg. Jako związek referencyjny zastosowano SIRA – selektywnego antagonistę receptorów sigma-1²⁶. Związki podawane były dopodszwowo w dawce 100 µg (**5** i SIRA) oraz 50 µg (**11**), a efekt antynocyceptywny monitorowano poprzez opóźnienie reakcji na bodziec mechaniczny przyłożony do łapy. Wszystkie testowane ligandy znacznie zwiększyły siłę działania przeciwbólowego loperamidu, co zostało odwrócone poprzez jednoczesne podanie agonisty σ_1R – związku PRE-084 w dawce 75 µg⁶³. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że efekt farmakologiczny **5** i **11** związany jest z blokadą receptorów sigma-1, co stanowi obiecującą przesłankę do ich dalszej ewaluacji w innych modelach bólu.

H5 Szczepańska K, Karcz T, Dichiara M, Mogilski S, Kalinowska-Tłuścik J, Pilarski B, Leniak A, Pietruś W, Podlewska S, Popiołek-Barczyk K, Humphrys LJ, Ruiz-Cantero MC, Reiner-Link D, Leitzbach L, Łażewska D, Pockes S, Górka M, Zmysłowski A, Calmels T, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Dual Piperidine-Based Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Ligands in the Treatment of Nociceptive and Neuropathic Pain. *J Med Chem.* **2023** Jul 27;66(14):9658-9683.

W publikacji **H5** zaprojektowano i zsyntetyzowano serię 16 dualnych ligandów H₃/ σ_1R , zawierających w swej strukturze modyfikowane ugrupowanie piperydyny w części zasadowej cząsteczki. Zaprojektowane związki zostały otrzymane w wyniku 2-etapowych reakcji zgodnie z wcześniej opisaną procedurą^{40,64,65}. W 1-etapie przeprowadzono alkilowanie komercyjnie dostępnych fenoli 1,3-dibromopropanem, 1,4-dibromobutanem, 1,5-dibromopentanem lub 1,6-dibromoheksanem w roztworze propanolanu sodu. W 2-etapie reakcji, związki finalne zostały otrzymane w reakcji *N*-alkilacji powstałych bromków odpowiednimi aminami cyklicznymi (3-metylopiperydyną, 4-metylopiperydyną, azepanem, pirolidyną, piperydyną, 4-pirydylopiperydyną lub 1-(2-pirazynylo) piperazyną) oraz przeprowadzone w sole kwasu szczawiowego. Następnie zbadano ich powinowactwo do receptorów H₃ oraz obydwu podtypów receptorów sigma (**Tabela 5**)^{54,61}. Co ciekawe, prawie wszystkie testowane związki (z wyjątkiem pochodnej piperazyny **16**) charakteryzowały się wysokim powinowactwem do H₃R z wartościami K_i poniżej 100 nM. Ponadto, podobnie jak w poprzedniej serii opisaniej w publikacji **H4**, wszystkie badane ligandy wykazywały mniej lub bardziej znaczącą aktywność w stosunku do σ_1R i σ_2R . Związek **16**, pomimo braku powinowactwa do H₃R, okazał się być wysoce aktywny względem obydwu podtypów receptorów sigma (σ_1R K_i = 7,6 nM, σ_2R K_i = 27 nM). Analizując budowę części zasadowej związków, niepodstawiony pierścień piperydyny wydaje się być lepiej tolerowany przez kieszeń wiążącą H₃R niż postawiony pirydyną, co można zaobserwować porównując aktywności ligandów **5-7** (hH₃R K_i = 6,2 nM, hH₃R K_i = 2,7 nM, hH₃R K_i = 5,2 nM) oraz **12-14** (hH₃R K_i = 7,7, hH₃R K_i = 24.2 nM, hH₃R K_i = 69 nM). Jednak w przypadku obydwu receptorów sigma, zaobserwowano odwrotną tendencję i większą siłę wiązania związków **12-14** niż **5-7**, zwłaszcza z σ_1R (σ_1R K_i = 4,5 nM, σ_1R K_i = 5,6 nM, σ_1R K_i = 3,3 nM vs. σ_1R K_i = 28 nM, σ_1R K_i = 18 nM, σ_1R K_i

Tabela 5. Struktura i aktywność dualnych ligandów H₃/σ₁R zaprojektowanych i zsyntetyzowanych w publikacji **H5** (numeracja zgodna z opisem w publikacji).

Lp.	n	R ¹	R ²	K _i [nM] \bar{x} [CI 95%]			σ ₂ /σ ₁
				hH ₃ R	σ ₁ R	σ ₂ R	
1				31 [11; 90]	1,5 [0,5; 4,1]	17 [9; 32]	11,3
2			fenyl	10,3 [1,7; 62,4]	2,4 [0,7; 8,2]	16 [12; 22]	6,7
3	1			4,3 [1,4; 13,0]	1,9 [0,6; 5,8]	25 [7,6; 83]	13,2
4				19,5 [4,7; 81,2]	24 [8,4; 66]	65 [34; 128]	2,7
5			4-cyjanofenyl	6,2 [1,5; 26] ^a	28 [5,7; 136]	47 [21; 105]	1,7
6			fenoksy	2,7 [1,1; 5,8]	18 [8,2; 39]	103 [48; 223]	5,7
7			N-fenylamina	5,2 [2,1; 12,6]	4,8 [2,8; 8,4]	116 [70; 191]	24,2
8			benzyl	27,5 [9,1; 83,4]	5,5 [1,1; 27]	47 [22; 102]	8,5
9	2			22 [7; 73]	95 [36; 252]	33 [14; 74]	0,3
10	3		fenyl	21,7 [3,9; 110] ^b	140 [78; 251]	19 [8,8; 41]	0,1
11	4			88,9 [42; 187] ^b	118 [31; 449]	46 [18; 114]	0,4
12			4-cyjanofenyl	7,7 [1,1; 52,5]	4,5 [1,3; 15]	10 [5,6; 20]	2,2
13			fenoksy	24,2 [3,1; 187,6]	5,6 [2,8; 11]	4 [0,8; 19]	0,7
14			N-fenylamina	69 [18,8; 253,4]	3,3 [1,6; 7,1]	29 [14; 59]	8,8
15	1		benzyl	76,1 [18,4; 315,7]	2,8 [1,3; 6]	9,9 [3,6; 27]	3,5
16			tert-butyl	5477 [1034; 29027] ^c	7,6 [4; 14]	27 [11; 67]	3,6

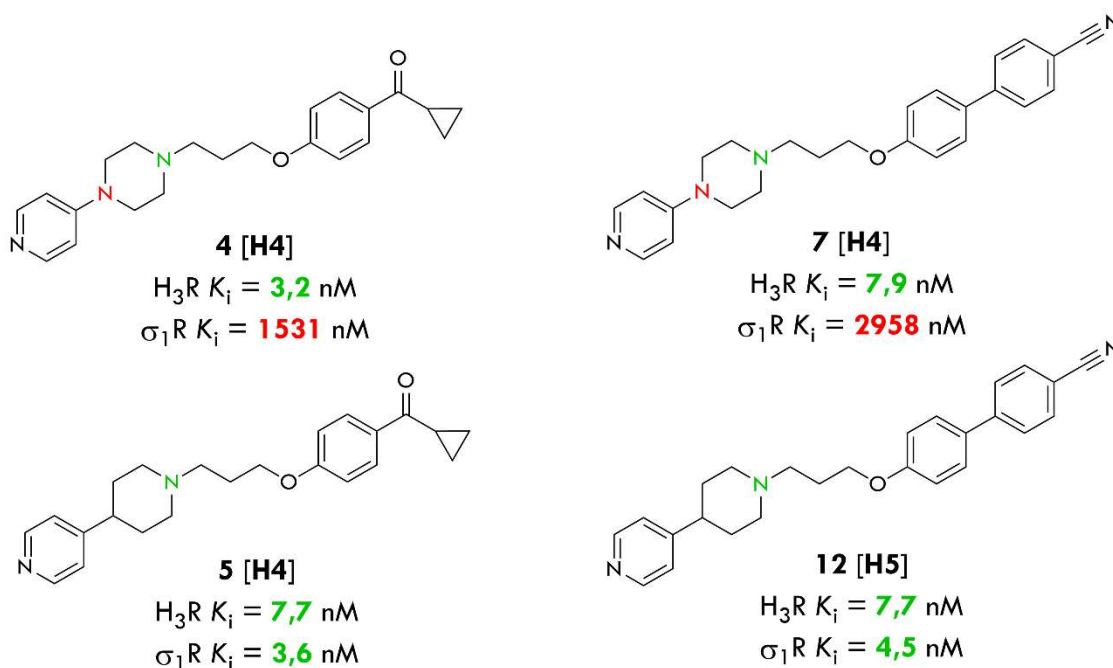
^a Dane opublikowane w [65]. ^b Dane opublikowane w [64]. ^c Dane opublikowane w [40].

= 4,8 nM). Dla wszystkich opisanych pochodnych piperydyny, wpływ długości łańcucha alkilowego na powinowactwo można zauważyć jedynie w przypadku receptora H₃, gdzie wydłużenie linkera w pochodnych bifenylowych **9-11** zmniejszało siłę wiązania z tym celem biologicznym (odpowiednio: hH₃R K_i = 22 nM, hH₃R K_i = 21,7 nM, hH₃R K_i = 88,9 nM).

W publikacji **H4** została zidentyfikowana kluczowa cecha strukturalna odróżniająca dualne ligandy H₃/σ₁R od związków selektywnych, oddziałujących jedynie z receptorem H₃⁶⁶. Jedną ze struktur wiodących – związek **5** zawierający w swej strukturze ugrupowanie 4-pirydylopiperydydy w części

zasadowej, wykazał wysokie powinowactwo zarówno do receptorów H_3 , jak i sigma-1, podczas gdy jego piperazynowy analog **4** był selektywny względem H_3R . Co ciekawe, w tej serii również potwierdzono ten fenomen strukturalny, co można zauważyć porównując wartości powinowactwa otrzymane dla pochodnej piperydyny **12** oraz jej piperazynowego analogu **7** opisanego w publikacji **H4** (odpowiednio: $hH_3R K_i = 7,7$ nM, $\sigma_1R K_i = 4,5$ nM vs. $hH_3R K_i = 7,9$ nM and $\sigma_1R K_i = 2958$ nM). Analizując parametr selektywności związków względem receptorów sigma-2, ligandy **1**, **3** oraz **7** charakteryzowały się najwyższymi wartościami współczynnika σ_2R/σ_1R i wynosiły odpowiednio: 11,3, 13,2 oraz 24,2.

Mając na uwadze fakt, jak częstym elementem strukturalnym ligandów GPCR jest układ piperydyny lub piperazyny oraz identyfikację drugiej pary związków, w której obecność pojedynczego atomu azotu decydowała o wysokim powinowactwie do σ_1R , w kolejnym etapie badań dokonano analizy eksperymentalnej możliwych stanów protonacji dla ligandów **4**, **5**, **7** (publikacja **H4**) oraz **12** (publikacja **H5**, Rysunek 9).



Rysunek 9. Struktury pochodnych piperydyny i piperazyny opisanych w publikacjach **H4** oraz **H5**, dla których przeprowadzono badania eksperymentalne możliwych stanów protonacji.

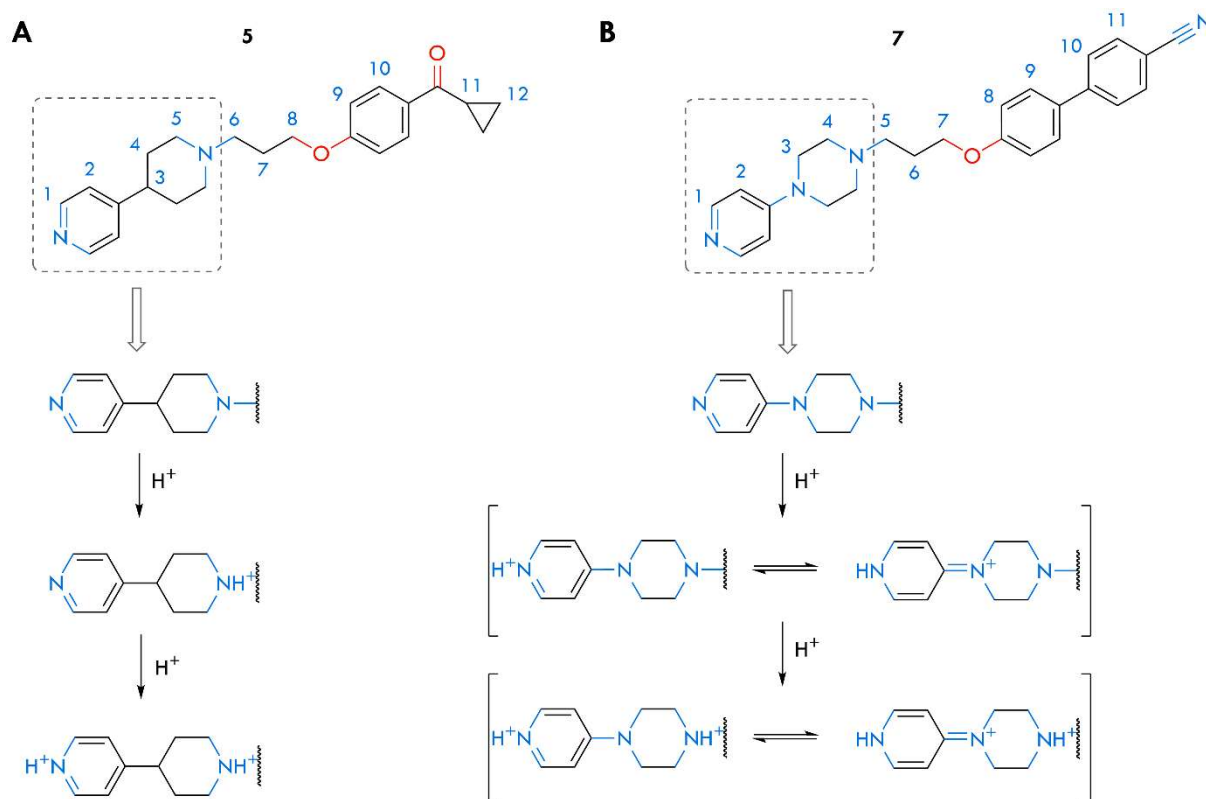
Badania te rozpoczęto od wyznaczenia wartości pK_a poszczególnych atomów azotu występujących w strukturze związków **5** i **7** techniką miareczkowania potencjometrycznego. Bazując na uprzednio zmodyfikowanej procedurze^{67,68}, przeprowadzono serię miareczkowań, a następnie obliczono wartości pK_a za pomocą algorytmu Kostrowickiego i Liwo^{69,70}. Dane eksperymentalne wyraźnie wykazały, że pochodna piperydyny **5** może być scharakteryzowana jako związek o charakterze zasadowym, w którym wartości pK_a atomów azotu układu pirydyny i piperydyny wynoszą odpowiednio 4,9 oraz 8,4. Co ciekawe, pochodna piperazyny **7** to ligand z centrum kwasowym zlokalizowanym na atomie azotu

układu piperazyny bezpośrednio połączonym z pirydyną, dla którego wartość pK_a wynosi około 1. Wszystkie eksperymentalnie wyznaczone wartości pK_a zostały potwierdzone w obliczeniach *in silico*².

Następnym etapem charakterystyki stanów protonacji związków **4**, **5**, **7** oraz **11** były badania krystalograficzne zarówno w formie wolnych zasad, jak i soli kwasu szczawiowego. Analiza otrzymanych danych pozwoliła zaobserwować interesującą geometrię wiązania wodorowego pomiędzy atomem azotu układu pirydyny w związku **5**, a grupą karboksylową kwasu szczawiowego, która sugeruje w tym miejscu transfer protonów. Oznacza to słabsze właściwości zasadowe azotu pirydyny w porównaniu z piperydyną. Co ciekawe, pochodne piperazyny **4** oraz **7** nie wykryły w neutralnej formie, a atom azotu pierścienia pirydyny okazał się mieć silnie zasadowy charakter – w strukturze kryształów tych związków zaobserwowano obecność atomów jodu, jako pozostałości po użytej w syntezie katalitycznej ilości jodku potasu. Wysoka zasadowość tego atomu azotu jest bezpośrednią konsekwencją obecności grupy aminowej w położeniu *para* pierścienia aromatycznego. Zwiększoną dostępność wolnych par elektronowych zaobserwowano w zmianach parametrów geometrycznych, a hybrydyzacja atomu azotu piperazyny bezpośrednio połączonej z pirydyną uległa zmianie ze stanu sp^3 na sp^2 . Sztywność układu 4-pirydylopiperazyny, która określa nie tylko orientację przestrzenną π elektronów pierścienia aromatycznego, ale również wysoce zasadowy charakter atomu azotu pirydyny, może wyjaśniać brak zdolności związków **4** i **7** do interakcji z kwasem glutaminowym 172 w kieszeni wiążącej σ_1R , a co za tym idzie spadek ich aktywności biologicznej.

Ostatnią metodą określenia kolejności protonowania poszczególnych atomów azotu w badanych pochodnych piperydyny i piperazyny było miareczkowanie związków kwasem trifluorometanosulfonowym (triflowym) bezpośrednio w probówce NMR z następczą analizą zmian przesunięć chemicznych. W przypadku związku **5**, atom azotu piperydyny protonowany był jako pierwszy. Dopiero po pełnym wysyceniu do stosunku molowego kwas triflowy-ligand równego 1:1, rozpoczęło się protonowanie układu pirydyny (**Rysunek 10A**). Można zatem wnioskować, że wartość pK_a atomu azotu piperydyny jest znacznie wyższa niż pirydyny. W przypadku pochodnej piperazyny – związku **7**, to atom azotu pirydyny protonowany był w pierwszej kolejności, a ładunek dodatni został następnie przeniesiony na bezpośredni atom azotu w pierścieniu piperazyny za pomocą odpowiednich struktur rezonansowych (**Rysunek 10B**). Drugi atom azotu piperazyny (połączony z linkerem) początkowo nie był protonowany, a dopiero po osiągnięciu stosunku molowego kwas triflowy-ligand równego 0,6:1 zaobserwowano dla niego przyłączenie protonu. Wyniki miareczkowania związków w probówce NMR okazały się być w pełni spójne z danymi krystalograficznymi oraz rezultatami miareczkowania potencjometrycznego. Ponadto, uzyskane dane jednoznacznie wyjaśniły charakter chemiczny pochodnych 4-pirydylopiperydyny i 4-pirydylopiperazyny oraz związaną z nim aktywność biologiczną badanych ligandów względem receptorów sigma-1.

² Dane obliczone w programach: Instant JChem (21.14.0, ChemAxon Ltd., Budapeszt, Węgry) oraz Epik (Schrödinger Release 2017-3: LLC, Nowy Jork, Stany Zjednoczone).



Rysunek 10. Kolejność protonowania poszczególnych atomów azotu w badanych pochodnych piperidyny **5** (A) i piperazyny **7** (B) oraz utworzone struktury rezonansowe opracowane na podstawie wyników miareczkowania związków kwasem triflowym w próbówce NMR.

Jako struktury wiodące do dalszych badań wyselekcjonowano dwa dualne ligandy H_3/σ_1R o najwyższej selektywności względem receptorów sigma-2 (**3** i **7**) oraz związek, który w równym stopniu wiązał się ze wszystkimi trzema celami biologicznymi (**12**). W wyborze tym kierowano się danymi literaturowymi na temat skuteczności antynocyceptywnej selektywnych ligandów σ_2R w testach na zwierzętach⁷¹. W pierwszej kolejności oznaczono powinowactwo struktur wiodących do pozostałych podtypów receptorów histaminowych oraz scharakteryzowano profil aktywności wewnętrznej względem H_3R w teście akumulacji cyklicznego AMP⁵⁸. Następnie zbadano przenikalność związków **3**, **7**, **12** oraz S1RA (selektywnego antagonisty σ_1R) przez sztuczną błonę biologiczną w teście PAMPA⁴¹. Jako związki referencyjne zastosowano wysoce przepuszczalną kofeinę (współczynnik przenikalności $P_e = 10,49 \times 10^{-6}$ cm/s) i nisko przenikalny sulpiryd ($P_e = 0,05 \times 10^{-6}$ cm/s). Wszystkie testowane ligandy okazały się być silnymi i selektywnymi antagonistami H_3R , które nie wykazały istotnego powinowactwa do pozostałych podtypów receptorów histaminowych oraz charakteryzowały się wysoką przepuszczalnością przez sztuczną błonę biologiczną (**Tabela 6**). Dla związku **12**, który zawiera w swej strukturze podatną na hydrolizę grupę nitylową, oznaczono także stabilność w surowicy względem wysoce trwałego atenololu. Porównując zawartość procentową związku referencyjnego w surowicy po 24 godzinach inkubacji (82,3%) z zawartością liganda **12** (17,5%), można wnioskować, że jest on umiarkowanie stabilny na działanie enzymów, a jego okres półtrwania $t_{1/2}$ wynosi 7,7 h.

Tabela 6. Wyniki testów powinowactwa wybranych związków do pozostałych podtypów receptorów histaminowych, aktywności wewnętrznej względem H₃R oraz przenikalności przez sztuczną błonę biologiczną.

Lp.	K _i [nM] \bar{x} [CI 95%]			IC ₅₀ [nM] \pm SD	P _e (10 ⁻⁶ cm/s)
	hH ₁ R	hH ₂ R	hH ₄ R	hH ₃ R	
3	7615 [4024; 14407]	> 10 000	> 10 000	83,4 \pm 15,9	6,57
7	> 10 000	> 10 000	> 10 000	83,7 \pm 2,1	10,63
11	653 [259; 1647]	> 10 000	> 10 000	215 \pm 108	12,00
SIRA	–	–	–	–	5,26
Kofeina	–	–	–	–	10,49
Sulpiryd	–	–	–	–	0,05

Finalnym etapem badań w publikacji **H5** było sprawdzenie skuteczności związków **3**, **7** oraz **12** w zwierzęcych modelach bólu o podłożu nocyceptywnym i neuropatycznym. W pierwszej kolejności scharakteryzowano profil farmakologii bezpieczeństwa struktur wiodących poprzez sprawdzenie ich wpływu na aktywność spontaniczną oraz koordynację ruchową u zwierząt w teście obracającego się pręta^{72,73}. Związki **3** i **7** w dawce 15 mg/kg wykazywały efekt silnie sedatywny oraz zaburzały koordynację ruchową u myszy. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że ligand **12** charakteryzuje się lepszym profilem bezpieczeństwa niż pozostałe dwa badane związki, dlatego został wybrany do dalszej analizy jego działania przeciwbólowego. Wykazał wysoką skuteczność w obydwu fazach testu formalinowego (I faza: ED₅₀ = 6,17 mg/kg, II faza: ED₅₀ = 12,32 mg/kg)⁷⁴, teście kapsaicynowym (ED₅₀ = 10,32 mg/kg)^{75,76} oraz właściwości antagonistyczne względem receptorów sigma-1 w modelu antynocycepcji indukowanej loperamidem⁵¹ w sposób zależny od dawki (testowany w 12,5 oraz 25 μ g). Ponadto, ligand **12** w dawkach 5, 10 oraz 15 mg/kg okazał się być wyraźnie aktywny w dwóch modelach bólu neuropatycznego – neuropatii obwodowej wywołanej oksaliplatyną⁷⁷ oraz wskutek mechanicznego uszkodzenia nerwu kulszowego⁷⁸. Uzyskane wyniki badań na zwierzętach potwierdzają szerokie spektrum działania przeciwbólowego związku **12** opartego na nowatorskim mechanizmie molekularnym – dualnej modulacji receptorów H₃ oraz σ_1 , z dodatkową interakcją z σ_2 R.

H6 Szczepańska K, Bojarski AJ, Popik P, Malikowska-Racia N. Novel object recognition test as an alternative approach to assessing the pharmacological profile of sigma-1 receptor ligands. *Pharmacol Rep.* **2023** Oct;75(5):1291-1298.

Chociaż terminy „agonista” i „antagonista” są używane do klasyfikacji ligandów receptora sigma-1, jednoznaczne określenie ich aktywności funkcjonalnej jest często trudne. W celu zdefiniowania profilu farmakologicznego ligandów σ_1 R, najpowszechniejszą metodą jest ocena ich siły działania w łagodzeniu analgezji opioidowej⁷⁹. Agoniści σ_1 R zmniejszają działanie przeciwbólne opioidów, podczas gdy antagoniści wzmagają ich aktywność w różnych modelach bólu⁸⁰. Niestety, słabo poznane szlaki sygnałowe związane z aktywacją σ_1 R spowodowały, że jak dotąd nie opracowano kanonicznych testów funkcjonalnych *in vitro*, które pozwoliłyby ocenić profil agonisty/antagonisty ligandów tych receptorów. Jediną metodą *in vitro* opisaną w literaturze jest test wiązania związków do σ_1 R

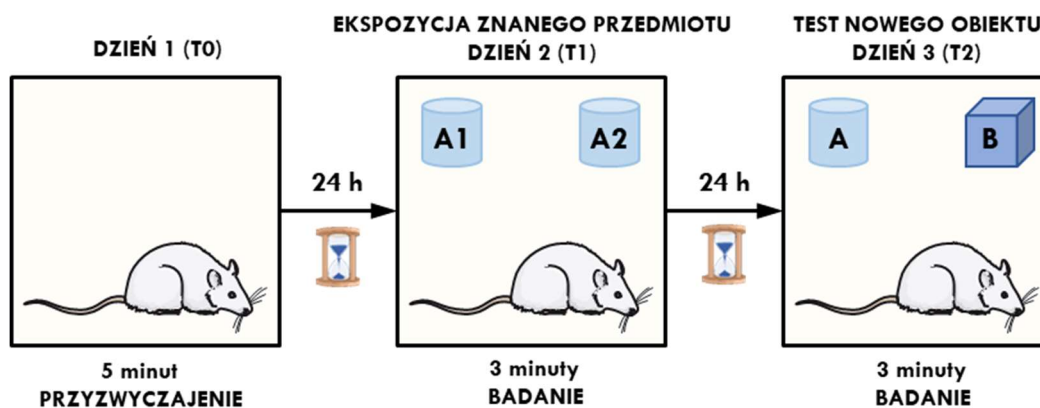
w obecności fenytoiny jako modulatora allosterycznego⁸¹. Badania wykazały, że jej dodatek różnicuje powinowactwo ligandów do σ_1R w zależności od profilu aktywności wewnętrznej – zwiększa siłę wiązania agonistów, a zmniejsza antagonistów⁸¹. Choć dane literaturowe jednoznacznie wskazują korelację pomiędzy wynikami otrzymanymi w teście funkcjonalnym z dodatkiem fenytoiny, a aktywnością związków w modelach *in vivo*, uzyskane różnice w wartościach powinowactwa w obecności modulatora allosterycznego i bez są bardzo niewielkie⁸¹.

Mając na uwadze powyższe, w publikacji **H6** zbadano wpływ agonistów i antagonistów receptora sigma-1 w teście rozpoznawania nowego obiektu (ang. *novel object recognition test*, test NOR), jako alternatywnej metody *in vivo* do oceny profilu aktywności wewnętrznej ligandów σ_1R .

Test NOR jest zwierzęcym modelem deficytów poznawczych, który służy do badania pamięci roboczej, uwagi, lęku i preferencji do nowości oraz ich zaburzeń u myszy lub szczurów⁸². Jest on oparty na wrodzonym repertuarze zachowań gryzoni, tj. naturalnej tendencji do eksploracji napotkanych obiektów. Podczas pierwszej próby prezentowane są dwa jednakowe przedmioty (**Rysunek 11**). Podczas drugiej próby jeden z obiektów zastąpiony zostaje nowym. Na podstawie czasu, jaki szczur (lub mysz) spędza eksplorując nowy obiekt w stosunku do obiektu prezentowanego już uprzednio, można wyznaczyć indeks dyskryminacji, który stanowi wskaźnik pamięci w tym teście. Bez wątpienia, test NOR jest jednym z najczęściej stosowanych metod do oceny potencjalnych właściwości prokognitywnych nowych związków. Mając na uwadze fakt, że agoniści receptora σ_1 poprawiają funkcje poznawcze w licznych modelach zwierzęcych (czego nie zaobserwowano u antagonistów)⁸³, jak również rutynowy charakter testu NOR, podjęto próbę jego wykorzystania do oceny funkcjonalnej ligandów σ_1R jako alternatywy dla zwierzęcych modeli bólu.

Do badań wyselekcjonowano selektywnego agonistę σ_1R (PRE-084, σ_1R $K_i = 53,2$ nM), selektywnego antagonistę σ_1R (S1RA, σ_1R $K_i = 17,0$ nM) oraz otrzymanego w publikacji **H5** dualnego antagonistę H_3/σ_1R (KSK100, symbol **12**, hH_3R $K_i = 7,7$ nM, σ_1R $K_i = 4,5$ nM)^{25,63,84}. Związek ten został uwzględniony w badaniach, ponieważ wiele danych literaturowych wskazuje na wysoki potencjał antagonistów H_3R do poprawy procesów związanych z uczeniem się i zapamiętywaniem w licznych modelach zwierzęcych⁸³. Jako pozytywną kontrolę testu NOR użyto donepezylu, który poza zdolnością hamowania aktywności enzymu acetylocholinoesterazy jest także silnym agonistą receptora sigma-1 (σ_1R $K_i = 14,6$ nM). Wszystkie związki podawano dootrzewnowo. Ligandy PRE-084 oraz S1RA testowane były w dwóch dawkach, odpowiednio 0,3 i 1 oraz 15 i 30 mg/kg. KSK100 testowano w trzech dawkach: 1, 3 i 10 mg/kg, natomiast donepezil, jako kontrolę pozytywną, tylko w dawce 1 mg/kg. Dobór poszczególnych dawek został oparty o dane literaturowe oraz wyniki wcześniejszych eksperymentów opisanych w publikacji **H5**⁸⁴⁻⁸⁶.

Na podstawie obliczonych wartości indeksu dyskryminacji można zauważyć wyraźne różnice w procesach związanych z pamięcią u szczurów po podaniu badanych związków. Obydwaj testowani agoniści σ_1R (PRE-084 i donepezil) poprawili proces uczenia się i zapamiętywania w teście NOR, czego



Rysunek 11. Schemat testu rozpoznawania nowego obiektu (NOR).

nie zaobserwowano po podaniu antagonistów tego receptora (S1RA i KSK100). Niemniej jednak, prokognitywne właściwości związku PRE-04 zaobserwowano wyłącznie w niższej dawce (0,3 mg/kg). Co ciekawe, nieliniowa zależność dawka-odpowiedź została już wielokrotnie zaobserwowana dla substancji wzmacniających funkcje poznawcze⁸⁷, również dla PRE-084⁸⁶, co tłumaczy jego efekt farmakologiczny występujący wyłącznie w dawce 0,3 mg/kg. Związek KSK100, pomimo właściwości antagonistycznych względem H₃R, nie wpłynął znacząco na proces rozpoznawania obiektu w przeprowadzonym eksperymencie. Jest to natomiast ligand dualny o równie wysokim powinowactwie do receptorów sigma-1, który wywołał efekt farmakologiczny zbliżony do referencyjnego antagonisty σ_1 R – związku S1RA.

Podsumowując, pomimo istotnych różnic we wpływie na uczenie się i pamięć pomiędzy agonistami i antagonistami σ_1 R, nieliniowa zależność dawka-odpowiedź związku referencyjnego PRE-084 nie uzasadnia stosowania testu NOR jako rutynowej metody do oceny aktywności funkcjonalnej ligandów receptora sigma-1. Wydaje się, że testy funkcjonalne w modelu analgezji opioidowej pozwalają na bardziej precyzyjną ocenę czy testowane związki mają profil agonisty czy też antagonisty σ_1 R.

4.4.4 Podsumowanie

Wyniki badań przedstawione w pracach [H1] – [H6] znacząco poszerzają aktualny stan wiedzy na temat receptorów H₃ histaminowych, glikoproteiny P oraz receptorów sigma-1. Zaprojektowane i zsyntetyzowane związki stanowią **oryginalne połączenia strukturalne**, powiększające światowe bazy wielocelowych ligandów H₃R oraz wiedzę na temat ich użyteczności farmakologicznej. **Nowatorską koncepcją było łączenie antagonizmu H₃R z blokowaniem receptorów sigma-1** i zaprojektowanie takich dwufunkcyjnych związków w grupie pochodnych piperidyny. Zdefiniowanie kluczowej cechy strukturalnej ligandów dla ich dualnej aktywności względem receptorów H₃ histaminowych oraz sigma-1 **jest wynikiem przełomowym dla rozwoju dyscypliny nauk farmaceutycznych**. Przedstawione w pracach wyniki analizy zależności struktura-aktywność pozwoliły na wyselekcjonowanie struktur wiodących i zaprojektowanie ich dalszych modyfikacji. Ponadto, uzyskane wyniki mogą stanowić cenne wskazówki i inspiracje do dalszych prac nie tylko dla mnie, ale i dla innych badaczy z dziedziny chemii

medycznej poszukujących aktywnych ligandów działających w ośrodkowym układzie nerwowym. Wyjaśnienie wpływu stanów protonacji pochodnych piperidyny i piperazyny na ich aktywność biologiczną względem σ_1R z użyciem metod eksperymentalnych, takich jak miareczkowanie potencjometryczne, badania krystalograficzne oraz miareczkowanie bezpośrednio w próbce NMR, dostarcza chemikom medycznym cennych informacji na temat zachowania związków w roztworze o fizjologicznym pH.

Przeprowadzone badania *in vivo* **potwierdzają aktywność dualnych antagonistów H_3/σ_1R w zwierzęcych modelach bólu o podłożu nocyceptywnym i neuropatycznym, jak również dają szansę na postawienie kolejnego kroku w poszukiwaniach innowacyjnych i bardziej skutecznych terapii przeciwbólowych.** Próba opracowania nowego testu *in vivo* do oceny aktywności wewnętrznej ligandów receptorów sigma-1 skłania do dalszych badań w zakresie farmakologii tej enigmatycznej grupy białek oraz podkreśla konieczność wdrożenia funkcjonalnego testu *in vitro*, aby móc rozróżnić agonistów i antagonistów σ_1R bez udziału zwierząt.

Podsumowując, wszystkie cele naukowe zaplanowane w ramach prezentowanego dzieła habilitacyjnego zostały osiągnięte. Receptor H_3 histaminowy jest niewątpliwie interesującym punktem uchwytu ligandów wielocelowych o dodatkowej zdolności hamowania glikoproteiny P, jak również blokowania receptorów sigma-1. Tak zaprojektowane związki mogą stanowić **innowacyjne narzędzia farmakologiczne w terapii licznych schorzeń ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego**, w tym nowotworów, otyłości czy bólu o zróżnicowanej etiopatologii.

4.4.5 Bibliografia

1. Medina-Franco JL, Giulianotti MA, Welmaker GS, Houghten RA. Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discov Today*. **2013** May;18(9-10):495-501.
2. Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov*. **2004** Apr;3(4):353-9.
3. Proschak E, Stark H, Merk D. Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds. *J Med Chem*. **2019** Jan 24;62(2):420-444.
4. Morphy R. Selective multitargeted drugs. W: *Polypharmacology in drug discovery*, red.: J.U. Peters. John Wiley & Sons, Hoboken **2012**, 247-262.
5. Morphy R, Kay C, Rankovic Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov Today*. **2004** Aug 1;9(15):641-51.
6. Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, Tumiatti V, Recanatini M, Melchiorre C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J Med Chem*. **2008** Feb 14;51(3):347-72.
7. Zimmermann GR, Lehár J, Keith CT. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today*. **2007** Jan;12(1-2):34-42.

8. Oset-Gasque MJ, Marco-Contelles J. Alzheimer's Disease, the "One-Molecule, One-Target" Paradigm, and the Multitarget Directed Ligand Approach. *ACS Chem Neurosci*. **2018** Mar 21;9(3):401-403.
9. Morphy R, Rankovic Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem*. **2005** Oct 20;48(21):6523-43.
10. Wichur T, Malawska B. Ligandy wielofunkcyjne: nowa strategia poszukiwania leku w terapii chorób o złożonej etiologii. *Postepy Hig Med Dosw*. **2015**;69:1423-1434.
11. Walter M, Stark H. Histamine receptor subtypes: a century of rational drug design. *Front Biosci (Schol Ed)*. **2012** Jan 1;4(2):461-88.
12. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*. **1983** Apr 28;302(5911):832-7.
13. Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev*. **1991** Jan;71(1):1-51.
14. Tiligada E, Kyriakidis K, Chazot PL, Passani MB. Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS Neurosci Ther*. **2011** Dec;17(6):620-8.
15. Łażewska D, Kieć-Kononowicz K. New developments around histamine H(3) receptor antagonists/inverse agonists: a patent review (2010 - present). *Expert Opin Ther Pat*. **2014** Jan;24(1):89-111.
16. Calik MW. Update on the treatment of narcolepsy: clinical efficacy of pitolisant. *Nat Sci Sleep*. **2017** Apr 26;9:127-133.
17. Syed YY. Pitolisant: First Global Approval. *Drugs*. **2016** Sep;76(13):1313-1318.
18. Smith SB. Introduction to Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets. *Adv Exp Med Biol*. **2017**;964:1-4.
19. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*. **2007** Nov 2;131(3):596-610.
20. Maurice T, Su TP. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther*. **2009** Nov;124(2):195-206.
21. Maurice T, Phan VL, Urani A, Kamei H, Noda Y, Nabeshima T. Neuroactive neurosteroids as endogenous effectors for the sigma1 (sigma1) receptor: pharmacological evidence and therapeutic opportunities. *Jpn J Pharmacol*. **1999** Oct;81(2):125-55.
22. Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner AM, Jansson S, Strauss SH, Nilsson O. CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*. **2006** May 19;312(5776):1040-3.
23. Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr Neuropharmacol*. **2008** Dec;6(4):344-66.
24. Díaz JL, Cuberes R, Berrocal J, Contijoch M, Christmann U, Fernández A, Port A, Holenz J, Buschmann H, Laggner C, Serafini MT, Burgueño J, Zamanillo D, Merlos M, Vela JM, Almansa C. Synthesis and biological evaluation of the 1-arylpyrazole class of $\sigma(1)$ receptor antagonists: identification of 4-{2-[5-methyl-1-(naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yloxy]ethyl}morpholine (S1RA, E-52862). *J Med Chem*. **2012** Oct 11;55(19):8211-24.

25. Romero L, Zamanillo D, Nadal X, Sánchez-Arroyos R, Rivera-Arconada I, Dordal A, Montero A, Muro A, Bura A, Segalés C, Laloya M, Hernández E, Portillo-Salido E, Escriche M, Codony X, Encina G, Burgueño J, Merlos M, Baeyens JM, Giraldo J, López-García JA, Maldonado R, Plata-Salamán CR, Vela JM. Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br J Pharmacol.* **2012** Aug;166(8):2289-306.
26. Gris G, Merlos M, Vela JM, Zamanillo D, Portillo-Salido E. S1RA, a selective sigma-1 receptor antagonist, inhibits inflammatory pain in the carrageenan and complete Freund's adjuvant models in mice. *Behav Pharmacol.* **2014** Jun;25(3):226-35.
27. Furuse T, Hashimoto K. Fluvoxamine monotherapy for psychotic depression: the potential role of sigma-1 receptors. *Ann Gen Psychiatry.* **2009** Dec 21;8:26.
28. Bhuiyan MS, Fukunaga K. Targeting sigma-1 receptor signaling by endogenous ligands for cardioprotection. *Expert Opin Ther Targets.* **2011** Feb;15(2):145-55.
29. Holysz H, Rubis B. Znaczenie polimorfizmów genu ABCB1 w odpowiedzi komórek raka piersi na chemioterapię. *Przegląd Menopauzalny.* **2013**;17(4):321-327.
30. Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx.* **2005** Jan;2(1):86-98.
31. Sauna ZE, Ambudkar SV. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000** Mar 14;97(6):2515-20.
32. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta.* **2009** May;1794(5):860-71.
33. Cascorbi I, Haenisch S. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters and clinical implications. *Methods Mol Biol.* **2010**;596:95-121.
34. Leschziner GD, Andrew T, Leach JP, Chadwick D, Coffey AJ, Balding DJ, Bentley DR, Pirmohamed M, Johnson MR. Common ABCB1 polymorphisms are not associated with multidrug resistance in epilepsy using a gene-wide tagging approach. *Pharmacogenet Genomics.* **2007** Mar;17(3):217-20.
35. Jaszczyszyn A, Gąsiorowski K, Świętek P, Malinka W, Cieślak-Boczula K, Petrus J, Czarnik-Matusiewicz B. New fluphenazine analogues as inhibitors of P-glycoprotein in human lymphocyte cultures. *Contemp Oncol (Pozn).* **2012**;16(4):332-7.
36. Adigbli DK, Wilson DG, Farooqui N, Sousi E, Riskey P, Taylor I, MacRobert AJ, Loizidou M. Photochemical internalisation of chemotherapy potentiates killing of multidrug-resistant breast and bladder cancer cells. *Br J Cancer.* **2007** Aug 20;97(4):502-12.
37. Szelağ A, Merwid-Ląd A. Rola Histaminy w Rozwoju Nowotworów II. Udział Poszczególnych Klas Receptorów Histaminowych: H1 , H2 , H3 , H4 Oraz H (Ic) w Rozwoju Nowotworów. *Adv Clin Exp Med.* **2005**;14(1):163-170.
38. Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. *Br J Pharmacol.* **2010** Oct;161(4):755-67.
39. Szczepańska K, Karcz T, Kotańska M, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, Mogilski S, Hagenow S, Lubelska A, Sobolewski M, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Optimization and preclinical

- evaluation of novel histamine H₃receptor ligands: Acetyl and propionyl phenoxyalkyl piperazine derivatives. *Bioorg Med Chem.* **2018** Dec 15;26(23-24):6056-6066 [A7].
40. Szczepańska K, Karcz T, Mogilski S, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, Kubacka M, Hagenow S, Lubelska A, Olejarz A, Kotańska M, Sadek B, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Synthesis and biological activity of novel tert-butyl and tert-pentylphenoxyalkyl piperazine derivatives as histamine H₃R ligands. *Eur J Med Chem.* **2018** May 25;152:223-234 [A5].
 41. Latacz G, Lubelska A, Jastrzębska-Więsek M, Partyka A, Sobilo A, Olejarz A, Kucwaj-Brysz K, Satała G, Bojarski AJ, Wesołowska A, Kieć-Kononowicz K, Handzlik J. In the search for a lead structure among series of potent and selective hydantoin 5-HT₇ R agents: The drug-likeness in vitro study. *Chem Biol Drug Des.* **2017** Dec;90(6):1295-1306.
 42. Riddy DM, Cook AE, Shackelford DM, Pierce TL, Mocaer E, Mannoury la Cour C, Sors A, Charman WN, Summers RJ, Sexton PM, Christopoulos A, Langmead CJ. Drug-receptor kinetics and sigma-1 receptor affinity differentiate clinically evaluated histamine H₃ receptor antagonists. *Neuropharmacology.* **2019** Jan;144:244-255.
 43. Villard V, Espallergues J, Keller E, Vamvakides A, Maurice T. Anti-amnesic and neuroprotective potentials of the mixed muscarinic receptor/sigma 1 (σ 1) ligand ANAVEX2-73, a novel aminotetrahydrofuran derivative. *J Psychopharmacol.* **2011** Aug;25(8):1101-17.
 44. Meunier J, Ieni J, Maurice T. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma1 receptor. *Br J Pharmacol.* **2006** Dec;149(8):998-1012.
 45. Mishina M, Ishiwata K, Ishii K, Kitamura S, Kimura Y, Kawamura K, Oda K, Sasaki T, Sakayori O, Hamamoto M, Kobayashi S, Katayama Y. Function of sigma1 receptors in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* **2005** Aug;112(2):103-7.
 46. Medhurst AD, Atkins AR, Beresford IJ, Brackenborough K, Briggs MA, Calver AR, Cilia J, Cluderay JE, Crook B, Davis JB, Davis RK, Davis RP, Dawson LA, Foley AG, Gartlon J, Gonzalez MI, Heslop T, Hirst WD, Jennings C, Jones DN, Lacroix LP, Martyn A, Ociepka S, Ray A, Regan CM, Roberts JC, Schogger J, Southam E, Stean TO, Trail BK, Upton N, Wadsworth G, Wald JA, White T, Witherington J, Woolley ML, Worby A, Wilson DM. GSK189254, a novel H₃ receptor antagonist that binds to histamine H₃ receptors in Alzheimer's disease brain and improves cognitive performance in preclinical models. *J Pharmacol Exp Ther.* **2007** Jun;321(3):1032-45.
 47. Bautista-Aguilera ÓM, Budni J, Mina F, Medeiros EB, Deuther-Conrad W, Entrena JM, Moraleda I, Iriepa I, López-Muñoz F, Marco-Contelles J. Contilisant, a Tetratarget Small Molecule for Alzheimer's Disease Therapy Combining Cholinesterase, Monoamine Oxidase Inhibition, and H₃R Antagonism with S₁R Agonism Profile. *J Med Chem.* **2018** Aug 9;61(15):6937-6943.
 48. Katz JL, Hiranita T, Hong WC, Job MO, McCurdy CR. A Role for Sigma Receptors in Stimulant Self-Administration and Addiction. *Handb Exp Pharmacol.* **2017**;244:177-218.
 49. Cottone P, Wang X, Park JW, Valenza M, Blasio A, Kwak J, Iyer MR, Steardo L, Rice KC, Hayashi T, Sabino V. Antagonism of sigma-1 receptors blocks compulsive-like eating. *Neuropsychopharmacology.* **2012** Nov;37(12):2593-604.
 50. Medhurst SJ, Collins SD, Billinton A, Bingham S, Dalziel RG, Brass A, Roberts JC, Medhurst AD, Chessell IP. Novel histamine H₃ receptor antagonists GSK189254 and GSK334429 are efficacious in surgically-induced and virally-induced rat models of neuropathic pain. *Pain.* **2008** Aug 15;138(1):61-69.

51. Sánchez-Fernández C, Montilla-García Á, González-Cano R, Nieto FR, Romero L, Artacho-Cordón A, Montes R, Fernández-Pastor B, Merlos M, Baeyens JM, Entrena JM, Cobos EJ. Modulation of peripheral μ -opioid analgesia by σ_1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **2014** Jan;348(1):32-45.
52. Szczepańska K, Karcz T, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, Bednarski M, Szafarz M, Hagenow S, Lubelska A, Olejarz-Maciej A, Sobolewski M, Mika K, Kotańska M, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Structural modifications and in vitro pharmacological evaluation of 4-pyridyl-piperazine derivatives as an active and selective histamine H_3 receptor ligands. *Bioorg Chem.* **2019** Oct;91:103071 [A8].
53. Hancock AA, Bennani YL, Bush EN, Esbenshade TA, Faghieh R, Fox GB, Jacobson P, Knourek-Segel V, Krueger KM, Nuss ME, Pan JB, Shapiro R, Witte DG, Yao BB. Antiobesity effects of A-331440, a novel non-imidazole histamine H_3 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* **2004** Mar 8;487(1-3):183-97.
54. Kottke T, Sander K, Weizel L, Schneider EH, Seifert R, Stark H. Receptor-specific functional efficacies of alkyl imidazoles as dual histamine H_3/H_4 receptor ligands. *Eur J Pharmacol.* **2011** Mar 11;654(3):200-8.
55. Baumeister P, Erdmann D, Biselli S, Kagermeier N, Elz S, Bernhardt G, Buschauer A. [(3) H]UR-DE257: development of a tritium-labeled squaramide-type selective histamine H_2 receptor antagonist. *ChemMedChem.* **2015** Jan;10(1):83-93.
56. Bartole E, Littmann T, Tanaka M, Ozawa T, Buschauer A, Bernhardt G. [³H]UR-DEBa176: A 2,4-Diaminopyrimidine-Type Radioligand Enabling Binding Studies at the Human, Mouse, and Rat Histamine H_4 Receptors. *J Med Chem.* **2019** Sep 12;62(17):8338-8356.
57. Höring C, Seibel U, Tropmann K, Grätz L, Mönnich D, Pitzl S, Bernhardt G, Pockes S, Strasser A. A Dynamic, Split-Luciferase-Based Mini-G Protein Sensor to Functionally Characterize Ligands at All Four Histamine Receptor Subtypes. *Int J Mol Sci.* **2020** Nov 10;21(22):8440.
58. Ligneau X, Perrin D, Landais L, Camelin JC, Calmels TP, Berrebi-Bertrand I, Lecomte JM, Parmentier R, Anaclet C, Lin JS, Bertaina-Anglade V, la Rochelle CD, d'Aniello F, Rouleau A, Gbahou F, Arrang JM, Ganellin CR, Stark H, Schunack W, Schwartz JC. BF2.649 [1-{3-[3-(4-Chlorophenyl)propoxy]propyl}piperidine, hydrochloride], a nonimidazole inverse agonist/antagonist at the human histamine H_3 receptor: Preclinical pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* **2007** Jan;320(1):365-75.
59. Nehmé R, Carpenter B, Singhal A, Strega A, Edwards PC, White CF, Du H, Grisshammer R, Tate CG. Mini-G proteins: Novel tools for studying GPCRs in their active conformation. *PLoS One.* **2017** Apr 20;12(4):e0175642.
60. Szczepańska K, Pockes S, Podlewska S, Höring C, Mika K, Latacz G, Bednarski M, Siwek A, Karcz T, Nagl M, Bresinsky M, Mönnich D, Seibel U, Kuder KJ, Kotańska M, Stark H, Elz S, Kieć-Kononowicz K. Structural modifications in the distal, regulatory region of histamine H_3 receptor antagonists leading to the identification of a potent anti-obesity agent. *Eur J Med Chem.* **2021** Mar 5;213:113041 [B3, H3].
61. Amata E, Dichiaro M, Gentile D, Marrazzo A, Turnaturi R, Arena E, La Mantia A, Tomasello BR, Acquaviva R, Di Giacomo C, Rescifina A, Prezzavento O. Sigma Receptor Ligands Carrying a Nitric Oxide Donor Nitrate Moiety: Synthesis, In Silico, and Biological Evaluation. *ACS Med Chem Lett.* **2020** Apr 9;11(5):889-894.

62. Almansa C, Vela JM. Selective sigma-1 receptor antagonists for the treatment of pain. *Future Med Chem.* **2014** Jun;6(10):1179-99.
63. Motawe ZY, Abdelmaboud SS, Cuevas J, Breslin JW. PRE-084 as a tool to uncover potential therapeutic applications for selective sigma-1 receptor activation. *Int J Biochem Cell Biol.* **2020** Sep;126:105803.
64. Łażewska D, Kaleta M, Schwed JS, Karcz T, Mogilski S, Latacz G, Olejarz A, Siwek A, Kubacka M, Lubelska A, Honkisz E, Handzlik J, Filipek B, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Biphenyloxy-alkyl-piperidine and azepane derivatives as histamine H₃ receptor ligands. *Bioorg Med Chem.* **2017** Oct 15;25(20):5341-5354.
65. Godyń J, Zaręba P, Łażewska D, Stary D, Reiner-Link D, Frank A, Latacz G, Mogilski S, Kaleta M, Doroz-Płonka A, Lubelska A, Honkisz-Orzechowska E, Olejarz-Maciej A, Handzlik J, Stark H, Kieć-Kononowicz K, Malawska B, Bajda M. Cyanobiphenyls: Novel H₃ receptor ligands with cholinesterase and MAO B inhibitory activity as multitarget compounds for potential treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Chem.* **2021** Sep;114:105129.
66. Szczepańska K, Podlewska S, Dichiaro M, Gentile D, Patamia V, Rosier N, Mönnich D, Ruiz Cantero MC, Karcz T, Łażewska D, Siwek A, Pockes S, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H, Rescifina A, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Structural and Molecular Insight into Piperazine and Piperidine Derivatives as Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Antagonists with Promising Antinociceptive Properties. *ACS Chem Neurosci.* **2022** Jan 5;13(1):1-15 [B7, H4].
67. Pilarski B, Kaliszan R, Wyrzykowski D, Młodzianowski J, Balińska A. General analytical procedure for determination of acidity parameters of weak acids and bases. *J Anal Methods Chem.* **2015**;2015:530731.
68. Hogendorf AS, Hogendorf A, Popiołek-Barczyk K, Ciechanowska A, Mika J, Satała G, Walczak M, Latacz G, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K, Ponimaskin E, Schade S, Zeug A, Bijata M, Kubicki M, Kurczab R, Lenda T, Staroń J, Bugno R, Duszyńska B, Pilarski B, Bojarski AJ. Fluorinated indole-imidazole conjugates: Selective orally bioavailable 5-HT₇ receptor low-basicity agonists, potential neuropathic painkillers. *Eur J Med Chem.* **2019** May 15;170:261-275.
69. Kostrowicki J, Liwo A. A general method for the determination of the stoichiometry of unknown species in multicomponent systems from physicochemical measurements. *Comput Chem.* **1987**;11(3):195-210.
70. Kostrowicki J, Liwo A. Determination of equilibrium parameters by minimization of an extended sum of squares. *Talanta.* **1990**;37(6):645-650.
71. Wilson LL, Alleyne AR, Eans SO, Cirino TJ, Stacy HM, Mottinelli M, Intagliata S, McCurdy CR, McLaughlin JP. Characterization of CM-398, a Novel Selective Sigma-2 Receptor Ligand, as a Potential Therapeutic for Neuropathic Pain. *Molecules.* **2022** Jun 4;27(11):3617.
72. Mogilski S, Kubacka M, Łażewska D, Więcek M, Głuch-Lutwin M, Tyszka-Czochara M, Bukowska-Strakova K, Filipek B, Kieć-Kononowicz K. Aryl-1,3,5-triazine ligands of histamine H₄ receptor attenuate inflammatory and nociceptive response to carrageen, zymosan and lipopolysaccharide. *Inflamm Res.* **2017** Jan;66(1):79-95.
73. Sałat K, Cios A, Wyska E, Sałat R, Mogilski S, Filipek B, Więckowski K, Malawska B. Antiallodynic and antihyperalgesic activity of 3-[4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one compared to pregabalin in chemotherapy-induced neuropathic pain in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* **2014** Jul;122:173-81.

74. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. **1992** Oct;51(1):5-17.
75. Lopes SC, da Silva AV, Arruda BR, Morais TC, Rios JB, Trevisan MT, Rao VS, Santos FA. Peripheral antinociceptive action of mangiferin in mouse models of experimental pain: role of endogenous opioids, K(ATP)-channels and adenosine. *Pharmacol Biochem Behav*. **2013** Sep;110:19-26.
76. Mogilski S, Kubacka M, Redzicka A, Kazek G, Dudek M, Malinka W, Filipek B. Antinociceptive, anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the pyrrolo[3,4-d]pyridazinone derivatives: Possible mechanisms of action. *Pharmacol Biochem Behav*. **2015** Jun;133:99-110.
77. Joseph EK, Levine JD. Comparison of oxaliplatin- and cisplatin-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *J Pain*. **2009** May;10(5):534-41.
78. Popiolek-Barczyk K, Łażewska D, Latacz G, Olejarz A, Makuch W, Stark H, Kieć-Kononowicz K, Mika J. Antinociceptive effects of novel histamine H₃ and H₄ receptor antagonists and their influence on morphine analgesia of neuropathic pain in the mouse. *Br J Pharmacol*. **2018** Jul;175(14):2897-2910.
79. Chien CC, Pasternak GW. Sigma antagonists potentiate opioid analgesia in rats. *Neurosci Lett*. **1995** May 5;190(2):137-9.
80. Vidal-Torres A, de la Puente B, Rocasalbas M, Touriño C, Bura SA, Fernández-Pastor B, Romero L, Codony X, Zamanillo D, Buschmann H, Merlos M, Baeyens JM, Maldonado R, Vela JM. Sigma-1 receptor antagonism as opioid adjuvant strategy: enhancement of opioid antinociception without increasing adverse effects. *Eur J Pharmacol*. **2013** Jul 5;711(1-3):63-72.
81. Dichiaro M, Ambrosio FA, Barbaraci C, González-Cano R, Costa G, Parenti C, Marrazzo A, Pasquinucci L, Cobos EJ, Alcaro S, Amata E. Synthesis, Computational Insights, and Evaluation of Novel Sigma Receptors Ligands. *ACS Chem Neurosci*. **2023** May 17;14(10):1845-1858.
82. Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*. **2017** Aug 30;(126):55718.
83. Szczepańska K, Kuder KJ, Kieć-Kononowicz K. Dual-targeting Approach on Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Ligands as Promising Pharmacological Tools in the Treatment of CNS-linked Disorders. *Curr Med Chem*. **2021**;28(15):2974-2995 [B2, H2].
84. Szczepańska K, Karcz T, Dichiaro M, Mogilski S, Kalinowska-Tłuścik J, Pilarski B, Leniak A, Pietruś W, Podlewska S, Popiolek-Barczyk K, Humphrys LJ, Ruiz-Cantero MC, Reiner-Link D, Leitzbach L, Łażewska D, Pockes S, Górka M, Zmysłowski A, Calmels T, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Dual Piperidine-Based Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Ligands in the Treatment of Nociceptive and Neuropathic Pain. *J Med Chem*. **2023** Jul 27;66(14):9658-9683 [B13, H5].
85. Ruiz-Leyva L, Salguero A, Morón I, Portillo-Salido E, Cendán CM, Pautassi RM. Sigma-1 antagonism inhibits binge ethanol drinking at adolescence. *Drug Alcohol Depend*. **2020** Oct 1;215:108214.
86. Maurice T, Su TP, Parish DW, Nabeshima T, Privat A. PRE-084, a sigma selective PCP derivative, attenuates MK-801-induced impairment of learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. **1994** Dec;49(4):859-69.

87. Braidia D, Paladini E, Griffini P, Lamperti M, Maggi A, Sala M. An inverted U-shaped curve for heptylphosphostigmine on radial maze performance in rats: comparison with other cholinesterase inhibitors. *Eur J Pharmacol.* **1996** Apr 29;302(1-3):13-20.

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

5.1 Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Swoją pracę naukową rozpoczęłam tuż po ukończeniu studiów magisterskich na kierunku farmacja, w lipcu 2014 roku, gdy jako stażystka kontynuowałam pracę w Zespole Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM w Krakowie, gdzie uprzednio wykonywałam badania do pracy magisterskiej.

W październiku 2015 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w KTiBŚL pod opieką prof. dr hab. Katarzyny Kieć-Kononowicz. W swojej pracy badawczej zajmowałam się syntezą selektywnych ligandów o spodziewanej aktywności względem receptorów H_3 histaminowych oraz badaniem ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych.

Podczas studiów doktoranckich kierowałam grantem Narodowego Centrum Nauki – Preludium: *Pochodne piperazyny jako aktywne ligandy receptorów H_3 histaminowych – modelowanie molekularne, synteza, ewaluacja farmakologiczna* oraz projektem celowym Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: *Poszukiwanie ligandów receptorów H_3 histaminowych w grupie N-podstawionych piperazyny*. Ponadto, swoje doświadczenie w syntezie organicznej poszerzyłam współpracując w czterech kolejnych projektach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (Maestro – 1 projekt, Opus – 2 projekty) oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (1 projekt). Mój wkład w wyżej wymienione granty badawcze obejmował syntezę oraz resyntezę ligandów różnych celów biologicznych, w tym receptorów oddziałujących z białkami G i kanałów jonowych. Praca w ramach tych projektów zaowocowała moim współautorstwem w 10 artykułach naukowych, które zostały wymienione poniżej wraz z opisem mojego wkładu (w nawiasach kwadratowych znajdują się symbole prac z *Wykazu Osiągnięć Naukowych*, część z nich została opublikowana po nadaniu mi stopnia naukowego doktora):

- Zsyntetyzowałam nowe narzędzia farmakologiczne do badań receptorów jonotropowych AMPA oraz kainowych:
 - Szymańska E, Chałupnik P, **Szczepańska K**, Cuñado Moral AM, Pickering DS, Nielsen B, Johansen TN, Kieć-Kononowicz K. Design, synthesis and structure-activity relationships of novel phenylalanine-based amino acids as kainate receptors ligands. *Bioorg Med Chem Lett.* **2016** Nov 15;26(22):5568-5572 [A1].

- Szymańska E, Nielsen B, Johansen TN, Cuñado Moral AM, Pickering DS, **Szczepańska K**, Mickowska A, Kieć-Kononowicz K. Pharmacological characterization and binding modes of novel racemic and optically active phenylalanine-based antagonists of AMPA receptors. *Eur J Med Chem.* **2017** Sep 29;138:874-883 [A3].
- Zsyntetyzowałam selektywne ligandy receptorów H₃ histaminowych o właściwościach przeciwpadaczkowych:
 - Kuder KJ, Łażewska D, Kaleta M, Latacz G, Kottke T, Olejarz A, Karcz T, Fruziński A, **Szczepańska K**, Karolak-Wojciechowska J, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Synthesis and biological activity of novel tert-amylphenoxyalkyl (homo)piperidine derivatives as histamine H₃R ligands. *Bioorg Med Chem.* **2017** May 15;25(10):2701-2712 [A2].
- Zaprojektowałam oraz zsyntetyzowałam ligandy receptorów H₃ histaminowych mające zdolność do redukcji masy ciała, działania anorektycznego i hipoglikemizującego oraz poprawiające parametry metaboliczne u badanych zwierząt:
 - Kotańska M, Kuder KJ, **Szczepańska K**, Sapa J, Kieć-Kononowicz K. The histamine H₃ receptor inverse agonist pitolisant reduces body weight in obese mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **2018** Aug;391(8):875-881 [A6].
 - Kotańska M, Mika K, Reguła K, **Szczepańska K**, Szafarz M, Bednarski M, Olejarz-Maciej A, Nowak K, Latacz G, Mogilski S, Kuder KJ, Kieć-Kononowicz K, Sapa J. KSK19 - Novel histamine H₃ receptor ligand reduces body weight in diet induced obese mice. *Biochem Pharmacol.* **2019** Oct;168:193-203 [A9].
 - Mika K, Szafarz M, Bednarski M, Kuder K, **Szczepańska K**, Pociecha K, Pomierny B, Kieć-Kononowicz K, Sapa J, Kotańska M. Metabolic benefits of novel histamine H₃ receptor ligands in the model of excessive eating: The importance of intrinsic activity and pharmacokinetic properties. *Biomed Pharmacother.* **2021** Oct;142:111952 [B5].
 - Mika K, Szafarz M, Bednarski M, Latacz G, Sudoł S, Handzlik J, Pociecha K, Knutelska J, Nicosia N, **Szczepańska K**, Kuder KJ, Kieć-Kononowicz K, Kotańska M. Histamine H₃ Receptor Ligands-KSK-59 and KSK-73-Reduce Body Weight Gain in a Rat Model of Excessive Eating. *Pharmaceuticals (Basel).* **2021** Oct 25;14(11):1080 [B6].
 - Mika K, Szafarz M, Zadrożna M, Nowak B, Bednarski M, **Szczepańska K**, Pociecha K, Kubacka M, Nicosia N, Juda I, Kieć-Kononowicz K, Kotańska M. KSK-74: Dual Histamine H₃ and Sigma-2 Receptor Ligand with Anti-Obesity Potential. *Int J Mol Sci.* **2022** Jun 24;23(13):7011 [B8].
 - Mika K, Szafarz M, Bednarski M, Siwek A, **Szczepańska K**, Kieć-Kononowicz K, Kotańska M. Evaluation of Some Safety Parameters of Dual Histamine H₃ and Sigma-2

Receptor Ligands with Anti-Obesity Potential. *Int J Mol Sci.* **2023** Apr 19;24(8):7499 [B11].

- Zsyntetyzowałam dualne ligandy receptorów H₃ histaminowych o dodatkowych właściwościach antyoksydacyjnych i potencjale terapeutycznym w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych:
 - Kuder KJ, Kotańska M, **Szczepańska K**, Mika K, Reiner-Link D, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Discovery of Potential, Dual-Active Histamine H₃ Receptor Ligands with Combined Antioxidant Properties. *Molecules.* **2021** Apr 15;26(8):2300 [B4].

W maju 2018 roku wygrałam ogólnopolskie przesłuchania Polskiego Towarzystwa Chemii Medycznej, w wyniku których reprezentowałam Polskę na V Sympozjum Młodych Naukowców Europejskiej Federacji Chemii Medycznej w Lublanie.

W latach 2018 – 2020 realizowałam dwuletni, anglojęzyczny program kształcenia dla zaawansowanych Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego *Jagiellonian Interdisciplinary PhD Programme* (JIPhDP), chcąc rozwijać swoje umiejętności oraz zapoznać się z praktykami badawczymi w innych obszarach i dyscyplinach nauki. W ramach dwumiesięcznego stażu naukowego finansowanego przez JIPhDP nawiązałam współpracę z zespołem prof. Sigurda Elza z Instytutu Chemii Medycznej i Farmaceutycznej Uniwersytetu w Regensburgu, gdzie pod opieką dr. Steffena Pockesa scharakteryzowałam właściwości antagonistyczne otrzymanych przeze mnie związków względem receptorów H₃ (test rekrutacji białka mini-G) oraz oznaczyłam ich powinowactwo do pozostałych podtypów receptorów histaminowych (badania radioreceptorowe).

8 czerwca 2020 roku na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM obroniłam z wyróżnieniem rozprawę doktorską zatytułowaną *The search for novel histamine H₃ receptor ligands in the group of piperazine derivatives*. Jest ona **moim kolejnym osiągnięciem, które stanowi istotny wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych**. W pracy doktorskiej, poza rozwiązaniem problemu naukowego, **byłam wiodącym twórcą koncepcji**, która zakładała zaprojektowanie i otrzymanie nowatorskich związków chemicznych oraz ich ewaluację farmakologiczną, w ramach której **odpowiadałam za analizę otrzymanych wyników**. Co więcej, moja praca doktorska miała charakter interdyscyplinarny i została zrealizowana we współpracy z trzema zagranicznymi ośrodkami naukowymi – Uniwersytetem w Düsseldorfie (grupa badawcza prof. Holgera Starka), Regensburgu (grupa badawcza prof. Sigurda Elza) oraz Zjednoczonych Emiratach Arabskich (grupa badawcza prof. Bassema Sadka). Stanowił ją cykl **5 publikacji naukowych** o łącznym współczynniku oddziaływania IF = **21,320**, natomiast łączna liczba punktów MNiSW wynosiła **310**:

1. **Szczepańska K**, Karcz T, Mogilski S, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, Kubacka M, Hagenow S, Lubelska A, Olejarz A, Kotańska M, Sadek B, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Synthesis and

- biological activity of novel tert-butyl and tert-pentylphenoxyalkyl piperazine derivatives as histamine H₃R ligands. *Eur J Med Chem.* **2018** May 25;152:223-234 [A5].
2. **Szczepańska K**, Karcz T, Kotańska M, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, Mogilski S, Hagenow S, Lubelska A, Sobolewski M, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Optimization and preclinical evaluation of novel histamine H₃ receptor ligands: Acetyl and propionyl phenoxyalkyl piperazine derivatives. *Bioorg Med Chem.* **2018** Dec 15;26(23-24):6056-6066 [A7].
 3. **Szczepańska K**, Karcz T, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, Bednarski M, Szafarz M, Hagenow S, Lubelska A, Olejarz-Maciej A, Sobolewski M, Mika K, Kotańska M, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Structural modifications and in vitro pharmacological evaluation of 4-pyridyl-piperazine derivatives as an active and selective histamine H₃ receptor ligands. *Bioorg Chem.* **2019** Oct;91:103071 [A8].
 4. **Szczepanska K**, Kuder K, Kiec-Kononowicz K. Histamine H₃ Receptor Ligands in the Group of (Homo)piperazine Derivatives. *Curr Med Chem.* **2018**;25(14):1609-1626 [A4].
 5. Kotańska M, Mika K, Reguła K, **Szczepańska K**, Szafarz M, Bednarski M, Olejarz-Maciej A, Nowak K, Latacz G, Mogilski S, Kuder KJ, Kieć-Kononowicz K, Sapa J. KSK19 - Novel histamine H₃ receptor ligand reduces body weight in diet induced obese mice. *Biochem Pharmacol.* **2019** Oct;168:193-203 [A9].

W wyniku przeprowadzonych badań do pracy doktorskiej otrzymałam 80 związków finalnych. Analiza zależności struktura-aktywność pozwoliła na wyłonienie ugrupowania 4-pirydylopiiperazyny jako kluczowego elementu strukturalnego zapewniającego wysokie powinowactwo związków do receptorów H₃ histaminowych. Najbardziej aktywne ligandy wykazały właściwości przeciwdrgawkowe, a związek KSK19 dodatkowy profil prokognitywny w mysich modelach zwierzęcych (badania we współpracy z dr. Szczepanem Mogilskim, Zakład Farmakodynamiki Katedry Farmakodynamiki UJ CM, [A5]). W związku z powyższym, ligand KSK19 został wybrany jako nowa struktura wiodąca do dalszych badań, gdzie oceniano jego wpływ na masę ciała w modelu nadmiernego objadania się (współpraca z dr hab. Magdaleną Kotańską, Zakład Wstępnych Badań Farmakologicznych Katedry Farmakodynamiki UJ CM). Zwierzęta karmione dietą wysokotłuszczową i otrzymujące związek KSK19 miały znacznie mniejszy przyrost masy ciała, w porównaniu z grupą kontrolną. Co więcej, 21-dniowe leczenie otyłych zwierząt ligandem KSK19 także znacząco poprawiło tolerancję glukozy i insulinooporność [A9].

5.1.1 Podsumowanie dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Liczba publikacji w bazie JCR: **9**

Liczba publikacji w bazie JCR jako pierwszy autor: **4**

Sumaryczny IF: **33,529**

Łączna liczba punktów MNiSW: **430**

5.2 Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Jeszcze przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, złożyłam wniosek o grant badawczy w programie Narodowego Centrum Nauki Sonatina. Projekt otrzymał finansowanie, a jego realizacja ma miejsce w Zakładzie Chemii Leków IF PAN kierowanym przez prof. dr. hab. Andrzeja J. Bojarskiego, gdzie 1 października 2020 roku podjęłam zatrudnienie na stanowisku asystenta.

Ponadto, zaraz po obronie pracy doktorskiej pracowałam jako specjalista w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM, gdzie w zespole prof. dr. hab. Marcina Kołaczkowskiego zajmowałam się syntezą selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora serotoninowego 5-HT_{1A}.

Kontynuacja pracy w KTiBŚL kierowanej przez prof. dr. hab. inż. Jadwigę Handzlik pozwoliła mi nawiązać współpracę z zespołem badawczym Dr Gabrielli Spengler z Uniwersytetu w Szegedzie.

Biorąc pod uwagę, że oporność wielolekowa jest główną przyczyną niepowodzeń chemioterapii w leczeniu nowotworów, jak również fakt, że histamina bierze udział w proliferacji komórek, celem naszych wspólnych badań było określenie potencjalnego wpływu ligandów H₃R na aktywność nowotworowej pompy wyrzutu leków ABCB1 w komórkach mysiego chłoniaka z limfocytów T. Ponadto, dla wszystkich badanych związków określiliśmy ich aktywność cytotoksyczną oraz antyproliferacyjną. Co ciekawe, 4 najbardziej aktywne ligandy wykazały silne działanie hamujące aktywność pompy ABCB1 oraz właściwości cytotoksyczne i antyproliferacyjne, jednakże miały one niskie powinowactwo do receptorów H₃ histaminowych.

- **Szczepańska K**, Kincses A, Vincze K, Szymańska E, Latacz G, Kuder KJ, Stark H, Spengler G, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K. N-Substituted piperazine derivatives as potential multitarget agents acting on histamine H₃ receptor and cancer resistance proteins. *Bioorg Med Chem Lett.* **2020** Nov 15;30(22):127522 [B1, H1].

W projekcie badawczym Sonatina zajmuję się projektowaniem i syntezą dualnych ligandów receptorów H₃ histaminowych oraz sigma-1 jako nowych narzędzi farmakologicznych w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego, ze szczególnym uwzględnieniem bólu neuropatycznego. Te dwie różne struktury biologiczne, receptory H₃ histaminowe oraz sigma-1, mają jednakowo wysoką ekspresję w ośrodkowym układzie nerwowym i mogą stanowić potencjalne cele terapeutyczne w rozwoju badań nad terapią licznych chorób ludzkich, takich jak otyłość, ból, uzależnienie czy choroby neurodegeneracyjne. Do końca roku 2021 nie było danych w literaturze na temat racjonalnego projektowania i otrzymywania dwufunkcyjnych ligandów receptorów H₃ oraz sigma-1, a mój poniższy artykuł był pierwszym przeglądem literaturowym na temat potencjału terapeutycznego jednoczesnego oddziaływania na te dwa cele biologiczne.

- **Szczepańska K**, Kuder KJ, Kieć-Kononowicz K. Dual-targeting Approach on Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Ligands as Promising Pharmacological Tools in the Treatment of CNS-linked Disorders. *Curr Med Chem.* **2021**;28(15):2974-2995 [B2, H2].

W swojej aktualnej pracy naukowej łączę elementy projektowania, syntezy oraz charakterystyki farmakologicznej *in vitro* nowych kandydatów na leki, a grant Sonatina planuję zakończyć czteromiesięcznym stażem badawczym na Uniwersytecie w Newcastle, gdzie ocenię właściwości farmakologiczne otrzymanych związków w testach na zwierzętach. Jak dotąd, prace projektowe zaowocowały opublikowaniem pięciu manuskryptów badawczych. W pierwszym z nich zaprojektowałam i otrzymałam serię 12 nowych antagonistów receptora H₃ histaminowego, w tym związki KSK67, KSK68 oraz KSK94, które zostały wybrane jako struktury wiodące do dalszych badań. Co więcej, ligand KSK94 (analog strukturalny związku A-331440 przedsiębiorstwa farmaceutycznego Abbott) zmniejszył ilość przyjmowanych kalorii w testach na zwierzętach, co potwierdziło jego potencjał terapeutyczny w leczeniu otyłości.

- **Szczepańska K**, Pockes S, Podlewska S, Höring C, Mika K, Latacz G, Bednarski M, Siwek A, Karcz T, Nagl M, Bresinsky M, Mönnich D, Seibel U, Kuder KJ, Kotańska M, Stark H, Elz S, Kieć-Kononowicz K. Structural modifications in the distal, regulatory region of histamine H₃ receptor antagonists leading to the identification of a potent anti-obesity agent. *Eur J Med Chem.* **2021** Mar 5;213:113041 [B3, H3].

Biorąc pod uwagę możliwą interakcję ligandów receptorów H₃ histaminowych z receptorami sigma-1 oraz potencjał terapeutyczny płynący z jednoczesnego oddziaływania na te dwa cele biologiczne, głównym celem kolejnej pracy było określenie powinowactwa do receptorów sigma dla dwudziestu ligandów H₃R. Związki te zostały wyselekcjonowane spośród biblioteki antagonistów receptorów H₃ otrzymanych przeze mnie we wcześniejszych badaniach, a powinowactwo do receptorów sigma-1 oraz sigma-2 zostało oznaczone we współpracy z grupą badawczą prof. Emanuele Amaty z Uniwersytetu w Katanii. Dwa spośród przebadanych związków (KSK68 oraz E377) okazały się być silnymi antagonistami obydwu celów biologicznych o obiecujących właściwościach przeciwbólowych w modelu zwierzęcym. Badania *in vivo* zostały przeprowadzone we współpracy z grupą badawczą dr. Enrique José Cobosa z Uniwersytetu w Granadzie. Co ciekawe, w wyniku analizy zależności struktura-aktywność zaobserwowaliśmy, że związek KSK68 zawierający w swej strukturze fragment 4-pirydylopiperydyny wykazał jednakowo wysokie powinowactwo do receptorów H₃ oraz sigma-1, natomiast jego analog strukturalny KSK67 różniący się jedynie częścią zasadową (fragment 4-pirydylopiperyazy), był selektywny względem H₃R i nie oddziaływał z receptorami sigma-1.

- **Szczepańska K**, Podlewska S, Dichiaro M, Gentile D, Patamia V, Rosier N, Mönnich D, Ruiz Cantero MC, Karcz T, Łażewska D, Siwek A, Pockes S, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H,

Rescifina A, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Structural and Molecular Insight into Piperazine and Piperidine Derivatives as Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Antagonists with Promising Antinociceptive Properties. *ACS Chem Neurosci*. **2022** Jan 5;13(1):1-15 [B7, H4].

Mając na uwadze tak spektakularne wyniki analizy SAR, w kolejnym etapie badań postanowiliśmy połączyć metody chemiczne, biologiczne i obliczeniowe w celu określenia właściwości molekularnych odpowiedzialnych za selektywne lub dwukierunkowe wiązanie badanych pochodnych piperydyny i piperazyny z receptorami H₃ histaminowymi oraz sigma-1. Następnie zaprojektowałam serię 16 nowych ligandów, dla której przeprowadziliśmy ich charakterystykę farmakologiczną metodami *in vitro*. Badania farmakologii bezpieczeństwa pozwoliły nam wyłonić związek KSK100 jako strukturę wiodącą do oceny jego działania przeciwbólowego *in vivo*. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazują, że ligand KSK100 może łączyć zarówno ból neuropatyczny wywołany chemioterapią, jak i spowodowany uszkodzeniem nerwu kulszowego. Potwierdza to jego szerokie spektrum działania przeciwbólowego opartego na nowatorskim mechanizmie molekularnym.

- **Szczepańska K**, Karcz T, Dichiara M, Mogilski S, Kalinowska-Tłuścik J, Pilarski B, Leniak A, Pietruś W, Podlewska S, Popiołek-Barczyk K, Humphrys LJ, Ruiz-Cantero MC, Reiner-Link D, Leitzbach L, Łażewska D, Pockes S, Górka M, Zmysłowski A, Calmels T, Cobos EJ, Marrazzo A, Stark H, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K. Dual Piperidine-Based Histamine H₃ and Sigma-1 Receptor Ligands in the Treatment of Nociceptive and Neuropathic Pain. *J Med Chem*. **2023** Jul 27;66(14):9658-9683 [B13, H5].

Niewątpliwie, bardzo istotnym problemem w projektowaniu związków o profilu antagonistycznym względem receptorów sigma-1 jest fakt, że wciąż nie ma opracowanych kanonicznych testów funkcjonalnych *in vitro* do oceny aktywności wewnętrznej ligandów σ_1 R. Najczęstszą metodą charakterystyki profilu funkcjonalnego ligandów receptorów sigma-1 pozostają testy na zwierzętach. Z tego względu, we współpracy z grupą badawczą prof. dr hab. Piotra Popika z Zakładu Badań Nowych Leków IF PAN, postanowiliśmy sprawdzić użyteczność testu rozpoznawania nowego obiektu do oceny aktywności agonistycznej/antagonistycznej ligandów σ_1 R. Pomimo zaobserwowanych różnic w tym teście pomiędzy agonistami oraz antagonistami σ_1 R, nieliniowy efekt dawka-zależność dla referencyjnego agonisty receptorów sigma-1, nie uzasadnia tej metody do rutynowej oceny aktywności funkcjonalnej związków o omawianym profilu receptorowym.

- **Szczepańska K**, Bojarski AJ, Popik P, Malikowska-Racia N. Novel object recognition test as an alternative approach to assessing the pharmacological profile of sigma-1 receptor ligands. *Pharmacol Rep*. **2023** Oct;75(5):1291-1298 [B14, H6].

Zważywszy na fakt, że swędzenie i ból są blisko spokrewnionymi, ale wciąż odrębnymi odczuciami, które w dużej mierze mają wspólne mediatory, w kolejnym etapie badań postanowiliśmy sprawdzić

skuteczność terapeutyczną dualnego liganda H_3/σ_1R – związku E153 w zwierzęcych modelach bólu oraz świądu zależnego i niezależnego od histaminy. Badania te przeprowadził dr Szczepan Mogilski z Katedry Farmakodynamiki UJ CM. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że ligand E153 ma właściwości zarówno przeciwbólowe, jak i przeciwświądowe w zwierzęcych modelach bólu i świądu o różnym pochodzeniu i mechanizmach. Ostatecznie udowodniliśmy, że na działanie przeciwbólowe związku wpływa antagonizm receptorów sigma-1 oraz receptorów H_3 histaminowych, natomiast działanie przeciwświądowe w większym stopniu zależy od antagonizmu σ_1R .

- Mogilski S, Kubacka M, Świerczek A, Wyska E, **Szczepańska K**, Sapa J, Kieć-Kononowicz K, Łażewska D. Mogilski S, Kubacka M, Świerczek A, Wyska E, Szczepańska K, Sapa J, Kieć-Kononowicz K, Łażewska D. Efficacy of the Multi-Target Compound E153 in Relieving Pain and Pruritus of Different Origins. *Pharmaceuticals* (Basel). **2023** Oct 17;16(10):1481. [B15].

Współpraca z dr. Tadeuszem Karczem z KTiBŚL pozwoliła mi nabyć umiejętności z zakresu oceny wybranych parametrów ADME (ang. *Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion*) nowych kandydatów na leki metodami *in vitro*, **które stanowią moje kolejne osiągnięcie o istotnym wkładzie w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych**. Przeprowadzone przeze mnie badania przenikalności związków przez sztuczną błonę biologiczną w teście PAMPA (ang. *parallel artificial membrane permeability assay*) zaowocowały współautorstwem w poniższych publikacjach:

- Bartuzi D, Kędzierska E, Targowska-Duda KM, Koszła O, Wróbel TM, Jademyr S, Karcz T, **Szczepańska K**, Stępnicki P, Wronikowska-Denysiuk O, Biała G, Handzlik J, Kristensen JL, Poso A, Kaczor AA. Funnel metadynamics and behavioral studies reveal complex effect of D2AAK1 ligand on anxiety-like processes. *Sci Rep*. **2022** Dec 7;12(1):21192 [B9].
- Stępnicki P, Targowska-Duda KM, Martínez AL, Zięba A, Wronikowska-Denysiuk O, Wróbel MZ, Bartyzel A, Trzpił A, Wróbel TM, Chodkowski A, Mirecka K, Karcz T, **Szczepańska K**, Loza MI, Budzyńska B, Turło J, Handzlik J, Fornal E, Poleszak E, Castro M, Kaczor AA. Discovery of novel arylpiperazine-based DA/5-HT modulators as potential antipsychotic agents - Design, synthesis, structural studies and pharmacological profiling. *Eur J Med Chem*. **2023** Apr 5;252:115285 [B10].
- Chałupnik P, Vialko A, Pickering DS, Nielsen B, Bay Y, Skov Kristensen A, Hinkkanen M, **Szczepańska K**, Karcz T, Latacz G, Johansen TN, Szymańska E. Structure-Activity Relationship and Solubility Studies of N1-Substituted Quinoxaline-2,3-diones as Kainate Receptor Antagonists. *ChemMedChem*. **2023** Jun 30:e202300278 [B12].

Za dotychczasowe osiągnięcia naukowe zostałam uhonorowana stypendium dla najlepszych młodych naukowców START 2021, przyznawanym przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, a moja rozprawa doktorska została wyróżniona certyfikatem Europejskiej Sieci Doktorantów Paula Ehrlicha.

We wrześniu 2022 roku rozpoczęłam trzymiesięczny staż badawczy w Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Florydzkiego pod kierownictwem naukowym prof. Christophera R McCurdy'ego, w trakcie którego oznaczyłam powinowactwo wyselekcjonowanych związków do receptorów sigma-1. W grudniu 2022 roku zostałam laureatką konkursu Opus 23 Narodowego Centrum Nauki. Projekt badawczy *Rola jednoczesnej i indywidualnej modulacji receptorów μ -opiodowych, sigma-1 oraz H_3 histaminowych jako nowe podejście terapeutyczne w leczeniu bólu o podłożu nocyceptywnym i neuropatycznym* (2022/45/B/NZ7/03101) realizuję we współpracy z firmą Celon Pharma S.A.

5.2.1 Podsumowanie dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Liczba publikacji w bazie JCR: **15**

Liczba publikacji w bazie JCR jako pierwszy autor: **6**

Sumaryczny IF: **79,412**

Łączna liczba punktów MNiSW: **1950**

5.3 Przedstawienie sumarycznego dorobku działalności naukowo-badawczej (2016-2024) (dotyczy wszystkich publikacji)

Liczba publikacji w bazie JCR: **24**

Liczba publikacji w bazie JCR jako pierwszy autor: **10**

Sumaryczny IF: **112,941**

Łączna liczba punktów MNiSW: **2380**

Liczba cytowań (Web of Science Core Collection): **163** (na dzień 23.01.24, w tym **98** bez autocytowań)

Liczba cytowań (Scopus): **169** (na dzień 23.01.24, w tym **104** bez autocytowań)

Indeks Hirsha: **9**

Współautorstwo doniesień zjazdowych: **32**

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

6.1 Działalność dydaktyczna

- Współprowadzenie Koła Chemii Medycznej na Wydziale Farmaceutycznym, UJ CM.
- Wystąpienia ustne podczas seminariów dla młodych naukowców Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Lecznicych, Wydział Farmaceutyczny, UJ CM:
 - *Dual histamine H_3 and sigma-1 receptor ligands as novel pharmacological tools in the treatment of central nervous system disorders with the focus on neuropathic pain*; 15.04.2021 r.

- *The role of simultaneous and individual modulation of μ -opioid, sigma-1 and histamine H_3 receptors as a new therapeutic approach in the treatment of neuropathic pain;* 14.03.2023 r.
- *In-depth analysis of the protonation states of piperazine and piperidine derivatives as dual histamine H_3 and sigma-1 receptor ligands – promising drug candidates in the treatment of pain;* 11.07.2023 r.
- Protokołowanie obrony rozprawy doktorskiej mgr. Michała Załuskiego oraz mgr Anety Kaczor, Wydział Farmaceutyczny, UJ CM.

6.2 Działalność popularyzacyjna

W ramach działalności popularyzacyjnej, prezentowałam tematykę swoich badań na portalu Platforma Nauki (<https://platformanauki.pl/filmy/profesor-andrzej-bojarski-instytut-farmakologii-im-gerzego-maja-polskiej-akademii-nauk,147>) oraz Rzecz o Innowacjach (<https://rzecz.pl/nowe-narzedzia-farmakologiczne-w-terapii-schorzen-osrodkowego-ukladu-nerwowego-ze-szczegolnym-uwzglednieniem-bolu-neuropatycznego/>). Ponadto, streszczenia dwóch artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego [H4, H5] zostały zamieszczone na stronie Po Prostu Nauka (<https://poprostunauka.cm-uj.krakow.pl/publikacje/2021/12/,/2023/7/>). Wyniki badań realizowanego przeze mnie grantu Sonatina są regularnie prezentowane na stronie internetowej projektu na portalu ResearchGate (<https://www.researchgate.net/project/Dual-histamine-H3-and-sigma-1-receptor-ligands-as-novel-pharmacological-tools-in-the-treatment-of-central-nervous-system-disorders-with-the-focus-on-neuropathic-pain>).

6.3 Działalność organizacyjna

- Udział w Komitecie organizacyjnym spotkania Europejskiej Sieci Doktorantów Paula Ehrlicha (Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network), Kraków, 3-5 lipca 2015 r.
- Udział w organizacji przesłuchań Polskiego Towarzystwa Chemii Medycznej mających na celu wyłonienie reprezentanta z Polski do wygłoszenia komunikatu na 3rd EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium 2016, Kraków, 7 maja 2016 r.
- Udział w organizacji przesłuchań Polskiego Towarzystwa Chemii Medycznej mających na celu wyłonienie reprezentanta z Polski do wygłoszenia komunikatu na 5th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium 2018, Kraków, 12 maja 2018 r.
- Udział w Komitecie organizacyjnym zjazdu Europejskiego Towarzystwa Badań nad Histaminą (European Histamine Research Society, EHRS), Kraków, 15-18 maja 2019 r.
- Udział w Komitecie organizacyjnym konferencji EFMC-ACSMEDI: Medicinal Chemistry Frontiers 2019, Kraków, 10-13 czerwca 2019 r.

- Udział w organizacji przesłuchań Polskiego Towarzystwa Chemii Medycznej mających na celu wyłonienie reprezentanta z Polski do wygłoszenia komunikatu na 8th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium 2021, Kraków, 15 maja 2021 r.
- Udział w organizacji przesłuchań Polskiego Towarzystwa Chemii Medycznej mających na celu wyłonienie reprezentanta z Polski do wygłoszenia komunikatu na 10th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium 2023, Kraków, 20 maja 2023 r.

7 Pozostałe informacje

7.1 Udział w projektach badawczych

7.1.1 Kierowanie projektami badawczymi

- 03.04.2023 – obecnie: *Rola jednoczesnej i indywidualnej modulacji receptorów μ -opiodowych, sigma-1 oraz H_3 histaminowych jako nowe podejście terapeutyczne w leczeniu bólu o podłożu nocyceptywnym i neuropatycznym* – Narodowe Centrum Nauki: **OPUS** nr 2022/45/B/NZ7/03101, wysokość dofinansowania: **2 533 291 PLN**, projekt realizowany w konsorcjum z firmą Celon Pharma S.A.
- 10.09.2020 – obecnie: *Dualne ligandy receptorów H_3 histaminowych oraz sigma-1 jako nowe narzędzia farmakologiczne w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego ze szczególnym uwzględnieniem bólu neuropatycznego* – Narodowe Centrum Nauki: **SONATINA** nr 2020/36/C/NZ7/00284, wysokość dofinansowania: **1 081 987 PLN**.
- 01.09.2017 – 28.02.2021: *Pochodne piperazyny jako aktywne ligandy receptorów H_3 histaminowych - modelowanie molekularne, synteza, ewaluacja farmakologiczna* – Narodowe Centrum Nauki: **PRELUDIUM** nr 2016/23/N/NZ7/00469, wysokość dofinansowania: **141 600 PLN**.
- 01.01.2017 – 31.12.2019: *Poszukiwanie ligandów receptorów H_3 histaminowych w grupie N-podstawionych piperazyny* – Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: projekt celowy nr K/DSC/004310.

7.1.2 Uczestnictwo w projektach badawczych w charakterze wykonawcy

- 01.09.2017 – 31.10.2018: *Analiza i ocena skuteczności działania anorektycznego oraz bezpieczeństwa nowych ligandów receptora H_3 histaminowego* – Narodowe Centrum Nauki: OPUS nr 2016/23/B/NZ7/01063, kierownik projektu: dr hab. Magdalena Kotańska.
- 01.11.2016 – 31.05.2017: *Receptory H_3/H_4 histaminowe jako atrakcyjny cel poszukiwań substancji biologicznie aktywne* – Narodowe centrum Nauki: MAESTRO nr 2011/02/A/NZ4/00031, kierownik projektu: prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz.

- 01.12.2015 – 31.05.2016: *Nowe selektywne ligandy jonotropowych receptorów kwasu glutaminowego AMPA/KA* – Narodowe Centrum Nauki: OPUS nr 2014/15/B/NZ7/00908, kierownik projektu: dr hab. Ewa Szymańska.
- 01.11.2014 – 30.09.2015: *Poszukiwanie ligandów receptorów H₃ histaminowych w grupie podstawionej N-acylopiperazyny* – Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: projekt celowy nr K/DSC/002882, kierownik projektu: dr hab. Kamil Kuder.

7.2 **Udział w konferencjach naukowych i sympozjach o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym**

Jestem współautorką 32 streszczeń konferencyjnych oraz wygłosiłam 15 referatów ustnych na konferencjach naukowych o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym (w tym 11 w języku angielskim, które zostały wymienione poniżej):

- **Szczepańska K**, Karcz T, Kuder K, Olejarz A, Siwek A, Hagenow S, Stark S, Kieć-Kononowicz K: *Piperazine derivatives as a novel potent histamine H₃ receptor ligands*, 25 – 27 VIII 2017, Wiedeń, Austria, VII Meeting of the Paul Ehrlich Euro-PhD Network.
- **Szczepańska K**, Karcz T, Mogilski S, Hagenow S, Kotańska M, Sadek B, Stark H, Kieć-Kononowicz K: *Piperazine derivatives as a novel, active histamine H₃ receptor ligands*. 12 V 2018, Kraków, Polska, Eliminacje reprezentanta z Polski na 5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium Lubljana 2018.
- **Szczepańska K**, Karcz T, Mogilski S, Hagenow S, Kotańska M, Sadek B, Stark H, Kieć-Kononowicz K: *Piperazine derivatives as a novel, active histamine H₃ receptor ligands*, 6 – 7 IX 2018, Ljubljana, Słowenia, 5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium.
- **Szczepańska K**, Karcz T, Mogilski S, Kuder KJ, Hagenow S, Kotańska M, Stark H, Sadek B, Kieć-Kononowicz K: *Step forward in search for novel histamine H₃ receptor ligands: 4-pyridyl-piperazine derivatives with promising multidirectional pharmacological activity*, 13 – 15 IX 2018, Lublin, Polska, IX Konwersatorium Chemii Medycznej.
- **Szczepańska K**, Karcz T, Mogilski S, Kuder KJ, Hagenow S, Kotańska M, Stark H, Sadek B, Kieć-Kononowicz K: *Piperazine derivatives as a novel, active histamine H₃ receptor ligands*, 19 – 21 IX 2018, Regensburg, Niemcy, 9th Summer School “Medicinal Chemistry”.
- **Szczepańska K**, Karcz T, Mogilski S, Kuder KJ, Hagenow S, Kotańska M, Stark H, Sadek B, Kieć-Kononowicz K: *Step forward in search for novel histamine H₃ receptor ligands: 4-pyridyl-piperazine derivatives with promising multidirectional pharmacological activity*, 25 – 27 XI 2018, Łódź, Polska, XVIIth Conference of the Polish Histamine Research Society.
- **Szczepańska K**, Karcz T, Kuder KJ, Latacz G, Kotańska M, Hagenow S, Stark H, Kieć-Kononowicz K: *Structural modifications and pharmacological evaluation of 4-*

- pyridylpiperazine derivatives as active and selective histamine H₃ receptor ligands*, 15 V – 18 V 2019, Kraków, Polska, 48th Meeting of the European Histamine Research Society.
- **Szczepańska K**, Kuder KJ, Karcz T, Pockes S, Kotańska M, Sadek B, Elz S, Stark H, Kieć-Kononowicz K: *The search for novel histamine H₃ receptor ligands in the group of piperazine derivatives*, 26 – 28 lipca 2021, spotkanie zdalne, Paul Ehrlich Euro-PhD Network Virtual Meeting.
 - **Szczepańska K**, Podlewska S, Dichiara M, Patamia V, Rosier N, Mönnich D, Ruiz-Cantero MC, Karcz T, Łażewska D, Pockes S, Cobos EJ, Stark H, Rescifina A, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K: *Dual histamine H₃ and sigma-1 receptor ligands as novel pharmacological tools in the treatment of central nervous system disorders with the focus on neuropathic pain*, 3 – 5 września 2021, Lublin, Polska, X Konwersatorium Chemii Medycznej.
 - **Szczepańska K**, Podlewska S, Dichiara M, Patamia V, Rosier N, Mönnich D, Ruiz-Cantero MC, Karcz T, Łażewska D, Pockes S, Cobos EJ, Stark H, Rescifina A, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K: *Dual histamine H₃ and sigma-1 receptor ligands as novel pharmacological tools in the treatment of central nervous system disorders with the focus on neuropathic pain*, 16 grudnia 2021, spotkanie zdalne, EHRS Festive Virtual Poster Event focused on neuronal histamine.
 - **Szczepańska K**, Karcz T, Mogilski S, Kalinowska-Tłuścik J, Pilarski B, Leniak A, Pietruś W, Podlewska S, Popiołek-Barczyk K, Pockes S, Cobos EJ, Stark H, Bojarski AJ, Amata E, Kieć-Kononowicz K: *Dual piperidine-based histamine H₃ and sigma-1 receptor ligands in the treatment of nociceptive and neuropathic pain*, 27 października 2023, Rzym, Włochy, THE FOCUS OF POLISH-ITALIAN COOPERATION IN THE AREA OF BIOMEDICINE.

7.3 Nagrody i wyróżnienia

- Laureatka Stypendium dla najlepszych młodych naukowców START 2021 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.
- Certyfikat Europejskiej Sieci Doktorantów Paula Ehrlicha za rozprawę doktorską *The search for novel histamine H₃ receptor ligands in the group of piperazine derivatives*.
- Wyróżnienie Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ za rozprawę doktorską *The search for novel histamine H₃ receptor ligands in the group of piperazine derivatives*.
- Laureatka Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju 2020 w kategorii: Naukowiec przyszłości za realizację projektów Preludium oraz Sonata: *Dualne ligandy receptorów H₃ histaminowych oraz sigma-1 jako nowe narzędzia farmakologiczne w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego ze szczególnym uwzględnieniem bólu neuropatycznego oraz Pochodne piperazyny*

jako aktywne ligandy receptorów H₃ histaminowych – modelowanie molekularne, synteza, ewaluacja farmakologiczna.

- Lata 2017/2018, 2018/2019, 2019/2020 – laureatka stypendium projakościowego UJ CM dla najlepszych doktorantów.
- Laureatka Eliminacji reprezentanta z Polski na 5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium Lubljana 2018, organizowanych przez Polskie Towarzystwo Chemii Medycznej.
- Wyróżnienie za poster podczas 47th Meeting of the European Histamine Research Society, Dublin, Irlandia.
- Laureatka stypendium dojazdowego na 47th Meeting of the European Histamine Research Society, Dublin, Irlandia.
- Dwukrotna wygrana w Konkursie Towarzystwa Doktorantów UJ na Dofinansowanie Działalności Doktorantów – uzyskanie stypendium dojazdowego na VII Meeting of the Paul Ehrlich Euro-PhD Network (25 – 27 VIII 2017, Wiedeń, Austria) oraz VIII Meeting of the Paul Ehrlich Euro-PhD Network (12 VII – 14 VII 2018, Porto, Portugalia).