



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

AUTOREFERAT

EWA SZYMAŃSKA

KATEDRA TECHNOLOGII I BIOTECHNOLOGII ŚRODKÓW LECZNICZYCH
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

KRAKÓW 2017

SPIS TREŚCI

1. Informacje podstawowe	1
1.1 Dane osobowe	1
1.2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	1
1.3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	1
2. Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę habilitacji	2
2.1 Tytuł osiągnięcia naukowego	2
2.2 Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	2
3. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji	4
3.1 Wprowadzenie	4
3.2 Podział i budowa receptorów AMPA/KA	7
3.3 Wybrane ligandy receptorów AMPA/KA	11
3.4 Koncepcja, cel i zakres pracy	13
3.4.1 Koncepcja pracy	13
3.4.2 Cel badań	15
3.4.3 Plan badań	15
3.5 Wyniki badań związanych z osiągnięciem naukowym w postępowaniu habilitacyjnym	19
3.5.1 Badania w grupie pochodnych 2-karboksyetylofenyloalaniny	19
3.5.2 Badania w grupie pochodnych biaryloalaniny	24
3.5.3 Podsumowanie osiągnięć stanowiących obszar habilitacji	42
4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych	44
4.1 Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	44
4.2 Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora	45
4.3 Podsumowanie działalności naukowo-badawczej	48
5. Literatura	49

1. INFORMACJE PODSTAWOWE

1.1 Dane osobowe

EWA SZYMAŃSKA

Miejsce zatrudnienia:

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

1.2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2005 Stopień doktora nauk farmaceutycznych

Rozprawa doktorska pt. „*Synteza i badania nad aromatycznymi pochodnymi hydantoiny o spodziewanym działaniu przeciwgruźliczym*”, 17.01.2005

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

1995 Magister chemii

Praca magisterska pt. „*Charakterystyka właściwości warstwy adsorpcyjnej na powierzchni wodnych roztworów mieszanych alkoholu propylowego i wybranych kwasów alifatycznych*”, 14.06.1995

Promotor: prof. dr hab. Maria Paluch

Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii, Wydział Chemii Uniwersytet Jagielloński

1.3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2008-obecnie	adiunkt Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
2005-2008	stypendium po-doktorskie, 3-letni staż naukowo-dydaktyczny Department of Medicinal Chemistry; Faculty of Pharmacy University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark
1997-2005	asystent naukowo-dydaktyczny Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
1995-1997	pracownik naukowo-techniczny Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

2. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE STANOWIĄCE POSTAWĘ HABILITACJI

(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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz.U. z 2016 r. poz. 1311)

2.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Badanie oddziaływań pochodnych fenyloalaniny z jonotropowymi receptorami glutaminianergicznymi – synteza, badania farmakologiczne i strukturalne

2.2 Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

P1. E. Szymańska, D.S. Pickering, B. Nielsen, T.N. Johansen; 3-Substituted phenylalanines as selective AMPA- and kainate receptor ligands; *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6390-6401. doi: 10.1016/j.bmc.2009.07.021.

IF (2009): 2,822; MNiSW: 20 pkt.

P2. E. Szymańska, K. Frydenvang, A. Contreras-Sanz, D.S. Pickering, E. Frola, Z. Serafimowska, B. Nielsen, J.S. Kastrup, T.N. Johansen; A new phenylalanine derivative acts as an antagonist at the AMPA receptor GluA2 and introduces partial domain closure: Synthesis, resolution, pharmacology, and crystal structure; *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 7289-7298. doi: 10.1021/jm200862h.

IF (2011): 5,248; MNiSW: 45 pkt.

P3. R. Venskutonyte, K. Frydenvang, E. Valades, E. Szymańska, T.N. Johansen, J.S. Kastrup, D.S. Pickering; Structural and pharmacological characterization of phenylalanine-based AMPA receptor antagonists at kainate receptors; *ChemMedChem* **2012**, 7, 1793-1798. doi: 10.1002/cmdc.201100599.

IF (2012): 2,835; MNiSW: 35 pkt.

P4. E. Szymańska, P. Chałupnik, K. Szczepańska, A.M. Cuñado Moral, D.S. Pickering, B. Nielsen, T.N. Johansen, K. Kieć-Kononowicz; Design, synthesis and structure-activity relationships of novel phenylalanine-based amino acids as kainate receptors ligands; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 5568-5572. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.09.075.

IF (2016): 2,454; MNiSW: 25 pkt.

P5. E. Szymańska, K. Frydenvang, D.S. Pickering, C. Krintel, B. Nielsen, A. Kooshki, L.G. Zachariassen, L. Olsen, J.S. Kastrup, T.N. Johansen; Studies on aryl-substituted phenylalanines: Synthesis, activity, and different binding modes at AMPA receptors; *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 448-461. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01666.

IF (2016): 6,259; MNiSW: 45 pkt.

P6. E. Szymańska, B. Nielsen, T.N. Johansen, A.M. Cuñado Moral, D.S. Pickering, K. Szczepańska, A. Mickowska, K. Kieć-Kononowicz; Pharmacological characterization and binding modes of novel racemic and optically active phenylalanine-based antagonists of AMPA receptors; *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 138, 874-883. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.007.

IF (2016): 4,519; MNiSW: 40 pkt.

P7. E. Szymańska, P. Chałupnik, T.N. Johansen, B. Nielsen, A.M. Cuñado Moral, D.S. Pickering, A. Więckowska, K. Kieć-Kononowicz; Aryl- and heteroaryl-substituted phenylalanines as AMPA receptor ligands; *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, in press, doi: 10.1111/cbdd.13048.

IF (2016): 2,396; MNiSW: 25 pkt.

Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego załączono kopie wszystkich prac wchodzących w skład monotematycznego cyklu publikacji (ZAŁĄCZNIK 4) oraz oświadczenia głównych współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy (ZAŁĄCZNIK 5). Udział własny w powstanie każdej pracy wchodzącej w monotematyczny cykl publikacji stanowiących podstawę habilitacji został szczegółowo opisany w ZAŁĄCZNIKU 6, pkt I część B. W pracach P4, P6 i P7 byłam autorem korespondującym.

Analiza bibliometryczna w/w prac, przeprowadzona przez Bibliotekę Medyczną UJ CM (z dn. 11.07.2017r.) według listy Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania, wykazała następującą łączną punktację prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (ZAŁĄCZNIK 7):

Sumaryczny Impact Factor: 26,533

MNiSW: 235 pkt.

Badania naukowe opisane w publikacjach stanowiących podstawę habilitacji prowadzone były w oparciu o środki finansowe uzyskane:

- w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (**MNiSW N N405 303936**)
- w ramach grantu Opus Narodowego Centrum Nauki (**NCN 2014/15/B/NZ7/00908**)
- w ramach projektów Badań Własnych i Statutowych - dotacja podmiotowa MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego

We wszystkich wymienionych projektach pełniłam rolę kierownika (ZAŁĄCZNIK 6, pkt II część I).

3. PREZENTACJA WYNIKÓW STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

3.1 Wprowadzenie

Choroby mózgu są obecnie jednymi z najpoważniejszych schorzeń, z jakimi zmagają się ludzie. Jak wynika z ostatniego raportu organizacji European Brain Council, w samej Europie stanowią one ok. 35% wszystkich zachorowań [1]. Szacuje się, że ok. 179 milionów Europejczyków cierpi na choroby mózgu, a widoczny wzrost częstości występowania tych schorzeń jest w dużej mierze związany z ogólnym starzeniem się ludzkiej populacji.

Pojęcie „choroby mózgu” jest bardzo obszerne. Obejmuje ono zarówno choroby neurologiczne, takie jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, płasawica Huntingtona, stwardnienie zanikowe boczne (ALS), udar, epilepsja, migreny czy neuropatia, jak i szereg chorób i zaburzeń psychicznych, takich jak depresja, schizofrenia lub lęk. Współczesne kierunki leczenia tego typu zaburzeń skupiają się między innymi na modyfikacji patomechanizmów zaangażowanych w rozwój procesów otępiennych. Podstawową rolę w procesach związanych z pamięcią i uczeniem odgrywa hipokamp i kora mózgu, obszary, w których stwierdzono znaczne zagęszczenie neuronów glutaminianergicznych.¹ Są one stymulowane przez kwas glutaminowy (a właściwie jego anion, glutaminian) - główny neuroprzekaźnik pobudzający w mózgu. Glutaminian (Glu) oddziałuje z dwiema odrębnymi rodzinami receptorów: jonotropowymi, odpowiedzialnymi za szybką neurotransmisję sygnału czynnościowego w mózgu oraz metabotropowymi, pośredniczącymi w wolnej neurotransmisji.

Jonotropowe receptory glutaminianergiczne, do których zaliczyć można receptory NMDA, AMPA i kainowe KA (nazwy pochodzą od selektywnych agonistów poszczególnych receptorów), są związane z kanałami jonowymi przepuszczalnymi dla jonów Na^+ , K^+ i Ca^{2+} . Odgrywają one istotną rolę w procesach plastyczności synaptycznej mózgu. W wyniku ich aktywacji, poprzez wzrost stężenia jonów wapnia i aktywację kinaz białkowych, w neuronie uruchomione zostają tzw. zjawiska LPT (długotrwałe wzmocnienie synaptyczne) oraz LTD (długotrwałe hamowanie synaptyczne), prowadzące do zmian czynnościowych synapsy. Obecnie zjawiska te uważane są za komórkowe podłoże neuronalnych zmian rozwojowych oraz procesów uczenia się i pamięci [2, 3]. Z drugiej strony, zaburzenia dotyczące działania układu glutaminianergicznego prowadzą do szeregu poważnych schorzeń, obejmujących zarówno choroby neurologiczne jak i psychiczne. U podłoża wielu z nich leży zjawisko ekscytotoksyczności, polegające na nadmiernym pobudzeniu receptorów jonotropowych przez podwyższony poziom glutaminianu, co prowadzi do

¹ W niniejszym opracowaniu przyjęto określenie „glutaminianergiczny” jako związany z przekazywaniem kwasu glutaminowego na podstawie: W. Kostowski, *Psychiatria* (2004) **1**, 63-71 oraz J. Vetulani, *Psychogeriatrya Polska* (2008) **5**, 1-13. W literaturze polskiej funkcjonują również terminy „glutaminergiczny” lub „glutamatergiczny”

niekontrolowanego wzrostu stężenia jonów wapnia w komórce. Nadmiar wapnia uruchamia proces aktywacji licznych enzymów uszkodzających struktury komórkowe i DNA, co w konsekwencji powoduje śmierć neuronu [2, 3].

Zjawisko ekscytotoksyczności neuronalnej jest jedną z bezpośrednich przyczyn powstawania zmian zwyrodnieniowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Stwierdzono, że towarzyszy ono między innymi udarom i urazom mózgu, chorobom neurodegeneracyjnym ośrodkowego układu nerwowego, stanom padaczkowym, oraz, że może być aktywowane przez liczne patogeny, m.in. niedokrwienie miejscowe (ischemia), niedotlenienie krwi (hypoxia), hipoglikemia, patogeny wirusowe i bakteryjne, metale toksyczne, stres, choroby autoimmunologiczne i nadmiar wolnych rodników [4].

Opisana powyżej rola jonotropowych receptorów kwasu glutaminowego w inicjowaniu ekscytotoksyczności sprawiła, że receptory te stały się w celem farmakologicznym w poszukiwaniu związków prokognitywnych, a także w terapii niektórych zaburzeń neurologicznych. Początkowe poszukiwania koncentrowały się na związkach hamujących receptory NMDA. Badania wykazały, że antagoniści tego receptora zapobiegają indukowanej przez kwas glutaminowy neurotoksyczności, jednak po zastosowaniu związków o wysokim powinowactwie (fencyklidyna, dizocilpina) stwierdzono, że mogą one wywoływać silne działania niepożądane - efekty psychozomimetyczne, zaburzenia pamięci i koordynacji ruchowej. Efekty te silnie ograniczają przydatność kliniczną antagonistów NMDA. Stosowane obecnie w leczeniu związki, których mechanizm działania (lub jeden z mechanizmów działania) polega na inhibicji kanałów jonowych NMDA, to **memantyna** (w chorobie Alzheimer), **amantadyna** (w chorobie Parkinsona), **riluzol** (w stwardnieniu zanikowym bocznym), **ketamina**, pochodna fencyklidyny (szybko działający środek w znieczuleniu ogólnym) oraz **felbamat** (lek przeciwpadaczkowy stosowany w przypadkach zespołu Lennoxa-Gastauta, nie zarejestrowany w Polsce) [5, 6].

W ostatnich latach zainteresowanie naukowców skupiło się także na pozostałych jonotropowych receptorach kwasu glutaminowego, tzw. receptorach non-NMDA, do których zalicza się receptory AMPA i kainowe. Duże nadzieje roją zwłaszcza pozytywne modulatory allosteryczne (PAM) oraz kompetycyjni lub niekompetycyjni antagoniści tych receptorów. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na potencjalne zastosowanie PAM receptorów AMPA w leczeniu choroby Alzheimer, depresji, schizofrenii, a także śpiączki, ostrej depresji oddechowej i ADHD [2, 7-13]. Z drugiej strony, związki o charakterze antagonistów receptorów AMPA i kainowych wykazały w badaniach aktywność neuroprotekcijną w schorzeniach takich jak stwardnienie zanikowe boczne (ALS), udar niedokrwienno mózgu i parkinsonizm oraz aktywność przeciwbólową w modelach bólu neuropatycznego, pooperacyjnego i u pacjentów ze stanami migrenowymi [7,

10, 14, 15]. Od kilku lat intensywnie badana jest także aktywność przeciwdrgawkowa kompetycyjnych i niekompetycyjnych antagonistów receptorów AMPA i kainowych [7, 8, 16, 17]. Stwierdzono, że związki te posiadają interesujący potencjał terapeutyczny, nie powodują bowiem efektów behawioralnych i psychozomimetycznych, często obserwowanych w przypadku antagonistów receptorów NMDA [8]. Zainteresowanie ligandami receptorów AMPA/KA znalazło swój wyraz w badaniach klinicznych (Tabela 1), a pierwszy selektywny niekompetycyjny antagonist receptorów AMPA – **perampanel** (Fycompa, Eisai) został wprowadzony na rynek w Unii Europejskiej w 2012 roku jako lek przeciwpadaczkowy wspomagający w leczeniu napadów częściowych. Należy tu dodać, że niekompetycyjne hamowanie receptorów AMPA i kainowych jest najprawdopodobniej jednym z mechanizmów przyczyniających się do działania innego leku przeciwdrgawkowego – **topiramatu**, stosowanego w terapii epilepsji i stanów migrenowych [18].

Tabela 1. Związki o charakterze kompetycyjnych i niekompetycyjnych antagonistów receptorów AMPA/KA w badaniach klinicznych - 2006-2017 [19].*

Zaburzenie	Cel/mechanizm	Lek	Faza badań
Ból neuropatyczny	ant. komp. AMPA/GluK1	LY 467711	I (ukończ.2008)
	ant. komp. AMPA/KA	NS 1209	II (ukończ.2007)
	ant. niekomp. AMPA	Perampanel	II (2015-obecnie)
Migrena	ant. komp. AMPA/GluK1	Tezampanel	II (ukończ.2007)
	ant. komp. AMPA	Selurampanel	II (ukończ.2010)
	ant. niekomp. AMPA	Perampanel	II (ukończ.2006)
Udar mózgu	ant. komp. AMPA	ZK 200775	II (nie kont.)
Epilepsja	ant. komp. AMPA	Becampanel	II (ukończ.2011)
	ant. komp. AMPA	Selurampanel	II (ukończ.2012)
	ant. komp. AMPA	NS 1209	II [9]
	ant. niekomp. AMPA	Talampanel	II (ukończ.2006)
	ant. niekomp. AMPA	Perampanel	wprowadzony na rynek 2012
Choroba Parkinsona	ant. niekomp. AMPA	Talampanel	II (ukończ.2006)
	ant. niekomp. AMPA	Perampanel	III (ukończ.2008)
	ant. niekomp. AMPA	Topiramate	II (ukończ.2007)
Stwardnienie zanikowe boczne	ant. niekomp. AMPA	Talampanel	II (ukończ.2010)
Zespół zależności alkoholowej	ant. niekomp. AMPA	Perampanel	II (2016-obecnie)
Chroniczne szumy uszne	ant. komp. AMPA	Selurampanel	II (ukończ.2012)

* zastosowane skróty: ant. komp. = antagonist kompetycyjny, ant. niekomp. = antagonist niekompetycyjny

W ciągu ostatnich lat szczególną uwagę badaczy przyciągają związki działające selektywnie na poszczególne typy jonotropowych receptorów kwasu glutaminowego [20-23]. Wiele zespołów badawczych opisuje osiągnięcie pożądanej selektywności farmakologicznej ligandów pomiędzy

receptorami NMDA a receptorami AMPA/KA. Ze względu jednak na wysokie podobieństwo struktury w zakresie kieszeni wiążącej receptorów AMPA i kainowych, większość ligandów wiążących się do miejsca ortosterycznego wykazuje równoczesne powinowactwo do obu typów receptorów.

3.2 Podział i budowa receptorów AMPA/KA

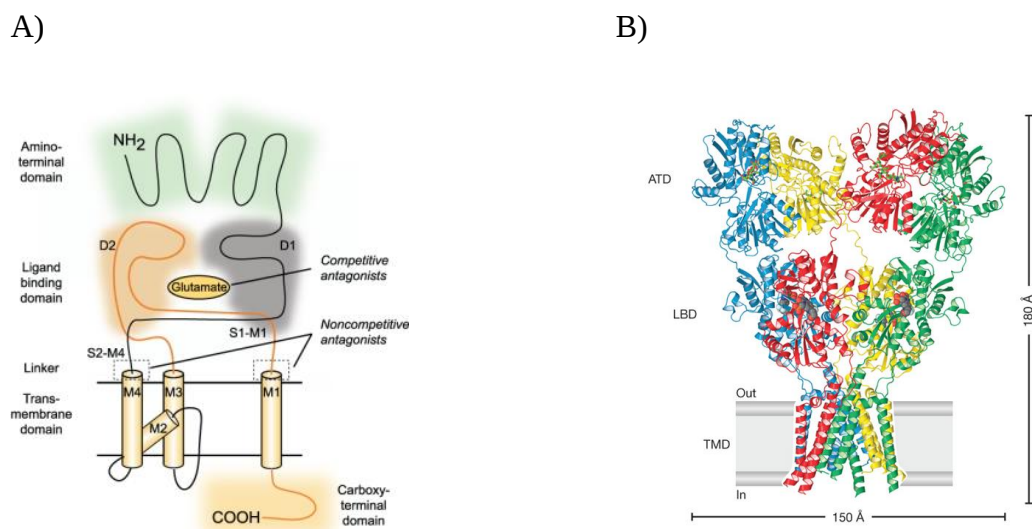
Wszystkie jonotropowe receptory glutaminianergiczne funkcjonują w ośrodkowym układzie nerwowym jako tetramery: homomery lub heteromery zbudowane z dwóch par identycznych podjednostek. Zidentyfikowano cztery podjednostki tworzące receptory AMPA: GluA1-4 (wg starego nazewnictwa: GluR1-4), oraz pięć podjednostek mogących wejść w skład receptorów KA: podjednostki GluK1-5 (wg starego nazewnictwa: GluR5-7, KA1, KA2) [24]. Receptory o różnym składzie podjednostkowym cechują się zróżnicowanym rozmieszczeniem w OUN oraz różnymi właściwościami farmakokinetycznymi.

W budowie każdej z podjednostek, liczącej ok. 900 aminokwasów, wyróżnić można (Rys. 1) :

1. łańcuch wewnątrzkomórkowy z końcem kwasowym (CTD – ang. *carboxy-terminal domain*)
2. domenę transbłonową (TMD – ang. *transmembrane domain*), składająca się z trzech segmentów transbłonowych (M1, M3 i M4), z których pierwszy i drugi przedzielone są wewnątrzmembranową pętlą (M2). Fragmenty M2 czterech podjednostek receptora tworzą „ścianki” kanału jonowego
3. zewnątrzkomórkową domenę wiążącą neuroprzekaźnik oraz ligandy kompetycyjne (tzw. ortosteryczna kieszeń wiążąca, LBD – ang. *ligand-binding domain*)
4. zewnątrzkomórkową domenę z końcem aminowym (ATD – ang. *amino-terminal domain*) [14, 25].

Receptory AMPA, pełniące podstawową rolę w szybkim przekazywaniu synaptycznym, są hetero- lub homomerycznymi oligomerami obecnymi w całym OUN. W wyniku potranskrypcyjnej modyfikacji mRNA, każda z podjednostek receptorów AMPA może występować w dwóch wariantach, zwanych „flip” i „flop”, różniących się fragmentem 38 aminokwasów w obrębie pętli pomiędzy segmentami M3 i M4. Występowanie różnic pomiędzy tymi formami wpływa na kinetykę i czas desensytyzacji kanału jonowego [23, 26]. Dodatkowo, podjednostka GluA2 może występować w postaci dwóch izoform, różniących się tzw. miejscem Q/R (glutamina /arginina) na pętli wewnątrzmembranowej M2, tworzącej kanał dla jonów [27]. Zmiana w regionie Q/R ma duże znaczenie dla przepuszczalności kanału jonowego dla jonów

wapniowych – stwierdzono, iż receptory zawierające podjednostki GluA2(R) posiadające w tym regionie argininę, charakteryzują się zmniejszonym przewodnictwem jonowym i nie przepuszczają jonów Ca^{2+} , w przeciwieństwie do pozostałych podjednostek GluA1, GluA3, GluA4 oraz GluA2(Q) [8, 13, 28, 29].



Rys. 1. A) Struktura podjednostki receptora AMPA lub KA [8]; B) Struktura krystaliczna szczurzego homomerycznego receptora GluA2 (PDB ID: 3KG2) [30].

Receptory kainowe są obecne w wielu strukturach OUN, głównie w hipokampie, gdzie pełnią rolę regulującą w transmisji synaptycznej [31, 32]. Podjednostki GluK1-3 mogą tworzyć funkcjonalne receptory homo- lub heteromeryczne, bądź łączyć się z podjednostkami GluK4 lub GluK5. Podobnie, jak w przypadku receptorów AMPA, podjednostki GluK1 i GluK2 występują w dwóch wariantach miejsca Q/R pętli wewnątrzmembranowej M2, przy czym receptory posiadające w tym regionie argininę są nieprzepuszczalne dla jonów Ca^{2+} [33]. Receptory posiadające w swym składzie GluK3 są najmniej liczne i charakteryzują się niższym powinowactwem kwasu glutaminowego w porównaniu z innymi receptorami AMPA i KA [33, 34].

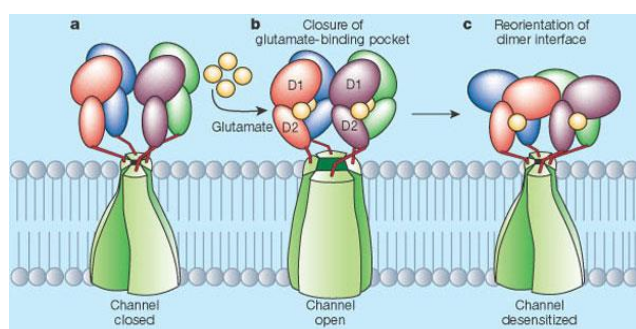
Terapeutyczna rola poszczególnych podjednostek receptorów AMPA i KA nie jest dokładnie poznana, głównie ze względu na brak selektywnych narzędzi farmakologicznych. Ostatnie badania z wykorzystaniem selektywnych antagonistów podtypu receptorów GluK1 wykazały wysoki związek tych receptorów z plastycznością synaptyczną hipokampa oraz potencjalne zastosowanie takich antagonistów w terapii bólu, epilepsji, migreny, niedokrwionego udaru i chorób neurodegeneracyjnych [11, 13, 34-36].

Biorąc pod uwagę duży wkład badań strukturalnych i rentgenograficznych w pracach stanowiących dorobek habilitacyjny, niezbędnym wydaje się poszerzenie rozdziału dotyczącego budowy i funkcjonowania receptorów AMPA (i kainowych).

Przełomem w dyscyplinie badań strukturalnych receptorów jonotropowych kwasu glutaminowego stało się uzyskanie stabilnych, rozpuszczalnych w wodzie białek rekombinowanych, odpowiadających wydzielonemu fragmentowi kieszeni wiążącej LBD. Badania strukturalne oraz badania powinowactwa związków referencyjnych pokazały wysoki stopień podobieństwa rekombinowanych białek LBD w porównaniu z pełnymi receptorami błonowymi. Białka takie uzyskano między innymi dla podjednostek GluA2 [37], GluA3 [38], GluA4 [39], GluK1 [40, 41] i GluK2 [41]. Opublikowane w ostatnich latach liczne struktury krystaliczne LBD różnych podjednostek, wykrystalizowanych z szeregiem związków małowcząstkowych (agonistów, kompetycyjnych antagonistów i modulatorów allosterycznych) [42, 43], a także struktury pełnego szczurzego receptora homomerycznego GluA2 [30], znacznie przyczyniły się do wzrostu wiedzy na temat mechanizmu działania receptorów i sposobu wiązania ligandów.

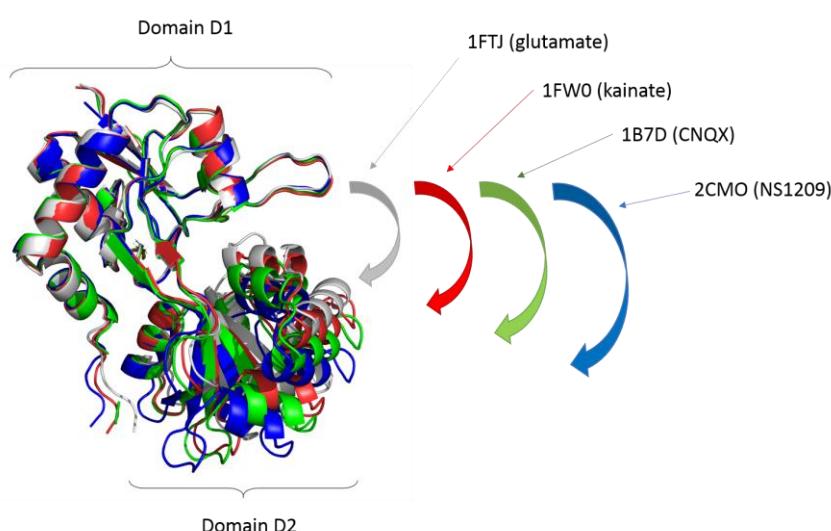
Jak już powiedziano, funkcjonalne receptory AMPA mają budowę homo- lub heteromeryczną, przy czym te ostatnie zbudowane są z dwóch par identycznych podjednostek. Zewnątrzkomórkowe domeny ATD i LBD są zorganizowane warstwowo i tworzą tzw. dimery dimerów (Rys. 2).

Pozostający w błonie komórkowej receptor w stanie nieaktywnym (tzw. *apo* – w stanie niezwiązany) znajduje się w konformacji, w której fragmenty transbłonowe poszczególnych podjednostek są do siebie zbliżone i kanał jonowy jest zamknięty. Przyłączenie agonisty (np. glutaminianu) powoduje obrót całego segmentu D2 miejsca wiążącego w kierunku D1 („zamknięcie” kieszeni wiążącej), oddalenie od siebie linkerów łączących LBD i TMD w poszczególnych podjednostkach i otwarcie kanału jonowego (Rys. 2). Po jakimś czasie następuje reorientacja na powierzchni styku dimerów w domenie LBD, co powoduje zmianę konformacji całego tetramerycznego receptora i ponowne zamknięcie kanału jonowego pomimo związanego w LBD agonisty. Zjawisko to nosi nazwę desensytyzacji. Związanie antagonisty kompetycyjnego powoduje niewielką zmianę konformacji domeny LBD w porównaniu z agonistą; stabilizuje konformację „otwartą” fragmentów D1 i D2 i zamknięty kanał jonowy.



Rys. 2. Zmiany konformacyjne receptora AMPA podczas aktywacji i desensytyzacji receptora (dla uproszczenia pominięto domeny ATD i CTD) [44].

Zmiany konformacyjne zachodzące w kieszeni LBD towarzyszące wiązaniu liganda w miejscu ortosterycznym polegają głównie na rotacji całego segmentu D2 w stronę D1 i „zamykaniu” kieszeni wiążącej dokoła liganda. Stwierdzono, że w przypadku podjednostki GluA2 istnieje ścisła korelacja pomiędzy stopniem tej rotacji (ang. *domain closure*) a profilem funkcjonalnym liganda i jego aktywnością, wyznaczoną w testach elektrofizjologicznych [42]. Agoniści generują pełne zamknięcie LBD (ok. 20°) w odniesieniu do struktury *apo* (PDB ID: 1FTO, molA), częściowi agoniści – ok. 13°; antagoniści – od 2.5° do 7°. Niektóre związki (np. NS1209, ZK 200775) zamiast zamknięcia, generują otwarcie kieszeni wiążącej w stosunku do struktury *apo*; stopień rotacji wynosi od -4° do -9° (Tabela 2).



Rys. 3. Nałożenie wybranych struktur krystalicznych LBD podjednostki GluA2 wykrystalizowanych z ligandami o różnym profilu funkcjonalnym. Widoczne są różnice w położeniu domeny D2 w porównaniu z domeną D1 kieszeni wiążącej (*domain closure*) dla agonisty glutaminianu, częściowego agonisty kainianu, antagonistów: CNQX oraz NS1209 [42].

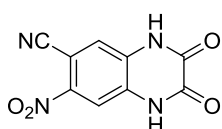
Tabela 2. Stopień zamknięcia kieszeni wiążącej dla ligandów podjednostki GluA2 receptora AMPA (w odniesieniu do struktury *apo*) wg [42].

ligand	PDB ID	stopień zamknięcia [°]	powinowactwo do natywnych receptorów AMPA [μM]
<i>agonista:</i>			
glutaminian	1FTJ	19.1 do 21.1	0.49
AMPA	1FTM	20.3 do 21.0	0.01
<i>częściowy agonista:</i>			
kainian	1FW0	13.1	9.0
<i>antagonista:</i>			
(S)-ATPO	1N0T	2.5 do 5.1	16.0
CNQX	3B7D	6.0 do 8.1	0.24
DNQX	1FTL	3.4 do 6.5	0.09
NS1209	2CMO	-5.4 do -6.4	0.03

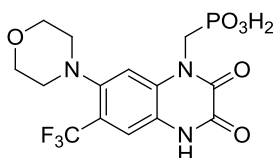
3.3 Wybrane ligandy receptorów AMPA/KA

Poszukiwanie **kompetycyjnych antagonistów AMPA/KA** prowadzone są dla związków o różnorodnej budowie chemicznej, jednak większość z nich można przydzielić do jednej trzech głównych klas [25, 45]:

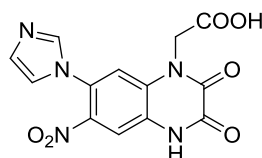
- **pochodne chinoksalino-2,3-dionu** – do kategorii tej zaliczyć można związki takie jak DNQX, CNQX (**1**) i NBQX wykazujące silny choć nieselektywny antagonizm w stosunku do receptorów NMDA, AMPA i KA i cechujące się niską rozpuszczalnością. W ciągu ostatniej dekady do badań klinicznych zakwalifikowały się pochodne o znacznie korzystniejszych właściwościach fizykochemicznych, takie jak ZK 200775 (MPQX, **2**), YM 872 (zonampanel, **3**) i becampanel (**4**, Tabela 1 str. 6)



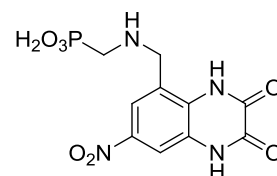
1, CNQX



2, ZK 200775

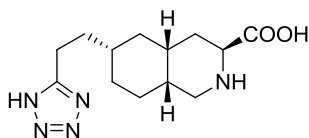


3, YM 872

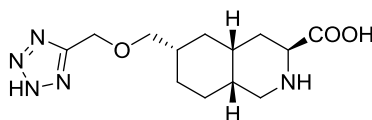


4, Becampanel

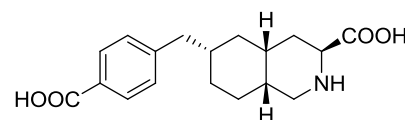
- **pochodne dekahydroisochinoliny** – do najbardziej obiecujących związków w tej klasie chemicznej można zaliczyć: LY 293558 (tezampanel, **5**, Tabela 1 str. 6) oraz związki o charakterze selektywnych antagonistów podjednostki GluK1, jak na przykład: LY 37770 (**6**) i LY 382884 (**7**)



5, Tezampanel



6, LY 37770



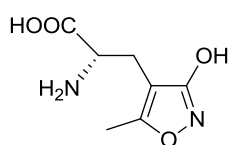
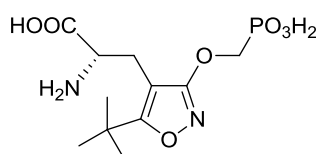
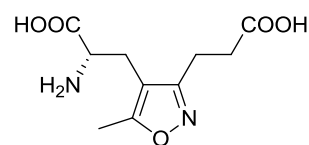
7, LY 382884

- **rozbudowane pochodne agonistów**

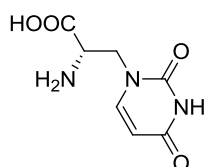
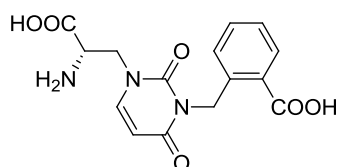
Ze względu na temat i zakres pracy habilitacyjnej, w dalszym ciągu tego opracowania skupię się na ostatniej wymienionej klasie związków. W jej skład wchodzi kompetyjni antagoniści receptorów AMPA/KA, o budowie opartej na zmodyfikowanych strukturach znanych α -aminokwasowych agonistów. Związki w tej klasie, oprócz grupy α -aminokwasowej posiadają także dodatkowe ugrupowanie o charakterze kwasowym (grupa karboksylowa, fosfonowa,

tetrazol), a rolę linkera pomiędzy tymi dwoma fragmentami spełnia pierścień heterocykliczny. Na uwagę zasługuje fakt, iż za wiązanie się aminokwasowych antagonistów o tej budowie do receptorów AMPA/KA odpowiadają w przeważającej większości przypadków tylko izomery o konfiguracji absolutnej *S*, podczas gdy enancjomery *R* są nieaktywne [42].

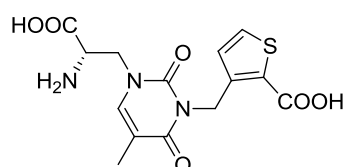
Typowym przykładem antagonistów należących do tej klasy chemicznej są pochodne izoksazolu, których struktura została oparta na wzorze AMPA (kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego). Do najbardziej aktywnych związków tej grupy należą (*S*)-ATPO ($IC_{50} \text{AMPA} = 16 \mu\text{M}$) oraz (*S*)-ACMP ($IC_{50} \text{AMPA} = 17 \mu\text{M}$) [46, 47].

8, (*S*)-AMPA9, (*S*)-ATPO10, (*S*)-ACMP

Kolejnym przykładem są aminokwasowe pochodne uracylu, których budowa została oparta o strukturę willardiiny, aminokwasu występującego w nasionach akacji i mimozy, agonisty receptorów AMPA i kainowych [48]. W wyniku wprowadzenia odpowiednich podstawników w pozycję *N3* pierścienia uracylu, uzyskano związki o charakterze wysoce selektywnych antagonistów podjednostki GluK1. Związki UBP302 i UBP310 w badaniach wykazały wysokie powinowactwo do ludzkiego sklonowanego receptora GluK1 (dla UBP310: $IC_{50} = 10 \text{ nM}$) i dużą selektywność w stosunku do pozostałych podjednostek receptorów AMPA i kwasu kainowego. Dodatkowo, związek UBP310 silnie wiązał się do receptorów GluK3 ($IC_{50} = 23 \text{ nM}$).

11, (*S*)-willardiine

12, UBP302



13, UBP310

3.4 Koncepcja, cel i zakres pracy

3.4.1 Koncepcja pracy

Opublikowanie w ostatnich latach licznych struktur krystalicznych domeny wiążącej (LBD) receptorów jonotropowych kwasu glutaminowego, wykrystalizowanych z szeregiem ligandów (zarówno agonistów jak i antagonistów) znacznie przyczyniło się do wzrostu wiedzy na temat mechanizmu działania i sposobu wiązania ligandów oraz stało się potężnym narzędziem służącym do projektowania nowych aktywnych i selektywnie działających związków. Analiza opublikowanych w bazie Protein Data Bank kompleksów kieszeni wiążącej receptorów AMPA (podtyp GluA2) i KA (podtyp GluK1), wykrystalizowanych z antagonistami **ATPO**, **UBP302**, **UBP310** (PDB ID: 1N0T, 1VSO, 2F35, 2F34 [49-51]) wykazała, że grupa α -aminokwasowa ligandów we wszystkich przypadkach wiąże się z receptorem w ten sam sposób, oddziałując z konserwatywnymi aminokwasami domeny D1 (Rys. 1): P499, T501, R506 oraz E423 (numeracja wg ludzkiego podtypu GluA2, sekwencja kanoniczna P42262). Dodatkowa kwasowa grupa tworzy wiązanie z aminokwasami domeny D2: S675 i/lub T676, stabilizując otwartą konformację kieszeni wiążącej receptora, co skutkuje zamknięciem kanału dla jonów (tzw. mechanizm „*foot-in-the-door*”), natomiast pierścień heterocykliczny spełnia w większości przypadków głównie rolę nośnika dla obu wspomnianych grup funkcyjnych.

Bazując na strukturach ATPO, ACMP, UBP302 i UBP310, w ramach niniejszej dysertacji zaprojektowano grupę związków, w których pierścień heterocykliczny zastąpiono pierścieniem benzenu z równoczesnym zachowaniem grupy aminokwasowej i dodatkowego, oddalonego ugrupowania kwasowego. W nielicznych doniesieniach literaturowych z lat 90-tych wykazano, że związki o takiej budowie mogą wywierać efekt antagonistyczny na jonotropowe receptory kwasu glutaminowego – głównie NMDA i AMPA [52, 53], temat ten jednak nie doczekał się kontynuacji. Z tego względu uznano, że analogi fenyloalaniny stanowią dobry punkt początkowy do rozpoczęcia bardziej szczegółowych badań w tej dziedzinie, w szczególności badań opartych na racjonalnym projektowaniu z wykorzystaniem metody dokowania do struktur krystalicznych kieszeni wiążącej poszczególnych podjednostek. W porównaniu z pierścieniem izoksazolu lub uracylu, pierścień benzenu umożliwia większą liczbę modyfikacji strukturalnych i wprowadzenie zróżnicowanych podstawników penetrujących niewykorzystane fragmenty kieszeni wiążącego w receptorze w celu zwiększenia powinowactwa. Wybiórcze oddziaływanie tych podstawników z aminokwasami niekonserwatywnymi w poszczególnych podtypach receptorów stanowi potencjalne źródło selektywnej aktywności farmakologicznej zaprojektowanego związku.

W ramach etapu projektowania struktur ligandów przeanalizowano większość dostępnych struktur krystalicznych domeny LBD podjednostek GluA2 i GluK1 ze związanymi antagonistami oraz porównano sekwencje wszystkich podjednostek należących do AMPA i KA. Wykazano, że w obrębie LBD poszczególnych podjednostek pomiędzy aminokwasami biorącymi udział w oddziaływaniu z ligandem istnieje tylko kilka różnic, zaś pomiędzy podjednostkami receptorów AMPA istnieje zaledwie jedna różnica - odpowiednikiem tyrozyny w GluA1/2 (Tyr716/723) jest fenyloalanina (Phe734/724 w GluA3/4). Wg doniesień literaturowych, wiązanie wodorowe ze wspomnianą tyrozyną jest w dużej części odpowiedzialne za 70-krotnie większe powinowactwo do GluA1/2 w porównaniu z GluA3/4 związku Br-HIBO, agonisty budowie opartej na pierścieniu izoksazolu.

Tabela 3. Porównanie aminokwasów w kieszeni wiążącej bezpośrednio oddziałujących z cząsteczkami kompetycyjnych antagonistów podjednostek GluA2 i GluK1 wg analizy dostępnych struktur krystalicznych.²

		domain D1						domain D2											
rat	GluA2 (P19491)*	E402	Y405	Y450	P478	T480	R485	T649	L650	G653	S654	T655	T686	Y702	L704	E705	T707	M708	Y732
rat	GluK1 (P22756)*	E441	Y444	Y489	P516	T518	R523	A684	V685	G688	S689	T690	S721	L735	M737	E738	T740	S741	Y764
human	GluA1 (P42261)	E416	Y419	Y464	P492	T494	R499	T663	L664	G667	S668	T669	T700	Y716	L718	E719	T721	M722	Y746
human	GluA2 (P42262)	E423	Y426	Y471	P499	T501	R506	T670	L671	G674	S675	T676	T707	Y723	L725	E726	T728	M729	Y753
human	GluA3 (P42263)	E432	Y435	Y480	P508	T510	R515	T681	L682	G685	S686	T687	T718	F734	L736	E737	T739	M740	Y764
human	GluA4 (P48058)	E424	Y427	Y472	P500	T502	R507	T671	L672	G675	S676	T677	T708	F724	L726	E727	T729	M730	Y754
human	GluK1 (P39086)	E456	Y459	Y504	P531	T533	R538	A699	V700	G703	S704	T705	S736	L750	M752	E753	T755	S756	Y779
human	GluK2 (Q13002)	E440	Y443	Y488	P516	A518	R523	A684	V685	G688	A689	T690	N721	F735	M737	E738	T740	T741	Y764
human	GluK3 (Q13003)	E443	F446	Y491	P518	T520	R525	A686	V687	G690	A691	T692	N722	L736	M738	E739	T741	T742	Y765
human	GluK4 (Q16099)	E425	Y428	Y473	G500	T502	R507	T669	I670	G673	S674	S675	T706	F720	L722	E723	T725	M726	Y749
human	GluK5 (Q16478)	E424	Y427	Y472	A499	T501	R506	T668	I669	G672	S673	T674	T705	F719	L721	E722	T724	M725	Y748

* Ze względu na numeracje wg szczurzych podtypów: GluA2 i GluK1, używane w niektórych prezentowanych publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, w powyższym nałożeniu sekwencji ludzkich uwzględniono także te podtypy (sekwencje UniProt P19491-1 bez peptydu sygnałowego i P22756-2)

² Uwaga: w dalszej części tekstu, jeśli brak jest osobnych przypisów, używana jest numeracja dla ludzkich podtypów receptorów AMPA i KA, wg sekwencji podanych w Tabeli 3

3.4.2 Cel badań

Niniejszy projekt, prowadzony we współpracy z naukowcami z Uniwersytetu w Kopenhadze, ma charakter interdyscyplinarny i łączy ze sobą dziedziny chemii, biologii i krystalografii. Prace badawcze opierają się na wykorzystaniu różnych gałęzi chemii medycznej, organicznej, analitycznej, farmakologii molekularnej, modelowania molekularnego oraz krystalografii białek i prowadzone są na poziomie podstawowym. Projekt ma na celu zarówno rozwijanie nowych narzędzi farmakologicznych, jak i ich zastosowanie w połączeniu z metodami współczesnej biologii molekularnej do badania struktury i funkcji białek oraz ich oddziaływań z ligandami, ze szczególnym uwzględnieniem czynników wpływających na selektywność powinowactwa w obrębie rodziny jonotropowych receptorów kwasu glutaminowego.³

Głównym celem projektu było otrzymanie i charakterystyka farmakologiczna serii nowych ligandów jonotropowych receptorów glutaminianergicznych, potencjalnie działających jako selektywni antagoniści receptorów AMPA i/lub kainowych lub poszczególnych ich podtypów.

3.4.3 Plan badań

Etap 1. Projektowanie struktur ligandów

Etap 2. Synteza chemiczna zaplanowanych związków

Etap 3. Charakterystyka farmakologiczna otrzymanych związków

Etap 4. Studia krystalograficzne dla wybranych najbardziej interesujących związków w kieszeni wiążącej podjednostek GluA2 i/lub GluK1 oraz ocena sposobu wiązania (*binding mode*) liganda

Etap 5. Modelowanie cząsteczkowe – dokowanie

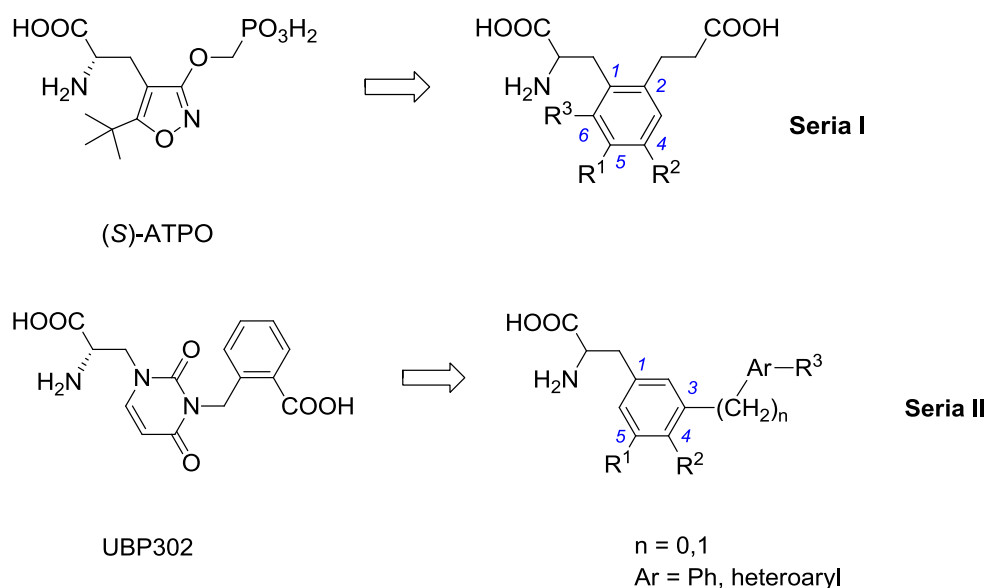
³ Zaznaczyć tu należy, że prowadzone badania miały na celu głównie rozwijanie nowych narzędzi farmakologicznych. Z tego powodu próby określenia właściwości fizykochemicznych, przenikania przez błony biologiczne i barierę krew-mózg zostały odłożone do czasu znalezienia związków o wysokim powinowactwie do receptorów AMPA/KA

Badania będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego zostały wykonane w następujących zespołach:

1. Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie
2. Department of Drug Design and Pharmacology, Medicinal Chemistry Research, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen
3. Department of Drug Design and Pharmacology, Molecular and Cellular Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen
4. Department of Drug Design and Pharmacology, Biostructural Research, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen

Etapy 1 i 2.

Projektowanie potencjalnych ligandów w grupie pochodnych fenyloalaniny objęło dwie serie związków (Rys. 4).



Rys. 4. Struktury syntetyzowanych pochodnych fenyloalaniny w obecnym projekcie.

Seria I zawiera pochodne fenyloalaniny, bezpośrednio wzorowane na strukturach znanych antagonistów ATPO i ACMP (związki **9** i **10** str. 12), natomiast **Seria II** obejmuje pochodne fenyloalaniny, wzorowane na strukturach antagonistów UBP302 i UBP310 (związki **12** i **13** str. 12). W projektowaniu konkretnych struktur wykorzystane zostały m.in. komputerowo wspomagane metody dokowania molekularnego z użyciem odpowiedniego oprogramowania i opublikowanych struktur krystalicznych kieszeni wiążącej receptorów AMPA i kainowych jako szablonów. Badania syntetyczne zostały opracowane i wykonane w oparciu o wypracowane

metody syntetyczne, oparte częściowo na metodach literaturowych, częściowo na doświadczeniu własnym habilitanta. W odniesieniu do kilku metod syntetycznych niezbędna była dodatkowa optymalizacja warunków reakcji. Przedmiotem badań były w większości związki racemiczne, jednak dla kilku najbardziej interesujących połączeń otrzymano poszczególne enancjomery. Wykorzystano (1) metodę syntezy chemicznej z wykorzystaniem związków czynnych optycznie jako substratów (2) metodę preparatywnego rozdziału mieszanin racemicznych na poszczególne enancjomery z wykorzystaniem chiralnej kolumny HPLC.

Zarówno projektowanie jak i synteza zostały wykonane samodzielnie przez habilitanta lub pod jego opieką, w ramach np. prac magisterskich. Badania te zostały wykonane częściowo podczas stypendium po-doktorskiego habilitanta, w *Department of Drug Design and Pharmacology, Medicinal Chemistry Research, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen*, a częściowo w jednostce macierzystej habilitanta - *Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum*. Rozdział mieszanin racemicznych został przeprowadzony częściowo przez habilitanta, częściowo przez naukowców duńskich.

Etap 3.

Badania farmakologiczne i strukturalne zawężono do receptorów AMPA, KA i NMDA oraz sklonowanych homomerycznych receptorów dla poszczególnych podjednostek: GluA1-GluA4 i GluK1-GluK3. Otrzymane związki zostały poddane następującym badaniom:

a) Badania receptorowe *in vitro* badanych związków pod kątem powinowactwa do natywnych receptorów AMPA, KA i NMDA w korze mózgowej szczura oraz powinowactwa do sklonowanych homomerycznych receptorów GluK1-GluK3. Badania zostały wykonane w ramach współpracy naukowej przez naukowców duńskich z *Department of Drug Design and Pharmacology, Medicinal Chemistry Research* oraz *Molecular and Cellular Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen*.

b) Badania receptorowe *in vitro* dla najbardziej aktywnych związków pod kątem powinowactwa do wybranych sklonowanych homomerycznych receptorów (GluA1-GluA4) w celu wykrycia selektywnego wiązania do danego podtypu receptora. Badania zostały wykonane w ramach współpracy naukowej, przez naukowców duńskich z *Department of Drug Design and Pharmacology, Molecular and Cellular Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen*.

c) Testy elektrofizjologiczne dla najbardziej aktywnych związków z wykorzystaniem linii komórkowej z nadekspresją homomerycznych receptorów GluA2, GluA3, GluK1, GluK3 w celu potwierdzenia profilu funkcjonalnego liganda. Badania zostały wykonane w ramach współpracy

naukowej, przez naukowców duńskich z *Department of Drug Design and Pharmacology, Molecular and Cellular Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen*.

Etap 4.

Wybrane związki zostały wykrystalizowane z konstruktem domeny LBD podjednostek GluA2 i/lub GluK1. Cztery otrzymane i rozwiązane struktury krystaliczne kieszeni wiążących GluA2 i GluK1 wykrystalizowane z otrzymanymi pochodnymi fenyloalaniny zostały zdeponowane w bazie Protein Data Bank (PDB) pod kodami:

3TZA, 4DPD, 5CBR, 5CBS (publikacje **P2**, **P3** i **P5**).

Badania zostały wykonane w ramach współpracy naukowej, przez naukowców duńskich z *Department of Drug Design and Pharmacology, Biostructural Research, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen*.

Etap 5.

W badaniach wykorzystane zostały komputerowo wspomagane metody modelowania oraz dokowania molekularnego z użyciem odpowiedniego oprogramowania. Jako szablony do dokowania wykorzystano zarówno znane, jak i rozwiązane w ramach projektu struktury krystaliczne domeny LBD podjednostek GluA2 i GluK1. Wykorzystano metody dokowania „sztywnego” oraz tzw. metodę „*induced fit docking*”. Badania zostały wykonane częściowo przez habilitanta, a częściowo w ramach współpracy naukowej, przez naukowców duńskich z *Department of Drug Design and Pharmacology, Biostructural Research, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen*.

3.5 Wyniki badań związanych z osiągnięciem naukowym w postępowaniu habilitacyjnym

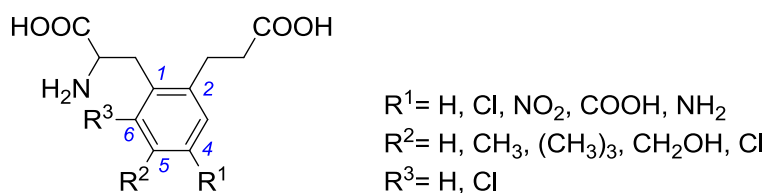
3.5.1 Badania w grupie pochodnych 2-karboksyetylofenyloalaniny

Projekt został podzielony na dwie osobne publikacje, z których jedna skupiła się na aktywności w stosunku do receptorów AMPA, druga zaś na aktywności w stosunku do receptorów kainowych. Celem obu prac była synteza i ocena aktywności biologicznej pochodnych fenyloalaniny należących do **Serii I**.

P2. E. Szymańska, K. Frydenvang, A. Contreras-Sanz, D.S. Pickering, E. Frola, Z. Serafimoska, B. Nielsen, J.S. Kastrup, T.N. Johansen; A new phenylalanine derivative acts as an antagonist at the AMPA receptor GluA2 and introduces partial domain closure: Synthesis, resolution, pharmacology, and crystal structure; *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 7289-7298.

P3. R. Venskutonyte, K. Frydenvang, E. Valades, E. Szymańska, T.N. Johansen, J.S. Kastrup, D.S. Pickering; Structural and pharmacological characterization of phenylalanine-based AMPA receptor antagonists at kainate receptors; *ChemMedChem* **2012**, 7, 1793-1798.

Projektowanie. W strukturach planowanych związków do pierścienia benzenu wprowadzono ugrupowanie α -aminokwasowe oraz łańcuch kwasu propionowego, naśladujący dodatkową grupę kwasową obecną w strukturach znanych α -aminokwasowych antagonistów. Pozostałe modyfikacje strukturalne objęły pozycje 4, 5 i 6 pierścienia fenyloalaniny (w odniesieniu do grupy α -aminokwasowej).



Z nałożenia struktur krystalicznych LBD podjednostek GluA2 i GluK1 wraz ze związanymi antagonistami (PDB ID: 1N0T, 3B7D, 2F34) wynika, że grupy *tert*-butylowa w ATPO, cyjanowa w CNQX oraz 5-metylowa w UBP310 (a także najprawdopodobniej metylowa w ACMP) zajmują podobną pozycję w receptorze i są umiejscowione w małym zagłębieniu kieszeni wiążącej. Wpływ obecności podstawników w pozycji 5 pierścienia uracylu pochodnych willardiiny na powinowactwo do receptorów AMPA i KA był intensywnie studiowany [54]; stwierdzono między innymi, że obecność w tej pozycji grupy metylowej jest częściowo odpowiedzialna za wysokie

powinowactwo do receptorów GluK1. Z tego powodu w zaprojektowanych związkach, w położeniu 5 pierścienia fenyloalaniny, odpowiadające w dokowaniach pozycji wspomnianych ugrupowań, wprowadzono podstawniki: metylowy i *tert*-butylowy, a także atom chloru (odpowiadający rozmiarem grupie metylowej) oraz polarną grupę hydroksymetylową. W położeniu 4, ze względu na otoczenie podstawnika R¹ modyfikacje objęły wprowadzenie grup o potencjalnych właściwościach akceptorów lub donorów wiązania wodorowego (NO₂, COOH, NH₂, Cl). Podjęto także pojedynczą próbę wprowadzenia podstawnika w pozycję 6 pierścienia.

Synteza. Zaprojektowane związki z **Serii I** otrzymano w kilkietapowej syntezie. Wyjściowe, (nie)podstawione 2-fenyloetanolę były cyklizowane poprzez etap MEM-acetali do odpowiednich izochromanów. Z tych ostatnich, po etapie działania kwasem bromowodorowym oraz nukleofilowej substytucji powstałych bromków acetamidomalonianem dietylu otrzymywano bromomaloniany dietylu, przekształcane następnie w odpowiednie nitryle. Po przeprowadzeniu kolejnych reakcji, niezbędnych do uzyskania odpowiedniego podstawienia w pierścieniu aromatycznym (reakcja nitrowania, reakcja redukcji, reakcja Sandmeyera) następowała hydroliza kwasowa, w wyniku której otrzymywano racemiczne pochodne fenyloalaniny.

Wybrane wyniki badań farmakologicznych.

1) W badaniach receptorowych powinowactwa do natywnych receptorów AMPA, KA i NMDA oraz homomerycznych sklonowanych receptorów GluK1 i GluK2, zaobserwowano dla większości związków umiarkowane powinowactwo (1.5-20 μM) w stosunku do badanych receptorów AMPA i/lub GluK1 (Tabela 1/**P2**, Tabela 1/**P3**). Stwierdzono, że podstawienie 4-nitro-5-chloro, obecne w związku **3h**⁴ jest optymalne dla powinowactwa zarówno do natywnych receptorów AMPA jak i homomerycznych sklonowanych receptorów GluK1 (IC₅₀AMPA = 3.4 μM, K_iGluK1 = 3.0 μM). Obecność chloru lub grupy metylowej w położeniu 5 wpływa na wzrost siły wiązania, głównie do receptorów GluK1 i GluK3 (z wyjątkiem podstawienia 4,5-dichloro, lepiej tolerowanego przez receptory AMPA niż kainowe), ale podstawnik hydroksymetylowy lub *tert*-butylowy w tej pozycji znacznie redukuje powinowactwo do wszystkich badanych receptorów. Wprowadzenie polarnej grupy aminowej w położeniu 4 (przy jednoczesnej obecności chloru w pozycji 5) wzmacnia wiązanie do receptorów GluK1 i GluK3, osłabiając równocześnie wiązanie do receptorów AMPA. Podstawienie 5,6-dichloro w pierścieniu fenyloalaniny doprowadziło do całkowitej eliminacji powinowactwa w porównaniu ze związkiem 5-chloropodstawionym **3d**,⁵ który wykazał najwyższe powinowactwo do GluK3 spośród całej serii otrzymanych związków, K_iGluK3 = 4.7 μM).

⁴ **3h**: kwas 2-amino-3-(2-(2-karboksyetylo)-5-chloro-4-nitrofenylo)propionowy

⁵ **3d**: kwas 2-amino-3-(2-(2-karboksyetylo)-5-chlorofenylo)propionowy

Na szczególną uwagę zasługują tu modyfikacje prowadzące do uzyskania powinowactwa do receptorów **GluK3**. Receptory te są najslabiej poznane (m. in. z powodu braku selektywnych narzędzi farmakologicznych), a do chwili obecnej nie opublikowano żadnej struktury krystalicznej kieszeni wiążącej podjednostki GluK3 ze związanym antagonistą kompetycyjnym.

2) Ze względu na najwyższą aktywność, kwas 2-amino-3-(2-(2-karboksyetylo)-5-chloro-4-nitrofenylo)propionowy **3h** został zakwalifikowany do zaawansowanych badań farmakologicznych, w tym do badań receptorowych *in vitro* pod kątem powinowactwa do:

- sklonowanych homomerycznych receptorów GluA1_o-4_o (izoformy „flop”)
- receptora (Y716F)GluA1_o z mutacją Y/F - jedyne niezakonserwowanego aminokwasu spośród aminokwasów biorących udział w wiązaniu ligandów w obrębie LBD GluA1-4
- rozpuszczalnych białek rekombinowanych GluA2-S1S2J, (Y702F)GluA2-S1S2J⁶ oraz GluK1 LBD (Tabela 2/P2, Rys. 2/P3)

Powyższe testy wykazały statystyczną zgodność powinowactwa **3h** do pełnego receptora GluA2(R)_o, białka GluA2-S1S2J i białka zmutowanego (Y702F)GluA2-S1S2J. Równocześnie jednak stwierdzono prawie 4-krotną różnicę powinowactwa **3h** do GluA1_o/2_o w porównaniu z GluA3_o/4_o i ponad 2-krotną różnicę w powinowactwie pomiędzy GluA1_o a mutantem (Y716F)GluA1_o. Wyniki te wskazują, że chociaż **3h** prawdopodobnie oddziałuje z niezakonserwowaną tyrozyną, to, wbrew oczekiwaniom, wpływ tego oddziaływania na selektywność wiązania do poszczególnych podjednostek AMPA nie jest znaczący. Co więcej, stwierdzono, że powinowactwo związku **3h** do białka rekombinowanego GluK1 LBD było prawie 8-krotnie niższe niż do pełnego receptora GluK1.

3) W testach elektrofizjologicznych z wykorzystaniem linii komórkowych z nadekspresją homomerycznych receptorów GluA2(Q)_i, GluA3_i, GluK1 i GluK3 wykazano antagonizm kompetycyjny związków **3h** i **3d** wobec badanych receptorów przez równoległe przesunięcie w prawo krzywej zależności stężenie (S)-Glu - odpowiedź w prawo (z równoczesnym brakiem zmiany odpowiedzi maksymalnej).

Mieszanina racemiczna związku **3h** została rozdzielona na poszczególne enancjomery metodą HPLC z użyciem kolumny chiralnej z wypełnieniem typu „ligand exchange”. Otrzymane enancjomery poddano badaniom elektrofizjologicznym, wykazując, że jedynie enancjomer S związku **3h** jest odpowiedzialny za powinowactwo do receptorów AMPA i kainowych, podczas gdy enancjomer R jest nieaktywny.

⁶ Numeracja GluA2 wg szczyrego podtypu, sekwencja P19491-1 bez peptydu sygnałowego

Wyniki badań krystalograficznych.⁷ W ramach projektu rozwiązano struktury krystaliczne kieszeni wiążącej LBD podtypów GluA2 i GluK1 wykrystalizowane z najbardziej aktywnym związkiem (S)-**3h**, co pozwoliło na szczegółową analizę i porównanie oddziaływań białko-ligand w obu receptorach (PDB ID: 3TZA, 4DLD).

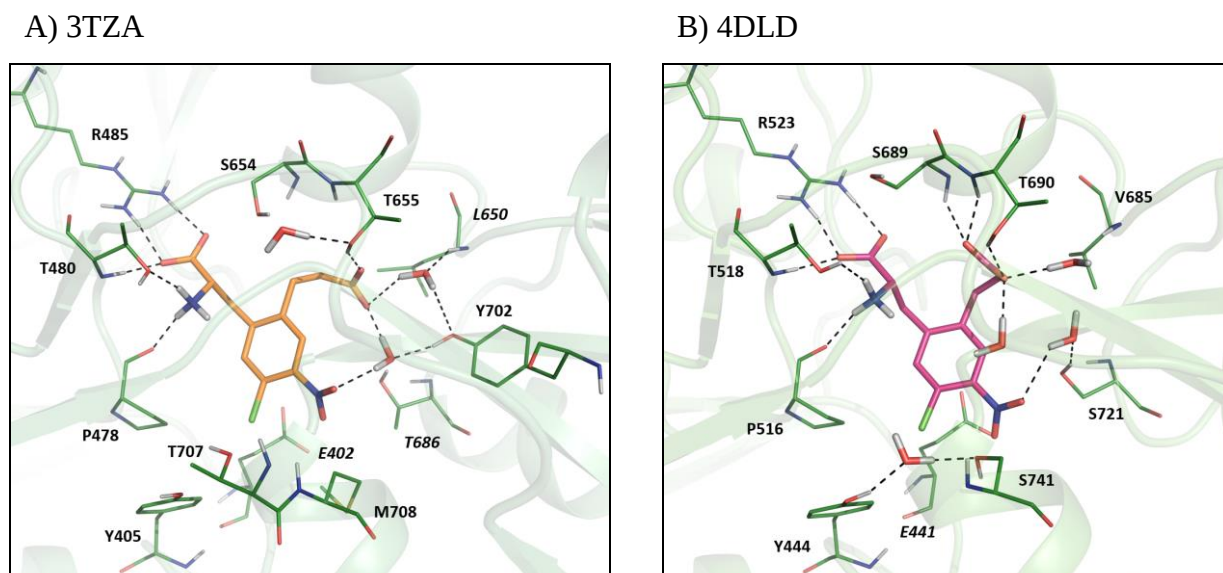
Analiza uzyskanych kompleksów pokazała, iż grupa α -aminokwasowa związku (S)-**3h** oddziałuje w sposób kanoniczny z kieszenią wiążącą obu receptorów, podczas gdy ugrupowanie kwasu propionowego liganda przyjmuje odmienne konformacje w obu strukturach (Rys. 5). W kompleksie 3TZA „dodatkowa” grupa karboksylowa wraz z grupą nitrową w pozycji 4 biorą udział w wiązaniu z receptorem, zarówno bezpośrednio (z Thr655) jak i za pośrednictwem cząsteczek wody tworzących wokół liganda sieć wiązań wodorowych (z Thr655, Thr686, Tyr702, Rys. 5A). Oddziaływania te, wzmocnione przez interakcje podstawników w pozycjach 4 i 5, zapobiegają wytworzeniu bezpośredniego wiązania między D1 i D2 (Glu402 z Thr686, kluczowego dla zamknięcia kieszeni wiążącej przy związanym agoniście) i wymuszają otwartą „antagonistyczną” konformację kieszeni wiążącej (Rys. 5/P2). Zmierzony stopień zamknięcia LBD (*domain closure*, patrz str. 10) w strukturze 3TZA wynosi 7-9° w odniesieniu do struktury *apo*. Jest to najwyższa wartość zmierzona do tej pory w kompleksach GluA2 z antagonistami (Tabela 2 str. 10) i klasyfikuje związek **3h** pomiędzy wartością zmierzoną dla LBD częściowych agonistów (jak kwas kainowy, ok. 13°) a antagonistów (CNQX i (S)-ATPO, 3-7°). Dodatkowe testy elektrofizjologiczne z receptorem GluA2 w zablokowanym stanie desensytyzacji (Rys. 4/P2) wykluczyły jednak jakiegokolwiek właściwości **3h** jako częściowego agonisty, potwierdzając jego profil funkcjonalny pełnego antagonisty.

Z analizy struktury krystalicznej 3TZA wynika, że (S)-**3h** słabo, za pośrednictwem cząsteczek wody, oddziałuje z niezakonserwowaną tyrozyną (Tyr702 w publikacji P2). Można sądzić, że oddziaływanie jest w części odpowiedzialne za niewielkie obserwowane różnice w powinowactwie do GluA1/2 w porównaniu z GluA3/4.

W strukturze krystalicznej 4DLD dodatkowe ugrupowanie kwasu propionowego liganda przyjmuje konformację odmienną od obserwowanej w kompleksie 3TZA, tworząc wiązania wodorowe z grupami NH Ser689 i Thr690 z domeny D2 (Rys. 5B, Rys. 3/P3). Grupa nitrowa natomiast oddziałuje z Ser721 i Ser741, stabilizując „otwartą” konformację LBD i zapobiegając wiązaniu Ser721 z Glu441, obserwowanym w przypadku agonistów (mechanizm *foot-in-the-door*). Podobnie jak w kompleksie 3TZA, stopień zamknięcia kieszeni wiążącej jest bliski temu, który generują w GluK1 częściowi agoniści.

⁷ W publikacji P2 zastosowano numerację GluA2 wg szczurzego podtypu, sekwencja P19491-1 bez peptydu sygnałowego. W publikacji P3 zastosowano numerację GluA2 wg ludzkiego podtypu, sekwencja P42262, oraz numerację GluK1 wg szczurzego podtypu, sekwencja P22756-2 (patrz Tabela 3, str. 14)

Porównanie obu struktur wskazało na duże znaczenie podstawników w położeniu 4 i 5 pierścienia aromatycznego liganda (S)-**3h** dla potencjalnego oddziaływania z otaczającymi aminokwasami. Atom chloru w położeniu 5 pierścienia fenyloalaniny doskonale wypełnia niewielką lipofilową wnękę w kieszeni wiążącej, zajmowaną m. in. przez grupę *tert*-butylową ATPO i 5-metylową UBP310. W najbliższym otoczeniu grupy nitrowej w położeniu 4 znajdują się między innymi Thr686 i Met708 w kieszeni wiążącej GluA2, zastąpione przez Ser721 i Ser741 w kieszeni wiążącej GluK1 (oraz Asn722 i Thr742 w GluK3). Podczas gdy zarówno Thr686(GluA2) jak i Ser721 (GluK1) są zaangażowane w tworzenie sieci wiązań wodorowych receptor-woda-(S)-**3h**, w przypadku drugiej pary aminokwasów (Met708 vs. Ser741) tylko łańcuch boczny Ser741 może wytworzyć silne wiązanie wodorowe z ligandem. Obecność wiązania wodorowego lub jego brak jest jednym z potencjalnych źródeł selektywności w powinowactwie liganda do receptorów AMPA i GluK1 (choć w przypadku związku (S)-**3h** powinowactwa te są prawie identyczne). W podobny sposób – obecnością wiązania wodorowego między grupą aminową liganda a Ser741/Thr742 – można wytłumaczyć obserwowane różnice w powinowactwie kwasu 2-amino-3-(4-amino-2-(2-karboksyetylo)-5-chlorofenylo)propionowego do receptorów GluK1 i GluK3 w porównaniu z receptorami AMPA.



Rys. 5. Struktury krystaliczne związku (S)-**3h** wykrystalizowanego z kieszenią wiążącą LBD podjednostek GluA2 (PDB ID: 3TZA) i GluK1 (PDB ID: 4DLD).

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych badań otrzymano serię nowych ligandów receptorów AMPA, GluK1 i GluK3 o strukturze pochodnych fenyloalaniny. Opracowano dwie struktury krystaliczne kieszeni wiążącej podjednostek GluA2 i GluK1 ze związkiem (S)-**3h** (zdeponowane w bazie danych Protein Data Bank pod kodami 3TZA i 4DLD). Analiza tych kompleksów

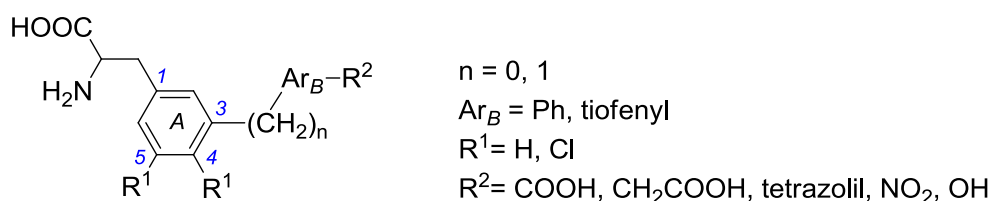
pozwoili na wyciągnięcie ważnych wniosków dotyczących wpływu budowy liganda na jego powinowactwo i potencjalną selektywność w stosunku do rozważanych receptorów.

3.5.2 Badania w grupie pochodnych biaryloalaniny

Seria II obejmuje pochodne fenyloalaniny, wzorowane na strukturach antagonistów UBP302 i UBP310. Związki te zawierają w swej budowie dodatkowe podstawione ugrupowanie aromatyczne w pozycji 3 pierścienia fenyloalaniny (w odniesieniu do grupy α -aminokwasowej). Modyfikacje strukturalne objęły: (1) zmianę odległości dodatkowego ugrupowania aromatycznego od pierścienia fenyloalaniny, (2) charakter tego ugrupowania (benzen, aromatyczny pierścień heterocykliczny) oraz rodzaj i położenie podstawnika, (3) sposób podstawienia w pozycjach 4 i 5 pierścienia aromatycznego fenyloalaniny (w odniesieniu do grupy α -aminokwasowej).

P1. E. Szymańska, D.S. Pickering, B. Nielsen, T.N. Johansen; 3-Substituted phenylalanines as selective AMPA- and kainate receptor ligands; *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6390-6401.

Projektowanie. Przedmiotem początkowego etapu badań związków z **Serii II** była grupa pochodnych fenyloalaniny zawierających w swej budowie podstawnik aryłowy *B* (fenyl, tiofenyl) przyłączony bezpośrednio lub za pośrednictwem mostka metylenowego. Rolę dodatkowej grupy kwasowej pełni podstawnik w pierścieniu aromatycznym *B*: grupa karboksylowa, karboksymetylowa lub bioizoster grupy karboksylowej – pierścień tetrazolu. Dodatkowo w kilku związkach zamiast grupy karboksylowej wprowadzono grupę nitrową – akceptor wiązania wodorowego lub grupę hydroksylową, która może pełnić rolę zarówno donora jak i akceptora wiązań wodorowych. Modyfikacje w pozycjach 4 i 5 pierścienia *A* ograniczono do podstawienia 4,5-dichloro.



Synteza. Zaprojektowane związki otrzymano w kilkietapowej syntezie. W początkowym etapie przeprowadzono niezbędne transformacje w celu otrzymania wyjściowych pochodnych toluenu (reakcja nitrowania, reakcja redukcji, reakcja Sandmeyer). Kluczowymi półproduktami w dalszej syntezie były halogenopochodne 2-acetamido-2-benzylomalonianu dietylu, otrzymane

z odpowiednich pochodnych toluenu w wyniku rodnikowego bromowania, a następnie nukleofilowej substytucji bromków benzylu acetamidomalonianem dietylu. Kolejnym etapem była reakcja sprzęgania Suzuki (ang. *cross coupling*), katalizowana przez związki palladu, w wyniku której otrzymano pochodne zawierające w strukturze fragment biarylowy lub benzylofenylowy. Związki te, po niezbędnych dalszych przekształceniach (wprowadzenie ugrupowania tetrazoilu) poddano hydrolizie kwasowej, prowadzącej do otrzymania racemicznych pochodnych feniloalaniny. W ramach pracy otrzymano także poszczególne enancjomery kwasu 3'-(2-amino-2-karboksyetylo)bifenilo-3-karboksyowego **9b**, wychodząc z czynnych optycznie pochodnych 3-bromofeniloalaniny.

Wybrane wyniki badań farmakologicznych.

W testach receptorowych *in vitro* spośród badanej serii związków kilka wykazało mikromolowe powinowactwo do receptorów AMPA/GluK1 (Tabela 1/**P1**). Jedną z ciekawszych obserwacji było zidentyfikowanie w związkach z tej serii fragmentu strukturalnego determinującego aktywność i selektywność pomiędzy grupą receptorów AMPA i kainowych. Stwierdzono, że:

- **podstawnik w pozycji 3' pierścienia B warunkuje aktywność i wpływa na wybiórcze wiązanie z poszczególnymi podtypami receptorów AMPA i kainowych**
- związki zawierające grupę karboksylową w pozycji 3' pierścienia B wykazywały powinowactwo głównie w stosunku do receptorów GluK1. Przykładem są związki: **9b**⁸ ($K_i\text{GluK1} = 7.9 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50}\text{AMPA} > 100 \mu\text{M}$) i **18b**⁹ ($K_i\text{GluK1} = 2.8 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50}\text{AMPA} > 100 \mu\text{M}$, Tabela 1/**P1**). Wyniki testów powinowactwa poszczególnych enancjomerów aminokwasu **9b** potwierdziły, że za powinowactwo do GluK1 odpowiada tylko enancjomer o konfiguracji absolutnej S
- grupa fenolowa w pierścieniu B może pełnić rolę dodatkowej grupy kwasowej, ale tylko w przypadku receptorów AMPA. Przykładem jest związek **18e**,¹⁰ który wiązał się głównie do natywnych receptorów AMPA ($\text{IC}_{50}\text{AMPA} = 4.6 \mu\text{M}$, $K_i\text{GluK1} > 100 \mu\text{M}$, Tabela 1/**P1**). Jest to pierwszy przykład użycia grupy fenolowej jako dodatkowej grupy kwasowej wśród α -aminokwasowych antagonistów kompetycyjnych. Co więcej, grupa hydroksylowa ma właściwości zarówno donora jak i akceptora wiązań wodorowych, podczas gdy grupa karboksylowa w receptora występuje w stanie zjonizowanym i może być tylko akceptorem wiązań wodorowych

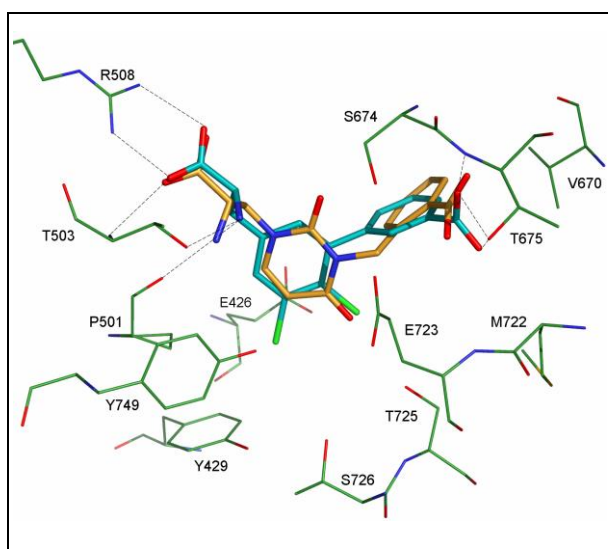
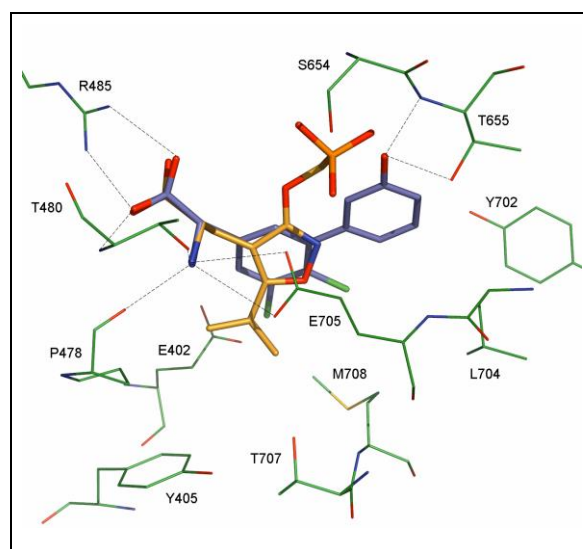
⁸ **9b**: kwas 3'-(2-amino-2-karboksyetylo)bifenilo-3-karboksyowy

⁹ **18b**: kwas 5'-(2-amino-2-karboksyetylo)-2',3'-dichlorobifenilo-3-karboksyowy

¹⁰ **18e**: kwas 2-amino-3-(5,6-dichloro-3'-hydroksybifenyl-3-ylo)propionowy

Modelowanie cząsteczkowe.¹¹ W ramach projektu przeprowadzono dokowanie molekularne ligandów, zawierających w swej strukturze ugrupowanie bifenyłowe lub benzylofenyłowe podstawione w pierścieniu *B* grupą karboksylową, do szablonu struktury krystalicznej GluK1 LBD (PDB ID: 2F35). Najwyższy wynik (mierzony tzw. funkcją *Docking Score*) osiągnięto dla (S)-**18b**, związku o najwyższym powinowactwie do GluK1. W kieszeni wiążącej GluK1 ligand (S)-**18b** w tej konformacji odtwarza system oddziaływań wykrystalizowanego antagonisty UBP302 (ang. *binding mode*, Rys. 6A), pomimo różnic w strukturach obu związków.

Przeprowadzono także dokowanie związku **18e** do szablonu struktury krystalicznej GluA2 LBD (PDB ID: 1N0T, Rys. 6B). Potwierdziło ono, że grupa fenolowa może oddziaływać z Thr655 domeny D2 w podobny sposób, jak grupa fosfonowa (S)-ATPO w GluA2 LBD i grupa karboksylowa UBP302 w GluK1 LBD, a więc może pełnić rolę dodatkowej grupy kwasowej.

A) Dokowanie (S)-**18b** do 2F35B) Dokowanie (S)-**18e** do 1N0T

Rys. 6. Wyniki dokowania molekularnego: A) związku (S)-**18b** do szablonu 2F35; B) związku (S)-**18e** do szablonu 1N0T.

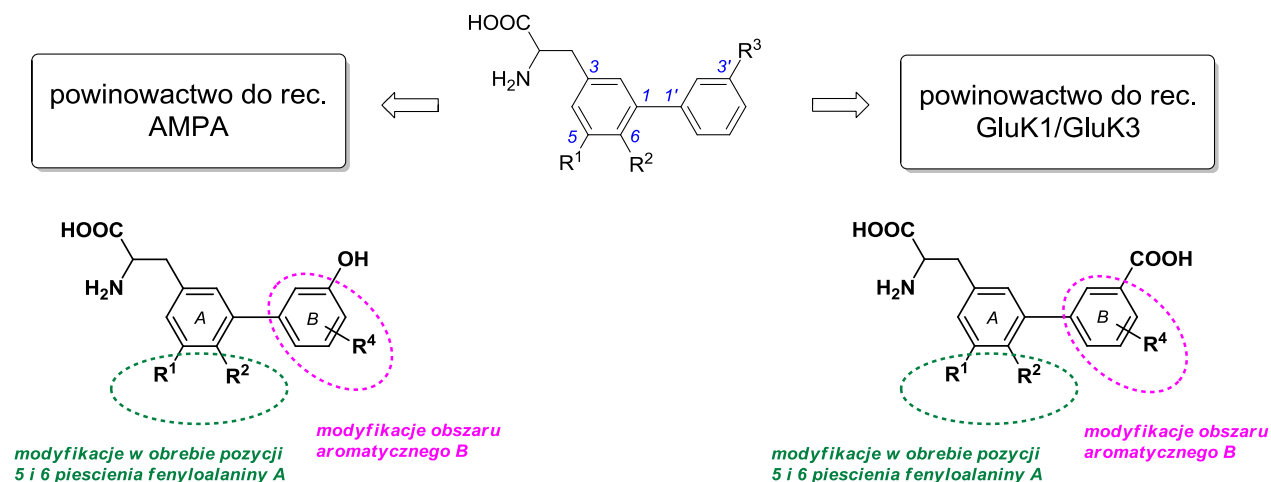
Powyższe obserwacje zaowocowały rozszczerpieniem projektu na dwa osobne kierunki badań (Rys. 7):

- 1) potencjalnych antagonistów receptorów AMPA, posiadających 3'-hydroksyfenylową grupę jako dodatkowe ugrupowanie aromatyczne *B*
- 2) potencjalnych antagonistów receptorów GluK1/GluK3 (oraz, w mniejszym stopniu, AMPA) posiadających 3'-karboksyfenylową grupę jako dodatkowy fragment aromatyczny *B*

¹¹ W publikacji **P1** zastosowano numerację GluK1 wg publikacji oryginalnej (M.L.Mayer et al., *J. Neurosci* (2006) **26**, 2852-2861) oraz numerację GluA2 wg szczurzego podtypu, sekwencja P19491-1 bez peptydu sygnałowego (patrz Tabela 3, str. 14)

W obu grupach ligandów zaplanowano następujące modyfikacje:

- optymalizację podstawienia R^1 i R^2 w pierścieniu A
- optymalizację ugrupowania aromatycznego B

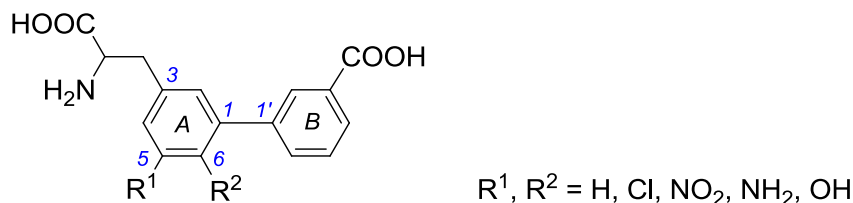


Rys. 7. Kierunek badań w grupie biaromatycznych pochodnych alaniny.¹²

P4. E. Szymańska, P. Chałupnik, K. Szczepańska, A.M. Cuñado Moral, D.S. Pickering, B. Nielsen, T.N. Johansen, K. Kieć-Kononowicz; Design, synthesis and structure-activity relationships of novel phenylalanine-based amino acids as kainate receptors ligands; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 5568-5572.

Projektowanie. Biorąc pod uwagę konkluzje wynikające z poprzednich badań (w szczególności publikacji **P1** i **P3**), za strukturę wiodącą dla następnej serii potencjalnych ligandów **receptorów kainowych** (Rys. 7) uznano: kwas 3'-(2-amino-2-karboksyetylo)bifenylo-3-karboksylowy (związek **9b**, publikacja **P1**). Modyfikacje strukturalne objęły położenia 5 i 6 pierścienia fenyloalaniny, w które wprowadzono podstawniki o potencjalnych właściwościach akceptorów lub donorów wiązania wodorowego (OH, NH₂, NO₂, Cl) w różnych kombinacjach. Jednym z celów tej pracy było porównanie wymagań strukturalnych związków opartych na szkielecie 2-karboksyetylofenyloalaniny (**Seria I**) i 3'-karboksybifenyloalaniny (**Seria II**) w odniesieniu do ich powinowactwa do receptorów homomerycznych GluK1 i/lub GluK3 (Rys. 1/**P4**).

¹² Ze względu na prawidłową numerację atomów węgla w pochodnych bifenyli, atomy węgla oznaczone jako 4 i 5 w związkach z grupy pochodnych 2-karboksyetylofenyloalaniny (**Seria I**) odpowiadają atomom węgla oznaczonym odpowiednio numerami 6 i 5 w związkach z grupy pochodnych biaryloalaniny (**Seria II**)



Synteza. W pracy wykorzystano metody opisane w literaturze w celu otrzymania odpowiednio podstawionych pochodnych 3-bromotoluenu (reakcje bromowania pierścienia aromatycznego, utleniania grupy aminowej do nitrowej, reakcje Sandmeyera, reakcje estryfikacji). Dalsza 4-etapowa synteza przebiegała analogicznie, jak w przypadku publikacji **P1**.

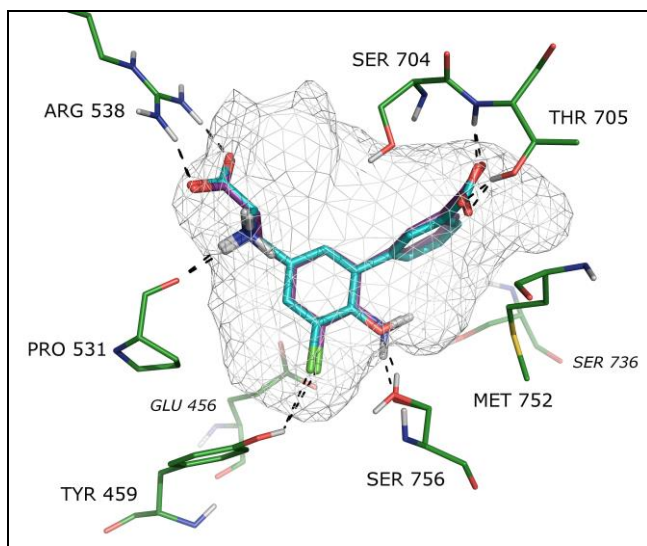
Wybrane wyniki badań farmakologicznych i modelowania molekularnego.

W testach receptorowych *in vitro* najwyższe powinowactwo do receptorów GluK1 (Tabela 1/**P4**), wykazały 5,6-dipodstawione bifenyloalaniny, posiadające atom chloru lub grupę nitrową w położeniu 5 pierścienia A ($K_i\text{GluK1} = 4.9\text{--}7.5\ \mu\text{M}$). Obecność grupy nitrowej, szczególnie w pozycji 6, związana jest ze wzbudzeniem nieselektywnego powinowactwa do receptorów AMPA/GluK1/(GluK3), co potwierdza poprzednie obserwacje dla związków z **Serii I** (publikacja **P3**). Interesujący efekt zaobserwowano w przypadku wprowadzenia donora wiązań wodorowych w pozycję 6: związek z podstawieniem 5-chloro-6-hydroksy (**3f**¹³) wykazał umiarkowanie silne wiązanie do receptorów homomerycznych GluK1 i GluK3 ($K_i\text{GluK1} = 5.5\ \mu\text{M}$, $K_i\text{GluK3} = 11\ \mu\text{M}$, $K_i\text{GluK3}/K_i\text{GluK1} = 2$), podczas gdy zamiana grupy fenolowej na aminową (związek **3e**¹⁴) spowodowała duży spadek powinowactwa do GluK3 ($K_i\text{GluK1} = 4.9\ \mu\text{M}$, $K_i\text{GluK3} > 100\ \mu\text{M}$, $K_i\text{GluK3}/K_i\text{GluK1} > 20$). Obecność grupy OH lub NH₂ w pozycji 6 obniża także powinowactwo badanych związków do natywnych receptorów AMPA.

Dokowanie cząsteczkowe badanych związków zostało przeprowadzone przy zastosowaniu kompleksu GluK1 LBD z antagonistą o budowie opartej na wilardiinie (PDB ID: 3S2V) jako szablonu (Rys. 8). Analiza uzyskanych wyników wskazała, podobnie jak w przypadku oddziaływań związku (S)-**3h** (publikacje **P2** i **P3**), na dwa niezakonserwowane aminokwasy z otoczenia podstawnika R², Ser736 i Ser756, ważne dla potencjalnej selektywności ligandów. Odpowiednikami tych ugrupowań są kwas asparaginowy i treonina w GluK3 oraz treonina i metionina w GluA2. Zmiana z donora wiązania wodorowego (seryna, treonina) na akceptor (kwas asparaginowy) lub redukcja tych właściwości (metionina) przyczyniają się do obserwowanych różnic w powinowactwie badanych związków.

¹³ **3f**: kwas 5'-(2-amino-2-karboksyetylo)-3'-chloro-2'-hydroksy-[1,1'-bifenilo]-3-karboksylowy

¹⁴ **3e**: kwas 2'-amino-5'-(2-amino-2-karboksyetylo)-3'-chloro-[1,1'-bifenilo]-3-karboksylowy



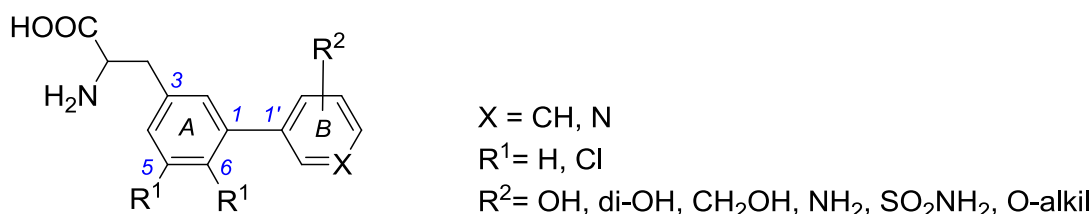
Rys. 8. Nałożenie najbardziej korzystnych (pod względem funkcji *Docking Score*) konformacji związków (S)-**3e** (fioletowy) i (S)-**3f** (niebieski) zadokowanych do szablonu GluK1 LBD (PDB ID: 3S2V).

Podsumowanie. Porównanie zależności struktura-aktywność pochodnych fenyloalaniny z **Serii I** (na podstawie publikacji **P2**, **P3** i publikacji współpracującego zespołu z Uniwersytetu w Kopenhadze [55]) oraz **Serii II** wykazała, że związki oparte na szkielecie bifenyloalaniny wykazują kilkukrotnie wyższe powinowactwo do GluK1 w porównaniu z 2-karboksyetylofenyloalaninami o analogicznym podstawieniu w pierścieniu A. Co więcej, w przypadku związków z **Serii II** wpływ grupy aminowej w pozycji 6 na spadek siły wiązania do receptorów AMPA i GluK3 jest dużo bardziej znaczący niż w przypadku związków z **Serii I**. W celu otrzymania ligandów selektywnie wiążących się do GluK1 należy więc skupić się na pochodnych 3'-karboksybifenyloalaniny, zawierających w położeniu 6 pierścienia A grupę aminową. Z drugiej strony, wyniki badań dla 6-fenolowej pochodnej z **Serii II** są interesującym punktem wyjścia do projektowania ligandów receptorów GluK1 oraz GluK3 nieaktywnych w stosunku do receptorów AMPA.

Stwierdzono także, że 2-karboksyetylofenyloalaniny z **Serii I** wykazują wyższe powinowactwo do homomerycznych receptorów GluK3, niż ich odpowiedniki z **Serii II** z analogicznym podstawieniem w pierścieniu A. Struktura 2-karboksyetylofenyloalaniny wydaje się więc optymalnym bazą strukturalną do modyfikacji w celu otrzymania ligandów receptorów GluK3. Szczególnie wysoki potencjał wydają się mieć związki z **Serii I** zawierające ugrupowanie fenolowe w położeniu 4 (w odniesieniu do grupy α -aminokwasowej), ze względu na oczekiwaną selektywność powinowactwa do receptorów GluK3 w stosunku do pozostałych receptorów kainowych.

P5. E. Szymańska, K. Frydenvang, D.S. Pickering, C. Krintel, B. Nielsen, A. Kooshki, L.G. Zachariassen, L. Olsen, J.S. Kastrup, T.N. Johansen; Studies on aryl-substituted phenylalanines: Synthesis, activity, and different binding modes at AMPA receptors; *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 448-461.

Projektowanie. Za strukturę wiodącą do zaplanowanych modyfikacji w grupie potencjalnych ligandów **receptorów AMPA** w grupie biaryloalanin (Rys. 7) uznano kwas 2-amino-3-(5,6-dichloro-3'-hydroksybifenyl-3-ylo)propionowy (związek **18e**, publikacja **P1**). W pierwszym etapie w strukturach projektowanych związków utrzymano podstawienie 5,6-dichloro w pierścieniu A, a modyfikacje strukturalne skupiły się na pierścieniu aromatycznym B i objęły: (1) wprowadzenie drugiej grupy hydroksylowej do pierścienia fenolu w pozycję 4' lub 5'; (2) „zabudowanie” grupy hydroksylowej w celu zablokowania możliwości tworzenia wiązania wodorowego i sprawdzenia jego znaczenia dla powinowactwa; (3) odsunięcie grupy hydroksylowej od pierścienia B poprzez wprowadzenie mostka metylenowego; (4) zastąpienie grupy fenolowej (w pozycjach 3' lub 4') grupami aminową lub sulfonamidową; (5) zmianę fragmentu 3'- lub 4'-fenolu na ugrupowanie 5-hydroksy-3-pirydyłowe lub 4-hydroksy-3-pirydyłowe.



Synteza. Serię zaplanowanych pochodnych fenyloalaniny otrzymano przy użyciu metod opracowanych w poprzednich badaniach (publikacje **P1**, **P4**), wykorzystując halogenopochodne 2-acetamido-2-benzylomalonianu dietylu jako kluczowe półprodukty. Mieszaninę racemiczną najbardziej aktywnego związku **37**¹⁵ rozdzielono na poszczególne enancjomery metodą HPLC z użyciem kolumny chiralnej z wypełnieniem typu „ligand exchange”. Dodatkowo, w celach porównawczych zsyntetyzowano racemiczny związek **38**¹⁶ (analog struktury wiodącej bez podstawienia 5,6-dichloro w pierścieniu A) oraz poszczególne enancjomery tego aminokwasu.

Wybrane wyniki badań farmakologicznych.

1) W badaniach receptorowych *in vitro* powinowactwo do natywnych receptorów AMPA zaobserwowano tylko dla związków z wolną grupą hydroksylową bezpośrednio podstawioną

¹⁵ **37**: kwas 2-amino-3-(3,4-dichloro-5-(5-hydroksypirydyn-3-ylo)fenylo)propionowy

¹⁶ **38**: kwas 2-amino-3-(3'-hydroksybifenyl-3-ylo)propionowy

w pierścieniu *B* w położeniu 3' (lub równoważnym). Odsunięcie tej grupy od pierścienia, jej zabudowanie lub wymiana na aminową bądź sulfonamidową doprowadziło do znacznego zredukowania siły wiązania. Natomiast wprowadzenie ugrupowania 5-hydroksy-3-pirydylowego do pierścienia fenyloalaniny 3-krotnie zwiększyło powinowactwo do AMPA w porównaniu ze związkiem referencyjnym **9**.¹⁷ Otrzymany w ten sposób aminokwas okazał się najsilniejszym ligandem receptorów AMPA w całej serii (**37**, $IC_{50}AMPA = 1.5 \mu M$, Tabela 1/**P5**).

Badania powinowactwa do natywnych receptorów AMPA przeprowadzone dla poszczególnych enancjomerów fenyloalanin **37** oraz **38** wykazały, że za aktywność związku **37** odpowiada wyłącznie jego izomer *S* ((*S*)-(+)-**37**) natomiast w przypadku pochodnej **38** (analog struktury wiodącej bez podstawienia 5,6-dichloro w pierścieniu *A*) za powinowactwo odpowiada wyłącznie izomer o konfiguracji absolutnej *R* ((*R*)-(–)-**38**).

Ostatnia obserwacja zasługuje na szczególną uwagę, gdyż:

- związki **37** i **38** są bardzo bliskimi analogami strukturalnymi
- wśród kompetycyjnych antagonistów receptorów AMPA/KA o budowie α -aminokwasowej znanych jest zaledwie kilka przykładów aktywności enancjomerów *R* [42]

2) Poszczególne izomery związków **37** i **38**, a także racemiczny związek referencyjny **9** poddano zaawansowanym badaniom receptorowym powinowactwa do sklonowanych homomerycznych receptorów GluA1-3 i GluK1-3 (Tabela 2/**P5**). Badania te potwierdziły całkowity brak aktywności związków (*R*)-**37** i (*S*)-**38** oraz umiarkowane powinowactwo pochodnej (*R*)-**38** do podtypów GluA2, GluK3, GluA1 i GluA3. Stwierdzono także, że związek referencyjny **9** (kwas 2-amino-3-(5,6-dichloro-3'-hydroksybifenyl-3-ylo)propionowy) wykazał najsilniejsze powinowactwo do receptorów GluA2 ($K_iGluA2 = 5.03 \mu M$), 3-krotnie słabiej wiązał się do GluA1, 10-krotnie słabiej do GluA3 i GluK3, ponad 15-krotnie słabiej do GluK2 oraz ponad 18-krotnie słabiej do GluK1. Bardziej selektywny okazał się (*S*)-**37**, którego powinowactwo do receptorów GluA2 ($K_iGluA2 = 1.74 \mu M$) było prawie 4-krotnie silniejsze niż powinowactwo do pozostałych podtypów AMPA, natomiast powinowactwo do receptorów GluK1-3 było w warunkach eksperymentu zaniedbywalne ($K_iGluK1-3 > 100 \mu M$, $K_iGluK1-3/K_iGluA2 > 57$). Znamienny jest fakt, że wszystkie aktywne fenyloalaniny (**9**, (*S*)-**37**, (*R*)-**38**) wykazały najsilniejsze powinowactwo do receptorów GluA2 i kilkukrotnie słabsze powinowactwo do innych podtypów, co wskazuje na obecność oddziaływań ligand-receptor także poza najbliższym otoczeniem liganda

¹⁷ **9** = **18e** w Publikacji **P1**, kwas 2-amino-3-(5,6-dichloro-3'-hydroksybifenyl-3-ylo)propionowy

w znanej kieszeni wiążącej. Według danych literaturowych skład aminokwasów biorących udział w oddziaływaniu z antagonistami kompetycyjnymi w kieszeni wiążącej GluA2 jest identyczny jak w przypadku GluA1.

Dla eutomerów (czynnych biologicznie enancjomerów) (S)-**37** i (R)-**38** zbadano dodatkowo ich powinowactwo do rozpuszczalnych białek rekombinowanych GluA2-S1S2J i GluK1 LBD. Zaobserwowano statystyczną zgodność powinowactwa związku (S)-**37** do białka GluA2-S1S2J i pełnego receptora GluA2. W przypadku (R)-**38** natomiast związek wykazał prawie 4-krotnie niższe powinowactwo do białka rekombinowanego w porównaniu z pełnym receptorem (Tabela 2/P5). Wyniki te sugerują, że sposoby oddziaływania obu ligandów z kieszenią wiążącą GluA2 (*binding mode*), mimo ich strukturalnego podobieństwa mogą różnić się od siebie.

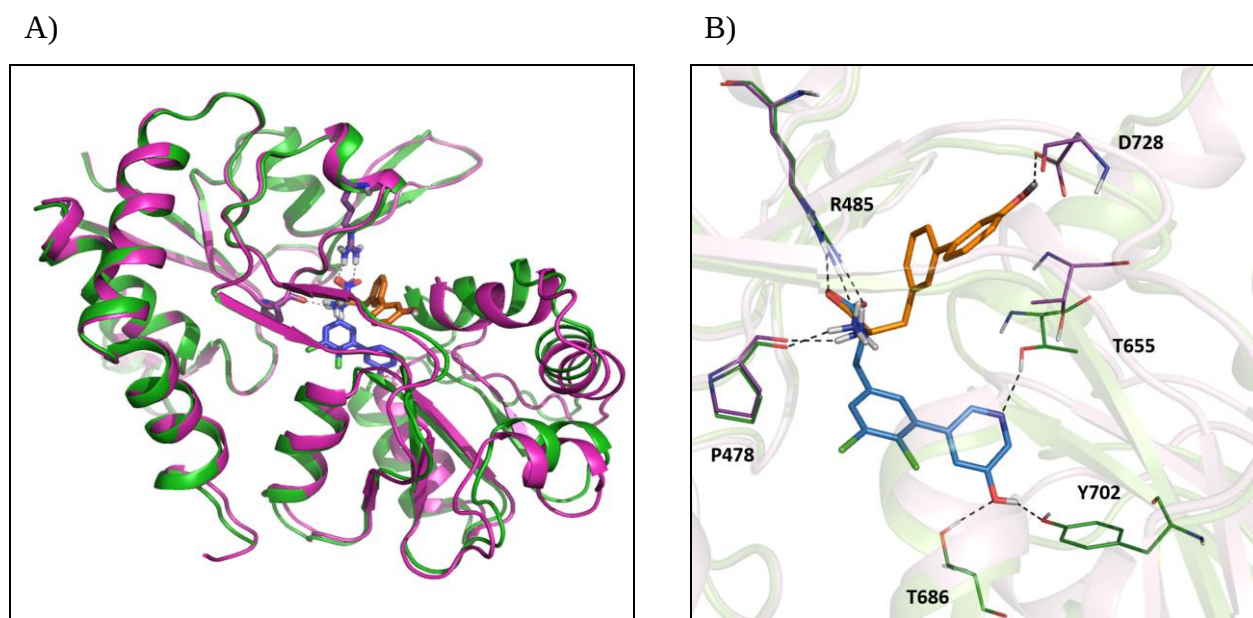
3) Wykonane badania elektrofizjologiczne z wykorzystaniem linii komórkowych z nadekspresją homomerycznych receptorów GluA2(Q)_i potwierdziły antagonistyczny profil obu ligandów (S)-**37** i (R)-**38** (Rys. 3/P5)

Wyniki badań krystalograficznych.¹⁸ Aby wyjaśnić obserwowane wyniki badań farmakologicznych dla poszczególnych izomerów związków **37** i **38** oraz ocenić sposób oddziaływania eutomerów w kieszeni wiążącej, rozwiązano struktury krystaliczne kieszeni wiążącej LBD podtypu GluA2 wraz ze związanymi związkami (S)-(+)-**37** (PDB ID: 5CBR) i (R)-(-)-**38** (PDB ID: 5CBS, Rys. 9). Stwierdzono, że oba związki wiążą się kompetycyjnie, a grupy α -aminokwasowe obu fenyloalanin, pomimo różnic w konfiguracji absolutnej, oddziałują z domeną D1 w kanoniczny sposób, obserwowany w przypadkach wszystkich α -aminokwasowych agonistów i antagonistów AMPA/KA. Ugrupowanie 3-hydroksypirydylowe w (S)-**37** przyjmuje pozycję w głębi kieszeni wiążącej, tworząc z aminokwasami domeny D2: Thr655, Thr686 i Tyr702 wiązania wodorowe, często obserwowane także w przypadku innych antagonistów kompetycyjnych (Rys. 4B/P5 i 6/P5). Odpowiednikiem Tyr702 w GluA2 jest Tyr716 w GluA1 oraz fenyloalanina w GluA3 i GluA4. Różnica ta, według źródeł literaturowych, jest w dużej mierze odpowiedzialna za selektywne powinowactwo znanych agonistów do GluA1,2 w porównaniu z GluA3,4. W przypadku związku (S)-**37**, bezpośrednio oddziałującego z Tyr702, nie zaobserwowano jednak takiej selektywności (podobnie jak w przypadku związku (S)-**3h**, publikacje **P2** i **P3**), z czego można wnioskować, że w przeciwieństwie do agonistów, u antagonistów zmiana tego konkretnego ugrupowania z tyrozyny na fenyloalaninę nie wywiera tak znaczącego wpływu na powinowactwo.

¹⁸ W publikacji **P5** zastosowano numerację GluA2 wg szczerzego podtypu, sekwencja P19491-1 bez peptydu sygnałowego

Struktura krystaliczna (*R*)-**38** w kompleksie z GluA2 ujawniła zupełnie nowy, nie obserwowany wcześniej system wiązania liganda (*binding mode*). Bifenylowy fragment związku przyjmuje pozycję nieobserwowaną do tej pory u antagonistów (ani agonistów) w znanych kompleksach krystalicznych GluA2 lub GluK1. Częsteczka liganda zorientowana jest w kierunku tzw. regionu „zawiasowego” (ang. *hinge region*), który tworzą aminokwasy: Thr480, Thr482, Leu498, Ile500, Ser654, Glu705, Asp728 i Lys730 (Rys. 4F/**P5**). Grupa fenolowa pierścienia *B* tworzy wiązanie wodorowe z Asp728 - oddziaływanie nie obserwowane wcześniej dla kompetycyjnych antagonistów (Rys. 9B).

Stopień zamknięcia kieszeni wiążącej struktury 5CBR wynosi 7.6° w stosunku do struktury *apo*. Podobnie jak w przypadku (*S*)-**3h**, wartość ta kwalifikuje się pomiędzy wartościami obserwowanymi dla antagonistów a częściowych agonistów (Tabela 2 str. 10). Związek (*R*)-**38** natomiast stabilizuje kieszeń wiążącą GluA2 w konformacji całkowicie otwartej i porównywalnej ze strukturą *apo* (0.6° - 2.3°), co odpowiada pełnemu zamknięciu kanału jonowego.¹⁹ Usytuowanie (*R*)-**38** we wnętrzu LBD powoduje steryczne oddziaływania, które zapobiegają zbliżeniu domen D1 i D2 i utworzeniu wiązania wodorowego Glu402-Thr686, charakterystycznego dla konformacji zamkniętej LBD. Pomimo więc odmiennej pozycji w kieszeni wiążącej, (*R*)-**38** działa poprzez mechanizm *foot-in-the-door*, charakterystyczny dla większości kompetycyjnych antagonistów.



Rys. 9. Porównanie struktur krystalicznych GluA2 LBD w kompleksie z (*S*)-**37** (granatowy kolor liganda, zielony kolor białka) i (*R*)-**38** (pomarańczowy kolor liganda, różowy kolor białka) (PDB ID: 5CBR i 5CBS). A) widok całej domeny LBD; B) najważniejsze oddziaływania ligandów z aminokwasami kieszeni wiążącej receptora GluA2.

¹⁹ W publikacji **P5** podano stopień otwarcia LBD, mierzony w stosunku do zamkniętej struktury GluA2 w kompleksie z glutaminianem (1FTJ, molB). W stosunku do tej struktury stopień otwarcia LBD dla struktury *apo* wynosi 21.1° [37, 42]

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych badań otrzymano i przebadano farmakologicznie serię nowych ligandów receptorów AMPA o strukturze pochodnych biaryloalaniny. Opracowano dwie struktury krystaliczne kieszeni wiążącej podjednostki GluA2 z wybranymi związkami (zdeponowane w bazie danych Protein Data Bank pod kodami 5CBR i 5CBS).

Przeprowadzone badania i analiza uzyskanych kompleksów krystalicznych przyniosły szereg cennych informacji odnośnie oddziaływania związków z grupy biaryloalanin z receptorami AMPA:

1) Eutomery (czynne biologicznie enancjomery) aminokwasów o zbliżonej strukturze mogą mieć różną konfigurację absolutną (nie można założyć, że zgodnie z danymi literaturowymi tylko S-enancjomery mogą być aktywne)

2) Odkryto nowy unikalny sposób wiązania kompetycyjnego antagonisty w kieszeni wiążącej GluA2. Nowy sposób oddziaływania liganda w GluA2 LBD może być związany z odmienną konfiguracją absolutną eutomeru. Dokładne zanalizowanie tej relacji wymaga większej ilości badań nad czystymi optycznie związkami

Obserwacje te otwierają nowy punkt widzenia na możliwe sposoby oddziaływania antagonisty w receptorze AMPA.

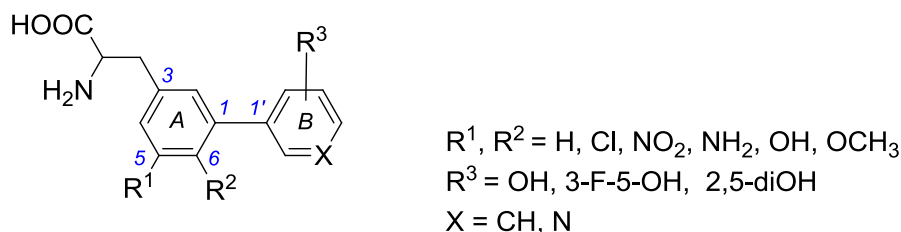
P6. E. Szymańska, B. Nielsen, T.N. Johansen, A.M. Cuñado Moral, D.S. Pickering, K. Szczepańska, A. Mickowska, K. Kieć-Kononowicz; Pharmacological characterization and binding modes of novel racemic and optically active phenylalanine-based antagonists of AMPA receptors; *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 138, 874-883. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.007.

P7. E. Szymańska, P. Chałupnik, T.N. Johansen, B. Nielsen, A.M. Cuñado Moral, D.S. Pickering, A. Więckowska, K. Kieć-Kononowicz; Aryl- and heteroaryl-substituted phenylalanines as AMPA receptor ligands; *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, in press, doi: 10.1111/cbdd.13048.

Projektowanie. Obie prace są bezpośrednią kontynuacją publikacji **P5** (gałęzi badawczej skoncentrowanej na 3'-hydroksybiarylowych pochodnych alaniny) i obejmują badania związków modyfikowanych głównie w pozycjach 5 i 6 pierścienia A fenyloalaniny.

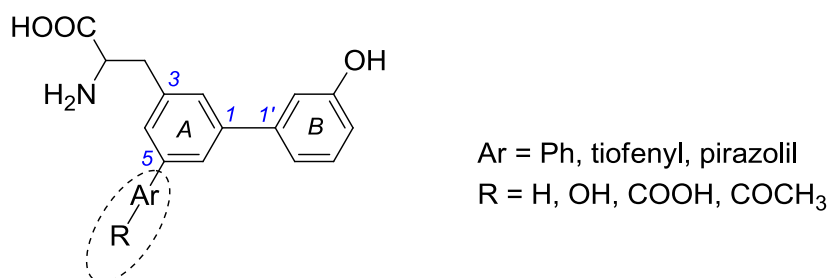
1) W pracy **P6**, analogicznie jak w przypadku publikacji **P4**, otrzymano i przebadano serię związków podstawionych w pozycjach 5 i 6 niewielkimi rozmiarowo ugrupowaniami o potencjalnych właściwościach akceptorów lub donorów wiązania wodorowego (OH, NH₂, NO₂, Cl) w różnych kombinacjach. Dla większości związków utrzymano fragment 3'- lub

4'-hydroksyfenylu jako pierścień aromatyczny B, jednak w przypadku najbardziej korzystnej kombinacji podstawników w pozycjach 5 i 6 wprowadzono kilka modyfikacji także w dodatkowym ugrupowaniu aromatycznym B. Dodatkowo, biorąc pod uwagę aktywność farmakologiczną enancjomerów analogów **37** i **38** (opisanych w publikacji **P5**), podjęto próbę analizy wpływu podstawienia w pozycjach 5 lub 6 na powinowactwo poszczególnych enancjomerów do receptorów AMPA (i prawdopodobny system wiązania do kieszeni wiążącej).



2) Praca **P7** jest oparta na modyfikacjach strukturalnych podstawnika w położeniu 5 pierścienia A fenyloalaniny przy równoczesnym braku podstawienia w pozycji 6. Porównanie różnych struktur krystalicznych kieszeni wiążącej podjednostek GluA2 i GluK1 wraz ze związanymi antagonistami wskazuje, że grupa *tert*-butylowa w ATPO, 5-metylowa w UBP310 (str. 11, 12), a także atom chloru w (*S*)-**3h** (**P2**, **P3**, Rys. 5 str. 23) i (*S*)-**37** (**P5**, Rys. 9 str. 33) zajmują w kieszeni wiążącej podobne położenie, wypełniając jedną z wnęk w powierzchni receptora. Ugrupowania te, odpowiadające w dokowaniu podstawnikowi w pozycji 5, pełnią w przypadku antagonistów kompetycyjnych ważną rolę w oddziaływaniu z receptorem. Dokładna analiza kompleksów krystalicznych, wsparta dokowaniem molekularnym, wykazała, że wspomniane zagłębienie w kieszeni wiążącej jest otwarte w głąb receptora, a otwarcie jest na tyle głębokie, aby wnęka mogła pomieścić większe ugrupowania o płaskim lub liniowym kształcie (jak np. pierścień aromatyczny 5-cio lub ew. 6-członowy, łańcuch alkilowy z wiązaniem potrójnym). Tak głęboka część LBD nie jest eksplorowana przez antagonistów w żadnej ze znanych do tej pory struktur krystalicznych kieszeni wiążącej podtypów receptorów AMPA ani kainowych.

Wychodząc z powyższego założenia, w ramach publikacji **P7** zaprojektowano serię potencjalnych ligandów receptorów AMPA, o strukturze 3'-hydroksybiphenyloalaniny, posiadających w położeniu 5 (nie)podstawiony pierścień aromatyczny, 5-cio lub 6-członowy.



Synteza. Podczas otrzymywania zaprojektowanych związków w pracach **P6** i **P7** wykorzystano zmodyfikowane metody syntetyczne, opracowane w poprzednich badaniach. Dla wybranych związków ich mieszaniny racemiczne zostały rozdzielone na poszczególne enancjomery metodą HPLC z użyciem kolumny chiralnej.

Wybrane wyniki badań farmakologicznych.

1) W testach receptorowych *in vitro* spośród badanej serii związków będącej przedmiotem publikacji **P6** pochodne 3'-fenolowe wykazały w przeważającej większości mikromolowe powinowactwo do natywnych receptorów AMPA, ze stałą K_i AMPA w zakresie 0.92-21 μ M, podczas związki z ugrupowaniem 4'-fenolowym wiązały się słabiej (K_i AMPA = 21-65 μ M, Tabela 1/**P6**). Analiza zależności pomiędzy rodzajem i położeniem podstawnika w pozycjach 5 lub 6 a powinowactwem do receptorów AMPA pokazała, że grupy polarne w położeniu 6, takie jak aminowa lub fenolowa, były tolerowane przez receptor w podobnym stopniu, jak chlor, grupa nitrowa a nawet brak podstawnika (z wyjątkiem grupy metoksyłowej, której obecność eliminowała powinowactwo do receptorów AMPA). Z drugiej strony, wprowadzenie atomu chloru w położenie 6 związków 5-podstawionych zwiększyło ich powinowactwo. Najbardziej korzystnym dla aktywności okazało się podstawienie 5-nitro-6-chloro w pierścieniu A. Otrzymano kilka związków z tej serii, różniących się ugrupowaniem aromatycznym B i zaobserwowano najwyższe powinowactwo w całej serii dla aminokwasu, w którym do pierścienia B wprowadzono dwie grupy hydroksylowe w położenia 2' i 5' (związek **5r**,²⁰ K_i AMPA = 0.92 μ M). Związek ten okazał się najbardziej aktywnym aminokwasem, otrzymanym do tej pory w całym projekcie. Obserwacja ta wydaje się zaskakująca w świetle dotychczasowych badań, w których stwierdzono, że dodatkowe grupy hydroksylowe obniżają powinowactwo do receptorów AMPA, a fragment 2'-hydroksyfenylowy jest szczególnie niekorzystny (publikacja **P5**).

2) Wśród diaryłopodstawionych pochodnych fenyloalaniny, opisanych w publikacji **P7**, przeważająca większość wiązała się do natywnych receptorów AMPA z powinowactwem porównywalnym do 5,6-niepodstawionego związku referencyjnego **3a**²¹ K_i AMPA = 9.5-28 μ M (Tabela 1/**P7**). Nie zauważono zdefiniowanej relacji pomiędzy strukturą badanych związków a ich powinowactwem, poza spostrzeżeniem, że w związkach terfenylowych (zawierających trzy nieskondensowane pierścienie benzenu w cząsteczce) grupa hydroksylowa w położeniu 2 trzeciego pierścienia (grupa 2''-fenolowa) wpływa na obniżenie siły wiązania. Najbardziej aktywną w tej serii okazała się pochodna fenyloalaniny, posiadająca jako podstawnik w położeniu

²⁰ **5r**: kwas 2-amino-3-(6-chloro-2',5'-dihydroxy-5-nitro-[1,1'-bifenyl]-3-ylo)propionowy

²¹ **3a** = **38** opisany w publikacji **P5**, kwas 2-amino-3-(3'-hydroksybifenyl-3-ylo)propionowy

5 pierścien pirazolu (**7e**,²² $K_i\text{AMPA} = 4.6 \mu\text{M}$). W badaniach powinowactwa do homomerycznych klonowanych receptorów z grupy AMPA, **7e** wykazał dwukrotnie wyższe powinowactwo do GluA2 w porównaniu z GluA3 ($K_i\text{GluA2} = 14.7 \mu\text{M}$ vs. $K_i\text{GluA3} = 38.4 \mu\text{M}$).

3) Do następnego etapu badań przesłankę stanowiło podobieństwo strukturalne oraz wyniki powinowactwa do receptorów AMPA opisane w publikacji **P5** dla związków **37** i **38**. W przypadku 5,6-dichloro podstawionego aminokwasu **37** jedynym czynnym biologicznie enancjomerem jest prawoskrętny izomer *S*, podczas gdy za aktywność 5,6-niepodstawionego związku **38** odpowiada jedynie jego lewoskrętny enancjomer *R*. Co więcej, oba związki wiążą się w odmienny sposób do kieszeni wiążącej receptora GluA2. Aby zbadać wpływ podstawienia w położeniu 5 i 6 pierścienia *A* na powinowactwo poszczególnych enancjomerów do receptorów homomerycznych GluA2 i GluA3, w pracy **P6** poddano badaniom radioreceptorowym enancjomery monopodstawionych pochodnych, zawierających atom chloru w pozycji 5 (związek **5d**²³) lub w pozycji 6 (związek **5a**²⁴). Zbadano także powinowactwo poszczególnych enancjomerów najbardziej aktywnego aminokwasu **5r**.

We wszystkich trzech przypadkach enancjomery lewoskrętne (o spodziewanej konfiguracji absolutnej *R*) wykazały wyższą siłę wiązania do receptora GluA2 od enancjomerów prawoskrętnych (o spodziewanej konfiguracji absolutnej *S*). Dla związku **5r** różnica ta jest ponad 10-krotna a stałe powinowactwa dla izomerów (+)-**5r** i (-)-**5r** wynoszą odpowiednio: $K_i\text{GluA2} = 18.4 \mu\text{M}$ i $1.71 \mu\text{M}$ (Tabela 2/**P6**). Szczególnym przypadkiem jest związek **5a**, dla którego enancjomer lewoskrętny jest w całości odpowiedzialny za powinowactwo do receptora GluA2, podczas gdy enancjomer prawoskrętny jest nieaktywny (podobnie jak w przypadku 5,6-niepodstawionego związku (*R*)-(-)-**38**). Obserwacja ta sugeruje, że w badanych przypadkach obecność podstawnika (atomu chloru) w pozycji 5 pierścienia *A* fenyloalaniny jest niezbędna do wiązania aminokwasów o konfiguracji absolutnej *S*. Stwierdzono także, że wszystkie badane enancjomery (poza (+)-**5a**) znacznie silniej wiązały się do homomerycznego receptora GluA2 w porównaniu z receptorem GluA3.

4) W ramach pracy **P6** wykonano testy elektrofizjologiczne z wykorzystaniem linii komórkowej z nadekspresją homomerycznych receptorów GluA2(Q)_i, w których potwierdzono antagonizm kompetycyjny związku (-)-**5r** wobec badanego receptora ($K_b = 2.13 \pm 0.28 \mu\text{M}$, Rys. 2/**P6**).

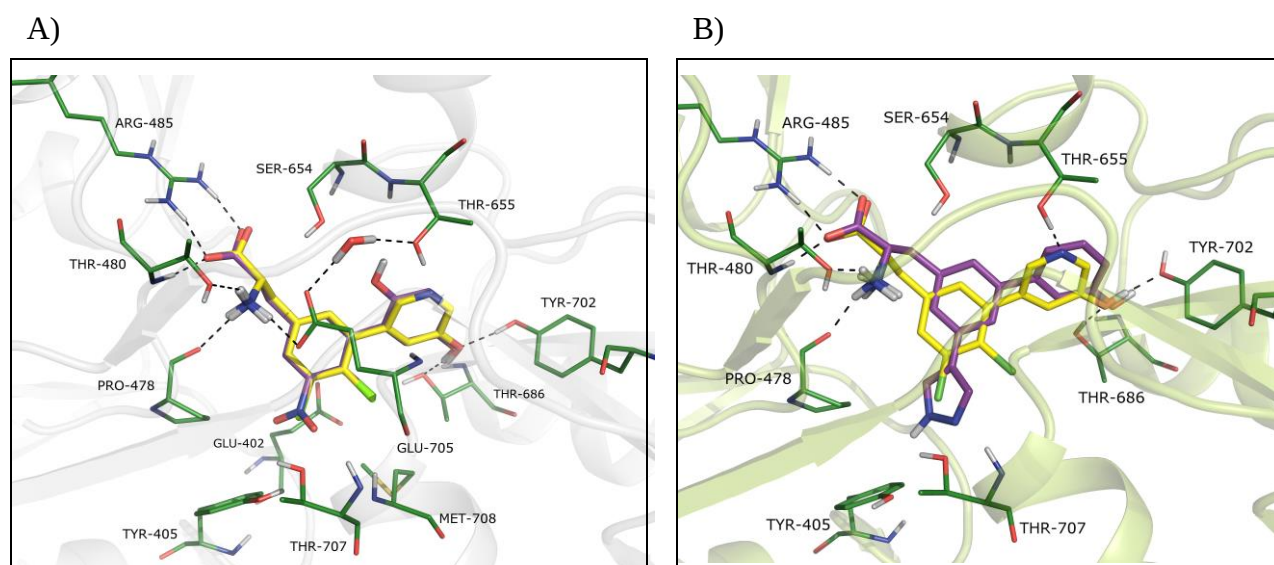
²² **7e**: kwas 2-amino-3-(3'-hydroksy-5-(1*H*-pirazol-4-ylo)-[1,1'-bifenyl]-3-ylo)propionowy

²³ **5d**: kwas 2-amino-3-(5-chloro-3'-hydroksy-[1,1'-bifenyl]-3-ylo)propionowy

²⁴ **5a**: kwas 2-amino-3-(6-chloro-3'-hydroksy-[1,1'-bifenyl]-3-ylo)propionowy

Modelowanie cząsteczkowe.²⁵ Przeprowadzone symulacje wiązania ligandów do GluA2 są znacznie utrudnione przez nieznaną konfigurację absolutnej eutomeru i docelowej pozycji struktury związku w kieszeni wiążącej. Dokowanie zostało więc przeprowadzone dla grupy enancjomerów o konfiguracji *S* i *R* wszystkich związków otrzymanych w ramach prac **P6** i **P7**. Jako cele białkowe (szablony do dokowania) w obliczeniach uwzględniono kompleksy krystaliczne 5CBR oraz 5CBS, wykrystalizowane z bifenyloalaninami (*S*)-**37** i (*R*)-**38** (opisane w publikacji **P5**) i reprezentujące dwa odmienne sposoby wiązania liganda w LBD GluA2.

1) **Dokowanie do 5CBR.** Najwyższe wyniki funkcji *Docking Score* (najlepsze dopasowanie) w przypadku dokowania do 5CBR osiągnięto dla *S*-enancjomerów związków posiadających podstawnik(i) w pozycji 5 lub 5 i 6 pierścienia aromatycznego A. W kieszeni wiążącej GluA2 konformacje tych ligandów odtwarzają system oddziaływań wykrystalizowanego antagonisty (*S*)-**37** (Rys. 10). Na Rys. 10A i 10B przedstawiono, jako przykłady, najbardziej korzystne konformacje dla związków (*S*)-**5r** (publikacja **P6**) i (*S*)-**7e** (publikacja **P7**).



Rys. 10. Wyniki dokowania związków (*S*)-**5r** (A) i (*S*)-**7e** (B) do kompleksu krystalicznego 5CBR. Kolorem fioletowym oznaczono zadokowany ligand, żółtym – wykrystalizowany ligand (*S*)-**37**, zielonym – wybrane aminokwasy kieszeni wiążącej GluA2 w 5CBR.

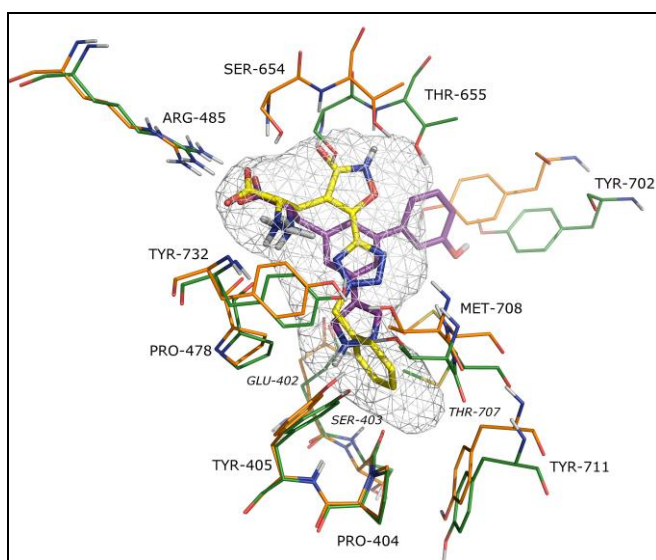
W przypadku związku (*S*)-**5r** jedna z grup fenolowych, odpowiadająca grupie 3'-fenolowej antagonisty (*S*)-**37**, tworzy wiązania wodorowe z Tyr702 i Thr686, druga zaś umiejscowiona jest w pobliżu polarnych łańcuchów bocznych aminokwasów Ser654 i Thr655 oraz cząsteczki wody, nie oddziałuje jednak z nimi poprzez wiązanie wodorowe. Brak takiego oddziaływania, obecnego w strukturze krystalicznej 5CBR pomiędzy atomem azotu w pierścieniu pirydyny liganda (*S*)-**37**

²⁵ W publikacjach **P6** i **P7** zastosowano numerację GluA2 wg szczyrzego podtypu, sekwencja P19491-1 bez peptydu sygnałowego (patrz Tabela 3, str. 14)

a Thr655, jest z pewnością jednym z czynników przyczyniających się do niższego powinowactwa związku (S)-5r do receptora GluA2 ($K_i \text{GluA2} = 18.4 \mu\text{M}$) w porównaniu z (S)-37.

Grupa nitrowa liganda (S)-5r odpowiada usytuowaniu atomu chloru w położeniu 5 antagonisty (S)-37 (Rys. 10A) i oddziałuje wiązaniami van der Waalsa i pozytywnymi siłami Coulomba z otaczającymi aminokwasami domeny D1 (Glu402, Tyr405, Tyr450, Pro478) oraz D2 (Thr707, Met708, Tyr732). Obliczone energie oddziaływań z ligandem, pochodzące od poszczególnych aminokwasów w tym miejscu receptora tworzą znaczący wkład do funkcji *Docking Score* (podobne wyniki osiągnięto dla innych bifenyloalanin, podstawionych w położeniu 5 lub 5,6). Obserwacja ta sugeruje, że związki posiadające podstawnik w położeniu 5 chętnie będą oddziaływać z receptorem w ułożeniu analogicznym do (S)-37. Z drugiej strony, w przypadku związku 5a brak podstawienia w pozycji 5 owocuje znacznym spadkiem wartości funkcji *Docking Score*, co wraz z wynikami powinowactwa enancjomerów tego aminokwasu sugeruje system oddziaływań liganda (R)-5a z receptorem GluA2 analogiczny jak w przypadku (R)-38.

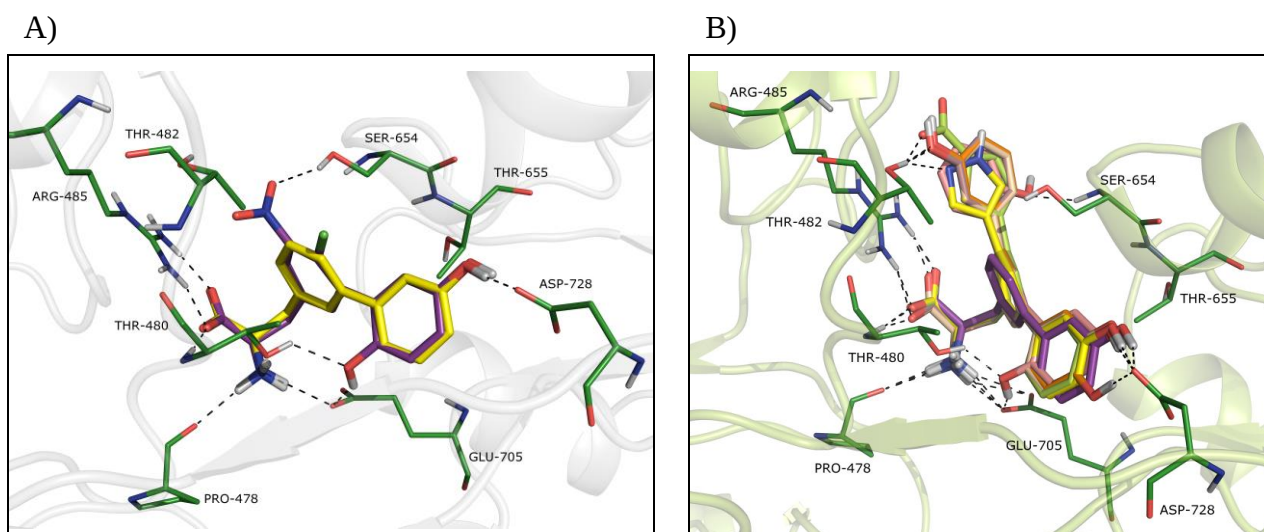
W tej samej wnęce, według wyników dokowania, umiejscowiony jest pierścień pirazolu związku (S)-7e (Rys. 10B i 11). Według danych literaturowych, w konformacji zamkniętej GluA2 LBD wnęka ta jest zdolna pomieścić grupę benzyłową – taka sytuacja została opisana dla jednego z agonistów receptorów AMPA, związku BnTetAMPA (PDB ID: 2P2A) [56]. Oddziaływanie grupy benzyłowej związku BnTetAMPA z otaczającymi niezakonserwowanymi aminokwasami wnętrza w dużym stopniu ma przyczyniać się do obserwowanej selektywności agonisty (Rys. 11).



Rys. 11. Nałożenie zadokowanej struktury związku (S)-7e wraz z szablonem 5CBR na strukturę krystaliczną GluA2 LBD ze związanym agonistą BnTetAMPA (PDB ID: 2P2A): kolorem fioletowym oznaczono zadokowany ligand (S)-7e, zielonym – wybrane aminokwasy kieszeni wiążącej GluA2 w 5CBR, żółtym – wykryształizowany ligand BnTetAMPA, pomarańczowym – wybrane aminokwasy kieszeni wiążącej GluA2 w 2P2A.

W przypadku konformacji (*S*)-**7e** uzyskanej w wyniku dokowania, pierścień pirazolu tylko częściowo zanurzony jest w opisanej wnęce kieszeni wiążącej, a jego bezpośrednie połączenie z pierścieniem fenyloalaniny w pozycji 5 nie pozwala przyjąć mu optymalnej pozycji, jaką przyjmuje u agonisty ugrupowanie fenyłu, połączone z rdzeniem cząsteczki BnTetAMPA przez mostek metylenowy. Z tego też względu ugrupowanie pirazolu nie wykorzystuje możliwości tworzenia wiązań wodorowych z formującymi wnękę aminokwasami polarnymi. W przyszłych badaniach należy więc uwzględnić wprowadzenie ugrupowania aromatycznego, połączonego z położeniem 5 pierścienia aromatycznego *A* za pomocą mostka metylenowego, azotu aminy drugorzędowej lub innego równoważnego linkera.

2) **Dokowanie do 5CBS.** W przypadku kompleksu 5CBS mamy do czynienia z kieszenią wiążącą o większej objętości w porównaniu z 5CBR (stopień otwarcia domen D1 i D2 jest porównywalny z maksymalnie otwartą strukturą *apo*). Dokowanie finalnych związków do tego szablonu pozwoliło uzyskać pozytywne wyniki dla wszystkich dokowanych ligandów z konfiguracją *R* grupy aminokwasowej, także diarylopodstawionych pochodnych fenyloalaniny zawierających w swej strukturze trzy pierścienie nieskondensowane benzenu (pochodne terfenylu) (Rys. 12).



Rys. 12. Wyniki dokowania finalnych związków do kompleksu krystalicznego 5CBS. Kolorem fioletowym oznaczono wykrystalizowany ligand (*R*)-**38**, zielonym – wybrane aminokwasy kieszeni wiążącej GluA2 w 5CBS. A) Dokowanie liganda (*R*)-**5r**; B) Dokowanie diarylo podstawionych pochodnych fenyloalaniny.

Obserwowane niskoenergetyczne konformacje zadokowanych ligandów odtwarzają sposób wiązania związku (*R*)-**38** w strukturze 5CBS, z grupą 3'- lub 4'-fenolową tworzącą wiązanie wodorowe z Asp728. W przypadku ligandów z publikacji **P7** (diarylofenyloalanin) dodatkowe ugrupowanie aromatyczne jest usytuowane blisko regionu zawiasowego między domenami D1 (Thr482) i D2 (Ser654), a w większości przypadków dla związków z tej serii zaobserwowano oddziaływanie z Thr482. Uzyskane wyniki tego dokowania nie dowiodły jednak jednoznacznej

zależności pomiędzy wartościami funkcji *Docking Score* a wynikami farmakologicznymi, nie uzasadniają także wysokiej aktywności związku **7e** (Rys. 12B).

Najwyższe wartości funkcji *Docking Score* zaobserwowano dla związku (R)-**5r**. Grupa fenolowa w położeniu 2' tego związku oddziałuje wiązaniem wodorowym z dwoma aminokwasami: Thr480 domeny D1 i Glu705 domeny D2, uniemożliwiając wytworzenie wiązania Thr480-Glu705 obserwowanego w zamkniętych strukturach agonistów (1FTJ and 1FTM). Grupa nitrowa w pozycji 5 pierścienia A fenyloalaniny pełni podobną rolę, stabilizując otwartą konformację LBD w regionie zawiasowym poprzez oddzielenie domeny D1 od D2 i oddziaływanie z ważnym aminokwasem S654 z domeny D2 (Rys. 12A). Wysoki wynik funkcji *Docking Score* dla liganda (R)-**5r** znajduje swoje odzwierciedlenie w wysokim powinowactwie tego związku do homomerycznego receptora GluA2.

Reasumując, w ramach pracy **P6**, w wyniku modyfikacji podstawienia w położeniach 5 i 6 pierścienia fenyloalaniny A oraz dodatkowej modyfikacji ugrupowania B uzyskano aminokwas, który w postaci racemicznej wykazuje najwyższe w całym projekcie powinowactwo do natywnych receptorów AMPA (**5r**). Badania aktywności poszczególnych enancjomerów dla wybranych aminokwasów wskazują, że powinowactwo pochodnych biaryloalaniny jest najczęściej wynikiem wiązania obu enancjomerów w kieszeni wiążącej receptora. Wyniki badań farmakologicznych, krystalograficznych i modelowania molekularnego, opisane w publikacjach **P5** i **P6**, sugerują, że obecność podstawnika w pozycji 5 pierścienia A oraz obecność pirydyłowego ugrupowania B determinują aktywność enancjomeru S i sposób wiązania w LBD obserwowany dla związku (S)-(+)-**37**. Z drugiej strony brak podstawnika w pozycji 5 i obecność fenolowego ugrupowania B (a w szczególności ugrupowania 2',5'-dihydroksyfenylowego) to czynniki zwiększające powinowactwo enancjomeru R i prawdopodobieństwo wiązania w sposób opisany dla związku (R)-(-)-**38**.

W pracy **P7**, w wyniku przeprowadzonych badań dowiedziono, że 3,5-diarylopo pochodne fenyloalaniny wiążą się do natywnych receptorów AMPA, ale, wbrew założeniom, w większości przypadków dodatkowe ugrupowanie aryłowe w położeniu 5 fenyloalaniny nie zwiększa powinowactwa do AMPA w stosunku do związku referencyjnego, (R)-**38**. Biorąc pod uwagę wyniki dokowania, można przypuszczać, że najbardziej aktywny związek **7e** wiąże się jako izomer S w pozycji podobnej do (S)-**37**, podczas gdy większe rozmiarowo pochodne terfenyłowe przyjmują we wnętrzu GluA2 LBD pozycję analogiczną do (R)-**38**. Nie można jednak wykluczyć możliwości oddziaływania tych związków w obu możliwych trybach, co dodatkowo utrudnia znalezienie ścisłej zależności struktura-aktywność.

3.5.3 Podsumowanie osiągnięć stanowiących obszar habilitacji

Racjonalne metody projektowania, poparte modelowaniem molekularnym i dokowaniem do dostępnych struktur krystalicznych, pozwoliły na zaplanowanie oraz przeprowadzenie syntezy kilkudziesięciu związków, będących pochodnymi fenyloalaniny, jako ligandów jonotropowych receptorów glutaminianergicznych AMPA i KA. Docelowe związki otrzymano w postaci mieszanin racemicznych lub czystych optycznie enancjomerów i poddano badaniom farmakologicznym *in vitro* w celu określenia ich powinowactwa i profilu funkcjonalnego. Należy zaznaczyć, że żaden z otrzymanych związków nie wykazał znaczącego powinowactwa do natywnych receptorów NMDA ani do homomerycznych sklonowanych receptorów podtypu GluK2. Uzyskane dane farmakologiczne zostały wzbogacone licznymi badaniami strukturalnymi, zarówno krystalograficznymi jak i obliczeniowymi, przeprowadzonymi w celu wyjaśnienia zaobserwowanych wyników oraz dogłębnej analizy sposobu oddziaływań otrzymanych ligandów z receptorem/receptorami podtypu GluA2 i/lub GluK1.

Za najważniejsze osiągnięcia i wnioski wpływające z powyższych badań można uznać:

- Opracowanie metod syntezy odpowiednich związków finalnych, ze szczególnym uwzględnieniem nowoczesnych metod metaloorganicznych
- Opracowanie zależności struktura-aktywność oraz wymogów strukturalnych ligandów wpływające na zwiększenie (selektywnego) powinowactwa do poszczególnych receptorów lub ich podtypów w grupie pochodnych 2-karboksyetylofenyloalaniny
- Rozwiązanie struktur krystalicznych kieszeni wiążącej podjednostki GluA2 oraz GluK1 wraz ze związanym antagonistą o budowie 2-karboksyetylofenyloalaniny i porównanie specyfiki oddziaływań tego liganda z oboma receptorami, co ma duże znaczenie dla dalszego projektowania związków w tej serii
- Opracowanie zależności struktura-aktywność oraz wymogów strukturalnych ligandów wpływające na zwiększenie (selektywnego) powinowactwa do poszczególnych receptorów lub ich podtypów w grupie pochodnych bifenyloalaniny. Zaprojektowanie unikalnej struktury ogólnej potencjalnych ligandów receptorów AMPA, w której grupa fenolowa spełnia rolę dodatkowej grupy kwasowej
- Obserwacja, iż, wbrew licznym doniesieniom literaturowym, enancjomery *R* antagonistów o budowie aminokwasowej mogą być odpowiedzialne lub częściowo odpowiedzialne za wiązanie do receptora
- Rozwiązanie i porównanie dwóch struktur krystalicznych kieszeni wiążącej podjednostki GluA2 wraz ze związanymi biaryloalaninami - bliskimi analogami strukturalnymi, co

pozwoiliło na odkrycie, że istnieją co najmniej dwa odmienne tryby wiązania się liganda o budowie aminokwasowej do kieszeni wiążącej GluA2

- Odkrycie unikalnego sposobu wiązania liganda z receptorem (*binding mode*) zaobserwowanego w jednej z rozwiązanych struktur krystalicznych. Taki tryb oddziaływań ligand-receptor nie był dotychczas obserwowany dla innych agonistów ani antagonistów kompetycyjnych w znanych kompleksach krystalicznych podtypów receptorów AMPA lub kainowych. Uzyskana struktura krystaliczna rzuca nowe światło na podstawy molekularne oddziaływania ligand-receptor w przypadku receptorów AMPA i KA
- Określenie niektórych wymogów strukturalnych wpływających na powinowactwo poszczególnych enancjomerów oraz na prawdopodobny sposób wiązania tych związków w kieszeni wiążącej. Obserwacje te pozwalają na dokładniejsze projektowanie struktur ligandów przy założeniu konkretnego ułożenia związku w LBD receptora

4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

4.1 Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja działalność naukowa w Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych CM UJ początkowo była związana z tematem aminokwasowych pochodnych imidazolidynonu wykazujących powinowactwo z miejscem wiążącym glicynę w receptorze NMDA czy miejscem wiążącym benzodiazepinę w receptorze GABA (publikacje **A20**, **A21**, Załącznik 6). Szybko jednak skoncentrowałam się na innym temacie badawczym, którym była synteza i aktywność przeciwgrzybicza, przeciwbakteryjna, a w szczególności przeciwgruźlicza pochodnych 5-arylidenoimidazol-4-onu.

W ramach tego tematu przeprowadziłam syntezę chemiczną kilkudziesięciu nowych związków zawierających w swej strukturze fragment 5-arylideno-3,5-dihydro-4*H*-imidazol-4-onowy oraz w pozycji 2 podstawnik tioarylo(aryloksy)alkilowy, aminowy lub hydrazydowy. W swojej pracy wykorzystałam zarówno konwencjonalne metody literaturowe jak i nowoczesne metody syntezy przy udziale mikrofal. Aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza otrzymanych związków była badana we współpracy z prof. dr hab. Andrzejem Kasprowiczem oraz dr Anną Białecką z Centrum Mikrobiologii i Autoszczepionek w Krakowie, natomiast badania *in vitro* na aktywność antymykobakteryjną zostały przeprowadzone w USA w ramach programu Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility. Uzyskane wyniki stały się podstawą do próby określenia zależności struktura-aktywność dla serii otrzymanych 5-arylidenoimidazo-4-onów.

Analizując właściwości spektroskopowe otrzymanych związków stwierdziłam, że badane pochodne mogą występować w roztworach i ciele stałym jako mieszanina możliwych tautomerów, co było zaczątkiem moich zainteresowań badaniami strukturalnymi w chemii organicznej. Szczegółowe badania struktury otrzymanych związków, izomerii E/Z i tautomerii w roztworach i w ciele stałym przeprowadziłam we współpracy z dr Wojciechem Schilfem z Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie (spektroskopia ¹⁵N-NMR) oraz z prof. dr hab. Janiną Karolak-Wojciechowską z Instytutu Chemii Ogólnej i Ekologicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej (metody krystalograficzne). Do analizy budowy opisywanych połączeń wykorzystałam także elementy modelowania molekularnego. Przeprowadziłam analizę konformacyjną wybranych związków uzyskując niskoenergetyczne konformacje przestrzenne, które następnie porównałam poprzez superpozycję ze strukturami krystalicznymi. Przeanalizowałam wielkość energetycznej bariery rotacyjnej dla wiązania pomiędzy częścią

arylidenową a imidazolową cząsteczki. Otrzymane wyniki badań strukturalnych w grupie 5-arylidenimidazo-4-onów stały się kanwą dalszej współpracy z prof. dr hab. Karolak-Wojciechowską.

Dodatkowo, dla serii zsyntetyzowanych związków oznaczyłam eksperymentalnie właściwości lipofilowe, wykorzystując metodę chromatografii cienkowarstwowej z odwróconymi fazami (RP-TLC). Uzyskane wyniki porównałam z wartościami teoretycznego współczynnika podziału, obliczonymi przy pomocy różnych programów komputerowych. Dla wybranych połączeń przeprowadzono także próbę ich trwałości w roztworach DMF i DMSO, w środowisku kwaśnym i zasadowym oraz przeanalizowano możliwe szlaki metaboliczne.

Całokształt tych prac wykonanych w latach 1998-2005 stał się przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej, którą obroniłam z wyróżnieniem na początku 2005r. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w postaci cyklu publikacji (A15-A19, A22, Załącznik 6), jednego zgłoszenia patentowego (Polska) oraz przedstawione w postaci kilku zgłoszeń zjazdowych na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Prace objęte były m.in. finansowaniem w ramach dwóch projektów KBN, w tym jednego promotorskiego i jednego własnego, w którym pełniłam rolę kierownika projektu.

4.2 Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Prawie natychmiast po uzyskaniu stopnia doktora dostałam możliwość wyjazdu na stypendium po-doktorskie w ówczesnej Royal School of Pharmacy (obecnie Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen) w stolicy Danii, Kopenhadze. Badania prowadzone na tej uczelni obejmowały m.in. syntezę chemiczną, modelowanie molekularne i uczestnictwo w badaniach radioreceptorowych *in vitro*. Brałam także udział jako prowadzący w zajęciach dydaktycznych (po angielsku). Wiodącym tematem mojej działalności naukowej były ligandy jonotropowych receptorów kwasu glutaminowego. Badania te zaowocowały dalszą współpracą po powrocie do Polski i cyklem publikacji będących przedmiotem postępowania habilitacyjnego (P1-P7).

W lutym 2008 roku podjęłam pracę w jednostce macierzystej, Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych CM UJ. Początkowo moja działalność związana była z rolą wykonawcy w grantie MNiSW i obejmowała syntezę ligandów metabotropowych receptorów kwasu glutaminowego mGluR2 i mGluR3 w grupie pochodnych hydantoiny. Następnie w 2009 roku, wraz z otrzymaniem dofinansowania w ramach projektu MNiSW, rozpoczęłam kontynuację tematu badawczego rozpoczętego na Uniwersytecie w Kopenhadze we współpracy z duńskim zespołem naukowym.

Równolegle do głównego nurtu moich zainteresowań, w pracach badawczych częściowo powróciłam do zagadnień związanych z aktywnością farmakologiczną i właściwościami pochodnych imidazol-4-onu. Nawiązana poprzednio współpraca z prof. dr hab. Karolak-Wojciechowską zaowocowała ponownie wspólnymi badaniami z zakresu badań strukturalnych, co znalazło odzwierciedlenie w dwóch kolejnych publikacjach (**A13** i **A14**, Załącznik 6). Dzięki współpracy z ukraińskim zespołem prof. Romana Lesyka z Uniwersytetu we Lwowie, otrzymane w ramach pracy doktorskiej związki zostały dodatkowo zbadane *in vitro* w kierunku aktywności przeciwnowotworowej z wykorzystaniem panelu 60 rodzajów linii komórkowych reprezentujących modele zachorowań nowotworowych. Większość związków wykazała aktywność w stężeniach mikro- i submikromolowych w jednym lub kilku modelach: białaczki, czerniaka, nowotworów płuc, nerek, jelita grubego, jajnika, prostaty, piersi lub nowotworu mózgu. Wyniki tych badań zostały porównane z wynikami uzyskanymi dla analogicznych tiazolidynonów i zaprezentowane we wspólnej publikacji (**A12**).

W latach 2009-2013 wzięłam udział w kilku projektach, będących owocem współpracy Katedry oraz grupy badawczej z Uniwersytetu Śródziemnomorskiego w Marsylii (Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Aix-Marseille University) zajmującym się tematyką lekooporności bakteryjnej pod przewodnictwem prof. Jean Marie Pagésa. W ramach tych projektów zajmowałam się projektowaniem, syntezą i modelowaniem molekularnym związków o budowie opartej na strukturze hydantoiny, o potencjalnym działaniu hamującym białkowe pompy wyrzutu leków, tzw. EPIs (ang. *efflux pumps inhibitors*). Przedmiotem badań były wybrane pochodne 5,5-difenylohydantoiny lub 5-metylo-5-naftylohydantoiny, zawierające w położeniu 1 lub w położeniu 3 pierścienia hydantoiny podstawnik alkiloaminowy lub zabudowaną grupę guanidynową. Badania były wykonywane w jednostce macierzystej oraz na Uniwersytecie Śródziemnomorskim w Marsylii podczas kilku wyjazdów o charakterze naukowym (m.in. krótkie stypendium naukowe *Short-Term Scientific Mission* w ramach programu COST Action BM0701), a ich wyniki zostały opublikowane w kilku pozycjach o zasięgu międzynarodowym i wysokim wskaźniku Impact Factor (**A3**, **A4**, **A8**, **A11**, Załącznik 6).

Jednym z moich głównych zainteresowań po doktoracie stało się zastosowanie technik modelowania molekularnego i dokowania w dziedzinie chemii medycznej, zarówno do analizy zależności struktura-aktywność jak i do projektowania nowych związków biologicznie czynnych. Dzięki nabytemu w Kopenhadze doświadczeniu, moja umiejętność wykorzystania tych metod znalazła uznanie współpracowników (publikacje **A5**, **A7-A10**, Załącznik 6), a także jest

przedmiotem części zajęć fakultatywnych dla studentów IV roku farmacji „Modelowanie w racjonalnym projektowaniu leków”.

W ostatnich latach moja działalność naukowa, poza głównym nurtem badawczym, skupiła się na tematyce receptorów adenozynowych, prowadzonej w ramach projektu „Poszukiwanie nowych ligandów receptorów adenozynowych o właściwościach lekopodobnych” (projekt NCN Harmonia, kierownik: prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz, publikacje **A2**, **A6**, **A7**, Załącznik 6). Receptory adenozynowe A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ należą do rodziny receptorów purynowych, metabotropowych, a miejsce wiązania agonistów i kompetycyjnych antagonistów mieści się pomiędzy domenami transbłonowymi w pobliżu regionu zewnątrzkomórkowego receptora. Początkowo mój wkład w pracę badawczą w tej tematyce polegał na zadokowaniu obszernej serii trójcyklicznych pochodnych 2,6-purynodionu do szablonu struktury krystalicznej A_{2A}. Na podstawie uzyskanych wyników zanalizowano główne oddziaływania odpowiedzialne za wiązanie ligandów oraz zasugerowano wymogi strukturalne wpływające na powinowactwo związków do receptora. Rezultaty obszernych badań zostały zaprezentowane na kilku międzynarodowych konferencjach, a część z nich została także opublikowana (publikacja **A7**).

Trudność modelowania receptorów adenozynowych wiąże się w dużej mierze z silnymi oddziaływaniami ligandów/antagonistów z pętlami zewnątrzkomórkowymi (w szczególności z tzw. EC2, środkową pętlą zewnątrzkomórkową). O ile region transmembranowy jest w wysokim stopniu konserwatywny, szczególnie w obrębie A₁, A_{2A}, A_{2B}, o tyle zarówno skład, jak i długość pętli pomiędzy poszczególnymi podtypami receptorów różnią się w dużym stopniu. Obecnie dostępne są kompleksy krystaliczne tylko dla ludzkiego receptora A_{2A}, wykryzalizowane z ligandami o różnym profilu funkcjonalnym oraz liczne modele homologiczne pozostałych podtypów. Niestety, podczas gdy modele homologiczne zwykle dość dokładnie odzwierciedlają region transbłonowy, to pętle są trudne do wymodelowania ze względu na ich fleksyjne ułożenie (niestabilizowane strukturami trzeciorzędowymi typu α -helisa lub β -wstęga). Co więcej, wyniki badań farmakologicznych wskazują, że te same związki wykazują różne powinowactwo dla tych samych podtypów receptorów w zależności od ich pochodzenia gatunkowego (np. do ludzkiego lub szczurzego receptora A_{2A}). W kolejnej pracy podjęłam się zanalizowania różnic w składzie kieszeni wiążącej dla ludzkich i szczurzych receptorów A₁ i A_{2A} oraz wpływu tych różnic na selektywność gatunkową w obrębie tego samego podtypu i na selektywność pomiędzy podtypami tego samego gatunku.

W pracy wykorzystałam metody budowania i doskonalenia modeli homologicznych oraz dokowania fleksyjnego (*induced fit docking*) oraz sztywnego. Dokowanie zostało przeprowadzone dla kolejnej serii trójcyklicznych pochodnych 2,6-purynodionu, zsyntetyzowanych wcześniej

w naszej Katedrze i przebadanych *in vitro* w kierunku powinowactwa do ludzkich i szczurzych receptorów A₁-A₃ we współpracy z prof. Christą Müller z Instytutu Farmaceutycznego Uniwersytetu w Bonn. Na podstawie uzyskanych wyników zanalizowano główne oddziaływania odpowiedzialne za obserwowane różnice w powinowactwie związków. Wnioski te zostały opisane w publikacji A2.

Ostatnio nawiązałam także współpracę z prof. Bassemem Sadkiem z College of Medicine and Health Sciences, United Arab Emirates University. Nasze wspólne badania skupiają się na aktywności przeciwdrgawkowej pochodnych fenyloalaniny, a część wyników została ostatnio opublikowana (publikacja A1, Załącznik 6).

4.3 Podsumowanie działalności naukowo-badawczej

Mój dorobek naukowy obejmuje w obecnej chwili 30 publikacji, których jestem autorem lub współautorem, w tym 28 publikacji oryginalnych (wszystkie w czasopismach posiadających Impact Factor), jedna publikacja przeglądowa oraz jedna praca popularnonaukowa (w języku duńskim). Łączny współczynnik **Impact Factor** tych pozycji wynosi **70,337**, w tym dla publikacji oryginalnych **69,61**. **Indeks Hirscha** tych prac wynosi **10**, a liczba cytowań **331**.

Realizacja moich szerokich zainteresowań naukowo-badawczych była możliwa dzięki licznym projektom i grantom (KBN, MNiSW, NCN), w których byłam kierownikiem (3 projekty) lub wykonawcą oraz dzięki dofinansowaniu ze środków MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego (tzw. badania własne i statutowe). Moje badania prowadzone są we współpracy z wieloma ośrodkami krajowymi i zagranicznymi, między innymi z naukowcami z Danii, Francji, Niemiec i Ukrainy. Oprócz tego brałam udział w programach międzynarodowych i związanych z nimi projektach międzynarodowych niewspółfinansowanych. Jestem też kierownikiem badań finansowanych z dotacji podmiotowej MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego.

Szczegółowe informacje na temat mojej współpracy, staży, projektów i nagród są przedstawione w załączonym „Wykazie opublikowanych prac naukowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej, odbytych stażach i działalności popularyzującej naukę” (ZAŁĄCZNIK 6).

Ewa Szymańska

5. LITERATURA

- [1] R.G.M. Morris, W. Oertel, W. Gaebel, G.G. M., A. Little, P. Montellano, M. Westphal, D.J. Nutt, M. Di Luca: Consensus Statement on European Brain Research: the need to expand brain research in Europe – 2015, *Eur. J. Neurosci.* (2016) **44**, 1919–1926.
- [2] A.C. Foster, J.A. Kemp: Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics, *Curr. Opin. Pharmacol.* (2006) **6**, 7-17.
- [3] U. Madsen, H. Bräuner-Osborne, J.R. Greenwood, T.N. Johansen, P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors, M. Nielsen, B. Frølund, GABA and glutamate receptors ligands and their therapeutic potential in CNS disorders, in: S.C. Gad (Ed.) *Drug Discovery Handbook*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005, pp. 797-868.
- [4] Á. Chamorro, U. Dirnagl, X. Urra, A.M. Planas: Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation, *Lancet Neurol.* (2016) **15**, 869-881.
- [5] J. Vetulani: Neurotoksyczność glutaminianu, *Neurol. Prakt.* (2014) **4**.
- [6] J. Ślawek: Kliniczne znaczenie blokowania receptora NMDA, *Pol. Prz. Neurol.* (2013) **9**.
- [7] P.K.-Y. Chang, D. Verbich, R.A. McKinney: AMPA receptors as drug targets in neurological disease - advantages, caveats, and future outlook, *Eur. J. Neurosci.* (2012) **35**, 1908-1916.
- [8] M.A. Rogawski: Revisiting AMPA receptors as an antiepileptic drug target, *Epilepsy Curr.* (2011) **11**, 56-63.
- [9] G.T. Swanson: Targeting AMPA and kainate receptors in neurological disease: therapies on the horizon?, *Neuropsychopharmacol. Rev.* (2009) **34**, 249-250.
- [10] K.A. Johnson, P.J. Conn, N.C. M.: Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* (2009) **8**, 475-491.
- [11] D. Bowie: Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* (2008) **7**, 129-143.
- [12] D. Bleakman, A. Alt, J.M. Witkin: AMPA receptors in the therapeutic management of depression, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* (2007) **6**, 117-126.
- [13] D. Bleakman, A. Alt, E.S. Nisenbaum: Glutamate receptors and pain, *Semin. Cell Dev. Biol.* (2006) **17**, 592-604.
- [14] D. Lemoine, R. Jiang, A. Taly, T. Chataigneau, A. Specht, T. Grutter: Ligand-gated ion channels: new insights into neurological disorders and ligand recognition, *Chem. Rev.* (2012) **112**, 6285-6318.
- [15] S.F. Traynelis, L.P. Wollmuth, C.J. McBain, F.S. Menniti, K.M. Vance, K.K. Ogden, K.B. Hansen, H. Yuan, S.J. Myers, R. Dingledine: Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function, *Pharmacol. Rev.* (2010) **62**, 405-496.
- [16] E. Russo, R. Gitto, R. Citraro, A. Chimirri, G. De Sarro: New AMPA antagonists in epilepsy, *Expert Opin. Investig. Drugs* (2012) **21**, 1371-1389.
- [17] M. Mula: Emerging drugs for focal epilepsy, *Expert Opin. Emerg. Drugs* (2013) **18**, 87-95.
- [18] S.D. Spritzer, T.P. Bravo, J.F. Drazkowski: Topiramate for treatment in patients with migraine and epilepsy, *Headache* (2016) **56**, 1081-1085.
- [19] www.clinicaltrials.gov.
- [20] A. Nilsen, P.M. England: A subtype-selective, use-dependent inhibitor of native AMPA receptors, *J. Am. Chem. Soc.* (2007) **129**, 4902-4903.
- [21] U. Pentikainen, L. Settimo, M.S. Johnson, O.T. Pentikainen: Subtype selectivity and flexibility of ionotropic glutamate receptors upon antagonist ligand binding, *Org. Biomol. Chem.* (2006) **4**, 1058-1070.
- [22] J. Valgeirsson, D. Peters, U. Madsen, E.Ø. Nielsen: New class of iGluR5 selective glutamate antagonists., *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* (2003) **225**, U208-U208.
- [23] M.D. Black: Therapeutic potential of positive AMPA modulators and their relationship to AMPA receptor subunits. A review of preclinical data, *Psychopharmacology (Berl.)* (2005) **179**, 154-163.
- [24] G.L. Collingridge, R.W. Olsen, J. Peters, M. Spedding: A nomenclature for ligand-gated ion channels, *Neuropharmacology* (2009) **56**, 2-5.
- [25] P. Stawski, H. Janovjak, D. Trauner: Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective, *Bioorg. Med. Chem.* (2010) **18**, 7759-7772.
- [26] H. Lomeli, J. Mosbacher, T. Melcher, T. Hoyer, J.R. Geiger, T. Kuner, H. Monyer, M. Higuchi, A. Bach, P.H. Seeburg: Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing, *Science* (1994) **266**, 1709-1713.
- [27] C.L. Palmer, L. Cotton, J.M. Henley: The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors, *Pharmacol. Rev.* (2005) **57**, 253-277.
- [28] R.I. Hume, R. Dingledine, S.F. Heinemann: Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability, *Science* (1991) **253**, 1028-1031.
- [29] J. Boulter, B. Bettler, R. Dingledine, J. Edgebjerg, M. Hartley, I. Hermans-Borgmeyer, M. Hollmann, R.I. Hume, S. Rogers, S. Heinemann: Molecular biology of the glutamate receptors, *Clin. Neuropharmacol.* (1992) **15 Suppl 1 Pt A**, 60A-61A.
- [30] A.I. Sobolevsky, M.P. Rosconi, E. Gouaux: X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor, *Nature* (2009) **462**, 745-756.

- [31] J.N. Kew, J.A. Kemp: Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology, *Psychopharmacology (Berl.)* (2005) **179**, 4-29.
- [32] A. Alt, B. Weiss, A.M. Ogden, J.L. Knauss, J. Oler, K. Ho, T.H. Large, D. Bleakman: Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro, *Neuropharmacology* (2004) **46**, 793-806.
- [33] D. Perrais, J. Veran, C. Mulle: Gating and permeation of kainate receptors: differences unveiled, *Trends Pharmacol. Sci.* (2010) **31**, 516-522.
- [34] J. Lerma, J.M. Marques: Kainate receptors in health and disease, *Neuron* (2013) **80**, 292-311.
- [35] D.A. Jane, D. Lodge, G.L. Collingridge: Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential, *Neuropharmacology* (2009) **56**, 90-113.
- [36] P. Vincent, C. Mulle: Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity, *Neuroscience* (2009) **158**, 309-323.
- [37] N. Armstrong, E. Gouaux: Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core, *Neuron* (2000) **28**, 165-181.
- [38] A.H. Ahmed, Q. Wang, H. Sondermann, R.E. Oswald: Structure of the S1S2 glutamate binding domain of GluR3, *Proteins* (2009) **75**, 628-637.
- [39] C. Kasper, K. Frydenvang, P. Naur, M. Gajhede, D.S. Pickering, J.S. Kastrup: Molecular mechanism of agonist recognition by the ligand-binding core of the ionotropic glutamate receptor 4, *FEBS Lett.* (2008) **582**, 4089-4094.
- [40] P. Naur, B. Vestergaard, L.K. Skov, J. Egebjerg, M. Gajhede, J.S. Kastrup: Crystal structure of the kainate receptor GluR5 ligand-binding core in complex with (S)-glutamate, *FEBS Lett.* (2005) **579**, 1154-1160.
- [41] M.L. Mayer: Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: Molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity, *Neuron* **45**, 539-552.
- [42] J. Pøhlsgaard, K. Frydenvang, U. Madsen, J.S. Kastrup: Lessons from more than 80 structures of the GluA2 ligand-binding domain in complex with agonists, antagonists and allosteric modulators, *Neuropharmacology* (2011) **60**, 135-150.
- [43] S. Møllerud, K. Frydenvang, D.S. Pickering, J.S. Kastrup: Lessons from crystal structures of kainate receptors, *Neuropharmacology* (2017) **112**, 16-28.
- [44] C. Rosenmund, M. Mansour: Ion channels: How to be desensitized, *Nature* (2002) **417**, 238-239.
- [45] D. Catarzi, V. Colotta, F. Varano: Competitive AMPA receptor antagonists, *Med. Res. Rev.* (2007) **27**, 239-278.
- [46] U. Madsen, F.A. Slok, T.B. Stensbøl, H. Bräuner-Osborne, H.H. Lutzhoft, M.V. Poulsen, L. Eriksen, P. Krogsgaard-Larsen: Ionotropic excitatory amino acid receptor ligands. Synthesis and pharmacology of a new amino acid AMPA antagonist, *Eur. J. Med. Chem.* (2000) **35**, 69-76.
- [47] E.H. Møller, J. Egebjerg, L. Brehm, T.B. Stensbøl, T.N. Johansen, U. Madsen, P. Krogsgaard-Larsen: Resolution, absolute stereochemistry, and enantiopharmacology of the GluR1-4 and GluR5 antagonist 2-amino-3-[5-tert-butyl-3-(phosphonomethoxy)-4-isoxazolyl]propionic acid, *Chirality* (1999) **11**, 752-759.
- [48] D.K. Patneau, M.L. Mayer, D.E. Jane, J.C. Watkins: Activation and desensitization of AMPA/kainate receptors by novel derivatives of willardiine, *J. Neurosci.* (1992) **12**, 595-606.
- [49] A. Hogner, J.R. Greenwood, T. Liljefors, M.L. Lunn, J. Egebjerg, I.K. Larsen, E. Gouaux, J.S. Kastrup: Competitive antagonism of AMPA receptors by ligands of different classes: crystal structure of ATPO bound to the GluR2 ligand-binding core, in comparison with DNQX, *J. Med. Chem.* (2003) **46**, 214-221.
- [50] H. Hald, P. Naur, D.S. Pickering, D. Sprogøe, U. Madsen, D.B. Timmermann, P.K. Ahring, T. Liljefors, A. Schousboe, J. Egebjerg, M. Gajhede, J.S. Kastrup: Partial agonism and antagonism of the ionotropic glutamate receptor iGluR5: structures of the ligand-binding core in complex with domoic acid and 2-amino-3-[5-tert-butyl-3-(phosphonomethoxy)-4-isoxazolyl]propionic acid, *J. Biol. Chem.* (2007) **282**, 25726-25736.
- [51] M.L. Mayer, A. Ghosal, N.P. Dolman, D.E. Jane: Crystal structures of the kainate receptor GluR5 ligand binding core dimer with novel GluR5-selective antagonists, *J. Neurosci.* (2006) **26**, 2852-2861.
- [52] G.S. Hamilton. Omega-[2-(alkyl)phenyl]-2-aminoalkanoic acids as antagonists of excitatory amino acids receptors. USA Patent US 5364876 (A), Nov 15, 1994.
- [53] G.S. Hamilton, Z. Huang, R.J. Patch, M.E. Guzewska, R.L. Elliott, S.A. Borosky, D.L. Bednar, J.W. Ferkany, E.W. Karbon: Phosphonoethylphenylalanine derivatives as novel antagonists of non-NMDA ionotropic glutamate receptors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1992) **2**, 1269-1274.
- [54] N.P. Dolman, J.C. More, A. Alt, J.L. Knauss, O.T. Pentikainen, C.R. Glasser, D. Bleakman, M.L. Mayer, G.L. Collingridge, D.E. Jane: Synthesis and pharmacological characterization of N3-substituted willardiine derivatives: role of the substituent at the 5-position of the uracil ring in the development of highly potent and selective GLUK5 kainate receptor antagonists, *J. Med. Chem.* (2007) **50**, 1558-1570.
- [55] N. Sköld, B. Nielsen, J. Olsen, L. Han, L. Olsen, U. Madsen, J.L. Kristensen, D.S. Pickering, T.N. Johansen: Design, synthesis and in vitro pharmacology of GluK1 and GluK3 antagonists. Studies towards the design of subtype-selective antagonists through 2-carboxyethyl-phenylalanines with substituents interacting with non-conserved residues in the GluK binding sites, *Bioorg. Med. Chem.* (2014) **22**, 5368-5377.
- [56] S.B. Vogensen, K. Frydenvang, J.R. Greenwood, G. Postorino, B. Nielsen, D.S. Pickering, B. Ebert, U. Bolcho, J. Egebjerg, M. Gajhede, J.S. Kastrup, T.N. Johansen, R.P. Clausen, P. Krogsgaard-Larsen: A tetrazolyl-substituted subtype-selective AMPA receptor agonist, *J. Med. Chem.* (2007) **50**, 2408-2414.

