

**Załącznik nr 3**

# **Autoreferat**

**Dr n. chem. Piotr F. J. Lipiński**  
**Zakład Neuropeptydów**  
**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN**

## Spis treści

1. Imię i nazwisko .....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych. ....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy. ....	3
Cykl publikacji .....	3
Podsumowanie bibliometryczne prac cyklu habilitacyjnego: .....	4
Wstęp.....	5
Obszar I: Substancje przeciwbólowe - pochodne fentanylu (prace H1-H3) .....	6
Obszar II: Substancje przeciwbólowe – peptydy opioidowe (prace H4-H8) .....	12
Obszar III: Substancje przeciwnowotworowe (prace H9-H11) .....	21
Podsumowanie najważniejszych osiągnięć w ramach cyklu habilitacyjnego .....	26
Wykaz skrótów.....	27
Bibliografia.....	28
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	32
5.1. Podsumowanie dorobku naukowego.....	32
5.2. Staż podoktorski / współpraca z Zespołem Struktury i Dynamiki Makroukładów, Uniwersytet Wrocławski.....	32
5.3. Współpraca z grupą prof. Sándora Benyhe (Institute of Biochemistry, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary). ....	32
5.4. Współpraca z Pracownią Peptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski. ....	33
5.5. Współpraca z prof. Joanną Sadlej, Narodowy Instytut Leków w Warszawie.....	34
5.6. Współpraca z zespołem prof. Jana Cz. Dobrowolskiego, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. ....	34
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę. ....	35
6.1. Dydaktyka .....	35
6.2. Popularyzacja nauki .....	36
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej wnioskodawcy .....	37
7.1. Współpraca z podmiotami gospodarczymi.....	37
7.2. Projekty grantowe.....	37
7.3. Wykonane recenzje .....	<b>Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.</b>
7.4. Nagrody .....	<b>Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.</b>

## 1. Imię i nazwisko.

Piotr Jakub Lipiński

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2016	Stopień naukowy doktora nauk chemicznych w zakresie chemii, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie, tytuł rozprawy: „Novel aspects of chiral QSPR analysis”.
2013	Tytuł zawodowy magistra farmacji, Warszawski Uniwersytet Medyczny, tytuł pracy: „Opracowanie i walidacja schematu przesiewu wirtualnego dla receptora androgenowego”.

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

Lata	Stanowisko	Instytucja
2016 - obecnie	Adiunkt	Zakład Neuropeptydów, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa
2013-2016	Specjalista	Zakład Neuropeptydów, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa
2012-2013	Młodszy specjalista	Zespół Spektroskopii i Modelowania Molekularnego, Instytut Chemii Przemysłowej im. Prof. I. Mościckiego, Warszawa

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

Cykl publikacji

Przedstawianym osiągnięciem jest cykl jedenastu (11) publikacji zatytułowany:

### Modelowanie molekularne i analiza korelacyjna w poszukiwaniu leków przeciwbólowych oraz przeciwnowotworowych.

Publikacje<sup>1</sup> składające się na cykl są zestawione w poniższej tabeli. Dla wygody omawiania są one uporządkowane w trzech obszarach tematycznych.

Lp.	Artykuł	IF	Punkty MNiSW
<b>Obszar I: Substancje przeciwbólowe - pochodne fentanylu</b>			
<b>H1</b>	Lipiński, P.F.J. ✉; Jarończyk, M.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. ✉ <b>Molecular dynamics of fentanyl bound to <math>\mu</math>-opioid receptor.</b> <i>J. Mol. Model.</i> <b>2019</b> , 25, 144.	1.638	40
<b>H2</b>	Lipiński, P.F.J. ✉; Kosson, P.; Matalińska, J.; Roszkowski, P.; Czarnocki, Z.; Jarończyk, M.; Misicka, A.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. ✉ <b>Fentanyl Family at the Mu-Opioid Receptor: Uniform Assessment of Binding and Computational Analysis.</b> <i>Molecules</i> <b>2019</b> , 24, 740.	3.267	100
<b>H3</b>	Lipiński, P.F.J. ✉; Szűcs, E.; Jarończyk, M.; Kosson, P.; Benyhe, S.; Misicka, A.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. ✉ <b>Affinity of fentanyl and its derivatives for the <math>\sigma</math> 1 -receptor.</b> <i>Medchemcomm</i> <b>2019</b> , 10, 1187–1191.	2.807	70

<sup>1</sup> Publikacje **H1** i **H9** zostały opublikowane w czasopiśmie, które w ministerialnym wykazie czasopism nie są przypisane do kategorii nauki medycznej. Pozwolę sobie jednak zauważyć, że podejmowane w nich kwestie wpisują się w problematykę nauk medycznych (chemia medyczna, poszukiwanie leków).

Lp.	Artykuł	IF	Punkty MNiSW
<b>Obszar II: Substancje przeciwbólowe – peptydy opioidowe</b>			
H4	Adamska-Bartłomiejczyk, A.; Lipiński, P.F.J.; Piekielna-Ciesielska, J.; Kluczyk, A.; Janecka, A. ☒ <b>Pharmacological Profile and Molecular Modeling of Cyclic Opioid Analogues Incorporating Various Phenylalanine Derivatives.</b> <i>ChemMedChem</i> <b>2020</b> , <i>15</i> , 1322–1329.	3.124	100
H5	Tymecka, D. ☒; Lipiński, P.F.J.; Kosson, P.; Misicka, A. ☒ <b>β<sup>2</sup>-Homo-Amino Acid Scan of μ-Selective Opioid Tetrapeptide TAPP.</b> <i>Molecules</i> <b>2020</b> , <i>25</i> , 2461.	3.267	100
H6	Dyniewicz, J. ☒; Lipiński, P.F.J. ☒; Kosson, P.; Bochyńska-Czyż, M.; Matalińska, J.; Misicka, A. ☒ <b>Antinociceptive and Cytotoxic Activity of Opioid Peptides with Hydrazone and Hydrazide Moieties at the C-Terminus.</b> <i>Molecules</i> <b>2020</b> , <i>25</i> , 3429.	3.267	100
H7	Matalińska, J. ☒ ①; Lipiński, P.F.J. ☒ ①; Kosson, P.; Kosińska, K.; Misicka, A. <b>In vivo, in vitro and in silico studies of the hybrid compound AA3266, an opioid agonist/NK1R antagonist with selective cytotoxicity.</b> <i>Int. J. Mol. Sci.</i> <b>2020</b> , <i>21</i> . ① - równorzędny pierwszy autor	4.556	140
H8	Matalińska, J. ☒; Lipiński, P.F.J. ☒; Kotlarz, A.; Kosson, P.; Muchowska, A.; Dyniewicz, J. <b>Evaluation of Receptor Affinity, Analgesic Activity and Cytotoxicity of a Hybrid Peptide, AWL3020.</b> <i>Int. J. Pept. Res. Ther.</i> <b>2020</b> , <i>26</i> , 2603–2617.	1.500	40
<b>Obszar III: Substancje przeciwnowotworowe</b>			
H9	Kowalczyk, A. ①; Lipiński, P.F.J. ①; Karoń, K.; Rode, J.E.; Lyczko, K.; Dobrowolski, J.Cz. ☒; Donten, M.; Kaczorek, D.; Poszytek, J.; Kawęcki, R. ☒; Łapkowski, M.; Malkowska, A.; Grudziński, I.P. ☒; Nowicka, A.M. ☒ <b>Enantioselective sensing of (S)-Thalidomide in blood plasma with a chiral naphthalene diimide derivative.</b> <i>Biosens. Bioelectron.</i> <b>2020</b> , <i>167</i> , 112446. ① - równorzędny pierwszy autor.	10.257	200
H10	Halik, P.K. ☒; Lipiński, P.F.J.; Matalińska, J.; Koźmiński, P.; Misicka, A.; Gniazdowska, E. <b>Radiochemical Synthesis and Evaluation of Novel Radioconjugates of Neurokinin 1 Receptor Antagonist Aprepitant Dedicated for NK1R-Positive Tumors.</b> <i>Molecules</i> <b>2020</b> , <i>25</i> , 3756.	3.267	100
H11	Fedoreczyk, B.; Lipiński, P.F.J.; Tymecka, D.; Puszko, A.K.; Wilenska, B.; Perret, G.Y.; Misicka, A. ☒ <b>Conformational latitude – activity relationship of KPPR tetrapeptide analogues toward their ability to inhibit binding of vascular endothelial growth factor 165 to neuropilin-1.</b> <i>J. Pept. Sci.</i> <b>2017</b> , <i>23</i> , 445–454.	1.969	20 “stara” punktacja (w roku publikacji), 70 „nowa” punktacja 2019

☒ - autor korespondencyjny; ① - równorzędny pierwszy autor.

Podsumowanie bibliometryczne prac cyklu habilitacyjnego:

**Sumaryczny impact factor** prac cyklu habilitacyjnego (z roku publikacji lub ostatni dostępny) prac wynosi 38.919.

**Suma punktów ministerialnych** prac cyklu habilitacyjnego (wg punktacji 2019) wynosi 1060.

Prace **H1-H10** były opublikowane w roku 2019 i 2020. Praca **H11** ukazała się w roku 2017.

Według serwisu Scopus, na dzień 23.04.2021 prace **H1-H11** były **cytowane** 44 razy, w tym 22 razy bez autocytowań.

## Modelowanie molekularne i analiza korelacyjna w poszukiwaniu leków przeciwbólowych oraz przeciwnowotworowych.

### Wstęp

---

Prezentowany cykl publikacji dotyczy poszukiwania nowych substancji czynnych w dwóch obszarach terapeutycznych: leczenia bólu i leczenia chorób nowotworowych. Prace te powstały jako rezultat kilku programów badawczych, w których uczestniczyłem lub uczestniczę jako członek wieloosobowych (a nawet wielogrupowych) zespołów badawczych. We wszystkich tych projektach moim zadaniem było zastosowanie metod *in silico* (modelowania molekularnego i analizy korelacyjnej) do odpowiedzi na pytanie:

*jakie są prawdopodobne podstawy strukturalne danej aktywności?*

Przez **podstawy strukturalne** rozumiem jakościowe albo ilościowe cechy struktury cząsteczek czynnych, bądź kompleksów cząsteczek czynnych i celów molekularnych, które mają decydujący wpływ na pewną mierzalną eksperymentalnie **aktywność**.

**Aktywności** rozważane w prezentowanych pracach były zróżnicowane. Badaliśmy wiązanie receptorowe, zdolność inhibitora do hamowania oddziaływania między dwoma białkami, aktywność cytotoksyczną, a także zdolność sensora elektrochemicznego do rozpoznawania enancjomerów. Zróżnicowane były także **cele molekularne** i **cząsteczki czynne**. Badane substancje były związkami małowcząsteczkowymi lub peptydami. Oddziaływać miały z receptorami  $\mu$ -opiodowymi (MOR), sigma-1 ( $\sigma_1R$ ), tachykininowymi NK1 (NK1R), neuropeptidami (NRP-1), jak również chiralnymi naftalenodiimidami (NDI) - małowcząsteczkowymi „receptorami” w sensorach voltamperometrycznych.

W swoich badaniach stosowałem wiele **technik modelowania**, a wśród nich:

- dokowanie molekularne (automatyczne i ręczne),
- dokowanie „przez nadbudowę”,
- pełnoatomową (klasyczną) dynamikę molekularną,
- obliczenia kwantowo-chemiczne,
- obliczenia kwantowo-chemiczne typu Fragment Molecular Orbitals (FMO) z analizą rozkładu energii oddziaływania par (*pair interaction energy decomposition analysis*, PIEDA),
- różnorakie analizy statystyczne (korelacje, analizę skupień, analizę składowych głównych etc.).

Zdając sobie sprawę z ograniczeń modelowania *in silico*, poszukiwałem **prawdopodobnych** podstaw strukturalnych rozpatrywanych aktywności. Wyniki modelowania traktuję jako hipotezy, które należy - o ile to możliwe - skonfrontować z eksperymentalnymi danymi literaturowymi w celu ich uprawdopodobnienia. Nawet jeśli modelowanie nie pozwala uzyskać pewności co do przebiegu procesu, modele i korelacje, które otrzymujemy, racjonalizują wnioski wynikające z naszych danych eksperymentalnych i stanowią użyteczne założenia dla formułowania dalszych hipotez roboczych. Dzięki temu umożliwiają **racjonalne poszukiwanie** nowych cząsteczek czynnych.

\*\*\*

W dalszym ciągu autoreferatu omówię poszczególne prace (**H1-H11**) składające się na cykl habilitacyjny. Pogrupowałem je w trzy obszary tematyczne, z czego pierwsze dwa dotyczą substancji przeciwbólowych, trzeci zaś substancji przeciwnowotworowych.

Prace związane z substancjami przeciwbólowymi chcę podzielić na dwie podgrupy. Pierwsza z nich (**H1-H3**) dotyczy fentanylu i jego analogów, druga zaś (**H4-H8**) peptydów opiodowych. Podział taki będzie stosowny dla uwypuklenia mojej wiodącej roli w projekcie *fentanylowym*, gdzie mój wkład nie ograniczał się tylko do rozwiązania poszczególnych problemów za pomocą technik *in silico*, lecz polegał również na planowaniu części eksperymentalnej badań.

## Obszar I: Substancje przeciwbólowe - pochodne fentanylu (prace H1-H3)

Fentanyl (*N*-fenylo-*N*-[1-(2-fenyloetylo)piperidyn-4-yl]propanoamid) należy do najważniejszych silnych środków przeciwbólowych stosowanych we współczesnym leczeniu. Związek ten jest również prototypem szerszej klasy syntetycznych związków przeciwbólowych, 4-anilidopiperidyn, nazywanych czasami po prostu „fentanylami” lub „fentalogami” [1]. Wśród fentanyle znajdują się substancje zatwierdzone do użytku w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej, a także ciekawe związki narzędziowe. Mowa tu np. o najsilniejszych znanych związkach przeciwbólowych jak karfentanyl czy ohmefentanyl (nawet 10 000-20 000 razy silniejsze od morfiny), bądź o ultrakrótko działających analgetykach stosowanych w znieczuleniach, jak alfentanyl czy remifentanyl. Niestety, fentanyl i fentalogi cieszą się także dużą popularnością jako środki odurzające i odpowiadają za liczne zgony wynikające z przedawkowania [2]. Problem jest na tyle poważny, że w literaturze i prasie, szczególnie amerykańskiej, mówi się o kryzysie opioidowym (*opioid crisis*) albo fentanylewej epidemii (*fentanyl epidemics*) [3].

Struktura fentanylu stanowi również produktywną inspirację we współczesnych poszukiwaniach innowacyjnych analgetyków. Szkielet cząsteczkowy 4-anilidopiperidyny był stosowany do tworzenia wielocelowych substancji przeciwbólowych [1]. Niedawno wykorzystano go także do poszukiwania stronniczych agonist opioidowych [4] albo agonist opioidowych zależnych od pH [5].

Gdy rozważamy fentanyle, czy to z punktu widzenia medycyny, farmakologii, toksykologii, czy też poszukiwania nowych leków, fundamentalnym zagadnieniem jest kwestia, w jaki sposób oddziałują one ze swoim głównym celem molekularnym, czyli receptorem  $\mu$ -opioidowym (MOR)? Próba odpowiedzi na to pytanie była główną motywacją podjęcia prac opisanych w publikacjach **H1-H2**.

Innym ważnym problemem jest to, czy receptor  $\mu$ -opioidowy jest jedynym istotnym celem molekularnym dla tej grupy związków czynnych? Rozważania nad tym zagadnieniem doprowadziły do odkrycia powinowactwa fentanyle do receptora  $\sigma_1$  ( $\sigma_1R$ ), co opisane jest w pracy **H3**.

**H1.** Lipiński, P.F.J. ✉; Jarończyk, M.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. ✉ **Molecular dynamics of fentanyl bound to  $\mu$ -opioid receptor.** *J. Mol. Model.* **2019**, 25, 144.

IF(2019) = 1.638, Pkty MNiSW(2019) = 40.

*Moja rola w badaniach opisanych w H1 polegała na sformułowaniu problemów badawczych, wykonaniu dokowania automatycznego, wykonaniu dokowania ręcznego, analizie danych literaturowych dotyczących mutagenyzy receptora MOR, przeprowadzeniu symulacji dynamiki molekularnej, napisaniu skryptów w języku Python do analizy wyników symulacji, przeprowadzeniu analizy symulacji, przygotowaniu części ilustracji, oraz przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.*

Jak do tej pory brak jest eksperymentalnej struktury kompleksu fentanyl-MOR, wobec czego odpowiedź na pytanie o sposób oddziaływania (*binding mode*<sup>2</sup>) fentanylu z receptorem MOR musi zostać uzyskana w wyniku modelowania molekularnego. Około 2014 roku, kiedy rozpoczynał się opisywany tutaj projekt badawczy, w literaturze dostępne były predykcje kompleksu oparte o dokowanie do starszych modeli homologicznych MOR. Postęp w technikach krystalizacji receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) umożliwił rozwiązanie struktury receptora MOR związanego z antagonistą (2012,

<sup>2</sup> W tekście referatu będę używać wymiennie niektórych angielskich terminów wraz z ich polskimi odpowiednikami, np. „binding mode” - „sposób oddziaływania” / „sposób wiązania”, „scoring” - „ocena” / „punktacja”, „target” - „cel molekularny”, etc. Wydaje mi się, że w tych (i innych) przypadkach: 1) nie ma powszechnie przyjętych polskich terminów, 2) w żargonie „modelarzy” terminy angielskie stosowane w spolszczonych wersjach, 3) pozwoli to uniknąć monotonii typu „taki sposób wiązania wiąże się z ...”.

[6]) i agonistą (2015, [7]). Dostępność tych struktur pozwoliła nam na uzyskanie pewniejszego wglądu w potencjalne oddziaływanie w porównaniu do predykcji z użyciem modeli homologicznych.

Procedura mająca na celu ustalenie *binding mode* składała się z dokowania i symulacji dynamiki molekularnej (MD). Fentanyl dokowałem do nieaktywnej i aktywowanej struktury MOR za pomocą programu AutoDock Vina [8]. Dodatkowe modele oddziaływania uzyskałem przez „ręczne” dokowanie liganda. Następnie, wiele możliwych konformacji kompleksu ligand-receptor (pochodzących z dokowania automatycznego i ręcznego) zostało poddanych pełnoatomowym symulacjom MD (o długości co najmniej 500 ns), w celu sprawdzenia stabilności danej konfiguracji. Okazało się, że pozy z dokowania automatycznego były niestabilne podczas przebiegów MD. Pozy uzyskane ręcznie, po pewnych przegrupowaniach w początkach symulacji, zbiegały do stabilnej konfiguracji, wspólnej dla symulacji z receptorem nieaktywnym i aktywowanym. Po porównaniu oddziaływań z dostępnymi danymi eksperymentalnymi (z mutagenezy receptora), przyjąłem, że jest to *binding mode* fentanylu w receptorze MOR i poddano dalszym analizom (symulacje MD o długości 1200 ns w trzech powtórzeniach, w wariantach z nieaktywnym receptorem, z nieaktywnym receptorem w obecności kationu sodu w miejscu allosterycznym oraz z aktywowanym receptorem).

Otrzymany w ten sposób *binding mode*, charakteryzuje się a) oddziaływaniem protonowanej grupy aminowej w pierścieniu piperydyny ( $\text{pipNH}^+$ ) z łańcuchem bocznym Asp147, b) orientacją łańcucha *N*-fenetylowego w kierunku wewnątrzkomórkowej części receptora oraz c) skierowaniem łańcucha propanoilowego w stronę zewnątrzkomórkowego fragmentu kieszeni wiążącej MOR. Poza oddziaływaniem jonowym  $\text{pipNH}^+ \cdots \text{Asp147}$ , kontakty fentanylu z receptorem mają charakter hydrofobowy (szczegółowy diagram kontaktów, Rysunek 4 w **H1**). W przypadku obu giętkich podstawników, w symulacjach obserwowana była pewna mobilność resztkowa (Rysunek 3 w **H1**).

Uzyskany *binding mode* fentanylu był dla mnie punktem wyjścia do analizy porównawczej z morfiną. Sposób oddziaływania z receptorem tego alkaloidowego agonisty MOR został ustalony w analogiczny sposób jak w przypadku fentanylu. Dokowanie ręczne i automatyczne dały w zasadzie identyczne pozy morfiny, które były stabilne w symulacjach MD. Uzyskane w ten sposób położenie morfiny w kieszeni wiążącej MOR (Rysunek 5 w **H1**) pokrywa się (we fragmentach wspólnych dla obu związków) z położeniem krystalograficznego liganda  $\beta$ -funaltreksaminy.

Przy porównaniu z *binding mode* fentanylu, okazuje się, że oba ligandy zajmują różne podprzestrzenie kieszeni wiążącej MOR (Rysunki 6-7 w **H1**). Główną cechą wspólną obu kompleksów jest oddziaływanie jonowe protonowanych grup aminowych z Asp147, a także to, iż oba ligandy kontaktują się z aminokwasami helisy przezbłonowych TM3, TM5, TM6 i TM7 receptora. Z drugiej strony zakres tych kontaktów jest zdecydowanie inny. Fentanyl położony jest bliżej TM3 i oddziałuje aż z 7 aminokwasami tej helisy (morfina jedynie z 4). „Smukła”, długa i giętka cząsteczka fentanylu sięga zarówno w głąb kieszeni receptora, jak i kontaktuje się z pętlami zewnątrzkomórkowymi oraz częścią *N*-końcową receptora. Bardziej „zbita”, „masywna” i sztywna cząsteczka morfiny tworzy więcej oddziaływań z helisą TM5 i TM6.

Dalej, kompleksy MOR z oboma ligandami różnią się, jeśli chodzi o stany niektórych kluczowych fragmentów receptora. Po pierwsze chodzi tu np. o stan rotameryczny Trp293, który to aminokwas uważany jest za składową mikroprzelącznika uczestniczącego w aktywacji receptora [9–11]. W symulacjach z morfiną a także bez obecności liganda w miejscu wiążącym, łańcuch boczny Trp293 (Rysunki 8-9 w **H1**) przyjmował stan rotameryczny ( $X_1/X_2$ )  $-70^\circ/110^\circ$ . W obecności fentanylu, w trajektoriach obserwowałem dodatkowe rotamery, np.  $180^\circ/-110^\circ$  (w symulacjach z aktywowanym receptorem) lub  $180^\circ/110^\circ$ .

Analiza symulacji MD wskazuje również na różnicę w odległości między łańcuchami bocznymi Asp147 i Tyr326 (Rysunek 12 w **H1**). W trajektoriach z fentanylem, średnia odległość jest krótsza niż w przypadku trajektorii bez liganda w miejscu wiążącym lub z morfiną. Obserwuje się także

charakterystyczne układy skupień w rozkładach kąta dwuściennego  $X_1$  Asp147 w symulacjach w poszczególnych wariantach (Rysunek 13 w **H1**). W przeciwieństwie do omówionych przed chwilą właściwości, hydratacja miejsca allosterycznego w pobliżu Asp114 (Rysunek 10 w **H1**) nie różnicuje ligandów między sobą, ani względem symulacji bez obecności liganda.

Wskazane różnice pomiędzy kompleksami fentanyli-MOR i morfina-MOR mogą – hipotetycznie – odpowiadać za niektóre różnice w działaniu obu analgetyków. Z jednej strony bowiem oba związki wiążą się do MOR z wysokim, nanomolowym powinowactwem. Oba są silnymi agonistami MOR i dają bardzo silny efekt przeciwbólowy [1]. Z drugiej jednak strony, oba ligandy w różnym stopniu sprzyjają poszczególnym zdarzeniom w wewnątrzkomórkowych kaskadach sygnalowania związanych z aktywacją MOR (np. wiązanie białek G, fosforylacja, rekrutacja  $\beta$ -arestyn etc.) [12]. Część z tych rozbieżnych właściwości może wynikać z różnicy w sposobach oddziaływania obu agonist z MOR i/lub z różnic w przebiegu zmian konformacyjnych podczas aktywacji receptora w obecności danej agonisty. W pracy **H1** zidentyfikowałem kilka cech różnicujących kompleksy, czy to po stronie kontaktów międzycząsteczkowych, czy też po stronie konformacji aminokwasów miejsca wiążącego. Modyfikacja elementów (np. w strukturach ligandów lub przez mutagenezę miejsca wiążącego) odpowiedzialnych za te cechy różnicujące mogłaby prowadzić do interesującego eksperymentalnego wglądu w procesy rozpoznania molekularnego i aktywacji receptorów MOR.

W momencie publikacji, praca **H1** była pierwszą i jedyną w literaturze predykcją oddziaływań fentanyli z MOR opartą o strukturę krystalograficzną receptora, a także pierwszą analizą komparatywną oddziaływań fentanyli i morfiny.

**H2.** Lipiński, P.F.J. ✉; Kosson, P.; Matalińska, J.; Roszkowski, P.; Czarnocki, Z.; Jarończyk, M.; Misicka, A.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. ✉ **Fentanyl Family at the Mu-Opioid Receptor: Uniform Assessment of Binding and Computational Analysis.** *Molecules* **2019**, *24*, 740.

IF(2019) = 3.267, Pkty MNiSW(2019) = 100.

*Moja rola w badaniach opisanych w H2 polegała na sformułowaniu problemów badawczych, wyborze związków do zakupu oraz współwyborze związków do syntezy, opisanie zależności SAR, wykonaniu dokowania oraz symulacji dynamiki molekularnej, napisaniu skryptów w języku Python do analizy wyników symulacji, przeprowadzeniu analizy symulacji, w tym analiz statystycznych, przygotowaniu ilustracji, redakcji danych otrzymanych od współautorów, współudziale w przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz korespondencji z redakcją.*

Kolejnym krokiem w opisywanym projekcie była próba zrozumienia (w kontekście oddziaływań ligand-receptor) zależności SAR dla szerszego zbioru fentanyli. Podjęliśmy więc łączone badanie eksperymentalno-teoretyczne fentanyli i grupy wybranych 20 pochodnych (w tym dwu nowych; w puli był także jeden związek, którego powinowactwa receptorowego do MOR nie opisano wcześniej; Rysunek 1 w **H2**).

W części eksperymentalnej badań (*in vitro*) zespół wyznaczył powinowactwo badanych związków do receptora MOR. Motywacją do ponownego wykonania takich oznaczeń dla opisanych już pochodnych była chęć uzyskania jednorodnego zestawu danych liczbowych – dane literaturowe pochodzą z różnych laboratoriów, są zatem uzyskane według różnych protokołów na przestrzeni wielu lat.

W części *in silico*, po pierwsze ustalono *binding mode* badanych związków (przez dokowanie i symulacje MD). W przypadku większości pochodnych, sposób oddziaływania z MOR był podobny do opisanego w pracy **H1** *mode* 'u' związku wyjściowego, fentanyli (Rysunek 2 w **H2**). Wydaje się też, że dla większości z badanych analogów, uzyskany w symulacjach *binding mode* bardzo dobrze odpowiada eksperymentalnie obserwowanym powinowactwom i pozwala na racjonalne objaśnienie zależności SAR w kontekście kontaktów między ligandami a receptorem.



Okazało się dalej, że eksperymentalne powinowactwo fentanyli koreluje ilościowo z objętością<sup>3</sup> podstawników na szkielecie 4-anilidopiperydyny. Zależność ta ma charakter dwuliniowy bądź paraboliczny (Rysunek 9 w **H2**). Według niej, związki o pośredniej objętości podstawników mają optimum powinowactwa, natomiast zwiększanie lub zmniejszanie tej objętości powoduje spadki wiązalności (zwraca uwagę różne nachylenie linii/ramion paraboli po obu stronach optimum). Wydaje się, że dobrze koresponduje to z hydrofobowym charakterem większości oddziaływań w kompleksach fentanyli-MOR. W przypadku tego typu kontaktów zarówno „niedopakowanie” (*underpacking*) jak i „przepakowanie” (*overpacking*) (sub)miejsca oddziaływania wiąże się z gorszym powinowactwem.

Drugim elementem analizy *in silico* było poszukiwanie charakterystyk receptora w kompleksach z fentanylami (na podstawie symulacji MD), które mogłyby różnicować poszczególne pochodne w powiązaniu z ich strukturą lub aktywnością eksperymentalną. Rozpatrywałem tutaj fluktuacje poszczególnych helis (za pomocą miary średniej kwadratowej fluktuacji, *root mean square fluctuation*, RMSF), zmienność kątów torsyjnych kluczowych aminokwasów miejsca wiążącego, zmienność odległości między Asp147 a Tyr326 oraz hydratację Asp114 i Tyr336. W obecności poszczególnych pochodnych, większość z tych charakterystyk (RMSF helis, hydratacja, większość kątów torsyjnych) nie różni się między sobą w statystycznie istotny sposób, lub nie ma prostego powiązania tychże ze strukturą lub aktywnością ligandów. Ciekawymi wyjątkami były wartości kątów torsyjnych X<sub>2</sub> Trp293, X<sub>2</sub> Trp133 oraz odległość między Asp147 a Tyr326. Dla tych zmiennych dała się zaobserwować liniowa (choć o średniej sile) zależność od objętości podstawników liganda (Rysunek 10 w **H2**).

Przykładowo, w przypadku Trp293 korelacja taka oznacza, że większe objętościowo pochodne „wypychają” indol tryptofanu do ułożenia bliższego prostopadłemu względem osi helisy TM6, podczas gdy w przypadku mniejszych analogów łańcuch boczny „zagina się” w stronę miejsca wiążącego (Rysunek 11 w **H2**). Zważywszy na powszechnie przyjmowany udział Trp293 w procesie aktywacji receptora MOR, zależność konformacji Trp293 od objętości liganda może być wykorzystana (jako hipoteza robocza) do projektowania związków próbujących procesy aktywacji receptora.

Trzecim elementem moich badań *in silico* było sprawdzenie, czy eksperymentalne powinowactwo jest prawidłowo przewidywane przez *scoring* czternastu popularnych funkcji oceniających. W przypadku żadnej z metod nie stwierdzono silnej zależności między predykcją a eksperymentem (współczynniki korelacji  $R < 0.30$ ). Po wykluczeniu z korelacji niektórych punktów, udało się uzyskać poprawę współczynników statystycznych do dobrych wartości, ale – bez dodatkowych badań – trudno stwierdzić, czy nie wynika to po prostu z przypadkowego dopasowania. Podjąłem także próbę przeskalowania współczynników poszczególnych komponent funkcji oceniającej *LUDI3* tak, aby odtwarzała ona dane eksperymentalne dla fentanyli, dzięki czemu uzyskałem korelację z  $R=0.84$ . Niestety, walidacja na zewnętrznym zbiorze danych nie potwierdziła nawet elementarnej mocy predykcyjnej takiej modyfikowanej funkcji oceniającej.

Podsumowując, w pracy **H2** przedstawiliśmy jednorodne dane eksperymentalne o powinowactwie fentanyli do MOR oraz wiarygodny model *in silico* oddziaływań tej grupy związków z receptorem. Dodatkowo, znalazłem ciekawe ilościowe zależności między charakterystykami ligandów lub receptora pochodzącymi z symulacji MD a aktywnością ligandów. Stwierdziłem także, że badane funkcje oceniające nie przewidują prawidłowo powinowactwa fentanyli.<sup>4</sup>

---

<sup>3</sup> Chodzi tu o objętość „dynamiczną” uzyskaną z przebiegów MD i obliczeń kwantowo-chemicznych. Wielkość taka uwzględnia giętkość konformacyjną łańcuchów oraz mobilność resztkową ligandów w miejscu wiążącym, co jest jej przewagą nad objętością „statyczną”.

<sup>4</sup> Warto zauważyć, że podczas trwania naszych badań, pojawiła się znacznie bardziej udana w tym aspekcie próba opisana przez Ellis i wsp. [58].

**H3.** Lipiński, P.F.J. ✉; Szűcs, E.; Jarończyk, M.; Kosson, P.; Benyhe, S.; Misicka, A.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. **Affinity of fentanyl and its derivatives for the  $\sigma_1$ -receptor.** *Medchemcomm* **2019**, *10*, 1187–1191.

IF(2019) = 2.807, Pkty MNiSW(2019) = 70.

*Moja rola w badaniach opisanych w H3 polegała na współ-sformułowaniu problemów badawczych, wyborze związków do zakupu, opisanu zależności SAR, wykonaniu dokowania oraz symulacji dynamiki molekularnej, analizie wyników symulacji, przeprowadzeniu analizy symulacji, przygotowaniu ilustracji, redakcji danych otrzymanych od współautorów, przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz korespondencji z redakcją.*

Badania opisane w pracy **H3** łączą się z pytaniem, czy receptor  $\mu$ -opiodowy jest jedynym istotnym celem molekularnym fentanyli? Wiele substancji czynnych wiąże się z więcej niż jednym celem molekularnym. Nierzadko, poza głównym (pożądanym) *targetem*, leki mają pewne powinowactwo do szeregu pomniejszych (wtórnych) miejsc wiążących, które odpowiadają za niekorzystne efekty uboczne, albo korzystną wielokierunkowość działania.

Mimo iż sam fentanyl znany jest już przeszło 60 lat, temat wielocelowości 4-anilidopiperidyn nie wydaje się dokładnie opracowany. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że fentanyl i medycznie istotne analogi stosowane są w bardzo niskich dawkach, w których działanie przez inne niż MOR cele molekularne (do których mają słabe powinowactwo) jest mało prawdopodobne. Inne pochodne otrzymywane były w ramach prób optymalizacji powinowactwa do MOR lub aspektów farmakokinetycznych/fizykochemicznych, wobec czego testowane były głównie wobec MOR (ew. innych receptorów opiodowych).

Temat wielocelowości jest jednak warty podjęcia dla pełnego zrozumienia farmakologii i toksykologii 4-anilidopiperidyn, a także z punktu widzenia projektowania nowych leków. W obiegu czarnorynkowym znajduje się wiele nieklasycznych pochodnych fentanyli. Ich farmakologia może nie ograniczać się do wiązania z MOR. Osoby długotrwale przyjmujące opioidy rozwijają także tolerancję na ich działanie. U narkomanów wiąże się to z przyjmowaniem coraz wyższych dawek. W dużych stężeniach działanie na wtórne cele molekularne może istotnie wpływać na profil toksyczności narkotyku. Tego, że nie są to czyste spekulacje, dowodzi na przykład niedawna praca Tschirharta *i wsp.*, którzy ustalili, że fentanyl blokuje kanały hERG z  $IC_{50} \sim 300$  nM, a stężenie to jest osiągalne w przypadku poważnego przedawkowania fentanyli [13].

W projekcie, w którym uczestniczyłem, zwróciliśmy uwagę na potencjalne oddziaływania 4-anilidopiperidyn z receptorem  $\sigma_1$  ( $\sigma_1R$ ), co wynikało z następujących faktów. Po pierwsze, wiele analogów fentanyli przypomina strukturalnie znane ligandy  $\sigma_1R$ . Po drugie, wyniki wstępnego modelowania molekularnego uprawdopodobniały możliwość wystąpienia dość silnych oddziaływań niektórych pochodnych [14]. Dodatkowo, od strony farmakologii receptorów, modulacja działania receptorów opiodowych przez  $\sigma_1R$  jest dobrze opisana [15]. Znany jest też udział  $\sigma_1R$  w działaniu niektórych narkotyków [16].

W starszej literaturze istniały dwa doniesienia o niskim, lecz mierzalnym powinowactwie fentanyli do  $\sigma_1R$  [17,18]. Brak było danych o innych pochodnych fentanyli. W celu uzupełnienia tej luki przeprowadziliśmy łączone badanie eksperymentalno-obliczeniowe fentanyli i 11 komercyjnie dostępnych analogów. Badania receptorowe potwierdziły umiarkowane powinowactwo fentanyli do  $\sigma_1R$  ( $IC_{50} \sim 5$   $\mu$ M). Okazało się jednak, że drobne modyfikacje strukturalne prowadzą do znaczącej poprawy wiązalności. Trzy analogi wykazują submikromolowe  $IC_{50}$ :

- *N*-benzylfentanyl (krótszy o jedną jednostkę  $-CH_2-$  w *N*-podstawniku),  $IC_{50} = 322$  nM,
- *p*-fluorofentanyl (podstawnik fluorowy w pierścieniu anilidu),  $IC_{50} = 495$  nM,

- 3-metylotiofentanył (podstawnik metylowy pozycji 3 piperydyny oraz wymiana fenylu na tiofen w *N*-podstawniku),  $IC_{50} = 465$  nM.

Stwierdziłem także, że wprowadzenie podstawników hydroksylowych w pozycje  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\omega-1$  jest dla wiązania do  $\sigma_1R$  wysoce niekorzystne ( $IC_{50} > 10$  uM). Zasadniczo niekorzystne jest także podstawienie 4-aksjalne, i pochodne takie jak norkarfentanył, remifentanył czy alfentanył mają bardzo słabe powinowactwo, choć np. sufentanył wykazuje pewną poprawę w porównaniu do fentanyłu.

Warto zauważyć, że niektóre trendy SAR w grupie przebadanych fentanyli są różne (przeciwnie) dla MOR i  $\sigma_1R$ . Przykładowo, *N*-benzylfentanył jest 400 razy słabszy od fentanyłu, jeśli chodzi o wiązanie do MOR, natomiast 15 razy silniejszy jeśli chodzi o wiązanie do  $\sigma_1R$ . Dalej, podstawienie 4-aksjalne daje zazwyczaj silne agonisty  $\mu$ -opiodowe, ale związki te mają bardzo słabe powinowactwo do  $\sigma_1R$ .

W celu ustalenia sposobu oddziaływania fentanyli z  $\sigma_1R$ , modelowałem (dokowanie i symulacje MD) kompleksy receptora z fentanyłem, *p*-fluorofentanyłem oraz *N*-benzylfentanyłem. Symulacje przewidują, że obie submikromolowe pochodne wiążą się z  $\sigma_1R$  w sposób zbliżony do *binding mode*'u związku 4-IBP, dla którego kompleksu z receptorem sigma uzyskano strukturę eksperymentalną (Rysunki 1-2 w **H3**). W ogólnym zarysie proponowany sposób oddziaływania charakteryzuje się:

- oddziaływaniem jonowym protonowanego azotu piperydyny z łańcuchem bocznym Glu172,
- skierowaniem pierścienia aromatycznego anilidu w kierunku helis  $\alpha_4$  i  $\alpha_5$  receptora,
- skierowaniem *N*-podstawnika w kierunku struktury  $\beta$ -beczki tworzącej część miejsca wiążącego.

W przypadku fentanyłu, dokowanie także przewiduje zbliżony sposób oddziaływania, ale w trakcie 3 z 5 symulacji dynamiki molekularnej wystartowanych z takiego położenia, fentanył przepływa w inne miejsce kieszeni wiążącej i przyjmuje położenie prostopadłe do krystalograficznego położenia 4-IBP.

Obserwacje z symulacji pasują do danych eksperymentalnych. Położenia farmakoforowych elementów 4-IBP (pierścienie aromatyczne, protonowana amina) pokrywają się dość dobrze z położeniami analogicznych podstruktur *N*-benzylfentanyłu, stąd względnie wysokie powinowactwo tej pochodnej. Dłuższy fentanył również jest w stanie wpasować się w taki *binding mode*, ale ułożenie to prawdopodobnie nie jest optymalne, a dodatkowo wymaga zamrożenia jednego wiązania więcej („kara entropowa”). Dotyczy to także *p*-fluorofentanyłu, ale tutaj podstawnik F w pozycji *para* zapewnia dodatkowe oddziaływania, które w pewnym stopniu mogą kompensować „karę entropową”. Model wyjaśnia także słabe powinowactwo pochodnych hydroksylowanych (brak dobrych partnerów do oddziaływań dla grupy OH) oraz analogów podstawionych w pozycji 4-aksjalnej (sterycznie brak możliwości przyjęcia takiego podstawnika w *binding mode* podobnym do krystalograficznego).

Artykuł **H3** stanowi pierwsze eksperymentalne doniesienie na temat powinowactwa pochodnych fentanyłu do receptora  $\sigma_1$ . We wnioskach pracy stwierdzałem, że struktura fentanyłu może być wykorzystana do poszukiwania nowych ligandów  $\sigma_1R$ . Dalej, zaproponowałem, że fentanyły mogą być dobrym punktem wyjściowym do tworzenia mieszanych ligandów o charakterze agonist MOR/antagonist  $\sigma_1R$ . Związki takie mogłyby mieć interesujące właściwości analgetyczne, ponieważ antagonisty  $\sigma_1R$  wykazują działanie przeciwbólne w bólu neuropatycznym, działają synergistycznie z opioidami w wielu typach bólu, a także wydają się zapobiegać powstawaniu tolerancji na opioidy i niektórych działań niepożądanych [19].

Trafność tej intuicji potwierdziły badania (niezależne od naszych) opublikowane kilka miesięcy później przez naukowców z firmy farmaceutycznej ESTEVE [20] oraz zespół Xiong et al. [21]. W obu pracach związki podobne do fentanyłu (w podstawowej strukturze) lub powstałe w wyniku hybrydyzacji jego fragmentu z innym fragmentem organicznym, wykazywały wysokie powinowactwo do MOR oraz  $\sigma_1R$ , a także pożądany profil funkcjonalny. Co bardzo ważne, *in vivo*, związki te miały obiecujące, silne

właściwości przeciwbólowe i lepszy profil działań niepożądanych w porównaniu do klasycznych opioidów.

Poszukiwanie mieszanych ligandów MOR/ $\sigma_1$ R należy do moich planów naukowych na najbliższą przyszłość. Mój projekt w tej tematyce uzyskał ostatnio finansowanie w ramach wewnętrznego konkursu projektów badawczych IMDiK PAN.

\*\*\*

Prace **H1-H3** powstały w ramach realizacji grantu NCN OPUS „Fentanylowe opioidowe dopalacze: od molekularnego modelowania do badań *in vitro*” (kierownik: prof. Joanna Sadlej). W tej tematyce jestem współautorem jeszcze 3 prac, których nie przedstawiłem jako składowych cyklu habilitacyjnego:

- Lipiński, P.F.J.; Jarończyk, M.; Ostrowski, S.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. Conformation of six fentanyl derivatives revisited. *Comput. Theor. Chem.* **2016**, *1086*, 18–24.
- Jarończyk, M.; Lipiński, P.F.J.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. The FMO analysis of the molecular interaction of fentanyl derivatives with the  $\mu$ -opioid receptor. *Chem. Pap.* **2017**, *71*, 1429–1443.
- Kurciński, M.; Jarończyk, M.; Lipiński, P.F.J.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. Structural Insights into  $\sigma_1$  Receptor Interactions with Opioid Ligands by Molecular Dynamics Simulations. *Molecules* **2018**, *23*, 456.

Poza tym nasze badania oraz prace innych autorów dotyczące fentanyli, receptora sigma oraz ligandów wielocelowych MOR/ $\sigma_1$ R opisałem w rozdziale („na zaproszenie”):

- Lipiński, P.F.J. ✉; Szűcs, E.; Jarończyk, M.; Kosson P.; Benyhe, S., Misicka, A.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. An excursion into secondary pharmacology of fentanyl derivatives with potential implications for drug design:  $\sigma_1$  receptor [w:] *The Neuroscience of Anesthetics and Analgesics*, red. Victor Preedy, Academic Press (Elsevier), planowana publikacja w 2021 roku.

## Obszar II: Substancje przeciwbólowe – peptydy opioidowe (prace H4-H8)

---

Poza fentanylem zajmowałem się także innymi związkami przeciwbólowymi – peptydami opioidowymi. Jest to bardzo szeroka grupa związków, zróżnicowana zarówno co do swojego pochodzenia jak i budowy chemicznej. Peptydy opioidowe produkowane w ośrodkowym układzie nerwowym są endogennymi ligandami receptorów opioidowych. W organizmie odgrywają rolę hormonów i neuromodulatorów, uczestnicząc w wielu procesach fizjologicznych, w tym w modulacji odczuwania bólu [22]. Ich rola i struktura inspirowała powstanie wielu syntetycznych analogów [23], które pierwotnie były używane jako związki narzędziowe, umożliwiające zrozumienie fizjologicznej roli receptorów opioidowych. Analogi syntetyczne odegrały także znaczącą rolę w badaniach wymagań strukturalnych dla ligandów receptorów opioidowych.

Zaproponowano również zastosowanie peptydowych opioidów (głównie syntetycznych) jako leków przeciwbólowych o potencjalnie lepszych właściwościach farmakologicznych [24]. Co prawda, przez wiele lat peptydy *in genere* nie były uważane za dobrych kandydatów na leki z powodu niskiej biodostępności (słaba przenikalność przez błony, szybki metabolizm przez endogenne peptydazy), ale w ostatnich kilkunastu latach pogląd ten przestał dominować [25–27]. Przyczyniły się do tego zarówno postęp w chemii peptydów, jak i pojawienie się nowych trendów w farmakologii i farmacji:


- dzięki odpowiednim modyfikacjom strukturalnym możliwe jest znaczące zwiększenie stabilności enzymatycznej oraz poprawa parametrów farmakokinetycznych,
- dzięki rozwojowi technologii postaci leku parenteralnego (np. nowoczesne systemy podające), drogi podania inne niż doustna niekoniecznie uważane są za nieakceptowalnie uciążliwe,

- dzięki modularnej budowie peptydów i prostej metodologii syntetycznej, możliwe jest generowanie wielu analogów i szybkie „przeczesywanie” SAR,
- dzięki tejże modularnej budowie i łatwości późnej funkcjonalizacji (przez wiązanie peptydowe) bioaktywne peptydy mogą być strukturami szkieletowymi dla różnego rodzaju substancji wielocelowych, wielofunkcyjnych biokoniugatów, np. radiofarmaceutyków do celowanej terapii radionuklidowej [28].

Z tych i innych powodów peptydy, peptydomimetyki, koniugaty oparte na peptydach cieszą się znaczącym zainteresowaniem we współczesnej chemii leków. Świadczy o tym m.in. fakt, że w latach 2017-2019, około 15 % zatwierdzeń (*approvals*) amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (FDA) dotyczyło peptydów lub aminokwasów [29].

Badania nad peptydami przeciwbólowymi, w których uczestniczyłem, związane były z:

- badaniem SAR syntetycznych peptydów opioidowymi z wykorzystaniem nienaturalnych aminokwasów (prace **H4** i **H5**),
- poszukiwaniem wielocelowych (opiodowo-antytachykininowych) związków hybrydowych łączących fragmenty peptydowe lub peptydowe i organiczne (prace **H6-H8**).

**H4.** Adamska-Bartłomiejczyk, A.; Lipiński, P.F.J.; Piekielna-Ciesielska, J.; Kluczyk, A.; Janecka, A.  **Pharmacological Profile and Molecular Modeling of Cyclic Opioid Analogues Incorporating Various Phenylalanine Derivatives.** *ChemMedChem* **2020**, *15*, 1322–1329.

IF(2019) = 3.124, pkty MNiSW(2019) = 100.

*Moja rola w badaniach opisanych w H4 polegała na wykonaniu dokowania, opisie SAR w kontekście wyników dokowania, przeprowadzeniu analizy korelacyjnej oraz wykonaniu części ilustracji.*

W zespole prof. Anny Janeckiej (Uniwersytet Medyczny w Łodzi) otrzymano cykliczny peptyd o sekwencji Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH<sub>2</sub> [30]. Związkiem wyjściowym do zaprojektowania tej struktury była endomorfina-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>). Omawiany cyklopeptyd jest agonistą opioidowym, charakteryzującym się wysokim powinowactwem receptorowym, stabilnością enzymatyczną i silnym działaniem przeciwbólowym *in vivo* po podaniu dokomorowym, a także po podaniu obwodowym.

W ramach badań mających na celu rozpracowanie zależności struktura-aktywność dla tego związku, zespół przygotował modyfikacje cyklopeptydu, w których fenyloalanina w pozycjach 3 i 4 została wymieniona na β<sup>3</sup>-fenyloalaninę (β<sup>3</sup>-Phe), *homo*-fenyloalaninę (hPhe), β<sup>3</sup>-*homo*-fenyloalaninę (β<sup>3</sup>-hPhe) lub fenyloglicynę (PhGly). Zsyntezowano 8 nowych związków, które zostały przebadane pod kątem powinowactwa do receptorów μ-, δ- i κ-opioidowych (skrótory odpowiednio: MOR, DOR i KOR) oraz pod kątem zdolności do aktywacji tych receptorów. Otrzymano zróżnicowany zestaw powinowactw, świadczący o tym, że nawet tak małe zmiany strukturalne (dodanie/odjęcie/przesunięcie jednej jednostki -CH<sub>2</sub>-) mogą mieć spory wpływ na aktywność związków tej serii.

W celu racjonalizacji otrzymanego SAR w kontekście oddziaływań z receptorem MOR przeprowadziłem dokowanie molekularne i analizę korelacyjną. Na podstawie dokowania uzyskałem model oddziaływania Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH<sub>2</sub> z MOR przedstawiony na Rysunkach 2 i 3 w **H4**. Oddziaływania peptydu z receptorem pogrupowałem według kryterium przestrzennego w trzy miejsca (*sites*). W ogólnym rysie cechowały się one:

- S1 – oddziaływaniem jonowym grupy aminowej Tyr<sup>1</sup> z Asp147; wiązaniem wodorowym atomu wodoru wiązania peptydowego Tyr<sup>1</sup>-D-Lys<sup>2</sup> z ugrupowaniem fenolowym Tyr148; licznymi oddziaływaniami hydrofobowymi,

- S2 – umiejscowieniem łańcucha bocznego Phe<sup>3</sup> w zdefiniowanym wgłębieniu utworzonym przez kilka aminokwasów helisy TM3 oraz pętli ECL1 i ECL2; licznymi kontaktami hydrofobowymi,
- S3 – położeniem łańcucha bocznego Phe<sup>4</sup> w pobliżu zewnątrzkomórkowego ujścia miejsca wiążącego, koło TM3, TM6, TM5 i TM7; licznymi kontaktami hydrofobowymi i trzema wiązaniami wodorowymi.

Według dokowania, modyfikacje obecne w analogach związku wyjściowego nie prowadzą do drastycznej zmiany całego *binding mode* i do analogów można w zasadzie zastosować schemat trójmiejskowy (S1, S2, S3). Niemniej jednak obserwuje się pewne zmiany w sposobie oddziaływania, które mogą racjonalnie wyjaśnić obserwowany eksperymentalnie SAR. Co ciekawe, przewidywana przez program dokujący wolna energia wiązania dość dobrze koreluje z eksperymentalnymi wartościami stałych inhibicji dla nowych analogów ( $R^2 = 0.73$ , Rysunek 6 w **H4**).

Modyfikacje w pozycji trzeciej znacząco przesuwają położenie pierścienia aromatycznego w S2 i jednocześnie prowadzą do dość dużych przegrupowań w miejscu S3. Modyfikacje w pozycji czwartej nie wpływają na oddziaływanie miejsca S2 i prowadzą do pewnych (choć niedużych) zmian w miejscu S3. Sumarycznie odpowiada to eksperymentalnej obserwacji, że modyfikacje w pozycji trzeciej mają większy (negatywny) wpływ na powinowactwo do MOR, podczas gdy pozycja czwarta jest bardziej tolerancyjna.

Od strony receptora można to powiązać z tym, że kształt miejsca S2 jest względnie dobrze zdefiniowany przez łańcuchy boczne aminokwasów, podczas gdy miejsce S3 ma sporo wolnej przestrzeni wypełnianej przez rozpuszczalnik. Wobec tego miejsce S2 ma tylko pewną dopuszczalną objętość partnerów oddziaływań, a miejsce S3 toleruje zmiany objętości obecnego w nim ugrupowania.

Aby zweryfikować użyteczność tego modelu jakościowego, sięgnąłem po starsze dane innych analogów cyklopeptydu, które miały różne podstawienia w pierścieniach aromatycznych pozycji 3 i 4. Okazało się, że w przypadku pozycji 3 można znaleźć (pół)ilościową, paraboliczną zależność między zmianą w objętości łańcucha bocznego, a powinowactwem (Rysunek 7 w **H4**). Dla pozycji 4, zgodnie z moim modelem, obserwowano małe zmiany powinowactwa (w tym poprawę w przypadku niektórych analogów).

Opisany przeze mnie w **H4** model oddziaływań cyklopeptydu z MOR może posłużyć do racjonalnego planowania dalszych pochodnych Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH<sub>2</sub>.

**H5.** Tymecka, D. ✉; Lipiński, P.F.J.; Kosson, P.; Misicka, A. ✉  **$\beta^2$ -Homo-Amino Acid Scan of  $\mu$ -Selective Opioid Tetrapeptide TAPP.** *Molecules* **2020**, *25*, 2461.

IF(2019) = 3.267, pkty MNiSW(2019) = 100.

*Moja rola w badaniach opisanych w H5 polegała na wykonaniu dokowania, opisie SAR w świetle wyników dokowania, przeprowadzeniu analizy korelacyjnej, wykonaniu części ilustracji oraz współudziale w napisaniu pierwszej i ostatniej wersji manuskryptu.*

Celem pracy **H5** było próbkowanie SAR tetrapeptydu opioidowego TAPP (H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>), cechującego się wysokim i selektywnym powinowactwem do receptora  $\mu$ . W tym wypadku zastosowano podejście określane jako „ $\beta^2$ -homo-amino acid scan”, polegające na zamianie poszczególnych aminokwasów w peptydzie na odpowiednie  $\beta^2$ -homologi. W pracy zsyntezowano 10 nowych analogów (4 pozycje x 2 stereoizomery + 2 analogi z R/S- $\beta^2$ -homo-meta-tyrozyną w pozycji 1). Związki te zostały przebadane pod kątem powinowactwa do receptorów MOR i DOR oraz pod kątem stabilności (odporności na proteolizę) w osoczu. Okazało się, że drobne zmiany strukturalne w TAPP mogą mieć bardzo duży wpływ na powinowactwo do MOR.

Aby zrozumieć SAR od strony oddziaływań peptyd-receptor, przeprowadziłem dokowanie TAPP i jego analogów do receptora MOR. Związek wyjściowy wiąże się z MOR w sposób podobny do krystalograficznego *binding mode* peptydu DAMGO (H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Gly-ol). W szczególności chodzi tu o następujące cechy wspólne:

- kanoniczne oddziaływanie jonowe protonowanej grupy aminowej Tyr<sup>1</sup> z Asp147,
- podobne położenie (i kontakty) pierścienia aromatycznego oraz grupy hydroksylowej Tyr<sup>1</sup>,
- podobne położenie (i kontakty) pierścienia aromatycznego Phe<sup>4</sup> we wgłębieniu odpowiadającym miejscu S2 opisanym przy omawianiu pracy **H4**.

Spośród cech różnicujących oba peptydy, w TAPP pierścień aromatyczny Phe<sup>3</sup> położony jest blisko Asn127 i His319 (lokalizacja podobna do miejsca S3 opisanego przy omawianiu pracy **H4**). Dodatkowo, C-końcowa grupa amidowa oddziałuje z Thr218 przez wiązanie wodorowe. Inne kontakty oraz nałożenie TAPP i DAMGO podane są na Rysunkach 2 i 3 w **H5**.

Jeśli chodzi o analogi TAPP, dokowanie przewiduje, że przeprowadzone modyfikacje mają znaczący wpływ na *binding mode*. Szczegółowo przedstawione jest to na Rysunku 4 w **H5** oraz w tabelach materiałów uzupełniających. Poza zachowaniem kanonicznego oddziaływania z Asp147, raczej nie da się sformułować dla całej serii prostej, ogólnej zależności między modyfikacjami strukturalnymi a zmianami w oddziaływaniach peptyd-receptor. Brak jest także korelacji między przewidywaną przez program dokujący energią swobodną wiązania a eksperymentalnym powinowactwem.

Jakościowa analiza sposobów oddziaływania pozwoliła mi na wychwycenie ciekawego powiązania położenia pierścienia aromatycznego w pozycji 4 i powinowactwa. Dla najsłabiej wiążących się pochodnych, modelowanie przewiduje znaczące przesunięcie tego pierścienia względem krystalograficznego położenia analogicznego pierścienia w DAMGO. Możliwe jest nawet ujęcie ilościowe w postaci równania korelacyjnego, gdzie zmienna modelująca to wyrażone w angstromach przesunięcie atomów pierścienia w zadokowanej pozycji (w porównaniu do pozycji krystalograficznej DAMGO), a zmienną modelowaną jest eksperymentalne powinowactwo analogów TAPP. Otrzymuje się powiązanie o dość dobrym współczynniku  $R^2 = 0.67$  (Rysunek 5 w **H5**).

Aby sprawdzić, czy zależność tego typu może mieć moc eksplanacyjną także poza zbiorem  $\beta^2$ -homologów TAPP, zadokowałem do MOR 12 dodatkowych peptydów o ogólnej strukturze H-Tyr-Xxx-Yyy-Phe-NH<sub>2</sub> i wykorzystałem przesunięcie pierścienia w pozycji 4 (względem krystalograficznego położenia DAMGO) do przeprowadzenia analogicznej analizy korelacyjnej. W tym zbiorze również dało się zaobserwować dość dobrą zależność ( $R^2 = 0.60$ , Rysunek 5 w **H5**), choć należy zauważyć, że w zestawie obecne są obserwacje typu „wysokiej dźwigni”<sup>5</sup>, co nakazuje ostrożność interpretacyjną. Niemniej jednak, przy zachowaniu tego zastrzeżenia, zależność powinowactwa od przesunięcia pierścienia w pozycji 4 (wg dokowania), może stanowić ciekawe narzędzie do dalszego projektowania analogów TAPP lub szerszej grupy peptydów opioidowych.

Wśród nowosyntezyzowanych analogów TAPP szczególną uwagę przykuwa para związków mających w pozycji 1 (S)- $\beta^2$ hTyr lub (S)- $\beta^2$ h-*m*-Tyr. Izomeria pozycyjna grupy hydroksylowej (pozycje *para* i *meta*) wiąże się tutaj z ponad 30-krotną różnicą w powinowactwie do MOR. Według wyników dokowania odpowiada za to powstanie w przypadku pochodnej *meta* dodatkowego wiązania wodorowego z grupą karbonylową Ile296 (Rysunek 6 w **H5**).

W pracy **H5** udało mi się zatem zastosować modelowanie molekularne i analizę korelacyjną do objaśnienia niektórych aspektów SAR dla peptydu TAPP. Spostrzeżenia jakościowe oraz model korelacyjny mogą posłużyć do projektowania nowych peptydów opioidowych.

---

<sup>5</sup> *high-leverage* – obserwacje o nietypowej wartości zmiennej modelującej

**H6.** Dyniewicz, J. ✉; Lipiński, P.F.J. ✉; Kosson, P.; Bochyńska-Czyż, M.; Matalińska, J.; Misicka, A. ✉ **Antinociceptive and Cytotoxic Activity of Opioid Peptides with Hydrazone and Hydrazide Moieties at the C-Terminus.** *Molecules* **2020**, *25*, 3429.

IF(2019) = 3.267, pkty MNiSW(2019) = 100.

*Moja rola w badaniach opisanych w H6 polegała na przeprowadzeniu dokowań, opisanu zależności SAR w kontekście dokowania, przeprowadzeniu analizy korelacyjnej, przygotowaniu (wspólnie z innymi autorami korespondencyjnymi) pierwszej wersji manuskryptu oraz prowadzeniu (wspólnie z innymi autorami korespondencyjnymi) korespondencji z redakcją.*

Badania opisane w pracy **H6** dotyczyły związków hybrydowych, składających się z elementów farmakoforowych właściwych dla peptydów opioidowych (enkefalin, TAPP, endomorfiny-2) oraz małowiązanych antagonist NK1R. Motywacją do tworzenia takich hybryd jest udział receptorów NK1R oraz ich endogenego liganda, Substancji P (SP), w modulacji antynocycypcji. Wydaje się, że jednoczesne aktywowanie receptorów opioidowych i blokowanie receptorów NK1R pozwala na uzyskanie silnego działania przeciwbólowego przy jednoczesnym ograniczeniu rozwoju tolerancji i powstawania typowych działań niepożądanych opioidów [31,32].

W pracy **H6** analizowane były nowe hybrydy opioidowo-antytachykininowe, w których sekwencje opioidowe zostały połączone z fragmentem 3,5-bistrifluorometylofenylowym za pomocą ugrupowania *N*-acylohydrazonu lub *N'*-acylohydrazidu w celu zbadania wpływu takich modyfikacji na właściwości biologiczne. Uzyskane związki charakteryzowały się zróżnicowanym powinowactwem do MOR, słabym powinowactwem do DOR oraz brakiem znaczącego powinowactwa do NK1R. *In vivo* nowe analogi miały względnie silne działanie przeciwbólowe. Badania komórkowe wykazały także działanie cytotoksyczne niektórych pochodnych na linie komórkowe czerniaka.

Wśród ciekawszych danych SAR, które obserwowano w omawianym zbiorze hybryd, było m.in. to, że:

- w przypadku pochodnych TAPP, C-końcowe podłączenie fragmentu organicznego (nienaruszające w zasadzie farmakoforowych elementów struktury) prowadziło do znacznego spadku powinowactwa do MOR (względem związku wyjściowego),
- w kilku wypadkach, w parach analogów opartych na strukturze *N*-acylohydrazonu lub *N'*-acylohydrazidu, te ostatnie miały niższe powinowactwo do MOR.

W celu zrozumienia strukturalnego podłoża tych obserwacji, modelowałem badane związki oraz ich wyjściowe analogi w miejscu wiążącym MOR. Początkowo (co nie zostało opisane w pracy **H6**) próbowałem ustalić *binding mode* analizowanych hybryd za pomocą typowej procedury dokowania automatycznego. Otrzymywane w taki sposób modele oddziaływania były sprzeczne z intuicją opartą na licznych danych eksperymentalnych dotyczących innych ligandów MOR (z mutagenyzy, SAR, krystalografii). Przykładowo, program dokujący kierował C-końcowy fragment organiczny głęboko do wnętrza kieszeni MOR, zaś fragment N-końcowy na brzeg kieszeni receptora bez utworzenia kanonicznego oddziaływania protonowanej grupy aminowej Tyr<sup>1</sup> z Asp147. Zważywszy na tę sprzeczność, oraz na to, że badane hybrydy są związkami dość dużymi, o znaczącej liczbie wolnorodujących wiązań, a kieszeń wiążąca receptora MOR jest obszerna, przyjąłem, że otrzymane sposoby oddziaływania są artefaktami.

Wobec tego zastosowałem „dokowanie przez nadbudowę”. Podejście to polega na:

- wybraniu (np. na podstawie danych z krystalografii, albo z dokowania automatycznego) wiarygodnego modelu oddziaływania z receptorem dla głównego fragmentu molekuly (ligand-rodzic),
- ręcznym rozbudowaniu struktury liganda-rodzica w kompleksie o elementy dodatkowe takie jak podstawniki, albo duże fragmenty,



- przeprowadzeniu optymalizacji za pomocą algorytmów przeszukiwania lokalnego (*local search* w programie AutoDock 4 [33]).

Taktyka taka pozwala na zawężenie przeszukiwania do racjonalnie uzasadnionej podprzestrzeni możliwych rozwiązań.

Wychodząc z eksperymentalnej struktury kompleksu DAMGO-MOR [34] (dla pochodnych enkefalin) lub ze struktur pochodzących z dokowania (np. w przypadku pochodnych TAPP; tutaj modelowanie liganda-rodzica opisałem w pracy **H5**), zaproponowałem sposoby oddziaływania z receptorem MOR dla naszych hybryd. Według użytej procedury, dobudowanie C-końcowego fragmentu nie ma dużego wpływu na oddziaływanie części N-końcowej (opiodowej) z receptorem (Rysunki 4-6 w **H6** oraz rysunki w materiałach uzupełniających). Zasadniczo obserwuje się tylko delikatne przesunięcia pozycji atomów w porównaniu do ligandów-rodziców.

Co do części C-końcowej, w przypadku analogów enkefalin, obserwuje się utworzenie wiązania wodorowego między Tyr148 a elementami ugrupowania hydrazonowego lub hydrazydowego oraz szereg kontaktów między grupą 3,5-bistrifluorometylofenylową a receptorem, zróżnicowanych zależnie od zastosowanego łącznika (Rysunek 4 w **H6**). W przypadku analogów TAPP, dołączenie na C-końcu fragmentu organicznego, powoduje stratę jednego wiązania wodorowego, co może odpowiadać spadkowi powinowactwa analogów do MOR w porównaniu do związku wyjściowego (Rysunek 5 w **H6**). Z drugiej strony, modelowanie nie sugeruje prostego wyjaśnienia, dlaczego w kilku przypadkach pochodne *N'*-acylohydrazidu wiążą się słabiej od analogicznych pochodnych *N*-acylohydrazonu. Należy też zauważyć, że brak jest korelacji między szacowaną przez program dokujący wolną energią wiązania a eksperymentalnymi danymi o powinowactwie.

Poza analizą sposobu oddziaływania nowosyntezyowanych hybryd z receptorem MOR, mój wkład w badania opisane w **H6** polegał także na przeprowadzeniu analizy korelacyjnej dotyczącej aktywności cytotoksycznej omawianych związków. Motywacją do badania cytotoksyczności naszych hybryd było ich potencjalne oddziaływanie z receptorem NK1. W przypadku zarówno agonist i antagonist NK1R opisany jest wpływ na proliferację komórek nowotworowych (odpowiednio pozytywny i negatywny) [35]. Kilka z omawianych związków miało silną lub bardzo silną zdolność do redukcji liczby komórek czerniaka (*in vitro*). Badania receptorowe wykazały jednakowoż, że zsyntezowane analogi cechują się bardzo niskim lub praktycznie żadnym powinowactwem do NK1R. Wobec tego powstaje problem zrozumienia mechanizmu ich cytotoksyczności.

Analiza korelacyjna nie wykazała związku ilościowego z powinowactwem do receptora MOR lub DOR. Zaproponowałem więc powiązanie wpływu na proliferację komórkową z lipofilowością badanych peptydów. Dla przeprowadzenia tej analizy, najpierw rozważaliśmy, czy teoretyczny deskryptor lipofilowości (logP z programu ACD/ChemSketch [36]) odzwierciedla eksperymentalne zachowanie badanych pochodnych. W tym celu przeprowadzono korelację czasu retencji (w chromatografii kolumnowej w odwróconym układzie faz) z logP. Po stwierdzeniu zgodności tych parametrów ( $R^2 = 0.95$ , Rysunek 3 w **H6**) w badanym zbiorze, logP został użyty jako zmienna modelująca przeżywalność komórek nowotworowych czerniaka. Po wykluczeniu punktu odstającego uzyskano tutaj zależność liniową (o ujemnym współczynniku kierunkowym) o względnie wysokim współczynniku determinacji,  $R^2 = 0.76$  (Rysunek 9 w **H6**). Korelacja taka oznacza, że im bardziej lipofilowy jest związek, tym silniejsza jest jego aktywność cytotoksyczna.

Zależność cytotoksyczności od lipofilowości sugeruje działanie cytotoksyczne w mechanizmie niespecyficznym. Alternatywnie możliwe jest, że cytotoksyczność wynika z oddziaływania z jakimś celem molekularnym (np. wewnątrzkomórkowym), ale dostęp do takiego celu molekularnego limitowany jest zdolnością związków do przenikania przez błony.

Podsumowując, w pracy **H6** zaprezentowałem możliwe modele oddziaływania grupy hybryd opiodowo-antytachykininowych z receptorem  $\mu$ -opiodowym. Modele te uzyskałem, stosując

nietypową strategię dokowania – „dokowanie przez nadbudowę” - która w tym przypadku dała wyniki znacznie lepsze (w znaczeniu zgodności z chemiczną intuicją) niż typowe dokowanie automatyczne. Wydaje się, że strategia taka może być szczególnie przydatna w modelowaniu oddziaływań kompleksów z receptorem dużych koniugatów i związków wielocelowych (podejście takie zastosowałem później w **H7** i **H10**). Drugim ważnym wynikiem pracy **H6** było stwierdzenie zależności między aktywnością cytotoksyczną hybryd a ich lipofilowością. Oba te elementy (modele i odkryta zależność) pozwolą na racjonalne planowanie badań nad nowymi analogami omawianych hybryd.

**H7.** Matalińska, J. ✉<sup>①</sup>; Lipiński, P.F.J. ✉<sup>①</sup>; Kosson, P.; Kosińska, K.; Misicka, A. **In vivo, in vitro and in silico studies of the hybrid compound AA3266, an opioid agonist/NK1R antagonist with selective cytotoxicity.** *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7738.

✉ - autor korespondencyjny, <sup>①</sup> - równorzędny pierwszy autor.

IF(2019) = 4.556, pkty MNiSW(2019) = 140.

*Moja rola w badaniach opisanych w H7 polegała na przeprowadzeniu dokowań, przeprowadzeniu symulacji dynamiki molekularnej, przeprowadzeniu obliczeń typu Fragment Molecular Orbitals (FMO), współuczestnictwie w redakcji pierwszej i ostatniej wersji manuskryptu, oraz prowadzeniu (wspólnie z drugim autorem korespondencyjnym) korespondencji z redakcją.*

Badania opisane w pracy **H7** dotyczyły związku AA3266, który jest hybrydą opioidowo-antytachykininową. Strukturalnie, związek ten łączy w sobie fragment enkefalinowy (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-...) z motywem N-karboksybenzylo-D-tryptofanu charakterystycznym dla małowcząsteczkowych antagonist NK1R. Badania *in vivo* i *in vitro* wykazały bardzo korzystne właściwości farmakologiczne AA3266:

- wysokie powinowactwo do receptorów MOR i DOR, oraz dość dobre powinowactwo do NK1R,
- silne właściwości przeciwbólowe,
- wolniejszy rozwój tolerancji przeciwbólowej niż w przypadku morfiny,
- brak rozwoju „zaparcia opioidowego” (w modelu zwierzęcym),
- cytotoksyczność selektywną wobec komórek nowotworowych (mały wpływ na komórki prawidłowe).

Wobec powyższego, AA3266 jest dobrym związkiem wiodącym dla poszukiwania leków przeciwbólowych do stosowania w bólach nowotworowych. Docelowy związek charakteryzowałby się silnym efektem analgetycznym, bez typowych opioidowych działań niepożądanych, oraz działaniem antyproliferacyjnym wobec komórek nowotworowych. W celu przygotowania kampanii optymalizacyjnej AA3266, przeprowadziłem wszechstronne modelowanie kompleksów tej hybrydy z receptorami MOR oraz NK1R. Metodyka modelowania obejmowała dokowanie molekularne (według omówionej w **H6** strategii „dokowania przez nadbudowę”), pełnoatomową dynamikę molekularną oraz obliczenia kwantowo-chemiczne typu FMO (*Fragment-Molecular Orbitals*) z analizą rozkładu energii PIEDA (*pair-interaction energy decomposition analysis*) [37].

Dla uzyskania startowych konfiguracji kompleksów AA3266-MOR, dobudowałem fragment antytachykininowy do struktury Tyr-D-Ala-Gly-Phe... w krystalograficznym kompleksie DAMGO z receptorem MOR [34]. Dalej, kompleks ten optymalizowałem przez dokowanie lokalne jak w pracy **H6**. W przypadku AA3266-NK1R, acylowany wariant substruktury antytachykininowej AA3266 był zadokowany (przez dokowanie automatyczne) do receptora, następnie najlepiej ocenione rozwiązanie posłużyło do rozbudowy molekuly o fragment opioidowy, a tak powstały kompleks był optymalizowany przez dokowanie lokalne. Najlepsze energetycznie pozy z dokowań lokalnych posłużyły jako punkt wyjściowy symulacji MD. Trajektorie zostały połączone, nałożone na wspólny punkt odniesienia i poddane analizie skupień w celu opisanie ruchomości poszczególnych fragmentów AA3266.

Według MD, w poszczególnych receptorach (MOR albo NK1R) część farmakoforowa odpowiednia dla danego receptora charakteryzuje się w zasadzie jednym stabilnym *binding mode*. W przypadku AA3266-MOR, poza wykazującą oddziaływania podobne do krystalograficznych oddziaływań DAMGO-MOR, jest próbkowana przez 72% czasu symulacji (analiza skupień przy rozdzielczości 1.4 Å), a pozostałe trzy znaczące skupienia zachowują ważniejsze cechy skupienia głównego. W przypadku AA3266-NK1R, analiza skupień przy rozdzielczości 1.0 Å znajduje tylko jeden *binding mode*. Dopiero zastosowanie rozdzielczości 0.8 Å, ujawnia cztery pozy, które są do siebie dość podobne, jeśli chodzi o ogólny zarys oddziaływań.

Drugi, niefarmakoforowy dla danego receptora, fragment hybrydy cechuje się w obu receptorach dużą heterogennością pól obserwowanych w MD. Analiza skupień pozycji fragmentu -NH-NH<-Z-D-Trp w kompleksie z MOR (przy rozdzielczości 1.4 Å) ujawnia aż 9 skupień obecnych w od 2% do 11 % czasu analizowanych trajektorii. Podobnie w NK1R, fragment opioidowy przyjmuje 10 różnych pozycji (analiza skupień przy rozdzielczości 1.4 Å) obserwowanych w 2% do 17% czasu MD. Rejestrowana tutaj heterogenność pól może być artefaktem wynikającym z dość krótkich czasów symulacji. Z drugiej strony, może ona odzwierciedlać prawdziwą mobilność niefarmakoforowego fragmentu umiejscowionego przy ujściu kieszeni wiążącej receptora. Za tym drugim przemawiają pewne przesłanki literaturowe z badań eksperymentalnych i obliczeniowych związanych z receptorami opioidowymi lub tachykininowymi.

Aby uzyskać szczegółowy wgląd w energię oddziaływań obserwowanych w poszczególnych pozach w MD, struktury kompleksów reprezentatywne dla znalezionych skupień poddałem analizie FMO-PIEDA na poziomie FMO-MP2/6-31G\*/PCM. W wyniku takiej analizy uzyskuje się całkowitą energię oddziaływania (*total interaction energy*, TIE) będącą sumą wkładów energii oddziaływań poszczególnych par (*pair interaction energy*, PIE) fragment liganda - fragment receptora. Dodatkowo, metodologia ta umożliwia rozkład energii na składowe: elektrostatyczną, przeniesienia ładunku (*charge-transfer*, CT), dyspersyjną i wymiany. Energie TIE uzyskiwane w obliczeniach FMO-PIEDA stosuje się jako estymaty energii oddziaływania ligandów z receptorem. Często uzyskiwane są dobre korelacje [38,39], a szczegółowy opis charakteru oddziaływań w kompleksach umożliwia racjonalne projektowanie nowych substancji czynnych [40]. Zastosowanie schematu FMO-PIEDA w poszukiwaniu leków jest podejściem nowym i obiecującym, wobec czego postanowiłem zastosować je do analizy kompleksów AA3266 z receptorami. O ile wiem, FMO-PIEDA nigdy nie było stosowane do modelowania bioaktywnych peptydów i hybryd opartych na peptydach.

W obu receptorach, oddzielnie rozważałem część opioidową i antytachykininową AA3266. Zgodnie z intuicją, energia oddziaływania fragmentu opioidowego z MOR (Tabela 2 w **H7**) jest większa (bardziej ujemna) niż energia oddziaływania fragmentu antytachykininowego z MOR (Tabela 4 w **H7**), choć ta druga może osiągać nawet około ćwiertni wartości tej pierwszej. W obu przypadkach, energetyka zdominowana jest przez wkład składowych elektrostatycznych i CT.

Jeśli chodzi o kompleksy z receptorem NK1R, energia oddziaływania części antytachykininowej (Tabela 5 w **H7**) charakteryzuje się znaczącym wkładem wyrazu opisującego oddziaływanie dyspersyjne. Fragment opioidowy w NK1R natomiast cechuje się energiami oddziaływania o dużym wkładzie ze strony oddziaływań elektrostatycznych i CT (Tabela 7 w **H7**). Co niespodziewane, według podejścia FMO-PIEDA, energie oddziaływania (niefarmakoforowego) fragmentu opioidowego z NK1R są nawet ponad dwukrotnie większe (bardziej ujemne) od energii oddziaływań (farmakoforowego) fragmentu antytachykininowego z NK1R. Oczywiście, takie energie nie uwzględniają wielu czynników składających się na entalpię swobodną wiązania, np. zmian entropii cząsteczek rozpuszczalnika, zmian entropii konformacyjnej receptora i liganda *etc.* Wobec przytoczonego nieintuicyjnego spostrzeżenia, można jednak spekulować, że powinowactwo związku hybrydowego do NK1R mogłoby zostać poprawione przez stosowne modyfikacje części opioidowej hybrydy, np. przez usztywnienie struktury tego fragmentu, które redukowaloby „karę entropową”.

Z drugiej strony, analiza konformacji hybrydy próbkowanych podczas symulacji MD sugeruje, że zadanie takie może być utrudnione przez zupełnie inne konformacje bioaktywne części opioidowej spotykane w symulacjach z MOR i z NK1R (Rysunek 10 w **H7**). Co ciekawe, część antytachykininowa w kompleksach z oboma receptorami przyjmuje konformacje znacznie bardziej do siebie zbliżone.

Modelowanie przedstawione w pracy **H7** jest pierwszą próbą modelowania oddziaływania hybrydowych związków agonista MOR/antagonista NK1R w kompleksach z oboma receptorami opisaną w literaturze. Modelowanie takie jest bardzo ważne z punktu widzenia projektowania związków wielocelowych, w przypadku których „pogodzenie” wymagań farmakoforowych obu receptorów bywa dużym wyzwaniem. Dalej, w pracy **H7** – również po raz pierwszy w literaturze - opisałem zastosowanie metody FMO-PIEDA w analizie oddziaływań bioaktywnych peptydów.

**H8.** Matalińska, J. ✉; Lipiński, P.F.J. ✉; Kotlarz, A.; Kosson, P.; Muchowska, A.; Dyniewicz, J. **Evaluation of Receptor Affinity, Analgesic Activity and Cytotoxicity of a Hybrid Peptide, AWL3020.** *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2020**, *26*, 2603–2617.

✉ - autor korespondencyjny.

IF(2019) = 1.500, pkty MNiSW(2019) = 40.

*Moja rola w badaniach opisanych w H8 polegała na przeprowadzeniu dokowań, współuczestnictwie w redakcji pierwszej i ostatniej wersji manuskryptu, oraz prowadzeniu (wspólnie z drugim autorem korespondencyjnym) korespondencji z redakcją.*

W kolejnej z prezentowanych prac, **H8**, opisano peptyd AWL3020, będący hybrydą opioidowo-antytachykininową. Związek ten zbudowany jest z fragmentów analogów deltorfiny (Tyr-D-Ala-Phe-His-Leu-Leu-Asp...) oraz pochodnych spantydu I (...D-Phe-Phe-D-Phe-Leu-Leu-NH<sub>2</sub>). Badania *in vitro* i *in vivo*, wykazały:

- wysokie powinowactwo AWL3020 do DOR oraz niskie powinowactwo do MOR i NK1R,
- dość silne (ale słabsze niż morfina) działanie przeciwbólowe w zwierzęcym modelu bólu ostrego,
- umiarkowaną aktywność antyproliferacyjną wobec komórek nowotworowych (lecz nieselektywną względem komórek prawidłowych).

Wydaje się więc, że AWL3020 może być związkiem wiodącym w poszukiwaniu peptydowych analgetyków z dodatkowym działaniem przeciwnowotworowym. Korzystna byłaby jednak poprawa powinowactwa do receptorów NK1 oraz uzyskanie selektywności cytotoksyczności. Przyszłe modyfikacje struktury peptydu nie powinny negatywnie wpływać na wysokie powinowactwo do DOR. Wobec tego postanowiłem zasugerować sposób oddziaływania AWL3020 z DOR za pomocą modelowania molekularnego.

Na podstawie wyników dokowania molekularnego, zaproponowałem prawdopodobny *binding mode* peptydu. Według tej propozycji AWL3020 łączy się z DOR przez wprowadzenie części N-końcowej do kieszeni wiążącej receptora. Kompleks stabilizowany jest przez oddziaływanie protonowanej grupy aminowej Tyr<sup>1</sup> z Asp128 i szereg oddziaływań hydrofobowych między receptorem a peptydem (Rysunki 3 i 4 w **H8**). Oddziaływania AWL3020 różnią się od oddziaływań krystalograficznego liganda DIPP-NH<sub>2</sub>, którego kompleks z receptorem DOR poznany jest eksperymentalnie. O ile w obu przypadkach obecne jest kanoniczne oddziaływanie protonowana grupa aminowa ... Asp128, pozostałe kontakty są inne. Przykładowo, Phe<sup>3</sup> w AWL3020 usytuowane jest koło TM5, podczas gdy w DIPP-NH<sub>2</sub> odpowiadający pierścień aromatyczny skierowany jest do TM3.

*Binding mode* AWL3020 zaprezentowany w pracy **H8** stanowi ważną informację wspomagającą proces optymalizacji tego związku.

### Obszar III: Substancje przeciwnowotworowe (prace H9-H11)

W pracach **H9-H11** zajmowałem się substancjami przeciwnowotworowymi, działającymi w różnych mechanizmach. Przedmiotem tych publikacji były:

- talidomid (**H9**)
- radiofarmaceutyki oparte na strukturze aprepitantu, mające na celu selektywne dostarczanie terapeutycznych lub diagnostycznych radionuklidów do nowotworów nadekspresjonujących receptory tachykininowe NK1 (**H10**),
- peptydowe związki antyangiogenne, inhibitory oddziaływania neuropiliny-1 z czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (**H11**).

**H9.** Kowalczyk, A. ①; Lipiński, P.F.J. ①; Karoń, K.; Rode, J.E.; Lyczko, K.; Dobrowolski, J.Cz. ✉; Donten, M.; Kaczorek, D.; Poszytek, J.; Kawęcki, R. ✉; Łapkowski, M.; Malkowska, A.; Grudziński, I.P. ✉; Nowicka, A.M. ✉ **Enantioselective sensing of (S)-Thalidomide in blood plasma with a chiral naphthalene diimide derivative.** *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *167*, 112446.

① - równorzędny pierwszy autor.

IF(2019) = 10.257, pkty MNiSW(2019) = 200.

*Moja rola w badaniach opisanych w H9 polegała na przeprowadzeniu dokowań, obliczeń kwantowo-chemicznych, przygotowaniu niektórych ilustracji oraz współdziała (wraz z innymi autorami) w przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Badania opisane w pracy **H9** odbiegają od pozostałych publikacji prezentowanych w cyklu habilitacyjnym. Nie mamy tutaj do czynienia z typowymi zagadnieniami z zakresu poszukiwania nowych leków, ale raczej z szeroko rozumianą chemią leków przeciwnowotworowych.

W trakcie projektu (wykonywanego przez wiele grup z różnych ośrodków) dotyczącego chiralnych naftaleno- oraz perylenodiimidów (odpowiednio NDI oraz PDI), okazało się, że niektóre z syntezowanych pochodnych mają właściwości półprzewodnikowe umożliwiające zastosowanie ich do konstrukcji sensorów voltamperometrycznych substancji chiralnych. Badania analityczne udowodniły, że sensor na bazie związku (*R*)-NDI-1 (Schemat 1 w **H9**) umożliwia enancjoselektywne, bezrozdzielowe (*separationless*), ilościowe oznaczenie (*S*)-talidomidu ((*S*)-TD) w roztworach, w tym w próbkach osocza szczurzego. Sensor taki ma potencjalnie bardzo duże znaczenie praktyczne, zważywszy na znaną teratogenność enancjomeru *S*, racemizację talidomidu w roztworach oraz na to, że lek ten jest współcześnie stosowany w terapii niektórych nowotworów i trądu [41]. Trwają też badania nad zastosowaniem w innych obszarach terapeutycznych.

Moim zadaniem była próba zaproponowania możliwej podstawy strukturalnej enancjoselektywnego rozpoznania izomerów talidomidu. Zadanie takie należy w pewnym sensie do beznadziejnie skomplikowanych, ponieważ brak jest jakichkolwiek wskazówek strukturalnych co do tego, jak może wyglądać kompleks odpowiadający za rozpoznanie molekularne na granicy faz roztworu i elektrody modyfikowanej chiralnym selektorem. Ilość możliwych kombinacji jest olbrzymia, głównie z powodu możliwych ułożeń wielu cząsteczek selektora. Zdając sobie z tego sprawę, przyjąłem jednakowoż upraszczające założenie, że powstanie sygnału w sensorze wynika z oddziaływania 1:1 cząsteczek selektora i selektandu. Nawet w takim przypadku liczba możliwych geometrii takiego kompleksu jest bardzo duża. Dla zbadania zagadnienia zaproponowałem – dość nowatorskie<sup>6</sup> – podejście polegające na zastosowaniu dokowania i obliczeń kwantowo-chemicznych. Jest ono o tyle

<sup>6</sup> Nie znam żadnych prac w literaturze stosujących podobne podejście. Ogółem, literatura dotycząca modelowania rozpoznania chiralnego w sensorach jest raczej skąpa.

nietypowe, że dokowanie molekularne (w programie AutoDock [33]) jest stosowane prawie wyłącznie do badania kompleksów białek z małymi cząsteczkami organicznymi.

W pierwszym kroku wygenerowałem ponad 400 konformerów „receptora” NDI-1. Konformery te zostały użyte jako „szytne receptory” do dokowania obu enancjomerów talidomidu (w uprzednio wygenerowanych kilku konformacjach). Wyniki tych prawie 5000 symulacji zostały pogrupowane w skupienia („poklastrowane”), a następnie około 2000 kompleksów każdego enancjomeru z „receptorem”, poddałem optymalizacji kwantowo-chemicznej na poziomie B3LYP/6-31G\*\* z zastosowaniem, lub bez zastosowania, empirycznej poprawki Grimma na oddziaływanie dyspersyjne GD3. Po odfiltrowaniu zdublowanych kompleksów, obliczyłem populacje według rozkładu Maxwella-Boltzmana dla temperatury pokojowej. Dalszej analizie poddałem kompleksy, których udział w populacji wynosił co najmniej 1%. Dla tychże wyznaczyłem energie oddziaływania. Uwzględniłem błąd superpozycji bazy przez poprawkę siedmiopunktową (*seven point*) [42].

Okazało się, że najstabilniejszy kompleks (R)-NDI-1 ⋯ (S)-TD jest stabilniejszy od najstabilniejszego kompleksu (R)-NDI-1 ⋯ (R)-TD o 2.1 kcal/mol. Podobną różnicę energetyczną widać dla kompleksów (S)-NDI-1 ⋯ (R)-TD i (S)-NDI-1 ⋯ (S)-TD. Bardzo dobrze odpowiada to uzyskanym danym eksperymentalnym.

Strukturalnie, kompleksy selektor-selektand (Rysunek 4 w **H9**) są stabilizowane przez dwa wiązania wodorowe pomiędzy sulfonamidem receptora i ugrupowaniem glutarimidowym talidomidu. Dodatkowo, enancjomer S talidomidu (w parze z enancjomerem R „receptora”), tworzy oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  i  $\pi$ -wolna para elektronowa. Wydaje się, że z powodu nieznacznej różnicy w kształcie enancjomerów talidomidu, niemożliwe jest utworzenie kompleksu ze wszystkimi tymi oddziaływaniami jednocześnie w przypadku drugiego enancjomeru selektandu.

Model oddziaływania talidomidu z chiralnym naftalenodiimidem opisany w pracy **H9**, pomimo swojego wstępnego charakteru, jest wartościowym punktem wyjścia dla projektowania nowych sensorów chiralnych. Wydaje się także, że udało mi się zaproponować interesujące podejście metodologiczne do badania rozpoznania chiralnego w sensorach, łączące dokowanie molekularne (mechanika molekularna) i obliczenia kwantowo-chemiczne. Z pewnością ta propozycja również ma charakter wstępny, i wymaga głębszego opracowania w kwestiach, np.

- uwzględniania kompleksów selektor-selektand innych niż 1:1,
- uwzględniania współudziału rozpuszczalnika,
- stosowania odpowiednich pól siłowych w dokowaniu (lub opracowania nowych),
- zbadania wpływu poziomu teoretycznego na wyniki,
- oraz walidacji zastosowania prospektywnego.

Mam nadzieję w niedalekiej przyszłości podjąć się opracowania części z wymienionych aspektów.

**H10.** Halik, P.K. ✉; Lipiński, P.F.J.; Matalińska, J.; Koźmiński, P.; Misicka, A.; Gniazdowska, E. **Radiochemical Synthesis and Evaluation of Novel Radioconjugates of Neurokinin 1 Receptor Antagonist Aprepitant Dedicated for NK1R-Positive Tumors.** *Molecules* **2020**, *25*, 3756.

IF(2019) = 3.267, pkty MNiSW(2019) = 100.

*Moja rola w badaniach opisanych w H10 polegała na wykonaniu dokowania, opisie i interpretacji SAR w kontekście wyników dokowania oraz wykonaniu części ilustracji.*

Badania opisane w pracy **H10** dotyczą poszukiwania radiofarmaceutyków do terapii radionuklidowej celowanej w receptor NK1. Związki tego typu mogą mieć potencjalne zastosowanie do diagnostyki i terapii glejaka wielopostaciowego. Ogólną strukturę takich radiofarmaceutyków można przedstawić: wektor – łącznik – chelator z radiometalem. Jako fragment wektorowy stosowana jest zazwyczaj (pod)struktura silnie wiążącego się liganda danego celu molekularnego. Kluczowym

problemem w projektowaniu radiofarmaceutyków jest charakter i długość łącznika, oraz miejsce jego przyłączenia do struktury wektora. Docelowy radiobiokoniugat musi charakteryzować się odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi oraz utrzymaniem wysokiego powinowactwa do *targetu*. Realizacja tego drugiego warunku może być nieraz bardzo trudna, zważywszy na to, że zazwyczaj silne ligandy mają zoptymalizowaną strukturę, w której nie ma elementów zbędnych, oraz to, że rozbudowa molekuly o dalsze elementy może np. prowadzić do niekorzystnych zawaad sterycznych w miejscu oddziaływania.

W celu rozwiązania takiego problemu w ramach konsorcyjnego projektu wykonywanego przez grupę z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie oraz nasz zespół (IMDiK PAN), zsyntezowano koniugaty aprepitantu (silnego antagonisty NK1R) z różnymi łącznikami i chelatorami przyłączonymi poprzez azot pierścienia triazolinonowego. Związki zostały wyznakowane metalami i poddane charakterystyce fizykochemicznej. Dodatkowo, zbadano powinowactwo pięciu analogów do receptora NK1R (pochodzenia szczurzego). Wszystkie związki wiązały się słabiej z NK1R w porównaniu do związku wyjściowego, ale w przypadku jednego analogu, spadek wiązalności był tylko około pięciokrotny.

Chcąc zrozumieć eksperymentalne powinowactwo naszych związków w kontekście oddziaływań ligand-receptor, modelowałem kompleksy koniugatów aprepitantu z receptorem NK1. Podobnie jak w pracach **H6** i **H7**, przyjąłem, że rozbudowa molekuly na końcu skierowanym w stronę ujścia miejsca wiążącego nie powinna drastycznie zmienić oddziaływań fragmentu zlokalizowanego w głębi kieszeni wiążącej. Zastosowałem więc ponownie procedurę „dokowania przez rozbudowę”. Punktem startowym były struktury, w których do krystalograficznej pozycji aprepitantu w NK1R [43] dobudowałem odpowiednie fragmenty zsyntezowanych analogów.

Dokowanie potwierdziło, że obecność *linkera* i chelatora (DOTA) w strukturze koniugatów aprepitantu nie wpływa na większość oddziaływań, które obserwujemy w strukturze krystalograficznej (Rysunek 5 w **H10**). Wyjątkiem są kontakty pierścienia triazolinonowego. W kryształach ugrupowanie to tworzy dwa wiązania wodorowe z Glu193 i Trp184 (Rysunek 6 w **H10**). Funkcjonalizacja przez jeden z atomów azotu uniemożliwia powstanie pierwszego z tych oddziaływań, oraz wymaga przesunięcia pierścienia względem położenia w strukturze krystalicznej, co uniemożliwia powstanie drugiego z wymienionych oddziaływań.

Wydaje się, że zmiana ta może tłumaczyć spadek powinowactwa wszystkich koniugatów w porównaniu do aprepitantu. To, że jest on różny w przypadku poszczególnych analogów wynika prawdopodobnie z tego, że *linker* i chelator mogą tworzyć dodatkowe oddziaływania z receptorem, które częściowo kompensują stratę kontaktów poprzez pierścień triazolinonowy. Dokowanie wskazuje, iż w przypadku każdego analogu oddziaływania fragmentów *linker*-chelator są różne pod względem partnerów i charakteru kontaktów. Biorąc pod uwagę to, że mają one miejsce blisko ujścia kieszeni wiążącej, czyli w miejscu dużej ekspozycji na rozpuszczalnik, poszczególne oddziaływania wnoszą zapewne pozytywny lecz mały wkład do energii oddziaływania, któremu negatywnie przeciwdziała „kara entropowa” za zamrożenie wiązań linkera.

W związku z obserwowaną krystalograficznie giętkością niektórych aminokwasów w pobliżu zewnątrzkomórkowego ujścia miejsca wiążącego NK1R, przeprowadziłem jeszcze dokowanie lokalne z uwzględnieniem giętkości łańcucha bocznego Glu193 i His197. Wyniki tej procedury były w zasadzie identyczne z wynikami omówionymi powyżej. Obserwowałem jedynie nieznaczne rotacje giętkich łańcuchów względem struktury krystalograficznej. Jeśli chodzi o szacowaną przez program dokujący entalpię swobodną wiązania, nie znalazłem korelacji między eksperymentalnym powinowactwem a przewidywaniami funkcji oceniającej, ani w przypadku dokowania giętkiego ani sztywnego.

Modele kompleksów NK1R z koniugatami aprepitantu opisane w pracy **H10** umożliwią racjonalne projektowanie ulepszonych radiofarmaceutyków celowanych w receptor NK1.

**H11.** Fedorczyk, B.; Lipiński, P.F.J.; Tymecka, D.; Puszko, A.K.; Wilenska, B.; Perret, G.Y.; Misicka, A.  **Conformational latitude – activity relationship of KPPR tetrapeptide analogues toward their ability to inhibit binding of vascular endothelial growth factor 165 to neuropilin-1.** *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 445–454.

IF(2017) = 1.969, pkty MNiSW(2017) = 20 („stary” system punktacji w roku publikacji; 70 „nowych” punktów w 2019)

*Moja rola w badaniach opisanych w H11 polegała na przeprowadzeniu analizy korelacyjnej, wykonaniu symulacji dynamiki molekularnej i napisaniu skryptów do analizy symulacji.*

W pracy **H11** opisano serię peptydowych inhibitorów oddziaływania pomiędzy neuropiliną-1 (NRP-1) a czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF-A). Inhibitory NRP-1/VEGF-A hamują angiogenezę [44], w związku z czym rozważa się zastosowanie ich w terapii przeciwnowotworowej [45]. Praca **H11** była częścią szerszej kampanii badania SAR tego typu inhibitorów, w ramach której zespół prof. Aleksandry Misickiej-Kęsik na Uniwersytecie Warszawskim zsyntezował, zbadał i opisał wiele interesujących analogów ([46,47,56,48–55]; jestem współautorem części z tych prac).

Nowosyntezowane analogi miały strukturę H-Lys-łącznik-Arg-OH, gdzie łącznik to dwa  $\alpha$ -aminokwasy z grupy: Pro, Ala, Gly, lub jeden  $\omega$ -aminokwas: Ava (kwas 5-aminowalerianowy) lub Ahx (kwas 6-aminokapronowy). Celem badania było ustalenie wpływu ruchomości łącznika na aktywność inhibicyjną.

Uszeregowanie nowych związków (z klasycznymi  $\alpha$ -AA) pod względem eksperymentalnej siły inhibicji było zgodne z intuicyjnym uszeregowaniem tych analogów pod względem ich swobody konformacyjnej. Ująłem to ilościowo, tworząc model korelacyjny, w którym aktywność hamująca była modelowana za pomocą spektroskopowych deskryptorów swobody konformacyjnej łańcucha głównego aminokwasów (Równanie 1 w **H11**). Wyliczone z równania aktywności bardzo dobrze korelowały z danymi eksperymentalnymi ( $R^2 = 0.97$ ). Wobec tego, można powiedzieć, że im bardziej giętki łącznik, tym niższa jest aktywność inhibicyjna, a także: giętkość pozycji 3 ma większy wpływ na aktywność niż giętkość pozycji 2.

Aby zrozumieć strukturalne podstawy takiej zależności, modelowałem kompleksy inhibitorów z NRP-1. Pierwsze próby polegały na zastosowaniu dokowania molekularnego (te próby nie zostały opisane w pracy **H11**), ale uzyskane predykcje nie pasowały ani do naszych danych eksperymentalnych, ani do literaturowych wskazówek co do oddziaływań inhibitor/NRP-1 pochodzących z mutagenyzy czy badań NMR.

W związku z tym, biorąc pod uwagę:

- ewidentną zależność aktywności badanych inhibitorów od giętkości łańcucha głównego w łączniku,
- fakt, iż miejsce wiążące na powierzchni NRP-1 jest mocno eksponowane do rozpuszczalnika,
- to, że w krystalograficznym kompleksie tuftsyna-NRP-1 [57], część struktury tuftsyny jest nierozwiązana, a inne elementy mają wysokie współczynniki B,

hipotetyzowałem, że badane inhibitory mogą w trakcie oddziaływania z NRP-1 zachowywać znaczącą ruchomość. Modelowałem więc kompleksy peptyd/NRP-1 z zastosowaniem dynamiki molekularnej. Obraz uzyskany w symulacjach był zgodny z zaproponowaną hipotezą. W trakcie przebiegów MD peptydy próbowały wiele możliwych kombinacji kontaktów z NRP-1, utrzymując jednakże (przez zdecydowaną większość czasu) oddziaływanie z białkiem (Rysunki 2 i 3 w **H11**).

Z wykorzystaniem autorskich skryptów klastrujących, dokonałem analizy trajektorii, w której uogólniłem i pogrupowałem obserwowane kontakty poszczególnych aminokwasów peptydu z białkiem.



Częstości indywidualnych klastrów zdarzeń wiążących (*binding events*) bądź ich kombinacji próbowałem dalej korelować ilościowo (bądź jakościowo) z obserwowaną aktywnością. Ustaliłem tutaj, że po pierwsze, im częściej C-końcowa arginina przyjmuje w MD zestaw kontaktów opisany jako R1, tym wyższa jest aktywność inhibicyjna, przy czym korelacja ta jest raczej przeciętna ( $R^2 = 0.55$ , wyraźne punkty odstające, Rysunek 4A w **H11**). Po drugie, częstość kontaktów N-końcowej lizyny (suma zdarzeń K1 i K2) jest związana z aktywnością inhibicyjną w sposób paraboliczny ( $R^2 = 0.92$ , Rysunek 4B w **H11**) – istnieje pewne optimum łączące się z wysoką aktywnością inhibicyjną. Wnioskowałem zatem, że związek aktywności z częstościami *binding events* jest kombinacją tych zależności.

Analizując miejsce oddziaływania na powierzchni NRP-1, dostrzegłem, że dookoła wgłębienia przyjmującego argininę inhibitora mamy do czynienia z anizotropowym rozłożeniem ładunków cząstkowych dostępnych dla oddziaływań (Rysunek 6 w **H11**). Ładunki ujemne eksponowane są głównie na „północ” oraz „południowy wschód” od wgłębienia, podczas gdy ładunek dodatni znajduje się wyłącznie na „południe”. Najlepszymi partnerami dla oddziaływania z naładowanymi grupami aminowymi N-końcowej lizyny są fragmenty „północne”, wobec czego łącznik powinien umożliwiać skierowanie lizyny na „północ”. Wydaje się więc, że aktywność naszych inhibitorów jest wypadkową trzech, częściowo sobie przeciwstawnych, tendencji:

- C-końcowa arginina „chce” być zanurzona we wgłębieniu, gdzie optymalnie oddziaływa z Asp320 oraz Ser346 i Thr349,
- N-końcowa lizyna „chce” stykać się z aminokwasami na „północ” od wgłębienia,
- łącznik, który raczej nie wchodzi w oddziaływania kierunkowe z białkiem, „chce” próbować swoją przestrzeń konformacyjną.

Jeśli peptyd ma zarówno utrzymać argininę we wgłębieniu, jak i oddziaływać przez lizynę z „północnymi” aminokwasami, musi ograniczyć rotacje łącznika. I odwrotnie, jeśli łącznik będzie swobodnie rotować, zrywane będą albo kontakty lizyny (która będzie kierować się także w inne niż „północne” regiony powierzchni NRP-1), albo optymalne kontakty argininy.

Modelowanie przedstawione w pracy **H11** umożliwiło strukturalne wyjaśnienie obserwowanych aktywności. Od strony aspektów metodologicznych pozwolę sobie zauważyć, że zaproponowany tutaj przeze mnie dynamiczny model oddziaływania liniowych peptydów z NRP-1 został następnie produktywnie zastosowany do objaśniania aktywności inhibitorów w kilku kolejnych pracach z moim udziałem [51–55] lub też przez innych autorów [49]. Zarówno więc szczegółowe wyniki uzyskane w tej pracy, jak i przedstawiony model w ogólności stanowią wartościowe narzędzie do racjonalnego projektowania nowych inhibitorów NRP-1/VEGF-A.

Poza pracą **H11**, jestem współautorem pięciu prac dotyczących inhibitorów NRP-1/VEGF-A:

- Fedorczyk, B.; Lipiński, P.F.J.; Puszko, A.K.; Tymecka, D.; Wilenska, B.; Dudka, W.; Perret, G.Y.; Wiczorek, R.; Misicka, A. Triazolepeptides Inhibiting the Interaction between Neuropilin-1 and Vascular Endothelial Growth Factor-165. *Molecules* **2019**, *24*, 1756.
- Tymecka, D.; Puszko, A.K.; Lipiński, P.F.J.; Fedorczyk, B.; Wilenska, B.; Sura, K.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Branched pentapeptides as potent inhibitors of the vascular endothelial growth factor 165 binding to Neuropilin-1: Design, synthesis and biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 453–462.
- Tymecka, D.; Lipiński, P.F.J.; Fedorczyk, B.; Puszko, A.; Wileńska, B.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Structure-activity relationship study of tetrapeptide inhibitors of the Vascular Endothelial Growth Factor A binding to Neuropilin-1. *Peptides* **2017**, *94*, 25–32.
- Grabowska, K.; Puszko, A.K.; Lipiński, P.F.J.; Laskowska, A.K.; Wileńska, B.; Witkowska, E.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Structure-activity relationship study of a small cyclic peptide H-c[Lys-Pro-Glu]-Arg-OH: a potent inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor interaction with Neuropilin-1. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 597–602.

- Grabowska, K.; Puszko, A.K.; Lipiński, P.F.J.; Laskowska, A.K.; Wileńska, B.; Witkowska, E.; Misicka, A. Design, synthesis and in vitro biological evaluation of a small cyclic peptide as inhibitor of vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2843–2846.

## Podsumowanie najważniejszych osiągnięć w ramach cyklu habilitacyjnego

---

W pracach zawartych w cyklu habilitacyjnym:

1. **(H1)** przedstawiłem pierwszy w literaturze model oddziaływania fentanylu z receptorem MOR z wykorzystaniem struktury krystalograficznej receptora,
2. **(H1)** przedstawiłem pierwszą w literaturze analizę porównawczą oddziaływań fentanylu i morfiny z receptorem MOR (z wykorzystaniem struktury krystalograficznej receptora),
3. **(H2)** opracowałem wiarygodny model oddziaływania szerszej grupy fentanyli z receptorem MOR, a także odkryłem zależności między charakterystykami ligandów lub receptora pochodzącymi z symulacji MD a aktywnością ligandów,
4. **(H3)** opisałem po raz pierwszy w literaturze wiązanie pochodnych fentanylu do receptora  $\sigma_1$ , oraz przedstawiłem możliwy model oddziaływań tychże związków z  $\sigma_1R$ ,
5. **(H4)** opracowałem model oddziaływania związku Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH<sub>2</sub> i jego analogów z receptorem MOR (model trójmiejskowy),
6. **(H5)** przedstawiłem strukturalne podstawy trendów w powinowactwie do MOR dla  $\beta^2$ -homo-aminokwasowych pochodnych peptydu TAPP,
7. **(H6)** wyjaśniłem (w kontekście oddziaływań ligand-receptor) trendy w powinowactwie do MOR dla hybryd opioidowo-antytachykininowych opartych na strukturze *N*-acylohydrazonu i *N'*-acylohydrazynu,
8. **(H6)** zaproponowałem powiązanie aktywności cytotoksycznej wymienionych w poprzednim punkcie hybryd z ich lipofilowością,
9. **(H7)** opracowałem model oddziaływania związku hybrydowego AA3266 z receptorami MOR i NK1R, który posłuży do optymalizacji tego związku wiodącego,
10. **(H7)** przedstawiłem po raz pierwszy w literaturze zastosowanie obliczeń FMO do modelowania oddziaływań z receptorami związków hybrydowych,
11. **(H8)** opisałem prawdopodobny model oddziaływania bifunkcyjnego związku AWL3020 z receptorem DOR, który posłuży do optymalizacji tego związku wiodącego,
12. **(H9)** zaproponowałem model rozpoznania enancjomerów talidomidu przez pochodną naftalenodiimidu,
13. **(H10)** przedstawiłem model oddziaływania radiofarmaceutyków opartych na aprepitancie z receptorem tachykininowymi NK1,
14. **(H11)** zaproponowałem dynamiczny model oddziaływania liniowych peptydów z neuropiliną-1 i wyjaśniłem zależność między giętkością struktury łącznikowej a ich powinowactwem.

## Wykaz skrótów

---

$\alpha$ -AA	$\alpha$ -aminokwas
AA	aminokwas
Ahx	kwas 6-aminokapronowy
Ava	kwas 5-aminowalerianowy
CT	przeniesienie ładunku ( <i>charge transfer</i> )
DAMGO	peptyd H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Gly-ol
DOR	receptor $\delta$ -opiodowy
DOTA	kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano- <i>N,N',N'',N'''</i> -tetraoctowy
FMO	obliczenia kwantowo-chemiczne metodą Fragment Molecular Orbitals
GPCR	receptor sprzężony z białkiem G ( <i>G-protein coupled receptor</i> )
IC <sub>50</sub>	stężenie substancji wykazujące połowę maksymalnego efektu inhibicyjnego ( <i>half-maximal inhibitory concentration</i> )
KOR	receptor $\kappa$ -opiodowy
MD	dynamika molekularna ( <i>molecular dynamics</i> )
MOR	receptor $\mu$ -opiodowy
NDI	naftalenodiimid
NK1R	receptor tachykininowy NK1
NRP-1	neuropilina-1
PIE	energia oddziaływania pary ( <i>pair interaction energy</i> )
PIEDA	analiza rozkładu energii oddziaływania par ( <i>pair interaction energy decomposition analysis</i> )
PDI	perylendiimid
SAR	zależności struktura-aktywność
$\sigma_1$ R	receptor $\sigma_1$
SP	substancja P
(S)-TD	(S)-talidomid
TAPP	tetrapeptyd H-Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH <sub>2</sub>
TD	talidomid
TIE	całkowita energia oddziaływania ( <i>total interaction energy</i> )
TM	helisa przez błonową ( <i>transmembrane helix</i> )
VEGF-A	czynnik A wzrostu śródbłonna naczyniowego ( <i>vascular endothelial growth factor A</i> )

## Bibliografia

---

1. Vardanyan, R.S.; Hruby, V.J. Fentanyl-related compounds and derivatives: current status and future prospects for pharmaceutical applications. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 385–412.
2. Mounteney, J.; Giraudon, I.; Denissov, G.; Griffiths, P. Fentanyls: Are we missing the signs? Highly potent and on the rise in Europe. *Int. J. Drug Policy* **2015**, *26*, 626–631.
3. Jannetto, P.J.; Helander, A.; Garg, U.; Janis, G.C.; Goldberger, B.; Ketha, H. The Fentanyl Epidemic and Evolution of Fentanyl Analogs in the United States and the European Union. *Clin. Chem.* **2019**, *65*, 242–253.
4. Kennedy, N.M.; Schmid, C.L.; Ross, N.C.; Lovell, K.M.; Yue, Z.; Chen, Y.T.; Cameron, M.D.; Bohn, L.M.; Bannister, T.D. Optimization of a Series of Mu Opioid Receptor (MOR) Agonists with High G Protein Signaling Bias. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 8895–8907.
5. Spahn, V.; Del Vecchio, G.; Rodriguez-Gaztelumendi, A.; Temp, J.; Labuz, D.; Klöner, M.; Reidelbach, M.; Machelska, H.; Weber, M.; Stein, C. Opioid receptor signaling, analgesic and side effects induced by a computationally designed pH-dependent agonist. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8965.
6. Manglik, A.; Kruse, A.C.; Kobilka, T.S.; Thian, F.S.; Mathiesen, J.M.; Sunahara, R.K.; Pardo, L.; Weis, W.I.; Kobilka, B.K.; Granier, S. Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **2012**, *485*, 321–326.
7. Huang, W.; Manglik, A.; Venkatakrishnan, A.J.; Laeremans, T.; Feinberg, E.N.; Sanborn, A.L.; Kato, H.E.; Livingston, K.E.; Thorsen, T.S.; Kling, R.C.; et al. Structural insights into  $\mu$ -opioid receptor activation. *Nature* **2015**, *524*, 315–321.
8. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–61.
9. Yuan, S.; Vogel, H.; Filipek, S. The Role of Water and Sodium Ions in the Activation of the  $\mu$ -Opioid Receptor. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 10112–10115.
10. Yuan, S.; Hu, Z.; Filipek, S.; Vogel, H. W2466.48 opens a gate for a continuous intrinsic water pathway during activation of the adenosine A2A receptor. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 556–559.
11. Trzaskowski, B.; Latek, D.; Yuan, S.; Ghoshdastider, U.; Debinski, A.; Filipek, S. Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1090–109.
12. Raehal, K.M.; Schmid, C.L.; Groer, C.E.; Bohn, L.M. Functional Selectivity at the mu-Opioid Receptor : Implications for Understanding Opioid Analgesia. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1001–1019.
13. Tschirhart, J.N.; Li, W.; Guo, J.; Zhang, S. Blockade of the Human Ether A-Go-Go-Related Gene (hERG) Potassium Channel by Fentanyl. *Mol. Pharmacol.* **2019**, *95*, 386–397.
14. Kurciński, M.; Jarończyk, M.; Lipiński, P.; Dobrowolski, J.; Sadlej, J. Structural Insights into  $\sigma$ 1 Receptor Interactions with Opioid Ligands by Molecular Dynamics Simulations. *Molecules* **2018**, *23*, 456.
15. Sánchez-Fernández, C.; Entrena, J.M.; Baeyens, J.M.; Cobos, E.J. Sigma-1 Receptor Antagonists: A New Class of Neuromodulatory Analgesics. In *Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Agents*; Smith, S.B., Su, T.-P., Eds.; Springer International Publishing, 2017; pp. 109–132.
16. Cobos, E.J.; Entrena, J.M.; Nieto, F.R.; Cendán, C.M.; Del Pozo, E. Pharmacology and

- therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* **2008**, *6*, 344–366.
17. Largent, B.L.; Wikström, H.; Gundlach, A.L.; Snyder, S.H. Structural determinants of sigma receptor affinity. *Mol. Pharmacol.* **1987**, *32*, 772–84.
  18. Chen, J.C.; Smith, E.R.; Cahill, M.; Cohen, R.; Fishman, J.B. The opioid receptor binding of dezocine, morphine, fentanyl, butorphanol and nalbuphine. *Life Sci.* **1993**, *52*, 389–396.
  19. Vidal-Torres, A.; de la Puente, B.; Rocasalbas, M.; Touriño, C.; Andreea Bura, S.; Fernández-Pastor, B.; Romero, L.; Codony, X.; Zamanillo, D.; Buschmann, H.; et al. Sigma-1 receptor antagonism as opioid adjuvant strategy: Enhancement of opioid antinociception without increasing adverse effects. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *711*, 63–72.
  20. García, M.; Virgili, M.; Alonso, M.; Alegret, C.; Fernández, B.; Port, A.; Pascual, R.; Monroy, X.; Vidal-Torres, A.; Serafini, M.-T.; et al. 4-Aryl-1-oxa-4,9-diazaspiro[5.5]undecane Derivatives as Dual  $\mu$ -Opioid Receptor Agonists and  $\sigma$  1 Receptor Antagonists for the Treatment of Pain. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 2434–2454.
  21. Xiong, J.; Jin, J.; Gao, L.; Hao, C.; Liu, X.; Liu, B.-F.; Chen, Y.; Zhang, G. Piperidine propionamide as a scaffold for potent sigma-1 receptor antagonists and mu opioid receptor agonists for treating neuropathic pain. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *191*, 112144.
  22. TOUBIA, T.; KHALIFE, T. The Endogenous Opioid System. *Clin. Obstet. Gynecol.* **2019**, *62*, 3–10.
  23. Janecka, A.; Fichna, J.; Janecki, T. Opioid Receptors and their Ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1–17.
  24. Aldrich, J. V.; McLaughlin, J.P. Opioid peptides: potential for drug development. *Drug Discov. Today Technol.* **2012**, *9*, e23–e31.
  25. Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 122–128.
  26. Al Musaimi, O.; Al Shaer, D.; de la Torre, B.; Albericio, F. 2017 FDA Peptide Harvest. *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, 42.
  27. Henninot, A.; Collins, J.C.; Nuss, J.M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1382–1414.
  28. Ersahin, D.; Doddamane, I.; Cheng, D. Targeted Radionuclide Therapy. *Cancers (Basel)*. **2011**, *3*, 3838–3855.
  29. Al Shaer, D.; Al Musaimi, O.; Albericio, F.; de la Torre, B.G. 2019 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 40.
  30. Perlikowska, R.; Do-Rego, J.C.; Cravezic, A.; Fichna, J.; Wyrebska, A.; Toth, G.; Janecka, A. Synthesis and biological evaluation of cyclic endomorphin-2 analogs. *Peptides* **2010**, *31*, 339–345.
  31. Largent-Milnes, T.M.T.; Yamamoto, T.; Nair, P.; Moulton, J.W.; Hruby, V.J.V.; Lai, J.; Porreca, F.; Vanderah, T.W. Spinal or systemic TY005, a peptidic opioid agonist/neurokinin 1 antagonist, attenuates pain with reduced tolerance. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 986–1001.
  32. Starnowska, J.; Costante, R.; Guillemyn, K.; Popiolek-Barczyk, K.; Chung, N.N.; Lemieux, C.; Keresztes, A.; Van Duppen, J.; Mollica, A.; Streicher, J.M.; et al. Analgesic properties of opioid/NK1 multitarget ligands with distinct in vitro profiles in naive and chronic constriction injury (CCI)-mice. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, acschemneuro.7b00226.
  33. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J.*

- Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
34. Koehl, A.; Hu, H.; Maeda, S.; Zhang, Y.; Qu, Q.; Paggi, J.M.; Latorraca, N.R.; Hilger, D.; Dawson, R.; Matile, H.; et al. Structure of the  $\mu$ -opioid receptor–Gi protein complex. *Nature* **2018**, *558*, 547–552.
  35. Muñoz, M.; Coveñas, R. The Neurokinin-1 Receptor Antagonist Aprepitant: An Intelligent Bullet against Cancer? *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 2682.
  36. Advanced Chemistry Development Inc. ACD/ChemSketch version 2018.1.
  37. Fedorov, D.G.; Kitaura, K. Pair interaction energy decomposition analysis. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 222–237.
  38. Heifetz, A.; Chudyk, E.I.; Gleave, L.; Aldeghi, M.; Cherezov, V.; Fedorov, D.G.; Biggin, P.C.; Bodkin, M.J. The Fragment Molecular Orbital Method Reveals New Insight into the Chemical Nature of GPCR–Ligand Interactions. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 159–172.
  39. Morao, I.; Fedorov, D.G.; Robinson, R.; Southey, M.; Townsend-Nicholson, A.; Bodkin, M.J.; Heifetz, A. Rapid and accurate assessment of GPCR–ligand interactions Using the fragment molecular orbital-based density-functional tight-binding method. *J. Comput. Chem.* **2017**, *38*, 1987–1990.
  40. Heifetz, A.; Aldeghi, M.; Chudyk, E.I.; Fedorov, D.G.; Bodkin, M.J.; Biggin, P.C. Using the fragment molecular orbital method to investigate agonist–orexin-2 receptor interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 574–581.
  41. Calabrese, L.; Fleischer, A.B. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 487–495.
  42. Rode, J.E.; Dobrowolski, J.C. Theoretical studies on the oxetane···HCl and thietane···HCl complexes. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *360*, 123–132.
  43. Chen, S.; Lu, M.; Liu, D.; Yang, L.; Yi, C.; Ma, L.; Zhang, H.; Liu, Q.; Frimurer, T.M.; Wang, M.-W.; et al. Human substance P receptor binding mode of the antagonist drug aprepitant by NMR and crystallography. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 638.
  44. Djordjevic, S.; Driscoll, P.C. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 447–455.
  45. Peng, K.; Bai, Y.; Zhu, Q.; Hu, B.; Xu, Y. Targeting VEGF–neuropilin interactions: a promising antitumor strategy. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 656–664.
  46. Puszko, A.K.; Sosnowski, P.; Pułka-Ziach, K.; Hermine, O.; Hopfgartner, G.; Lepelletier, Y.; Misicka, A. Urea moiety as amide bond mimetic in peptide-like inhibitors of VEGF-A165/NRP-1 complex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 2493–2497.
  47. Puszko, A.K.; Sosnowski, P.; Tymecka, D.; Raynaud, F.; Hermine, O.; Lepelletier, Y.; Misicka, A. Neuropilin-1 peptide-like ligands with proline mimetics, tested using the improved chemiluminescence affinity detection method. *Medchemcomm* **2019**, *10*, 332–340.
  48. Puszko, A.K.; Sosnowski, P.; Raynaud, F.; Hermine, O.; Hopfgartner, G.; Lepelletier, Y.; Misicka, A. Does Cysteine Rule (CysR) Complete the CendR Principle? Increase in Affinity of Peptide Ligands for NRP-1 Through the Presence of N-Terminal Cysteine. *Biomolecules* **2020**, *10*, 448.
  49. Puszko, A.K.; Sosnowski, P.; Rignault-Bricard, R.; Hermine, O.; Hopfgartner, G.; Pułka-Ziach, K.; Lepelletier, Y.; Misicka, A. Urea-Peptide Hybrids as VEGF-A165/NRP-1 Complex Inhibitors with Improved Receptor Affinity and Biological Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *22*, 72.

50. Niescioruk, A.; Nieciecka, D.; Puszko, A.K.; Królikowska, A.; Kosson, P.; Perret, G.Y.; Krysinski, P.; Misicka, A. Physicochemical properties and in vitro cytotoxicity of iron oxide-based nanoparticles modified with antiangiogenic and antitumor peptide A7R. *J. Nanoparticle Res.* **2017**, *19*, 160.
51. Fedorczyk, B.; Lipiński, P.F.J.; Puszko, A.K.; Tymecka, D.; Wilenska, B.; Dudka, W.; Perret, G.Y.; Wieczorek, R.; Misicka, A. Triazolo-peptides Inhibiting the Interaction between Neuropilin-1 and Vascular Endothelial Growth Factor-165. *Molecules* **2019**, *24*, 1756.
52. Tymecka, D.; Puszko, A.K.; Lipiński, P.F.J.; Fedorczyk, B.; Wilenska, B.; Sura, K.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Branched pentapeptides as potent inhibitors of the vascular endothelial growth factor 165 binding to Neuropilin-1: Design, synthesis and biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 453–462.
53. Tymecka, D.; Lipiński, P.F.J.; Fedorczyk, B.; Puszko, A.; Wileńska, B.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Structure-activity relationship study of tetrapeptide inhibitors of the Vascular Endothelial Growth Factor A binding to Neuropilin-1. *Peptides* **2017**, *94*.
54. Grabowska, K.; Puszko, A.K.; Lipiński, P.F.J.; Laskowska, A.K.; Wileńska, B.; Witkowska, E.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Structure-activity relationship study of a small cyclic peptide H-c[Lys-Pro-Glu]-Arg-OH: a potent inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor interaction with Neuropilin-1. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 597–602.
55. Grabowska, K.; Puszko, A.K.; Lipiński, P.F.J.; Laskowska, A.K.; Wileńska, B.; Witkowska, E.; Misicka, A. Design, synthesis and in vitro biological evaluation of a small cyclic peptide as inhibitor of vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2843–2846.
56. Fedorczyk, B.; Lipiński, P.F.J.; Tymecka, D.; Puszko, A.K.; Wilenska, B.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Conformational latitude – activity relationship of KPPR tetrapeptide analogues toward their ability to inhibit binding of vascular endothelial growth factor 165 to neuropilin-1. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 445–454.
57. Vander Kooi, C.W.; Jusino, M.A.; Perman, B.; Neau, D.B.; Bellamy, H.D.; Leahy, D.J. Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 6152–6157.
58. Ellis, C.R.; Kruhlak, N.L.; Kim, M.T.; Hawkins, E.G.; Stavitskaya, L. Predicting opioid receptor binding affinity of pharmacologically unclassified designer substances using molecular docking. *PLoS One* **2018**, *13*, e0197734.

## 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. Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje:

**36 prac w czasopismach ze współczynnikiem IF** (z czego w 14 pracach jestem autorem głównym lub korespondencyjnym; 27 z tych publikacji ukazało się po tym, jak uzyskałem stopień doktora),

**1 pracę naukową bez IF** (artykuł polski z punktami MNiSW),

**6 rozdziałów** w monografiach (w tym 4 w podręcznikach akademickich),

**1 uzyskany patent,**

**19 prac popularnonaukowych.**

**Sumaryczny Impact Factor** wszystkich publikacji z dnia 23.04.2021: 116.587 (w tym po doktoracie: 90.500)

**Sumaryczny 5-letni Impact Factor** publikacji po doktoracie (z dnia 23.04.2021): 92.194

**Sumaryczne punkty MNiSW** wszystkich publikacji z dnia 23.04.2021 (wg punktacji MNiSW z 2019 roku): 3350 (w tym po doktoracie: 2580)

**Liczba cytowań oraz indeks Hirscha (H)** (stan na 23.04.2021) wg poniższej tabeli:

	<b>Web Of Science</b>	<b>Scopus</b>	<b>Google Scholar</b>
<b>Indeks H</b>	9	9	11
<b>Cytowania</b>	198	205	243
<b>Cytowania bez autocytowań</b>	144	149	-

### 5.2. Staż podoktorski / współpraca z Zespołem Struktury i Dynamiki Makroukładów, Uniwersytet Wrocławski.

W połowie stycznia 2020 roku rozpocząłem staż podoktorski w Zespole Struktury i Dynamiki Makroukładów (Uniwersytetu Wrocławski), kierowanym przez dr. hab. Jarosława Panka (w ramach projektu NCN: HARMONIA 2016/22/M/ST4/00226). Tematyką podejmowaną w trakcie stażu miało być modelowanie aktywności i struktury enzymów w fazie gazowej. Niestety, rozwój pandemii koronawirusa COVID-2019 w marcu 2020 roku i następnych miesiącach, oraz związane z tym ograniczenia rządowe, uniemożliwiły normalny przebieg stażu. Dzięki jednak możliwości „zdalnego” wykonywania badań *in silico*, moje uczestnictwo w tym projekcie i współpraca z Zespołem były nadal możliwe. Po roku trwania badań, w dniu składania referatu, przygotowywane są manuskrypty dwóch publikacji.

### 5.3. Współpraca z grupą prof. Sándora Benyhe (Institute of Biochemistry, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary).

W ramach współpracy z grupą prof. Sándora Benyhe rozwijam tematykę oddziaływań 4-anilidopiperidyn z receptorami  $\sigma_1$ . Pierwsze doniesienie z tego zakresu zostało opublikowane w 2019 roku, w opisanej w referacie pracy **H3**.



Dalej, w wyniku tej współpracy, przygotowałem rozdział do monografii „The Neuroscience of Anesthetics and Analgesics” pod redakcją prof. Victora Preedy’ego, planowanej do wydania w 2021 roku przez Academic Press (Elsevier):

- Lipiński, P.F.J. ✉; Szűcs, E.; Jarończyk, M.; Kosson P.; Benyhe, S., Misicka, A.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. An excursion into secondary pharmacology of fentanyls with potential implications for drug design:  $\sigma_1$  receptor [w:] Preedy, V. (red.), The Neuroscience of Anesthetics and Analgesics, Academic Press (Elsevier), planowana publikacja w 2021 roku.

W październiku 2019, odbyłem krótką wizytę badawczą (*short scientific stay*) w laboratorium prof. Benyhe w Szegedzie. Podczas tego pobytu wygłosiłem seminarium instytutowe pt. „Computational and experimental studies on fentanyls”.

#### 5.4. Współpraca z Pracownią Peptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski.

Od wielu lat współpracuję z Pracownią Peptydów, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Warszawskiego (grupa prof. Aleksandry Misickiej). Tematyka współpracy obejmuje modelowanie inhibitorów oddziaływania pomiędzy neuropiliną-1 (NRP-1) a czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A). W ramach tej współpracy powstała praca **H11** oraz kilka innych publikacji:

- Fedorczyk, B.; Lipiński, P.F.J.; Puszko, A.K.; Tymecka, D.; Wilenska, B.; Dudka, W.; Perret, G.Y.; Wiczorek, R.; Misicka, A. Triazolepeptides inhibiting the interaction between neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *Molecules* **2019**, *24*.
- Tymecka, D.; Puszko, A.K.; Lipiński, P.F.J.; Fedorczyk, B.; Wilenska, B.; Sura, K.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Branched pentapeptides as potent inhibitors of the vascular endothelial growth factor 165 binding to Neuropilin-1: Design, synthesis and biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 453–462.
- Tymecka, D.; Lipiński, P.F.J.; Fedorczyk, B.; Puszko, A.; Wileńska, B.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Structure-activity relationship study of tetrapeptide inhibitors of the Vascular Endothelial Growth Factor A binding to Neuropilin-1. *Peptides* **2017**, *94*.
- Grabowska, K.; Puszko, A.K.; Lipiński, P.F.J.; Laskowska, A.K.; Wileńska, B.; Witkowska, E.; Perret, G.Y.; Misicka, A. Structure-activity relationship study of a small cyclic peptide H-c[Lys-Pro-Glu]-Arg-OH: a potent inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor interaction with Neuropilin-1. *Bioorganic Med. Chem.* **2017**, *25*.
- Grabowska, K.; Puszko, A.K.; Lipiński, P.F.J.; Laskowska, A.K.; Wileńska, B.; Witkowska, E.; Misicka, A. Design, synthesis and in vitro biological evaluation of a small cyclic peptide as inhibitor of vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2843–2846.

Dalej, byłem współautorem wniosku grantowego NCN OPUS „Radioizotopowo znakowane peptydomimetyczne inhibitory kompleksu VEGF/NRP-1 do obrazowania patologicznej angiogenezy związanej z wczesnymi stadiami formowania się nowotworów złośliwych”, który został złożony przez kierownika Pracowni i uzyskał finansowanie w 2020 roku. Obecnie uczestniczę w tym projekcie jako wykonawca.

Dodatkowo, zaangażowałem się w inny nurt badań Pracowni, dotyczący syntezy i zastosowania niekanonicznych aminokwasów. W ramach tych badań modeluję oddziaływania peptydów modyfikowanych przez niekanoniczne aminokwasy z receptorami. Owocem tej pracy jest m.in. publikacja **H5** opisana w referacie. Kolejne manuskrypty są na etapie przygotowania (na dzień składania autoreferatu).

### 5.5. Współpraca z prof. Joanną Sadlej, Narodowy Instytut Leków w Warszawie.

W latach 2014-2019 współpracowałem z prof. Joanną Sadlej z Narodowego Instytutu Leków w Warszawie (w ramach grantu NCN OPUS 2013/11/B/ST4/00785, „**Fentanylowe opioidowe dopalacze: od molekularnego modelowania do badań in vitro**”). Przedmiotem współpracy było modelowanie oddziaływań fentanyli z receptorem MOR oraz koordynacja prac eksperymentalnych w granicie. We współpracę zaangażowani byli również naukowcy z Uniwersytetu Warszawskiego oraz grupa prof. Benyhe (opisane częściowo w pktcie 5.3.). W wyniku tych badań powstały opisane w referacie prace **H1-H3** oraz dodatkowo trzy publikacje:

- Lipiński, P.F.J.; Jarończyk, M.; Ostrowski, S.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. Conformation of six fentanyls revisited. *Comput. Theor. Chem.* **2016**, *1086*, 18–24.
- Jarończyk, M.; Lipiński, P.F.J.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. The FMO analysis of the molecular interaction of fentanyl derivatives with the  $\mu$ -opioid receptor. *Chem. Pap.* **2017**, *71*, 1429–1443.
- Kurciński, M.; Jarończyk, M.; Lipiński, P.F.J.; Dobrowolski, J.Cz.; Sadlej, J. Structural Insights into  $\sigma_1$  Receptor Interactions with Opioid Ligands by Molecular Dynamics Simulations. *Molecules* **2018**, *23*, 456.

### 5.6. Współpraca z zespołem prof. Jana Cz. Dobrowolskiego, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie.

Od wielu lat współpracuję z grupą prof. Jana Cz. Dobrowolskiego z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Prof. Dobrowolski był promotorem mojego doktoratu (2016). Uczestniczyłem jako wykonawca w dwóch kierowanych przez niego projektach grantowych.

W ramach pierwszego z nich (NCN OPUS, 2013/09/B/ST5/03664, 2014-2017, „**Chiralne rdzenie/monomery leków i polimerów przewodzących: Od obliczeń do charakterystyk eksperymentalnych**”) modelowałem różne zagadnienia z zakresu fizycznej chemii organicznej, spektroskopii obliczeniowej i chiralnych analiz QSAR. Owocem tych badań były 4 publikacje:

- Dobrowolski, J.Cz.; Lipiński, P.F.J.; Ostrowski, S.; Jamróz, M.H.; Rode, J.E. The influence of the position of a chiral substituent on undecathiophene chain. A DFT study. *Synth. Met.* **2018**, *242*, 73–82.
- Lipiński, P.F.J.; Dobrowolski, J.Cz. Substituent effect in theoretical ROA spectra. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 40760–40764.
- Dobrowolski, J.Cz.; Lipiński, P.F.J.; Ostrowski, S.; Jamróz, M.H.; Rode, J.E. The influence of the position of a chiral substituent on undecathiophene chain. A DFT study. *Synth. Met.* **2018**, *242*, 73–82.
- Dobrowolski, J.Cz.; Jamróz, M.H.; Lipiński, P.F.J. On chiral graph topological indices of  $\alpha$ -amino acids. *Match* **2016**, *76*.

Pozwolę sobie tutaj zwrócić uwagę na dwie pierwsze. Mieliśmy w nich przyjemność opisania po raz pierwszy w literaturze odpowiednio zjawiska rozszczepienia parametru NICS w związkach chiralnych, oraz efektu podstawnikowego w widmach ramanowskiej aktywności optycznej.

W ramach drugiego projektu (NCN OPUS, 2017/25/B/ST5/02267, 2018-2021, „**6xS dla Chiralnych Naftalenodiimidów: Synteza, Symulacje, Struktura, Spektroskopia, Spektroelektrochemia, Sensory**”) modelowałem rozpoznanie chiralne w sensorach opartych na naftalenodiimidach oraz niektóre aspekty oddziaływań atropizomerycznych naftalenodiimidów z rozpuszczalnikami.

W wyniku tych badań powstała praca **H9** opisana w referacie oraz praca:

- Machalska, E.; Zajac, G.; Baranska, M.; Kaczorek, D.; Kawęcki, R.; Lipiński, P.F.J.; Rode, J.E.; Dobrowolski, J.C. On Raman optical activity sign-switching between the ground and excited states leading to an unusual resonance ROA induced chirality. *Chem. Sci.* **2021**.

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

### 6.1. Dydaktyka

#### 6.1.1. Wykład kursowy dla studium doktoranckiego

W 2017 roku prowadziłem wykład pt. „Chemia Leków” (12 h) dla uczestników studium doktoranckiego Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Wykład zakończony był egzaminem.

#### 6.1.2. Opieka naukowa nad wykonywaniem prac magisterskich

W latach 2018-2021 sprawowałem opiekę naukową nad 5 pracami magisterskimi studentów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wykonywanych (część laboratoryjna) w Zakładzie Neuropeptydów Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Tematy prac zestawione są w poniższej tabeli:

Lp.	Rok	Kierunek studiów	Tytuł pracy magisterskiej
5	2021	Farmacja	Nowe pochodne 4-anilidopiperydyny o potencjalnym działaniu przeciwbólowym (praca w trakcie wykonywania w dniu składania autoreferatu)
4	2021	Analityka medyczna	Badanie ilościowych zależności struktura-retencja peptydowych i niepeptydowych ligandów receptora mu-opioidowego (praca w trakcie wykonywania w dniu składania autoreferatu)
3	2020	Analityka medyczna	Ilościowe zależności struktura-retencja (QSRR) dla nowych ligandów receptora NK-1
2	2020	Analityka medyczna	Oznaczanie lipofilowości nowych ligandów receptora NK-1 opartych na fenyloalaninie za pomocą metod chromatograficznych
1	2019	Analityka medyczna	Modelowanie czasu retencji nowych ligandów receptora tachykininowego NK1

#### 6.1.3. Autorstwo rozdziałów w podręczniku

Jestem autorem rozdziału teoretycznego i ćwiczenia dotyczących oscylacyjnego dichroizmu kołowego w podręcznikach spektroskopii oscylacyjnej:

4. Lipiński P.F.J., **Determination of absolute configuration using vibrational circular dichroism** [w:] *Vibrational Spectroscopy: From Theory to Practice*, PWN, Warszawa, 2016, ISBN: 978-83-01-18885-6.
3. Lipiński P.F.J., **Vibrational circular dichroism** [w:] Małek, K. (red.), *Vibrational Spectroscopy: From Theory to Practice*, PWN, Warszawa, 2016, ISBN: 978-83-01-18885-6.
2. Lipiński P.F.J., **Ustalanie konfiguracji absolutnej z wykorzystaniem oscylacyjnego dichroizmu kołowego** [w:] Małek, K. (red.), *Spektroskopia oscylacyjna: od teorii do praktyki*, PWN, Warszawa, 2016, ISBN: 978-83-01-18826-9.
1. Lipiński P.F.J., **Oscylacyjny dichroizm kołowy** [w:] Małek, K. (red.), *Spektroskopia oscylacyjna: od teorii do praktyki*, PWN, Warszawa, 2016, ISBN: 978-83-01-18826-9.

## 6.2. Popularyzacja nauki

### 6.2.1. Artykuły popularnonaukowe w czasopismach branżowych

W latach 2012-2020 opublikowałem 19 artykułów popularnonaukowych dotyczących:

- osób, które odegrały wybitną rolę w rozwoju chemii leków (np. Sir James Black, Dr Paul A. Janssen, Paul Ehrlich, Gerard Domagkh etc.),
- odkryć niektórych substancji czynnych (np. syldenafilu, warfaryny, sulfonamidów etc.),
- nowych trendów i technik stosowanych w chemii leków (np. modelowania molekularnego, spektroskopii VCD, projektowania leków opartego na fragmentach, poszukiwania leków wielocelowych etc.).

Poniżej przedstawiam listę tych publikacji:

19. Piotr F.J. Lipiński, **Poza przetarte szlaki**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 1/2020, 83-86.
18. Piotr F.J. Lipiński, **Peptydami w nowotwór**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 3/2019, 60-62.
17. Piotr F.J. Lipiński, **Koniec kryzysu innowacyjności?**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 1/2019, 55-57.
16. Piotr F.J. Lipiński, **Od fragmentów do leków**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 6/2018, 56-61.
15. Piotr F.J. Lipiński, **Magiczne dubeltówki**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 04.maj/2018, 70-75.
14. Piotr F.J. Lipiński, **Peptydy się liczą!**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 3/2018, 85-88.
13. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Spektroskopia VCD - nowe narzędzie farmacji**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 2/2018, 44-47.
12. Piotr F. J. Lipiński, Jolanta Dyniewicz, Dariusz Plewczyński, **Nowe horyzonty leczenia bólu, czyli o stronniczych agonistach receptorów opioidowych**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 1/2018, 58-61.
11. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Racjonalny projekt i efekt uboczny, który wszystko odwrócił, czyli krótko o historii odkrycia syldenafilu**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 6/2017, 99-101.
10. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Od kumaryny do warfaryny**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 5/2017, 71-75.
9. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Skutki sulfarewolucji**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 3/2017, 62-65.
8. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Oszukać komórki**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 6/2016, 60-65.
7. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Sir James Black: przez serce do żołądka**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 04.maj/2016, 96-101.
6. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Bohaterka z FDA**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 3/2016, 77-81.
5. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Sulfarewolucja**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 2/2016, 64-67.
4. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Ojciec chemioterapii**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 1/2016, 70-74.
3. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Dziwięciu wspaniałych cz.II**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 6/2012, 32-35.
2. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Dyrygent**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 5/2012, 100-104.
1. Piotr F. J. Lipiński, Dariusz Plewczyński, **Dziwięciu wspaniałych cz.I**, *Przemysł Farmaceutyczny*, 5/2012, 40-44.

### 6.2.2. Wykłady popularyzatorskie

W roku 2019 wygłosiłem wykład popularyzatorski w ramach XXIII Festiwalu Nauki (21 września 2019, IMDiK PAN, Warszawa), pt. „Wiedzy garść, szczęścia szczypta... i dolarów miliard, czyli o przepisie na odkrycie nowego leku”. Tematem wykładu były historyczne i współczesne metody odkrywania i projektowania leków.

## 7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej wnioskodawcy

### 7.1. Współpraca z podmiotami gospodarczymi

Od lipca 2019 roku biorę udział w pracach amerykańsko-polskiej spółki Vasa Therapeutics (Encinitas CA, USA / Wrocław, Polska) realizującej projekt rozwoju innowacyjnego kandydata na lek do stosowania w jednej z chorób układu sercowo-naczyniowego, finansowany przez grant NCBiR. Mój wkład jako specjalisty chemii obliczeniowej (*computational chemist*) polega na modelowaniu oddziaływań syntezowanych analogów, oraz na wspomaganii projektowania nowych związków przez dyrektora działu chemii medycznej.

### 7.2. Projekty grantowe

Byłem / jestem kierownikiem dwóch projektów grantowych z Narodowego Centrum Nauki oraz uczestnikiem sześciu projektów kierowanych przez innych naukowców. Dane o projektach zestawilem w poniższej tabeli:

Lata	Numer projektu	Kierownik	Tytuł
<b>Jako kierownik</b>			
2017-2021	2016/23/D/NZ7/03636	ja	<b>SONATA:</b> Opracowanie modelu homologicznego receptora NK1 z wykorzystaniem danych o międzygantunkowych różnicach wiązalności ligandów.
2013-2016	2012/05/N/NZ7/01952	ja	<b>PRELUDIUM:</b> Projektowanie leków: Miary chiralności jako deskryptory QSAR.
<b>Jako wykonawca</b>			
2020-2023	2019/33/B/NZ7/02818	Prof. Aleksandra Misicka-Kęsik (Uniwersytet Warszawski)	<b>OPUS:</b> Radioizotopowo znakowane peptydomimetyczne inhibitory kompleksu VEGF/NRP-1 do obrazowania patologicznej angiogenezy związanej z wczesnymi stadiami formowania się nowotworów złośliwych
2018-2021	2017/25/B/ST5/02267	Prof. Jan Cz. Dobrowolski (Instytut Chemii i Techniki Jądrowej)	<b>OPUS:</b> 6xS dla Chiralnych Naftalenodiimidów: Synteza, Symulacje, Struktura, Spektroskopia, Spektroelektrochemia, Sensory
2018-2021	2017/25/B/NZ7/01896	Prof. Aleksandra Misicka-Kęsik (IMDiK PAN)	<b>OPUS:</b> Radiofarmaceutyki oparte na antagonistach receptora tachykininowego-1 do diagnostyki i terapii nowotworu mózgu - glejaka wielopostaciowego.
2017-2021	2016/22/M/ST4/00226	Dr hab. Jarosław Panek (Uniwersytet Wrocławski)	<b>HARMONIA:</b> Struktura i reaktywność protein w fazie gazowej - na styku zaawansowanej spektrometrii mas i modelowania molekularnego
2014-2019	2013/11/B/ST4/00785	Prof. Joanna Sadlej (Narodowy Instytut Leków)	<b>OPUS:</b> Fentanylowe opioidowe dopalacze: od molekularnego modelowania do badań in vitro.
2014-2017	2013/09/B/ST5/03664	Prof. Jan Cz. Dobrowolski (Instytut Chemii i Techniki Jądrowej)	<b>OPUS:</b> Chiralne rdzenie/monomery leków i polimerów przewodzących: Od obliczeń do charakterystyk eksperymentalnych.

### 7.3. Wykonane recenzje

Wielokrotnie wykonywałem recenzje manuskryptów z zakresu chemii, farmacji, a w szczególności chemii leków i poszukiwania nowych substancji leczniczych. Recenzowałem dla następujących czasopism (w nawiasie podana ilość wykonanych recenzji):

- ChemistrySelect, Wiley (1)
- Computational And Structural Biotechnology Journal, Elsevier (1)
- Future Medicinal Chemistry, Future Science (1)
- International Journal of Molecular Sciences, MDPI (5)
- Medicinal Chemistry Research, Springer (7)
- Molecules, MDPI (4)
- Physical Chemistry Chemical Physics, Royal Society of Chemistry (1)

### 7.4. Nagrody

3. Nagroda Naukowa Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (2019) za publikacje w roku 2018.

2. Nagroda Naukowa Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (2016) za publikacje w roku 2014.

1. Nagroda Zespołowa I-go Stopnia im. Wojciecha Świątosławskiego, 2013, nadana przez Radę Naukową Instytutu Chemii Przemysłowej im. I. Mościckiego w Warszawie, w zespole: Jan Cz. Dobrowolski, Michał H. Jamróz, Piotr F. J. Lipiński, Sławomir Ostrowski, Joanna E. Rode.

*Lipinski Piotr*  
.....  
(podpis wnioskodawcy)

23.04.2021

Warszawa