

Modele teoretyczne w projektowaniu nowych chemoterapeutyków i polimerów imprintowanych oraz analiza parametrów ADMET



Dr n. farm. Teresa Iwona Żolek

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Chemii Organicznej
ul. Banacha 1
02-097 Warszawa

Autoreferat do wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego

Warszawa 2019

1. Teresa Iwona Żolek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.

Doktor nauk farmaceutycznych,

Wydział Farmaceutyczny Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, 1 lipca 2008, tytuł pracy doktorskiej: „Badanie oddziaływań analogów pentamidyny z DNA oraz poszukiwanie modeli CoMFA dla układów z 1-alkilo-4-arylopiperazyną metodami modelowania molekularnego”.

Promotor: prof. dr hab. Dorota Maciejewska

Recenzenci: prof. dr hab. Aleksander P. Mazurek
prof. dr hab. Zdzisław Chilmończyk

Magister fizyki (specjalizacja biofizyka),

Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, 17 czerwca 1999, tytuł pracy magisterskiej: „Badanie oddziaływań podwójnie interkalujących antracyklin z DNA metodami modelowania molekularnego”.

Promotor: prof. dr hab. Bogdan Lesyng

Recenzent: dr hab. Maciej Geller

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

09.1999 – 09.2003 Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, asystent.

10.2003 – 09.2008 Zakład Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, wykładowca.

od 09.2008 Zakład Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, adiunkt.

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.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego,

Modele teoretyczne w projektowaniu nowych chemoterapeutyków i polimerów imprintowanych oraz analiza parametrów ADMET

b) wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

H1. Żolek T., Maciejewska D. (2010) Theoretical models of pentamidine analogs activity based on their DNA minor groove complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 1991-1999. (IF₂₀₁₀ = **3.193**, MNiSW = 27).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań obliczeniowych oraz praktycznym przeprowadzeniu pomiaru temperatury mięknienia DNA, wykonanie obliczeń DFT, zbudowaniu kompleksów dla dwóch dimerycznych dodekanukleotydów i wykonaniu obliczeń metodą mechaniki i dynamiki molekularnej, współudział w analizie otrzymanych teoretycznych i eksperymentalnych wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu, a także przygotowaniu Supplementary data. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

H2. Żolek T., Maciejewska D., Żabiński J., Kaźmierczak P., Rezler M. (2015) Probing the relationship between anti-*Pneumocystis carinii* activity and DNA binding of bisamidines by molecular dynamics simulations. *Molecules*, 20, 5942-5964. (IF₂₀₁₅ = **2.465**, MNiSW = 30).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań obliczeniowych oraz praktycznym przeprowadzeniu pomiaru temperatury mięknienia DNA, wykonanie obliczeń DFT, zbudowaniu układów DNA - ligand i wykonaniu obliczeń metodą mechaniki i dynamiki molekularnej, współudział w analizie otrzymanych teoretycznych i eksperymentalnych wyników oraz w przygotowaniu części manuskryptu, a także w przygotowaniu Supplementary data. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

H3. Żolek T., Luliński P., Maciejewska D. (2011) A computational model for selectivity evaluation of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylamine (homoveratrylamine) imprinted polymers towards biogenic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 693, 121-129. (IF₂₀₁₁ = **4.555**, MNiSW = 40).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań obliczeniowych, wykonaniu obliczeń DFT, zbudowaniu układów i wykonaniu obliczeń

metodą mechaniki molekularnej, współudział w analizie wyników obliczeń, a także w przygotowaniu manuskryptu (rozdziały teoretyczne). Mój udział procentowy szacuję na **40%**.

H4. Żolek T., Maciejewska D. (2017) Theoretical evaluation of ADMET properties for coumarin derivatives as compounds with therapeutic potential. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 109, 486-502. (IF₂₀₁₇ = **3.466** MNiSW = 35).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań obliczeniowych, wykonaniu obliczeń DFT, oszacowaniu parametrów ADMET, zbudowaniu kompleksów hERG - ligand i wykonaniu obliczeń metodą mechaniki i dynamiki molekularnej, współudział w interpretacji otrzymanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz współudział w korekcie pracy. Mój udział procentowy szacuję na **60%**.

H5. Żolek T., Enyedy É. A., Ostrowska K., Pósa V., Maciejewska D. (2018) Drug likeness prediction of 5-hydroxy-substituted coumarins with high affinity to 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 115, 25-36. (IF₂₀₁₈ = **3.466**, MNiSW = 35).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na określeniu celu naukowego i opracowaniu koncepcji badań obliczeniowych, wykonaniu obliczeń DFT, oszacowaniu parametrów ADMET, zbudowaniu kompleksów HSA - ligand i wykonaniu obliczeń metodą mechaniki i dynamiki molekularnej, współudział w interpretacji otrzymanych wyników teoretycznych, współudział w przygotowaniu manuskryptu (rozdziały teoretyczne) oraz przygotowaniu korekty pracy zgodnie z uwagami recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na **50%**.

H6. Żolek T.*, Dömötör O., Ostrowska K., Enyedy É. A., Maciejewska D. (2019) Evaluation of blood-brain barrier penetration and binding to human serum albumin of 7-O-arylpiperazinylcoumarins as potential antipsychotic agents. *Bioorganic Chemistry*, 84, 211-225. (IF₂₀₁₉ = **3.929**, MNiSW = 25).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na określeniu celu naukowego i opracowaniu koncepcji badań obliczeniowych, wykonaniu obliczeń DFT, oszacowaniu parametrów ADMET w kierunku wpływu ligandów na OUN, zbudowaniu kompleksów HSA - ligand i wykonaniu obliczeń metodą mechaniki i dynamiki molekularnej, interpretacji otrzymanych wyników teoretycznych, współudział w przygotowaniu manuskryptu

(rozdziały teoretyczne), redagowaniu tekstu, korespondowaniu z Edytorem oraz przygotowaniu recenzji dla recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na **50%**.

* - prace, w których byłam autorem korespondencyjnym

Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) publikacji **H1 – H6** wytypowanych do cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi **21.074**, punkty MNiSW – **192**.

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

Wprowadzenie

Poszukiwanie nowych chemoterapeutyków o określonych właściwościach farmakokinetycznych oraz pożądanym profilu aktywności biologicznej jest jednym z podstawowych celów współczesnej farmacji i medycyny.¹⁻³ Chemoterapeutyk wprowadzany do ustroju, zróżnicowany pod względem budowy chemicznej, bierze udział w różnych procesach biochemicznych toczących się nieprzerwanie w każdej komórce żywego organizmu, aby doprowadzić zakłócone w stanach patologicznych procesy do stanu prawidłowego. Każdy chemoterapeutyk, aby wywołać odpowiedź farmakologiczną musi dotrzeć do swojego miejsca działania przechodząc przez szereg barier biologicznych. O tym jak szybko ulegnie interakcji z miejscem działania, jak również o intensywności i czasie trwania efektu farmakologicznego decyduje nie tylko wielkość podawanej dawki, ale także takie czynniki jak droga podawania, stopień i szybkość uwalniania się substancji czynnej, jej rozpuszczalność, zdolność do przechodzenia przez błony biologiczne oraz właściwości farmakokinetyczne i toksykologiczne.^{4, 5}

Szczegółowe zrozumienie mechanizmu działania chemoterapeutyków wymaga gruntownej znajomości ich właściwości fizykochemicznych, struktury, powierzchni molekularnej i związanych z tymi parametrami sił fizycznych, biorących udział we wszystkich zmianach, jakie może wywołać chemoterapeutyk w ustroju. Możemy założyć, że aktywność wielu substancji czynnych biologicznie wyraża się głównie poprzez oddziaływanie z określonym celem molekularnym takim jak receptor, enzym, DNA lub inna

makrocząsteczka i jest zdeterminowana przez możliwość dopasowania się molekuly do wnęki w makrocząsteczce, w sposób umożliwiający uzyskanie pożądaney odpowiedzi. Uzyskanie ogólnej teorii, która wyjaśniłaby w pełni działanie każdej substancji leczniczej w organizmie żywym, wydaje się być bardzo trudne i złożone, niemniej projektowanie nowych chemoterapeutyków mogą ułatwić metody teoretyczne wsparte komputerowym modelowaniem molekularnym (CADD, ang. *computer-assisted drug design*).⁶ Projektowanie nowych celów syntetycznych o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym oraz przewidywanie ich potencjalnej aktywności biologicznej jest bardzo ważne, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, iż zaledwie jeden z kilku tysięcy nowo zsyntetyzowanych związków ma szanse pomyślnego przejścia przez cykl testów farmakologicznych oraz badań klinicznych. Duża liczba chemoterapeutyków, które zostają wykluczone na etapie badań klinicznych wynika z faktu, że większość z nich działa nioselektywnie. Dodatkowo niejednokrotnie pojawiają się trudności ze sposobem podawania, stężeniem, interakcjami, brakiem efektywności oraz skutkami ubocznymi.

Uzasadnione zatem jest wprowadzenie metod teoretycznych stosujących różne modele teoretyczne na wczesnych etapach opracowywania struktury chemicznej związku dopasowującego się do miejsca aktywnego receptora czy enzymu tzw. struktury wiodącej, a następnie na jej modyfikacji, aby w efekcie uzyskać jak najbardziej idealne dopasowanie. W zależności od wiedzy, którą dysponujemy przystępując do etapu tworzenia modeli teoretycznych lub zbioru związków wykazujących pożądaney właściwości zarówno fizykochemiczne jak i biologiczne, w chwili obecnej możemy wyróżnić dwa podstawowe nurty projektowania chemoterapeutyków. Pierwszy opiera się na poszukiwaniu niskocząsteczkowego *bio-efektora* jako komplementarnego dopełnienia receptora (ang. *receptor-based design*), który obejmuje konstrukcję ligandów (obliczenia kwantowo-mechaniczne np. metoda DFT (ang. *density functional theory*)), dopasowanie ligandów do miejsca aktywnego makrocząsteczki (metoda dokowania) oraz badanie dynamiki kompleksu ligand-makrocząsteczka na poziomie molekularnym (metoda mechaniki molekularnej (MM) i dynamiki molekularnej (MD)).⁷ Drugi zaś ogranicza się do analizy zbioru aktywnych ligandów z wytworzeniem przestrzennej mapy

oddziaływań zwanej farmakoforem (ang. *ligand-based design*).⁸ Wykorzystywane są tu modele QSAR (ang. *quantitative structure-activity relationship model*), QSPR (ang. *quantitative structure-property relationships model*) lub QSRR (ang. *quantitative structure retention relationship model*) pozwalające oszacować potencjalny wpływ podstawników na aktywność oraz poznać potencjalny mechanizm oddziaływania ligand-białko.⁹⁻¹¹

W procesie projektowania związków aktywnych kolejnym kluczowym elementem, jest ocena efektów termodynamicznych wynikających z udziału środowiska wodnego w procesach biomolekularnych. Metody eksperymentalne pozwalają tylko na pomiar parametrów termodynamicznych układu jako całości, bez możliwości bezpośredniego wskazania na wkład poszczególnych jego elementów.^{12, 13} W połączeniu z metodami fizyki statystycznej symulacje komputerowe układów biomolekularnych umożliwiają określenie zmian energii swobodnej w funkcji zadanego parametru jak również oszacowanie wkładów entropowych i entalpowych.¹⁴ Prawidłowe dobranie warunków symulacji umożliwia nam porównanie wyników z danymi eksperymentalnymi, dając unikalną możliwość interpretacji rzeczywistych pomiarów w oparciu o model teoretyczny opisujący przemiany układu w rozdzielczości atomowej.

W celu ułatwienia i wyznaczenia wstępnego kierunku opracowywania nowych, potencjalnych substancji aktywnych jest wykorzystywany odrębny nurt projektowania określający ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Opisuje losy badanej substancji już po podaniu w postaci leku tzw. reguły ADMET (wchłanianie (absorpcja, ang. *absorption*, A), rozmieszczenie (dystrybucja, ang. *distribution*, D), metabolizm (ang. *metabolism*, M), wydalenie (eliminacja, ang. *excretion*, E) i toksyczność (efekty toksyczne, ang. *toxicity*, T).¹⁵ Odpowiednie algorytmy umożliwiają wykorzystanie modeli teoretycznych do odzwierciedlenia zachowania się substancji w organizmie ludzkim, pozwalając w krótkim czasie oszacować możliwość wystąpienia efektów toksycznych, jak również ocenić parametry farmakokinetyczne cząsteczki na podstawie jej wzoru chemicznego. Z puli wielu związków można wybrać te, które posiadają pożądany efekt i kontynuować badania nad nimi zmniejszając prawdopodobieństwo późnego wykrycia zagrożeń.

Cel moich badań naukowym, których wyniki opisano w prezentowanym cyklu publikacji, koncentrował się na opracowaniu modeli teoretycznych wspomagających podejmowanie decyzji przy projektowaniu i wyborze cząsteczek o pożądanych właściwościach do dalszych etapów badań w procesie opracowywania nowych chemoterapeutyków i materiałów. Realizację celu podzieliłam na trzy etapy.

Pierwszy etap polegał na opracowaniu podejścia metodycznego do zbadania korelacji między aktywnością biologiczną a strukturą analogów pentamidyny. Dotychczas prowadzone były próby odnalezienia tej korelacji dla analogów pentamidyny posiadających aktywność anty-*Pneumocystis carinii* a powinowactwem do DNA z wykorzystaniem metod eksperymentalnych i teoretycznych, ale jej nie uzyskano, chociaż istnieją przesłanki eksperymentalne świadczące o jej istnieniu.¹⁶⁻²⁰ Opracowany przeze mnie nowy model na podstawie danych eksperymentalnych i dzięki zastosowaniu odpowiedniego doboru metod i parametrów symulacji, pozwala identyfikować elementy struktury chemicznej odpowiedzialne za aktywność biologiczną liniowych analogów pentamidyny.

Drugi etap polegał na zaproponowaniu nowego podejścia metodycznego opisującego tworzenie modelu miejsca wiążącego polimeru. Pozwala on na ocenę właściwości związanych z rozpoznawaniem i wychwytem związków przez wdrukowane materiały polimerowe. Należy podkreślić, że sposób tworzenia wnęki adsorpcyjnej jest oryginalny. W dostępnym piśmiennictwie teoretyczna analiza polimerów wdrukowanych polegała na badaniu oddziaływań ligand-monomer i tworzeniu najczęściej szablonu jedno- lub dwupunktowego z odpowiednio dobranym monomerem.²¹⁻²³

Trzeci etap polegał na zastosowaniu szeregu metod obliczeniowych, które łączą strategie deskryptorów molekularnych QSPR oraz symulacji MM/MD, i które pozwalają zapoznać się z kluczowymi właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi substancji aktywnych i z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć procesy, jakimi ulega związek po podaniu do organizmu ludzkiego, zanim dotrze on do miejsca swojego działania. W dostępnej literaturze profil farmakokinetyczny dla większości kumaryn jest określany na modelu zwierzęcym.^{24, 25}

Głównymi założeniami przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego były:

- opracowanie teoretycznego modelu umożliwiającego przewidywanie struktur związków silniej wiążących się z DNA niż wzorcowa pentamidyna [**H1** oraz **H2**],
- opracowanie nowego teoretycznego modelu pozwalającego na ocenę powinowactwa i selektywności polimeru imprintowanego 2-(3,4-dimetoksyfenylo)etyloaminą (homoweratryloaminą) [**H3**],
- teoretyczna ocena właściwości farmakokinetycznych pochodnych 7-hydroksykumaryn o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej oraz opracowanie metodologii umożliwiającej stworzenie modelu teoretycznego do przewidywania struktur związków wchodzących w interakcje z kanałem potasowy hERG [**H4**],
- teoretyczna ocena właściwości fizykochemicznych i biologicznych pochodnych 5- i 7-O-arylopiperazynylokumaryn wykazujących wysokie powinowactwo do receptorów serotoninerгіcznych 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} oraz opracowanie metodologii umożliwiającej stworzenie modelu teoretycznego do oszacowania struktur związków silniej wiążących z ludzką albuminą (HSA) [**H5** oraz **H6**].

Opracowanie teoretycznego modelu umożliwiającego przewidywanie struktur związków silniej wiążących się z DNA niż wzorcowa pentamidyna

Pentamidyna należy do grupy chemoterapeutyków oddziałujących z dwuniciowym DNA w obszarze małego rowka bogatym w pary zasad adenina-tymina (A-T).²⁶ Stosowana jest głównie w terapii i profilaktyce pneumocystozowego zapalenia płuc (PCP) wywoływanego przez *Pneumocystis carinii* oraz w leczeniu leishmaniozy i trypanosomazy.²⁷ Utworzenie kompleksu pentamidyny z określoną sekwencją DNA uniemożliwia replikację patogenu. Pentamidyna jest lekiem skutecznym, ale niestety wykazującym szereg działań ubocznych. Wiąże się nie tylko z DNA patogenu, ale i z komórkami gospodarza, powodując uszkodzenie wątroby, zaburzenia w układzie krążenia i czynności nerek, które są szczególnym zagrożeniem dla pacjentów osłabionych nie tylko

chorobą, ale także terapią. Pomimo dużej ilości publikacji opisujących syntezę analogów pentamidyny o zmodyfikowanej strukturze łańcucha łączącego różne ugrupowania kationowe, w dalszym ciągu poszukuje się nowych związków, bardziej biodostępnych, skuteczniejszych i mniej toksycznych niż pentamidyna.^{26, 28-30}

W celu wsparcia tych poszukiwań postanowiłam opracować model teoretyczny wykorzystując metody modelowania molekularnego, który może stanowić dobrą alternatywę do wstępnej oceny związków w procesie projektowania nowych analogów pentamidyny o lepszym powinowactwie do DNA i wykazujących skuteczność terapeutyczną przeciwko *Pneumocystis jiroveci*.

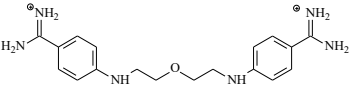
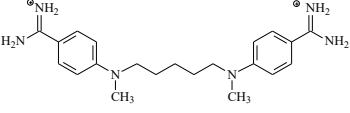
Poszukując odpowiedniego modelu teoretycznego w pierwszym etapie prowadzonych badań prześledziłam oddziaływania szeregu *bis*-amidyn (Tabela 1 publikacji **H1**) z dwoma dimerycznymi dodekanukleotydami różniącymi się kolejnością nukleotydów w obszarze kasety TATA (o sekwencji 5'-d(CGCGAATTCGCG)₂-3' oraz 5'-d(CGCGATATCGCG)₂-3'). Poza tym, postanowiłam sprawdzić czy kolejność pary zasad A-T w sekwencji DNA ma wpływ na charakter oddziaływania *bis*-amidyn z DNA. Struktury kompleksów ligand-makrocząsteczka optymalizowałam przy pomocy MM i MD poszukując stabilnego układu molekularnego odpowiadającego minimum energii potencjalnej. W swoich obliczeniach uwzględniłam dwa układy: układ I – symulujący obecność rozpuszczalnika (rozpuszczalnik został wymodelowany przy użyciu efektywnej funkcji dielektrycznej zależnej od odległości ($\epsilon=4r_{ij}$) oraz układ E – uwzględniający bezpośrednio cząsteczki wody krystalicznej obecne w strukturze krystalograficznej. Z uzyskanych wartości energii dla poszczególnych zoptymalizowanych układów wyznaczyłam energię oddziaływania (ΔE) porównując do eksperymentalnie wyznaczonej różnicy między temperaturą mięknięcia dodekameru DNA i odpowiednich kompleksów (ΔT_m) poszukując liniowych zależności. W celu uzyskania wartości T_m wykorzystałam układ pomiarowy opracowany przeze mnie w ramach pracy doktorskiej.

Na podstawie otrzymanych wartości energii oddziaływania *bis*-amidyn w układach I i E mogłam zauważyć, iż teoretyczne wartości energii

odzwierciedlają wartości przyrostu temperatury mięknięcia DNA tzn. im wyższa energia oddziaływania tym większa wartość przyrostu temperatury (Tabela 1 publikacji **H1**). Pozwoliło mi również ustalić, iż powinowactwo analizowanych *bis*-amidyn zależy znacząco od kolejności par zasad A–T w sekwencji DNA, gdyż niektóre z nich silniej wiążą się z DNA posiadającym sekwencję par zasad -AATT-, a niektóre silniej z DNA posiadającym sekwencję par zasad -ATAT-. Uzyskane dane użyłam do wyznaczenia czterech modeli: MI_{AATT} , MI_{ATAT} , ME_{AATT} i ME_{ATAT} będące liniową aproksymacją zależności ΔT_m od $(-\Delta E)$ (Rys. 1 i 5 publikacji **H1**). Otrzymane modele, pozwalające wyznaczyć zmiany wartości temperatury mięknięcia wolnego i skompleksowanego DNA od teoretycznie wyznaczonych przeze mnie energii oddziaływania ligandów mają postać: $\Delta T_m = -1.23\Delta E - 54.46$ dla modelu MI_{AATT} , $\Delta T_m = -1.052\Delta E - 34.36$ dla modelu MI_{ATAT} , $\Delta T_m = -0.612\Delta E - 304.1$ dla modelu ME_{AATT} i $\Delta T_m = -0.479\Delta E - 316.02$ dla modelu ME_{ATAT} . Modele dobrze opisują analizowane układy, gdyż współczynnik korelacji między wartościami $(-\Delta E)$ otrzymanymi z układu, a wartościami ΔT_m wynosił odpowiednio: dla modelu MI_{AATT} $R^2=0.939$; dla modelu MI_{ATAT} $R^2=0.918$; dla modelu ME_{AATT} $R^2=0.902$ i dla modelu ME_{AATT} $R^2=0.912$. Analizując otrzymane wyniki mogłam stwierdzić, iż modele te mogą zostać wykorzystane do oszacowania powinowactwa do DNA nieznanych związków.

W celu sprawdzenia poprawności otrzymanych modeli wykorzystałam dwie pochodne: 6 (dikation 1,5-*bis*[(4-amidynofenylo)amino]-3-oksapentan) i 7 (dikation 1,5-*bis*[(4-amidynofenylo)-*N*-metyloamino]-3-oksapentan), które nie były zawarte w tworzeniu modeli (Tabela 1). Z porównania czterech modeli wynika, że przewidywały prawidłową tendencję: wyższe powinowactwo do DNA wykazał związek 6, a niskie powinowactwo związek 7. Najlepszą zgodnością z wartościami otrzymanymi eksperymentalnie ΔT_m charakteryzował się model MI dla obu sekwencji DNA, pozwalał mi w sposób trafniejszy przewidzieć wartości przyrostów temperatury mięknięcia DNA związanych z skompleksowaniem *bis*-amidyn. Natomiast układ E, uwzględniający cząsteczki wody krystalicznej pozwalał lepiej zobrazować oddziaływania międzycząsteczkowe w układzie DNA-ligand-woda.

Tabela 1. Przewidywane wartości przyrostu temperatur mięknięcia ΔT_{mp} dla pochodnych 6 i 7 wraz z odchyleniami standardowymi. W nawiasach kwadratowych przedstawiona jest wartość eksperymentalna ΔT_m . (Tabela 2 publikacji **H1**).

No	Struktura	$\Delta T_{mp} \pm \delta T_{mp}$ (°C) MI _{AATT}	$\Delta T_{mp} \pm \delta T_{mp}$ (°C) MI _{ATAT}	$\Delta T_{mp} \pm \delta T_{mp}$ (°C) ME _{AATT}	$\Delta T_{mp} \pm \delta T_{mp}$ (°C) ME _{ATAT}
6		9.65±0.59 [5.84]	5.64±0.55 [5.48]	10.56±0.8 [5.84]	6.85±0.56 [5.48]
7		1.85±0.59 [1.17]	1.32±0.55 [1.10]	0.02±0.8 [1.17]	1.40±0.56 [1.10]

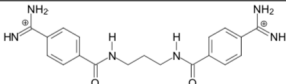
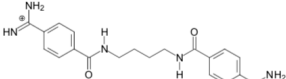
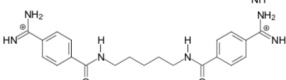
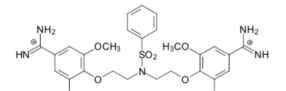
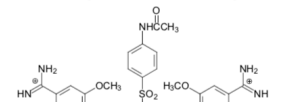
Dalsze badania w grupie *bis*-amidyn, skłoniły mnie w następnej pracy **H2** do rozszerzenia układu E, biorąc pod uwagę środowisko wodne *explicite*, które posiada niezwykle istotny wpływ na strukturę, dynamikę, a tym samym na badanie aktywności biologicznej.³¹ Przygotowując układ, uwzględniłam nie tylko pierwszą warstwę hydratacyjną, która zależy od lokalnego upakowania cząsteczek wody krystalicznej, ale również odwzorowywałam pełny efekt hydratacyjny używając model wody TIP3P.³² Ma to szczególne znaczenie praktyczne dla szybko rozwijającej się dziedziny tzw. racjonalnego projektowania leków w oparciu o znajomość struktury makrocząsteczki, gdyż uwzględnienie efektów termodynamicznych i sterycznych związanych z cząsteczkami wody w miejscu wiążącym mogą istotnie wpływać na opracowanie właściwej struktury potencjalnego chemoterapeutyka.

Do opracowania modelu teoretycznego wybrałam trzynaście analogów pentamidyny (1 – 13) (Tabela 1 publikacji **H2**), dla których zostały wykonane badania *in vitro* oceniające aktywność biologiczną przeciwko *Pneumocystis carinii*.³³ Przy wykorzystaniu symulacji MD zbadalam, czy zmiany aktywności biologicznej (wyrażone IC₅₀) można wyjaśnić interakcjami z DNA o sekwencji 5'-d(CGCGAATTCGCG)₂-3'. Innym parametrem, który został uwzględniony w badaniach, był podobnie jak w pracy **H1** wyznaczona eksperymentalnie wartość ΔT_m , co stanowiło dobrą miarę dla uszeregowania związków pod względem powinowactwa do DNA.

Analizowane przeze mnie analogi pentamidyny w różnym stopniu oddziaływały z DNA, o czym świadczyły otrzymane eksperymentalnie różne wartości T_m . Największy wzrost ΔT_m zaobserwowałam dla pochodnej 5 i 10, w których środkowa grupa CH_2 w cząsteczce pentamidyny została zastąpiona przez atomy O (związek 5) lub S (związek 10), a dodatkowo fenolowe atomy O zastąpiono grupami NH (związek 5). Związki z centralną grupą metylenową zastąpioną przez podstawniki N- CH_3 lub sulfonamidowe nie zwiększyły stabilności kompleksów z DNA. Związki, w których była obecna grupa metoksy- przy pierścieniach benzenowych charakteryzowały się najniższymi wartościami ΔT_m . Te obserwacje pozwalają wstępnie stwierdzić, że aktywność biologiczna przeciw *Pneumocystis carinii* liniowych analogów pentamidyny była związana z ich zdolnością do wiązania z DNA oraz obecność atomu azotu i siarki w strukturze związku (które są zdolne do tworzenia wiązań wodorowych z zasadami nukleinowymi) powinna być uwzględniona w projektowaniu nowych chemoterapeutyków. Następnie analiza wyznaczonych na podstawie symulacji energii swobodnych wiązania ($-\Delta G_{bind}$) i eksperymentalnych różnic temperatury mięknienia DNA (ΔT_m) sugeruje, iż siła oddziaływań międzycząsteczkowych wszystkich ligandów z DNA dobrze odzwierciedla zmiany temperatury mięknienia DNA oraz potwierdza, że niewielkie modyfikacje strukturalne mają bardzo duży wpływ na oba parametry. Uzyskane dane użyłam do wyznaczenia trzech modeli będące aproksymacją zależności: ΔT_m od ($-\Delta G_{bind}$) oraz $\log(1/IC_{50})$ od ($-\Delta G_{bind}$) i ΔT_m (Rys. 1, 2 i 3 publikacji **H2**). Otrzymane modele mają postać: $\Delta T_m = -0.139\Delta G_{bind} - 1.382$ dla ΔT_m vs. ($-\Delta G_{bind}$) ($R^2 = 0,942$), $\log(1/IC_{50}) = -0,029\Delta G_{bind} + 4,757$ dla $\log(1/IC_{50})$ vs. ($-\Delta G_{bind}$) ($R^2 = 0.790$), $\log(1/IC_{50}) = 0,195\Delta T_m + 5,084$ dla $\log(1/IC_{50})$ vs. (ΔT_m) ($R^2=0.728$). Otrzymane liniowe korelacje (wzrost wartości ΔG_{bind} do wzrostu wartości ΔT_m i wzrostu $\log(1/IC_{50})$) potwierdziły znaczenie siły wiązania pochodnych pentamidyny z DNA w mechanizmie aktywności biologicznej przeciw *Pneumocystis carinii*. Otrzymany współczynnik korelacji dla modelu aktywności biologicznej był wysoki. Dowodzi to, że opracowane modele mogą stanowić podstawę w zrozumieniu aktywności liniowych pentamidyn i potwierdzić znaczenie etapu interakcji z DNA w mechanizmie aktywności biologicznej wśród analogów pentamidyny.

Do oceny otrzymanych modeli teoretycznych wykorzystałam pięć związków TC1 – TC5 (Tabela 2).

Tabela 2. Ocena modeli: testowanie związków TC1 - TC5; parametry eksperymentalne i teoretyczne: ΔT_m , IC_{50} i ΔG_{bind} . (Tabela 2 publikacji **H2**).

Name	Chemical Structure	($T_m \pm SDT_m$) [°C]	ΔT_m [°C]	($IC_{50} \pm SDIC_{50}$) [μM]	ΔG_{bind} [kcal/mol]
TC1		55.66 ± 0.22	2.37 Predicted: 2.31	2.99 ± 1.76 Predicted: 3.97	-26.6
TC2		-	-	3.58 ± 0.02 Predicted: 4.65	-21.1
TC3		50.21 ± 0.71	-3.08 Predicted: -2.46	14.33 ± 0.42 Predicted: 10.75	7.7
TC4		-	-	4.40 ± 1.39 Predicted: 4.93	-19.2
TC5		-	-	3.71 ± 1.19 Predicted: 4.37	-23.3

Uzyskane wyniki pokazały, że teoretyczny model udoskonalony o pełny efekt hydratacyjny pozwala w sposób trafniejszy (porównując z modelem ME publikacji **H1**) przewidzieć wartości ΔT_m czy IC_{50} dla badanych analogów pentamidyny. Ponadto wyniki wykazały, że w teoretycznej analizie modeli biologicznych uwzględnienie cząsteczek wody pozwala w sposób efektywny opisać zachowanie się makrocząsteczek w reakcjach biochemicznych *in vivo*.

Opracowanie nowego teoretycznego modelu pozwalającego na ocenę powinowactwa i selektywności polimeru imprintowanego 2-(3,4-dimetoksyfenylo)etyloaminą (homoweratryloaminą)

Imprintowane polimery jako inteligentne materiały zdolne do rozpoznawania określonych związków i naśladujących mechanizm działania naturalnych układów np. receptor-substrat znalazły szerokie zastosowanie w medycynie, farmacji oraz analityce.³⁴ Szczególnie szerokie zainteresowanie związane jest z ich stosowaniem w nowoczesnych systemach terapeutycznych jako nośniki substancji czynnych. Imprintacja molekularna jest metodą

pozwalającą na wytworzenie w produkowanym materiale trójwymiarowych wnęk, które będą preferencyjnie wiązały określoną substancję. Przygotowanie imprintowanego polimeru polega na kopolimeryzacji monomerów funkcyjnych i monomerów sieciujących w obecności cząsteczek wzorca w odpowiednim rozpuszczalniku (porogenie). Podczas procesu polimeryzacji tworzą się kompleksy prepolimeryzacyjne, które następnie przekształcane są w wysoce usieciowane polimery. Po usunięciu cząsteczki wzorca z uzyskanego produktu powstają trójwymiarowe wnęki, komplementarne pod względem kształtu i właściwości chemicznych wzorca. Tak powstały polimer posiada trwałą „pamięć” pozwalającą wychwytywać cząsteczki wzorca wielokrotnie i selektywnie.^{35, 36}

W naszym laboratorium od kilku lat prowadzone były badania nad syntezą i zdefiniowaniem właściwości polimerów imprintowanych do izolacji związków biogennych z grupy neuroprzekazników m.in. dopaminy i ich metabolitów.³⁷ Zaburzenia funkcjonowania układu dopaminergicznego są przyczyną tak poważnych schorzeń jak choroba Parkinsona czy schizofrenia. Monitorowanie stężenia dopaminy w przypadku tych chorób ma duże znaczenie. Jednak trudność sprawia znalezienie odpowiednio dokładnej i czulej metody oznaczania tego związku, ponieważ występuje on w płynach ustrojowych w bardzo niskim stężeniu oraz jest substancją mało stabilną, ulegającą rozkładowi w środowisku reakcji polimeryzacji. Dlatego poszukuje się metod, które pozwoliłyby na zwiększenie dokładności oznaczeń. Jedną z nich jest użycie materiałów selektywnie adsorbujących dopaminę i zwiększających jej stężenie podczas prowadzenia oznaczeń.

W ramach naszych badań zastosowaliśmy główny analog strukturalny tzw. pseudowzorec dopaminy - homoweratryloaminę (2-(3,4-dimetoksyfenyl) etylaminę, DMPEA) jako matrycę w syntezie polimeru będącego selektywnym sorbentem dopaminy. Moim celem było opracowanie procedury obliczeniowej, która umożliwi stworzenie modelu teoretycznego do oceny powinowactwa molekularnie imprintowanego polimeru (MIP) oraz selektywności złoż polimerowych używanych w ekstrakcji do fazy stałej.

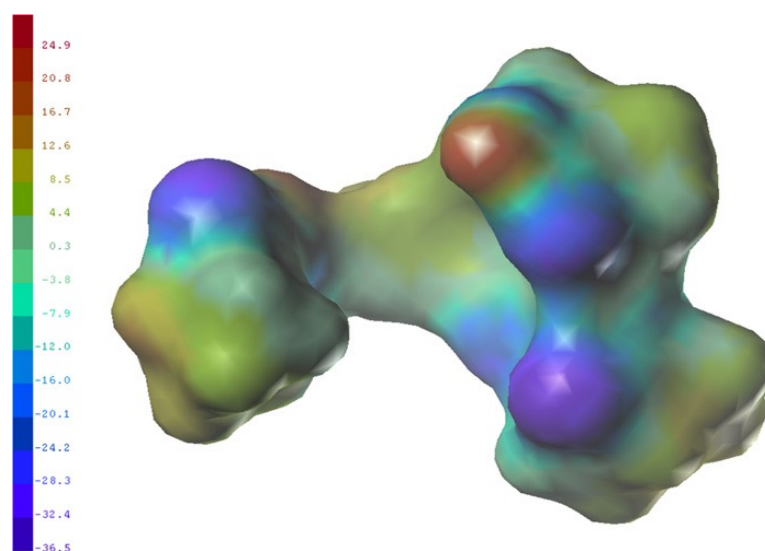
Pierwszym krokiem opracowania modelu była analiza trwałości kompleksów prepolimeryzacyjnych w zależności od zastosowanego monomeru

funkcyjnego, rozpuszczalnika i wzorca. Wpływ monomeru sieciującego został zaniedbany w celu uniknięcia zbyt dużej ilości danych w modelu teoretycznym oraz uwzględniając fakt, że w ocenie właściwości MIP, interakcje między matrycą (analitem) i monomerami funkcyjnymi mogą być kluczowe dla rozpoznania molekularnego. Na początku wygenerowałam trójwymiarowe struktury wszystkich związków, używanych przeze mnie w analizie wykonując obliczenia metodą DFT (Tabela 1 publikacji **H3**). Następnie, w celu określenia właściwości MIP-ów na poziomie molekularnym, utworzyłam cztery modele kompleksów prepolimeryzacyjnych (CP1 – CP4) (Rys. 1 publikacji **H3**). Modele utworzyłam, otaczając cząsteczkę wzorca czterema cząsteczkami monomeru funkcyjnego, biorąc pod uwagę stosunek molowy reagentów użytych podczas polimeryzacji (1:4). Przygotowane struktury wejściowe kompleksów prepolimeryzacyjnych zostały zoptymalizowane na poziomie MM, do osiągnięcia gradientu energii na atomie poniżej 0.01 kcal/mol·Å, uwzględniając wpływ porogenu jako ośrodek ciągły (przy użyciu efektywnej funkcji dielektrycznej zależnej od odległości). Wartości energii tworzenia kompleksu (ΔE_c) dla czterech modeli kompleksów prepolimeryzacyjnych porównałam z eksperymentalnie wyznaczonymi wartościami współczynnika wychwyty (IF) (Tabela 3 publikacji **H3**). Analizując otrzymane wyniki mogłam stwierdzić, im wartość bezwzględna energii (ΔE_c) była wyższa tym układ był bardziej trwały oraz główną rolę w stabilizacji kompleksu odgrywają wiązania wodorowe pomiędzy monomerem funkcyjnym a wzorcem.

Kolejnym krokiem było utworzenie modelu wnęki polimeru, którą wykonałam na podstawie modelu najbardziej trwałej struktury kompleksu prepolimeryzacyjnego (homowetratryloamina - kwas metakrylowy (CP1)). Wiązania podwójne występujące w monomerach funkcyjnych zastąpiłam wiązaniami pojedynczymi. Proces ten miał naśladować formowanie wiązań pojedynczych podczas reakcji polimeryzacji. Usunęłam cząsteczkę wzorca, a uzyskana przestrzeń stanowiła model miejsca wiążącego polimeru (Rys. 1).

Model wnęki polimerowej (MIP1) wykorzystałam podczas symulowania procesu adsorpcji i analizy selektywności polimeru. Anality (3-metoksytyramina, serotonina, dopamina, L-epinefryna, kwas homowanilinowy (HVA) i kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy (DOPAC)) (Tabela

2 publikacji **H3**) zostały umieszczone wewnątrz wnęki, zastępując cząsteczkę wzorca. Podczas analizy teoretycznej procesu adsorpcji analitów we wnęce polimeru obliczyłam energię wiązania wnęki – analit (ΔE_B). Najwyższą wartość tej energii otrzymałam dla homowetratryloaminy (wzorca), natomiast w pozostałych przypadkach otrzymane wyniki były znacznie niższe. Kwasowe związki biogenne (HVA i DOPAC) oddziaływały z MIP1 bardzo słabo i praktycznie nie wykazywały powinowactwa do matrycy polimerowej. Analiza interakcji poszczególnych analitów z miejscem wiążącym polimeru wykazała, że jest to związane z różnicami struktury analitów, które mają wpływ na rozkład potencjału elektrostatycznego wokół analizowanych cząsteczek (Rys. 3 i 4 publikacji **H3**).



Rysunek 1. Model teoretyczny trójwymiarowej wnęki polimeru zbudowanego z czterech cząsteczek kwasu metakrylowego. Barwy przedstawiają molekularny potencjał elektrostatyczny (MEP). Wartości ujemne są wyświetlane jako niebieskie, wartości neutralne - jako żółto-zielone, a wartości dodatnie - jako czerwono-pomarańczowe. (Rys.2 publikacji **H3**).

W celu sprawdzenia poprawności otrzymanych modeli teoretycznych polimerów porównałam wyniki otrzymane podczas modelowania molekularnego z eksperymentalnie wyznaczonymi wartościami zdolności wiązania (B) i współczynnika selektywności (α) (Tabela 4 publikacji **H3**). Uzyskane wyniki pokazały, że teoretyczny model skutecznie przewiduje powinowactwo analitów do matrycy polimerowej. Przeprowadzone obliczenia i

ich analiza pozwoliła potwierdzić, że polimer MIP1 zsyntetyzowany z kwasu metakrylowego, który tworzył najbardziej stabilny kompleks prepolimeryzacyjny CP1 z homoweratryloaminą wykazywał najwyższy współczynnik wychwytu. Na podstawie otrzymanej dobrej korelacji wyników analizy teoretycznej i rezultatów eksperymentalnych wykazałam, że opracowany uproszczony model miejsca wiążącego polimeru może wstępnie posłużyć do projektowania i oceny właściwości związanych z rozpoznawaniem i wychwytem związków przez wdrukowane materiały polimerowe.

Uzyskane doświadczenie pozwoliło mi na dalsze rozwijanie opracowanej metodologii i proponowanie nowych rozwiązań. Obecnie prowadzę analizę warstw polimerowych otrzymanych w procesie elektropolimeryzacji, stanowiących element rozpoznawczy chemosensorów, uwzględniając w większym stopniu złożoność układu rzeczywistego. Badania prowadzone są w ramach projektu NCN nr 2015/19/B/ST4/03743 we współpracy z Instytutem Chemii Fizycznej PAN.

Teoretyczna ocena właściwości farmakokinetycznych pochodnych 7-hydroksykumaryn o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej oraz opracowanie metodologii umożliwiającej stworzenie modelu teoretycznego do przewidywania struktur związków wchodzących w interakcje z kanałem potasowy hERG

Kumaryny stanowią dużą grupę naturalnych związków, powszechnie występujących w królestwie roślin, określanych mianem metabolitów wtórnych.³⁸⁻⁴⁰ W przypadku większości naturalnie i syntetycznie występujących kumaryn stwierdzono, iż odznaczają się szerokim spektrum aktywności biologicznej, a istotny wpływ na właściwości fizykochemiczne i biologiczne kumaryn ma ich struktura chemiczna.^{41, 42} Zaobserwowano, że pochodne kumaryny wykazują między innymi, właściwości przeciwbakteryjne,⁴³ przeciwgrzybicze,⁴⁴ przeciwnowotworowe,⁴⁵ oraz wykazano ich powinowactwo do receptorów ośrodkowego układu nerwowego takich jak α_{1A} (receptor adrenergiczny), D₂, D₃ (receptory dopaminowe) i receptory serotoninowe.^{46, 47} Oprócz tych niezwykle cennych działań

wielokrotnie wspomina się o niekorzystnym wpływie niektórych pochodnych kumaryn na organizmy żywe. Wykazano, że ich aktywność biologiczna pojawia się przy dużych stężeniach i towarzyszą jej niekorzystne działania uboczne m. in. nefro- kardio- i hepatotoksyczne.⁴⁰

Poszukując nowych chemoterapeutyków o dużym współczynniku terapeutycznym, w naszym laboratorium od kilku lat prowadzone są syntezy nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i przeciwnowotworowej przyjmując 7-hydroksykumarynę jako strukturę wiodącą.⁴⁸⁻⁵¹ Jako kontynuację badań postanowiłam oszacować dla nich parametry mające decydujący wpływ na kierunek i wielkość efektu biologicznego. Moim celem była teoretyczna ocena profilu farmakokinetycznego pochodnych 7-hydroksykumaryn, dla których zostały wykonane badania *in vitro* oceniające ich aktywność przeciwdrobnoustrojową i przeciwnowotworową. Szczegółowej analizie poddałam trzydzieści jeden struktur należących do czterech grup analogów kumaryny (Rys. 1 publikacji **H4**).

W pierwszym etapie prowadzonych badań wygenerowałam na podstawie struktur krystalograficznych i danych CP/MAS ¹³C NMR trójwymiarowe struktury wyjściowe wszystkich analizowanych pochodnych kumaryny. W celu uzyskania najlepszej parametryzacji i geometrii badanych związków, wykonałam obliczenia metodą DFT. Następnie na podstawie struktury chemicznej zostały obliczone wartości deskryptorów molekularnych za pomocą niezależnych modeli matematycznych wykorzystanych w programie ADMET PredictorTM w celu wyznaczenia parametrów ADMET. Ocena przebiegu procesów farmakokinetycznych analizowanych związków wykazała, że wszystkie pochodne spełniały warunki „reguła 5” Lipinskiego, co czyni analizowane kumaryny potencjalnie obiecującymi związkami do dalszych badań biologicznych (Tabela S1 materiały dodatkowe publikacji **H4**). Wartości objętości dystrybucji, dla większości kumaryn znajdowała się w określonym przedziale (≤ 3.7 L/kg), kwalifikując je do grupy leków rozmieszczających się w łożysku naczyniowym. Badane związki wykazały dobrą rozpuszczalność w wodzie, co znacząco wpływa na ich wchłanianie i możliwość uzyskania określonego efektu farmakologicznego (najlepszą rozpuszczalność ukazują

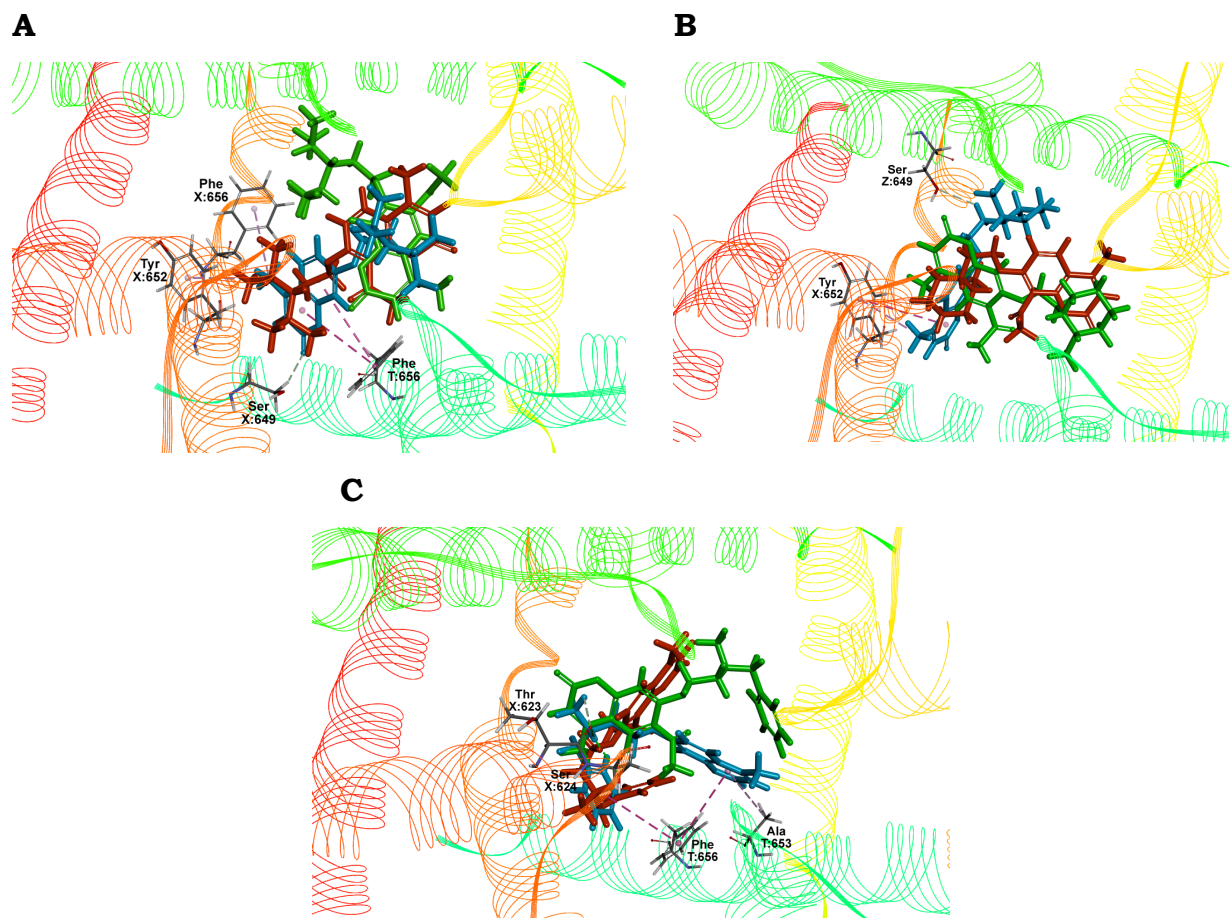
dwa chlorowodorki z podstawnikiem 7-[2-*N,N*-dietyloamino)etoksylowym] (1a i 1b)). Otrzymane wyniki pokazują, że wszystkie analizowane pochodne kumaryny przejawiają dobry transport przez błony biologiczne oraz dla większości związków wysokie prawdopodobieństwo przechodzenia przez barierę krew-mózg (Tabela 1 publikacji **H4**). W trakcie analizy wskazałam, że w przypadku kumaryn posiadających podstawnik 7-[2-(2-metylopiperydynylo)etoksylowy], różniące się grupą metylową w pozycji C-4 (1c i 2c), są najbardziej prawdopodobnymi kandydatami jako chemoterapeutyki neuroterapeutyczne, chociaż ostateczny wynik może wymagać dalszej optymalizacji. Podczas analizy parametrów, które pozwalają oszacować zdolność substancji do wiązania z białkami osocza, mogłam wskazać, że jedynie nieliczne pochodne kumaryn 2d, 3d, 4d (z podstawnikiem 2-(1-morfolino)etoksylowym), 2f, 3f, 4f (z podstawnikiem 2-(*N*-benzylo-*N*-metyloamino)etoksylowym i 1g, 2g (z podstawnikiem benzonitrylowym) charakteryzują się wysokim stopniem wiązania z białkami osocza (Rys. 3 publikacji **H4**). Analizując proces metabolizmu wszystkie analizowane związki wykazały, że mogą być substratami izoformy CYP2C19, a większość z nich może stanowić substrat pozostałych izoform (CYP1A2, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4) (Tabela 2 publikacji **H4**). Na podstawie wyników uzyskanych w toku badań dotyczących toksyczności pochodnych kumaryny ustaliłam, że wprowadzenie podstawnika morfolinowego lub benzenowego do struktury kumaryny ma wpływ na wartość maksymalnej zalecanej dawki terapeutycznej (MRTD), wywołując prawdopodobieństwo wystąpienia efektów ubocznych (Tabela 3 publikacji **H4**). Dokonując wstępnej oceny hepatoksyczności badanych związków przy wykorzystaniu pięciu modeli biomarkerów enzymatycznych (AlkPhos, GGT, LDH, SGOT i SGPT) wykazałam, że głównie dla pochodnych kumaryny posiadających podstawnik benzamidynowy lub nitrylowy istnieje prawdopodobieństwo wywołania efektu toksycznego. Analiza wyników kardiotoxyczności badanych struktur w oparciu o wartości dwóch parametrów (hERG_Filter i hERG_pIC₅₀) ujawniła, że tylko dwie pochodne kumaryny posiadające podstawnik morfolinowy (3d, 4d) i cztery pochodne kumaryny z podstawnikiem nitrylowym (1e, 2e, 3e, 4e) nie przewidują efektu kardiotoxyczności. Dodatkowo mogłam stwierdzić, że wprowadzenie grupy

acetylowej w pozycje 6- i 8- do pierścienia kumarynowego wpływa pozytywnie na zanik efektu kardio- i hepatotoksyczności, co może być bardzo ważne w projektowaniu nowych chemoterapeutyków z tej grupy związków.

Z racji tego, że działania toksyczne m. in. działanie kardiotoksyczne są jedną z głównych przyczyn eliminacji potencjalnych chemoterapeutyków zarówno w trakcie badań, jak i po wprowadzeniu ich do obrotu, w kolejnym etapie prowadzonych badań postanowiłam przeprowadzić analizę wyjaśniającą molekularny mechanizm kardiotoksyczności kumaryn połączony z blokadą kanału hERG K⁺ (kanał potasowy kodowany przez gen hERG (ang. *human ether-a-go-go-related gene*)). Moim kolejnym celem było opracowanie metodologii umożliwiającej stworzenie modelu teoretycznego do oceny powinowactwa struktur związków wchodzących w interakcje z kanałem potasowy hERG poprzez badanie wpływu podstawnika metylowego i acetylowego.

Do analizy wybrałam trzy podgrupy kumaryn, w których występowały związki będące potencjalnymi inhibitorami kanału hERG. Selekcji dokonałam opierając się na wynikach otrzymanych z programu ADMET Predictor™. Strukturę modelu kanału hERG K⁺ (CSM-TM-model732), którą wykorzystałam do przygotowania modelowych układów otrzymałam dzięki współpracy z prof. dr hab. S. Y. Noskovem (Rys. 5 publikacji **H4**).⁵² Do poszukiwania stabilnego układu molekularnego odpowiadającego minimum energii swobodnej zastosowałam początkowo metody MM, a następnie metody MD (szczegóły procedury zawarłam w materiałach dodatkowych publikacji **H4**). Badania siły oddziaływania pochodnych kumaryny ($-\Delta G_{\text{bind}}$) z modelowym kanałem hERG K⁺ wykazały, że dla układów wchodzących w interakcje z kanałem potasowy hERG w grupie związków z podstawnikiem 7-[2-(*N,N*-diizopropylamino)etoksylowym] wynoszą poniżej -30 (kcal/mol), w grupie związków z podstawnikiem 7-[2-(2-metylopiperydynyl)etoksylowym] poniżej -28 (kcal/mol) oraz w grupie związków z podstawnikiem 7-[2-(*N*-benzylo-*N*-metyloamino)etoksylowym] poniżej -43 (kcal/mol) (Tabela 4 publikacji **H4**). Uzyskane wyniki pokazały, że pochodne kumaryny (2a, 2c i 2f) nieposiadające grupy acetylowej były najsilniej wiążącymi strukturami (Rys. 2). Obecność grupy acetylowej przy atomie C8 ograniczała siłę wiązania o około 4,4-6,1

kcal/mol, natomiast obecność w pozycji C6 była nieznacznie mniej skuteczna (~1,5-3,7 kcal/mol).



Rysunek 2. Projekcja związków z górnej strony kanału hERG K⁺. **(A)** Położenie związków: 2a (niebieski), 3a (zielony) i 4a (czerwony); **(B)** Położenie związków: 2c (niebieski), 3c (zielony) i 4c (czerwony); **(C)** Położenie związków: 2f (niebieski), 3f (zielony) i 4f (czerwony). (Rys. S2, S3 i S4 materiały dodatkowe publikacji **H4**).

Przewiduje się, że wprowadzenie podstawnika acetylowego do cząsteczki kumaryny zmniejszy toksyczność kardiologiczną w tej serii związków. Przeprowadzone obliczenia i ich analiza pozwoliła wykazać, że rezultaty osiągnięte podczas modelowania molekularnego są zgodne z parametrami pIC₅₀ uzyskanymi z matematycznego modelu kardiotoxyczności zaimplementowanego w programie ADMET PredictorTM.

Wykazałam, że wprowadzenie grupy acetylowej w pozycje 6- i 8- miało duży wpływ na układ ligandów w kieszeni kanału i zmniejszenie siły oddziaływania z kanałem potasowym. Dodatkowo zaobserwowałam, że

cząsteczki wody uczestniczyły w stabilizacji ligandów w kieszeni poprzez oddziaływanie z grupą acetylową. Uzyskane wyniki pokazały, że zaproponowana przeze mnie metodologia badań stanowi dobre uzupełnienie badań biologicznych kwalifikujących nowych kandydatów na potencjalne chemoterapeutyki z danej grupy związków.

Teoretyczna ocena właściwości fizykochemicznych i biologicznych pochodnych 5- i 7-O-arylopiperazynylokumaryn wykazujących wysokie powinowactwo do receptorów serotoninergetycznych 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} oraz opracowanie metodologii umożliwiającej stworzenie modelu teoretycznego do oszacowania struktur związków silniej wiążących z HSA

Każdy chemoterapeutyk, niezależnie od drogi podawania jest transportowany w organizmie przy udziale układu krążenia. Układ krążenia stanowi wspaniałe narzędzie służące dystrybucji ogromnej liczby substancji z miejsca ich wchłaniania, do miejsca ich działania, przechowania lub eliminacji z organizmu. Na potencjał terapeutyczny chemoterapeutyków duży wpływ ma charakter ich interakcji z krążącymi białkami osocza, takimi jak albumina surowicy ludzkiej (HSA), glikoproteina kwasu α_1 , lipoproteiny i α -, β -, γ -globuliny.^{53, 54} Spośród białek osocza, HSA jest najważniejszym transporterem dla związków endogennych (kwasów tłuszczowych, hormonów, kwasów żółciowych, aminokwasów itp.) i egzogennych (chemoterapeutyki i substancje odżywcze)⁵⁵⁻⁵⁷ ze względu na jego stosunkowo wysokie stężenie w stosunku do innych białek osocza.⁵⁸ Ogólnie przyjmuje się, że związane lub niezwiązane cząsteczki chemoterapeutyku w osoczu krwi są w równowadze, ale tylko niezwiązana ilość chemoterapeutyku jest farmakologicznie czynna i zdolna do przechodzenia przez błony komórkowe.⁵⁹ Według najnowszych badań ponad 50% chemoterapeutyków wiąże się z białkami osocza w stopniu przekraczającym 90% całkowitego ich stężenia.⁶⁰ Dlatego dodatkowe informacje dotyczące cech strukturalnych, które mogą sprzyjać silnemu wiązaniu z HSA dla substancji ocenianych w testach *in vitro* są bardzo istotne podczas poszukiwania nowych potencjalnych chemoterapeutyków.

Obecnie duże zainteresowanie badaczy jest skupione na poszukiwaniu nowych chemoterapeutyków o właściwościach przeciwpsychotycznych wśród pochodnych kumaryny, gdzie zdefiniowano ich powinowactwo do receptorów serotoninergetycznych 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}.^{61, 62} Wiele badań wykazało, że aktywacja receptora 5-HT_{1A} zwiększa uwalnianie dopaminy w korze czołowej, co może poprawiać objawy negatywne i deficyty poznawcze w schizofrenii.⁶³ A zatem, kumaryny mogą stanowić potencjalne źródło struktur wiodących do zapobiegania i leczenia wybranych chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN) (na przykład stanów lękowych, depresji, schizofrenii, choroby Alzheimera i Parkinsona).⁶⁴

Powyższe fakty zainspirowały mnie do postawienia sobie celu jakim było zbadanie biodystrybucji i charakteru oddziaływań białka transportowego (HSA) ze związkami należącymi do pochodnych 5- hydroksykumaryny.

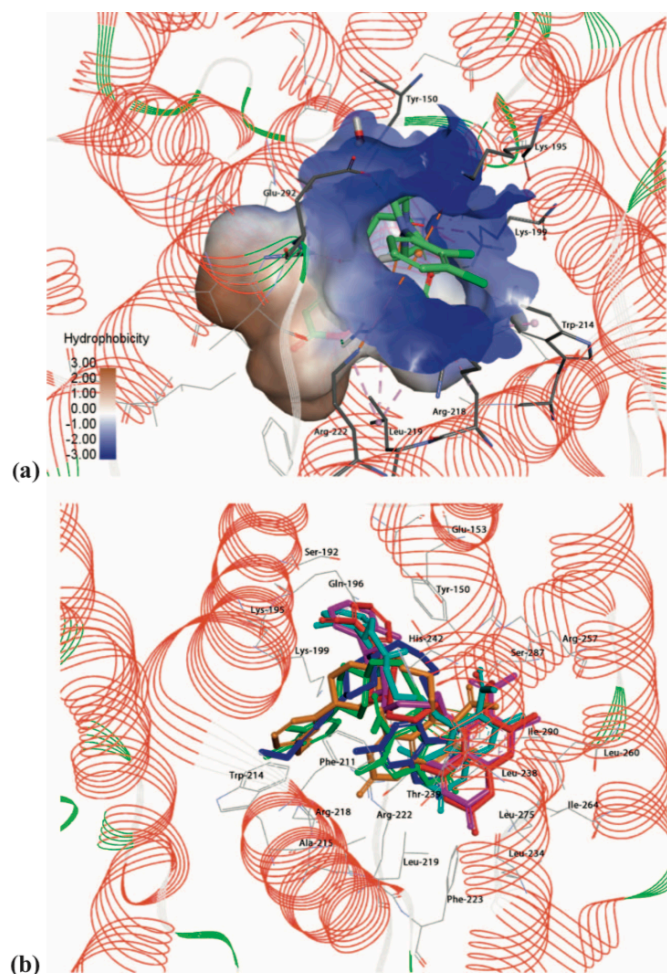
W pierwszym etapie prowadzonych badań szczegółowej analizie poddałam sześć struktur, należących do pochodnych 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny połączonych z podstawnikiem *N*-arylopiperazyny poprzez łącznik propylowy lub butylowy (Rys. 1 publikacji **H5**). Związki te zostały zsyntetyzowane w naszym laboratorium i wykazały w testach *in vitro* bardzo wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A}.⁶⁵ Struktury wyjściowe pochodnych kumaryn utworzyłam na podstawie dostępnych struktur krystalograficznych. Geometrię cząsteczek optymalizowałam wykonując obliczenia metodą DFT. Następnie podobnie jak w przypadku pracy **H4** zostały obliczone wybrane parametry fizykochemiczne i biofarmaceutyczne w celu określenia „lekopodobności” dla badanych związków. Na podstawie otrzymanych wyników mogłam stwierdzić, że wartość topologicznego obszaru polarnej powierzchni (TPSA) wszystkich analizowanych związków przewiduje dobrą zdolność do penetracji bariera krew-mózg (BBB), co jest obiecujące w kierunku poszukiwania chemoterapeutyków przeciwpsychotycznych. Zgodnie z regułą Lipinskiego, tylko związek 1 posiadający podstawnik 4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)propoksylowy będzie z dużym prawdopodobieństwem charakteryzować się małą absorpcją i złą przenikalnością (Tabela 1 publikacji **H5**). Oceniając

wartości logD, które umożliwiają oszacowanie lipofilności substancji przy pH osocza krwi (pH=7.4) mogłam określić, że większość związków ukazuje duże prawdopodobieństwo wiązania z białkami osocza.^{66, 67} Dodatkowo teoretyczne wartości procentu leku niezwiązanego z białkiem w osoczu krwi (%Unbnd) potwierdziły, że badane kumaryny mogą charakteryzować się znaczącym wiązaniem z białkami osocza (Tabela 2 publikacji **H5**). Oceniając przebieg procesu przenikalności mogłam oszacować, że wszystkie analizowane pochodne 5-hydroksykumaryny przejawiają dobry transport przez błony biologiczne oraz potwierdzić wysokie prawdopodobieństwo przechodzenia przez BBB. W oparciu o wartości dwóch parametrów (BBB filter i logBB), mogłam wskazać, że najwyższe stężenie w mózgu jest przewidywane dla związku 5, który posiada podstawnik 2-(fluorofenylo)piperazynyłowy połączony przez łącznik butylowy. Rozpatrując wyniki uzyskane w toku badań dotyczących toksyczności pochodnych kumaryny oszacowałam, że wszystkie testowane kumaryny mogą wywoływać potencjalne działania niepożądane oraz potencjalną kardiotoxyczność (Tabela 3 publikacji **H5**).

Z uwagi na fakt, że wzrost toksyczności wymuszany jest przez zwiększenie dawki terapeutycznej oraz biorąc pod uwagę przewidywany wysoki stopień wiązania z białkami osocza dla wszystkich analizowanych związków kolejnym moim krokiem prowadzonych badań było poświęcone analizie powinowactwa pochodnych 5-hydroksykumaryny do HSA. Moim celem było opracowanie metodologii umożliwiającej stworzenie modelu teoretycznego do określenia struktury związków odpowiedzialnej za siłę wiązania z HSA.

Znajomość struktury krystalograficznej albuminy, którą otrzymałam z bazy RCSB PDB: 2BXD umożliwiła mi przygotowanie modelowych układów. Procedurę dokowania molekularnego przeprowadziłam w programie AutoDock 4.2, wybierając jako miejsce wiązania – miejsce 1 Sudlowa, blisko aminokwasu Trp-214 znajdującego się w subdomenie IIA HSA. Efektem przeprowadzonych obliczeń był wybór konformacji kompleksów o najniższej energii wiązania do przeprowadzenia w kolejnym etapie symulacji MD. Otrzymując układy o najniższej energii, zaobserwowałam, że nasze badane

kumaryny lokalizują się w kieszeni albuminy, której wejście obejmuje obszar hydrofilowy, a dół kieszeni obszar hydrofobowy (Rys. 3).



Rysunek 3. Położenie pochodnych 5-hydroksykumaryny w miejscu 1 HSA. (a) Hydrofobowe i hydrofilowe reszty aminokwasowe otaczające ligandy. Hydrofobowość powierzchni została przedstawiona za pomocą kolorów: brązowy - hydrofobowy i niebieski - obszary lipofilowe. (b) Superpozycja związków: 1 (zielony), 2 (niebieski), 3 (pomarańczowy), 4 (czerwony), 5 (różowy), 6 (granatowy). (Rys.6 publikacji **H5**).

Przewidywane ułożenie związków w kieszeni było podobne, pierścienie kumarynowe wszystkich badanych związków były w podobny sposób usytuowane w hydrofobowej części kieszeni wiążącej HSA, podczas gdy reszta cząsteczki (złożona z łańcuchów alkilowych, pierścieni piperazynowych i benzenowych) decydowała o konformacji i sposobie wiązania się z HSA.

Z uzyskanych wartości energii dla poszczególnych zoptymalizowanych układów wyznaczyłam teoretyczną swobodną energię wiązania (ΔG_{bind}) i określiłam sposób wiązania analizowanych pochodnych kumaryn z HSA. Na podstawie otrzymanych wartości energii wiązania mogłam oszacować, że największe powinowactwo do HSA w grupie związków posiadających łącznik propylowy wykazuje związek 1 z podstawnikiem 2,3-dichlorofenylowym, a najmniejsze związek 3 z podstawnikiem 3-metoksyfenylowym. Analizując lokalizację, przewiduje się, że związki te będą umieszczone w kieszeni HSA przyjmując zgiętą konformację. Różnica dotyczyła jedynie ułożenia pierścienia kumarynowego (obróć o 180°). Ułożenie pierścienia kumarynowego związku 1 sprzyjało tworzeniu interakcji grupy metylowej w pozycji 7 z pierścieniem indolowym Trp-214 HSA, które może być odpowiedzialne za jego wyższe powinowactwo niż związku 3 (Rys. 7 publikacji **H5**). Z kolei w drugiej grupie związków posiadających łącznik butylowy, największe powinowactwo uzyskał związek 6 z podstawnikiem 3-metoksyfenylowym, a najmniejsze związek 5 z podstawnikiem 2-fluorofenylowym. Obserwując ułożenie ligandów w kieszeni białka, mogłam zweryfikować, że związek 6 przewiduje podobną orientację jak związek 1 (przyjmuje konformację zgiętą) oraz znajdował się w pobliżu Trp-214 w HSA tworząc hydrofobową interakcję (Rys. 8 publikacji **H5**). Natomiast kompleks 5-HSA wykazywał wydłużoną konformację w kieszeni HSA.

Interakcja ligandu z HSA może być sondowana przez zmiany emisji fluorescencji, które wynikają z obecności pojedynczej reszty tryptofanu (Trp-214) znajdującej się w poddomenie IIA miejsca 1.^{57, 68} Do oceny powinowactwa analizowanych związków do HSA zostały wyznaczone dla wszystkich układów eksperymentalne wartości stałej wiązania ($\log K$) z HSA świadczące o trwałości utworzonego kompleksu. Wykorzystując otrzymane wartości $\log K$ wyliczyłam wartości doświadczalnej energii swobodnej wiązania na podstawie równania Gibbs'a ($\Delta G_{\text{exp}} = -2.303 \cdot RT \log K$) i porównałam z przewidywanymi wartościami energii swobodnej (Tabela 5 publikacji **H5**). Na podstawie otrzymanej dobrej korelacji wyników analizy teoretycznej i rezultatów eksperymentalnych wykazałam, że opracowany model teoretyczny pozwolił mi w sposób trafny przewidzieć stopień oddziaływania z HSA badanych związków i może zostać wykorzystany do oszacowania powinowactwa do HSA nieznanych związków.

Prowadząc dalsze badania w grupie pochodnych kumaryny postanowiłam w kolejnej pracy **H6** rozwinąć aspekt wstępnych badań *in silico* w przewidywaniu ich zdolności do przenikania przez barierę krew-mózg, co stanowi jedną z najważniejszych właściwości farmakokinetycznych dla potencjalnych chemoterapeutyków skierowanych na OUN. Głównym wyzwaniem podczas projektowania nowych chemoterapeutyków wycelowanych na OUN jest zapewnienie obecności substancji w docelowym miejscu farmakologicznym w dostatecznym stężeniu w celu wykazania skuteczności klinicznej.⁶⁹ Chociaż silne wiązanie cząsteczki chemoterapeutyku z jej zamierzonym celem jest kluczowe dla siły działania, słaba przepuszczalność membrany może skutkować brakiem skuteczności *in vivo*. W związku z tym dokładne zbadanie transportu substancji przez błony ma ogromne znaczenie dla pomyślnego zaprojektowania cząsteczki o pożądanых właściwościach.

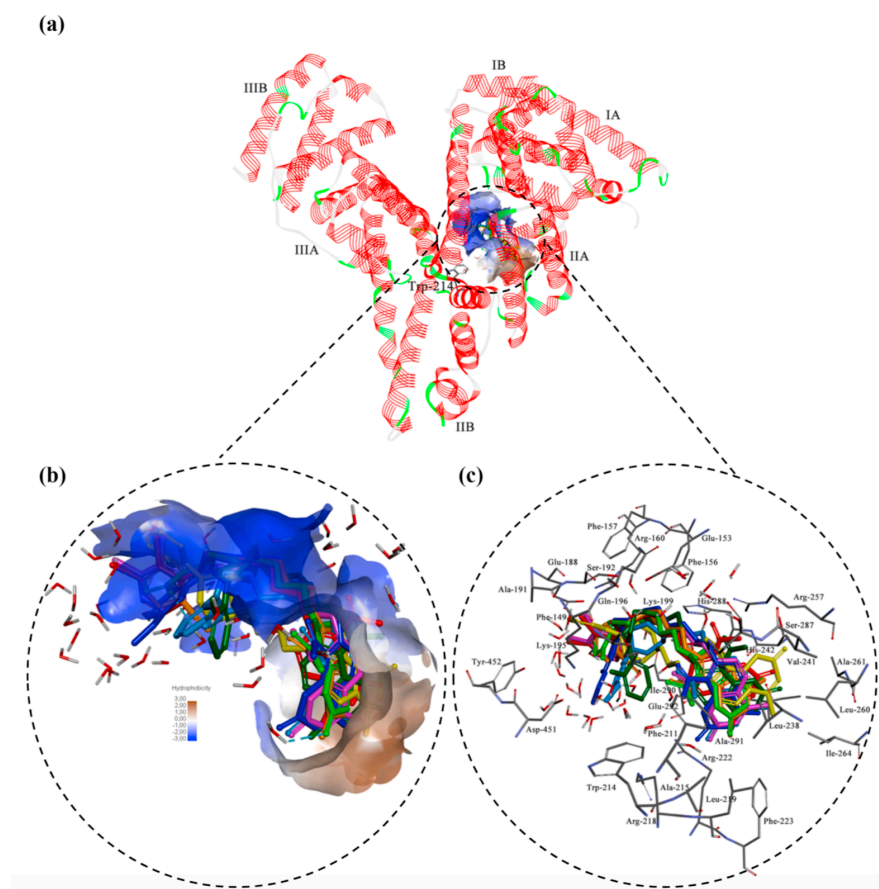
Obiektem moich badań było osiem struktur, należących do 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryny (Rys. 1 publikacji **H6**), które wykazały w testach *in vitro* wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}.⁷⁰ Dla wszystkich związków oszacowałam kluczowe dla oceny penetracji BBB parametry fizykochemiczne i biologiczne, wykorzystując program ADMET Predictor™. Klasyfikując badane związki opierałam się na odpowiednich zakresach wartości granicznych wskaźników wyrażających zdolność przenikania chemoterapeutyków do OUN. Początkową analizę ograniczyłam do „reguły 5” Lipinskiego, gdzie na podstawie otrzymanych wyników mogłam ustalić, że tylko pochodne 4a i 4b z podstawnikiem 2,3-dichlorofenyłowym mogą wskazywać na większe prawdopodobieństwo wiązania z białkami osocza oraz że wszystkie badane struktury posiadają potencjał skutecznego przekroczenia BBB (Tabela S1 materiały dodatkowe publikacji **H6**). Na podstawie wyliczonej wartości stałej dysocjacji protonów (pK_a) wykazałam, iż skrócenie łącznika z butylowego do łańcucha propylowego w badanych pochodnych kumaryny powoduje zmniejszenie wartości pK_a, co może mieć istotny wpływ na ich aktywność. Teoretyczne wartości pK_a porównałam z eksperymentalnie wyznaczonymi wartościami pK_a, co pozwoliło mi potwierdzić dobrą zgodność wyników teoretycznych z doświadczalnymi (Tabela 1 i 4

publikacji **H6**). Na podstawie kolejnych wyznaczonych parametrach (BBB_filter, logBB) wykazałam, że obecność atomu halogenu (atom F i Cl) w związkach 1b, 4a i 4b zwiększa zdolność przenikania do OUN, natomiast obecność grupy cyjanowej w związkach 3a i 3b, sygnalizuje niekorzystny wpływ do penetracji BBB, co stanowi cenną wskazówkę do projektowania nowych chemoterapeutyków. Podczas analizy parametrów (%Unbnd, RBP), które pozwalają oszacować zdolność substancji do wiązania z białkami osocza, zaobserwowałam, że wszystkie związki wchodzą w obszar silnego wiązania z białkami osocza. W zależności od chemoterapeutyku i jego miejsca działania, wysokie powinowactwo do białek osocza może w konsekwencji zwiększyć lub zmniejszyć skuteczność transportu chemoterapeutyku. Biorąc pod uwagę analizę aktywnych transporterów białkowych, głównie P-glikoproteinę (P-gp), która jest wykorzystywana między innymi w systemie aktywnego transportu chemoterapeutyków w kierunku przeciwnym, z mózgu do krwi (tzw. efflux system) wykazałam, że badane związki posiadają zdolność hamowania P-gp (Tabela 1 publikacji **H6**), co sugeruje ich możliwości tłumienia aktywności P-gp i mogą być uważane za obiecujące związki do dalszych etapów rozwoju jako nowe środki terapeutyczne. Dodatkowo przeprowadziłam analizę biotransformacji wszystkich analizowanych związków. Na podstawie otrzymanych wyników oszacowałam, że wszystkie badane kumaryny są potencjalnymi substratami dla izoenzymów CYP1A2 i CYP2C19. Natomiast związki posiadające ugrupowanie (2-cyjanofenylo)piperazynyłowe (3a i 3b) mogą nie być metabolizowane przez izoenzym CYP2D6, podczas gdy inne testowane kumaryny mogą być substratami i inhibitorami zarówno dla CYP2D6 i CYP3A4 (Tabela 2 publikacji **H6**). Co ciekawe, w przypadku wstępnej oceny hipotetycznych metabolitów badanych kumaryn przewiduje się, że głównymi metabolitami są aldehydy (do 64%), które powstają w wyniku rozbicia wiązania C–N w piperazynowym pierścieniu lub przez hydroksylację pierścienia benzenowego lub grupy metylowej przy atomie C-4 w pierścieniowej części kumaryny (Rys. S1 materiały dodatkowe publikacji **H6**). Na podstawie wyników uzyskanych w toku badań dotyczących toksyczności pochodnych kumaryny oszacowałam wpływ podstawnika 2-fluorofenyłowego i 2-cyjanofenyłowego na prawdopodobieństwo wystąpienia efektów ubocznych.

Jak już wcześniej wspomniano, wiązanie ligandów z HSA jest wyjątkowo ważne dla dystrybucji i eliminacji chemoterapeutyku, jak również czasu trwania i intensywności jego działania farmakologicznego lub toksykologicznego, z tego względu kolejnym moim krokiem prowadzonych badań dotyczyło analizy powinowactwa pochodnych 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryny do HSA. W celu uzyskania teoretycznych wartości swobodnej entalpii wiązania (ΔG_{bind}) i wyjaśnienia sposobu wiązania analizowanych kumaryn z HSA zastosowałam metody obliczeniowe identyczne jak w pracy **H5**. Otrzymując układy o najniższej entalpii swobodnej zaobserwowałam, że nasze badane kumaryny ulokowane są w kieszeni białka utworzone przez hydrofilowe łańcuchy boczne (Glu-153, Ser-192, Lys-195, Lys-199, Arg-222, Arg-257, Ala-261, Ser-287, Ala-291 i Glu-292) oraz region hydrofobowy (utworzony przez Phe-146, Phe-156, Phe-157, Trp-214, Leu-219, Leu-238, His-242, Leu-260, Ile-264, Ile-290 i Ala-291) (Rys. 4).

Analizując lokalizację, przewiduje się, że pierścienie kumarynowe wszystkich badanych związków są podobnie usytuowane w hydrofobowej kieszeni wiązania HSA, podczas gdy grupa acetylowa w pozycji 8 tworzy wiązania wodorowe głównie z Lys-199 i His-242, Arg-257 i Ser-287. Pozostałe elementy molekularne (łańcuchy alkilowe, pierścień piperazynowy i benzenowy) były decydującymi czynnikami pokazującymi różnice w sposobie wiązania z HSA. Uzyskane wyniki wykazały, że łącznik propylowy przyjmuje konformację wydłużoną w kompleksach związków 1a - 4a (z wyjątkiem związku 2a), podczas gdy łącznik butylowy przyjmuje konformację złożoną w kompleksach związków 1b-4b. Przewiduje się, że związki 1b, 2b i 4b zostaną umieszczone w kieszeni HSA w zgiętych konformacjach, co jest energetycznie niekorzystne i zmniejsza oddziaływania hydrofobowe z otaczającymi aminokwasami (Rys. 10 publikacji **H6**). Zaobserwowano, że ułożenie pierścienia kumarynowego analizowanych kumaryn nie sprzyja tworzeniu interakcji z pierścieniem indolowym Trp-214, odległość molekularna mieściła się w zakresie od 7,06 do 13,89 Å. Podczas analizy teoretycznej wykazałam, że oddziaływanie hydrofobowe w miejscu 1 kieszeni HSA jest najmniej prawdopodobne w przypadku związków 1b i 2b, a ich odległość od Trp-214

jest znacznie większa niż w przypadku innych związków, co dobrze odzwierciedla otrzymane wyniki eksperymentalne.



Rysunek 4 Położenie pochodnych 7-hydroksykumaryny w miejscu 1 HSA. (a) Struktura HSA pokazująca poddomeny i miejsca wiązania związków 1a – 4a i 1b – 4b. (b) Hydrofobowe i hydrofilowe reszty aminokwasowe otaczające ligandy. Hydrofobowość powierzchni została przedstawiona za pomocą cieniowanych kolorów: brązowego - region hydrofobowy i niebieski – region lipofilowy. (c) Superpozycja związków: 1a (zielony), 2a (niebieski), 3a (pomarańczowy), 4a (czerwony), 1b (ciemnozielony), 2b (ciemny niebieski), 3b (żółty) i 4b (różowy). (Rys.8 publikacji **H6**).

Opierając się na otrzymanych wynikach teoretycznych i eksperymentalnych, zaproponowano miejsce 1 Sudłowa jako znaczące dla związków 1a, 2a, 3a i 3b, podczas gdy dla związków 1b i 2b postuluje się istnienie innego miejsca wiązania, a dla związków 4a i 4b szacuje się zaangażowanie dwóch miejsc wiązania w kieszeni HSA. Dodatkowo wykazano,

że obecność dłuższego łącznika alifatycznego między pierścieniem kumarynowym i piperazyny sprzyja wiązaniu w innej kieszeni HSA niż miejsce 1 Sudlowa.

Uzyskane wartości swobodnej entalpii wiązania otrzymane metodą MM-PBSA (ang. Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area) dla wszystkich związków były zgodne z wartościami eksperymentalnymi energii swobodnej wiązania uzyskanymi na podstawie izotermy Gibbs'a i $\log K_D$ ($\Delta G_{\text{exp}} = -2.303 \cdot RT \log K_D$), co sugeruje dobrą jakość zastosowanego modelu teoretycznego (Tabela 5 publikacji **H6**). Różnicę jaką zaobserwowałam między wartościami entalpii swobodnej otrzymanej teoretycznie i eksperymentalnie mieściła się w zakresie od 0,54 do 1,54 kcal/mol, co mogło wskazywać na podstawie analizy eksperymentalnej, że ligandy mogą nie oddziaływać efektywnie z hipotetyczną kieszenią.

.....

Wyniki moich prac pokazują, że zastosowanie zaawansowanych metod obliczeniowych do stworzenia modeli teoretycznych mogą stanowić wartościowe wsparcie procesu projektowania nowych aktywnych biologicznie substancji oraz dokonać jednoznacznej selekcji związków na wczesnym etapie projektowania dając wskazówkę do modyfikacji struktury chemicznej w celu poprawienia odpowiednich parametrów ADMET.

Najważniejsze osiągnięcie prowadzonych przeze mnie prac:

- opracowanie kolejnych etapów analizy korelacji między parametrami teoretycznymi a wynikami eksperymentalnymi oddziaływania analogów pentamidyny z DNA,
- stworzenie modelu teoretycznego w postaci równania matematycznego pozwalającego ocenić potencjał projektowanych substancji leczniczych jako efektywnie oddziałujących z DNA patogenu w obszarze par zasad A-T,
- stworzenie modelu opisującego decydujący wpływ cząsteczek wody na odzwierciedlenie oddziaływań międzycząsteczkowych w układzie DNA-ligand i uzyskanie zadawalającej zgodności struktura-aktywność,

- utworzenie modelu wnęki polimeru imprintowanego homoweratryloaminą do oceny powinowactwa i selektywności polimeru. Zaproponowanie wstępnej metodologii umożliwiającej analizę rozpoznawania molekularnego w matrycach polimerowych,
- wyznaczenie niezdefiniowanych do tej pory parametrów ADMET dla pochodnych 7-hydroksykumaryn podawanych doustnie z wykorzystaniem modeli teoretycznych. Określenie struktur wiodących o najwyższym potencjale terapeutycznym,
- wyznaczenie niezdefiniowanych do tej pory parametrów opisujących zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg pochodnych 5- i 7-O-arylopiperazynylokumaryn. Zaproponowanie przemian metabolicznych pochodnych 7-O-arylopiperazynylokumaryn oraz zdefiniowanie struktur o największej zdolności przenikania do OUN,
- zaproponowanie i oszacowanie empiryczne metodologii do oceny oddziaływań hydroksykumaryn z HSA na bazie modelowej struktury białka (RCSB PDB: 2BXD). Wyjaśnienie udziału grup funkcyjnych w tworzeniu oddziaływań międzycząsteczkowych,
- zaproponowanie metodologii do teoretycznej oceny oddziaływania z kanałem potasowym hERG na bazie struktury modelu kanału CSM-TM-model732 przez pochodne kumaryn. Zdefiniowanie struktury o najmniejszym działaniu kardi toksycznym.

Bibliografia

1. Weisman, J. L.; Liou, A. P.; Shelat, A. A.; Cohen, F. E.; Guy, R. K.; DeRisi, J. L. Searching for new antimalarial therapeutics amongst known drugs. *Chem Biol Drug Des* **2006**, 67, 409-16.
2. Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* **1997**, 60, 52-60.
3. Khosla, C.; Keasling, J. D. Metabolic engineering for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2, 1019-25.
4. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 46, 3-26.
5. Di, L.; Kerns, E. H.; Carter, G. T. Drug-like property concepts in pharmaceutical design. *Curr Pharm Des* **2009**, 15, 2184-94.
6. Lesyng, B.; McCammon, J. A. Molecular modeling methods. Basic techniques and challenging problems. *Pharmacol Ther* **1993**, 60, 149-67.
7. Katsila, T.; Spyroulias, G. A.; Patrinos, G. P.; Matsoukas, M. T. Computational approaches in target identification and drug discovery. *Comput Struct Biotechnol J* **2016**, 14, 177-84.
8. Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W., Jr. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol Rev* **2014**, 66, 334-95.
9. Kawczak, P.; Bober, L.; Baczek, T. QSPR analysis of some agonists and antagonists of alpha-adrenergic receptors. *Med Chem Res* **2015**, 24, 372-382.
10. Baskin, II; Palyulin, V. A.; Zefirov, N. S. Neural networks in building QSAR models. *Methods Mol Biol* **2008**, 458, 137-58.
11. Baczek, T.; Kaliszan, R.; Novotna, K.; Jandera, P. Comparative characteristics of HPLC columns based on quantitative structure-retention relationships (QSRR) and hydrophobic-subtraction model. *J Chromatogr A* **2005**, 1075, 109-15.
12. Levitt, M.; Park, B. H. Water: now you see it, now you don't. *Structure* **1993**, 1, 223-6.
13. Conti Nibali, V.; Havenith, M. New insights into the role of water in biological function: studying solvated biomolecules using terahertz absorption spectroscopy in conjunction with molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc* **2014**, 136, 12800-7.
14. Pohorille, A.; Jarzynski, C.; Chipot, C. Good practices in free-energy calculations. *J Phys Chem B* **2010**, 114, 10235-53.
15. van de Waterbeemd, H.; Gifford, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2, 192-204.
16. Patrick, D. A.; Hall, J. E.; Bender, B. C.; McCurdy, D. R.; Wilson, W. D.; Tanious, F. A.; Saha, S.; Tidwell, R. R. Synthesis and anti-Pneumocystis carinii pneumonia activity of novel dicationic dibenzothiophenes and orally active prodrugs. *Eur J Med Chem* **1999**, 34, 575-83.
17. Tao, B.; Huang, T. L.; Zhang, Q.; Jackson, L.; Queener, S. F.; Donkor, I. O. Synthesis and anti-Pneumocystis carinii activity of conformationally restricted analogues of pentamidine. *Eur J Med Chem* **1999**, 34, 531-538.
18. Boykin, D. W.; Kumar, A.; Spsychala, J.; Zhou, M.; Lombardy, R. J.; Wilson, W. D.; Dykstra, C. C.; Jones, S. K.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.; et al. Dicationic diarylfurans as anti-Pneumocystis carinii agents. *J Med Chem* **1995**, 38, 912-6.
19. Patrick, D. A.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D.; Tanious, F. A.; Spsychala, J.; Bender, B. C.; Hall, J. E.; Dykstra, C. C.; Ohemeng, K. A.; Tidwell, R. R. Anti-Pneumocystis carinii pneumonia activity of dicationic carbazoles. *Eur J Med Chem* **1997**, 32, 781-793.

20. Hopkins, K. T.; Wilson, W. D.; Bender, B. C.; McCurdy, D. R.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.; Kumar, A.; Bajic, M.; Boykin, D. W. Extended aromatic furan amidino derivatives as anti-Pneumocystis carinii agents. *J Med Chem* **1998**, 41, 3872-8.
21. Tom, L. A.; Foster, N. Development of a molecularly imprinted polymer for the analysis of avermectin. *Anal Chim Acta* **2010**, 680, 79-85.
22. Yao, J.; Li, X.; Qin, W. Computational design and synthesis of molecular imprinted polymers with high selectivity for removal of aniline from contaminated water. *Anal Chim Acta* **2008**, 610, 282-8.
23. Atta, N. F.; Hamed, M. M.; Abdel-Mageed, A. M. Computational investigation and synthesis of a sol-gel imprinted material for sensing application of some biologically active molecules. *Anal Chim Acta* **2010**, 667, 63-70.
24. Yang, Y. F.; Zhang, L.; Yang, X. W. Distribution Assessments of Coumarins from Angelicae Pubescentis Radix in Rat Cerebrospinal Fluid and Brain by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Molecules* **2018**, 23.
25. Feng, L.; Wang, L.; Jiang, X. H. Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Excretion of Coumarin Components from Psoralea corylifolia L. in Rats. *Archives of Pharmacal Research* **2010**, 33, 225-230.
26. Nunn, C. M.; Jenkins, T. C.; Neidle, S. Crystal structure of d(CGCGAATTCGCG) complexed with propamidine, a short-chain homologue of the drug pentamidine. *Biochemistry* **1993**, 32, 13838-43.
27. Wispelwey, B.; Pearson, R. Pentamidine. A risk-benefit analysis. *Drug Saf* **1990**, 5, 212-9.
28. Tidwell, R. R.; Jones, S. K.; Geratz, J. D.; Ohemeng, K. A.; Cory, M.; Hall, J. E. Analogues of 1,5-bis(4-amidinophenoxy)pentane (pentamidine) in the treatment of experimental Pneumocystis carinii pneumonia. *J Med Chem* **1990**, 33, 1252-7.
29. Donkor, I. O.; Jones, S. K.; Tidwell, R. R. Pentamidine Congeners 1: Synthesis of Cis- and Trans-Butamidine Analogues As Anti-Pneumocystis carinii Pneumonia Agents. *Bioorg Med Chem Lett* **1993**, 3, 1137-1140.
30. Porcheddu, A.; Giacomelli, G.; De Luca, L. New pentamidine analogues in medicinal chemistry. *Curr Med Chem* **2012**, 19, 5819-36.
31. Ball, P. Water is an active matrix of life for cell and molecular biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2017**, 114, 13327-13335.
32. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* **1983**, 79, 926.
33. Maciejewska, D.; Zabinski, J.; Kazmierczak, P.; Rezler, M.; Krassowska-Swiebocka, B.; Collins, M. S.; Cushion, M. T. Analogs of pentamidine as potential anti-Pneumocystis chemotherapeutics. *Eur J Med Chem* **2012**, 48, 164-73.
34. Piletsky, S. A.; Turner, N. W.; Laitenberger, P. Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics--future potential and existing problems. *Med Eng Phys* **2006**, 28, 971-7.
35. H., Y.; K.H., R. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *Int J Mol Sci* **2006**, 7, 155-178.
36. Wu, L.; Li, Y. Study on the recognition of templates and their analogues on molecularly imprinted polymer using computational and conformational analysis approaches. *J Mol Recognit* **2004**, 17, 567-574.
37. Lulinski, P.; Maciejewska, D.; Bamburowicz-Klimkowska, M.; Szutowski, M. Dopamine-imprinted polymers: template-monomer interactions, analysis of template removal and application to solid phase extraction. *Molecules* **2007**, 12, 2434-49.
38. Egan, D.; O'Kennedy, R.; Moran, E.; Cox, D.; Prosser, E.; Thornes, R. D. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab Rev* **1990**, 22, 503-29.

39. Finn, G. J.; Kenealy, E.; Creaven, B. S.; Egan, D. A. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Lett* **2002**, 183, 61-8.
40. Lake, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol* **1999**, 37, 423-53.
41. Abd Elhafez, O. M.; El Khrisy Eel, D.; Badria, F.; Fathy Ael, D. Synthesis and biological investigations of new thiazolidinone and oxadiazoline coumarin derivatives. *Arch Pharm Res* **2003**, 26, 686-96.
42. Doss, S. H.; Wardakhan, W. W.; Louca, N. A. The reaction of digitoxin and digoxin with cyanoacetic acid hydrazide: synthesis of coumarin, thiazole, thiophene and pyridine derivatives with potential biological activities. *Arch Pharm Res* **2001**, 24, 377-84.
43. Kayser, O.; Kolodziej, H. Antibacterial activity of simple coumarins: structural requirements for biological activity. *Z Naturforsch C* **1999**, 54, 169-74.
44. Montagner, C.; de Souza, S. M.; Groposoa, C.; Delle Monache, F.; Smania, E. F.; Smania, A., Jr. Antifungal activity of coumarins. *Z Naturforsch C* **2008**, 63, 21-8.
45. Kaur, M.; Kohli, S.; Sandhu, S.; Bansal, Y.; Bansal, G. Coumarin: a promising scaffold for anticancer agents. *Ant Agen Med Chem* **2015**, 15, 1032-48.
46. Teran, C.; Santana, L.; Uriarte, E.; Fall, Y.; Unelius, L.; Tolf, B. R. Phenylpiperazine derivatives with strong affinity for 5HT1A, D2A and D3 receptors. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, 8, 3567-70.
47. Gonzalez-Gomez, J. C.; Santana, L.; Uriarte, E.; Brea, J.; Villazon, M.; Loza, M. I.; De Luca, M.; Rivas, M. E.; Montenegro, G. Y.; Fontenla, J. A. New arylpiperazine derivatives with high affinity for alpha1A, D2 and 5-HT2A receptors. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, 13, 175-8.
48. Trykowska, J.; Hejchman, E.; Wolska, I.; Maciejewska, D. Solid state structure by X-ray and ^{13}C CP/MAS NMR of new 7-[2-(N,N-diisopropylamino)ethoxy]coumarins. *J Mol Struct* **2009**, 930, 195-200.
49. Hejchman, E.; Trykowska Konc, J.; Maciejewska, D.; Kruszewska, H. Conventional and microwave-assisted syntheses and solid-state structure of new coumarins and angelicins. *Synth Gomm* **2011**, 41, 2392-2402.
50. Trykowska Konc, J.; Hejchman, E.; Kruszewska, H.; Wolska, I.; Maciejewska, D. Synthesis and pharmacological activity of O-aminoalkyl derivatives of 7-hydroxycoumarin. *Eur J Med Chem* **2011**, 46, 2252-63.
51. Trykowska Konc, J.; Hejchman, E.; Maciejewska, D.; Wolska, I. Solid-state structure of O-aminoalkyl derivatives of 7-hydroxy-4-methylcoumarin by ^{13}C CP/MAS NMR and X-ray diffraction methods. *J Mol Struct* **2011**, 998, 42-48.
52. Durdagi, S.; Deshpande, S.; Duff, H. J.; Noskov, S. Y. Modeling of open, closed, and open-inactivated states of the hERG1 channel: structural mechanisms of the state-dependent drug binding. *J Chem Inf Model* **2012**, 52, 2760-74.
53. Bailey, D. N.; Briggs, J. R. The binding of selected therapeutic drugs to human serum alpha-1 acid glycoprotein and to human serum albumin in vitro. *Ther Drug Monit* **2004**, 26, 40-3.
54. Bertucci, C.; Domenici, E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance. *Curr Med Chem* **2002**, 9, 1463-81.
55. Bhattacharya, A. A.; Grune, T.; Curry, S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* **2000**, 303, 721-32.
56. Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol* **2005**, 353, 38-52.

57. Petitpas, I.; Grune, T.; Bhattacharya, A. A.; Curry, S. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J Mol Biol* **2001**, 314, 955-60.
58. Perez-Ruiz, R.; Bueno, C. J.; Jimenez, C.; Miranda, M. A. In situ transient absorption spectroscopy to assess competition between serum albumin and alpha-1-acid glycoprotein for drug transport. *J Physl Chem Lett* **2010**, 1, 829-833.
59. Flarakos, J.; Morand, K. L.; Vouros, P. High-throughput solution-based medicinal library screening against human serum albumin. *Anal Chem* **2005**, 77, 1345-53.
60. Zhang, F.; Xue, J.; Shao, J.; Jia, L. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discov Today* **2012**, 17, 475-85.
61. Chen, Y.; Wang, S.; Xu, X.; Liu, X.; Yu, M.; Zhao, S.; Liu, S.; Qiu, Y.; Zhang, T.; Liu, B. F.; Zhang, G. Synthesis and biological investigation of coumarin piperazine (piperidine) derivatives as potential multireceptor atypical antipsychotics. *J Med Chem* **2013**, 56, 4671-90.
62. Chen, Y.; Lan, Y.; Wang, S.; Zhang, H.; Xu, X.; Liu, X.; Yu, M.; Liu, B. F.; Zhang, G. Synthesis and evaluation of new coumarin derivatives as potential atypical antipsychotics. *Eur J Med Chem* **2014**, 74, 427-39.
63. Lameh, J.; Burstein, E. S.; Taylor, E.; Weiner, D. M.; Vanover, K. E.; Bonhaus, D. W. Pharmacology of N-desmethyloclozapine. *Pharmacol Ther* **2007**, 115, 223-31.
64. Skalicka-Wozniak, K.; Orhan, I. E.; Cordell, G. A.; Nabavi, S. M.; Budzynska, B. Implication of coumarins towards central nervous system disorders. *Pharmacol Res* **2016**, 103, 188-203.
65. Ostrowska, K.; Grzeszczuk, D.; Gluch-Lutwin, M.; Grybos, A.; Siwek, A.; Dobrzycki, L.; Trzaskowski, B. Development of selective agents targeting serotonin 5HT1A receptors with subnanomolar activities based on a coumarin core. *MedChemComm* **2017**, 8, 1690-1696.
66. Wils, P.; Warnery, A.; Phung-Ba, V.; Legrain, S.; Scherman, D. High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **1994**, 269, 654-8.
67. Laznickek, M.; Laznickova, A. The effect of lipophilicity on the protein binding and blood cell uptake of some acidic drugs. *J Pharm Biomed Anal* **1995**, 13, 823-8.
68. Il'ichev, Y. V.; Perry, J. L.; Ruker, F.; Dockal, M.; Simon, J. D. Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Binding sites localized by competitive interactions with the native protein and its recombinant fragments. *Chem Biol Interact* **2002**, 141, 275-93.
69. Morgan, P.; Van der Graaf, P. H.; Arrowsmith, J.; Feltner, D. E.; Drummond, K. S.; Wegner, C. D.; Street, S. D. A. Can the flow of medicines be improved? Fundamental pharmacokinetic and pharmacological principles toward improving Phase II survival. *Drug Discovery Today* **2012**, 17, 419-424.
70. Ostrowska, K.; Młodzikowska, K.; Gluch-Lutwin, M.; Grybos, A.; Siwek, A. Synthesis of a new series of aryl/heteroarylpiperazinyl derivatives of 8-acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin with low nanomolar 5-HT1A affinities. *Eur J Med Chem* **2017**, 137, 108-116.

Teresa Żolek