



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM

AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

ANNA WIĘCKOWSKA

ZAKŁAD FIZYKOCHEMICZNEJ ANALIZY LEKU

KATEDRA CHEMII FARMACEUTYCZNEJ

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

KRAKÓW 2018

Spis treści

1. Imię i nazwisko	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	2
4. Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę habilitacji.....	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	3
4.3. Omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
4.3.1. Wprowadzenie – choroba Alzheimera i cele biologiczne istotne z punktu widzenia jej terapii	5
4.3.2. Cel i metody realizacji badań	7
4.3.3. Omówienie badań stanowiących osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym	9
4.3.4. Podsumowanie osiągnięć naukowych stanowiących podstawę habilitacji	22
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	23
5.1. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora	23
5.2. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	29
6. Piśmiennictwo	32

1. Imię i nazwisko

Anna Więckowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Stopień doktora nauk farmaceutycznych - 2008

Rozprawa doktorska: *Nowe inhibitory cholinoesteraz z ugrupowaniami karbamoiloksyfenyłowymi i N-benzylopiperydynowymi.*

Promotor: prof. dr hab. Barbara Malawska

Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum.

Magister farmacji - 2003

Praca magisterska: *Synteza karbaminianowych pochodnych N-benzyloamidów kwasu α -(N-fenylpiperazyno)- γ -hydroksymastłowego o spodziewanym działaniu hamującym acetylocholinoesterazę.*

Promotor: prof. dr hab. Barbara Malawska

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2009–	Adiunkt Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum
2011–2012	Pobyt naukowo-badawczy na stanowisku postdoctoral fellow Division of Endocrinology, Faculty of Medicine, university of Sherbrooke, Kanada
2009–2011	Pobyt naukowo-badawczy na stanowisku postdoctoral fellow Department of Medicinal Chemistry, Organic Pharmaceutical Chemistry, Uppsala University, Szwecja
2007–2009	Asystent na stanowisku naukowo-dydaktycznym Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum

4. Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę habilitacji

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

NOWE LIGANDY WIELOFUNKCYJNE O POTENCJALNYM ZASTOSOWANIU W TERAPII CHOROBY ALZHEIMERA

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

H1 – Guzior, N.; **Więckowska, A.**; Panek, D.; Malawska, B. Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 2015, 22, 373-404.

IF 3.455; KBN/MNiSW 40

H2 – **Więckowska, A.**; Więckowski, K.; Bajda, M.; Brus, B.; Sałat, K.; Czerwińska, P.; Gobec, S.; Filipek, B.; Malawska, B. Synthesis of new *N*-benzylpiperidine derivatives as cholinesterase inhibitors with β -amyloid anti-aggregation properties and beneficial effects on memory *in vivo*. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 2445-2457.

IF 2.923; KBN/MNiSW 30

H3 – Panek, D.¹; **Więckowska, A.**¹; Wichur, T.; Bajda, M.; Godyń, J.; Jończyk, J.; Mika, K.; Janockova, J.; Soukup, O.; Knez, D.; Korabecny, J.; Gobec, S.; Malawska, B. Design, synthesis and biological evaluation of new phthalimide and saccharin derivatives with alicyclic amines targeting cholinesterases, beta-secretase and amyloid beta aggregation. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 125, 676–695.

IF 4.519; KBN/MNiSW 40

H4 – Panek, D.¹; **Więckowska, A.**¹; Pasięka, A.; Godyń, J.; Jończyk, J.; Bajda, M.; Knez, D.; Gobec, S.; Malawska, B. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 2-(Benzylamino-2-Hydroxyalkyl)Isoindoline-1,3-Diones Derivatives as Potential Disease-Modifying Multifunctional Anti-Alzheimer Agents. *Molecules.* 2018, 23, E347.

IF 2.861; KBN/MNiSW 30

¹ Autorzy byli w równym stopniu zaangażowani w powstanie tych publikacji. Publikacje te wchodziły w zakres pracy doktorskiej dr Dawida Panka, której byłam promotorem pomocniczym.

H5 – Panek, D.¹; **Więckowska, A.**¹; Jończyk, J.; Godyń, J.; Bajda, M.; Wichur, T.; Pasieka, A.; Knez, D.; Pislar, A.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Sepsova, V.; Sabate, R.; Kos, J.; Gobec, S.; Malawska, B. Design, synthesis and biological evaluation of 1-benzylamino-2-hydroxyalkyl derivatives as new potential disease-modifying multifunctional anti-Alzheimer's agents. *ACS Chem. Neurosci.* 2018, 9, 1074-1094.

IF 3.883; KBN/MNiSW 40

H6 – **Więckowska, A.**², Kończkowski, M.; Bucki, A.; Godyń, J.; Marcinkowska, M.; Więckowski, K.; Zaręba, P.; Siwek, A.; Kazek, G.; Głuch-Lutwin, M.; Mierzejewski, P.; Bienkowski, P.; Sienkiewicz-Jarosz, H.; Knez, D.; Wichur, T.; Gobec, S.; Malawska, B. Novel multi-target-directed ligands for Alzheimer's disease: combining cholinesterase inhibitors and 5-HT6 receptor antagonists. Design, synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 124, 63–81.

IF 4.519; KBN/MNiSW 40

H7 – **Więckowska, A.**²; Wichur, T.; Godyń, J.; Bucki, A.; Marcinkowska, M.; Siwek, A.; Więckowski, K.; Zaręba, P.; Knez, D.; Głuch-Lutwin, M.; Kazek, G.; Latacz, G.; Mika, K.; Kończkowski, M.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Benkova, M.; Kiec-Kononowicz, K.J.; Gobec, S.; Malawska, B. Novel multi-target-directed ligands aiming at symptoms and causes of Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* 2018, 9, 1195-1214.

IF 3.883; KBN/MNiSW 40

² Autor korespondujący

4.3. Omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Wprowadzenie – choroba Alzheimera i cele biologiczne istotne z punktu widzenia jej terapii

Choroba Alzheimera (Alzheimer's disease, AD) jest najczęstszą formą demencji. Szacuje się, że na świecie liczba osób cierpiących z powodu demencji wynosi około 47 milionów, a w 2050 roku chorych może być aż 131 milionów. Rosnąca liczba chorych i brak skutecznej terapii powodują, że AD należy do poważnych problemów społecznych, medycznych i ekonomicznych. Według Światowej Organizacji Zdrowia badania nad nowymi rozwiązaniami terapeutycznymi dotyczącymi demencji powinny należeć do priorytetowych.¹

Choroba Alzheimera jest chorobą neurodegeneracyjną o złożonym, nie do końca poznanym patomechanizmie. Do jej charakterystycznych cech należą m.in. zaburzenia pamięci, problemy z wystawianiem się czy orientacją w czasie i przestrzeni. U większości pacjentów występują również behawioralne i psychologiczne objawy demencji (behavioural and psychological symptoms of dementia, BPSD), takie jak psychozy, zaburzenia depresyjne, pobudzenie czy stany lękowe.²⁻⁴

Powiązanie obserwowanych w przebiegu AD zaburzeń pamięci ze zmianami neurodegeneracyjnymi obejmującymi głównie neurony cholinergiczne znajdujące się w częściach mózgu odpowiedzialnych za procesy poznawcze i zachowanie (hipokamp, kora nowa i ciało migdałowate) doprowadziło do powstania teorii cholinergicznej AD.⁵ W konsekwencji poszukiwania leków zostały skierowane na związki nasilające transmisję cholinergiczną i doprowadziły do wprowadzenia na rynek inhibitorów enzymów hydrolizujących acetylocholinę (ACh): acetylocholinoesterazy (AChE) lub/i butyrylocholinoesterazy (BuChE). Takryna (1993), donepezil (1996), riwastygmina (2000) i galantamina (2001) podnoszą poziom acetylochliny w synapsach cholinergicznym i nasilają transmisję cholinergiczną, co przekłada się na krótkotrwałą poprawę funkcji poznawczych u pacjentów w umiarkowanym stadium choroby Alzheimera.^{6,7} W 2002 roku do terapii choroby Alzheimera wprowadzono memantynę, związek będący niekompetycyjnym antagonistą receptorów NMDA, który zapobiega skutkom nadmiernego pobudzenia glutaminianem.⁸ Memantyna jest stosowana w terapii łączonej z inhibitorami cholinoesteraz i podobnie jak one same ma krótkotrwałe i jedynie objawowe działanie.

Równoległe z poszukiwaniem leków nasilających przeżywalność cholinergiczną, prowadzono dalsze badania nad patomechanizmem choroby. Lata 80. przyniosły szereg istotnych informacji dotyczących dwóch głównych zmian morfologicznych występujących w mózgu chorych na AD: złogów białka β -amyloidu (β A, tzw. blaszek amyloidowych) oraz splątków neurofibrylarnych tworzonych przez fosforylowane białko tau. Doprowadziły one w 1991 roku do powstania amyloidowej teorii choroby Alzheimera,⁹ która jako pierwotną przyczynę choroby wskazywała zaburzenia w metabolizmie białka prekursorowego β -amyloidu i w następstwie odkładanie się blaszek amyloidowych w mózgu. Dzisiaj nadal nie ma pewności co do pierwotnej przyczyny choroby Alzheimera, ale z pewnością zarówno blaszki amyloidowe, jak i splątki neurofibrylarnie odgrywają kluczową rolę w patomechanizmie choroby.¹⁰ Stąd rozmaite strategie mające na celu

zahamowanie agregacji tych białek wysuwają się na czoło w poszukiwaniach skutecznej terapii AD. W II, II/III i III fazie badań klinicznych znajduje się obecnie 78 związków badanych pod kątem terapii choroby Alzheimera (dane na dzień 23.05.2018 według bazy Alzforum).¹¹ Spośród nich wymienić można 29 związków o mechanizmie związanym z β amyloidem, 6 związków celujących w białko tau i 12 związków wpływających na neuroprzebieżność inne niż cholinergiczne, w tym SUVN-502 – antagonistę receptorów 5-HT₆.

Zainteresowanie receptorami serotoninowymi 5-HT₆ i ich związkiem z chorobą Alzheimera wynika ze specyficznej lokalizacji tych receptorów, ograniczonej prawie wyłącznie do OUN, zwłaszcza regionów mózgu odpowiedzialnych za procesy pamięciowe i nastrój.¹²⁻¹⁴ Związki blokujące receptory 5-HT₆, poprzez nasilenie transmisji cholinergicznej i glutaminianergicznej wykazują działanie prokognitywne w badaniach na modelach zwierzęcych oceniających różne aspekty procesów pamięciowych, pamięć operacyjną, przestrzenną, społeczną.^{15,16} Liczne badania wskazują również na powiązanie receptorów 5-HT₆ z behawioralnymi i psychologicznymi symptomami AD.^{17,18} Udowodniono działanie przeciwdepresyjne antagonistów receptorów 5-HT₆ wynikające z nasilenia uwalniania noradrenaliny i dopaminy oraz działanie anksjolityczne będące rezultatem wpływu tych antagonistów na transmisję GABA-ergiczną.^{19,20}

W niniejszej pracy przedstawiłam jedynie mechanizmy i cele biologiczne istotne z punktu widzenia prowadzonych przeze mnie badań, które jednocześnie są obecnie uważane za jedne z najistotniejszych dla rozwoju choroby Alzheimera i jej terapii.

Biorąc pod uwagę złożony, wieloczynnikowy charakter choroby Alzheimera, skuteczna farmakoterapia tego schorzenia może wymagać jednoczesnego działania na kilka celów biologicznych. Działanie takie można osiągnąć poprzez podanie pacjentowi kilku leków równocześnie w postaci osobnych preparatów (inhibitor cholinesteraz plus antagonistą NMDA) lub jednego preparatu złożonego (Namzaric – donepezil plus memantyna). Oba wymienione podejścia, związane ze stosowaniem kilku różnych związków aktywnych jednocześnie, niosą ryzyko potencjalnie niebezpiecznych interakcji lekowych, wynikających ze specyficznych parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych poszczególnych substancji. W 2004 roku Morphy i Rankovic opisali innowacyjne podejście do projektowania nowych leków - ligandy wielofunkcyjne (multi-target-directed ligands, MTDLs). Ligandy wielofunkcyjne to związki celowo zaprojektowane tak, aby oddziaływać z kilkoma wybranymi celami biologicznymi.^{21,22} Związki tego typu zyskały ogromną popularność w poszukiwaniu terapii schorzeń o złożonym patomechanizmie takich jak AD.²³

4.3.2. Cel i metody realizacji badań

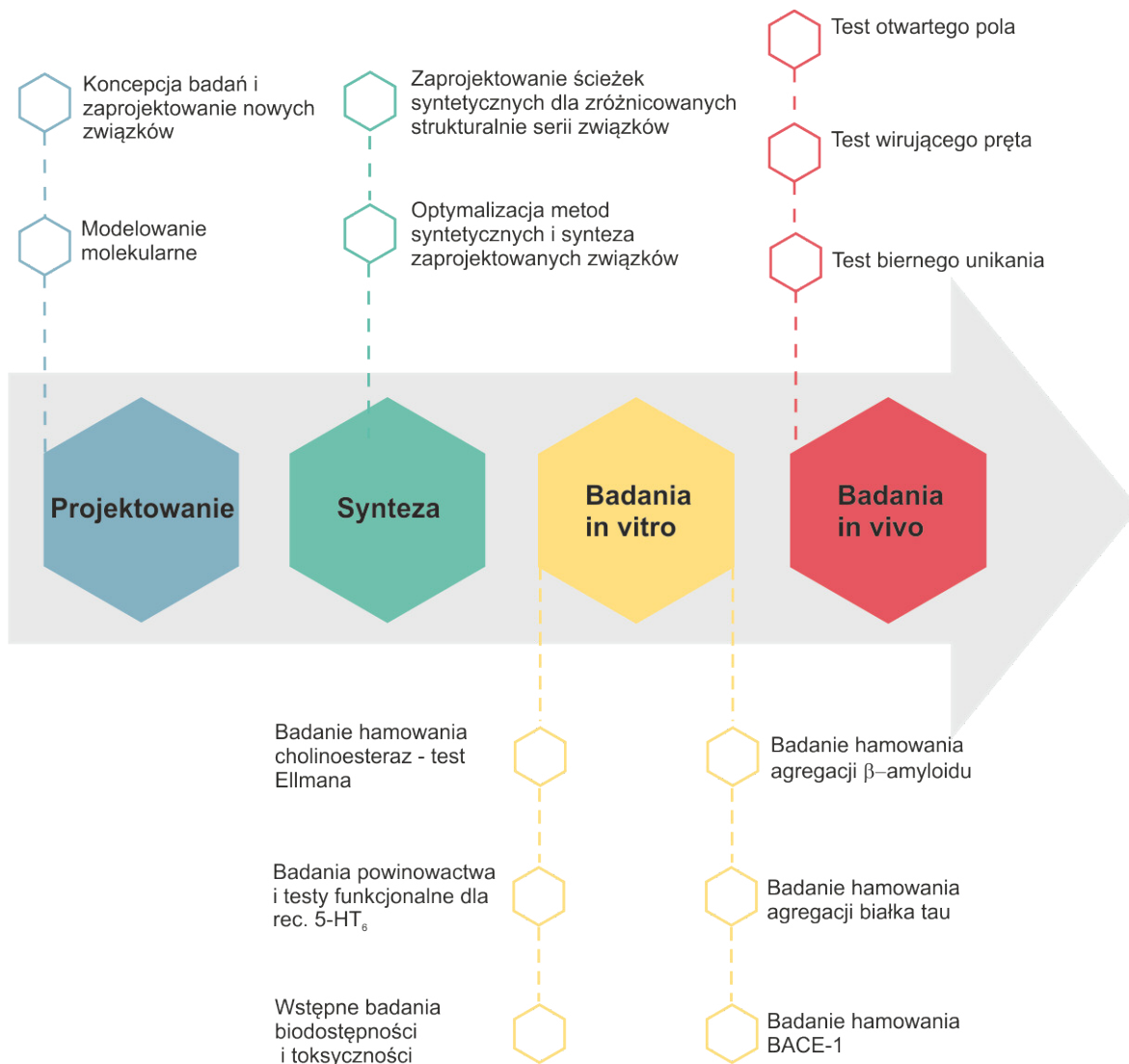
Z uwagi na stale rosnącą liczbę osób cierpiących na demencję, badanie jej przyczyn oraz możliwości skutecznej terapii należą do priorytetowych zadań dzisiejszej nauki. **Celem prowadzonych przeze mnie badań i osiągnięciem naukowym stanowiącym podstawę mojego wniosku habilitacyjnego było otrzymanie ligandów wielofunkcyjnych skierowanych na cele biologiczne o kluczowym dla terapii choroby Alzheimera znaczeniu. Dodatkowo związki te z uwagi na swoje unikalne właściwości farmakologiczne będą stanowiły znaczący wkład w rozwój dziedziny związanej z szeroko rozumianym poszukiwaniem nowych związków o działaniu prokognitywnym.** Badania prowadzone w ramach realizacji celu miały charakter interdyscyplinarny i obejmowały projektowanie nowych związków, syntezę chemiczną oraz badania biologiczne *in vitro* i *in vivo* (Rysunek 1). Tak szeroki zakres badań wymagał współpracy ze specjalistami z różnych dziedzin nauki.

Synteza wszystkich związków opisanych w pracach (**H2–H7**), podobnie jak badania *in vitro* obejmujące badanie hamowania cholinoesteraz i kinetyki enzymatycznej (**H2–H7**), badania przenikania przez barierę krew-mózg (**H2, H3, H6 i H7**) oraz badania aktywności hamującej β -sekretazę (**H3–H5**) zostały przeprowadzone w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM.

W ramach realizacji pracy nawiązałam współpracę z polskimi i zagranicznymi zespołami badawczymi, w których zostały wykonane:


1. badania hamowania agregacji β -amyloidu *in vitro* opisane w publikacjach **H2–H7** – zespół prof. Stanislava Gobeca, Chair of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana (Słowenia);
2. badania farmakologiczne *in vivo* u szczurów opisane w publikacji **H6** obejmujące test otwartego pola – zespół prof. dr. hab. Pawła Mierzejewskiego z Zakładu Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego Instytutu Psychiatrii i Neurologii;
3. badania farmakologiczne *in vivo* u myszy opisane w publikacji **H2** obejmujące test otwartego pola, test wirującego pręta i test biernego unikania – dr hab. Kinga Sałat, prof. UJ z Zakładu Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ CM;
4. badania powinowactwa związków do receptorów 5-HT₆ oraz badania aktywności funkcjonalnej opisane w pracach **H6 i H7** – dr Agata Siwek i mgr Monika Głuch-Lutwin z Zakładu Wstępnych Badań Farmakologicznych UJ CM;
5. modelowanie molekularne w publikacjach **H6 i H7** – zespół dr. hab. Marcina Kończakowskiego, prof. UJ z Zakładu Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego UJ CM;
6. badanie hamowania agregacji białka tau opisane w publikacji **H5** – dr Raimon Sabate, Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN2UB), University of Barcelona (Hiszpania);
7. badania stabilności metabolicznej *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich mikrosomów wątrobowych oraz badania wpływu na funkcję izoenzymu CYP3A4 opisane w publikacji **H7** – dr Gniewomir Latacz z Zakładu Biotechnologii i Technologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ CM;
8. badanie zdolności do przenikania bariery krew-mózg opisane w publikacjach **H3 i H5** oraz badanie hamowania ludzkiej butyrylocholinoesterazy opisane w publikacji **H7** – zespół dr. Jana Korabecnego, Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove (Czechy).

Opisane badania finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki z programu Sonata (2016/23/D/NZ7/01328) oraz z programów Opus (2016/21/B/NZ7/01744 i 2012/07/B/NZ7/04 253), przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego z programu Iuventus Plus (IP2012063272), przez Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w ramach dotacji statutowej (K/ZDS/007865, K/ZDS/007216 i K/ZDS/004657).



Rysunek 1. Metody wykorzystane w realizacji prac wchodzących w zakres postępowania habilitacyjnego

4.3.3. Omówienie badań stanowiących osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym



Ligandy
wielofunkcyjne
w chorobie
Alzheimera

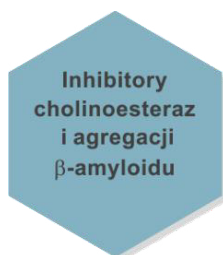
H1 - Guzior, N.; Więckowska, A.; Panek, D.; Malawska, B. Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 2015, 22, 373-404, IF 3.455; KBN/MNiSW 40.

Systematyczny przegląd bieżącej literatury dotyczącej moich zainteresowań naukowych i prac badawczych zaowocował powstaniem pracy przeglądowej zatytułowanej „Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease” (do dnia 23.07.2018 praca cytowana była 99 razy). W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat przyczyn i mechanizmów prowadzących do choroby Alzheimera, a przede wszystkim zestawienie prac z lat 2012–2015 dotyczących poszukiwań nowych ligandów wielofunkcyjnych o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera. Ligandy te zostały podzielone z uwagi na cele biologiczne z jakimi oddziałują, co pozwoliło na określenie znaczenia poszczególnych celów w prowadzonych badaniach. Na uwagę zasługuje fakt, że cholinoesterazy nadal stanowią kluczowy cel biologiczny w poszukiwaniu terapii choroby Alzheimera, a inhibitory tych enzymów stanowią główną grupę leków stosowanych w terapii AD. Wynika to z ich funkcji regulującej poziom acetylocholiny w OUN, ale również dodatkowych funkcji, a zwłaszcza możliwego wpływu na agregację β -amyloidu. Przypuszcza się, że agregacja β -amyloidu jest jedną z pierwotnych przyczyn choroby, więc jej hamowanie powinno modyfikować przebieg choroby. Stąd też drugim, najczęściej wybieranym punktem uchwytu dla nowo opracowywanych terapii jest hamowanie agregacji β -amyloidu poprzez niespecyficzne oddziaływania z tym białkiem bądź przez hamowanie β -sekreazy. Wiele prac opisuje również ligandy wielofunkcyjne o aktywności cholinergicznej, której towarzyszy działanie neuroprotektoryjne poprzez blokowanie receptorów NMDA, działanie antyoksydacyjne, chelatowanie jonów Fe^{2+} , Cu^{2+} czy Zn^{2+} czy też działanie przeciwzapalne. Ze względu na potencjalne korzyści jakie może nieść oddziaływanie z receptorami kannabinoidowymi CB_2 czy histaminowymi H_3 , również one znalazły się wśród dodatkowych celów biologicznych.

Zainteresowanie naukowe poszczególnymi celami biologicznymi w poszukiwaniu nowych terapii choroby Alzheimera odzwierciedla ich potencjalne znaczenie dla tej terapii. Cholinoesterazy stanowią zwalidowany cel biologiczny i mimo, że leki hamujące te enzymy mają ograniczoną skuteczność nadal są podstawą farmakoterapii. Terapią o najwyższej skuteczności byłaby terapia przyczynowa stąd niesłabnącym zainteresowaniem cieszą się wszelkie cele biologiczne związane z agregacją β -amyloidu i białka tau. Ogromne zaangażowanie przemysłu farmaceutycznego w rozwój kolejnych cząsteczek hamujących agregację tych białek nie przełożyło się jednak do tej pory na wprowadzenie na rynek leku. Mimo to, nadal najwięcej związków w zaawansowanych badaniach klinicznych to cząsteczki wpływające na procesy agregacji. Sporą grupę związków w badaniach klinicznych stanowią cząsteczki wpływające na inne neuroprzekaźniki, zwłaszcza przewodnictwo glutaminergiczne.

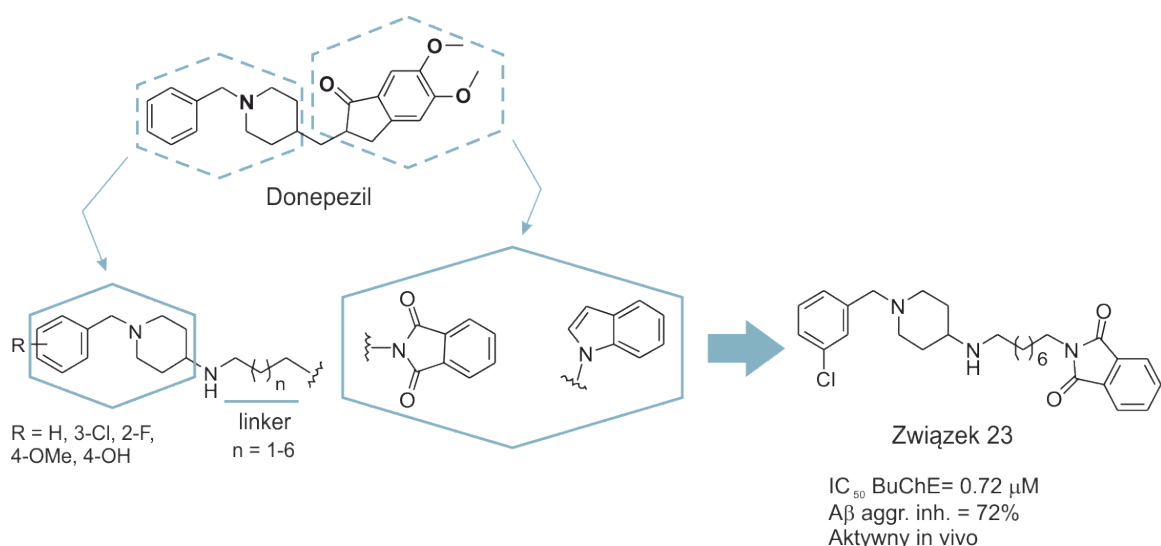
Jednym z kluczowych etapów poszukiwania nowych leków jest odpowiedni wybór celu/celów biologicznych. Analiza dotychczasowych doniesień pozwoliła mi na wybór celów biologicznych,

które są istotne z punktu widzenia terapii choroby Alzheimera i których połączenie w formie ligandów wielofunkcyjnych mogłoby przynieść korzyści terapeutyczne.



H2 - Więckowska, A.; Więckowski, K.; Bajda, M.; Brus, B.; Sałat, K.; Czerwińska, P.; Gobec, S.; Filipek, B.; Malawska, B. Synthesis of new *N*-benzylpiperidine derivatives as cholinesterase inhibitors with β -amyloid anti-aggregation properties and beneficial effects on memory *in vivo*. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 2445-2457, IF 2.923; KBN/MNiSW 30.

Projektowanie. Strukturą wiodącą w projektowaniu nowych ligandów wielofunkcyjnych opisanych w publikacji **H2** był donepezyl, selektywny inhibitor AChE (BuChE IC_{50} /AChE IC_{50} = 183), lek zarejestrowany w terapii choroby Alzheimera. Celem projektu było poszerzenie aktywności donepezilu o cele biologiczne ważne z punktu widzenia terapii choroby Alzheimera – BuChE i β -amyloid. AChE i BuChE postrzegane są obecnie jako równorzędnie istotne cele biologiczne w terapii AD. Początkowe przekonanie o nadrzędnej roli AChE w regulowaniu poziomu acetylocholino w OUN zmieniło się wraz z wynikami badań, w których udowodniono zdolność BuChE do rekompensowania braku AChE u myszy ze znokautowanym genem AChE.²⁴ Zaobserwowano również zdolność do przywracania odpowiedniego poziomu acetylocholino oraz poprawę funkcji poznawczych u myszy po zastosowaniu selektywnych inhibitorów BuChE.^{25–27} Dodatkowo pojawiły się doniesienia o znaczącym spadku poziomu AChE (do 85%) w korze mózgowej osób cierpiących na AD przy równoczesnym wzroście poziomu BuChE.²⁸ Wszystkie te fakty wskazują na istotną rolę BuChE w regulacji transmisji cholinergiczej w przebiegu choroby Alzheimera i klasyfikują BuChE jako jeden z ważniejszych celów biologicznych w poszukiwaniu nowych terapii.



Rysunek 2. Ligandy wielofunkcyjne hamujące cholinesterazy i agregację β -amyloidu – projektowanie i struktura wybranego związku 23

Wykazano również, że funkcja AChE nie ogranicza się jedynie to regulacji poziomu acetylocholinyl. Wśród dodatkowych funkcji AChE wykazano zdolność do indukowania agregacji β -amyloidu poprzez oddziaływania peryferyjnego miejsca wiązania w enzymie (PAS) z białkiem.²⁹ Blokowanie AChE zarówno poprzez oddziaływania z miejscem katalitycznym jak i PAS może więc w konsekwencji nasilać transmisję cholinergiczną oraz hamować agregację β -amyloidu.

Jak wykazały badania krystalograficzne, elementem kluczowym dla wiązania cząsteczki donepezylu w centrum aktywnym AChE jest *N*-benzyloaminowy fragment wbudowany w układ *N*-benzylopiperydyny. W projektowaniu nowych związków ten fragment został zachowany i dodatkowo zmodyfikowany w pierścieniu aromatycznym przez następujące podstawniki: 3-Cl, 2-F, 4-OMe, 4-OH. Podstawniki te zostały wybrane na podstawie danych literaturowych oraz wyników modelowania molekularnego które wykazały, że mogą one korzystnie wpływać na powinowactwo względem cholinoesteraz.³⁰ Występujący w donepezylu fragment 5,6-dimetoksy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-onu zastąpiono ugrupowaniami izoindolino-1,3-dionu (ftalimidu) i indolu, które poprzez tworzenie korzystnych oddziaływań z peryferyjnym miejscem wiązania (PAS) mogą nasilać aktywność hamującą cholinoesterazy. Fragment *N*-benzylopiperydynowy połączono z ugrupowaniem ftalimidowym i indolowym za pomocą łączników alkilowych zawierających od 3 do 8 atomów węgla. Przewidywano, że oddalenie od siebie tych fragmentów i zwiększenie giętkości cząsteczki zwiększy szanse na optymalne oddziaływania z BuChE i PAS AChE.

Synteza zaprojektowanych związków przebiegała wieloetapowo. W pierwszej kolejności wymagała opracowania metody i przygotowania odpowiednio podstawionych pochodnych 1-benzylopiperydyno-4-aminy. Te bloki budulcowe były następnie alkilowane za pomocą otrzymanych bromoalkilowych pochodnych ftalimidu i indolu prowadząc do otrzymania związków końcowych.

Badania in vitro AChE/BuChE. Otrzymane związki poddano badaniom *in vitro* mającym na celu określenie aktywności względem zakładanych celów biologicznych. W pierwszej kolejności związki zostały poddane testowi Ellmana, który pozwala na zbadanie zdolności hamowania cholinoesteraz. W teście wykorzystano standardowo używane w badaniach przesiewowych enzymy, AChE z węgorka elektrycznego (*ee*AChE) oraz BuChE z osocza końskiego (*eq*BuChE). Wyniki badań wskazują, że wprowadzone modyfikacje korzystnie wpłynęły na oddziaływania z BuChE dzięki czemu otrzymano związki hamujące zarówno AChE i BuChE oraz grupę związków selektywnie hamujących BuChE o submikromolowych wartościach IC_{50} (0.34–0.93 μ M). Analiza zależności struktura-aktywność (SAR) względem BuChE wykazała wyższe aktywności dla pochodnych indolowych oraz pozytywny wpływ zastosowanych podstawników 2-F, 3-Cl i 4-OH na aktywność związków w porównaniu z niepodstawionymi pochodnymi. Zauważono również, że aktywności są wyższe dla związków z dłuższymi, sześć- i ośmiowęglowymi łącznikami. Badania kinetyki związków pozwoliły na określenie niekompetytywnego typu inhibicji.

Agregacja β -amyloidu. Na podstawie wyników testu Ellmana wyselekcjonowano jedenaście związków, dla których przeprowadzono badania zdolności hamowania agregacji β A z zastosowaniem tioflawiny T. Badania te możliwe były dzięki nawiązaniu współpracy z prof. Stanislavem Gobecem z Uniwersytetu w Lublanie. Pięć spośród przebadanych pochodnych hamowało agregację powyżej 50% (54–76%) w stężeniu przesiewowym 10 μ M. Większą aktywność wykazały związki z dłuższym łącznikiem (szczególnie C8), odnotowano również

pozytywny wpływ podstawnika chlorowego w pozycji 3. Dla związku 23³ przeprowadzono dodatkowe testy wykazując dawkozależny charakter inhibicji.

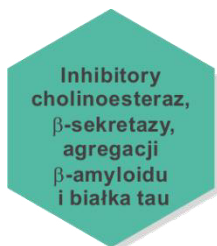
PAMPA-BBB. Dla wybranych związków przeprowadzono również test zdolności do przenikania przez barierę krew-mózg metodą PAMPA-BBB (parallel artificial membrane permeability assay for the BBB). Na podstawie otrzymanych wyników wszystkie związki zostały zakwalifikowane do łatwo przenikających barierę krew-mózg.

Badania in vivo. W celu zweryfikowania potencjału otrzymanych związków w zakresie poprawy funkcji poznawczych zaplanowano przeprowadzenie badań behawioralnych w kierunku aktywności prokognitywnej na myszach. Niewiele prac opisywało selektywne inhibitory BuChE, a prace opisujące ich aktywność *in vivo* były rzadkością. Dlatego spośród otrzymanych związków do badań *in vivo* wyselekcjonowano związek 23 będący selektywnym inhibitorem BuChE ($IC_{50} = 0.72 \mu M$, poniżej 50% hamowania AChE w $10 \mu M$), inhibitorem agregacji βA (%inh. = 72%) zdolnym do przenikania BBB w teście PAMPA. W celu oceny zdolności związku 23 do odwracania zaburzeń pamięci poddano go testowi biernego unikania (ang. passive avoidance test). Test biernego unikania jest oparty na nabywaniu, przechowywaniu i utrzymaniu awersyjnego warunkowania Pawłowowskiego, angażującego procesy pamięci krótko i długotrwałej. Deficyt poznawczy u myszy wywoływane były za pomocą antagonisty receptorów muskarynowych – skopolaminy. Związek 23 skutecznie odwracał zaburzenia pamięci wywołane przez skopolaminę już w dawce 5 mg/kg, jednocześnie nie zaburzając aktywności lokomotorycznej ani koordynacji ruchowej badanych zwierząt w teście otwartego pola i teście wirującego pręta.

Najważniejsze osiągnięcia zaprezentowane w pracy:

- ✓ Opracowanie ścieżki syntetycznej pozwalającej na dywersyfikację fragmentu *N*-benzylpiperazyny – farmakoforowego ugrupowania występującego w inhibitorach cholinesteraz.
- ✓ Zaprojektowanie i otrzymanie niekompetycyjnych selektywnych inhibitorów BuChE hamujących agregację β -amyloidu.
- ✓ Potwierdzenie *in vivo* skuteczności selektywnych inhibitorów BuChE w zwierzęcych modelach deficytów poznawczych.

³ Numeracja związków w autoreferacie jest zaczerpnięta z odpowiednich publikacji.



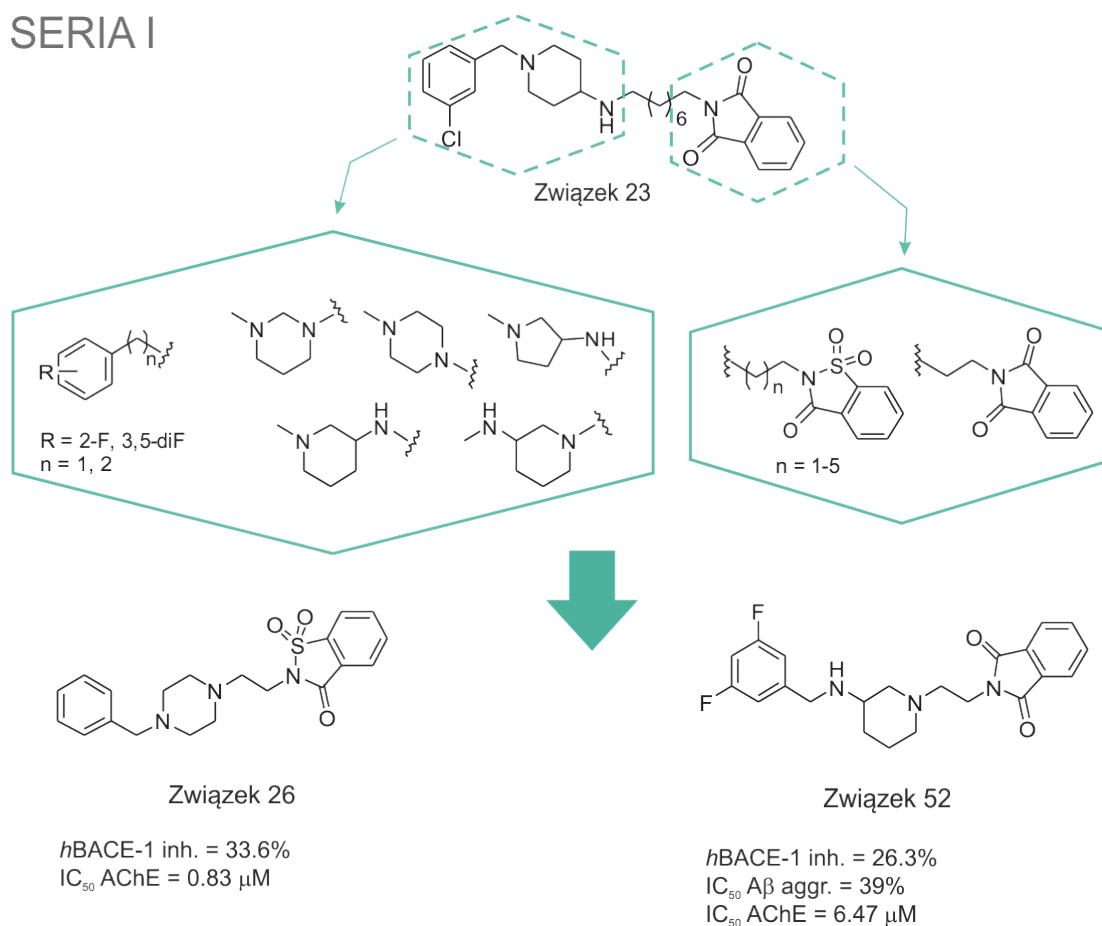
H3 – Panek, D.; Więckowska, A.; Wichur, T.; Bajda, M.; Godyń, J.; Jończyk, J.; Mika, K.; Janockova, J.; Soukup, O.; Knez, D.; Korabecny, J.; Gobec, S.; Malawska, B. Design, synthesis and biological evaluation of new phthalimide and saccharin derivatives with alicyclic amines targeting cholinesterases, beta-secretase and amyloid beta aggregation. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, *125*, 676–695, IF 4.519; KBN/MNiSW 40.

H4 – Panek, D.; Więckowska, A.; Pasięka, A.; Godyń, J.; Jończyk, J.; Bajda, M.; Knez, D.; Gobec, S.; Malawska, B. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 2-(Benzylamino-2-Hydroxyalkyl)Isoindoline-1,3-Diones Derivatives as Potential Disease-Modifying Multifunctional Anti-Alzheimer Agents. *Molecules.* 2018, *23*, E347, IF 2.861; KBN/MNiSW 30.

H5 – Panek, D.; Więckowska, A.; Jończyk, J.; Godyń, J.; Bajda, M.; Wichur, T.; Pasięka, A.; Knez, D.; Pislár, A.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Sepsova, V.; Sabate, R.; Kos, J.; Gobec, S.; Malawska, B. Design, synthesis and biological evaluation of 1-benzylamino-2-hydroxyalkyl derivatives as new potential disease-modifying multifunctional anti-Alzheimer's agents. *ACS Chem. Neurosci.* 2018, *9*, 1074-1094, IF 3.883; KBN/MNiSW 40.

Projektowanie – seria I (publikacja **H3**). Opisany wcześniej związek 23 stał się związkiem wyjściowym do projektowania nowych pochodnych o aktywności biologicznej poszerzonej o hamowanie β -sekretazy (BACE-1). BACE-1 to enzym, który inicjuje sekwencję reakcji prowadzących do powstania amyloidu β . W związku ze swoją rolą jest to ważny cel biologiczny w badaniach nad terapią AD. Jak przedstawiono na rysunku 3, fragment piperidyno-4-aminy związku 23 został zastąpiony ugrupowaniem heksahydropiryminy, piperazyny, piperidyno-3-aminy oraz piperidyno-3-aminy. Wymienione aminy alicykliczne z dwoma zasadowymi atomami azotu mogą tworzyć oddziaływania z kluczowymi dla aktywności enzymatycznej aminokwasami β -sekretazy - Asp32 oraz Asp228.^{31,32} Dodatkowo fragment benzylowy został zmodyfikowany atomami fluoru w pozycji 2 oraz 3 i 5 w pierścieniu fenylowym. Zachowane zostało ugrupowanie ftalimidu, które w części pochodnych zostało zastąpione ugrupowaniem sacharynowym. Ugrupowanie sacharynowe tworzyło oddziaływania z PAS w AChE i skutecznie zwiększało aktywność wcześniej otrzymanych w naszym zespole pochodnych.³³

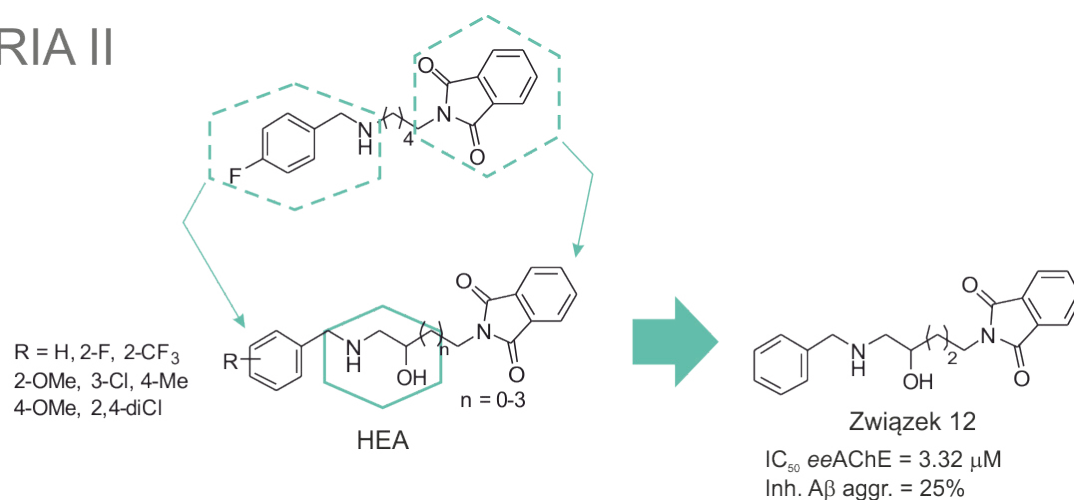
SERIA I



Rysunek 3. Ligandy wielofunkcyjne hamujące AChE, BACE-1 i agregację β-amyloidu – projektowanie i struktura wybranych związków 26 i 52

Projektowanie – seria II (publikacja H4). Związki serii II zostały zaprojektowane jako analogi wcześniej opublikowanych w zespole inhibitorów cholinesteraz o aktywności hamującej agregację β-amyloidu i działaniu neuroprotektynym (związek 13b, rysunek 4).³⁴ Przedstawione modyfikacje strukturalne miały na celu rozszerzenie aktywności biologicznej na β-sekretazę. Związki te stanowią równocześnie kontynuację serii I, w której dokonano zmiany fragmentu odpowiedzialnego za oddziaływanie z centrum aktywnym BACE-1. Alicykliczne aminy serii I zostały zastąpione ugrupowaniem hydroksyetyloaminowym (HEA) będącym farmakoforem występującym w strukturach znanych inhibitorów BACE-1 oraz innych proteaz aspartylowych.³⁵ Zachowano fragment ftalimidowy oraz *N*-benzyloaminowy jako fragmenty, które powinny oddziaływać odpowiednio peryferyjnym oraz katalitycznym miejscem wiązania. Fragment *N*-benzyloaminowy został zmodyfikowany ugrupowaniami wybranymi na podstawie badań dokowania z AChE i BACE-1.

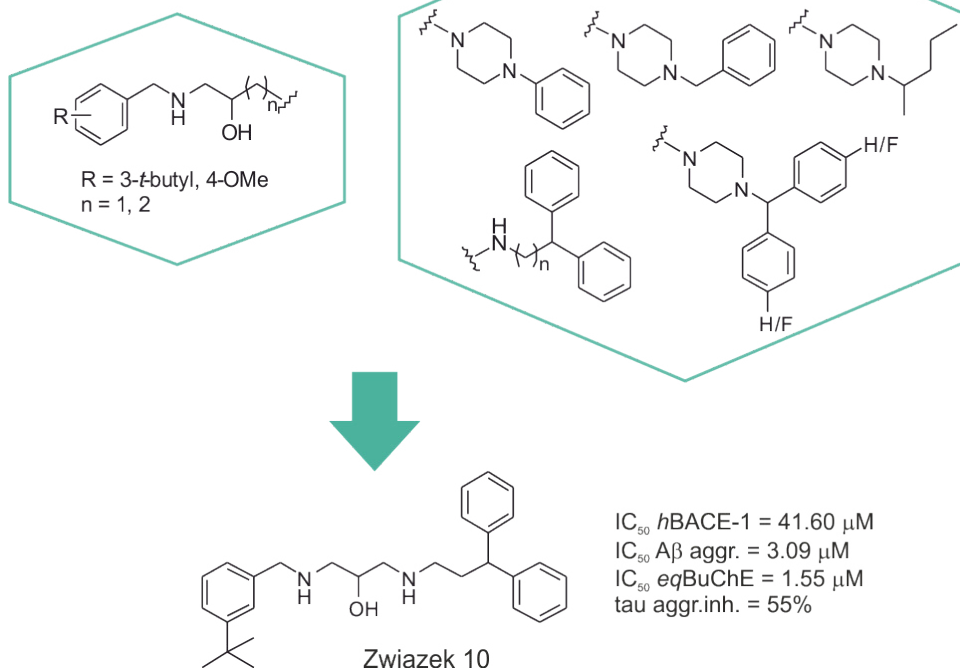
SERIA II



Rysunek 4. Ligandy wielofunkcyjne hamujące AChE i agregację β -amyloidu – projektowanie i struktura wybranego związku 12

Projektowanie – seria III (publikacja H5). W serii III połączyliśmy występujące w serii II ugrupowanie 2-(benzyloamino)etan-1-olu z grupą amin wyłonionych w ramach wirtualnego skriningu względem BACE-1, AChE i BuChE. Skriningowi poddano pierwszo- i drugorzędowe aminy (dostępne w Sigma Aldrich) z podstawnikami, które tworzyłyby korzystne oddziaływania z odpowiednimi kieszeniami wiążącymi BACE-1 oraz z peryferyjnym miejscem wiązania AChE i BuChE. Spośród amin dających najlepsze wyniki w dokowaniu wybrano 4-(difenylometylo)piperazynę i 4-(bis(4-fluorofenylometylo)piperazynę, ich wydłużone analogi: 2,2-difenyloetyloaminę i 3,3-difenylopropan-1-aminę, oraz 4-fenylo-piperazynę, 4-benzylo-piperazynę i 4-(pentan-2-yl)piperazynę jako zredukowane przestrzennie analogi. Dodatkowo pierścień fenylowy ugrupowania 2-(benzyloamino)etan-1-olu został zmodyfikowany podstawnikami 3-*tert*-butylowym i 4-metoksyowym.

SERIA III



Rysunek 5. Ligandy wielofunkcyjne hamujące cholinoesterazy, BACE-1 i agregację β -amyloidu oraz białka tau – projektowanie i struktura wybranego związku 10

Synteza i badania *in vitro*. Z uwagi na dużą różnorodność strukturalną zaprojektowanych związków, ich otrzymanie wymagało zaprojektowania wielu ścieżek syntetycznych, z których każda obejmowała od trzech do ośmiu etapów. Otrzymane w wyniku syntezy związki zostały poddane testom pozwalającym na określenie ich aktywności względem cholinoesteraz (test Ellmana), względem BACE-1 (test spektrofluorymetryczny oparty na zjawisku FRET) oraz względem agregacji β -amyloidu i białka tau (test tioflawiny T).

AChE/BuChE. Spośród wszystkich otrzymanych związków te z serii I i II (publikacje **H3** i **H4**) charakteryzuje selektywna aktywność hamująca AChE, związki serii III (publikacja **H5**) to selektywne inhibitory BuChE. Analiza zależności struktura-aktywność serii I wskazała jednoznacznie na przewagę ugrupowania piperazyiny i sacharyny dla aktywności hamującej AChE. Mniejsze znaczenie miała długość łańcucha węglowego łączącego te dwa fragmenty czy wprowadzone podstawniki. Długość łącznika była kluczowa dla aktywności związków serii II, w której największą aktywność wykazywały związki z dłuższym, trzy- i czterowęglowym łącznikiem między ugrupowaniem ftalimidowym a grupą hydroksylową. Wyznaczone dla najbardziej aktywnych pochodnych wartości IC_{50} mieszczą się w granicach od 0,8 do 19 μ M. Związki serii III to selektywne inhibitory BuChE o wartościach IC_{50} od 1,5 do 16,6 μ M. Do najbardziej aktywnych należą pochodne z ugrupowaniami 2,2-difenyloetyloaminowymi i 3,3-difenylopropan-1-aminowymi.

BACE-1. Aktywność związków serii I i II, opisanych w publikacjach **H3** i **H4** względem BACE-1 była niska i dla najbardziej aktywnego wyniosła 50% hamowania enzymu w stężeniu 50 μ M.

Wprowadzone elementy strukturalne – aminy alicykliczne (seria I) i ugrupowanie hydroksyetyloaminowe (seria II) zgodnie z wynikami badań modelowania molekularnego powinny wiązać się w miejscu katalitycznym enzymu jednak pozostałe elementy strukturalne nie zapewniają związkom optymalnego wiązania. Zamiana ugrupowania ftalimidowego i sacharynowego na aminy wyłonione w wirtualnym skryningu miała pozytywny efekt na aktywność względem BACE-1. Wśród związków serii III opisanych w publikacji **H5** wyłoniono grupę związków o aktywności przekraczającej 50% hamowania w stężeniu przesiewowym, dla których oznaczono wartości IC_{50} , mieszczące się w granicach od 32 do 102 μM . Największą aktywność wykazały pochodne z dużymi 2,2-difenyloetyloaminowymi i 3,3-difenylopropan-1-aminowymi podstawnikami, które poprzez oddziaływania z kieszeniami wiążącymi BACE-1 zapewniły odpowiednie ułożenie związków w enzymie i ich aktywność.

Agregacja β -amyloidu i białka tau. Spośród wszystkich związków zbadanych w teście agregacji β -amyloidu najaktywniejsze okazały się związki serii III opisane w publikacji **H5**. Aktywność wyższą niż referencyjny resweratrol (>79%) wykazało pięć pochodnych, w których wspólnymi elementami strukturalnymi były z jednej strony podstawnik difenylometylowy, a z drugiej podstawnik *tert*-butyloowy w pierścieniu fenylowym. Spośród tych związków cztery wybrane zostały do badania hamowania agregacji białka tau, w którym wykazały od 44 do 68% inhibicji w standardowo stosowanym stężeniu przesiewowym 10 μM .

PAMPA-BBB. Zdolność wybranych związków, przedstawicieli każdej z serii, do przekraczania bariery krew-mózg została określona na podstawie badania w teście parallel artificial membrane permeability (PAMPA-BBB). Wyniki testu pozwoliły zakwalifikować większość związków do grupy łatwo przenikających do OUN, jedynie dwa związki do grupy o niejasnych możliwościach przenikania BBB. Są to wstępne badania, lecz standardowo wykonywane przed podaniem związku zwierzętom w badaniach *in vivo*, a uzyskane przez nas wyniki stanowią pozytywną prognozę dla dalszych badań i rozwoju badanych związków.

Najważniejsze osiągnięcia zaprezentowane w pracach:

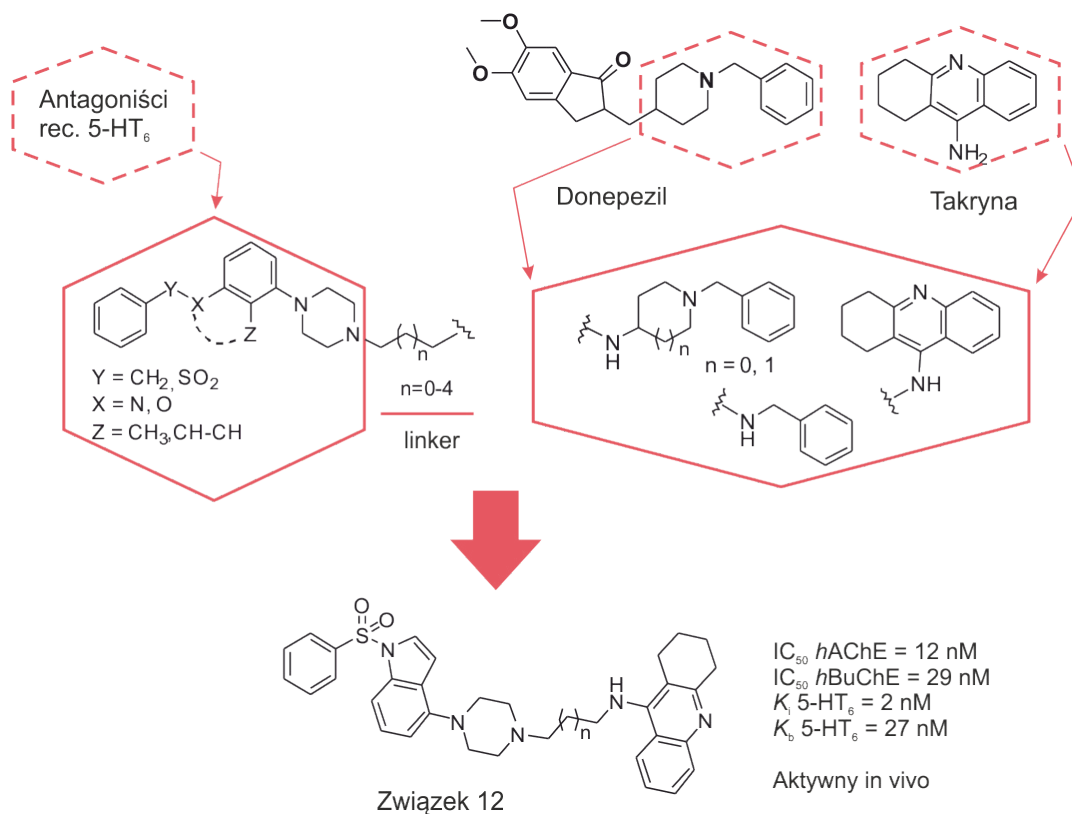
- ✓ Opracowanie szeregu ścieżek syntetycznych pozwalających na otrzymanie zróżnicowanych strukturalnie ligandów wielofunkcyjnych;
- ✓ Otrzymanie ligandów wielofunkcyjnych o unikalnym profilu farmakologicznym, hamujących β -sekretazę, butyrylocholinoesterazę oraz agregację neurotoksycznych białek β -amyloidu i białka tau;
- ✓ Analiza zależności struktura-aktywność w dużej grupie związków (70 pochodnych) pozwalająca na dalsze racjonalne projektowanie nowych ligandów wielofunkcyjnych.

Inhibitory
cholinoesteraz
i antagoniści
rec. 5-HT₆

H6 – Więckowska, A., Kończkowski, M.; Bucki, A.; Godyń, J.; Marcinkowska, M.; Więckowski, K.; Zaręba, P.; Siwek, A.; Kazek, G.; Głuch-Lutwin, M.; Mierzejewski, P.; Bieńkowski, P.; Sienkiewicz-Jarosz, H.; Knez, D.; Wichur, T.; Gobec, S.; Malawska, B. Novel multi-target-directed ligands for Alzheimer's disease: combining cholinesterase inhibitors and 5-HT₆ receptor antagonists. Design, synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 124, 63–81, IF 4.519; KBN/MNiSW 40.

H7 – Więckowska, A.; Wichur, T.; Godyń, J.; Bucki, A.; Marcinkowska, M.; Siwek, A.; Więckowski, K.; Zaręba, P.; Knez, D.; Głuch-Lutwin, M.; Kazek, G.; Latacz, G.; Mika, K.; Kończkowski, M.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Benkova, M.; Kieć-Kononowicz, K.J.; Gobec, S.; Malawska, B. Novel multi-target-directed ligands aiming at symptoms and causes of Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* 2018, 9, 1195-1214, IF 3.883; KBN/MNiSW 40.

Projektowanie. Koncepcja tej części pracy została opracowana w oparciu o wyniki badań II fazy badań klinicznych, w których otrzymano obiecujące wyniki z zastosowaniem skojarzonej terapii za pomocą antagonisty receptora 5-HT₆ (idalopirdyna, intepirdyna) i inhibitora acetylocholinoesterazy (donepezyl). Terapia ta wykazała lepsze efekty w zakresie poprawy funkcji poznawczych u pacjentów z umiarkowaną postacią choroby Alzheimera, niż terapia za pomocą samego donepezylu.³⁶ W trzeciej fazie badań żaden ze związków nie osiągnął punktów końcowych założonych przez sponsorów co, jak się przypuszcza, mogło wynikać z nieodpowiedniego dawkowania.³⁷ Badania nad antagonistami receptorów 5-HT₆ w aspekcie terapii choroby Alzheimera nadal trwają, obecnie w 2 fazie badań klinicznych znajdują się trzeci związek, SUVN-502.³⁸



Rysunek 6. Ligandy wielofunkcyjne blokujące receptory 5-HT₆, hamujące cholinoesterazy i agregację β-amyloidu – projektowanie i struktura wybranego związku 12

Wobec powyższego i w świetle potencjalnych korzyści jakie mogą towarzyszyć stosowaniu ligandów wielofunkcyjnych zaprojektowano nowe cząsteczki łączące aktywność hamującą cholinoesterazy oraz antagonistyczną względem receptorów 5-HT₆. Nowe ligandy wielofunkcyjne zostały zaprojektowane w oparciu o strategię „*designing in*”. Strategia ta ma na celu połączenie aktywności na dwa (lub więcej) cele biologiczne w jednej cząsteczce poprzez wbudowanie w nią elementów strukturalnych dwóch (lub więcej) selektywnych ligandów działających na te cele.

Jako fragmenty odpowiedzialne za oddziaływanie z centrum aktywnym cholinoesteraz wybrano ugrupowanie *N*-benzylopiperydyny, występujące w cząsteczce donepezilu, które wykorzystywane było już we wcześniej opisanych projektach, oraz analogi strukturalne tego ugrupowania (*N*-benzylopirolidyna, *N*-benzyloamina). Jako dodatkowy fragment farmakoforowy zastosowano cząsteczkę takryny, pierwszego leku zarejestrowanego w terapii AD. Fragmenty te nie tylko występują w cząsteczkach leków, ale również wykorzystywane są w projektowaniu nowych ligandów wielofunkcyjnych.^{34,39–41} Jako ugrupowania o wysokim powinowactwie do receptorów 5-HT₆ wybrano opisane w literaturze⁴² arylopiiperazyny: 1-(fenylosulfonylo)-4-(piperazyn-1-ylo)-1*H*-indol, 1-benzylo-4-(piperazyn-1-ylo)-1*H*-indol oraz 1-(3-(benzyloksy)-2-metylofenylo)piperazynę. Obydwa fragmenty farmakoforowe połączono prostymi łącznikami alifatycznymi o różnej długości łańcucha, co ilustruje rysunek 6.

Proces projektowania związków wspomagany był metodami modelowania cząsteczkowego. Poszczególne związki zostały zadokowane do odpowiednio przygotowanych modeli celów biologicznych. Spośród badanych struktur wyłoniono te, które wykazały prawidłowe oddziaływanie zarówno z receptorem 5-HT₆, jak i miejscem katalitycznym i peryferyjnym cholinoesteraz, co pozwoliło na sporządzenie rankingu związków.

Synteza i badania *in vitro*. Otrzymanie związków wymagało zaprojektowania kilku ścieżek syntetycznych, różnych dla pochodnych donepezilu i takryny, zmodyfikowanych odpowiednio dla poszczególnych długości linkerów łączących elementy farmakoforowe. Wszystkie otrzymane pochodne (47 związków) zostały poddane testowi Ellmana oraz badaniom powinowactwa do receptorów 5-HT₆.

Receptory 5-HT₆. Znakomita większość związków wykazała bardzo wysokie i wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT₆ mieszczące się w granicach od 2 do 96 nM. Jedynie 15 związków wykazało powinowactwo przekraczające 100 nM. Najwyższe i najbardziej zrównoważone powinowactwo wykazywały związki pochodne 1-(fenylosulfonylo)-4-(piperazyn-1-ylo)-1*H*-indolu opisane w publikacji **H6** ($K_i = 2–39$ nM).

AChE/BuChE. Znacznie większe rozbieżności odnotowano w przypadku aktywności względem cholinoesteraz. Tutaj najwyższymi aktywnościami hamującymi charakteryzowały się pochodne takrynowe, dla których wartości IC₅₀ względem *ee*AChE wynosiły od 7,1–57 nM, z wyjątkiem dwóch związków dla których te wartości przekroczyły 100 nM. Ze względu na tak wysoką aktywność związki te zostały również poddane badaniu względem ludzkiego enzymu AChE, gdzie wykazały aktywność w granicach od 1,3 do 62 nM. Warto podkreślić, że aktywności wybranych pochodnych były wyższe niż referencyjnej takryny (IC₅₀ *ee*AChE = 24 nM, *h*AChE = 131 nM). Podobnie wysoką aktywność pochodne takryny wykazywały względem BuChE (IC₅₀ = 5–85 nM). Związki zawierające ugrupowania *N*-benzylopiperydynowe i jego analogi były nieaktywne względem AChE. Wyjątek stanowiły pochodne *N*-benzyloaminy z ugrupowaniem 1-benzylo-4-

(piperazyn-1-ylo)-1*H*-indolu opisane w publikacji **H7** ($IC_{50} = 3\text{--}8 \mu\text{M}$) oraz pochodne *N*-benzyloaminy z 5-węglowymi łącznikami z ugrupowaniem 1-(fenylosulfonylo-4-(piperazyn-1-ylo)-1*H*-indolu ($IC_{50} = 4 \mu\text{M}$) i 1-(3-(benzyloksy)-2-metylofenylo)piperazyny ($IC_{50} = 2 \mu\text{M}$) opisane w publikacjach **H6** i **H7**. Wszystkie pochodne *N*-benzylopiperydynowe wykazywały aktywność względem BuChE w granicach od 0,2 do 10 μM . Badania kinetyki przeprowadzone dla wybranych związków wykazały, że są one niekompetytywnymi inhibitorami zarówno AChE jak i BuChE.

Agregacja β -amyloidu. Związki opisane w publikacji **H7** przebadano również pod kątem ich zdolności hamowania agregacji β -amyloidu. Wykazały one 48–95% hamowania agregacji w stężeniu 10 μM ; aż dziesięć pochodnych wykazało aktywność powyżej 79%, co jest wynikiem lepszym niż wynik związku referencyjnego, resweratrolu. Dodatkowo dla dwóch pochodnych wyznaczono wartości IC_{50} , które wyniosły 1 μM .

PAMPA-BBB. Dla wybranych związków przeprowadzono wstępne badania biodostępności (**H6**, **H7**) *in vitro*. Zdolność związków do przekraczania bariery krew-mózg została zbadana w teście PAMPA-BBB, w którym wykazały wartości $\log P_e$ klasyfikujące je do związków o dobrej przenikalności. Wyjątek stanowił jeden związek, o najwyższej masie cząsteczkowej i lipofilowości, który zakwalifikowany został jako pochodna o niepewnej przenikalności.

Stabilność metaboliczna. Dla związku 12, będącego pochodną takryny (publikacja **H7**) zbadano stabilność metaboliczną na ludzkich mikrosomach, a powstające metabolity oznaczono metodą HPLC z użyciem wzorca wewnętrznego i zidentyfikowano metodą spektrometrii masowej. Wśród metabolitów nie zidentyfikowano żadnego ze związków odpowiedzialnych za hepatotoksyczność takryny, co może świadczyć o tym, że dzięki zastosowanym modyfikacjom strukturalnym związek został pozbawiony potencjalnej toksyczności.

Wpływ na aktywność CYP3A4. Dodatkowo zbadano wpływ związku 12 na aktywność izoformy 3A4 cytochromu P450 metodą bioluminescencyjną, tym samym szacując możliwość wystąpienia potencjalnych interakcji międzylekowych. Wartość hamowania aktywności enzymu, wyrażona jako IC_{50} i wynosząca 17 μM była 170 razy wyższa niż flukonazolu, będącego standardowym związkiem referencyjnym używanym w tym teście, co świadczy o niskiej aktywności w tym zakresie.

Badania *in vivo*. W celu potwierdzenia wykazanego *in vitro* mechanizmu cholinergicznego otrzymanych związków, wybrany związek 12 (rysunek 6, publikacja **H6**) przekazano do badań *in vivo* na szczurach. W pierwszym etapie badań związek został poddany testowi otwartego pola. W teście tym potwierdzona została jego zdolność do przenikania bariery krew-mózg, brak znaczącego wpływu na aktywność lokomotoryczną zwierząt w dawkach 1 i 3 mg/kg oraz wyznaczony optymalny czas podania związku w dalszych eksperymentach. Aktywność cholinergiczna związku została potwierdzona w badaniu zdolności do znoszenia hiperlokomocji u zwierząt wywołanej skopolaminą. Związek 12 dawkozależnie znosił hiperlokomocję (1, 3 i 10 mg/kg).

Badania opisane w publikacjach **H6** i **H7** możliwe były dzięki otrzymaniu przeze mnie dofinansowania z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w programie Iuventus Plus (2013–2016) oraz z Narodowego Centrum Nauki w programie Sonata (2017–2020).

Najważniejsze osiągnięcia zaprezentowane w pracach:

- ✓ Otrzymanie nowych, oryginalnych związków o unikatowym mechanizmie działania – hamujących cholinesterazy i agregację białka β -amyloidu, działających antagonistycznie na receptory 5-HT₆, które wyznacza nowy kierunek poszukiwania wielofunkcyjnych ligandów o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera.
- ✓ Potwierdzenie mechanizmu działania otrzymanych ligandów w modelach zwierzęcych.
- ✓ Opracowanie szeregu ścieżek syntezy, niezbędnych do otrzymania zaplanowanych związków, ale również mogących znaleźć zastosowanie w dalszych pracach i otrzymaniu kolejnych związków.
- ✓ Analiza wyników zależności struktura-aktywność w grupie otrzymanych związków o istotnym znaczeniu dla dalszych poszukiwań związków wielofunkcyjnych o potencjalnym zastosowaniu w chorobie Alzheimera, która pozwoli na skuteczniejsze planowanie kolejnych pochodnych.

4.3.4. Podsumowanie osiągnięć naukowych stanowiących podstawę habilitacji

Opisane prace badawcze dotyczą istotnego zagadnienia jakim jest terapia choroby Alzheimera. Z powodu ograniczonej liczby dostępnych leków, a także ich niezadowalającej skuteczności, choroba Alzheimera wciąż jest nieuleczalna. Co więcej, częstość występowania tego schorzenia wzrasta, a zatem konieczne są intensywne badania, mające na celu poszukiwanie nowych leków na AD. W pracach przedstawiono szerokie, interdyscyplinarne badania, które doprowadziły do identyfikacji ligandów wielofunkcyjnych oddziałujących z szeregiem celów biologicznych o ważnym znaczeniu dla patofizjologii i przebiegu choroby. Badania obejmowały projektowanie, syntezę chemiczną oraz badania biologiczne *in vitro* i *in vivo* mające na celu scharakteryzowanie związków pod względem farmakologicznym.

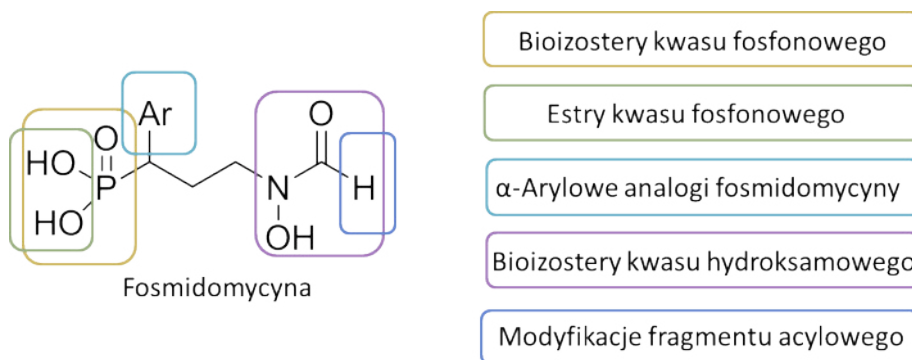
Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracach należą:

- ✓ Opracowanie koncepcji badań prowadzących do identyfikacji nowych, oryginalnych ligandów wielofunkcyjnych;
- ✓ Opracowanie szeregu ścieżek syntetycznych, prowadzących do otrzymania zróżnicowanych strukturalnie związków;
- ✓ Zaprojektowanie i otrzymanie niekompetycyjnych selektywnych inhibitorów BuChE hamujących agregację β -amyloidu;
- ✓ Zaprojektowanie i otrzymanie ligandów wielofunkcyjnych o unikalnym profilu farmakologicznym, hamujących β -sekreazę, butyrylocholinoesterazę oraz agregację neurotoksycznych białek β -amyloidu i białka tau;
- ✓ Zaprojektowanie i otrzymanie pierwszych ligandów wielofunkcyjnych hamujących cholinesterazy i działających antagonistycznie na receptory 5-HT₆, działających jednocześnie antyagregacyjnie względem białka β -amyloidu;
- ✓ Opracowanie zależności struktura-aktywność dla poszczególnych grup opisanych ligandów wielofunkcyjnych, która pozwoli na dalsze, skuteczne projektowanie nowych związków;
- ✓ Potwierdzenie *in vivo* zdolności wyselekcjonowanych ligandów wielofunkcyjnych do odwracania deficytów poznawczych u zwierząt laboratoryjnych.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Wkrótce po obronie pracy doktorskiej rozpoczęłam dwuletni pobyt naukowo-badawczy w Department of Medicinal Chemistry, Organic Pharmaceutical Chemistry na Uniwersytecie w Uppsali w Szwecji. Głównym kierunkiem moich badań prowadzonych w grupie profesora Andersa Karlena i profesora Matsa Larheda była synteza nowych pochodnych fosmidomycyny jako inhibitorów reduktiozomerazy fosforanu 1-deoksy-D-ksylulozy (DXR). DXR to jeden z kluczowych enzymów w syntezie izoprenoidów niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek, występujący w komórkach roślin, pierwotniaków i wielu bakterii.⁴³ DXR katalizuje zależne od NADPH oraz dwuwartościowych jonów Mg^{2+} , Co^{2+} lub Mn^{2+} przegrupowanie i redukcję 5-fosforanu 1-deoksy-D-ksylulozy do 4-fosforanu 2-C-metylo-D-erytrytolu. DXR jest enzymem kluczowym dla rozwoju *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* oraz *Plasmodium falciparum* i w związku z tym istotnym celem biologicznym dla poszukiwania leków na choroby wywoływane przez te drobnoustroje. Fosmidomycyna to naturalny antybiotyk, który *in vitro* skutecznie hamuje DXR *Escherichia coli* oraz *Plasmodium falciparum* i jednocześnie hamuje ich rozwój *in vivo*. Wykazano również, że fosmidomycyna *in vitro* hamuje DXR *M. tuberculosis* (MtDXR), jednak nie działa na komórki bakteryjne *in vivo*.⁴⁴ Ten różnica w działaniu *in vitro* i *in vivo* najprawdopodobniej wynika z właściwości fizykochemicznych fosmidomycyny. Jej niska lipofilowość ($clogP = -1.80$) nie pozwala na przenikanie przez bardzo lipofilową ścianę komórkową *M. tuberculosis*. Moim zadaniem było przeprowadzenie wielokierunkowych modyfikacji strukturalnych cząsteczki fosmidomycyny prowadzących do poprawy jej parametrów fizykochemicznych. Zaplanowane kierunki modyfikacji zostały przedstawione na rysunku 7.



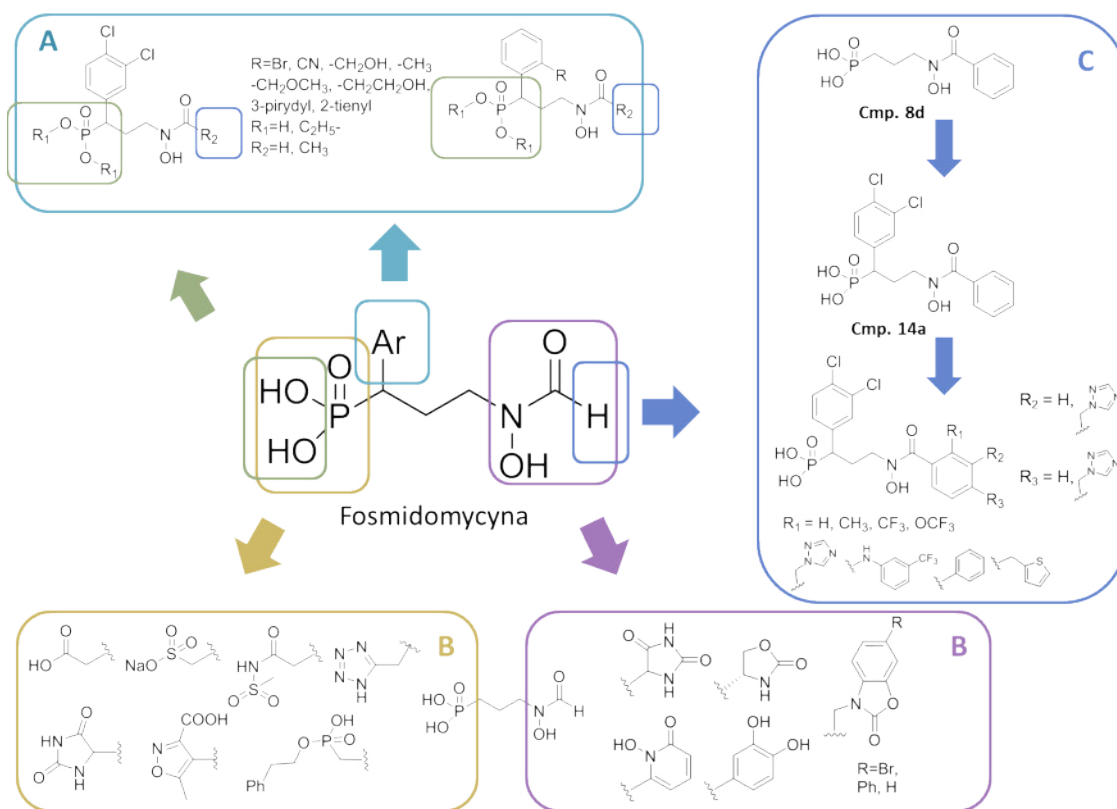
Rysunek 7. Kierunki modyfikacji fosmidomycyny

W 2006 roku Haemers et al.⁴⁵ otrzymał α -arylowe pochodne fosmidomycyny, które wykazywały większą aktywność hamującą wzrost *P. falciparum* i zwiększoną lipofilowość w porównaniu z wyjściową fosmidomycyną. Pierwszym etapem mojego projektu była resynteza najbardziej aktywnych pochodnych otrzymanych przez Haemera i zbadanie ich aktywności na MtDXR. Otrzymano α -3,4-dichlorofenylowe analogi fosmidomycyny, jak również pochodne zawierające zestyfikowany fragment kwasu fosfonowego (mono- i diestry etylowe) oraz analogi acetylowe w miejscu fragmentu formylowego. Największą aktywność hamującą DXR wykazał bezpośredni analog fosmidomycyny, ale aktywny był również analog z ugrupowaniem acetylowym oraz ester monoetylowy. Równoległe z badaniami biologicznymi prowadzone były badania krystalograficzne, dzięki którym możliwe było uzyskanie struktury krystalicznej α -3,4-dichlorofenylfosmidomycyny

z MtDXR. Struktura ta pozwoliła na odkrycie uwodnionej kieszeni wiążącej w pobliżu centrum katalitycznego enzymu. Stało się to inspiracją do syntezy pochodnych, które wypierając cząsteczkę wody wypełniłyby tę kieszeń i uczestniczyły w tworzeniu wiązań wodorowych. Przy wsparciu modelowania molekularnego przeprowadzonego na podstawie otrzymanej struktury krystalicznej zaprojektowano grupę pochodnych α -2-podstawionych arylowych (rysunek 8A). Strategia ta nie doprowadziła do otrzymania związków o aktywności większej niż aktywność fosmidomycyny, jednak otrzymana w ramach projektu struktura krystaliczna dostarczyła nowych informacji na temat tego jak inhibitory wiążą się z centrum aktywnym enzymu. Te informacje są wyjątkowo cenne dla dalszych poszukiwań leków przeciwgruźliczych w grupie inhibitorów reduktioizomerazy fosforanu 1-deoksy-D-ksylulozy i zostały zaprezentowane w publikacji **D13**:

D13 – Andaloussi, M.; Henriksson, L.M.; **Więckowska, A.**; Lindh, M.; Björkelid, C.; Larsson, A.M.; Suriseti, S.; Iyer, H.; Srinivasa, B.R.; Bergfors, T.; Unge, T.; Mowbray, S.L.; Larhed, M.; Jones, T.A.; Karlén, A. Design, Synthesis, and X-ray Crystallographic Studies of α -Aryl Substituted Fosmidomycin Analogues as Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis 1-Deoxy-d-xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *J. Med. Chem.* 2011, *54*, 4964–4976.

IF 5.248; KBN/MNiSW 45



Rysunek 8. Przeprowadzone modyfikacje strukturalne fosmidomycyny

Obecność reszty kwasu fosfonowego i hydroksamowego w cząsteczce fosmidomycyny determinuje jej polarny charakter. Jednocześnie znana jest funkcja tych fragmentów w wiązaniu fosmidomycyny z DXR i wynikająca z niej konieczność zachowania funkcjonalności o charakterze kwaśnym oraz fragmentu o właściwościach chelatujących jony metali. Możliwość zastąpienia jednej bądź obydwu tych grup zbadano przez zastąpienie ich szeregiem ugrupowań bioizosterycznych (rysunek 8B). Badania aktywności otrzymanych pochodnych pokazały, że jest

możliwość zastąpienia zarówno ugrupowania fosfonowego – najlepsze wyniki uzyskano dla pochodnej kwasu izoksazolowego – jak i ugrupowania hydroksamowego – najlepsze wyniki miały pochodne z ugrupowaniem katecholowym. Jest to ważna obserwacja z punktu widzenia możliwości poprawy właściwości fizykochemicznych fosmidomycyny i jej aktywności *in vivo*. Wyniki te zostały opisane w publikacji **D12**:

D12 – Andaloussi, M.; Lindh, M.; Björkelid, C.; Surisetti, S.; **Więckowska, A.**; Iyer, H.; Karlén, A.; Larhed, M. Substitution of the phosphonic acid and hydroxamic acid functionalities of the DXR inhibitor FR900098: An attempt to improve the activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 5403–5407.

IF 2.554; KBN/MNiSW 30

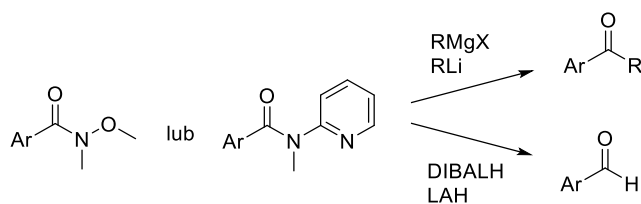
Kolejny kierunek przeprowadzonych modyfikacji strukturalnych cząsteczki fosmidomycyny prezentuje rysunek 8C. W pierwszym etapie otrzymano grupę pochodnych fosmidomycyny, w których atom wodoru ugrupowania formylowego zastąpiono różnymi ugrupowaniami alkilowymi, aryłowymi, amidowymi i heteroaromatycznymi. W ramach strategii STOP – same-target-other-pathogen – związki przebadano zarówno względem DXR z *M. tuberculosis* oraz *P. falciparum*. Największą aktywność względem obydwu enzymów wykazała pochodna z podstawnikiem fenylowym – związek 8d. Kolejnym etapem było połączenie α -3,4-dichlorofenylfosmidomycyny ze związkiem 8d. Otrzymany w ten sposób związek 14a wykazywał submikromolową aktywność względem MtDXR ($IC_{50} = 0,32 \mu M$) oraz wyjątkowo wysoką aktywność hamującą wzrost *P. falciparum* *in vitro* ($IC_{50} = 0,04 \mu M$). Otrzymana struktura krystaliczna związku 14a z MtDXR wskazała, że związek jednocześnie oddziałuje z kieszenią wiążącą substrat oraz miejscem wiążącym kofaktor. Jest to pierwszy inhibitor DXR tego typu. Struktura krystaliczna związku 14a z MtDXR wskazała również, iż odpowiednie modyfikacje pierścienia fenylowego w części hydroksamowej mogłyby nasilić oddziaływanie z kieszenią wiążącą kofaktor. Na tej podstawie zaprojektowano nowe pochodne z pierścieniem fenylowym podstawionym głównie w pozycji *orto*, ale również *meta* i *para* (rysunek 8C). Związki te co prawda nie wykazały lepszej aktywności od związku wyjściowego, ale dzięki nim możliwe było przeanalizowanie nowego trybu wiązania pochodnych fosmidomycyny, co stanowi doskonałe źródło informacji dla dalszych poszukiwań inhibitorów DXR. Wyniki tych badań zostały opisane w publikacji **D8**:

D8 – Jansson, A.M.; **Więckowska, A.**; Björkelid, C.; Yahiaoui, S.; Sooriyaarachchi, S.; Lindh, M.; Bergfors, T.; Dharavath, S.; Desroses, M.; Surisetti, S.; Andaloussi, M.; Nikhil, R.; Sreevalli, S.; Srinivasa, B.R.; Larhed, M.; Jones, T.A.; Karlen, A.; Mowbray, S.L. DXR Inhibition by Potent Mono- and Disubstituted Fosmidomycin Analogues. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 6190–6199.

IF 5.480; KBN/MNiSW 45

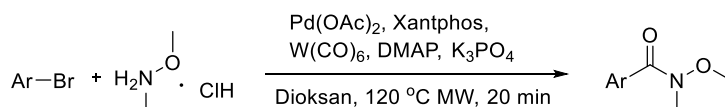
Drugim kierunkiem moich badań realizowanych podczas stażu podoktorskiego na Uniwersytecie w Uppsali były reakcje katalizowane palladem. W ramach projektu „Environmentally benign and microwave-accelerated metal-catalyzed organic reactions”, zajmowałam się opracowaniem metody syntezy amidów Weinreba i MAP na drodze katalizowanej palladem reakcji aminokarboksylacji Hecka. Amidy Weinreba (amidy *N*-metoksy-*N*-metylowe) oraz amidy MAP

(amidy *N*-metyloaminopirydylowe) są cennymi odczynnikami acylującymi, wykorzystywanymi w syntezie aldehydów i ketonów (rysunek 9).^{46,47}



Rysunek 9. Struktura amidów Weinreba i MAP i ich zastosowanie w syntezie jako czynników acylujących

Tradycyjnie amidy Weinreba otrzymywano z kwasów karboksylowych oraz ich pochodnych – chlorków kwasowych, estrów, laktonów, amidów czy bezwodników kwasowych. Nowsze metody wykorzystują reakcje katalizowane metalami przejściowymi, w tym reakcje sprzęgania (cross-coupling) chlorku *N*-metoksy-*N*-metylokarbamoilu z kwasami boronowymi lub stannanami winylowymi. Alternatywnie stosuje się reakcję aminokarbonylacji Hecka, w której substratami są łatwo dostępne halogenki bądź triflasy arylowe. Sporym ograniczeniem tej metody jest konieczność stosowania toksycznego tlenku węgla (CO). Alternatywą dla gazowego CO są stałe źródła tego gazu takie jak Mo(CO)₆, W(CO)₆, Co₂(CO)₈ czy DMF, z których tlenek węgla uwalniany jest *in situ*. Opracowana przeze mnie metoda pomija konieczność stosowania gazowego CO zastępując go stałymi źródłami tego gazu – Mo(CO)₆ oraz W(CO)₆ (rysunek 10). Modyfikacja ta stanowi znaczne ułatwienie i rozszerza możliwość stosowania tej metody syntezy na każde laboratorium chemiczne prowadzące syntezę na małą skalę.



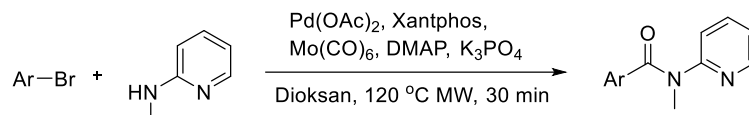
Rysunek 10. Synteza amidów Weinreba w reakcji aminokarbonylacji Hecka

Dodatkową zaletą tej metody jest krótki czas reakcji wynoszący 20 minut, w przypadku prowadzenia reakcji w reaktorze mikrofalowym.. W przypadku użycia jodków arylowych jako substratów tej reakcji możliwe było skrócenie czasu reakcji do 10 minut przy temperaturze 110 °C. Opracowana metoda pozwala na syntezę amidów Weinreba z wysoką wydajnością, w krótkim czasie z łatwo dostępnych komercyjnie bromków i jodków arylowych i heteroarylowych o zróżnicowanych właściwościach elektronowych i sterycznych. Metoda nie wymaga specjalnego sprzętu i co ważne pracy z toksycznym tlenkiem węgla.

Równoległe opracowałam pierwszą metodę syntezy amidów MAP w reakcji aminokarbonylacji z zastosowaniem bromków i jodków arylowych i heteroarylowych (rysunek 11). Podobnie jak opisana synteza amidów Weinreba, również ta metoda pozwala na otrzymanie amidów MAP z wysokimi wydajnościami z szerokiej gamy zróżnicowanych substratów bez konieczności użycia gazowego tlenku węgla. Opracowane metody zostały opisane w publikacji **D14**:

D14 – Więckowska, A.; Fransson, R.; Odell, L.R.; Larhed, M. Microwave-assisted synthesis of Weinreb and MAP aryl amides via Pd-catalyzed Heck aminocarbonylation using Mo(CO)₆ or W(CO)₆. *J. Org. Chem.* 2011, 3, 978–981.

IF 4.450; KBN/MNiSW 35



Rysunek 11. Synteza amidów MAP metodą aminokarbonylacji Hecka

W ramach współpracy między Uniwersytetem w Uppsali a Uniwersytetem w Sherbrooke (Kanada), odbyłam dziewięciomiesięczny (04.2011–01.2012) staż podoktorski w Faculty of Medicine, Department of Endocrinology w zespole pani profesor Nicole Gallo-Payet. Współpraca między jednostkami dotyczyła projektu poszukiwania selektywnych, niepeptydowych ligandów receptora adenyzynowego AT₂. Badania prowadzone przeze mnie podczas stażu miały na celu określenie powinowactwa i selektywności otrzymanych wcześniej związków do receptorów AT₁ i AT₂ a także zbadanie ich aktywności funkcjonalnej względem receptorów AT₂. Badania powinowactwa prowadzone były metodą radioreceptorową z wykorzystaniem angiotensyny II znakowanej [¹²⁵I]. Określenie aktywności funkcjonalnej przeprowadzono, badając przyrost neurytów w komórkach NG108-15. Wyniki tych badań zostały opublikowane w publikacji **D7**:

D7 – Behrends, M.; Wallinder, C.; **Więckowska, A.**; Guimond, M.O.; Hallberg, A.; Gallo-Payet, N.; Larhed, M. *N*-Aryl Isoleucine Derivatives as Angiotensin II AT₂ Receptor Ligands. *ChemistryOpen*. 2014, 3, 65–75.

IF 2.107; KBN/MNiSW 30

W latach 2010–2016 jako wykonawca brałam również udział w realizacji projektów naukowych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Badania te prowadzone były w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM i dotyczyły poszukiwania ligandów wielofunkcyjnych o potencjalnej możliwości zastosowania w terapii choroby Alzheimera. Badania obejmowały projektowanie, syntezę, badania biologiczne oraz badania właściwości fizykochemicznych nowych związków. Wyniki tych badań zostały opisane w publikacjach **D2**, **D5**, **D6**, **D9**, **D11**:

D2 – Godyń, J.; Hebda, M.; **Więckowska, A.**; Więckowski, K.; Malawska, B.; Bajda, M. Lipophilic properties of anti-Alzheimer's agents determined by micellar electrokinetic chromatography and reversed-phase thin-layer chromatography. *Electrophoresis*. 2017, 38, 1268–1275.

IF 2.744; KBN/MNiSW 25

D5 – Hebda, M.; Bajda, M.; **Więckowska, A.**; Szałaj, N.; Pasieka, A.; Panek, D.; Godyń, J.; Wichur, T.; Knez, D.; Gobec, S.; Malawska, B. Synthesis, Molecular Modelling and Biological Evaluation of Novel Heterodimeric, Multiple Ligands Targeting Cholinesterases and Amyloid Beta. *Molecules*. 2016, 21, 1–24.

IF 2.861; KBN/MNiSW 30

D6 – Bajda, M.; Panek, D.; Hebda, M.; **Więckowska, A.**; Guzior, N.; Malawska, B. Search for potential cholinesterase inhibitors from the zinc database by virtual screening method. *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.* 2015, 72, 737–745.

IF 0.877; KBN/MNiSW 15

D9 – Bajda, M.; **Więckowska, A.**; Hebda, M.; Guzior, N.; Sotriffer, C.A.; Malawska, B. Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, *14*, 5608–5632.

IF 2.339; KBN/MNiSW 30

D11 – Bajda, M.; Kuder, K.J.; Łażewska, D.; Kieć-Kononowicz, K.; **Więckowska, A.**; Ignasik, M.; Guzior, N.; Jończyk, J.; Malawska, B. Dual-acting diether derivatives of piperidine and homopiperidine with histamine H₃ receptor antagonistic and anticholinesterase activity. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2012, *345*, 591–7.

IF 1.540; KBN/MNiSW 20

Ponadto podjęłam współpracę z panią dr Dorotą Łażewską z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w projekcie poszukiwania ligandów receptorów histaminowych H₃ i inhibitorów cholinoesteraz – publikacja **D4**:

D4 – Łażewska, D.; Jończyk, J.; Bajda, M.; Szałaj, N.; **Więckowska, A.**; Panek, D.; Moore, C.; Kuder, K.; Malawska, B.; Kieć-Kononowicz, K. Cholinesterase inhibitory activity of chlorophenoxy derivatives-Histamine H₃ receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016, *26*, 4140–4145.

IF 2.454; KBN/MNiSW 25

Moje doświadczenie w oznaczaniu lipofilowości wykorzystałam we współpracy z panią dr hab. Ewą Szymańską z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ-CM. Metodą PR-HPLC wyznaczyłam współczynniki lipofilowości dla serii ligandów receptorów AMPA – publikacja **D1**:

D1 – Szymańska, E.; Chałupnik, P.; Johansen, T.N.; Nielsen, B.; Cuñado Moral, A.M.; Pickering, D.S.; **Więckowska, A.**; Kieć-Kononowicz, K. Aryl- and heteroaryl-substituted phenylalanines as AMPA receptor ligands. *Chem. Biol. Drug Des.* 2017, *90*, 1271–1281.

IF 2.396; KBN/MNiSW 25

5.2. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Nigdy nie zadawałam sobie pytania o to, co chciałabym studiować, zawsze wiedziałam. Dlaczego, w jaki sposób i gdzie działają leki? Jak wyglądają? Żeby dowiedzieć się tego wszystkiego wiedziałam, że muszę i chcę studiować farmację. Chemia leków stała się moim ulubionym przedmiotem, a moje rosnące zainteresowanie pragnęłam rozwijać poza standardowymi zajęciami. Dlatego z dwoma kolegami z roku wystąpiłam z inicjatywą i prośbą do Profesor Barbary Malawskiej o możliwość utworzenia koła naukowego „Nowoczesnej Chemii Leków” w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM. Dzięki entuzjazmowi i wsparciu Pani Profesor koło rozpoczęło swoją działalność w 2001 roku, dzięki czemu już od czwartego roku studiów zaangażowałam się w prace naukowe koordynowane przez Panią Profesor. W początkowym okresie moje badania poświęcone były poszukiwaniu związków o działaniu przeciwpadaczkowym w grupie pochodnych kwasu γ -aminomasłowego. W ramach tego tematu zajmowałam się syntezą zaprojektowanych pochodnych, badaniami ich powinowactwa do transporterów GABA (GABA transporter, GAT) oraz badaniem ich właściwości fizykochemicznych, w szczególności lipofilowości. Badania lipofilowości prowadziłam w oparciu o opracowaną w zespole metodologię, metodą chromatografii cienkowarstwowej z odwróconym układem faz (RP-TLC) oraz metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz (RP-HPLC). Badania te były przedmiotem następujących publikacji:

D20 – Malawska, B.; Kulig, K.; Bucki, A.; Zbęk, P.; **Więckowska, A.** The study of the lipophilicity of α -(4-phenylpiperazin-1-yl)- γ -phthalimidobutyramides using chromatographic and computational methods. *Biomed. Chromatogr.* 2008, 22, 688–694.

IF 1.592; KBN/MNiSW 20

D22 – Więckowski, K.; Czaja, A.; Woźniak, A.; **Musiak, A.**; Malawska, B. A study of the lipophilicity of amide derivatives of α -(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)- γ -hydroxybutyric acid by use of RP-TLC and calculation. *JPC, J. Planar Chromatogr. Mod. TLC.* 2007, 20, 101–106.

IF 0.683; KBN/MNiSW 10

Badania powinowactwa otrzymanych pochodnych względem GAT prowadziłam w trakcie stażu naukowego w zespole profesora Klaus T. Wannera w Ludwig-Maximilians University, Department of Pharmacy, Center of Drug Research, Monachium, Niemcy (program DAAD, „Projektowanie, synteza i właściwości fizykochemiczne pochodnych kwasu 4-aminomasłowego oraz jego cyklicznego analogu piroolidyn-2-onu jako inhibitorów wychwytu zwrotnego kwasu 4-aminomasłowego (GABA)”). Badania te pozwoliły na wyłonienie pierwszych aktywnych struktur i rozwoju tego kierunku badań, a w rezultacie podpisania umowy „Development of ligands of biogenic amine transporters for the treatment of CNS disorders” między Uniwersytetem Jagiellońskim a Ludwig-Maximilians-Universität w Monachium. Badania te były przedmiotem publikacji **D10** i **D15**:

D10 – Sałat, K.; **Więckowska, A.**; Więckowski, K.; Höfner, G.C.; Kamiński, J.; Wanner, K.T.; Malawska, B.; Filipek, B.; Kulig, K. Synthesis and pharmacological properties of new GABA uptake inhibitors. *Pharmacol Rep.* 2012, 64, 817–33.

IF 1.965; KBN/MNiSW 25

D15 – Kulig, K.; Więckowski, K.; **Więckowska, A.**; Gajda, J.; Pochwat, B.; Höfner, G.C.; Wanner, K.T.; Malawska B. Synthesis and biological evaluation of new derivatives of 2-substituted 4-hydroxybutanamides as GABA uptake inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, *1*, 183–190.

IF 3.346; KBN/MNiSW 35

Równolegle podjęłam temat, będący nowym kierunkiem badań w zespole – poszukiwanie nowych inhibitorów cholinesteraz o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera, który stał się tematem mojej pracy magisterskiej a później doktorskiej. W ramach realizacji tego tematu zajmowałam się syntezą nowych pochodnych, badaniami biologicznymi otrzymanych związków oraz badaniem ich właściwości fizykochemicznych. Otrzymane przeze mnie pochodne zostały zaprojektowane jako inhibitory zarówno acetylo- jak i butyrylocholinesterazy, mające zdolność do oddziaływania zarówno z katalitycznym, jak i peryferyjnym miejscem wiązania enzymów. Związki te należą do pochodnych riwastygminy i donepezilu i zawierają w swojej strukturze fragmenty farmakoforowe charakterystyczne dla tych leków – karbamoiloksyfenylowe i *N*-benzylpiperidynowe. Na badania te przyznany został przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Grant Promotorski pt. „Nowe inhibitory cholinesteraz z ugrupowaniami karbaminianowymi lub *N*-alkilopiperidynowymi”. Prace syntetyczne prowadziłam również podczas stażu naukowo-badawczego odbywanego w ramach programu Erasmus w grupie pani profesor Ulrike Holzgrabe w Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Julius-Maximilians Universität, Würzburg, Niemcy. Jednym z efektów mojego pobytu w grupie prof. Holzgrabe było zaimplementowanie w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku UJ CM testu Ellmana. Jest to standardowa metoda spektrofotometryczna stosowana do oznaczania aktywności hamującej związków względem cholinesteraz. Dzięki implementacji metody mogłam samodzielnie przebadać zsyntezowane pochodne. Otrzymane wyniki posłużyły mi do przeanalizowania zależności struktura-aktywność w otrzymanej grupie związków oraz wyznaczenie dalszych kierunków badań. Dodatkowo, metodami *in silico* oraz doświadczalnymi metodami RP-TLC i RP-HPLC wyznaczyłam parametry lipofilowości i dokonałam ilościowej analizy zależności między aktywnością a lipofilowością związków. Wyniki tych prac stały się przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej oraz publikacji **D16–D19**:

D16 – **Więckowska, A.**; Bajda, M.; Guzior, N.; Malawska B. Novel alkyl- and arylcarbamate derivatives with *N*-benzylpiperidine and *N*-benzylpiperazine moieties as cholinesterases inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, *12*, 5602–5611.

IF 3.193; KBN/MNiSW 27

D17 – **Więckowska, A.**; Bajda, M.; Więckowski, K.; Malawska, B. Study of physicochemical properties of cholinesterases inhibitors – alkyl- and arylcarbamate derivatives with *N*-benzylpiperidine and *N*-benzylpiperazine moieties using chromatographic and computational methods. *JPC, J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 2010, *23*, 359–364.

IF 1.247; KBN/MNiSW 20

D18 – Bajda, M.; **Więckowska, A.**; Malawska, B. Electrophoretically mediated microanalysis technique as a tool for the rapid screening of novel acetylcholinesterase inhibitors. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 2009, *66*, 357–362.

IF 0.358; KBN/MNiSW 6

D19 – Franczak, J.; Kolesińska, B.; Czarnecka, A.; Malawska, B; **Więckowska, A.**; Bajda, M.; Kamiński, Z.J. Application of a library of artificial receptors formed by self-organization of *N*-lipidated peptides immobilized on cellulose for preliminary studies of binding of *N*-phenylpiperazines. *QSAR Comb. Sci.* 2009, 28, 728–736.
IF 3.027; KBN/MNiSW 24

Anne Więckowska

6. Piśmiennictwo

- (1) Prince, M.; Comas-Herrera, M. A.; Knapp, M.; Guerchet, M.; Karagiannidou, M. M. World Alzheimer Report 2016 Improving Healthcare for People Living with Dementia Coverage, Quality and Costs Now and In the Future. **2016**.
- (2) Okura, T.; Plassman, B. L.; Steffens, D. C.; Llewellyn, D. J.; Potter, G. G.; Langa, K. M. Neuropsychiatric Symptoms and the Risk of Institutionalization and Death: The Aging, Demographics, and Memory Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2011**, *59* (3), 473–481.
- (3) Borisovskaya, A.; Pascualy, M.; Borson, S. Cognitive and Neuropsychiatric Impairments in Alzheimer's Disease: Current Treatment Strategies. *Curr. Psychiatry Rep.* **2014**, *16* (9), 470.
- (4) Kales, H. C.; Gitlin, L. N.; Lyketsos, C. G. Assessment and Management of Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia. *BMJ* **2015**, *350*.
- (5) Davies, P.; Maloney, A. J. Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer's Disease. *Lancet* **1976**, *2* (8000), 1403.
- (6) Howard, R.; McShane, R.; R Lindsay, J.; Ritchie, C.; Denning, T.; Findlay, D.; Holmes, C.; Hughes, A.; Jacoby, R.; Jones, R.; McKeith, I. Donepezil and Memantine for Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366* (10), 893–903.
- (7) Schneider, L. S.; Mangialasche, F.; Andreasen, N.; Feldman, H.; Giacobini, E.; Jones, R.; Mantua, V.; Mecocci, P.; Pani, L.; Winblad, B.; Kivipelto, M. Clinical Trials and Late-Stage Drug Development for Alzheimer's Disease: An Appraisal from 1984 to 2014. *J. Intern. Med.* **2014**, *275* (3), 251–283.
- (8) Matsunaga, S.; Kishi, T.; Iwata, N. Memantine Monotherapy for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **2015**, *10* (4), e0123289.
- (9) Selkoe, D. J. The Molecular Pathology of Alzheimer's Disease. *Neuron* **1991**, *6* (4), 487–498.
- (10) Selkoe, D. J.; Hardy, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8* (6), 595–608.
- (11) ALZFORUM | NETWORKING FOR A CURE <https://www.alzforum.org/> (accessed Jul 31, 2018).
- (12) Kohen, R.; Metcalf, M. A.; Khan, N.; Druck, T.; Huebner, K.; Lachowicz, J. E.; Meltzer, H. Y.; Sibley, D. R.; Roth, B. L.; Hamblin, M. W. Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization of a Human 5-HT₆ Serotonin Receptor. *J. Neurochem.* **2002**, *66* (1), 47–56.
- (13) Hamon, M.; Doucet, E.; Lefèvre, K.; Miquel, M. C.; Lanfumey, L.; Insausti, R.; Frechilla, D.; Del Rio, J.; Vergé, D. Antibodies and Antisense Oligonucleotide for Probing the Distribution and Putative Functions of Central 5-HT₆ Receptors. *Neuropsychopharmacology* **1999**, *21* (2 Suppl), 68S–76S.
- (14) Codony, X.; Vela, J. M.; Ramírez, M. J. 5-HT₆ Receptor and Cognition. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11* (1), 94–100.
- (15) Riemer, C.; Borroni, E.; Levet-Trafit, B.; Martin, J. R.; Poli, S.; Porter, R. H. P.; Bös, M. Influence of the 5-HT₆ Receptor on Acetylcholine Release in the Cortex: Pharmacological Characterization of 4-(2-Bromo-6-Pyrrolidin-1-Ylpyridine-4-Sulfonyl)Phenylamine, a Potent and Selective 5-HT₆ Receptor Antagonist. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (7), 1273–1276.

- (16) Dawson, L. A.; Nguyen, H. Q.; Li, P. The 5-HT₆ Receptor Antagonist SB-271046 Selectively Enhances Excitatory Neurotransmission in the Rat Frontal Cortex and Hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **2001**, *25* (5), 662–668.
- (17) Lorke, D. E.; Lu, G.; Cho, E.; Yew, D. T. Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₆ Receptors in the Prefrontal Cortex of Alzheimer and Normal Aging Patients. *BMC Neurosci.* **2006**, *7* (1), 36.
- (18) Marcos, B.; García-Alloza, M.; Gil-Bea, F. J.; Chuang, T. T.; Francis, P. T.; Chen, C. P.; Tsang, S. W. T. Y.; Lai, M. K. P.; Ramirez, M. J. Involvement of an Altered 5-HT₆ Receptor Function in Behavioral Symptoms of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2008**, *14* (1), 43–50.
- (19) Wesółowska, A. Potential Role of the 5-HT₆ Receptor in Depression and Anxiety: An Overview of Preclinical Data. *Pharmacol. Reports* **2010**, *62* (4), 564–577.
- (20) Wesółowska, A.; Nikiforuk, A. Effects of the Brain-Penetrant and Selective 5-HT₆ Receptor Antagonist SB-399885 in Animal Models of Anxiety and Depression. *Neuropharmacology* **2007**, *52* (5), 1274–1283.
- (21) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (21), 6523–6543.
- (22) Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. From Magic Bullets to Designed Multiple Ligands. *Drug Discov. Today* **2004**, *9* (15), 641–651.
- (23) Unzeta, M.; Esteban, G.; Bolea, I.; Fogel, W. A.; Ramsay, R. R.; Youdim, M. B. H.; Tipton, K. F.; Marco-Contelles, J. Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* **2016**, *10*, 205.
- (24) Mesulam, M.-M.; Guillozet, A.; Shaw, P.; Levey, A.; Duysen, E. .; Lockridge, O. Acetylcholinesterase Knockouts Establish Central Cholinergic Pathways and Can Use Butyrylcholinesterase to Hydrolyze Acetylcholine. *Neuroscience* **2002**, *110* (4), 627–639.
- (25) Hartmann, J.; Kiewert, C.; Duysen, E. G.; Lockridge, O.; Greig, N. H.; Klein, J. Excessive Hippocampal Acetylcholine Levels in Acetylcholinesterase-Deficient Mice Are Moderated by Butyrylcholinesterase Activity. *J. Neurochem.* **2007**, *100* (5), 1421–1429.
- (26) Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Yu, Q. S.; Mamczarz, J.; Holloway, H. W.; Giordano, T.; Chen, D.; Furukawa, K.; Sambamurti, K.; Brossi, A.; Lahiri, D. K. Selective Butyrylcholinesterase Inhibition Elevates Brain Acetylcholine, Augments Learning and Lowers Alzheimer Beta-Amyloid Peptide in Rodent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (47), 17213–17218.
- (27) Furukawa-Hibi, Y.; Alkam, T.; Nitta, A.; Matsuyama, A.; Mizoguchi, H.; Suzuki, K.; Moussaoui, S.; Yu, Q.-S.; Greig, N. H.; Nagai, T.; Yamada, K. Butyrylcholinesterase Inhibitors Ameliorate Cognitive Dysfunction Induced by Amyloid- β Peptide in Mice. *Behav. Brain Res.* **2011**, *225* (1), 222–229.
- (28) Giacobini, E. Cholinergic Function and Alzheimer's Disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2003**, *18* (S1), S1–S5.
- (29) Castro, A.; Martinez, A. Targeting Beta-Amyloid Pathogenesis Through Acetylcholinesterase Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12* (33), 4377–4387.
- (30) Bajda, M.; Więckowska, A.; Hebda, M.; Guzior, N.; Sotriffer, C. A.; Malawska, B. Structure-Based Search for New Inhibitors of Cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (3), 5608–

5632.

- (31) Mohamed, T.; Yeung, J. C. K.; Vasefi, M. S.; Beazely, M. A.; Rao, P. P. N. Development and Evaluation of Multifunctional Agents for Potential Treatment of Alzheimer's Disease: Application to a Pyrimidine-2,4-Diamine Template. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2012, pp 4707–4712.
- (32) Laras, Y.; Garino, C.; Dessolin, J.; Weck, C.; Moret, V.; Rolland, A.; Kraus, J.-L. New N(4)-Substituted Piperazine Naphthamide Derivatives as BACE-1 Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24* (1), 181–187.
- (33) Szałaj, N.; Bajda, M.; Dudek, K.; Brus, B.; Gobec, S.; Malawska, B. Multiple Ligands Targeting Cholinesterases and B-Amyloid: Synthesis, Biological Evaluation of Heterodimeric Compounds with Benzylamine Pharmacophore. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci* **2015**, 556–563.
- (34) Guzior, N.; Bajda, M.; Skrok, M.; Kurpiewska, K.; Lewiński, K.; Brus, B.; Pišlar, A.; Kos, J.; Gobec, S.; Malawska, B. Development of Multifunctional, Heterodimeric Isoindoline-1,3-Dione Derivatives as Cholinesterase and β -Amyloid Aggregation Inhibitors with Neuroprotective Properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 738–749.
- (35) Maillard, M. C.; Hom, R. K.; Benson, T. E.; Moon, J. B.; Mamo, S.; Bienkowski, M.; Tomasselli, A. G.; Woods, D. D.; Prince, D. B.; Paddock, D. J.; Emmons, T. L.; Tucker, J. A.; Dappen, M. S.; Brogley, L.; Thorsett, E. D.; Jewett, N.; Sinha, S.; John, V. Design, Synthesis, and Crystal Structure of Hydroxyethyl Secondary Amine-Based Peptidomimetic Inhibitors of Human β -Secretase. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (4), 776–781.
- (36) Wilkinson, D.; Windfeld, K.; Colding-Jørgensen, E. Safety and Efficacy of Idalopirdine, a 5-HT₆ Receptor Antagonist, in Patients with Moderate Alzheimer's Disease (LADDER): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. *Lancet. Neurol.* **2014**, *13* (11), 1092–1099.
- (37) Hesselink, J. M. K. Idalopirdine (LY483518, SGS518, Lu AE 58054) in Alzheimer Disease: Never Change a Winning Team and Do Not Build Exclusively on Surrogates. Lessons Learned from Drug Development Trials. *J. Pharmacol. Clin. Res.* **2017**, *2* (1).
- (38) Nirogi, R.; Abraham, R.; Benade, V.; Medapati, R. B.; Jayarajan, P.; Bhyrapuneni, G.; Muddana, N.; Mekala, V. R.; Subramanian, R.; Shinde, A.; Kambhampati, R.; Jasti, V. SUVN-502, a Novel, Potent, Pure, and Orally Active 5-HT₆ Receptor Antagonist: Pharmacological, Behavioral, and Neurochemical Characterization. **2018**.
- (39) Sola, I.; Aso, E.; Frattini, D.; López-González, I.; Espargaró, A.; Sabaté, R.; Di Pietro, O.; Luque, F. J.; Clos, M. V.; Ferrer, I.; Muñoz-Torrero, D. Novel Levetiracetam Derivatives That Are Effective against the Alzheimer-like Phenotype in Mice: Synthesis, in Vitro, Ex Vivo, and in Vivo Efficacy Studies. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (15), 6018–6032.
- (40) Hamulakova, S.; Janovec, L.; Hrabínova, M.; Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kristian, P.; Kuca, K.; Imrich, J. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Tacrine Derivatives and Tacrine-Coumarin Hybrids as Cholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (16), 7073–7084.
- (41) Samadi, A.; de la Fuente Revenga, M.; Pérez, C.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Rodríguez-Franco, M. I.; Marco-Contelles, J. Synthesis, Pharmacological Assessment, and Molecular Modeling of 6-Chloro-Pyridonepezils: New Dual AChE Inhibitors as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 64–74.

- (42) Liu, K. G.; Robichaud, A. J. 5-HT₆ Antagonists as Potential Treatment for Cognitive Dysfunction. *Drug Dev. Res.* **2009**, *70* (2), 145–168.
- (43) Takahashi, S.; Kuzuyama, T.; Watanabe, H.; Seto, H. A 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase Catalyzing the Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate in an Alternative Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (17), 9879–9884.
- (44) Dhiman, R. K.; Schaeffer, M. L.; Bailey, A. M.; Testa, C. A.; Scherman, H.; Crick, D. C. 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (IspC) from *Mycobacterium Tuberculosis*: Towards Understanding Mycobacterial Resistance to Fosmidomycin. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (24), 8395–8402.
- (45) Haemers, T.; Wiesner, J.; Poecke, S. Van; Goeman, J.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Calenbergh, S. Van. Synthesis of α -Substituted Fosmidomycin Analogues as Highly Potent *Plasmodium Falciparum* Growth Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (7), 1888–1891.
- (46) Balasubramaniam, S.; Aidhen, I. The Growing Synthetic Utility of the Weinreb Amide. *Synthesis (Stuttg)*. **2008**, *2008* (23), 3707–3738.
- (47) Comins, D.; Meyers, A. I. A Facile and Efficient Formylation of Grignard Reagents. *Synthesis (Stuttg)*. **1978**, *1978* (05), 403–404.