

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Farmaceutyczny  
Katedra Chemii Farmaceutycznej  
Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku



## **Autoreferat**

Marek Bajda

Kraków 2017

## Spis treści

1. Dane osobowe .....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe .....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	3
4. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego .....	3
5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).....	4
a) tytuł osiągnięcia naukowego .....	4
b) wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe .....	5
c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	8
Wprowadzenie .....	8
Poszukiwanie nowych związków biologicznie aktywnych w terapii AD .....	11
Komputerowo wspomagane projektowanie nowych leków .....	13
Cel prowadzonych badań.....	15
Wyniki prowadzonych badań w ramach postępowania habilitacyjnego .....	15
Podsumowanie wyników .....	32
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych .....	33
7. Literatura .....	37

## 1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: **Marek Bajda**

Data i miejsce urodzenia: 20 sierpnia 1981r., Rzeszów

Adres korespondencyjny: Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku, Katedra Chemii Farmaceutycznej UJCM, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Telefon: +48 12 620 54 65

Adres e-mail: marek.bajda@uj.edu.pl

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

**mgr farmacji** - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny – 2005 – obrona pracy magisterskiej z wyróżnieniem, tytuł pracy: Oznaczanie lipofilowości pochodnych tiochinoliny o działaniu przeciwnowotworowym, opiekun pracy: prof. dr hab. Barbara Malawska; 31.03.2006 – po odbyciu stażu zawodowego ukończenie studiów magisterskich na kierunku farmacja

**dr nauk farmaceutycznych** - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny – 30.09.2010 – ukończenie studiów doktoranckich; 8.11.2010 - obrona pracy doktorskiej z wyróżnieniem – specjalność: chemia leków, tytuł pracy: Projektowanie nowych inhibitorów cholinoesteraz metodami modelowania molekularnego, promotor: prof. dr hab. Barbara Malawska

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

**doktorant** - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku – 1.10.2006 – 30.09.2010 (grupa badawcza prof. Barbary Malawskiej)

**asystent** - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku – 1.10.2010 – 30.09.2011 (grupa badawcza prof. Barbary Malawskiej)

**samodzielny pracownik (staż podoktorski)** - Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, 1.10.2012 – 31.03.2014 (grupa badawcza prof. Sławomira Filipka)

**adiunkt** - Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku – 1.10.2011 – obecnie (grupa badawcza prof. Barbary Malawskiej)

## 4. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego

W roku 2000 rozpocząłem studia magisterskie na kierunku farmacja na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zainteresowany przedmiotem Chemia Leków, realizowanym na III roku studiów, pogłębiałem swoją wiedzę pod opieką prof. dr hab. Barbary Malawskiej w ramach prac Koła Nowoczesnej Chemii Leków, a następnie w 2005 r. podczas wykonywania pracy magisterskiej, zatytułowanej „Oznaczanie lipofilowości pochodnych tiochinoliny o działaniu przeciwnowotworowym”. Po obronie z wyróżnieniem pracy magisterskiej odbyłem staż zawodowy, a po jego ukończeniu tj. w 2006 r. rozpocząłem studia doktoranckie pod opieką naukową prof. dr hab. Barbary

Maławskiej. Tematem mojej pracy doktorskiej było „Projektowanie nowych inhibitorów cholinoesteraz metodami modelowania molekularnego”. Zaangażowanie w prace badawcze zaowocowało uzyskaniem stypendium fundacji Sapere Auso dla najlepszych doktorantów w Małopolsce. W trakcie odbywania studiów doktoranckich zdobyłem również stypendium Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej, które umożliwiło mi wyjazd na staż naukowy do zespołu profesora Christopha Sottriffa w Instytucie Farmacji i Chemii Żywnościowej na Uniwersytecie w Wuerzburgu. W czasie tego pobytu pogłębiałem swoją wiedzę z zakresu technik modelowania molekularnego. Pracę doktorską obroniłem z wyróżnieniem w 2010 r. Na tym etapie rozwoju naukowego mój dorobek stanowiło 9 prac, w tym 6 publikacji oryginalnych, 2 prace poglądowe oraz jedna monografia, o łącznym współczynniku *impact factor* równym 16,024 i sumie punktów MNiSW 149.

1 października 2010 r. zostałem zatrudniony w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej UJCM na stanowisku asystenta, a rok później na stanowisku adiunkta. Moje prace badawcze skoncentrowały się wówczas na dwóch głównych zagadnieniach: zastosowaniu metod modelowania molekularnego w projektowaniu nowych substancji biologicznie aktywnych oraz badaniu właściwości fizykochemicznych substancji bioaktywnych, szczególnie z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej.

W latach 2012-2014 odbywałem staż podoktorski w grupie badawczej profesora Sławomira Filipka na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, w trakcie którego mogłem zapoznać się z nowymi metodami modelowania cząsteczkowego.

Wyniki wszystkich prowadzonych przeze mnie badań były prezentowane w formie posterów oraz komunikatów ustnych na licznych konferencjach międzynarodowych (m. in. w trakcie International Symposium on Medicinal Chemistry, Frontiers in Medicinal Chemistry, RICT) oraz krajowych (m. in. na Konwersatorium Chemii Medycznej, Multidyscyplinarnej Konferencji Nauki o Leku). Jestem współautorem 56 streszczeń konferencyjnych, w tym 35 ze zjazdów międzynarodowych.

Od 2004 r. uczestniczyłem w realizacji różnych projektów naukowych. W 6 projektach pełniłem rolę kierownika (1 projekt NCN, 2 dotacje celowe, 1 projekt DAAD, 2 granty studenckie), a w 6 byłem wykonawcą (2 projekty NCN, 1 projekt MNiSW, 1 projekt NCBiR, 2 projekty statutowe).

Obecnie mój dorobek obejmuje 43 prace oryginalne, 4 prace poglądowe, jedną monografię oraz jedną publikację z badań wielośrodkowych. Łączny współczynnik oddziaływania *impact factor* całego dorobku wynosi 107,15, suma punktów MNiSW 1125. Prace były cytowane 490 razy, a współczynnik Hirscha wynosi 12.

## **5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)**

### **a) tytuł osiągnięcia naukowego**

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą postępowania habilitacyjnego, stanowi cykl publikacji, złożony z 12 oryginalnych prac oraz 1 poglądowej, opublikowanych w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR). Cykl publikacji obejmuje zwarte tematycznie badania z zakresu chemii leków, zatytułowane: **„Poszukiwanie nowych związków o potencjalnym**

zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera przy pomocy metod modelowania molekularnego”. Zgodnie z analizą bibliometryczną łączna punktacja MNiSW prezentowanego cyklu wynosi 385, a sumaryczny współczynnik *impact factor* 36,181. W sześciu pracach jestem pierwszym autorem.

#### b) wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

H-1. **Bajda M.**, Guzior N., Ignasik M., Malawska B., Multi-target-directed ligands in Alzheimer’s disease treatment, *Curr. Med. Chem.* **2011**, 18(32): 4949-4975

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu przeglądu literaturowego, opisie przykładów związków wielofunkcyjnych, hamujących cholinesterazy i agregację beta-amyloidu, przygotowaniu rysunków oraz korekcie całego manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

H-2. **Bajda M.**, Więckowska A., Hebda M., Guzior N., Sottriffer C.A., Malawska B., Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14(3): 5608-5632

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu badań modelowania cząsteczkowego, zaprojektowaniu nowych inhibitorów, analizie wyników, przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

H-3. Więckowska A., Więckowski K., **Bajda M.**, Brus B., Sałat K., Czerwińska P., Gobec S., Filipek B., Malawska B., Synthesis of new N-benzylpiperidine derivatives as cholinesterase inhibitors with  $\beta$ -amyloid anti-aggregation properties and beneficial effects on memory *in vivo*, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23(10): 2445-2457

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym przygotowaniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu nowych inhibitorów, wykonaniu badań modelowania cząsteczkowego i opisie ich wyników, udziale w całościowej analizie wyników oraz korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 15%.

H-4. Ignasik M., **Bajda M.**, Guzior N., Prinz M., Holzgrabe U., Malawska B., Design, synthesis and evaluation of novel 2-(aminoalkyl)-isoindoline-1,3-dione derivatives as dual binding site acetylcholinesterase inhibitors, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2012**, 345(7): 509-516

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym opracowaniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu nowych inhibitorów, wykonaniu badań modelowania cząsteczkowego i opisie ich wyników, udziale w całościowej analizie wyników oraz korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

H-5. Guzior N., **Bajda M.**, Skrok M., Kurpiewska K., Lewiński K., Brus B., Pišlar A., Kos J., Gobec S., Malawska B., Development of multifunctional, heterodimeric isoindoline-

1,3-dione derivatives as cholinesterase and  $\beta$ -amyloid aggregation inhibitors with neuroprotective properties, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 92: 738-749

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym opracowaniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu nowych inhibitorów, wykonaniu badań modelowania cząsteczkowego i opisie ich wyników, udziale w całościowej analizie wyników oraz korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 20%.

- H-6. Guzior N., **Bajda M.**, Rakoczy J., Brus B., Gobec S., Malawska B., Isoindoline-1,3-dione derivatives targeting cholinesterases: Design, synthesis and biological evaluation of potential anti-Alzheimer's agents, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23(7): 1629-1637

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym opracowaniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu nowych inhibitorów, wykonaniu badań modelowania cząsteczkowego i opisie ich wyników, udziale w całościowej analizie wyników oraz korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

- H-7. Szałaj N., **Bajda M.**, Dudek K., Brus B., Gobec S., Malawska B., Multiple ligands targeting cholinesterases and  $\beta$ -amyloid: Synthesis, biological evaluation of heterodimeric compounds with benzylamine pharmacophore, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2015**, 348(8): 556-563

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym opracowaniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu nowych inhibitorów, wykonaniu badań modelowania cząsteczkowego i opisie ich wyników, udziale w całościowej analizie wyników oraz korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

- H-8. Hebda M., **Bajda M.**, Więckowska A., Szałaj N., Pasięka A., Panek D., Godyń J., Wichur T., Knez D., Gobec S., Malawska B., Synthesis, molecular modelling and biological evaluation of novel heterodimeric, multiple ligands targeting cholinesterases and amyloid beta, *Molecules* **2016**, 21(4): 410

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym opracowaniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu nowych inhibitorów, wykonaniu badań modelowania cząsteczkowego i opisie ich wyników, udziale w całościowej analizie wyników oraz korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

- H-9. **Bajda M.**, Jończyk J., Malawska B., Czarnecka K., Girek M., Olszewska P., Sikora J., Mikiciuk-Olasik E., Skibiński R., Gumieniczek A., Szymański P., Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of new tetrahydroacridine derivatives as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23(17): 5610-5618

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badań modelowania cząsteczkowego i opisie ich wyników, udziale w całościowej analizie wyników oraz przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

- H-10. **Bajda M.**, Jończyk J., Malawska B., Filipek S., Application of computational methods for the design of BACE-1 inhibitors: validation of *in silico* modelling, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15(3): 5128-5139

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań modelowania cząsteczkowego i wykonaniu ich części, analizie wyników, przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- H-11. Panek D., Więckowska A., Wichur T., **Bajda M.**, Godyń J., Jończyk J., Mika K., Janockova J., Soukup O., Knez D., Korabecny J., Gobec S., Malawska B., Design, synthesis and biological evaluation of new phthalimide and saccharin derivatives with alicyclic amines targeting cholinesterases, beta-secretase and amyloid beta aggregation, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 125: 676-695

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym opracowaniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu nowych inhibitorów, wykonaniu większości badań modelowania cząsteczkowego i opisie ich wyników, udziale w całościowej analizie wyników oraz korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

- H-12. **Bajda M.**, Filipek S., Study of early stages of amyloid A $\beta$ <sub>13-23</sub> formation using molecular dynamics simulation in implicit environments, *Comp. Biol. Chem.* **2015**, 56: 13-18

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu badań modelowania cząsteczkowego, analizie wyników, przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

- H-13. **Bajda M.**, Filipek S., Computational approach for the assessment of inhibitory potency against beta-amyloid aggregation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27: 212-216

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu badań modelowania cząsteczkowego, analizie wyników, przygotowaniu i korekcie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

Badania opisane w pracach H-1 – H-13 zostały wykonane w następujących ośrodkach:

1. Przygotowanie pracy pogładowej wykonano w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku na Wydziale Farmaceutycznym UJCM (H-1).
2. Badania modelowania cząsteczkowego, obejmujące m. in. projektowanie nowych pochodnych, analizę oddziaływań ligand – cel biologiczny oraz symulacje agregacji beta-amyloidu wykonano w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku na Wydziale Farmaceutycznym UJCM (H-2 - H-13), na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (H-10, H-12, H-13) oraz w Instytucie Farmacji i Chemii Żywnościowej Uniwersytetu w Wuerzburgu (H-2, H-4).
3. Syntezę nowych związków przeprowadzono w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku na Wydziale Farmaceutycznym UJCM (H-2 - H-8, H-11) oraz w Zakładzie

- Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (H-9).
4. Badania krystalograficzne przeprowadzono w Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego (H-5).
  5. Badania *in vitro* aktywności związków względem cholinoesteraz i beta-sekretazy oraz kinetyki enzymatycznej przeprowadzono w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku na Wydziale Farmaceutycznym UJCM (H-2 - H-8, H-11) oraz w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (H-9).
  6. Badania *in vitro* agregacji beta-amyloidu przeprowadzono w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej na Wydziale Farmacji Uniwersytetu w Ljublanie (H-3, H-5 - H-8, H-11), w Instytucie Farmacji i Chemii Żywnościowej Uniwersytetu w Wuerzburgu (H-4) oraz w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (H-9).
  7. Test przenikalności przez barierę krew-mózg metodą PAMPA wykonano w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku na Wydziale Farmaceutycznym UJCM (H-3, H-6, H-7) oraz w Centrum Badań Biomedycznych Szpitala Uniwersyteckiego w Hradec Kralove (H-11).
  8. Badania działania neuroprotektynowego wykonano w Zakładzie Biologii Farmaceutycznej na Wydziale Farmacji Uniwersytetu w Ljublanie (H-5).
  9. Badania cytotoksyczności wykonano w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (H-9).
  10. Badania *in vivo* w kierunku działania prokognitywnego oraz działań niepożądanych przeprowadzono w Katedrze Farmakodynamiki na Wydziale Farmaceutycznym UJCM (H-3).

### **c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **Wprowadzenie**

Ponad 100 lat temu Alois Alzheimer opisał pierwszy przypadek nowej choroby mózgu, która obecnie nosi nazwę pochodzącą od jego nazwiska [1]. Objawia się ona zaburzeniami kognitywnymi, postępującą utratą pamięci, dezorientacją, zaburzeniami mowy, zmianami w zachowaniu, prowadząc w końcowym etapie do całkowitej demencji i śmierci pacjenta [2]. Analizy post-mortem wykazały obecność w mózgu chorych dwóch zmian: występującego zewnątrzkomórkowo beta-amyloidu, który odkłada się w formie blaszek starczych oraz wewnątrzkomórkowych splątków neurofibrylarnych, złożonych z hiperfosforylowanego białka tau [3]. Obie te zmiany prowadzą do degeneracji neuronów i rozwoju choroby.

Choroba Alzheimera (*Alzheimer's disease*, AD) najczęściej dosięga osób starszych. Szacuje się, że na całym świecie obecnie choruje 46,8 miliona osób i liczba ta ulegnie podwojeniu w ciągu kolejnych 20 lat [4]. Choroba jest zwykle późno wykrywana, a często zdarza się, iż pacjenci umierają zanim zostaną zdiagnozowani [5]. Te niepokojące dane



pociągają za sobą konieczność prowadzenia badań naukowych ukierunkowanych na poprawę diagnostyki i wprowadzenie skutecznego leczenia.

Złożony patomechanizm choroby obejmuje szereg procesów prowadzących do neurodegeneracji [6]. Najważniejszą rolę odgrywa akumulacja nieprawidłowo sfałdowanych białek i peptydów, których obecność wywołuje stres oksydacyjny i powoduje rozwój stanu zapalnego, przez co zaburza prawidłowe funkcjonowanie neuronów [7, 8]. Występujące w pobliżu komórek nerwowych blaszki starcze składają się ze złogów beta-amyloidu, który powstaje z białka prekursorowego APP [9]. Białko APP posiada długą domenę N-końcową, pojedynczą domenę transbłonową oraz krótki C-końcowy fragment cytoplazmatyczny [10]. Występuje ono w trzech izoformach, różniących się długością [11]. Białko APP może być przetwarzane dwoma alternatywnymi drogami. Pierwsza z nich, zwana nieamyloidogenną wiąże się z działaniem dwóch enzymów:  $\alpha$ - i  $\gamma$ -sekreazy [12].  $\alpha$ -Sekretaza tnie białko prekursorowe pomiędzy Lys16 a Leu17, w wyniku czego powstaje sAPP $\alpha$ , któremu przypisuje się działanie neuroprotektoryjne oraz fragment C83 [13]. Rolę  $\alpha$ -sekreazy przypisuje się kilku enzymom z rodziny ADAM (a disintegrin and metalloprotease) - głównie ADAM10, ADAM17 (TACE) i ADAM9 [14]. Enzymy te pełnią również inne funkcje takie, jak wpływ na procesy hematopoetyczne czy powstawanie czynnika TNF $\alpha$ . W dalszym etapie na fragment C83 działa  $\gamma$ -sekreaza, w efekcie czego powstaje peptyd p3, który nie posiada zdolności formowania złogów amyloidu [12]. Patologiczny beta-amyloid powstaje w tzw. ścieżce amyloidogennej tj. w wyniku sekwencyjnego działania beta-sekreazy (BACE1) oraz gamma-sekreazy [15]. Beta-sekreaza jest proteazą aspartylową, która posiada zdolność cięcia APP w dwóch miejscach: Met-1 - Asp1 i Tyr10 - Glu11 [16]. Cięcie w pierwszym miejscu jest zdecydowanie częstsze i prowadzi do dwóch fragmentów: sAPP $\beta$  oraz C99, z których ten drugi jest substratem dla gamma-sekreazy.  $\gamma$ -Sekretaza jest proteazą błonową, złożoną z czterech podjednostek: PS (preseniliny), APH-1 (anterior pharynx - defective protein 1), NCT (nikastryny) i PEN-2 (presenilin enhancer 2), występujących w stosunku 1:1:1:1 [17, 18]. Zaproponowany w literaturze model sugeruje, że presenilina w nieaktywnym kompleksie jest stabilizowana przez związanie z APH-1 i NCT [19]. Dopiero po związaniu PEN-2 z kompleksem, następuje endoproteoliza preseniliny do fragmentu N- i C-końcowego (NTF, CTF), dzięki czemu  $\gamma$ -sekreaza zyskuje aktywność proteolityczną. Presenilina może występować w dwóch odmianach (PS-1 i PS-2)[20]. Obie posiadają 67% identycznych aminokwasów, ale  $\gamma$ -sekreaza zawierająca PS-1 wykazuje znacznie wyższą aktywność. Preseniliny posiadają dwie reszty kwasu asparaginowego, zlokalizowane w obrębie błony komórkowej, które tworzą „rdzeń” katalityczny dla wewnątrzbłonowej proteolizy substratu [21]. Przemiany C99 prowadzą do uwalniania peptydów o zmiennej długości, przeciętnie liczących od 37 do 43 aminokwasów [22]. Spośród nich 40- i 42-aminokwasowe fragmenty, zwłaszcza ten dłuższy, posiadają największą zdolność agregacji i charakteryzują się najwyższą toksycznością [23]. Dane literaturowe pokazują, iż proces tworzenia złogów (fibryli) przebiega poprzez stadium oligomerów, charakteryzujących się zdecydowanie wyższą toksycznością od form monomerycznych jak i ukształtowanych fibryli, i w największym stopniu przyczyniających się do degeneracji synaps i powstawania objawów chorobowych [24-26]. Zaburzenia równowagi pomiędzy powstawaniem a usuwaniem agregatów beta-amyloidu mogą być czynnikiem inicjującym rozwój AD [27]. Hipoteza, mówiąca o kluczowej roli beta-amyloidu w patogenezie

choroby Alzheimera została zaproponowana przez Hardy'ego w 1991 roku [28, 29]. Obecnie pojawiają się również doniesienia literaturowe sugerujące, iż beta-amyloid jest efektem, a nie przyczyną choroby oraz iż pojawia się on także u zdrowych osób. Wpływ A $\beta$  na neurodegenerację nie jest zatem w pełni wyjaśniony [30, 31], ale nadal trwają liczne prace badawcze skupiające się nad poszukiwaniem związków wpływających na procesy agregacji [32, 33].

Drugą oznaką choroby Alzheimera jest obecność splątków neurofibrylarnych, zawierających hiperfosforylowaną formę białka tau [34]. Białko tau występuje głównie w aksonach komórek nerwowych i należy do rodziny białek związanych z mikrotubulami [35]. Obecne jest w cytoplazmie w postaci kilku form różniących się długością [36]. Jego rola polega na stabilizacji mikrotubul, zapewnieniu prawidłowego funkcjonowania cytoszkieletu, regulacji transportu aksonalnego czy regulacji podziałów komórkowych [37]. Zbudowane jest z czterech domen: domeny N-końcowej, domeny bogatej w prolinę, domeny wiążącej mikrotubule i domeny C-końcowej [38]. Rejon zawierający liczne reszty proliny jest rozpoznawany przez kinazy (MAPK, CDK5, GSK3 $\beta$ ), co prowadzi do fosforylacji reszt seryny i treoniny w motywach sekwencyjnych PS i PT [39-41]. Nadmierna fosforylacja, obecna w stanach patologicznych, zmniejsza powinowactwo białka tau do mikrotubul, prowadząc do powstania helikalnie zwiniętych sparowanych włókienek [42, 43]. Dalsza agregacja powoduje powstawanie splątków neurofibrylarnych, co w efekcie zaburza transport aksonalny i prowadzi do śmierci neuronu [44, 45]. Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują na prawdopodobne istnienie związku pomiędzy powstawaniem blaszek starczych a powstawaniem splątków neurofibrylarnych [46]. Zależność ta nie jest jednak w pełni poznana, nie jest również pewne, która ze zmian powstaje wcześniej.

Poza zmianami, obejmującymi agregację białek i peptydów, w przebiegu AD pojawiają się także zmiany w neuroprzeźnaczności [47]. W 1976 r. Davies i Maloney zaproponowali hipotezę cholinergiczną choroby Alzheimera [48]. Mówi ona o tym, że za zaburzenia pamięci i procesu myślenia odpowiada degeneracja neuronów cholinergicznym w obrębie hipokampa oraz kory mózgowej. Zanik neuronów cholinergicznym prowadzi do obniżenia poziomu acetylocholiny (ACh) – bardzo istotnego neuroprzeźcznika oraz acetylotransferazy cholinowej – enzymu, odpowiedzialnego za jego syntezę. Towarzyszy temu także zmniejszenie ilości receptorów, na które oddziałuje acetylocholina tj. receptorów muskarynowych, szczególnie M<sub>1</sub> oraz neuronalnych receptorów nikotynowych N<sub>n</sub> [49, 50]. Jednocześnie poziom acetylocholiny jest regulowany poprzez dwa enzymy: acetylocholinoesterazę (AChE) oraz butyrylocholinoesterazę (BuChE)[51-53]. Oba te enzymy należą do rodziny proteaz serynowych i charakteryzują się wysoką homologią sekwencji. Niemniej jednak acetylocholinoesteraza występuje głównie na neuronach i pełni wiodącą rolę w hydrolizie acetylocholiny, podczas gdy butyrylocholinoesteraza w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) znajduje się przede wszystkim na komórkach glejowych, a jej rola jest drugorzędna. BuChE posiada także zdolność hydrolizy innych estrów, poprzez co pełni rolę detoksykacyjną [54, 55]. Badania nad chorobą Alzheimera pokazały, że w późniejszych etapach choroby ilość AChE znacząco zmniejsza się, a jej rolę przejmuje butyrylocholinoesteraza [56].

Spośród innych hipotez choroby Alzheimera należy wyszczególnić hipotezę stresu oksydacyjnego [57] oraz hipotezę wapniową [58]. Pierwsza z nich mówi o nadmiernym generowaniu wolnych rodników w mitochondriach, które prowadzi do niszczenia komórek. Do oksydacyjnych uszkodzeń mogą przyczyniać się jony metali takich jak cynk, miedź, żelazo czy glin, które uczestnicząc m.in. w reakcji Fentona generują wolne rodniki [59]. Hipoteza wapniowa nawiązuje z kolei do nadmiernej kumulacji jonów wapnia, które uczestniczą w apoptozie komórek.

Pomimo, iż pierwszy przypadek AD został opisany ponad 100 lat temu pacjenci z tą chorobą nie doczekali się skutecznego leczenia [60]. Do dnia dzisiejszego nie ma leków, które prowadziłyby do całkowitego wyleczenia lub zatrzymania rozwoju choroby. Dostępne metody terapii obejmują przede wszystkim działanie objawowe, łagodząc symptomy oraz nieznacznie spowalniając postęp choroby. Najpopularniejsze jest stosowanie inhibitorów cholinesteraz takich jak donepezyl, galantamina czy riwastygmina, które hamując rozkład acetylocholiny poprawiają funkcje kognitywne [61-64]. Jedynym stosowanym dotąd lekiem modyfikującym przebieg choroby Alzheimera jest memantyna, która jako antagonist receptorów NMDA zmniejsza ekscytotoxicność wywołaną przez stres oksydacyjny i nadmierne nagromadzenie się jonów wapnia [65]. Wielorakość czynników prowadzących do rozwoju AD oraz brak metod skutecznego leczenia jest przyczyną podejmowania licznych badań nad nowymi lekami w terapii tego schorzenia [66-69].

### **Poszukiwanie nowych związków biologicznie aktywnych w terapii AD**

Badania nad nowymi lekami o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera obejmują różne cele biologiczne [66]. Grill i Cummings zaproponowali podział tych celów na dwie główne grupy [70]. Pierwsza z nich obejmuje cele, które są podstawą leczenia objawowego, natomiast druga skupia się na celach, istotnych dla leczenia modyfikującego przebieg choroby. W odniesieniu do AD leczenie objawowe bazuje na ingerencji w neurotransmisję cholinergiczną [71] oraz powiązane z uwalnianiem acetylocholiny przekazywanie histaminergiczne [72] i serotoninergetyczne [73]. Spośród celów, które mogą modyfikować przebieg choroby Alzheimera wymienia się beta-amyloid [29], białko tau [74] oraz działanie neuroprotektoryjne [75]. Istotne dla drugiej grupy celów są również liczne enzymy, zaangażowane w przemiany wspomnianych białek i peptydów. W przypadku beta-amyloidu bierze się pod uwagę alfa-, beta- i gamma-sekretazę [76], natomiast dla białka tau ważne są kinazy np. GSK-3 $\beta$ , MAPK czy CDK5 [77].

W kontekście usprawniania neurotransmisji prowadzone badania dotyczą inhibitorów cholinesteraz [78], agonistów receptorów muskarynowych M<sub>1</sub> [79] i nikotynowych N<sub>n</sub> [80] oraz antagonistów lub odwrotnych agonistów receptorów histaminowych H<sub>3</sub> [81] i serotoninergetycznych 5-HT<sub>6</sub> [82]. Z kolei poszukiwanie terapii modyfikujących przebieg choroby opiera się na inhibitorach beta-sekretazy [83], modulatorach gamma-sekretazy [84], aktywatorach alfa-sekretazy [85], inhibitorach agregacji beta-amyloidu i białka tau [86], inhibitorach kinaz [87] oraz czynnikach neuroprotektoryjnych, antyoksydacyjnych i chelatujących jony metali [88]. Ostatnie lata intensywnych prac wielu ośrodków naukowych

doprowadziły do wprowadzenia do badań klinicznych kilkunastu substancji o znaczącym potencjale leczniczym [89].

Istotnym związkiem jest NIC5-15, który w zwykłych dawkach (0,8 – 2,0 g/dzień) działa uwrażliwiająco na insulinę, a w wyższych dawkach zmniejsza akumulację beta-amyloidu poprzez modulowanie aktywności gamma-sekretazy [90]. Związek ten hamuje przemianę APP bez wpływu na NOTCH, dzięki czemu można uniknąć wielu działań niepożądanych. Zakończona druga faza badań klinicznych dla NIC5-15 wykazała jego dobrą tolerancję i bezpieczeństwo. Pośród modulatorów gamma-sekretazy ważne miejsce zajmuje również CHF-5074 – analog R-flurbiprofenu, który w I fazie badań wykazał odpowiedni profil bezpieczeństwa i trafił do II fazy badań klinicznych [90].

Do inhibitorów beta-sekretazy o obiecujących właściwościach należy MK-8931 oraz AZD 3293 [90]. Pierwszy związek przeszedł pozytywnie badania bezpieczeństwa oraz wykazał dawkozależne obniżenie poziomu beta-amyloidu w płynie mózgowo-rdzeniowym. Obecnie trwają przygotowania do badań fazy II/III. Podobnie do związku MK-8931 wypadł opracowany przez firmę Astra-Zeneca inhibitor AZD 3293, który obecnie znajduje się w fazie II/III.

W odniesieniu do białka tau warto wspomnieć o LMTX i tideglusibie [91, 92]. LMTX jest pochodną błękitu metylenowego, która obecnie znajduje się w III fazie badań klinicznych. Posiada on ulepszoną biodostępność oraz jest lepiej tolerowany w porównaniu do związku macierzystego. Związek ten zapobiega agregacji białka tau, ułatwia jego usuwanie, posiada również aktywność przeciwko beta-amyloidowi. LMTX działa jako inhibitor hiperfosforylacji białka tau. Tideglusib jest z kolei nieodwracalnym inhibitorem kinazy GSK-3 $\beta$ . W badaniach preklinicznych zapobiegał utracie komórek nerwowych i redukował deficyty pamięci przestrzennej. We wstępnych badaniach klinicznych nieznacznie poprawiał funkcje kognitywne, jednak został odrzucony w fazie IIb ze względu na trudności w potwierdzeniu wcześniejszych rezultatów.

W innych badaniach sprawdzano możliwości stosowania ligandów receptorów serotoninowych 5-HT<sub>6</sub> i histaminowych H<sub>3</sub> [93, 94]. Idalopirdyna, będąca selektywnym antagonistą receptorów 5-HT<sub>6</sub>, wykazała dobry profil bezpieczeństwa w fazie I. Badania przedkliniczne udowodniły zwiększoną skuteczność kombinacji antagonistów 5-HT<sub>6</sub> i inhibitorów cholinesteraz, dlatego II fazę badań klinicznych prowadzono na pacjentach zażywających donepezil. Wyniki tych badań wskazywały na poprawę funkcji kognitywnych i stały się powodem do rozpoczęcia fazy III. Z kolei antagoniści receptorów H<sub>3</sub> np. ABT-288 również byli dobrze tolerowani. Jednakże w fazie II badań dla ABT-288 nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w zakresie funkcji poznawczych.

Nasilenie działania układu cholinergicznego umożliwia enceniklina [95]. Jest ona częściowym agonistą  $\alpha$ -7 receptorów nikotynowych ( $\alpha$ -7 nAChR). Działa jako selektywny koagonista wraz z acetylocholiną, mogąc poprawiać funkcje kognitywne bez ryzyka nadmiernej stymulacji receptorów nikotynowych z innymi podjednostkami i receptorów muskarynowych. Wyniki badań fazy II potwierdziły jej bezpieczeństwo i skuteczność, w konsekwencji czego rozpoczęto fazę III badań klinicznych [90].

W ciągu ostatnich lat dużego znaczenia nabrało poszukiwanie ligandów wielofunkcyjnych (multitarget directed ligands)(H-1). Zaproponowane w 2005 roku przez Morphy'ego i Rankovic'a podejście do poszukiwania leków w terapii chorób o złożonej etiologii mówi o stosowaniu substancji, które mogą oddziaływać z więcej niż tylko jednym celem biologicznym [96]. Kombinacja kilku aktywności w jednej cząsteczce pozwala na efektywniejszą farmakoterapię – zwiększa jej skuteczność, ogranicza działania niepożądane oraz upraszcza schemat leczenia. Istnieje kilka dróg prowadzących do uzyskania ligandów wielocelowych. Wśród najważniejszych wymienia się łączenie struktur dwóch aktywnych ligandów za pomocą linkera, bezpośrednie łączenie aktywnych cząsteczek lub częściowe nałożenie farmakoforów. W odniesieniu do choroby Alzheimera stosowanie ligandów wielocelowych nabiera szczególnego znaczenia, gdyż umożliwia połączenie leczenia objawowego i modyfikującego przebieg choroby. Najczęściej spotyka się łączenie działania hamującego cholinesterazy z hamowaniem agregacji beta-amyloidu, z działaniem antyoksydacyjnym i neuroprotektynym lub z chelatowaniem jonów metali. Rzadziej pojawia się łączenie dwóch celów o znaczeniu w leczeniu objawowym np. hamowanie cholinesteraz i antagonizm względem receptorów 5-HT<sub>6</sub> lub H<sub>3</sub>. Zagadnienia te zostały opisane w pracy przeglądowej H-1.

### **Komputerowo wspomagane projektowanie nowych leków**

Poszukiwanie nowych leków jest procesem kosztownym i bardzo czasochłonnym [97, 98]. Jego celem jest wyłonienie substancji o pożądanej aktywności i optymalnych parametrach farmakokinetycznych. W przeszłości olbrzymią rolę w otrzymywaniu nowych leków odgrywało losowe testowanie różnych substancji w kierunku działania na określone cele biologiczne [99, 100]. Takie podejście, zwane skryningiem biologicznym, wymagało najpierw otrzymania danej substancji metodą syntezy lub jej izolacji z surowców pochodzenia naturalnego, a następnie przebadania w różnych modelach biologicznych. Często najważniejszych odkryć dokonywano przypadkiem. Jako przykład może doskonale posłużyć odkrycie penicyliny i jej działania przeciwbakteryjnego [101, 102]. Znajomość pierwszych substancji o pożądanej aktywności prowadziła do eksploracji przestrzeni chemicznej wokół danej cząsteczki [103]. W ten sposób otrzymywano różne pochodne danego związku, po czym testowano je, aby sprawdzić jak dane modyfikacje wpływają na aktywność biologiczną. W obecnych czasach duży nacisk kładzie się na racjonalne projektowanie leków [104]. Takie podejście ma zapewnić większą efektywność działań oraz niższe koszty. Bardzo pomocne w osiągnięciu tego celu jest wspomagane komputerowo projektowanie leków (computer-aided drug design)[105]. Dzięki dostępności wydajnych stacji roboczych oraz licznych programów komputerowych możliwe jest zaprojektowanie i optymalizacja struktur cząsteczek o pożądanej bioaktywności. Wśród stosowanych w tym celu technik występują ilościowe analizy zależności struktura – aktywność (*quantitative structure-activity relationship*, QSAR), modelowanie farmakoforów, dokowanie cząsteczek do miejsca wiązania czy symulacje dynamiki molekularnej [106, 107].

Analizy QSAR pozwalają na ilościowe ujęcie zależności pomiędzy strukturą substancji a ich działaniem biologicznym [108]. Takie zależności są opracowywane, a następnie walidowane na dużych zbiorach związków, dzięki czemu można dokładnie zidentyfikować

elementy strukturalne cząsteczek lub ich właściwości o szczególnym znaczeniu dla aktywności biologicznej oraz określić ich liczbowy wkład. Uzyskana wiedza jest z kolei wykorzystywana w projektowaniu nowych pochodnych o większej sile działania.

Modelowanie farmakoforów wykorzystywane jest w sytuacji, kiedy dostępna jest grupa ligandów o określonym działaniu, a struktura samego celu biologicznego wciąż pozostaje nieznana [109]. Na podstawie tych ligandów budowany jest model farmakoforowy tj. zespół cech przestrzennych i elektronowych, który charakteryzuje związki aktywne. Tak sporządzony model można wykorzystać w wirtualnym skryningu olbrzymich baz związków w celu wyłonienia tych o potencjalnej aktywności [107].

Dokowanie ligandów do miejsca wiązania pozwala na określenie sposobu wiązania z danym celem biologicznym [110]. Szczegółowa identyfikacja oddziaływań ligand – cel biologiczny pozwala na podanie przyczyny działania, wyjaśnienie różnic w aktywności różnych pochodnych, a finalnie na taką optymalizację struktury liganda, aby jego wiązanie było jak najkorzystniejsze. Dodatkowo odpowiednio dobrana funkcja oceniająca gwarantuje prawidłową ocenę potencjalnej aktywności, przez co ułatwia wybór struktur nowych związków do syntezy.

Ciekawym rozwiązaniem jest zastosowanie dynamiki molekularnej (MD)[111, 112]. Symulacje MD pozwalają na prześledzenie przebiegu różnych zjawisk, w tym procesu wiązania liganda, procesu aktywacji różnych białek czy procesu agregacji białek i peptydów. Dokowanie uzupełnione symulacjami dynamiki molekularnej umożliwia ocenę wpływu nowych związków na wybrane cele biologiczne na różnych etapach. Dzięki takiemu rozwiązaniu można zaprojektować nowe pochodne, które będą prowadzić do określonych zmian konformacyjnych danego celu biologicznego z jednoczesną możliwością śledzenia stanów przejściowych oraz szybkości zachodzenia tych zmian.

W przypadku nieznanego struktury badanego celu biologicznego przydatne staje się modelowanie homologiczne [113] oraz modelowanie *ab initio* [114]. Obie metody pozwalają na zbudowanie modelu wybranego białka i lepsze poznanie jego budowy. Modelowanie homologiczne wymaga dostępności struktury innego białka, które jest spokrewnione z modelowanym obiektem. Stanowi ono wówczas matrycę, na bazie której powstaje nowy model. W przypadku modelowania *ab initio* nie jest konieczna obecność białek homologicznych. Model nowego białka powstaje poprzez bezpośrednie fałdowanie łańcucha polipeptydowego. Na zbudowanych obiema metodami modelach można prowadzić analizy wiązania ligandów poprzez dokowanie lub symulacje dynamiki molekularnej.

Ważnym uzupełnieniem wspomnianych wcześniej metod są przewidywania właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych [115]. Dzięki zastosowaniu różnych algorytmów, różnych sposobów podziału cząsteczek na fragmenty strukturalne, różnych analiz podobieństwa do znanych substancji leczniczych możliwe staje się przybliżone określenie właściwości nowych substancji. Ma to szczególne znaczenie, ponieważ już na etapie projektowania nowych pochodnych oprócz aktywności bierze się pod uwagę właściwości farmakokinetyczne, takie jak odpowiednie wchłanianie, dystrybucja, metabolizm czy wydalanie.

Projektowanie wspomagane komputerowo stało się istotnym elementem w pracach nad każdym nowym lekiem. To dzięki niemu wprowadzono na rynek m. in. dorzolamid – inhibitor anhidrazy węglanowej, kaptopril – inhibitor konwertazy angiotensynowej, sakwinawir – inhibitor proteazy HIV oraz tirofiban – antagonistę receptorów glikoproteinowych GP IIb/IIIa [116, 117]. Liczne przykłady skutecznego stosowania modelowania cząsteczkowego zachęcają do coraz szerszego wdrażania tych technik w badaniach nad nowymi lekami.

### **Cel prowadzonych badań**

Pojawienie się koncepcji ligandów wielocelowych i możliwość jej zastosowania w odniesieniu do terapii choroby Alzheimera stała się przyczyną rozpoczęcia szerokich badań skupionych na poszukiwaniu nowych związków bioaktywnych, wpływających na procesy powstawania złogów beta-amyloidu i przekąźnictwo cholinergiczne. Prezentowane badania zostały ukierunkowane na związki, które oprócz hamowania acetylo- i butyrylocholinoesterazy mogą hamować samoistną agregację A $\beta$  i/lub hamować  $\beta$ -sekretazę. Celem głównych prac w ramach przedstawionego wniosku habilitacyjnego było wdrożenie technik modelowania molekularnego do projektowania nowych ligandów. Pierwszy etap badań obejmował opracowanie sposobów projektowania i oceny związków jako potencjalnych inhibitorów AChE, BuChE, BACE1 i agregacji beta-amyloidu, a drugi etap zastosowanie ich do projektowania nowych pochodnych.

Prace związane z poszukiwaniem inhibitorów cholinoesteraz zostały zapoczątkowane w ramach pracy doktorskiej, a następnie znacząco rozwinięte w ramach działań po doktoracie. Poszukiwanie inhibitorów agregacji beta-amyloidu i inhibitorów beta-sekretazy było całkowicie nowym tematem podjętym już po obronie doktoratu. Badania nad projektowaniem nowych ligandów skłoniły mnie również do bliższego przyjrzenia się samemu procesowi agregacji beta-amyloidu.

Przedstawione we wniosku habilitacyjnym prace obejmują:

1. przegląd literaturowy w zakresie poszukiwań związków wielocelowych jako potencjalnych leków w terapii choroby Alzheimera – H-1,
2. opracowanie metody projektowania i oceny inhibitorów cholinoesteraz – H-2,
3. opracowanie metody projektowania i oceny inhibitorów beta-sekretazy – H-10,
4. badanie procesu agregacji amyloidu na przykładzie A $\beta_{13-23}$  – H-12,
5. opracowanie metody projektowania i oceny inhibitorów agregacji beta-amyloidu – H-13,
6. projektowanie nowych ligandów wielofunkcyjnych – H-3 – H-9 i H-11.

### **Wyniki prowadzonych badań w ramach postępowania habilitacyjnego**

Wprowadzeniem do prac eksperymentalnych było przygotowanie pracy przeglądowej H-1, która przedstawia trendy w poszukiwaniu nowych ligandów wielocelowych o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera. W ciągu ostatnich lat otrzymano interesujące związki multifunkcyjne, które wpływają zarówno na objawy jak i przyczyny choroby. Wśród opisanych przykładów dominują pochodne takryny, donepezilu, ksantostygminy, benzofuranu i struktury policykliczne, charakteryzujące się wpływem na

cholinoesterazy oraz działaniem hamującym agregację beta-amyloidu. Pojawiają się także nieliczne związki, łączące w sobie aktywność inhibicyjną względem cholinoesteraz oraz beta-sekretazy. Często jednak okazuje się, że połączenie różnych kierunków aktywności w jednej cząsteczce jest skomplikowane ze względu na konieczność odpowiedniego zbilansowania siły działania na wybrane cele biologiczne. Chęć otrzymania nowych ligandów wielofunkcyjnych łączących aktywność antycholinoesterazową z hamowaniem agregacji i/lub powstawania beta-amyloidu stała się przyczyną podjęcia badań w tym temacie. Głównym zagadnieniem w prowadzonych pracach było wdrożenie technik modelowania do projektowania nowych pochodnych.

Prace H-2, H-10 i H-13 zawierają opis opracowanych metod projektowania i oceny ligandów cholinoesteraz, beta-sekretazy i beta-amyloidu. Metody te oparte były na znajomości struktur przestrzennych wspomnianych celów biologicznych (structure-based approach), a każda z nich została zwalidowana na grupie ligandów referencyjnych.

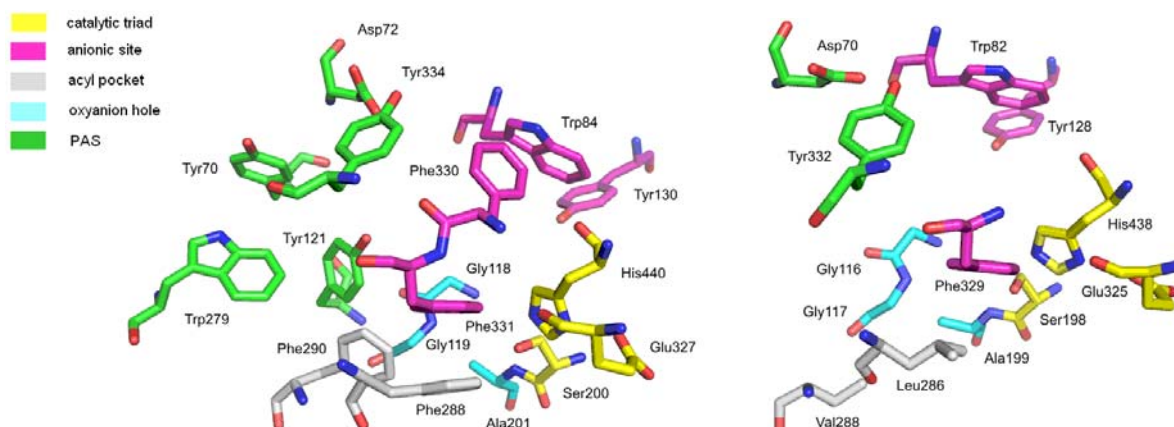
Acetylo- i butyrylocholinoesteraza należą do hydrolaz serynowych o fałdowaniu  $\alpha/\beta$  [118]. Pierwsza struktura krystaliczna AChE została opisana w 1991 r. przez J. Sussmana [119]. Acetylocholinoesteraza zawiera 12 beta-kartek, otoczonych przez 14 alfa-helis. Hydroliza substratu przebiega w głębokim, wąskim gardle enzymu o wymiarach 20 Å x 5 Å, które składa się z dwóch zasadniczych części: miejsca katalitycznego i peryferyjnego (Rys.1). Miejsce katalityczne zbudowane jest z 4 części: triady katalitycznej (Ser200, His440, Glu327)<sup>1</sup>, miejsca anionowego (Trp84, Tyr130, Phe330, Phe331), kieszeni acylowej (Phe288, Phe290) i dziury oksyanionowej (Gly118, Gly119, Ala201)[120]. Triada katalityczna odpowiada bezpośrednio za transfer grupy acylowej na serynę, miejsce anionowe wiąże protonowaną grupę aminową substratu, kieszeń acylowa determinuje wielkość podstawnika w grupie acylowej, a dziura oksyanionowa stabilizuje strukturę stanu przejściowego w hydrolizie substratu. Peryferyjne miejsce anionowe (Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279, Tyr334) jest zlokalizowane przy wejściu do gardła enzymu i odpowiada za pierwotne wiązanie substratu oraz pełni funkcje dodatkowe np. uczestniczy w interakcji z beta-amyloidem [121]. Gardło enzymatyczne butyrylocholinoesterazy składa się z tych samych części: triady katalitycznej (Ser198, His438, Glu325)<sup>2</sup>, miejsca anionowego (Trp82, Tyr128, Ala328, Phe329), kieszeni acylowej (Leu286, Val288), dziury oksyanionowej (Gly116, Gly117, Ala199) oraz miejsca peryferyjnego (Asp70, Tyr332)[122]. Jest jednak zdecydowanie szersze, przez co enzym ten może hydrolizować substraty o większej cząsteczce niż acetylcholina.

---

<sup>1</sup> numeracja reszt aminokwasowych w AChE, pochodzącej z drętwy kalifornijskiej

<sup>2</sup> numeracja reszt aminokwasowych w ludzkiej BuChE





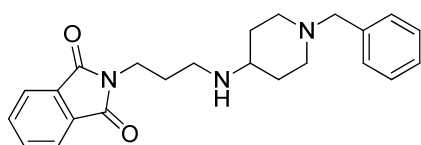
Rys.1. Gardła enzymatyczne cholinoesteraz: miejsce katalityczne wraz z podziałem na części oraz miejsce peryferyjne. Acetylocholinoesterazę przedstawiono na lewym panelu, butyrylocholinoesterazę na prawym.

Badania w tematyce cholinoesteraz (praca H-2) rozpoczęto od porównania dostępnych struktur krystalicznych, biorąc pod uwagę zmienność konformacyjną reszt aminokwasowych w obrębie gardła enzymu oraz obecność cząsteczek wody. Wykonane analizy potwierdziły opisaną w literaturze dużą giętkość dwóch aminokwasów w strukturze AChE tj. Phe330 z miejsca anionowego oraz Trp279 znajdującego się miejscu peryferyjnym. Stwierdzono także obecność cząsteczek wody w obrębie gardła enzymu, które pośredniczyły w wiązaniu ligandów referencyjnych. W przypadku BuChE struktura miejsca aktywnego pozostawała sztywna. Nie mniej jednak również zaobserwowano istotne dla wiązania ligandów cząsteczki wody. Dokowanie ligandów do obu enzymów prowadzono za pomocą programu GOLD, który oferuje uwzględnianie cząsteczek wody w procesie dokowania. Walidacja dokowania została oparta na procesach redokowania (redocking) i dokowania krzyżowego (cross-docking). Wybrano siedem struktur krystalicznych AChE, różniących się ligandami, z którymi zostały wykrystalizowane. W etapie redokowania ustalono parametry, które zapewniały uzyskanie póż liganda o jak najniższej wartości RMSD (root mean square deviation; wartości do 1 Å – dobra poza, do 2 Å – bliska poza). W ten sposób udało się zdefiniować wielkość miejsca wiązania, cząsteczki wody, których obecność była niezbędna dla prawidłowego odtworzenia sposobu wiązania ligandów referencyjnych i wybrać funkcję oceniającą, która pozwalała na prawidłową ocenę póż ligandów. W etapie dokowania krzyżowego zadokowano wszystkie ligandy referencyjne do wszystkich struktur acetylocholinoesterazy. W ten sposób ustalono, które struktury enzymu pozwalały na dobre zadokowanie jak największej ilości inhibitorów. Okazało się, że wystarczą tylko trzy struktury AChE, które umożliwiały łącznie na poprawne zadokowanie wszystkich siedmiu związków referencyjnych. Należały do nich kompleksy z donepezilem (1EVE)<sup>3</sup>, takryną (1ACJ) i bis-(7)-takryną (2CKM), które odpowiadały trzem najczęściej występującym kombinacjom skrajnych ułożeń najbardziej zmiennych konformacyjnie reszt Phe330 i Trp279. Wartości funkcji oceniającej dla związków referencyjnych pozwoliły na ustanowienie punktu na skali ocen, który odpowiadał związkom o podobnej aktywności. W związku z tym, iż struktura acetylocholinoesterazy 1EVE dawała najlepsze wyniki dokowania, a nasze zainteresowania skupiły się na poszukiwaniu nowych

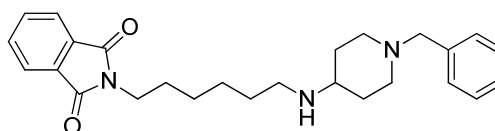
<sup>3</sup> kody struktur krystalicznych w bazie Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>)

związków o strukturze spokrewnionej z donepezilem w toku dalszych badań został ustalony punkt odcięcia dla funkcji ChemScore na poziomie 40, który odpowiadał związków o  $IC_{50}$  rzędu 1  $\mu M$ . Jednocześnie wartością docelową pozostała wartość 49,48, która odpowiadała aktywności donepezilu ( $IC_{50} = 31,2$  nM). W przypadku BuChE walidacja dokowania była utrudniona, ponieważ nie były dostępne struktury krystaliczne kompleksów tego enzymu z ligandami, wiążącymi się niekowalencyjnie. Rozwiązaniem było wykorzystanie takryny, która jest inhibitorem obu cholinoesteraz i której wiązanie z oboma enzymami powinno być bardzo podobne. Przeprowadzając dokowania tego związku referencyjnego ustalono optymalne parametry tego procesu, uwzględniając zarówno wielkość miejsca wiązania, rodzaj funkcji oceniającej czy obecność cząsteczek wody. Dla takryny najlepszą funkcją oceniającą okazała się również funkcja ChemScore, a wartość odpowiadająca aktywności tego związku wyniosła 52,63. Opracowane metody dokowania wraz z analizą spójności wyników i oceną trybu wiązania zostały zaimplementowane do projektowania nowych inhibitorów AChE i BuChE (prace H-3 – H-9).

Punktem wyjścia w projektowaniu nowych ligandów były związki **1** i **2**, otrzymane w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku UJCM i wykazujące słabą zdolność hamowania obu cholinoesteraz z wartościami  $IC_{50}$  na poziomie dziesiątek  $\mu M$  (Rys.2). Postanowiono zoptymalizować struktury tych związków, aby uzyskać pochodne o zwiększonej sile działania (H-2, H-3). Związki macierzyste, występując w rozciągniętej konformacji, mogły oddziaływać zarówno z miejscem katalitycznym jak i peryferyjnym acetylocholinoesterazy. Fragment benzylový tworzył oddziaływania o charakterze przystawiania pierścieni aromatycznych ( $\pi$ - $\pi$  stacking) z Trp84 w miejscu anionowym, a układ ftalimidu z Trp279 ( $\pi$ - $\pi$  stacking) i Tyr70 (CH- $\pi$ ) w miejscu peryferyjnym. Protonowana piperydyna oddziaływała z Phe330 (oddziaływania kation- $\pi$ ), a grupa aminowa z łącznika z Tyr334. Całość kompleksu była stabilizowana przez sieć wiązań wodorowych. Piperydyna poprzez cząsteczkę wody wiązała się z grupą OH Tyr121, jedna grupa karbonylowa ftalimidu oddziaływała także z Tyr121, a druga grupa karbonylowa poprzez kolejną cząsteczkę wody z grupą karbonylową łańcucha głównego Phe288. Związki te wiązały się także z butyrylocholinoesterazą. Wówczas występowały w konformacji zgiętej, a ich fragment benzylový i protonowana piperydyna oddziaływały z Trp82, grupa aminowa oddziaływała z Tyr332 lub Tyr128, podczas gdy układ ftalimidu lokował się w lipofilowej kieszeni wyścielonej przez Leu286, Val288, Trp231 i Phe398. Taki sposób wiązania inhibitorów **1** i **2** dawał szansę na dalszą optymalizację ich struktury. Modyfikacje objęły zastąpienie układu ftalimidu innymi układami heterocyklicznymi, zmianę długości łącznika oraz wprowadzenie prostych podstawników do fragmentu benzylového.



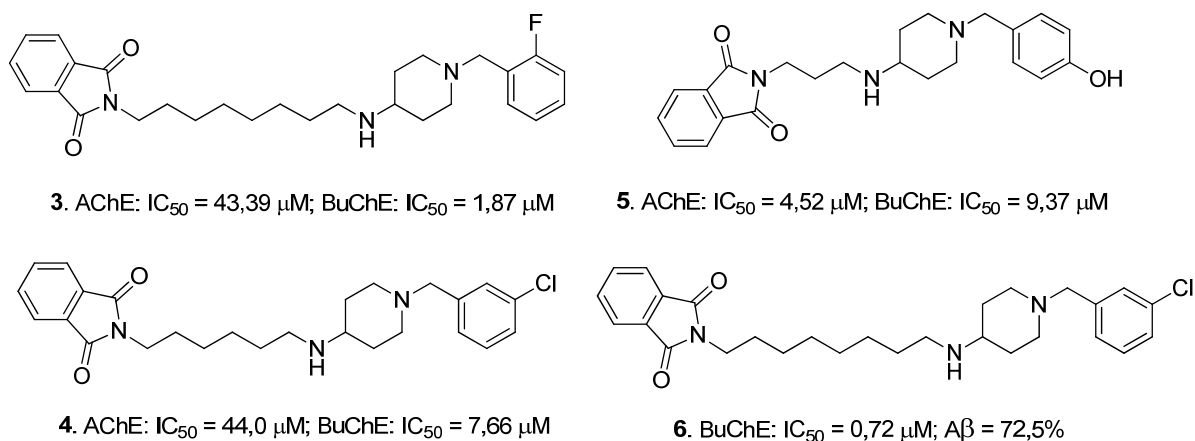
**1.** AChE:  $IC_{50} = 18,2$   $\mu M$ ; BuChE:  $IC_{50} = 22,8$   $\mu M$



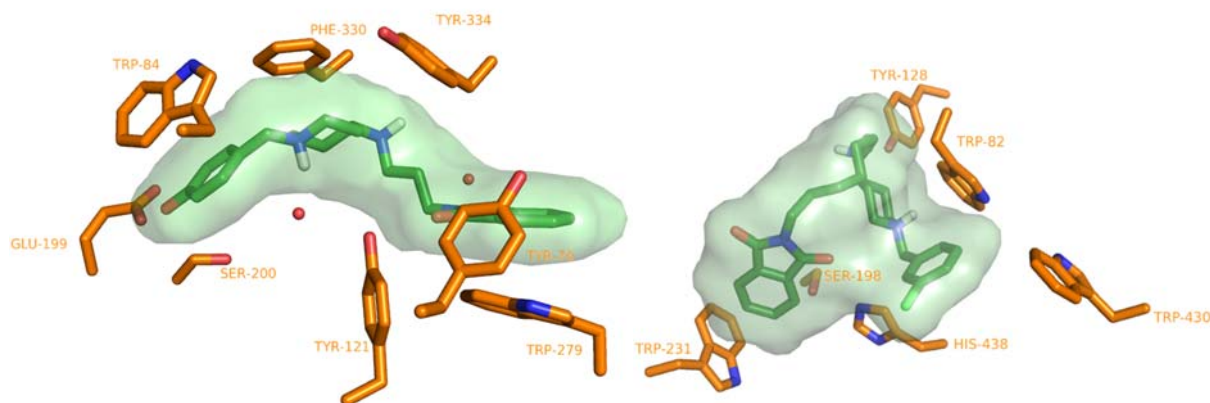
**2.** AChE:  $IC_{50} = 53,7$   $\mu M$ ; BuChE:  $IC_{50} = 24,5$   $\mu M$

Rys.2. Wyjściowe struktury inhibitorów cholinoesteraz użyte do projektowania nowych pochodnych.

Wykonane analizy wyników dokowania wykazały, że żaden z testowanych układów heterocyklicznych (tetrahydroizochinolina, tetrahydrochinolina, indol, indolina) nie dawał lepszego dopasowania do AChE aniżeli macierzysty fragment ftalimidu, jedynie dwa skondensowane pierścienie aromatyczne w układzie indolu były oceniane na podobnym poziomie. Korzystne okazywało się wprowadzenie atomu fluoru w pozycji orto w podstawniku benzylovym ze względu na tworzenie wiązania wodorowego z Ser200, atomu chloro w pozycji meta ze względu na wiązania halogenowe i grupy hydroksylowej położeniu para, która mogła tworzyć wiązanie wodorowe z Glu199. W większości wypadków dłuższe łączniki, tj. liczące 6-8 atomów węgla, dawały lepsze równoczesne dopasowanie związków do miejsca katalicznego i peryferyjnego acetylocholinoesterazy. Wyjątek stanowił łącznik trójwęglowy, dla którego dopasowanie było równie dobre jak w przypadku dłuższych łańcuchów węglowodorowych. Wyniki badań biologicznych metodą Ellmana dla otrzymanych pochodnych **3**, **4** i **5** potwierdziły obserwacje wynikające z modelowania (Rys.3). Nowe inhibitory wykazywały silniejsze hamowanie AChE w porównaniu do związków macierzystych **1** i **2**. Jednocześnie charakteryzowały się także silniejszą inhibicją BuChE. Wśród zaprojektowanych związków znalazła się także pochodna **6**, która najsilniej hamowała butyrylocholinoesterazę przy słabym hamowaniu acetylocholinoesterazy. Wybrane pochodne m. in. **6** zostały przebadane w kierunku hamowania agregacji beta-amyloidu A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Związek **6** okazał się jednym z najsilniej wpływających na agregację. Dalsze badania potwierdziły dla tej pochodnej możliwość przenikania przez barierę krew-mózg (metoda PAMPA-BBB) oraz istotną poprawę pamięci w testach *in vivo* (test biernego unikania z indukowanym skopolaminą uszkodzeniem pamięci). Wiązanie związku **5** z AChE i **6** z BuChE przedstawiono na Rys.4.

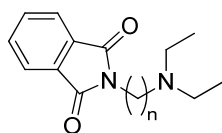


Rys.3. Struktury nowo zaprojektowanych i otrzymanych inhibitorów cholinoesteraz i agregacji beta-amyloidu (**3-6**).

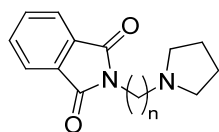


Rys.4. Sposób wiązania związku **5** w miejscu aktywnym acetylocholinoesterazy (lewy panel) oraz związku **6** w miejscu aktywnym butyrylocholinoesterazy (prawy panel).

W dalszych pracach wykorzystano projektowanie oparte na fragmentach strukturalnych takich jak różne układy aromatyczne, heterocykliczne czy ugrupowania aminowe (H-2 i H-4). Stosując technikę dokowania oceniono możliwość wiązania się poszczególnych fragmentów z AChE i BuChE. Z wybranych fragmentów bardzo korzystnie wypadł, występujący w macierzystych związkach, ftalimid, ponieważ mógł oddziaływać z acetylocholinoesterazą w miejscu anionowym (oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  i CH- $\pi$  z Phe330, Phe331 i Trp84) oraz miejscu peryferyjnym (oddziaływania o podobnym charakterze z Trp279 i Trp334). Równie korzystnie został oceniony fragment dietyloaminowy, który także mógł wiązać się z oboma miejscami poprzez oddziaływania kation- $\pi$ . W przypadku butyrylocholinoesterazy zarówno ftalimid jak i dietylamina wiązały się w jednym miejscu tj. oddziaływały z Trp82 z miejsca anionowego. Te obserwacje wskazały, że dla powyższych fragmentów istnieją dwa miejsca interakcji z AChE, a tylko jedno z BuChE oraz, że ich połączenie może prowadzić do selektywnej inhibicji acetylocholinoesterazy. Analiza wyników dokowania dla związków powstałych przez połączenie ftalimidu z dietyloaminą łącznikiem alkilowym o długości 6-8 atomów węgla potwierdziła możliwość wiązania nowych pochodnych z oboma miejscami AChE, natomiast w odniesieniu do BuChE wiązanie nowych ligandów było ograniczone. Badania *in vitro* dla związków **7-9** (Rys.5) potwierdziły, że są one selektywnymi inhibitorami acetylocholinoesterazy z wartościami  $IC_{50}$  na poziomie pojedynczych  $\mu M$ . Poszerzone testy biologiczne wykazały, że pochodna **8** hamowała agregację beta-amyloidu  $A\beta_{13-23}$  na poziomie 39,4% w stężeniu skryningowym 80  $\mu M$ . Wyznaczona aktywność hamująca AChE była zgodna z przewidywaną tj. około  $IC_{50} = 1 \mu M$ . Dla najaktywniejszego związku **9** wartość funkcji oceniającej ChemScore wyniosła 40,54, co nadal plasowało go na pozycji zdecydowanie niższej niż referencyjny donepezyl i skłaniało do dalszej optymalizacji.



7.  $n = 6$ ; AChE:  $IC_{50} = 1,2 \mu M$   
 8.  $n = 7$ ; AChE:  $IC_{50} = 1,1 \mu M$ ;  $A\beta = 39,4\%$   
 9.  $n = 8$ ; AChE:  $IC_{50} = 0,9 \mu M$



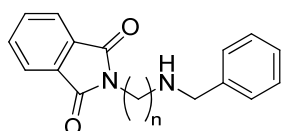
10.  $n = 6$ ; AChE:  $IC_{50} = 0,643 \mu M$   
 11.  $n = 7$ ; AChE:  $IC_{50} = 0,276 \mu M$   
 12.  $n = 8$ ; AChE:  $IC_{50} = 0,282 \mu M$ ; BuChE:  $IC_{50} = 3,24 \mu M$ ;  $A\beta = 15,17\%$

Rys.5. Struktury nowo zaprojektowanych i otrzymanych inhibitorów cholinesteraz i agregacji beta-amyloidu (7-9 i 10-12).

Ciekawą modyfikacją była możliwość przekształcenia dietyloaminy w układ cykliczny pirolidyny (praca H-8). Taka zmiana zwiększała oddziaływania hydrofobowe z resztą tryptofanu Trp84, dzięki czemu nowe pochodne miały zyskać zwiększoną aktywność. Pochodne **10-12** tj. analogi związków **7-9**, zawierające fragment pirolidyny charakteryzowały się selektywną lub preferencyjną inhibicją acetylocholinoesterazy na poziomie submikromolarnym (Rys.5). Najaktywniejszy związek **12** posiadał także zdolność hamowania agregacji beta-amyloidu  $A\beta_{1-42}$  na poziomie 15,17% oraz potwierdzoną w teście PAMPA-BBB zdolność przenikania przez barierę krew-mózg.

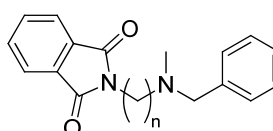
Atrakcyjnym fragmentem w projektowaniu inhibitorów była również benzyloamina (prace H-2 i H-5). Fragment ten, podobnie jak dietyloamina, mógł oddziaływać z oboma miejscami AChE, a tylko z jednym w BuChE. Przewagą benzyloaminy było to, że oprócz oddziaływań kation- $\pi$  tworzyła także oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$  oraz CH- $\pi$ . Połączenie benzyloaminy z uprzywilejowanym układem ftalimidu za pomocą łącznika alkilowego o zoptymalizowanej długości (5-7 grup  $CH_2$ ) dało związki **13-15** (Rys.6). Pochodne te były selektywnymi inhibitorami AChE o aktywności submikromolarnej. Ich dalsza optymalizacja, obejmująca wprowadzanie różnych podstawników do układu benzyloaminy, doprowadziła do pochodnych **16-18** i **19-21** (Rys.6), które zawierały odpowiednio atom fluoru w pozycji *orto* lub atom chloru w pozycji *meta*. Taki sposób podstawienia, analogicznie jak w związkach **3** i **4**, pozwalał na tworzenie dodatkowych oddziaływań. Atom fluoru tworzył wiązanie wodorowe z Ser200, a atom chloru wiązanie halogenowe z grupą karboksylową Glu199 i łańcuchem głównym Gly441. Otrzymane pochodne hamowały selektywnie acetylocholinoesterazę, posiadając wartości  $IC_{50}$  w zakresie dziesiątek lub setek nM. Dla porównania zsyntetyzowane zostały także pochodne o innym podstawieniu (para-fluoro, 2,4-difluoro), które w badaniach *in silico* miały niższe oceny niż związki niepodstawione, co sugerowało ich niższą aktywność. Testy biologiczne potwierdziły przewidywania z badań modelowania cząsteczkowego. Dodatkowe badania *in vitro* wykazały, że najaktywniejsze inhibitory AChE hamują agregację beta-amyloidu na poziomie porównywalnym z donepezilem (donepezil 13,80%, a związek **16** – 13,74% w stężeniu 10  $\mu M$ ). Najsilniejszym inhibitorem agregacji okazał się związek **22** (hamowanie 65,96%)(Rys.6). Wykazał on także działanie neuroprotektoryjne w teście cytotoxyczności indukowanej  $A\beta_{1-42}$  na liniach komórkowych SH-SY5Y. Był on jednak nieco słabszym inhibitorem AChE.

Pochodne benzyloaminy

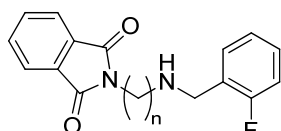


- 13.** n = 5; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,078 μM  
**14.** n = 6; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,216 μM  
**15.** n = 7; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,249 μM

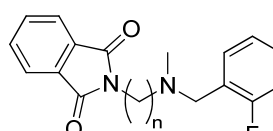
Pochodne N-metylobenzyloaminy



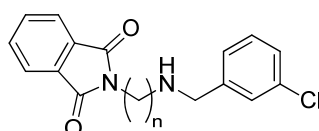
- 23.** n = 5; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,080 μM  
**24.** n = 6; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,089 μM  
**25.** n = 7; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,172 μM; BuChE: IC<sub>50</sub> = 1,011 μM



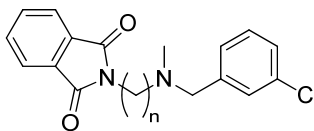
- 16.** n = 5; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,041 μM; Aβ = 13,74%  
**17.** n = 6; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,113 μM  
**18.** n = 7; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,119 μM; Aβ = 17,12%



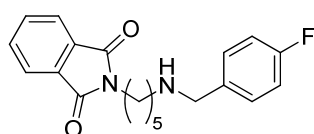
- 26.** n = 5; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,067 μM  
**27.** n = 6; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,075 μM; BuChE: IC<sub>50</sub> = 10,46 μM  
**28.** n = 7; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,525 μM; BuChE: IC<sub>50</sub> = 7,157 μM



- 19.** n = 5; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,034 μM  
**20.** n = 6; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,180 μM; Aβ = 20,75%  
**21.** n = 7; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,502 μM



- 29.** n = 5; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,110 μM; BuChE: IC<sub>50</sub> = 5,83 μM  
**30.** n = 6; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,095 μM; BuChE: IC<sub>50</sub> = 2,44 μM  
**31.** n = 7; AChE: IC<sub>50</sub> = 0,500 μM; BuChE: IC<sub>50</sub> = 1,50 μM



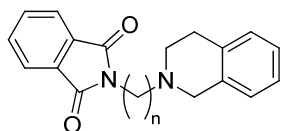
- 22.** AChE: IC<sub>50</sub> = 0,219 μM; Aβ = 65,96%

Rys.6. Struktury nowo zaprojektowanych i otrzymanych inhibitorów cholinesteraz i agregacji beta-amyloidu (13-31).

W dalszej kolejności sprawdzono możliwość wiązania z cholinesterazami N-metylowych pochodnych związków **13-15**, **16-18** i **19-21** (praca H-6). Zaprojektowane pochodne **23-25**, **26-28** i **29-31** (Rys.6) charakteryzowały się mniejszą zasadowością niż związki macierzyste (amina III rz. vs II rz.), co osłabiało nieznacznie oddziaływania kation- $\pi$ . Jednak wprowadzenie małego podstawnika alkilowego (-CH<sub>3</sub>) nasilało oddziaływania hydrofobowe. Sumarycznie biorąc wyniki dokowania wskazały, że N-metylowe analogi powinny posiadać zbliżoną aktywność antycholinesterazową. Wykonane testy potwierdziły, że związki **23-25**, **26-28** i **29-31** mają zdolność selektywnego lub preferencyjnego hamowania AChE w podobnych stężeniach do związków niemetylowanych.

Bazując na przekształceniu fragmentu dietyloaminowego w piperolidynę i obserwowanym wzroście aktywności anty-AChE, w kolejnym etapie postanowiono wkomponować benzyloaminę w układ heterocykliczny (praca H-8). W ten sposób powstały związki **32-34**, które fragmentem tetrahydroizochinoliny mogły silnie wiązać się z miejscem

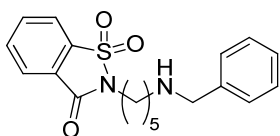
anionowym AChE oraz BuChE (Rys.7). Otrzymane pochodne wykazały działanie inhibicyjne względem obu cholinesteraz z wartościami  $IC_{50}$  zazwyczaj poniżej 1  $\mu M$  dla AChE i nieznacznie powyżej 1  $\mu M$  dla BuChE.



**32.** n = 5; AChE:  $IC_{50}$  = 1,266  $\mu M$ ; BuChE:  $IC_{50}$  = 5,314  $\mu M$   
**33.** n = 6; AChE:  $IC_{50}$  = 0,387  $\mu M$ ; BuChE:  $IC_{50}$  = 1,169  $\mu M$   
**34.** n = 7; AChE:  $IC_{50}$  = 0,688  $\mu M$ ; BuChE:  $IC_{50}$  = 0,618  $\mu M$

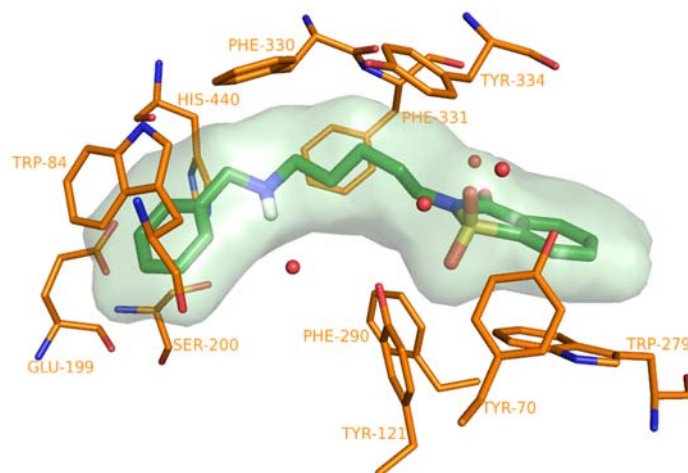
Rys.7. Nowo zaprojektowane struktury inhibitorów cholinesteraz i agregacji beta-amyloidu (**32-34**).

Sprawdzając technikami *in silico* możliwości zastąpienia układu ftalimidu innym układem heterocyklicznym wykazano m. in., że zarówno izoindolinon jak i izoindolina osłabiają oddziaływania w miejscu peryferyjnym (praca H-7). Eliminacja z tych fragmentów kolejnych grup karbonylowych znacząco redukowała ilość wiązań wodorowych z resztami aminokwasowymi. Otrzymane, dla celów porównawczych pochodne, w badaniach *in vitro* potwierdziły przewidziane efekty. W toku intensywnych poszukiwań bioizosteru dla ftalimidu wykazano, że fragment sacharyny (imid kwasu o-sulfobenzoesowego) doskonale dopasowuje się do miejsca peryferyjnego AChE, tworząc oprócz oddziaływań obecnych dla ftalimidu dodatkowe wiązanie wodorowe z zakonserwowaną cząsteczką wody. W teście Ellmana związek **35** (sacharynowy analog związku **13**) charakteryzował się najsilniejszą aktywnością względem AChE ze wszystkich dotychczas otrzymanych inhibitorów (Rys.8). W dalszych badaniach *in vitro* wykazano dla tej pochodnej zdolność hamowania agregacji beta-amyloidu na poziomie 22,19% w stężeniu 10  $\mu M$  oraz możliwość przenikania przez barierę krew-mózg (PAMPA-BBB). Sposób wiązania związku **35** z acetylocholinoesterazą przedstawiono na Rys.9.



**35.** AChE:  $IC_{50}$  = 0,036  $\mu M$ ;  $A\beta$  = 22,19%

Rys.8. Struktura nowo zaprojektowanego i otrzymanego inhibitora cholinesteraz i agregacji beta-amyloidu (**35**).



Rys.9. Sposób wiązania najaktywniejszego z zaprojektowanych inhibitorów **35** w centrum aktywnym AChE.

Wcześniejsze obserwacje korzystnego wpływu atomów fluoru i chloru w podstawniku benzylovym (związki **3** i **4** oraz **16-18** i **19-21**) skłoniły do sprawdzenia czy taka modyfikacja w odniesieniu do związku **35** będzie korzystna (praca H-8). Wyniki dokowania wskazywały możliwość tworzenia wspomnianych wcześniej oddziaływań jednak w badaniach biologicznych nie zaobserwowano wzrostu aktywności.

Dla wszystkich pochodnych o strukturze opartej na budowie donepezylu można wskazać optymalną długość łącznika alkilowego, który warunkuje najlepsze dopasowanie do miejsc katalitycznego i peryferyjnego acetylocholinoesterazy (prace H-2 – H-8). Jednocześnie zaobserwowano, że optymalny dla AChE linker nie zapewnia odpowiedniego hamowania butyrylocholinoesterazy. Dopiero dalsze wydłużenie łańcucha nasila inhibicję BuChE, przy jednoczesnym zmniejszaniu aktywności względem AChE. Prowadzone badanie wykazały, że odpowiednio zbilansowaną aktywność względem obu cholinoesteraz można osiągnąć przez manipulację długością linkera. Warto także wspomnieć, że wprowadzenie w krótszym łączniku alkilowym układu aromatycznego prowadzi już do hamowania obu enzymów. Jednak aktywności kształtują się na poziomie mikromolarnym (praca H-6).

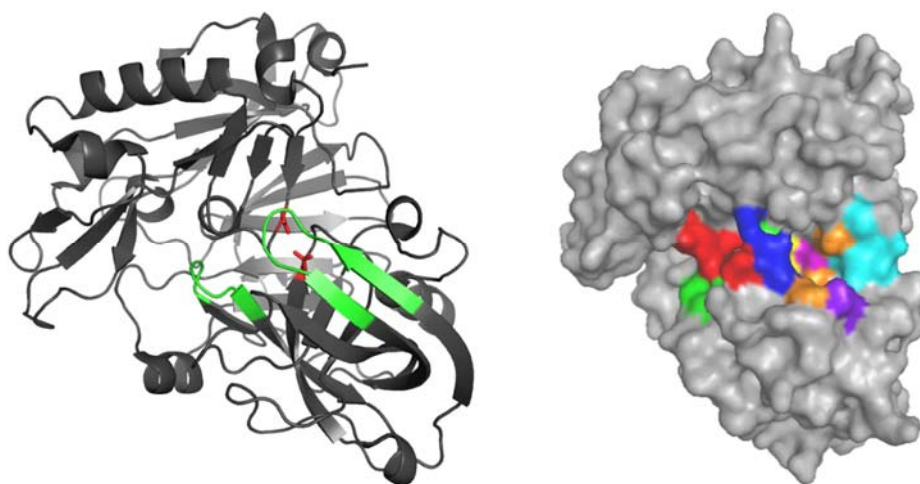
Uzupełnieniem prac w zakresie poszukiwania nowych inhibitorów cholinoesteraz było wykonanie badań sposobu wiązania dla nowych pochodnych takryny (praca H-9). Związki te stanowiły połączenie takryny z p-dimetyloaminobenzamidem i różniły się długością łącznika alkilowego. Wszystkie wykazywały zbliżoną lub silniejszą aktywność względem obu cholinoesteraz w porównaniu do samej takryny z jednoczesną zdolnością hamowania agregacji beta-amyloidu przez najaktywniejszą pochodną. Analizy wyników dokowania pokazały, że otrzymane związki mogą jednocześnie wiązać się z miejscem katalitycznym i peryferyjnym AChE. Fragment takryny umiejscawiał się pomiędzy dwiema resztami aminokwasowymi tj. Trp84 i Phe330 i był odpowiedzialny za tworzenie oddziaływań typu  $\pi$ - $\pi$  stacking. Ponadto miał możliwość tworzenia wiązania wodorowego z łańcuchem głównym His440 oraz mógł tworzyć oddziaływania kation- $\pi$  z Trp84 i Phe330. Za wiązanie z miejscem peryferyjnym odpowiadał fragment benzamidu, który oddziaływał z Trp279 i Tyr70 poprzez przystawanie



pierścieni aromatycznych ( $\pi$ - $\pi$  stacking). W przypadku BuChe sposób wiązania nowych związków były podobny. Fragment takryny również wiązał się w miejscu katalitycznym w pobliżu reszty Trp82, z którą tworzył oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$ . Ponadto tworzył wiązanie wodorowe z His438. Układ benzamidu poprzez  $\pi$ - $\pi$  wiązał się z Tyr332 w miejscu peryferyjnym butyrylocholinoesterazy. Uzyskane informacje na temat sposobu wiązania mogą być wykorzystane w przyszłych pracach nad optymalizacją struktury inhibitorów z grupy pochodnych takryny o podwójnym punkcie uchwytu.

Badania dotyczące beta-sekretazy zostały również rozpoczęte od opracowania metody *in silico* służącej do projektowania i oceny potencjalnych inhibitorów (praca H-10). Opierając się na dostępnych strukturach krystalicznych, związkach referencyjnych oraz technice dokowania przeprowadzono szereg prób, które umożliwiły w końcowym etapie selekcję najbardziej obiecujących pochodnych.

Beta-sekretaza (BACE1, memapsyna-2) jest proteazą aspartylową [16](Rys.10). Jej domena katalityczna zawiera charakterystyczne motywy sekwencyjne: DTGS oraz DSTG [123]. Diada katalityczna składa się z dwóch reszt kwasu asparaginowego Asp32 i Asp228, które są koplanarne i formie apo tworzą sieć wiązań wodorowych z cząsteczką wody, znajdującą się pomiędzy nimi [124]. Wspomniana cząsteczka wody uczestniczy w ataku nukleofilowym na grupę karbonylową z wiązania peptydowego w substracie. Badania krystalograficzne zaowocowały licznymi strukturami tego enzymu, zarówno w formie apo jak i związanej z cząsteczkami inhibitorów [124]. Reszty aminokwasowe 67-77 tworzą strukturę beta-spinki ( $\beta$ -hairpin) o nazwie klapka (flap), która znajduje się nad miejscem aktywnym i limituje do niego dostęp [125]. Jest to struktura o dużej ruchliwości: w czasie wejścia substratu klapka się otwiera, zamyka się w czasie hydrolizy, po czym znów się otwiera, aby ułatwić wyjście produktom. W kompleksach BACE1 z inhibitorami o budowie pseudopeptydowej klapka przyjmuje stan zamknięty, a w formach apo znajduje się w stanie otwartym. Reszty 9-14 tworzą krótką pętlę 10s pomiędzy dwiema nićmi beta u podstawy kieszeni S3 [126]. Pętla ta również cechuje się dużą ruchliwością i może przyjmować różne konformacje. Miejsce aktywne beta-sekretazy składa się z 8 głównych kieszeni S4-S4', które wiążą poszczególne reszty substratu (P4-P4') podczas jego hydrolizy [127]. Według nomenklatury Schechter'a – Berger'a reszty aminokwasowe substratów są numerowane względem miejsca cięcia i oznaczanie odpowiednio: P4, P3, P2, P1 ↓ P1', P2', P3', P4' [128, 129]. Obecność dodatkowych kieszeni S5-S7 została zauważona w trakcie poszukiwań inhibitorów o rozbudowanych cząsteczkach [130].



Rys.10. Struktura  $\beta$ -sekreazy. Najważniejsze elementy takie jak katalityczne reszty kwasu asparaginowego oraz pętla flap i 10s zaznaczono odpowiednio kolorem czerwonym i zielonym (lewy panel); powierzchnię enzymu tworzącą kieszenie S4 – S4' pokolorowano zgodnie z oznaczeniami: S4S3S2S1S1'S2'S3'S4' (prawy panel).

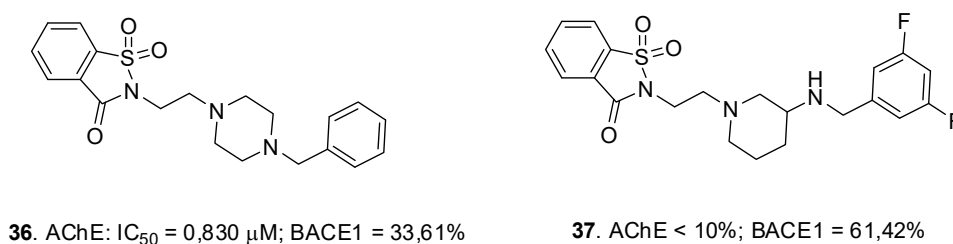
Pierwsze prace skupiły się na porównaniu struktur krystalicznych beta-sekreazy (H-10). Wybrano 20 kompleksów o wysokiej rozdzielczości z bardzo lub umiarkowanie aktywnymi inhibitorami o budowie peptydowej i niepeptydowej. Szczególną uwagę poświęcono diadzie katalitycznej, pętli 10s, beta-spince flap oraz wszystkim innym aminokwasom, które znajdowały się w promieniu 8 Å od diady. Wykonana analiza wykazała względną sztywność większości reszt aminokwasowych z wyjątkiem tych budujących pętlę 10s i klapkę flap. Położenie katalitycznych reszt kwasu asparaginowego nie ulegało zmianie. Największą zmiennością położenia cechowały się klapka oraz pętla 10s, co było zgodne z danymi literaturowymi. Dokładna analiza wykazała, że beta-spinka flap w kompleksach z inhibitorami przyjmowała nie tylko zamkniętą konformację, ale także położenie bardzo bliskie formie otwartej oraz położenia pośrednie pomiędzy obiema konformacjami. Z kolei pętla 10s przyjmowała liczne konformacje, które zmieniały się w zależności od związanego inhibitora, regulując w ten sposób objętość miejsca aktywnego. W dalszym etapie wzięto pod uwagę cząsteczki wody, szczególnie te, które były zakonserwowane tj. występowały w tym samym miejscu w różnych kompleksach oraz te, które tworzyły oddziaływania z ligandami lub katalitycznymi resztami kwasu asparaginowego. Wyodrębnione cząsteczki wody były brane później pod uwagę w etapie walidacji dokowania.

Walidacja dokowania była oparta o redokowanie i dokowanie krzyżowe (H-10). Do wyłonionych wcześniej 20 struktur BACE1 próbowano zadokować inhibitory, z którymi zostały wykrystalizowane. W tym etapie ustalono parametry dokowania, które pozwalały na optymalne zadokowanie związków referencyjnych. Pod uwagę wzięto m.in. wielkość miejsca wiązania, obecność cząsteczek wody czy różne funkcje oceniające. Analiza wyników pokazała, że 17 inhibitorów udało się bardzo dobrze lub dobrze zadokować ( $RMSD \leq 2,0$ ). Jedyne 3 inhibitory peptydowe ze względu na dużą giętkość dawały wyższe wartości RMSD. Wykazano również, że prawidłowe odtwarzanie pozycji ligandów rzadko wymagało uwzględniania obecności cząsteczek wody oraz, że zazwyczaj pozycje o najniższej wartości

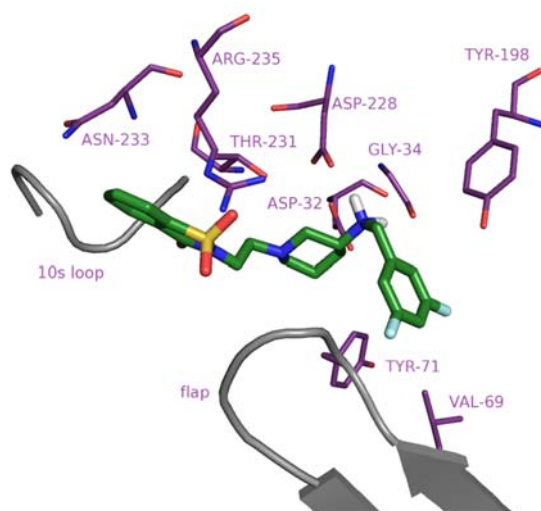
RMSD najlepiej były oceniane przez funkcję GoldScore. Do dokowania krzyżowego wybrano 10 najlepszych kompleksów z najniższymi wartościami RMSD, po czym do każdej struktury BACE1 zadokowano wszystkie 17 niepeptydowych inhibitorów, stosując wcześniej ustalone parametry dokowania w odniesieniu do białka. Zauważono, że spośród 10 struktur beta-sekretazy dwie tj. 4D8C i 3L5E najlepiej adoptowały ligandy referencyjne. Struktura 4D8C odpowiadała BACE1 z klapką flap w zamkniętej konformacji, zaś 3L5E zawierała beta-spinę w stanie przejściowym. Ponadto w przypadku drugiej struktury należało uwzględnić cząsteczki wody. Fakt, iż beta-sekretaza częściej tworzy kompleksy z inhibitorami w formie zamkniętej oraz brak konieczności uwzględniania wody zadecydował o wyborze struktury 4D8C do dalszych badań. Wcześniej udowodniono, że funkcja GoldScore dobrze nadawała się do wyboru póż o najniższych wartościach RMSD, dlatego następnie postanowiono sprawdzić czy może być również zastosowana do różnicowania aktywności ligandów. W tym celu wybrano z literatury grupę 60 inhibitorów o różnych strukturach oraz zróżnicowanej aktywności. Grupę tę podzielono na dwie równe części: treningową i testową, a następnie wykorzystano do sprawdzenia zależności aktywność – ocena z dokowania. Dla grupy testowej wyprowadzono równanie, które jasno pokazywało powiązanie aktywności z oceną GoldScore:  $pIC_{50} = 0,0791 \times \text{GoldScore} + 0,410$  ( $R = 0,8822$ ,  $n = 30$ ). W oparciu o to równanie możliwe stało się przewidywanie aktywności dla grupy testowej ze średnim błędem dla  $pIC_{50}$  na poziomie  $\pm 0,46$ , a korelacja dla  $pIC_{50}$  przewidzianego i eksperymentalnego pozostawała na poziomie  $R = 0,8937$  ( $n = 30$ ). Opracowana metoda pozwalała jednocześnie na śledzenie zmian w trybie wiązania i przekładanie ich na zmiany w aktywności biologicznej.

Zastosowanie metody opisanej w pracy H-10 wraz z metodą oceny działania hamującego cholinoesterazy zostało przedstawione w publikacji H-11. Bazując na dotychczas otrzymanych związkach postanowiono zaprojektować nowe, ale bliskie pochodne, łączące w sobie aktywność antycholinoesterazową i anty-beta-sekretazową. Punktem wyjścia był związek **35**, który posiadał już potwierdzone działanie hamujące AChE. W strukturze nowych analogów w łączniku alkilowym wprowadzono fragment piperazyny, w którym jednemu atomowi azotu odpowiadała grupa aminowa benzyloaminy ze związku macierzystego. Wprowadzenie drugiego atomu azotu miało nasilić oddziaływanie z diadą katalityczną BACE1, przy jednocześnie niewielkim osłabieniu działania na AChE. W ten sposób zaprojektowano pochodną **36** (Rys.11). Związek ten oddziaływał z AChE w sposób bardzo podobny do związku **35**, wiążąc się z oboma miejscami acetylocholinoesterazy. Wprowadzenie drugiego centrum zasadowości zmieniło dystrybucję ładunku w całej cząsteczce poprzez co osłabiło oddziaływanie z Phe330 i w efekcie miało przełożyć się na nieznaczny spadek aktywności. Przewidywane hamowanie AChE wciąż miało pozostać na poziomie submikromolarnym. Z kolei wprowadzenie układu piperazyny umożliwiło wiązanie się nowej pochodnej z BACE1. Układ ten wiązał się z Asp32 i Asp228, a pozostałe fragmenty lokowały się w pobliskich kieszeniach tj. S2', S2 i S3. Podstawnik benzylowy umiejscawiał się w kieszeni S2', a układ sacharyny w S2 i S3. Co prawda sposób wiązania charakteryzował się stosunkowo małą ilością specyficznych oddziaływań, jednak przewidywana aktywność kształtowała się na poziomie dziesiątek  $\mu\text{M}$ . Badania biologiczne dla związku **36** wykazały zdolność hamowania AChE z  $IC_{50}$  równym  $0,83 \mu\text{M}$ , przy jednocześnie słabym hamowaniu BACE1 wynoszącym  $33,61\%$  w stężeniu skryningowym  $50 \mu\text{M}$  ( $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$ ). Optymalizacja struktury związku **36**

pod kątem zwiększonego hamowania beta-sekretazy doprowadziła do otrzymania pochodnej **37** (Rys.11). Wyłączenie jednego z atomów azotu poza pierścień, prowadzące do pochodnej aminopiperydyny pozwoliło na lepsze dopasowanie podstawnika benzyłowego do kieszeni S2' (Rys.12). Związek **37** tworzył mostek solny poprzez protonowaną grupę aminową z Asp228 i wiązanie wodorowe z Gly34. Fluorowany podstawnik benzyłowy wypełniał kieszeń S2', oddziałując z Tyr71, Val69 i Tyr198. Fragment sacharynowy wiązał się na pograniczu kieszeni S2/S3, oddziałując z Asn233, Arg235 i Thr231. Związek ten wykazał silniejszą inhibicję BACE1 (61,42% w stężeniu 50  $\mu$ M,  $IC_{50} < 50 \mu$ M). Jednak odejście od budowy typowo liniowej do nieco zgiętej (podstawienie 1,3 w układzie piperydyny) oraz dwa atomy fluoru w położeniach 3,5 utrudniały wiązanie z AChE, co doprowadziło do spadku aktywności poniżej 10% w stężeniu skryningowym 10  $\mu$ M. Aktywności dla pierwszych otrzymanych związków potwierdzają wyniki modelowania cząsteczkowego i stanowią podstawę dalszych prac.



Rys.11. Struktury nowo zaprojektowanych i otrzymanych inhibitorów cholinoesteraz i beta-sekretazy (**36**, **37**).



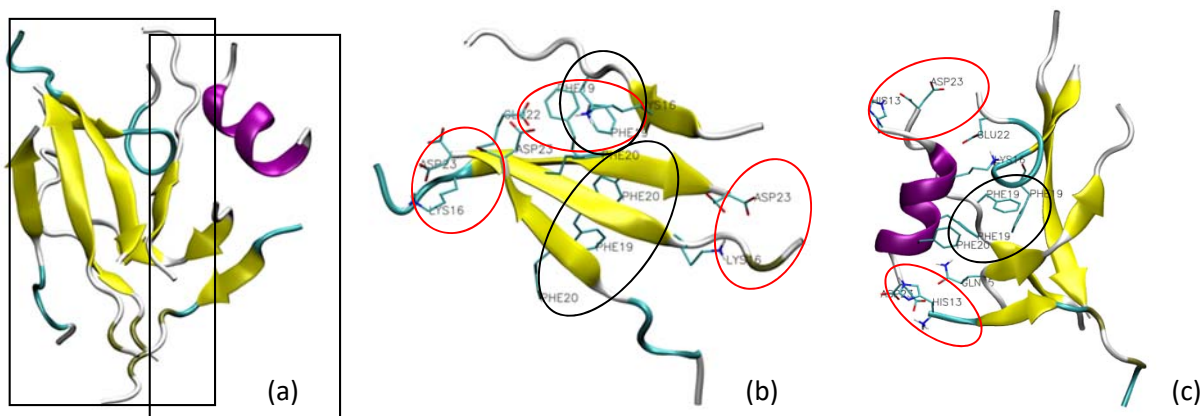
Rys.12. Sposób wiązania związku **37** w obrębie miejsca aktywnego BACE1. Asp32 i Asp228 stanowią diadę katalityczną. Pętla 10s i klapka flap są najbardziej fleksyjnymi częściami BACE1. Kieszeń S2' zawiera Tyr71, Val69 i Tyr198. Asn233 oraz Arg235 należą do kieszeni S2, a Thr231 do kieszeni S3.

Dotychczas otrzymane podwójne inhibitory cholinoesteraz i beta-amyloidu były projektowane jako ligandy cholinoesteraz, a ich aktywność antyagregacyjna była oceniana metodą skryningu biologicznego. Ze względu na wysokie koszty beta-amyloidu  $A\beta_{1-42}$  postanowiono opracować metodę oceny związków jako potencjalnych inhibitorów agregacji już na etapie projektowania.

Powstające z APP fragmenty A $\beta$ <sub>1-42</sub> przyjmują zmienną strukturę drugorzędową w zależności od środowiska, w którym występują [131]. Wykazano, że  $\alpha$ -helikalna struktura dominuje w środowisku niepolarnym, podczas gdy struktura  $\beta$  pojawia się w roztworach wodnych. Przyjmuje się, że helikalny amyloid występuje w obrębie błony komórkowej tuż po wycięciu go z fragmentu C99 przez gamma-sekretazę, zaś  $\beta$ -kartka odpowiada agregatom, obecnym zewnątrzkomórkowo. Przejście formy  $\alpha$ -helikalnej w  $\beta$ -kartki jest zatem kluczowym elementem procesu agregacji, która ma charakter odwracalny. Dowiedziono również, że agregacja przebiega głównie dzięki obecności sekwencji hydrofobowych: 17-21 (LVFFA) oraz 29-42 (C-koniec)[132, 133]. Badania prowadzone techniką spektroskopii NMR pozwoliły na określenie struktury przestrzennej obu form amyloidu [131, 134]. Monomeryczna forma helikalna składa się z  $\alpha$ -helisy, zgięcia i  $\alpha$ -helisy (1YIT), natomiast w przypadku agregatów (pentameryczna struktura - 2BEG) N-końcowe reszty 1-17 prezentują strukturę niezorganizowaną, a pozostałe tworzą motyw nic  $\beta$  – zwrot – nic  $\beta$ . W każdym monomerze reszty 18-26 i 31-42 tworzą dwie  $\beta$ -kartki, oznaczane odpowiednio  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2. Struktura agregatu jest stabilizowana przez wiązania wodorowe pomiędzy poszczególnymi łańcuchami głównymi, a także dzięki międzycząsteczkowym mostkom solnym pomiędzy Asp23 i Lys28, oddziaływaniom typu  $\pi$ - $\pi$  pomiędzy Phe19 - Phe19 i Phe20 – Phe20 oraz kontaktom typu wybrzuszenie – dziura („knob-hole”) w parach Phe19 – Gly38 i Ala21 – Val36. Znajomość struktury tych dwóch form nie jest jednak w pełni wystarczająca do zrozumienia procesu agregacji, a informacje o przebiegu tego zjawiska często pochodzą z badań modelowania molekularnego.

Opracowując metodę projektowania inhibitorów agregacji beta-amyloidu na wstępie przeanalizowano sam proces formowania agregatów. W pracy H-12 skupiono się na mechanizmie agregacji skróconej formy amyloidu A $\beta$ <sub>13-23</sub>. Forma ta zawiera najistotniejszy dla agregacji motyw KLVFF i może być wykorzystywana jako alternatywa dla amyloidów o pełnej długości w badaniach biologicznych (H-4). Stosując metodę EEF1/IMM1 (implicit membrane – water environment) wykonano symulacje dynamiki molekularnej o długości 500 ns dla układu zawierającego 9 fragmentów A $\beta$ <sub>13-23</sub>. Zgodnie z hipotezą, mówiącą o tym, że przejście struktury  $\alpha$  do  $\beta$  jest początkiem agregacji, struktura startowa nonameru była helikalna. Obecność błony w symulacji przyspieszyła zachodzące zmiany konformacyjne, co było zgodne z danymi literaturowymi, które wskazują, że agregacja zachodzi szybciej w sąsiedztwie różnego rodzaju powierzchni m. in. błon biologicznych [135]. Jednocześnie wykorzystanie uproszczonego modelu błony pozwoliło na skrócenie czasu obliczeń. Początkowe  $\alpha$ -helikalne konformacje peptydów szybko zmieniały się w struktury w formie kłęбка oraz  $\beta$ -kardtek. Po upływie 100 ns osiem łańcuchów traciło całkowicie startową konformację. Podczas symulacji zaobserwowano tworzenie się równoległych i antyrównoległych  $\beta$ -kardtek. Już na początku powstały 4 niezależne  $\beta$ -kartki, obejmujące 8 peptydów, co sugerowało istotną rolę oddziaływań helisa-helisa w formowaniu  $\beta$ -kardtek. Końcowa struktura zawierała duże, regularne  $\beta$ -kartki, stabilizowane przez oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$  pomiędzy resztami Phe19 i Phe20 oraz mostki solne pomiędzy Lys16 i Asp23 lub rzadziej pomiędzy Lys16 i Glu22 (Rys.13). W układzie aż do końca symulacji pozostawała pojedyncza helisa, pomimo licznych oddziaływań ze strukturami  $\beta$ . Helisa ta oddziaływała z wewnętrznym rejonem hydrofobowym oligomeru poprzez reszty Phe19 i Phe20, a ponadto jej N- i C-koniec

tworzył wiązania wodorowe i mostki solne. Stwierdzono obecność licznych wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami bocznymi tej helisy a łańcuchami głównymi  $\beta$ -krotek. Z kolei brak wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami bocznymi obu struktur drugorzędowych mógł być odpowiedzialny za wyjątkową stabilność tej helisy.

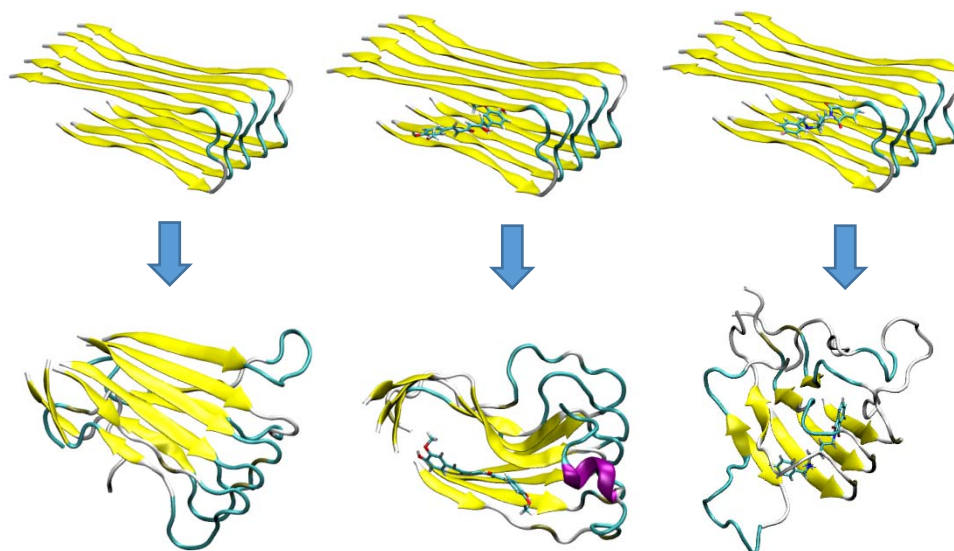


Rys.13. Struktura wczesnego stadium oligomeru osiągnięta po 500 ns symulacji MD: (a) – struktura drugorzędowa nonameru, (b) – cztery łańcuchy  $A\beta_{13-23}$ , które tworzyły motyw  $\beta$  o najwyższej zawartości  $\beta$ -krotek, (c) – oddziaływania pozostałej helisy z innymi monomerami. Oddziaływania są zaznaczone elipsami: czarnymi – oddziaływania hydrofobowe, czerwonymi – mostki solne.

Właściwe prace nad nową metodą oceny potencjału antyagregacyjnego (praca H-13) rozpoczęto od selekcji ligandów oraz wyboru struktury startowej beta-amyloidu. Do badań wykorzystano otrzymane dotychczas wielocelowe ligandy o znanej już aktywności w kierunku hamowania agregacji beta-amyloidu. Grupę związków badanych uzupełniono o referencyjną kurkuminę, która jest szeroko opisywanym w literaturze inhibitorem agregacji  $A\beta$  [136]. Opierając się na założeniu, że proces agregacji jest odwracalny przyjęto, że jeśli ligand hamuje agregację beta-amyloidu to może również wiązać się z powstałymi fibrylami, prowadząc do ich destrukcji. Z tego powodu wybrano  $\beta$ -dywanową strukturę pentameru  $A\beta_{17-42}$  jako właściwą do badania oddziaływań ligand – amyloid oraz do oceny siły działania antyagregacyjnego. Wyniki dokowania badanych związków do takiego modelu beta-amyloidu pokazały, że wszystkie pochodne wiązały się w tej samej okolicy. Układały się wzdłuż osi fibryli w lipofilowej kieszeni, wyścielonej przez łańcuchy boczne reszt Ala21, Lue34 i Val36 oraz dodatkowo Asp23. Powstałe kompleksy ligand – amyloid były głównie stabilizowane przez oddziaływania hydrofobowe oraz wiązania jonowe. Układy heterocykliczne ligandów wiązały się z łańcuchami bocznymi alaniny, leucyny i waliny, a protonowana grupa aminowa tworzyła mostek solny z kwasem asparaginowym. Już na tym etapie prac widoczna była istotna rola oddziaływań hydrofobowych w procesie agregacji / dezagregacji, natomiast nie było jeszcze istotnych różnic pomiędzy związkami aktywnymi i nieaktywnymi. Uzyskane w procesie dokowania kompleksy po solwatacji i dodaniu jonów stały się przedmiotem pełnoatomowych symulacji dynamiki molekularnej o długości 100 ns (Rys.14). W trakcie symulacji śledzono zmiany struktury drugorzędowej. Największe różnice zaobserwowano pomiędzy układami zawierającymi aktywne i nieaktywne związki. Ponadto różnice zaobserwowano również

w przypadku systemów z aktywnymi związkami i układem zawierającym sam amyloid, natomiast układy z nieaktywnymi pochodnymi zachowywały się podobnie do samego pentameru. W przypadku symulacji dla kompleksu kurkuminy z beta-amyloidem najistotniejsze zmiany struktury drugorzędowej dotyczyły dwóch skrajnych peptydów P1 i P5 w pentamerze. Łańcuch P5 bardzo szybko tracił strukturę  $\beta$ , już po 10 ns 70% reszt przyjmowało konformację niezorganizowaną. Pod koniec symulacji tylko fragment 19-23 zachował strukturę  $\beta$ -nici. Podobnie było z łańcuchem P1, który w 50% utracił strukturę  $\beta$ . Ponadto w jego przypadku około 90 ns reszty 33-37 utworzyły jeden obrót  $\alpha$ -helisy. Warto zauważyć, że struktura helikalna jest charakterystyczna dla pierwotnych, niezagregowanych form amyloidu. Pozostałe, wewnętrzne łańcuchy P2-P4 ulegały mniejszym zmianom, obejmującym krótkie fragmenty  $\beta$ -kartek w pobliżu zwrotu i C-końca. Najaktywniejsza pochodna spośród wybranych związków własnych (związek **22**) również powodowała istotne zmiany w strukturze amyloidu. Podobnie jak wcześniej najbardziej zmieniały się skrajne łańcuchy P1 i P5, które zaczęły oddzielać się od pozostałych. Struktura  $\beta$  reszt aminokwasowych 31-42 z każdego łańcucha ulegała największej degradacji. Pod koniec symulacji peptyd P5 w całości przyjmował konformację niezorganizowaną, a pozostałe zachowywały jedynie krótkie fragmenty nici  $\beta$ . Dla porównania w układach z nieaktywnymi związkami oraz w układzie z samym amyloidem zmiany były niewielkie i obejmowały pojedyncze reszty aminokwasowe w obrębie  $\beta$ -zwrotu, N- i C-końca. Stabilność agregatów beta-amyloidu była oceniana ilościowo za pomocą liczby międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, tworzonych przez łańcuchy główne poszczególnych nici  $\beta$  pentameru. Zaobserwowano, iż ilość takich wiązań wodorowych jest porównywalna w przypadku symulacji dla układów z nieaktywnymi związkami i układu z samym amyloidem. Z kolei w przypadku aktywnych pochodnych ilość wiązań wodorowych znacząco się zmniejszała. Porównanie średniej ilości międzycząsteczkowych wiązań wodorowych tworzonych przez łańcuchy główne pod koniec symulacji z poziomem agregacji beta-amyloidu z badań *in vitro* wykazało, że istnieje umiarkowana zależność pomiędzy analizowanymi parametrami. Pozwoliło to na wyróżnienie wśród badanych związków trzech grup: związki aktywne, związki nieaktywne i związki, których aktywność było trudno przewidzieć. Wykazano, że jeśli średnia ilość wspomnianych wiązań wodorowych w czasie symulacji zmniejszała się do wartości 55 lub mniej to amyloid słabo agregował w warunkach *in vitro*, ponieważ analizowany związek silnie hamował jego agregację. Na tej podstawie zaproponowano powyższe podejście jako metodę do projektowania nowych inhibitorów agregacji  $\beta$ -amyloidu.





Rys.14. Początkowa i końcowa konformacja badanych układów. Lewy panel reprezentuje sam amyloid, środkowy amyloid z referencyjną kurkumina, a prawy amyloid ze związkiem **22**. Początkowa konformacja odpowiada kompleksom amyloid – ligand, uzyskany w dokowaniu, podczas gdy końcowa konformacja oznacza strukturę układu po 100 ns pełnoatomowej symulacji dynamiki molekularnej.

### Podsumowanie wyników

Efektom prowadzonych badań, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, było opracowanie metod do projektowania i oceny inhibitorów czterech różnych celów biologicznych o dużym znaczeniu dla terapii choroby Alzheimera. Pod uwagę zostały wzięte cele, które są istotne z punktu widzenia leczenia objawowego oraz modyfikujące przebieg choroby. Badania skupiły się na acetylocholinoesterazie, butyrylocholinoesterazie, beta-sekretazie i beta-amyloidzie. Wykorzystano znajomość struktur przestrzennych wszystkich celów biologicznych i opierając się na związkach referencyjnych zaproponowano sposoby oceny nowych związków jako potencjalnych inhibitorów. W przypadku enzymów (AChE, BuChE, BACE1) badania opierały się na redokowaniu i dokowaniu krzyżowym. Takie podejście doprowadziło do wyboru zestawów parametrów dokowania, które umożliwiały prawidłowe przewidywanie ułożenia ligandów referencyjnych w miejscach aktywnych wspomnianych celów biologicznych. Następnie skupiono się na sposobie oceny ligandów tak, aby pozwalał on na selekcję cząsteczek o wysokiej aktywności. Zastosowano różne funkcje oceniające, które skutecznie różnicowały związki według siły działania biologicznego. W odniesieniu do beta-amyloidu metoda projektowania wymagała zastosowania bardziej zaawansowanych technik modelowania molekularnego. W tym przypadku oparto się na dokowaniu i symulacjach dynamiki molekularnej. Dokowanie pozwalało na określenie sposobu wiązania ligandów referencyjnych z amyloidem. Następujące po nim symulacje dynamiki molekularnej umożliwiały śledzenie wpływu ligandów na strukturę beta-amyloidu. Aktywne związki powodowały degradację beta-kartkowej struktury amyloidu przebiegu symulacji MD tym większą im silniejsze działanie *in vitro* wykazywały. Dla porównania w symulacjach dla samego amyloidu oraz układów z nieaktywnymi związkami nie obserwowano większych



zmian. Wykazano, że najlepszą miarą do przewidywania potencjalnej aktywności jest zmiana ilości międzycząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami głównymi w agregatach beta-amyloidu w czasie symulacji dynamiki molekularnej. Ciekawym uzupełnieniem badań nad metodą projektowania inhibitorów agregacji beta-amyloidu było określenie mechanizmu agregacji krótszej formy amyloidu A $\beta$ <sub>13-23</sub>. Potwierdzono, że agregacja zachodzi szybciej w pobliżu błony komórkowej oraz wykazano, że istotną rolę w formowaniu  $\beta$ -kartek odgrywa oddziaływanie w parach helisa-helisa. Badania te potwierdziły również dużą rolę oddziaływań hydrofobowych oraz mostków solnych w stabilizacji utworzonych oligomerów.

Opracowane metody zostały z sukcesem zaaplikowane w projektowaniu inhibitorów enzymatycznych oraz inhibitorów agregacji. Dzięki zastosowaniu metody *in silico* ukierunkowanej na inhibicję cholinesteraz zaprojektowano i otrzymano nowe pochodne o nanomolarnej sile działania, wśród których dzięki skryningowi biologicznemu wyłoniono wielofunkcyjne inhibitory AChE/BuChE i agregacji amyloidu. Dalsze prace projektowe wykorzystywały dwie metody *in silico* tj. ukierunkowane na inhibitory cholinesteraz i beta-sekretazy. Łączne zastosowanie obu metod pozwoliło już na etapie projektowania na połączenie w jednej cząsteczce obu aktywności. Otrzymane pierwsze, bliskie pochodne wykazały submikromolarną aktywność w kierunku cholinesteraz oraz umiarkowaną aktywność w kierunku beta-sekretazy. Metoda *in silico* służąca do projektowania inhibitorów agregacji beta-amyloidu została również wdrożona, zastępując częściowo metodę skryningu biologicznego. Badania nad nowymi pochodnymi łączącymi w sobie aktywność inhibicyjną względem AChE/BuChE i/lub BACE1 i/lub A $\beta$  są kontynuowane.

Podsumowując, badania stanowiące podstawę habilitacji, doprowadziły do opracowania metod projektowania ligandów wielofunkcyjnych o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera. Zaaplikowanie tych metod znacząco przyspieszyło prace badawcze i umożliwiło otrzymanie nowych aktywnych związków wielocelowych, które są dalej rozwijane, a w przyszłości mogą być atrakcyjnymi kandydatami na lek.

## **6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych**

Prace naukowe prowadzone przed doktoratem skupiły się wokół dwóch tematów. Pierwszy nurt dotyczył badań właściwości fizykochemicznych, natomiast drugi wiązał się z poszukiwaniem nowych inhibitorów cholinesteraz. Badania właściwości fizykochemicznych, a w szczególności oznaczanie lipofilowości zostały zapoczątkowane już w czasie przygotowywania pracy magisterskiej. Przedmiotem pierwszych badań w tym zakresie była seria 8 pochodnych tiochinoliny o działaniu przeciwnowotworowym (praca D-2 [137]), dla której wyznaczono lipofilowość metodami eksperymentalnymi oraz obliczeniowymi. W badaniach eksperymentalnych zastosowano techniki chromatograficzne: RP-TLC, RP-HPLC i IAM-HPLC, natomiast przewidywania zostały wykonane za pomocą programów Pallas i CAChe. Wyznaczone eksperymentalnie współczynniki lipofilowości były ze sobą wysoce skorelowane, a wartości przewidywane znacząco od nich odbiegały. To podkreślało konieczność wykonywania badań eksperymentalnych w tym zakresie. Uzyskane

wyniki pozwoliły na wykonanie analizy zależności struktura – lipofilowość oraz umożliwiły ocenę wpływu lipofilowości na aktywność antyproliferacyjną.

W kolejnych badaniach lipofilowości skupiono się na pochodnych N-fenylpiperazyny (praca D-3 [138]). Dla nich również wykonano badania metodami eksperymentalnymi (RP-TLC i RP-HPLC) i obliczeniowymi oraz przeprowadzono analizę zależności struktura – lipofilowość. Uzyskane parametry lipofilowości posłużyły później w badaniach nad wiązaniem pochodnych N-fenylpiperazyny z biblioteką sztucznych receptorów utworzonych przez N-lipidowane peptydy immobilizowane na celulozie (praca D-5 [139]). Wykazano, że istnieją takie kombinacje kwasów tłuszczowych i aminokwasów, że wiązanie z utworzonymi przez nie receptorami jest uwarunkowane głównie lipofilowością ligandów.

Badania lipofilowości były również rozszerzane o określanie innych parametrów fizykochemicznych (praca D-6 [140]). Dla dużej grupy inhibitorów cholinoesteraz wykonano przewidywania właściwości fizykochemicznych za pomocą modułu QikProp z pakietu Schrodinger Suite, a następnie przeprowadzono analizę ilościowej zależności właściwości - aktywność, wykazując, że lipofilowość jest jednym z czynników wpływających na aktywność hamującą AChE i BuChE.

Prace dotyczące poszukiwania inhibitorów cholinoesteraz skupiły się na opracowaniu metody do szybkich oznaczeń aktywności w kierunku hamowania acetylocholinoesterazy oraz wyjaśnieniu sposobu oddziaływania otrzymanych wcześniej inhibitorów z cholinoesterazami. Jako alternatywę dla szeroko stosowanej w badaniach biologicznych metody Ellmana zaproponowano mikroanalizę wspomaganą elektroforezą kapilarną (praca D-4 [141]). Wykorzystano możliwość przeprowadzenia reakcji enzymatycznej we wnętrzu kapilary, a następnie przeprowadzono rozdział powstałego produktu od nieprzereagowanego substratu. Dzięki wcześniejszemu wykonaniu próby ślepej tj. bez inhibitora, która odpowiadała maksymalnej aktywności enzymu, możliwe stało się określenie stopnia zahamowania enzymu w obecności badanych związków.

Badania nad sposobem oddziaływania nowych karbaminianów zawierających ugrupowanie N-benzylopiperidynowe i N-benzylopiperazynowe z AChE i BuChE zostały przedstawione w pracy D-7 [142]. Zastosowanie techniki dokowania w pakiecie Schrodinger Suite umożliwiło określenie sposobu wiązania nowych pochodnych z cholinoesterazami oraz wskazanie przyczyny zróżnicowanej aktywności. Wykazano, że elementem istotnym dla hamowania AChE była obecność fragmentu N-benzylopiperidynowego, który wiązał się z miejscem anionowym enzymu. Ugrupowanie karbaminianowe okazało się zbyt duże dla tej grupy pochodnych. Z kolei związki zawierające fragment N-benzylopiperazynowy układały się odwrotnie i jednocześnie były bardziej oddalone od triady katalitycznej. To uniemożliwiało oddziaływanie z centrum anionowym grupy N-benzylopiperazynowej oraz utrudniało transfer grupy karbamoilowej na resztę seryny w triadzie. W przypadku wiązania z BuChE obie grupy pochodnych reprezentowały spójny tryb wiązania, układając się w taki sposób, że możliwa była karbamoilacja seryny w centrum katalitycznym enzymu.

Poszukując nowych inhibitorów cholinoesteraz zaproponowano zastosowanie trójstopniowego wirtualnego skryningu, opartego na filtrach dla właściwości fizykochemicznych, farmakoforach i dokowaniu (praca D-22 [143]). Pierwszy etap pozwolił na wybór cząsteczek z bazy ZINC o optymalnych parametrach fizykochemicznych. Następnie przeprowadzono szybki skryning w oparciu o modele farmakoforowe dla ligandów

referencyjnych. Finalnie zastosowano dokowanie, aby ocenić sposób oddziaływania z wyselekcjonowanych wcześniej cząsteczek z cholinoesterazami i wybrać potencjalne hity. Badania biologiczne dla wybranych związków wykazały, że kilka pochodnych wykazało słabe działanie hamujące AChE i/lub BuChE i że wymagają one dalszej optymalizacji w celu poprawy aktywności.

Prace prowadzone po obronie doktoratu wiązały się z aplikowaniem w szerokim zakresie metod modelowania molekularnego w badaniach nad nowymi związkami bioaktywnymi oraz z wyznaczaniem właściwości fizykochemicznych.

Do badań właściwości cząsteczek zastosowano nową metodę tj. micelną chromatografię elektrokinetyczną (MEKC). Umożliwiła ona określenie lipofilowości dużej serii pochodnych  $\gamma$ -butyrolaktonu o aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej (D-16 [144]). Uzyskane wyniki wykorzystano w analizie zależności struktura – lipofilowość, porównano z innymi wyznaczonymi wcześniejszej parametrami lipofilowości (D-12 [145]) oraz ostatecznie wykazano różnice w lipofilowości pomiędzy grupą związków aktywnych w teście maksymalnego elektroszoku (MES) a związkami nieaktywnymi. Opracowana metoda MEKC posłużyła później do badań lipofilowości leków dermatologicznych (D-26 [146]).

Badania modelowania cząsteczkowego skupiły się na różnych celach biologicznych: cholinoesterazach, kanałach potasowych hERG,  $\alpha$ -glukozydazie, fosforylacji tymidyny, ureazie i receptorach z rodziny GPCR (5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, smoothed SMO). Największą liczebnie grupę związków w tych badaniach stanowiły inhibitory cholinoesteraz, dla których prowadzono analizę oddziaływań w kompleksach z enzymami. Wykazano, że nowe pochodne 1,3,4-tiadiazoli oddziaływały głównie z miejscem katalitycznym AChE, tworząc charakterystyczną „kanapkę” z resztami Trp84 i Phe330 (D-14 [147]). Ważną rolę w wiązaniu tej grupy inhibitorów odgrywały wiązania halogenowe. Najaktywniejsza pochodna dzięki obecności w jej cząsteczce atomu bromu uzyskała aktywność na poziomie IC<sub>50</sub> = 60 nM.

W dalszych pracach badano oddziaływanie pochodnych kwasu indoliloctowego z acetylocholinoesterazą (D-17 [148]). Wykazano, że nowe związki mogą oddziaływać z oboma miejscami AChE. Jednak zbyt krótki łącznik pomiędzy układem indolu a drugim układem aromatycznym oraz brak centrum zasadowego sprawiał, że dopasowanie tych związków nie było optymalne, co dawało w efekcie aktywność z IC<sub>50</sub> na poziomie około 100  $\mu$ M.

Sulfonamidowe pochodne bifenylu wykazywały słabe hamowanie obu cholinoesteraz, dlatego postanowiono zbadać przyczynę niskiej aktywności (D-29 [149]). Dokowanie ligandów do centrum aktywnego enzymów wykazało, że ich wiązanie jest głównie uwarunkowane oddziaływaniami o charakterze hydrofobowym. Brak istotnych wiązań wodorowych czy oddziaływań jonowych sprawiał, że wiązanie było mało specyficzne.

Dużo uwagi poświęcono badaniu oddziaływań nowych pochodnych takryny z cholinoesterazami (D-10, D-11, D-13 i D-15 [150-153]). Związki te miały budowę heterodimerską i łączyły w sobie układ takryny lub jej analogu z pierścieniem pięcioczłonowym (aminocyklopentachinoliny) za pomocą łącznika alkilowego z amidami kwasu p-fluorobenzoesowego lub 6-hydrazynonikotynowego. Analiza wyników dokowania wykazała, że mogą one oddziaływać z oboma miejscami aktywnymi cholinoesteraz, a ich głównym elementem odpowiedzialnym za aktywność jest fragment takryny lub jej analogu wiążący się w miejscu anionowym. Prowadzone badania umożliwiły także stworzenie modelu

farmakoforowego dla wspomnianych pochodnych. Rozwinięciem wcześniejszych prac była analiza sposobu oddziaływania znaczących technetem  $Tc^{99m}$  pochodnych takryny z AChE (D-33 [154]). Związki te były rozpatrywane jako potencjalne radioligandy do diagnostyki choroby Alzheimera. Badania dokowania wykazały, że związki te mają podwójny punkt uchwytu, a układ takryny wiąże się w miejscu anionowym. Ponadto zauważono, że fragment zawierający technet lokuje się poza gardłem enzymu, tuż przy wejściu do niego.

Dalsze badania skupiły się na poszukiwaniu aktywności antycholinoesterazowej wśród zsyntetyzowanych już związków. Pierwsza część tych prac dotyczyła pochodnych azafenotiazyny (D-21 [155]). Bibliotekę 143 związków poddano wirtualnemu skryningowi wyłaniając grupę hitów, które zostały następnie przebadane metodą Ellmana. W ten sposób wyłoniono aktywne pochodne, hamujące butyrylocholinoesterazę. Najaktywniejsza pochodna azafenotiazyny wykazała aktywność z  $IC_{50}$  na poziomie 11,78 nM. W drugiej części prac poszukiwano nowych ligandów wielocelowych wśród eterowych i dieterowych pochodnych piperydyny i homopiperydyny (D-9 i D-31 [156, 157]). Grupę związków o potwierdzonej aktywności w kierunku receptorów  $H_3$  histaminowych przebadano metodą Ellmana, w efekcie czego wyselekcjonowano związki wielofukcyjne, które dodatkowo posiadały zdolność hamowania cholinoesteraz. Najciekawsze pochodne wykazywały powinowactwo do receptorów  $H_3$  na poziomie pojedynczych nM oraz inhibicję obu cholinoesteraz w stężeniach mikromolarnych ( $K_i (H_3) = 3,48$  nM,  $IC_{50} (AChE) = 7,91$   $\mu$ M,  $IC_{50} (BuChE) = 4,97$   $\mu$ M). Dla wyłonionych związków wielocelowych przeanalizowano ich oddziaływanie z AChE i BuChE. W przypadku acetylocholinoesterazy związki występowały w wydłużonej konformacji, wiążąc się z oboma miejscami aktywnymi. Układ heterocykliczny wiązał się w miejscu anionowym, a dodatkowy pierścień aromatyczny w miejscu peryferyjnym. W przypadku butyrylocholinoesterazy związki występowały w zgiętej konformacji; układ piperydyny / homopiperydyny wiązał się w miejscu anionowym, a fragment aromatyczny w lipofilowej kieszeni utworzonej m. in. przez aminokwasy miejsca peryferyjnego. Analiza oddziaływań wykazała dobre dopasowanie nowych pochodnych do centrum aktywnego enzymów.

Podjęto również obliczenia, zmierzające do oszacowania wpływu  $\alpha_1$ -antagonistów z grupy fenylopipezazynowych pochodnych fenytoiny na kanały potasowe hERG (D-8 [158]). Obliczenia wykonano za pomocą modułu QikProp z pakietu Schrodinger Suite, porównując badane związki ze związkami referencyjnymi. Wykazano, że nowe pochodne mają zdolność blokowania kanałów hERG, wpływając na pracę serca. Najaktywniejszy bloker charakteryzował się wartością  $\log IC_{50} = -8,21$  w porównaniu z  $-6,85$  dla referencyjnego ibutyliidu. Chociaż wiązanie z kanałami potasowymi nie zostało wprost potwierdzone, to obserwacja wydłużenia odstępu QT w obrazie EKG może potwierdzać taki mechanizm działania. Wysznuło hipotezę, że za działanie przeciwartmicyjne tych związków może być uwarunkowane m. in. blokowaniem kanałów potasowych.

Badanie oddziaływania nowych inhibitorów z  $\alpha$ -glukozydazą prowadzono w oparciu o dokowanie do zbudowanego na początku modelu homologicznego enzymu (D-19, D-24, D-28, D-32 [159-162]). Brak struktury krystalicznej wspomnianego enzymu doprowadził do rozpoczęcia prac w zakresie modelowania homologicznego. Bazując na strukturze oligo-1,6-glukozydazy zbudowano za pomocą programu Modeller modele  $\alpha$ -glukozydazy z drożdży piekarskich, spośród których po ocenie wybrano najlepszy do dokowania ligandów. Nowe związki pochodziły z czterech grup, każda o innej budowie. Były to pochodne

dihydropiryminy, imidazolu, pirydyny i piperydyny. Stwierdzono, że w przypadku dwóch pierwszych grup rdzeń cząsteczki był kluczowy dla wiązania z  $\alpha$ -glukozydazą, a obecne w nim podstawniki modyfikowały aktywność. W przypadku dwóch ostatnich grup, układ pirydyny i piperydyny zapewniał jedynie odpowiednią geometrię cząsteczek, a kluczowe były oddziaływania podstawników. Wykazano, że aktywne pochodne tworzyły istotne oddziaływania z podstawowymi aminokwasami, budującymi miejsce aktywne tj. His111, Asp214, Glu276, His348 i Asp349. Udało się także wykazać przyczyny zróżnicowanej aktywności.

Kontynuując prace związane z dokowaniem nowych ligandów przeanalizowano również oddziaływanie pochodnych 1,3,4-oksadiazolu z fosforylazą tymidyny (D-18, D-25 [163, 164]) oraz pochodnych kwasu barbiturowego i tiobarbiturowego (D-27 [165]) z ureazą.

Mniejsze cząsteczki 5-arylo-1,3,4-oksadiazolino-2-tionu wiązały się wyłącznie w miejscu wiązania zasady azotowej nukleozydu tymidyny i cechowały się niższą aktywnością. Bardziej rozbudowane zasady Mannicha, pochodne 5-arylo-1,3,4-oksadiazolino-2-tionu, wiązały się w miejscach wiązania zasady azotowej i cukru jednocześnie, a ich skrajne fragmenty sięgały aż do reszty fosforanowej obecnej w miejscu aktywnym. W efekcie takie pochodne wykazały wyższą siłę hamowania fosforylazy tymidyny.

Analizując oddziaływanie pochodnych kwasu barbiturowego i tiobarbiturowego z ureazą wykazano, że zawdzięczają one swoją aktywność zdolności kompleksowania jonów niklu, obecnych w centrum aktywnym enzymu. Siarkowe pochodne cechowały się silniejszą zdolnością kompleksowania, co przekładało się na wyższą aktywność. Podstawniki obecne w układzie kwasu barbiturowego / tiobarbiturowego tworzyły dodatkowe wiązania, modyfikując aktywność układu podstawowego.

Uwieńczeniem prac w zakresie modelowania był zespołowy udział (jako członek grupy badawczej prof. Sławomira Filipka) w konkursie GPCR Dock 2013, organizowanym przez Uniwersytet Kalifornijski i Instytut Badawczy Scripps. Celem badań było zbudowanie jak najdokładniejszych modeli kompleksów receptorów 5-HT<sub>1B</sub> i 5-HT<sub>2B</sub> z ergotaminą oraz receptorów smoothed SMO z LY-2940680 i SANT-1 (D-20, D-30 [166, 167]). Stosując hybrydowe podejście do tematu modelowania udało się zbudować jedne z najlepszych modeli kompleksów ligand - receptor. Zaawansowane techniki pozwoliły na wygenerowanie dużej puli zróżnicowanych modeli, która była stopniowo zawężana w oparciu o kryteria geometryczne i energetyczne. Finalną ocenę modeli przeprowadzono stosując technikę dokowania, która pozwalała na wybór modeli o optymalnym kształcie miejsca wiązania. Końcowe dokowanie o zwiększonej precyzji pozwoliło na wybór konkursowych kompleksów ligand – receptor. Ułożenie ergotaminy w receptorach 5-HT<sub>2B</sub> i 5-HT<sub>1B</sub> udało się przewidzieć z dokładnością, wyrażoną jako RMSD na poziomie 1,05 Å i 2,03 Å, co zapewniło naszemu zespołowi odpowiednio pierwsze i drugie miejsce wśród wszystkich uczestników tego światowego konkursu.

## 7. Literatura

[1] M. Goedert, M.G. Spillantini, A century of Alzheimer's disease, *Science*, **2006**, 314: 777-781.

- [2] C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, E. Jones, Alzheimer's disease, *Lancet*, **2011**, 377: 1019-1031.
- [3] M. Goedert, S.S. Sisodia, D.L. Price, Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease, *Current opinion in neurobiology*, **1991**, 1: 441-447.
- [4] M. Prince, Wimo A., Guerchet M., Ali G.C., Wu Y.T., Prina M., World Alzheimer Report, Alzheimer's Disease International 2015.
- [5] R. Williams, Biomarkers: warning signs, *Nature*, **2011**, 475: S5-7.
- [6] R. Anand, A. Kaushal, W.Y. Wani, K.D. Gill, Road to Alzheimer's disease: the pathomechanism underlying, *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, **2012**, 79: 55-71.
- [7] V.H. FINDER, Alzheimer's disease: a general introduction and pathomechanism, *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **2010**, 22 Suppl 3: 5-19.
- [8] Z. Cai, B. Zhao, A. Ratka, Oxidative stress and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease, *Neuromolecular medicine*, **2011**, 13: 223-250.
- [9] T.A. Bayer, O. Wirths, K. Majtenyi, T. Hartmann, G. Multhaup, K. Beyreuther, C. Czech, Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport, *Brain Pathol*, **2001**, 11: 1-11.
- [10] K.V. Nguyen, The human beta-amyloid precursor protein: biomolecular and epigenetic aspects, *Biomolecular concepts*, **2015**, 6: 11-32.
- [11] N.N. Nalivaeva, A.J. Turner, The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease, *FEBS letters*, **2013**, 587: 2046-2054.
- [12] B.L. Tang, Alzheimer's disease: channeling APP to non-amyloidogenic processing, *Biochemical and biophysical research communications*, **2005**, 331: 375-378.
- [13] S. Bandyopadhyay, L.E. Goldstein, D.K. Lahiri, J.T. Rogers, Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease, *Curr Med Chem*, **2007**, 14: 2848-2864.
- [14] T.M. Allinson, E.T. Parkin, A.J. Turner, N.M. Hooper, ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases, *Journal of neuroscience research*, **2003**, 74: 342-352.
- [15] A. Kowalska, [The beta-amyloid cascade hypothesis: a sequence of events leading to neurodegeneration in Alzheimer's disease], *Neurologia i neurochirurgia polska*, **2004**, 38: 405-411.
- [16] N. Marks, M.J. Berg, BACE and gamma-secretase characterization and their sorting as therapeutic targets to reduce amyloidogenesis, *Neurochemical research*, **2010**, 35: 181-210.
- [17] M.S. Wolfe, Toward the structure of presenilin/gamma-secretase and presenilin homologs, *Biochimica et biophysica acta*, **2013**, 1828: 2886-2897.
- [18] L. Sun, L. Zhao, G. Yang, C. Yan, R. Zhou, X. Zhou, T. Xie, Y. Zhao, S. Wu, X. Li, Y. Shi, Structural basis of human gamma-secretase assembly, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2015**, 112: 6003-6008.
- [19] B. De Strooper, T. Iwatsubo, M.S. Wolfe, Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, **2012**, 2: a006304.

- [20] Y. Yonemura, E. Futai, S. Yagishita, S. Suo, T. Tomita, T. Iwatsubo, S. Ishiura, Comparison of presenilin 1 and presenilin 2 gamma-secretase activities using a yeast reconstitution system, *The Journal of biological chemistry*, **2011**, 286: 44569-44575.
- [21] M.S. Wolfe, W. Xia, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, W.T. Kimberly, D.J. Selkoe, Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity, *Nature*, **1999**, 398: 513-517.
- [22] M.P. Kummer, M.T. Heneka, Truncated and modified amyloid-beta species, *Alzheimer's research & therapy*, **2014**, 6: 28.
- [23] M. Balcells, J.S. Wallins, E.R. Edelman, Amyloid beta toxicity dependent upon endothelial cell state, *Neuroscience letters*, **2008**, 441: 319-322.
- [24] M. Fandrich, Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity, *Journal of molecular biology*, **2012**, 421: 427-440.
- [25] A. Rijal Upadhaya, I. Kosterin, S. Kumar, C.A. von Arnim, H. Yamaguchi, M. Fandrich, J. Walter, D.R. Thal, Biochemical stages of amyloid-beta peptide aggregation and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease, *Brain : a journal of neurology*, **2014**, 137: 887-903.
- [26] A. Rijal Upadhaya, E. Capetillo-Zarate, I. Kosterin, D. Abramowski, S. Kumar, H. Yamaguchi, J. Walter, M. Fandrich, M. Staufenbiel, D.R. Thal, Dispersible amyloid beta-protein oligomers, protofibrils, and fibrils represent diffusible but not soluble aggregates: their role in neurodegeneration in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice, *Neurobiology of aging*, **2012**, 33: 2641-2660.
- [27] F.G. De Felice, S.T. Ferreira, Beta-amyloid production, aggregation, and clearance as targets for therapy in Alzheimer's disease, *Cellular and molecular neurobiology*, **2002**, 22: 545-563.
- [28] J. Hardy, D. Allsop, Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease, *Trends in pharmacological sciences*, **1991**, 12: 383-388.
- [29] D.J. Selkoe, J. Hardy, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO molecular medicine*, **2016**, 8: 595-608.
- [30] G.P. Morris, I.A. Clark, B. Vissel, Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease, *Acta neuropathologica communications*, **2014**, 2: 135.
- [31] T. Hedden, H. Oh, A.P. Younger, T.A. Patel, Meta-analysis of amyloid-cognition relations in cognitively normal older adults, *Neurology*, **2013**, 80: 1341-1348.
- [32] J.E. Cho, J.R. Kim, Recent approaches targeting beta-amyloid for therapeutic intervention of Alzheimer's disease, *Recent patents on CNS drug discovery*, **2011**, 6: 222-233.
- [33] T. Mohamed, A. Shakeri, P.P. Rao, Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry, *European journal of medicinal chemistry*, **2016**, 113: 258-272.
- [34] F.M. LaFerla, S. Oddo, Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction, *Trends in molecular medicine*, **2005**, 11: 170-176.
- [35] K.S. Kosik, A. Caceres, Tau protein and the establishment of an axonal morphology, *Journal of cell science. Supplement*, **1991**, 15: 69-74.

- [36] M. Kolarova, F. Garcia-Sierra, A. Bartos, J. Rícný, D. Ripova, Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease, *International journal of Alzheimer's disease*, **2012**, 2012: 731526.
- [37] A. Ferreira, J. Busciglio, A. Caceres, Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau, *Brain research. Developmental brain research*, **1989**, 49: 215-228.
- [38] T. Arendt, J.T. Stieler, M. Holzer, Tau and tauopathies, *Brain research bulletin*, **2016**, 126: 238-292.
- [39] G. Drewes, B. Lichtenberg-Kraag, F. Doring, E.M. Mandelkow, J. Biernat, J. Goris, M. Doree, E. Mandelkow, Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state, *The EMBO journal*, **1992**, 11: 2131-2138.
- [40] K. Baumann, E.M. Mandelkow, J. Biernat, H. Piwnicka-Worms, E. Mandelkow, Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5, *FEBS letters*, **1993**, 336: 417-424.
- [41] D.P. Hanger, K. Hughes, J.R. Woodgett, J.P. Brion, B.H. Anderton, Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase, *Neuroscience letters*, **1992**, 147: 58-62.
- [42] J.R. Bamburg, G.S. Bloom, Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease, *Cell motility and the cytoskeleton*, **2009**, 66: 635-649.
- [43] K.L. Gendreau, G.F. Hall, Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem, *Frontiers in neurology*, **2013**, 4: 160.
- [44] T. Rodriguez-Martin, I. Cuchillo-Ibanez, W. Noble, F. Nyenya, B.H. Anderton, D.P. Hanger, Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation, *Neurobiology of aging*, **2013**, 34: 2146-2157.
- [45] D. Terwel, I. Dewachter, F. Van Leuven, Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Neuromolecular medicine*, **2002**, 2: 151-165.
- [46] H.C. Huang, Z.F. Jiang, Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **2009**, 16: 15-27.
- [47] E. Souder, Neuropathology in Alzheimer's disease: target of pharmacotherapy, *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, **2005**, Suppl: 3-5.
- [48] P. Davies, A.J. Maloney, Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease, *Lancet*, **1976**, 2: 1403.
- [49] R. Medeiros, M. Kitazawa, A. Caccamo, D. Baglietto-Vargas, T. Estrada-Hernandez, D.H. Cribbs, A. Fisher, F.M. LaFerla, Loss of muscarinic M1 receptor exacerbates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline, *The American journal of pathology*, **2011**, 179: 980-991.
- [50] A. Wevers, L. Burghaus, N. Moser, B. Witter, O.K. Steinlein, U. Schutz, B. Achnitz, U. Krempel, S. Nowacki, K. Pilz, J. Stoodt, J. Lindstrom, R.A. De Vos, E.N. Jansen Steur, H. Schroder, Expression of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease: postmortem investigations and experimental approaches, *Behavioural brain research*, **2000**, 113: 207-215.



- [51] W. Leuzinger, Structure and function of acetylcholinesterase, *Progress in brain research*, **1969**, 31: 241-245.
- [52] O. Lockridge, Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses, *Pharmacology & therapeutics*, **2015**, 148: 34-46.
- [53] M. Adler, R.E. Sweeney, T.A. Hamilton, O. Lockridge, E.G. Duysen, A.L. Purcell, S.S. Deshpande, Role of acetylcholinesterase on the structure and function of cholinergic synapses: insights gained from studies on knockout mice, *Cellular and molecular neurobiology*, **2011**, 31: 909-920.
- [54] M. Dwyer, S. Javor, D.A. Ryan, E.M. Smith, B. Wang, J. Zhang, J.R. Cashman, Novel human butyrylcholinesterase variants: toward organophosphonate detoxication, *Biochemistry*, **2014**, 53: 4476-4487.
- [55] P. Masson, M.T. Froment, E. Gillon, F. Nachon, O. Lockridge, L.M. Schopfer, Hydrolysis of oxo- and thio-esters by human butyrylcholinesterase, *Biochimica et biophysica acta*, **2007**, 1774: 16-34.
- [56] E. Giacobini, Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives, *Pharmacological research*, **2004**, 50: 433-440.
- [57] W.R. Markesbery, Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease, *Free radical biology & medicine*, **1997**, 23: 134-147.
- [58] M.J. Berridge, Calcium hypothesis of Alzheimer's disease, *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **2010**, 459: 441-449.
- [59] C.S. Atwood, X. Huang, R.D. Moir, R.E. Tanzi, A.I. Bush, Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Metal ions in biological systems*, **1999**, 36: 309-364.
- [60] G.A. Malik, N.P. Robertson, Treatments in Alzheimer's disease, *Journal of neurology*, **2017**, 264: 416-418.
- [61] M.J. Ehret, K.W. Chamberlin, Current Practices in the Treatment of Alzheimer Disease: Where is the Evidence After the Phase III Trials?, *Clinical therapeutics*, **2015**, 37: 1604-1616.
- [62] D. Deleu, Y. Hanssens, Donepezil in the treatment of Alzheimer disease, *Archives of neurology*, **2000**, 57: 1380.
- [63] J.K. Kim, S.U. Park, Pharmacological aspects of galantamine for the treatment of Alzheimer's disease, *EXCLI journal*, **2017**, 16: 35-39.
- [64] A. Kurz, M. Farlow, P. Quarg, R. Spiegel, Disease stage in Alzheimer disease and treatment effects of rivastigmine, *Alzheimer disease and associated disorders*, **2004**, 18: 123-128.
- [65] E.R. Peskind, S.G. Potkin, N. Pomara, B.R. Ott, S.M. Graham, J.T. Olin, S. McDonald, Memantine treatment in mild to moderate Alzheimer disease: a 24-week randomized, controlled trial, *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, **2006**, 14: 704-715.
- [66] B.U. Islam, S. Tabrez, Management of Alzheimer's disease-An insight of the enzymatic and other novel potential targets, *International journal of biological macromolecules*, **2017**, 97: 700-709.

- [67] B.U. Islam, S.K. Zaidi, M.A. Kamal, S. Tabrez, Exploration of various proteins for the treatment of Alzheimer's disease, *Current drug metabolism*, **2017**.
- [68] M.A. Islam, S.S. Khandker, F. Alam, M.I. Khalil, M.A. Kamal, S.H. Gan, Alzheimer's Disease and Natural Products: Future Regimens Emerging From Nature, *Curr Top Med Chem*, **2017**.
- [69] B. Ul Islam, M.S. Khan, N.R. Jabir, M.A. Kamal, S. Tabrez, Elucidating Treatment of Alzheimer's Disease via Different Receptors, *Curr Top Med Chem*, **2017**.
- [70] J.D. Grill, J.L. Cummings, Current therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease, *Expert review of neurotherapeutics*, **2010**, 10: 711-728.
- [71] A. Lleo, S.M. Greenberg, J.H. Growdon, Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease, *Annual review of medicine*, **2006**, 57: 513-533.
- [72] R.S. Bitner, S. Markosyan, A.L. Nikkel, J.D. Brioni, In-vivo histamine H3 receptor antagonism activates cellular signaling suggestive of symptomatic and disease modifying efficacy in Alzheimer's disease, *Neuropharmacology*, **2011**, 60: 460-466.
- [73] K. Wicke, A. Haupt, A. Bernalov, Investigational drugs targeting 5-HT6 receptors for the treatment of Alzheimer's disease, *Expert opinion on investigational drugs*, **2015**, 24: 1515-1528.
- [74] M. Gold, Tau therapeutics for Alzheimer's disease: the promise and the challenges, *Journal of molecular neuroscience : MN*, **2002**, 19: 331-334.
- [75] G.K. Wilcock, Current approaches to the treatment of Alzheimer's disease, *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration*, **1996**, 5: 505-509.
- [76] M. Citron, Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease, *Molecular medicine today*, **2000**, 6: 392-397.
- [77] W.H. Stoothoff, G.V. Johnson, Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences, *Biochimica et biophysica acta*, **2005**, 1739: 280-297.
- [78] A. Musial, M. Bajda, B. Malawska, Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment, *Curr Med Chem*, **2007**, 14: 2654-2679.
- [79] C.J. Langmead, J. Watson, C. Reavill, Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets, *Pharmacology & therapeutics*, **2008**, 117: 232-243.
- [80] S.N. Haydar, J. Dunlop, Neuronal nicotinic acetylcholine receptors - targets for the development of drugs to treat cognitive impairment associated with schizophrenia and Alzheimer's disease, *Curr Top Med Chem*, **2010**, 10: 144-152.
- [81] G.M. Haig, Y. Pritchett, A. Meier, A.A. Othman, C. Hall, L.M. Gault, R.A. Lenz, A randomized study of H3 antagonist ABT-288 in mild-to-moderate Alzheimer's dementia, *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **2014**, 42: 959-971.
- [82] H. Ferrero, M. Solas, P.T. Francis, M.J. Ramirez, Serotonin 5-HT6 Receptor Antagonists in Alzheimer's Disease: Therapeutic Rationale and Current Development Status, *CNS drugs*, **2017**, 31: 19-32.
- [83] A.K. Ghosh, M. Brindisi, J. Tang, Developing beta-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease, *Journal of neurochemistry*, **2012**, 120 Suppl 1: 71-83.
- [84] T.E. Golde, E.H. Koo, K.M. Felsenstein, B.A. Osborne, L. Miele, gamma-Secretase inhibitors and modulators, *Biochimica et biophysica acta*, **2013**, 1828: 2898-2907.

- [85] F. Panza, V. Solfrizzi, V. Frisardi, C. Capurso, A. D'Introno, A.M. Colacicco, G. Vendemiale, A. Capurso, B.P. Imbimbo, Disease-modifying approach to the treatment of Alzheimer's disease: from alpha-secretase activators to gamma-secretase inhibitors and modulators, *Drugs & aging*, **2009**, 26: 537-555.
- [86] F. Panza, V. Solfrizzi, V. Frisardi, B.P. Imbimbo, C. Capurso, A. D'Introno, A.M. Colacicco, D. Seripa, G. Vendemiale, A. Capurso, A. Pilotto, Beyond the neurotransmitter-focused approach in treating Alzheimer's disease: drugs targeting beta-amyloid and tau protein, *Aging clinical and experimental research*, **2009**, 21: 386-406.
- [87] H. Qi, S. Prabakaran, F.X. Cantrelle, B. Chambraud, J. Gunawardena, G. Lippens, I. Landrieu, Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase, *The Journal of biological chemistry*, **2016**, 291: 7742-7753.
- [88] N. Guzior, A. Wieckowska, D. Panek, B. Malawska, Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease, *Curr Med Chem*, **2015**, 22: 373-404.
- [89] J. Godyn, J. Jonczyk, D. Panek, B. Malawska, Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials, *Pharmacological reports : PR*, **2016**, 68: 127-138.
- [90] <https://clinicaltrials.gov>.
- [91] R. Anand, K.D. Gill, A.A. Mahdi, Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future, *Neuropharmacology*, **2014**, 76: 27-50.
- [92] F. Gruninger, Drug development for tauopathies, *Neuropathology and applied neurobiology*, **2015**, 41: 81-96.
- [93] D. Wilkinson, K. Windfeld, E. Colding-Jorgensen, Safety and efficacy of idalopirdine, a 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, in patients with moderate Alzheimer's disease (LADDER): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial, *Lancet neurology*, **2014**, 13: 1092-1099.
- [94] T.A. Esbenshade, K.E. Browman, T.R. Miller, K.M. Krueger, V. Komater-Roderwald, M. Zhang, G.B. Fox, L. Rueter, H.M. Robb, R.J. Radek, K.U. Drescher, T.A. Fey, R.S. Bitner, K. Marsh, J.S. Polakowski, C. Zhao, M.D. Cowart, A.A. Hancock, J.P. Sullivan, J.D. Brioni, Pharmacological Properties and Procognitive Effects of ABT-288, a Potent and Selective Histamine H<sub>3</sub> Receptor Antagonist, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2012**, 343: 233-245.
- [95] J. Prickaerts, N.P. van Goethem, R. Chesworth, G. Shapiro, F.G. Boess, C. Methfessel, O.A.H. Reneerkens, D.G. Flood, D. Hilt, M. Gawryl, S. Bertrand, D. Bertrand, G. Konig, EVP-6124, a novel and selective alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors, *Neuropharmacology*, **2012**, 62: 1099-1110.
- [96] R. Morphy, Z. Rankovic, Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm, *Journal of medicinal chemistry*, **2005**, 48: 6523-6543.
- [97] A. Mullard, New drugs cost US[dollar]2.6 billion to develop, *Nature reviews. Drug discovery*, **2014**, 13: 877-877.
- [98] D. Taylor, The Pharmaceutical Industry and the Future of Drug Development, *Pharmaceuticals in the Environment*, RCS, 2015.
- [99] A. Smith, Screening for drug discovery: the leading question, *Nature*, **2002**, 418: 453-459.

- [100] J.A. Bittker, N.T. Ross, High Throughput Screening Methods : Evolution and Refinement, RSC2016.
- [101] E.P. Abraham, Discovery and development of penicillin, *The Dental record*, **1946**, 66: 197-200.
- [102] J.W. Bennett, K.T. Chung, Alexander Fleming and the discovery of penicillin, *Advances in applied microbiology*, **2001**, 49: 163-184.
- [103] W.J. Greenlee, M.C. Desai, The chemistry of drug design and lead optimization, *Curr Opin Drug Disc*, **2003**, 6: 435-436.
- [104] M.R. Reddy, Advances in rational drug design, *Curr Pharm Design*, **2013**, 19: 4673.
- [105] C.M. Song, S.J. Lim, J.C. Tong, Recent advances in computer-aided drug design, *Brief Bioinform*, **2009**, 10: 579-591.
- [106] A. Wadood, N. Ahmed, L. Shah, A. Ahmad, H. Hassan, S. Shams, In-silico drug design: An approach which revolutionarised the drug discovery process, *OA Drug Design & Delivery*, **2013**, 1: 3.
- [107] S. Ekins, J. Mestres, B. Testa, In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling, *British journal of pharmacology*, **2007**, 152: 9-20.
- [108] G. Gini, QSAR Methods, *Methods Mol Biol*, **2016**, 1425: 1-20.
- [109] S.Y. Yang, Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances, *Drug discovery today*, **2010**, 15: 444-450.
- [110] X.Y. Meng, H.X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery, *Current computer-aided drug design*, **2011**, 7: 146-157.
- [111] J. Mortier, C. Rakers, M. Bermudez, M.S. Murgueitio, S. Riniker, G. Wolber, The impact of molecular dynamics on drug design: applications for the characterization of ligand-macromolecule complexes, *Drug discovery today*, **2015**, 20: 686-702.
- [112] H. Zhao, A. Caflisch, Molecular dynamics in drug design, *European journal of medicinal chemistry*, **2015**, 91: 4-14.
- [113] V.K. Vyas, R.D. Ukawala, M. Ghate, C. Chintha, Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives, *Indian journal of pharmaceutical sciences*, **2012**, 74: 1-17.
- [114] J. Lee, S. Wu, Y. Zhang, Ab Initio Protein Structure Prediction, From Protein Structure to Function with Bioinformatics, Springer, 2009, pp. 3-25.
- [115] G. Schneider, Prediction of Drug-Like Properties, Madame Curie Bioscience Database, Austin, 2000-2013.
- [116] T.T. Talele, S.A. Khedkar, A.C. Rigby, Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic, *Curr Top Med Chem*, **2010**, 10: 127-141.
- [117] J.H. Van Drie, Computer-aided drug design: the next 20 years, *Journal of computer-aided molecular design*, **2007**, 21: 591-601.
- [118] M. Holmquist, Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms, *Current protein & peptide science*, **2000**, 1: 209-235.
- [119] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Science*, **1991**, 253: 872-879.

- [120] G. Kryger, I. Silman, J.L. Sussman, Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*, *Journal of physiology, Paris*, **1998**, 92: 191-194.
- [121] G. Johnson, S.W. Moore, The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design, *Curr Pharm Design*, **2006**, 12: 217-225.
- [122] Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J.C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products, *The Journal of biological chemistry*, **2003**, 278: 41141-41147.
- [123] H. Wang, R. Li, Y. Shen, beta-Secretase: its biology as a therapeutic target in diseases, *Trends in pharmacological sciences*, **2013**, 34: 215-225.
- [124] S. Patel, L. Vuillard, A. Cleasby, C.W. Murray, J. Yon, Apo and inhibitor complex structures of BACE (beta-secretase), *Journal of molecular biology*, **2004**, 343: 407-416.
- [125] Y. Xu, M.J. Li, H. Greenblatt, W. Chen, A. Paz, O. Dym, Y. Peleg, T. Chen, X. Shen, J. He, H. Jiang, I. Silman, J.L. Sussman, Flexibility of the flap in the active site of BACE1 as revealed by crystal structures and molecular dynamics simulations, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2012**, 68: 13-25.
- [126] S. Chakraborty, S. Kumar, S. Basu, Conformational transition in the substrate binding domain of beta-secretase exploited by NMA and its implication in inhibitor recognition: BACE1-myricetin a case study, *Neurochemistry international*, **2011**, 58: 914-923.
- [127] T. Guo, D.W. Hobbs, Development of BACE1 inhibitors for Alzheimer's disease, *Curr Med Chem*, **2006**, 13: 1811-1829.
- [128] I. Schechter, A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochemical and biophysical research communications*, **1967**, 27: 157-162.
- [129] N.M. Hooper, Proteases: a primer, *Essays in biochemistry*, **2002**, 38: 1-8.
- [130] R.T. Turner, 3rd, L. Hong, G. Koelsch, A.K. Ghosh, J. Tang, Structural locations and functional roles of new subsites S5, S6, and S7 in memapsin 2 (beta-secretase), *Biochemistry*, **2005**, 44: 105-112.
- [131] O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A.M. D'Ursi, P.A. Temussi, D. Picone, Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain, *European journal of biochemistry / FEBS*, **2002**, 269: 5642-5648.
- [132] E. Gazit, A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **2002**, 16: 77-83.
- [133] E. Gazit, Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. Model short peptides as a key research tool, *The FEBS journal*, **2005**, 272: 5971-5978.
- [134] T. Luhrs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Dobeli, D. Schubert, R. Riek, 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2005**, 102: 17342-17347.
- [135] C.H. Davis, M.L. Berkowitz, Interaction between amyloid-beta (1-42) peptide and phospholipid bilayers: a molecular dynamics study, *Biophysical journal*, **2009**, 96: 785-797.

- [136] T. Hamaguchi, K. Ono, M. Yamada, REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease, *CNS neuroscience & therapeutics*, **2010**, 16: 285-297.
- [137] M. Bajda, S. Boryczka, J. Wietrzyk, B. Malawska, Investigation of lipophilicity of anticancer-active thioquinoline derivatives, *Biomedical chromatography : BMC*, **2007**, 21: 123-131.
- [138] M. Bajda, A. Bucki, J. Szlek, M. Szwaczkiewicz, M. Swierczek, B. Malawska, Determination of lipophilicity of alpha-(4-phenylpiperazine) derivatives of N-benzylamides using chromatographic and computational methods, *Biomedical chromatography : BMC*, **2008**, 22: 428-432.
- [139] J. Fraczyk, B. Kolesinska, A. Czarnecka, B. Malawska, A. Wieckowska, M. Bajda, Z.J. Kaminski, Application of a Library of Artificial Receptors Formed by Self-Organization of N-Lipidated Peptides Immobilized on Cellulose for Preliminary Studies of Binding of N-Phenylpiperazines, *QSAR & Combinatorial Science*, **2009**, 28: 728-736.
- [140] A. Więckowska, M. Bajda, K. Więckowski, B. Malawska, Chromatographic and computational studies of the physicochemical properties of cholinesterase inhibitors — alkyl- and arylcarbamate derivatives of N-benzylpiperidine and N-benzylpiperazine, *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, **2010**, 23: 359-364.
- [141] M. Bajda, A. Wieckowska, B. Malawska, Electrophoretically mediated microanalysis technique as a tool for the rapid screening of novel acetylcholinesterase inhibitors, *Acta poloniae pharmaceutica*, **2009**, 66: 357-362.
- [142] A. Wieckowska, M. Bajda, N. Guzior, B. Malawska, Novel alkyl- and arylcarbamate derivatives with N-benzylpiperidine and N-benzylpiperazine moieties as cholinesterases inhibitors, *European journal of medicinal chemistry*, **2010**, 45: 5602-5611.
- [143] M. Bajda, D. Panek, M. Hebda, A. Wieckowska, N. Guzior, B. Malawska, Search for Potential Cholinesterase Inhibitors from the Zinc Database by Virtual Screening Method, *Acta poloniae pharmaceutica*, **2015**, 72: 737-745.
- [144] M. Bajda, A. Gula, K. Wieckowski, B. Malawska, Determination of lipophilicity of gamma-butyrolactone derivatives with anticonvulsant and analgesic activity using micellar electrokinetic chromatography, *Electrophoresis*, **2013**, 34: 3079-3085.
- [145] K. Wieckowski, K. Salat, J. Bytnar, M. Bajda, B. Filipek, J.P. Stables, B. Malawska, Search for anticonvulsant and analgesic active derivatives of dihydrofuran-2(3H)-one, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2012**, 20: 6533-6544.
- [146] A. Czopek, A. Zagórska, M. Bajda, K. Stanisiz-Wallis, M. Pawłowski, The Lipophilicity Estimation of Selected Dermatological Drugs Using Micellar Electrokinetic Chromatography Method, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2015**, 38: 1435-1438.
- [147] A. Skrzypek, J. Matysiak, A. Niewiadomy, M. Bajda, P. Szymanski, Synthesis and biological evaluation of 1,3,4-thiadiazole analogues as novel AChE and BuChE inhibitors, *European journal of medicinal chemistry*, **2013**, 62: 311-319.
- [148] M. Yar, M. Bajda, R.A. Mehmood, L.R. Sidra, N. Ullah, L. Shahzadi, M. Ashraf, T. Ismail, S.A. Shahzad, Z.A. Khan, S.A. Naqvi, N. Mahmood, Design and Synthesis of New Dual Binding Site Cholinesterase Inhibitors: in vitro Inhibition Studies with in silico Docking, *Letters in drug design & discovery*, **2014**, 11: 331-338.

- [149] S. Mutahir, J. Jonczyk, M. Bajda, I.U. Khan, M.A. Khan, N. Ullah, M. Ashraf, A. Quratul, S. Riaz, S. Hussain, M. Yar, Novel biphenyl bis-sulfonamides as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies, *Bioorganic chemistry*, **2016**, 64: 13-20.
- [150] P. Szymanski, M. Markowicz, M. Bajda, B. Malawska, E. Mikiciuk-Olasik, Synthesis and Biological Activity of New 2,3-dihydro-1H-cyclopenta[b]-quinoline Derivatives as Acetylcholinesterase Inhibitors, *Letters in drug design & discovery*, **2012**, 9: 645-654.
- [151] P. Szymanski, A. Laznickova, M. Laznicek, M. Bajda, B. Malawska, M. Markowicz, E. Mikiciuk-Olasik, 2,3-dihydro-1H-cyclopenta[b]quinoline derivatives as acetylcholinesterase inhibitors-synthesis, radiolabeling and biodistribution, *International journal of molecular sciences*, **2012**, 13: 10067-10090.
- [152] P. Szymanski, M. Markowicz, M. Bajda, B. Malawska, E. Mikiciuk-Olasik, Synthesis, biological activity and molecular modeling of 4-fluoro-N-[omega-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)-alkyl]-benzamide derivatives as cholinesterase inhibitors, *Arzneimittel-Forschung*, **2012**, 62: 655-660.
- [153] P. Szymanski, R. Skibinski, T. Inglot, M. Bajda, J. Jonczyk, B. Malawska, E. Mikiciuk-Olasik, New tacrine analogs as acetylcholinesterase inhibitors - theoretical study with chemometric analysis, *Molecules*, **2013**, 18: 2878-2894.
- [154] E. Gniazdowska, P. Kozminski, M. Wasek, M. Bajda, J. Sikora, E. Mikiciuk-Olasik, P. Szymanski, Synthesis, physicochemical and biological studies of technetium-99m labeled tacrine derivative as a diagnostic tool for evaluation of cholinesterase level, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2017**, 25: 912-920.
- [155] K. Lodarski, J. Jonczyk, N. Guzior, M. Bajda, J. Gladysz, J. Walczyk, M. Jelen, B. Morak-Mlodawska, K. Pluta, B. Malawska, Discovery of butyrylcholinesterase inhibitors among derivatives of azaphenothiazines, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, **2015**, 30: 98-106.
- [156] M. Bajda, K.J. Kuder, D. Lazewska, K. Kiec-Kononowicz, A. Wieckowska, M. Ignasik, N. Guzior, J. Jonczyk, B. Malawska, Dual-acting diether derivatives of piperidine and homopiperidine with histamine H(3) receptor antagonistic and anticholinesterase activity, *Archiv der Pharmazie*, **2012**, 345: 591-597.
- [157] D. Lazewska, J. Jonczyk, M. Bajda, N. Szalaj, A. Wieckowska, D. Panek, C. Moore, K. Kuder, B. Malawska, K. Kiec-Kononowicz, Cholinesterase inhibitory activity of chlorophenoxy derivatives-Histamine H3 receptor ligands, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2016**, 26: 4140-4145.
- [158] J. Handzlik, M. Bajda, M. Zygmunt, D. Maciag, M. Dybala, M. Bednarski, B. Filipek, B. Malawska, K. Kiec-Kononowicz, Antiarrhythmic properties of phenylpiperazine derivatives of phenytoin with alpha(1)-adrenoceptor affinities, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2012**, 20: 2290-2303.
- [159] M. Yar, M. Bajda, L. Shahzadi, S.A. Shahzad, M. Ahmed, M. Ashraf, U. Alam, I.U. Khan, A.F. Khan, Novel synthesis of dihydropyrimidines for alpha-glucosidase inhibition to treat type 2 diabetes: in vitro biological evaluation and in silico docking, *Bioorganic chemistry*, **2014**, 54: 96-104.
- [160] M. Yar, M. Bajda, S. Shahzad, N. Ullah, M.A. Gilani, M. Ashraf, A. Rauf, A. Shaukat, Organocatalyzed solvent free an efficient novel synthesis of 2,4,5-trisubstituted

- imidazoles for alpha-glucosidase inhibition to treat diabetes, *Bioorganic chemistry*, **2015**, 58: 65-71.
- [161] S. Riaz, I.U. Khan, M. Bajda, M. Ashraf, A. Qurat Ul, A. Shaukat, T.U. Rehman, S. Mutahir, S. Hussain, G. Mustafa, M. Yar, Pyridine sulfonamide as a small key organic molecule for the potential treatment of type-II diabetes mellitus and Alzheimer's disease: In vitro studies against yeast alpha-glucosidase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Bioorganic chemistry*, **2015**, 63: 64-71.
- [162] A. Farooq, L. Shahzadi, M. Bajda, N. Ullah, A. Rauf, S.A. Shahzad, A.F. Khan, M. Ashraf, M. Yar, Organocatalyzed Novel Synthetic Methodology for Highly Functionalized Piperidines as Potent alpha-Glucosidase Inhibitors, *Archiv der Pharmazie*, **2016**, 349: 724-732.
- [163] S.A. Shahzad, M. Yar, M. Bajda, B. Jadoon, Z.A. Khan, S.A. Naqvi, A.J. Shaikh, K. Hayat, A. Mahmmod, N. Mahmood, S. Filipek, Synthesis and biological evaluation of novel oxadiazole derivatives: a new class of thymidine phosphorylase inhibitors as potential anti-tumor agents, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2014**, 22: 1008-1015.
- [164] S.A. Shahzad, M. Yar, M. Bajda, L. Shahzadi, Z.A. Khan, S.A. Naqvi, S. Mutahir, N. Mahmood, K.M. Khan, Synthesis, thymidine phosphorylase inhibition and molecular modeling studies of 1,3,4-oxadiazole-2-thione derivatives, *Bioorganic chemistry*, **2015**, 60: 37-41.
- [165] A. Rauf, S. Shahzad, M. Bajda, M. Yar, F. Ahmed, N. Hussain, M.N. Akhtar, A. Khan, J. Jonczyk, Design and synthesis of new barbituric- and thiobarbituric acid derivatives as potent urease inhibitors: Structure activity relationship and molecular modeling studies, *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2015**, 23: 6049-6058.
- [166] I. Kufareva, V. Katritch, R.C. Stevens, R. Abagyan, Advances in GPCR modeling evaluated by the GPCR Dock 2013 assessment: meeting new challenges, *Structure*, **2014**, 22: 1120-1139.
- [167] D. Latek, M. Bajda, S. Filipek, A Hybrid Approach to Structure and Function Modeling of G Protein-Coupled Receptors, *Journal of chemical information and modeling*, **2016**, 56: 630-641.

Kraków, 15.05.2017 r.

*Mark Bajda*