

**STRATEGIA REPOZYCJONOWANIA,
CZYLI NOWE ZASTOSOWANIE DLA STARYCH
LEKÓW**

REPOSITIONING STRATEGY, A NEW USES FOR OLD
DRUGS

**Nikola Fajkis, Marcin Kołaczkowski,
Monika Marcinkowska**

*Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie
Wydział Farmaceutyczny
ul. Medyczna 9, 30-688, Kraków
e-mail: nikola.fajkis@gmail.com*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Strategie otrzymywania nowych leków
2. Przykłady repozycjonowanie leków działających na ośrodkowy układ nerwowy
 - 2.1. Duloksetyna
 - 2.2. Historia błękitu metylenowego
 - 2.3. Tiorydazyna
 - 2.4. Talidomid
3. Selektywna optymalizacja działań niepożądanych


Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

mgr Nikola Fajkis, doktorantka Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Pracę magisterską wykonywała w firmie Photo High Technologies. Prezes Naukowego Koła Chemii Medycznej i Ochrony Środowiska UJ, aktywny członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego, European Young Chemists' Network, Samorządu Studentów Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Uczelnianej Komisji ds. Informacji i Promocji.



 <https://orcid.org/0000-0002-9109-8351>


dr Monika Marcinkowska – absolwentka Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Stopień doktora nauk chemicznych i inżynierii chemicznej uzyskała w 2009 roku na Politechnice w Mediolanie (Włochy). Stypendystka programu Erasmus (Utrecht University, Holandia, 2004), Marie Curie Fellowship: Early Stage Researcher (Mediolan, Włochy, 2005), visiting scholarship (Walencja, Hiszpania, 2007), program Inter IV edycja Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Od 2011 adiunkt w Katedrze Chemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM w Krakowie. Zainteresowania naukowe: poszukiwanie cząsteczek biologicznie aktywnych o potencjalnym działaniu przeciwpsychotycznym, przeciwdepresyjnym, neuroprotektynym, ligandy receptora GABA-A.



 <https://orcid.org/0000-0002-4948-6617>

dr hab. Marcin Kołaczkowski – prof. UJ: jest absolwentem Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W latach 2002–2006 odbył staż naukowy w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Stypendysta programu Start Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Stopień doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych uzyskał na Wydziale Farmaceutycznym UJCM w 2015 r. Aktualnie profesor nadzwyczajny w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM oraz Prodziekan ds. Strategii i Rozwoju Wydziału Farmaceutycznego UJCM. Od 2007 związany również z Działem Badań i Rozwoju Grupy Adamed, obecnie jako naukowiec wiodący w Departamencie Innowacyjnym. Zainteresowania naukowe: poszukiwanie nowych cząsteczek biologicznie aktywnych, kandydatów na leki ośrodkowego układu nerwowego. Twórca 5 zgłoszeń patentowych polskich i międzynarodowych, oraz 8 patentów udzielonych z zakresu poszukiwania nowych terapii behawioralnych i psychologicznych symptomów demencji (BPSD).



 <https://orcid.org/0000-0001-8402-1121>

ABSTRACT

Drug discovery and development is associated with enormous costs, time consumption and high risk of failure. To increase the productivity, pharmaceutical companies are constantly looking for new strategies to deliver a new drug faster, with relatively lower costs. Recently, the drug repositioning has been recognized as a fruitful approach, which enables to diminish the cost and time associated with bringing a drug to the market. This review discusses the repositioning strategy, their advantages and disadvantages, along with several successful examples of drugs that have been approved for a different purpose than at the beginning of the application. The report will focus on examples of drugs that act on the central nervous system such as duloxetine, thioridazine, thalidomide and methylene blue. In addition, the article briefly describes the selective optimization of side activities of drug molecules (the SOSA approach), another highly efficient strategy, which enables to generate new biologically active compounds.

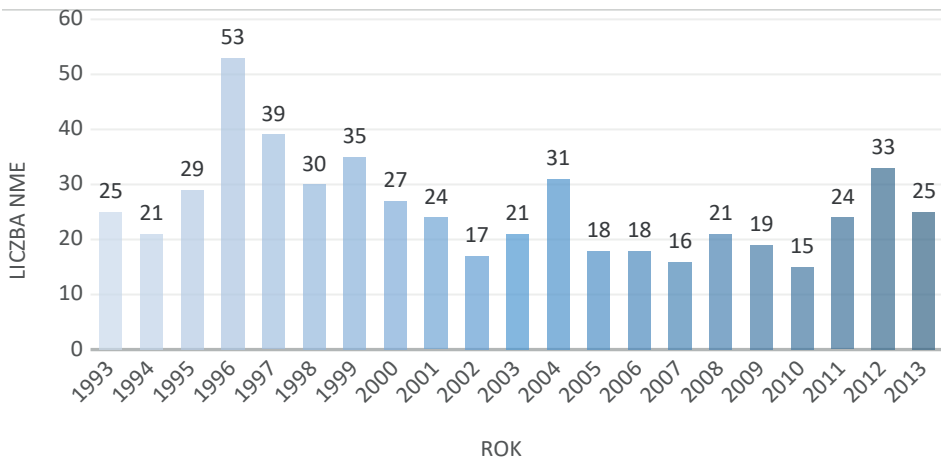
Keywords: repositioning strategy, Selective Optimization of Side Activities (SOSA)
Słowa kluczowe: leki repozycjonowane, selektywna optymalizacja działań (SOSA)

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AD	– choroba Alzheimerera (ang. <i>alzheimer disease</i>)
BK _{Ca}	– kanały potasowe o dużym przewodnictwie (ang. <i>big potassium channel</i>)
BMI	– wskaźnik masy ciała (ang. <i>Body Mass Index</i>)
FDA	– Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
GA	– guanabenz (ang. <i>guanabenz</i>)
HTS	– wysokowydajne badania przesiewowe (ang. <i>high-throughput screening</i>)
NME	– innowacyjna substancja chemiczna (ang. <i>new molecular entity</i>)
OUN	– ośrodkowy układ nerwowy
R&D	– badania i rozwój (ang. <i>research and development</i>)
SOSA	– selektywna optymalizacja działań ubocznych (ang. <i>Selective Optimization of Side Activities</i>)
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

WPROWADZENIE

Szybki i tani proces odkrywania nowych leków jest marzeniem koncernów farmaceutycznych, które niestety mocno kontrastuje z rzeczywistością. Analiza przeprowadzona na 68 zarejestrowanych lekach przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) wykazała, iż aby wprowadzić jeden lek do obrotu, koncerny farmaceutyczne średnio wydają około 1 mld USD, a sam proces zajmuje przeciętnie 10–16 lat [1]. Pomimo, iż nakład finansowy na badania i rozwój podwoił się na przestrzeni ostatniej dekady [2], liczba nowo zarejestrowanych leków każdego roku wynosi jedynie 20–30 nowych substancji (Rys. 1) [3].



Rysunek 1. Liczba nowych leków dopuszczonych do obrotu przez FDA (Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków) [3]

Figure 1. The number of new medicines authorized by the FDA (ang. Food and Drug Administration) [3]

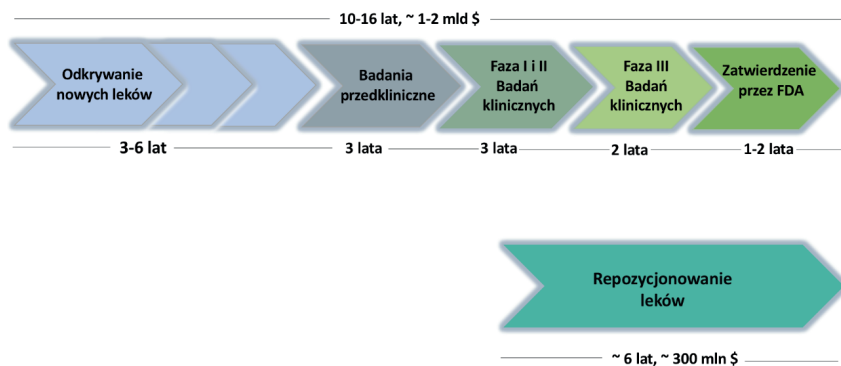
Stwierdzono, że około 1 na 1000 kandydatów na środek leczniczy, po potwierdzeniu skuteczności w badaniach przedklinicznych na zwierzętach, przechodzi do I fazy badań klinicznych na ludziach. Niestety tylko 1 na 10 potencjalnych środków leczniczych w formie odpowiednich formułacji farmaceutycznych, przechodzących do I fazy badań klinicznych z sukcesem zostaje wdrożony i trafia na rynek farmaceutyczny [4]. Szacuje się, że idąc w tym tempie, będziemy potrzebować około 300 lat [5], aby podwoić liczbę leków na świecie. W świetle powyższych faktów, firmy farmaceutyczne i grupy badawcze starają się wdrożyć nowe pomysły i technologie, które pozwolą przyspieszyć rozwój nowych leków.

1. STRATEGIA REPOZYCJONOWANIA

Na przestrzeni ostatniej dekady pojawił się nowy trend, polegający na wykorzystaniu leków już zarejestrowanych w nowych wskazaniach terapeutycznych. Taka

strategia często określana jest w literaturze jako „repozycjonowanie leków”, „przekierowywanie leków” lub „znajdowanie nowych zastosowań dla starych leków” [6,7] i wydaje się bardzo owocną oraz oszczędną ścieżką w rozwoju nowych leków. Przede wszystkim pozwala ona skrócić czas wprowadzenia leku na rynek [8] oraz jest niezwykle korzystna z punktu widzenia finansowego [9].

Standardowy proces odkrywania i rozwoju nowych leków (*de novo*), sięgający od pomysłu do jego wdrożenia na rynek, to proces trwający średnio od 10 do 16 lat [10], w którym wyróżnia się następujące etapy: etap badań przedklinicznych oraz badania kliniczne (Rys. 2). Etap badań przedklinicznych obejmuje odpowiednio: a) 2–3 lata dla odkrycia celu biologicznego i jego walidacji, b) 0,5–1 roku w celu zaprojektowania i/lub zbadania cząsteczek biologicznie aktywnych, c) 1–3 lat w celu optymalizacji struktury wiodącej, d) 1–2 lat prowadzi się ocenę biodostępności ADMET, ocenę efektywności *in vivo* i zaawansowany rozwój przedkliniczny (ocenę toksyczności, opracowanie formułacji farmaceutycznej). Etap badań klinicznych obejmuje odpowiednio: a) 5–7 lat badania fazy I, II, III, w których ocenia się najpierw bezpieczeństwo stosowania kandydata na lek, działania niepożądane i tolerancje u ludzi (I faza), skuteczność w jednostce chorobowej na małej i dużej populacji pacjentów (odpowiednio II i III faza) oraz b) 1–2 lat w celu zarejestrowania nowego produktu leczniczego. Faza IV badań klinicznych monitoruje bezpieczeństwo nowo zarejestrowanego leku, związane z skutkami długoterminowego stosowania danego leku [4].



Rysunek 2. Porównanie procesu tworzenia leku *de novo* oraz strategii repozycjonowania [11]

Figure 2. Comparison of *de novo* drug discovery and repositioning strategies [11]

Strategia repozycjonowania leków pozwala znacznie zredukować ten proces, ponieważ niektóre etapy mogą zostać ominięte. Dodatkowo wiele leków już istniejących posiada a) gotowe formułacje, b) obszerne dane dotyczące absorpcji, dystrybucji, metabolizmu, eliminacji i toksyczności (ADMET), c) przeszły już testy bezpieczeństwa w badaniach klinicznych, dlatego nie ma ryzyka niepowodzenia z powodu reakcji niepożądanych, d) posiadają gotowe dane na temat bezpieczeństwa, uzyskanie z fazy IV badań klinicznych [12, 13]. Wszystkie powyższe aspekty

pozwalają znacznie skrócić czas i koszty zarejestrowania leku w innym, nowym wskazaniu. Przykładowo, badania kliniczne fazy IV, które monitorują bezpieczeństwo nowo zarejestrowanego leku, kosztują przeciętnie około 100 milionów USD [14]. Z uwagi na fakt, iż większość leków wprowadzonych do obrotu zostało poddanych monitorowaniu w fazie IV na milionie pacjentów, repozycjonowanie pozwala na pominięcie tego kosztu, gdyż bezpieczeństwo danej substancji leczniczej zostało już wcześniej sprawdzone.

Leki dostępne na rynku można ponownie wykorzystać na różnych etapach rozwoju, począwszy od badań przedklinicznych: wirtualne badania przesiewowe *in silico*, badania przesiewowe *in vitro* [15], badania w zwierzęcych modelach chorób, skończywszy na II fazie badań klinicznych u ludzi. Przykładowo, w latach 2006–2011 zidentyfikowano co najmniej 34 doniesień, w których testowano biblioteki leków komercyjnych w badaniach przesiewowych *in vitro*. Dla kilku leków komercyjnych udało się zidentyfikować nową aktywność biologiczną, która wcześniej nie została opisana [14]. Kilka firm oferuje gotowe biblioteki leków zatwierdzonych przez FDA, które można wykorzystać do przesiewowych badań *in vitro* (np. Prestwick Chemicals [16], Selleckchem [17, 18], MedChemexess [19]). Podobną biblioteką dysponują uniwersytety, np. John Hopkins University Clinical Compound Library (JHCCL) [20], w której znajduje się około 1,600 leków zatwierdzonych przez FDA. Wiele grup badawczych korzysta z gotowych bibliotek, w celu wykonania badań przesiewowych *in vitro* do nowego celu biologicznego [21]. W ten sposób ponad 100 leków komercyjnych wykazało *in vitro* potencjalną aktywność w schorzeniach innych niż te, do których terapii pierwotnie zostały dopuszczone [14].

Inną strategię stosują firmy, które zajmują się wyłącznie repozycjonowaniem leków. Szukając nowych zastosowań dla leków zarejestrowanych, firmy te przeszukują wszystkie dostępne informacje na temat leków zarejestrowanych, takie jak: artykuły naukowe, patenty oraz bazy danych, dotyczące działań niepożądanych opracowywanych przez FDA. Następnie tworzą bazę danych i swoistą sieć łączącą zależności pomiędzy lekiem, szlakami molekularnymi, biochemicznymi i genetycznymi, zwiększając szanse na znalezienie nowego zastosowania dla leku generycznego [22]. W ten sposób firma Bovista odkryła, iż pirlindol – lek przeciwdepresyjny, który został opracowany i stosowany w Rosji, może być wykorzystany w terapii stwardnienia rozsianego [23]. Firma uzyskała ochronę patentową na terenie USA na pirlindol [24], który obecnie rozwija w kierunku terapii stwardnienia rozsianego. W podobny sposób Bovista znalazła trzy leki które można zastosować w terapii chorób nowotworowych [25] oraz jeden do leczenia padaczki [26].

Kolejnym źródłem wiedzy są obserwacje kliniczne i wiedza lekarzy, którzy często wykorzystują różne leki poza ich pierwotnym wskazaniem. Pozarejestracyjne stosowanie leków (*z ang. off-label*) jest bardzo często wykorzystywane w praktyce klinicznej, w szczególności, jeśli dany lek istnieje już kilka lat na rynku [27]. Szacuje się, że jeden lek może mieć około 20 innych pozarejestracyjnych wskazań [22]. Z uwagi na fakt, iż klinicyści mają trudności z opublikowaniem swoich wyników (zgoda pacjenta na publikację wyników, zgoda placówki w której badanie było pro-

wadzone), często ich obserwacje nie są rozpowszechniane [22]. Z tego powodu na uniwersytecie w Ariel (Izrael) powstał jeden z pierwszych ośrodków zajmujących się repozycjonowaniem leków. Grupa kierowana przez Moshe Rogosnitzky [28], współpracuje z klinicystami, analizuje każdy zgłoszony korzystny „pozarejestacyjny” efekt terapeutyczny dla danego leku i pomaga wprowadzić lek do obrotu w nowym wskazaniu. Ta sama grupa zainicjowała badania kliniczne z tzw. niskimi dawkami naltreksonu 3–5 mg/dobę [29] w chorobach autoimmunologicznych, który pierwotnie wykorzystywano do leczenia uzależnienia od opioidów oraz alkoholizmu (50 mg/dobę) [30]. Ta sama grupa badawcza wprowadziła do lecznictwa krople z dipirydamolem (lek pierwotnie stosowany w leczeniu nadciśnienia tętniczego) w terapii zespołu suchego oka, skrzydlika (łac. *Pterygium*) oraz innych chorób oczu [31]. W podobny sposób wiele uczelnianych zespołów badawczych szuka nowych zastosowań dla leków już istniejących.

Chociaż strategia repozycjonowania oferuje wiele korzyści, koncerny farmaceutyczne nie zawsze podzielają optymizm środowiska akademickiego. Sporym problemem są regulacje prawne dotyczące ochrony własności intelektualnej oraz szeroka ochrona patentowa złożona przez firmę, która jako pierwsza odkryła nowy lek. Dlatego też strategia repozycjonowania jest opłacalna, jeżeli ochrona patentowa na dany lek już wygasła, lub nie jest zbyt szeroka. Ponadto, rozpatrując kandydata na lek repozycjonowany, oprócz nowego wskazania należy zwrócić uwagę na konieczność stworzenia nowej formułacji lub innej niż dotychczas stosowanej dawki dla danego leku. Tylko takie połączenie zapewni możliwość uzyskania nowej ochrony patentowej i efektywne ekonomicznie repozycjonowanie. W przeciwnym wypadku istnieje ryzyko, iż klinicyści w celu uzyskania podobnego efektu terapeutycznego, będą stosowali tani lek generyczny sprzedawany przez konkurencyjne firmy, zamiast nowego, droższego leku repozycjonowanego [32].

Niemniej jednak, pomimo wielu trudności, na jakie można natrafić w trakcie repozycjonowania, w latach 2012–2014 FDA zarejestrowało 114 zgłoszeń leków repozycjonowanych [33]. Przykłady leków repozycjonowanych które znalazły zastosowanie w nowych wskazaniach terapeutycznych przedstawia Tabela 1 [8, 12]. Ponadto, strategia repozycjonowania stała się „gorącym tematem” poruszonym ostatnio w literaturze ogólnościowej, o czym świadczy fakt, iż każdego miesiąca czasopisma naukowe publikują około 30 artykułów na ten temat. W 2015 r. powstało czasopismo poświęcone tematyce repozycjonowania leków – „*Drug Repurposing, Rescue, and Repositioning*” [34]. Ponadto, na świecie istnieje około 40 firm, których głównym celem jest wyszukiwanie nowych zastosowań dla leków już istniejących.

Tabela 1. Nowe wskazania terapeutyczne dla istniejących już leków
 Table 1. New therapeutic indications for existing drugs

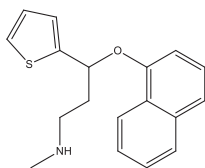
Substancja lecznicza	Pierwotne zastosowanie	Nowe zastosowanie
Amantadyna	Grypa	choroba Parkinsona [8]
Amfoterycyna B	Infekcja grzybicza	leiszmanioza [35]
Kwas acetylosalicylowy	Przeciwzapalne, przeciwbólowe	przeciwplytkowe [36]
Atomoksetyna	Przeciwdepresyjne	zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi [37, 38]
Azydetymidyna	Przeciwnowotworowe	HIV/AIDS [39]
Bromokryptyna	Choroba Parkinsona	cukrzyca [40]
Bupropion	Przeciwdepresyjne	problemy z rzuceniem palenia [39]
Gabapentyna	Epilepsja	ból neuropatyczny [41]
Kolchicyna	Dna moczanowa	nawracające zapalenie osierdzia [37]
Metotreksat	Przeciwnowotworowe	łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów [10]
Miltefozyna	Przeciwnowotworowe	leiszmanioza trzewna [42]
Propranolol	Nadciśnienie	profilaktyka migreny [43]
Kwas retinowy	Trądzik	ostra białaczka promielocytowa [44,45]
Ropinirol	Choroba Parkinsona	zespół niespokojnych nóg [46]
Talidomid	Lek uspakajający	szpiczak mnogi [47]

Szacuje się, iż liczba repozycjonowanych leków wprowadzonych na rynek, rośnie systematycznie i w przyszłości może stanowić około 30% wszystkich zatwierdzonych leków [12]. Wybrane przykłady zostały omówione szczegółowo poniżej.

2. PRZYKŁADY REPOZYCJONOWANIA LEKÓW DZIAŁAJĄCYCH W OBRĘBIE OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

2.1. DULOKSETYNA

Jednym z pierwszych przykładów strategii repozycjonowania, gdzie dla leku już zarejestrowanego znaleziono nowe wskazanie terapeutyczne jest duloksetyna (Rys. 3) [10]. Duloksetyna została pierwotnie opracowana jako lek przeciwdepresyjny przez firmę Eli Lilly, która pracowała nad „ulepszoną wersją” fluoksetyny (handlowa nazwa leku – Prozac) [10]. Mechanizm działania duloksetyny opiera się na hamowaniu wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny, co prowadzi do zwiększenia poziomu tych neuroprzekazników w szczeliny synaptycznej [10].



Rysunek 3. Struktura chemiczna duloksetyny

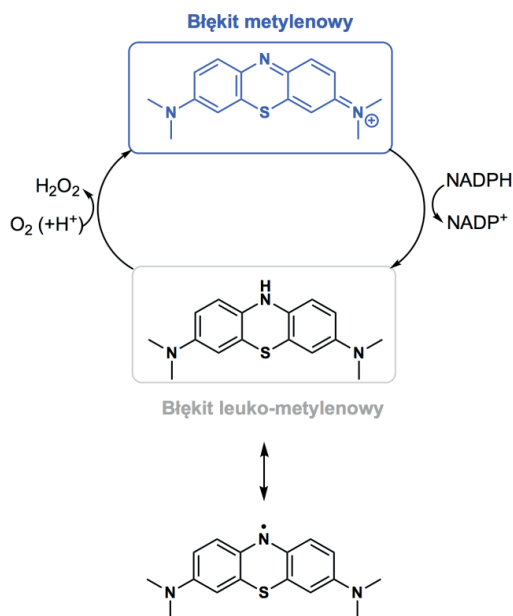
Figure 3. Duloxetine structure

W 1998 r. po raz pierwszy odnotowano poprawę w zakresie nietrzymania moczu u kobiet z wysiłkowym nietrzymaniem moczu (WNM), u których wdrożono leczenie duloksetyną. Badania farmakologiczne u zwierząt wykazały, że podwyższony poziom katecholamin wpływa pozytywnie na aktywność mięśni prążkowanych zwieracza cewki moczowej, a także zwiększa pojemność pęcherza moczowego [48]. Przeprowadzone później badania kliniczne z udziałem 458 kobiet potwierdziły efekt terapeutyczny duloksetyny w WNM [49, 50]. Dodatkową korzyścią duloksetyny jest stosunkowo niewielka ilość działań niepożądanych, w porównaniu do dotychczas stosowanymi lekami antycholinergicznymi [16]. Duloksetyna została zarejestrowana w Wielkiej Brytanii w 2004 do leczenia WNM. Biorąc pod uwagę, że proces wdrożenia duloksetyny do leczenia WNM na rynek wynosił 6 lat, jest on znacznie krótszy niż średni okres 13,5 lat w przypadku nowych substancji leczniczych, opracowywanych *de novo* i podkreśla jak efektywna jest metoda repozycjonowania. Firma Lilly, która wprowadziła na rynek duloksetynę do leczenia WNM, w ciągu czterech lat od daty rejestracji uzyskała dochód ze sprzedaży tego leku sięgający około 800 mln USD [10].

2.2. BŁĘKIT METYLENOWY

Błękit metylenowy został zsyntetyzowany po raz pierwszy w 1883 r., a jego struktura została ostatecznie potwierdzona przez Heinricha Bernthsenę w 1885 r. [51]. Chwilę później Paul Ehrlich odkrył, że błękitem metylenowym można specyficznie wybarwić zarodźca malarii (*Plasmodium malariae*) w krwi pacjentów chorych na malarię [52]. Obserwacje te dały asumpt do sprawdzenia efektywności błękitu metylenowego w leczeniu malarii u ludzi. W 1897 r. Ehrlich opisał udaną terapię dwóch pacjentów z malarią przebywających w szpitalu Moabit w Berlinie [53]. Niestety błękit metylenowy nie był skuteczny u wszystkich pacjentów i został później wyparty z rynku przez chininę. Niemniej jednak, Ehrlich jako pierwszy opisał metabolizm błękitu metylenowego, oraz jego zdolność do ulegania reakcji typu red-ox. Podczas barwienia różnych tkanek zaobserwował zmienną, odwracalną redukcję błękitu metylenowego do bezbarwnej formy błękitu leukometylenowego [54]. Po ekspozycji na tlen, niebieski kolor utlenionego błękitu metylenowego powracał (Rys. 4) [55].

Przez wiele dekad, błękit metylenowy był wykorzystywany głównie w przemyśle chemicznym oraz tekstylnym. Ostatnimi czasy, zainteresowanie błękitem metylenowym powróciło z uwagi na jego właściwości chemiczne, które można wykorzystać w walce z „stresem oksydacyjnym” [56]. Stres oksydacyjny powstaje w wyniku zachwianej równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników a ich neutralizacją. Sugeruje się, iż stres oksydacyjny prowadzi do obumierania komórek na drodze apoptozy lub nekrozy, i często bywa wymieniany jako jeden z patomechanizmów prowadzących do chorób neurodegeneracyjnych [57, 58]. W chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona, występuje wybiórcza i wysoce charakterystyczna utrata neuronów, która często jest skorelowana z kumulacją reaktywnych form tlenu (z ang. *reactive oxygen species* ROS) [59]. W 1992 r. badacze z laboratoriów Eli Lilly opisali, iż *N*-niepodstawione pochodne fenotiazyny hamują reakcje utleniania lipidów w hodowli komórkowej neuronów, wykazując tym samym właściwości neuroprotektcyjne. Właściwości neuroprotektcyjne błękitu metylenowego potwierdzono również w zwierzęcych modelach choroby Parkinsona, wywołanych toksynami powodującymi dysfunkcję mitochondriów [60]. Późniejsze prace wyjaśniły mechanizm działania neuroprotektyjnego błękitu metylenowego. W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* wykazano, że błękit metylenowy jest przekształcany do formy leuko-metylenowej przez mitochondrialną dehydrogenazę NADH lub inne, zależne od NADPH flawoenzymy [61]. Z kolei błękit leuko-metylenowy jest zdolny do bezpośredniej reakcji z wolnymi rodnikami za pomocą ugrupowania N-H obecnych w pierścieniu fenotiazyny. Powstałe rodniki fenotiazynylowe są wyjątkowo dobrze stabilizowane przez mezomerię, co powoduje, iż błękit leuko-metylenowy ma silne właściwości przeciwutleniające (Rys. 4). Ponadto, jako „kation lipofilowy” błękit leukometylenowy gromadzi się w mitochondriach. Ze względu na duży potencjał błony mitochondrialnej, kationy lipofilowe są kumulowane wewnątrz mitochondriów tak długo, jak długo błona mitochondrium utrzymuje swój potencjał błonowy [62]. Obecnie sugeruje się, iż kationy lipofilowe można wykorzystać do opracowania przeciwutleniaczy, które selektywnie działają w obrębie mitochondrium, zapobiegając niektórym rodzajom śmierci komórkowej [63].

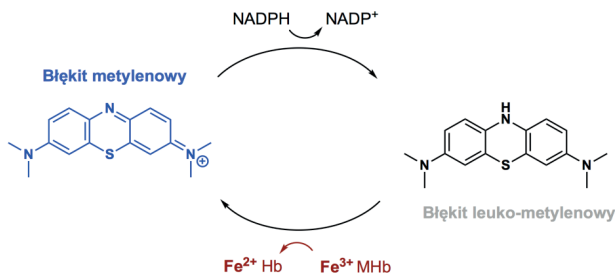


Rysunek 4. Schemat redukcji błękitu metylenowego (kolor niebieski) do błękitu leuko-metylenowego (bezbarwny), który ma efekt antyoksydacyjny [55]

Figure 4. Diagram of reduction of methylene blue (blue) to leuco-methylene blue (colorless), which has an antioxidant effect [55]

Powyzsze wyniki zasugerowały, iż błękit metylenowy może znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych [64]. W 1992 r. w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* wykazano, iż błękit metylenowy hamuje agregację białka tau, które leży u podłoża zmian patologicznych w chorobie Alzheimera [65]. Biorąc po uwagę, że zmiany patologiczne związane z agregacją białka tau korelują z obrazem klinicznym choroby Alzheimera, sugeruje się, iż cząsteczki które hamują agregację białka tau mogą mieć potencjał terapeutyczny [66]. Kilka lat temu brytyjska firma TauRx Therapeutics zainicjowała badania kliniczne, w których oceniano skuteczność błękitu metylenowego [67] oraz sól błękitu leukometylenowego [68] (LMTX® [69]), u pacjentów z chorobą Alzheimera, niestety nie uzyskano pozytywnych wyników.

Niemniej jednak, obecnie błękit metylenowy jest stosowany w praktyce klinicznej, ale w innym schorzeniu: methemoglobinemii. Błękit metylenowy pod wpływem enzymów mitochondrialnych ulega redukcji do błękitu leukometylenowego, który następnie redukuje żelazo Fe^{3+} (obecne w methemoglobinie) do żelaza Fe^{2+} (w hemoglobinie) (Rys. 5). Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) zarejestrowała błękit metylenowy do leczenia methemoglobinemii [70] oraz infekcji dróg moczowych [71]. Na polskim rynku błękit metylenowy produkowany w formułacjach farmaceutycznych dostępny jest w postaci iniekcji i stosowany jest w lecznictwie zamkniętym w przypadkach methemoglobinemii [72].

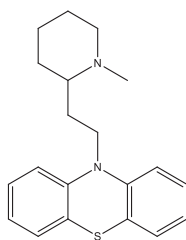


Rysunek 5. Schemat redukcji żelaza Fe³⁺ obecnego w methemoglobinie (MHb) do żelaza Fe²⁺ w hemoglobinie (Hb) pod wpływem błękitu leuko-metylenowego [73]

Figure 5. Scheme shows the reduction of Ferrum ions Fe³⁺ present in methemoglobin (MHb) to Fe²⁺ present in hemoglobin by leuko-methylene blue [73]

2.3. TIORYDAZYNA

Tiorydazyna to pochodna układu fenotiazyny, która była powszechnie stosowana w terapii zaburzeń psychicznych (Rys. 6) [74]. Ze względu na fakt, iż leczenie tiorydazyną wiązało się z działaniem kardiotoksycznym, polegającym na wydłużeniu odstępu QT w zapisie elektrokardiograficznym, i zwiększonym ryzyku wystąpienia arytmii komorowych, w 2005 r. lek ten został wycofany z obrotu w Europie i USA [75]. Jednakże ze względu na aktywność przeciwbakteryjną tiorydazyny, zainteresowanie tym lekiem powróciło. Zaobserwowano, iż dzięki zdolności do kumulowania się w makrofagach, tiorydazyna wykazuje aktywność przeciwbakteryjną w badaniach *in vitro* wobec wielu mikroorganizmów: *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi*, *Plazmodium falciparum*, szczepy *Staphylococcus aureus* odporne na metycylinę a także bakterii z rodzaju *Enterococcus* [76].



Rysunek 6. Struktura chemiczna tiorydazyny

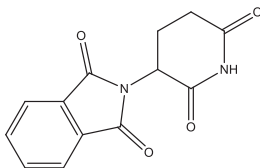
Figure 6. Chemical structure of thioridazine

Późniejsze badania *in vivo* potwierdziły aktywność przeciwbakteryjną w zwierzęcych modelach zakażeń skórnych, wywołanych szczepami *S. aureus* [77]. Przeprowadzono również wiele badań *in vitro* oraz *in vivo*, które wykazały aktywność przeciwegzyczną tiorydazyny wobec wielolekoopornych szczepów *Mycobacterium*

(ang. *multi-drug resistant tuberculosis* MDR-TB), [78,79] w monoterapii oraz terapii łączonej z lekami przeciwgruźliczymi takimi jak rifampicyna lub izoniazyd. Co ciekawe, u ludzi tiorydazyna w terapii skojarzonej wykazywała skuteczność w leczeniu gruźlicy wielolekoopornej (MDR-TB) i w gruźlicy z lekoopornością wielolekową o rozszerzonej oporności [80] (ang. *extensively drug resistant tuberculosis*, XDR-TB [81]). Przykładowo, badania przeprowadzone w 2012 r. w Argentynie wykazały, iż tiorydazyna w terapii skojarzonej z linezolidem oraz moxifloksacyną była skuteczna w leczeniu XDR-TB u 90% pacjentów [82]. Podobne wyniki zaobserwowano na małej grupie pacjentów w Indiach, u których zaobserwowano skuteczność tiorydazyny w leczeniu XDR-TB [83]. Autorzy tego doniesienia wykazali również, iż monoterapia tiorydazyną przez okres 3 tygodni była bezpieczna, bez znaczącego wpływu na odstęp QT lub jakiegokolwiek innych funkcji serca, zgodnie z rygorystycznym monitorowaniem prowadzonym w tych badaniach. Obecnie duże nadzieje wiąże się z stosowaniem tiorydazyny u pacjentów z postacią XDR-TB [84], gdyż leczenie tej postaci gruźlicy obecnie dostępnymi lekami przeciwprątkowymi jest często nieskuteczne. Dodatkowo, około 20% pacjentów z gruźlicą XDR umiera w ciągu roku od rozpoznania, natomiast śmiertelność wśród pacjentów współzakażonych wirusem HIV jest znacznie wyższa i osiąga poziom 80–90% [85]. Skuteczność kliniczna tiorydazyny wśród pacjentów z XDR sprawiła, iż w 2015 r. tiorydazyna znalazła się na liście 5 leków zalecanych przez WHO do leczenia pacjentów z postacią XDR [86]. Jednocześnie zaleca się, aby leczenie tiorydazyną było wdrażane po wykluczeniu chorób serca, a pacjenci powinni być monitorowani przez cały okres leczenia pod kątem możliwych powikłań kardiologicznych [83].

2.4. TALIDOMID

Innym przykładem strategii repozycjonowania jest Talidomid (Rys. 7). Jako lek substancja ta została wprowadzona do obrotu w 1957 r. w Niemczech i Anglii jako środek uspokajający, który później był stosowany przez kobiety w ciąży w celu łagodzenia porannych mdłości. Niestety stosowanie talidomidu w pierwszym trymestrze ciąży doprowadziło do ciężkich wad wrodzonych płodu [87]. Jak oszacowano później, co najmniej 15 000 dzieci, których matki stosowały talidomid w ciąży, urodziło się z wadami kończyn. W latach 60 zaprzestano stosowania tego leku u kobiet w ciąży [88]. W 1998 roku znaleziono nowe zastosowanie dla talidomidu w leczeniu szpiczaka mnogiego, w szczególności w postaci lekoopornej. W 2006 talidomid został oficjalnie zarejestrowany przez FDA w terapii szpiczaka, a zyski ze sprzedaży wynosiły około 270 milionów dolarów [89].



Rysunek 7. Struktura chemiczna talidomidu
Figure 7. Chemical structure of thalidomide

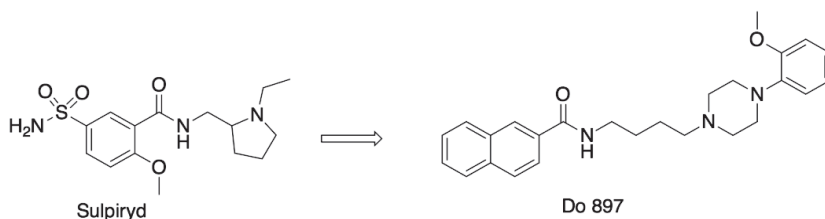
3. SELEKTYWNA OPTYMALIZACJA DZIAŁAŃ UBOCZNYCH (SOSA)

Kolejnym podejściem, które pozwala ułatwić opracowanie nowych substancji leczniczych jest tzw. koncepcja „selektywnej optymalizacji działań ubocznych” (ang. *selective optimization of side activities*, SOSA). Została ona po raz pierwszy sformułowana w 2004 r. przez badaczy z Prestwick Chemical Inc [90]. Według niej leki obecne na rynku stanowią punkt wyjścia do opracowywania nowych cząsteczek wiodących w innym obszarze terapeutycznym. Koncepcja SOSA opiera się na fakcie, iż leki oprócz oddziaływania z podstawowym celem biologicznym, który odpowiedzialny jest za efekt terapeutyczny w danej jednostce chorobowej, posiadają powinowactwo do innych celów biologicznych, które odpowiedzialne są za powstawanie działań ubocznych [91]. Celem koncepcji SOSA jest modyfikacja struktury chemicznej leku, pozwalającej odwrócić powinowactwo leku do celów biologicznych, tak aby działanie niepożądane stało się podstawową aktywnością farmakologiczną. Wówczas na bazie leku już istniejącego tworzy się bibliotekę analogów danego leku, a następnie w badaniach *in vitro* sprawdza się, w jaki sposób modyfikacja zmieniała powinowactwo. Koncepcja SOSA pozwala znacznie skrócić czas i zmniejszyć koszty w porównaniu do generowania substancji leczniczych *de novo*. Ponadto podejście SOSA ułatwia otrzymanie nowych cząsteczek, które będą się charakteryzowały mniejszą toksycnością, dobrą biodostępnością i łatwą syntezą, którą już dla większości analogów została opracowana wcześniej [92,16]. Podejście SOSA przewiduje dwa główne etapy:

- a) Etap I – badania przesiewowe *in vitro* biblioteki, dla których dostępne są dane dotyczące dostępności biologicznej oraz toksykologii. Cząsteczki, które zostaną wytypowane w tym etapie są z założenia strukturami „leko-podobnymi” [90].
- b) Etap II – optymalizacja leków wyselekcjonowanych w badaniach przesiewowych. Struktura chemiczna leku jest następnie modyfikowana tak, aby przekształcić jej profil farmakologiczny, zwiększając powinowactwo do nowego celu biologicznego, redukując jednocześnie wyjściową aktywność farmakologiczną [90].

Przykładem zastosowania techniki SOSA jest otrzymanie cząsteczki Do 897, wykazującej selektywne powinowactwo do receptorów D_3 , dokonując modyfika-

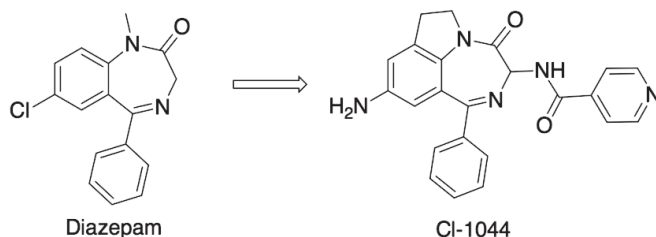
cji struktury chemicznej sulpirydu, neuroleptyku wykazującego powinowactwo do receptorów dopaminowych $D_2:D_3$. Receptory dopaminergiczne D_3 znajdują się w rejonach mózgu, które kontrolują funkcje motoryczne [93]. W trakcie procesu optymalizacji struktury chemicznej Do 897, fragment benzamidu zastąpiono naftalenem, natomiast w miejsce pierścienia piperolidyny wprowadzono podstawnik *o*-metoksyfenylopiperazynowy, uzyskując cząsteczkę Do 897, która cechowała się wybiórczą selektywnością do receptorów D_3 (Rys. 8) [16]. Cząsteczka Do 897 jest w trakcie badań klinicznych II fazy, gdzie sprawdzana jest jej skuteczność w terapii choroby Parkinsona [92].



Rysunek 8. Schemat przekształcania struktury chemicznej sulpirydu do Do 897 [16]

Figure 8. Diagram of transformation of the chemical structure of sulpiride into Do 897 [16]

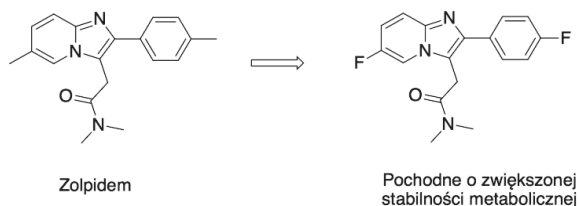
Kolejnym przykładem zastosowania techniki SOSA jest opracowanie selektywnego inhibitora fosfodiesterazy IV (PDE IV), poprzez przekształcenie leku przeciwlękowego, diazepamu w pochodną trójcykliczną, CI-1044. Cząsteczka CI-1044 w badaniach *in vitro* wykazywała aktywność przeciwzapalną i może znaleźć potencjalne zastosowanie w terapii astmy lub przewlekłych stanów zapalnych (Rys. 9) [16].



Rysunek 9. Schemat przekształcenia diazepam do cząsteczki CI-1044 [16]

Figure 9. Diagram of transformation of the chemical structure of diazepam into CI-1044 [16]

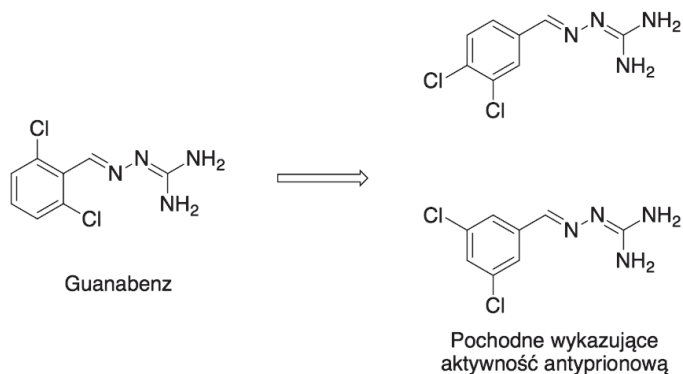
Zolpidem, którego podstawowym działaniem farmakologicznym jest sedacja, w niskich dawkach (1 mg/kg) wykazuje działanie przeciwpsychotyczne [90]. W celu zwiększenia jego okresu półtrwania wprowadzono szereg modyfikacji strukturalnych, których celem było zablokowanie hydroksylacji grup metylowych połączonych z pierścieniem fenylowym i imidazopirydynowym. Wykazano zwiększoną stabilność metaboliczną oraz efekt przeciwpsychotyczny w zwierzęcych modelach schizofrenii (Rys. 10) [93].



Rysunek 10. Zwiększenie stabilności metabolicznej zolpidemu uzyskano wprowadzając fluor w miejsce grup metylowych [94]

Figure 10. Replacement of methyl groups with fluorine resulted in increased metabolic stability of zolpidem [94]

Guanabenz (GA) to agonista receptorów α_2 -adrenergicznych, wcześniej stosowany w terapii nadciśnienia [95]. W badaniach *in vitro* wykazano, iż guanabenz posiada dodatkową aktywność antyprionową. Jednakże wysokie powinowactwo guanabenzu do receptora α_2 -adrenergicznego i związana z tym aktywność hipotensyjna, stanowiła duże ograniczenie do wykorzystania guanabenzu w terapii chorób prionowych. Modyfikacja struktury guanabenzu, poprzez zmianę usytuowania podstawników chlorowych wokół pierścienia aromatycznego, spowodowała całkowity spadek powinowactwa do receptorów α_2 -adrenergicznych, przy zachowanej aktywności antyprionowej (Rys. 11) [96].



Rysunek 11. Modyfikacja struktury chemicznej guanabenzu [96]

Figure 11. Modification of guanabenz structure [96]

Pozostałe przykłady efektywnego zastosowania techniki SOSA są przedstawione w Tabeli 2.

Tabela 2. Pozostałe przykłady zastosowania techniki SOSA
 Table 2. Other examples of the application of the SOSA technique

Lek wyjściowy	Profil farmakologiczny	Uzyskany analog SOSA	Profil farmakologiczny
Amiloryd	Moczopędny	Mesyłan kariporidu (Hoe 642)	Inhibitor pompy Na/H [94]
Niguldypina	Bloker kanału wapniowego	SNAP-6383	Antagonista receptorów adrenergicznych $\alpha 1A$ [97]
Atenolol	β -bloker	Kromakalim	Bloker kanału potasowego IKs [98]
Minaprina	Przeciwdepresyjny	Pochodne aminotiadiazolu	Antagonista CRH [99-101]
Lu 110896 i Lu 110897	Herbicyd	Analog difenylowy	Selektywny antagonistą ETA [102]
Tetracyklina	Antybiotyk	BMS 1922548	Neuropeptydowy ligand Y [103]
Erytromycyna A	Antybiotyk	Kładozyna – zamiennik analogowy	Niepeptydowy hormon lutenizujący - antagonistą hormonu uwalniającego [104]
Fluoksetyna	Inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny	Analog imidazolowy	Przeciwgrzybiczy [105]

Koncepcja SOSA jest obiecującą techniką, która może przyspieszyć tempo rozwoju nowych leków, ponieważ zapewnia wysokie prawdopodobieństwo uzyskania cząsteczek o właściwościach lekopodobnych i niskiej toksyczności [16]. Istnieje, jednakże ryzyko, iż pochodne opracowane na bazie znanego leku zostały już wcześniej opatentowane przez pierwotnych wynalazców. Ryzyko to częściowo mityguje jednak fakt, iż pierwotny patent nie obejmuje nowego wskazania terapeutycznego dla danej grupy związków.

PODSUMOWANIE

Rosnące koszty, czas i wysokie ryzyko niepowodzenia, związane z procesem odkrywania nowego leku, skłoniły przemysł farmaceutyczny do poszukiwania strategii, które mogą ten proces ułatwić. Zarówno poszukiwanie nowych zastosowań dla leków już zarejestrowanych, jak i podejście SOSA, pozwalają znacznie zredukować koszty i przede wszystkim czas związany z wprowadzeniem nowego leku do obrotu. W szczególności strategia repozycjonowania jest „drogą na skróty” pomiędzy laboratorium a praktyką kliniczną która na wielu przykładach już się sprawdziła. Wielu autorów uważa, że repozycjonowanie jest nowym trendem i uzupełnieniem procesu odkrywania nowych leków, lecz nie alternatywą. Należy zwrócić uwagę, iż najlepszymi kandydatami do repozycjonowania są leki, dla których pierwotna ochrona patentowa już wygasła i dla których istnieje możliwość stworzenia nowej formu-

cji, umożliwiającej, wraz z nowym wskazaniem terapeutycznym, zapewnienie nowej ochrony patentowej.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, projekt badawczy nr DEC/2014/15/D/NZ7/01789.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.A. DiMasi, R.W. Hansen, H.G. Grabowski, *Health Econ*, 2003, **22**, 151.
- [2] B. Tauzin, *Pharmaceutical Industry Profile 2009*, Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, Wahington 2009.
- [3] A. Mullard, *Nat. Rev. Drug Disc.*, 2015, **14**, 77.
- [4] A. Gail, M.D. Van Norman, Elsevier, 2016, **1(3)**, 170.
- [5] C.R. Chong, D.J. Sullivan, *Nature*, 2007, **448**, 645.
- [6] J. Langedijk, A.K. Mantel-Teeuwisse, D.S. Slijkerman, M.H. Schutjens, Elsevier, 2015, **20(8)**, 1027.
- [7] R. Kerber, *Boston Globe*, 2003.
- [8] B.M. Padhy, Y.K. Gupta, *J. Postgrad. Med.*, 2011, **57(2)**, 153.
- [9] S.H. Sleigh, C.L. Barton., *Pharm Med.*, 2010, **24**, 151.
- [10] T.T. Ashburn, K.B. Thor, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004, **3(8)**, 673.
- [11] J.W. Scannell, A. Banckley, H. Boldon, B. Rarrington, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2012, **11(3)**, 191.
- [12] N. Singh, A.C. Halliday, J.M. Thomas, O.V. Kuznetsova, R. Baldiwn, C.Y. Woon, P.K. Aley, I. Antoniadou, T. Sharp, S.R. Vasudevan, G.C. Churchill, *Nature communiacations*, 2013, **4**, 1.
- [13] Y.Y. Li, S.J.M. Jones, *Genome Med.*, 2012, **4(3)**, 27.
- [14] S. Ekins, A.J. Williams, *Pharm. Res.*, 2011, **28(8)**, 1785.
- [15] T.I. Oprea, J.P. Overington, *Assay Drug Dev. Technol.*, 2015, **13(6)**, 299.
- [16] C.G. Wermuth, 2006, **11(3-4)**, 160.
- [17] S.M. Corsello, J.A. Bittker, Z. Liu, J. Gould, P. McCarren, J.E. Hirschman, S.E. Johnston, A. Vrcic, B. Wong, M. Khan, J. Asiedu, R. Narayan, C.C. Mader, A. Subramanian, T.R. Golub, *Nat. Med.*, 2017, **23(4)**, 405.
- [18] S.P. McElroy, P.S. Jones, D.V. Barrault, *Drug Discov. Today*, 2017, **22(2)**, 199.
- [19] G. Cruciani, N. Milani, P. Benedetti, S. Lepri, L. Cesarini, M. Baroni, F. Spyraakis, S. Tortorella, E. Mosconi, *J. Med. Chem.*, 2018, **61(1)**, 360.
- [20] D.A. Patel, A.C. Patel, W.C. Nolan, Y. Zhang, M.J. Holtzman, *PLoS One.*, 2012, **7(5)**.
- [21] J. Franco, A.K. Witkiewicz, E.S. Knudsen, *Oncotarget*, 2014, **5(15)**, 6512.
- [22] N. Nosengo, *Nature*, 2016, **534(7607)**, 314.
- [23] E. Lekka, S.N. Deftereos, A. Persidis, A. Persidis, C. Andronis, *Drug Discov. Today Ther. Strateg.*, 2011, **8**, 103.
- [24] S. Deftereos A. Persidis, patent, 2011, US2011/0268699A1.
- [25] Biovista, Pipeline – Overview, [online], Biovista, [dostęp: 2018-04-11]. Dostępny w Internecie: <https://www.biovista.com/pipeline/>
- [26] S. Deftereos A. Persidis S. Deftereos A. Persidis, patent, 2008, EP2340254A4.
- [27] M. Christopher, M.D. Wittich, M.D. Burkle, W.L. Lanier, *Mayo Clin Proc.*, 2012, **87(10)**, 982.

- [28] M. Rogosnitzky, Professional Timeline, [online], [dostęp: 2018-04-11]. Dostępny w Internecie: <http://mosherogonitzky.info/professional-timeline/>
- [29] J.P. Smith, H. Stock, S. Bingaman, D. Mauger, M. Rogosnitzky, I.S. Zagon IS, *Am. J. Gastroenterol.*, 2007, **102(4)**, 820.
- [30] M. Ziółkowski, J. Rybakowski, *Alkoholizm i narkomania*, 1996, **1(22)**, 105.
- [31] M.R. Rogosnitzky, I. Isakov, W. Wlassoff, A. Ingram, Y.R. Barishak, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 2015, **32(2)**, 83.
- [32] R.B. Smith, *Drug Discov. Today*, 2011, **8(3-4)**, 131.
- [33] Abbreviated New Drug Applications and 505(b)(2) Applications, [online], [dostęp: 2018-08-10]. Dostępny w Internecie: <https://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/ReportsManualsForms/Reports/EconomicAnalyses/UCM524735.pdf>
- [34] A.M. Herman, A New Journal for the Drug Repurposing Community, [online], [dostęp: 2018-04-11]. Dostępny w Internecie: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/drrr.2014.0002>
- [35] Prescribing information. SYMMETREL (Amantadine Hydrochloride, USP). Endo Pharmaceuticals Inc. USA. 2009., [online], [dostęp: 2018-08-10]. Dostępny w Internecie: http://sci-hub.tw/http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/016023s041,018_101s_0161bl.pdf
- [36] S. Mondal, P. Bhattacharya, M. Rahaman, N. Ali, R.P. Goswami, *PLoS Negl Trop Dis.*, 2010, **4**, 764.
- [37] Comprehensive Prescribing Information. BAYER SAFETY COATED ASPIRIN. Bayer Corporation, USA. [online], [dostęp: 2018-08-10]. Dostępny w Internecie: http://sci-hub.tw/http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/4012B1_03_Appd%201-Professional%20Labeling.pdf
- [38] A.F. Shaughnessy, *BMJ*, 2011, **342**, 741.
- [39] Prescribing information. STRATTERA (atomoxetine hydrochloride). Eli Lilly and Company, USA. 2010, [online], [dostęp: 2018-08-10]. Dostępny w Internecie: <http://sci-hub.tw/http://pi.lilly.com/us/strattera-pi.pdf>
- [40] C. Burnouf, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 4850.
- [41] L.M. Sayre, *Chem. Res. Toxicol.*, 2008, **21**, 172.
- [42] A.Y. Baev, A. Negoda, *J. Bioen. Biomem.*, 2013, **45(1-2)**, 165.
- [43] Prescribing information. CYCLOSET (bromocriptine mesylate). VeroScience LLC, USA. 2009, [online], [dostęp: 2018-08-10]. Dostępny w Internecie: http://sci-hub.tw/http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/0208661bl.pdf
- [44] Prescribing information. NEURONTIN (gabapentin). Parke-Davis, Division of Pfizer Inc, USA. 2010. [online], [dostęp: 2018-08-10]. Dostępny w Internecie: http://sci-hub.tw/http://www.pfizer.com/files/products/uspi_neurontin.pdf
- [45] Prescribing information. Methotrexate. Bedford Laboratories, USA. 2005. [online], [dostęp: 2018-08-10]. Dostępny w Internecie: <http://sci-hub.tw/http://www.bedfordlabs.com/products/inserts/MTX-LYO-P00.pdf>
- [46] E. Bidabadi, M. Mashouf, *Paediatr Drugs*, 2010, **12**, 269.
- [47] G. Avvisati, M.S. Tallman, *Best Pract Res Clin Haematol*, 2003, **16**, 419.
- [48] H.J. Li, *Eur J Pharmacol.*, 2014, **735**, 38.
- [49] H.J. Li, *Eur J Pharmacol.*, 2014, **735**, 38.
- [50] S. Boy, *Eur Urol*. 2006, **50(1)**, 119.
- [51] A. Bernthsen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1883, **16**, 2896.
- [52] P. Guttman, P. Ehrlich, *Berl. Klin. Wochenschr.*, 1891, **28**, 953.
- [53] P. Guttman, P. Ehrlich, *Berl. Klin. Wochenschr.* 1891, **28**, 953.
- [54] P. Ehrlich, *Centrb. Med. Wiss.* 1885, **8**, 113.
- [55] J.M. Ohlow, B. Moosmann, *Drug Discov. Today*, 2011, **16(3-4)**.
- [56] M. Duicu, A. Privistirescu, A. Wolf, A. Petrus, C. Ratiu, D. Muntean, *Can. J. Phys. Pharm.*, 2017, **95(11)**, 1376.

- [57] N.A. Simonian, J.T. Coyle, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1996, **36**, 83.
- [58] L.M. Sayre, *Chem. Res. Toxicol.*, 2008, **21**, 172.
- [59] B. Halliwell, *J. Neurochem.*, 2006, **97**, 1634.
- [60] D. Blum, *Prog. Neurobiol.*, 2001, **65**, 135.
- [61] H. Atamna, *FASEB J.*, 2008, **22**, 703.
- [62] M. P. Murphy, Elsevier, 2008, **1778(7-8)**, 1028.
- [63] A.Y. Baev, A. Negoda, *J. Bioen. Biomem.*, 2013, **45(1-2)**, 165-73.
- [64] H. Atamna, R. Kumar, *J. Alzheimers Dis.*, 2010, **20(2)**, 439.
- [65] C.M. Wischik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 11213.
- [66] G. Blessed, B.E. Tomlinson, *Brit. J. Psychat.*, 1968, **114**, 797.
- [67] C.M. Wischik, R.T. Staff, D.J. Wischik, P. Bentham, A.D. Murray, J.M. Storey, K.A. Kook, C.R. Harrington, *J. Alzheimers Dis.*, 2015, **44(2)**, 705.
- [68] S. Gauthier, H.H. Feldman, L.S. Schneider, *Lancet*. 2016, **388(10062)**, 2873.
- [69] C.R. Harrington, J.M. Storey, S. Clunas, K.A. Harrington, D. Horsley, A. Ishaq, S.J.
- [70] A. Mansouri, A.A. Lurie, *Am. J. Hematol.*, 1993, **42**, 7.
- [71] Accessdata, [online], [dostęp: 2018-08-10]. Dostępny w Internecie: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/204630s000lbl.pdf
- [72] F. Flake, K. Runggaldier, *Ratownictwo medyczne. Procedury od A do Z*, ElsevierUrban &Partner, Wrocław 2013.
- [73] S. David, N. Sawal, M. Hamzah, R. Rajabalaya, 2018, **9(1)**, 1.
- [74] H. Azima, H. Durost, D. Arthurs, *Can. Med. Assoc. J.*, 1959, **81(7)**, 549.
- [75] I.B. Alvarez, J.P. Paredero, E. Idini, M.P. Ruestes, *Actas Esp Psiquiatr.*, 2008, **36(3)**, 183.
- [76] J. Bergman, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2013, **16 (2)**, 445.
- [77] B.L. Hahn, P.G. Sohnle, *In Vivo.*, 2014, **28(1)**, 33.
- [78] L. Amaral, M. Viveiros, *Antibiotics (Basel)*, 2017, **6(1)**, 3.
- [79] D. Van Soolingen, R. Hernandez-Pando, H. Orozco, D. Aguilar, C. Magis-Escurra, L. Amaral, J. van Ingen, M.J. Boeree, *PLoS ONE.*, 2010, **5**, 12640.
- [80] K. Kruczak, E. Niżankowska-Mogilnicka, *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2009, **77**, 276.
- [81] L. Amaral, J. Molnar, *Pharmaceuticals*, 2012, **5(9)**, 1021.
- [82] E. Abbate, M. Vescovo, M. Natiello, M. Cufre, An. Garcia, P.G. Montaner, M. Abroggi, V. Ritacco, D. Soolingen, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, **67(2)**, 473.
- [83] Z.F. Udwardia, T. Sen, L.M. Pinto, *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 2011, **6**, 88.
- [84] L. Amaraland, J. Molnar, *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 2010, **5(2)**, 109.
- [85] F.A. Drobniewski, Y.M. Balabanova, *Int. J. Infect. Dis.*, 2002, **6(1)**, 21.
- [86] N. Winters, G. Butler-Laporte, D. Menzis, *Eur Respir. J.*, 2015, **46(5)**, 1461.
- [87] N. Vargesson, *Birth. Defects Res. C. Embryo. Today*, 2015, **105(2)**, 140.
- [88] C.G. Brook, S.N. Jarvis, C.G. Newman, *Acta Paediatr. Scand.*, 1977, **66**, 673.
- [89] R.J. D'Amato, M.S. Loughnan, E. Flynn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 4082.
- [90] C. G. Wermuth, *J. Med. Chem.*, 2004, **47 (6)**, 1303.
- [91] C.G. Wermuth, *Drug Discov. Today*, 2005, **9(19)**, 826.
- [92] Drugs.com, ISOTretinoin. [online], Drugs.com, [dostęp: 2018-04-12]. Dostępny w Internecie: <https://www.drugs.com/ppa/isotretinoin.html>
- [93] P. Mierzejewski, M. Kołaczkowski, M. Marcinkowska, A. Wesołowska, J. Samochowicz, M. Pawłowski, P. Bienkowski, *Europ. J. Pharm.*, 2016, **773**, 51.
- [94] M. Marcinkowska, M. Kołaczkowski, K. Kamiński, A. Bucki, M. Pawłowski, A. Siwek, T. Karcz, B. Mordyl, G. Starowicz, P. Kubowicz, E. Pękala, A. Wesołowska, J. Samochowicz, P. Mierzejewski, P. Bienkowski, *Europ. J. Med. Chem.*, 2016, **124**, 456.
- [95] J. Hypertens, J. Hashimoto, K. Chonan, Y. Aoki, T. Ugajin, J. Yamaguchi, 2003, **21(4)**, 805-11.

- [96] P.H. Nguyen, ACS Chem Neurosci., 2014, **5**(10), 1075.
- [97] H.W. Kleeman, A.G. Weichert, Drug Discov. Today, 2006, **11**(3-4), 160.
- [98] B. Lagu, Drugs Fut., 2001, **26**, 757.
- [99] U. Gerlach, Drugs Fut., 2001, **26**, 473.
- [100] D. Gully, G. Courtemanche, C. Gautieer, P. Roger, G. Balette, C. Wermuth, 1992, patent.
- [101] D. Gully, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1993, **90**, 65.
- [102] A. Mann, C.G. Wermuth, Actual. Chim., 2003, 91.
- [103] Y.Z. Shu, J. Antibiot. (Tokyo) 1995, **48**, 1060.
- [104] J.T. Randolph, J. Med. Chem. 2004, **47**, 1085.
- [105] R. Silvestri, J. Med. Chem., 2004, **47**, 3924.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 lipca 2018