

Załącznik nr 2

Autoreferat

**Rola i znaczenie wybranych niekowalencyjnych
oddziaływań międzycząsteczkowych w racjonalnym
projektowaniu ligandów receptorów klasy A GPCR**

Rafał Kurczab

Zakład Chemii Leków

Instytut Farmakologii PAN

Kraków, 2019

Spis treści

1. Informacje o autorze	3
2. Informacje o posiadanych dyplomach i uzyskanych stopniach naukowych	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).....	3
4.1. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego	4
4.2. Tytuł osiągnięcia naukowego	5
4.3. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	5
4.4. Podsumowanie dorobku naukowego	9
4.5. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	9
4.5.1. Wprowadzenie	9
4.5.2. Cele badawcze.....	14
4.5.3. Omówienie wyników badań.....	15
4.5.4. Podsumowanie i wnioski	33
4.5.5. Literatura	34
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo–badawczych.....	36
5.1. Omówienie działalności naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora.....	37
5.2. Omówienie działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora	39
5.3. Udział w projektach badawczych	41
5.4. Odbyte szkolenia i kursy.....	43
5.5. Recenzje prac naukowych.....	43
5.6. Staże naukowe	43
5.7. Współpraca naukowa	43
6. Nagrody i wyróżnienia	44
7. Działalność dydaktyczna.....	45
8. Działalność organizacyjna	45

1. Informacje o autorze

Imię i nazwisko: Rafał Kurczab
Stopień naukowy: doktor nauk chemicznych
Telefon służbowy: 126623301
e-mail: kurczab@if-pan.krakow.pl

2. Informacje o posiadanych dyplomach i uzyskanych stopniach naukowych

Doktor nauk chemicznych: Wydział Chemii UJ, Kraków, 2013

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Opracowanie i weryfikacja protokołu wirtualnego skryningu, jako narzędzia wspomagającego proces poszukiwania nowych leków*

Promotor: prof. dr hab. Andrzej J. Bojarski

Magister chemii: Wydział Chemii UJ, Kraków, 2008

Tytuł pracy magisterskiej: *Badanie teoretyczne i spektroskopowe widm oscylacyjnych wiązań wodorowych w kryształach molekularnych kwasu szczawiowego*

Promotor: prof. dr hab. Marek Wójcik

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

Miejsca zatrudnienia:

- 2008–obecnie: Instytut Farmakologii PAN, Zakład Chemii Leków, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków,
- 2012–obecnie: Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Tarnowie, Zakład Chemii, ul. Mickiewicza 8, 33-100 Tarnów.

Zajmowane stanowiska:

- lipiec 2017–obecnie: adiunkt, Instytut Farmakologii PAN, Zakład Chemii Leków,
- październik 2012–obecnie: starszy wykładowca, Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Tarnowie, Zakład Chemii,
- lipiec 2011–czerwiec 2017: asystent, Instytut Farmakologii PAN, Zakład Chemii Leków,
- marzec 2009–czerwiec 2011: pracownik inżyniersko-techniczny, Instytut Farmakologii PAN, Zakład Chemii Leków
- sierpień 2008–luty 2009: stażysta, Instytut Farmakologii PAN, Zakład Chemii Leków.

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

4.1. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego

W 2002 r. ukończyłem I Liceum Ogólnokształcące im. Kazimierza Brodzińskiego w Tarnowie, w klasie o profilu biologiczno-chemicznym. W tym samym roku rozpocząłem studia I-stopnia na kierunku chemia, specjalność chemia stosowana w Państwowej Wyższej Szkole Zawodowej (PWSZ) w Tarnowie. W czasie studiów w PWSZ zacząłem interesować się badaniem oddziaływań międzycząsteczkowych zarówno w prostych, modelowych układach, jak i bardziej złożonych układach biologicznych używając metod obliczeniowych i spektroskopowych. Swoją pracę licencjacką, wykonaną pod opieką dr. hab. Marka Boczara, poświęciłem opracowaniu modelu kwantowo-mechanicznego sprzężenia drgań rozciągających i zginających wiązania wodorowego w dimerze imidazolu. Studia (II-stopnia) kontynuowałem na Wydziale Chemii UJ pod kierownictwem prof. dr hab. Marka Wójcika (Zakład Spektroskopii Molekularnej), gdzie rozwijałem zaproponowaną w pracy licencjackiej kwantową teorię wiązania wodorowego. W tym czasie nawiązałem również współpracę z prof. dr hab. Arturem Michalakiem (Grupa Modelowania Molekularnego Procesów Katalitycznych), dzięki której poszerzyłem swój warsztat badawczy o znajomość metody ETS–NOCV. Metoda ta stała się dodatkowym narzędziem badania natury wiązań wodorowych w różnych układach molekularnych. Wyniki badań wykonanych w czasie studiów II-stopnia opublikowałem w 3 artykułach naukowych w czasopismach z listy JCR (**P41–P43**), byłem autorem 1 posteru prezentowanego na konferencji międzynarodowej, a moja praca magisterska została wyróżniona przez Polskie Towarzystwo Chemiczne w kategorii najlepszych prac magisterskich za 2008 rok ([nagroda im. J. Janikowej](#)).

Od 1 sierpnia 2008 r. odbywałem 6-miesięczny staż w Zakładzie Chemii Leków IF PAN w Krakowie, kierowanym przez prof. dr hab. Andrzeja J. Bojarskiego. Po odbyciu stażu zostałem zatrudniony na stanowisku pracownika inżyniersko-technicznego, a od 2011 do 2017 roku na stanowisku asystenta. Moja działalność naukowa w tym okresie związana była z wykorzystaniem metod (*in silico*) modelowania molekularnego, chemo- i bioinformatycznych w racjonalnym projektowaniu/poszukiwaniu nowych ligandów receptorów monoaminergicznych (głównie serotoninowych 5-HT₇, 5-HT_{1A}, oraz 5-HT₆). W tym czasie byłem intensywnie zaangażowany (jako wykonawca/kierownik zadania) w realizację trzech grantów finansowanych z programu POIG (ModAll, ProKog i DeMeTer), oraz jednego we współpracy z Uniwersytetem w Tromsø (NorPol). Również w tym czasie nawiązałem współpracę z dr. Tomaszem Stefańskim z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, czego wynikiem było otrzymanie wspólnego grantu Opus na poszukiwanie nowych związków o działaniu cytotoksycznym i przeciwnowotworowym w grupie siarkowych pochodnych kombretastatyny A-4. Za moje osiągnięcia naukowe na tym etapie kariery naukowej zostałem uhonorowany stypendium dla najlepszych młodych naukowców [START 2012](#), przyznawanym przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej.

Dnia 30 września 2013 r. na Wydziale Chemii UJ obroniłem rozprawę doktorską pt. *Opracowanie i weryfikacja protokołu wirtualnego skryningu, jako narzędzia wspomagającego proces poszukiwania nowych leków*. Promotorem pracy był prof. dr hab. Andrzej J. Bojarski. Praca doktorska miała charakter interdyscyplinarny i została zrealizowana we współpracy z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi (Wydziałem Farmaceutycznym UJ CM i Uniwersytetem w Tromsø).

W latach 2015–2018 byłem kierownikiem grantu Sonata 8 (UMO-2014/15/D/NZ7/01782) finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki. Projekt dotyczył określenia roli i znaczenia wiązań halogenowych w kompleksach ligand–receptor. Postawiona w projekcie hipoteza o uprzywilejowanych aminokwasach zaangażowanych w tworzenie wiązań halogenowych z ligandami (ang. *halogen bonding hot spots*) została potwierdzona poprzez racjonalne zaprojektowanie i optymalizację kilku grup związków aktywnych wobec wybranych receptorów klasy A GPCR.

W 2015 roku za całokształt moich osiągnięć naukowych otrzymałem stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców (2015–2018).

Od 1 lipca 2017 r. jestem zatrudniony na stanowisku adiunkta w Zakładzie Chemii Leków IF PAN. Głównym przedmiotem mojej działalności naukowej jest badanie metodami teoretycznymi (chemii kwantowej, chemo- i bioinformatyki) natury i znaczenia wybranych niekowalencyjnych oddziaływań międzycząsteczkowych w kompleksach ligand–receptor, tj. wiązań halogenowych, ładunkowo-wspomaganych wiązań wodorowych (tzw. mostków solnych), oraz specyficznej roli fluoru w oddziaływaniach międzycząsteczkowych. Równolegle, w celu zwiększenia skuteczności identyfikacji potencjalnie nowych kandydatów na leki, zajmuję się opracowaniem nowych metod i algorytmów używanych w technologii wirtualnego skringingu komercyjnych i kombinatorycznych baz danych. W tym zakresie, moje główne zainteresowania naukowe skupione są na implementacji metod sztucznej inteligencji (uczenia maszynowego) do tworzenia inteligentnych narzędzi wspomagających proces selekcji nowych kandydatów na leki z jednoczesną minimalizacją potencjalnych działań niepożądanych (oddziaływanie z *off-targetami*). Wynikiem kilkuletnich prac nad tym zagadnieniem, było [otrzymanie finansowania na realizację grantu badawczo–wdrożeńowego Lider IX](#) (finansowanego ze środków NCBiR) na opracowanie polifarmakologicznej platformy skringingowej *in silico* (2019–2021).

Obecnie mój dorobek naukowy obejmuje 43 prace w czasopismach z listy JCR, 1 patent, 4 artykuły popularnonaukowe, 3 prace opublikowane w czasopismach spoza listy JCR. Współczynnik oddziaływania (Impact Factor 2017, IF_A) dla całego dorobku naukowego wynosi 142,365, suma punktów MNiSW 1426. Prace były cytowane 376 razy (298 razy bez autocytowań), a współczynnik Hirscha wynosi 13 (wg. Web of Science). Jestem także współautorem 72 streszczeń konferencyjnych, wygłosiłem 13 referatów ustnych na konferencjach naukowych (w tym 5 w języku angielskim). Moje plany badawcze zakładają kontynuację prac w zakresie wykorzystania metod obliczeniowych (chemia kwantowa, chemo- i bioinformatyka, uczenie maszynowe) w poszukiwaniu nowych kandydatów na leki.

4.2. Tytuł osiągnięcia naukowego

Rola i znaczenie wybranych niekowalencyjnych oddziaływań międzycząsteczkowych w racjonalnym projektowaniu ligandów receptorów klasy A GPCR

4.3. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

* – autorstwo korespondencyjne habilitanta,

IF_A – aktualny współczynnik oddziaływania podany za rok 2017,

IF_{5letni} – średni pięcioletni współczynnik oddziaływania,

IF_{rok wydania} – współczynnik oddziaływania podano wg JCR zgodnie z rokiem opublikowania,
 cyt. – liczba cytowań wg Web of Science z dn. 25.01.2019,
 MNiSW- aktualna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Lp

Kurczab R.,* Śliwa P., Rataj K., Kafel R., Bojarski A. J.

The salt bridge in ligand-protein complexes - systematic theoretical and statistical investigations

J. Chem. Inf. Model., **2018**, 58, 2224–2238.

H1 IF_A=3,804 IF_{5letni}=4,112 IF₂₀₁₇=3,804 cyt=0 MNiSW=40

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu całej koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu przeszukiwania baz danych (PDB, CSD, DrugBank, ChEMBL, GPCRdb), opracowaniu i implementacji algorytmu (autor kodu programu) do skanowania sferycznego mostka solnego, wykonaniu części obliczeń kwantowo-mechanicznych, dokowaniu molekularnym, przygotowaniu większości rysunków i tabel, interpretacji otrzymanych wyników, napisaniu publikacji, korespondencji z edytorem i recenzentami, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.

Kurczab R.,* Canale V., Satała G., Zajdel P., Bojarski A. J.

Amino acid hot spots of halogen bonding—a combined theoretical and experimental case study of the 5-HT₇ receptor

J. Med. Chem., **2018**, 61, 8717–8733.

H2 IF_A=6,253 IF_{5letni}=5,900 IF₂₀₁₇=6,253 cyt=0 MNiSW=45

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich badań *in silico*, przygotowaniu wszystkich rysunków i większości tabel do publikacji, interpretacji otrzymanych wyników, napisaniu i edycji tekstu publikacji, korespondencji z edytorem i recenzentami, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Publikacja jest drugą z cyklu kilku publikacji raportujących wyniki grantu SONATA, którego habilitant był kierownikiem. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.

Kurczab R.*

The evaluation of QM/MM-driven molecular docking combined with MM/GBSA calculations as a halogen-bond scoring strategy

H3 *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.*, **2017**, B73, 188–194.

IF_A=6,467 IF_{5letni}=4,173 IF₂₀₁₇=6,467 cyt=8 MNiSW=30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich badań, przygotowaniu wszystkich rysunków, interpretacji otrzymanych wyników, napisaniu publikacji, korespondencji z edytorem i recenzentami, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Publikacja jest pierwszą z cyklu kilku publikacji raportujących wyniki grantu SONATA,

którego habilitant był kierownikiem.

Kurczab R., Ali W., Łażewska D., Kotańska M., Jastrzębska-Więsek M., Satała G., Więcek M., Lubelska A., Latacz G., Partyka A., Starek M., Dąbrowska M., Wesołowska A., Jacob C., Kieć-Kononowicz K., Handzlik J.

Computer-aided studies for novel arylhydantoin 1,3,5-triazine derivatives as 5-HT₆ serotonin receptor ligands with antidepressive-like, anxiolytic and antiobesity action in vivo

H4 *Molecules* **2018**, *23* (10), 2529.

IF_A=3,098 IF_{5letni}=3,268 IF₂₀₁₇=3,098 cyt=0 MNiSW=30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich badań *in silico* (modelowanie homologiczne, dokowanie molekularne, analiza otrzymanych kompleksów L–R pod kątem roli wiązania halogenowego w różnicowaniu aktywności biologicznej badanej biblioteki związków), przygotowaniu rysunków 1 i 8, interpretacji otrzymanych wyników, współudziale w pisaniu i edycji publikacji, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 35 %.

Hogendorf A. S., Hogendorf A., **Kurczab R.**, Satała G., Lenda T., Walczak M., Latacz G., Handzlik J., Kieć-Kononowicz K., Wierońska J. M., Woźniak M., Cieślik P., Bugno R., Staroń J., Bojarski A. J.

Low-basicity 5-HT₇ receptor agonists synthesized using the van Leusen multicomponent protocol

H5 *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 1444.

IF_A=4,122 IF_{5letni}=4,609 IF₂₀₁₇=4,122 cyt=3 MNiSW=40

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu wszystkich badań *in silico* (modelowanie homologiczne, dokowanie molekularne, analiza otrzymanych kompleksów L–R pod kątem roli wiązania halogenowego w różnicowaniu aktywności biologicznej badanej biblioteki związków), przygotowaniu rysunków 6 i 8, interpretacji otrzymanych wyników, współudziale w pisaniu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 25 %.

Partyka A., **Kurczab R.**, Canale V., Satała G., Marciniec K., Pasierb A., Jastrzębska-Więsek M., Pawłowski M., Wesołowska A., Bojarski A. J., Zajdel P.

H6 The impact of the halogen bonding on D₂ and 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptor activity of azinesulfonamides of 4-[(2-ethyl)piperidiny-1-yl]phenylpiperazines with antipsychotic and antidepressant properties

Bioorg. Med. Chem., **2017**, *25*, 3638–3648.

IF_A=2,881 IF_{5letni}=2,911 IF₂₀₁₇=2,881 cyt=3 MNiSW=30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu wszystkich badań *in silico* (modelowanie homologiczne, dokowanie molekularne, analiza otrzymanych kompleksów L–R pod kątem roli wiązania halogenowego w różnicowaniu aktywności biologicznej badanej biblioteki związków), przygotowaniu rysunków 4 i 5, interpretacji otrzymanych wyników symulacji, współudziale w pisaniu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 40 %.

Grychowska K., **Kurczab R.**, Śliwa P., Satała G., Dubiel K., Matłoka M., Moszczyński-Pętkowski R., Pieczykolan J., Bojarski A. J., Zajdel P.

Pyrroloquinoline scaffold-based 5-HT₆R ligands: synthesis, quantum chemical and molecular dynamic studies, and influence of nitrogen atom position in the scaffold on affinity

Bioorg. Med. Chem., **2018**, 26, 3588–3595.

H7

IF_A=2,881 IF_{5letni}=2,911 IF₂₀₁₇=2,881 cyt=1 MNiSW=30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu wszystkich badań *in silico* (modelowanie homologiczne, dokowanie molekularne, symulacje metodami dynamiki molekularnej, analiza otrzymanych kompleksów L–R pod kątem roli wiązania halogenowego w różnicowaniu aktywności biologicznej badanej biblioteki związków), przygotowaniu rysunków 6 i 7, interpretacji otrzymanych wyników, współudziale w pisaniu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 35 %.

Canale V., Guzik P., **Kurczab R.**, Verdie P., Satała G., Pawłowski M., Martinez J., Subra G., Bojarski A. J., Zajdel P.

Solid-supported synthesis, molecular modeling, and biological activity of long-chain arylpiperazine derivatives with cyclic amino acid amide fragments as 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptor ligands

Eur. J. Med. Chem., **2014**, 78, 10–22.

H8

IF_A=4,816 IF_{5letni}=4,527 IF₂₀₁₄=3,432 cyt=18 MNiSW=40

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu wszystkich badań *in silico* (modelowanie homologiczne, dokowanie molekularne, analiza otrzymanych kompleksów L–R pod kątem roli wiązania halogenowego w różnicowaniu aktywności biologicznej badanej biblioteki związków), przygotowaniu rysunku 6, interpretacji otrzymanych wyników, współudziale w pisaniu publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 35 %.

Podsumowanie cyklu publikacji

- Suma IF_{rok wydania}: **32,938**
- Średni IF_{rok wydania}: **4,117**

- Suma punktów MNiSW : 285

4.4. Podsumowanie dorobku naukowego

Liczba publikacji opublikowanych w czasopismach z bazy Journal Citation Reports		43
Liczba publikacji opublikowanych w czasopismach z bazy Journal Citation Reports po uzyskaniu stopnia doktora		36
Sumaryczny IF _A		142,365
Średni IF _A		3,311
Suma punktów MNiSW		1426
Liczba cytowań wg Web of Science (dane z dn. 25.01.2019)	wszystkich	376
	bez autocytowań	298
Liczba cytowań wg Scopus (dane z dn. 25.01.2019)	wszystkich	399
	bez autocytowań	319
Indeks Hirscha H (dane z 25.01.2019)	Web of Science	13
	Scopus	12
Autor korespondencyjny w publikacjach		5
Publikacje popularnonaukowe		4
Patenty, zgłoszenia patentowe, wdrożenia		2
Liczba projektów badawczych, w tym:	kierownik projektu	3
	kierownik zadania	5
	wykonawca	11
Wykłady na zaproszenie wygłoszone przez habilitanta		7
Prezentacje ustne wygłoszone osobiście		6
Współautorstwo wystąpień konferencyjnych		72
Recenzje projektów badawczych		1
Recenzje publikacji naukowych		15

4.5. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.5.1. Wprowadzenie

Komputerowo-wspomagane projektowanie leków (CADD) jest współcześnie nieodłącznym elementem procesu odkrywania nowego leku. Skuteczność tych metod została wielokrotnie potwierdzona, a z roku na rok pojawia się coraz więcej nowych i wydajnych algorytmów.¹⁻⁷ Jednym z podstawowych zastosowań metod CADD jest ocena kompleksu powstającego przez oddziaływanie cząsteczki potencjalnego leku z aminokwasami tworzącymi miejsce aktywne receptora (Rysunek 1). Na poziomie molekularnym, za tworzenie stabilnego kompleksu odpowiadają oddziaływania międzycząsteczkowe (zarówno kowalencyjne jak i niekowalencyjne). Zrozumienie natury oddziaływań wiążących cząsteczkę

leku z receptorem pozwala prawidłowo przewidzieć m.in. mechanizm jego działania oraz racjonalnie projektować nowe związki chemiczne o pożądanej aktywności biologicznej. Tworzenie kompleksu ligand-receptor (L–R) rozpoczyna się podczas zbliżania się liganda do receptora, gdy w pierwszej kolejności „włączają się” oddziaływania dalekiego zasięgu (elektrostatyczne), następnie dołączają oddziaływania krótkiego zasięgu (tj. wiązania wodorowe, halogenowe, oddziaływania polarne oraz van der Waalsa). Otrzymanie końcowego kompleksu L–R indukuje zmiany konformacji zarówno w strukturze liganda, jak i receptora. Stabilność powstałego kompleksu można opisać za pomocą stałej powinowactwa (K_d):

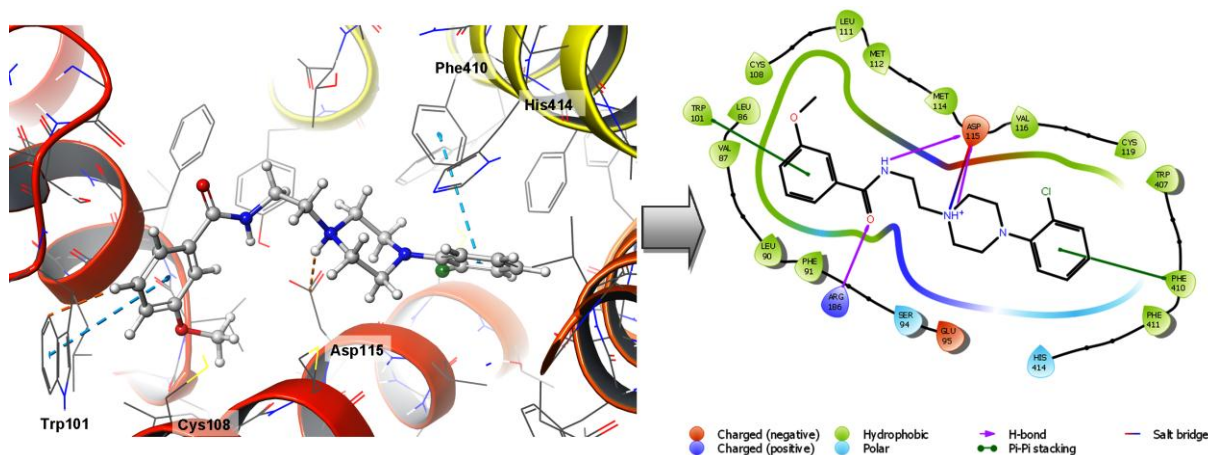
$$K_d = \Delta H - T\Delta S$$

w tym wyrażeniu, przyczynek entalpowy (ΔH) opisuje klasyczne oddziaływania międzycząsteczkowe (elektrostatyczne, wiązania wodorowe, halogenowe, itd.), natomiast przyczynek entropowy ($T\Delta S$) opisuje globalne efekty zachodzące w strukturze kompleksu L–R (np. utraty elastyczności molekuł oraz kompensowanie uporządkowania cząsteczek wody po związaniu liganda).⁸

Do chwili obecnej, teoretycznie i eksperymentalnie scharakteryzowanych zostało wiele oddziaływań międzycząsteczkowych, mimo to nadal pojawia się wiele doniesień naukowych pokazujących odkrycie nowych zastosowań/właściwości dla znanych oraz nowych typów oddziaływań – co oznacza, że badania podstawowe i aplikacyjne są nadal potrzebne w tym obszarze. Przykładowo, w ostatnim czasie, w strategii projektowania nowych leków coraz więcej uwagi poświęca się mniej znanym oddziaływaniom niekowalencyjnym, tj.: wiązaniom halogenowym, wiązaniom fluorowym, anion- π oraz wiązaniom di-wodorowym.

Obecnie, firmy farmaceutyczne szeroko wykorzystują zaawansowane techniki obliczeniowe w celu skrócenia czasu trwania oraz obniżenia kosztów rozwoju nowych leków. Jedną z głównych metod jest szacowanie energii oddziaływania ligand–receptor, na podstawie procedury dokowania i obliczenia wartości funkcji oceniającej (ang. *scoring function*).^{9–12} Większość stosowanych funkcji oceniających bazuje na dostępnych polach siłowych, za pomocą których obliczana jest suma przyczynków energetycznych do oddziaływania L–R, tj. elektrostatycznego, van der Waalsa, wiązań wodorowych, solwatacji oraz przyczynków entropowych. Takie podejście ograniczone jest jednak do zastosowanego pola siłowego, które może „nie rozpoznawać” wszystkich typów oddziaływań molekularnych. Właściwe określenie przyczynków stabilizujących i destabilizujących takie oddziaływanie ma w wielu eksperymentach decydujący wpływ na decyzję o dalszych losach danego związku w projekcie (np. wybór związków do badań *in vitro* na podstawie wyników wirtualnego skriningu).

Pośrednio, informacje o typach istotnych oddziaływań w procesie formowania kompleksu ligand–receptor wykorzystywane są także podczas tworzenia modeli farmakoforowych.



Rysunek 1. Różne sposoby reprezentacji oddziaływań międzycząsteczkowych w kompleksach ligand–receptor (po lewej w postaci struktury trój-wymiarowej oraz dwu-wymiarowej mapy po prawej stronie). Do sporządzenia tego poglądowego rysunku wykorzystano wyniki dokowania molekularnego jednego ze znanych antagonistów receptora D₄ do struktury krystalicznej (PDB ID: 5MIU).

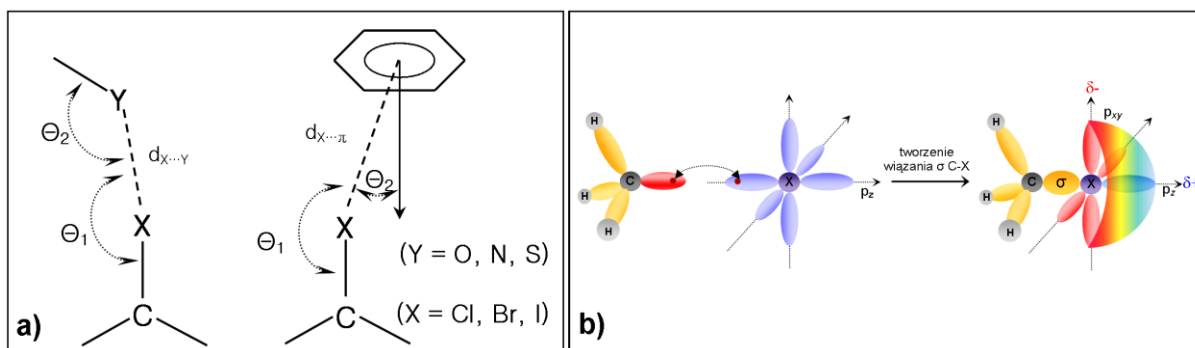
Wszystkie dostępne dziś algorytmy do budowy hipotez farmakoforowych mają zdefiniowany podobny zbiór typów oddziaływań (tj.: jonowe, wodorowe, hydrofobowe, aromatyczne, dipol–dipol, itd.), co powoduje, że otrzymywane modele charakteryzują się ograniczoną specyficznością. Istotny wpływ na poprawę skuteczności identyfikacji nowych związków biologicznie aktywnych można osiągnąć przez uwzględnienie dodatkowych typów oddziaływań (np. halogenowe, anion- π , itp.).

Wiązania halogenowe

Wiązanie halogenowe (*X-bond*, XB) $C-X \cdots Y$ można zdefiniować (Rysunek 2a) jako oddziaływanie kierunkowe między atomem halogenu (X) wiązania C-X (kwas Lewisa, akceptor) a dowolną zasadą Lewisa (Y, donor). Kompletny model wiązania halogenowego zaproponowany został przez Politzera, Murraya i Clarka.^{13–15} W tym modelu, mechanizm tworzenia wiązania halogenowego jest tłumaczony anizotropią gęstości elektronowej atomu halogenu w wiązaniu C-X, która powoduje, że na powierzchni halogenu pojawiają się obszary o dodatnim (σ -dziura) i ujemnym potencjale elektrostatycznym (Rysunek 2b). W wyniku tego zjawiska atom halogenu wykazuje dwojaką naturę, z jednej strony może pełnić rolę kwasu Lewisa (np. w wiązaniu halogenowym), a z drugiej zasady Lewisa (np. w wiązaniu wodorowym, jako akceptor protonu). W konsekwencji prowadzi to do oddziaływań przyciągających między grupą C-X a klasycznymi akceptorami wiązań wodorowych. Należy również zaznaczyć, iż nie udowodniono jednoznacznie istnienia wiązań halogenowych zawierających atom fluoru i znane są tylko takie, które zawierają chlor, brom lub jod.¹⁶ Obliczenia kwantowo-mechaniczne wskazują jako przyczynę brak σ -dziury, co w konsekwencji uniemożliwia oddziaływanie elektrostatyczne z donorem.

Siła wiązań halogenowych jest porównywalna ze słabymi oraz średnimi wiązaniami wodorowymi i zmienia się w zakresie 5–180 kJ/mol.¹⁷ Wiele parametrów geometrycznych ma istotny wpływ na występowanie i siłę wiązań halogenowych. Na podstawie analizy kompleksów L–R z bazy PDB,^{18–20} w których zidentyfikowano wiązania halogenowe, sformułowano następujące ogólne wnioski dotyczące tych wiązań:

- optymalna długość wiązania halogenowego $d_{X\cdots Y}$ wynosi 3,06, 3,15 oraz 3,24 Å odpowiednio dla chloru, bromu i jodu. Należy jednak zaznaczyć, że fluktuacje długości wiązania (wydłużenie/skrócenie) powodują zredukowanie jego siły (np. skrócenie odległości jodobenzenu względem donora o 0,5 Å powoduje zanik oddziaływania, natomiast wydłużenie o 0,9 Å jego osłabienie o około 50% w stosunku do wartości osiągananej przy optymalnej odległości),
- wartość kąta Θ_1 wykazuje dwa maksima, pierwsze $\sim 160\text{--}170^\circ$ oraz drugie przy $\sim 145\text{--}150^\circ$,
- dystrybucja wartości kąta Θ_2 wykazuje maksimum przy 120° ,
- najczęściej obserwowanym wiązaniem halogenowym w układach biologicznych jest $C\text{--}X\cdots O=C$ (43,6%, 25,2% oraz 15,3% wszystkich zidentyfikowanych wiązań halogenowych odpowiednio dla $X=\text{Cl}$, Br , I) oraz $C\text{--}X\cdots \text{Ar}$ (Tyrozyna) (22,3%, 3,8% oraz 2,4% dla Cl , Br , I).



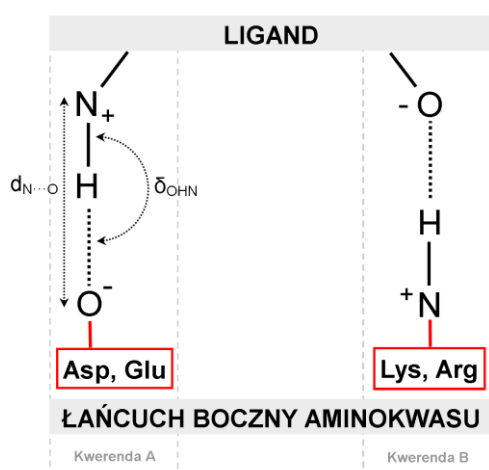
Rysunek 2. Modele wiązań halogenowych typu $C\text{--}X\cdots Y$ oraz $C\text{--}X\cdots \pi$ obserwowanych w układach biologicznych (a), model powstawania σ -dziury (b); obszary o najbardziej dodatnim i ujemnym potencjale elektrostatycznym oznaczono odpowiednio kolorami czerwonym oraz niebieskim.^{H2}

Siłę oddziaływania atomu X z donorem można regulować przez: wymianę atomu fluorowca (wzrasta w szeregu $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$; obliczenia kwantowe wskazują jako powód powiększenie σ -dziury i przez to wzrost oddziaływania przyciągającego $X\cdots Y^{16}$), wprowadzenie do podstawionego halogenem rdzenia molekularnego dodatkowych podstawników „wyciągających” elektrony (np. zastąpienie atomów wodoru w chlorobenzenie atomami fluoru zwiększa siłę wiązania halogenowego nawet kilkukrotnie^{21–23}) oraz podmianę rdzenia molekularnego z którym związany jest atom halogenu (zastąpienie pierścienia benzenowego, pirydyną lub tiofenem spowodowało zwiększenie aktywności biologicznej związków).²⁴

W ostatnich latach wiązania halogenowe były z powodzeniem stosowane w racjonalnym projektowaniu struktury wiodącej, jak i optymalizacji jej aktywności biologicznej. Jako przykład można przytoczyć 200-krotne zwiększenie powinowactwa zanotowane dla serii inhibitorów kinazy adenozynowej przy zmianie wodoru na atom jodu, podczas gdy zastąpienie wodoru na atom chloru spowodowało tylko 34-krotny wzrost powinowactwa.²⁵ Innym przykładem jest ponad 300-krotna różnica powinowactwa przy zamianie wodoru na atom jodu zanotowana w serii inhibitorów HIV RT (gdzie zauważono, że karbonylowy atom tlenu Tyr188 tworzy wiązanie halogenowe z atomem jodu).²⁶

Ładunkowo-wspomagane wiązania wodorowe (mostek solny)

W oparciu o klasyfikację układów z wiązaniem wodorowych zaproponowaną przez Gilli i wsp.,^{27–29} zwyczajowo przyjęte określenie „mostek solny” odpowiada w niej podwójnie ładunkowo-wspomaganemu wiązaniu wodorowemu ($\pm$)CAHB, które definiuje się jako oddziaływanie niekowalencyjne powstające między dwiema zjonizowanymi cząsteczkami. Mostek solny w swojej naturze miesza dwa przyczynki, tj. pochodzące od klasycznego wiązania wodorowego (oddziaływanie między grupą protono-donorową, a protono-akceptorową) oraz elektrostatycznego (poprzez podwójne wspomaganie ładunkowe, pojawia się oddziaływanie przyciągające między ładunkami o przeciwnych znakach). W kompleksach ligand–receptor mostek solny (Rysunek 3) może zostać utworzony w wyniku migracji protonu z łańcucha bocznego aminokwasu zawierającego grupę karboksylową do grupy aminowej liganda (w drugim przypadku, z cząsteczki liganda zawierającego grupę karboksylową na aminową grupę łańcucha bocznego aminokwasu) – stąd można poniekąd wnioskować, iż zbliżające się ligandy występują w postaci zjonizowanej.



Rysunek 3. Schemat możliwych konfiguracji w ładunkowo-wspomaganych wiązań wodorowych typu ($\pm$)CAHB (tzw. mostków solnych) występujących w kompleksach ligand–receptor.^{H1}

Szereg badań potwierdza, że miejsce wiążące ligandy w aminergicznym GPCR znajduje się w części transbłonowej receptora i składa się głównie z reszt aminokwasowych odcinków transbłonowych helis TM 3, 5, 6 i 7. Wiele doniesień naukowych oraz analiz struktur krystalicznych GPCR wskazuje, że kwas asparaginowy Asp3.32, występuje w miejscu wiążącym wszystkich receptorów aminergicznym i jest kluczowy w tworzeniu kompleksu L–R.^{30–32} Kwas asparaginowy działa jako przeciwnon dla protonowanego fragmentu aminowego cząsteczki i odpowiada za prawidłową orientację liganda w miejscu wiążącym.³³

Do tej pory nie istniały w literaturze naukowej systematyczne opracowania związane z preferencjami geometrycznymi, występowaniem, oraz naturą ładunkowo-wspomaganych wiązań wodorowych w kompleksach ligand–receptor.

Receptory sprzężone z białkami G (G-protein-coupled receptors, GPCRs)

Receptory GPCR stanowią aktualnie największą (ok. 800 różnych typów receptorów) i funkcjonalnie najbardziej zróżnicowaną grupę receptorów, która wykazuje wspólny schemat budowy: tworzy je siedem odcinków transbłonowych (TM1–7) połączonych trzema pętlami zewnątrzkomórkowymi (ECL1–3) i trzema pętlami wewnątrzkomórkowymi (ICL1–3).^{34,35} Zakończenie łańcucha białkowego z wolną grupą aminową znajduje się na zewnątrz,

natomiast C-koniec skierowany jest do wewnątrz komórki. Receptory te rozpoznają szeroki zbiór ligandów, tj. od protonów, przez małe cząsteczki po białka. Białka GPCR związane są z wieloma procesami fizjologicznymi oraz patologicznymi i z tego powodu stanowią aktualnie cel terapeutyczny dla ponad 30% wszystkich leków.^{36–38} Analiza sekwencji oraz funkcji wszystkich GPCR doprowadziła do podzielenia tej rodziny białek na pięć klas (A–F).³⁹ Najliczniejsza jest klasa A (to klasa receptorów rodopsyno-podobnych, *rhodopsin like*), obejmująca ponad 80% wszystkich GPCR. Receptory wchodzące w skład tej grupy są jednymi z najlepiej zbadanych. Zaliczamy do nich, obok rodopsyny, między innymi: receptory adrenergiczne, opioidowe, adenozynowe, kanabinoidowe, receptory chemokin, dopaminowe i histaminowe.

4.5.2. Cele badawcze

Osiągnięcie naukowe, stanowiące podstawę mojego wniosku habilitacyjnego, dotyczy określenia roli i znaczenia wybranych oddziaływań niekowalencyjnych w kompleksach ligand–receptor na przykładzie rodziny A receptorów sprzężonych z białkiem G. Spośród wszystkich znanych oddziaływań międzycząsteczkowych skupiłem się na szczegółowym badaniu dwóch, lecz specyficznych oddziaływań – halogenowego oraz ładunkowo-wspomagane wiązania wodorowego. Głównym zadaniem badawczym było określenia roli i znaczenia tych oddziaływań w kompleksach ligand–receptor oraz wykorzystanie tych informacji w racjonalnym projektowaniu nowych ligandów wybranych receptorów monoaminergicznych GPCR (wybór receptorów podyktowany był równolegle prowadzonymi projektami oraz dostępnymi w Zakładzie Chemii Leków IF PAN testami *in vitro*). Cele szczegółowe można sformułować następująco:

- badania natury oddziaływań metodami chemii obliczeniowej (metody chemii kwantowej, dynamika molekularna, dokowanie molekularne),
- badanie preferencji geometrycznych (odległość, kąt) oddziaływań halogenowych i mostków solnych, jakie obserwowane są w kompleksach ligand–receptor (analiza molekularna i statystyczna kompleksów znajdujących się w bazie PDB),
- opracowanie nowych algorytmów/narzędzi wspomagających racjonalne projektowanie nowych związków biologicznie aktywnych, poprzez implementacje preferencji znalezionych na gruncie badań teoretycznych,
- przetestowanie opracowanych narzędzi oraz hipotez związanych z wpływem danego oddziaływania niekowalencyjnego na aktywność związku względem danego receptora na przykładzie wybranych grup związków chemicznych.

Cykl stanowiący moje osiągnięcie habilitacyjne obejmuje 8 publikacji opracowanych w latach 2014–2018. Nowatorstwo otrzymanych w ramach przedstawionego cyklu wyników badań polega na wykazaniu znaczenia wybranych oddziaływań niekowalencyjnych (wiązanie halogenowe oraz mostek solny) w racjonalnym projektowaniu związków aktywnych biologicznie, zarówno dla specyficznych grup receptorów (np. mostek solny w monoaminergicznych receptorach GPCR jest kluczowy dla aktywności), jak i w dowolnej klasie receptorów (podstawniki halogenowe są najczęściej stosowaną przez chemików modyfikacją/”dekoracją” struktury wiodącej, zatem celowane „wstawienie” podstawnika

halogenowego, tak aby utworzył dodatkowe oddziaływanie stabilizujące kompleks ligand–receptor, może wielokrotnie poprawić aktywność związku w porównaniu do struktury wyjściowej).

Badania te były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu SONATA 8 realizowanego w latach 2015–2018 oraz z funduszy statutowych Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie.

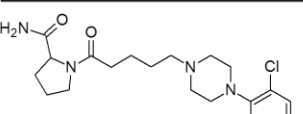
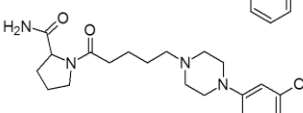
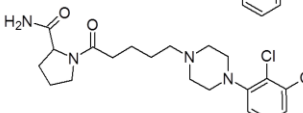
4.5.3. Omówienie wyników badań

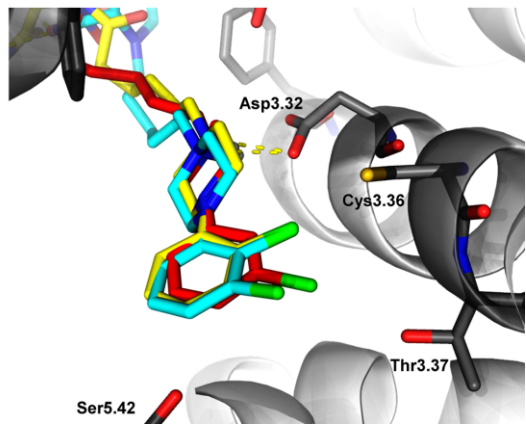
Przyjęty schemat badań zakładał, w skrócie, opracowanie narzędzi (chemo- i bioinformatycznych) wspomagających badania teoretyczne nad rolą i znaczeniem wybranych oddziaływań niekowalencyjnych na przykładzie wybranych receptorów klasy A GPCR. Opracowana metodologia/narzędzia (wyniki badań teoretycznych) zostały kolejno zweryfikowane na płaszczyźnie eksperymentalnej przez racjonalne projektowanie lub/i optymalizację struktury kilku rdzeni molekularnych oraz wytłumaczenie otrzymanych zależności między strukturą a aktywnością (SAR) względem kilku wybranych receptorów monoaminergicznych GPCR (tj. 5-HT_{1A}, 5-HT₆, 5-HT₇, D₂). Tak przyjęty schemat badań ma swoje odzwierciedlenie w prezentowanym cyklu publikacyjnym. Trzon cyklu stanowią 3 prace metodologiczne, w których byłem głównym autorem koncepcji badań (**H1–H3**). W pracach tych zaprezentowano główne wyniki badań teoretycznych (algorytmy, narzędzia, analizy statystyczne, obliczenia kwantowo-mechaniczne). Kolejne 5 publikacji to przykłady aplikacji wiedzy i narzędzi na płaszczyźnie eksperymentalnej (**H4–H8**), gdzie byłem współautorem koncepcji badań oraz jedynym autorem fragmentów publikacji poświęconych badaniom teoretycznym (*in silico*).

Geneza podjęcia badań nad rolą i znaczeniem wiązań halogenowych

Idea podjęcia szerszych badań nad rolą i znaczeniem wiązań halogenowych była wynikiem współpracy w wykonaniu analizy zależności między strukturą a aktywnością względem receptora 5-HT₇ dla serii długołańcuchowych pochodnych arylopiiperazyn z fragmentami terminalnymi o charakterze amidów cyklicznych aminokwasów (**H8**). Część pochodnych zawierała podstawniki halogenowe we fragmencie fenylopiiperazyny (analogi 2-Cl, 3-Cl i 2,3-di-Cl), dla których wykonałem szczegółową analizę *in silico* ich kompleksów L–R otrzymanych przez dokowanie molekularne do modeli homologicznych receptora. Zaobserwowano istotną preferencję pochodnych halogenowych do oddziaływania z łańcuchami bocznymi Cys3.36 i Thr3.37. Zgodnie z tymi wynikami, słabe oddziaływanie pochodnej 2-Cl z Cys3.36 (tylko jedno wiązanie halogenowe o długości $d(S\cdots Cl) = 3,5 \text{ \AA}$ i kącie σ -dziury = 145°) było przyczyną niskiego powinowactwa do 5-HT₇R ($K_i = 1312 \text{ nM}$). Przesunięcie atomu Cl z pozycji 2 na pozycję 3 stworzyło warunki do utworzenia silnego wiązania halogenowego z Cys3.36 (odległość $d(S\cdots Cl)$ i kąt σ -dziury były odpowiednio równe 3,4 $\text{\AA}$ i 146°) oraz słabego wiązania halogenowego ($d(O\cdots Cl)$ i kąt σ -dziury były odpowiednio 4,0 $\text{\AA}$ i 130°) z Thr3.37. Dodatkowo dla pochodnej 2,3-di-Cl zaobserwowano utworzenie sieci wiązań halogenowych o różnej sile (długość wiązania i kąt σ -dziury wahały się odpowiednio od 3,6–4,6 $\text{\AA}$ i 122–154°). Pochodna 2,3-di-Cl wykazywała wyższe powinowactwo niż pochodne 3-Cl i 2-Cl (K_i = odpowiednio 179, 478 i 1312 nM). Co

ciekawe, analogi 2,3-di-Cl wykazały wyraźniejszy przyczynek pochodzący od wiązań halogenowych w oddziaływaniach z receptorem 5-HT_{1A}.

Związek	K _i [nM]	
	5-HT ₇	5-HT _{1A}
	1312	232
	478	38
	179	4

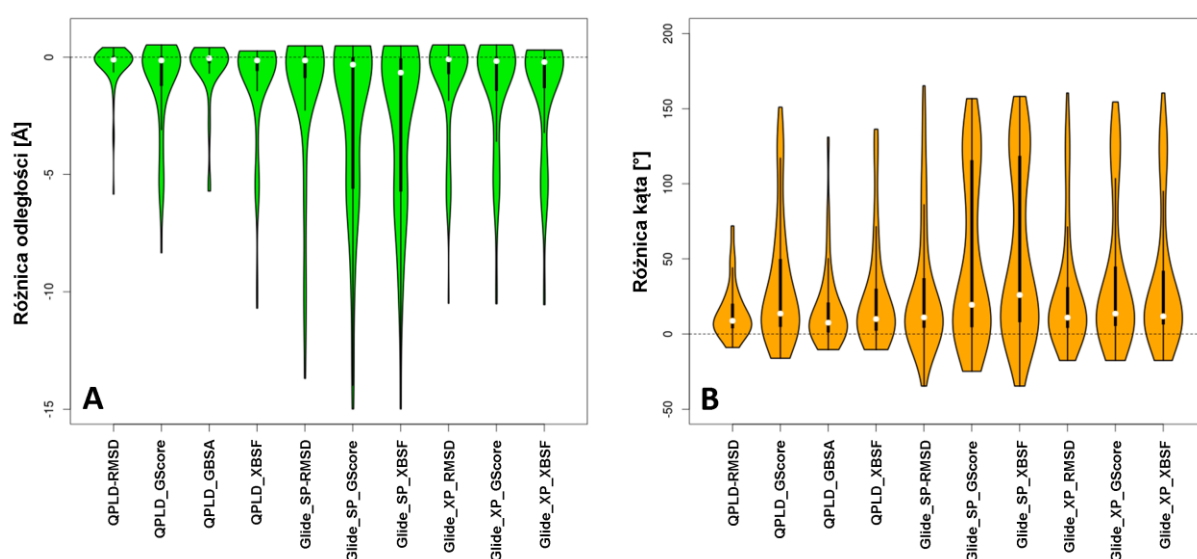


Rysunek 3. Wpływ miejsca podstawienia atomem chloru we fragmencie aryloperazyny na modelowanie ich aktywność biologicznej względem receptorów 5-HT₇ i 5-HT_{1A}. Potencjalny mechanizm molekularny odpowiedzialny za różnicowanie aktywności względem receptora 5-HT₇ w grupie chloro-pochodnych (2,3-di-Cl – niebieski, 2-Cl – żółty, 3-Cl – czerwony) – tworzenie wiązania halogenowego z łańcuchami bocznymi aminokwasów Cys3.36 i/lub Thr3.37.^{H8}

Jak istotne jest uwzględnienie anizotropii rozkładu gęstości elektronowej dla atomu halogenu w procedurze dokowania molekularnego?

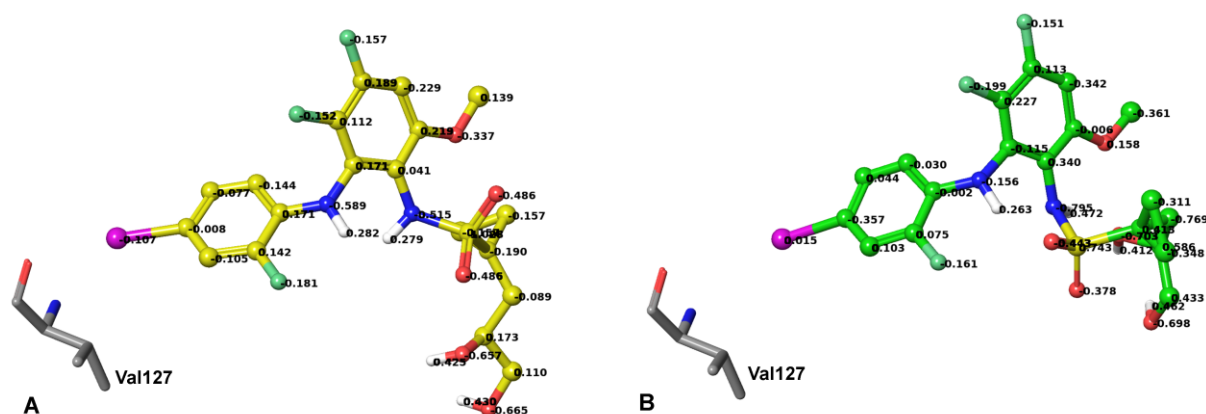
Na podstawie przytoczonych powyżej wyników badań wstępnych oraz faktu, iż rola atomu halogenu w oddziaływaniach międzycząsteczkowych nie została jeszcze dobrze wyjaśniona, napisałem wniosek i otrzymałem finansowanie na realizację projektu poświęconego badaniom teoretycznym i eksperymentalnym wiązań halogenowych w układach biologicznych (program SONATA 8 realizowany w latach 2015–2018). Pierwszym moim zadaniem badawczym wykonanym w ramach grantu było zaprojektowanie (utworzenie odpowiednich skryptów automatyzujących obliczenia) i wykonanie bardzo rozległych testów różnych podejść do dokowania molekularnego ligandów zawierających atom halogenu. W chwili składania wniosku grantowego żadne oprogramowanie specjalistyczne do dokowania molekularnego nie uwzględniało zjawiska powstawania anizotropii gęstości elektronowej dla atomów halogenu (nie dotyczy atomu F). Wskazywało to na pomijanie roli σ -dziury, a tym samym możliwości tworzenia wiązania halogenowego w kompleksach ligand–receptor. Wybór odpowiedniego algorytmu dokowania był istotny, głównie dlatego, iż miał on stanowić kluczowy element metodologii używanej w dalszych etapach realizacji zadań *in silico*. Badania wykonałem przy użyciu algorytmów komercyjnych (Glide na poziomie SP i XP, Schrödinger⁴⁰) oraz niekomercyjnych (AutoDock VinaXB; jeden z pierwszych algorytmów uwzględniający człon energetyczny do funkcji oceniającej pochodzący od wiązania halogenowego⁴¹) do dokowania oraz zaproponowanego podejścia łączącego dokowanie QM/MM (ligand traktowany na poziomie kwantowym, otoczenie – aminokwasy na poziomie pola sił OPLS3⁴²) z modelem GBSA (*Generalized Born Surface Area*)⁴³ szacowania entalpii swobodnej oddziaływania ligand–receptor. W tym celu wykorzystałem protokół dokowania QM/MM z pakietu Schrödinger QPLD (*QM-Polarized Ligand Docking*)^{44,45}, w którym przy użyciu metod chemii kwantowej (*ab initio* lub DFT) obliczane są ładunki formalne na atomach liganda. Do oceny skuteczności (tj. RMSD, różnice

między długością i kątem wiązania halogenowego zmierzone w kryształach i otrzymane z dokowania) testowanych podejść użyłem zbioru 106 kompleksów z bazy PDB (przykłady zawierały identyczne ilości kompleksów dla każdego z halogenów: Cl, Br, I), w których występowało co najmniej jedno wiązanie halogenowe między ligandem a receptorem (ten sam zbiór kompleksów L–R był wcześniej użyty do testowania wersji algorytmu AutoDock VinaXB, implementującego wiązania halogenowe do procesu dokowania⁴¹). Wygenerowane w wyniku zastosowania użytych procedur dokowania kompleksy L–R zostały krzyżowo ocenione przez: kryterium najniższego RMSD, funkcję Glide Score, XBSF (funkcja oceniająca z programu AutoDock VinaXB) oraz wartość ΔG kompleksu uzyskaną przy użyciu algorytmu GBSA (Rysunek 4). Wyniki obliczeń pokazały, że kombinacja metody dokowania QM/MM i oceny GBSA znacząco lepiej odtwarza natywne geometrie kompleksów ligand–receptor z wiązaniem halogenowym.



Rysunek 4. Wykresy skrzypcowe przedstawiające rozkład różnic długości wiązania halogenowego (A) i kąta σ -dziury (B) obliczone pomiędzy najlepszym kompleksem przewidzianym przez daną metodę oceny (scoringu) a geometrią natywną danego kompleksu z PDB. Linia kropkowana (o wartości 0) oznaczono brak różnicy w geometrii wiązań halogenowych pomiędzy geometrią odtwarzanego i natywnego kompleksu L–R.^{H3}

Otrzymane wyniki dostarczyły jasnych dowodów na to, jak istotne jest uwzględnienie na etapie dokowania właściwej metody przypisywania ładunków formalnych atomom liganda – standardowo stosowane w programach do dokowania pola siłowe nie uwzględniały anizotropii gęstości elektronowej powstającej na atomach halogenu i przez to przypisywane wartości ładunków były niewłaściwe. Z kolei w procedurze dokowania QM/MM ładunki na poszczególnych atomach są obliczane na gruncie kwantowo-mechanicznym, co prowadzi do zgodnego z teorią opisu rozkładu ładunku na atomach X (Rysunek 5).

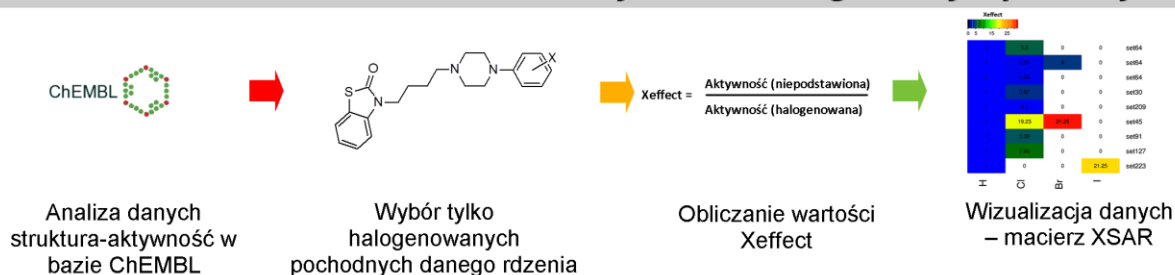


Rysunek 5. Porównanie cząstkowych ładunków atomowych dla fragmentu kompleksu L–R (PBD: 3E8N) przypisanych przez pole sił OPLS3 (A, dokowanie za pomocą algorytmu Glide) i obliczonych metodą DFT: B3PW91/cc-pVTZ-pp (B, dokowanie za pomocą algorytmu QPLD). Dla atomu jodu, biorącego udział w tworzeniu wiązania halogenowego z tlenem karbonylowym Val127 odnotowano istotną zmianę wartości ładunku; zgodnie z teorią XB, ładunek zlokalizowany na atomie jodu w przypadku (A) powinien raczej zapobiegać tworzeniu wiązania halogenowego, głównie z powodu elektrostatycznego odpychania z grupą akceptorową (O=C).^{H3}

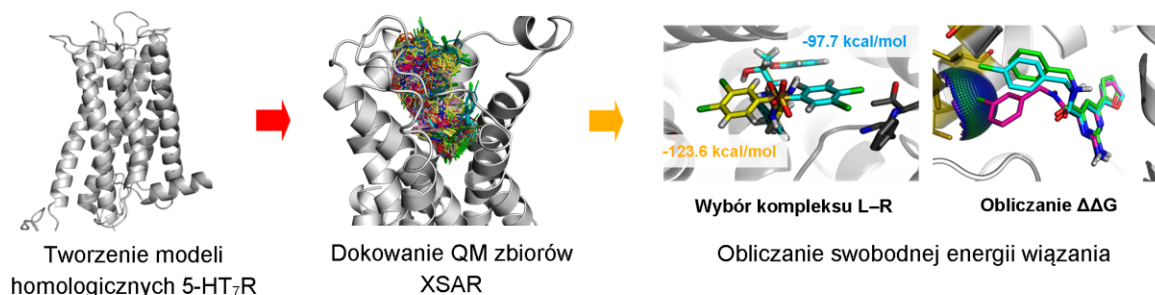
Uprzywilejowane aminokwasy dla wiązań halogenowych w miejscu aktywnym receptora

Kolejnym krokiem było zweryfikowanie postawionej hipotezy o istnieniu uprzywilejowanych aminokwasów w miejscu aktywnym receptora dla wiązań halogenowych (XB *hot-spots*). W tym celu opracowałem i zaimplementowałem (w postaci programu) metodologię eksploracji kieszeni wiążącej dowolnego receptora w celu lokalizacji wspomnianych aminokwasów (**H2**). Wzięto pod uwagę akceptory wiązań halogenowych zlokalizowanych w odpowiednich grupach funkcyjnych łańcuchów bocznych aminokwasów, jak również karbonylowych atomów tlenu z wiązań peptydowych eksponowanych do wnętrza kieszeni wiążącej. Opracowana procedura składa się z kolejno wykonywanych modułów: (i) tworzenie zbiorów-sond testowych reprezentujących zależność struktura-aktywność, które zawierały przykłady ligandów niepodstawionych i ich halogenowanych analogów (gdy wymianie ulega tylko atom H na Cl, Br lub I – zbiory XSAR), (ii) procedury dokowania QM/MM z GBSA, oraz (iii) reguł identyfikacji aminokwasów (kryterium geometryczne, aktywności, częstości występowania w kompleksach L–R) kluczowych z punktu widzenia tworzenia stabilnych wiązań halogenowych. Przy użyciu otrzymanego algorytmu wygenerowano zbiory XSAR dla wszystkich 31 wykrystalizowanych receptorów GPCR klasy A (dane z czerwca 2018 roku; wzięto pod uwagę tylko receptory ludzkie otrzymane z rozdzielczością nie większą niż 3,0 Å, wyniki jeszcze nieopublikowane), oraz wybranych niewykrystalizowanych receptorów monoaminergicznych GPCR (tj. 5-HT_{1A}R, 5-HT₆R oraz 5-HT₇R).

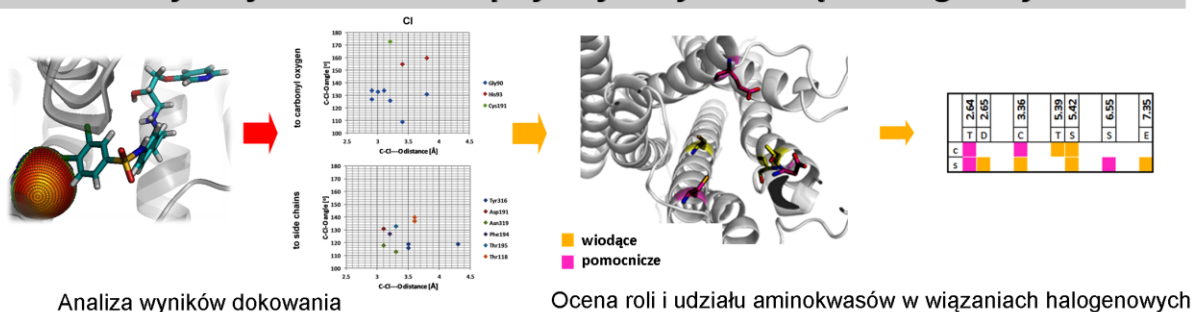
Generowanie zbiorów zależności struktura-aktywność dla halogenowanych pochodnych



Dokowanie i ocena kompleksów L–R



Identyfikacja aminokwasów uprzywilejowanych dla wiązań halogenowych

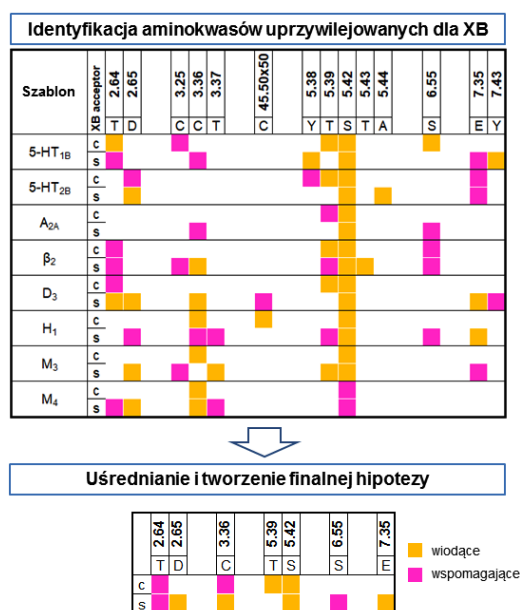


Rysunek 6. Schemat koncepcyjny opracowanego algorytmu do identyfikacji aminokwasów uprzywilejowanych dla wiązań halogenowych.^{H2}

Zbiory XSAR zostały utworzone na podstawie analizy bazy danych ChEMBL – najpotężniejszej i uznanej bazy danych gromadzącej informacje o zależności między strukturą a aktywnością biologiczną związku względem wszystkich znalezionych w literaturze naukowej celów biologicznych.⁴⁶ Głównym wynikiem zastosowania procedury było otrzymanie „mapy drogowej” wszystkich uprzywilejowanych aminokwasów (*XB hot-spots*) dla wiązań halogenowych w klasie A receptorów GPCR. Otrzymane wyniki mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w projektowaniu/optymalizacji syntezy aktywnych związków, przez użycie ich do celowanego podstawienia atomem halogenu, które umożliwi utworzenie oddziaływania halogenowego między ligandem a określonym aminokwasem uprzywilejowanym. Taka operacja ma na celu zwiększyć aktywność struktury wiodącej, jak również poprawić pozostałe parametry związków (lipofilowość, toksyczność, polarność).

Z uwagi na wieloletnie doświadczenie w badaniu metodami *in silico* oddziaływań różnych klas ligandów z receptorem 5-HT₇ (H2, H5–H8, P11, P12, P14, P19, P21–23, P25, P26, P28, P29, P33, P39, P40), wybrałem to białko do weryfikacji hipotezy o istnieniu i roli uprzywilejowanych aminokwasów dla wiązań halogenowych w miejscu aktywnym receptora (zarówno na drodze teoretycznej, jak i eksperymentalnej). Ponieważ receptor 5-HT₇ nie został

do tej pory wykrystalizowany, dlatego opracowałem modele homologiczne tego receptora używając 8 najbliższych homologicznie szablonów i wybierając do dalszych badań po 10 najlepszych konformacji dla danego szablonu (wg procedury opublikowanej przez Rataj i wsp.).⁴⁷ Wyniki dokowania zbioru XSAR (Rysunek 7) wskazują, że niezależnie od rodzaju szablonu na jakim zbudowany jest model receptora 5-HT₇ w jego miejscu wiążącym wyróżnić można dwa aminokwasy uprzywilejowane dla tworzenia wiązań halogenowych z akceptorem zlokalizowanym na karbonylowym atomie tlenu (T5.39 i S5.42) wiązania peptydowego, oraz cztery, w których rolę akceptora pełni odpowiednia grupa funkcyjna zlokalizowana w łańcuchu bocznym aminokwasu (D2.65, C3.36, S5.42 i E7.35).



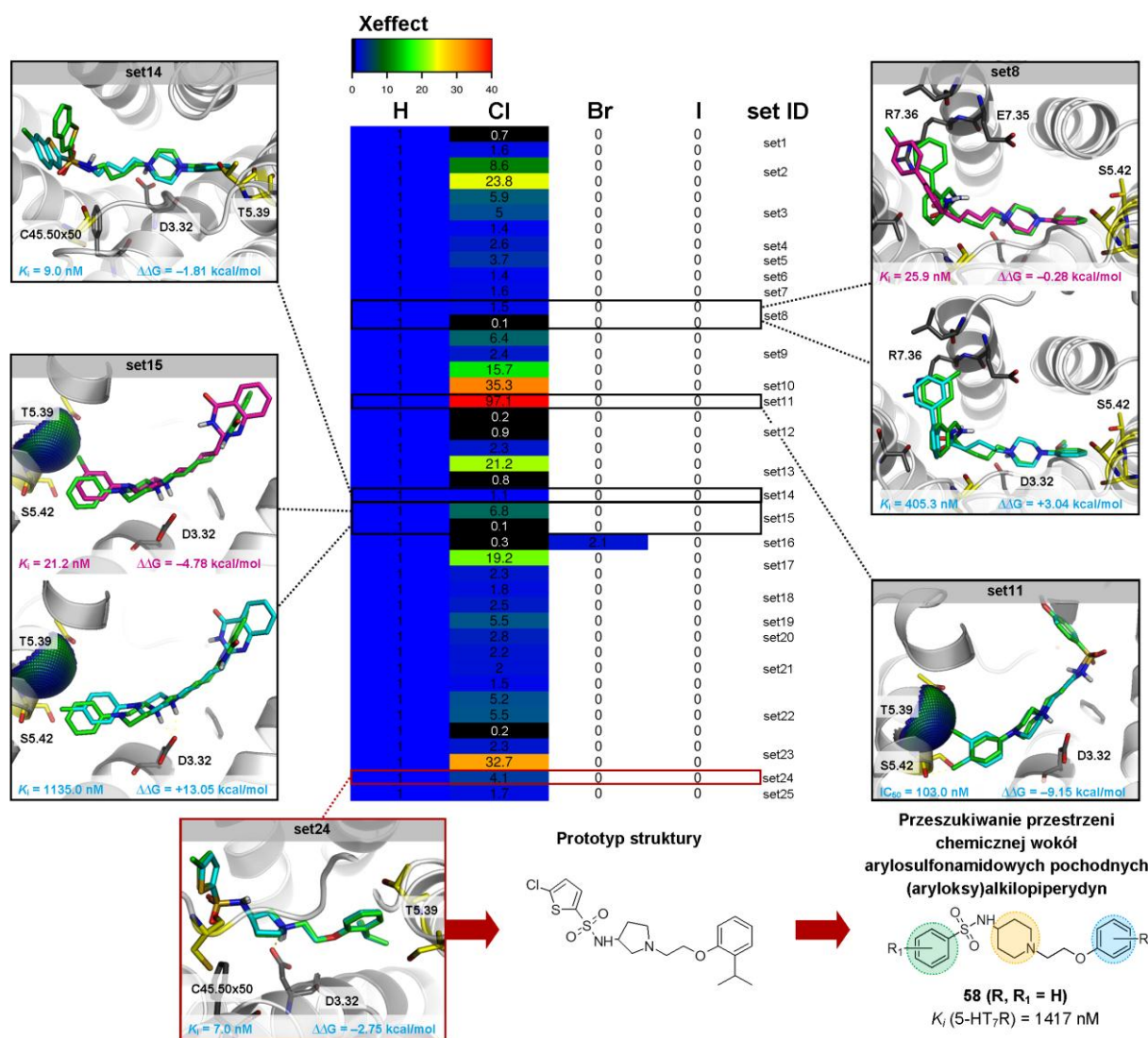
Rysunek 7. Wyniki zastosowania procedury poszukiwania uprzywilejowanych aminokwasów dla wiązań halogenowych wśród 8 zestawów modeli homologicznych receptora 5-HT₇ (wyniki uśrednione po 10 różnych konformacjach dla każdego szablonu). Ze względu na częstotliwość, z jaką dany aminokwas uczestniczy w tworzeniu wiązania halogenowego z ligandem, zdefiniowano dwie klasy aminokwasów: wiodące (żółte kwadraty) oraz pomocnicze (różowe kwadraty). Dodatkowo również, wskazano podział na lokalizację grupy akceptorowej dla wiązań halogenowych na łańcuchy boczne aminokwasów (*s-side chain*) i łańcuch główny (*c-carbonyl oxygen*).^{H2}

W sumie, otrzymano 43 zbiory tworzące bibliotekę XSAR, ale tylko w 25 z nich pochodne halogenowe wykazywały poprawę aktywności względem niemodyfikowanej struktury i dlatego ten „podzbiór” został użyty do sondowania miejsca aktywnego receptora. Analiza wizualna otrzymanych rezultatów potwierdziła kluczową rolę aminokwasów uprzywilejowanych w tworzeniu wiązań halogenowych, szczególnie, że zbiory XSAR zawierały strukturalnie zróżnicowane klasy ligandów 5-HT₇.

W celu jakościowej oceny pochodnych halogenowych danej struktury we wszystkich analizach *in silico* stosowałem: parametr Xeffect, wartości $\Delta\Delta G$, oraz sfery interakcji XB. Do opisu kierunku i wielkości zmiany aktywności po podstawieniu atomem halogenu wprowadziłem parametr Xeffect, obliczany jako iloraz aktywności struktury niepodstawionej i aktywność pochodnej halogenowej. Wartości większe od 1, oznaczają krotność poprawy aktywności biologicznej dla pochodnej halogenowej. Do oceny wpływu podstawnika X na stabilność tworzonego kompleksu L–R używałem różnicy entalpii swobodnej wiązania pochodnej halogenowej i analogu niepodstawionego – wartości $\Delta\Delta G < 0$ oznaczały dodatkowe, stabilizujące kompleks L–R przyczynki pochodzące od oddziaływania atomu halogenu z receptorem. Z kolei, do oceny jakości tworzących się wiązań halogenowych w miejscu aktywnym receptora, używałem teoretycznych sfer oddziaływania (Rysunek 8) dla wiązań halogenowych (generowane za pomocą serwera www.halogenbonding.com).^{19,48,49}

Obrazują one obszary korzystne i mniej korzystne (w postaci nieregularnej sfery) dla tworzenia wiązania halogenowego wokół odpowiedniego akceptora (najczęściej karbonylowy atom tlenu wiązania peptydowego). Projekcja atomu halogenu na dany obszar sfery pozwala na szybkie określenie siły utworzonego wiązania halogenowego.

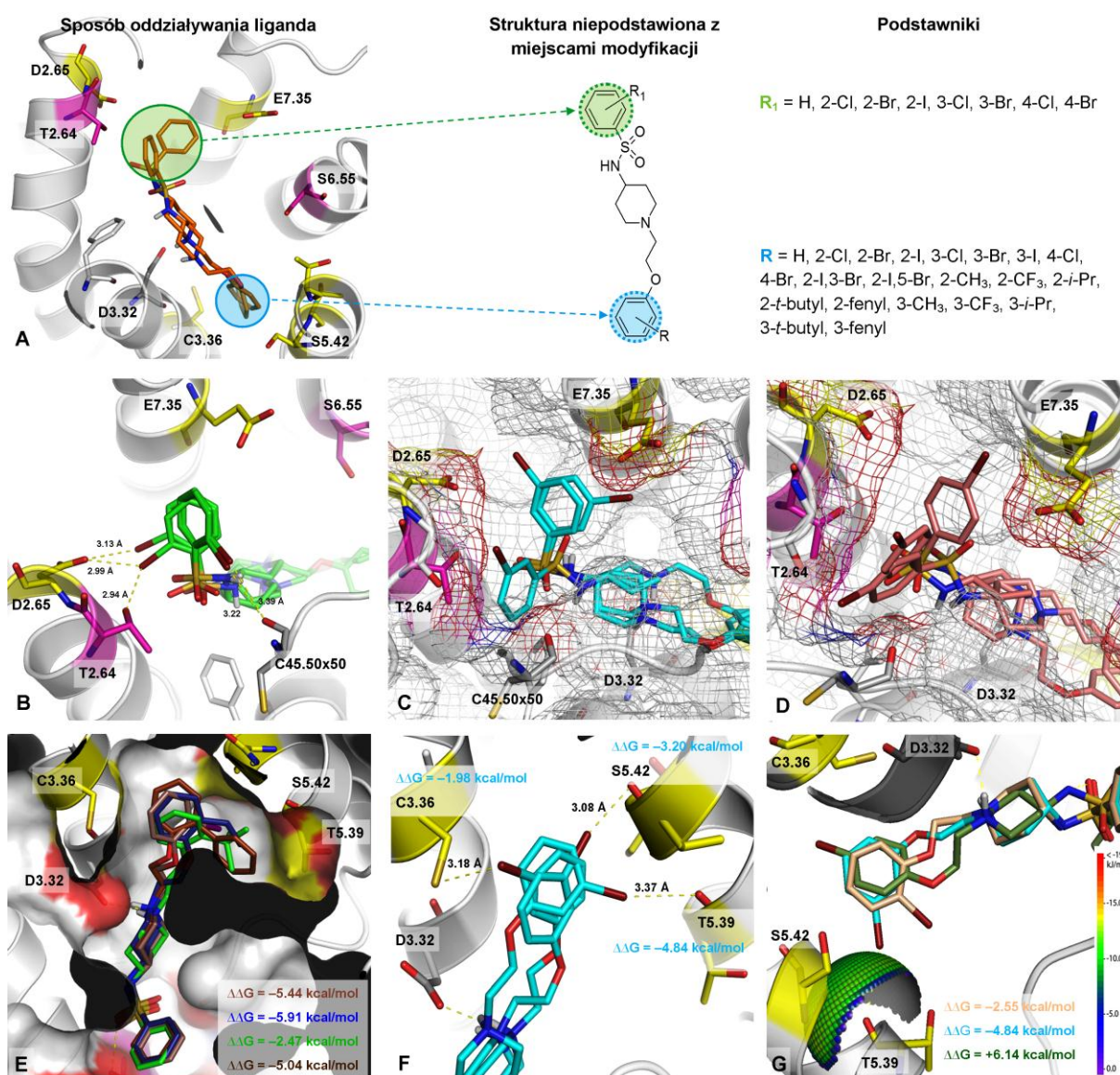
Jedna ze struktur reprezentujących „set24” – arylosulfonamidowe pochodne (aryloksy)alkilamin,⁵⁰ biblioteki XSAR (Rysunek 8) została wykorzystana do zaprojektowania biblioteki analogów halogenowych użytej kolejno do weryfikacji otrzymanych, na drodze obliczeń teoretycznych, zależności między aktywnością biologiczną a rodzajem i położeniem atomu halogenu.



Rysunek 8. Ilustracja zaproponowanego podejścia do wizualizacji zbiorów XSAR (mapa cieplna) oraz ich użycia w poszukiwaniu aminokwasów uprzywilejowanych dla wiązań halogenowych. Do przygotowania niniejszego schematu użyto modelu receptora 5-HT₇ otrzymanego na szablonie receptora D₃ (PDB: 3PBL). Wartości liczbowe w macierzy XSAR reprezentują wartość parametru Xeffect. Teoretyczne sfery dla oddziaływania halogenowego zostały wygenerowane dla wybranych aminokwasów w miejscu wiążącym receptora w celu ilustracji przydatności tego narzędzia w ocenie jakości tworzonych wiązań halogenowych.^{H2}

W tym celu wygenerowano bibliotekę kombinatoryczną *in silico* zawierającą: pochodne monohalogenowe (wymiana halogenów w każdej pozycji pierścienia R i R₁ niezależnie) oraz

dipodstawione (wprowadzenie halogenów w jednym, jak i obu pierścieniach R i R₁ jednocześnie). Dodatkowo, w celu głębszego zbadania specyficznej natury wiązania halogenowego w badanych kompleksach L–R zaprojektowano także analogi z podstawnikami alkilowymi (nie tworzą wiązań halogenowych). W kolejnym etapie zadokowano całą bibliotekę (liczącą ponad 100 związków) do wybranych modeli receptora 5-HT₇ z użyciem algorytmu QPLD, a dla otrzymanych kompleksów obliczono wartości $\Delta\Delta G$ używając algorytmu GBSA. Analiza wyników pod kątem roli aminokwasów uprzywilejowanych dla wiązań halogenowych znalezionych za pomocą biblioteki XSAR wskazała ciekawe zależności, które zostały kolejno zweryfikowane na drodze syntezy (w ramach współpracy z dr. Vittorio Canale z Zakładu Chemii Leków UJ CM) wybranych analogów (Rysunek 9A) z całej biblioteki kombinatorycznej i określenie powinowactwa zsyntetyzowanych cząsteczek, w testach *in vitro*, względem receptora 5-HT₇ (dr Grzegorz Satała z Zakładu Chemii Leków IF PAN).



Rysunek 9. Zebranie najważniejszych wyników z wykonanych badań (H2). (A) lokalizacja aminokwasów kluczowych (żółty) oraz pomocniczych (różowy) dla tworzenia wiązań halogenowych wyznaczonych z sondowania miejsca wiążącego receptora 5-HT₇ przy użyciu zbioru XSAR. Przedstawiono również sposób

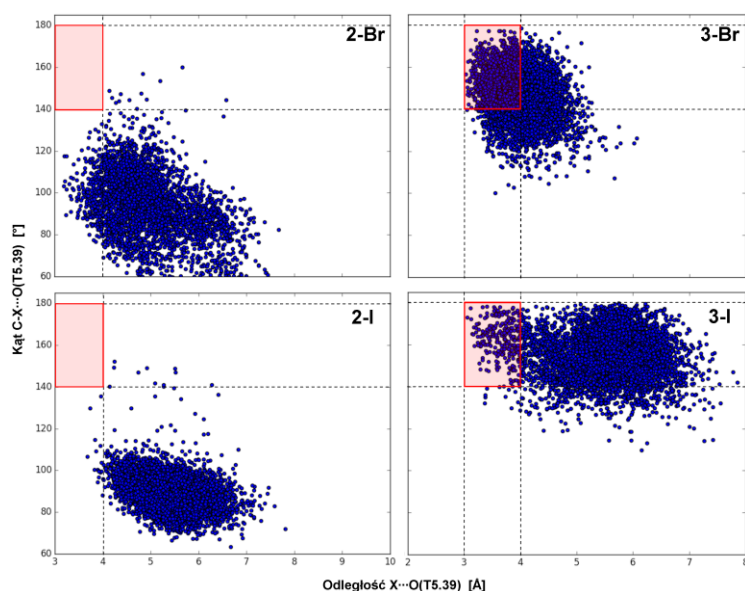
oddziaływania struktury wyjściowej użytej w badaniach wraz z zaznaczeniem miejsc modyfikacji oraz podstawników użytych do syntezy związków z biblioteki kombinatorycznej. Ewaluacja roli uprzywilejowanych aminokwasów w części zewnątrzkomórkowej (B–D) oraz transbłonowej (E–G) receptora w zależności od rodzaju podstawienia atomu halogenu we fragmencie (aryloksy)alkilowym.^{H2}

Najważniejszym rezultatem przeprowadzonych badań było potwierdzenie roli wybranych aminokwasów w tworzeniu wiązania halogenowego z ligandami, co prowadzi do wzrostu aktywności biologicznej *in vitro*. Szczegółowe wnioski na temat roli atomu halogenu można streścić następująco:

- wpływ pozycji podstawienia atomem halogenu w pierścieniu aromatycznym liganda (najczęściej tylko jedna z pozycji daje istotny wzrost aktywności biologicznej poprzez tworzenie wiązania halogenowego; pozostałe wnoszą niewielki wkład lub nawet prowadzą do obniżenia aktywności związku – Rysunek 9 B–D, G). Zastosowana procedura obliczeniowa przewidywała, że pod względem energetycznym i geometrycznym najlepszej jakości wiązania halogenowe powstają dla pochodnych podstawionych w pozycji 3 we fragmencie aryloksyalkilowym, które tworzyły wiązanie halogenowe z najistotniejszym aminokwasem uprzywilejowanym T5.39,
- efekty steryczne stabilizujące i destabilizujące (niedopasowanie do kształtu kieszeni wiążącej; największy spadek aktywności powodowały pochodne podstawione w pozycji 4 fragmentu (aryloksy)alkilowego – przewidziany przyczynek do stabilizacji kompleksu L–R dla 4-Br miał dodatnią wartość, a więc oznaczał destabilizację, Rysunek 9G),
- wzrost wielkości atomu halogenu niekoniecznie prowadzi do wzrost aktywności pochodnej (zgodnie z teorią, wzrost wielkości atomu halogenu $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$ powoduje powstawanie mocniejszych wiązań halogenowych przez wzmocnienie σ -dziury – taka sytuacja jest możliwa w układach izolowanych. W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano układy, w których wzrost aktywności zatrzymuje się na pochodnej 3-Br, podczas gdy dla pochodnej 3-I aktywność uległa nawet pogorszeniu – efekt *plateau*),
- pozostałe efekty (hydrofobowe, stabilizujące oddziaływania steryczne atomu halogenu – pochodne z podstawnikami w pozycji 2 we fragmencie (aryloksy)alkilowym dały istotne wzrosty aktywności przy wzroście wielkości atomu halogenu, ale jeszcze bardziej znaczące przy użyciu odpowiednio dużych podstawników alkilowych).

Otrzymane wyniki eksperymentalne *in vitro* stały się podstawą do podjęcia kolejnych badań związanych z wpływem wielkości atomu halogenu na modelowanie aktywności biologicznej badanych pochodnych, tj. przyczyn zanotowanej różnicy aktywności dla pochodnych 2- oraz 3-Br/I we fragmencie aryloksylowym. Na podstawie badań teoretycznych przewidziano utworzenie stabilnych wiązań halogenowych z pochodnymi podstawionymi w pozycji 3 (dodatkowe przyczynki do stabilizacji kompleksu L–R dla pochodnych chloro, bromo, jodo miały odpowiednio wartości $\Delta\Delta G = -1,4$; $-4,5$ oraz $-4,8$ kcal/mol), lecz wyniki badań aktywności biologicznej pokazały, że największy wzrost wystąpił dla pochodnej 3-Br ($X_{\text{effect}} = 34,6$), a dużo mniejszy dla 3-I ($X_{\text{effect}} = 7$). Z kolei pochodne halogenowe podstawione w pozycji 2 fragmentu (aryloksy)alkilowego wykazały wzrost aktywności biologicznej do receptora 5-HT₇ wraz ze wzrostem wielkości atomu halogenu. Badania

teoretyczne nie wskazały natomiast zdolności do tworzenia wiązań halogenowych, mimo to pochodne te utworzyły stabilne kompleksy z receptorem 5-HT₇ kierując podstawniki halogenowe w hydrofobowe zagłębienie w kieszeni wiążącej powstałej między helisami 3, 5 i 6 (Rysunek 9E, pochodne chloro, bromo, jodo miały odpowiednio wartości $\Delta\Delta G = -1,6$; $-2,1$ oraz $-4,9$ kcal/mol). Opisane efekty analizowano za pomocą trwającej 60 ns symulacji dynamiki molekularnej (w tym celu użyto procesorów GPU). Do analizy otrzymanych trajektorii użyto wykresów zależności kąta ($C-X\cdots O$) od długości ($X\cdots O$) wiązania halogenowego dla T5.39 (ponieważ był to najbliższej położony aminokwas uprzywilejowany). Wyniki pokazały, że zarówno pochodne 2-Br, jak i 2-I charakteryzowały się niekorzystnymi parametrami geometrycznymi dla tworzenia wiązania halogenowego z tlenem karbonylowym T5.39 w trakcie symulacji (Rysunek 10). Podczas gdy dla pochodnej 3-Br większość punktów uzyskanych z symulacji MD znajdowała się w regionie korzystnym (geometrycznie) dla tworzenia wiązań halogenowych, to w przypadku jodu korzystne wiązania halogenowe z T5.39 tworzone były znacznie rzadziej, prawdopodobnie ze względu na jego duży rozmiar.



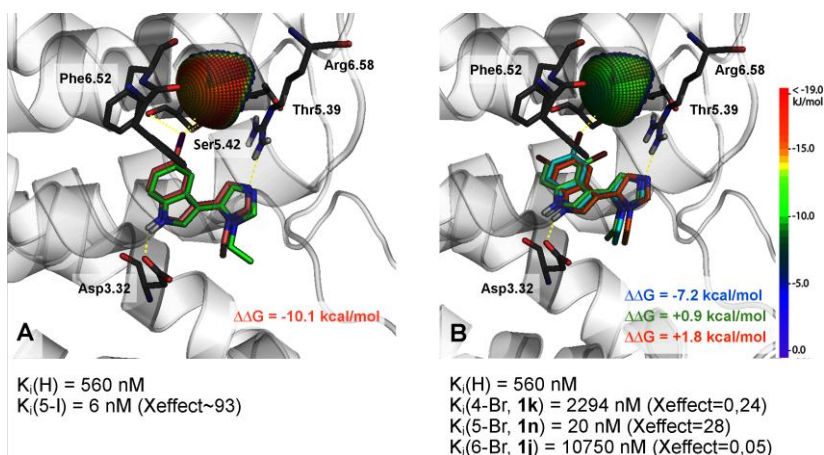
Rysunek 10. Wykresy punktowe obrazujące zmiany wartości kąta i długości wiązania halogenowego zachodzące w czasie 60 ns symulacji MD dla analogów 2- i 3-Br/I. Każdy punkt reprezentuje dane wyodrębnione z jednej klatki trajektorii MD (interwał symulacji ustawiono na 10 fs). Czerwone prostokąty oznaczają obszary parametrów geometrycznych korzystnych (kąt i długość) dla tworzenia wiązań halogenowych z karbonylowym atomem tlenu T5.39.^{H2}

Zastosowanie opracowanej metodologii dla wiązań halogenowych do optymalizacji aktywności biologicznej różnych grup związków aktywnych dla wybranych receptorów monoaminergicznych GPCR

Otrzymane narzędzia zostały zastosowane do poszukiwania aminokwasów uprzywilejowanych dla wiązań halogenowych w wybranych receptorach klasy A GPCR, które nie zostały dotąd wykrystalizowane i są używane w badaniach nad nowymi lekami OUN prowadzonych w Zakładzie Chemii Leków IF PAN (tj. 5-HT_{1A}R, 5-HT₆R, 5-HT₇R oraz D₂). Rola atomu halogenu (jako podstawnika) została zbadana na przykładzie czterech niezależnych bibliotek (chemotypów) nowo otrzymanych ligandów dla wspomnianych receptorów monoaminergicznych GPCR (**H4–H7**). Głównym przesłaniem wpływającym z tych badań jest eksperymentalne potwierdzenie hipotezy o możliwości sterowania aktywnością biologiczną związku chemicznego za pomocą podstawienia atomem halogenu,

oraz o istnieniu w miejscu aktywnym receptora uprzywilejowanych aminokwasów dla tworzenia wiązań halogenowych. Wykorzystanie opracowanej metodologii oraz narzędzi pozwala na racjonalne projektowanie pochodnych, które przez utworzenie dodatkowego oddziaływania halogenowego w kieszeni wiążącej receptora wpływają na poprawę aktywności biologicznej – pozwala to na zaoszczędzenie czasu i pieniędzy w projektach celowanych na poszukiwanie/optymalizację struktury wiodącej leku.

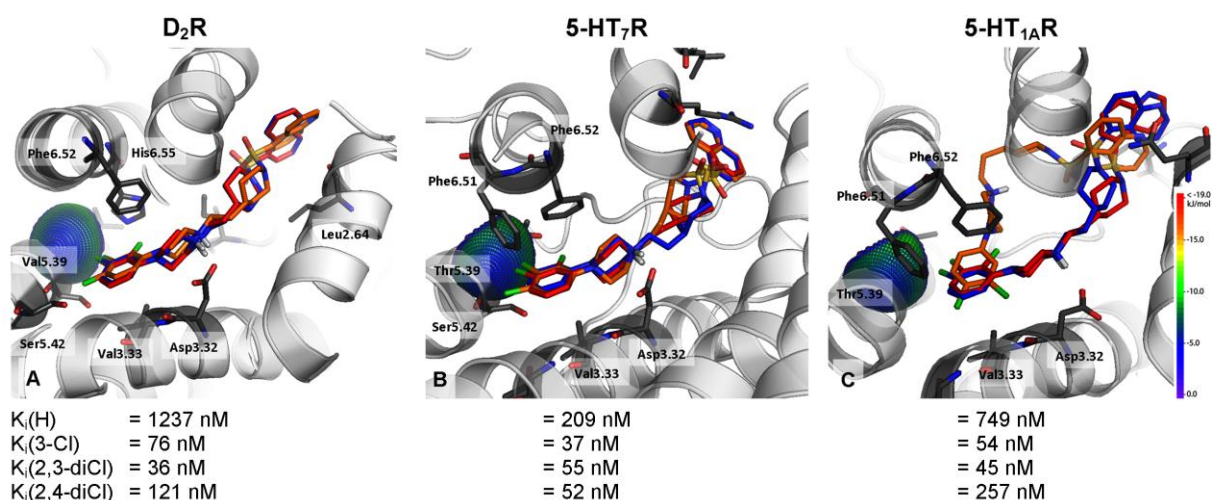
Jednym z najbardziej spektakularnych przykładów użycia opracowanej metody było jej zastosowanie w optymalizacji aktywności struktury wiodącej nowych, niskozasadowych agonistów receptora 5-HT₇ w grupie pochodnych imidazolo-indoli (**H5**). Moim zadaniem było otrzymanie biblioteki kombinatorycznej wszystkich halogenowych pochodnych struktury wyjściowej (której aktywność do receptora 5-HT₇ wynosiła $K_i = 560$ nM), kolejno dokowanie QM/MM do wybranych modeli homologicznych receptora 5-HT₇, analiza otrzymanych kompleksów L–R i wartości dodatkowych przyczynków do energii oddziaływania ($\Delta\Delta G < 0$), oraz wyselekcjonowanie pochodnych do syntezy organicznej. Otrzymane wyniki badań *in silico* wykazały, że zastąpienie wodoru atomem halogenu w pozycji 5 pierścienia indolowego, proporcjonalnie do wielkości atomu X, zwiększało powinowactwo do 5-HT₇R. Analiza kompleksów L–R wykazała, że znaczący udział w aktywności biologicznej związku można przypisać wiązanom halogenowym utworzonym między ligandem, a karbonylowym atomem tlenu dwóch aminokwasów uprzywilejowanych dla XB (tj. Ser5.42 i T5.39). Największy, 93-krotny wzrost aktywności względem niepodstawionej struktury zanotowano dla pochodnej 5-I ($K_i = 6$ nM), niewiele mniejszy (28-krotny) dla pochodnej 5-Br ($K_i = 20$ nM), oraz najmniejszy dla 5-Cl ($K_i = 42$ nM). Parametry geometryczne otrzymane z analizy *in silico* kompleksów L–R (Rysunek 11A) dla pochodnej 5-I pokazały istotny udział obu uprzywilejowanych aminokwasów w tworzeniu wiązań halogenowych, tj.: Ser5.42 ($d(I\cdots O) = 3,1$ Å, kąt σ -dziury (C–I $\cdots$ O) = 155°) i Thr5.39 ($d(I\cdots O) = 4,4$ Å, kąt σ -dziury (C–I $\cdots$ O) = 171°). Kolejność zmian różnicowej swobodnej energii wiązania $\Delta\Delta G$ (po zastąpieniu wodoru w pozycji 5 indolu na chlor, brom i jod wyniosły odpowiednio -6,6, -7,2 i -10,1 kcal/mol), oraz projekcja na karbonyłowy atom tlenu T5.39 teoretycznej sfery interakcji dla wiązań halogenowych (wszystkie wiązania halogenowe tworzone przez pochodne 5-X znajdowały się w obszarach korzystnych energetycznie, Rysunek 11A, B) potwierdziły istotną rolę wiązania halogenowego w tworzeniu kompleksu L–R. Teoretycznych sfer interakcji dla wiązań halogenowych użyłem także do wyjaśnienia przyczyn znacznego obniżenia aktywności biologicznej po przesunięciu atomu bromu z pozycji 5 do 4 i 6 w pierścieniu indolu (Rysunek 11B). Scentrowana na karbonylowym atomie tlenu T5.39 sfera interakcji dla XB wykazała, że pochodna 5-Br ($d(Br\cdots O) = 3,2$ Å, kąt σ -dziury (C–Br $\cdots$ O) = 159°) leży w energetycznie korzystnym obszarze interakcji, podczas gdy atomy bromu w pochodnych 4- i 6-Br były zwrócone poza obszar sfery, wykluczając tym samym możliwość dodatkowej stabilizacji kompleksu L–R przez tworzenie wiązań halogenowych. Wyniki te były także zgodne z obliczonymi wartościami różnicowej swobodnej energii oddziaływania – tylko pochodna 5-Br wykazała istotny przyczynek do energii oddziaływania ($\Delta\Delta G = -7,6$ kcal/mol), w porównaniu z analogami 4- i 6-Br ($\Delta\Delta G$ odpowiednio równe +0,9 i +1,8 kcal/mol, Rysunek 11B).



Rysunek 11. Porównanie sposobu oddziaływania w miejscu aktywnym receptora 5-HT₇ niepodstawionej (zielony) i jej 5-I (pomarańczowy) pochodnej (A). Porównanie kompleksów 4-, 5- i 6-Br pochodnych (odpowiednio, szarozielony, pomarańczowy i cyjan) oraz struktury wyjściowej (zielony) w miejscu aktywnym receptora. Teoretyczne sfery oddziaływania dla wiązań halogenowych zostały nałożone na tlen karbonylowy T5.39.^{H5}

Kolejnym przykładem zastosowania opracowanej metodologii była analiza zależności struktura-aktywność w niewielkiej bibliotece azyno-sulfonamidowych pochodnych długołańcuchowych arylopiperazyn (LCAP) posiadających układ aromatyczny różnie podstawiony atomami halogenów (**H6**). Struktura wiodąca wykazywała aktywność względem kilku receptorów monoaminergicznych GPCR, dlatego otrzymane pochodne przeanalizowano w kontekście ich oddziaływania z trzema najistotniejszymi receptorami (tj. D₂, 5-HT₇ oraz 5-HT_{1A}). Wyniki badań *in vitro* pokazały, że związek niepodstawiony we fragmencie fenylopiperazyny wykazuje niskie powinowactwo do wszystkich badanych receptorów (Rysunek 12). Wprowadzenie atomu chloru w pozycję 4 fenylopiperazyny zwiększyło aktywność pochodnej do receptora D₂ i 5-HT₇R odpowiednio 8- i 5-krotnie, co jak wskazały badania *in silico* związane było z dodatkową stabilizacją kompleksu L–R poprzez tworzenie wiązania halogenowego z tlenem karbonylowym Ser5.42 (znajdującej się zarówno w kieszeni wiążącej receptora D₂ i 5-HT₇). Z kolei w receptorze 5-HT_{1A}, pochodna 4-Cl powodowała istotną destabilizację kompleksu L–R (czego skutkiem był brak interakcji z kluczowym aminokwasem Asp3.32), co tłumaczyło jej niską aktywność.

Przesunięcie atomu chloru z pozycji 4 do 3 zwiększyło powinowactwo do rozpatrywanych receptorów – wyniki analizy *in silico* wykazały, że obecność atomu chloru w położeniu 3 dodatkowo stabilizuje kompleksy L–R przez tworzenie wiązań halogenowych z: Val5.39 (w D₂R; $d(\text{Cl}\cdots\text{O}) = 2,95 \text{ \AA}$, kąt σ -dziury = $171,87^\circ$), oraz z Thr5.39 (w 5-HT₇R; $d(\text{Cl}\cdots\text{O}) = 2,88 \text{ \AA}$, kąt σ -dziury = $155,80^\circ$ i 5-HT_{1A}R; $d(\text{Cl}\cdots\text{O}) = 3,83 \text{ \AA}$, kąt σ -dziury = $137,46^\circ$).



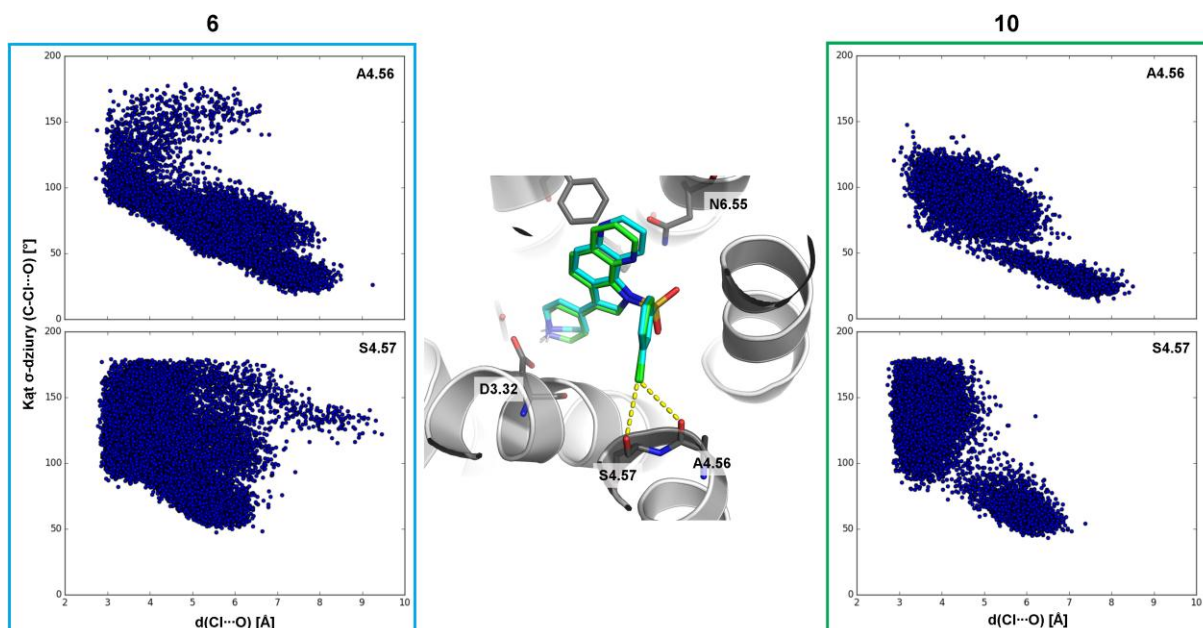
Rysunek 12. Porównanie kompleksów otrzymanych przez dokowanie QM/MM halogenowanych (we fragmencie fenylopiperazyny) pochodnych z analizowanej biblioteki (3-Cl: niebieski, 2,3-di-Cl: czerwony, 2,4-di-Cl: pomarańczowy) w miejscach aktywnych receptorów D₂, 5-HT₇ i 5-HT_{1A}. Teoretyczne sfery interakcji chlor-tlen ilustrują jakość formowanych wiązań halogenowych w otrzymanych kompleksach L-R.^{H6}

Interesujące zależności otrzymano dla analogów z dwoma atomami chloru w pierścieniu fenylopiperazyny (tj. 2,3-di-Cl oraz 2,4-di-Cl). Dla pochodnej 2,3-di-Cl wzrost aktywności w porównaniu do analogu 3-Cl odnotowano tylko w przypadku D₂R – wyniki analizy *in silico* pokazały, że atomu chloru w pozycji 2 tworzy dodatkowe wiązanie halogenowe z His6.55 ($d(\text{Cl} \cdots \text{N}) = 2,81 \text{ \AA}$, kąt σ -dziury = $149,45^\circ$, Rysunek 12A), natomiast w pozostałych receptorach nie zanotowano żadnych dodatkowych oddziaływań stabilizujących z udziałem 2-Cl. We wszystkich receptorach atom chloru w pozycji 3 stabilizował kompleksy L-R przez tworzenie wiązań halogenowych z Val5.30 w przypadku D₂R i z Thr5.39 w pozostałych receptorach (Rysunek 12). Natomiast, wprowadzenie drugiego atomu chloru w pozycję 4 (analog 3,4-di-Cl), spowodowało drastycznie obniżenie aktywności do receptorów 5-HT_{1A} i D₂, ale także zachowanie wysokiej aktywności do 5-HT₇R. Również i w tym przypadku, przyczyną wysokiej aktywności do 5-HT₇R była dodatkowa stabilizacja kompleksu L-R, wynikająca z utworzenia wiązania halogenowego z Thr5.39 ($d(\text{Cl} \cdots \text{O}) = 3,31 \text{ \AA}$; kąt σ -dziury = $172,12^\circ$) i Ser5.42 ($d(\text{Cl} \cdots \text{O}) = 2,84 \text{ \AA}$, kąt σ -dziury = $147,15^\circ$, Rysunek 12B).

Dla receptora serotoninowego 5-HT₆, rolę wiązań halogenowych w dodatkowej stabilizacji kompleksów L-R badałem na przykładzie dwóch grup związków: pochodnych pirolochinoliny (**H7**) oraz 1,3,5-triazyny (**H4**).

Głównym celem w pierwszej pracy (**H7**) było wytłumaczenie różnic w aktywności między dwoma izomerycznymi strukturami, tj. arylosulfonamidowymi pochodnymi 1H-pirol[2,3-*f*]chinoliny oraz 1H-pirol[3,2-*h*]chinoliny podstawionymi w pozycji 3 fragmentu tetrahydropirydynowego. Zaplanowałem i nadzorowałem badania teoretyczne wyjaśniające przyczyny takiego zachowania związków. Przy użyciu metod kwantowo-mechanicznych (badania wykonane przez dr. inż. Pawła Śliwę z Politechniki Krakowskiej), oraz dokowania i dynamiki molekularnej (badania wykonane przeze mnie) zaproponowano wyjaśnienie różnicy w aktywności obu pochodnych. Dodatkowo, wprowadzenie atomu chloru w pozycji 3 we fragmencie arylosulfonamidowym (pochodne oznaczone w publikacji jako **6** i **10**) zwiększyło powinowactwo (X_{effect}) do 5-HT₆R odpowiednio 1,5- i 5-krotnie względem struktur niepodstawionych. Analiza kompleksów L-R otrzymanych na drodze

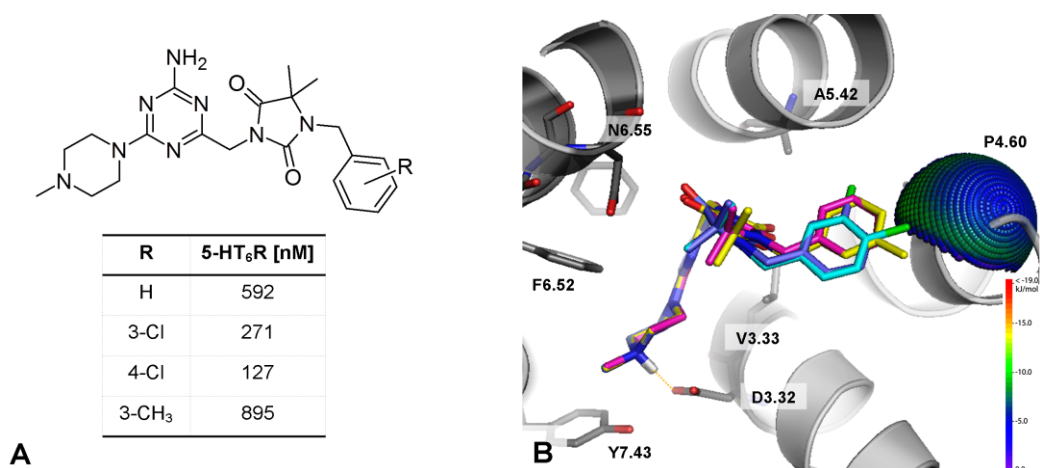
dokowania molekularnego QM/MM do modeli homologicznych receptora 5-HT₆ dowiodła, że podstawnik 3-Cl może tworzyć dwa wiązania halogenowe, tj. z tlenem karbonylowym A4.56 i/lub S4.57; jednakże otrzymane parametry geometryczne (dla S4.57: $d(\text{Cl}\cdots\text{O}) = 3,3 \text{ \AA}$, kąt σ -dziury = 169° , oraz dla A4.56: $d(\text{Cl}\cdots\text{O}) = 3,4 \text{ \AA}$, kąt σ -dziury = 124°) wskazywały na dominującą rolę S4.57 w formowaniu wiązań halogenowych. Rezultat ten został poparty wynikami symulacji MD pokazującymi, że związki **10** i **6** częściej przyjmowały właściwe parametry geometryczne (długość i kąt XB) dla wiązań halogenowych z S4.57, niż A4.56 (Rysunek 13).



Rysunek 13. Weryfikacja roli aminokwasów A4.56 i S4.57 jako punktów uchwytu dla wiązań halogenowych w badanej serii pochodnych pirolochinoliny. W celu uproszczenia wyników otrzymanych ze 100 ns symulacji MD, z każdej klatki wyciągnięto parametry geometryczne wiązań halogenowych z badanymi aminokwasami, tj. długość ($\text{Cl}\cdots\text{O}$) oraz kąt σ -dziury wiązania halogenowego dla kompleksów związków **6** (cyjan) i **10** (zielony) z 5-HT₆R.^{H4}

Przy użyciu pochodnych halogenowych reprezentujących drugą grupę związków – pochodne 1,3,5-triazyny zawierające fragment arylohydantoiny (**H4**), poddano dalszej ewaluacji hipotezę aminokwasów uprzywilejowanych dla wiązań halogenowych znajdujących się w helisie 4 receptora 5-HT₆ (tj. A4.56 i S4.57). Pochodna niepodstawiona wykazała niski poziom powinowactwa względem 5-HT₆R ($K_i = 592 \text{ nM}$). Przesunięcie atomu chloru z pozycji 3 do 4 spowodowało 4–5-krotny (w zależności od modyfikacji rdzenia) wzrost aktywności do 5-HT₆R w porównaniu do ich niepodstawionych pochodnych. Zależność ta została potwierdzona przez dokowanie molekularne QM/MM wszystkich pochodnych do modeli homologicznych receptora 5-HT₆. Analiza wykazała (Rysunek 14), że jedynie obecność atomu chloru w położeniu 4 stabilizuje dodatkowo kompleks L–R poprzez tworzenie wiązań halogenowych z tlenem karbonylowym P4.60 ($d(\text{Cl}\cdots\text{O}) = 3,31 \text{ \AA}$, oraz kąt σ -dziury = $151,5^\circ$). W celu dodatkowej weryfikacji znalezionych zależności, użyto teoretycznej sfery interakcji dla XB scentrowanej na karbonylowym atomie tlenu P4.60 (Rysunek 14B) – podstawnik 4-Cl znajdował się w obszarze sfery korzystnym energetycznie, podczas gdy podstawnik 3-Cl wskazywał na brak możliwości tworzenia wiązań halogenowych dla tej

poходnej. Dodatkowym eksperymentalnym potwierdzeniem tej zależności jest obniżenie aktywności pochodnej 3-CH₃, dla której zidentyfikowano istotne przeszkody steryczne powodujące destabilizację kompleksu L–R. Interesującym rezultatem wykonanych badań jest zidentyfikowanie innego aminokwasu biorącego udział w tworzeniu wiązań halogenowych z ligandami, niż wskazane w poprzedniej pracy (H7): A4.56 i S4.57. Przyczyną może być wpływ chemotypu, który w procesie formowania kompleksu powoduje indukowanie innego stanu konformacyjnego kieszeni wiążącej receptora, a tym samym zaangażowanie innych aminokwasów w tworzenie wiązań halogenowych z ligandami. Niemniej jednak, hipoteza ta wymaga wykonania dalszych, bardziej rozległych badań teoretycznych.



Rysunek 14. Nałożenie kompleksów L–R otrzymanych w wyniku dokowania do modelu homologicznego 5-HT₆R związków: analogu niepodstawionego (różowy), 3-CH₃ (żółty), 4-Cl (cyjan) i 3-Cl (fioletowy) na hipotetyczne miejsca oddziaływania w kieszeni wiążącej. Teoretyczne sfery oddziaływania chlor–tlen ilustrują przewidywane właściwości tworzonych wiązań halogenowych.^{H4}

Badania nad ładunkowo-wspomaganyimi wiązaniami wodorowymi

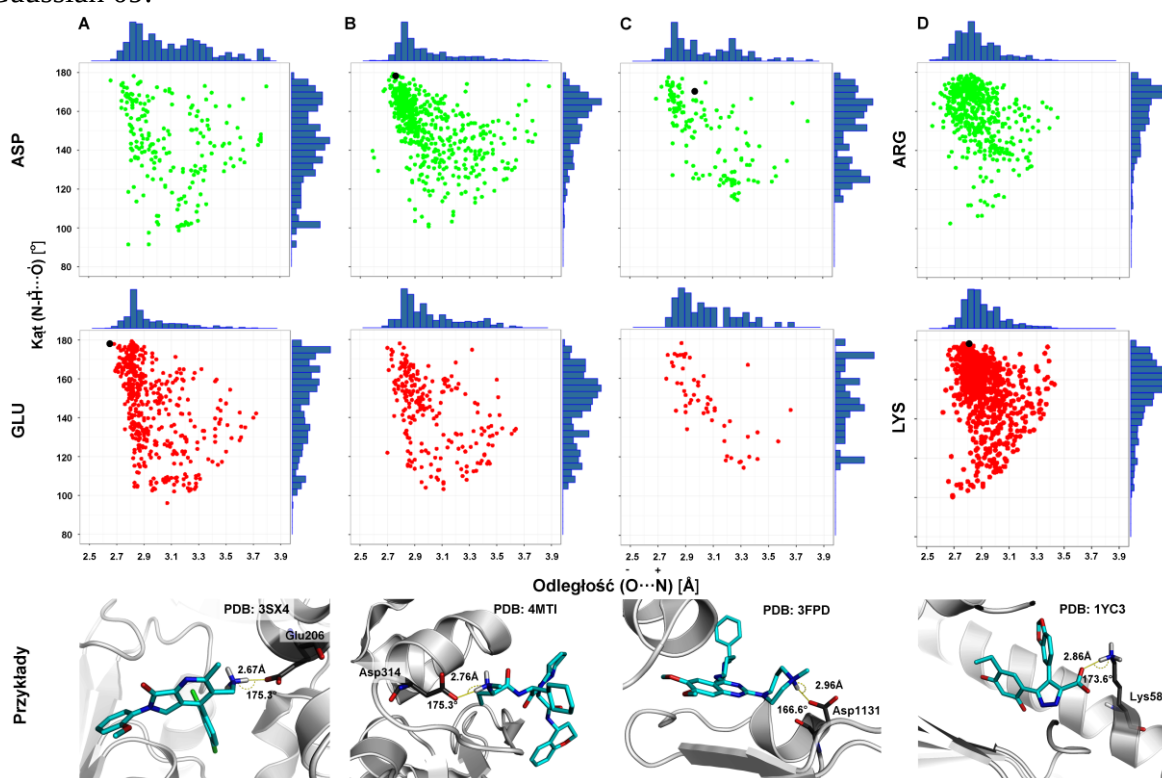
Podjęcie wszechstronnych badań teoretycznych nad ładunkowo-wspomaganyimi wiązaniami wodorowymi było spowodowane brakiem systematycznych badań nad istotą oraz rolą tych oddziaływań w kompleksach ligand–receptor. Dodatkowym powodem były, prowadzone już od wielu lat w Zakładzie Chemii Leków IF PAN, teoretyczne prace badawcze nad oddziaływaniem ligandów z różnymi receptorami monoaminergicznymi GPCR. Stąd naturalnym krokiem było podjęcie badań nad mostkami solnymi co, również w założeniu, miało prowadzić do otrzymania nowych narzędzi wspierających proces racjonalnego projektowania nowych ligandów metodami *in silico*. Jestem autorem koncepcji badań, w ramach których nawiązałem współpracę z dr. inż. Pawłem Śliwą z Politechniki Krakowskiej (specjalista od obliczeń kwantowo-mechanicznych). W rezultacie, opublikowana została praca (H1) prezentująca bardzo bogate wyniki badań na temat roli i znaczenia mostków solnych w układach biologicznych. Oprócz zaprojektowania i koordynowania (jak również napisania publikacji) prac badawczych w tym temacie, moim głównym osiągnięciem jest: (i) analiza wyników przeszukiwania baz danych PDB,⁵¹ ChEMBL,⁴⁶ DrugBank⁵² oraz GPCRdb,⁵³ (ii) zaprojektowanie i wykonanie badań zależności zmiany kąta, odległości oraz położenia monomerów od energii oddziaływania, (iii) opracowanie koncepcji i implementacja w postaci programu teoretycznych sfer oddziaływania dla układów modelowych z mostkiem solnym.

Najważniejsze wyniki badań otrzymane w wyniku analizy baz danych można streścić następująco:

- analiza geometrii kompleksów L–R z mostkiem solnym zidentyfikowanych w bazie PDB pokazała (Rysunek 15), że najbardziej preferowana geometria mostka solnego występuje przy wartościach odległości ($N^+ \cdots O^-$) i kąta ($N^+-H \cdots O^-$) odpowiednio 2,8–2,9 Å i 140–175°. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku kompleksów amin trzeciorzędowych, na wykresach rozkładu danego parametru geometrycznego wystąpiły widoczne drugie maksima (tj. 3,1–3,3 Å i 120–140°),
- istotna rola mostka solnego została potwierdzona także przez analizę danych mutagenetycznych znalezionych w bazie [GPCRdb](#) dla aminergicznych receptorów klasy A GPCR (gdzie mostek solny między Asp3.32 a ligandem uznawany jest za kluczowe oddziaływanie). Zidentyfikowano trzy rodzaje mutacji Asp3.32, gdzie największy spadek (biorąc pod uwagę medianę rozkładów uzyskanych dla stosunku powinowactwa związków do formy zmutowanej i dzikiej receptora) aktywności ligandów stwierdzono dla mutacji Asp3.32Ala (126-krotny), kolejno Asp3.32Asn (63-krotny), natomiast najłabszy efekt wykazała mutacja Asp3.32Glu (5-krotny).
- Analiza bazy DrugBank pod kątem struktur zawierających fragmenty molekularne, które potencjalnie mogą być zaangażowane w tworzenie mostków solnych z receptorem (Asp/Glu, Lys/Arg). Przy użyciu algorytmów chemoinformatycznych (do przeszukiwania podstrukturalnego i klastrowania hierarchicznego) otrzymano unikalne zestawienia wszystkich fragmentów molekularnych, które zostały użyte w strukturach leków. Dane te mogą być bardzo pomocne w racjonalnym projektowaniu nowych struktur związków aktywnych biologicznie, na drodze podmiany fragmentów molekularnych na inne, ale zachowujące możliwość tworzenia mostków solnych.
- Baza ChEMBL posłużyła do poszukiwania zbiorów SAR obrazujących zależność zmiany rzędowości fragmentów aminowych występujących w tych samych strukturach związków od ich aktywności biologicznej w danym receptorze. Dane te posłużyły jako weryfikacja eksperymentalna dla wykonanych obliczeń kwantowo-mechanicznych energii mostków solnych w różnych układach modelowych (kompleksy Asp z metylo-, dimetylo-, trimetyloaminą oraz N-metylopiperydyną). Wyniki przeszukiwania dostarczyły wielu cennych danych potwierdzających wyniki otrzymane w części teoretycznej pracy (np. że różnica między aktywnością pochodnych zawierających grupę aminową pierwszo- i trzeciorzędową może w niektórych przypadkach wynosić nawet 300-razy; co spowodowane jest niższą energią oddziaływania w układzie z grupą aminową pierwszo-, niż trzeciorzędową).

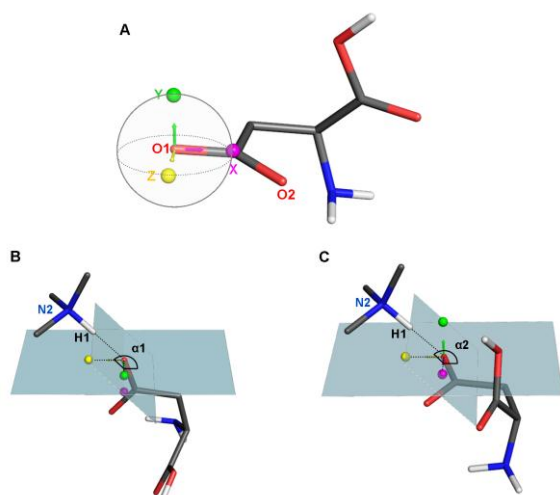
Kolejnym moim osiągnięciem było zaplanowanie i wykonanie, na przykładzie kilku prostych układów modelowych imitujących możliwe konfiguracje mostków solnych w układach biologicznych (kompleksy Asp z metylo-, dimetylo-, trimetyloaminą, N-metylopiperydyną, oraz Lys z kwasem mrówkowym), systematycznych badań teoretycznych zależności energii mostka solnego od: rzędowości grupy aminowej jako donora, długości mostka solnego (odległość $N^+ \cdots O^-$), kąta walencyjnego mostka solnego ($N^+-H \cdots O^-$) oraz wzajemnej orientacji fragmentów molekularnych donora i akceptora mostka solnego względem siebie (skan sferyczny). Obliczenia energii mostka solnego wykonano metodą MP2 w bazie

6-31++G**, z uwzględnieniem rozpuszczalnika (woda, model PCM), przy użyciu programu Gaussian 09.



Rysunek 15. Parametry geometryczne mostków solnych zidentyfikowanych w kompleksach ligand–receptor zdeponowanych w bazie PDB (dla ligandów zawierających grupę aminową A – pierwszo-, B – drugo-, C – trzeciorzędową w roli donora, oraz D – karboksylową w roli akceptora). Dla każdej grupy wybrano przykładowe kompleksy ilustrujące zidentyfikowane oddziaływanie.^{H1}

Wyniki pokazały, że zależność energii od długości mostka solnego przyjmuje kształt krzywej Lenarda-Jonnesa, a energie oddziaływania układów dla optymalnych długości (równowagowych) mostka solnego układają się w zależność: pierwszo- < drugo- < trzeciorzędowa grupa aminowa. Wyniki obliczeń dla zmiany kąta walencyjnego ($N^+-H\cdots O$) wykonane dla wszystkich układów Asp–aminowych wykazały drastyczne zmniejszenie energii oddziaływania w wyniku odchylenia od wartości optymalnej. Najbardziej znaczące zmiany zaobserwowano w przypadku układu Asp–N-metylopiperydyna – odchylenie o więcej niż 10° od wartości optymalnej spowodowało odwrócenie charakteru oddziaływania ze stabilizującego na destabilizujące (spowodowane zawadą steryczną). Pozostałe kompleksy (tj. aminy pierwszo- i drugorzędowe) pokazały niesymetryczny kształt krzywej energii mostka solnego. Ostatnim etapem badań kwantowo-mechanicznych, było opracowanie metodologii i jej implementacja do skanowania sferycznego (Rysunek 16) – otrzymanie sfery interakcji dla mostka solnego przy różnym ułożeniu przestrzennym jednego z fragmentów kompleksu i zamrożeniu pozycji atomów drugiego fragmentu oraz długości mostka solnego. Otrzymany program pozwolił na automatyczne generowanie poszczególnych stanów geometrycznych (2664 punkty dla jednego układu modelowego), kolejno obliczenie energii poszczególnych kompleksów na poziomie MP2/6-31++G** (z modelem PCM) oraz projekcji otrzymanych energii oddziaływania na sferę obrazującą obszary korzystne dla tworzenia mostka solnego (Rysunek 17).

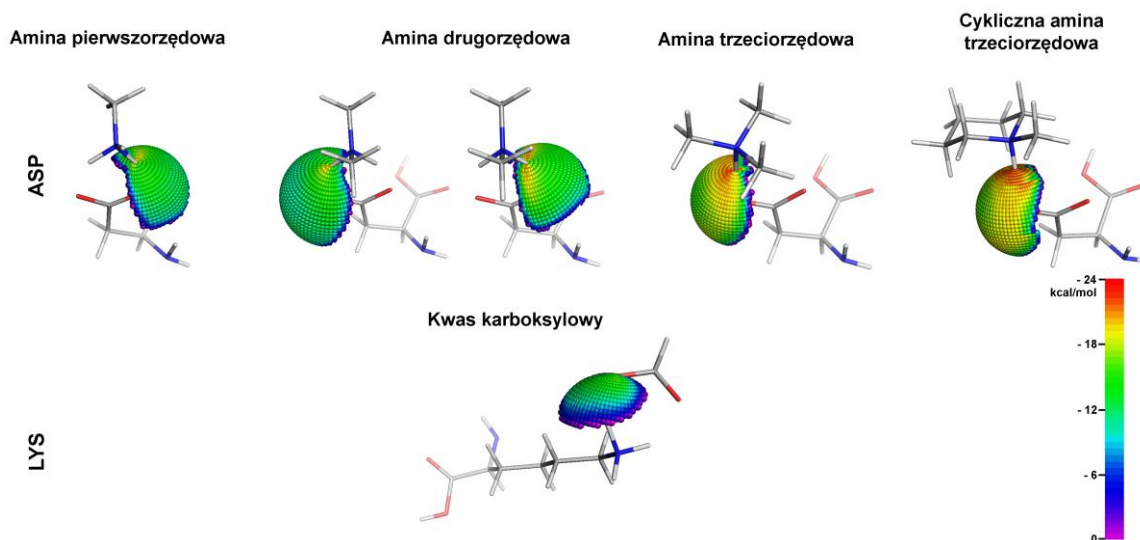


Rysunek 16. Ilustracja metodologii zaimplementowanej do wykonania sferycznego skanu na przykładzie jednego z układów modelowych Asp-trimetyloamina. (A) Definicja przyjętego układu współrzędnych; punkty X, Y, Z wyznaczają wierzchołki wektorów jednostkowych układu współrzędnych. Definicja kątów dwuściennych (B, C) wokół których zdefiniowane były obroty jednego monomeru względem drugiego przy zachowaniu ustalonej długości mostka solnego (odległość między N2 i O1).^{H1}

Analiza wyników skanu sferycznego dla układów modelowych dostarczyła bardzo interesujących wniosków:

- dla Asp, jako akceptora, znaleziono bardzo duży obszar korzystnych interakcji wskazujących na dużą dostępność atomu tlenu grupy karboksylowej,
- mniejszy obszar korzystnego oddziaływania znaleziono dla układu modelowego z Lys jako donorem, najprawdopodobniej z powodu zwiększonej zawady sterycznej powodowanej sąsiednimi atomami wodoru,
- nałożenie obliczonych sfer oddziaływania na losowo wybrane kompleksy z PDB zawierające mostek solny potwierdziło ich zgodność z danymi eksperymentalnymi (mostki solne znajdujące się w danym kompleksie PDB zajmowały obszary sfery korzystne energetycznie).

Na koniec należy nadmienić, iż narzędzia otrzymane w niniejszej pracy (**H1**) zostały wykorzystane do wytłumaczenia mechanizmu zmian aktywności biologicznej pomiędzy stereoizomerami (R/S) zawierającymi ugrupowania aminowe tworzące mostki solne w miejscu aktywnym receptora 5-HT₆ (dane nieopublikowane).



Rysunek 17. Teoretyczne sfery oddziaływania otrzymane dla badanych układów modelowych z mostkiem solnym.^{H1}

4.5.4. Podsumowanie i wnioski

Przedstawione wyniki prac habilitacyjnych dotyczą badania natury i możliwości aplikacji wybranych oddziaływań niekowalencyjnych w racjonalnym projektowaniu nowych związków aktywnych biologicznie w procesie poszukiwania nowych leków z wykorzystaniem metod *in silico*. Badania w tematyce oddziaływań międzycząsteczkowych stanowią jeden z fundamentów nauk podstawowych, niezbędnych aby móc lepiej zrozumieć różnorodne procesy zachodzące w otaczającym świecie. I choć mogłoby się wydawać, że na przestrzeni ostatnich dekad wszystkie procesy jednostkowe jakie zachodzą w skali cząsteczkowej zostały już poznane i rozumiane, to ciągle pojawiają się nowe problemy i wyzwania, których podjęcie i rozwiązanie leży u podstaw zrozumienia i opanowania języka, którym porozumiewają się cząsteczki – oddziaływań niekowalencyjnych. Ponieważ, swoją dotychczasową karierę naukową poświęciłem projektowaniu nowych związków biologicznie aktywnych z wykorzystaniem różnorodnych metod obliczeniowych, to naturalnym krokiem było włączenie się w badania podstawowe na temat dwóch istotnych z punktu widzenia współczesnej chemii medycznej oddziaływań: halogenowego i mostka solnego.

Głównym osiągnięciem naukowym w kwestii badania wiązań halogenowych jest opracowanie nowej metodologii do poszukiwania i weryfikacji aminokwasów uprzywilejowanych dla wiązań halogenowych oraz ich użycia do sterowania aktywnością biologiczną związków chemicznych. W wyniku wykonanych prac badawczych powstały nowe narzędzia do tworzenia zbiorów XSAR, określenia optymalnej metody dokowania i oceny kompleksów związków halogenowych z receptorem, identyfikacji aminokwasów uprzywilejowanych dla wiązań halogenowych, których przydatność została kolejno zweryfikowana w badaniach eksperymentalnych – wpływ rodzaju i miejsca podstawienia atomu halogenu na kierunek zmiany aktywności pochodnych względem ich niepodstawionych analogów.

Dla receptora 5-HT₇ znaleziono dwa aminokwasy uprzywilejowane (T5.39 i S5.42), których wykorzystanie do projektowania pochodnych wykazujących lepszą aktywność, niż niepodstawione analogii została potwierdzona dla trzech grup związków. Wyniki pokazały, że w zależności od rdzenia molekularnego, aktywność związku można poprawić blisko 100-krotnie w porównaniu do niepodstawionego związku macierzystego. Należy również zaznaczyć, iż wybór złej pozycji podstawienia w pierścieniu aromatycznym liganda może również kilkaset-krotnie zmniejszyć aktywność biologiczną. Z kolei weryfikacja eksperymentalna wykonana na przykładzie dwóch grup związków dla receptora 5-HT₆ nie potwierdziła tych samych aminokwasów uprzywilejowanych w każdym z przypadków, ale dostarczyła bardzo ważnych wniosków na temat istotnej roli rdzenia molekularnego.

Drugim badanym oddziaływaniem było ładunkowo-wspomagane wiązanie wodorowe, potocznie zwane mostkiem solnym. Oddziaływanie to, mimo iż znane od dawna nie było do chwili obecnej przedmiotem systematycznych badań nad jego rolą w projektowaniu leków. Ponadto, mostki solne uważane są za jedno z najmocniejszych znanych oddziaływań niekowalencyjnych oraz kluczowych dla zapewnienia aktywności np. w receptorach monoaminergicznych GPCR (które stanowią przedmiot moich badań już od początku działalności naukowej w IF PAN). Głównym rezultatem tych badań, jest otrzymanie wielu ważnych danych nt. zależności geometrycznych mostka solnego od jego energii, częstości

występowania w układach biologicznych, natury oddziaływania (analiza ETS-NOCV). Dodatkowo, opracowano i zaimplementowano algorytm do tworzenia teoretycznych sfer interakcji dla mostków solnych, które można wykorzystać do jakościowej oceny tworzonych oddziaływań i w dalszym kroku wykonać takie modyfikacje w strukturze liganda aby polepszyć parametry tego oddziaływania i tym samym aktywność nowoprojektowanych cząsteczek.

Opracowane narzędzia i metodologia są w dalszym ciągu optymalizowane i weryfikowane, a w niedługim czasie mogą stać się istotnym wspomaganie pracy chemików medycznych w kwestii wyboru odpowiednich pochodnych do dalszych syntez służących odkrywaniu innowacyjnych leków, o przełomowym znaczeniu dla współczesnej farmakoterapii.

4.5.5. Literatura

- (1) Yu, W.; MacKerell, A. D.; Jr. *Methods Mol. Biol.* **2017**, 1520, 85.
- (2) *Computer-Aided Drug Discovery*; Zhang, W., Ed.; Methods in Pharmacology and Toxicology; Springer New York: New York, NY, 2016.
- (3) Yang, J. *Int. J. Org. Chem.* **2013**, 03 (01), 1.
- (4) Surabhi, S.; Singh, B. *J. Drug Deliv. Ther.* **2018**, 8 (5), 504.
- (5) Ban, F.; Dalal, K.; Li, H.; LeBlanc, E.; Rennie, P. S.; Cherkasov, A. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, 57 (5), 1018.
- (6) Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W.; Jr. *Pharmacol. Rev.* **2014**, 66 (1), 334.
- (7) Baig, M. H.; Ahmad, K.; Roy, S.; Ashraf, J. M.; Adil, M.; Siddiqui, M. H.; Khan, S.; Kamal, M. A.; Provazník, I.; Choi, I. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, 22 (5), 572.
- (8) Wermuth, C. G. *The practice of medicinal chemistry*; Elsevier/Academic Press, 2008.
- (9) Huang, S.-Y.; Grinter, S. Z.; Zou, X. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12 (40), 12899.
- (10) Pakpahan, M. T.; Rusmerryani, M.; Kawaguchi, K.; Saito, H.; Nagao, H. In *AIP Conference Proceedings*; American Institute of Physics, 2013; Vol. 1518, pp 645–648.
- (11) Liu, J.; Wang, R. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, 55 (3), 475.
- (12) Shamsara, J. *Int. J. Med. Chem.* **2014**, 2014, 1.
- (13) Politzer, P.; Murray, J. S.; Clark, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12 (28), 7748.
- (14) Hennemann, M.; Murray, J. S.; Politzer, P.; Riley, K. E.; Clark, T. *J. Mol. Model.* **2012**, 18 (6), 2461.
- (15) Murray, J. S.; Paulsen, K.; Politzer, P. *Proc. Indian Acad. Sci.* **1994**, 106 (2), 267.
- (16) Clark, T.; Hennemann, M.; Murray, J. S.; Politzer, P. *J. Mol. Model.* **2007**, 13 (2), 291.
- (17) Metrangolo, P.; Neukirch, H.; Pilati, T.; Resnati, G. *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38 (5), 386.
- (18) Sirimulla, S.; Bailey, J. B.; Vegesna, R.; Narayan, M. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53 (11), 2781.
- (19) Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerger, A. C.; Boeckler, F. M. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1363.
- (20) Auffinger, P.; Hays, F.; Westhof, E.; Ho, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101 (48), 16789.
- (21) Riley, K. E.; Murray, J. S.; Fanfrlík, J.; Řezáč, J.; Solá, R. J.; Concha, M. C.; Ramos, F. M.; Politzer, P. *J. Mol. Model.* **2011**, 17 (12), 3309.
- (22) Riley, K. E.; Murray, J. S.; Fanfrlík, J.; Řezáč, J.; Solá, R. J.; Concha, M. C.; Ramos, F. M.; Politzer, P.

- J. Mol. Model.* **2013**, *19* (11), 4651.
- (23) Fanfrlík, J.; Kolář, M.; Kamlar, M.; Hurný, D.; Ruiz, F. X.; Cousido-Siah, A.; Mitschler, A.; Řezáč, J.; Munusamy, E.; Lepšík, M.; Matějčíček, P.; Veselý, J.; Podjarný, A.; Hobza, P. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (11), 2484.
 - (24) Hardegger, L. A.; Kuhn, B.; Spinnler, B.; Anselm, L.; Ecabert, R.; Stihle, M.; Gsell, B.; Thoma, R.; Diez, J.; Benz, J.; Plancher, J. M.; Hartmann, G.; Banner, D. W.; Haap, W.; Diederich, F. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (1), 314.
 - (25) Iltzsch, M. H.; Uber, S. S.; Tankersley, K. O.; el Kouni, M. H. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49* (10), 1501.
 - (26) Benjahad, A.; Guillemont, J.; Andries, K.; Nguyen, C. H.; Grierson, D. S. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (24), 4309.
 - (27) Gilli, P.; Gilli, G. *J. Mol. Struct.* **2010**, 972 (1–3), 2.
 - (28) Gilli, P.; Pretto, L.; Bertolasi, V.; Gilli, G. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (1), 33.
 - (29) Gilli, P.; Pretto, L.; Gilli, G. *J. Mol. Struct.* **2007**, 844–845, 328.
 - (30) Bywater, R. P. *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18* (1), 60.
 - (31) Kristiansen, K.; Kroeze, W. K.; Willins, D. L.; Gelber, E. I.; Savage, J. E.; Glennon, R. A.; Roth, B. L. *A Highly Conserved Aspartic Acid (Asp-155) Anchors the Terminal Amine Moiety of Tryptamines and Is Involved in Membrane Targeting of the 5-HT 2A Serotonin Receptor But Does Not Participate in Activation via a "Salt-Bridge Disruption" Mechanism 1*; Gether and Kobilka, 1996; Vol. 293.
 - (32) Kooistra, A. J.; Kuhne, S.; de Esch, I. J. P.; Leurs, R.; de Graaf, C. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *170* (1), 101.
 - (33) Sencanski, M.; Sukalovic, V.; Shakib, K.; Soskic, V.; Dosen-Micovic, L.; Kostic-Rajacic, S. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *83* (4), 462.
 - (34) Kobilka, B. K. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1768 (4), 794.
 - (35) Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G. F.; Kobilka, B. K. *Nature* **2009**, 459 (7245), 356.
 - (36) Sriram, K.; Insel, P. A. *Mol. Pharmacol.* **2018**, *93* (4), 251.
 - (37) Hauser, A. S.; Attwood, M. M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H. B.; Gloriam, D. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (12), 829.
 - (38) Hauser, A. S.; Chavali, S.; Masuho, I.; Jahn, L. J.; Martemyanov, K. A.; Gloriam, D. E.; Babu, M. M. *Cell* **2018**, 172 (1–2), 41.
 - (39) Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63* (6), 1256.
 - (40) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1739.
 - (41) Koebel, M. R.; Schmadeke, G.; Posner, R. G.; Sirimulla, S. *J. Cheminform.* **2016**, *8* (1), 27.
 - (42) Harder, E.; Damm, W.; Maple, J.; Wu, C.; Reboul, M.; Xiang, J. Y.; Wang, L.; Lupyan, D.; Dahlgren, M. K.; Knight, J. L.; Kaus, J. W.; Cerutti, D. S.; Krilov, G.; Jorgensen, W. L.; Abel, R.; Friesner, R. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (1), 281.
 - (43) Brooijmans, N.; Humblet, C. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24* (5), 433.
 - (44) Park, K.; Sung, N. K.; Cho, A. E. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, *34* (2), 545.

- (45) Singh, K. D.; Muthusamy, K. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, 34 (12), 1592.
- (46) Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M. L.; Patricia Bento, A.; Chambers, J.; Mendez, D.; Mutowo, P.; Atkinson, F.; Bellis, L. J.; Cibrian-Uhalte, E.; Davies, M.; Dedman, N.; Karlsson, A.; Magarinos, M. P.; Overington, J. P.; Papadatos, G.; Smit, I.; Leach, A. R. *Nucleic Acids Res.* **2017**.
- (47) Rataj, K.; Witek, J.; Mordalski, S.; Kosciolatek, T.; Bojarski, A. J. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54 (6), 1661.
- (48) Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Zahn, S.; Exner, T. E.; Boeckler, F. M. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, 56 (7), 1373.
- (49) Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Zahn, S.; Boeckler, F. M. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2012**, 26 (8), 935.
- (50) Zajdel, P.; Kurczab, R.; Grychowska, K.; Satała, G.; Pawłowski, M.; Bojarski, A. J. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 56, 348.
- (51) Berman, H. M. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28 (1), 235.
- (52) Law, V.; Knox, C.; Djoumbou, Y.; Jewison, T.; Guo, A. C.; Liu, Y.; Maciejewski, A.; Arndt, D.; Wilson, M.; Neveu, V.; Tang, A.; Gabriel, G.; Ly, C.; Adamjee, S.; Dame, Z. T.; Han, B.; Zhou, Y.; Wishart, D. S. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42 (D1), D1091.
- (53) Isberg, V.; Mordalski, S.; Munk, C.; Rataj, K.; Harpsøe, K.; Hauser, A. S.; Vroling, B.; Bojarski, A. J.; Vriend, G.; Gloriam, D. E.; V., C.; G., C. M.; L., R. B.; C., S. R.; S.K., B. *Nucleic Acids Res.* **2016**, 44 (D1), D356.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Sumarycznie na mój dorobek naukowy składa się: 43 artykuły oryginalne (o łącznym współczynniku $IF_{rok\ opublikowania} = 136,579$ i sumie punktów MNiSW = 1426), 4 artykuły popularnonaukowe, 1 patent oraz 72 wystąpienia na konferencjach krajowych i zagranicznych. W tym:

- przed uzyskaniem stopnia doktora: 7 artykułów oryginalnych (o sumarycznym $IF_{rok\ wydania} = 17,591$, pkt. MNiSW = 214), 4 artykuły popularnonaukowych, oraz 25 prezentacji konferencyjnych. Byłem także kierownikiem grantu Preludium 2,
- po uzyskaniu stopnia doktora: 36 artykułów oryginalnych (o sumarycznym $IF_{rok\ wydania} = 118,988$, pkt. MNiSW = 1212), 3 artykuły spoza listy JCR, 1 patent, 47 prezentacji konferencyjnych. Byłem także kierownikiem grantu Sonata 8.

Moje zainteresowania dotyczyły następujących obszarów badawczych:

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

- badanie natury i roli wiązań wodorowych za pomocą metod kwantowych (**P41–43**),
- budowa i optymalizacja protokołu wirtualnego przeszukiwania chemicznych baz danych w celu identyfikacji nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwdepresyjnym i przeciwłękowym (**P40**),
- badanie wpływu gęstości fingerprintowej (tzw. daktylogramów molekularnych) oraz składu zbioru treningowego na efektywność metod uczenia maszynowego oraz ich wykorzystaniem w wirtualnym skryningu,

- opracowanie i implementacją nowego algorytmu generowania modeli farmakoforowych opartych o strukturę znanych ligandów oraz sposób ich oddziaływania w miejscu wiążącym receptora (**P33**),
- opracowanie sposobu tworzenia i analizy wirtualnych bibliotek kombinatorycznych opartych na schemacie syntezy (**P39**).

Po uzyskaniu stopnia doktora:

- implementacja wirtualnego skringingu do poszukiwania związków o różnym profilu działania (**P27, P31**),
- badanie mechanizmu oddziaływania różnych grup związków chemicznych z receptorami: 5-HT₆R (**P9, P18**), 5-HT₇R (**P12, P14, P19, P21, P23, P25, P28, P29**), tubulina (**P10, P15**),
- implementacja metod uczenia maszynowego do protokołu wirtualnego skringingu w celu rozszerzenia stosowalności i poprawy skuteczności (**P20, P27, P30, P34, P36**),
- opracowanie modeli decyzyjnych wspomagających nowy paradygmat w projektowaniu leków (polifarmakologia obliczeniowa) związany z przewidywaniem aktywności związku do wielu receptorów jednocześnie (**P22, P23**),
- badanie wpływu i znaczenia oddziaływań halogenowych w racjonalnym projektowaniu i optymalizacji nowych leków na przykładzie wybranych receptorów klasy A GPCR (**H2–8, P11, P24**),
- rola i znaczenie ładunkowo-wspomaganych wiązań wodorowych (mostków solnych) w kompleksach ligand–receptor (**H1**),
- wpływ substytucji fluorem na zmianę aktywności biologicznej związków chemicznych, a w szczególności właściwości kluczowych oddziaływań, tj. wiązań wodorowych i halogenowych wykorzystując szereg metod eksperymentalnych (spektroskopia FTIR, NMR, XRD) oraz teoretycznych (obliczenia kwantowo-chemiczne, dynamika molekularna *ab initio* oraz klasyczna).

5.1. Omówienie działalności naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja działalność naukowa rozpoczęła się na piątym roku studiów, gdy obok tematu pracy magisterskiej realizowałem autorski projekt (pod opieką naukową prof. dr. hab. Artura Michalaka i dr. Mariusza Mitoraja) na temat badania natury rezonansowo-wspomaganych wiązań wodorowych (RAHB) z zastosowaniem metod chemii kwantowej (głównie ETS-NOCV). Wynikiem tej działalności było opublikowanie 3 artykułów naukowych w czasopiśmie z listy JCR (**P41–P43**) oraz 1 prezentacja posteru na konferencji międzynarodowej (**J72**).

Zaraz po obronie pracy magisterskiej zacząłem prace w Instytucie Farmakologii PAN, gdzie zająłem się tworzeniem protokołu wirtualnego skringingu (VS) chemicznych baz danych. Skuteczność opracowanego protokołu została przetestowana podczas poszukiwania nowych ligandów receptora serotoniny 5-HT₇, którego regulacja ma duże znaczenie dla działania wielu leków psychotropowych. Spośród około 750 tysięcy związków dostępnych w bibliotece firmy Enamine, zidentyfikowano wiele połączeń chemicznych, z których 26 zakupiono, a następnie wyznaczono eksperymentalnie ich powinowactwo do receptora

5-HT₇. W grupie zbadanych związków, dwie pochodne benzodioksanu wykazały znaczący poziom aktywności ($K_i < 300$ nM), co biorąc pod uwagę niewielką liczbę zakupionych związków i fakt, iż pochodne benzodioksanu nie były do tej pory klasyfikowane jako ligandy 5-HT₇R, potwierdzało poprawność przyjętego modelu (**P40**).

W ramach wspólnego grantu ([NorPol](#)) z naukowcami z Uniwersytetu w Tromsø, zastosowano ulepszony protokół VS do przeszukania pięciu komercyjnych baz (liczących w sumie około 3 240 000 struktur), z których wybrano 202 związki jako potencjalne inhibitory transportera serotoniny (SERT). Wyniki badań *in vitro* potwierdziły znaczące powinowactwo 24 związków do SERT ($K_i < 1000$ nM). Nowością w tych badaniach było m.in. opracowanie i wdrożenie metody weryfikacji aktywności znalezionych „hitów”. Struktury związków zidentyfikowanych w VS dla SERT, wykorzystano do utworzenia kwerend molekularnych na podstawie których przeszukano ponownie zawartość pięciu wybranych baz i wybrano 198 najbliższych analogów strukturalnych. Wyniki oznaczeń aktywności biologicznej potwierdziły znamienne powinowactwo ($K_i < 1000$ nM) dla 11 chemotypów, przy czym, w 5 przypadkach znaleziono nawet związki aktywniejsze niż w VS. W ten sposób zaproponowany schemat uproszczonego podejścia do pozyskiwania analogów struktur trafionych (ang. *hit-to-lead*, *H2L*) przyniósł spodziewane rezultaty i dostarczył w szybki sposób wstępnych informacji do przeprowadzenia analizy zależności struktura-aktywność w danej grupie związków, niezbędnych do dalszej racjonalnej optymalizacji struktur związków aktywnych.

Ogólną skuteczność opracowanej strategii VS podsumowują tzw. współczynniki trafień: 8% w badaniach skierowanych na 5-HT₇R oraz 11,4% dla SERT. W porównaniu z metodami skriningu wysokoprzepustowego (HTS), w których współczynnik trafień $\ll 1\%$, otrzymane wyniki VS są znacznie korzystniejsze. Należy podkreślić, że w obu przypadkach wybór związków był zawsze ograniczony tylko do struktur niewykazujących podobieństwa do znanych ligandów danego celu biologicznego (**P31**).

Prace rozwojowe nad protokołem VS kontynuowałem także w ramach grantu Opus 2 we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu ukierunkowanym na poszukiwanie siarkowych pochodnych w grupie kombretastatyny A-4 (CA-4) o działaniu cytotoksycznym i przeciwnowotworowym. W ramach współpracy opracowałem narzędzia (skrypty, programy) oraz modele predykcyjne (oparte na kodowaniu oddziaływań ligand–receptor w postaci wektora binarnego oraz algorytmie uczenia maszynowego SVM) do tworzenia i analizy wirtualnych bibliotek kombinatorycznych opartych na dwu-etapowym schemacie otrzymywania siarkowych pochodnych CA-4. Ich zastosowanie pozwoliło ocenić całą dostępną przestrzeń syntetyczną (na podstawie wszystkich handlowo dostępnych reagentów) i wybrać zestaw kilkudziesięciu związków, wśród których znalazły się związki o wysokiej aktywności ($K_i < 10$ nM). Metoda została wdrożona w różnych projektach i współpracach z innymi ośrodkami naukowymi (Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Wydział Farmaceutyczny UJ CM), pozwalając na identyfikację nowych grup związków biologicznie aktywnych (**P15**).

W 2012 roku otrzymałem grant badawczy Preludium 2 na badania podstawowe związane z użyciem fingerprintów molekularnych w VS. Główne wyniki dotyczyły zbadania wpływu gęstości różnych fingerprintów molekularnych, sposobu generowania zbioru nieaktywnych przykładów uczących oraz ich ilości na efektywność uczenia maszynowego.

Wyniki znalazły zastosowanie jako „przewodnik” do zwiększenia wydajności metod uczenia maszynowego w przeszukiwaniu baz danych pod kątem identyfikacji nowych struktur aktywnych. Otrzymane zależności mogą być wykorzystane do dowolnych aplikacji metod uczenia maszynowego (**P20, P30, P34**).

5.2. Omówienie działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałem pracę naukową w Zakładzie Chemii Leków IF PAN w Krakowie skupiając się na rozwijaniu własnych zainteresowań badawczych (tj. badania wybranych niekowalencyjnych oddziaływań międzycząsteczkowych, dalszy rozwój protokołu i algorytmów dla VS), oraz zadań, związanych z użyciem komputerowo-wspomaganej projektowania/optimalizacji nowych leków w różnych projektach naukowo-badawczych (projekty nakierowane głównie na poszukiwanie nowych substancji o działaniu przeciwdepresyjnym, przeciwłękowym, prokognitywnym, cytotoksycznym, przeciwnowotworowym).

W ramach prac nad rozwojem metod/algorytmów stosowanych w VS na wspomnienie zasługują dwa działania. W ramach pierwszego, opracowałem i przetestowałem skuteczność nowatorskiego algorytmu do tworzenia kwerend farmakoforowych (kombinacji modeli farmakoforowych) opartych na zbiorze możliwych modeli farmakoforowych zbudowanych na podstawie analizy oddziaływań ligandów z miejscem wiążącym receptora. Metoda okazała się skuteczniejsza, niż stosowane wówczas podejście do budowy modeli farmakoforowych typu *ligand-based*. Dodatkowo, w żadnym dostępnym komercyjnym oprogramowaniu nie ma możliwości budowy takiej kwerendy oraz jej optymalizowania na określone potrzeby VS. Algorytm został opublikowany w postaci 1 artykułu (**P33**), 1 wystąpienia ustnego (**I7**) oraz 2 posterów na konferencjach międzynarodowych (**J48, J45**). Dodatkowo, w ramach projektu [PLATFORMex](#) utworzono pierwszą implementację tego algorytmu z interfejsem graficznym użytkownika (GUI). W chwili obecnej prowadzone są testy i optymalizacja oprogramowania. Drugim działaniem są prace związane z implementacją metod uczenia maszynowego na potrzeby VS. Do chwili obecnej zaplanowałem i wykonałem kilka istotnych eksperymentów numerycznych, w których badane były globalne preferencje użycia kombinacji różnych metod uczenia maszynowego ze sposobem opisu struktury cząsteczki związku chemicznego (deskryptory molekularne). Wyniki badań stały się podstawą 4 publikacji naukowych o charakterze metodycznym (**P36, P34, P30, P20**) oraz 1 publikacji o charakterze aplikacyjnym w VS (**P27**). Generalnie w tej serii prac wykazano, że skuteczności wyszukiwania związków aktywnych w wirtualnym skryningu zależy od: (i) rodzaju użytego algorytmu uczenia maszynowego, (ii) rodzaju użytego deskryptora (fingerprintu) molekularnego, (iii) wielkości zbioru uczącego (treningowego), oraz (iv) relacji stosunku pozytywne/negatywne przykłady uczące i wielkość przeszukiwanej biblioteki związków chemicznych. Otrzymane wyniki dostarczyły wskazówek dotyczących, pomijanego dotąd, aspektu optymalizowania sposobu doboru rodzaju fingerprintu do danej metody uczenia maszynowego oraz wielkości przeszukiwanej bazy danych. Pozwala to budować skuteczniejsze modele klasyfikacyjne i tym lepiej przeszukiwać przestrzeń chemiczną stosując metody wirtualnego skryningu.

Moje kolejne, zainteresowania naukowe skupiają się wokół opracowania metod/algorytmów obliczeniowych wspierających popularny obecnie paradygmat polifarmakologii, czyli równoczesnej symulacji oddziaływań związków chemicznych z pożądanymi i niekorzystnymi celami biologicznymi (interakcje krzyżowe). W tej kwestii opracowałem nowatorski algorytm poszukiwania selektywnie działających ligandów dla strukturalnie bliskich receptorów białkowych (1 praca została opublikowana na przykładzie selektywności 5-HT₇/5-HT_{1A}). Główną ideą zaproponowanego algorytmu jest tworzenie klasyfikatora SVM (używając mechanizmu fuzji danych) bazującego na czterech komponentowych modelach szczegółowych SVM. Trenowanych w taki sposób, że pozytywny zbiór treningowy stanowią ligandy selektywne w stosunku do pożądanego receptora (5-HT₇), a klasy negatywne odpowiednio ligandy: (i) selektywne względem niepożądanego receptora (5-HT_{1A}), (ii) nieselektywne, ale spełniające kryterium aktywności względem pożądanego receptora ($K_i < 100$ nM), (iii) nieselektywne, oraz (iv) losowo wybrane z biblioteki ZINC przy użyciu algorytmu DUD-e (*directory of useful decoys*). Przetestowano dwa podejścia do kodowania informacji, tj. w formie klasycznych fingerprintów molekularnych (podejście *ligand-based*) oraz bazujące na kodowaniu oddziaływań 3D ligand–receptor w formie fingerprintów oddziaływania (SIFt, *structure-based*). Na badanym przykładzie selektywności 5-HT_{7R}/5-HT_{1A} receptorowej lepszym podejściem okazało się bazujące tylko na strukturach ligandów, a model wynikowy SVM okazał się bardzo wydajny w testach retrospektywnych (**P22**). Opracowany model obliczeniowy dla selektywności 5-HT₇/5-HT_{1A} został następnie zastosowany do prospektywnej oceny biblioteki nowych arylosulfonamidowych pochodnych (aryloksy)propylo-piperydiny (badania wykonane we współpracy z Zakładem Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny UJ CM), jako selektywnych antagonistów receptora 5-HT₇ (**P23**). Model poprawnie przewidział selektywność dla ~72% wszystkich zsyntezowanych pochodnych. Badania te dostarczyły również dodatkowych danych, które zostały użyte do trenowania modeli komponentowych SVM. Skutkowało to blisko 20% wzrostem poprawności przewidywania selektywnych ligandów 5-HT_{7R} przez algorytm.

Badania te stały się podstawą do opracowania konceptu ideowego polifarmakologicznej platformy obliczeniowej *in silico*, na co otrzymałem finansowanie w ramach programu LIDER IX (finansowany ze środków NCBR na lata 2019–2021, budżet 1 200 000 zł.). Projekt będzie realizowany przez doświadczony zespół młodych naukowców pod moim kierownictwem, i we współpracy z firmą bioinformatyczną Ardigen. Należy dodać, iż na chwilę obecną nie istnieją gotowe rozwiązania realizujące tego typu obliczenia (komercyjne/darmowe), dlatego opracowany prototyp platformy będzie pierwszym tego typu narzędziem na świecie, pozwalającym na eliminowanie związków chemicznych, mogących mieć niepożądane interakcje, już na wczesnym etapie rozwoju leku.

W 2017 roku nawiązałem współpracę z dr. hab. Robertem Podgajnym z Wydziału Chemii UJ, w ramach której zajmuję się badaniem oddziaływań anion- π w układach biologicznych (przeszukiwanie bazy danych PDB, dokowanie molekularne, obliczenia kwantowo-mechaniczne). W ramach współpracy zostałem także promotorem pomocniczym w doktoracie poświęconym tej tematyce (*Projektowanie i synteza nowych syntonów anion- π istotnych z punktu widzenia układów i procesów biologicznych*, 2017–2021).

Również w 2017 roku rozpocząłem intensywne badania nad rolą i wpływem fluoru (jako podstawnika) na zmianę aktywności biologicznej związków chemicznych na przykładzie wybranych receptorów klasy A GPCR (5-HT₇, D₂, D₃), a w szczególności właściwości kluczowych oddziaływań obserwowanych w kompleksach ligand–receptor, tj. wiązań wodorowych i halogenowych, wykorzystując szereg metod eksperymentalnych (spektroskopia FTIR, NMR, XRD) oraz teoretycznych (obliczenia kwantowo-chemiczne, dynamika molekularna *ab initio* oraz klasyczna). Badania wstępne wykonano dla czterech układów modelowych (anilina, 2-F-anilina, 3-F-anilina oraz 4-F-anilina) tj. pomiary widm FTIR, oraz szereg standardowych obliczeń kwantowo-mechanicznych (optymalizacja geometrii monomerów, analiza drgań normalnych w zakresie podczerwieni, mapy potencjałów elektrostatycznych). Kolejno, w ramach pracy magisterskiej (sprawowałem rolę opiekuna naukowego, mgr Wojciech Pietruś), użyto techniki dynamiki molekularnej *ab initio* (AIMT). Na podstawie wykonanej serii 20 ps symulacji dla układów modelowych oraz danych eksperymentalnych otrzymano szereg istotnych informacji nt. roli fluoru w oddziaływaniach międzycząsteczkowych, które stały się podstawą do opracowania wniosku grantowego w ramach programu SONATA BIS. Ponadto, jestem promotorem pomocniczym w doktoracie poświęconym badaniom teoretycznym i spektroskopowym roli fluoru w kompleksach ligand–receptor (*Rola i znaczenie fluoru w racjonalnym projektowaniu leków na przykładzie wybranych receptorów klasy A GPCR*, 2017–2021).

5.3. Udział w projektach badawczych

W latach 2009–2019 brałem udział w następujących projektach badawczych (pełnione funkcje: wykonawca, kierownik zadania, kierownik projektu):

1. Polifarmakologiczna platforma skринingowa *in silico*, Lider IX LIDER/37/0137/L-9/17/NCBR/2018, **kierownik projektu**, 2019–2021,
2. Opracowanie unikalnych sond molekularnych: niskozasadowi agoniści do badania funkcji receptora 5-HT₇, Opus UMO-2017/25/B/NZ7/02929, **wykonawca**, 2017–2020,
3. Funkcjonalnie selektywni odwrotni agoniści receptora 5-HT₆ oraz podwójne inhibitory 5-HT₆/MAO-B – w poszukiwaniu nowych podejść terapeutycznych do leczenia choroby Alzheimer, Opus UMO-2016/21/B/NZ7/01742, **wykonawca**, 2017–2020,
4. Projektowanie, synteza, badania krystalograficzne oraz ocena aktywności biologicznej nowych pochodnych chalkonów – potencjalnych czynników antymitotycznych, Opus UMO-2015/17/B/ST4/03701, **wykonawca**, 2016–2019,
5. Wiązania halogenowe w oddziaływaniu ligandów z SERT, Sonata, UMO–2016/21/D/NZ7/00620, **wykonawca**, 2017–2018,
6. Triazynowe ligandy receptora serotoninowego 5-HT₆ – nowa perspektywa w terapii współczesnych chorób cywilizacyjnych OUN, Opus UMO-2015/17/B/NZ7/02973, **wykonawca**, 2015–2019,
7. Wiązania halogenowe – rola i znaczenie w oddziaływaniach ligandów z receptorami klasy A GPCR, Sonata UMO-2014/15/D/NZ7/01782, **kierownik projektu**, 2015–2018,
8. Nowa nieamyloidowa terapia zaburzeń poznawczych (NATCo), współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu Badań Stosowanych, **wykonawca**, 2015–2017,

9. Biomimetyki LCAP pochodne amin alicyklicznych jako nowa klasa ligandów dla receptorów monoaminergicznych, Opus UMO-2012/05/B/NZ7/03076, **wykonawca**, 2013–2016,
10. EXtension of academia-based PLATFORM to antidepressant hits discovery, dofinansowany ze środków Norweskiego Mechanizmu Finansowego w ramach Polsko-Norweskiej Współpracy Badawczej, Pol-Nor/198887/73/2013, **kierownik zadania**, 2013–2016,
11. Innowacyjne terapie chorób neurodegeneracyjnych i neurorozwojowych w oparciu o modulatory allosteryczne receptorów mGlu (Allosterix), współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu Badań Stosowanych, PBS1/B7/8/2012, **wykonawca**, 2012–2015,
12. Wpływ gęstości fingerprintów molekularnych na efektywność rozpoznawania chemicznych wzorców strukturalnych, Preludium UMO-2011/03/N/NZ2/02478, **kierownik projektu**, 2012–2013,
13. Projektowanie, synteza i ocena aktywności biologicznej metylotiopochodnych kombretastatyny CA-4 – potencjalnych czynników antymitotycznych, Opus UMO-2011/03/B/NZ7/00509, **kierownik zadania**, 2012–2014,
14. Demeter – Depresja, mechanizmy, terapia, Projekt współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, WND-POIG.01.01.02-12.004/09, **wykonawca**, 2010–2013,
15. Modulacja allosteryczna – nowa strategia w farmakoterapii. Identyfikacja własności psychotropowych ligandów receptorów glutamatergicznych III grupy, Projekt współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, WND-POIG.01.03.01-12-100/08, **kierownik zadania**, 2009–2013,
16. Stworzenie platformy do poszukiwania związków działających na układy serotonergiczny lub glutamatergiczny jako potencjalnych leków przeciwdepresyjnych lub przeciwlękowych, Projekt dofinansowany z ze środków Norweskiego Mechanizmu Finansowego w ramach Polsko-Norweskiego Funduszu Badań Naukowych, PNRF-103-AI-1/07, **wykonawca**, 2010–2011,
17. Antagoniści receptora 5-HT₆: Nowoczesne leki przeciwpsychotyczne o dodatkowym działaniu pro kognitywnym, Projekt współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, UDA-POIG.01.03.01-12-063/09-02, **kierownik zadania**, 2010–2014,
18. Poszukiwanie nowych ligandów mGluR2 i mGluR3 i ich charakterystyka farmakologiczna, MNiSW nr N405 1846 35, **wykonawca**, 2008–2011,
19. Poszukiwanie nowych ligandów receptorów 5-HT₆ i 5-HT₇ o potencjalnym działaniu ośrodkowym, MNiSW N N405 671540, **kierownik zadania**, 2011–2013.

5.4. Odbyte szkolenia i kursy

1. Szkolenie: **Zastosowanie statystyki i Statistica w opracowywaniu wyników badań naukowych**, zrealizowane przez StatSoft Polska, Tarnów, 3,4, 23, 24, 30.11.2016,
2. Szkolenie z zakresu **Negocjacji**, organizowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej w ramach Projektu Skills, Kraków 8–9.10.2014,
3. Szkolenie: **Zarządzania projektami badawczymi**, organizowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej w ramach Projekt Skills, Warszawa 25–26.06.2014,
4. Kurs pedagogiczny, Studium Pedagogiczne Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej w Tarnowie, data ukończenia 2006, świadectwo nr SP/kp/IMP/642/2005/2006.

5.5. Recenzje prac naukowych

Byłem recenzentem prac w następujących czasopismach naukowych znajdujących się na liście JCR: Acta Crystallographica Section B (1), Arabian Journal of Chemistry (1), Bioinformatics, Oxford press (1), Chemical Biology & Drug Design (1), Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening (3), Journal of Cheminformatics (1), Journal of Medicinal Chemistry (1), Methods (1), Pharmacological Reports (1), Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (1), The Scientific World Journal (1), PLOS One (1).

5.6. Staże naukowe

W latach 2009–2019 odbyłem kilka krótkoterminowych staży w ramach realizowanych wspólnych projektów naukowo-badawczych:

1. Francja, Institut de Chemie Organique et Analytique, Université d'Orléans, 02–06.12.2012,
2. Francja, Institut de Chemie Organique et Analytique, Université d'Orléans, 27.05–03.06.2012,
3. Norwegia, Medical Pharmacology and Toxicology, Department of Medical Biology, Faculty of Health Science, University of Tromsø, 12–21.09.2011,
4. Norwegia, Medical Pharmacology and Toxicology, Department of Medical Biology, Faculty of Health Science, University of Tromsø, 14–22.11.2010,
5. Norwegia, Medical Pharmacology and Toxicology, Department of Medical Biology, Faculty of Health Science, University of Tromsø, 18–26.03.2010

5.7. Współpraca naukowa

W trakcie mojej działalności naukowej (w latach 2010–2019) współpracowałem/nadal współpracuję z różnymi ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą, tj.:

- Katedra Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych, Instytut Chemii i Technologii Organicznej, Politechnika Krakowska (dr inż. Paweł Śliwa),
- Zakład Krystalografii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (prof. dr hab. Maciej Kubicki),
- Zakład Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński (dr hab. Paweł Zajdel),

- Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński (dr hab. Jadwiga Handzlik),
- Wydział Matematyki i Informatyki Stosowanej Uniwersytet Jagielloński (dr Marek Śmieja, dr Marcin Żelawski),
- Zakład Chemii Organicznej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (dr Krzysztof Marciniak, dr hab. Beata Morak-Młodawska),
- Narodowy Instytut Leków w Warszawie (dr Małgorzata Jarończyk),
- Zakład Biologii Medycznej Uniwersytetu w Tromsø, Norwegia (dr Mari Gabrielsen),
- Wydziałem Nauk Farmaceutycznych, Uniwersytetu w Catanii, Włochy (prof. Maria Siracusa, dr Sebastiano Intagliata),
- Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu (dr Tomasz Stefański, dr Jacek Kujawski),
- Instytut Chemii Organicznej i Analitycznej (ICOA), Uniwersytet w Orleanie, Francja (prof. Franck Suzenet),
- CELON Pharma S.A., Łomianki/Kielpin,
- Selvita S.A., Kraków.

6. Nagrody i wyróżnienia

1. Pierwsza nagroda za poster pt. *Novel derivatives of 1H-pyrrolo[3,2-c]quinoline as dual 5-HT₆/D₃R antagonists with procognitive properties*, Grychowska K., Deville C., **Kurczab R.**, Satała G., Piska K., Koczurkiewicz P., Chaumont-Dubel S., Krawczyk M., Pękała E., Bojarski A., Marin P., Popik P., Zajdel P., zaprezentowany podczas IX Konwersatorium Chemii Medycznej, **13–15.09.2018**, Lublin,
2. Nagroda Rektora PWSZ w Tarnowie za indywidualne osiągnięcia naukowe Młodego Naukowca, **2018**,
3. Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców (**2015–2018**),
4. Druga nagroda za poster pt. *N-alkylated arylsulfonamides of (aryloxy)ethyl piperidines: 5-HT₇ receptor selectivity vs multireceptor profile*, Canale V., **Kurczab R.**, Satała G., Partyka A., Jastrzębska-Więsek M., Słoczyńska K., Kos T., Pękała E., Popik P., Bojarski A.J., Wesołowska A., Zajdel P., zaprezentowany podczas VII Konwersatorium Chemii Medycznej, **17–19.09.2015**, Lublin,
5. Najlepsza norweska publikacja z farmakologii w roku **2014 (P30)**, nagroda przyznana przez Norweskie Towarzystwo Farmakologii i Toksykologii,
6. Pierwsza nagroda za poster pt. *Design, synthesis and biological evaluation of novel combretastatin A-4 derivatives – potential antimitotic agents*, Stefański T., **Kurczab R.**, Dutkiewicz Z., Mikstak R., Cichocki M., Murias M., Gielara-Korzańska A., Sobiak S., zaprezentowany podczas VI Konwersatorium Chemii Medycznej, **18–20.09.2014**, Lublin,
7. Stypendium dla wybitnych młodych uczonych START przyznawane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, **2012**,

8. Wyróżnienie do nagrody im. Janiny Janikowej przyznawane przez Polskie Towarzystwo Chemiczne za najlepszą pracę magisterską w **2008** roku.

7. Działalność dydaktyczna

Moja działalność dydaktyczna rozpoczęła się w 2012 roku, z chwilą podjęcia zatrudnienia w Zakładzie Chemii Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej w Tarnowie:

- jestem współautorem specjalności Chemia medyczna, która znajduje się w ofercie uczelni od 2012 roku (do dziś najchętniej wybierana specjalność),
- prowadziłem/prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów chemii i ochrony środowiska z: chemii fizycznej (wykłady, ćwiczenia, laboratorium), informatyki (wykłady, laboratorium), wstępu do modelowania molekularnego metodami chemii kwantowej (laboratorium), komputerowo-wspomaganego projektowania leków (wykłady, laboratorium), statystyki i chemometrii w analityce chemicznej (wykłady, ćwiczenia, laboratorium),
- w dotychczasowej pracy naukowo–dydaktycznej byłem promotorem 14 prac licencjackich na kierunku chemia oraz 1 na kierunku ochrona środowiska. Byłem również opiekunem naukowym w 1 pracy magisterskiej. Ponadto, byłem promotorem pomocniczym w 2 zakończonych przewodach doktorskich (2016, 2018) oraz jestem promotorem pomocniczym w 2 nowych przewodach doktorskich (w ramach programu InterDokMed),
- w 2016 roku opiekowałem się jednym studentem zagranicznym odbywającym praktykę w ramach programu ERASMUS+: Nicolas van der Mueren, Artesis Plantijn University College, Antwerpia, Belgia (01–06.2016).

8. Działalność organizacyjna

Moja aktywność organizacyjna (podobnie jak dydaktyczna) skupia się głównie w działalności na rzecz rozwoju Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej w Tarnowie:

- od 2014 roku do chwili obecnej pełnię funkcję Zakładowego Koordynatora Programu ERASMUS+,
- od 2015 roku jestem członkiem Senatu Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej w Tarnowie,
- w latach 2015–2019 byłem powoływany jako członek: Komisji Rekrutacyjnej (2016), Komisji Konkursowej oceniającej wnioski złożone w ramach programu grantów wewnętrznych PWSZ (2018, 2019), Komisji ds. Ewaluacji Naukowej Uczelni (2018),
- od 2015 do chwili obecnej pełnię funkcję Pełnomocnika Rektora ds. Badań Naukowych (Kierownik Działu Badań Naukowych). W ramach tej działalności, od 2016 roku organizuję SeminaRIA Naukowe odbywających się w PWSZ w Tarnowie (do chwili obecnej odbyło się 7 spotkań), których celem jest katalizowanie współpracy naukowej otocznia przemysłowo-biznesowego powiatu tarnowskiego z lokalnym środowiskiem naukowym,

- w 2016 roku byłem organizatorem Sesji Studenckich Kół Naukowych „*Interdyscyplinarność badań naukowych jako droga do wielkich odkryć naukowych*” odbywającej się w Tarnowie 17.05.2016,
- od 2017 roku rozwijam (pełnię funkcję Redaktora Zarządzającego) czasopismo naukowe *Science, Technology and Innovation* wydawane przez PWSZ w Tarnowie – wdrażanie profesjonalnego systemu informatycznego Index Copernicus, administracja stroną internetową czasopisma, indeksowanie w bazach danych, marketing naukowy.

