UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

AUTOREFERAT

PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

MARCIN KOŁACZKOWSKI

ZAKŁAD CHEMII LEKÓW

KATEDRA CHEMII FARMACEUTYCZNEJ

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

KRAKÓW 2015

SPIS TREŚCI

1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA DOROBKU NAUKOWEGO 3

2. PREZENTACJA OSIĄGNIĘĆ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI 5

2.1. WYKAZ PRAC STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI 5

2.2. PREZENTACJA WYNIKÓW STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI 7

2.2.1. Behawioralne i Psychologiczne Symptomy Demencji (BPSD) jako poważny, niezaspokojony problem medyczny 7

2.2.2. Strategia poszukiwania nowych kandydatów na leki przeciw BPSD na poziomie przedklinicznym 10

2.2.3. Nowe kierunki w modelowaniu receptorów monoaminergicznych, jako celów biologicznych dla działania nowych leków 15

2.2.4. Koncepcja pochodnych arylosulfonamidowych blokujących receptory 5-$HT_{6/7/2A}$ oraz D_2, jako nowych kandydatów na leki przeciw psychozie w demencji 20

2.2.5. Poszerzona charakterystyka farmakologiczna molekuł wiodących z grupy wielofunkcyjnych antagonistów receptorów 5-$HT_{6/7/2A}$ i D_2 - związków ADN-1184 i ADN-2157, w porównaniu z aktualnie stosowanymi lekami przeciwpsychotycznymi 27

2.2.6. Dualni antagoniści receptora 5-HT_6 / częściowi agoniści receptora D_2, jako nowa klasa ligandów wielofunkcyjnych o potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej i prokognitywnej 32

2.2.7. Poszerzona charakterystyka farmakologiczna molekuły wiodącej z grupy dualnych antagonistów receptora 5-HT_6 / częściowych agonistów receptora D_2 – związku ADN-2013, w porównaniu z substancjami referencyjnymi 38

3. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH 41

3.1. AKTYWNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA 41

3.2. AKTYWNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA 43

4. PIŚMIENNICTWO 54

1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA DOROBKU NAUKOWEGO

Moje prace naukowe dotyczą szeroko pojętych badań nad poszukiwaniem nowych substancji biologicznie aktywnych, z myślą o uzyskaniu nowych kandydatów na leki. Są to badania interdyscyplinarne, sięgające od modelowania molekularnego celów biologicznych i komputerowo-wspomaganego projektowania ich ligandów, po badania farmakologiczne.

Można w nich wyróżnić dwa podstawowe nurty. Pierwszy dotyczy przede wszystkim komputerowo-wspomaganego projektowania substancji biologicznie aktywnych oraz ich odpowiedniej selekcji w oparciu o dane biologiczne. Drugi skupia się na poszukiwaniu narzędzi badawczych, optymalnych do wyłaniania właściwych kandydatów na leki, w szczególności modeli molekularnych celów biologicznych, wspomagających projektowanie nowych struktur, a także odpowiednich modeli zwierzęcych i ich kombinacji, pozwalających na skuteczną selekcję nowych związków.

Swoje zainteresowania naukami przyrodniczymi rozwijałem już w szkole średniej, w ramach fakultetu biologiczno-chemicznego, a następnie kontynuowałem podczas studiów na krakowskim Wydziale Farmaceutycznym. Wtedy to, podczas zajęć z chemii leków i farmakologii w sposób szczególny zainteresowałem się problematyką farmakoterapii schorzeń neuropsychiatrycznych, w szczególności zaburzeń psychotycznych i afektywnych. Rozwój i przygotowanie do pracy naukowej bardzo ułatwiło mi zatrudnienie w lutym 2000 roku (jeszcze w czasie studiów) w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM, na etacie technicznym, gdzie rozpocząłem prace naukowe pod kierunkiem prof. Macieja Pawłowskiego. Po ukończeniu studiów na kierunku Farmacja i obronie pracy magisterskiej, dotyczącej syntezy nowych pochodnych metyloksantynowych, w roku 2001 zostałem zatrudniony w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM na stanowisku asystenta. Początkowo zajmowałem się syntezą chemiczną, a następnie rozpocząłem kształcenie w dziedzinie modelowania molekularnego. Istotne znaczenie miał w tym zakresie staż naukowy, który odbyłem w latach 2002-2006 w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, pod kierunkiem prof. Andrzeja Bojarskiego. Współpraca zaowocowała szeregiem publikacji naukowych, a w szczególności opracowaniem nowej generacji modeli receptorów serotoninowych typu 5-HT_{1A} i 5-HT_7, uwzględniających swobodę konformacyjną miejsca wiążącego. Prace te stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej, którą obroniłem w roku 2007 na Wydziale Farmaceutycznym UJCM. Zostałem wtedy również stypendystą Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (FNP), w ramach programu START. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych zostałem zatrudniony w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM na stanowisku adiunkta, a także w Dziale Badań i Rozwoju polskiej firmy farmaceutycznej Adamed, na stanowisku kierownika projektów innowacyjnych. Od tej pory, większość moich prac badawczych związana była z projektem „Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – schizofrenii, depresji, lęku", którego byłem kierownikiem.

Projekt ten był multidyscyplinarnym przedsięwzięciem, realizowanym w latach 2008-2013 przez konsorcjum naukowo-przemysłowe, koordynowane przez firmę Adamed, w skład którego weszło kilkudziesięciu naukowców z Wydziału Farmaceutycznego UJCM, Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie i Politechniki Krakowskiej. Projekt ten był dofinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu Inicjatywa Technologiczna I. W ramach projektu opracowano i przebadano szeroką grupę ponad 4 tysięcy związków innowacyjnych oddziałujących z metabotropowymi receptorami monoaminergicznymi, głównie typu 5-HT_6 i 5-HT_7 oraz glutaminianergicznymi typu $mGluR_2$, z których najaktywniejsze stały się przedmiotem 5 krajowych i 5 międzynarodowych zgłoszeń patentowych, a także publikacji naukowych. Część badań przeprowadzonych w ramach niniejszego projektu stała się przedmiotem prac stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

Aktualnie mój dorobek naukowy obejmuje 94 pozycje. Składa się na niego 32 publikacje naukowe, w tym 29 pełnotekstowych publikacji oryginalnych w angielskojęzycznych, recenzowanych czasopismach, posiadających impact factor, 2 polskojęzyczne, recenzowane publikacje przeglądowe i 1 praca poglądowa, 5 polskich i 5 międzynarodowych zgłoszeń patentowych, oraz 52 doniesienia konferencyjne, w tym 17 opublikowanych w suplementach do czasopism posiadających impact factor. Sumaryczny współczynnik oddziaływania impact factor (IF) publikacji recenzowanych wynosi 80,517 co odpowiada punktacji MNiSW = 729. Całkowita liczba cytowań wynosi 252, w tym bez autocytowań 225, a indeks Hirsha h=8.

Do chwili obecnej brałem/biorę udział łącznie w 16 projektach naukowych, w tym 1 dofinansowanym przez NCBiR oraz 1 finansowanym przez firmę farmaceutyczną - jako kierownik projektu, 7 grantach KBN/MNiSW/NCN jako wykonawca, 1 projekcie statutowym i 6 projektach własnych finansowanych przez UJCM, jako kierownik projektu.

2. PREZENTACJA OSIĄGNIĘĆ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCE 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. NR 65, POZ. 595, Z PÓŹN. ZM.)

Przedmiotem istotnego osiągnięcia naukowego, będącego podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego jest **powiązany tematycznie cykl 7 publikacji** zatytułowany: „**Nowe kierunki w poszukiwaniu farmakoterapii behawioralnych i psychologicznych symptomów demencji**". Obejmuje on 5 oryginalnych artykułów pełnotekstowych, opublikowanych w anglojęzycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, posiadających *impact factor* oraz 2 międzynarodowe zgłoszenia patentowe, opublikowane przez Światową Organizację Własności Intelektualnej (WIPO). Zgodnie z analizą bibliometryczną, łączny współczynnik *impact factor* cyklu publikacji wynosi **20,33**, a odpowiadająca mu punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to **190** punktów. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, a w zgłoszeniach patentowych głównym twórcą.

2.1. WYKAZ PRAC STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

H1 - Kołaczkowski, M.; Mierzejewski, P.; Bienkowski, P.; Wesołowska, A.; Newman-Tancredi, A. "Antipsychotic, Antidepressant, and Cognitive-Impairment Properties of Antipsychotics: Rat Profile and Implications for Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia." *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2014**, *387*, 545–557. IF_{2013}=2,360; KBN/MNiSW 25

H2 - Kołaczkowski, M.; Bucki, A.; Feder, M.; Pawłowski, M. "Ligand-Optimized Homology Models of D1 and D2 Dopamine Receptors: Application for Virtual Screening." *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 638–648. IF_{2013}=4,068; KBN/MNiSW 40

H3 - Kolaczkowski M., Kowalski P., Jaskowska J., Marcinkowska M., Mitka K., Bucki A., Wesolowska A., Pawlowski M., "Arylsulfonamides for the Treatment of CNS Diseases. WO2012035123", **2013**.01.03

H4 - Kołaczkowski, M.; Marcinkowska, M.; Bucki, A.; Pawłowski, M.; Mitka, K.; Jaśkowska, J.; Kowalski, P.; Kazek, G.; Siwek, A.; Wasik, A.; Wesołowska, A.; Mierzejewski, P.; Bienkowski, P. "Novel Arylsulfonamide Derivatives with 5-HT6/5-HT7 Receptor Antagonism Targeting Behavioral and

Psychological Symptoms of Dementia." *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4543–4557. IF_{2013}=5,480; KBN/MNiSW 45

H5 - Kołaczkowski, M.; Mierzejewski, P.; Bieńkowski, P.; Wesołowska, A.; Newman-Tancredi, A. "ADN-1184 a Monoaminergic Ligand with 5-HT6/7 Receptor Antagonist Activity: Pharmacological Profile and Potential Therapeutic Utility." *British Journal of Pharmacology* **2014**, *171*, 973–984. IF_{2013}=4,990; KBN/MNiSW 40

H6 - Kołaczkowski M, Marcinkowska M, Bucki A, Pawłowski M, Kazek G, Bednarski M, Wesołowska A. "Indoleamine derivatives for the treatment of central nervous system diseases, WO2013001499." **2013**.01.03

H7 - Kołaczkowski, M.; Marcinkowska, M.; Bucki, A.; Sniecikowska J; Pawłowski, M.; Kazek, G.; Siwek, A.; Jastrzębska-Więsek, M; Anna Partyka, A; Wasik, A.; Wesołowska, A.; Mierzejewski, P.; Bienkowski, P. "Novel 5-HT6 Receptor Antagonists / D2 Receptor Partial Agonists Targeting Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia." *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 92, 221-235. IF_{2013}=3,432; KBN/MNiSW 40

2.2. PREZENTACJA WYNIKÓW STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

2.2.1. Behawioralne i Psychologiczne Symptomy Demencji (BPSD) jako poważny, niezaspokojony problem medyczny

Demencja (otępienie) jest zespołem stopniowego pogorszenia funkcji poznawczych, powiązanego z zaburzeniami behawioralnymi i psychologicznymi oraz trudnościami w codziennym funkcjonowaniu (Hersch i Falzgraf, 2007). Najpoważniejszą kategorią czynników uszkadzających mózg w takim stopniu, że pojawiają się objawy otępienia, są choroby neurodegeneracyjne, prowadzące do postępującego zwyrodnienia tkanki nerwowej. Według klasyfikacji ICD-10 można wyróżnić między innymi otępienie w chorobie Alzheimera (ang. Dementia of the Alzheimer Type*, DAT*), a także otępienie w chorobie Picka (skroniowo-czołowe), otępienie w chorobie Huntingtona, otępienie w chorobie Parkinsona oraz bardzo do niego podobne otępienie z ciałkami Lewy`ego. Przyczyną uszkodzenia mózgu prowadzącego do demencji mogą być choroby infekcyjne, takie jak choroba Creutzfeldta-Jacoba (zaliczana równolegle do chorób neurodegeneracyjnych), zakażenie wirusem HIV/AIDS czy neuroborelioza. Obok chorób neurodegeneracyjnych i zakaźnych do powstania objawów demencji mogą prowadzić również choroby naczyniowe, takie jak udar mózgu, mogący stać się przyczyną tzw. otępienia z ostrym początkiem lub otępienia wielozawałowego (po serii udarów). U osób w podeszłym wieku najbardziej rozpowszechnioną przyczyną demencji jest choroba Alzheimera. Globalne rozpowszechnienie demencji szacuje się na około 3.9% populacji w wieku powyżej 60 roku życia (Ferri et al., 2005), co oznacza, że aktualnie na świecie żyje około 35,6 millionów ludzi z różnymi formami demencji. W świetle przewidywanego wzrostu długości życia, ta liczba podwoi się do roku 2030, a potroi do 2050. Demencja stanowi więc bardzo poważny i rosnący problem medyczny i społeczny.

Oprócz osiowych zaburzeń poznawczych, aż 60% pacjentów z demencją doświadcza także tzw. behawioralnych i psychologicznych symptomów demencji (ang. behavioral and psychological symptoms of dementia – BPSD). Wyróżnić tu można zaburzenia psychotyczne (urojenia i halucynacje), depresję, apatię, odhamowanie seksualne, drażliwość, agresję słowną i fizyczną, pobudzenie psychoruchowe i lęk (Carson et al., 2006; Jeste et al., 2008). Na przykład, od 40 do 60% pacjentów cierpiących na demencję doświadcza w pewnym stadium choroby znaczących zaburzeń depresyjnych (Hersch i Falzgraf, 2007), a rozpowszechnienie objawów psychotycznych może sięgać 63% pacjentów w przypadku urojeń oraz 41% pacjentów w przypadku halucynacji (Jeste et al., 2008). BPSD mogą wystąpić w każdym stadium choroby, przy czym niektóre objawy są bardziej powszechne w łagodnym otępieniu (depresja, apatia, lęk, drażliwość), podczas gdy inne występują częściej w bardziej zaawansowanych stadiach demencji (urojenia, halucynacje, odhamowanie) (Hersch i

Falzgraf, 2007). Wykazano wielokrotnie, że to właśnie BPSD stanowią główny ciężar zarówno dla samych chorych z otępieniem jak i ich opiekunów, odczuwany nawet bardziej dotkliwie niż podstawowe zaburzenia poznawcze. Występowanie BPSD wiąże się także z gorszą prognozą postępu choroby, szybszą utratą funkcji poznawczych oraz szczególnym upośledzeniem życia codziennego. Towarzyszące demencji psychoza, pobudzenie, agresja i depresja są wiodącymi predyktorami instytucjonalizacji pacjenta i stanowią podstawowe cele w leczeniu BPSD z perspektywy klinicznej i społecznej (Amano et al., 2009; Gauthier et al., 2010; Hersch i Falzgraf, 2007).

Do połowy lat dziewięćdziesiątych XX wieku, lekami z wyboru w terapii BPSD były leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji (tzw. neuroleptyki typowe), szczególnie w przypadku wystąpienia urojeń i halucynacji. Wykazano, iż główny przedstawiciel tej klasy leków, haloperidol, nie ma wpływu na pobudzenie lub objawy behawioralne jako całość, to ogranicza agresję. Jednocześnie, metaanaliza badań klinicznych wykazała brak różnic pomiędzy antypsychotykami pierwszej generacji w skuteczności wobec BPSD (Sink et al., 2005). W późniejszych latach, neuroleptyki typowe zostały częściowo zastąpione w terapii BPSD lekami przeciwpscyhotycznymi drugiej generacji (tzw. neuroleptykami atypowymi) (De Deyn et al., 2005), które charakteryzują się niższą tendencja do wywoływania zaburzeń pozapiramidowych (polekowe zaburzenia pseudoparkinsonowskie, ang. extrapyramidal symptoms – EPS) oraz wyższą skutecznością, w porównaniu z lekami pierwszej generacji (Liperoti et al., 2008).

Jednakowoż, efektywność i bezpieczeństwo leków aktualnie stosowanych w terapii BPSD nie są satysfakcjonujące (Nobili et al., 2009). Wykonany w ramach działalności organizacji Cochrane (http://www.cochranelibrary.com/), przegląd 16 badań klinicznych z użyciem leków przeciwpsychotycznych drugiej generacji w leczeniu BPSD ujawnił, że risperidon i olanzapina były skuteczne w leczeniu agresji, a risperidon był także skuteczniejszy od placebo w terapii psychozy związanej z demencją (Ballard i Waite, 2006). Oba leki wywoływały jednak znaczące działania niepożądane o charakterze zaburzeń pozapiramidowych oraz incydentów sercowo-naczyniowych. Tymczasem aripiprazol nie wykazał przewag nad placebo w leczeniu urojeń i halucynacji u pacjentów z psychozą towarzyszącą chorobie Alzheimera (De Deyn et al., 2005). Stosowanie leków przeciwpsychotycznych w terapii BPSD jest dodatkowo komplikowane przez fakt, że leki te nasilają istniejące zaburzenia poznawcze, co jest szczególnie niekorzystne w przypadku pacjentów z demencją (Fasano et al., 2012; Jeste et al., 2008; Vigen et al., 2011).

W świetle tych faktów, od roku 2005 amerykańska Agencja ds. Leków i Żywności (US Food and Drug Administration – FDA) żąda umieszczania specjalnych ostrzeżeń na ulotkach leków przeciwpsychotycznych drugiej generacji. Ostrzeżenia te (tzw. „boxed warnings”) są związane z

występowaniem poważnych działań niepożądanych i zwiększonym ryzykiem śmierci, w przypadku stosowania atypowych neuroleptyków u chorych z demencją (U.S. Food and Drug Administration, 2005). Od roku 2008, wymóg podobnych ostrzeżeń zastosowano również w przypadku leków przeciwpsychotycznych pierwszej generacji (U.S. Food and Drug Administration, 2008).

Pomimo tego, leki przeciwpsychotyczne nie przestają być szeroko stosowane u pacjentów z BPSD (Schneider et al., 2006b; Schulze et al., 2013b), bez wątpienia głównie dlatego, że nie ma dla nich żadnej korzystniejszej alternatywy (Schulze et al., 2013a). Aktualnie brak jest leków dopuszczonych do terapii psychoz związanych z demencją, jak również nie ma leków przeciwdepresyjnych, przeciwlękowych, czy anty-agresywnych opracowanych specjalnie w celu zaspokojenia potrzeb terapeutycznych osób starszych. Należy przy tym zauważyć, że mimo takiego stanu rzeczy i ogromnej potrzeby medycznej, BPSD pozostają poza głównym nurtem badań wiodących firm farmaceutycznych oraz laboratoriów akademickich. Tak długo jak demencji nie uda się skutecznie zapobiegać albo leczyć jej przyczynowo (przerywać, czy odwracać postęp choroby), kluczowym jest opracowanie optymalnej terapii objawowej. Zaspokojenie zapotrzebowania medycznego na efektywną i bezpieczną farmakoterapię BPSD, wymaga opracowania strategii poszukiwania nowych leków, pozwalających na ocenę nowych substancji chemicznych w modelach stosownych do leczonego zaburzenia. W szczególności, nowe leki powinny łagodzić objawy psychotyczne i/lub depresyjne, równocześnie nie interferując negatywnie z funkcjami poznawczymi i motorycznymi (Fasano et al., 2012; Jeste et al., 2008).

2.2.2. Strategia poszukiwania nowych kandydatów na leki przeciw BPSD na poziomie przedklinicznym

Jak wcześniej wspomniano, BPSD znajdują się poza głównym nurtem badawczym zarówno wiodących firm farmaceutycznych, jak i laboratoriów akademickich, a skala problemu i konieczność jego pilnego rozwiązania zaczęła przebijać się do szerszej świadomości stosunkowo niedawno. W związku z tym, w przeciwieństwie do takich schorzeń jak schizofrenia czy depresja, brak jest „tradycji" w poszukiwaniu leków przeciw BPSD, oraz ustalonych kanonów postępowania na etapie badań przedklinicznych. Wczesne badania farmakologiczne, specyficznie ukierunkowane na BPSD, są szczególnie utrudnione przez brak modeli zwierzęcych, specyficznych dla tego schorzenia. Wobec powyższego, charakterystyka farmakologiczna nowych kandydatów na leki, musi aktualnie opierać się na odpowiednio dobranej palecie znanych testów, odpowiednich dla poszczególnych objawów z grupy BPSD. Tymczasem, porównawcze, przedkliniczne dane farmakologiczne są zaskakująco ubogie i fragmentaryczne, a badania obejmujące równolegle aktywność kilku leków przeciwpsychotycznych w zwierzęcych modelach psychozy, depresji i zaburzeń funkcji poznawczych - niezmiernie rzadkie. Zidentyfikowano zatem potrzebę wyboru stosownej baterii testów, spośród modeli zwierzęcych, powszechnie używanych jako procedury skriningowe w poszukiwaniu nowych leków psychotropowych, oraz wykonania z ich użyciem charakterystyki grupy klinicznie stosowanych leków przeciwpsychotycznych, jako bazy i punktu odniesienia dla prac nad związkami innowacyjnymi – kandydatami na leki przeciw BPSD. Badania te zostały przedstawione w pracy **H1**.

Brak wyraźnej separacji pomiędzy dawkami wywołującymi aktywność przeciwpsychotyczną i przeciwdepresyjną, a tymi prowadzącymi do zaburzeń funkcji poznawczych i motorycznych, może limitować możliwość stosowania leków przeciwpsychotycznych w terapii BPSD (Ballard et al., 2009; Jeste et al., 2008; Potenza i McDougle, 1998). W związku z tym, głównym celem niniejszej pracy (**H1**) było określenie zależności między dawkami wywołującymi aktywność przeciwpsychotyczną, przeciwdepresyjną, amnestyczną i upośledzającą ruchowo, dla szerokiej grupy leków przeciwpsychotycznych.

Porównano dwa neuroleptyki pierwszej generacji (haloperidol i chlorpromazynę) z aktualnie, powszechnie stosowanymi neuroleptykami drugiej generacji (klozapiną, olanzapiną, risperidonem i aripiprazolem) oraz z lurasidonem i asenapiną, które zostały ostatnio wprowadzone do terapii (Ishibashi et al., 2010; Schatzberg i Nemeroff, 2009).

Jako miary aktywności przeciwpsychotycznej, użyto testu odwracania hiperlokomocji wywołanej podaniem dizocilpiny (MK-801) – niekompetytywnego antagonisty receptorów NMDA. Test ten został wybrany z uwagi na rolę receptorów NMDA w różnych formach demencji (Olivares et al., 2012) oraz

fakt, że gęstość receptorów NMDA w korze czołowej pacjentów z choroba Alzheimera jest obniżona, co stwierdzono analizując próbki mózgów post mortem (Scheuer et al., 1996). Sugeruje to, że dysfunkcja receptorów NMDA może leżeć u podłoża niektórych aspektów choroby, takich jak podatność na występowanie objawów psychotycznych.

Zgodnie z oczekiwaniami, biorąc pod uwagę aktywność kliniczną, większość leków przeciwpsychotycznych odwracała hiperlokomocję wywołaną MK-801. Spośród nowszych leków, lurasidon i asenapina, ale nie aripiprazol, wykazały znaczącą aktywność w tym teście. Jest to zgodne z niską aktywnością aripiprazolu, częściowego agonisty receptorów D_2, w kontrolowaniu zaburzeń psychotycznych u pacjentów z chorobą Alzheimera (De Deyn et al., 2005; Schneider et al., 2006a) i podkreśla istotną rolę testu odwracania hiperlokomocji wywołanej MK-801, jako kryterium selekcji nowych kandydatów na leki przeciw psychozie w demencji (**H1**).

W teście katalepsji, badane leki, z wyjątkiem klozapiny, aripiprazolu i lurasidonu, wywoływały dawko-zależny efekt, korelujący z ich podatnością do indukowania zaburzeń pozapiramidowych w warunkach klinicznych. Wszystkie badane leki hamowały również spontaniczną aktywność lokomotoryczną, w dawkach zbliżonych do aktywnych w teście na aktywność przeciwpsychotyczną, odzwierciedlając ich właściwości sedatywne. Te aspekty aktywności farmakologicznej mogą mieć szczególne znaczenie w kontekście poszukiwania leków przeciw BPSD, ponieważ starsi pacjenci z demencją często cierpią na zaburzenia koordynacji motorycznej i inne zaburzenia sfery ruchowej (Fasano et al., 2012). Pożądanym zatem byłoby, aby nowi kandydaci na leki przeciw BPSD byli pozbawieni tego typu niepożądanych aktywności.

Zaburzenia nastroju i objawy depresyjne są bardzo częste u pacjentów z demencją, szczególnie na jej wczesnym etapie (Hersch i Falzgraf, 2007). Dane kliniczne wskazują, że samo hamowanie wychwytu zwrotnego monoamin przez leki z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny (ang. selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI), selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny i noradrenaliny (ang. selective serotonin and norepinephrine inhibitors, SNRI), czy trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (TLPD), nie zapewnia optymalnej terapii przeciwdepresyjnej dla wielu pacjentów. W istocie, aktualnie stosowane leki przeciwdepresyjne wywołują szerokie nasilenie transmisji monoaminergicznej, które oddziałuje na wszystkie receptory serotoninowe i noradrenergiczne, włączając w to te, których aktywacja może limitować odpowiedź przeciwdepresyjną, np. receptory 5-HT_6 i 5-HT_7. Tak więc, efektywność wspomagającej terapii przeciwdepresyjnej z użyciem leków przeciwpsychotycznych, może wynikać z wywoływanej przez nie blokady celów biologicznych hamujących działanie przeciwdepresyjne (Carr et al., 2011). Zdolność leków przeciwpsychotycznych do łagodzenia objawów depresyjnych jest coraz częściej zauważana, czego odzwierciedleniem jest

stosowanie olanzapiny, risperidonu i aripiprazolu do leczenia depresji lekoopornej lub choroby afektywnej-dwubiegunowej, w połączeniu z lekami przeciwdepresyjnymi (Komossa et al., 2010) lub, jak w przypadku kwetiapiny, w monoterapii (Weisler et al., 2012).

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania (**H1**) pokazują, że leki przeciwpsychotyczne używane w terapii BPSD charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością w teście wymuszonego pływania wg. Porsolt'a (ang. forced swimming test – FST), klasycznym modelu do wykrywania potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej. W większości przypadków, badane leki wykazywały aktywność tylko w jednej dawce. Jest to prawdopodobnie odzwierciedleniem ich wieloreceptorowego profilu działania, skutkującego interferencją różnych celów biologicznych w wywoływaniu efektu przeciwdepresyjnego w szerszym zakresie dawek. Olanzapina i lurasidon były aktywne w dawkach 3-krotnie niższych od tych aktywnych w teście z MK-801,podczas gdy risperidon wykazał aktywność w tej samej dawce, która była najniższą efektywną przeciwpsychotycznie. Wartą zauważenia jest aktywność klasycznego neuroleptyku, haloperidolu, w bardzo niskich dawkach, około 10-30-krotnie niższych niż przeciwpsychotyczne, co jest prawdopodobnie skutkiem blokady presynaptycznych receptorów D_2 i wynikającym z niej nasileniem transmisji dopaminergicznej w układzie limbicznym (Lucas i Spampinato, 2000).

Jedynym lekiem, który wykazał znamienną aktywność przeciwdepresyjną w więcej niż jednej dawce, była klozapina. Warto tu podkreślić, że klozapina jest jednym z leków przeciwpsychotycznych o najwyższej efektywności w redukcji tendencji samobójczych, parametru ściśle powiązanego z zaburzeniami nastroju (Meltzer, 2012). Klozapina była również jedynym lekiem, który wykazał aktywność przeciwdepresyjną w teście zawieszenia za ogon u myszy (ang. tail suspension test – TST), wykonanym w ramach naszego wcześniejszego badania porównawczego neuroleptyków (Wykaz publikacji – praca **D15**. Wynika z tego, że efekty przeciwdepresyjne klozapiny są mierzalne w modelach farmakologicznych i aktywność taka powinna być brana pod uwagę jako istotne kryterium w selekcji nowych kandydatów na leki, na wczesnym etapie rozwoju.

Badane neuroleptyki redukowały czas bezruchu u szczurów o około 10-15%, co jest wartością relatywnie niską. Jednakże imipramina, klasyczny lek przeciwdepresyjny testowany w tych samych warunkach, skracała bezruch o około 25%, co może świadczyć z jednej strony o istotności efektu leków przeciwpsychotycznych, a z drugiej strony wskazywać obszar do poprawy skuteczności.

Zważywszy, że zaburzenia poznawcze są główną cechą charakterystyczną demencji (Hersch i Falzgraf, 2007), kluczową jest możliwość uniknięcia leczenia BPSD z użyciem leków, które wywołują lub nasilają upośledzenie funkcji poznawczych.

W niniejszej pracy (**H1**) użyliśmy testu biernego unikania (ang. passive avoidance test – PA), klasycznego testu na pamięć, aby porównać w nim aktywność stosowanych klinicznie leków przeciwpsychotycznych. Test biernego unikania jest oparty na nabywaniu, przechowywaniu i utrzymaniu awersyjnego warunkowania Pawłowowskiego, angażującego procesy pamięci krótko- i długotrwałej. Ponadto, reakcja biernego unikania powiązana jest z uwagą, percepcją (bodźców bólowych i rozróżnieniem wizualnym kompartmentów aparatu) oraz integracją sensomotoryczną, co angażuje różne układy neuroprzekaźnikowe (Myhrer, 2003). Tak więc, nabywanie reakcji biernego unikania jest procesem złożonym, a uzyskanie na wczesnym etapie informacji czy związek upośledza ten proces, stanowi istotną wartość w selekcji nowych kandydatów na leki przeciw BPSD.

Badane leki przeciwpsychotyczne (**H1**) w większości wywoływały zaburzenia w teście biernego unikania, różniąc się przy tym profilem działania. Risperidon wywoływał zaburzenia, jednakże w dawkach 10-krotnie wyższych niż te, wymagane do osiągnięcia działania przeciwpsychotycznego. Sugeruje to, iż lek ten może wywoływać aktywność terapeutyczną bez zaburzania pamięci, chociaż jego tendencja do wywoływania katalepsji i sedacji pozostaje suboptymalna. Inne neuroleptyki, takie jak klozapina, olanzapina, lurasidon i asenapina, wykazywały niewielką lub nieistniejącą separację pomiędzy efektami przeciwpsychotycznymi i amnestycznymi. Warto zauważyć, że również nowy lek przeciwpsychotyczny lurasidon wywoływał zaburzenia w teście biernego unikania w dawkach zbliżonych do aktywnych przeciwpsychotycznie. Jest to o tyle ciekawe, że istnieją doniesienia o jego łagodnym wpływie na funkcje poznawcze, w testach labiryntu wieloramiennego, labiryntu wodnego Morris'a oraz właśnie biernego unikania (Enomoto et al., 2008; Ishiyama et al., 2007). Co więcej, pokazano, że lurasidon ma wręcz zdolność do odwracania deficytów poznawczych, wywołanych podaniem MK-801 w niskich dawkach (Ishiyama et al., 2007), sugerując separację dawek pomiędzy efektami prokognitywnymi i przeciwpsychotycznymi. Interesujące zatem byłoby powtórzenie tych eksperymentów również w innych laboratoriach oraz sprawdzenie użyteczności lurasidonu w terapii pacjentów z demencją. W odróżnieniu od pozostałych leków, aripiprazol nie wywoływał zaburzeń pamięci w teście biernego unikania, co można uznać za generalnie zgodne z jego korzystnym profilem bezpieczeństwa. Uważa się, że właściwości częściowo agonistyczne aripiprazolu wobec receptorów dopaminowych D_2 i serotoninowych 5-HT_{1A}, odpowiadają za jego „stabilizujący" wpływ na przekaźnictwo nerwowe i mogą leżeć u podłoża braku wywoływania zaburzeń biernego unikania (Tamminga i Carlsson, 2002). Niemniej jednak, niepełna blokada receptorów D_2 przez aripiprazol (wynikająca z profilu częściowo agonistycznego), może być także odpowiedzialna za jego, opisaną wcześniej, niższą skuteczność w ograniczaniu stanów psychotycznych i pobudzenia psychoruchowego (odzwierciedloną niższą zdolnością do odwracania hiperlokomocji wywołanej MK-801) oraz brak aktywności przeciwpsychotycznej u pacjentów z chorobą Alzheimera (De Deyn et al., 2005).

Podsumowując, zbadane leki przeciwpsychotyczne (**H1**) oferują ograniczoną separację pomiędzy efektami terapeutycznymi, w szczególności przeciwpsychotycznymi, a wywoływaniem zaburzeń poznawczych i motorycznych. Ten suboptymalny profil aktywności farmakologicznej w modelach zwierzęcych jest zgodny z charakterystyką ich aktywności klinicznej, która jest nieodpowiednia do terapii BPSD. Wykazano także, że stosując odpowiednią kombinację stosunkowo prostych modeli zwierzęcych, można wykryć właściwości farmakologiczne, przekładające się na sytuację kliniczną. Wobec powyższego, można stwierdzić, że otrzymanie substancji, która odwracałaby hiperlokomocję wywołaną dizocilpiną (MK-801), redukowała bezruch w teście Porsolta, równocześnie nie zaburzając biernego unikania oraz nie wywołując katalepsji i sedacji, byłoby istotnym postępem w zakresie identyfikacji nowych kandydatów na leki w BPSD. Związki wykazujące odpowiedni profil w tak dobranej palecie wstępnych testów, mogłyby być następnie poddane poszerzonej charakterystyce farmakologicznej z użyciem bardziej zaawansowanych modeli, możliwie zbliżających układ eksperymentalny do warunków klinicznych. Opracowanie takich modeli pozostaje jednakowoż ciągle sporym wyzwaniem dla współczesnej nauki.

2.2.3. Nowe kierunki w modelowaniu receptorów monoaminergicznych, jako celów biologicznych dla nowych leków

Oprócz odpowiednich strategii badawczych i modeli służących selekcji właściwych kandydatów na leki, konieczne są również skuteczne metody projektowania nowych cząsteczek chemicznych (ang. new chemical entities – NCE), pozwalające na otrzymanie związków o pożądanym profilu farmakologicznym. W projektowaniu nowych substancji biologicznie aktywnych, bardzo istotna jest wiedza o strukturze celu biologicznego, z którym oddziaływać ma projektowana cząsteczka. Jako że przedmiotem poszukiwań nowych kandydatów na leki przeciw BPSD stały się wielofunkcyjne ligandy receptorów monoaminergicznych, do ich skutecznego projektowania potrzebne były dobre modele tychże receptorów. Nowe odkrycia w zakresie ustalania struktury przestrzennej receptorów monoaminergicznych, poszerzające paletę matryc do modelowania homologicznego (Jacobson i Costanzi, 2012; Katritch et al., 2012) oraz nowe rozwiązania w obszarze oprogramowania (Andrews et al., 2014; Beuming i Sherman, 2012; Shoichet i Kobilka, 2012), pozwoliły na opracowanie nowego podejścia do modelowania homologicznego błonowych receptorów metabotropowych oraz odpowiedniego ich przygotowania do analizy sposobu wiązania ligandów oraz selekcji związków bioaktywnych (tzw. skrinigu wirtualnego). Mimo znacznego postępu w zakresie eksperymentalnego rozwiązywania struktury przestrzennej błonowych receptorów metabotropowych, struktura większości z nich, w tym wielu terapeutycznie istotnych receptorów monoaminergicznych, pozostaje nieznana. Ponadto, nawet w przypadku dostępności struktury krystalicznej danego receptora, takie zagadnienia, jak swoboda konformacyjna białka, optymalizacja geometrii miejsca wiążącego czy otrzymanie modelu odpowiedniego dla procedury wirtualnego skriningu, nadal pozostają aktualne.

W ramach wcześniejszych badań, będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej, opisana została metoda optymalizacji modeli homologicznych receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_7, oparta o oddziaływania z ligandami aktywnymi. Może być ona określana mianem “odwróconego wirtualnego skriningu”, gdyż opiera się na selekcji właściwego modelu receptora, w wyniku dokowania aktywnych, możliwie konformacyjnie usztywnionych ligandów, do szerokiego zestawu konformacji modelu receptora, utworzonego na wstępnym etapie modelowania (Wykaz publikacji – prace **D8** i **D9**). Zaletą tego podejścia było uwzględnienie pewnego stopnia swobody konformacyjnej receptora w procesie automatycznego dokowania oraz użycie informacji płynącej ze struktury liganda, na etapie selekcji optymalnej konformacji kieszeni wiążącej. Jednakowoż, pewną wadą tej metody był brak uwzględnienia kontekstu liganda na etapie tworzenia modelu, zastąpiony przez losową generację początkowego zestawu konformacji, które były następnie wybierane w procedurze dokowania. To z kolei stwarzało konieczność przeszukania bardzo szerokiego zestawu konformacji receptora, skutkując niejednokrotnie modyfikacjami pozostającymi bez związku z optymalizacją miejsca

wiążącego. Z drugiej strony, z natury ograniczona liczba konformacji, która mogła być użyta do selekcji na podstawie oddziaływania z ligandami, nie gwarantowała pełnego pokrycia konformacyjnego najistotniejszych regionów receptora.

Metoda Induced-Fit Docking (IFD), opracowana przez firmę Schrödinger, łączy fleksyjne dokowanie liganda z przewidywaniem struktury receptora i optymalizacją położenia łańcuchów bocznych miejsca wiążącego. Obejmuje ona naprzemienne dokowanie automatyczne ligandów do wstępnie wygenerowanych modeli receptorów, z wykorzystaniem wielokrokowego algorytmu programu Glide, oraz optymalizację otrzymanych kompleksów ligand-receptor z użyciem programu Prime, który umożliwia indukowaną ligandem „relaksację" receptora (Sherman et al., 2006a, 2006b). Procedura ta może być traktowane jako metoda optymalizacji modeli białek, w oparciu o strukturę ich ligandów i wydaje się być bardzo użyteczna w modelowaniu homologicznym receptorów monoaminergicznych (Phatak et al., 2010).

W pracy **H2** opisano nową metodę modelowania receptorów monoaminergicznych, opierającą się na optymalizacji miejsca wiążącego, poprzez jego dopasowywanie do ligandów bioaktywnych, na etapie tworzenia modelu, z wykorzystaniem metody IFD. Moje badania zostały przeprowadzone na przykładzie, istotnego z punktu widzenia poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwpsychotycznej, receptora dopaminowego typu D_2. Równolegle, metoda ta została przetestowana na pokrewnym receptorze dopaminowym typu D_1 (badania te wykonał w ramach swojej pracy doktorskiej dr Adam Bucki).

Za istotne uznano udzielenie odpowiedzi na następujące pytania: (1) Czy optymalizacja kieszeni wiążącej z użyciem metody IFD jest odpowiednia dla modelowania receptorów monoaminergicznych? (2) Jaka jest jej skuteczność w porównaniu ze stosowanym wcześniej „odwrotnym wirtualnym skriningiem" zestawu konformacji? (3) Jaki jest wpływ wyboru określonej matrycy dla modelowania homologicznego tych receptorów, na wyniki wirtualnego skriningu? (4) Jaki jest wpływ wyboru liganda narzędziowego do procedury IFD na jakość modelu? I wreszcie, (5) jak najbardziej efektywnie dokonać wyboru najlepszego receptora do wirtualnego skriningu dużej bazy związków?

Zważywszy, że globalne sfałdowanie oraz ukształtowanie przestrzenne struktury drugorzędowej jest bardzo podobne pomiędzy błonowymi receptorami metabotropowymi, przyjęto założenie, że klasyczne modelowanie homologiczne pozwoli na uzyskanie sensownego „rusztowania" (modelu wstępnego), oddającego ogólną strukturę przestrzenną nowo modelowanych receptorów. Z drugiej strony, szczegółowe ułożenie łańcuchów bocznych aminokwasów w miejscu wiążącym może się znacząco różnić pomiędzy poszczególnymi receptorami, w związku z czym jakość

nieoptymalizowanych modeli homologicznych w tym zakresie jest niewystarczająca, szczególnie pod kątem użycia w wirtualnym screeningu. Nawiązując do użytego przez Paula Ehrlicha porównania kompleksu enzym-substrat do klucza w zamku, zastosowaną procedurę optymalizacji modeli receptorów można by porównać do rekonstrukcji zamka w oparciu o strukturę klucza.

Nałożenie sekwencji aminokwasowych do budowy wstępnego modelu homologicznego receptora dopaminowego D_2 wykonane zostało z użyciem metaserwera Genesilico (Kurowski i Bujnicki, 2003), dającego dostęp do grupy algorytmów nakładających, między innymi algorytmu hhsearch, porównującego profile peptydowe w celu przewidywania struktury trzeciorzędowej (Söding, 2005). Jako najkorzystniejsze matryce do modelowania homologicznego, algorytm ten wskazał struktury krystaliczne receptora adrenergicznego beta2 (Cherezov et al., 2007) oraz dopaminowego D3 (Chien et al., 2010). Wstępny model homologiczny został przygotowany z użyciem serwera SwissModel (Kiefer et al., 2009), natomiast sterowana ligandem optymalizacja miejsca wiążącego, została przeprowadzona opisaną wcześniej metodą IFD, dostępną w ramach pakietu Schrodinger Suite. Jako ligandy narzędziowe do optymalizacji miejsca wiążącego, użyta została grupa związków bioaktywnych, charakteryzujących się wysokim powinowactwem do receptora D_2 (pKi = 7.1−10.6). Proces optymalizacji miejsca wiążącego przebiega etapowo. Najpierw ligand jest wstępnie dokowany do miejsca wiążącego przez program Glide, co obejmuje przybliżone umiejscowienie liganda w miejscu wiążącym i ocenę jakości wstępnego kompleksu ligand receptor. Następnie najkorzystniejsze kompleksy są optymalizowane, poprzez próbkowanie kątów torsyjnych metodą Monte Carlo. Wtedy struktura miejsca wiążącego jest dopasowywana przez program Prime do umieszczonego w nim bioaktywnego liganda, co pozwala na przeniesienie na receptor informacji o miejscu wiążącym, zakodowanej w strukturze liganda. Wreszcie, funkcja oceniająca kompleksy ligand-receptor – GlideScore, szereguje końcowe kompleksy (Friesner et al., 2006, 2004). Podczas optymalizacji metody, wprowadzono modyfikację oryginalnej procedury IFD, poprzez dodanie kolejnego cyklu optymalizacji struktury receptora oraz zastosowanie dokowania liganda z wyższą dokładnością (Glide XP – extra precision). Dzięki temu otrzymano modele pozwalające na uzyskanie lepszych wartości funkcji oceniającej GlideScore. Dla porównania, zbudowano także modele referencyjne, z użyciem opisanej wcześniej metodyki „odwrotnego wirtualnego skriningu”. W celu weryfikacji i porównania jakości otrzymanych modeli, oraz wyboru tych najlepiej rozróżniających związki aktywne i nieaktywne, przeprowadzono serię eksperymentów próbnego wirtualnego skriningu. W testach tych wykorzystano 4 bazy ligandów, o różnej wielkości i sposobie przygotowania, aby sprawdzić ich użyteczność w selekcji modeli do właściwej procedury, wielkoskalowego wirtualnego skriningu. Najważniejszą różnicą między tymi bazami był skład ligandów o zakładanym braku aktywności (tzw. wabików, ang. decoys), które miały istotny wpływ na możliwość odróżniania przez model ligandów

aktywnych. W opisie wyników wirtualnego skrinigu posłużono się dwoma uznanymi parametrami. Pierwszym z nich był współczynnik wzbogacenia (ang. enrichment factor – EF), który jest miarą przyrostu liczby odnalezionych związków aktywnych w danym segmencie bazy, uszeregowanej po wartości funkcji oceniającej, w stosunku do rozkładu losowego. Najczęściej stosuje się współczynnik wzbogacenia początkowego przedziału bazy, np. EF1%. Drugim był parametr BEDROC (ang. Boltzmann-Enhanced Discrimination of Receiver-Operating Characteristic), zwany "skalą przydatności wirtualnego skriningu" i podobnie jak EF, ocenia poprawę uszeregowania związków po przewidywanej aktywności, w stosunku do rozkładu losowego, przypisując wyższą rangę wynikom uzyskanym w początkowych przedziałach bazy.

Przeprowadzone badania (**H2**) pozwoliły na udzielenie odpowiedzi na postawione wcześniej pytania. W szczególności, zastosowanie nowej metodologii pozwoliło na uzyskanie modeli receptora D_2, które spójnie i konsekwentnie odtwarzały sposób wiązania liganda oraz wykazały skuteczność w eksperymentach wirtualnego skriningu, co znalazło odzwierciedlenie w wysokich wartościach parametrów BEDROC (0,3−0,4) i EF1% (18−20). Podkreślenia wymaga fakt, że wyniki te zostały uzyskane przy użyciu bazy testowej, zawierającej „wabiki" przefiltrowane z użyciem modelu farmakoforowego dla ligandów monoaminergicznych, co czyniło ten eksperyment wyjątkowo trudnym, z uwagi na podobieństwo strukturalne rozróżnianych związków. Wyniki uzyskane z użyciem publicznie dostępnej, nie filtrowanej farmakoforowo, a więc bardziej strukturalnie zróżnicowanej, bazy udostępnianej przez firmę Schrödinger, były jeszcze korzystniejsze (BEDROC > 0,5; EF1% > 30). Podobne wyniki uzyskano dla często stosowanego ostatnio typu bazy, zawierającej wabiki o niskim podobieństwie strukturalnym, ale zbliżonych właściwościach fizykochemicznych do zawartych w bazie związków aktywnych (tzw. property-matched decoys). Stanowi to dodatkowe potwierdzenie jakości nowych modeli (**H2**).

Modele referencyjne, otrzymane z użyciem metody „odwrotnego wirtualnego screeningu", wypadły w tych samych testach znacząco słabiej, na co wskazują niższe wartości zarówno współczynnika BEDROC (0,2−0,3) jak i EF1% (10−11). Świadczy to o przewadze nowego podejścia, co związane jest najprawdopodobniej z korzystnym wpływem liganda, już na etapie budowy modelu, czego brak jest w poprzedniej metodyce. Nowe podejście pozwala skupić się na zmianach konformacyjnych jedynie w istotnych obszarach receptora, szczególnie w miejscu wiążącym i promuje głównie te korzystne dla wiązania liganda, pomijając nieistotne.

Modele zbudowane na matrycy receptora β_2 i D_3 wypadły w eksperymentach wirtualnego skriningu bardzo podobnie, z nieznaczną przewagą dla modeli opartych na strukturze krystalicznej receptora beta2 (BEDROC 0,383 vs 0,369 i EF1% 18 vs 16). Rezultaty te mogą się wydawać nieco zaskakujące,

biorąc pod uwagę znacząco wyższą homologię sekwencyjną pomiędzy receptorem D_2 i D_3 niż β_2, ale pokazują jednocześnie, że w przypadku tak strukturalnie i funkcjonalnie zbliżonych białek, wybór matrycy o formalnie wyższej homologii sekwencyjnej, nie ma pierwszorzędnego znaczenia dla jakości uzyskanych modeli, a istotniejszy jest raczej proces ich optymalizacji.

Kluczowym aspektem optymalizacji miejsca wiążącego metodą IFD jest użycie tzw. liganda narzędziowego. Otrzymane rezultaty wskazują, że wybór odpowiednich ligandów narzędziowych, ma kluczowe znaczenie dla jakości otrzymanych modeli, szczególnie w zakresie efektywności modelu w wirtualnym skriningu. Należy podkreślić, że jakość uzyskanych parametrów wirtualnego skriningu zależała w dużo większym stopniu od liganda narzędziowego użytego w procedurze IFD, niż od matrycy zastosowanej do otrzymania wstępnego modelu homologicznego, czy nawet od ogólnej metodologii optymalizacji modelu. Wskazują na to znacząco większe różnice w parametrach BEDROC i EF1%, pomiędzy modelami otrzymanymi z użyciem różnych ligandów narzędziowych, w obrębie tej samej matrycy lub metodologii (np. 0,383; 18 vs 0,139; 4,7), niż pomiędzy najlepszymi modelami receptorów uzyskanymi na różnych matrycach (np. 0,383; 18 vs 0,369; 16) lub z użyciem różnych metod optymalizacji (np. 0,383; 18 vs 0,315; 11). Warto podkreślić, że pomimo kluczowego wpływu liganda narzędziowego na strukturę optymalizowanego miejsca wiążącego, otrzymane modele wydają się nie faworyzować jedynie związków do niego podobnych. Pozycjonowanie badanych związków, wynikające z dokowania do modelu receptora, nie koreluje bowiem z wartościami współczynnika Tanimoto, określającymi ich podobieństwo do liganda narzędziowego, co świadczy o obiektywności uzyskanych modeli.

Brak uniwersalnej recepty na wybór optymalnego liganda narzędziowego, wymusza używanie licznych i zróżnicowanych strukturalnie związków do optymalizacji miejsca wiążącego, w celu zwiększenia prawdopodobieństwa uzyskania efektywnych modeli receptorów. To z kolei wymaga efektywnej metody selekcji modeli. W ramach niniejszej pracy (**H2**) dokonano porównania efektywności trzech mniejszych baz związków w wyborze najlepszego modelu do wirtualnego skriningu dużej bazy. Wykazano, że odpowiednio przygotowana mniejsza baza związków, o strukturze podobnej do docelowej, „dużej" bazy (np. wylosowana z niej), może być efektywna w identyfikacji najkorzystniejszych modeli dla właściwego wirtualnego skriningu, znacząco redukując czas obliczeniowy.

Metodyka przedstawiona w niniejszej pracy (**H2**) oraz wnioski z niej płynące, zostały zastosowane do otrzymania modeli innych receptorów, istotnych z punktu widzenia prowadzonych badań, między innymi serotoninowych typu 5-HT_6, 5-HT_{2A}, czy muskarynowego typu M_1. Receptory te, podobnie jak modelowany tu receptor D_2, czy opisane wcześniej receptory 5-HT_{1A} i 5-HT_7 (Wykaz publikacji – praca

D22), zostały użyte do projektowania związków biologicznie aktywnych, w tym nowych kandydatów na leki przeciw BPSD.

2.2.4. Koncepcja pochodnych arylosulfonamidowych blokujących receptory 5-$HT_{6/7/2A}$ oraz D_2, jako nowych kandydatów na leki przeciw psychozie w demencji

Psychoza w demencji może mieć różne podłoże neurobiologiczne od tej w schizofrenii. Istotnie, pacjenci z chorobą Alzheimera, cierpiący na zaburzenia psychotyczne, często doświadczają halucynacji wzrokowych czy błędnej identyfikacji opiekunów, a więc symptomów, które nie są powszechnie spotykane u pacjentów ze schizofrenią. Z drugiej strony, dziwaczne lub złożone urojenia, charakterystyczne dla psychoz schizofrenicznych, są rzadko obserwowane u pacjentów z demencją (Jeste i Finkel, 2000). Odmienna natura objawów psychotycznych w demencji, sugeruje zaangażowanie w ich patomechanizm innych mechanizmów neurobiologicznych. W szczególności, istotną rolę odgrywać mogą zaburzenia w układzie serotoninergicznym, ponieważ np. halucynacje w demencji są podobne do tych wywoływanych przez agonistów serotoninergicznych, takich jak meskalina czy LSD (Marsh, 1979). Silne halucynacje wzrokowe mogą być także wywoływane przez antagonistów receptora NMDA, takich jak ketamina lub fencyklidyna (Siegel, 1978), ale są znacząco rzadziej skutkiem działania dopaminomimetyków, takich jak amfetamina lub kokaina, które są szeroko stosowane w skriningu przedklinicznym nowych leków przeciw schizofrenii (Jones et al., 2011). Zgodnie z dopaminową teorią schizofrenii, aktualnie stosowane leki przeciwpsychotyczne zostały wyselekcjonowane głównie na podstawie zdolności do odwracania efektów dopaminomimetyków, przez co mogą być suboptymalnym rozwiązaniem terapeutycznym wobec psychozy w demencji.

Istnieje wiele danych potwierdzających istotną rolę układu serotoninowego w rozwoju BPSD. Na przykład, polimorfizmy genów kodujących receptory serotoninowe są powiązane z występowaniem halucynacji wzrokowych i słuchowych u pacjentów z chorobą Alzheimera (Holmes et al., 1998). Polimorfizm genetyczny regionu promotora transportera serotoninowego (genotyp L/L) został powiązany z występowaniem zachowania agresywnego (Sukonick et al., 2001). Inne badania wskazują na zaangażowanie receptorów 5-HT_{2A} i 5-HT_6 w patogenezę choroby Alzheimera (Lorke et al., 2006), jak również na związek receptorów 5-HT_6 z występowaniem objawów psychotycznych u pacjentów z demencją typu Alzheimerowskiego (Marcos et al., 2008).

Istnieją także liczne dowody wskazujące, że blokada receptorów 5-HT_6 może wywoływać efekt: (i) prokognitywny, wskutek nasilania transmisji cholinergicznej i glutaminianergicznej (Liu i Robichaud, 2009; Riemer et al., 2003), (ii) przeciwdepresyjny, poprzez nasilanie uwalniania noradrenaliny i

dopaminy oraz (iii) anksjolityczny, mediowany poprzez wpływ na transmisję GABA-ergiczną (Wesołowska, 2010; Wesołowska i Nikiforuk, 2007). Tezy te są dodatkowo wsparte przez specyficzną lokalizację receptorów 5-HT_6, niemal wyłącznie w ośrodkowym układzie nerwowym, szczególnie w okolicach limbicznych i korowych, zaangażowanych w kontrolę nastroju i funkcji poznawczych (Woolley et al., 2004). Ostatnio, selektywni antagoniści receptora 5-HT6, związek SB-742457 oraz Lu AE58054 (idalopirdyna) wykazali aktywność prokognitywną w badaniach klinicznych II fazy, u pacjentów z chorobą Alzheimera (H. Lundbeck A/S, 2012; Maher-Edwards et al., 2010), potwierdzając potencjał terapeutyczny i adekwatność antagonistów 5-HT_6 dla pacjentów z demencją.

Receptor serotoninowy typu 5-HT_7 może odgrywać rolę w kontroli rytmów dobowych, snu, termoregulacji, bólu i migreny, a także procesów poznawczych. Co więcej, wysokie powinowactwo i aktywność antagonistyczna niektórych leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych, wobec tego podtypu, sugeruje potencjalną rolę receptora 5-HT_7 w patofizjologii różnych schorzeń neuropsychiatrycznych. Stosownie do tego, wykazano aktywność przeciwdepresyjną i przeciwlękową antagonistów receptora 5-HT_7 u myszy i szczurów (Wesołowska et al., 2006). Stwierdzono również, że selektywny antagonista receptora 5-HT_7, związek SB-269970 może wywoływać u zwierząt efekty przeciwpsychotyczne (Galici et al., 2008; Waters et al., 2012).

Oddziaływanie na receptory 5-HT_6 i 5-HT_7 związkami o aktywności antagonistycznej może więc stanowić obiecującą strategię w poszukiwaniu nowych, skutecznych leków, także przeciw BPSD, pozwalając równocześnie na uniknięcie niektórych działań niepożądanych, wywoływanych przez aktualnie stosowane leki. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę złożony patomechanizm demencji, oraz towarzyszące jej objawy psychologiczne i behawioralne wydaje się, że mało prawdopodobnym jest, aby zaburzenia te mogły być leczone przez lek oddziałujący z jednym tylko celem biologicznym oraz że skuteczne opracowanie nowego leku przeciw BPSD powinno uwzględniać podejście wieloczynnikowe (Kim et al., 2009; Morphy i Rankovic, 2005).

Istotnie, chociaż niektóre z dostępnych leków przeciwpsychotycznych blokują receptory 5-HT_6 lub 5-HT_7, oddziałują one także z wieloma innymi celami biologicznymi, w tym takimi, z którymi interakcja może wywoływać działania niepożądane i/lub limitować (maskować) ich aktywność terapeutyczną. Na przykład, leki te blokują receptory muskarynowe i histaminowe, co może skutkować aktywnością cholinolityczną i sedacją. Ponadto, działają jak silni antagoniści receptora 5-HT_{2C}, która to właściwość może być czynnikiem ryzyka dysfunkcji metabolicznej (Bai et al., 2011; Reynolds i Kirk, 2010). Niektórzy autorzy sugerują, że udoskonalony profil aktywności przeciwpsychotycznej może być osiągnięty poprzez uwzględnienie aktywności antagonistycznej wobec receptora 5-HT_6, przy braku aktywności cholinolitycznej, tak jak ma to miejsce w przypadku sertindolu, ale nie klozapiny czy

olanzapiny (Rodefer et al., 2008). Jednakże, ewaluacja kliniczna sertindolu została znacząco utrudniona w związku z jego potencjałem arytmogennym, wywołanym przez silną blokadę kanałów potasowych hERG.

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, zaprojektowaliśmy serię pochodnych arylosulfonamidowych, wykazujących wysokie powinowactwo do receptorów serotoninowych typu 5-HT_6, 5-HT_7 i 5-HT_{2A} oraz dopaminowych typu D_2, natomiast pozbawionych istotnych interakcji z receptorami muskarynowymi i kanałem potasowym hERG. Komputerowo-wspomagane projektowanie i synteza oraz profil farmakologiczny tej nowej serii ligandów multimodalnych, zostały opisane w pracy **H4**. Związki te stały się również przedmiotem ochrony patentowej i stanowią część międzynarodowego zgłoszenia patentowego WO2012035123 (praca **H3**).

W toku prac badawczych poświęconych strukturze receptorów monoaminergicznych, zaproponowaliśmy sposób wiązania selektywnych antagonistów receptora 5-HT_7 (Wykaz publikacji – praca **D9**). W oparciu o wyniki modelowania molekularnego, stwierdziliśmy, że najbardziej selektywni antagoniści receptora 5-HT_7 wiążą się preferencyjnie w kieszeni miejsca wiążącego, zlokalizowanej pomiędzy helisami transmembranowymi 7, 1 i 2. Wysunęliśmy również hipotezę, że ligandy receptora 5-HT_7, zdolne do tworzenia silnych oddziaływań z tą częścią miejsca wiążącego, mogą wykazywać wysokie powinowactwo, niezależnie od interakcji z kieszenią zlokalizowaną między helisami 4, 5 i 6, która jest znacznie bardziej jednolita strukturalnie pomiędzy receptorami monoaminergicznymi. Co za tym idzie, ligandy takie mogłyby być bardziej selektywne wobec receptora 5-HT_7, niż te wymagające oddziaływań z bardziej strukturalnie zakonserwowaną kieszenią między helisami 4-6.

Zważywszy, że naszym aktualnym celem stało się zaprojektowanie ligandów wielofunkcyjnych, oddziałujących z receptorami 5-HT_7, stwierdziliśmy, że fragment N-aminoalkiloarylosulfonamidowy, stanowić może bardzo dobrą bazę do modyfikacji strukturalnych. Istotnie, zapewnia on silny antagonizm receptora 5-HT_7, poprzez skuteczne kotwiczenie w kieszeni wiążącej pomiędzy helisami 7-3 (oddziałując szczególnie z fenyloalaniną 3.32 i argininą 7.36) i pozwala na wprowadzenie dodatkowych ugrupowań, wnoszących aktywność wobec innych celów biologicznych, takich jak receptor serotoninowy 5-HT_{2A}, dopaminowy D_2, czy transporter serotoninowy (SERT). W niniejszej pracy (**H4**) skupiono się na ugrupowaniach umożliwiających blokadę receptorów 5-HT_{2A} i D_2, mogących przyczynić się do uzyskania przez konstruowany ligand multimodalny aktywności przeciwpsychotycznej. W związku z tym, potrzebowaliśmy fragmentów, które mogłyby być odpowiedzialne za antagonizm wobec receptorów 5-HT_{2A} i D_2 oraz byłyby syntetycznie dogodne do połączenia z fragmentem arylosulfonamidowym, poprzez łącznik alkilenowy. W tym celu,

przeanalizowaliśmy struktury ligandów receptorów 5-HT_{2A}/D_2 dostępne w bazie danych ChEMBL (K_i < 10 nM wobec obu receptorów) i zidentyfikowaliśmy układy aryloaminowe, zdolne do odziaływania z kieszenią wiążącą pomiędzy helisami 4-6, która została zidentyfikowana jako region tolerujący rozwinięcie chemiczne cząsteczki. Powyższe kryteria spełniały układy benzizotiazolopiperazyny, benzizoksazolopiperazyny oraz fluorobenzizoksazolopiperydyny, których właściwości lekopodobne zostały dodatkowo potwierdzone ich obecnością w strukturach stosowanych klinicznie leków przeciwpsychotycznych (Lemke i Williams, 2008). Następnie, zaprojektowano prototypową cząsteczkę hybrydową, poprzez połączenie 3-metylo-N-propylobenzenosulfonamidu z 3- (piperazyn-1-yl)-1,2-benzotiazolem. Cząsteczka ta została następnie zadokowana do modeli receptorów 5-HT_7, 5-HT_{2A} i D_2, charakteryzując się dobrym dopasowaniem i nawiązując korzystne interakcje, które potwierdziły zakładany sposób wiązania liganda w tych receptorach. Jako że, antagonizm wobec receptora 5-HT_6 był bardzo pożądaną cechą dla nowo projektowanej serii ligandów multimodalnych, prototypowa hybryda została zadokowana także do modelu receptora 5-HT_6, w celu oszacowania możliwości jej interakcji z tym receptorem oraz określenia ewentualnych modyfikacji wymaganych do zaistnienia tej aktywności. Co ciekawe, związek ten został bardzo dobrze dopasowany w modelu receptora 5-HT_6, sugerując jego wysokie powinowactwo wobec tego celu biologicznego, bez wymagania szczególnych modyfikacji. Ogólna orientacja liganda w miejscu wiążącym receptora 5-HT_6 była podobna do tej obserwowanej w modelach receptorów 5-HT_7, 5-HT_{2A} i D_2, z układem arylosulfonamidowym oddziałującym głównie z aminokwasami helisy 7, 1 i 2 oraz układem benzizotiazolu penetrującym kieszeń pomiędzy helisami 4, 5 i 6.

Zachęcające wyniki modelowania oddziaływań związku prototypowego z najważniejszymi celami terapeutycznymi, skłoniły nas także do zbadania in silico potencjalnych interakcji z niepożądanymi celami biologicznymi (tzw. „antycelami", ang. „antitargets"), tu kanałami potasowymi hERG oraz receptorami muskarynowymi typu M_1, których blokada mogłaby negatywnie wpływać na profil bezpieczeństwa projektowanych związków lub maskować ich aktywność terapeutyczną. W przeciwieństwie do receptorów 5-HT_6, 5-HT_7, 5-HT_{2A} i D_2, badany związek nie był optymalnie akomodowany w miejscach wiążących „antycelów". W przypadku receptora M_1, relatywnie długa cząsteczka nie mogła swobodnie ułożyć się wzdłuż miejsca wiążącego i nawiązać korzystnych oddziaływań, podobnych do tych obserwowanych w celowanych receptorach, w związku z relatywnie ograniczoną objętością miejsca wiążącego receptorów muskarynowych, a szczególnie brakiem przestrzeni wiążącej pomiędzy helisami 7, 1 i 2. Chociaż był on w stanie penetrować miejsce wiążące w modelu kanału hERG, to jego sposób wiązania był suboptymalny, przede wszystkim w związku z brakiem oddziaływań hydrofobowych w rejonach czterech reszt fenyloalaniny (Phe 656), które są uznawane za istotne z punktu widzenia blokady kanału (Vandenberg et al., 2012).

W oparciu o powyższe ustalenia zaprojektowaliśmy zróżnicowany strukturalnie zestaw ligandów wielofunkcyjnych, który eksplorował różne części prototypowej hybrydy, takie jak: fragment arylosulfonamidowy, łącznik alkilenowy, oraz fragment aryloaminowy. Wybór poszczególnych bloków budulcowych podyktowany był przede wszystkim ich dopasowaniem do miejsca wiążącego receptora 5-HT_6, uznawanego za najistotniejszy cel biologiczny. Analiza budowy miejsca wiążącego receptora 5-HT_6, a także sposób wiązania związku prototypowego i jego bliskich analogów wskazały, że układ aromatyczny połączony z układem sulfonamidowym penetruje obszary hydrofobowe w sąsiedztwie helisy 7 i 2, a co za tym idzie fragmenty arylosulfonylowe wybrane dla projektowanej serii były przede wszystkim lipofilowe, z kilkoma wyjątkami, w celu potwierdzenia tej hipotezy. Co więcej, dostępna przestrzeń w regionach akomodujących fragment arylosulfonamidowy sugerowała, że powinny one zawierać układy jedno i dwupierścieniowe. W oparciu o analizę wizualną kompleksów ligand-receptor, uznano że optymalna długość łącznika alkilenowego powinna wynosić 3-4 węgli, a zatem łączniki o tych długościach zostały zastosowane w większości projektowanych ligandów. Dłuższe nie były brane pod uwagę, ze względu na wysoką masę cząsteczkową otrzymywanych hybryd, natomiast zważywszy na niższą masę cząsteczkową, dla porównania uwzględniono kilka kombinacji z łącznikiem 2-węglowym. Wszystkie zaprojektowane cząsteczki zostały następnie zadokowane do modeli receptorów 5-HT_6, 5-HT_7, 5-HT_{2A}, D_2 i M_1 oraz kanału hERG, a ich sposoby wiązania poddane analizie, potwierdzając obserwacje poczynione dla prototypowego związku hybrydowego oraz jego bliskich analogów. W rezultacie wybrano do syntezy chemicznej serię 185 kombinacji. Związki te zostały otrzymane i przebadane oraz zastrzeżone w zgłoszeniu patentowym **H3**. Dla zachowania przejrzystości przekazu, w publikacji **H4** zostało zaprezentowane 85 najbardziej reprezentatywnych przykładów.

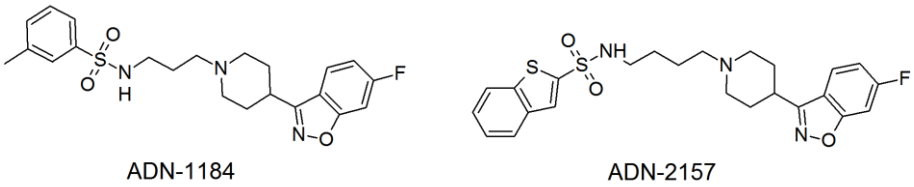
Otrzymana seria struktur hybrydowych została zbadana pod kątem powinowactwa do receptorów 5-HT_6, 5-HT_7, 5-HT_{2A}, D_2 i M_1 metodą radioreceptorową oraz pod kątem blokady kanału hERG, metodą elektrofizjologiczną „automated patch clamp". Zgodnie z przewidywaniami wynikającymi z modelowania molekularnego, większość związków wykazała wysokie powinowactwo (Ki < 100 nM) wobec głównych celów terapeutycznych oraz znacząco niższą aktywność wobec „antycelów" (< 50% hamowania w stężeniu 1 µM). Co więcej, liczne związki posiadały wysokie powinowactwo do głównych receptorów (Ki < 10 nM), a niektóre z nich wiązały się nawet w zakresie stężeń subnanomolarnych, potwierdzając skuteczność zastosowanej, racjonalnej strategii projektowania. Ogólnie, badane związki charakteryzowały się najwyższym powinowactwem wobec receptorów 5-HT_7 i 5-HT_{2A}, jak również silnym wiązaniem do receptora D_2, to jest, wobec celów biologicznych, traktowanych jako podstawowe podczas projektowania. Na poziomie molekularnym, wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_7 jest zapewniane przez fragment N-

aminoalkiloarylosulfonamidowy, który zapewnia optymalne oddziaływania z kieszenią wiążącą między helisami 7-3. Czyni to badane związki relatywnie niewrażliwymi na wpływ modyfikacji w części aryloaminowej, akomodowanej w kieszeni pomiędzy helisami 4-6. Te właściwości układu N-aminoalkiloarylosulfonamidowego są dopełniane przez cechy fragmentu benzazolopiperazyny/piperydyny, które zapewniają wysokie powinowactwo wobec receptorów 5-HT_{2A} i D_2, ze szczególnym naciskiem na ten pierwszy. Tymczasem, powinowactwo badanych związków wobec receptora 5-HT_6 było zróżnicowane i dało się zauważyć pewne zależności struktura-aktywność. Po pierwsze, analogi zawierające układ 6-fluoro-3-(piperydyno-4-ylo)-1,2-benzoksazolu były nieco bardziej aktywne, niż te zawierające układ 3-(piperazyn-1-ylo)-1,2-benzotiazolu, ale obie te grupy były znacząco aktywniejsze od pochodnych 3-(piperazyn-1-ylo)-1,2-benzoksazolu. Podobne preferencje dotyczyły powinowactwa do pozostałych, głównych celów biologicznych, chociaż w mniejszym stopniu w przypadku receptorów 5-HT_7 i 5-HT_{2A}, pomiędzy pochodnymi 6-fluoro-3-(piperydyno-4-ylo)-1,2-benzoksazolu i 3-(piperazyn-1-ylo)-1,2-benzotiazolu. Po drugie, fragmenty arylosulfonamidowe zawierające atomy azotu lub tlenu podstawione lub wbudowane w pierścień aromatyczny, były mniej aktywne wobec receptora 5-HT_6, niż te bardziej hydrofobowe, w szczególności zawierające pierścień benzenowy w dystalnej części tego fragmentu. Obserwacje te są zgodne z eksperymentami dokowania, w których stwierdzono oddziaływanie tych fragmentów z hydrofobowymi rejonami między helisami 7 i 2 receptora 5-HT_6. Po trzecie, analogi z łącznikiem etylenowym były znacząco mniej aktywne od tych z dłuższymi łańcuchami alkilenowymi, co również było zgodne z przewidywaniami opartymi na modelowaniu molekularnym. Zauważono natomiast zróżnicowane zależności struktura-aktywność pośród związków z łącznikami 3 i 4 członowymi. Pośród pochodnych 6-fluoro-3-(piperydyno-4-ylo)-1,2-benzoksazolu i 3-(piperazyn-1-ylo)-1,2-benzotiazolu, analogi propylenowe stanowiły optymalne kombinacje z arylosulfonamidami jednopierścieniowymi, podczas gdy pochodne butylenowe były bardziej aktywne w kombinacji z arylosulfonamidami dwupierścieniowymi. Obserwacje te mogą być wytłumaczone różnicami w sposobie wiązania arylosulfonamidów jedno- i dwupierścieniowych w miejscu wiążącym receptora 5-HT_6. Zaobserwowano, że układy monocykliczne skojarzone z krótszymi łącznikami plasują się w niższej partii kieszeni wiążącej, oddziałując z hydrofobową powierzchnią tryptofanu 3.28, alaniny 2.61 oraz możliwie także tryptofanu 7.40 i tyrozyny 7.43. Tymczasem, ugrupowanie sulfonamidowe tworzy wiązanie wodorowe z polarną argininą 181. Z kolei pochodne dwupierścieniowe z łącznikiem butylenowym są zdolne do jeszcze głębszego penetrowania tej kieszeni, oddziałując z alaniną 2.65 i tryptofanem 7.40. W tym wypadku, kompleks ligand-receptor jest stabilizowany wiązaniem wodorowym z kwasem asparaginowym 7.36. Pośrednie położenia fragmentu arylosulfonamidowego, zajmowane przez inne kombinacje; układ pierścieniowy/łącznik alkilenowy, są niekorzystne, prawdopodobnie dlatego, że podstawnik arylowy zajmuje pozycję w sąsiedztwie reszt aminokwasów

polarnych, takich jak arginina 181, kwas asparaginowy 7.36, czy asparagina 2.64. Ten sam trend, chociaż o mniejszym nasileniu, może być zauważony w odniesieniu do powinowactwa wobec receptora 5-HT_7. Odwrotnie, w grupie pochodnych 3-(piperazyn-1-ylo)-1,2-benzoksazolu, pochodne z łącznikami 4-węglowymi były znacząco bardziej aktywne wobec wszystkich receptorów, szczególnie receptora 5-HT_6, niezależnie od struktury fragmentu arylosulfonamidowego. Przyczyna tej rozbieżności, jak również ogólnie niskiej aktywności propylenowych pochodnych 3-(piperazyn-1-ylo)-1,2-benzoksazolu, nie jest znana i nie została wytłumaczona eksperymentami modelowania molekularnego.

W oparciu o wyniki badań radioreceptorowych, wytypowano grupę 12 związków o powinowactwie poniżej 20 nM do wszystkich 4 głównych celów biologicznych i poddano badaniom aktywności wewnętrznej *in vitro*. Wszystkie zbadane związki potwierdziły wysoką aktywność wobec pożądanych receptorów. Nie stwierdzono aktywacji żadnego z receptorów, natomiast związki wykazały znaczące właściwości antagonistyczne wobec wszystkich receptorów, a szczególnie receptora 5-HT_7. Pochodne z jednopierścieniowymi układami arylosulfonamidowym i łącznikiem propylenowym, były zdolne do blokady receptora 5-HT_7 w stężeniach subnanomolarnych, co jest zgodne z wcześniejszymi ustaleniami dotyczącymi optymalnych warunków strukturalnych dla antagonizmu wobec receptora 5-HT_7 (Wykaz publikacji - praca **D9**; Forbes et al., 1998). Nie stwierdzono już natomiast, w tej wyselekcjonowanej grupie związków o wysokim powinowactwie, wpływu długości łącznika lub rodzaju fragmentu arylosulfonamidowego na antagonizm wobec receptora 5-HT_6. Silni antagoniści receptora 5-HT_6, o wartościach Kb < 10 nM, zostali zidentyfikowani zarówno pośród pochodnych monocyklicznych z łącznikiem propylenowym, jak i dwupierścieniowych z łącznikiem butylenowym.

Na podstawie otrzymanych wyników, wytypowano dwa związki wiodące, występujące pod kodami ADN-1184 i ADN-2157 (Rycina 1), które zostały poddane szerokiej charakterystyce farmakologicznej metodami *in vitro* i *in vivo*.



Rycina 1. Wzory strukturalne związków ADN-1184 i ADN-2157

2.2.5. Poszerzona charakterystyka farmakologiczna molekuł wiodących z grupy wielofunkcyjnych antagonistów receptorów 5-$HT_{6/7/2A}$ i D_2 - związków ADN-1184 i ADN-2157, w porównaniu z aktualnie stosowanymi lekami przeciwpsychotycznymi

Jako potwierdzenie i poszerzenie badań wykonanych na Wydziale Farmaceutycznym UJCM (opisanych w poprzednim rozdziale), związki ADN-1184 oraz ADN-2157, zostały przebadane pod kątem powinowactwa i aktywności wewnętrznej wobec łącznie 15 celów biologicznych, w niezależnych laboratoriach specjalizujących się w badaniach kontraktowych – Cerep (Francja) oraz ChanTest (USA), a wyniki badań zostały przedstawione w pracach **H4** i **H5**.

ADN-1184 i ADN-2157 charakteryzowały się wysokim powinowactwem i silnym antagonizmem wobec wszystkich czterech głównych celów biologicznych (wartości K_i i K_b < 25 nM dla receptorów 5-HT_6, 5-HT_7, 5-HT_{2A} i D_2). Wartą podkreślenia cechą tych związków jest ich równoczesny antagonizm wobec receptorów 5-HT_6 i D_2 (odpowiednio K_b ADN-1184/2157 = 16/24 nM oraz 13/2,4 nM), co koresponduje z przyjętym celem wyłonienia związków, które łączyłyby aktywność wobec receptorów związanych zarówno z działaniem przeciwpsychotycznym, jak i korzystnym wpływem na funkcje poznawcze. Potwierdzono także bardzo niskie powinowactwo obu związków wobec receptorów muskarynowych M_1-M_5 (K_i > 1000 nM) oraz słabą blokadę kanałów hERG (IC50 >1000 nM), co świadczy o istotnej separacji (kilka rzędów wielkości) pomiędzy stężeniami aktywnymi wobec celów terapeutycznych i kluczowych „antycelów". Ustalenia te wyraźnie kontrastują z analogicznymi profilami aktywności aktualnie stosowanych leków, oddziałujących równocześnie z receptorami D_2 i 5-HT_6, takimi jak np. olanzapina i klozapina , które silnie blokują receptory muskarynowe (K_i < 10 nM) (Millan et al., 2000), czy sertindol, będący silnym blokerem kanału hERG (IC_{50} = 2,7 nM) (Kongsamut et al., 2002). Oba związki wykazały też wysokie powinowactwo (K_i < 30 nM) do receptorów D_1, D_3, α_{1A} i α_{2C}, co przełożyło się na silne właściwości antagonistyczne (K_b < 10 nM) w przypadku receptorów D_3 i α_{1A}. Silna blokada receptorów D_3 może być uznana za cechę pożądaną, jako że może wywoływać efekty prokognitywne, poprzez nasilenie uwalniania acetylocholiny (Millan et al., 2007). Antagonizm wobec receptorów adrenergicznych α_1 jest cechą wielu leków przeciwpsychotycznych, włączając w to klozapinę, risperidon, czy kwetiapinę (Arnt et al., 2008; Newman-Tancredi i Kleven, 2011) i może mieć wpływ na ich aktywność terapeutyczną. Istotnie, w połączeniu z umiarkowanym wysyceniem receptorów D_2, blokada receptorów α_1 może nasilać aktywność przeciwpsychotyczną i poszerzać okno terapeutyczne, w odniesieniu do zaburzeń pozapiramidowych (Wadenberg et al., 2000). Co więcej, receptory adrenergiczne α_1 są wysoce ko-eksprymowane z receptorami 5-HT_{2A} w korze przedczołowej, co sugeruje, że równoczesna blokada obu tych receptorów, obserwowana dla związków ADN-1184 i ADN-2157 może mieć szczególnie korzystny wpływ na kontrolę zaburzeń

funkcjonowania kory przedczołowej (Santana et al., 2013). Ponadto, blokada ośrodkowych receptorów α_1 może być także korzystna z punktu widzenia terapii BPSD, a w szczególności pobudzenia psychoruchowego i agresji. W mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera, badanych *post mortem*, stwierdzono bowiem deregulację receptora α_1 w korze czołowej (Szot et al., 2006), a prazosyna, lek blokujący receptory α_1, ograniczała pobudzenie i zachowania agresywne w pilotowym badaniu klinicznym i to bez szczególnego wpływu na parametry krążeniowe (Wang et al., 2009). Podczas gdy obserwacje te sugerują, że blokada ośrodkowych receptorów adrenergicznych typu α_1 może być pożądaną cechą leków kierowanych na terapię BPSD, antagonizm wobec receptorów obwodowych może jednak wiązać się z działaniami niepożądanymi, takimi jak ortostatyczne spadki ciśnienia, które powinny być brane pod uwagę, w przypadku starszych pacjentów, ze szczególnie wrażliwym układem krążenia.

Pomimo istotnego powinowactwa wobec receptorów histaminowych typu H_1, separacja aktywności antagonistycznej wobec tego receptora i głównych celów terapeutycznych wynosi około rzędu wielkości (K_b > 100 nM vs 0,5−16 nM). Tymczasem, znane leki przeciwpsychotyczne o stwierdzonej aktywności przeciwhistaminowej, jak olanzapina czy klozapina, charakteryzują się odwrotnymi właściwościami, wykazując wyższe powinowactwo wobec receptora H_1, niż wobec głównych, istotnych terapeutycznie receptorów (Millan et al., 2000). Jako że blokada receptorów H_1 jest powiązana z efektami sedatywnymi (Reiner i Kamondi, 1994), relatywnie słabe właściwości przeciwhistaminowe ADN-1184 i ADN-2157 mogą mieć związek z ich niską tendencją do wywoływania sedacji (co opisano niżej). Co więcej, niskie powinowactwo i praktyczny brak właściwości antagonistycznych ADN-1184 i ADN-2157 wobec receptora 5-HT_{2C}, pozwala przypuszczać, że działanie tych związków nie będzie powiązane z wzrostem apetytu i masy ciała lub zaburzeniami metabolicznymi (Bai et al., 2011; Reynolds i Kirk, 2010).

Związki ADN-1184 i ADN-2157 zostały przebadane w palecie testów farmakologicznych na szczurach, które zostały wybrane w badaniach na lekach referencyjnych, jako bateria skrinigowa do wyłaniania nowych związków o korzystnych parametrach pod kątem terapii BPSD (praca **H1**). Badania te zostały opisane w pracach **H4** (dla ADN-2157) i **H5** (dla ADN-1184). Związek ADN-1184 podawany był drogą dootrzewnową (i.p.), natomiast związek ADN-2157, charakteryzujący się lepszą biodostępnością z przewodu pokarmowego, podawany był drogą dożołądkową (p.o.)

Jak opisano w rozdziale 2.2.4, zaburzenia psychotyczne w demencji mogą mieć odmienne podłoże neurobiologiczne od tych obserwowanych w schizofrenii, tak więc do badania nowych związków użyto przede wszystkim niedopaminergicznych modeli psychozy. Hiperlokomocja i stereotypie wywołane dizocilpiną (MK-801), podobnie jak potrząsanie głową wywołane podaniem agonisty

receptorów 5-$HT_{2A/2C}$ – związku DOI (2,5-dimetoksy-4-jodoamfetamina), stanowią modele oparte na zaburzeniach w transmisji glutaminianergicznej i serotoninergicznej, o relewancji wobec psychoz towarzyszących demencji. Z kolei test warunkowego, aktywnego unikania (ang. conditioned avoidance response – CAR) jest modelem niefarmakologicznym, standardowo używanym do potwierdzania specyficznego efektu przeciwpsychotycznego (Wadenberg, 2010).

ADN-1184 i ADN-2157 wykazały w zastosowanych modelach aktywność świadczącą o znacznym potencjale kontrolowania zaburzeń psychotycznych. W dawkach 3-10 mg/kg odwracały hiperaktywność wywołaną przez niekompetytywnego antagonistę receptorów NMDA, dizocilpinę (0,3 mg/kg). Ich aktywność była podobna do klozapiny, olanzapiny i lurasidonu, zbadanych w tych samych warunkach eksperymentalnych (praca **H1**). Były one natomiast znacząco bardziej aktywne od aripiprazolu, który odwracał efekty MK-801 jedynie częściowo (praca **H1**), co było zgodne z jego niską aktywnością przeciwpsychotyczną u pacjentów z chorobą Alzheimera (De Deyn et al., 2005). Częściowy agonizm wobec receptora D_2 może być bowiem mniej skuteczny w kontroli psychoz związanych z hipofunkcją receptorów NMDA, co zauważono również we wcześniejszych badaniach (Bardin et al., 2007). ADN-1184 całkowicie odwracał także zachowania stereotypowe (ang. circling, head weaving), indukowane wyższymi dawkami MK-801 (1,2 mg/kg) (Wu et al., 2005). Aktywnością taką cechują się także klinicznie bardzo skuteczne leki, jak olanzapina czy risperidon, co sugeruje, że ADN-1184 ma potencjał do silnej aktywności przeciwpsychotycznej. Ponadto, ADN-1184 w dawkach zbliżonych do tych aktywnych w odwracaniu efektów MK-801, całkowicie hamował reakcję warunkowego unikania (CAR), podobnie jak testowane w tych samych warunkach haloperidol i asenapina, ale nie lurasidon czy aripiprazol, które wywoływały jedynie częściowe efekty (praca **H1**). Z kolei ADN-2157 dawkozależnie odwracał potrząsanie głową u szczurów, wywołane podaniem agonisty receptorów 5-$HT_{2A/2C}$, związku DOI. Reasumując, wyraźna aktywność związków ADN-1184 i ADN-2157 w różnych modelach świadczy, że charakteryzują się one bardzo obiecującą aktywnością względem zaburzeń psychotycznych, takich jak te towarzyszące demencji.

ADN-1184 i ADN-2157 były aktywne w klasycznym modelu badania aktywności przeciwdepresyjnej (Porsolt et al., 1978), łącząc wyraźną aktywność przeciwpsychotyczną (opisaną powyżej) z korzystnym wpływem na nastrój. ADN-1184 wykazał aktywność w dwóch dawkach (0,3 i 1 mg/kg), a ADN-2157 w trzech (od 0,3 do 3 mg/kg), przypominając pod tym względem klozapinę, której szczególnie korzystny wpływ na nastrój, zarówno w warunkach klinicznych jak i modelach zwierzęcych był dyskutowany wcześniej (rozdział 2.2.2). Dla porównania, inne leki przeciwpsychotyczne były aktywne tylko w pojedynczej dawce (praca **H1**). Należy podkreślić, że ADN-1184 i ADN-2157 skracały czas bezruchu w teście wymuszonego pływania o około 20%, podczas gdy referencyjne leki przeciwpsychotyczne, włącznie z klozapiną, redukowały bezruch w tych samych warunkach jedynie o około 10-15%.

Tymczasem imipramina, skracała bezruch w dawce 10 mg/kg o około 25% (praca **H1**). Obserwowane efekty ADN-1184 i ADN-2157 są więc bardzo zbliżone do tych wywoływanych przez znany, trójcykliczny lek przeciwdepresyjny i korzystniejsze niż dla leków przeciwpsychotycznych. Zakres dawek aktywnych ADN-1184 i ADN-2157 w teście Porsolta był nieco niższy niż w przypadku testów na aktywność przeciwpsychotyczną. Podobny profil aktywności był obserwowany w przypadku niektórych leków przeciwpsychotycznych. Można zatem przewidywać, że w przypadku klinicznego zastosowania ADN-1184 lub ADN-2157, pacjenci z objawami depresyjnymi powinni otrzymywać niskie dawki leków, natomiast ci wykazujący zaburzenia psychotyczne wymagaliby zwiększenia dawek.

ADN-1184 i ADN-2157 nie zaburzały funkcji poznawczych w teście biernego unikania, w całym zakresie testowanych dawek (ADN-1184 do 30 mg/kg, ADN-2157 do 100 mg/kg), pokrywających i znacznie przewyższających te aktywne w testach Porsolta, warunkowego unikania oraz odwracania efektów MK-801 i DOI. Kontrastuje to wyraźnie z efektami referencyjnych leków przeciwpsychotycznych, badanych w tych samych warunkach, z których prawie wszystkie wywoływały dawkozależne zaburzenia biernego unikania, przy niejednokrotnie niewielkiej lub nie istniejącej separacji dawek wobec efektów „terapeutycznych" (praca **H1**). Jedynym wyjątkiem był tutaj aripiprazol, który nie wywoływał efektu amnestycznego, jednakże jak wcześniej wspomniano nie wykazywał również istotnej aktywności w niedopaminergicznym modelu psychozy. Tymczasem ADN-1184 i ADN-2157 wykazywały wyraźną aktywność przeciwpsychotyczną w tym modelu, równocześnie nie wywołując zaburzeń pamięci w szerokim zakresie dawek.

Podobnie, ADN-1184 i ADN-2157 w całym zakresie testowanych dawek nie wywoływały istotnej katalepsji (efektu prognozującego kliniczne ryzyko wystąpienia zaburzeń pozapiramidowych). Odróżnia to badane związki od niektórych referencyjnych leków przeciwpsychotycznych, takich jak risperidon czy haloperidol (praca **H1**), które ze względu na swoją skuteczność i brak alternatywnych terapii, mimo formalnego braku dopuszczenia, są ciągle szeroko stosowane u pacjentów z demencją (Carson et al., 2006). Wywołują one dawkozależne zaburzenia pozapiramidowe (Rummel-Kluge et al., 2012), które są szczególnie niebezpieczne w przypadku starszych pacjentów, cierpiących na zaburzenia funkcji motorycznych.

Miarą klinicznej sedacji jest u zwierząt laboratoryjnych hamowanie spontanicznej aktywności lokomotorycznej. Nawet leki przeciwpsychotyczne, które nie wywołują katalepsji, takie jak np. klozapina, mogą silnie ograniczać aktywność lokomotoryczną, w związku z aktywnością sedatywną (Miller, 2000). Istotnie, znaczące obniżenie aktywności lokomotorycznej było obserwowane dla leków referencyjnych w zakresie dawek zbliżonym do tych wywołujących aktywność przeciwpsychotyczną

(praca **H1**). Tymczasem, ADN-1184 obniżał aktywność lokomotoryczną jedynie w najwyższej dawce (30 mg/kg), która była o co najmniej rząd wielkości wyższa od tych aktywnych w testach „terapeutycznych”, a ADN-2157 nie wywoływał znamiennych statystycznie zmian w aktywności lokomotorycznej w całym zakresie badanych dawek (do 100 mg/kg).

Podsumowując, udało się zidentyfikować nową grupę ligandów multimodalnych, wywołujących równoczesną blokadę receptorów 5-HT_6 i D_2, pozbawionych niekorzystnych interakcji z kluczowymi „antycelami” (receptorami muskarynowymi i kanałem hERG), co wyróżnia je od dostępnych leków przeciwpsychotycznych. Taki układ oddziaływań z celami biologicznymi, wzbogacony o antagonizm wobec receptorów 5-HT_7 i 5-HT_{2A}, może przekładać się na korzystny efekt psychotropowy, połączony z łagodnym profilem bezpieczeństwa. Co więcej, najlepiej rokujące cząsteczki wybrane do poszerzonej charakterystyki farmakologicznej, związki ADN-1184 i ADN-2157, wykazały istotną aktywność w modelach psychozy i zaburzeń nastroju, bez wywoływania negatywnego wpływu na funkcje poznawcze i motoryczne. Ten profil aktywności jest korzystniejszy od prezentowanego przez aktualnie stosowane neuroleptyki, testowane w tych samych warunkach, co sugeruje, że możliwe jest zidentyfikowanie już na etapie przedklinicznym, kandydatów na leki przeciwpsychotyczne, które bardziej odpowiadają wymaganiom terapii pacjentów z demencją.

2.2.6. Dualni antagoniści receptora 5-HT_6 / częściowi agoniści receptora D_2, jako nowa klasa ligandów wielofunkcyjnych o potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej i prokognitywnej

Pomimo szerokiej aktywności farmakologicznej, jaką wykazały związki z grupy wielofunkcyjnych antagonistów receptorów 5-$HT_{6/7/2A}$ i D_2, ich podstawowym działaniem terapeutycznym, leżącym u podstaw ich tworzenia, była aktywność przeciwpsychotyczna. Mając jednakowoż na uwadze poważny problem jakim są stany depresyjne towarzyszące demencji, za cel przyjęto opracowanie grupy ligandów o nowym mechanizmie działania, które adresowałyby przede wszystkim kwestię zaburzeń nastroju oraz wykazywały działanie prokognitywne, szczególnie istotne w przypadku pacjentów z demencją.

Korzystny wpływ blokady receptorów 5-HT_6 na poprawę funkcji poznawczych oraz ich aktywność przeciwdepresyjna i przeciwlękowa, zostały omówione wcześniej. Wskazano również, że z uwagi na złożoność zaburzeń behawioralnych i psychologicznych towarzyszących demencji, mało prawdopodobne jest, aby mogły być one skutecznie leczone przy pomocy leku oddziałującego tylko na jeden cel biologiczny.

Z drugiej strony, chociaż niektóre nieselektywne leki są skuteczne w terapii zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego, takich jak stany psychotyczne czy depresyjne, oddziaływania z różnymi celami biologicznymi, powiązanymi z działaniami niepożądanymi, powodują, że są one nieodpowiednie do terapii pacjentów w podeszłym wieku z demencją. Obiecującą strategią identyfikowania nowych kandydatów na leki jest opracowywanie tzw. zaprojektowanych ligandów wielofunkcyjnych (ang. designed multiple ligands, DMLs), które oddziałują z 2 lub więcej celami biologicznymi, które są fizjologicznie adekwatne do leczonego zaburzenia. Taka kombinacja powinna charakteryzować się nasiloną efektywnością, w porównaniu do substancji oddziałujących na pojedynczy cel biologiczny (ang. single-target drugs), równocześnie nie będąc obarczoną działaniami niepożądanymi, charakterystycznymi dla nieselektywnych „brudnych" cząsteczek (Kim et al., 2009; Liu et al., 2009; Medina-Franco et al., 2013; Morphy i Rankovic, 2005).

Istnieje wiele przesłanek wskazujących na wysoki potencjał terapeutyczny częściowych agonistów receptora dopaminowego typu D_2, zarówno w zakresie działania przeciwpsychotycznego jak i przeciwdepresyjnego (Stahl, 2008; Ye et al., 2013; Zhang et al., 2007). Najistotniejszymi przedstawicielami tej grupy związków są: atypowy lek przeciwpsychotyczny aripiprazol oraz jego analog brexpiprazol, kandydat kliniczny do terapii zaburzeń depresyjnych. Korzystny profil terapeutyczny częściowych agonistów receptora D_2 wiąże się z ich łagodnym profilem bezpieczeństwa, a w szczególności niską incydencją zaburzeń pozapiramidowych (Leucht et al., 2013;

Otsuka, Ltd., 2011). Profil farmakologiczny aripiprazolu i brexpiprazolu obejmuje częściowy agonizm wobec receptora D_2, o niskim poziomie aktywności wewnętrznej oraz wyraźną aktywność agonistyczną wobec receptora 5-HT_{1A}, połączoną z umiarkowaną blokadą receptorów 5-HT_{2A} i 5-HT_7, które mogą mieć istotny wpływ na ich profil terapeutyczny, natomiast nie obejmuje istotnych interakcji z receptorem 5-HT_6.

Biorąc pod uwagę, że antagoniści receptora 5-HT_6 wykazują efekty prokognitywne, jak również obiecujące właściwości modulujące nastrój, podczas gdy częściowi agoniści receptora D_2 posiadają aktywność przeciwpsychotyczną i przeciwdepresyjną, przy łagodnym profilu bezpieczeństwa, korzystnym byłoby połączyć obie te aktywności, w celu uzyskania nowych związków o skuteczności i profilu bezpieczeństwa odpowiednich do terapii BPSD.

W pracy **H7** opisane zostało projektowanie wspomagane komputerowo, synteza oraz charakterystyka farmakologiczna nowej serii zaprojektowanych ligandów wielofunkcyjnych (DMLs), charakteryzujących się właśnie takim, innowacyjnym mechanizmem działania, obejmującym blokadę receptora 5-HT_6 i częściowy agonizm wobec receptora D_2. Związki te stały się również przedmiotem ochrony patentowej i stanowią część międzynarodowego zgłoszenia patentowego WO2013001499 (praca **H6**).

W projektowaniu ligandów działających równocześnie na receptory 5-HT_6 i D_2 użyto podejścia opartego na wiedzy, na temat zarówno struktur znanych ligandów tych receptorów, jak i budowy ich miejsc wiążących. Jako że podstawowym celem było uzyskanie ligandów o podwójnej aktywności, wybrano tzw. podejście „design in", pozwalające na inkorporowanie aktywności wobec obu celów biologicznych do jednej cząsteczki (Morphy i Rankovic, 2005). Proces projektowania rozpoczął się od szczegółowej analizy budowy miejsc wiążących obu receptorów oraz sposobów wiązania w nich antagonistów receptora 5-HT_6 i częściowych agonistów receptora D_2. W tym celu użyto modeli homologicznych, które zostały opracowane z użyciem metodologii opisanej w pracy **H2**.

Grupy związków wykazujących wysokie powinowactwo do obu receptorów (częściowi agoniści receptora D_2 i antagoniści receptora 5-HT_6), zostały zadokowane do odpowiednich miejsc wiążących. Bazując na uzyskanych kompleksach ligand-receptor, opracowano modele farmakoforowe oparte na strukturze celu biologicznego (ang. structure-based pharmacophores). Dzięki uwzględnieniu kontekstu receptora, procedura ta pozwala na tworzenie tzw. objętości wykluczonych (ang. excluded volumes), czyli obszarów miejsca wiążącego, w których występowanie podstawników jest wysoce niekorzystne, a także na identyfikację fragmentów ligandów, które mogą być z korzyścią rozbudowywane, w kierunku tzw. regionów tolerancyjnych (ang. tolerant regions). Funkcjonalność ta jest zaletą w porównaniu do klasycznych modeli farmakoforowych, opartych jedynie na strukturze

ligandów, znacząco usprawniającą projektowanie struktur aktywnych. Oparte na strukturze receptora modele farmakoforowe, opracowane dla ligandów receptorów 5-HT_6 i D_2, zostały następnie nałożone, w celu zidentyfikowania wspólnych fragmentów oraz obszarów tolerancyjnych, pozwalających na scalenie układów chemicznych wymaganych dla podwójnej aktywności. Nałożenia dokonano poprzez wyświetlenie modeli opracowanych na bazie wcześniej nałożonych miejsc wiążących obu receptorów. Pozwoliło to na określenie cech farmakoforowych, wspólnych dla obu grup, którymi były: protonowalny atom azotu oraz pierścień aromatyczny, które zajmowały te same pozycje w obu miejscach wiążących, w sąsiedztwie zakonserwowanych sekwencyjnie aminokwasów – kwasu asparaginowego 3.32 i fenyloalaniny 6.52, które są znanymi, istotnymi punktami oddziaływań dla ligandów monoaminergicznych (Braden et al., 2006; Strader et al., 1988). W sąsiedztwie obszaru scalania zidentyfikowano także regiony tolerancyjne. Były one związane z poszczególnymi cechami farmakoforowymi, które nie były wspólne, ale charakterystyczne, odpowiednio dla antagonistów receptora 5-HT_6 i częściowych agonistów receptora D_2. Dodatkowy układ aromatyczny, występujący w strukturze antagonistów receptora 5-HT_6, zwykle przyłączony do głównego układu arylowego poprzez ugrupowanie sulfonamidowe lub sulfonowe, penetrował kieszeń hydrofobową pomiędzy helisą 4 i 5, oddziałując z fenyloalaniną 5.38. Tymczasem, układ aromatyczny połączony z akceptorem i donorem wiązania wodorowego, charakterystyczny dla częściowych agonistów receptora D_2, ułożony był w sąsiedztwie helisy 2 i 7, oddziałując z kwasem glutaminowym 2.65 i seryną 7.36. W rezultacie skonstruowano prototypową cząsteczkę hybrydową, która posiadała wszystkie cechy obecne w scalonym modelu farmakoforowym. W oparciu o nią, zaprojektowano trzy serie ligandów, które eksplorowały przestrzeń chemiczną w obrębie uzyskanego, scalonego farmakoforu.

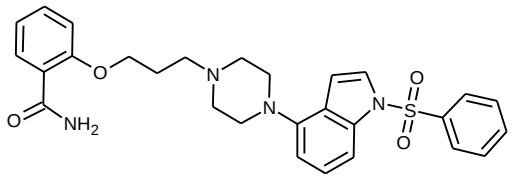
W pierwszej serii cząsteczek hybrydowych, o spodziewanej aktywności dualnej, testowano zróżnicowane ugrupowania, odpowiedzialne za wprowadzenie antagonizmu wobec receptora 5-HT_6 (zwane dalej „fragmentami 5-HT_6”). W tym celu wybrano grupę fragmentów, dla których wcześniej opisano antagonizm wobec receptora 5-HT_6 oraz charakteryzujących się relatywnie niską masą cząsteczkową. Podczas eksplorowania „fragmentu 5-HT_6” cząsteczki hybrydowej, „fragment D_2”, odpowiedzialny za częściowy agonizm wobec tego receptora, pozostawiono niezmieniony. Użyto w tym celu układu butoksy-3,4-dihydrochinolino-2(1H)-onu, jako że był on obecny w strukturze najlepiej scharakteryzowanego częściowego agonisty receptora D_2, aripiprazolu.

Pierwsza seria cząsteczek hybrydowych została przetestowana pod kątem powinowactwa do receptorów 5-HT_6 i D_2, metodą radioreceptorową. Wszystkie przebadane związki wykazały znaczące powinowactwo wobec obu celów biologicznych, charakteryzując się, w większości przypadków, stałymi wiązania K_i < 100 nM, co sugerowało, że zastosowana strategia projektowania ligandów dualnych była właściwa. Otrzymane wyniki potwierdziły wpływ zastosowanych modyfikacji

strukturalnych na aktywność biologiczną oraz pozwoliły na zaobserwowanie zależności struktura-aktywność. Najwyższa aktywność wobec obu celów biologicznych była obserwowana dla pochodnych 4-(piperazyno-1-ylo)-*1H*-indolu, a najniższa dla N1-podstawionych pochodnych 2-(*1H*-indolo-3-ylo)etylominy. Aktywność pochodnych 3-(1,2,3,6-tetrahydropirydyno-4-ylo)-*1H*-indolu oraz 3-(piperydyno-4-ylo)-*1H*-indolu była w przypadku obu receptorów zróżnicowana i zależała od nasycenia aminy cyklicznej. Pochodne tetrahydropirydyny wykazały relatywnie silniejsze powinowactwo wobec receptora 5-HT_6 i słabsze do receptora D_2, podczas gdy związki z pierścieniem piperydynowym charakteryzowały się odwrotną tendencją. Spośród pochodnych 4-(piperazyno-1-ylo)-*1H*-indolu, najwyższa aktywność dualna była obserwowana dla pochodnej N1-fenylosulfonylowej oraz pochodnych N1-benzylowych, podstawionych w pozycji meta lub niepodstawionych. Z kolei pochodne *orto*- i *para*- wykazywały wysokie powinowactwo jedynie do receptora D_2. Biorąc pod uwagę, że aktywność dualna o realnym znaczeniu biologicznym wymaga wysokiego powinowactwa do obu celów biologicznych, do dalszych badań zostały wybrane jedynie związki o powinowactwie ≤ 20 nM wobec obu receptorów. Dla 4 wybranych związków wykonano badania aktywności wewnętrznej wobec dwóch głównych celów biologicznych, jak również oceniono interakcje z kluczowymi „antycelami", receptorem muskarynowym M_1 oraz kanałem hERG (ich rola w wywoływaniu działań niepożądanych została omówiona w rozdziale 2.2.4).

Wszystkie zbadane związki wykazały znaczący poziom agonizmu wobec receptora D_2, potwierdzając pożądany profil częściowo agonistyczny. Z drugiej strony, nie wywoływały one żadnego efektu agonistycznego wobec receptora 5-HT_6, natomiast charakteryzowały się zróżnicowanym poziomem antagonizmu. Rezultaty te potwierdziły więc osiągnięcie podstawowego celu, a mianowicie uzyskanie dualnych ligandów, antagonistów receptora 5-HT_6 / częściowych agonistów receptora D_2. Żaden ze związków nie wywoływał także znaczącej blokady kanału hERG, co znacząco obniża ryzyko badanej serii w aspekcie potencjalnego działania arytmogennego. Z kolei pochodne N-benzylowe wykazały znaczące powinowactwo wobec receptorów muskarynowych, co mogłoby skutkować osłabieniem pożądanych efektów wynikających z blokady receptora 5-HT_6, która stymuluje uwalnianie acetylocholiny. W oparciu o te ustalenia oraz biorąc pod uwagę względnie słabsze właściwości antagonistyczne pochodnych benzylowych wobec receptora 5-HT_6, do dalszych modyfikacji chemicznych wybrana została jedynie N1-fenylosulfonylowa pochodna 4-(piperazyno-1-ylo)-*1H*-indolu. Związek ten, opisany kodem ADN-1319, charakteryzował się wysokim powinowactwem oraz odpowiednim profilem aktywności wewnętrznej wobec obu celów biologicznych, jak również niską aktywnością wobec receptora M_1 i kanału hERG. Jednakowoż, posiadał on stosunkowo wysoką masę molową, której obniżenie stało się głównym celem prac nad kolejną serią pochodnych.

W drugiej serii wprowadzono więc modyfikacje w celu obniżenia masy cząsteczkowej dualnego liganda, jednocześnie zachowując jego korzystny profil farmakologiczny, lub nawet go poprawiając. Zważywszy, że „fragment 5-HT_6" był eksplorowany w pierwszej serii, co doprowadziło do wyboru w tym zakresie układu 1-(fenylsulfonyl)-4-(piperazyn-1-yl)-*1H*-indolu, ugrupowanie to w serii drugiej zostało utrzymane. Modyfikacje chemiczne dotyczyły tym razem „fragmentu D_2" i obejmowały wprowadzenie mniejszych podstawników arylowych, a także skrócenie łącznika alkilenowego. Otrzymane związki zostały poddane tym samym badaniom, co związki z serii pierwszej i przy wyborze cząsteczek do dalszych badań zostały zastosowane te same kryteria aktywności. Zgodnie z przewidywaniami, seria charakteryzowała się wyższą zmiennością w zakresie powinowactwa wobec receptora D_2, wynikającą zarówno ze skrócenia łącznika alkilenowego, jak i modyfikacji w układzie arylowym, przy relatywnie stałym, istotnym powinowactwie do receptora 5-HT_6. Zaobserwowano ogólny trend do obniżenia powinowactwa do receptora D_2, wraz ze skróceniem łącznika alkilenowego z 4 do 3 węgli, z wyjątkiem 2-propoksylowej pochodnej benzamidu, która miała około 20-krotnie wyższe powinowactwo do receptora D_2, niż jej analog butoksylowy. Związek ten miał także najwyższe powinowactwo do receptora 5-HT_6 i był w zasadzie jedynym związkiem z drugiej serii, który spełniał założone kryteria aktywności. Pochodna ta, opisana kodem ADN-2013 (Rycina 2), charakteryzowała się założonym profilem aktywności wobec kluczowych „terapeutycznych" celów biologicznych, oraz niską aktywnością wobec „antycelów".



Rycina 2. Wzór strukturalny związku ADN-2013

Co warte podkreślenia, zgodnie z założonym celem, poprzez zastosowanie lżejszego „fragmentu D2", masa cząsteczkowa nowo wyłonionej pochodnej została obniżona o 40 Da, w porównaniu ze strukturą wyjściową, przy zachowaniu korzystnego profilu farmakologicznego. Co prawda, masa cząsteczkowa związku ADN-2013 pozostawała na poziomie ponad 500 Da, niemniej jednak badania zależności struktura-aktywność wykazały, że żadna większa redukcja struktury chemicznej nie była tolerowana. Na przykład, usunięcie akceptora wiązania wodorowego spomiędzy głównego i dodatkowego pierścienia aromatycznego we „fragmencie 5-HT_6", czy też donora wiązania wodorowego przy układzie aryloksylowym „fragmentu D_2", skutkowało, odpowiednio, istotnym obniżeniem aktywności antagonistycznej wobec receptora 5-HT_6 oraz utratą selektywności wobec

receptorów M_1, lub obniżeniem powinowactwa do receptora D_2. W rezultacie, analiza składu hipotezy farmakoforowej ligandów dualnych pozwoliła na stwierdzenie, że wszystkie z początkowo zidentyfikowanych cech, są ważne dla zapewnienia akceptowalnego poziomu aktywności i selektywności. Sposób wiązania związku ADN-2013 w modelach receptorów 5-HT_6 i D_2 był zgodny z tym, zaproponowanym dla związków referencyjnych i prototypowej cząsteczki hybrydowej. W receptorze 5-HT_6 ugrupowanie sulfonamidowe ADN-2013 penetrowało kieszeń hydrofobową pomiędzy helisą 4 i 5, nawiązując kontakt z fenyloalaniną 5.38, natomiast w receptorze D_2 było zlokalizowane w sąsiedztwie helisy 6, zwrócone w kierunku części zewnątrzkomórkowej receptora. Fragment 2-propoksybenzamidowy oddziaływał natomiast z resztami aminokwasowymi tworzącymi drugą kieszeń wiążącą, zlokalizowaną pomiędzy helisami 2 i 7. W przypadku kompleksu z receptorem D_2, ligand zachował wiązanie wodorowe z Seryną 7.36, charakterystyczne dla częściowych agonistów, natomiast w mniej obszernej kieszeni receptora 5-HT_6 uległ wygięciu, by stworzyć wiązania wodorowe z asparaginą 2.64 i argininą 181 z drugiej pętli zewnątrzkomórkowej.

Rezultatem badań nad drugą serią cząsteczek hybrydowych był wybór 2-propoksybenzamidu, jako nowego „fragmentu D_2". Biorąc pod uwagę, że wybór ten był oparty na analizie kombinacji jedynie z układem 1-(fenylosulfonylo)-4-(piperazyno-1-ylo)-*1H*-indolu, postanowiono sprawdzić także inne „fragmenty 5-HT_6", opisane w serii pierwszej. Celem było wykluczenie możliwości, że optymalne dopasowanie 1-(fenylosulfonylo)-4-(piperazyno-1-ylo)-*1H*-indolu jest ograniczone jedynie do układu 7-butoksy-3,4-dihydrochinolino-2(*1H*)-onu, który został użyty do testowania „fragmentów 5-HT_6" w serii pierwszej oraz potwierdzenia, że jest to także najlepszy wybór w przypadku zastosowania „fragmentu D_2" o strukturze 2-propoksybenzamidu.

Otrzymano więc trzecią serię związków hybrydowych i poddano tym samym badaniom. Wyniki badań powinowactwa potwierdziły wyższość kombinacji 2-propoksybenzamidu, także z 1-(fenylosulfonylo)-4-(piperazyno-1-ylo)-*1H*-indolem, nad tymi z użyciem innych „fragmentów 5-HT_6". Analiza zależności struktura aktywność wszystkich trzech serii związków hybrydowych pozwoliła na wybór związku ADN-2013 do szerszej charakterystyki farmakologicznej, uwzględniającej poszerzone badania powinowactwa i aktywności wewnętrznej *in vitro* oraz badania w modelach zwierzęcych.

2.2.7. Poszerzona charakterystyka farmakologiczna molekuły wiodącej z grupy dualnych antagonistów receptora 5-HT_6 / częściowych agonistów receptora D_2 – związku ADN-2013, w porównaniu z substancjami referencyjnymi

Poszerzone badania farmakologiczne in vitro (Cerep, Francja oraz ChanTest, USA) oraz ocena aktywności przeciwdepresyjnej, przeciwlękowej i prokognitywnej związku ADN-2013 zostały opisane w pracy **H7**.

Badanie wiązania do 11 kolejnych receptorów monoaminergicznych, obok receptorów 5-HT_6 i D_2, ujawniły wysokie powinowactwo także wobec receptorów D_3, D_4, 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} (> 90% wiązania w stężeniu 1 µM), jak również umiarkowane powinowactwo wobec receptorów 5-HT_7, α_{1A}, α_{2C} oraz H_1 (> 50% wiązania w stężeniu 1 µM). Dla wszystkich tych receptorów wyznaczono stałe wiązania K_i. Dla kluczowych celów biologicznych, to jest receptorów 5-HT_6 i D_2 oraz D_3, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i α_{1A}, przeprowadzono także badania aktywności wewnętrznej. Eksperymenty te potwierdziły pożądany profil związku ADN-2013 wobec podstawowych celów biologicznych. Związek ten cechował się bardzo silnym antagonizmem wobec receptora 5-HT_6, opisanym stałą K_b = 1,8 nM, co było najsilniejszym efektem farmakologicznym ze wszystkich zbadanych. Wywoływał on również częściową blokadę receptora D_2, z wartością K_b = 3,7 nM, połączoną z jego częściowym pobudzeniem, o wartości EC_{50} = 54 nM. Z drugiej strony, pomimo wysokiego powinowactwa wobec receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, w badaniach aktywności wewnętrznej stwierdzono znacząco niższą aktywność, co wskazuje, że znaczenie oddziaływań z tymi receptorami dla globalnego efektu farmakologicznego związku ADN-2013 nie jest jednoznaczne. Należy zauważyć, że powinowactwo ADN-2013 do receptorów innych niż 5-HT_6 i D_2 nie jest zaskakujące, gdyż aripiprazol, który posłużył jako jedna z podstawowych struktur modelowych dla „fragmentu D_2" związków hybrydowych, nie jest w istocie substancją całkowicie selektywną wobec receptora D_2. Oddziałuje także z receptorami D_3, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_7 oraz, o czym rzadko się wspomina, również H_1 i właściwości te mogły zostać „transferowane" do cząsteczek hybrydowych, jako skutek użycia podobnego rdzenia chemicznego. Niemniej jednak można stwierdzić, że ADN-2013 wykazuje ukierunkowany, zaprojektowany profil wieloreceptorowy, z wyraźną preferencją wobec głównych celów biologicznych, to jest receptorów 5-HT_6 i D_2. Co więcej, dodatkowe cechy farmakologiczne tego związku mogą być traktowane jako potencjalnie korzystne i wspierające efekty wynikające z oddziaływania z głównymi celami biologicznymi. Na przykład, blokada ośrodkowych receptorów D_3 i α_1 może mieć korzystne znaczenie terapeutyczne dla pacjentów z demencją, co zostało przedyskutowane w rozdziale 2.2.5.

Związek ADN-2013 został poddany wstępnym badaniom biodostępności *in vitro*, w ramach panelu „Bioavailability" oferowanego przez firmę Cerep, zawierającego oznaczenia: rozpuszczalności w

wodzie, wiązania z białkami osocza, przenikalności na komórkach Caco-2 oraz stabilności metabolicznej z użyciem mikrosomów ludzkich. Stwierdzono, że charakteryzował się on dobrą rozpuszczalnością (97,3 mM w buforze PBS o pH 7,4, 200 mM w symulowanym płynie żołądkowych oraz 97,3 mM w symulowanym płynie jelitowym), wysokim stopniem wiązania z białkami (> 99%), akceptowalną stabilnością metaboliczną ($T_{0,5}$ > 60 min., klirens wewnętrzny < 115,5 mL/min/mg), ale niską przenikalnością na komórkach Caco-2 (0,7 x 10^{-3} cm/s). Chociaż właściwości te pozostawiają przestrzeń do optymalizacji, uzasadniają przekazanie związku ADN-2013 do badań in vivo.

Dla związku ADN-2013 przeprowadzono więc badania na szczurach, z użyciem uznanych procedur służących identyfikacji związków o potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej (test Porsolt'a) i przeciwlękowej (test Vogel'a oraz test otwartego pola). Dla porównania, w tych samych modelach przetestowano także referencyjnego antagonistę receptora 5-HT_6, związek SB-271046 oraz referencyjnego częściowego agonistę receptora D_2, aripiprazol.

Jako że celem było opracowanie kandydatów na leki przeciw BPSD, występujących głównie u osób w wieku podeszłym, test Porsolt'a oraz test otwartego pola zostały wykonane również na tzw. szczurach „starych", czyli w wieku powyżej 18 miesięcy, obok standardowych badań wykonywanych na zwierzętach dorosłych (ok. 3 miesiąca życia).

We wszystkich zastosowanych procedurach ADN-2013 był aktywny już w niskich dawkach. Minimalne dawki efektywne u szczurów dorosłych wynosiły jedynie 1 mg/kg, wskazując, że związek był odpowiednio biodostępny, także ośrodkowo, aby zapewnić znaczące interakcje z głównymi celami biologicznymi. Tymczasem, chociaż obie substancje referencyjne były również aktywne w testach Porsolt'a i Vogel'a, ich minimalne dawki efektywne były wyższe, wahając się w przedziale 3-10 mg/kg. Obserwacja ta sugeruje, że połączenie antagonizmu wobec receptora 5-HT_6 z częściowym agonizmem wobec receptora D_2 w cząsteczce hybrydowej, może wywołać efekt synergistyczny, prowadzący do zwiększenia jej potencjału terapeutycznego, w porównaniu z substancjami selektywnymi, odpowiadającymi składowym jej mechanizmu działania. Co więcej, ADN-2013 wykazał aktywność w teście Porsolt'a, także u szczurów „starych", przy tej samej minimalnej dawce efektywnej, co u zwierząt dorosłych (1 mg/kg) oraz w teście otwartego pola, w dawce jedynie nieco wyższej (3 mg/kg). Stwierdzenie aktywności związku ADN-2013 u „starych" zwierząt, jest bardzo istotnym krokiem w kierunku potwierdzenia ich potencjału terapeutycznego u pacjentów w podeszłym wieku, do których terapia ta jest głównie kierowana.

Obniżony apetyt oraz anhedonia smakowa są jednymi z głównych objawów depresji (Schatzberg i Nemeroff, 2009). Procedury eksperymentalne oparte na warunkowaniu instrumentalnym umożliwiają testowanie wpływu kandydatów na leki na złożone odpowiedzi behawioralne, związane

z codziennymi, przyjemnymi aktywnościami (Mierzejewski et al., 2008; Radwanska et al., 2008). W zgodzie z efektem obserwowanym w teście Porsolt'a, ADN-2013 nasilał naciskanie dźwigni powiązanej z sacharyną, w teście samopodawania nagrody naturalnej, u szczurów dorosłych (minimalna dawka efektywna = 1 mg/kg). Obserwacja ta sugeruje, że ADN-2013 mógłby być skuteczny w łagodzeniu anhedonii i apatii, które często towarzyszą epizodom depresyjnym u pacjentów w różnym wieku. Co więcej, ADN-2013 dawko-zależnie hamował poszukiwanie sacharyny w procedurze wygaszania (ekstynkcji), czyli kiedy nagroda naturalna jest nieobecna i naciskanie dźwigni nie skutkuje jej podaniem. Efekt ten może być związany z działaniem prokognitywnym ADN-2013, wynikającym z antagonizmu wobec receptora 5-HT_6. Z jednej strony, nasilenie samopodawania sacharyny, a z drugiej strony, ułatwienie wygaszania niewzmocnionej odpowiedzi, połączonej z tą samą nagrodą, sugeruje, że ADN-2013 nie wywołuje zachowań perseweracyjnych czy też nasilenia apetytu na słodycze, lecz raczej obniża anhedonię oraz poprawia elastyczność poznawczą i emocjonalną.

Reasumując, przeprowadzone badania pozwoliły na osiągnięcie założonego celu, to jest opracowanie zaprojektowanego liganda wielofunkcyjnego, będącego antagonistą receptora 5-HT_6 i częściowym agonistą receptora D_2, o wyraźnej i nasilonej, w stosunku do substancji selektywnych, aktywności farmakologicznej. Efekty przeciwdepresyjne, przeciwlękowe i prokognitywne, obserwowane u zwierząt z różnych grup wiekowych, świadczą o potencjale tego typu związków jako kandydatów na nowe leki w terapii BPSD.

3. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

3.1. AKTYWNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

W czasie studiów farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego zainteresowałem się tematyką poszukiwania substancji biologicznie aktywnych. W związku z tym, już na IV roku studiów, podjąłem pracę w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, na stanowisku technicznym. Z Katedrą związałem również swoje dalsze plany naukowe, tam obroniłem pracę magisterską pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Pawłowskiego, oraz podjąłem pracę na stanowisku asystenta. Początkowo moje zainteresowania skupiały się na syntezie chemicznej połączeń o spodziewanej aktywności biologicznej, a konkretnie, złożonych pochodnych arylopiperazynowych o działaniu ośrodkowym, w szczególności ligandów receptorów serotoninowych typu 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. Prace syntetyczne prowadziłem w czasie studiów, oraz już jako asystent, co zostało opisane w mojej pracy magisterskiej, oraz w publikacjach oryginalnych (spis prac naukowych, publikacje **D1**-**D5**). Na szczególną uwagę zasługuje tu publikacja **D2** „New arylpiperazine 5-HT_{1A} receptor ligands containing the pyrimido[2,1-*f]*purine fragment: synthesis, in vitro, and in vivo pharmacological evaluation.”, opublikowana w wiodącym czasopiśmie w dziedzinie chemii leków, Journal of Medicinal Chemistry (IF_{2003}=4,820). Jeden z otrzymanych przeze mnie związków, opisanych tam, charakteryzował się wyjątkowo korzystną aktywnością przeciwdepresyjną i przeciwlękową.

Stopniowo moje zainteresowania zaczęły jednak ewoluować w kierunku komputerowych metod wspomagających racjonalne projektowanie substancji leczniczych, opartych na modelowaniu molekularnym i do chwili obecnej stanowią one główny obszar moich zainteresowań naukowych. Pierwsze działania w tym kierunku podjąłem już w czasie pracy magisterskiej, której część wykonałem w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Kolejnym krokiem w realizacji tych zainteresowań było podjęcie stażu naukowego w zakresie modelowania molekularnego, w Zakładzie Chemii Leków IF PAN, pod kierunkiem prof. Andrzeja Bojarskiego. Badania w ramach stażu dotyczyły problematyki modelowania oddziaływań pomiędzy receptorami serotoninowymi a ich ligandami, głownie z grupy złożonych pochodnych arylopiperazynowych. W szczególności były to zagadnienia związane z badaniami konformacyjnymi fleksyjnych ligandów, tworzeniem modeli błonowych receptorów metabotropowych, automatycznym dokowaniem ligandów do modeli receptorów oraz projektowaniem ligandów w oparciu o strukturę receptora. Moje działania przyczyniły się do rozwinięcia nowego rodzaju aktywności naukowej w Katedrze Chemii Farmaceutycznej (modelowanie molekularne), oraz znacznego zintensyfikowania współpracy pomiędzy obydwoma jednostkami naukowymi. Rezultaty badań w dziedzinie modelowania molekularnego stanowiły również część mojej pracy magisterskiej oraz zostały opublikowane w kilku

publikacjach oryginalnych (publikacje **D6**-**D9**). Stały się one również przedmiotem mojej pracy doktorskiej, którą obroniłem z wyróżnieniem w maju 2007 roku pod kierunkiem prof. Andrzeja Bojarskiego, zatytułowanej „Analiza oddziaływań ligandów z receptorami serotoninowymi typu 5-HT_{1A} i 5-HT_7, metodami modelowania molekularnego".

Najistotniejszym nurtem moich badań było w tamtym czasie tworzenie komputerowych modeli receptorów serotoninowych typu 5-HT_{1A} i 5-HT_7, z użyciem nowej metodyki, pozwalającej na częściowe uwzględnienie swobody konformacyjnej miejsca wiążącego oraz wykorzystującej długołańcuchowe pochodne arylopiperazynowe o ograniczonej swobodzie konformacyjnej jako narzędzia wspomagające jego modelowanie. Głównymi wnioskami z przeprowadzonych badań było: (i) potwierdzenie skuteczności nowej metodyki w modelowaniu receptorów błonowych (ii) stwierdzenie, że najbardziej prawdopodobną konformacją bioaktywną długołańcuchowych arylopiperazyn w receptorze 5-HT_{1A} jest konformacja rozciągnięta, co korespondowało z obliczeniami wykonanymi w symulowanym środowisku wodnym, badaniami krystalograficznymi oraz badaniami NMR (iii) stworzenie modelu farmakoforowego dla antagonistów receptora 5-HT_7, w oparciu o oddziaływania z miejscem wiążącym modelu oraz (iv) wskazanie kluczowej roli optymalnego dopasowania do kieszeni wiążącej pomiędzy helisami 7-3 w receptorze 5-HT_7, a w szczególności roli oddziaływań z fenyloalaniną 3.28 i argininą 7.36, jako wymogu selektywności wobec tego receptora. Wyniki tych prac zostały zamieszczone w 2 publikacjach w Journal of Medicinal Chemistry (publikacje **D8**, **D9**). Publikacje te stały sią podstawą przyznania zespołowej nagrody Ministra Zdrowia.

W tamtym okresie nawiązałem współpracę naukową z Zakładem Badań Nowych Leków IF PAN, kierowanym przez prof. dr hab. Ewę Chojnacką-Wójcik (publikacje **D1**-**D3**), Zakładem Chemii Organicznej, Instytutu Chemii Organicznej i Technologii Politechniki Krakowskiej, kierowanym przez prof. dr hab. Piotra Kowalskiego (publikacja **D6**) oraz Pracownią Spektroskopii NMR Katedry Chemii Organicznej UJCM. Ponadto, byłem wykonawcą trzech grantów finansowanych przez KBN/MNiSW oraz kierownikiem dwóch projektów naukowych subsydiowanych przez UJCM. Brałem również udział w projekcie pt. „Polski lek innowacyjny w terapii cukrzycy typu II oparty na mechanizmie oddziaływania poprzez receptor PPARγ", realizowanym przez firmę Adamed, polegający na wspomaganiu projektowania związków aktywnych technikami komputerowego modelowania molekularnego.

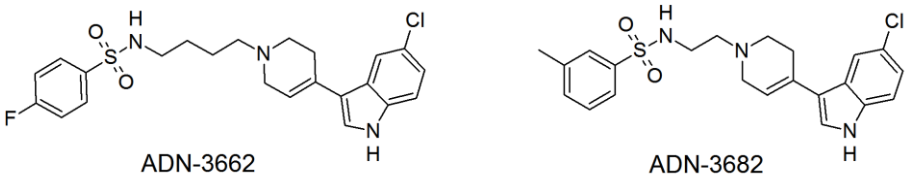
3.2. AKTYWNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, moja działalność naukowa związana była przede wszystkim z badaniami prowadzonymi w ramach projektu „Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – schizofrenii, depresji, lęku". Moim zadaniem, jako kierownika tego projektu, a także jako osoby odpowiedzialnej za prowadzenie i rozwój projektów innowacyjnych w obszarze neuropsychiatrii w dziale Badań i Rozwoju Adamed, było: (1) planowanie kierunków badawczych, w oparciu o zapotrzebowanie medyczne, wiedzę naukową, stan techniki oraz sytuację rynkową, (2) wyznaczanie głównych i pośrednich celów projektu, (3) dobór odpowiednich rozwiązań do ich realizacji, w tym wybór metod badawczych oraz wykwalifikowanych wykonawców, (4) dobór i rozwój narzędzi badawczych, w tym modeli molekularnych i zwierzęcych, (5) proponowanie rozwiązań technicznych, w szczególności wspomagane komputerowo projektowanie nowych substancji biologicznie aktywnych, (6) koordynowanie wszystkich prac badawczych, obejmujące rozdział prac, ocenę raportów okresowych i końcowych, od etapu in silico, do in vivo oraz sprawozdawczość wobec sponsorów, (7) szczegółową i globalną interpretację wyników badań oraz kwalifikację wybranych innowacyjnych związków chemicznych – kandydatów na leki do kolejnych etapów rozwoju, a także (8) aktywny udział w promocji oraz przygotowaniu do komercjalizacji kluczowych wyników projektu. Taki zakres obowiązków wymagał znacznego poszerzenia mojej ówczesnej wiedzy i kompetencji. Szczególną rolę w tym względzie odegrała współpraca naukowa z Zakładem Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie, którą nawiązałem w roku 2007. Ścisła współpraca naukowa z prof. dr hab. Przemysławem Bieńkowskim, kierownikiem Zakładu, oraz dr hab. Pawłem Mierzejewskim, prof. IPiN, którzy łączą kompetencje w obszarze badań farmakologicznych na zwierzętach z doświadczeniem w zakresie badań klinicznych, pozwoliła mi na znaczne poszerzenie kompetencji w zakresie farmakologii ośrodkowego układu nerwowego. Istotną rolę w poszerzeniu zakresu moich prac badawczych o planowanie i interpretację eksperymentów farmakologicznych *in vivo* odegrała także, nawiązana w 2010 roku, współpraca z Zakładem Farmacji Klinicznej UJCM, kierowanym przez prof. dr hab. Annę Wesołowską.

Główne cele projektu, początkowo skupione wokół poszukiwania nowych rozwiązań farmakoterapeutycznych dla 3 najbardziej rozpowszechnionych chorób psychicznych, czyli schizofrenii, depresji i zaburzeń lękowych, z czasem ewoluowały w kierunku nieco bardziej niszowego, lecz nie mniej istotnego medycznie, szczególnie w świetle starzenia społeczeństwa, problemu behawioralnych i psychologicznych symptomów demencji. Z projektu tego, ukończonego w roku 2013, wywiódł się nowy, zatytułowany „Opracowanie nowych kandydatów na leki w terapii behawioralnych i psychologicznych symptomów demencji (BPSD)", kontynuowany do dziś. Prace te

zaowocowały otrzymaniem i przebadaniem ponad 4000 związków innowacyjnych, należących do kilkunastu chemotypów, z których ponad 1000 zostało objętych ochroną w ramach 5 krajowych i 5 międzynarodowych zgłoszeń patentowych. Najbardziej zaawansowane w rozwoju kierunki badawcze zostały uwzględnione w zgłoszeniach patentowych WO2012035123 oraz WO2013001499 i weszły w skład prac będących podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (prace habilitacyjne **H3** i **H6**). Zgłoszenie patentowe WO2012035123, opisujące pierwszą grupę pochodnych arylosulfonamidowych, jest bardzo obszerne, obejmuje ponad 300 nowych związków końcowych i można w nim wyróżnić 3 główne podgrupy chemiczne, odpowiadające różnym aktywnościom farmakologicznym. Podgrupy pochodnych arylopiperydyny i arylopiperazyny zostały opisane w pracach wchodzących w skład habilitacji (**H3**-**H5**). Kolejną, bardzo interesującą podgrupą pochodnych arylosufonamidowych są związki zawierające w swojej strukturze układ tetrahydropirydyloindolu (THPI). Układ ten został inkorporowany z myślą o wprowadzeniu do profilu farmakologicznego, obok blokady receptorów 5-HT_6 i 5-HT_7, także aktywności blokującej transporter serotoninowy (SERT) (van Hes et al., 2003). Koncepcja tego typu ligandów wielofunkcyjnych została opracowana w oparciu o synergię pomiędzy blokadą transportera serotoninowego i antagonizmu wobec receptorów 5-HT_6 i 5-HT_7 w aktywności przeciwdepresyjnej (Bonaventure et al., 2007; Hirano et al., 2009; Wesołowska, 2007; Wesołowska et al., 2007). Poza podstawowymi celami terapeutycznymi tych związków hybrydowych, modelowanie ich oddziaływań z receptorami D_2 i 5-HT_{1A} wskazało na możliwość wysokiej aktywności wobec tych celów biologicznych. Zaprojektowano i otrzymano 59 pochodnych z tej podgrupy, które następnie zostały przebadane pod kątem powinowactwa i aktywności wewnętrznej wobec szerokiej palety receptorów monaminergicznych, transportera serotoninowego oraz kanału potasowego hERG. Badania te potwierdziły powinowactwo otrzymanych związków wobec receptorów 5-HT_7 i ich zdolność blokowania SERT, a także dodatkowe korzystne właściwości, takie jak częściowy agonizm wobec receptorów dopaminowych typu D_2 i serotoninowych typu 5-HT_{1A}. Potwierdziły także, zakładany podczas projektowania struktur, brak istotnego powinowactwa wobec kanału hERG czy receptorów muskarynowych. Zidentyfikowano także ciekawą zależność dotyczącą powinowactwa badanych związków wobec receptorów 5-HT_6, a mianowicie, ich aktywność była odwrotnie proporcjonalna do długości łącznika alkilowego pomiędzy częścią arylosulfonamidową i układem tetrahydropirydyloindolu, a istotną aktywnością blokującą receptor 5-HT_6 charakteryzowały się tylko pochodne z łącznikiem etylenowym. Na szczególną uwagę zasługuje w tym względzie związek ADN-3682, którego powinowactwo (K_i) wobec SERT i receptora 5-HT_6 wynosi odpowiednio 5 nM i 6,4 nM. Taka kombinacja aktywności wyraźnie wyróżnia ten związek, oraz jego najbliższe pochodne o podobnej aktywności, na tle stanu techniki. Spośród pochodnych z łącznikiem butylenowym, najciekawszy okazał się związek ADN-3662, w profilu receptorowym którego na

pierwszy plan, oprócz blokady transportera serotoninowego, wysunęła się aktywność częściowo agonistyczna wobec receptorów D_2 (Rycina 3).

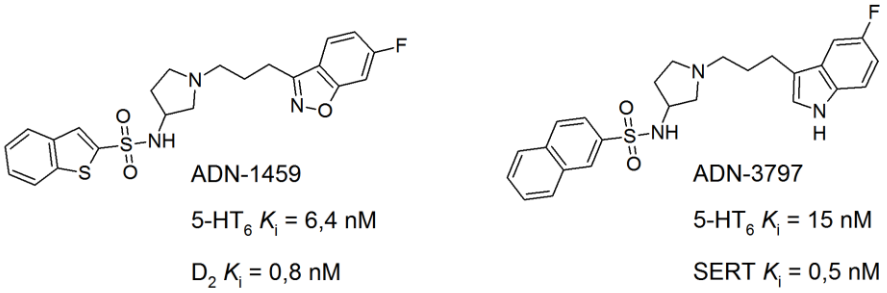


Rycina 3. Wzory strukturalne związków ADN-1184 i ADN-2157

Tego typu połączenie jest również bardzo interesujące ze względu na możliwą synergię pomiędzy powyższymi aktywnościami, w zakresie terapii zaburzeń nastroju (depresja, choroba afektywna dwubiegunowa) oraz schorzeń z nimi współistniejących (zaburzenia lękowe, zaburzenia przyjmowania pokarmu, uzależnienia) (Conway et al., 2014; Sheffrin et al., 2009; Worthington et al., 2005). ADN-3662 charakteryzuje się szeroką aktywnością w: (1) klasycznych modelach aktywności przeciwdepresyjnej, takich jak test zawieszenia za ogon u myszy czy test Porsolt'a u myszy i szczurów (MED = 0,312-1,25 mg/kg), (2) aktywności przeciwlękowej – test czterech płytek u myszy i test Vogel'a u szczurów (MED = 0,312-1 mg/kg) oraz (3) zaawansowanych modelach opartych na modulowaniu reakcji instrumentalnej u szczurów, takich jak wpływ na ekspresję samopodawania nagrody naturalnej. ADN-3662 nasilał samopodawanie sacharyny u dorosłych szczurów (MED = 3 mg/kg), co dodatkowo potwierdza jego korzystny wpływ na nastrój, oraz odwracał deficyt samopodawania sacharyny wywołany haloperidolem (MED = 1 mg/kg). Aktywność ta może świadczyć o potencjale tego związku w terapii wtórnych objawów negatywnych schizofrenii. Wartym podkreślenia jest również brak aktywności związku ADN-3662 w modelach działań niepożądanych, takich jak katalepsja (MED > 100 mg/kg), sedacja (MED > 100 mg/kg), czy zaburzenia interakcji socjalnych (MED > 30 mg/kg). Wyniki wyżej wymienionych badań zostały, oprócz zgłoszenia patentowego, przedstawione na międzynarodowej konferencji chemii medycznej w Lizbonie we wrześniu 2014 roku (Wykaz publikacji – pozycja **P1**), a publikacja je zawierająca jest aktualnie w przygotowaniu.

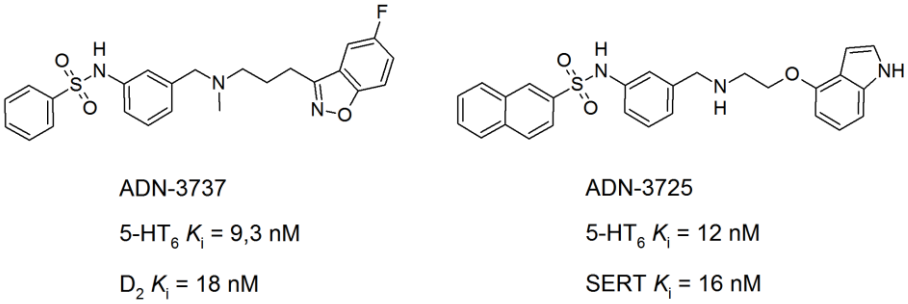
Kolejną grupą związków otrzymanych w ramach projektu, które stały się przedmiotem ochrony patentowej były arylosulfonamidowe pochodne amin cyklicznych. Zostały one opisane w zgłoszeniu patentowym WO2013001505 (Wykaz publikacji – pozycja **D10**). Grupa ta została opracowana na podstawie wyników uzyskanych dla pierwszej serii pochodnych arylosulfonamidowych (WO2012035123, **H3**) jako jej strukturalna modyfikacja. Głównym celem zaprojektowania i otrzymania tej grupy związków, oprócz dywersyfikacji chemicznej, była chęć ograniczenia

powinowactwa wobec receptorów adrenergicznych typu α_1. Jak wspomniano wcześniej, blokada tych receptorów może wpływać korzystnie na ograniczenie pobudzenia i agresji u pacjentów z demencją (Szot et al., 2006; Wang et al., 2009), niemniej jednak może stać się również źródłem działań niepożądanych, szczególnie o charakterze hipotonii ortostatycznej lub nadmiernej sedacji. Celem zatem stało się uzyskanie związków zachowujących korzystny profil aktywności antagonistycznej wobec receptorów 5-HT_6 i 5-HT_7, przy jednocześnie niższej tendencji do blokady receptorów α_1. W tym celu, dokonano analizy miejsca wiążącego receptora adrenergicznego α_1 z użyciem jego modelu homologicznego i stwierdzono nieco mniejszą objętość kieszeni wiążącej w obszarze, w którym lokuje się łącznik alkilowy pochodnych arylosulfonamidowych pierwszego typu. Jest to związane z obecnością tam relatywnie obszernej reszty fenyloalaniny 7.39, która może utrudniać wiązanie objętościowych fragmentów liganda. Dokonano zatem modyfikacji strukturalnej polegającej na przeniesieniu fragmentu cyklicznego usztywniającego cząsteczkę pierwszego typu pomiędzy aminą a układem aromatycznym, lokującym się w kieszeni wiążącej pomiędzy helisami 4 a 6, pomiędzy aminę a układ sulfonamidowy, oddziałujący z aminokwasami kieszeni wiążącej między helisą 7 a 3 receptora. Spowodowało to lokalizację obszerniejszego, cyklicznego fragmentu cząsteczki w stosunkowo wąskim rejonie miejsca wiążącego, w sąsiedztwie fenyloalaniny 7.39, co miało negatywnie wpłynąć na powinowactwo do receptora α_1. Opisana grupa pochodnych zawiera 6 układów centralnych opartych na aminie cyklicznej, takich jak: azetydyna, metyloazetydyna, pirolidyna, metylopirolidyna, piperydyna i metylopiperydyna. W rejonie układu aromatycznego, podobnie jak w przypadku arylosulfonamidów pierwszego typu, zastosowano 3 rodzaje układów: fluorobenzizoksazolopropylowy (analogi pochodnych arylopiperydydyny), indolopropylowy (analogi pochodnych THPI) oraz zróżnicowane fragmenty aryloksyetylenowe (analogi pochodnych arylopiperazyny). Otrzymana szeroka grupa pochodnych charakteryzowała się wysokim powinowactwem do założonych celów biologicznych, w szczególności receptorów 5-HT_6 i 5-HT_7. Zgodnie z założeniami, pochodne benzizoksazolowe wykazywały także wyraźny antagonizm wobec receptorów 5-HT_{2A} i D_2, a pochodne indolowe blokadę transportera serotoninowego. Arylosulfonamidy drugiego typu charakteryzowały się relatywnie obniżonym powinowactwem wobec receptora adrenergicznego α_1, w porównaniu do analogów arylosulfonamidowych pierwszego typu. Powinowactwo to jednakowoż nie zostało wyeliminowane, a jedynie względnie zredukowane. W tej grupie związków na szczególną uwagę zasługuje pochodna benzizoksazolowa ADN-1459, wykazująca aktywność przeciwpscyhotyczną, oraz pochodna indolowa ADN-3797 (Rycina 4).



Rycina 4. Wzory strukturalne związków ADN-1459 i ADN-3797 oraz ich powinowactwa do wybranych celów biologicznych.

Trzecią serię ligandów multimodalnych zawierających ugrupowania arylosulfonamidowe oraz zróżnicowane fragmenty aryloaminowe opisano w zgłoszeniu patentowym WO2013140347 (Wykaz publikacji – pozycja **D11**). Związki tu opisane są rozwinięciem koncepcji pochodnych przedstawionych w zgłoszeniu patentowym **D10** i ich strukturalnymi analogami, gdzie jako układ centralny zastosowano aromatyczny fragment benzylowy. Wśród arylosulfonamidowych pochodnych benzyloaminy udało się zidentyfikować szereg związków wykazujących wysokie powinowactwo do receptora 5-HT_6 oraz D_2 (Rycina 5).



Rycina 5. Wzory strukturalne związków ADN-3737 i ADN-3725 oraz ich powinowactwa do wybranych celów biologicznych.

Część z pochodnych, zawierająca jako fragment aryloaminowy układ 4-indoloksyetylenowy, charakteryzowała się oryginalnym profilem obejmującym częściowy agonizm wobec receptora D_2, połączony z antagonizmem wobec receptora 5-HT_6. Mimo odmiennej budowy chemicznej, pod względem farmakologicznym związki te wykazywały podobieństwo do pochodnych indoloaminowych, opisanych w zgłoszeniu patentowym WO2013001499 (**H6**) oraz publikacji **H7**, omówionych w rozdziałach 2.2.6 i 2.2.7. Warto tutaj zauważyć, że zgodnie z założeniami, powinowactwo pochodnych benzyloaminowych wobec receptora adrenergicznego α_1 zostało jeszcze

bardziej obniżone. Związki te wykazywały się również niskim powinowactwem wobec receptorów histaminowych i muskarynowych oraz kanałów hERG.

W zgłoszeniu patentowym WO2013001498 (Wykaz publikacji – pozycja **D12**) opisano grupę związków, charakteryzujących się zdolnością blokady receptorów monoaminergicznych (głównie D_2 i 5-HT_{2A}) i napięciowozależnych kanałów sodowych Nav1.1-8. Chemicznie związki te są hybrydami zawierającymi w swej strukturze fragmenty trójcyklicznych neuroleptyków II generacji, takich jak olanzapina czy kwetiapina oraz układy imidowe charakterystyczne dla niektórych związków o aktywności przeciwdrgawkowej (Kamiński et al., 2011, 2008), połączone łącznikiem alkilowym. Na szczególną uwagę zasługuje tu związek ADN-0076, który charakteryzował się bardzo korzystną aktywnością przeciwpsychotyczną, a w szczególności zdolnością do odwracania zaburzeń bramkowania sensomotorycznego wywołanych dizocylpiną (MK-801) u szczurów. Zaburzenie to jest trudne do odwrócenia dostępnymi lekami przeciwpsychotycznymi, szczególnie w dawkach nie wywołujących zaburzeń pozapiramidowych. Deficyty bramkowania sensomotorycznego są charakterystyczne zarówno dla schizofrenii jaki i innych schorzeń, np. fazy maniakalnej choroby afektywnej dwubiegunowej. Jedną ze strategii terapeutycznych w tych schorzeniach jest leczenie kombinacją neuroleptyku (antagonisty receptorów monoaminergicznych) i leku przeciwdrgawkowego (blokującego kanały sodowe). Otrzymane związki oferują więc taki mechanizm działania w jednej cząsteczce.

Równolegle do opracowywania nowych związków, w ramach Projektu prowadzono charakterystykę substancji referencyjnych.

Szczególną uwagę poświęcono związkowi EMD386088, opisywanemu w literaturze jako selektywny agonista receptorów 5-HT_6, o jedynie umiarkowanym powinowactwie do receptorów 5-HT_3 i stosowanym jako narzędzie farmakologiczne do badania efektów pobudzenia receptorów 5-HT_6. W pierwszym etapie prac wykonano badanie profilu funkcjonalnego (agonizm/antagonizm) tego związku metodami *in vitro* (Wykaz publikacji – pozycja **D13**). Badania przeprowadzono równolegle na Wydziale Farmaceutycznym UJCM i w firmie Cerep, z użyciem dwóch metod detekcji sygnału wewnątrzkomórkowego – pomiaru stężenia cyklicznego adenozynomonofosforanu oraz wewnątrzkomórkowego uwalniania jonów wapniowych. Obie metody wykazały częściowy, a nie jak wcześniej opisywano, pełny agonizm związku EMD386088 wobec receptora 5-HT_6. To oryginalne odkrycie wskazało na konieczność uwzględnienia nowo opisanego profilu EMD386088 w interpretacji badań farmakologicznych *in vivo* z jego użyciem.

Kolejnym etapem było określenie aktywności związku EMD386088 w testach na aktywność przeciwlękową (Wykaz publikacji – pozycja **D14**). Badania przeprowadzono z użyciem uznanych

modeli zwierzęcych – testu podniesionego labiryntu krzyżowego oraz testu konfliktu wg Vogel'a. EMD386088 wykazał wyraźną aktywność anksjolityczną w obu testach, wywołując efekt o charakterze „odwróconego U" (krzywa dzwonowata), uzyskując znamienną statystycznie aktywność w dawce 2,5 mg/kg. Efekt ten był znoszony przez związek SB-271046 – selektywnego antagonistę receptorów 5-HT_6, natomiast nie wykazano interakcji ze związkami modulującymi układ GABA-ergiczny (diazepam, flumazenil). Świadczyć to może o bezpośrednim powiązaniu obserwowanej aktywności przeciwlękowej z pobudzeniem receptorów 5-HT_6 przez EMD386088.

Zdobywaniu wiedzy na temat substancji referencyjnych, towarzyszyły także analizy dotyczące przydatności określonych modeli badawczych w wyłanianiu nowych kandydatów na leki. Przykładem tego typu badań może być publikacja przedstawiająca porównanie aktywności grupy leków przeciwpsychotycznych w teście zawieszenia za ogon u myszy (Wykaz publikacji – pozycja **D15**). Celem niniejszej pracy było, z jednej strony określenie aktywności leków referencyjnych, jako odniesienia do badań nad substancjami innowacyjnymi, a z drugiej strony zbadanie użyteczności samego modelu w selekcji nowych związków. Wykazano, że test zawieszenia za ogon u myszy jest relatywnie nieczuły na aktywność przeciwdepresyjną wybranych leków przeciwpsychotycznych, o klinicznie potwierdzonej skuteczności. Warto jednak zauważyć, że klozapina, złoty standard w terapii schizofrenii, o udowodnionym działaniu przeciwdepresyjnym i najkorzystniejszym wpływie na redukcję liczby samobójstw (Meltzer, 2012), wykazywała aktywność w jednym z parametrów testu, wyróżniając się tym samym na tle pozostałych leków. Wyniki te pozostają w zgodności z badaniami leków przeciwpsychotycznych, wykonanych w teście Porsolt'a u szczurów, przedstawionych w publikacji habilitacyjnej **H1**, gdzie klozapina również charakteryzowała się najkorzystniejszym profilem aktywności przeciwdepresyjnej. W rezultacie można stwierdzić, że test zawieszenia za ogon, mimo stosunkowo niskiej czułości w wykrywaniu aktywności przeciwdepresyjnej leków przeciwpsychotycznych, może stanowić cenne narzędzie uzupełniające charakterystykę nowych kandydatów na leki przeciwpsychotyczne, gdyż wyraźna aktywność w tym teście może być prognostykiem szczególnie korzystnego wpływu na nastrój.

Przeprowadzono również podobne badania, charakteryzujące aktywność przeciwlękową wybranych leków przeciwpsychotycznych w teście podniesionego labiryntu krzyżowego (Wykaz publikacji – pozycja **S1**) oraz wpływ na zachowania społeczne i pamięć (Wykaz publikacji – pozycja **S2**). Na szczególną uwagę zasługuje tu zdecydowanie wyróżniający się profil farmakologiczny nowego leku przeciwpsychotycznego – lurasidonu, który w przeciwieństwie do innych zbadanych leków przeciwpsychotycznych, nie powodował zaburzeń w teście eksploracji i rozpoznania socjalnego. Analizowano także przydatność różnych modeli do badania nowych leków pod kątem anhedonii oraz współistnienia psychozy i uzależnienia (Wykaz publikacji, prace **D16**-**D18**)

W związku z zapotrzebowaniem na nowe modele zwierzęce BPSD, które zbliżyłyby badania przedkliniczne do sytuacji klinicznej i usprawniły proces poszukiwania nowych terapii w tym kierunku, uruchomiono program badań polegających na szerokiej charakterystyce tzw. szczurów „starych", czyli w wieku powyżej 18 miesięcy. Najistotniejszym dotychczas odkryciem w tym zakresie było stwierdzenie występowania u części tych zwierząt, stabilnych w czasie, spontanicznych potrząśnięć głową (ang. head twitches) (Wykaz publikacji – pozycja **S3**). Spontaniczne potrząśnięcia głową u zwierząt dorosłych (ok. 3 miesięcy) występują bardzo rzadko i są w celach badawczych indukowane farmakologicznie, z użyciem agonisty receptorów 5-$HT_{2A/2C}$ – związku DOI (2,5-dimetoksy-4-jodoamfetamina). Model odwracania potrząśnięć głową wywołanych DOI jest używany do badania antagonizmu wobec receptorów 5-HT_{2A} i 5-HT_{2C} *in vivo* oraz może być traktowany jako jeden z farmakologicznych modeli psychozy, w tym wypadku o podłożu serotoninowym. Jak wspomniano w rozdziałach 2.2.2 i 2.2.4, istnieją bowiem przesłanki, że w przeciwieństwie do psychozy w schizofrenii, głównie o podłożu dopaminowym, w psychozach towarzyszących demencji większą rolę mogą odgrywać zaburzenia w innych układach neuroprzekaźnikowych, jak serotonina czy glutaminian. Znamiennym jest, że pimawanseryna, kandydat na lek przeciw psychozom w chorobie Parkinsona, będący aktualnie w 3 fazie badań klinicznych, jest odwrotnym agonistą receptorów 5-HT_{2A}. Należy podkreślić, że spontaniczne potrząsania głową u szczurów „starych" były nasilane przez agonistę receptorów 5-$HT_{2A/2C}$ – DOI oraz przez niekompetytywnego antagonistę receptorów glutaminianergicznych NMDA – dizocilpinę (MK-801) oraz dawkozależnie odwracane przez związki blokujące receptor 5-HT_{2A}, jak ketanseryna i pimawanseryna, lecz nie przez antagonistów receptora D_2 i 5-HT_6, co potwierdza jego farmakologiczną specyficzność. Nasilenie występowania spontanicznych potrząśnięć głową było także skorelowane z wrażliwością na stymulację motoryczną indukowaną MK-801, stanowiącą uznany model farmakologiczny, używany w selekcji związków o potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej. Odkrycie występowania u części „starych" szczurów spontanicznego efektu, mechanistycznie powiązanego z zaburzeniami psychotycznymi u osób z demencją, może być bardzo istotnym krokiem w kierunku modelowania tego schorzenia u zwierząt, o dużym znaczeniu dla poszukiwania nowych leków przeciw BPSD.

Poza projektami „Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego – schizofrenii, depresji, lęku" oraz „Opracowanie nowych kandydatów na leki w terapii behawioralnych i psychologicznych symptomów demencji (BPSD)" prowadzono współpracę naukową dotycząca modelowania molekularnego celów biologicznych i opisu oddziaływań z ligandami oraz ich komputerowo-wspomaganego projektowania. Oprócz modeli homologicznych receptorów monoaminergicznych typu 5-HT_6, 5-HT_7, 5-HT_{2A} i D_2, opisanych w rozdziałach 2.2.3 i 2.2.4, szczególną uwagę poświęcono także studiowanemu wcześniej modelowi receptora 5-HT_{1A} oraz

transporterowi serotoninowemu. Opisano między innymi sposób wiązania nowego agonisty receptora 5-HT_{1A}, związku ((1-[3-(4-(2-metoksyfenylo)piperazin-1-yl)propyl]-3',4'-dihydro-2'H-spiro[imidazolidyn-4,1'-naftalen]-2,5-dion)), należącego do grupy długołańcuchowych pochodnych arylopiperazynowych (LCAPs) z 4-podstawionym układem hydantoiny w części terminalnej o aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwlękowej (Wykaz publikacji – pozycja **D20**). Sposób wiązania liganda uwzględniał oddziaływanie części arylopierazynowej z kieszenią wiążącą pomiędzy helisami 4-6, a układu spirohydantoiny - w kieszeni pomiędzy helisami 7-3. Ten sposób wiązania był zgodny z opisanym przez nas wcześniej dla długołańcuchowych arylopiperazyn o strukturze usztywnionej i konformacyjne labilnej (Wykaz publikacji – pozycja **D9**), a odwrotny do proponowanego przez Lopez-Rodriguez i wsp. (Lopez-Rodriguez et al., 2005, 2002, 2001). Wskazano również, że ze względu na lepsze dopasowanie do miejsca wiążącego, aktywniejszy może być izomer R badanego związku.

Podobny sposób wiązania liganda, obejmujący oddziaływanie ugrupowania arylopiperazynowego z kieszenią pomiędzy helisami 4-6 został opisany w publikacji poświęconej nowym długołańcuchowym arylopiperazynom, pochodnym metyloksantyny (Wykaz publikacji – pozycja **D21**). Stwierdzono, że układ puryno-2,6-dionu oddziaływał z kieszenią wiążącą pomiędzy helisami 7-3, nawiązując korzystne energetycznie wiązanie wodorowe pomiędzy grupą karbonylową związku a resztą amidową asparaginy 7.39, w przypadku związków z łącznikiem 4 i 5 węglowym. Krótsze analogi nie były w stanie nawiązać tego odziaływania, co może tłumaczyć wyższą aktywność związków z dłuższymi łącznikami.

W przypadku arylopiperazynowych pochodnych hydroksybenzamidu, zaproponowano ich sposób wiązania z receptorami 5-HT_{1A} i 5-HT_7 (Wykaz publikacji – pozycja **D22**). Analiza kompleksów aktywnych w miejscu wiążącym receptora 5-HT_{1A} pozwoliła wytłumaczyć wyższą aktywność pochodnych z ugrupowaniem amidowym w pozycji *meta*, co wynikało z możliwości nawiązania przez to ugrupowanie wiązań wodorowych także z łańcuchami bocznymi glutaminy 2.62 oraz tryptofanu 7.40, a nie tylko z asparaginą 7.39, jak to miało miejsce w przypadku analogów *orto*. Optymalna długość łącznika alkilowego wynosiła 4 atomy (mostek oksypropylenowy) i, podobnie jak w przypadku pochodnych metyloksantynowych, jego skrócenie skutkowało spadkiem aktywności, w związku z utratą możliwości wiązania wodorowego z asparaginą 7.39. W receptorze 5-HT_7 pochodne hydroksybenzamidu nawiązywały mniejszą ilość oddziaływań specyficznych, co może tłumaczyć ich generalnie niższe powinowactwo wobec tego podtypu receptora. Relatywnie najsilniejsze wiązanie związku podstawionego pierścieniem fenylowym przy układzie benzamidowym, wytłumaczono możliwością tworzenia korzystnych oddziaływań hydrofobowych z występującą w pozycji 7.39 lipofilową leucyną (zamiast zdolnej do tworzenia wiązań wodorowych asparaginy w receptorze 5-HT_{1A}).

Ciekawym przykładem konstruowania ligandów wielofunkcyjnych, z użyciem modelowania molekularnego, jest praca poświęcona nowym zasadom Mannicha, pochodnym hydantoiny (Wykaz publikacji – pozycja **D23**). W oparciu o analizę budowy miejsca wiążącego transportera serotoninowego, z użyciem jego modelu homologicznego, sposób wiązania referencyjnych inhibitorów oraz analizę oddziaływań nowych struktur, zaproponowano modyfikacje chemiczne otrzymanych wcześniej ligandów receptora 5-HT_{1A}, pochodnych hydantoiny (opisanych w publikacji **D20**), w celu uzyskania powinowactwa również do transportera serotoninowego. Skrócenie łącznika alkilowego z 3 do 1 węgla oraz zwiększenie swobody konformacyjnej podstawnika arylowego w pozycji 5 układu hydantoiny, pozwoliło na uzyskanie związków o istotnym powinowactwie, zarówno wobec receptora 5-HT_{1A}, jaki i transportera serotoninowego. Jako kluczowe dla uzyskania oddziaływań z transporterem serotoninowym, uznano odpowiednie dopasowanie fragmentu aromatycznego do kieszeni hydrofobowej tworzonej przez leucynę 99, tryptofan 103, tyrozynę 176, izoleucynę 179, fenyloalaninę 335 oraz łańcuch alifatyczny argininy 104. Analiza profilu funkcjonalnego oraz badanie oddziaływań z innymi celami biologicznymi, pozwoliły stwierdzić, że otrzymane związki są częściowymi agonistami receptora 5-HT_{1A} oraz antagonistami receptora 5-HT_{2A}. Oba te efekt mogą dawać synergię z blokadą transportera serotoninowego, polegającą na przyspieszeniu wystąpienia efektu przeciwdepresyjnego (Dawson i Watson, 2009; Rickels et al., 2009). Ponadto charakteryzowały się one niskim powinowactwem do receptorów adrenergicznych α_1, a najaktywniejszy ze związków wykazywał efekt przeciwdepresyjny w teście Porsolt'a, bez towarzyszącej sedacji.

Po uzyskaniu stopnia doktora brałem również udział jako wykonawca w kilku grantach naukowych, finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki.

W ramach grantu NCN nr 5887/B/P01/2011/40 stwierdzono, że zolpidem, krótko działający lek nasenny z grupy niebenzdiazepinowych agonistów miejsca benzodiazepinowego receptora GABA-A, wywołuje u szczurów katalepsję, podobną do tej wywoływanej przez leki przeciwpsychotyczne, blokujące receptory D_2, jak np. haloperidol (Wykaz publikacji – pozycja **D24**). Stało się to przesłanką do zbadania zolpidemu w zwierzęcych modelach aktywności przeciwpsychotycznej (Wykaz publikacji – pozycja **S4**). Wyraźne działanie przeciwpsychotyczne zolpidemu, występujące w dawkach niższych niż katalepsja i sedacja, wskazały na możliwość znalezienia nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej, o innym niż dotychczas mechanizmie działania, opartym na oddziaływaniu z układem GABA-ergicznym. Krótki czas działania zolpidemu, będący jego zaletą jako leku wprowadzającego w sen, jest właściwością niekorzystną w przypadku rozważania aktywności przeciwpsychotycznej. W związku z tym, zaprojektowano serię fluorowanych pochodnych zolpidemu, o potencjalnie dłuższym czasie działania. Wśród otrzymanych związków znaleziono takie,

zachowujące wysoką aktywność pobudzającą receptor GABA-A, poprzez oddziaływanie z miejscem benzodiazepinowym, ale charakteryzujących się wyższą stabilnością metaboliczną od leku wyjściowego (Wykaz publikacji – pozycja **P2**).

Udało mi się także zaprojektować grupę ligandów receptora adrenergicznego α_2, o potencjalnym wpływie obniżającym masę ciała (grant NCN nr DEC-2011/03/B/NZ7/00635, Wykaz publikacji – pozycja **P3**), oraz serię ligandów wielofunkcyjnych, blokujących receptory 5-HT_6 i cholinoesterazy, o spodziewanej synergistycznej aktywności prokognitywnej, w chorobie Alzheimer'a (grant MNiSW nr IP2012 063272).

Nowo otrzymane związki są aktualnie poddawane szerokiej charakterystyce farmakologicznej *in vitro* i *in vivo*.

4. PIŚMIENNICTWO

Amano, N., Inuzuka, S., Ogihara, T., 2009. Behavioral and psychological symptoms of dementia and medical treatment. Psychogeriatr. Off. J. Jpn. Psychogeriatr. Soc. 9, 45–49.

Andrews, S.P., Brown, G.A., Christopher, J.A., 2014. Structure-Based and Fragment-Based GPCR Drug Discovery. ChemMedChem 9, 256–275.

Arnt, J., Bang-Andersen, B., Dias, R., Bøgesø, K.P., 2008. Strategies for pharmacotherapy of schizophrenia. Drugs Future 33, 777–791.

Bai, Y.M., Chen, T.-T., Liou, Y.-J., Hong, C.-J., Tsai, S.-J., 2011. Association between HTR2C polymorphisms and metabolic syndrome in patients with schizophrenia treated with atypical antipsychotics. Schizophr. Res. 125, 179–186.

Ballard, C., Corbett, A., Chitramohan, R., Aarsland, D., 2009. Management of agitation and aggression associated with Alzheimer's disease: controversies and possible solutions. Curr. Opin. Psychiatry 22, 532–540.

Ballard, C., Waite, J., 2006. The effectiveness of atypical antipsychotics for the treatment of aggression and psychosis in Alzheimer's disease. Cochrane Database Syst. Rev. Online CD003476.

Bardin, L., Auclair, A., Kleven, M.S., Prinssen, E.P.M., Koek, W., Newman-Tancredi, A., Depoortère, R., 2007. Pharmacological profiles in rats of novel antipsychotics with combined dopamine D2/serotonin 5-HT1A activity: comparison with typical and atypical conventional antipsychotics. Behav. Pharmacol. 18, 103–118.

Beuming, T., Sherman, W., 2012. Current Assessment of Docking into GPCR Crystal Structures and Homology Models: Successes, Challenges, and Guidelines. J. Chem. Inf. Model. 52, 3263–3277.

Bonaventure, P., Kelly, L., Aluisio, L., Shelton, J., Lord, B., Galici, R., Miller, K., Atack, J., Lovenberg, T.W., Dugovic, C., 2007. Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)7 receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. J. Pharmacol. Exp. Ther. 321, 690–698.

Braden, M.R., Parrish, J.C., Naylor, J.C., Nichols, D.E., 2006. Molecular interaction of serotonin 5-HT2A receptor residues Phe339(6.51) and Phe340(6.52) with superpotent N-benzyl phenethylamine agonists. Mol.Pharmacol. 70, 1956–1964.

Carr, G.V., Schechter, L.E., Lucki, I., 2011. Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT6 receptor agonists in rats. Psychopharmacology (Berl.) 213, 499–507.

Carson, S., McDonagh, M.S., Peterson, K., 2006. A Systematic Review of the Efficacy and Safety of Atypical Antipsychotics in Patients with Psychological and Behavioral Symptoms of Dementia. J. Am. Geriatr. Soc. 54, 354–361.

Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., Stevens, R.C., 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science 318, 1258–1265.

Chien, E.Y.T., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G.W., Hanson, M.A., Shi, L., Newman, A.H., Javitch, J.A., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2010. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. Science 330, 1091–1095.

Conway, C.R., Chibnall, J.T., Cumming, P., Mintun, M.A., Gebara, M.A.I., Perantie, D.C., Price, J.L., Cornell, M.E., McConathy, J.E., Gangwani, S., Sheline, Y.I., 2014. Antidepressant response to aripiprazole augmentation associated with enhanced FDOPA utilization in striatum: a preliminary PET study. Psychiatry Res. 221, 231–239.

Dawson, L.A., Watson, J.M., 2009. Vilazodone: a 5-HT1A receptor agonist/serotonin transporter inhibitor for the treatment of affective disorders. CNS Neurosci. Ther. 15, 107–117.

De Deyn, P., Jeste, D.V., Swanink, R., Kostic, D., Breder, C., Carson, W.H., Iwamoto, T., 2005. Aripiprazole for the treatment of psychosis in patients with Alzheimer's disease: a randomized, placebo-controlled study. J. Clin. Psychopharmacol. 25, 463–467.

Enomoto, T., Ishibashi, T., Tokuda, K., Ishiyama, T., Toma, S., Ito, A., 2008. Lurasidone reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the Morris water maze and radial-arm maze tests in rats. Behav. Brain Res. 186, 197–207.

Fasano, A., Plotnik, M., Bove, F., Berardelli, A., 2012. The neurobiology of falls. Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol. 33, 1215–1223.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Scazufca, M., 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet 366, 2112–2117.

Forbes, I.T., Dabbs, S., Duckworth, D.M., Jennings, A.J., King, F.D., Lovell, P.J., Brown, A.M., Collin, L., Hagan, J.J., Middlemiss, D.N., Riley, G.J., Thomas, D.R., Upton, N., 1998. (R)-3,N-dimethyl-N-[1-methyl-3-(4-methyl-piperidin-1-yl) propyl]benzenesulfonamide: the first selective 5-HT7 receptor antagonist. J.Med.Chem. 41, 655–657.

Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P., Shenkin, P.S., 2004. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. J. Med. Chem. 47, 1739–1749.

Friesner, R.A., Murphy, R.B., Repasky, M.P., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Halgren, T.A., Sanschagrin, P.C., Mainz, D.T., 2006. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. J. Med. Chem. 49, 6177–6196.

Galici, R., Boggs, J.D., Miller, K.L., Bonaventure, P., Atack, J.R., 2008. Effects of SB-269970, a 5-HT7 receptor antagonist, in mouse models predictive of antipsychotic-like activity. Behav. Pharmacol. 19, 153–159.

Gauthier, S., Cummings, J., Ballard, C., Brodaty, H., Grossberg, G., Robert, P., Lyketsos, C., 2010. Management of behavioral problems in Alzheimer's disease. Int. Psychogeriatr. IPA 22, 346–372.

Hersch, E.C., Falzgraf, S., 2007. Management of the behavioral and psychological symptoms of dementia. Clin. Interv. Aging 2, 611–621.

Hirano, K., Piers, T.M., Searle, K.L., Miller, N.D., Rutter, A.R., Chapman, P.F., 2009. Procognitive 5-HT6 antagonists in the rat forced swimming test: potential therapeutic utility in mood disorders associated with Alzheimer's disease. Life Sci. 84, 558–562.

H. Lundbeck A/S, 2012. Lundbeck's Lu AE58054 meets primary endpoint in large placebo-controlled clinical proof of concept study in people with Alzheimer's disease. Corp. Release 472, 1–4. http://investor.lundbeck.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=677436. Accessed Oct 23 2012.

Holmes, C., Arranz, M.J., Powell, J.F., Collier, D.A., Lovestone, S., 1998. 5-HT2A and 5-HT2C receptor polymorphisms and psychopathology in late onset Alzheimer's disease. Hum. Mol. Genet. 7, 1507–1509.

Ishibashi, T., Horisawa, T., Tokuda, K., Ishiyama, T., Ogasa, M., Tagashira, R., Matsumoto, K., Nishikawa, H., Ueda, Y., Toma, S., Oki, H., Tanno, N., Saji, I., Ito, A., Ohno, Y., Nakamura, M., 2010. Pharmacological profile of lurasidone, a novel antipsychotic agent with potent 5-hydroxytryptamine 7 (5-HT7) and 5-HT1A receptor activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 334, 171–181.

Ishiyama, T., Tokuda, K., Ishibashi, T., Ito, A., Toma, S., Ohno, Y., 2007. Lurasidone (SM-13496), a novel atypical antipsychotic drug, reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the rat passive-avoidance test. Eur. J. Pharmacol. 572, 160–170.

Jacobson, K.A., Costanzi, S., 2012. New Insights for Drug Design from the X-Ray Crystallographic Structures of G-Protein-Coupled Receptors. Mol. Pharmacol. 82, 361–371.

Jeste, D.V., Blazer, D., Casey, D., Meeks, T., Salzman, C., Schneider, L., Tariot, P., Yaffe, K., 2008. ACNP White Paper: Update on Use of Antipsychotic Drugs in Elderly Persons with Dementia. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. 33, 957–970.

Jeste, D.V., Finkel, S.I., 2000. Psychosis of Alzheimer's disease and related dementias: Diagnostic criteria for a distinct syndrome. Am. J. Geriatr. Psychiatry 8, 29–34.

Jones, C.A., Watson, D.J.G., Fone, K.C.F., 2011. Animal models of schizophrenia. Br. J. Pharmacol. 164, 1162–1194.

Kamiński, K., Obniska, J., Dybała, M., 2008. Synthesis, physicochemical and anticonvulsant properties of new N-phenylamino derivatives of 2-azaspiro[4.4]nonane- and [4.5]decane-1,3-diones: Part V. Eur. J. Med. Chem. 43, 53–61.

Kamiński, K., Obniska, J., Wiklik, B., Atamanyuk, D., 2011. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. Eur. J. Med. Chem. 46, 4634–4641.

Katritch, V., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2012. Diversity and Modularity of G Protein-Coupled Receptor Structures. Trends Pharmacol. Sci. 33, 17–27.

Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. Nucleic Acids Res. 37, D387–392.

Kim, D.H., Maneen, M.J., Stahl, S.M., 2009. Building a better antipsychotic: receptor targets for the treatment of multiple symptom dimensions of schizophrenia. Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother. 6, 78–85.

Komossa, K., Depping, A.M., Gaudchau, A., Kissling, W., Leucht, S., 2010. Second-generation antipsychotics for major depressive disorder and dysthymia. Cochrane Database Syst. Rev. Online CD008121.

Kongsamut, S., Kang, J., Chen, X.-L., Roehr, J., Rampe, D., 2002. A comparison of the receptor binding and HERG channel affinities for a series of antipsychotic drugs. Eur. J. Pharmacol. 450, 37–41.

Kurowski, M.A., Bujnicki, J.M., 2003. GeneSilico protein structure prediction meta-server. Nucleic Acids Res. 31, 3305–3307.

Lemke, T.L., Williams, D.A., 2008. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Leucht, S., Cipriani, A., Spineli, L., Mavridis, D., Orey, D., Richter, F., Samara, M., Barbui, C., Engel, R.R., Geddes, J.R., Kissling, W., Stapf, M.P., Lässig, B., Salanti, G., Davis, J.M., 2013. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. Lancet 382, 951–962.

Liperoti, R., Pedone, C., Corsonello, A., 2008. Antipsychotics for the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD). Curr. Neuropharmacol. 6, 117–124.

Liu, K.G., Robichaud, A.J., 2009. 5-HT6 antagonists as potential treatment for cognitive dysfunction. Drug Dev. Res. 70, 145–168.

Liu, Z., Zhang, J., Zhang, A., 2009. Design of Multivalent Ligand Targeting G-Protein-Coupled Receptors. Curr. Pharm. Des. 15, 682–718.

Lopez-Rodriguez, M.L., Morcillo, M.J., Fernandez, E., Benhamu, B., Tejada, I., Ayala, D., Viso, A., Campillo, M., Pardo, L., Delgado, M., Manzanares, J., Fuentes, J.A., 2005. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 8. Computational simulation of ligand-receptor interaction of 5-HT(1A)R agonists with selectivity over alpha1-adrenoceptors. J.Med.Chem. 48, 2548–2558.

Lopez-Rodriguez, M.L., Morcillo, M.J., Fernandez, E., Rosado, M.L., Pardo, L., Schaper, K., 2001. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. Study of the 5-HT(1a)/alpha(1)-adrenergic receptor affinity by classical hansch analysis, artificial neural networks, and computational simulation of ligand recognition. J.Med.Chem. 44, 198–207.

Lopez-Rodriguez, M.L., Vicente, B., Deupi, X., Barrondo, S., Olivella, M., Morcillo, M.J., Behamu, B., Ballesteros, J.A., Salles, J., Pardo, L., 2002. Design, synthesis and pharmacological evaluation of 5-hydroxytryptamine(1a) receptor ligands to explore the three-dimensional structure of the receptor. Mol.Pharmacol. 62, 15–21.

Lorke, D.E., Lu, G., Cho, E., Yew, D.T., 2006. Serotonin 5-HT2A and 5-HT6 receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. BMC Neurosci. 7, 36.

Lucas, G., Spampinato, U., 2000. Role of striatal serotonin2A and serotonin2C receptor subtypes in the control of in vivo dopamine outflow in the rat striatum. J. Neurochem. 74, 693–701.

Maher-Edwards, G., Zvartau-Hind, M., Hunter, A.J., Gold, M., Hopton, G., Jacobs, G., Davy, M., Williams, P., 2010. Double-blind, controlled phase II study of a 5-HT6 receptor antagonist, SB-742457, in Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. 7, 374–385.

Marcos, B., García-Alloza, M., Gil-Bea, F.J., Chuang, T.T., Francis, P.T., Chen, C.P., Tsang, S.W.T.Y., Lai, M.K.P., Ramirez, M.J., 2008. Involvement of an altered 5-HT -{6} receptor function in behavioral symptoms of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD 14, 43–50.

Marsh, A., 1979. Visual hallucinations during hallucinogenic experience and schizophrenia. Schizophr. Bull. 5, 627–630.

Medina-Franco, J.L., Giulianotti, M.A., Welmaker, G.S., Houghten, R.A., 2013. Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. Drug Discov. Today 18, 495–501.

Meltzer, H.Y., 2012. Clozapine. Clin. Schizophr. Relat. Psychoses 6, 134–144.

Mierzejewski, P., Olczak, M., Rogowski, A., Kostowski, W., Samochowiec, J., Filip, M., Przegalinski, E., Bienkowski, P., 2008. Effects of cycloheximide on extinction in an appetitively motivated operant conditioning task depend on re-exposure duration. Neurosci. Lett. 441, 307–310.

Millan, M.J., Brocco, M., Rivet, J.M., Audinot, V., Newman-Tancredi, A., Maiofiss, L., Queriaux, S., Despaux, N., Peglion, J.L., Dekeyne, A., 2000. S18327 (1-[2-[4-(6-fluoro-1, 2-benzisoxazol-3-yl)piperid-1-yl]ethyl]3-phenyl imidazolin-2-one), a novel, potential antipsychotic displaying marked antagonist properties at alpha(1)- and alpha(2)-adrenergic receptors: II. Functional

profile and a multiparametric comparison with haloperidol, clozapine, and 11 other antipsychotic agents. J. Pharmacol. Exp. Ther. 292, 54–66.

Millan, M.J., Di Cara, B., Dekeyne, A., Panayi, F., De Groote, L., Sicard, D., Cistarelli, L., Billiras, R., Gobert, A., 2007. Selective blockade of dopamine D(3) versus D(2) receptors enhances frontocortical cholinergic transmission and social memory in rats: a parallel neurochemical and behavioural analysis. J. Neurochem. 100, 1047–1061.

Miller, D.D., 2000. Review and management of clozapine side effects. J. Clin. Psychiatry 61 Suppl 8, 14–17; discussion 18–19.

Morphy, R., Rankovic, Z., 2005. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. J. Med. Chem. 48, 6523–6543.

Myhrer, T., 2003. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. Brain Res. Rev. 41, 268–287.

Newman-Tancredi, A., Kleven, M.S., 2011. Comparative pharmacology of antipsychotics possessing combined dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptor properties. Psychopharmacology (Berl.) 216, 451–473.

Nobili, A., Pasina, L., Trevisan, S., Riva, E., Lucca, U., Tettamanti, M., Matucci, M., Tarantola, M., 2009. Use and misuse of antipsychotic drugs in patients with dementia in Alzheimer special care units. Int. Clin. Psychopharmacol. 24, 97–104.

Olivares, D., Deshpande, V.K., Shi, Y., Lahiri, D.K., Greig, N.H., Rogers, J.T., Huang, X., 2012. N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. Curr. Alzheimer Res. 9, 746–758.

Otsuka, Ltd., 2011. Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. Announces Results from a Phase 2 Study of Investigational Product OPC-34712 as Adjunctive Therapy in Adults with Major Depressive Disorder http://www.businesswire.com/news/home/20110515005031/en/Otsuka–Pharmaceutical–Ltd.–Announces–Results–Phase–2#.U75s5LHEfHg Accessed Feb 16 2012.

Phatak, S.S., Gatica, E.A., Cavasotto, C.N., 2010. Ligand-Steered Modeling and Docking: A Benchmarking Study in Class A G-Protein-Coupled Receptors. J Chem Inf Model 50, 2119–2128.

Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur. J. Pharmacol. 47, 379–391.

Potenza, M.N., McDougle, C.J., 1998. Potential of Atypical Antipsychotics in the Treatment of Nonpsychotic Disorders. CNS Drugs 9, 213–232.

Radwanska, K., Wrobel, E., Korkosz, A., Rogowski, A., Kostowski, W., Bienkowski, P., Kaczmarek, L., 2008. Alcohol relapse induced by discrete cues activates components of AP-1 transcription

factor and ERK pathway in the rat basolateral and central amygdala. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. 33, 1835–1846.

Reiner, P.B., Kamondi, A., 1994. Mechanisms of antihistamine-induced sedation in the human brain: H1 receptor activation reduces a background leakage potassium current. Neuroscience 59, 579–588.

Reynolds, G.P., Kirk, S.L., 2010. Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment--pharmacological mechanisms. Pharmacol. Ther. 125, 169–179.

Rickels, K., Athanasiou, M., Robinson, D.S., Gibertini, M., Whalen, H., Reed, C.R., 2009. Evidence for efficacy and tolerability of vilazodone in the treatment of major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J. Clin. Psychiatry 70, 326–333.

Riemer, C., Borroni, E., Levet-Trafit, B., Martin, J.R., Poli, S., Porter, R.H.P., Bös, M., 2003. Influence of the 5-HT6 receptor on acetylcholine release in the cortex: pharmacological characterization of 4-(2-bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl)phenylamine, a potent and selective 5-HT6 receptor antagonist. J. Med. Chem. 46, 1273–1276.

Rodefer, J.S., Nguyen, T.N., Karlsson, J.-J., Arnt, J., 2008. Reversal of subchronic PCP-induced deficits in attentional set shifting in rats by sertindole and a 5-HT6 receptor antagonist: comparison among antipsychotics. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. 33, 2657–2666.

Rummel-Kluge, C., Komossa, K., Schwarz, S., Hunger, H., Schmid, F., Kissling, W., Davis, J.M., Leucht, S., 2012. Second-generation antipsychotic drugs and extrapyramidal side effects: a systematic review and meta-analysis of head-to-head comparisons. Schizophr. Bull. 38, 167–177.

Santana, N., Mengod, G., Artigas, F., 2013. Expression of α1-adrenergic receptors in rat prefrontal cortex: cellular co-localization with 5-HT2A receptors. Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP 16, 1139–1151.

Schatzberg, A.F., Nemeroff, C.B., 2009. Textbook of Psychopharmacology, 4th ed. American Psychiatric Publishing, Inc., Washington.

Scheuer, K., Maras, A., Gattaz, W.F., Cairns, N., Förstl, H., Müller, W.E., 1996. Cortical NMDA receptor properties and membrane fluidity are altered in Alzheimer's disease. Dement. Basel Switz. 7, 210–214.

Schneider, L.S., Dagerman, K., Insel, P.S., 2006a. Efficacy and adverse effects of atypical antipsychotics for dementia: meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry 14, 191–210.

Schneider, L.S., Tariot, P.N., Dagerman, K.S., Davis, S.M., Hsiao, J.K., Ismail, M.S., Lebowitz, B.D., Lyketsos, C.G., Ryan, J.M., Stroup, T.S., Sultzer, D.L., Weintraub, D., Lieberman, J.A., CATIE-AD

Study Group, 2006b. Effectiveness of atypical antipsychotic drugs in patients with Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. 355, 1525–1538.

Schulze, J., Glaeske, G., van den Bussche, H., Kaduszkiewicz, H., Koller, D., Wiese, B., Hoffmann, F., 2013a. Prescribing of antipsychotic drugs in patients with dementia: a comparison with age-matched and sex-matched non-demented controls. Pharmacoepidemiol. Drug Saf. 22, 1308–1316.

Schulze, J., van den Bussche, H., Glaeske, G., Kaduszkiewicz, H., Wiese, B., Hoffmann, F., 2013b. Impact of safety warnings on antipsychotic prescriptions in dementia: nothing has changed but the years and the substances. Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol. 23, 1034–1042.

Sheffrin, M., Driscoll, H.C., Lenze, E.J., Mulsant, B.H., Pollock, B.G., Miller, M.D., Butters, M.A., Dew, M.A., Reynolds, C.F., 2009. Pilot study of augmentation with aripiprazole for incomplete response in late-life depression: getting to remission. J. Clin. Psychiatry 70, 208–213.

Sherman, W., Beard, H.S., Farid, R., 2006a. Use of an induced fit receptor structure in virtual screening. Chem. Biol. Drug Des. 67, 83–84.

Sherman, W., Day, T., Jacobson, M.P., Friesner, R.A., Farid, R., 2006b. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. J. Med. Chem. 49, 534–553.

Shoichet, B.K., Kobilka, B.K., 2012. Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol. Sci. 33, 268–272.

Siegel, R.K., 1978. Phencyclidine and ketamine intoxication: a study of four populations of recreational users. NIDA Res. Monogr. 119–147.

Sink, K.M., Holden, K.F., Yaffe, K., 2005. Pharmacological treatment of neuropsychiatric symptoms of dementia: a review of the evidence. JAMA J. Am. Med. Assoc. 293, 596–608.

Söding, J., 2005. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. Bioinforma. Oxf. Engl. 21, 951–960.

Stahl, S.M., 2008. Do dopamine partial agonists have partial efficacy as antipsychotics? CNS Spectr. 13, 279–282.

Strader, C.D., Sigal, I.S., Candelore, M.R., Rands, E., Hill, W.S., Dixon, R.A., 1988. Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function. J. Biol. Chem. 263, 10267–10271.

Sukonick, D.L., Pollock, B.G., Sweet, R.A., Mulsant, B.H., Rosen, J., Klunk, W.E., Kastango, K.B., DeKosky, S.T., Ferrell, R.E., 2001. The 5-HTTPR*S/*L polymorphism and aggressive behavior in Alzheimer disease. Arch. Neurol. 58, 1425–1428.

Szot, P., White, S.S., Greenup, J.L., Leverenz, J.B., Peskind, E.R., Raskind, M.A., 2006. Compensatory changes in the noradrenergic nervous system in the locus ceruleus and hippocampus of

postmortem subjects with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 26, 467–478.

Tamminga, C.A., Carlsson, A., 2002. Partial dopamine agonists and dopaminergic stabilizers, in the treatment of psychosis. Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. 1, 141–147.

U.S. Food and Drug Administration, 2005. Public Health Advisory: Deaths with Antipsychotics in Elderly Patients with Behavioral Disturbances. Rockville, MD: Center for Drug Evaluation and Research, Available at: www.fda.gov/Drugs/DrugSafety. Accessed Nov 28, 2013.

U.S. Food and Drug Administration, 2008. Information on Conventional Antipsychotics Rockville, MD: Center for Drug Evaluation and Research, Available at: www.fda.gov/Drugs/DrugSafety. Accessed Nov 28, 2013.

Vandenberg, J.I., Perry, M.D., Perrin, M.J., Mann, S.A., Ke, Y., Hill, A.P., 2012. hERG K+ Channels: Structure, Function, and Clinical Significance. Physiol. Rev. 92, 1393–1478.

Van Hes, R., Smid, P., Stroomer, C.N.J., Tipker, K., Tulp, M.T.M., van der Heyden, J.A.M., McCreary, A.C., Hesselink, M.B., Kruse, C.G., 2003. SLV310, a novel, potential antipsychotic, combining potent dopamine D2 receptor antagonism with serotonin reuptake inhibition. Bioorg. Med. Chem. Lett. 13, 405–408.

Vigen, C.L.P., Mack, W.J., Keefe, R.S.E., Sano, M., Sultzer, D.L., Stroup, T.S., Dagerman, K.S., Hsiao, J.K., Lebowitz, B.D., Lyketsos, C.G., Tariot, P.N., Zheng, L., Schneider, L.S., 2011. Cognitive effects of atypical antipsychotic medications in patients with Alzheimer's disease: outcomes from CATIE-AD. Am. J. Psychiatry 168, 831–839.

Wadenberg, M.-L.G., 2010. Conditioned avoidance response in the development of new antipsychotics. Curr. Pharm. Des. 16, 358–370.

Wadenberg, M.L., Hertel, P., Fernholm, R., Hygge Blakeman, K., Ahlenius, S., Svensson, T.H., 2000. Enhancement of antipsychotic-like effects by combined treatment with the alpha1-adrenoceptor antagonist prazosin and the dopamine D2 receptor antagonist raclopride in rats. J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 107, 1229–1238.

Wang, L.Y., Shofer, J.B., Rohde, K., Hart, K.L., Hoff, D.J., McFall, Y.H., Raskind, M.A., Peskind, E.R., 2009. Prazosin for the treatment of behavioral symptoms in patients with Alzheimer disease with agitation and aggression. Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry 17, 744–751.

Waters, K.A., Stean, T.O., Hammond, B., Virley, D.J., Upton, N., Kew, J.N.C., Hussain, I., 2012. Effects of the selective 5-HT(7) receptor antagonist SB-269970 in animal models of psychosis and cognition. Behav. Brain Res. 228, 211–218.

Weisler, R.H., Montgomery, S.A., Earley, W.R., Szamosi, J., Lazarus, A., 2012. Efficacy of extended release quetiapine fumarate monotherapy in patients with major depressive disorder: a

pooled analysis of two 6-week, double-blind, placebo-controlled studies. Int. Clin. Psychopharmacol. 27, 27–39.

Wesołowska, A., 2007. Study into a possible mechanism responsible for the antidepressant-like activity of the selective 5-HT6 receptor antagonist SB-399885 in rats. Pharmacol. Rep. PR 59, 664–671.

Wesołowska, A., 2010. Potential role of the 5-HT6 receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data. Pharmacol. Rep. PR 62, 564–577.

Wesołowska, A., Nikiforuk, A., 2007. Effects of the brain-penetrant and selective 5-HT6 receptor antagonist SB-399885 in animal models of anxiety and depression. Neuropharmacology 52, 1274–1283.

Wesołowska, A., Nikiforuk, A., Stachowicz, K., 2006. Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats. Eur. J. Pharmacol. 553, 185–190.

Wesołowska, A., Tatarczyńska, E., Nikiforuk, A., Chojnacka-Wójcik, E., 2007. Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT7 receptor antagonist in the forced swimming test in mice. Eur. J. Pharmacol. 555, 43–47.

Woolley, M.L., Marsden, C.A., Fone, K.C.F., 2004. 5-ht6 receptors. Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. 3, 59–79.

Worthington, J.J., Kinrys, G., Wygant, L.E., Pollack, M.H., 2005. Aripiprazole as an augmentor of selective serotonin reuptake inhibitors in depression and anxiety disorder patients. Int. Clin. Psychopharmacol. 20, 9–11.

Wu, J., Zou, H., Strong, J.A., Yu, J., Zhou, X., Xie, Q., Zhao, G., Jin, M., Yu, L., 2005. Bimodal effects of MK-801 on locomotion and stereotypy in C57BL/6 mice. Psychopharmacology (Berl.) 177, 256–263.

Ye, N., Neumeyer, J.L., Baldessarini, R.J., Zhen, X., Zhang, A., 2013. Update 1 of: Recent Progress in Development of Dopamine Receptor Subtype-Selective Agents: Potential Therapeutics for Neurological and Psychiatric Disorders. Chem. Rev. 113, PR123–PR178.

Zhang, A., Neumeyer, J.L., Baldessarini, R.J., 2007. Recent Progress in Development of Dopamine Receptor Subtype-Selective Agents: Potential Therapeutics for Neurological and Psychiatric Disorders. Chem. Rev. 107, 274–302.