

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**Počítačové metody návrhu a analýzy vybraných
bioaktivních látek určených pro léčbu**

Habilitační práce

(soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

2019

Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem a že jsem všechny použité informační zdroje, z kterých jsem čerpal, v textu řádně citoval a uvedl je seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne 28.5.2019

Rafael Doležal

***Těsná je brána a úzká cesta, která vede k životu,
a málokdo ji nalézá.***

Bible, Matouš 7,14

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval všem lidem, kteří se mnou během mé výzkumné činnosti spolupracovali, psali se mnou publikace, podporovali mě a pomáhali mi plnit nesnadné úkoly z různých vědeckých oblastí. Bez jejich podpory a inspirace by tento výzkum nebyl možný. Předně bych rád poděkoval pracovníkům CBV ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, kteří počítačem asistované metody designu léčiv (CADD) přijali a vytvořili prostor pro jejich aplikaci v praxi. Mé srdečné poděkování si dále zaslouží správa akademické sítě MetaCentrum při MU v Brně za poskytnutí přístupu ke gridové struktuře a důležitým počítačovým programům, jako je Gaussian či Amber. Podobnou vděčnost musím vyjádřit též superpočítačovému centru IT4Innovations v Ostravě, které mi umožnilo provádět masivní paralelní výpočty s výpočetní náročností v řádu milionů jádrohodin a rovněž mi ochotně pomohlo při zdolávání různých infromatických problémů.

Velmi rád bych poděkoval Katedře chemie PŘF UHK a jejím pracovníkům za možnost vyučovat počítačově chemické předměty studenty různých přírodovědných i pedagogických studijních oborů. Taktéž jsem upřímně vděčný FIM UHK, kde jsem mohl provádět základní výzkum vysoce účinných výpočtů a vyvíjet nástroje umělé inteligence pro potřeby CADD. Oběma zmíněným fakultám bych chtěl velice poděkovat za poskytnutou finanční podporu v rámci mnoha Specifických výzkumných projektů a projektů Excellence.

Dále bych rád poděkoval agenturám GAČR a IGA za poskytnutí finanční podpory pro náš výzkum potenciálních léčiv. Mé vřelé díky také náleží Operačnímu programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, MŠMT, díky jehož podpoře jsem mohl na CBV realizovat svůj postdoktorandský projekt.

Mou příjemnou povinností je poděkovat konkrétním lidem, kteří mi vytrvale pomáhali, projeví mi velkou míru trpělivosti, laskavosti a pochopení. Má vděčnost míří k mnoha osobám. Předně bych rád poděkoval panu prof. Karlu Kolářovi za veškerou pomoc, cenné rady a podporu. Panu prof. Kamilu Kučovi děkuji za jeho motivující myšlenky a nabídnuté možnosti pro výzkum. Velmi rád děkuji panu prof. Hubovi Kalászovi a jeho teamu za velkou pomoc nejen při vývoji analytických metod. Prof. Teodoricu Ramalhovi a prof. Tanosovi Francovi a jejich teamům děkuji za podporu a spolupráci na počítačově chemických projektech. Prof. Mikhailu Venerovi a prof. Vladimíru Tsirelsonovi děkuji za motivující vedení a pomoc při kvantově chemických výpočtech v oblasti pevných látek. Mé nejhlubší díky patří Bohu, mé rodině a všem přátelům.

OBSAH

1. ÚVOD	9
1.1. Volba tématu habilitační práce	9
1.2. Hledání nových léčiv, náhoda a racionalita	12
2. POČÍTAČEM ASISTOVANÉ METODY NÁVRHU LÉČIV	18
2.1. Strukturně založené metody CADD.....	20
2.2. Kritické body strukturně založených metod CADD	23
2.3. Ligandově založené metody CADD.....	27
2.4. Kritické body ligandově založených metod CADD	32
3. VYSOCE ÚČINNÉ VÝPOČTY V CADD.....	34
4. VYBRANÉ PATOFYZIOLOGICKÉ PROCESY PRO CADD.....	36
4.1. Alzheimerova nemoc a její farmakoterapie.....	36
4.2. Aktuální vývoj léčiv Alzheimerovy nemoci a využití CADD metod	49
4.3. Narkolepsie a její farmakoterapie.....	52
4.4. Využití CADD metod ve vývoji léčiv narkolepsie	60
4.5. Reaktivace inhibovaných cholinesteras.....	63
4.6. Využití CADD metod ve vývoji reaktivátorů inhibovaných cholinesteras	67
5. KOMENTÁŘ K PŘEDLOŽENÝM PRACÍM	70
5.1. Využití CADD ve výzkumu léčiv proti Alzheimerově nemoci	73
5.2. Využití CADD ve výzkumu léčiv proti narkolepsii.....	84
5.3. Využití CADD ve výzkumu reaktivátorů inhibovaných cholinesteras.....	86
6. ZÁVĚRA A MOŽNÉ SMĚŘOVÁNÍ DALŠÍHO VÝZKUMU.....	89
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	92
8. LITERATURA.....	94
8.1. Citace vlastních prací	94
8.2. Citace literatury ostatních autorů.....	98
9. PODÍL PŘEDKLADATELE HABILITAČNÍ PRÁCE NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH..	116
9.1. Původní práce.....	116
9.2. Původní práce nezahrnuté v habilitační práci	118
10. SOUBOR VYBRANÝCH PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH PRACÍ	120
P1. Dolezal, R.; Sobeslav, V.; Hornig, O.; Balik, L.; Korabecny, J.; Kuca, K. HPC Cloud Technologies for Virtual Screening in Drug Discovery. In: Nguyen N., Trawiński B., Kosala R. (eds.) Intelligent Information and Database Systems. ACIIDS 2015. <i>Lecture Notes in Computer Science</i> 2015 , 9012, 440–449.....	124

- P2.** Dolezal, R.; Ramalho, T. C.; França, T. C.; Kuca, K. Parallel Flexible Molecular Docking in Computational Chemistry on High Performance Computing Clusters. In: Núñez M., Nguyen N., Camacho D., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. *Lecture Notes in Computer Science* **2015**, 9330, 418–427. 135
- P3.** Korabecny, J.; Dolezal, R.; Cabelova, P.; Horova, A.; Hruby, E.; Ricny, J.; Sedlacek, L.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Andrs, M.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Sepsova, V.; Ripova, D.; Kuca, K. 7-MEOTA–Donepezil like Compounds as Cholinesterase Inhibitors: Synthesis, Pharmacological Evaluation, Molecular Modeling and QSAR Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 82, 426–438. 146
- P4.** Korabecny, J.; Andrs, M.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Horova, A.; Malinak, D.; Mezeiova, E.; Gorecki, L.; Sepsova, V.; Hrabnova, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Kuca, K. 7-Methoxytacrine-p-Anisidine Hybrids as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer’s Disease Treatment. *Molecules* **2015**, 20 (12), 22084–22101. 172
- P5.** Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Ondrejicek, A.; Jun, D.; Sepsova, V.; Horova, A.; Hrabnova, M.; Soukup, O.; Bukum, N.; Jost, P.; Muckova, L.; Kassa, J.; Malinak, D.; Andrs, M.; Kuca, K. Tacrine–Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58 (22), 8985–9003. 192
- P6.** Hepnarova, V.; Korabecny, J.; Matouskova, L.; Jost, P.; Muckova, L.; Hrabnova, M.; Vykoukalova, N.; Kerhartova, M.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Mezeiova, E.; Pham, N.; Jun, D.; Staud, F.; Kaping, D.; Kuca, K.; Soukup, O. The Concept of Hybrid Molecules of Tacrine and Benzyl Quinolone Carboxylic Acid (BQCA) as Multifunctional Agents for Alzheimers Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 150, 292–306. 212
- P7.** Spilovska, K.; Korabecny, J.; Horova, A.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Drtinova, L.; Gazova, Z.; Siposova, K.; Dolezal, R.; Jun, D.; Kuca, K. Design, Synthesis and in Vitro Testing of 7-Methoxytacrine-Amantadine Analogues: a Novel Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Medicinal Chemistry Research* **2015**, 24 (6), 2645–2655. 226
- P8.** Spilovska, K.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Jun, D.; Hrabnova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Soukup, O.; Janockova, J.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Mezeiova, E.; Kaping, D.; Kuca, K. Novel Tacrine-Scutellarin Hybrids as Multipotent Anti-Alzheimer’s Agents: Design, Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* **2017**, 22 (6), 1006. 239

- P9.** Mezeiova, E.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Hrabinoval, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Misik, J.; Spilovska, K.; Pham, N.; Pokrievkova, L.; Roh, J.; Jun, D.; Soukup, O.; Kaping, D.; Kuca, K. Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1265.....262
- P10.** Chalupova, K.; Korabecny, J.; Bartolini, M.; Monti, B.; Lamba, D.; Caliandro, R.; Pesaresi, A.; Brazzolotto, X.; Gastellier, A.-J.; Nachon, F.; Pejchal, J.; Jarosova, M.; Hepnarova, V.; Jun, D.; Hrabinoval, M.; Dolezal, R.; Karasova, J. Z.; Mzik, M.; Kristofikova, Z.; Misik, J.; Muckova, L.; Jost, P.; Soukup, O.; Benkova, M.; Setnicka, V.; Habartova, L.; Chvojkova, M.; Kleteckova, L.; Vales, K.; Mezeiova, E.; Uliassi, E.; Valis, M.; Nepovimova, E.; Bolognesi, M. L.; Kuca, K. Novel Tacrine-Tryptophan Hybrids: Multi-Target Directed Ligands as Potential Treatment for Alzheimers Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *168*, 491–514.....282
- P11.** Mezeiova, E.; Spilovska, K.; Nepovimova, E.; Gorecki, L.; Soukup, O.; Dolezal, R.; Malinak, D.; Janockova, J.; Jun, D.; Kuca, K.; Korabecny, J. Profiling Donepezil Template into Multipotent Hybrids with Antioxidant Properties. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2018**, *33* (1), 583–606.306
- P12.** Dolezal, R.; Melikova, M.; Mesicek, J.; Kuca, K. Rational Discovery of GSK3-Beta Modulators Aided by Protein Pocket Prediction and High-Throughput Molecular Docking. In: Nguyen N., Iliadis L., Manolopoulos Y., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. ICCCI 2016. *Lecture Notes in Computer Science* **2016**, *9876*, 429–439.332
- P13.** Benek, O.; Hroch, L.; Aitken, L.; Dolezal, R.; Guest, P.; Benkova, M.; Soukup, O.; Musil, K.; Kuca, K.; Smith, T. K.; Gunn-Moore, F.; Musilek, K. 6-Benzothiazolyl Ureas, Thioureas and Guanidines Are Potent Inhibitors of ABAD/17 β -HSD10 and Potential Drugs for Alzheimer"s Disease Treatment: Design, Synthesis and in Vitro Evaluation. *Medicinal Chemistry* **2017**, *13* (4), 345–358.....344
- P14.** Hroch, L.; Guest, P.; Benek, O.; Soukup, O.; Janockova, J.; Dolezal, R.; Kuca, K.; Aitken, L.; Smith, T. K.; Gunn-Moore, F.; Zala, D.; Ramsay, R. R.; Musilek, K. Synthesis and Evaluation of Frentizole-Based Indolyl Thiourea Analogues as MAO/ABAD Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25* (3), 1143–1152.....359
- P15.** Honegr, J.; Malinak, D.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Benkova, M.; Hroch, L.; Benek, O.; Janockova, J.; Kuca, K.; Prymula, R. Rational Design of Novel TLR4 Ligands by in Silico Screening and Their Functional and Structural Characterization in Vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *146*, 38–46.....370

- P16.** Honegr, J.; Dolezal, R.; Malinak, D.; Benkova, M.; Soukup, O.; Almeida, J.; Franca, T.; Kuca, K.; Prymula, R. Rational Design of a New Class of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Tryptamine Related Agonists by Means of the Structure- and Ligand-Based Virtual Screening for Vaccine Adjuvant Discovery. *Molecules* **2018**, *23* (1), 102..... 380
- P17.** Dolezal, R.; Trejbal, J.; Mesicek, J.; Milanov, A.; Racakova, V.; Krenek, J. Designing QSAR Models for Promising TLR4 Agonists Isolated from *Euodia Asteridula* by Artificial Neural Networks Enhanced by Optimal Brain Surgeon. In: Nguyen N., Iliadis L., Manolopoulos Y., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. ICCI 2016. *Lecture Notes in Computer Science* **2016**, *9876*, 271–281..... 400
- P18.** Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Melikova, M.; Kuca, K. Structure-Based Virtual Screening for Novel Modulators of Human Orexin 2 Receptor with Cloud Systems and Supercomputers. In: Król D., Nguyen N., Shirai K. (eds.) Advanced Topics in Intelligent Information and Database Systems. ACIIDS 2017. *Studies in Computational Intelligence* **2017**, *710*, 161–171..... 412
- P19.** Janockova, J.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Kobrlova, T.; Benkova, M.; Kuca, K.; Konecny, J.; Mezeiova, E.; Melikova, M.; Hepnarova, V.; Ring, A.; Soukup, O.; Korabecny, J. Investigation of New Orexin 2 Receptor Modulators Using In Silico and In Vitro Methods. *Molecules* **2018**, *23* (11), 2926..... 424
- P20.** Dolezal, R.; Korabecny, J.; Malinak, D.; Honegr, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Ligand-Based 3D QSAR Analysis of Reactivation Potency of Mono- and Bis-Pyridinium Aldoximes toward VX-Inhibited Rat Acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2015**, *56*, 113–129..... 439

1. ÚVOD

1.1. Volba tématu habilitační práce

Tato habilitační práce si klade za cíl stručně představit výsledky mé výzkumné práce za posledních 7 let, kterých jsem dosáhl v rámci vývoje léčiv s využitím počítačových technologií (computer aided drug design, CADD). Protože CADD techniky mají univerzální aplikační potenciál, využil jsem je při výzkumu pestré palety malých molekul, kterými jsme se v naší pracovní skupině zabývali. Tím ovšem okruh výzkumných témat získal poněkud difuzní charakter. V habilitační práci bylo proto nutné učinit kompromis a vytvořit spíše přehled aplikovaných CADD metod ve vybraných oblastech výzkumu. Příklady použitých CADD metod spojuje dohromady určitá provázanost studovaných biologických cílů, protože všechny mají důležitou roli v nervovém systému. Pro habilitační práci jsem tedy vybral publikace, které souvisí s vývojem léčiv proti Alzheimerově nemoci (Alzheimer's diseases, AD) a narkolepsii. Dále jsem přidal stručné pojednání o výzkumu reaktivátorů cholinesteras inhibovaných bojovými chemickými látkami nebo pesticidy ze skupiny organofosforových látek, protože problematika inhibice cholinesteras má důležitý význam i ve farmakoterapii AD.

Velmi významná práce, díky které jsem zahájil CADD studie s využitím superpočítačů, se týkala vývoje modulátorů toll-like receptoru 4 (TLR4). Protože TLR4 receptory, a jejich homology, mají zajímavou roli v reakci na amyloid beta ($A\beta$) jakožto na jeden z potenciálních biomarkerů AD, připojil jsem toto téma do kapitoly o AD. V souladu se soudobým poznáním o patofyziologii AD jsem zařadil do habilitační práce i téma hyperfosforylace tau proteinů a též stručné pojednání o $A\beta$ vázající alkoholdehydrogenase (ABAD). Každé z těchto témat je ale tak obsažné, že by se mohlo stát samo předmětem letitého výzkumu. V habilitační práci je proto uvedeno pouze základní informační pensum, které uvádí čtenáře do propracovanějších publikací připojených v kapitole 10 a rovněž ho odkazuje k dalšímu prohloubení poznatků v citované odborné literatuře.

Zcela nové téma, kterému jsme během posledních 3 let věnovali značné úsilí, představuje vývoj a výzkum léčiv narkolepsie. Na molekulární úrovni jsme se zabývali předně hledáním nových základních struktur agonistů orexinových receptorů (OXR), které aktivují orexinergní nervový systém. Toto téma je sice pro naši pracovní skupinu poměrně nové, ale zato je od počátku provázené dominantní rolí CADD technik. V této chvíli máme již výsledky prvních *in vitro* testů, které však vedly k odhalení jen několika nových antagonistů OXR. Experimentální *in vitro* data jsou nyní využita ke zpětnovazební kontrole *in silico* simulací, jejichž cílem je rozlišit antagonisty od agonistů OXR. Do habilitační práce jsou tyto studie

zařazeny jako ukázka zlomku možností CADD, které lze uplatnit v moderně pojaté strategii vývoji léčiv.

Z pohledu CADD jsem zahrnul do habilitační práce jen takové počítačové techniky, které bezprostředně souvisí s provedeným výzkumem. Jedná se v první řadě o virtuální screening, molekulární docking a molekulární dynamiku s využitím vysoce paralelního počítačového prostředí. Dále jsou to varianty metod QSAR, metody umělé inteligence a techniky hledání alosterických aktivních míst v receptorech. Pokud jde o biologické cíle, vybral jsem pro habilitační práci studie zaměřené na: acetylcholinesterasu (AChE), butyrylcholinesterasu (BuChE), glykogensynthasa-kinasu 3 β (GSK3 β), amyloid vázající alkoholdehydrogenasu (ABAD), TLR4 a orexinový receptor 2 (OX₂R).

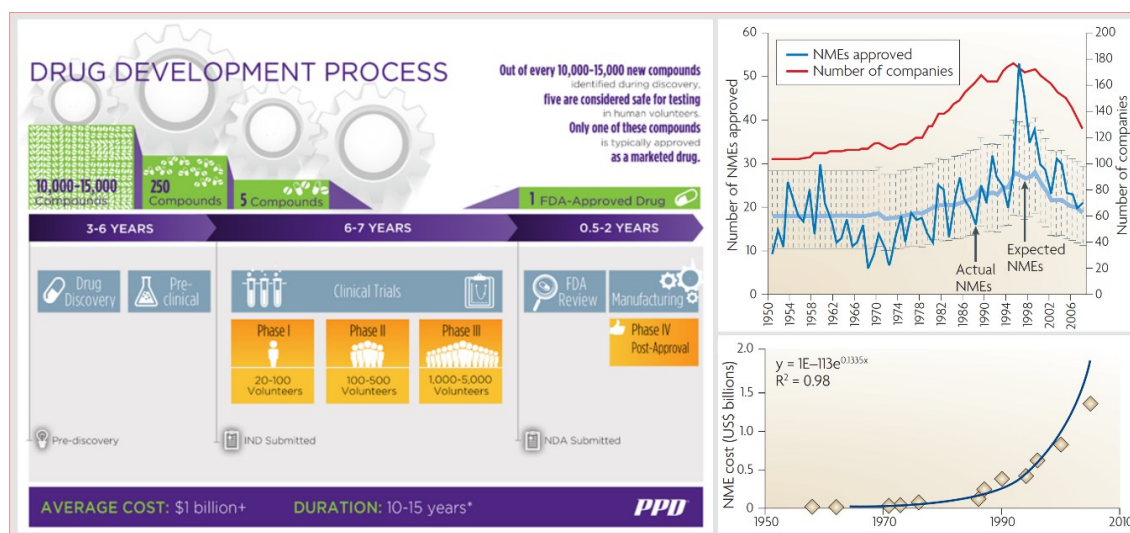
V následujících kapitolách budou uvedeny základní informace o použitých CADD metodách. Následně bude stručně pojednáno o Alzheimerově nemoci, narkolepsii a reaktivaci inhibovaných cholinesteras, v nichž má vývoj nízkomolekulárních ligandů výše uvedených biologických cílů velmi významnou roli. Habilitační práci uzavře komentář k vybraným publikacím, které se vztahují aplikaci CADD metod ve vývoji léčiv proti Alzheimerově nemoci, narkolepsii a vývoji reaktivátorů inhibovaných cholinesteras. Protože některé klíčové práce začínaly vývojem algoritmů pro různé počítačově chemické a biologické problematiky, uvádím zde i články, které byly publikovány v recenzovaných časopisech řady *Lecture Notes in Computer Science* (LNCS). Příspěvky v LNCS jsou indexované na Web of Science, avšak nemají v současné době impakt faktor. Na tyto práce ovšem navázaly komplexní studie, zahrnující organickou syntézu, *in vitro* i *in vivo* testy, které se nám podařilo publikovat v časopisech s impakt faktorem. Články v LNCS uvádím proto samostatně, protože je lze chápat jako významné preliminární výstupy, které byly následně rozvinuty do komplexních studií.

V habilitační práci je vloženo několik desítek obrázků a predikcí různých fyzikálně chemických vlastností. Molekulární modely byly vytvořeny v programu PyMOL. Pro výpočty sekvenční a geometrické podobnosti proteinů jsem využil server www.rcsb.org. Fyzikálně chemické vlastnosti pro vybrané ligandy byly vzaty z databáze Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) nebo vypočítány v programu MarvinSketch. Tyto molekulární deskriptory lze chápat jako jednoduché prediktory pasivní absorpce po perorálním podání. V textu habilitační práce dále používám trojí systém bibliografických referencí, abych podle zvyklostí na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové Univerzity Karlovy zřetelně odlišil publikace s vlastním autorským podílem od ostatní citované literatury. Odkazy na vlastní autorské publikace jsou uváděny v hranatých závorkách tučným modrým písmenem P a číslicí (např. [P1]). Jiné bibliografické reference jsou

uvedené dle citační normy, kterou používá časopis Journal of Medicinal Chemistry. Z publikací označených modrým P, kterých je celkem v habilitační práci citováno 46, jsem vybral ke komentáři jen 20 klíčových publikací. Tyto komentované publikace jsou uvedeny červeným tučným písmenem P a číslicí (např. **[P1]**).

1.2. Hledání nových léčiv, náhoda a racionalita

Kromě výjimečně šťastných případů, kdy se shodou různých okolností setká klíčový biologický cíl, zodpovědný za určitý patologický projev, s vhodným molekulárním modulátorem, který dokáže napravit důsledky disfunkce tohoto biologického cíle, je objev nového léčiva výsledkem letité namáhavé práce, jejíž finanční náklady vystupují v průměru dle aktuálních ekonomických studií výše než 1 miliarda amerických dolarů.¹ Farmakoekonomické studie také ukazují, že od roku 1950 do současnosti rostou finanční náklady na jedno nové léčivo (resp. novou molekulární entitu, NME) takřka matematicky přesně exponenciální řadou, přičemž roční počet nově objevených léčiv fluktuuje kolem hodnoty 20 (Obr. 1).^a Podle analýzy DiMasi *et al.* z roku 2016 soudobý vývoj léčiv však nelze charakterizovat nějakým standardním metodickým paradigmatem, nýbrž je nutné jej chápat jako komplexní součinnost různých technologií.² Podle aktuálních studií vyžaduje vývoj jednoho léčiva přibližně 10 – 15 let práce, během které je nutné připravit a analyzovat zhruba 10 – 15 tisíc chemických látek (Obr. 1).



Obr. 1. Některé charakteristiky současného procesu vývoje léčiv.¹ Schéma převzato částečně z internetu, PPD, About drug development.³

Díky velmi složité problematice interakce tzv. malých molekul s biologickými cíli v organismu a oprávněné tendenci minimalizovat rizika proniknutí nebezpečných potenciálních léčiv do klinické praxe se realizuje výzkum vývoj a vývoj léčiv jako intenzivní multidisciplinární kooperace celé řady vědních oborů. Své nezastupitelné místo zde mají chemické obory (organická chemie, analytická chemie, fyzikální chemie, biochemie),

^a Počet NME léčiv schválených americkou společností Food and Drug Administration (FDA) ročně je závislý na řadě faktorů. Během roku 2016 bylo schváleno 22 léčiv, kdežto roku 2018 dosáhl tento počet hodnoty 59. Přesto se ale dá říci, že počet objevených léčiv za rok před 60 lety je víceméně stejný jako dnes.

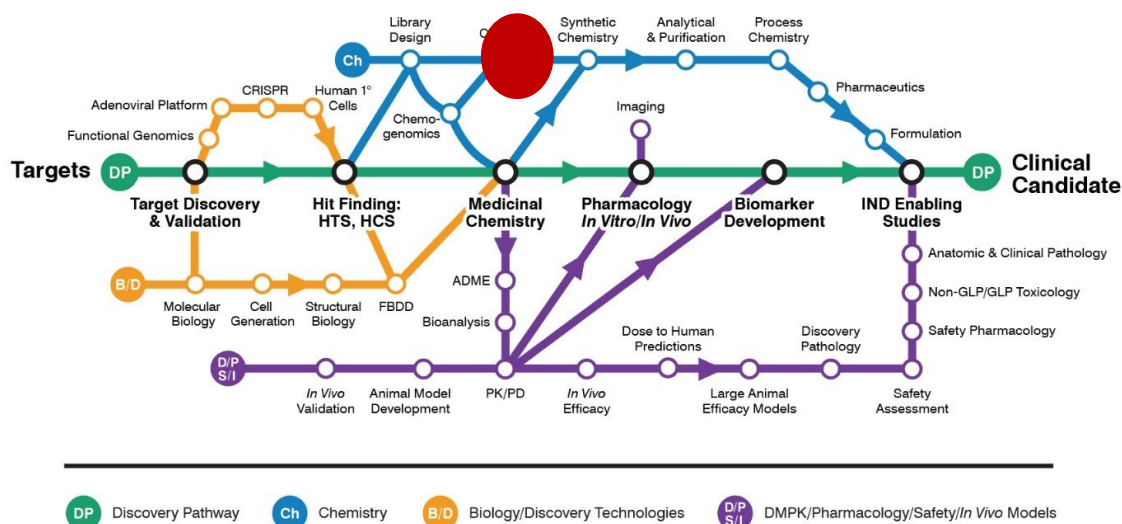
biologické obory (farmakologie, molekulární biologie, chemogenomika, biotechnologie) a rovněž počítačové obory (počítačová chemie, počítačová biologie, bioinformatika, chemometrie).⁴ Ačkoli se všechny uvedené disciplíny dynamicky rozvíjejí v čase, největší progresi v oblasti studia bioaktivních látek za několik posledních desetiletí lze pozorovat především v kontextu vývoje moderních počítačových technologií. Podle prohlášení zástupců společnosti Certara, která je přední světovou organizací v oblasti studia léčiv pomocí informačních technologií, byl vývoj zhruba 90 % léčiv schválených FDA (Food and Drug Administration) za poslední 3 roky doprovázen aplikací počítačových technologií.⁵ Podobný názor zastává také současný komisař FDA Scott Gottlieb a tvrdí, že prakticky 100 % žádosti o registraci NME zahrnuje výzkum pomocí počítačového modelování a simulací.⁶

V některých případech mohou přivádět vědce k objevu léčiva nahodilé okolnosti (např. náhodný objev imipraminu), ale většinou nezbyvá jiná cesta, než získat léčivo promyšleným způsobem a provést mnoho experimentů. Proces designu biologicky účinné látky, která splní veškerá požadovaná kritéria na použitelnost v klinické praxi, získal během poslední let poměrně jasnou a logickou strukturu.⁷ Racionální vývoj léčiv bychom mohli v tomto idealizovaném, zjednodušeném pojetí rozdělit do 6 symbolických etap⁸:

- 1) objevení biologického cíle, jehož chemickou modulací je možné patologický biologický proces omezit nebo zastavit,
- 2) nalezení základní chemické struktury (tzv. hitu), která moduluje relevantní biologický cíl (např. receptor nebo enzym),
- 3) proces optimalizace základní chemické struktury na předlohovou strukturu (tzv. hit-to-lead optimalizace, H2L),
- 4) komplexní farmakologická optimalizace předlohové struktury na léčivo (tzv. lead-to-drug optimalizace, L2D),
- 5) farmakologické testy *in vitro* a *in vivo* (tj. preklinické a klinické testování),
- 6) proces schvalování léčiva pro nabytí vlastnických práv a použití v klinické praxi.

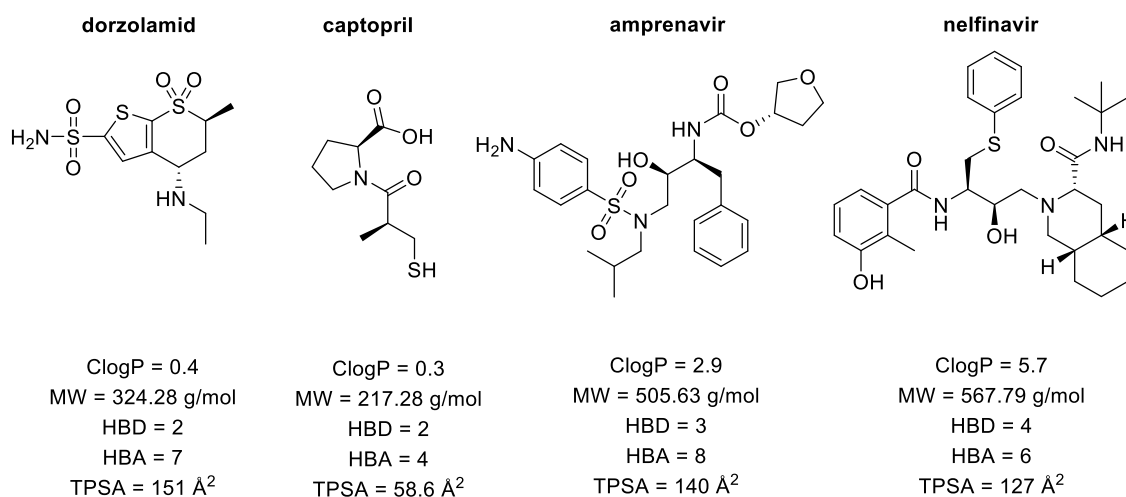
Realistický obraz racionálního vývoje je velmi pracný a zahrnuje četné zpětnovazebné regulační kroky, v jejichž rámci je nutné potenciální léčivo chemicky obměňovat, aby bylo možné dosáhnout optimálního biologického účinku jak z pohledu farmakodynamiky, tak z farmakokinetického úhlu pohledu. Když bychom odhlédli od multidisciplinární náročnosti vývoje léčiv a zaměřili se jen na problematiku hledání základní chemické struktury (tzv. hit) a procesy spojené s její optimalizací (tzv. hit-to-lead, neboli H2L optimalizace) na předlohovou strukturu, či na otázku optimalizace předlohové struktury (tzv. lead-to-drug optimization, L2D), zjišťujeme, že velký podíl na zvýšení racionality zde mají počítačem

asistované metody pro návrh léčiv (computer-aided drug design, CADD).⁹ Třebaže se tyto CADD metody nemohou zatím vždy spolehlivě dopracovat k optimálním chemickým strukturám, které by bylo možné využít jako léčiv ve farmakoterapii, jejich potenciál předložit *in silico* model, který osvětluje interakce systému ligand – receptor na molekulární úrovni, představuje pro výzkum a vývoj léčiv klíčový element (Obr. 2).



Obr. 2. Pozice počítačem asistovaných metod návrhu léčiv (CADD) v kooperačním schématu vědních přístupů a metod vedoucích k nalezení léčiva. Převzato z internetu, O' Rourke et al., *The New Age of Drug Development*.¹⁰

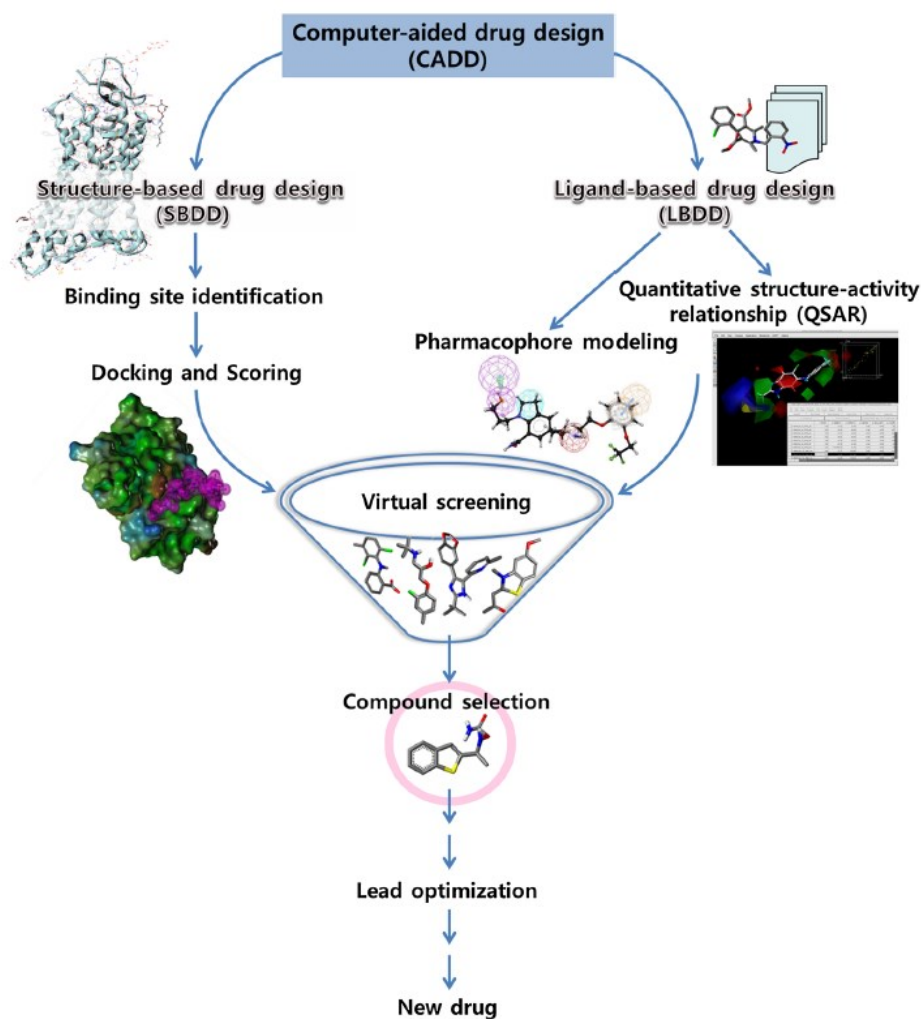
CADD metody v sobě ukrývají velký potenciál, kterému mohou stěží konkurovat jiné racionální principy uplatňované ve vývoji léčiv.¹¹ Možnosti a přínosy, které nabízejí CADD metody, lze pravděpodobně nejvýmluvněji demonstrovat na příkladech, kde k objevení základní struktury léčiv a jejich optimalizaci tyto přístupy významně přispěly. V současné době do této kategorie léčiv, v rámci jejichž vývoje sehrály CADD metody důležitou roli, náleží několik desítek chemických látek (např. dorzolamid, captopril, amprenavir, nelfinavir) (Obr. 3).¹²⁻¹⁵ Hugo Kubinyi uvádí v jedné své přehledné práci z roku 2006 celkem 83 struktur, které byly získány CADD metodami a daného roku byly v různé fázi optimalizace L2D.^{12, 16}



Obr. 3. Příklady léčiv, které byly získány s přispěním metod CADD. Predikované fyzikálně chemické veličiny (ClogP – logaritmus vypočítaného rozdělovacího koeficientu látky v systému *n*-oktanol/voda, MW – molární hmotnost, HBD – počet donorů vodíkových vazeb, HBA – počet akceptorů vodíkových vazeb, TPSA – topologická polární plocha povrchu) byly vzaty z online databáze Pubchem.¹⁰

Éra CADD metod a jejich úspěchů dle průzkumu odborné literatury začala zhruba roku 1981, kdy časopis *Fortune* publikoval článek *Next Industrial Revolution: Designing Drugs by Computer at Merck*.¹⁷ Od té doby se CADD metody začaly intenzivně rozvíjet a jejich možnosti se rozšiřovaly ruku v ruce s vývojem informačních technologií. Dle analýzy publikací CADD poskytlo od této doby mnoho základních či předlohových struktur. Značná část těchto struktur je nyní ve fázi H2L.

CADD metody se rozdělují do dvou hlavních skupin, přičemž kritériem pro jejich klasifikaci je znalost chemické struktury biologického cíle.¹⁸ Pokud je objasněna struktura biologického cíle (např. pomocí rentgenostrukturní analýzy, kryoelektronové mikroskopie či nukleární magnetické rezonance, NMR), je možné aplikovat tzv. strukturně založené metody CADD (structure-based CADD, SB CADD). SB CADD představují v podstatě počítačovou analogii klasického vysoko-propustného screeningu (high-throughput screening, HTS), který vede k nalezení základní struktury cestou *in vitro*.^{19, 20} Mezi nejvýznamnější SB CADD metody náleží především molekulární docking.²¹ Pokud je známá jen struktura biologicky aktivních látek a jejich experimentální biologická aktivita, užívají se v praxi tzv. ligandově založené CADD metody (ligand-based CADD, LB CADD). K těmto LB CADD metodám náleží předně různé varianty kvantitativních studií vztahů mezi strukturou a aktivitou (quantitative structure-activity relationship, QSAR) a farmakoforová analýza (Obr. 4).^{22, 23}



Obr. 4. Jednoduché schéma vyjadřující roli strukturně založených (SBDD) a ligandově založených (LBDD) metod ve vývoji léčiv (drug design, DD). Převzato z publikace Macalino et al., 2018.²³

CADD metody představují univerzální nástroj, který lze využít ke studiu farmakodynamických i farmakokinetických vlastností jakýchkoli potenciálních léčiv.²³ Ve světovém vývoji a výzkumu léčiv jsou CADD metody široce přijímány, ale nechybí rovněž kritické ohlasy, který těmto přístupům nekompromisně ukazují jejich aktuální meze.²⁴ Kritický faktor, který stojí za větší či menší mírou nesprávnosti výsledků CADD, je pochopitelně dán aproximacemi, které jsou zahrnuty v klíčových výpočtech. Většina SBDD metod využívá pro usnadnění výpočtů molekulární mechaniku a pracuje v podstatě jen s jedním molekulárním modelem biologického cíle v aktuálním čase. Vedle nepřesnosti v určení distribuce potenciální a kinetické energie mikrokanonického systému jsou často ve výpočtech zanedbávány entropické faktory či predikce statistického rozdělení pro makrostav. I to je ale dáno potřebou zjednodušit výpočty a získat výsledky, které mají alespoň statisticky uspokojivou korelaci s experimentálními daty pro určitou sadu pozorování. Důsledkem však je nízká robustnost takto zjednodušených metod.

CADD přístupy se začínají stále více prosazovat i ve vývoji a výzkumu léčiv v rámci České republiky. I když pravděpodobně velká většina výzkumných pracovišť, která se zabývají syntézou a analýzou potenciálních léčiv, využívá semiempirické přístupy jako je Lipinského pravidlo pěti, bioisosterické záměny substituentů či Toplissovo operační schéma, někdy bývá k těmto studiím též připojen molekulární docking jakožto aposteriorní CADD pomůcka pro objasnění geometrie interakcí malých molekul s enzymy či receptory a k interpretaci pozorované biologické aktivity pomocí predikované Gibbsovy vazebné energie.²⁵ Obecně se však CADD metody v rámci České republiky aplikují poměrně málo, a jejich popularizace si proto zaslouží více pozornosti.²⁶⁻²⁸ Nicméně i v České republice se během poslední dekády začaly objevovat výkonné počítačové nástroje a infrastruktury, které podporují CADD metody. Vysoce paralelizované výpočty (tzv. high-performance computing, HPC) lze provádět např. na dvou českých superpočítačích Anselm a Salomon nebo lze též využít rozsáhlé počítačové clustery a gridy, propojující některá akademická pracoviště (např. české Národní superpočítačové centrum IT4Innovations, česká Národní gridová iniciativa MetaCentrum). Pomocí těchto technologií je možné realizovat simulace poměrně velkých molekulárních systému, a přispět tak k poznání charakteru např. interakce ligandu s receptorem v modelu fyziologického prostředí.

Oprávněně můžeme tedy hovořit o tom, že moderní vývoj a výzkum léčiv má v dnešní době těžiště v oblasti, kde se překrývají experimenty *in silico*, *in vitro* a *in vivo*. I když všechny uvedené experimenty svou metodologií stále vylepšují, je nutné díky složitosti výzkumu léčiv vzít v úvahu, že *in silico* přístupy jsou v této skupině nejmladší, a náleží jim proto adekvátní nárok na evoluční čas, aby se zdokonalily. Racionální přístupy ve výzkumu léčiv se pokouší též recyklovat a inovovat zastaralé přístupy, jako je tradiční HTS cílený na základní struktury s bioaktivitou v řádu nM. Inovativním směrem je aplikace fragmentově založených metod (např. fragment-based lead discovery, FBLD), jejichž cílem je nalézt nejprve *in vitro* screeningem ligandových knihoven o několika tisících látek, splňující např. pravidlo tří^b, nízkomolekulární bioaktivní fragmenty, a ty pak racionálně kombinovat do předlohy struktury s využitím různých racionálních přístupů, včetně CADD. Pomocí FBLD bylo získáno např. léčivo erdafitinib, které bylo roku 2019 schváleno FDA pro léčbu metastatické rakoviny močového měchýře.²⁹ Lze tedy s jistotou říci, že všechny metody vývoje léčiv sami vyžadují neustálý vývoj, jehož filosofie by měla spočívat v kritickém úsudku, či jak podotýká prof. Hugo Kubinyi, v zkoumání, které probíhá *in cerebro*.³⁰

^b Jedná se o modifikaci klasického pravidla pěti, podle kterého má mít předlohy struktura veličiny logP, MW, HBD, HBA a počet rotovatelných vazeb nižší než 3, resp. nižší než 300 g/mol v případě MW. Toto tzv. lead-like pravidlo má, podobně jako Lipinského pravidlo pěti, své výjimky.

2. POČÍTAČEM ASISTOVANÉ METODY NÁVRHU LÉČIV

Počítačem asistované metody návrhu léčiv (computer-aided drug design, CADD) jsou založené na součinnosti mezi medicínou, počítačovou chemií, počítačovou biologií, chemoinformatikou a informačními technologiemi.³¹ Z metodologického hlediska se CADD metody dělí podle složitosti studovaného systému na ligandově a strukturně založené přístupy.^c Díky aplikaci pokročilé výpočetní techniky s vysokým výkonem (např. superpočítače nebo počítačové clustery) a sofistikovaného softwaru je možné simulovat fyzikální i chemické interakce, ke kterým při setkání léčiva s biologickým systémem dochází.³² Avšak i s využitím superpočítačů se v rámci aplikace CADD stále využívají rozsáhlé aproximace, protože přesné řešení procesů v mnoha částicových, molekulárních systémech pomocí kvantově chemických metod zůstává problematické.^{18, 33} V mnoha případech se postupuje tak, že převážná část systému se reprezentuje na úrovni molekulární mechaniky a část systému, která zahrnuje klíčové procesy zodpovědné za vyvolání biologické odpovědi, se simuluje s využitím *ab initio* metod či metod funkcionálu elektronové hustoty (DFT) v rámci hybridních molekulárně mechanických a kvantově mechanických výpočetních metod (MM/QM).³⁴ Tyto přístupy reprezentují na současné úrovni technologie CADD cestu k dosažení nejsprávnějších výsledků.

Farmaceutické společnosti v dnešní době (např. Eli Lilly) se během vývoje a výzkumu léčiv pokouší kombinovat laboratorní metody screeningu (např. HTS, FBLD) s metodami CADD, aby jednak minimalizovaly náklady a čas potřebný na vývoj nového léčiva, a jednak aby objasnily mechanismus účinku léčiva na molekulární úrovni a definovaly vztah mezi strukturou a aktivitou léčiv (structure-activity relationship, SAR).³⁵ Pomocí metod CADD je možné kupříkladu ověřit poměrně rychle vazebnou energii milionů definovaných ligandů (skutečně existujících či nových chemických entit, které byly navrženy *in silico*) vůči zvolenému biologickému cíli, a nalézt tak nejvýhodnější základní strukturu léčiva (tzv. hit), z níž se optimalizací struktury a vlastností může stát skutečné léčivo.^[P1] Také je možné problematiku tohoto virtuálního screeningu převést do reverzního režimu a ověřit možnou interakci mezi jediným ligandem a početnou databází enzymů či receptorů (tzv. reverzní virtuální screening či off-target screening).³⁶ Takto lze pomocí CADD predikovat, jaké by mohly být pravděpodobné důsledky podání potenciálního léčiva do organismu, který

^c V celosvětové literatuře se běžně CADD metody, které pracují s explicitním modelem biologického cíle, označují jako strukturně založené techniky. Toto vžitě označení je ale poměrně zavádějící, protože strukturu mají pochopitelně i ligandy. Více vhodnější, avšak méně užívané označení, je pojmenování receptorově založené metody.

obsahuje velmi mnoho důležitých biologických cílů, jejichž funkce by měla v mnoha případech zůstat v přítomnosti těchto látek neporušená.

Ve srovnání s HTS a kombinatoriální chemií, které se zdály být mocnými nástroji při objevování nových léčiv, mají CADD metody vyšší pravděpodobnost nalezení nové základní struktury léčiva, protože zahrnují racionální mechanismy, pomocí nichž lze vyřadit z testování látky, které nemají tzv. předlohové a lékové vlastnosti (tzv. lead-likeness a drug-likeness).³⁷ Avšak definice těchto vlastností je zjednodušená, víceméně chemoinformaticky nestrukturovaná a velmi často vychází jen z jednorozměrných molekulárních deskriptorů, podobně jako je tomu u Lipinského pravidla pěti a jeho vylepšených variant.²⁸ Jejich použití v racionálním designu však přináší užitek, protože jednoduchým způsobem napovídají, že například látky obtížně rozpustné ve vodě nemusí být schopné transportu k biologickému cíli. Obecně lze říci, že smyslem moderních CADD metod je naplnit tři symbolické cíle medicíně chemického výzkumu:³⁸

- 1) prozkoumat velmi velkou množinu malých molekul (tzv. chemický prostor) a vybrat nejvýhodnější základní struktury či kandidáty předlohových struktur, jejichž skutečná biologická aktivita se následně ověří experimentálně,
- 2) vézt proces optimalizace struktury a vlastností objevené základní či předlohové struktury (tzv. H2L, L2D) tak, aby měla žádoucí farmakodynamické i farmakokinetické vlastnosti, jako je absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece a toxicita (ADMET),
- 3) navrhnout nové typy léčiv buď *in silico* aditivní derivatizací (tj. zvětšováním molekuly připojováním substituentů) nebo rozkladem známých struktur a kombinací fragmentů do nových chemotypů.

Aktuální stav počítačových technologií umožňuje širokou dostupnost jak ligandově, tak strukturně založených CADD metod pro pracovní skupiny, které se zabývají vývojem léčiv. Preferovány jsou však více strukturně založené metody, neboť umožňují hlubší vhled do mechanismu účinku bioaktivních látek, jestliže je dostupný model biologického cíle. Ligandově založené metody jsou obvykle využívány, když je biologický cíl neznámý. Základní členění CADD metod je uvedeno v Tabulce 1.³⁹

Tabulka 1. Rozdělení CADD metod do dvou základních skupin.

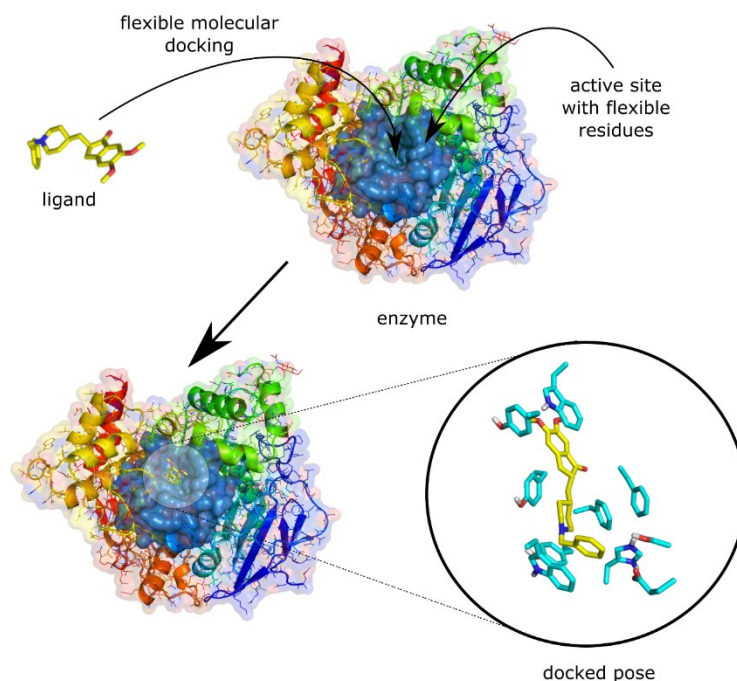
CADD	
SB CADD metody	LB CADD metody
Molekulární docking	QSAR a QSPR
Molekulárně dynamické simulace	QSAR se simulovaným receptorem
<i>De novo</i> design	Ligandový scaffold hopping
Modelování farmakoforu	Farmakoforová analýza
Homologní modelování	Filtrace ligandů
Virtuální screening	Virtuální screening
Detekce vazebných míst biologického cíle	ADMET predikce

Pro aplikaci CADD metod je velmi důležité disponovat přesnými vstupními daty, jejichž analýzou či simulací se následně odvozují chemické struktury pro syntézu a biologické hodnocení. Jak modely biologických cílů, tak i velké množství reálně existujících ligandů lze získat z veřejně dostupných databází na internetu. V případě biologických cílů je nevýznamnější databází Proteinová databanka PDB (www.rcsb.org), která zahrnuje více než 151 tisíc 3D modelů různých enzymů, receptorů, DNA, RNA či virů. Je obvyklé, že tyto modely jsou odvozené rentgenostrukturní analýzou, NMR či elektronovou mikroskopií a často zahrnují ve struktuře i molekulu nějakého slibného ligandu, což umožňuje snadnou lokalizaci vazebného či aktivního místa. Podobné databáze existují i pro ligandy, z nichž databáze ZINC zahrnuje přibližně 230 milionů ligandů, a je proto nejvýznamnější databází určenou pro *in silico* výzkum léčiv (zinc15.docking.org).⁴⁰

2.1. Strukturně založené metody CADD

Pokud se zaměříme na SB CADD metody, nejdůležitější a prakticky nejčastěji užívaným nástrojem je molekulární docking. Ve stručnosti lze o této metodě říci, že aplikuje v drtivé většině případů principy molekulární mechaniky, aby pomocí vhodného algoritmu (např. heuristické algoritmy, evoluční algoritmy, algoritmy kolonie mravenců, aj.) našla takové vzájemné geometrické uspořádání mezi ligandem a receptorem či enzymem, které má nejnižší potenciální nebo dokonce Gibbsovu energii. Molekulární docking může být přitom proveden tak, že buď celý receptor má rigidní konformaci, anebo jeho určitá část má

umožněnou flexibilitu torzních úhlů. Proto hovoříme o tzv. rigidním a flexibilním molekulárním dockingu (Obr. 5).[P2]



Obr. 5. Schéma principu molekulárního dockingu.[P2]

Výsledky molekulárního dockingu poskytují tedy informaci o tom, jaká je pravděpodobná topologie vazebného módu a jak silně se ligand k biologickému cíli váže. V praxi se používají k tomuto různé komerční či open-source programy, které se vzájemně odlišují správností výpočtů (tj. implementací různě definované skórovací funkce), možností zahrnout do výpočtu explicitní molekuly vody, možností využívat multithreading, grafické karty, matematické koprocesory, aj. (např. AutoDock Vina, Molegro, Glide, Gold, FlexX, FRED, atd.). Molekulární docking bývá velmi často zařazován do multioborových publikací zaměřených na vývoj potenciálních léčiv, kde slouží buď k provedení SB virtuálního screeningu a objevu základní struktury, anebo k SAR interpretaci stanovených biologických aktivit. Vedle klasického uspořádání molekulárního dockingu, v kterém se výpočet optimalizuje tak, aby pozice ligandu byla testována jen v aktivním místě, může být tato metoda využita k detekci potenciálních alosterických vazebných míst pomocí skenování povrchu celého receptoru vhodným ligandem (tzv. energetický přístup). K těmto metodám hledání alosterických míst je možné využít i poměrně jednoduché topochemické analýzy (např. aplikovanou Voronoiovu teselaci), která hledá na povrchu receptoru geometricky výhodná uspořádání atomů (tzv. geometrický přístup).[P3]

SB metody jsou založené na znalosti struktury biologického cíle, která může být stanovena buď experimentálně nebo homologním modelováním (HM).⁴¹ Metoda HM

umožňuje, aby byl na základě znalosti primární struktury enzymu či receptoru vytvořen realistický 3D molekulární model. Využívají se k tomu především algoritmy, které v dané primární sekvenci hledají takové úseky, jejichž konformace už byla experimentálně stanovená a je dostupná v např. proteinové databance (www.rcsb.org). Pro HM lze využít samostatné programy (např. Modeller) nebo on-line webové servery (např. Swiss-Model).

Dalším krokem, který navazuje velmi často na molekulární docking, je molekulárně dynamická (MD) simulace se zahrnutím vlivu teploty, času, přítomnosti vody a iontů. MD simulace jsou relativně vysoce výpočetně náročné, třebaže jsou založené na molekulární mechanice, a slouží k přesnějšímu ověření chování studovaného molekulárního systému v podmínkách, které se přibližují fyziologickému stavu. Nejznámějšími programy pro MD simulace jsou Gromacs a Amber, z nichž první je volně dostupný a více užívaný. Důležitými výsledky MD simulací jsou především trajektorie atomů, z kterých lze odvodit, zda je např. vazebný mód ligandu stabilní nebo zda dochází k nějakým významným změnám konformace ligandu a receptoru. Je obvyklé, že trajektorie se reprezentují závislostí průměrné mezi-atomové vzdálenosti mezi konformery ligandů či reziduy (tzv. root mean square distance, RMSD) na čase. Vedle hodnocení trajektorií atomů je velmi důležité, že pomocí MD simulací, zahrnujících rozpouštědlo a ionty, lze odvodit přesnější odhad Gibbsovy vazebné energie (např. Poisson-Boltzmannovou metodou, PBSA, nebo perturbací volné energie, FEP), než je tomu v případě molekulárního dockingu.⁴²[P4]

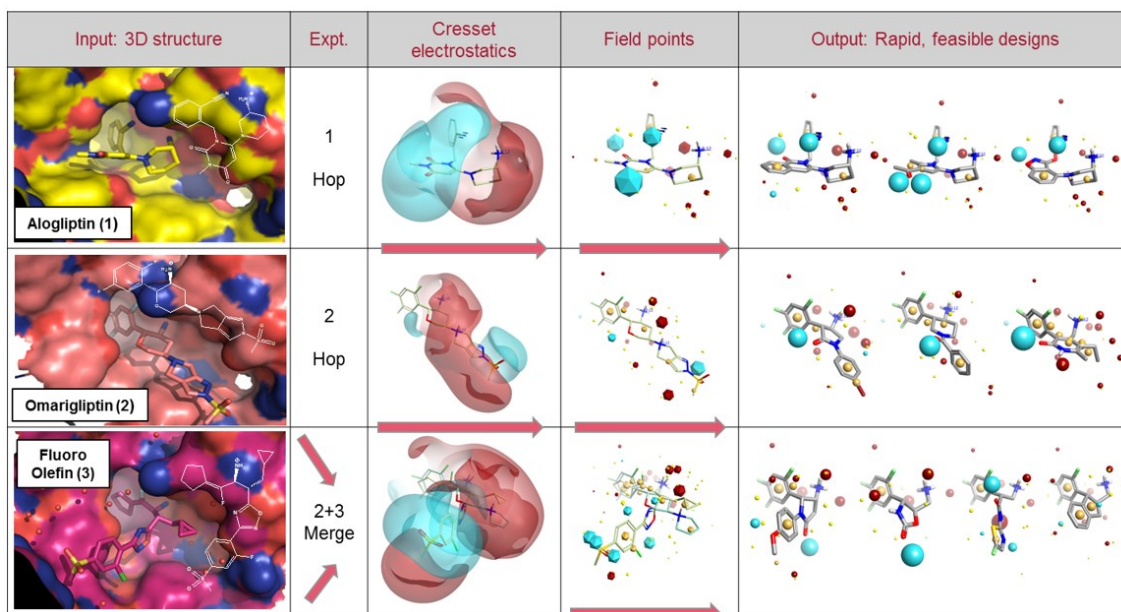
Mezi další formy SB CADD patří farmakoforové modelování, jehož cílem je charakterizovat elektronické a sterické parametry aktivního místa biologického cíle, které musí nalézt svůj protějšek u aktivního ligandu.⁴³ Farmakoforové modelování může vycházet ze znalosti vazebných módů aktivně se vázajících ligandů (tj. takových, které vyvolávají žádanou biologickou odpověď), u nichž se následně popisují vodíkové vazby, hydrofobní interakce, interakce mezi náboji či π -elektrony. Farmakoforový model jakožto topochemická mapa HDB/HBA, zásaditých a bazických funkčních skupin, parciálních nábojů, aromatických a jiných struktur v aktivním místě, může potom nahradit explicitní model celého enzymu či receptoru ve vyhodnocení interakce s ligandy. Toho lze využít zejména ve virtuálním screeningu, kde farmakoforový model zjednodušuje výpočty.

Nové struktury ligandů, které mohou mít nejvýhodnější vlastnosti pro interakci s biologickým cílem, lze navrhnout *de novo* SB metodami.^{44, 45} Vychází z bioaktivního ligandu, v němž se pomocí vhodného softwaru přidávají či zaměňují různé funkční skupiny (tzv. scaffold hopping a growing ligands). Následně se ověřuje vazebná afinita nového ligandu k biologickému cíli pomocí molekulárního dockingu nebo molekulární dynamiky.⁴⁶⁻

⁴⁸ Nové substituenty mohou být voleny náhodně nebo na základě nějaké metody umělé

intelligence, která páruje např. vodíkové vazby ligandu a chemického okolí v aktivním místě biologického cíle. Jiným přístupem z kategorie *de novo* designu ligandů je spojování ligandových fragmentů, které se poměrně dobře vážou v aktivním místě biologického cíle (tzv. linking fragments).

Některé programy určené pro CADD (např. Maestro – Schrödinger, MOE, Discovery Studio) využívají pro *de novo* design pokročilé algoritmy, které mohou např. vyhledávat v ligandech fragmenty zodpovědné za interakci s biologickým cílem, a ty hybridizovat do nové molekuly. Automatizovaný SB *de novo* design může postupovat tak, že nejprve vyhledá v databázi nejsilněji interagující ligandy s biologickým cílem, pak vygeneruje jejich elektrostatické vlastnosti a pomocí linkingových strategií rekonstruuje nový ligand s optimální vazebnou energií (Obr. 6).⁴⁹ Nevýhodou těchto *de novo* metod je však možnost, že navrhnou struktury, které budou obtížně syntetizovatelné. Nicméně, nové přístupy umělé intelligence umožňují zakomponovat do těchto metod i testy, které ověří, zda je organická syntéza navržené látky proveditelná.⁵⁰



Obr. 6. Ukázka SB *de novo* designu nové molekuly fluorolefinu (3) v programu Cresset.⁵¹

2.2. Kritické body strukturně založených metod CADD

Úspěšnost SBDD metod je předně závislá na zdrojových datech, správnosti teoretických předpokladů a technické dokonalosti provedených výpočtů. Jak již bylo naznačeno výše, CADD výpočty nenáleží mezi jednoduché procesy, nýbrž mezi komplikované techniky, které vyžadují detailní kontrolu. V následující části uvádím několik kritických míst, které se

mohou stát zdrojem selhání predikce potenciálních léčiv, pakliže nejsou patřičně v *in silico* výzkumu léčiv promyšleny a zohledněny.

SBDD předpokládají, že za patologickými projevy nemocí stojí definovatelné biologické cíle, resp. že je to mnohdy jeden poškozený protein či gen, který podstatně reguluje patofyziologické kaskády. Tato pracovní hypotéza musí však být nejprve potvrzena komplexními studii, zahrnující např. experimenty se zvířaty s knock-outovanými geny, jestliže je tedy možné zavést zvířecí model dané nemoci. Je-li biologický cíl nalezen a jeho role v patologii dané nemoci validována, je nutné ověřit, zda je cíl chemicky modulovatelný (tj. zda má vlastnost zvanou ligandability či druggability). Drtivá většina biologických cílů, které mají tuto vlastnost, náleží mezi receptory spřažené s G-proteiny (GPCR), enzymy a iontové kanály. Biologickými cíli mohou být i nukleové kyseliny. SBDD zaměřené na modulaci DNA/RNA mají sice v CADD velmi minoritní zastoupení, ale v principu je tu možné aplikovat rovněž metody počítačové chemie a biologie, jako je např. molekulární docking.⁵²⁻⁵⁵ Na druhou stranu existují paradoxně i biologické cíle (např. některé fosfatasy s mechanismem účinku ve spektru protein-proteinových interakcí), o nichž se v současné době míní, že jsou nedomulovatelné (tzv. undruggable).⁵⁶⁻⁵⁸

Některé inovativní přístupy v návrzích a optimalizacích předlohových struktur zastávají praktickou filosofii, jejímž cílem je design léčiva s vyváženým žádoucím účinkem vůči více biologickým cílům (např. multi-targeted directed přístup).⁵⁹ Východiskem této metodologie je jednak skutečnost, že každá látka se v těle setkává s velkým množstvím potenciálních biologických cílů, které by neměla negativně ovlivnit, a jednak skutečnost, že řadu onemocnění bylo vhodnější léčit modulací několika biologických cílů současně. Tento přístup je zatím v CADD spíše minoritní. Převládajícím schématem racionálního vývoje léčiv je zejména optimalizace selektivity bioaktivních látek.^{60, 61}

Modulovatelnost funkce biologického cíle malými molekulami je úzce svázána s jeho geometrií, přítomností kapes, tunelů a polárních interakčních map na jeho povrchu. Lze předpokládat, že biologický cíl je modulovatelný, když je známé jeho aktivní místo a pokud má dostatečně velký a komplexní povrch. V současné době se objevují různé studie, které se pokouší modulovatelnost biologických cílů předpovědět a kvantifikovat.⁶² Souběžně se také rozvíjejí různé přístupy, které se snaží nalézt v modelu biologického cíle specifická, resp. alosterická vazebná místa. Tyto metody lze klasifikovat na geometrické, energetické a bioinformatické přístupy.^{63, 64} Do problematiky modulovatelnosti biologického cíle se dále promítá také fakt, že většina SBDD přístupů využívá pro detekci vazebných míst model průměrné stabilní konformace cíle, která byla stanovena experimentálními metodami. Pro nalezení vazebného místa je ale vhodnější zkoumat více relevantních konformací

biologického cíle. Populace konformací mohou být získány neklasickými algoritmy pro molekulární dynamiku, které dokážou překonat mnohačetná lokální minima na hyperploše potenciální energie, separující jednotlivé konformery (např. Swarm-MD, simulace konformační plavení, tepelně akcelerované MD simulace, replica exchange MD).^{65, 66} Je též velmi důležité, pokud se za model biologického cíle vezme struktura stanovená X-ray, aby před aplikací tohoto modelu v SBDD byla provedena analýza populace kokrystalizovaného ligandu, tepelného pohybu v aktivním místě, který je indikován B-faktorem, a ověřena konzistence sítě vodíkových vazeb.⁶⁷ Je-li model biologického cíle v tomto ohledu nespolehlivý, má neuspokojivou populaci dihedrálních úhlů v amidických vazbách, apod., je vhodné provést *in silico* simulace, které konformaci proteinu ověří, či vytvořit model biologického cíle homogními metodami.⁶⁸

Na předpověď vazebné energie mezi ligandem a biologickým cílem, který je obvykle proteinem, má zásadní vliv též určení protonace reziduí, zejména v aktivním místě. Je velmi výpočetně náročné správně určit ionizaci polárních funkčních skupin, pokud má být vzata v úvahu flexibilita celého skeletu biologického cíle a proximita nějakého ligandu. Lokální dielektrické rozložení v aktivním místě může měnit hodnotu pK_A funkčních skupin až o několik jednotek.⁶⁹ Díky těmto jevům se mohou teoreticky předpokládané HBD zaměnit za HBA, čímž se zásadně mění rozeznávací mapa biologického cíle, a následně strukturní požadavky na farmakofor v ligandech. Tyto podmínky proto narušují představu, že by bylo pro molekulárně mechanicky založený SB virtuální screening spolehlivé využít jednu konformaci biologického cíle se specifikovanou protonací, nezávisle na přítomném ligandu. Konformační flexibilitu biologického cíle lze kompenzovat aplikací tzv. indukovaného fitu neboli flexibilního dockingu, ale pro regulaci protonace reziduí a ligandů na úrovni modelování molekulárně mechanickými metodami prozatím není dostupný prakticky žádný nástroj. Cesta k řešení této náročné problematiky by mohla vést přes využití např. semiempirických kvantově chemických výpočetních metod.⁷⁰

V neposlední řadě je velice důležitým faktorem pro správný výpočet vazebné energie komplexu ligand-biologický cíl zahrnutí molekul vody. Analýza vazebných módů ukazuje, že ve zhruba 2/3 případů se na vazbě ligandu a biologického cíle významně podílejí molekuly vody.⁷¹ Je tudíž důležité při SBDD vodu brát v úvahu, především když analýzy experimentální modelů biologických cílů s ligandy, které jsou v centru pozornosti, indikovaly přítomnost tzv. těsně vázané vody.

Velkou pozornost si samozřejmě zaslouhuje příprava virtuálních ligandových knihoven pro potřeby SBDD. Modely ligandů je potřeba získat v realistické geometrii a odpovídajícími fyzikálně chemickými vlastnostmi, což je díky velikosti molekul relativně snadné. Klíčovou

otázkou je, které ligandy pro SBDD metody, zejména SB virtuální screening, využít. Ligandové knihovny se předně využívají jako množina potenciálních základních struktur, ale je možné také testovat na zvoleném biologickém cíli ligandové knihovny, které obsahují multipotentní látky s prokázanou schopností způsobovat ve SB virtuálním screeningu tzv. falešně pozitivní signál. Tím se dá do určité míry validovat zvolená SBDD metodika. Obecně by bylo ideální, kdyby ligandy pro SBDD byly přefiltrovány pomocí nástrojů odstraňující tzv. PAINS (pan assay interference compounds) a též, aby nebylo nutné je v dalších fázích výzkumu optimalizovat z farmakokinetického hlediska. Ligandy je možné vybrat na základě splnění Lipinského pravidla pěti, či jiných semiempirických pravidel. Lze též zahrnout do těchto výpočtů pouze fragmenty, které splňují např. pravidlo tří, a optimální fragmenty následně využít pro *de novo* design základních struktur.^{72, 73}

Pochopitelně nejdůležitějším prvkem, na kterém závisí výsledky CADD metod, jsou použité výpočetní techniky. Pro charakterizaci vazebné afinity ligandů a biologických cílů se využívají v praxi rozmanité skórovací funkce, které jsou aproximací příslušné Gibbsovy vazebné energie. Těchto skórovacích funkcí je implementováno v různých programech pro CADD celá řada.⁷⁴⁻⁷⁶ Skórovací funkce může být založena využitím parametrů silových polí na úrovni molekulární mechaniky, může zahrnovat parametry odvozené z QSAR studií biologických aktivit (tzv. empirické skórovací funkce), parametry získané topologickou analýzou experimentálně určených vazebných módů ligand-biologický cíl (tzv. knowledge based skórovací funkce) anebo může zahrnovat různé kombinace těchto parametrů (tzv. konsensní skórovací funkce).⁷⁷ Nejpřesnější určení Gibbsovy vazebné energie lze očekávat od kvantově chemických výpočetních přístupů, které mohou odhadnout s vyšší správností partiční funkci systému a odvodit vazebnou energii mezi vázaným a nevázaným stavem. Tyto výpočty jsou díky současným technologickým pokrokům HPC realizovatelné, ale dostatečná výpočetní kapacita není snadno dostupná, aby bylo možné provést např. SB virtuální screening *ab initio*. Jelikož pokročilé kvantově chemické výpočetní metody poskytují správné výsledky a nepotřebují kalibraci, přichází jejich aplikace v úvahu, když se provádí studium jen na několika málo ligandech a jednom biologickém cíli.

Skórovací funkce jsou široce v SBDD využívány a stále se zdokonalují. Některé skórovací funkce dokážou zohlednit entropické a hydrofobní efekty, a mohly by též zahrnovat i reaktivní silová pole a algoritmy pro simulaci tvorby chemických vazeb.⁷⁸⁻⁸¹ Ve spojení s různými systematickými, stochastickými (tj. Monte Carlo varianty s Metropolis kritériem) či genetickými algoritmy (např. Lamarkovské metody) pro konformační analýzu a geometrickou optimalizaci umožňují skórovací funkce provést prakticky nejcennější krok v návrhu léčiv *in silico*, a to je nalezení základní struktury. Jakmile je základní struktura

objevena, je možné aplikovat celou řádu dalších metod, včetně metod klasické medicíně chemie, a dopracovat se až k léčivu.

2.3. Ligandově založené metody CADD

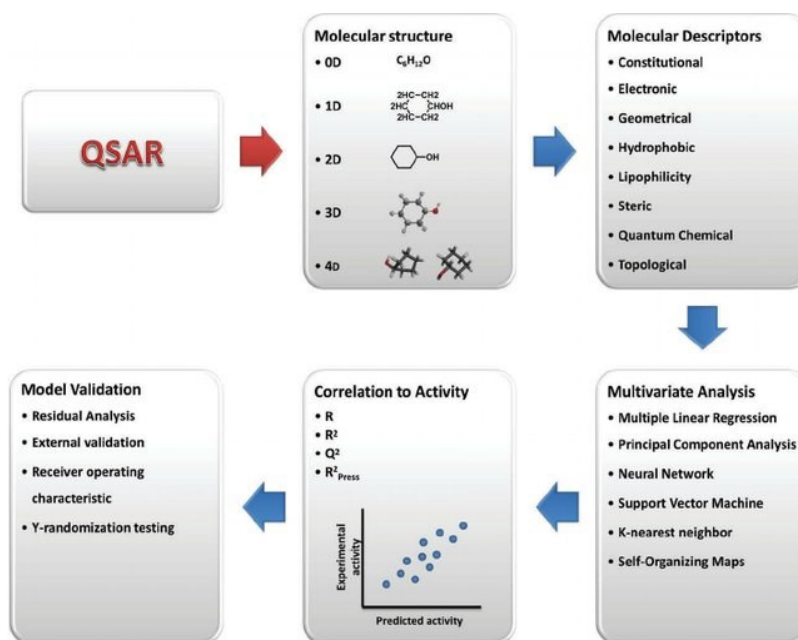
Druhou kategorií CADD metod jsou ty, které vychází pouze ze znalosti struktury ligandů a jejich biologických aktivit. Fundamentálním zástupcem těchto LB CADD metod je analýza kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou chemických látek (QSAR). Za zakladatele QSAR metod je považován Corwin Hansch, který v 60. letech 20. století využil dřívější poznatky o Hammettově vztahu a definoval biologickou aktivitu (pIC_{50}) jako matematickou funkci elektronických, lipofilních a sterických vlastností bioaktivních molekul (1).⁸²⁻⁸⁵

$$pIC_{50} = a\sigma + b\pi + cE_s + D. \quad (1)$$

Hanschova rovnice (1) je paradigmatickým vyjádřením skutečnosti, že biologická aktivita chemických látek se řídí principy lineárních vztahů pro Gibbsovu energii (linear free-energy relationships, LFER) a lze ji charakterizovat molekulárními deskriptory, jako je Hammettova substituentová konstanta σ , Hanschova lipofilní substituentová konstanta π a Taftova substituentová sterická konstanta (E_s). V rovnici (1) je též uvedena konstanta D , jejíž význam může být např. biologická aktivita nesubstituované látky. Specifickým rysem QSAR metod je využití metod strojového učení, které jsou schopny určit analýzou matice molekulárních deskriptorů matematický vztah k biologické aktivitě (např. koncentrace látky způsobující 50% inhibici či aktivaci enzymu, IC_{50} , EC_{50}) jakožto závislé proměnné. V počátcích rozvoje QSAR metod, kdy ještě nebyla dostupná výkonná výpočetní technika, se využívala jen několikanásobná lineární regrese (multiple linear regression, MLR) k určení funkčního vztahu mezi molekulárními deskriptory a biologickou aktivitou. V dnešní době, kdy molekulárních deskriptorů může být pomocí vhodného softwaru (např. Dragon, AlvaDesc) vypočítáno mnoho tisíc, lze aplikovat pokročilé metody rozboru mnohorozměrných dat, jako je analýza základních komponent (principal component analysis, PCA), projekce latentních struktur (projection of latent structures, PLS), metoda podpůrných vektorů (support vector machine, SVM) nebo umělé neuronové sítě (artificial neural networks, ANN), aby se dal QSAR model vypočítat. QSAR metody se tedy od základní Hanschovy verze, která se stále užívá, začaly přes metodu Free a Wilsona dynamicky rozvíjet, využívat četné molekulární deskriptory, včetně kvantově chemických deskriptorů, jako je superdolokalizabilita, a aplikovat pokročilé statistické metody, čímž přispívají k vývoji léčiv především díky poskytnutí predikčních modelů pro výpočet biologické aktivity.[P5,P6,P7,P8,P9,P10,P11,P12,P13,P14,P15]

Chemoinformatická problematika výpočtů molekulárních deskriptorů může být řešena nejjednodušeji pomocí analýzy strukturních vzorců v rámci teorie grafů (např. přítomnosti funkčních skupin, indexy konektivity, informační indexy), dále geometrickou analýzou optimalizovaných 3D molekulárních modelů (např. topologické indexy, radiální distribuční funkce, 3D autokorelace, 3D konfigurační deskriptory invariantní k mřížce) nebo mohou být molekulární deskriptory odvozeny z vlnové funkce ligandů (např. energie hraničních orbitalů, parciální atomové náboje určené specifickým schématem, kvantová podobnost).⁸⁶⁻⁸⁹ Další významná skupina molekulárních deskriptorů se získává pomocí sčítání aditivních konstant atomů či funkčních skupin, které jsou přítomné v molekule ligandu (např. log *P*, molekulový objem, topologická polární plocha povrchu – TPSA, polarizabilita). Tyto atomové a fragmentové semiempirické přístupy poskytují velmi rychle významné molekulární deskriptory, které mohou být použity pro odhadnutí drug-likeness předpokládaných předlohových struktur. Jiné molekulární deskriptory dokážou charakterizovat např. pravděpodobnost toxicity ligandů vůči dafniím či pravděpodobnost jejich antiinfektivních účinků.⁹⁰ Specifickými molekulárními deskriptory, které mají zejména široké uplatnění v chemických databázích při vyhledávání podobných struktur (např. Reaxys, ChemSpider), jsou molekulární fingerprinty.^{91, 92} Fingerprinty mají povahu relativně obsáhlých binárních vektorů (např. 1024 bitů), přičemž každý element reprezentuje přítomnost či nepřítomnost určitého strukturního rysu (tzv. path). Fingerprinty lze použít k farmakoforové analýze nebo k LB virtuálnímu screeningu, v jehož rámci se ve virtuální ligandové knihovně mohou hledat látky, které se nejvíce podobají určité předlohové struktuře. Tento LB virtuální screening je výpočetně nenáročný, což umožňuje v rozumném čase analyzovat např. pomocí Tanimotova indexu podobnosti knihovny s miliony ligandů.⁹³

Aby mohl být QSAR model použitelný v pro výpočet biologické aktivity, k návrhu optimální bioaktivní struktury ligandu a interpretaci pozorované biologické aktivity, je nutné ho důkladně statisticky a chemometricky validovat. Interní statistická kritéria, jako je koeficient determinace, Fischer-Snedecorův *F* test, standardní reziduální odchylka, Studentův *t* test regresních koeficientů, která byla stanovena na datech použitých při odvozování QSAR modelu, jsou mnohdy zavádějící, a je nutné pro QSAR modely provést alespoň kros-validaci anebo predikci biologických aktivit látek, které nebyly zahrnuty v tzv. trénovacím setu při odvozování modelu.⁹⁴⁻⁹⁶ Navržený QSAR model, respektive zvolená metodika QSAR analýzy, by měla též adekvátně reagovat, pokud jsou hodnoty molekulárních deskriptorů nahrazeny náhodnými čísly nebo se biologické aktivity přehází tak, aby biologické aktivity byly vztaženy k molekulárním deskriptorům, které popisují jinou látku v testovaném souboru (tzv. test randomizace a scramblingu) (Obr. 7).⁹⁷



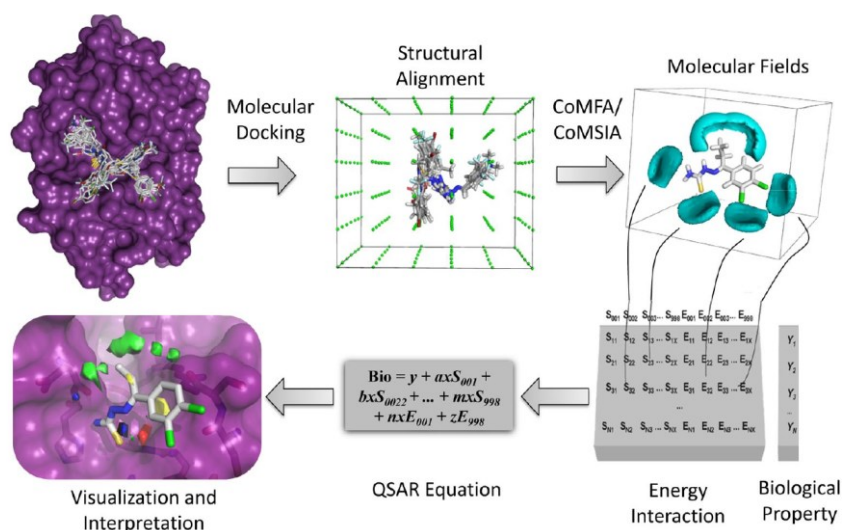
Obr. 7. Základní etapy QSAR analýzy.⁹⁸

Dále bývá velmi vhodné, aby se u QSAR modelu ověřila doména použitelnosti analýzou chemického prostoru zkoumaných látek např. pomocí Williamsova grafu. Tato analýza určuje, zda je chemický prostor rovnoměrně pokryt studovanými látkami a zda není některá z nich odlehlym objektem. Důležitým hodnocením je též test normality reziduí (např. rankitový graf, Kolmogorův-Smirnovův test, Shapiro-Wilkův test) a ověření, zda zahrnutí či vyřazení jednotlivých molekulárních deskriptorů z QSAR modelu vede k významnému vzrůstu, resp. poklesu statistické významnosti modelu (např. Akaikeho nebo Schwarzovo kritérium).⁹⁹⁻¹⁰¹ Je-li QSAR model spolehlivý, pak je možné jej použít v CADD, a to jak pro vyhodnocení biologických vlastností malého souboru látek, tak virtuální screening, který předpoví biologickou aktivitu širší množiny látek. Je však nutným mít na paměti, že QSAR model dokáže spolehlivě predikovat biologickou aktivitu jen pro podobné látky, náležející do stejného chemického podprostoru.

Vzhledem k velkému množství dostupných molekulárních deskriptorů je nutné obvykle využívat při QSAR analýzách různé výpočetní techniky, které vyhledávají ve vstupních datech prediktory s maximální informační relevancí. Je možné využít např. metody PCA a PLS, které inherentně zahrnují mechanismy pro minimalizaci vlivu informačně nevýznamných molekulárních deskriptorů, anebo lze aplikovat selekční algoritmy, které jejich významnost explicitně ověří (např. dopředný, zpětný, evoluční, brute force, particle swarm, krokový selekční algoritmus pro výběr molekulárních deskriptorů).^{31, 102, 103}

Současné QSAR metody dokážou analyzovat nejen chemické struktury, které jsou charakterizované vektorem molekulárních deskriptorů, ale mohou též zpracovávat

případy, kdy je každá molekula ve studovaném souboru charakterizovaná 3D polem, tedy trojrozměrnou maticí hodnot. Tato 3D QSAR metoda, známá též jako komparativní analýza molekulárního pole (CoMFA), je založena na domněnce, že všechny studované látky působí v určitém místě biologického cíle, které má konstantní topochemické vlastnosti.^{104, 105} Proto je nutné všechny studované látky nejprve podrobit konformační analýze (např. pomocí molekulární dynamiky s algoritmem simulovaného žíhání), vytvořit reprezentativní knihovnu konformerů, provést optimální strukturní přeložení (tzv. alignment) nejvýhodnějších konformerů na templátovou strukturu, vypočítat molekulární interakční 3D pole pro každou molekulu a získaná data statisticky analyzovat např. metodou PLS, která dokáže analyzovat interkorelované a singulární matice.¹⁰⁴ 3D QSAR metoda může místo molekulárních interakčních polí (MIF) analyzovat molekulární pole podobnostních indexů (CoMSIA) a lze ji též kombinovat s molekulárním dockingem, který této metodě poskytne přeložený soubor ligandů, a tudíž není v ideálním případě nutné generovat knihovny konformerů pomocí molekulární dynamiky (Obr. 8).^{106, 107}



Obr. 8. Schéma postupu 3D QSAR analýzy se zahrnutím molekulárního dockingu.¹⁰⁸

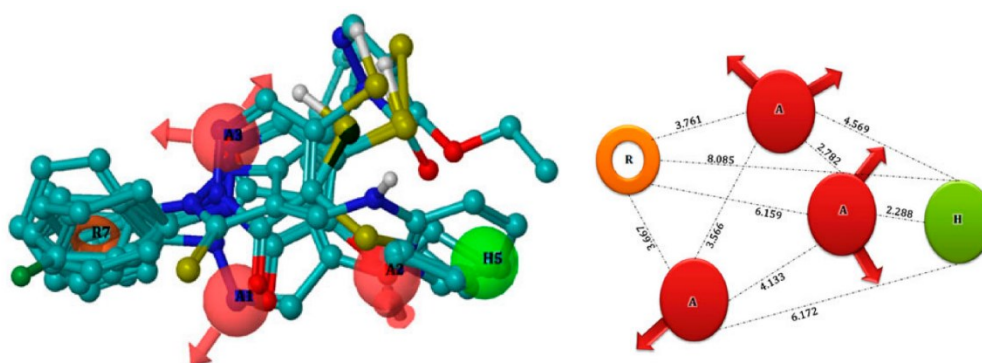
Výsledkem 3D QSAR analýzy je jednak predikční model biologické aktivity a jednak mapy tzv. pseudo- β koeficientů normalizovaných jejich směrodatnou odchylkou, které vyznačují regiony v molekulárních polích s významným vlivem na biologickou aktivitu. 3D QSAR metoda je poměrně výpočetně náročná a je ji možné využít jen pro látky, které působí stejným mechanismem účinku, a náleží tedy do stejné domény v chemickém prostoru.

Jako analogie 3D QSAR metody postupně vznikly i vícerozměrné nD QSAR varianty. 4D QSAR analýza využívá na rozdíl od 3D QSAR metody pro každý ligand Boltzmannovu váženou knihovnu konformerů, které se všechny umístí do gridboxu, určí se jejich interakční farmakoforové elementy a okupační deskriptory, a posléze se odvodí nejlepší 4D

QSAR model.^{109, 110} Vedle konformerů se mohou pro reprezentaci ligandů použít knihovny tautomerů, stereoisomerů či různých ionizačních stavů.¹¹¹ 5D QSAR model přidává ke každému ligandu novou proměnnou, která zastupuje tzv. indukovaný fit receptoru neboli přizpůsobení tvaru kavity receptoru dle rozměrů ligandů.¹¹² 6D QSAR modely obsahují proměnné, které reprezentují solvatační efekty, 7D QSAR metody navíc zahrnují informaci o interakci se skutečným či simulovaným receptorem.^{111, 113, 114}

Na podobném principu jako QSAR metody jsou vypracovány korelační studie, které uvádějí do matematického vztahu nějakou vlastnost látek (např. toxicita, ADME, přístup přes hematoencefalickou bariéru, kapacitní faktor) a jejich molekulární deskriptory (quantitative structure property relationship, QSPR). S využitím QSPR modelu lze tedy předpovídat kvantitativní veličiny, které jsou obvykle komplikovaně stanovitelné. Příkladem je nelineární MPO model prostupu látek do mozku, který využívá 6 molekulárních deskriptorů.¹¹⁵ Speciální formou QSPR modelů jsou filtry ligandů, které umožňují např. identifikovat na základě stanovení molekulární podobnosti látky se schopností působit na mnoho receptorů (PAINS) nebo látky, které snadno vytvářejí ve vodě aglomeráty nebo jsou ve vodě nerozpustné.^{116, 117}

Vedle QSAR a QSPR metod náleží mezi LB CADD metody farmakoforová analýza, která může být provedena s využitím několika odlišných principů.^{118, 119} Farmakofor, jakožto soubor elektronických a sterických rysů zodpovědných za optimální interakci s biologickým cílem, je možné odvodit pomocí maximalizace překryvu chemických typů, které se nacházejí v bioaktivních ligandech. Díky konformační flexibilitě ligandů je ale nutné ve farmakoforové analýze prostudovat konformační knihovny. Superponované konformery jsou následně zpracovány počítačovými nástroji pro extrakci farmakoforů (Obr. 9), které se mohou využít pro klasifikaci biologické aktivity dalších látek.¹²⁰



Obr. 9. Příklad určení farmakoforu ze superponovaných bioaktivních ligandů. R označuje aromatický cyklus, A akceptor vodíkové vazby, H je hydrofobní řetězec.¹²¹

LB CADD metody lze stejně jako SB CADD metody využít pro virtuální screening (VS) a vybírat jejich prostřednictvím z virtuálních knihoven nejvhodnější kandidáty základních či předlohových struktur. Virtuální screening lze v tomto případě uskutečnit pomocí ověření přítomnosti farmakoforu, selekcí látek podle Tanimotova indexu podobnosti s nějakou vzorovou strukturou nebo aplikací QSAR modelu. Existují rovněž LB *de novo* metody, které mohou s využitím QSAR modelu navrhnout nové struktury s optimální biologickou aktivitou (např. evoluční fragmentový přístup).^{122, 123} Výhodou LBVS zpravidla bývá mnohem vyšší rychlost, než má screening založený na SBVS, který většinou aplikuje výpočetně náročný molekulární docking.¹²⁴

2.4. Kritické body ligandově založených metod CADD

Ligandově založené CADD metody jsou z historického pohledu starší než strukturně založené CADD přístupy, a tudíž pro ně byl během času vypracován poměrně komplexní validační aparát.^{94, 125, 126} Základními otázkami v LB CADD jsou především: jaký je dostatečný počet ligandů pro strojové učení a jaká je nejvhodnější metodologie pro odvození správného modelu. Nejvíce reprezentativním zástupcem těchto přístupů jsou QSAR/QSPR studie, na nichž lze demonstrovat základní úskalí, kterým je nutné věnovat v této oblasti zvýšenou pozornost.

QSAR i QSPR metody bývají obvykle posuzovány podle hodnoty koeficientů determinace R^2 , Fisher-Snedecorova F , a kros-validovaných koeficientů determinace Q^2 , přičemž bývá pravidlem, že QSAR/QSPR modely s neuspokojivými statistickými kritérii nebývají dále analyzovány a publikovány.¹²⁷ Je však nutné připustit, že modely s vysokými hodnotami interních kritérii statistické významnosti mohou zahalovat přetrénovanou funkční závislost, skrytý vliv šumu či náhodných faktorů, a naopak statisticky nevýznamný model může reflektovat klíčovou informaci o určitých odlehlých hodnotách či o diskontinuitě zahrnutého chemického prostoru, která může být pro vývoj a výzkum léčiv podstatná.^{128, 129} Obecně se má za to, že validní QSAR model by měl být vystaven z dat, kde na jeden prediktor (tj. molekulární deskriptor) připadá alespoň 5 pozorování (tj. biologických aktivit).^{130, 131} Pro validaci QSAR/QSPR modelu je nutné použít kros-validaci typu leave-many-out a ověřit predikci též na externím setu, který nebyl aplikován při odvození modelu.⁹⁷ Je-li dostatek experimentálních dat, je vhodné určit ROC (receiver operating characteristics) a posoudit schopnost modelu klasifikovat biologicky aktivní a neaktivní ligandy.¹³² Též je nutné zajistit, aby tréninkový set zahrnoval různé strukturní typy ligandů v dostatečném počtu.

Navyšování počtu ligandů sice vede k větší výpočetní náročnosti QSAR/QSPR studií, ale náhradou za to je vyšší robustnost a prediktivnost odvozeného modelu.

Velmi důležitá je pro odvození QSAR/QSPR modelů metoda strojového učení. Z rešerše odborné literatury vyplývá, že za posledních několik desetiletí bylo publikováno více než 18 tisíc QSAR modelů, jenž byly odvozeny různými lineárními a nelineárními regresními metodami.^{133, 134} Mnoho QSAR/QSPR modelů bylo vytvořeno též pomocí MLR, což poukazuje na platnost principu parsimonie ve smyslu preferování nejjednoduššího modelu v dané oblasti.¹³⁵ Díky pokrokům v oblasti umělé inteligence se do rukou počítačových chemiků dostaly nástroje, které jsou schopné zpracovat rozsáhlá data a hledat v nich jakékoli funkční závislosti.¹³⁶ Takovým nástrojem jsou kupříkladu umělé neuronové sítě, které mohou díky přístupům hlubokého učení aproximovat velmi složité funkční závislosti. Nevýhodou modelů utvořených umělými neuronovými sítěmi je na druhou stranu obtížná interpretovatelnost a relativně nepřehledná vnitřní struktura.¹³⁷ I když existují přístupy, jako je citlivostní analýza, které jsou schopné kvantifikovat významnost jednotlivých prediktorů v modelu, je třeba dbát na to, aby byla při LB analýzách použita jen informačně relevantní data.¹³⁸ Matice molekulárních deskriptorů se proto v praxi před zpracováním metodami QSAR/QSPR podrobuje důkladné analýze, která z ní má odstranit šum.¹³⁹ Jsou-li vstupní data spolehlivá a relevantní, je větší pravděpodobnost, že nalezený model biologické aktivity nebude klamný.

Pokud hovoříme o biologické aktivitě, není možné opomenout, že tato řídicí veličina pro odvozování QSAR modelů je velmi často zatížena různě velkou chybou, kterou je žádoucí dobře znát. Do QSAR studií by měla být brána jen ta biologická data, která byla stanovena podle spolehlivé metodiky, byla statisticky analyzována a zahrnula i testování standardů se známou biologickou aktivitou na daném biologickém cíli. Jsou-li do QSAR studií a farmakoforových analýz zahrnována biologická data stanovená v různých laboratořích a podle rozdílných protokolů, je nutné počítat s uplatněním různých latentních faktorů, které mohou odvození očekávaného modelu výrazně narušit.

3. VYSOCE ÚČINNÉ VÝPOČTY V CADD

CADD metody jsou v podstatě založené na složitých výpočtech, pro jejichž realizaci je nezbytná výkonná výpočetní technika a adekvátní softwarové vybavení. Pokud jde o počítačovou chemii, existuje značný počet komerčních i volně dostupných programů, pomocí nichž lze provádět molekulárně mechanické, kvantově chemické a hybridní MM/QM výpočty (např. HyperChem, Spartan, Gaussian, NewChem, Amber, Gromacs, Molegro, AutoDock Vina, GOLD, MOE, Schrödinger a mnoho dalších).¹⁴⁰ Je velmi dobře známo, že výpočetní náročnost počítačově chemický úloh prudce vzrůstá s počtem zahrnutých atomů, resp. elektronů, jsou-li explicitně uvažovány. Čím více má modelovaný systém stupňů volnosti a čím je použitá výpočetní metoda složitější, tím více jsou výpočty časově náročné. Podobné zákonitosti platí pro zpracování dat pomocí nástrojů strojového učení, které se využívají např. při QSAR/QSPR analýzách. Je proto velmi žádoucí, aby se CADD metody mohly provádět s využitím paralelizace a distribuce, a tím se podstatně zkrátila doba, která je nutná pro dokončení výpočtů.¹⁴¹

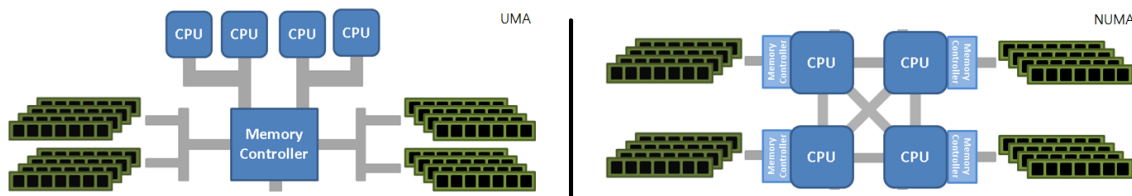
Základním principem paralelizace je, že výpočetní úloha je rozložitelná do více nezávislých částí, které počítají odlišné procesory. Na úrovni softwaru je nutné pro náročné úlohy vyvinout paralelní algoritmy (např. pro násobení matic) a implementovat je pro určité hardwarové prostředky s větším počtem procesorů (např. GPU). Když jsou výpočetní úlohy založené např. na energetické optimalizaci s využitím Markovových řetězců nebo jde o Monte Carlo metody, je možné přistoupit k tzv. dokonalé paralelizaci (perfect parallelization), protože úloha je štěpitelná do ideálně nezávislých částí. Bohužel ne všechny výpočetní úlohy jsou dokonale paralelizovatelné a též nelze všechny výpočty efektivně rozdělit do libovolně velkého počtu podúloh. Většinu výpočetních úloh lze rozštěpením na menší části urychlit s nelineárním zrychlením (speedup), což je dle Amdalova zákona dané podílem sériových a paralelních algoritmů v kódu.¹⁴² Dokonalou paralelizací lze realizovat např. metodu perturbace volné energie (FEP), flexibilní molekulární docking, SB a LB virtuální screening.

Paralelizované výpočty lze podle použitého hardwaru rozdělit na dvě hlavní skupiny:¹⁴³

- 1) paralelizace na jednom vícejaderném (multi-core) nebo víceprocesorovém (multi-processor) stroji bez využití sítové komunikace mezi fyzicky odlišnými výpočetními nody,
- 2) distribuce v homogenní či heterogenní skupině multi-core/processor strojů s využitím sítové komunikace mezi fyzicky odlišnými nody.

Pro vysoce účinné výpočty (high performance computing, HPC) se v praxi mohou využít počítačové clustery či superpočítače, které propojují vysoce propustnou síť (např. InfiniBand, OPA) výkonné výpočetní nody.¹⁴⁴ HPC lze také provádět formou gridových výpočtů v rozlehlých heterogenních sítích počítačů s různým výpočetním výkonem, které jsou propojené internetem, nebo na virtuálních počítačích v cloudovém prostředí. Bývá též velmi časté, že se kombinuje paralelizace na vícejádrovém počítači, grafických kartách (GPU), akcelerátorech (Xeon Phi) a distribuce s využitím neblokující sítě s nízkou latencí a širokým pásmem.

Výpočetní úlohy z oblasti CADD mohou být realizovány pomocí vlastních programů a skriptů pro gridové sítě (např. v Čechách MetaCentrum), které využívají aplikace s jednotným přístupem k paměti (uniform memory access, UMA). Je-li k dispozici cluster nebo superpočítač (např. v Čechách Solomon), lze díky jeho síti s nízkou latencí využít s určitými výhodami programy zkompileované pro distribuci typu MPI (message passing interface), které pracují v režimu neuniformního přístupu k paměti (non-uniform memory access, NUMA). Určité nesnáze ale plynou ze skutečnosti, že gridy, clustery či superpočítače většinou pracují na Linuxové platformě a komunikují s uživatelem pomocí terminálu. Programy se též často musí kompilovat ze zdrojových kódů a ladit pro konkrétní systém, což vyžaduje dostatečné uživatelské zkušenosti. Přesto stále více aplikací dokáže využívat GPU, protokoly s MPI a distribuovanou paměť typu NUMA (např. Gromacs), čímž se otvírají brány pro masivně paralelizované CADD výzkumy (Obr. 10).¹⁴⁵



Obr. 10. Základní vlastnosti paralelních systémů UMA a NUMA.

HPC tedy představuje nezbytný nástroj pro pokročilé CADD metody, které mohou zlepšit spávnost dosažených výsledků, a tím učinit nalezení léčiva pravděpodobnější. Vývoj informatických technologií s sebou nese specifické úkoly, které však přesahují rámec počítačové chemie a biologie. Proto zde může být uveden jen velice stručný komentář a několik klíčových pojmů k HPC, na nichž závisí proveditelnost CADD.

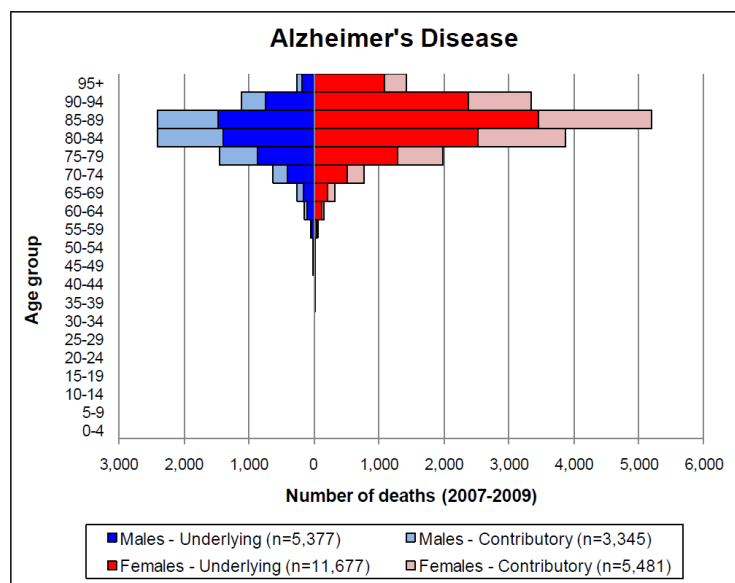
4. VYBRANÉ PATOFYZIOLOGICKÉ PROCESY PRO CADD

Předchozí kapitoly ve stručnosti představily základní charakteristiku CADD metod, které jsem během své výzkumné činnosti využíval. Rozmanité metody CADD byly aplikovány pro vývoj potenciálních léčiv nemocí, které souvisí především s poruchami nervového systému. Jedná se tedy o Alzheimerovu nemoc, narkolepsii a problematiku reaktivace cholinesteras, které byly inhibované organofosforovými látkami. V následujících podkapitolách budou uvedeny základní informace o těchto patofyziologických procesech.

4.1. Alzheimerova nemoc a její farmakoterapie

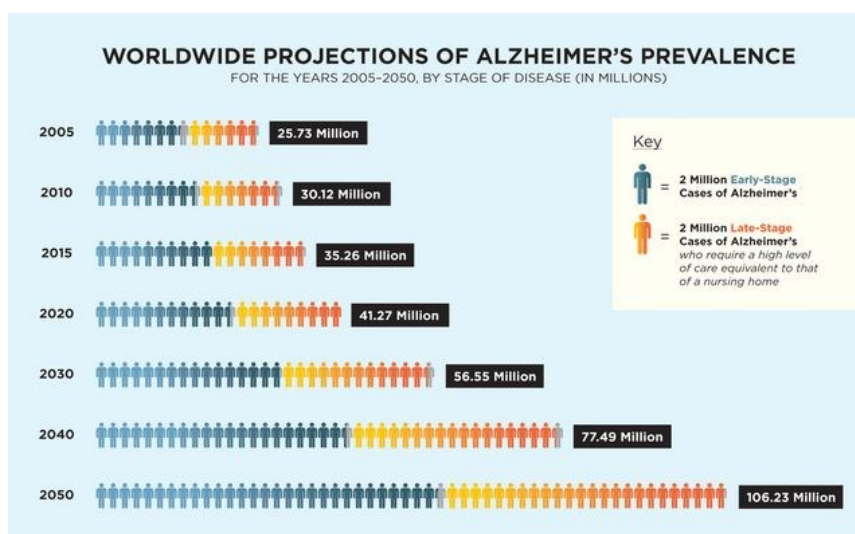
Alzheimerova nemoc (AD) patří mezi nejzávažnější chronické či progresivní neurodegenerativní onemocnění, které po 3 až 20 letech od propuknutí prvních patologických projevů vede neúprosně k smrti pacienta.¹⁴⁶ Mezi typické známky počínající AD náleží nenápadné výpadky paměti, zužování slovní zásoby, poruchy nervosvalové koordinace či obtíže provádět algebraické operace.¹⁴⁷ Postupně člověk postižený touto nemocí zakouší problémy s psaním, čtením, nevzpomíná si datum a místo svého narození, krátkodobá paměť se mu velmi zhoršuje, má narušenou prostorovou orientaci a stejně tak je dezorientován v čase.¹⁴⁸ Poškození kognitivních funkcí dále provází poruchy nálad, agresivní jednání, mravní dezintegrace, žárlivost, ale i různé formy neadekvátního jednání (např. pojídání rostlin, které jsou určeny k dekoraci místnosti). V konečné fázi nemoci je pacient s AD upoután na lůžko či invalidní vozík, není schopný komunikovat, je kachektický, inkontinentní a vyžaduje totální péči ošetřovatelů.

Když byla AD na počátku 20. století odhalena, nepředpokládalo se, že by během následujících 100 let mohla propuknout ve světovou epidemii.¹⁴⁹ V dnešní době se objevuje AD jako forma demence i u pacientů s věkem pod 65 let, avšak existují i případy pacientů s věkem mezi 35 a 39 lety (tzv. hereditární forma AD). Analýzy rozdělení příčin úmrtí např. v letech 2007 – 2009 v Anglii ukazují, že největší podíl má AD na mortalitě pacientů ve věkovém rozhraní 85 – 89 let, přičemž jsou postiženy ženy zhruba dvakrát častěji než muži (Obr. 11).



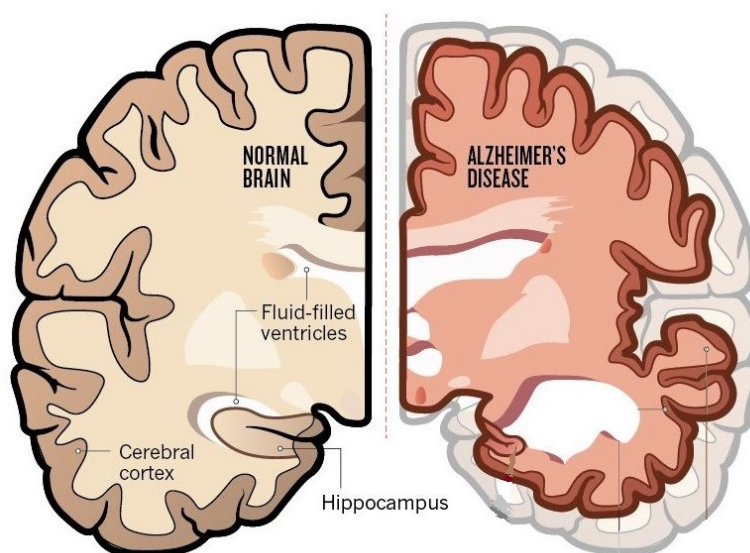
Obr. 11. Počty zemřelých pacientů v Anglii během let 2007 – 2009, kde byla AD hlavní příčinou smrti (underlying) nebo k smrti významně přispěla (contributory).¹⁵⁰

Pravděpodobnost postižení AD se exponenciálně zvyšuje s věkem, přičemž se odhaduje, že po 5 letech života se tato pravděpodobnost zhruba zdvojnásobí.¹⁵¹ Z různých studií též vyplývají odhady, že v populaci lidí s věkem nad 65 let se výskyt AD pohybuje v rozmezí 5 – 7 %, v případě lidí starších 70 let již zastoupení nabývá hodnoty 10 %.¹⁵²⁻¹⁵⁵ V roce 2014 činila odhadnutá globální prevalence AD 29.8 milionů lidí.¹⁵⁶ Prognostické analýzy ale ukazují, že trend v expanzi pacientů s AD se bude exponenciálně vyvíjet a v roce 2050 dosáhne její globální prevalence hodnoty 106.23 milionů, pokud se nenajde účinné léčivo na toto onemocnění (Obr. 12).^{152, 157, 158}



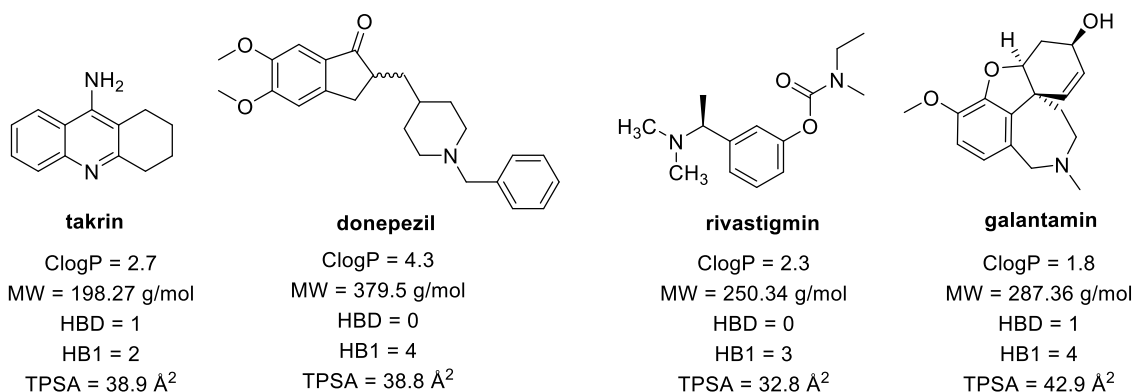
Obr. 12. Predikce globální prevalence AD v horizontu roku 2050.^{152, 157}

Přestože se do výzkumu a vývoje léčiv proti AD každoročně investují značné částky, stále se nedaří vyvinout kauzální léčivo, které by AD vyléčilo či pozastavilo.^{159, 160} Příčinou je bezpochyby fakt, že AD je multifaktorové onemocnění, které má komplikovanou etiopatogenezi. Mezi hlavní patologické projevy AD patří především atrofie mozku a ztráta neuronů a synapsí v neokortexu, temporálním a parietálním laloku (Obr. 13).^{161, 162} Dále je pro AD charakteristická tvorba extracelulárních amyloidových plaků a intracelulárních neurofibrilárních klubek.¹⁶³ Se vznikem AD též úzce souvisí genetické mutace presenilinů, které obsahují γ -sekretasu, mutace genu amyloidového prekurzorového proteinu (APP), zvýšená exprese apolipoproteinu *E4*, nadměrná hromadění excitotoxických aminokyselin v mozku (tj. glutamátu a aspartátu), nekontrolované působení reaktivních dusíkových a kyslíkových metabolitů (tzv. reactive oxygen/nitrogen species, ROS, RNS), nadměrný stres, toxický účinek kovů, zánětlivé procesy, virové infekce, nezdravý životní styl, sociální deprivace, aj.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶



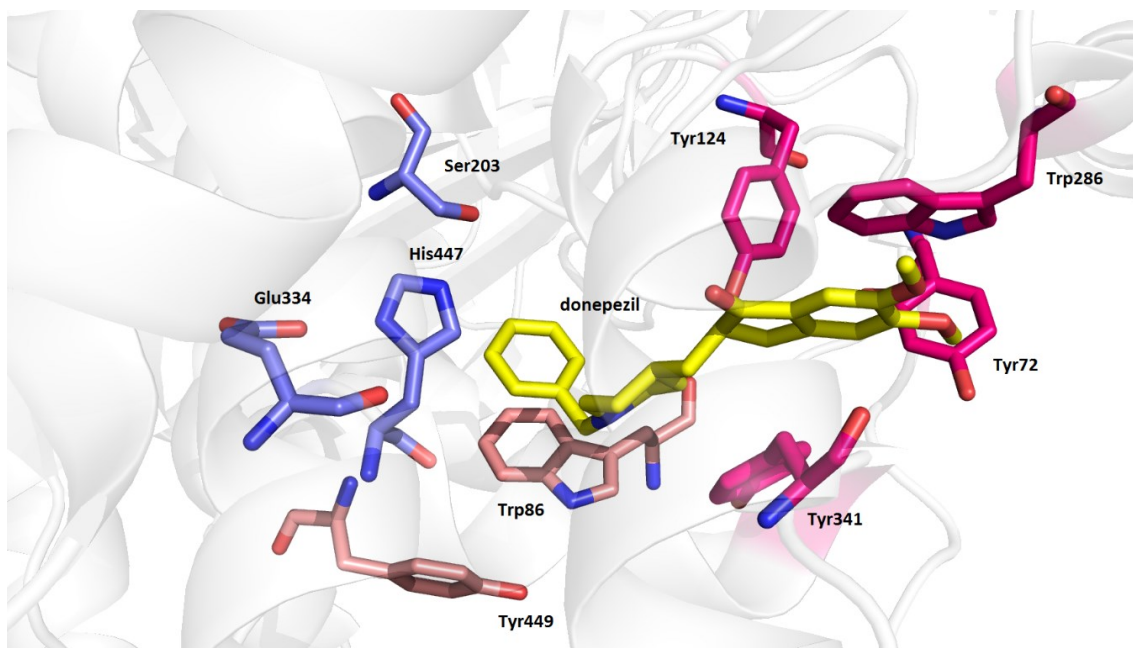
Obr. 13. Srovnání zdravého a atrofovaného mozku, který je postižen AD.¹⁶²

Během posledních několika desetiletí bylo navrženo několik hypotéz, které se pokoušely objasnit etiopatogenezi AD, avšak každá z nich poskytuje jen částečný náhled na komplexní povahu tohoto onemocnění.^{167, 168} Nejstarší, tzv. cholinerní hypotéza předpokládá, že za AD je zodpovědná snížená produkce acetylcholinu, a proto byly do terapie AD uvedeny reverzibilní inhibitory acetylcholinestasy (AChE, EC 3.1.1.7) jakožto sympatomimetická léčiva, která však mnohdy mají inhibiční účinek i na butyrylcholinesterasu (BuChE, EC 3.1.1.8) (Obr. 14).^{169, 170}



Obr. 15. Nejvýznamnější inhibitory AChE, které se uplatnily či uplatňují v terapii AD.¹⁶⁹

Všechny tyto látky působí tak, že se vážou do aktivního místa AChE, lokalizovaného kolem tzv. katalytické triády reziduí Ser203, Glu334 a His447 (tj. v případě lidské AChE), a zabraňují tak přístupu acetylcholinu a jeho hydrolýze.¹⁷¹ Toto tzv. katalytické místo (tzv. catalytic anionic site, CAS) je umístěné přibližně u dna podlouhlé, 20 Å hluboké kavity AChE. Velký význam pro vývoj inhibitorů AChE má dále oxyanionická prohlubeň (Gly121, Gly122, Ala204), anionické místo (Trp86, Tyr133, Glu202, Gly448, Ile451), acyl vázající kapsa (Trp236, Phe295, Phe297) a tzv. periferní anionické místo (peripheral anionic site, PAS), které bylo objeveno pomocí molekulárního dockingu.¹⁷² [P16] PAS má velmi důležitou roli zejména pro uskutečnění ne vazebné interakce s aromatickými funkčními skupinami či kationty prostřednictvím π - π a kationt- π interakcí s rezidui Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286 a Tyr341, které se mohou uplatnit jak v případě vazby reverzibilních inhibitorů AChE, tak i v mechanismu účinku tzv. reaktivátorů AChE reverzibilně inhibované organofosfáty (např. látka VX, sarin, tabun, atd.).¹⁷³⁻¹⁷⁵ [P17] Vedle těchto významných vazebných míst ve struktuře AChE se ještě v odborné literatuře uvádí tzv. boční a zadní dveře (side door, SD, back door, BD), které byly objeveny *in silico* simulacemi.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ SD je lokalizováno mezi Asn74 a Asp87, BD vytváří pár reziduí Trp86 a Tyr449. Tyto dynamicky aktivní póry otvírají díky flexibilní konformaci proteinu cestu molekulám vody a malým ligandům do aktivního místa AChE (Obr. 16).^{180,181} [P18,P19] Soudobé odborné práce dále ukazují, že i mnohá další rezidua v AChE (např. Asp72, Tyr337, Phe338, aj.) mají důležitý význam pro modulaci tohoto enzymu, a to především v případě nově vyvinutých inhibitorů. [P20,P21,P22,P23,P24,P25]



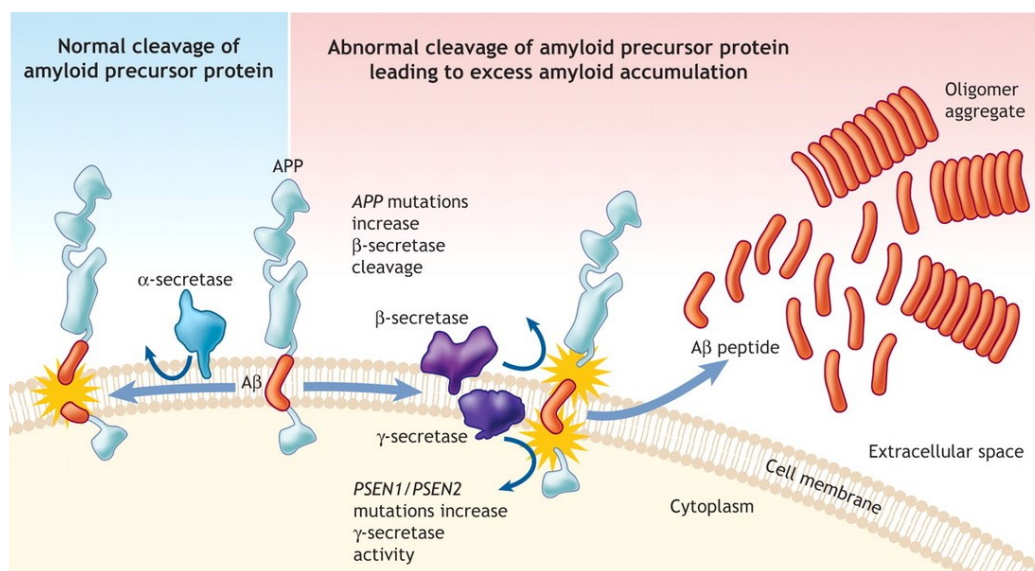
Obr. 17. Ukázka experimentálně určeného vazebného módu donepezilu (žlutá) v aktivním místě rekombinantní lidské AChE (pdb id: 4EY7). Rezidua náležející k CAS jsou obarvena modře, rezidua PAS jsou fialová a rezidua patřící do tzv. zadních dveří AChE jsou obarvena růžově.

Skupina reverzibilních inhibitorů AChE patří mezi velmi časté kandidáty na léčiva AD, ačkoliv je evidentní, že samotná inhibice AChE nemůže průběh AD zastavit ani nemoc vyléčit. Proto se v aktuálním designu inhibitorů AChE v kontextu vývoje léčiv proti AD uplatňují přístupy, které se pokouší do molekuly vnést fragmenty se schopností působit ještě jiným mechanismem účinku (např. inhibici agregace amyloidu β). Tyto hybridní molekuly bývají často označovány jako ligandy zaměřené na interakci s více biologickými cíli (tzv. multi-target directed ligands, MTDL). Tyto MTDL mohou vycházet např. ze základní struktury takrinu či jeho derivátů, jako je 7-methoxytakrin nebo 6-chlortakrin. Jako základních struktur inhibitorů AChE/BuChE lze využít i různé přírodní látky. [P26,P27,P28,P29,P30,P31,P32,P33]

V souvislosti s vývojem inhibitorů AChE je nutné poznamenat, že mnohdy vycházejí např. z výše uvedeného takrinu, který sice byl stažen z klinické praxe roku 2013 v USA kvůli toxicitě, ale stále může posloužit jako předlohová struktura pro racionální design výhodnějších kandidátů na léčiva AD.¹⁸² Výhodnější metabolickou stabilitu než takrin vykazuje např. 6-chlortakrin či 7-methoxytakrin, které nejsou tak náchylné k oxidaci a produkci toxických metabolitů.¹⁸³ Vedle žádoucích inhibičních účinků na AChE mají totiž deriváty takrinu často dobrou pasivní prostupnost skrze hematoencefalickou bariéru (blood-brain barrier, BBB) a poměrně uspokojivou rozpustnost ve vodě.¹⁸⁴ Díky těmto

vlastnostem mohou být použity k inhibici AChE, která je přítomná v centrálním nervovém systému (CNS).[\[P34,P35\]](#)

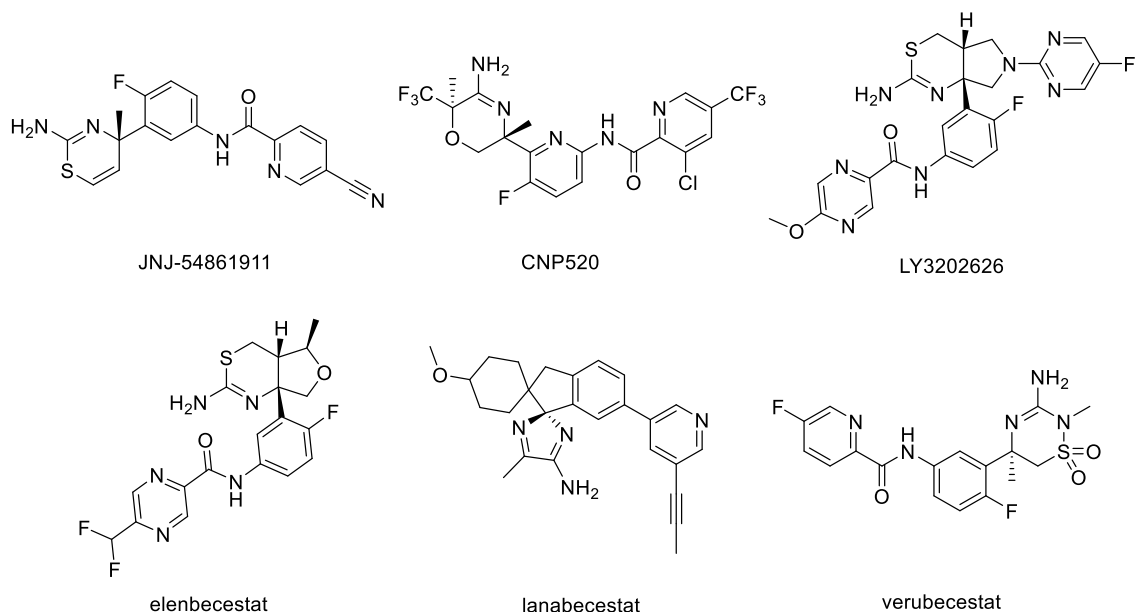
Dalšími hypotézami, které se pokouší vysvětlit vznik AD, jsou amyloidová a tau hypotéza.¹⁸⁵ Amyloidová hypotéza předpokládá, že zvýšená koncentrace amyloidu β ($A\beta$) v extracelulárního prostoru v mozku je kauzálně svázaná s patogenezí AD, ačkoli se přesně neví, zda není narušená rovnováha $A\beta$ spíše důsledkem AD.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ $A\beta$ vzniká štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (amyloid precursor protein, APP) tzv. amyloidovou cestou pomocí β - a následně γ -sekretasy na neurotoxické fragmenty o délce 40 až 42 aminokyselin (tj. $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$).¹⁸⁹ Hlavní patologickou roli při vzniku $A\beta$ hraje především β -sekretasa (neboli BACE-1), protože součinnost enzymů α - a γ -sekretasy při štěpení APP je nepatologická a produkuje fragmenty sAPP- α , C83, a následně krátký fragment p3 (Obr. 18).¹⁹⁰



Obr. 18. Štěpení APP patologickou a nepatologickou cestou.¹⁹⁰

Je otázkou, zda může být BACE-1 považována za hlavní příčinu produkce $A\beta$, jeho aglomerace na amyloidový plak, a posléze za příčinu AD.¹⁹¹ Experimenty na myších s knock-outovými geny pro BACE-1 ukazují, že absence BACE-1 v mozku zjevně neovlivňuje životaschopnost myší, ani jejich reprodukční schopnosti či kompozici hlavních tkání a orgánů. Podrobnějším studiem těchto myší se ale později zjistilo, že mají deformované axony s porušenou myelinizací, mají sníženou pamětní kapacitu a vykazují patologické chování s charakterem schizofrenie.¹⁹² Tyto patologické jevy spojené s absencí BACE-1 ovšem neznamenají, že parciální inhibice tohoto enzymu pomocí malých molekul léčiv by nemohla pacientův s AD přinést úlevu a pozitivně ovlivnit negativní prognózu tohoto onemocnění. V současné době je dokonce několik inhibitorů BACE-1 v různých klinických

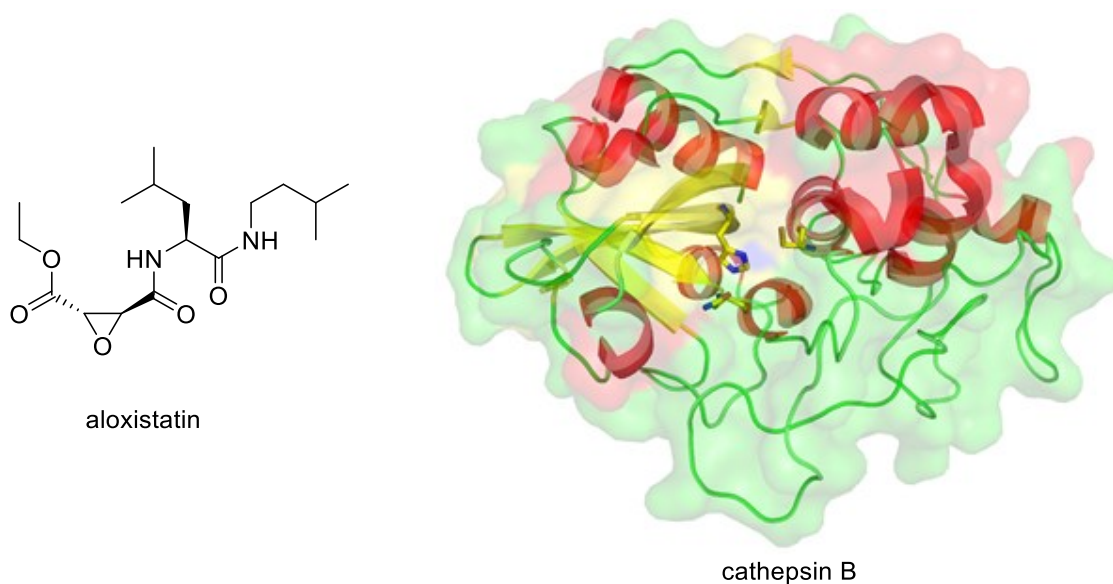
fázích testování (např. JNJ-54861911, CNP520, LY3202626, elenbecestat, lanabecestat a verubecestat) (Obr. 19).¹⁹³⁻¹⁹⁵



Obr. 19. *Inhibitory BACE-1, které jsou v současné době v klinické fázi testování.*¹⁹⁵

V souvislosti s hledáním léčiv, které by omezily tvorbu toxických forem A β , se hledají též inhibitory γ -sekretasy, přičemž se do různých fází klinického testování dostalo několik malých molekul (např. BMS299897, LY450139, ELND006, D0U6FT).¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

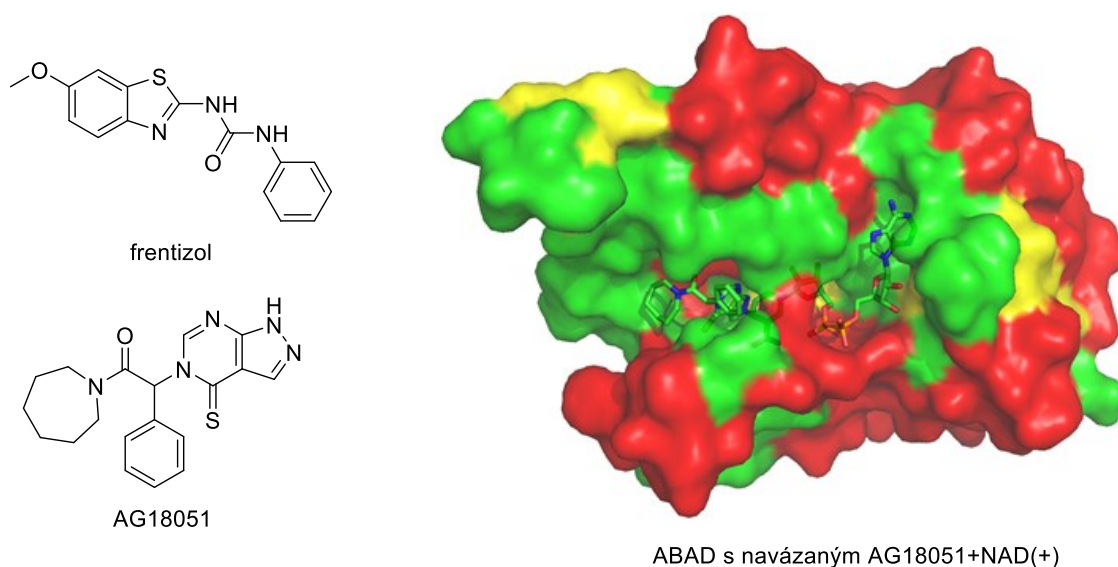
Významnou roli v mechanismu tvorby A β má též lysosomální cysteinová proteasa cathepsin B (CB), přičemž se zdá, že může jeho koncentraci zvyšovat.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Některé studie ale na druhou stranu prokazují, že CB může proteolytickou aktivitu vykazovat i vůči A β_{1-42} , který je nejvíce náchylný k agregaci, a odbourávat jej.²⁰² CB je rovněž zahrnutá v procesu tvorby metastází tumorů jako klíčový enzym pro degradaci extracelulární matrix, a tudíž její inhibice z ní dělá důležitý biologický cíl ve výzkumu léčby rakoviny.²⁰³ Velmi slibným kandidátem pro léčbu AD, který náleží mezi ireversibilní inhibitory CB, je např. látka aloxistatin (E64d).²⁰⁴ Aloxistatin se dostal do 3. fáze klinického testování, avšak neprokázal statisticky významný efekt v terapii Duchennovy svalové dystrofie, a proto byl stažen z praxe.²⁰⁵ Toto však nemůže být bráno jako překážka po výzkum léčby AD, a tudíž aloxistatin zůstává alespoň jako předlohová struktura vysoce zajímavým (Obr. 20).



Obr. 20. *Struktura aloxistatinu a lidského CB (pdb id: 6AY2). Tyčinkovým modelem je zvýrazněna struktura katalytická triáda CB (Cys29, His199, Asn219).*

Amyloidová hypotéza vzniku AD byla ve své původní variantě založena na představě, že rozpustné formy $A\beta$ se extracelulárního prostoru aglomerují na ve vodě nerozpustný plak, který způsobuje odumírání neuronů. Poslední výzkumy však odhalily, že rozpustné formy $A\beta$ se mohou dostat též do nitra neuronů a vyvolávat zde apoptózu (tzv. intraneuronální amyloid beta, $iA\beta$).²⁰⁶⁻²⁰⁸ Současný výzkum ukazuje, že $iA\beta$, a to především $iA\beta_{1-42}$, se akumuluje v neuronech dříve, než dojde k tvorbě amyloidového extracelulárního plaku. Rozpustné formy $iA\beta_{1-42}$ narušují anterográdní a retrográdní axonální transport, který je důležitý pro přenos neurotransmitérů, neurotrofinů a endosomů mezi somatem neuronů a synapsí.²⁰⁹ Mechanismus narušení transportních mechanismů není zatím objasněn, ale předpokládá se, že $iA\beta_{1-42}$ interaguje s mitogenem aktivovanou proteinkinasou (MAPK) a dalšími enzymy morfogenní signalizace, což může vést ke spuštění apoptózy. Dále byla též prokázána přítomnost $iA\beta_{1-42}$ v mitochondriích neuronů, kde narušuje pochody dýchacího řetězce depolarizací mitochondriální membrány, podporuje uvolnění cytochromu *C* zvýšením exprese mitochondriálního permeabilního tranzitního kanálu (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) a urychluje tvorbu volných radikálů.²¹⁰⁻²¹⁴ Mezi mitochondriálními enzymy, které jsou ovlivněny $iA\beta$ náleží např. amyloid vázající alkoholdehydrogenasa (ABAD), cyklofilin D (CypD), glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), Htr proteasa A2 (HtrA2). S souvislostí se spuštěním mechanismů vedoucích k destrukci neuronů se v odborné literatuře velmi poukazuje na interakci ABAD- $iA\beta$, která může vést ke změně funkce ABADu na katalyzátor produkce toxických aldehydů (např. hydroxynonenal, malondialdehyd) vedoucích k mitochondriální dysfunkci.²¹⁵⁻²¹⁷ Z tohoto důvodu se v dnešním vývoji a výzkumu léčiv vůči AD hledají také látky, které zabraňují

interakci ABAD s $iA\beta$, popř. inhibitory ABAD, které selektivně působí na jeho funkčně modifikovanou formu.²¹⁸⁻²²⁰ [P36,P37,P38] Mezi slibné látky, které inhibují interakci ABAD s $iA\beta$, náleží např. deriváty frentizolu či analoga purinu (Obr. 21).^{221, 222}

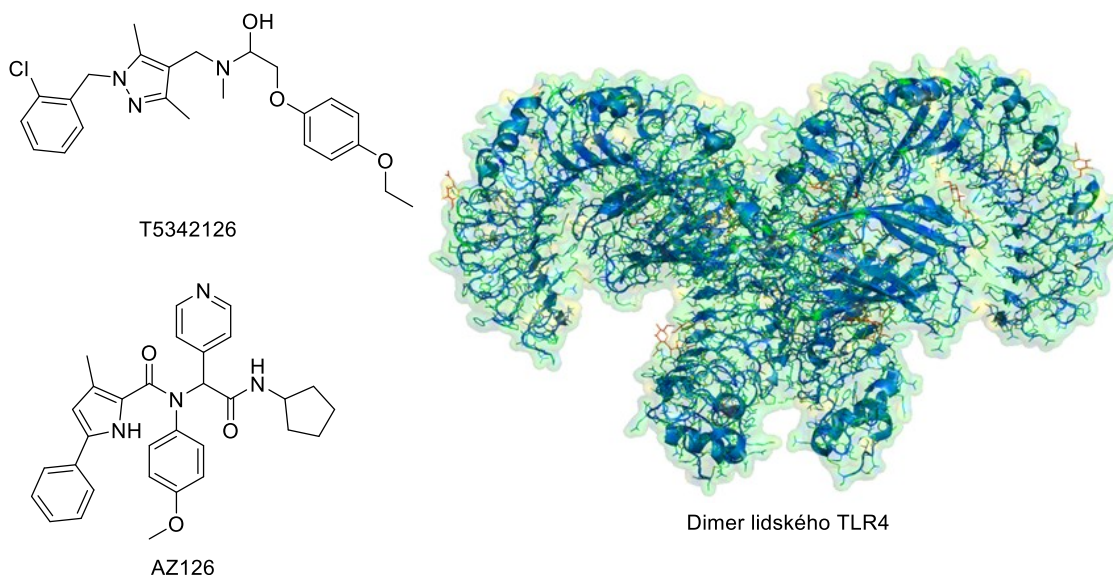


Obr. 21. Inhibitory interakce ABAD s $iA\beta$ a model lidské ABAD s inhibitorem AG18051 (pdb id: 1U7T), který se kovalentně váže na nikotinamidadenindinukleotid (NAD(+)).

K důležitým vlastnostem amyloidového plaku, které je vhodné v souvislosti s vývojem léčiv proti AD vyzdvihnout, je aktivace mikroglíí působením $A\beta$ a produkce ROS a RNS s neurotoxickým účinkem.^{223, 224} Mikroglíální aktivace je dále spojena s produkcí proteolytických enzymů, glutamátu a cytokininů, které významně přispívají k chronické neurodegeneraci během vývoje AD.^{225, 226} Mikroglíální buňky jakožto mononukleární fagocyty jsou důležitou částí imunitního systému. Mohou interagovat s molekulárními patogenními vzory (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) prostřednictvím toll-like receptorů (TLR) či receptoru lipopolysacharidu CD14 a spustit aktivaci transkripčních faktorů, jako je nukleární faktor kappa B (NF- κ B), interferonový regulační faktor 3 (IRF3), IRF5, IRF7, následně produkci zánětlivých cytokininů interferon- α/β .²²⁷

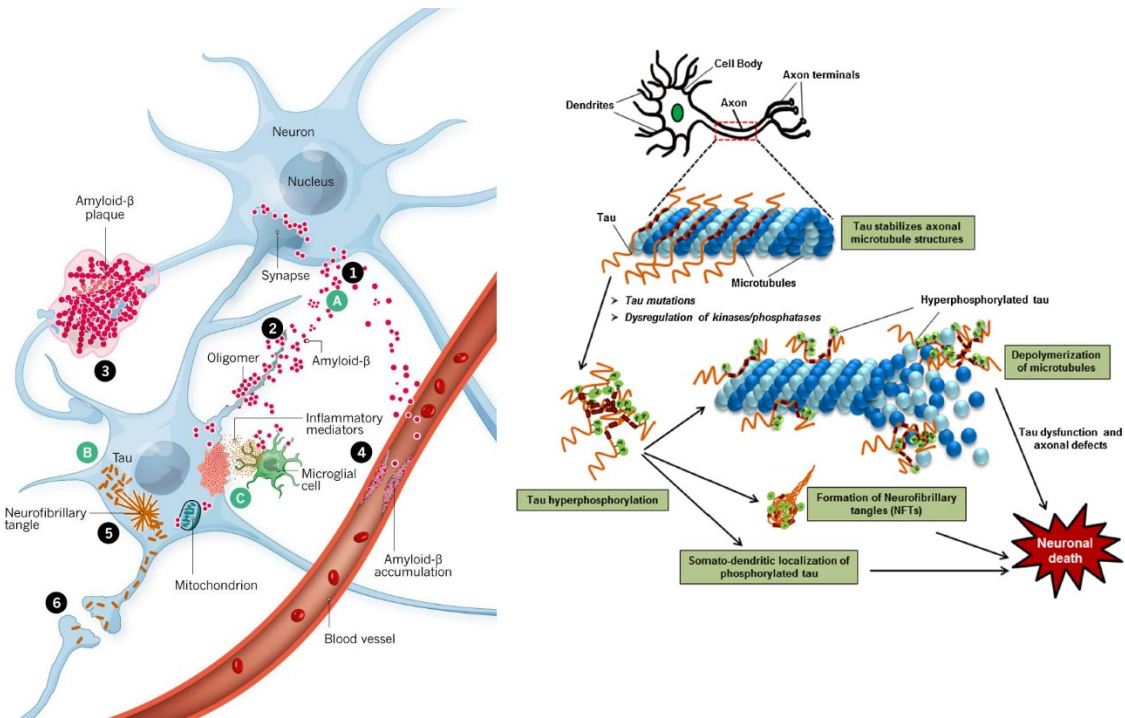
Výzkum prokázal, že aktivace TLR4, který je z rodiny TLR v mikroglíích nejvíce exprimován, může vyvolat oligodendrocytické poškození v gliových kulturách.²²⁸ TLR4 vytváří komplex s myeloidním diferenačním proteinem 2 (MD2) a je aktivován exogenními látkami (např. lipopolysacharid (LPS) gram-negativních bakterií) či endogenními ligandy (např. lipidy, proteiny, nukleové kyseliny).^{229, 230} Bylo též prokázáno, že LPS může prostřednictvím aktivace TLR4 vyvolat buněčnou smrt či poškození neuronů.²³¹ TLR4 je tedy významně propojen vývojem léčiv proti AD, jelikož náleží mezi důležité regulátory progresu neurozánětu. Otázkou zůstává, zda je výhodné TLR4 inhibovat,

či jeho aktivitu modulovat, protože některé studie ukazují, že aktivace TLR4 může vyvolat jak zánět, tak spustit žádoucí fagocytózu a tzv. clearance A β .²³² Studium vztahu mezi TLR4 a AD je tudíž ve velké pozornosti, protože TLR4 odpovídá nejen na přítomnost A β , ale též na tau protein.²³³ V současné době existuje celá řada prací, která se zabývá vývojem nových agonistů i antagonistů TLR4 (Obr. 22).²³⁴⁻²⁴⁰ [P39,P40,P41]



Obr. 22. Syntetický agonista (AZ126) a syntetický antagonist (T5342126) TLR4 (pdb id: 4G8A).

Pravděpodobně nejvýznamnější hypotéza, která vysvětluje etiopatogenezi AD, je spojena s hyperfosforylací tau proteinu (τ).²⁴¹ Ukazuje se, že amyloidová hypotéza je velmi komplexní a terapie zaměřená pouze na potlačení produkce a agregace A β není účinnou cestou k léčbě AD, ačkoliv na zvířecích modelech často dávala důvod věřit, že u člověka AD potlačí.²⁴² τ patří mezi důležité, ve vodě dobře rozpustné proteiny, které mají klíčovou roli při stabilizaci jednotek tubulinů v mikrotubulech.²⁴³ Tyto vlákna umožňují vazbu molekulárních proteinových motorů dynein a kinesin, pomocí nichž může docházet k intracelulárnímu transportu různých typů váčků.²⁴⁴ Mikrotubuly též mají velký význam pro udržení geometrické stability neuronů, pro buněčné dělení a oddělení replikovaných chromozomů. Během rozvoje AD dochází k post-translačním úpravám τ , a to především k hyperfosforylaci, která má za následek nedostatečně silnou vazbu τ k mikrotubulům, což vede k jejich destabilizaci a hroucení cytoskeletu se všemi jeho důležitými funkcemi. Hyperfosforylované formy τ (τ_H) mají též sklon k agregaci a vytvářejí za určitých podmínek intracelulární helikální filamenta, z kterých se později stávají charakteristická neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangles, NTFs) (Obr. 23).²⁴⁵

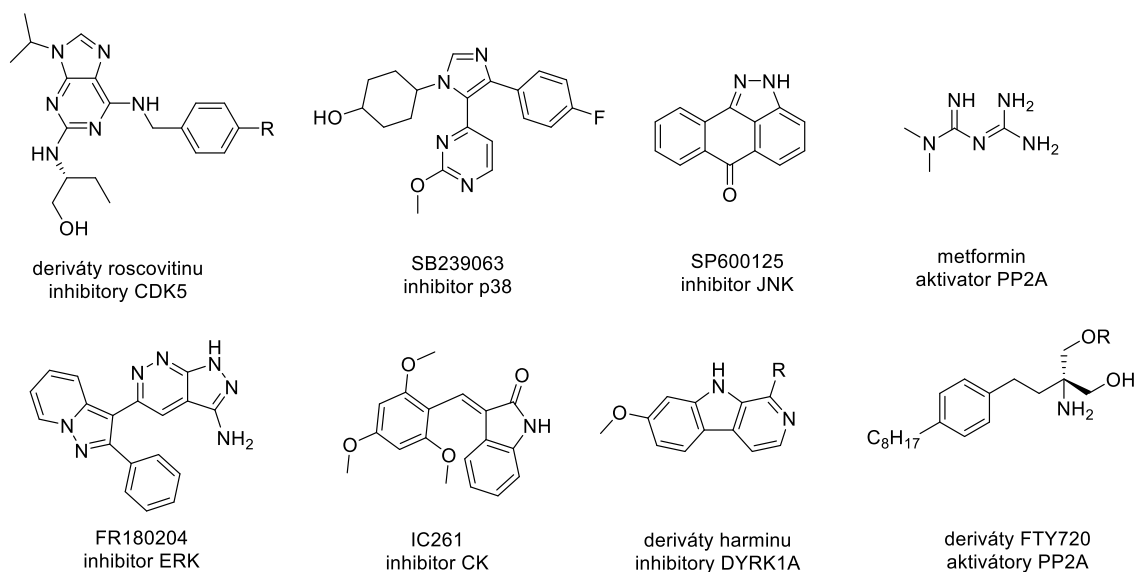


Obr. 23. Schéma znázorňující tvorbu amyloidového plaku, neurofibrilárních klubek a funkci τ . 1 – $A\beta$; 2 – oligomerní $A\beta$; 3 – agregáty $A\beta$; 4 – aktivace mikroglíí $A\beta$; agregáty zdeformovaného τ ; 6 – transfer τ axonen. A – symbol eliminace $A\beta$; B – imunoterapie; C – terapie zánětu.^{162, 246}

τ , kterých je celkem 6, a mnohdy se mezi nimi v kontextu AD nerozlišuje, náleží do skupiny proteinů asociovaných s mikrotubuly (mikrotubule-associated protein tau, MAPT). Za hlavní příčinu patologicky změny funkce τ se považuje především jeho hyperfosforylace, zkrácení jeho řetězce a porušení jeho konformačních vlastností. K hlavním kinasám, které fosforylují τ náleží cyklin-dependentní kinasa 5 (CDK5) a mitogenem aktivovaná proteinkinasa (MAP).²⁴¹ Dále se na fosforylaci τ podílí adenosinmonofosfát-dependentní proteinkinasa (PKA), mikrotubulární regulační kinasa (MARK), kaseinkinasa I a II, kalmodulin-dependentní proteinkinasa II (CaMKII) a glykogensynthasa-kinasa 3 β (GSK3 β).^{247, 248} Tyto kinasy se vzájemně odlišují především schopností, jaké hydroxylové skupiny v τ mohou fosforylovat (tzv. prolinem řízené nebo neřízené seriny a threoniny).²⁴⁹ V normální stavu je určitý stupeň fosforylace τ přirozený, a tento stupeň je regulován proteinkinasami a proteinfosfatasami (např. proteinfosfata 2A, PP2A).²⁵⁰ Za klíčový zlom, který vede k hyperfosforylaci τ , se považuje porušení rovnováhy mezi příslušnými kinasami a fosfatasami, avšak bližší podmínky tohoto narušení jsou stále předmětem odborných diskuzí.

V současné době se v rámci vývoje léčiv, které se zaměřují na obnovení funkce τ , volí různé strategie, přičemž přední místo mezi nimi zaujímá racionální design inhibitorů

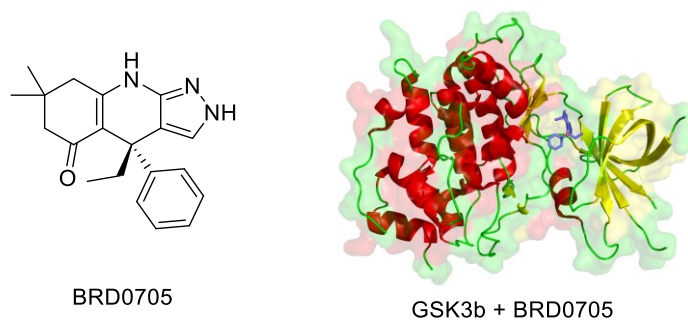
proteinkinas a aktivátoru proteinfosfatas zahrnutých v post-translačních úpravách τ (Obr. 24).^{251, 252}



Obr. 24. Vybrané inhibitory proteinkinas a aktivátory PP2A, které jsou zahrnuty v regulačním systému fosforylace τ .^{251, 253}

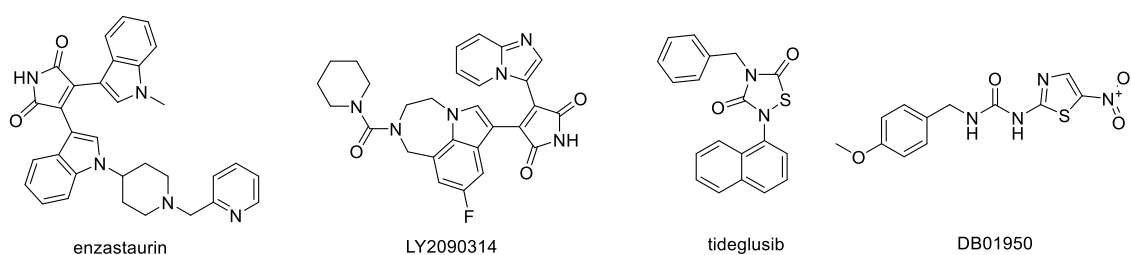
K velmi významným biologickým cílům, na které se zaměřuje vývoj a výzkum inhibice hyperfosforylace τ , náleží GSK3 β .^{254, 255} Disregulace GSK3 β je spojena s řadou nemocí, jako je rakovina, cukrovka, AD, bipolární porucha a schizofrenie. Je to kinasa, která je pravděpodobně zahrnuta v procesu regulace aktivity komplexu α -disintegrinu a metaloproteinasy (ADAM) s α -sekretasou, a může způsobit jeho inhibici v neamyloidovém štěpení APP.²⁵⁶ Taktéž je GSK3 β pravděpodobně zapojena do komplexu s γ -sekretasou, kde podporuje její proteolytickou aktivitu při štěpení APP.²⁵⁷ Vedle zapojení do produkce A β má GSK3 β schopnost také fosforylovat nejméně 36 hydroxylů v τ , a tím podstatně vyvolávat jeho hyperfosforylaci.²⁵⁸ Experimenty prokazují, že optimalizace aktivity GSK3 β redukuje hyperfosforylaci τ a snižuje frekvenci smrti neuronů u myší.²⁵⁹ Na druhou stranu je GSK3 β zahrnuta ve velkém počtu důležitých buněčných procesů a její deaktivace by měla škodlivé důsledky (např. aktivace nefosforylovaného β -catenin, která spouští onkogenezi).²⁶⁰⁻²⁶²

Výzkum GSK3 β vedl k produkci mnoha slibných inhibitorů, které inhibují tento enzym jak orthostericky, tak alostericky.²⁶¹ Některé látky též vedou k takové inhibici GSK3 β , která nenarušuje dráhu β -catenin (např. BRD0705, Obr. 25).^{263, 264}



Obr. 25. *Struktura inhibitoru BRD0705 a jeho vazebný mód (modrý) v GSK3β (pdb id: 5PKL).*

Výběr nejvýznamnějších inhibitorů GSK3β, z nichž enzastaurin, LY2090314 a tideglusib vstoupily do klinické fáze testování, je uveden na Obr. 26.²⁶⁵



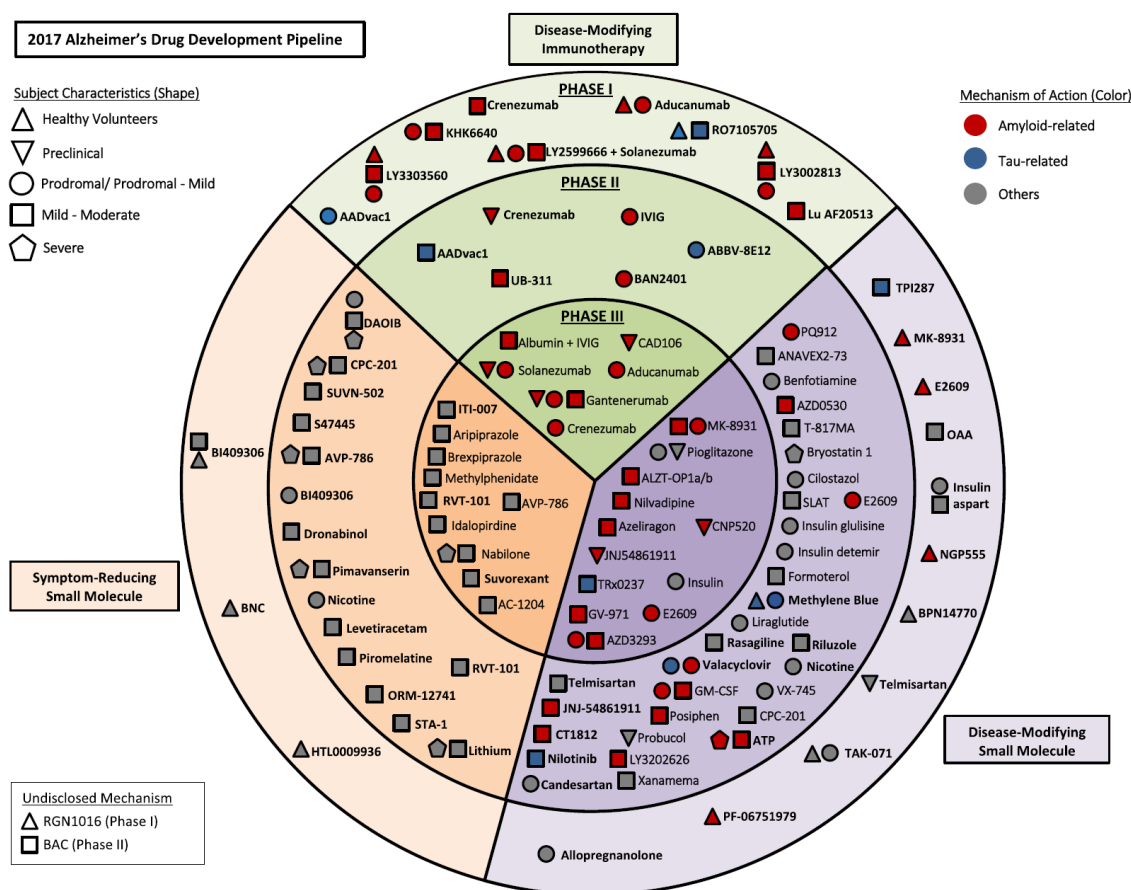
Obr. 26. *Výběr nejvýznamnějších inhibitorů GSK3β.*

Třebaže je vývoj nových léčiv vůči AD velmi intenzivní, uplatnění CADD přístupů v této oblasti není příliš časté. Nezřídka se volí cesty tzv. intuitivního designu, kdy se určí některé známé léčivo (např. takrin), a to se modifikuje na hybridní molekulu schopnou např. působit inhibicí AChE, zároveň blokovat agregaci Aβ a působit jako scavenger ROS/RNS. Kombinovat či zdvojit se tedy mohou struktury s různým mechanismem účinku (např. inhibitory AChE a inhibitor *N*-methyl-*D*-aspartátového receptoru (NMDA) – memantin). Tyto MTDL budou mít pravděpodobně zachovaný kombinovaný farmakodynamický profil, ale též odlišné farmakokinetické vlastnosti.^{266, 267}

Protože dosud není nalezeno žádné kauzální léčivo pro AD a v klinické praxi se aplikují pouze symptomatická léčiva ze skupiny inhibitorů AChE a memantin, je stále důležité pokoušet se nelézt nové léčivo na AD. Toto úsilí je společné velkému množství pracovních skupin po celém světě, které mají často k dispozici nejmodernější techniku, aby se zamýšleného úkolu vyvinout léčivo pro AD zhostili se ctí. Ale přes tuto velkou kapacitu pro slibný vývoj a výzkum léčiv, navržené struktury velmi často selhávají v klinických testech díky neselektivnímu účinku, popř. toxicitě.

4.2. Aktuální vývoj léčiv Alzheimerovy nemoci a využití CADD metod

Současná terapie AD je založena na aplikaci reversibilních inhibitorů AChE a antagonistů NMDA receptoru memantinu. V různých fázích klinického testování se však nacházejí potenciální léčiva, která se zaměřují na modulaci cholinergního systému, $\alpha 7$ acetylcholinového receptoru nikotinového typu, NMDA receptoru, β -sekretasy, γ -sekretasy, inhibitory hyperfosforylace a agregace τ a regulátory zánětlivých procesů.²⁶⁸ Podle výzkumu, který provedli roku 2017 Cummings et al. se v klinické fázi testování nachází 105 potenciálních léčiv AD, přičemž 25 látek je první fázi, 52 látek v druhé fázi a 42 látek v třetí fázi klinického testování.²⁶⁹ 27 % z těchto látek náleží mezi symptomatické posilovače kognitivních funkcí nebo jsou to látky, které potlačují psychiatrické a sociálně patologické projevy spojené s progresí AD. 70 % látek má naproti tomu charakter modulatorů nemoci (tzv. disease-modifying agents). Rozložení těchto 105 látek podle mechanismu účinku a fáze klinického testování (pro rok 2017) je uvedeno na Obr. 27.²⁶⁹



Obr. 27. Mechanismus účinku a klinické fáze testování potenciálních léčiv AD.²⁶⁹

Do výzkumu a vývoje léčiv AD se též zapojují metody CADD, které buď hledají nové základní struktury schopné modulovat aktivitu některého z biologických cílů figurujících

v patogenezi AD nebo jen ověřují a interpretují *a posteriori* výsledky, kterých bylo dosaženo pomocí organické syntézy a *in vitro* analýz. Patel et al. provedli LB farmakoforovou analýzu 23 známých inhibitorů katechol-*O*-methyltransferasy (COMT), které mohou zvýšit koncentraci dopaminu v mozku, a symptomaticky tak zmírnit některé projevy AD. Farmakoforovou hypotézu ověřili na množině 1 500 tzv. falešných hitů (databáze DUD-E, <http://dude.docking.org/>) a pak ji využili pro LBVS množiny všech komerčně dostupných látek z databáze ZINC (zinc15.docking.org).²⁷⁰ Nejlepší struktury identifikované pomocí LBVS byli dále přefiltrovány Lipinského pravidlem pěti a ADME-Tox filtrem na on-line serveru FAF-Drug3. 36 nejlepších látek bylo následně molekulárně dokováno v modelu COMT (pdb id: 3A7E) a získané vazebné mody byly podrobeny molekulárně dynamické studii o délce 1 ns v programu Yasara. Výsledky této studie, které identifikovali opicapon a quercetin jako optimální inhibitory COMT, však nebyly ověřeny experimentálně.

CADD metody byly využity např. pro hledání nových inhibitorů AChE, BuChE, glutaminylyklyasy, GSK3 β , monoaminoxidasy, metalothieninu 3, kaseinkinasy 1, BACE-1, τ _H agregace, A β agregace, biomarkerů acetylcholintransferasy, inhibitory fosfolipasy A2, 5-lipoxygenasy, cyklooxygenasy 2, aj.²⁷¹⁻²⁸¹ Některé studie zahrnují jen virtuální screening na základě LB farmakoforové analýzy, jiné studie využívají pokročilejší metody, jako je flexibilní molekulární docking nebo i molekulární dynamiku s rozsahem simulace několik ns. Jen velmi výjimečně se setkáváme s hybridizovanými MM/QM výpočty anebo výpočty, které pro zpřesnění získaných výsledků využívají náročnější výpočetní protokol a pokročilé výpočetní technologie, jako jsou superpočítače.^{282, 283} Některé CADD studie na druhou stranu nezahrnují hodnocení ADMET a nejsou ověřené experimentálně. Proto je třeba CADD studie vždy posuzovat s dostatečnou, avšak spravedlivou mírou skepse.

Známkami komplexních CADD studií, které mohou poskytovat spolehlivé informace nejen v oblasti výzkumu a vývoje léčiv AD, je přítomnost několika základních metodologických kroků. Přestože kritické body při provádění CADD studií již byly zmíněny v předchozích kapitolách (např. 2.2.), uvedeme jednoduchý souhrn hlavních kontrolních metodiky i zde:

- 1) ligandová databáze obsahuje realistické molekulární geometrie ligandů, jejichž protonace odpovídá podmínkám laboratorního experimentu,
- 2) struktura modelu biologického cíle je ověřená pomocí vhodných nástrojů (např. kontrola sterických překryvů atomů, abnormálních konformačních úhlů, chybění částí řetězců, aj.),

- 3) molekulární docking dokáže reprodukovat výsledky stanovené rentgenostrukturální analýzou,
- 4) farmakoforové hypotézy dokážou klasifikovat s uspokojivou úspěšností účinné a neúčinné látky,
- 5) molekulárně dynamická simulace má trvání nejméně v řádu desítek ns a systém je řádně parametrizován jednotným silovým polem,
- 6) nejlepší kandidátní struktury by měly být přefiltrovány přes ADMET a PAINS filtry,
- 7) získaná *in silico* data je nutné konfrontovat s experimentálními daty.

Pro predikci MTDL určených k léčbě AD jsou také vyvíjeny QSAR modely (tzv. multi target QSAR, mt-QSAR), které dokážou z chemické struktury charakterizované fingerprinty predikovat aktivitu vůči několika biologickým cílům (např. AChE, histaminový receptor, aj.).^{59, 284} Fang et al. vytvořili kupříkladu mt-QSAR model, který predikuje aktivitu vůči 25 klíčovým biologickým cílům spojených s AD. Tento mt-QSAR model využívá Bayesovské a rekurzivní dělení pro látky charakterizované binárním vektorem se 100 složkami.²⁸⁵ K odvození modelu bylo po odfiltrování nevhodných struktur použito 18 741 potenciálních léčiv, které vstoupily alespoň do první fáze klinického testování vůči AD. mt-QSAR model byl validován pomocí kros-validace a ověřen na databázi falešných základních struktur DUD-E. Vytvořený mt-QSAR model byl nakonec ověřen experimentálně, kde se potvrdila predikovaná aktivita vůči BuChE a CDK-5 u látek, jejichž účinek vůči těmto biologickým cílům nebyl znám. mt-QSAR model byl také schopen detekovat charakter MTDL pro několik látek v klinické fázi testování vůči AD, o němž se nevědělo. Tato metodologie představuje tedy velmi zajímavý nástroj pro hledání nových kandidátů na léčiva AD díky hodnocení aktivity vůči více biologickým cílům. Velmi slibná se proto zdá být např. studie, když by se tento mt-QSAR model využil pro tzv. přecílení (repurposing) známých léčiv.

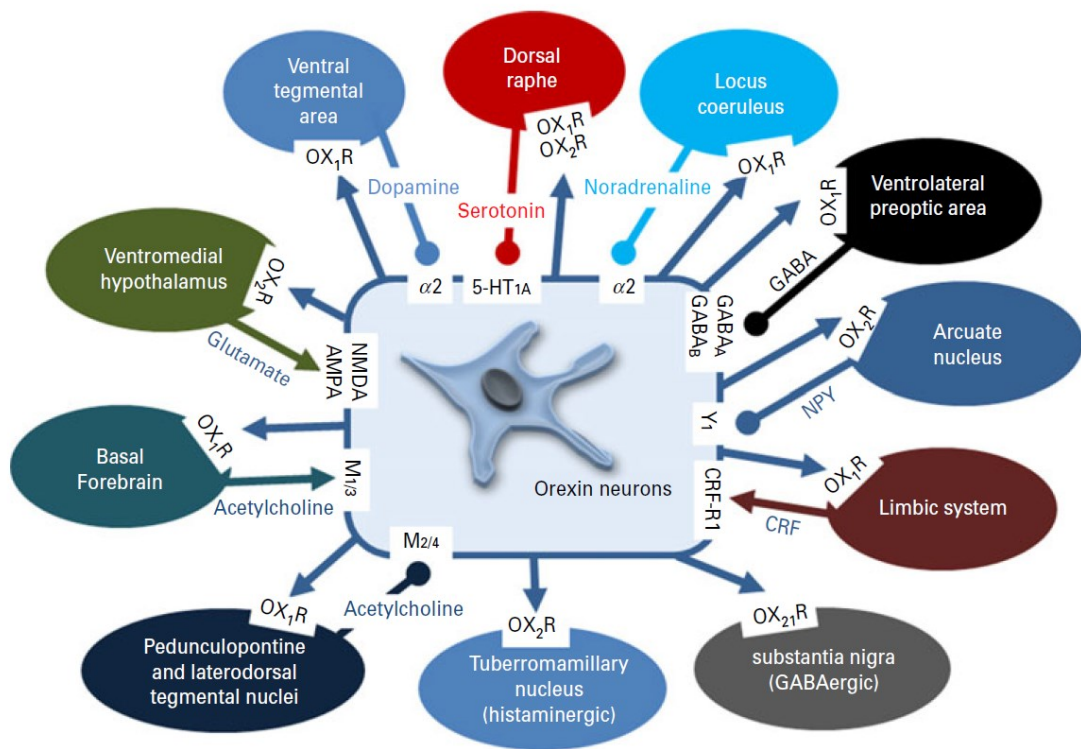
4.3. Narkolepsie a její farmakoterapie

Narkolepsie náleží mezi chronické, sporadické, dosud ne zcela pochopené, spánkové poruchy, která postihuje přibližně 0.02 % – 0.18 % obyvatel USA a východní Evropy.²⁸⁶ Toto onemocnění bychom mohli charakterizovat pětici následujících patologických projevů: nadměrná denní spavost (excessive day sleepiness, EDS), kataplexie (tj. náhlá a přechodná svalová slabost při plném vědomí), hypnagogické či hypnopompické halucinace, spánková paralýza (tj. krátká neschopnost mluvit a hýbat se při usínání nebo probouzení) a nesouvislý noční spánek s abnormálním profilem fáze rychlého pohybu očí (rapid eye movement, REM).²⁸⁷ Narkolepsie je rovněž spojena s kognitivní dysfunkcí, která se v angličtině označuje termínem brain fog neboli „zatemnělá mysl“.²⁸⁸ Brain fog se projevuje obtížemi, jako je hledání ztracených klíčů, které nakonec najdeme ve vlastní kapse, náhlá neschopnost správně vyslovit krkolonné slovo nebo hledání auta na parkovišti s dálkovým ovládačem v ruce, pomocí něhož auto opět dokážeme lokalizovat.²⁸⁹ Narkolepsii dále provází obtíže se soustředěním a rozmazané vidění. Ať tímto onemocněním trpí dospělí či děti, je to velmi často spojené s depresemi a úzkostí, s hyperaktivitou, agresivitou, a někdy i s přibýváním na váze.[P42]

Z pohledu patofyziologie je pro rozvinutou narkolepsii typická ztráta až 95 % orexinových neuronů v laterálním hypotalamu, které produkují orexinový peptid A a B (OXA, OXB) (též zvané hypocretin 1 a 2).²⁹⁰ Sníženou koncentrací OXA se projevuje narkolepsie I, která zahrnuje všechny výše uvedené symptomy.²⁹¹ Naproti tomu se u některých pacientů vyskytuje rovněž narkolepsie II, která není spojena s kataplexií a nepůsobí v cerebrospinální tekutině (cerebrospinal fluid, CSF) pokles koncentrace OXA a OXB.²⁹² Příčina narkolepsie a důvod proč, se objevují dva její typy, není dosud plně známa. Studie však ukazují, že s propuknutím narkolepsie významně koreluje mutace genu pro komplex lidského leukocytového antigenu (human leukocyte antigen, HLA), která může vést k autoimunitní reakci na orexinové neurony a jejich orexinové receptory (OXR).²⁹³

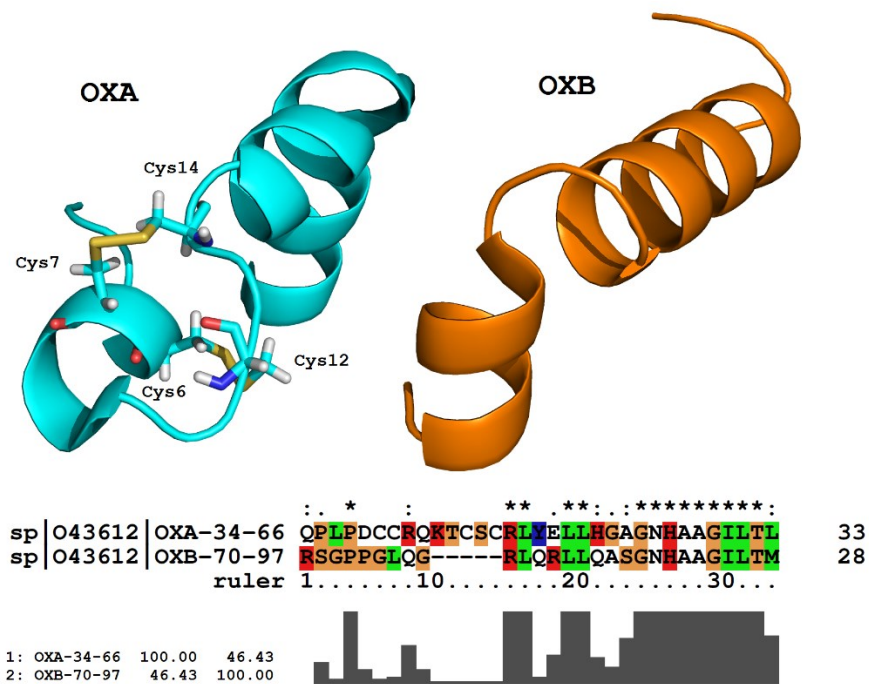
Lidský mozek obsahuje v normálním stavu zhruba 50 000 až 80 000 orexinových neuronů, které produkují a distribuují OXA a OXB napříč CNS i periferním nervovým systémem.²⁹⁴ Tyto neurony jsou propojeny s mnoha mozgovými centry, které jsou spoluzodpovědné např. za udržení pozornosti, motivaci, vnímání hladu, metabolismus glukózy, adaptaci na stres nebo rozvoj drogové závislosti.²⁹⁵ Díky tomu, že orexinový neuronový systém interaguje s noradrenergními neurony v locus coeruleus, s histaminergními neurony v tuberomammilárním jádru, serotoninergními neurony v raphe nucleii, a dopaminergními neurony ve ventrální tegmentální oblasti, má postižení tohoto

nervového subsystému velmi komplexní patologické důsledky (Obr. 28).^{296, 297} Některé studie rovněž prokazují souvislost mezi AD a patologií orexinergního systému.²⁹⁸⁻³⁰⁰



Obr. 28. Interakce orexinových neuronů s různými nervovými podsystémy.²⁹⁷

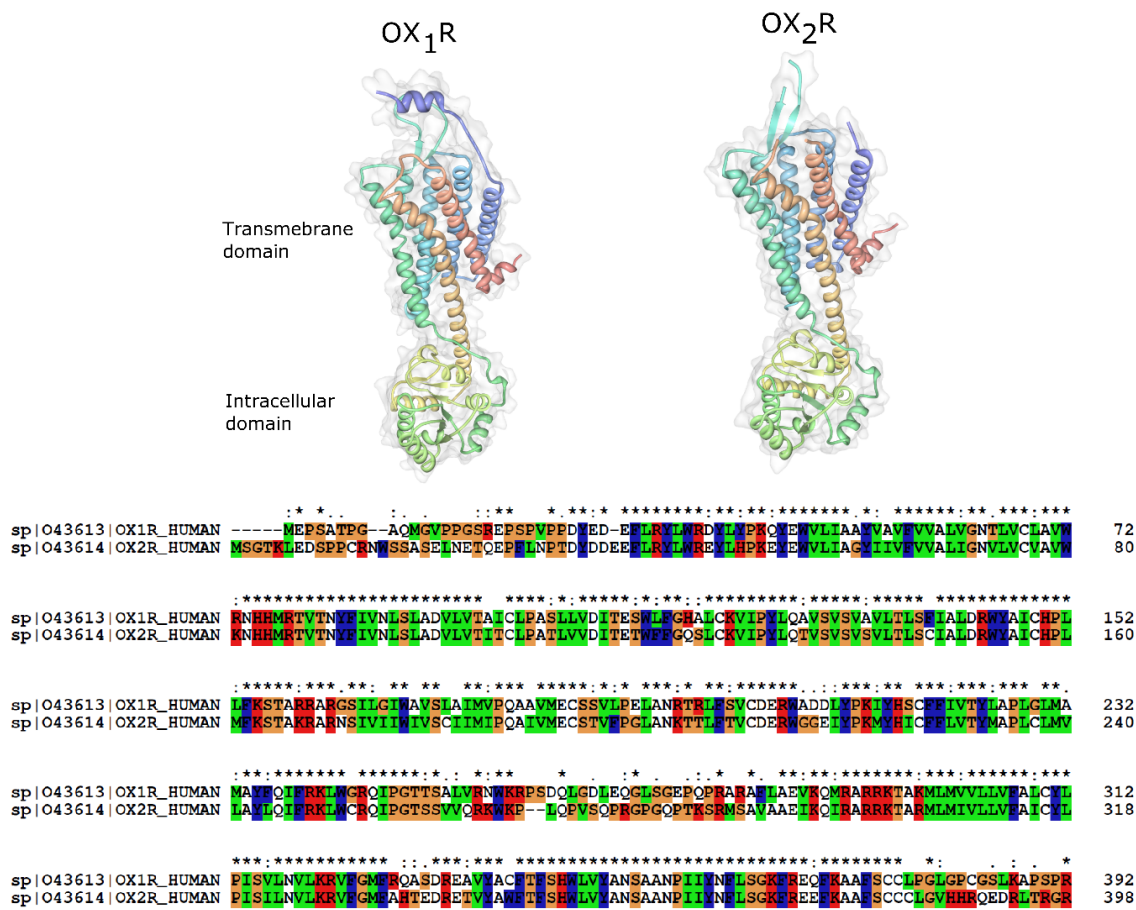
OXA a OXB jsou produkovány proteolytickým štěpením orexinového preproteinu o délce 131 aminokyselin na 4 různě dlouhé peptidové řetězce.³⁰¹ OXA obsahuje 33 aminokyselin a dva disulfidické můstky (Cis6 – Cis12, Cys7 – Cys14), které stabilizují jeho konformaci. OXB je kratším peptidem s 28 rezidui, přičemž je ve srovnání s OXA konformačně flexibilnější. Oba peptidy sdílí dle výpočtu v programu Clustal2.1 46.43% podobnost primární sekvence (Obr. 29).



Obr. 29. Srovnání sekvence OXA a OXB. Vlevo dole je matice podobnosti, napravo je sloupcový graf, který vyjadřuje individuální příspěvky mezi rezidui k celkové podobnosti peptidů. Nahoře vlevo je model OXA (pdb id: 1WSO), vpravo nahoře je model OXB (pdb id: 1CQ0).

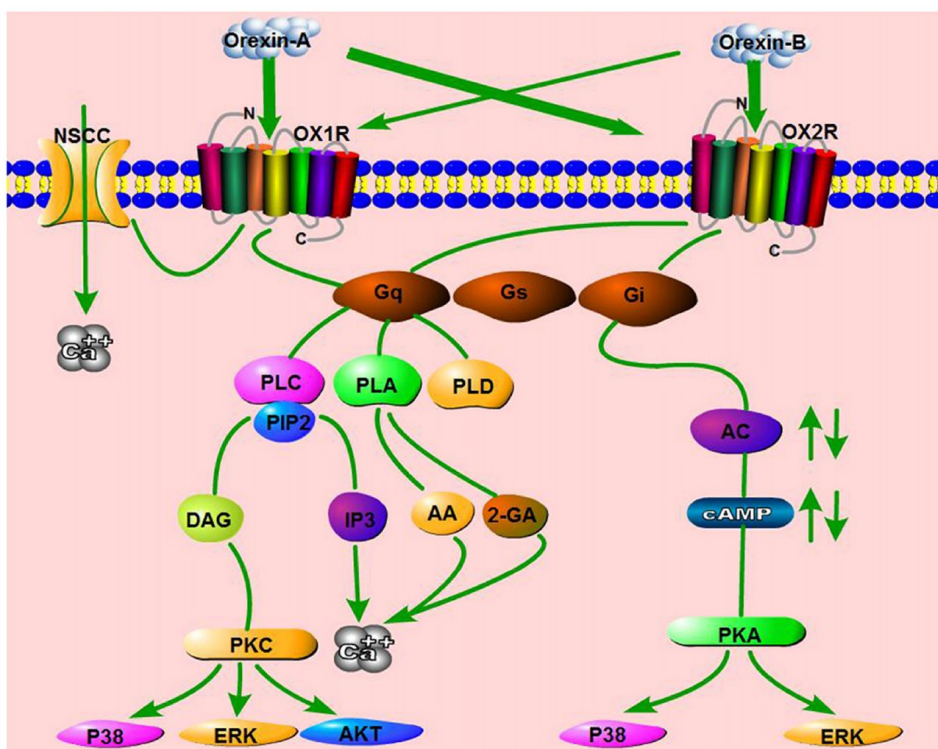
Orexinové peptidy OXA a OXB jsou agonisty orexinových receptorů 1 a 2, (OX₁R, OX₂R), které náleží do kategorie proteinů spřažených s G-proteiny (G-protein coupled receptors, GPCR). Pomocí biochemických experimentů bylo stanoveno, že OXA vykazuje stejnou afinitu k OX₁R i OX₂R (IC₅₀ ~ 20 nM v kompetičním experimentu), zatímco OXB má přibližně 10 x vyšší afinitu k OX₂R než k OX₁R.³⁰² V experimentu s transfekovanými ovariálními buňkami čínské křečka (Chinese hamster ovary cells, CHO), které produkují OX₁R, bylo zjištěno, že koncentrace způsobující 50% aktivaci OX₁R (EC₅₀) je v případě OXA 30 nM, kdežto pro OXB 2500 nM.³⁰³ Tento překvapivý rozdíl v aktivitě naznačuje poměrně vyhraněnou aktivační specifitu orexinových receptorů.

Receptory OX₁R a OX₂R jsou exprimovány v neuronech napříč celým CNS a setkáváme se s nimi v malé míře i v tkáních slinivky břišní, gastrointestinálním systému či v ledvinách. Oba receptory náleží do kategorie GPCR, které se vyznačují složitou strukturou a funkcí. Charakteristickým znakem GPCR je transmembránová doména se 7 úseky ve tvaru šroubovice. OX₁R obsahuje 425 rezidui, a je tedy kratším proteinem než OX₂R, který obsahuje 444 aminokyselin. Oba receptory obsahují disulfidický můstek mezi třetím transmembránovým segmentem (TM3) a druhou extracelulární smyčkou (ECL2), přičemž dle bioinformační analýzy sdílejí 63.23% podobnost sekvence (Obr. 30).[\[P43\]](#)



Obr. 30. Modely *OX1R* (pdb id: 4ZJ8) a *OX2R* (pdb id: 4S0V) a jejich přeložené sekvence. [P43]

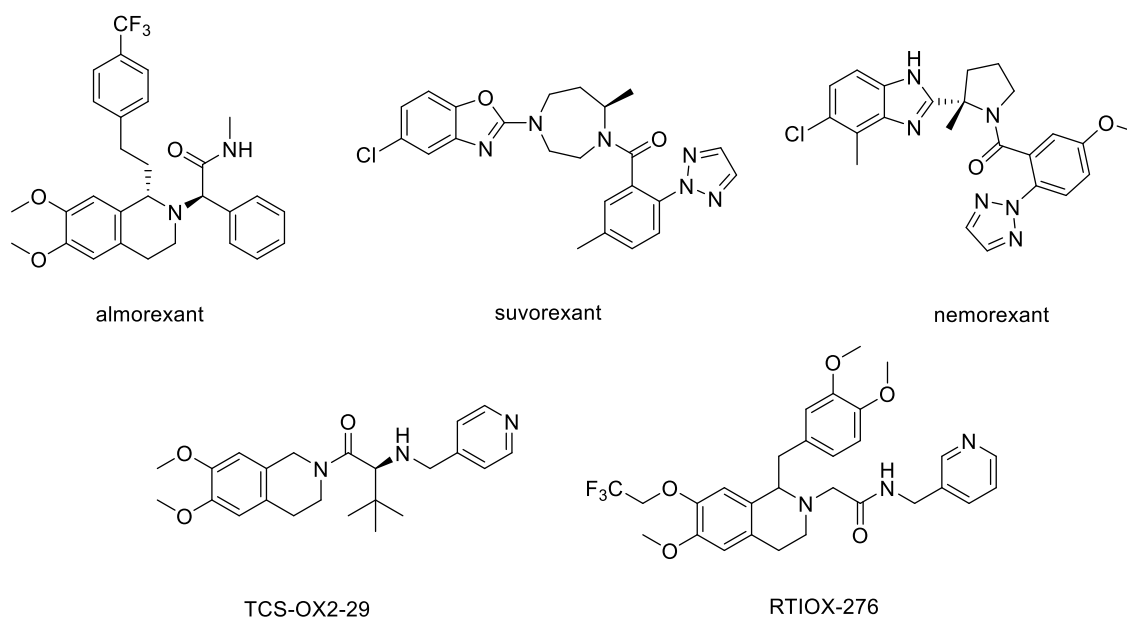
Mechanismus aktivace OXR lze zjednodušeně popsat jako kaskádu několika kroků. Orexinové peptidy (OXA i OXB) se vážou do extracelulární části OXR, mění jeho konformaci a způsobují aktivaci třech podtypů G-proteinů ($G_{q/11}$, $G_{i/o}$ a G_s). Oba receptory OXR vyvolávají influx vápenatých iontů do buňky, avšak v případě *OX1R* je tento influx doprovázený rovněž aktivací neselektivního kationtového kanálu (nonselective cation channel, NSCC), a tedy rychlejším nárůstem koncentrace Ca^{2+} v neuronech (Obr. 31).³⁰⁴



Obr. 31. Zjednodušený mechanismus aktivace OXR. Po aktivaci OXR následuje stimulace fosfolipas C, A a D (PLC, PLA, PLD), která vede k nárůstu koncentrace cytosolického Ca^{2+} .³⁰⁴

V současné době probíhá intenzivní vývoj nízkomolekulárních modulátorů OXR, protože podání syntetických peptidů OXA a OXB v terapii narkolepsie je jednak kriticky limitované BBB a jednak se tyto peptidy rychle metabolizují v krevním oběhu. Experimenty na myších nicméně dokazují, že centrální podání OXA redukuje příznaky kataplexie a prodlužuje čas potřebný k probouzení.³⁰⁵ Vedle genové terapie a transplantace orexinových neuronů se však velká pozornost v oblasti léčby narkolepsie věnuje vývoji syntetických agonistů OXR.^{306, 307}

Přestože je cílem racionálního designu v oblasti léčby narkolepsie vyvinout agonisty OXR, v mnoha případech byly objeveny antagonisté těchto receptorů, které nacházejí své místo v léčbě nespavosti (např. suvorexant, almorexant, nemorexant, aj.).³⁰⁸⁻³¹⁰ Ve většině případů jsou tyto antagonisty schopni blokovat oba receptory OX₁R a OX₂R (tzv. dual orexin receptor antagonists, DORAs), avšak specificky účinné blokátory orexinových receptorů byly rovněž objeveny (např. TCS-OX2-29 a RTIOX-276) (Obr. 32).³¹¹⁻³¹³ Pokud bychom se pokusily uvedené struktury antagonistů porovnat, našli bychom ve všech látkách amidickou skupinu. Nelze ale bez farmakoforové analýzy (ať už na bázi SB či LB CADD) říci, zda se jedná o nezbytnou funkční skupinu pro vyvolání antagonistického efektu vůči OXR.



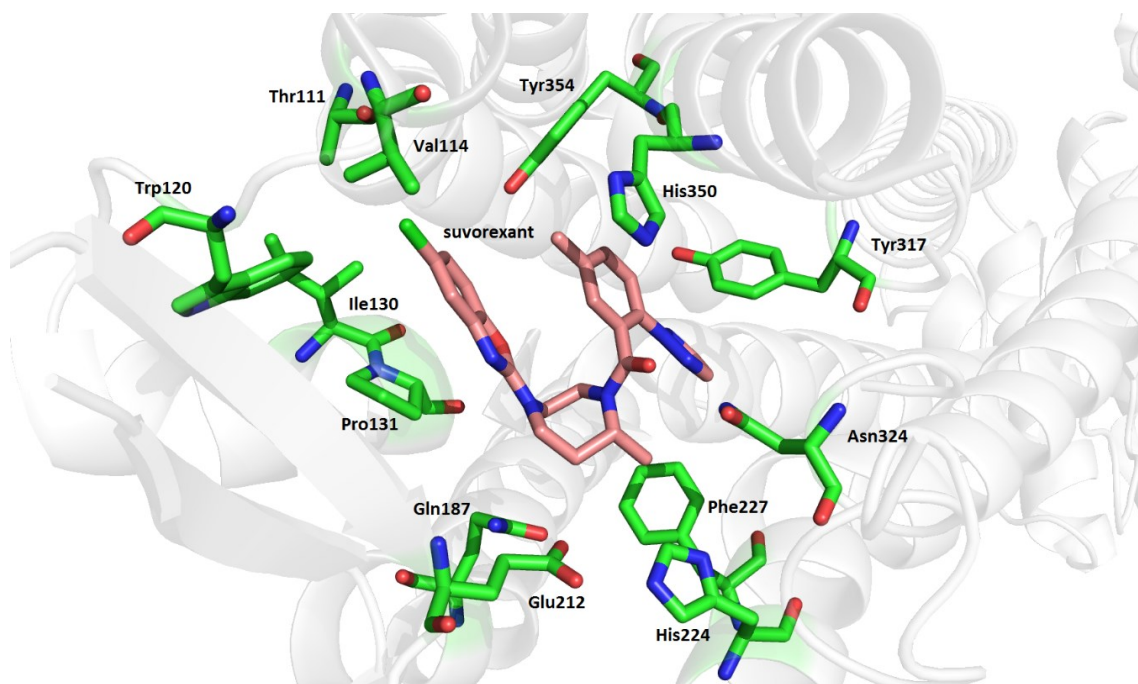
Obr. 32. Příklady agonistů OX₂R. Látka TCS-OX2-29 působí specificky na OX₁R, RTIOX-276 je selektivní antagonist OX₂R. Ostatní uvedené látky náležejí k DORAs.

Z důvodu nesnadného designu malých agonistů OX₂R, které by napodobily účinek OXA/OXB, se při léčbě narkolepsie využívají symptomatická léčiva, z nichž většina náleží do skupiny inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI) (Tabulka 2).

Tabulka 2. Symptomatická léčiva aplikovaná při léčbě narkolepsie a typ jejich účinku.²⁸⁶

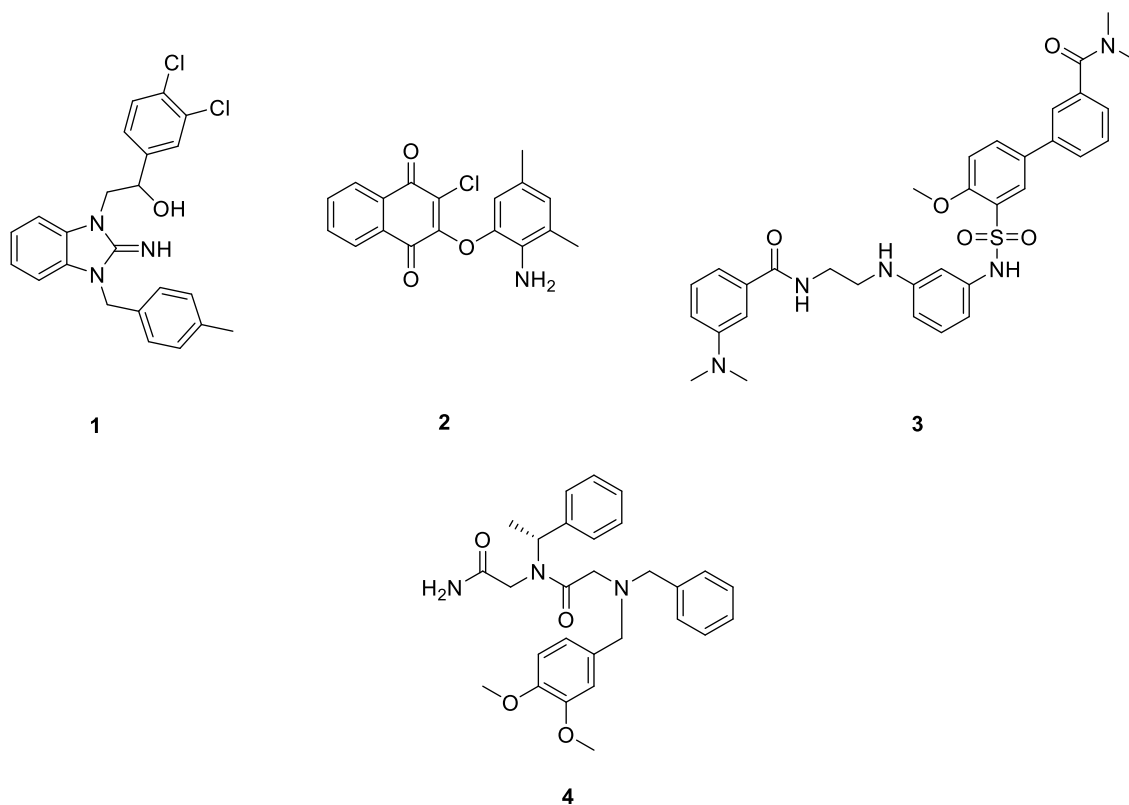
Látka	Účinek
Oxybát sodný	Aktivace GABA-B a GHB receptorů
Venlafaxin	Inhibice zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
Sertralin	Inhibice zpětného vychytávání serotoninu, noradrenalinu a dopaminu
Protriptylin	Inhibice zpětného vychytávání noradrenalinu, serotoninu a dopaminu
Modafinil	Inhibice zpětného vychytávání dopaminu
Amfetamin	Zvýšení transmise dopaminu
Pitolisant	Agonismus histaminového H3 receptoru

Pro vývoj nových modulátorů OX₂R je velmi podstatné, že roku 2015 byla stanovena 3D struktura obou typu těchto receptorů, a tím otevřena brána pro SB CADD metody.³¹⁴⁻³¹⁶ Příkladem je klíčová studie Yin et al. (2015), která objasňuje pomocí rentgenostrukturní analýzy vazebný mód suvorexantu v OX₂R (Obr. 33).³¹⁵



Obr. 33. Vazebný mód suvorexantu (světle fialový) v OX_2R , stanovený rentgenostrukturní analýzou (pdb id: 4S0V). Rezidua vzdálená maximálně 4 Å od suvorexantu jsou obarvena zeleně.

Ačkoliv je 3D struktura OX_2R známa, využívají se k objevování nových základních struktur modulátorů OX_2R převážně techniky spojené s HTS (např. při objevu suvorexantu).³¹⁰ Pomocí HTS byly rovněž nalezeny první nepeptidické látky, schopné působit agonisticky na OX_2R .³¹⁷ Skupina kolem prof. Masashiho Yanagisawy z Univerzity v Dallasu patentovala (US 8,258,163 B2) v roce 2012 cyklické deriváty guanidinu jako první agonisty OX_2R .^[P42] Dále následovaly objevy dalších malých agonistů OX_2R , které obsahovaly jako klíčový strukturální prvek sulfonamidickou skupinu nebo náležely do skupiny peptoidů na bázi *N*-substituovaných oligomerů glycinu (Obr. 34).^{318, 319}



Obr. 34. Vybrané látky, které vykazují agonistický efekt vůči OXR. Jedná se o deriváty guanidinu (1), naftochinonu (2), sulfonamidu (3) a substituované glycinu (4).

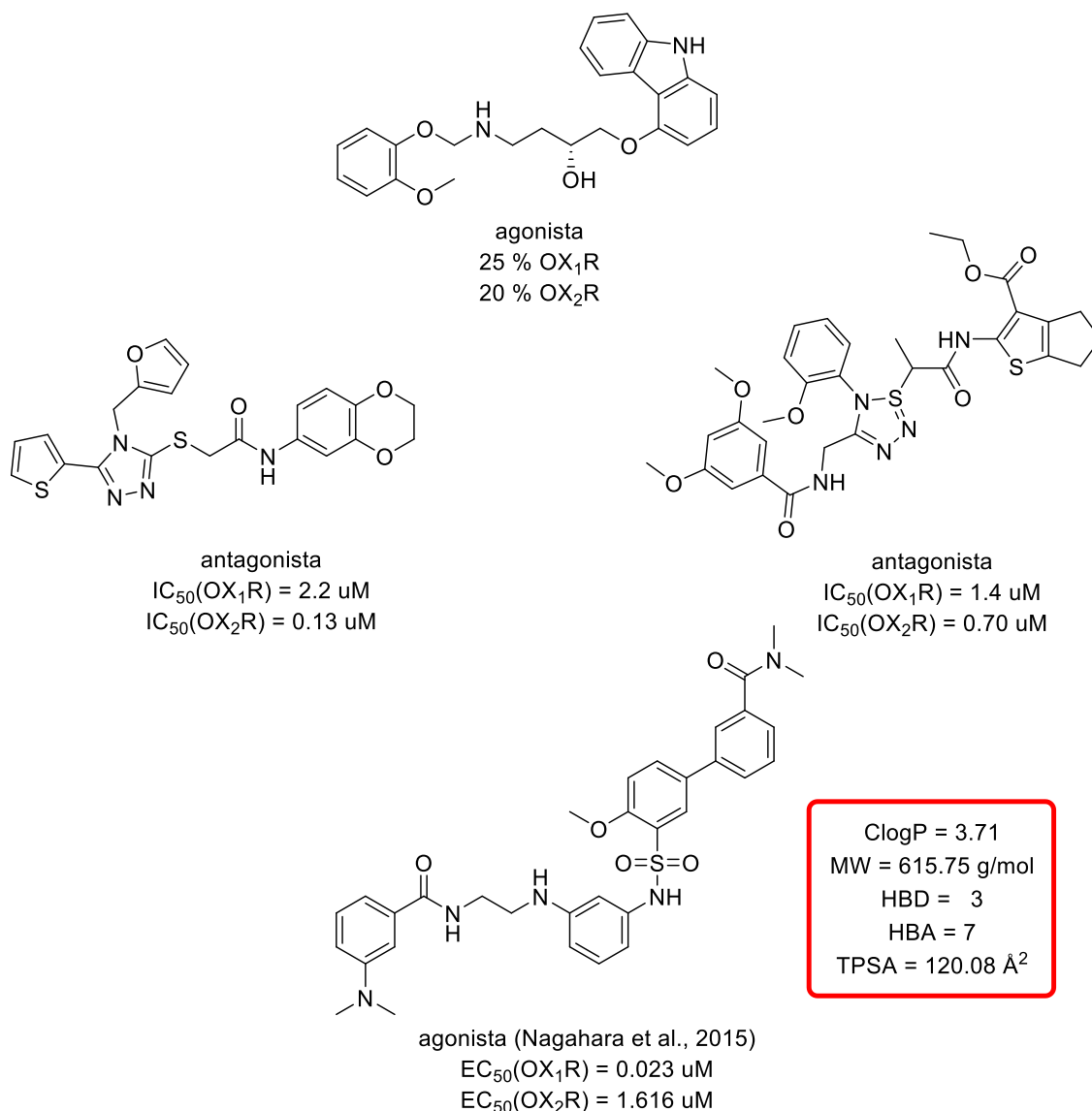
Ačkoliv již byly nalezené látky, které působí poměrně silným agonistickým účinkem na OXR, žádná z nich se dosud podle aktuálních, veřejně dostupných informačních zdrojů nedostala do klinické fáze testování. U derivátů guanidinu se naopak ukazuje, že jsou cytotoxické vůči CHO buňkám, což ve vývoji nových léčiv není nic neobvyklého.³²⁰ Proto je žádoucí, aby se nadále vyvíjely látky, které bude možné přivést do klinické fáze testování, a následně pak do terapie narkolepsie.

4.4. Využití CADD metod ve vývoji léčiv narkolepsie

Nejvýznamnější objev v oblasti hledání nízkomolekulárních agonistů OXR byl zatím dosažen roku 2015 ve skupině Nagahara et al., kde její členové provedli klasický *in vitro* HTS chemické knihovny čítající zhruba 250 000 drug-like chemických látek.³¹⁷ Po této etapě následovala organická syntéza 1 000 analogů základní struktury nalezené pomocí HTS a pak jejich *in vitro* testování vůči OX₁R a OX₂R. Takto velmi náročná a drahá práce podnítila např. pracovní skupinu Turku et al., aby se pokusili využít k nalezení nových základních struktur modulátorů OXR nástrojů CADD, a uskutečnili proto *in silico* alternativu HTS, přesněji LBVS.³²¹ Jejich práci lze popsat stručně v následujících krocích:

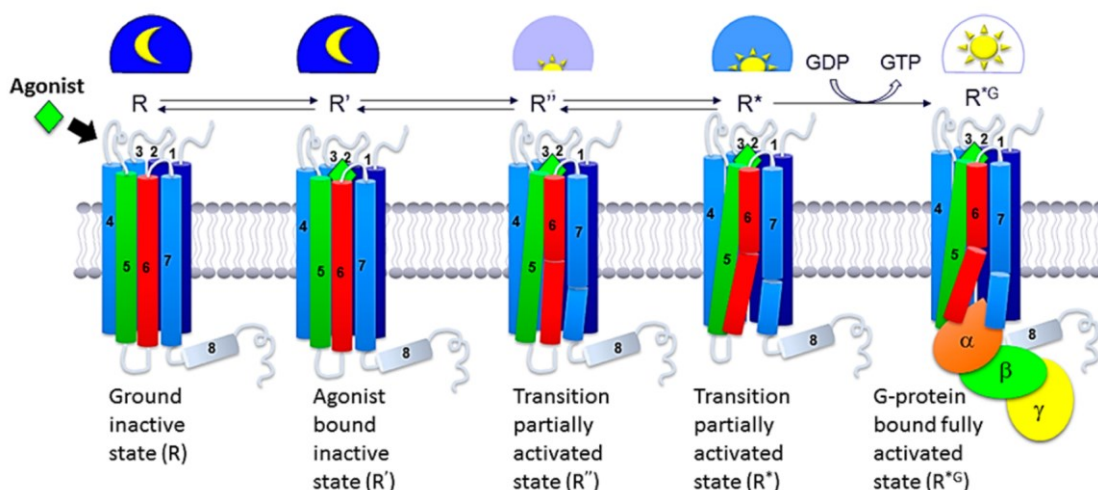
- 1) vytvoření homologního modelu OX₁R,
- 2) flexibilní molekulární docking látky **1**, uvedené na Obr. 34, v homologním OX₁R pomocí programu Glide (Schrödinger Maestro 2013v),
- 3) vytvoření ligandové databáze se 450 malými molekulami, u nichž byla experimentálně stanovena biologická aktivita vůči OX₁R,
- 4) vytvoření LB farmakoforové hypotézy se 4 proměnnými v programu Discovery Studio 3.5,
- 5) kombinace poznatků získaných z flexibilního molekulárního dockingu (krok 2) a LB farmakoforové hypotézy (krok 4) do optimální farmakoforové hypotézy,
- 6) LBVS online databáze <http://ddcb.fi/en/> o 137 000 ligandů s využitím uživatelské farmakoforové hypotézy a selekce 800 nejlepších kandidátů,
- 7) post-sceningová filtrace 800 ligandů, která vyloučila látky s molekulární hmotností nižší než 400 g/mol, látky obsahující reaktivní skupiny (tzv. REOS filtr, rapid elimination of swill) a látky spadající do kategorie PAINS,
- 8) hodnocení agonistické a antagonistické aktivity *in vitro* pro 395 látek vůči OX₁R a OX₂R.

S využitím výše uvedeného protokolu bylo nakonec vybráno 26 agonistů a 23 antagonistů OXR, u nichž bylo provedeno hodnocení kinetiky aktivace a inhibice OX₁R a OX₂R. Experimentální měření ukázala, že nejlepší agonista vyvolá v OX₁R cca při koncentraci 10 μM jen zhruba 25% odpověď, jakou způsobí 10 nM OXA. Když byla analogicky testována aktivita vůči OX₂R, agonista vyvolal 20% odpověď ve srovnání s OXA. V případě testování antagonistů byla určena IC₅₀ v řádu jednotek μM až stovek nM, přičemž látky vyvolávaly silnější inhibici u OX₂R než u OX₁R (Obr. 35).



Obr. 35. Přehled 3 nejlepších modulátorů OXR, které byly získány CADD metodami (v horní části). Pro srovnání je uvedena chemická struktura (v dolní části) nejlepšího agonisty OXR, která byla nalezena kombinací HTS a syntetických přístupů.^{317, 321}

Velice přínosná práce skupiny Nagahara et al., která vedla k objevu silného agonisty OXR, byla *a posteriori* roku 2015 analyzována skupinou Heifetz et al. pomocí flexibilního molekulárního dockingu.³²² Práce ukázala, že tzv. Nagaharův agonista se váže prakticky ve stejném místě OX₂R jako suvorexant, ale vyvolává odstředivý posun domény TM5 a dostředivý pohyb domény TM6 receptoru.[P44] Heifetzova studie potvrdila Manglikovy a Trzaskowského propozice o významu konformačních změn TM6 domény pro aktivaci rhodopsinu, který náleží do skupiny GPCR receptorů (Obr. 36).^{323, 324}



Obr. 36. Předpokládaný mechanismus aktivace GPCR receptorů a význam konformačních změn domény T6.^{322, 324}

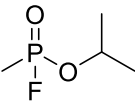
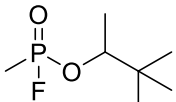
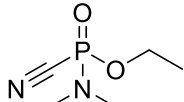
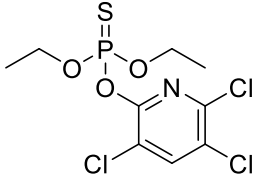
Další Heifetzovy práce v oblasti modulátorů OXR dále poukazuje na skutečnost, že SB CADD metody založené pouze na molekulární mechanice nemohou postihnout všechny interakce, ke kterým během aktivace GPCR dochází.^{322, 325, 326} Z tohoto důvodu jen nutné zahrnout též kvantově chemické výpočty, které jsou např. schopné reflektovat interakce typu C-H - π , halogen - π , kation - π , a neklasické vodíkové vazby.³²⁷ Nelze samozřejmě tvrdit, že by nebylo možné tento typ nevazebných interakcí parametrizovat na úrovni molekulární mechaniky, ale soudobý software pro molekulárně mechanické výpočty prozatím tuto možnost interakcí neimplementuje. Naproti QM metody v principu dokážou reflektovat všechny interakce, pokud nejsou tedy hrubě zjednodušené. Problematická je samozřejmě ta skutečnost, že aplikace QM na systémy s proteiny je extrémně výpočetně náročná.

Heifetz et al. poukázali na možnost dosáhnout přesnějších výsledků v CADD, když se využije metoda fragmentů molekulárních orbitalů (fragment molecular orbital, FMO).^{328, 329} Metoda je založena na rozdělení molekulárního systému na fragmenty o několika atomech (např. amidické vazby, aminokyselinové zbytky) a výpočet kvantově chemických interakcí mezi těmito fragmenty. Totální energie systému je součet párových interakčních energií (pair interaction energy, PIE) mezi všemi páry fragmentů, které se skládají ze 4 kvantově chemických příspěvků: elektrostatická interakce, výměnná interakce (exchange interaction), přenos náboje, disperze náboje. Na úrovni FMO mají pochopitelně vysvětlení i π - π interakce, které se mnohdy současné odborné literatuře využívající molekulární modelování vyvozují jen na základě van der Waalových interakcí, které zahrnuje molekulární mechanika.

S využitím FMO metody dokázali Hiefert et al.³²⁷ predikovat jak spolehlivější geometrie vazebných módů pro všechny látky, které publikovali Nagahara et al., 2015,³¹⁷ ale též vypočítat vazebnou energii, která korelovala se záporným logaritmem hodnot EC_{50} s hodnotou koeficientu determinace $R^2 = 0.872$. Tyto výsledky proto jen potvrzují základní předpoklad, že pokud mají CADD metody přinášet ve vývoji a výzkumu léčiv spolehlivé informace, je nutné použít co nejpřesnějších výpočetních metod. To však vyžaduje velmi pokročilou výpočetní techniku, jako jsou superpočítače nebo počítačové clustery.

4.5. Reaktivace inhibovaných cholinesteras

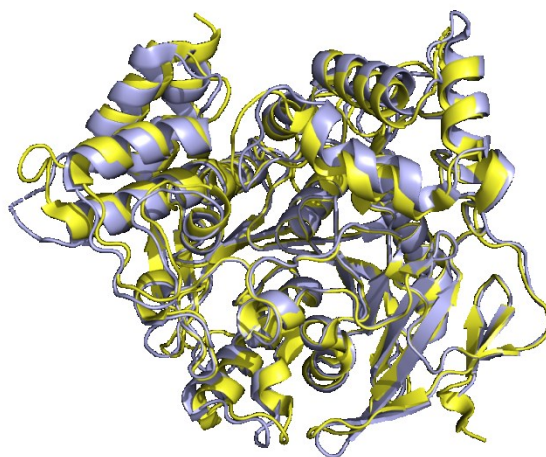
Určitou analogií k symptomatické léčbě AD či Myasthenia gravis pomocí reverzibilní inhibice AChE je inaktivace této cholinesterasy během intoxikace organofosforovými sloučeninami, mezi něž náleží nervově paralytické látky, jako je sarin, soman, tabun, nebo některé insekticidy (např. chlorpyrifos) (Obr. 37).^{330, 331}

sarin	soman	tabun	chlorpyrifos
			
ClogP = 0.8	ClogP = 2.1	ClogP = 0.1	ClogP = 5.3
MW = 140.09 g/mol	MW = 182.18 g/mol	MW = 162.13 g/mol	MW = 350.58 g/mol
HBD = 0	HBD = 0	HBD = 0	HBD = 0
HBA = 3	HBA = 3	HBA = 4	HBA = 5
TPSA = 26.3 Å ²	TPSA = 26.3 Å ²	TPSA = 53.3 Å ²	TPSA = 72.7 Å ²

Obr. 37. Příklady organofosforových sloučenin, které inhibují cholinesterasy AChE/BuChE. Fyzikálně chemické vlastnosti byly vzaty z online databáze PubChem.

Základní fyziologickou úlohou AChE je hydrolytický rozklad acetylcholinu, který zprostředkovává neurotransmisi v cholinergním nervovém systému (např. synapse a nervosvalová ploténka). Je-li tomuto rozkladu zabráněno kovalentní vazbou organofosforové sloučeniny v aktivním místě AChE, dochází k hromadění nerozloženého acetylcholinu, a následně k nadměrné stimulaci muskarinových a nikotinových receptorů. Má-li být aktivita AChE obnovena, je nutné pomocí reaktivátorů odstranit organofosfát, který se estericky váže v aktivním místě na aminokyselinu serin, a tím obnovit jejich hydrolytickou aktivitu.

Organofosforové látky, a v různé míře i jiné inhibitory AChE, působí taktéž na BuChE, která je produkována v játrech a vyskytuje se především v plazmě, v menší míře ale též v ledvinách a mozku.³³² Inhibice plasmatické BuChE sice nemá tak významný dopad na funkci organismu, jako je tomu v případě AChE, ale je potřeba s její přítomností v organismu při výzkumu inhibitorů AChE počítat.^{333, 334} AChE a BuChE mají velmi podobnou strukturu a funkci, avšak BuChE má poněkud větší aktivní místo, díky čemuž může hydrolyzovat i objemnější substráty, než je acetylcholin (např. nefyziologické substráty butyrylcholin a benzoylcholin, fyziologický peptid ghrelin).^{335, 336} Pokud přeložíme 3D modely lidských AChE a BuChE pomocí algoritmu, který minimalizuje RMSD pro alfa uhlíky v párujících aminokyselinách, pozorujeme poměrně dobrou koincenci, ačkoli přeložení primárních sekvencí pomocí programu ClustalX (freeware) udává podobnost 53 % (Obr. 38).



Obr. 38. Přeložené modely AChE (pdb id: 4EY7, žlutá) a BuChE (pdb id: 4BDS, modrá). Výsledné RMSD pro alfa uhlíky je 0.73 Å. Hodnota RMSD byly vypočítána na serveru PDB.

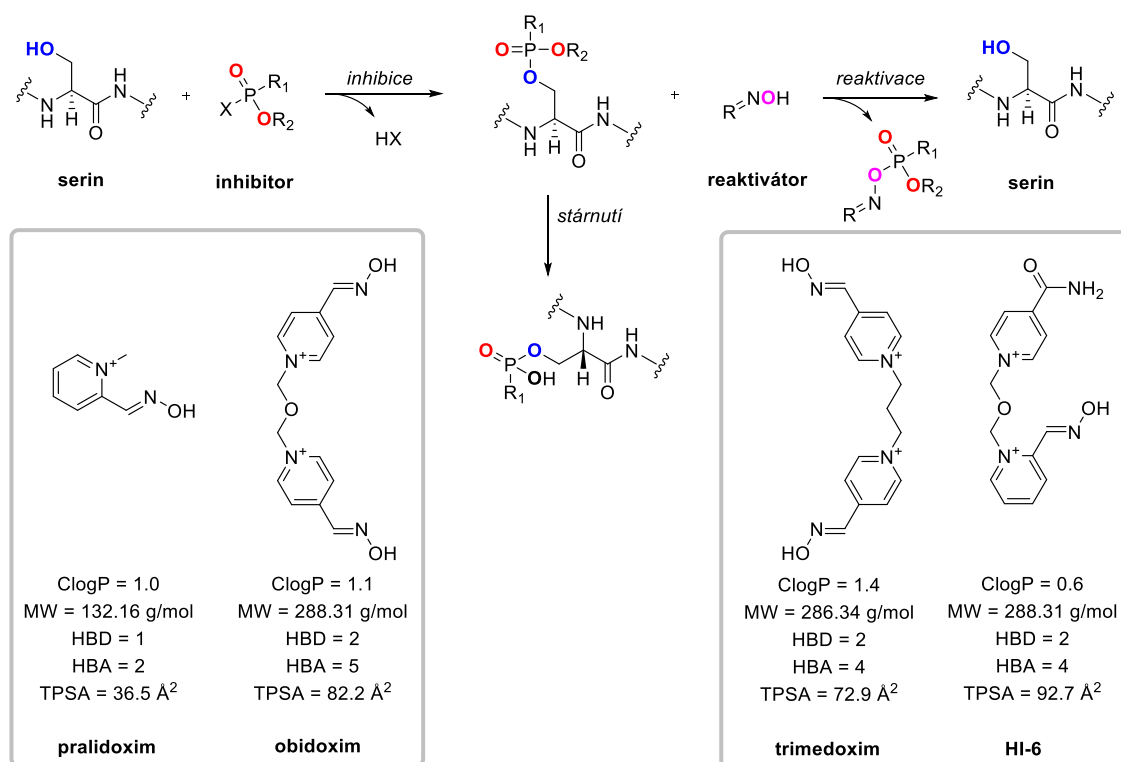
U obou enzymů se v dolní části podlouhlé kavity (cca 20 Å) nachází katalytická triáda aminokyselin glutamin – histidin – serin (tzv. CAS), která je zodpovědná za hydrolýzu acetylcholinu či jiných analogů cholinu. Jak již bylo uvedeno v kapitole o Alzheimerově nemoci (4.1.), v aktivním místě obou cholinesteras jsou přítomná další vazebná místa (tj. oxyanionové, kation – π , PAS, atd.), resp. skupiny aminokyselin, které hrají klíčovou roli při vytváření nekovalentních vazeb s různými ligandy (např. acetylcholin, donepezil, takrin, 7-methoxytakrin).³³⁷

Otrava organofosforovými látkami může nastat u lidí, kteří pracují v zemědělství, kde se tyto látky využívají jako insekticidy. Nebezpečí otrav hrozí dále ve válečných konfliktech, při teroristických útocích a při úmyslném zneužití těchto látek (tj. vraždy a sebevraždy). Intoxikace organofosforovými látkami se projevuje hypotenzí, bradykardií, miózou, slzením, bolestmi hlavy, závratí, zvracením, útlumem dýchání a bezvědomím. Cholinergní

krize bez léčby většinou končí smrtí díky kolapsu dýchacího systému. Vedle postižení nervového systému má na patologický obraz intoxikace organofosforovými sloučeninami též vliv hypoxie a překyselení organismu.

Je-li možné otravu organofosforovými sloučeninami předpokládat (např. u vojáků v první linii), přichází v úvahu podání profylakticky působících inhibitorů cholinesteras, které chrání aktivní místo cholinesteras před fosfylací (např. pyridostigmin). V případě již započaté otravy je možné obětem podat látky, které organofosforové sloučeniny v organismu vychytávají (např. BuChE a jiné scavengery) nebo je katalyticky rozkládají (např. paraoxonasa).³³⁸ Klasická terapie akutní otravy organofosforovými látkami nicméně spočívá v podání kombinace léčiv, které působí jak symptomaticky, tak kauzálně. Pro potlačení symptomů daných nahromaděným acetylcholinem se podávají parasymptolytika (např. atropin), která blokují muskarinové receptory, a antikonvulziva, která zabraňují tonicko-klonickým křečím (např. diazepam).³³⁹ Dalšími podpůrnými prostředky zejména u silné otravy jsou nasazení umělé ventilace a infuze bikarbonátu pro neutralizaci systémové acidózy. Kauzální část léčby intoxikace organofosforovými látkami je založena na aplikaci léčiv, které jsou schopné reaktivovat inhibované cholinesterasy.

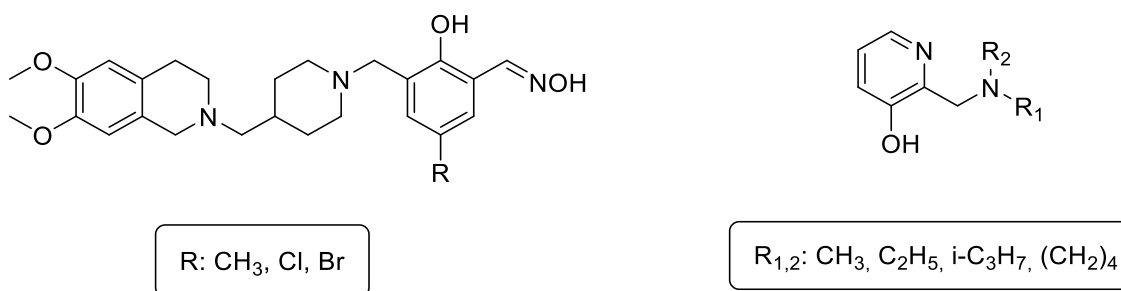
Z pohledu mechanismu otravy organofosforovými látkami a její kauzální léčby je podstatná vědomost o zablokování hydroxylové skupiny serinu AChE/BuChE, která je nezbytná pro jejich hydrolytickou aktivitu. Vzniklý ester serinu může být regenerován působením vhodných nukleofilních reaktivátorů, jako jsou např. aldoximy pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, HI-6.³⁴⁰ [P45,P46] Před aplikací konkrétních reaktivátorů je ale nutné vědět, jaká organofosforová látka otravu způsobila, protože reaktivátory mají optimální aktivitu vždy jen vůči některým inhibovaným komplexům AChE/BuChE. Proces reaktive dále ztěžuje doba, po kterou se inhibované cholinesterasy nechají tzv. stárnout, tedy chemicky změnit na formy, které jsou obtížně reaktivovatelné (Obr. 39).³⁴¹



Obr. 39. Předpokládaný mechanismus účinku organofosforových inhibitorů na AChE a BuChE, proces reaktivity a stárnutí inhibovaného komplexu a vybrané biskvarterní reaktivátory. Fyzikálně chemické vlastnosti reaktivátorů byly vzaty z online databáze Pubchem.

Ačkoli již bylo vyvinuto mnoho reaktivátorů inhibované AChE/BuChE, stále se nedaří nalézt takové látky, které by měly schopnost pronikat účinně do centrálního nervového systému, reaktivovat všechny typy inhibovaných komplexů cholinesteras (tj. inhibované různými organofosforovými látkami a nacházející se v odlišných stavech „stárnutí“ komplexů), a nepůsobit po úspěšné reaktivaci jako fosfylační činidla se schopností zpětně inhibovat AChE/BuChE.^{342, 343} Velká většina reaktivátorů je totiž zastoupena deriváty aldoximů pyridiniových solí, které obtížně prostupují z krve od mozku, a jejich fosfylvané formy vykazují nezanedbatelnou toxicitu.

Z výše uvedených důvodů se současné vědecké úsilí v oblasti vývoje optimálních reaktivátorů inhibovaných cholinesteras zaměřuje na studium nenabitých či neoximových reaktivátorů a na posílení jejich reaktivační schopnosti. Příkladem mohou být salicylaldoximy a aromatické β -aminoalkoholy jakožto prekurzory chinonmethidů (quinone methide precursors, QMP), které vykazují výhodnější farmakokinetický profil a v některých případech schopnost reaktivovat „zestárlý“ komplex cholinesteras s organofosforovými látkami (Obr. 40).^{344, 345}



Obr. 40. Ukázky nekvarterních reaktivátorů AChE/BuChE inhibovaných organofosforovými látkami (salicylaldoximy, vlevo; QMP, vpravo).

4.6. Využití CADD metod ve vývoji reaktivátorů inhibovaných cholinesteras

Analýza a vývoj reaktivátorů inhibované AChE a BuChE probíhá již řadu let s významným přispěním počítačových metod.³⁴⁶ Éru SB CADD metod odstartovalo roku 1991 určení 3D struktury AChE (z *Torpedo californica*) a identifikace 14 aromatických reziduí, které významně přispívají k vazání kvarterních amoniových kationtů v aktivním místě enzymu.³⁴⁷ Topochemická stavba kavity AChE a její silné negativní elektrostatické pole byly považovány za základní informace umožňující racionální design nových inhibitorů či reaktivátoru tohoto enzymu. Významné informace přinesly dále molekulárně dynamické simulace, které objasnily tepelný pohyb klíčových reziduí a roli vody uvnitř aktivního místa AChE.¹⁷⁸ Pokročilé metody molekulární dynamiky tak napomohly vysvětlit mechanismus transferu substrátu do kavity AChE, která má zhruba v polovině hloubky významné zúžení průměru, pomocí tzv. enzymového dýchání.¹⁵⁴ S využitím molekulárně dynamických simulací bylo také potvrzeno, že cholin, který je v AChE silně vázán díky svému kladnému náboji a elektrostatickému dipólu kavity (tj. vypočítáno 505 Db), se může uvolnit z enzymu tzv. zadními či bočními dveřmi podél Ω -smyčky (Cys69 – Cys96).¹⁷⁷ Jiné studie aplikující steered molekulární dynamiku (SMD) nebo mapování profilu volné energie pro ligandy (free energy landscape for ligands, BFEL) odhalily rozdíl mezi asociační a disociační energií komplexu AChE – huperzin A a rovněž poukázaly na existenci tří stabilních a dvou transitních stavů na inhibiční koordinátě.³⁴⁸ Tyto výsledky velmi dobře korelovaly s experimentálními měřeními metodou rezonance povrchových plazmonů (surface plasmon resonance, SPR).

Zhang et al. aplikovali hybridní QM/MM výpočty pro stanovení aktivační energie acylace katalytického serinu v myší AChE. Tato výzkumná skupina též později provedla simulaci hydrolyzy acetylcholinu v AChE s využitím Born-Oppenheimerovy molekulární dynamiky, metodou B3LYP/6-31G(d) určenými potenciály a deštníkovým vzorkováním.^{171, 349} Aplikací

stejně metody QM/MM Zhang et al. analyzovali i mechanismus fosfonylace AChE somanem a objevili několikastupňový adičně-eliminační mechanismus, který začíná nukleofilním napadením atomu fosforu v somanu atomem kyslíku serinu AChE za účasti His440 jako pomocné báze. Interakcí vzniká intermediát s geometrií ve formě trigonální bipyramidy, který se následně rozkládá za odštěpení fluoridového aniontu. Fluoridový aniont je stabilizován nejprve vodíkovou vazbou s Tyr121 a posléze se solvatoovaný uvolní z kavity AChE.^{350, 351}

Řada QM/MM simulací byla rovněž provedena za účelem objasnění mechanismu reaktivace AChE inhibované organofosforovými látkami pomocí nabitých či nenabitých aldoximů. Lo et al. potvrdili, že reaktivační mechanismus aldoximů má povahu adičně-eliminační reakce, přičemž některá rezidua v kavitě AChE pomáhají stabilizovat transitní stav, jehož vlastností řídí průběh reakce.³⁵² QM/MM výpočty také potvrdily, že nezanedbatelný vliv na celkovou reaktivaci mají molekuly vody, které rovněž reaktivují inhibovanou AChE.³⁵³ Pomocí QM/MM výpočtů bylo dále zjištěno, že pro reaktivaci je nutné, aby na Glu202 a/nebo His447 byl proton, který umožní odštěpení a stabilizaci serinového hydroxyly AChE. Pokud jde o aldoxim, ten musí atakovat atom fosforu jako oximátový aniont. Za fyziologických podmínek se zdá pravděpodobný takový mechanismus, kdy do aktivního místa vstupuje neutrální aldoxim, následně protonuje Glu202 nebo His447, a poté vzniklý oximátový anion interaguje s organofosfátem. I když bylo vypočítáno několik alternativních scénářů reaktivace, je nejvíce pravděpodobná reaktivace po deprotonaci aldoximu v aktivním místě AChE. Tento mechanismus vede tedy k tomu, že proti sobě působí dva opačné fyzikálně chemické faktory, které zvyšují reaktivační schopnost reaktivátorů: nukleofilicita a acidita oximové skupiny.^{354, 355}

Důležité výsledky týkající se predikce reaktivační schopnosti aldoximů byly publikovány skupinou Gicoppo et al., kteří pomocí QM/MM odvodili vztah mezi aktivační energií adičně-eliminačního mechanismu reaktivace, vazebnou afinitou a reaktivační schopností pyridiniového aldoximu BI-6 vůči myši AChE, inhibované 6 různými organofosforovými látkami.³⁵⁶ Jejich lineární dvouparametrový QSPR model s koeficientem determinace $R^2 = 0.89$ a $n = 6$ ukázal, že reaktivační schopnost aldoximu BI-6 posiluje silná vazebná energie reaktivátoru vůči AChE a nízká aktivační energie, přičemž vazebná afinita a aktivační energie přispívají k reaktivaci zhruba v poměru 1 : 2.

Protože QM/MM výpočty jsou velmi výpočetně náročné a komplikované, většina *in silico* studií reaktivace inhibované AChE či BuChE spoléhá na molekulární docking jakožto na pomůcku pro odvození SAR hypotéz. Některé studie ukazují, že vazebná afinita aldoximových reaktivátorů k AChE, určená molekulárním dockingem, dobře koreluje

s volnou energií vypočítanou MM/PBSA/MD metodou, a proto se věří, že výsledků molekulárního dockingu lze použít k predikci reaktivace.³⁵⁷ Nicméně je nutné akceptovat fakt, že afinita k reaktivátoru ke kavité AChE vytváří z těchto látek inhibitory AChE. Některé studie tudíž prokazují, že samotná vazebná afinita reaktivátorů k aktivnímu místu inhibované AChE není jednoznačně spjata s vysokou reaktivační schopností. Molekulární docking nicméně poskytl zajímavé semi-kvantitativní koncepce, které slouží k posouzení reaktivační schopnosti reaktivátoru molekulárně mechanickými výpočty na základě geometrie predikovaného vazebného modu.³⁵⁸ Byly např. definovány některé konformační parametry vázaných molekul reaktivátorů, které vedou k účinné reaktivaci AChE (tzv. near-attack conformation, NAC).³⁵⁹ NAC konformace je charakterizována vzdáleností mezi kyslíkem aldoximové skupiny a atomem fosforu v organogoforové látce vázané na serin AChE menší než 10 Å a úhlem mezi kyslíkem serinu, fosforem a kyslíkem aldoximu v rozmezí $180 \pm 60^\circ$. I když molekulárně mechanické výpočty v principu nemohou operovat s koncepcí geometrií transitních stavů při reaktivaci, mohou přesto poukázat, že z mechanistického pohledu nic v reaktivaci kvantově-mechanickými procesy nebrání.

Ve snaze nalézt nové reaktivátory inhibované AChE se širším spektrem účinku a vyšší prostupností přes hematoencefalickou bariéru bylo též provedeno několik SB/LB virtuálních screeningů.³⁶⁰⁻³⁶² Využívají se zde stejné, univerzální přístupy jako v jiných případech hledání základních struktur. Při LBVS se vychází ze známých struktur reaktivátorů (např. pyridiniumaldoximy, imidazoliumaldoximy), ke kterým se hledají podobné struktury, a to v souladu s teorií, že podobné struktury mají podobné fyzikálně chemické vlastnosti a biologický účinek. Při SBVS se využívá molekulární docking ve vysoko-propustném režimu, který zpravidla zahrnuje heuristický průzkum rigidního modelu AChE. Jako zdroj velkého počtu ligandů, které reálně existují, se využívá především online databáze zinc.docking.org.³⁶³ QSAR studie reaktivátorů AChE/BuChE zahrnují analýzy molekulárních deskriptorů odvozených z kvantově-chemických výpočtů pomocí lineárních regresních technik (např. PCA, PCR, MLR) nebo umělých neuronových sítí.³⁶⁴⁻³⁶⁶ Všechny tyto studie vedly ke statisticky významným QSAR modelům a v některých případech podnítily organickou syntézu predikovaných struktur, které následně vykázaly zajímavou reaktivační aktivitu *in vitro*. Některé *nD*-QSAR predikce potenciálně účinných reaktivátorů AChE/BuChE však také zůstaly zapomenuty, a žádný další experimentální výzkum na ně nenavázal.³⁶⁷⁻³⁶⁹

5. KOMENTÁŘ K PŘEDLOŽENÝM PRACÍM

V následujících kapitolách budou shrnuty výsledky mé vědecké práce, které vznikaly od roku 2012 až do letošního roku 2019. Protože jsem se během tohoto období zabýval více tématy, vybral jsem pro habilitační práci ty publikace, které úzce souvisí s vývojem léčiv proti Alzheimerově nemoci, narkolepsii a vývojem reaktivátorů inhibované AChE. Studium těchto skupiny bioaktivních látek probíhalo především v Centru biomedicínského výzkumu (CBV) Fakultní nemocnice Hradec Králové, ale měla na něm velký podíl též Katedra toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, kde probíhala část organické syntézy navržených potenciálních léčiv a testování *in vitro* reaktivačních či inhibičních vlastností vůči AChE a BuChE. Hodnocení cytotoxicity a biologické aktivity vůči OXR, GSK3 β a TLR4 probíhalo na CBV. Výpočty CADD byly realizovány díky své náročnosti zejména na externích zdrojích, částečně ale také na Katedře chemie Přírodovědecké fakulty a v Centru základního a aplikovaného výzkumu (CZAV) Fakulty informatiky a managementu Univerzity Hradec Králové.

Pokud jde o provedení CADD metod, nenahraditelnou pomocí pro mě byla spolupráce s Národním superpočítačovým centrem IT4Innovations v Ostravě, kde jsem se s několika projekty účastnil veřejných grantových soutěží o výpočetní čas. V těchto projektech jsem získal více než 10 milionů jádrohodin výpočetního času k provedení nejrůznějších simulací a modelování s využitím vysoce paralelizovaného prostředí superpočítačů Salomon (24192 CPU, 2 PFlop/s) a Anselm (3344 CPU, 94 TFlop/s). K výpočtům jsem mohl využívat jak vícejaderné CPU nody a vysoce propustnou síť 7D Enhanced Hypercube InfiniBand, tak nody s grafickými kartami NVIDIA Kepler K20m a Intel Xeon Phi MIC akcelerátory. Druhou a neméně významnou pomocí pro mě byla Národní gridová infrastruktura MetaCentrum, která mi umožnila provádět paralelní výpočty v heterogenní gridové počítačové síti bez potřeby podávat projektovou přihlášku a projít s ní úspěšně oponentním řízením.

Tato habilitační práce určitým způsobem navazuje na témata mé diplomové a disertační práce, pro něž bylo společné využití počítačové chemie ve studiu struktury a vlastností organických látek. V rámci doktorandského studia na (toho času) Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové jsem se zabýval návrhem, organickou syntézou a QSAR analýzou potenciálních antituberkulotik ze skupiny fenylylkarbamátů, salicylamidů, thiosalicylamidů a tetrazolů. Předně jsem se zaměřil v rámci QSAR analýz na aplikaci kvantově chemických molekulárních deskriptorů a pokročilých matematických metod pro datamining mnohorozměrných dat (metoda regrese základních komponent, metoda parciálně nejmenších čtverců, umělé neuronové sítě). Na tyto studie

jsem ale během postdoktoranského projektu na CBV explicitně nenavázal, ale aplikoval je a rozšířil ve studiu jiných látek.

V souvislosti s vývojem CADD metodiky, pro mě byl klíčový počítačový výzkum modulátorů TLR4 receptorů, kde bylo nutné vyřešit problematiku agonismu a antagonismu receptoru, která se odlišuje od problematiky inhibice např. AChE. V zjednodušeném pohledu na věc lze říci, že predikovaná vazebná energie ligandu v případě simulace inhibice enzymu by měla korelovat s hodnotami pIC_{50} . Je-li však studována interakce malých molekul s receptorem, nelze rozhodnout, zda vypočítaná vazebná energie mezi ligandem a receptorem reflektuje sílu antagonistického, nebo agonistického efektu. Lze sice předpokládat, že silný agonista i antagonist bude vykazovat významnou interakci s receptorem, ale o tom, zda interakce povede k aktivaci receptoru, či ne, je možné spekulovat zřejmě jen na základě molekulárně dynamické simulace, pomocí níž lze posoudit konformační změny modulovaného receptoru.

Při provádění SBVS jsem se také často setkával s otázkou, zda je rozumné vyřadit z testované ligandové knihovny látky, které mají nevhodné farmakokinetické vlastnosti nebo mají charakter PAINS, před SBVS, nebo provést filtraci ligandů až pro zúženou množinu kandidátů, které prošly SBVS. Má zkušenost naznačuje, že je spíš výhodnější dát přednost SBVS a ligandy přefiltrovat po jeho ukončení, protože nalezenou základní strukturu s potenciálním farmakoforem je pak možné optimalizovat v rámci H2L procesu, a tak upravit její farmakokinetický profil. Nicméně je velmi riskantní filtraci ligandů zanedbat, protože v SBVS může identifikovat významný ligand, který je nerozpustný ve vodných mediích, a jeho tudíž aktivita nemůže být vyhodnocena *in vitro*.

Další problematika CADD je koordinace s organickou syntézou, kdy se často ukáže, že navržené či identifikované struktury optimální ligandů se v laboratoři dají připravit jen s velmi velkým úsilím. Takto jsem např. provedl SBVS s využitím knihovny, která obsahovala exotické látky používané v tradiční Čínské medicíně (Traditional Chinese Medicine, TCM). Některé látky z této knihovny vykazovaly vynikající *in silico* vazebné vlastnosti např. vůči OX₂R, a navíc měly i výborné predikované farmakokinetické vlastnosti, ale byly nedostupné na trhu. Tyto přírodní látky je pochopitelně extrémně náročné syntetizovat, a proto bylo od jejich experimentálního testování prozatím upuštěno.

Na druhou stranu ze strany organických chemiků přicházely návrhy hybridních struktur, které měly charakter nových chemických entit. Protože pro *de novo* design ligandů je nutné mít patřičný software, který jsem neměl k dispozici, byly tyto invence, opřené o nenahraditelnou chemickou intuici, velmi žádoucí. Nové chemické struktury jsou zajímavé

pro všechna odvětví chemie, a to platí i pro CADD. Tím mohlo dojít ke kompromisu, kdy se navrhuje pro CADD takové látky, které lze v rozumném časovém horizontu a s přijatelnou mírou obtížnosti připravit v běžné laboratoři organické syntézy.

Zajímavým přístupem v CADD je screening schválených léčiv a jejich tzv. přecílení (repurposing). Z tohoto důvodu jsem v pozdějších etapách při studiu modulace různých biologických cílů vždy zapojil ve SBVS knihovnu FDA schválených léčiv. Pokud by se totiž našlo léčivo, o němž se nevědělo, že působí i na zvolený biologický cíl, velmi by to usnadnilo jeho testování, a byla by taktéž velká naděje na dokončení všech klinických fází testování.

Vzhledem k tomu, že CADD techniky byly v naší pracovní skupině aplikovány na různé farmakologické problematiky, uvádím zde určité aplikační spektrum CADD metod, které jsou demonstrovány na vybraných příkladech. Z důvodu přehlednosti jsem se pokusil ze svých prací vybrat ty studie, které se zabývají vývojem léčiv proti AD, narkolepsii a designem reaktivátorů inhibované AChE. Jak bylo naznačeno v předchozích kapitolách, problematika AD, narkolepsie a reaktivace inhibované AChE úzce souvisí. Zajímavá je spojitost mezi AD a narkolepsií. Během AD mohou být postiženy i orexinergní neurony. Tomu také odpovídá skutečnost, že suvorexant je v současnosti zařazen do klinického testování jako pomocná látka pro symptomatickou kompenzaci některých patologických projevů spojených s progresí AD.

Komentář k předloženým pracím jsem se pokusil rozdělit do tří skupin, které jsou si v principu velmi blízké:

- 1) využití CADD ve výzkumu a vývoji léčiv proti Alzheimerově nemoci,
- 2) využití CADD ve výzkumu a vývoji léčiv proti narkolepsii,
- 3) využití CADD ve výzkumu a vývoji reaktivátorů AChE.

Aby byly odkazy na předkládané práce v textu více zřetelnější, zvolil jsem na základě příkladu svých předchůdců, kteří na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové ucházeli o habilitační řízení, trojí formát referencí, přičemž na vlastní publikace, uvedené v kapitole 10, odkazují pomocí červených, číslovaných symbolů **P1 – P20**.

5.1. Využití CADD ve výzkumu léčiv proti Alzheimerově nemoci

Počítačové metody zaměřené na vývoj a výzkum léčiv (CADD) je možné v malém měřítku provádět na osobním počítači, na kterém jsou nainstalované potřebné programy. Je-li však nutné provádět SBVS na několika desítkách tisíců virtuálních ligandů, vyžaduje to přibližně 1 milion jádrohodin. Je pochopitelně možné výpočty zjednodušit, ale tím by se ohrozila kvalita získaných výsledků. Náročné výpočetní metody je tudíž nutné provést s využitím gridů, clusterů či superpočítačů a aplikovat potřebný software. Pro potřeby CADD bylo vyvinuto pro naši skupinu několik distribučních skriptů pro superpočítače pracující s linuxovou platformou Cent OS [P1,P2]. Problematika těchto výpočtů spočívá ve správné implementaci UMA a NUMA systémů, které přinášejí nejlepší počítačový výkon. V rámci studií efektivity se ukázal jako nejvíce užitečný nástroj AutoDock Vina 1.1.2 (dále jen Vina) pro flexibilní molekulární docking, který byl ve zdrojovém kódu upraven a zkompilován pro 64bitový systém superpočítače Salomon (IT4Innovations, Ostrava). Program Vina umožňuje jen UMA paralelizaci, která se ukazuje jako robustnější, protože program lze přenést na gridové systémy (např. MetaCentrum). Experimenty s verzí Vina, která byla upravena pro implementaci MPI, vykazala při testech na NUMA systému superpočítače Salomon vyšší speedup než UMA Vina, ale zároveň byla tato varianta programu závislá na konkrétním systému s FDR InfiniBandem a prakticky nepřenositelná na gridový systém. Zajímavého výkonu programu Vina ve flexibilním molekulárním dockingu bylo dosaženo na virtualizované cloudové platformě OpenStack. Experimenty na cloudové platformě však měly jen povahu předběžné analýzy a vyšší škálovatelnost výpočetních úloh z oblasti flexibilního molekulárního dockingu nebyla ověřena. Pro SBVS byla proto v následujících výpočtech vždy použita vlastní upravené kompilace programu Vina a vlastní bash skript pro distribuci a analýzu výpočtů. Dále byla vytvořena řada skriptů pro transformaci ligandových knihoven a kvantově-chemické výpočty v HyperChemu, Gaussianu a Gromacsu.

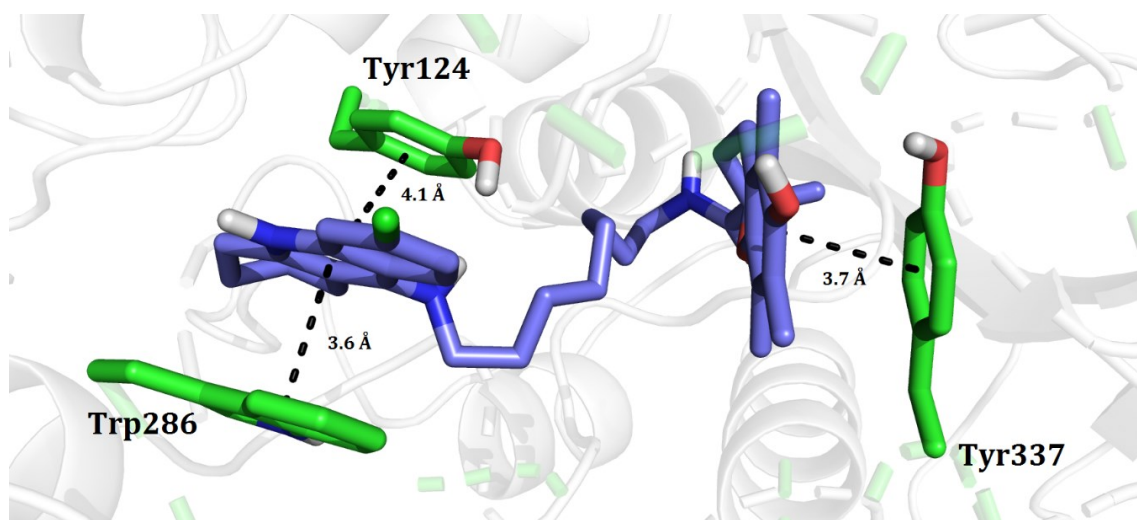
Pokud se zaměříme na problematiku CADD ve vztahu k hledání léčiv vůči AD, je možné uvažovat o simulace modulace těchto biologických cílů:

- 1) AChE a BuChE, [P3,P4,P5,P6,P7,P8,P9,P10,P11],
- 2) GSK3 β , [P12],
- 3) ABAD, [P13,P14],
- 4) TLR4.[P15,P16,P17]

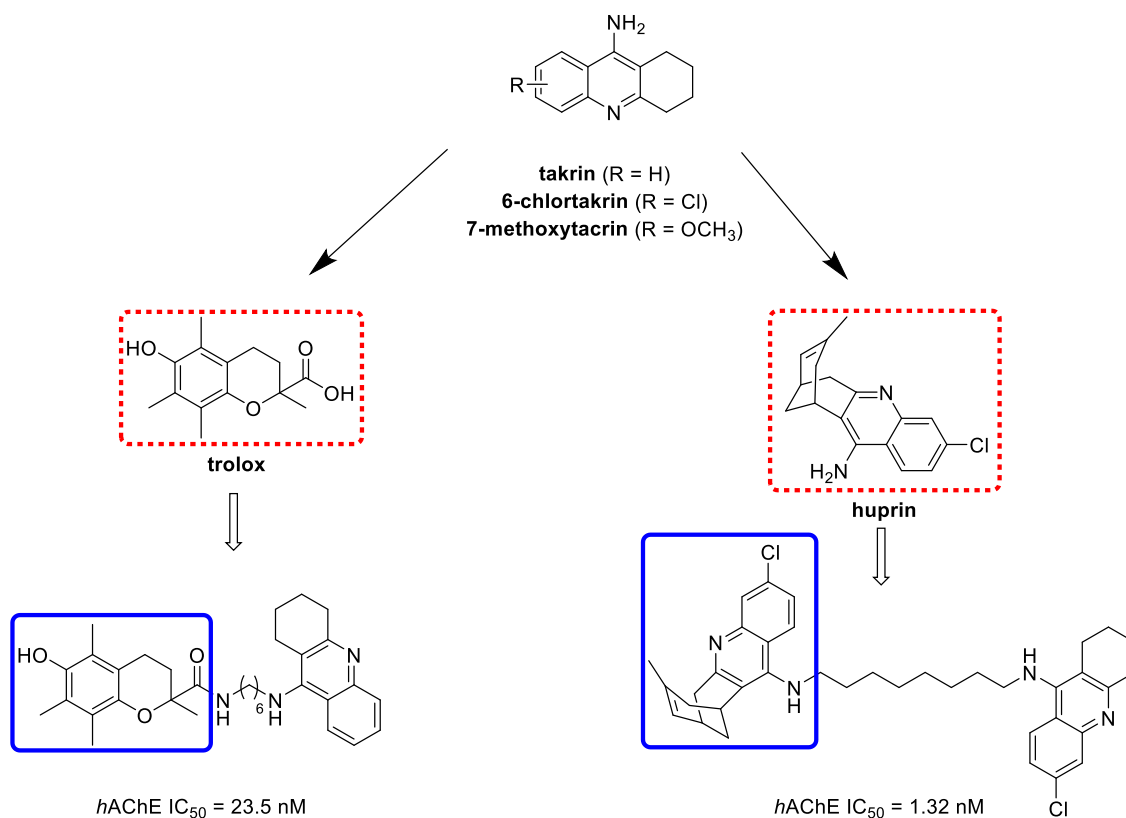
Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, AChE je enzym, který hraje důležitou roli při ukončení nervového signálu v cholinergním systému. Blokací jeho aktivního místa lze

dosáhnout toho, že neuromediátor acetylcholin se začne hromadit v synapsích či nervosvalové ploténce a působit negativní efekty, které mohou vést v neléčeném případě k smrti postiženého. Je-li však cholinergní systém oslaben a přenos signálu je v něm provázen nízkou produkcí acetylcholinu, jako je tomu při AD, lze účinek neurotransmise posílit inhibitory AChE. Účinek inhibitorů AChE v organismu však s sebou často nese i inhibici BuChE, což je ovšem žádoucí, protože hladinu acetylcholinu v mozku může BuChE snižovat také.

Značnému zájmu se při designu inhibitorů AChE/BuChE těší již známe struktury inhibitorů, jako je takrin, donepezil nebo rivastigmin. Tyto předlokové struktury se staly předmětem studia i našeho výzkumu, v jehož rámci jsme se zaměřili na design takových látek, které mají silnější inhibiční aktivitu a selektivitu vůči AChE, vyšší schopnost penetrace přes hematoencefalickou bariéru, antioxidační vlastnosti a schopnost bránit agregaci A β . Strategie designu nových inhibitorů AChE vycházela tedy z MTDL filosofie, přičemž byly navrhovány různé hybridní kombinace takrinu, 6-chlortakrinu, 7-methoxytakrinu s troloxem, amantadinem, benzylcholinolinkarboxylovou kyselinou, fragmenty donepezilu, tryptofanem, scutellarinem či huprinem [P3,P4,P5,P6,P7,P8,P9,P10,P11] (Obr. 41, Obr. 42).



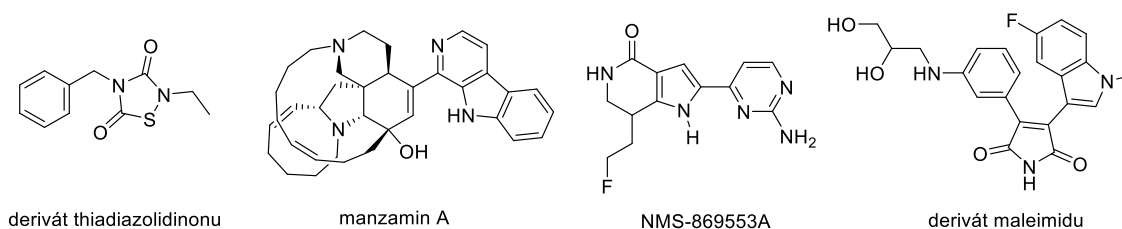
Obr. 41. Vazebný mód nejlepšího studovaného takrin-troloxového hybridu v lidské AChE (pdb id: 4EY7). Odhad vazebné energie vypočítaný programem Vina činil – 15.5 kcal/mol.[P5]



Obr. 42. Příklady medicíně chemického návrhu struktur inhibitorů AChE. [P5,P9]

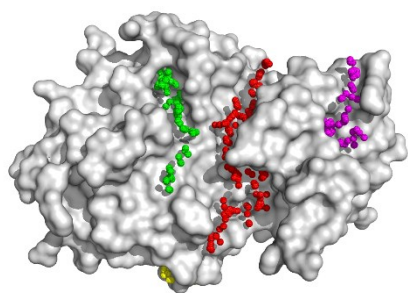
U všech sérií látek byl v rámci jejich výzkumu proveden především flexibilní molekulární docking v lidské AChE (pdb id: 4EY7) s využitím vysoce paralelního výpočtového prostředí. Nastavení flexibilního dockingu vycházelo ze znalosti vazebného modu známých ligandů AChE (např. takrin). Tak mohl být nastaven střed gridboxu zhruba do těžiště dolní třetiny kavity AChE a zahrnuta všechna rezidua v okolí cca 10 Å od tohoto těžiště do flexibilní části enzymu. Velká část výpočtů byla též provedena s modely zvířecích AChE (tj. myš, úhoř, kůň) a s modelem lidské BuChE (pdb id: 4BDS). Ukázalo se, že struktury, které měly předpovězenou vazebnou energii k modelu lidské AChE nižší než -12 kcal/mol, vykazaly rovněž významnou hodnotu IC₅₀ při *in vitro* experimentech. Takrinový fragment se vázal v predikovaných vazebných módech v převážně v PAS AChE. Nejlépe skórované látky dosáhly ve flexibilním molekulárním dockingu energií často pod -15 kcal/mol. Ale korelační studie mezi predikovanou vazebnou afinitou ligandu k lidské AChE a experimentálně určenou biologickou aktivitou pIC₅₀ poskytovaly QSAR modely s koeficientem determinace $R^2 \sim 0.5$. Když byla při QSAR analýzách inhibitorů AChE použita metoda hledání optimálního MLR modelu pomocí brute force selektivního algoritmu, který vybíral nejvýhodnější kombinaci prediktorů z množiny cca 5 000 molekulárních deskriptorů, byly nalezeny QSAR modely statisticky mnohem významnější. [P3]

Velice slibný přístup pro vývoji léčiv AD představuje regulace hyperfosforylace τ . Řízení hyperfosforylace τ je však velmi komplexní a podílí se na něm evidentně celá řada faktorů. Mezi enzymy, které jsou zapojeny do tvorby τ H náleží též GSK3 β . Tato kinasa má významnou roli nicméně i v jiných procesech, než je hyperfosforylace τ , a tudíž je její inhibice spojena s otázkou např. zvýšeného rizika propuknutí rakoviny (více o tom v kapitole o Alzheimerově nemoci 4.1.). Z těchto a dalších důvodů se jeví jako výhodná cesta modulace GSK3 β přes alosterickou inhibici. Proto byla provedena analýza povrchu GSK3 β (pdb id: 3DU8) pomocí Voroniovovy teselace (program Fpocket) a rigidního dockingu (program Vina) se 4 různými molekulárními sondami, které jsou známými inhibitory tohoto enzymu (tj. derivát meleimidu, manzamin A, NMS-896553A a derivát thiazolidinonu) (Obr. 43).**[P12]**

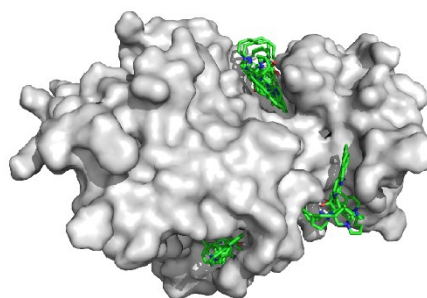


Obr. 43. Použité sondy pro skenování povrchu GSK3 β energetickou metodou pomocí rigidního molekulárního dockingu v programu Vina.**[P12]**

Výsledky geometrické i energetické metody průzkumu povrchu modelu GSK3 β se víceméně shodovaly, přičemž nejlépe bylo v obou případech vyhodnoceno orthosterické ATP vázající místo GSK3 β (Obr. 44). Celkem 5 detekovaných vazebných míst, včetně orthosterického, bylo dále využito při SBVS pomocí flexibilního molekulárního dockingu 5000 ligandů, které byly náhodně vybrány z databáze zinc.docking.org, z kategorie drug-like (4000 látek) a z kategorie látek užívaných v tradiční čínské medicíně (1000 látek) (Obr. 45). K SBVS byl využit superpočítač Salomon a bylo objeveno celkem 7 základních struktur (6 z nich z kategorie TCM), které vykázaly *in silico* vazebnou energii vůči GSK3 β (pdb id: 3DU8) nižší než - 15 kcal/mol.

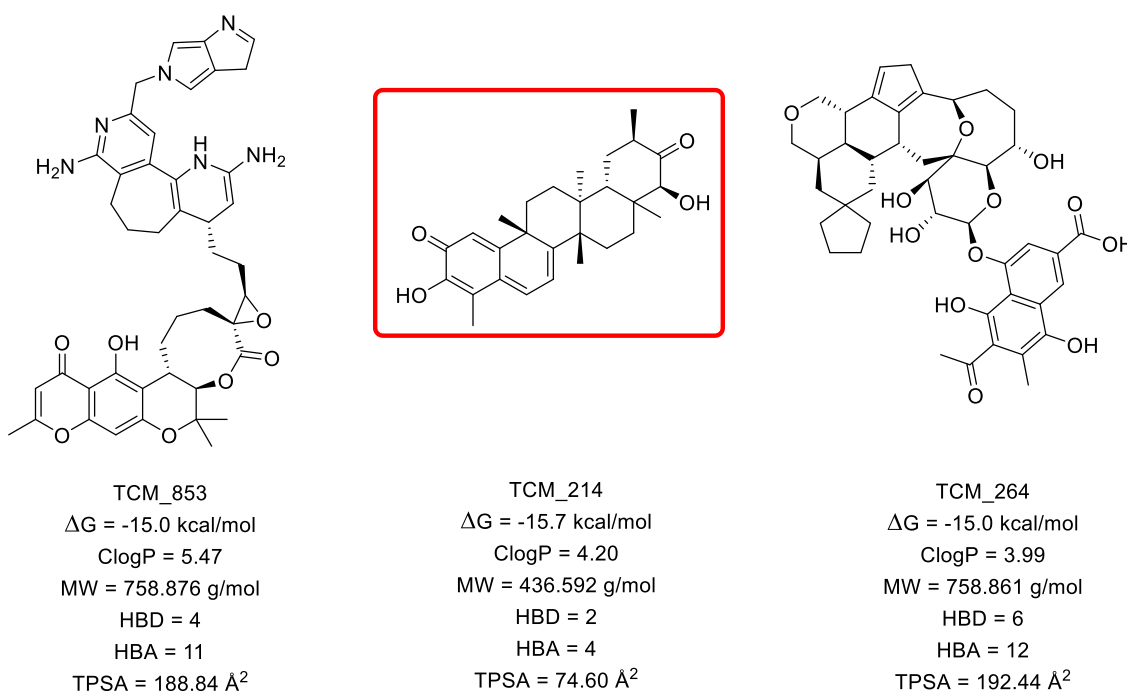


Fpocket



AutoDock Vina

Obr. 44. Ukázka nalezených potenciálních vazebných míst na povrchu GSK3 β (pdb id: 3DU8) pomocí geometrické analýzy v programu Fpocket a pomocí energetického přístupu s využitím molekulárního dockingu v programu Vina (jako sonda byl použit model manzaminu A). [P12]

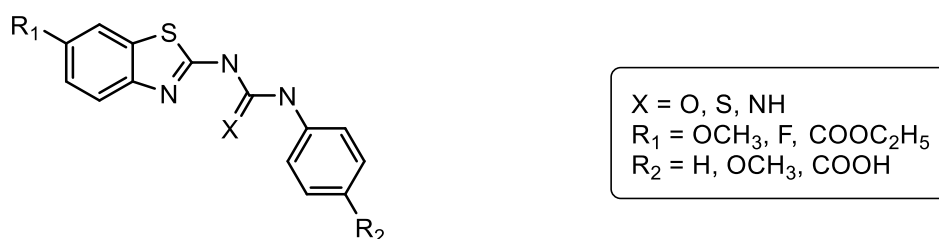


Obr. 45. Ukázky struktur z knihovny látek TCM, které v SBVS vůči GSK3 β (pdb id: 3DU8) vykázaly *in silico* vazebnou energii ΔG nižší než -15 kcal/mol. Další fyzikálně chemické veličiny byly získány v programu MarvinSketch 15.12.0.7.

V současné době probíhá další ověřování inhibičních vlastností látek, které SBVS vyhodnotil jako silně vázající ligandy GSK3 β . Jelikož se ale nejlépe skórované struktury z knihovny TCM obtížně získávají, zaměřuje se náš současný výzkum na dostupnější ligandy, které rovněž vykázaly relativně silnou afinitu *in silico* vůči GSK3 β modelu. Krom toho je nutné vzít v úvahu, že ligandy z knihovny TCM se silnou afinitou ke GSK3 β nemusí mít zcela ideální farmakokinetické vlastnosti, ačkoli se jedná o přírodní látky. Z pohledu optimálních fyzikálně chemických vlastností a Lipinského pravidla se ze tří uvedených látek zdá být zajímavá látka TCM_214, která je známá jako tingenin B. Tento terpenoid z *Myatenus* sp.

získává nyní pozornost ve vývoji léčiv jako silný inhibitor růstu rakovinných kmenových buněk.³⁷⁰

Soudobé poznání v oblasti patofyziologie AD ukazuje, že amyloidová hypotéza nemá tak závažný význam pro vznik a léčbu této nemoci, jak se dříve myslelo.³⁷¹ Přesto se ale stále studuje např. toxický vliv A β na ABAD a následně vyvolanou mitochondriální disfunkci (více v kapitole 4.1.). V těchto studiích se předpokládá, že spektrum katalytické aktivity ABADu se mění vlivem A β .**[P13]** Za tímto účelem byla syntetizována série inhibitorů ABADu, které byly strukturně odvozeny od benzothiazolyločoviny (Obr. 46). Pro 15 látek z této skupiny byla provedena QSAR analýza s využitím MLR a brute force selekčního algoritmu. Celkem bylo ke QSAR studii vypočítáno 4885 molekulárních deskriptorů, z kterých se vybíraly optimální trojice prediktorů. Jako biologická aktivita byla použita relativní inhibice ABADu, způsobená 25 mM roztokem studovaných látek. QSAR modely byly kros-validovány metodou LOO a L30%O, dále byly ověřeny v testech randomizace a scramblingu. Rovněž byla ověřena doména použitelnosti navržených QSAR modelů pomocí Williamsových grafů.

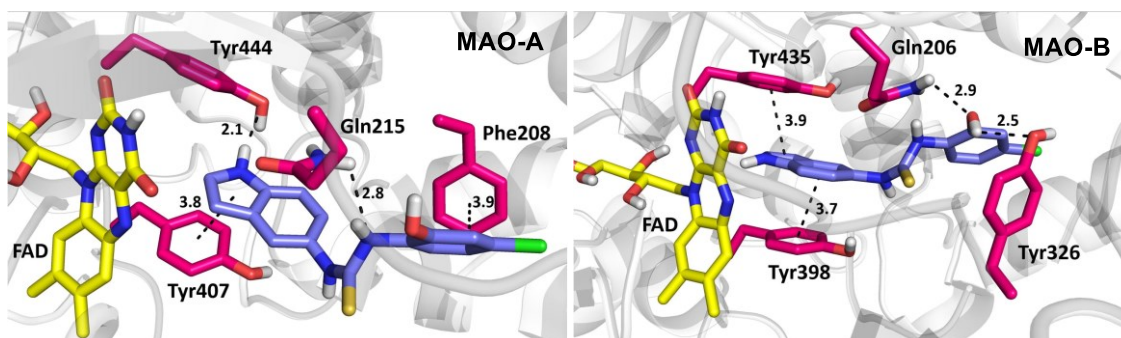
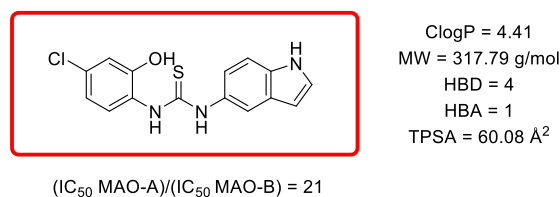


Obr. 46. Skupina inhibitorů ABADu, které byly intuitivně odvozeny od benzothiazolyločoviny.**[P13]**

Nalezený 3-parametrový MLR QSAR model byl charakterizován hodnotami $R^2 = 0.95$, $F = 67.5$, $Q^2_{LOO} = 0.9$ a $Q^2_{L30\%O} = 0.76$. Model QSAR byl tedy statisticky významný a statisticky významné byly i zahrnuté prediktory. Analýza QSAR modelu po randomizaci a scramblingu vektoru biologických hodnot poskytla statisticky nevýznamné korelace, což prokazuje dostatečnou citlivost modelu. Williamsův graf potvrdil, že studovaný soubor 15 látek vytváří v chemickém prostoru daném vybranou trojicí molekulárních deskriptorů rovnoměrně rozloženou grupu bodů. MLR QSAR model byl vytvořen z molekulárních deskriptorů M_v (průměr van der Waalsových atomových poloměrů vztažený k atomu uhlíku), $JGI6$ (průměrný index topologického náboje šestého řádu) a V_s (index celkové velikosti molekuly vážený ionizačním stavem). Zjednodušená interpretace tohoto QSAR modelu naznačuje, že biologicky aktivnější jsou látky, které jsou polarizovanější a mají určitý optimální molekulární objem.**[P13]**

Ve skupině derivátů benzothiazolyločoviny byly rovněž nalezeny látky, které vykazují aktivitu vůči monoaminoxidasám A a B (MAO-A, MAO-B). U některých zástupců této skupiny

látek byla zjištěna selektivní inhibice MAO-B vzhledem k MAO-A (někdy i 10 x nižší hodnota IC_{50} pro inhibici MAO-B). [P14] Z těchto důvodů byl proveden flexibilní molekulární docking pro nejúčinnější inhibitor MAO-A/B v dané sérii látek (Obr. 47).



Obr. 47. Ukázky predikovaných vazebných modů vybraného ligandu v MAO-A (pdb id: 2Z5X) a MAO-B (pdb id: 2V5Z) pomocí flexibilního molekulárního dockingu ve Vině. [P14]

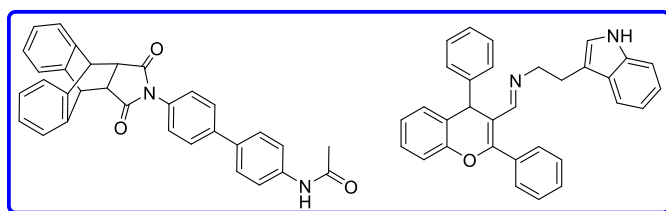
Flexibilní molekulární docking uvedeného inhibitoru MAO-A/B však v obou případech inhibice predikoval stejnou vazebnou energii ligandu k enzymu: -10.3 kcal/mol. Oba enzymy MAO-A a MAO-B mají dle Smith-Watermanova sekvenčního přeložení identitu 73.1 % a při 3D přeložení alfa uhlíků vykazují RMSD = 0.71 Å. Jedná se tedy o podobné enzymy, ale selektivita inhibice MAO-A/B zvoleného inhibitoru se takto provedeným molekulárním dockingem nedá vysvětlit. Ačkoli problematika inhibice MAO-A/B souvisí s AD, z důvodu stručnosti zde nebude dále rozebírána. Zmínka o inhibici je uvedena proto, aby dokreslila širší linie možného spektra biologického účinku derivátů benzothiazolyльмоčoviny jakožto inhibitorů ABADu.

Velmi úzkou spojitost s A β , především s jeho odbouráváním, mají TLR4 receptory, jak bylo zmíněno v kapitole o Alzheimerově nemoci (4.1.). Je ale nutné zdůraznit, že TLR4 receptory mají především význam pro funkci imunitního systému během rozpoznávání patogenních strukturních vzorů na bakteriích (tzv. PAMP a DAMP). Mohou však stimulovat imunitní systém skrze mikrogliální a monocytární aktivaci k odbourávání A β .^{227, 232, 233} V naší pracovní skupině jsme se modulátory zabývali především z pohledu vývoje adjuvans. Jádrem našeho CADD výzkumu bylo nalézt základní struktury, které se vážou silně k TLR4, a ty posléze chemicky optimalizovat na předlohové struktury. Základní otázkou CADD v oblasti TLR4 je, jak pomocí počítačových metod rozhodnout, zda má ligand schopnosti

agonismu či antagonismu. Z tohoto důvodu jsme se během první fáze výzkumu zaměřili na vývoj antagonistů TLR4, protože mechanismus antagonismu se jeví jednodušší než agonismus. Lze předpokládat, že silně vázající ligand (např. eritoran) bude v aktivním místě TLR4 receptoru bránit vazbě s LPS, čímž dojde k inhibici příslušné biochemické kaskády, a tudíž k zeslabení reakce imunitního systému na patogenní struktury. V případě agonismu TLR4 nízkomolekulárním ligandem je situace poměrně složitější, protože agonista TLR4 musí při interakci vykázat tzv. vnitřní aktivitu a způsobit přechod receptoru do aktivní konformace. I když by se z pohledu vývoje látek posilujících odbourávání A β jevílo více žádoucí získat spíše agonisty TLR4, technické obtíže spojené se počítačovými simulacemi agonismu a jejich uplatnění při SBVS dosud brání provedení rozsáhlejších studií. Z těchto důvodů jsme pro hledání nových základních struktur ligandů TLR4 využily při SBVS jednodušší flexibilní molekulární docking.[P15,P16]

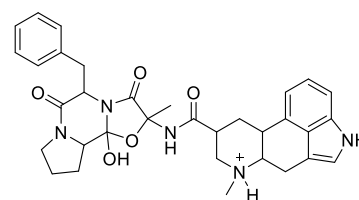
Základem hledání nových základních struktur ligandů TLR4 byla hierarchická kombinace LBVS a SBVS.³⁷² LBVS byl proveden v programu Screening Assistant 2, do kterého bylo naimportováno 130 000 náhodně vybraných ligandů z databáze zinc.dockin.org. Z této virtuální knihovny bylo vybráno celkem 9 000 látek, které vykazaly vůči známým ligandům TLR4 (tj. agonistů i antagonistů) Tanimotův index podobnosti vyšší než 0.7. K prohledání virtuální ligandové databáze byly použity např. tyto látky: fentanyl, morfin, mianserin, imipramin, ibudilast. K těmto 9 000 látkám bylo přidáno 200 látek, které byly připraveny v našich laboratořích, a 100 dalších látek bylo navrženo intuitivně podle dostupné odborné literatury zaměřené na téma modulátory TLR4. Celkem bylo tedy pro SBVS připraveno 10 000 modelů látek.

SBVS byl proveden paralelizovaně programem Vina s využitím X-ray modelu TLR4/MD2 (pdb id: 4G8A) na superpočítačích Anselm a Salomon (IT4Innovations). Flexibilní část receptoru zahrnovala 32 reziduí a celkově si SBVS formou flexibilního dockingu vyžádal 500 000 jádrohodin. Ligandy byly protonovány v programu OpenBabel pro pH = 7.4. Po výpočtu vazebné energie všech 10 000 ligandů byly vybrány nejvýhodnější základní struktury pro další optimalizaci. Pro první sérii optimalizací byla vybrány dvě struktury s nejnižší nalezenou vazebnou energií (tj. derivát sukcinimidu a derivát tryptaminu) (Obr. 48).

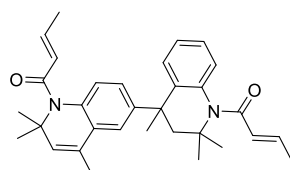


$\Delta G = -15.1$ kcal/mol
 ClogP = 4.91
 MW = 484.555 g/mol
 HBD = 1
 HBA = 3
 TPSA = 66.48 Å²

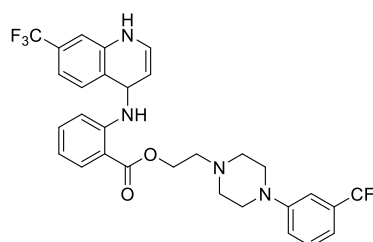
$\Delta G = -14.3$ kcal/mol
 ClogP = 6.80
 MW = 436.592 g/mol
 HBD = 1
 HBA = 2
 TPSA = 37.38 Å²



$\Delta G = -13.9$ kcal/mol
 ClogP = 2.89
 MW = 584.696 g/mol
 HBD = 4
 HBA = 5
 TPSA = 116.41 Å²



$\Delta G = -13.8$ kcal/mol
 ClogP = 6.72
 MW = 482.668 g/mol
 HBD = 0
 HBA = 2
 TPSA = 40.62 Å²

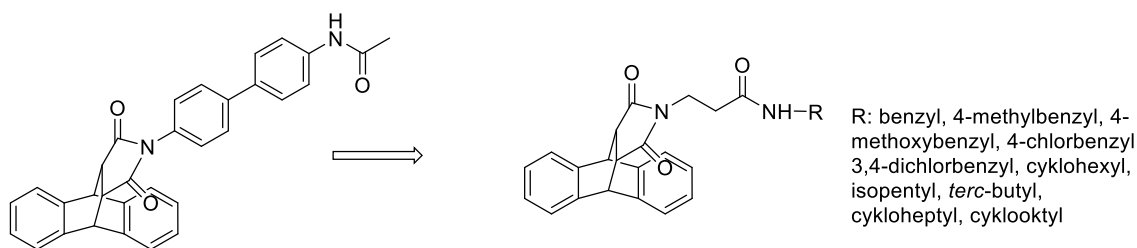


$\Delta G = -13.7$ kcal/mol
 ClogP = 7.00
 MW = 590.570 g/mol
 HBD = 2
 HBA = 5
 TPSA = 56.84 Å²

Obr. 48. Základní struktury nalezené při SBVS s TLR4 jakožto biologickým cílem. Dvě struktury vybrané pro další výzkum jsou orámovány modře. [P15,P16]

Základní struktura odvozena od sukcinimidu splňuje nároky Lipinského pravidla, v případě derivátu tryptaminu je již porušen limit pro ClogP, ale tím ještě není dosaženo vyšší pravděpodobnosti nízké absorpce této látky v organismu. Další vybrané základní struktury ligandů TLR4 mají většinou vyšší lipofilitu, což koresponduje s povahou vazebného místa TLR4, které obsahuje vyšší podíl lipofilních aminokyselin a váže lipofilní PAMP/DAMP.

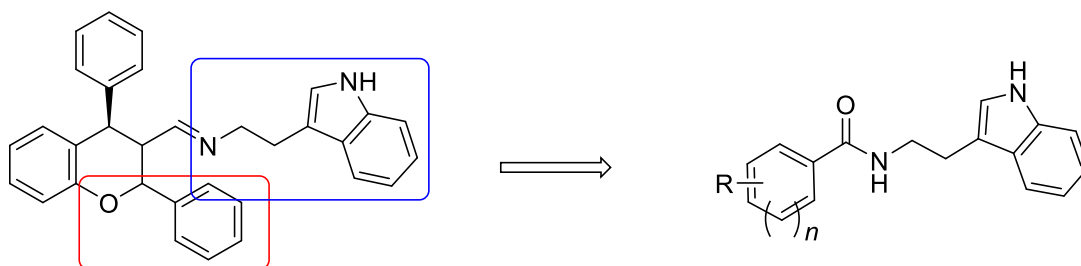
Strukturální obměny derivátu sukcinimidu spočívaly v náhradě *N*-bifenylylacetamidového fragmentu za *N*-benzylbutyramidový zbytek. Celkem bylo v první sérii připraveno s uplatněním klasických medicíně chemických přístupů (např. Toplissova řada substitucí) 11 látek (Obr. 49). Všechny 11 syntetizovaných látek v této studii vyvolávalo pouze antagonistický *in vitro* efekt.



Základní struktura 1

Obr. 49. Navržené strukturální obměny základní struktury 1, která byla označena v SBVS jako potenciální ligand TLR4. [P15]

V další studii modulátorů TLR4 byly provedeny strukturální obměny druhé nejlépe skórované základní struktury, která obsahovala tryptaminový fragment. Cílem bylo zachovat přibližnou mapu rozdělení HBD/HBA, ale snížit přitom lipofilitu struktury (Obr. 50).

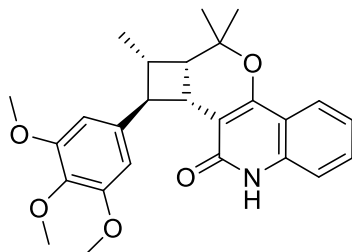


Základní struktura 2

Obr. 50. Navržené strukturální obměny základní struktury 2, která byla označena v SBVS jako potenciální ligand TLR4. [P16]

Substituce byly u zjednodušené struktury amidu tryptaminu provedeny ve fenylové části a celkem bylo syntetizováno nových 13 látek. U sedmi kandidátních struktur byla prokázána vnitřní aktivita a potvrzen agonismus vůči TLR4 *in vitro*. V rámci této práce byla pro všechny připravené látky provedena MD simulace o délce 10 ns a vypočítána vazebná energie ligandů metodou MM/PBSA. MD simulace vodou solvatovaných komplexů ligand-receptor potvrdily jejich termodynamickou stabilitu a vypočítané odhady vazebných energií byly ve srovnání s predikcí pomocí flexibilního molekulárního dockingu v lepší shodě s trendem experimentálně stanovených agonistických aktivit vůči TLR4. MD též odhalila, že agonisté ovlivňují soudružnost TLR4 s MD2 doménou. [P16] Nejvyšší agonistický efekt vůči TLR4 působila látka, která ve struktuře měla skupinu 4-Cl na fenylovém jádře acylové části zjednodušené tryptaminové základní struktury (tj. agonistická aktivita na úrovni cca 20 % monofosforyllipidu A, MPLA).

V rámci výzkumu agonistů TLR4 byla rovněž provedena QSAR studie 56 derivátů euodeninu A (Obr. 51).³⁷³ Studie měla spíše pomocný charakter pro náš výzkum, protože bylo nutné prozkoumat vlastnosti většího množství agonistů TLR4, které jsme neměli k dispozici.[P17]



ClogP = 4.0
MW = 435.52 g/mol
HBD = 1
HBA = 5
TPSA = 66.0 Å²

euodenin A, TLR4 agonista, EC₅₀ = 3.9μM

Obr. 51. *Struktura agonisty TLR4 euodeninu A, jehož 56 derivátů bylo podrobena QSAR analýze.*[P17]

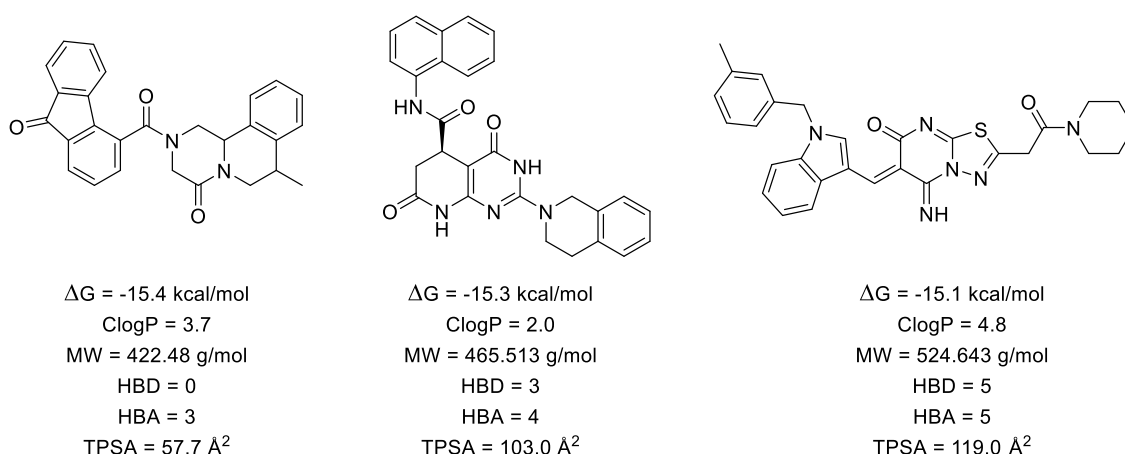
56 struktur derivátů euodeninu A a jejich agonistické aktivity vůči TLR4 byly tedy vzaty z literatury.³⁷³ Všechny tyto látky byly nejprve modelovány v programu HyperChem 8.0, geometricky optimalizovány ve vakuu semiempirickou metodou PM3 a Polak-Ribiérovým konjugovaným gradientem, a následně reoptimalizovány v Gaussianu 09 pomocí DFT metody m062x/6-311++G(d,p) s implicitní simulací vodního prostředí (self consistent reaction field, SCRF). Takto získané struktury byly použity v programu Dragon 6 k výpočtu 4885 molekulárních deskriptorů.

Matice molekulárních deskriptorů a vektor biologických aktivit byly zpracovány speciální neuronovou sítí: optimální chirurg mozku (optimal brain surgeon, OBS).[P17] Kvalita OBS QSAR modelu byla porovnána s QSAR analýzami provedenými klasickými dvou a třívrstevnými perceptronovými sítěmi s hyperbolickou tangentní sigmoidou jako transferovou funkcí. Z 56 látek bylo pro trénovací množinu vybráno náhodně 39 látek. K trénování perceptronových neuronových sítí bylo použito 10 rozdílných algoritmů. OBS QSAR model se ukázal ve srovnání s klasickými perceptronovými sítěmi jako výhodnější, protože poskytl poměrně nekomplexní síť s nejnižší střední chybou predikce MSE = 0.52 pro validační set. Vyvinutý OBS QSAR model byl v předběžných testech vyhodnocen jako validní a robustní, a může se proto stát zdrojem důležitých informací pro další výzkum modulatorů TLR4. V současné době probíhají další QSAR analýzy derivátů euodeninu A a rovněž jsou připraveny pokročilé molekulárně dynamické simulace (např. steered MD). Cílem bude získat více poznatků o strukturních rysech derivátů euodeninu A, které pravděpodobně působí agonistickou aktivitu vůči TLR4.

5.2. Využití CADD ve výzkumu léčiv proti narkolepsii

Vývoj léčiv narkolepsie, jež jsou cílené na modulaci OX_2R , představuje pro CADD i přes rapidní vývoj počítačových technologií velkou výzvu. V případě tohoto typu receptoru ze skupiny GPCR jsou hlavním úskalím obtíže spojené se simulací agonismu a antagonismu, kde musí být zohledněna nejen Gibbsova vazebná energie modulátorů, ale též jejich vnitřní aktivita. Agonismus a antagonismus mohou být v principu modelovány *in silico*, ale je k tomu nutné dostatečné softwarové a hardwarové vybavení. U transmembránových receptorů, jako je GPCR a TLR4, je proto flexibilní molekulární docking pouze nouzovým CADD řešením, které z množiny virtuálních ligandů vybere ty, které díky svým sterickým a elektronickým parametrům splňují základní předpoklady pro interakci s receptorem v aktivním místě.

S vědomím podstatného zjednodušení byl tedy proveden SBVS, který hledal v knihovně s 1 milionem chemických struktur nejsilněji vázající ligandy OX_2R (pdb id: 4S0V). Využita byla cloudová technologie iStar využívající dokovací aplikaci iDock. [P18] Principem funkce programu iDock je molekulárně mechanicky řízený docking s totálně rigidním receptorem a torzně flexibilními ligandy. iDock je v paralelizované implementaci poměrně výpočetně rychlý, a molekulární docking 1 milionu ligandů mohl být tak dokončen na stroji s 320 CPU jádry za 125 hodin. Podle vypočítaných hodnot skóre bylo vybráno 1 000 ligandů, které byly na superpočítači Salomon redockovány v programu Vina se zahrnutím torzní flexibility 38 aminokyselin z aktivního místa OX_2R (pdb id: 4S0V). Tím bylo dosaženo přesnější odhadu vazebné energie, na jejímž základě mohly být vybrány nejslibnější kandidáty pro OX_2R modulaci. Ukázky třech nejlépe skórovaných ligandů OX_2R jsou uvedeny na Obr. 52.

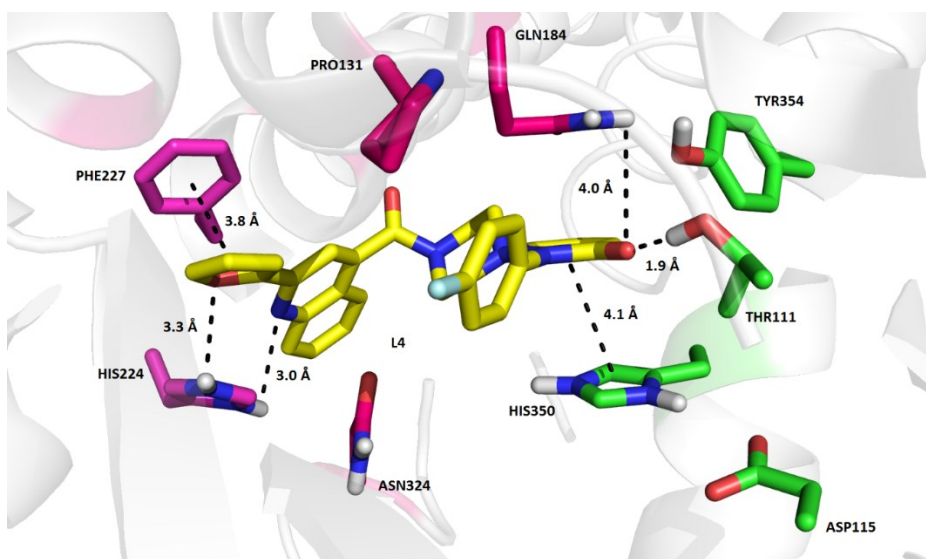


Obr. 52. Ukázky třech ligandů s relativně významnou vazebnou energií k OX_2R (pdb id: 4S0V). [P18]

Struktury nejlépe skórovaných ligandů s predikovanou vazebnou energií v rozsahu –15.4 až –13.0 kcal/mol byly hledány v databázích látek a katalozích komerčních prodejců.

Některé struktury s optimální vazebnou energií k OX₂R však nebyly dostupné, protože dodavatelé přerušily jejich výrobu. Zakázková syntéza pro nás nebyla finančně možná. Z tohoto důvodu bylo zakoupeno u obchodních společností několik látek, u nichž byla v rámci SBVS predikovaná vazebná energie nad nalezeným minimem -15.4 kcal/mol. Nejlépe skórované látky byly nahrazeny strukturami, které vzhledem k nim vykazovaly nejvyšší Tanimotův index podobnosti v databázi látek společnosti Mcule. Pro tyto náhrady byla pomocí flexibilního molekulárního dockingu v programu Vina vypočítána vazebná energie vůči OX₂R. Pokud byla predikovaná vazebná energie < -13.0 kcal/mol, náhrada byla zakoupena.

V další studii bylo tedy vybráno, zakoupeno a testováno *in vitro* celkem 11 potenciálních modulátorů OX₂R. [P19] *In vitro* experimenty prokázaly, že v této skupině vybraných látek nebyl žádný agonista, pouze několik látek vykazovalo antagonistický účinek. Nejnižší hodnota IC₅₀ = 2.2 ± 0.47 μM byla stanovena pro látku L4, u níž byla pomocí flexibilního dockingu v programu Vina predikována vazebná energie -15.0 kcal/mol (Obr. 53).



Obr. 53. Predikovaný vazebný mód látky L4 v aktivním místě OX₂R (pdb id: 4S0V), která vykazovala poměrně významný antagonistický efekt. [P19]

V této SBVS studii se potvrdilo, že silná *in silico* vazebná energie ligandu k receptoru není postačující podmínkou pro vyvolání agonistického efektu v OX₂R. Určitý vodítkem pro predikci agonismu může být analýza vazebného módu, který byl určen molekulárním dockingem. Podle kvalitativních představ o aktivaci OX₂R je nutné, aby ligand interagoval v aktivním místě receptoru s určitými rezidui (např. Thr111, Asp115, His350 a Tyr354 u modelu OX₂R pdb id: 4S0V). [P19] Analýza vazebných módů by tedy mohla odhalit potenciální agonisty, ale je nutné tuto hypotézu ještě důkladně ověřit.

Velmi důležitou skutečností, která je v CADD poměrně častá, bylo zjištění, že suvorexant byl v rámci této metodiky charakterizován predikovanou vazebnou energií -12.5 kcal/mol, přičemž jeho IC_{50} vůči OX_2R je 71 ± 1.3 nM. Tyto hodnoty jsou s hodnotami vazebné energie a IC_{50} pro látku **L4** ve značném kontrastu. Rozdíl IC_{50} ve třech řádech by se měl projevit u suvorexantu navýšením predikované vazebné energie o zhruba 4 kcal/mol ve srovnání s **L4**. Nic takového ale nebylo pozorováno. Nízkou absolutní hodnotu predikované vazebné energie pro suvorexant bychom mohli interpretovat přítomností tzv. těsně vázané vody, která v molekulárním dockingu nemohla být simulována. Z vazebného modu suvorexantu v modelu pdb id: 4S0V je patrné, že pravděpodobně 2 molekuly vody se podílejí na stabilizaci nevazebné interakce s receptorem OX_2R . Přítomnost dalších vodíkových vazeb zesiluje vazebnou energii, ale tento příspěvek by se mohl projevit u všech studovaných ligandů, které mají HBD/HBA. Z tohoto důvodu je potřeba vliv těsně vázané vody ve vazebném modu ověřit např. pomocí molekulárně dynamické studie s následným MM/PBSA či FEP výpočtem volné Gibbsovy energie.

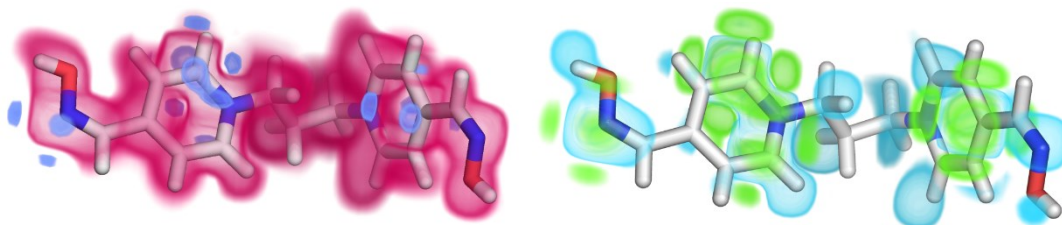
5.3. Využití CADD ve výzkumu reaktivátorů inhibovaných cholinesteras

Současná situace ve vývoji a výzkumu reaktivátorů cholinesteras AChE a BuChE inhibovaných organofosforovými látkami je taková, že se hledají nové struktury, které jsou schopné účinně prostupovat přes hematoencefalickou bariéru, mají reaktivační schopnost pro širší spektrum inhibovaných AChE/BuChE a dokážou obnovit jejich enzymatickou funkci i poté, co došlo k tzv. zestárnutí inhibovaného komplexu.³⁴⁰

Poměrně velkou měrou přispívají k výzkumu reaktivátorů inhibovaných cholinesteras *in silico* metody, které např. odhalují mechanismus reaktivace a vliv proximity reziduí v kavitě enzymů na rychlost či energetické podmínky reaktivace. Předpokládá se, že faktory proximity v kavitě těchto enzymů se významně podílejí na stabilizaci transitních stavů, které se nacházejí na reakční koordinátě během reaktivace. Díky těmto nekovalentním interakcím mezi reaktivátory, rezidui v kavitě enzymu a fosforylovaným serinem je možné předpokládat, že lze odvodit např. statisticky významné 3D QSAR modely pro predikci reaktivační schopnosti na základě analýzy molekulárních interakčních polí struktur reaktivátorů. Z pohledu kvantově-chemického je ale důležité rovněž zohlednit vliv faktorů proximity v kavitě enzymů na nukleofilitu a bazicitu reaktivátorů. Je předmětem intenzivního výzkumu, jak se při reaktivaci uplatňuje vazebná afinita reaktivátorů

k AChE/BuChE a jejich kvantově-chemicky chápaná reaktivita. Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.6., pokud se predikuje aktivační energie pouze mezi fosforylovaným serinem a reaktivátorem a zvláště se odvodí nekovalentní vazebná energie mezi reaktivátorem a aktivním místem AChE/BuChE v pozici NAC pomocí molekulárního dockingu, lze odvodit QSPR model reaktivační schopnosti, v kterém má příspěvek aktivační energie dvakrát vyšší hodnotu než příspěvek vazebné energie.³⁵⁶ Tento model by ale bylo nutné ještě ověřit dalšími *in silico* studiemi. Zdá se však pravděpodobné, že vazebná afinita reaktivátorů hraje při procesu reaktivače důležitou roli. Polární a ionizované funkční skupiny v kavitě AChE/BuChE zcela jistě ovlivňují distribuci elektronové hustoty v reaktivátorech, a tím zásadně ovlivňují jejich reaktivační schopnosti.

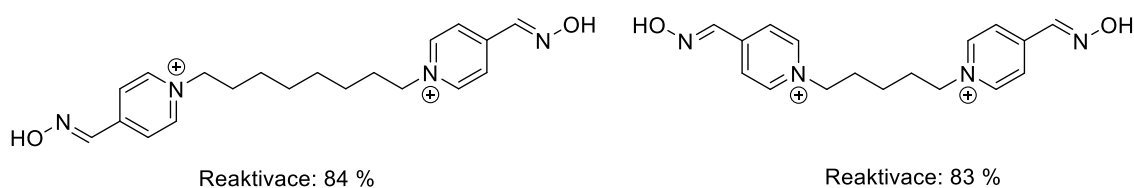
V rámci výzkumu reaktivátorů byla tedy provedena 3D QSAR analýza vybraných biskvarterních pyridiniových aldoximů. Do studie bylo zahrnuto celkem 29 látek, přičemž byla analyzována jejich reaktivační schopnost vůči potkaní (*Rattus norvegicus*) AChE, která byla inhibovaná látkou VX.[P20] Vstupní molekulární modely všech studovaných látek byly připraveny v programu HyperChem 7.52. Následovala příprava knihoven konformerů metodou zhášené molekulární dynamiky (quenched molecular dynamics) v programu Open3DAlign s využitím aplikace Tinker, seřazení molekul různými algoritmy, výpočet různých typů molekulárních interakčních polí (např. van der Waalsovo pole, elektrostatické pole odvozené z elektronové hustoty dle metody B3LYP/6-31G*) a PLS analýza (Obr. 54).



Obr. 54. Ukázka van der Waalsova (vlevo) a elektrostatického (vpravo) molekulárního interakčního pole pro vybraný bispyridiniumaldoximový reaktivátor.[P20]

Pro PLS analýzu byly použity některé pokročilé techniky pro odstraňování šumu v datech (např. iterativní eliminace proměnných, eliminace neinformačních proměnných).^{139, 374} Odvozené 3D QSAR modely byly kros-validovány metodami LOO, L20%O a ověřeny predikcí reaktivačních potencií v externím setu. Dále byly modely testovány pomocí metody scrambling. Ukázalo se, že metody pro odstranění šumu v datech mohou podstatně zlepšit prediktivnost a robustnost odvozených modelů. Nalezené 3D QSAR modely byly statisticky významné a byly použity při predikci reaktivační schopností další reaktivátorů. Nejvýhodnější reaktivační vlastnosti byly identifikovány 3D QSAR

modelem se 4 latentními proměnnými u bispyridiniových reaktivátorů, které měly v polohách 4 a 4' aldoximovou skupinu a atomy dusíku byly propojeny uhlíkovým řetězcem s 5 nebo 8 uhlíkovými atomy (Obr. 55).



Obr. 55. Aldoximové reaktivátory a jejich vypočítané reaktivační schopnosti vůči AChE z potkana, která byla inhibována látkou VX. K predikci byl využit 3D QSAR model se 4 latentními proměnnými. [P20]

Mapy směrodatnou odchylkou vážených pseudo-beta koeficientů, které byly odvozeny PLS, po promítnutí do 3D prostoru molekulárních intrakčních polí ukázaly statisticky významné regiony v molekulách, jejich van der Waalsův či elektrostatický potenciál nejvýše ovlivňuje reaktivační schopnost studovaných látek. Šlo zejména o oblasti kolem aldoximové skupiny.

V této 3D QSAR studii byl také analyzován přeložený set molekul, který byl získán flexibilním molekulárním dockingem v potkaní AChE (pdb id: 2U2Y). Tento ligandový set však vykazoval hodnotu RMSD = 145.76 Å, což je mnohonásobně více, než bylo vypočítáno pro set odvozený překládacím algoritmem (RMSD = 9.6 Å), a proto nebyl tento 3D QSAR model akceptován. 3D QSAR model odvozený klasickým překládacím algoritmem byl potvrzen, jako statisticky signifikantní.

Další studie, které byly provedeny v oblasti výzkumu reaktivátorů v rámci naší pracovní skupiny, představovaly především molekulární docking. Získané výsledky ukazují, že vazebná energie a způsob interakce reaktivátorů s rezidui v aktivním místě AChE/BuChE může podílet ovlivňovat velikost výsledné reaktivační schopnosti. Vlastní kvantitativní model reaktivity zahrnující predikovanou vazebnou energii ale zatím objeven a validován nebyl.

6. ZÁVĚR A MOŽNÉ SMĚŘOVÁNÍ DALŠÍHO VÝZKUMU

Za posledních 7 let bylo v naší pracovní skupině synteticky připraveno několik stovek látek, které byly následně testovány *in vitro* vůči biologickým cílům, jako jsou např. AChE, BuChE, TLR4 či OX₂R. Řada látek byla rovněž ověřena *in vivo* experimenty, kde prokázala akceptovatelnou toxicitu a uspokojivý farmakologický profil. V jejich designu se ve většině případů uplatnily klasické principy medicíně chemie (např. zdvojení molekuly, hybridizace různých farmakoforů, substituční obměny v duchu Toplissovy filosofie), neboť předlohy struktury již byly dané (např. struktura takrinu). S progresivní dynamikou jsme ale do tohoto klasického designu léčiv nechali vstoupit CADD metody, kterými bylo postupně ověřeno několik milionů látek. CADD metodami byly odhaleny základní struktury modulátorů výše zmíněných biologických cílů, které nyní analyzujeme pomocí pokročilejších technik (např. MM/PBSA/MD). V počátečních etapách CADD jsme tedy používali jednodušší výpočetní metody, abychom dosáhli vyšší rychlosti. Po získání zpětné vazby biochemickými experimenty jsme zařadili přesnější a náročnější metody CADD.

Pro základní hodnocení vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou jsme využívali zejména molekulární docking a QSAR analýzy, které bylo možné provést na našich počítačích. Vysvětlení biologické aktivity pomocí molekulárního dockingu spočívalo v objasnění intermolekulárních interakcí mezi ligandem a biologickým cílem ve smyslu popisu geometrického uspořádání a energetické bilance vazebného modu. V případě QSAR analýz se jednalo o statistický důkaz, že pozorovanou biologickou aktivitu je možné brát jako matematickou funkci některých specifických vlastností ligandů. Tyto základní principy interpretace platí pro všechny CADD metody.

Integrace náročných CADD metod do našeho výzkumu byla již závislá na získání projektů na českých superpočítačích a gridových sítích. Zejména superpočítač Salomon, s kterým jsme měli možnost provádět výzkum v rozsahu milionů jádrohodin, představuje prozatím v České republice unikátní technologické řešení, které může potřeby CADD dostatečně uspokojit. Díky dostupnosti těchto informačních technologií pro vědeckou veřejnost jsme mohli provést SBVS, a v některých případech i velmi důležité molekulárně dynamické simulace. Výsledky získané v těchto *in silico* studiích však ještě nebyly všechny publikovány a o některých se nepíše ani v této habilitační práci (např. o inhibitech cathepsinu B).

Z vědeckého pohledu na aplikaci CADD v oblasti AD se zdají nejvíce perspektivními ty metody designu, které simultánně optimalizují aktivitu látek vůči několika biologickým cílům (tzv. MTDL). Velkou pozornost ve vývoji anti- Alzheimerik si dále zaslouží látky, které dokážou tlumit hyperfosforylaci tau proteinů. Amyloidová hypotéza na druhou stranu

postupně ztrácí na své vědecké přitažlivosti, neboť se objevují četné kritické studie, které tuto hypotézu stále více zpochybňují. Vytrvalému zájmu se těší také komplexní vývoj nových reverzibilních inhibitorů AChE, ke kterým se pomocí metod farmaceutické chemie přidávají další farmakofory schopné kupříkladu deaktivovat reaktivní formy kyslíku či dusíku. Lze říci, že bádání po nových, multipotentních inhibitech AChE je již dobře zavedenou technikou, která by díky systematickosti zkoumání chemického prostoru mohla přinést v brzké budoucnosti zajímavé výsledky pro léčbu AD.

Naproti tomu CADD agonistů TLR4 a OX₂R se zaměřuje na oblast chemického prostoru, který je nutné ještě důkladně prozkoumat, protože základních či předlohových struktur se vztahem k těmto biologickým cílům je známo poměrně málo. Je ovšem pravda, že výzkum a vývoj bioaktivních struktur probíhá všemi možnými způsoby a množství relevantních informací roste v čase geometrickou řadou. Vedle molekulárně mechanických metod, které se využívají k virtuálnímu screeningu, jsou rovněž důležité kvantově chemické studie zaměřené na analýzu mechanismu účinku aktivních ligandů výše uvedených receptorů. Často se totiž setkáváme s fundamentální kritikou, že majoritně používané přístupy v SB CADD nedokážou správně predikovat hodnoty, jako jsou IC₅₀ a EC₅₀. Velmi důležité je proto revidovat výpočetní strategie, které např. predikují Gibbsovu energii. Je nutné také reagovat na skutečnost, že se v CADD s určitou samozřejmostí neoprávněně spoléhá např. na predikci π - π interakcí molekulárně mechanickými metodami nebo na výpočet Gibbsovy energie bez uvažování vody, iontů, entropických efektů apod. Tento problém je především dán kompromisy mezi správností a náročností používaných výpočetních metod.³⁷⁵

S těmito argumenty je možné přistoupit i k otázce simulace reaktivace cholinesteras, které byly inhibovány organofosforovými sloučeninami. Cílem v této oblasti výzkumu se stalo vyvinutí bioaktivní látky, která bude působit jako univerzální, centrálně aktivní antidotum pro otravu jakýmkoli organofosforovými sloučeninami. Předpokladem CADD reaktivátorů je, že se využívá metodika schopná spolehlivě ověřit, jak daná látka reaktivuje fosforylovaný serin cholinesteras. Jak již bylo diskutováno v předchozích kapitolách, simulaci reaktivace lze ale náležitě provést jen s využitím kvantově chemických výpočetních metod. Dále je nutné zahrnout efekty proximity nekovalentně vázaných atomů v kavitě enzymů, efekty rozpouštědla, iontů, vliv teploty a zvážit možnost reverze reaktivace. Tyto požadavky tedy volají po aplikaci kvantově chemické dynamiky na makromolekulární systémy.

Lze očekávat v brzké budoucnosti, že se interakce mezi ligandem a biologickým cílem budou studovat pomocí kvantově chemických metod, které simulují biochemické procesy za fyziologických podmínek. Studie, které by prováděly např. kvantově chemický docking, jsou prozatím velice vzácné, ale mohly by přinést razantní zvýšení správnosti

predikovaných biologických aktivit. Správnost, rychlost a rovněž ekonomická přiměřenost se mi tedy jeví jako důležité pracovní cíle, o které je v CADD nutné usilovat.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(i)A β	(intracelulární) amyloid beta
ABAD	A β vázající alkoholdehydrogenasa
AD	Alzheimerova nemoc (Alzheimer's diseases)
AChE	acetylcholinesterasa, pokud není uvedeno jinak, myslí se lidská verze
ANN	umělé neuronové sítě (artificial neural networks)
BACE-1	beta sekretasa 1 (beta-secretase 1)
BBB	hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
BD	zadní dveře (back door)
BFEL	plocha vazebné volné energie (binding free-energy landscape)
BuChE	butyrylcholinesterasa, pokud není uvedeno jinak, myslí se lidská verze
CADD	počítačem asistovaný návrh léčiv (computer-aided drug design)
CB	cathepsin B
CBV	Centrum biomedicínského výzkumu
CD14	shluk diferenciacie 14 (cluster of differentiation 14)
CDK5	cyklindependentní kinasa 5
ClogP	vypočítané log P
COMT	katechol- <i>o</i> -methyltransferasa (catechol- <i>o</i> -methyltransferase)
CPU	centrální procesorová jednotka
CSF	cerebrospinální tekutina
cypD	cyklofylin D
DAMP	molekulární vzory poškození (damage-associated molecular patterns)
DFT	teorie funkcionálu elektronové hustoty (density functional theory)
DORA	duální antagonist orexinových receptorů
DUD-E	posílená databáze účinných návnad (database of useful decoys – enhanced)
EC ₅₀	koncentrace láky, která působí 50% nárůst aktivity enzymu nebo receptoru
ECL x	extracelulární smyčka x (extra-cellular loop)
EDS	nadměrná denní spavost (excessive day sleepiness)
FBLD	fragmentově založený objev předlohové struktury (fragment-based lead discovery)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FEP	perturbace volné energie (free-energy perturbation)
FMO	metoda fragmentů molekulárních orbitalů (fragment orbital method)
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem (G-protein coupled receptor)
GPU	grafická procesorová jednotka
GSK3 β	glykogensynthasa-kinasa 3 β
H2L	optimalizace základní struktury na předlohovou strukturu (hit to lead)
HBA/HBD	akceptory/donory vodíkové vazby (hydrogen bond acceptors/donors)
HM	homologní modelování
HPC	vysoce účinné výpočty (high-performance computing)
HTS	vysoko-propustný screening (high throughput screening)
CHO	ovariální buňky čínské křečka (Chinese hamster ovary)
IC ₅₀	koncentrace láky, která působí 50% pokles aktivity enzymu
L2D	optimalizace předlohové struktury na léčivo (lead to drug)
LB	ligandově založený (ligand based)
LBVS	ligandově založený virtuální screening (ligand-based virtual screening)
LFER	lineární vztahy pro volnou energii (linear free-energy relationships)
LOO	kros-validační technika, vypouštění jednoho objektu (leave-one-out)
Lx%O	kros-validační technika, vypouštění x % objektů (leave-x%-out)
MAO-A/B	monoaminoxidasa A/B
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa (mitogen-activated protein kinase)
MD	molekulární dynamika
MIF	molekulární interakční pole (molecular interaction field)
MLR	několikanásobná lineární regrese (multiple linear regression)
MM	molekulární mechanika (molecular mechanics)
MM/PBSA	molekulárně mechanická metoda Poisson-Boltzmannovi plochy povrchu
MPI	rozhraní pro posílání zpráv (message passing interface)

MPO	multiparametrová optimalizace (multi-parameter optimization)
mPTP	mitochondriální pór permeačního prostupu (mitochondrial permeability transition pore)
MTDL	ligand zaměřený na více cílů (multi-target directed ligand)
mt-QSAR	QSAR model pro více biologických cílů (multi-targeted QSAR)
MW	molární hmotnost
NAC	konformace blízká ataku (near-attack conformation)
NAD(+)	nikotinamidinukleotid
<i>n</i> D QSAR	<i>n</i> -rozměrný QSAR
NDMA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartát
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NME	nová molekulární entita
NTF	neurofibrilární klubíčka (neurofibrillar tangles)
NUMA	nejednotný přístup k paměti (non-uniform memory access)
OBS	optimální chirurg mozku (optimal brain surgeon)
OX ₁ R	orexinový receptor 1
OX ₂ R	orexinový receptor 2
OXA	orexinový peptid A
OXB	orexinový peptid B
PAINS	látky, které interferují ve všech analýzách (pan-assay interference compounds)
PAMP	molekulární vzory patogenů (pathogen-associated molecular patterns)
PDB	on-line proteinová databanka
pdb id	identifikátor struktury v PDB
pIC ₅₀	záporný dekadický logaritmus IC ₅₀
PIE	párová interakční energie (pair interaction energy)
PLS	metoda projekce latentních struktur (projection of latent structures)
QM	kvantová mechanika (quantum mechanics)
QSAR	kvantitativní vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou (quantitative structure-activity relationships)
QSPR	kvantitativní vztahy mezi strukturou a vlastnostmi (quantitative structure-property relationships)
REM	rychlý pohyb očí (rapid eye movement)
REOS	filtr pro rychlé odstranění nečistot (rapid elimination of swill)
RMSD	odmocněná střední kvadratická distance (root mean square distance)
ROC	charakteristika operačního přijetí (receiver operating characteristics)
ROS/RNS	reaktivní formy kyslíku/dusíku (reactive oxygen/nitrogen species)
SB	strukturně založený (structure based)
SBVS	strukturně založený virtuální screening (structure-based virtual screening)
SD	boční dveře (side door)
SPR	metoda rezonance povrchových plazmonů (surface plasmon resonance)
SSRI	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (selective serotonin reuptake inhibitor)
SVM	metoda podpůrných vektorů (support vector machine)
TCM	tradiční čínská medicína (Traditional Chinese Medicine)
TLR4	toll-like receptor 4
TM x	transmembránový segment x
TPSA	topologická polární plocha povrchu (topological polar surface area)
UMA	jednotný přístup k paměti (uniform memory access)
VS	virtuální screening
VX	bojová chemická látka s označením VX
τ _{p(H)}	tau protein (hyperfosforylovaný)

8. LITERATURA

8.1. Citace vlastních prací

- P1.** [Dolezal, R.](#); Sobeslav, V.; Hornig, O.; Balik, L.; Korabecny, J.; Kuca, K. HPC Cloud Technologies for Virtual Screening in Drug Discovery. In: Nguyen N., Trawiński B., Kosala R. (eds.) Intelligent Information and Database Systems. ACIIDS 2015. *Lecture Notes in Computer Science*, **2015**, 9012, 440–449.
- P2.** [Dolezal, R.](#); Ramalho, T. C.; França, T. C.; Kuca, K. Parallel Flexible Molecular Docking in Computational Chemistry on High Performance Computing Clusters. In: Núñez M., Nguyen N., Camacho D., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. *Lecture Notes in Computer Science* **2015**, 9330, 418–427.
- P3.** [Dolezal, R.](#); Melikova, M.; Mesicek, J.; Kuca, K. Rational Discovery of GSK3-Beta Modulators Aided by Protein Pocket Prediction and High-Throughput Molecular Docking. In: Nguyen N., Iliadis L., Manolopoulos Y., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. ICCCI 2016. *Lecture Notes in Computer Science* **2016**, 9876, 429–439.
- P4.** [Dolezal, R.](#); Soukup, O.; Malinak, D.; Savedra, R. M. L.; Marek, J.; Dolezalova, M.; Pasdiorova, M.; Salajkova, S.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Ramalho, T. C.; Kuca, K. Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 121, 699-711.
- P5.** [Dolezal, R.](#); Waisser, K.; Petrlikova, E.; Kunes, J.; Kubicova, L.; Machacek, M.; Kaustova, J.; Dahse, H. M. N-Benzylsalicylthioamides: Highly Active Potential Antituberculotics. *Archiv Der Pharmazie* **2009**, 342, 113-119.
- P6.** [Dolezal, R.](#); Van Damme, S.; Bultinck, P.; Waisser, K. QSAR analysis of salicylamide isosteres with the use of quantum chemical molecular descriptors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44, 869-876.
- P7.** [Dolezal, R.](#); Trejbal, J.; Mesicek, J.; Milanov, A.; Racakova, V.; Krenek, J. Designing QSAR Models for Promising TLR4 Agonists Isolated from *Euodia Asteridula* by Artificial Neural Networks Enhanced by Optimal Brain Surgeon. In: Nguyen N., Iliadis L., Manolopoulos Y., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. ICCCI 2016. *Lecture Notes in Computer Science* **2016**, 9876, 271–281.
- P8.** Waisser, K.; Adamec, J.; [Dolezal, R.](#); Kaustova, J. 1-Aryl-5-benzylsulfanyltetrazoles, a new group of antimycobacterial compounds against potentially pathogenic strains. *Folia Microbiologica* **2005**, 50, 195-197.
- P9.** Waisser, K.; [Dolezal, R.](#); Palat, K.; Cizmarik, J.; Kaustova, J. QSAR study of antimycobacterial activity of quaternary ammonium salts of piperidinylethyl esters of alkoxy-substituted phenylcarbamic acids. *Folia Microbiologica* **2006**, 51, 21-24.
- P10.** Waisser, K.; Matyk, J.; Kunes, J.; [Dolezal, R.](#); Kaustova, J.; Dahse, H. M. Highly Active Potential Antituberculotics: 3-(4-Alkylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 3-(4-Alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones Substituted in Ring-B by Halogen. *Archiv der Pharmazie* **2008**, 341, 800-803.
- P11.** Imramovsky, A.; Vinsova, J.; Ferriz, J. M.; [Dolezal, R.](#); Jampilek, J.; Kaustova, J.; Kunc, F. New antituberculotics originated from salicylanilides with promising in vitro activity against atypical mycobacterial strains. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, 3572-3579.
- P12.** Petrlikova, E.; Waisser, K.; [Dolezal, R.](#); Holy, P.; Gregor, J.; Kunes, J.; Kaustova, J. Antimycobacterial 3-phenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones substituted on phenyl and benzoxazine moiety in position 6. *Chemical Papers* **2011**, 65, 352-366.

- P13.** Nesmerak, K.; [Dolezal, R.](#); Hudska, V.; Bartl, J.; Sticha, M.; Waisser, K. Quantitative Structure-Electrochemistry Relationship of 1-Phenyl-5-benzyl-sulfanyltetrazoles and Their Electrooxidation as a Metabolic Model. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 2117-2122.
- P14.** Soukup, O.; [Dolezal, R.](#); Malinak, D.; Marek, J.; Salajkova, S.; Pasdiorova, M.; Honegr, J.; Korabecny, J.; Nachtigal, P.; Nachon, F.; Jun, D.; Kuca, K. Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *24*, 841-8.
- P15.** [Dolezal, R.](#); Krenek, J.; Racakova, V.; Karaskova, N.; Maltsevskaya, N. V.; Melikova, M.; Kolar, K.; Trejbal, J.; Kuca, K. ANN and GMDH Algorithms in QSAR Analyses of Reactivation Potency for Acetylcholinesterase Inhibited by VX Warfare Agent. In: Nguyen N., Iliadis L., Manolopoulos Y., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. ICCCI 2017. *Lecture Notes in Computer Science* **2017**, *10449*, 171-181.
- P16.** [Dolezal, R.](#); Korabecny, J.; Malinak, D.; Honegr, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Ligand-Based 3D QSAR Analysis of Reactivation Potency of Mono- and Bis-Pyridinium Aldoximes toward VX-Inhibited Rat Acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2015**, *56*, 113-129.
- P17.** Gorecki, L.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Malinak, D.; Nepovimova, E.; [Dolezal, R.](#); Jun, D.; Soukup, O.; Kuca, K. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Archives of Toxicology* **2016**, *90*, 2831-2859.
- P18.** de Almeida, J.; Cavalcante, S. F. A.; [Dolezal, R.](#); Kuca, K.; Musilek, K.; Jun, D.; Franca, T. C. C. Molecular modeling studies on the interactions of aflatoxin B1 and its metabolites with the peripheral anionic site of human acetylcholinesterase. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2018**, *37(8)*, 2041-2048.
- P19.** de Almeida, J.; [Dolezal, R.](#); Krejcar, O.; Kuca, K.; Musilek, K.; Jun, D.; Franca, T. C. C. Molecular Modeling Studies on the Interactions of Aflatoxin B1 and Its Metabolites with Human Acetylcholinesterase. Part II: Interactions with the Catalytic Anionic Site (CAS). *Toxins* **2018**, *10*, 389-400.
- P20.** Sepsova, V.; Karasova, J. Z.; Korabecny, J.; [Dolezal, R.](#); Zemek, F.; Bennion, B. J.; Kuca, K. Oximes: inhibitors of human recombinant acetylcholinesterase. A structure-activity relationship (SAR) study. *International journal of molecular sciences* **2013**, *14*, 16882-900.
- P21.** Korabecny, J.; [Dolezal, R.](#); Cabelova, P.; Horova, A.; Hrubá, E.; Ricny, J.; Sedlacek, L.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Andrs, M.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Sepsova, V.; Ripova, D.; Kuca, K. 7-MEOTA–Donepezil like Compounds as Cholinesterase Inhibitors: Synthesis, Pharmacological Evaluation, Molecular Modeling and QSAR Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *82*, 426-438.
- P22.** Korabecny, J.; Andrs, M.; Nepovimova, E.; [Dolezal, R.](#); Babkova, K.; Horova, A.; Malinak, D.; Mezeiova, E.; Gorecki, L.; Sepsova, V.; Hrabínova, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Kuca, K. 7-Methoxytacrine-p-Anisidine Hybrids as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Molecules* **2015**, *20* (12), 22084-22101.
- P23.** Nepovimova, E.; Korabecny, J.; [Dolezal, R.](#); Babkova, K.; Ondrejicek, A.; Jun, D.; Sepsova, V.; Horova, A.; Hrabínova, M.; Soukup, O.; Bukum, N.; Jost, P.; Muckova, L.; Kassa, J.; Malinak, D.; Andrs, M.; Kuca, K. Tacrine–Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58* (22), 8985-9003.
- P24.** Hepnarova, V.; Korabecny, J.; Matouskova, L.; Jost, P.; Muckova, L.; Hrabínova, M.; Vykoukalova, N.; Kerhartova, M.; Kucera, T.; [Dolezal, R.](#); Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Mezeiova, E.; Pham, N.; Jun, D.; Staud, F.; Kaping, D.; Kuca, K.; Soukup, O. The Concept of Hybrid Molecules of Tacrine and Benzyl Quinolone Carboxylic Acid (BQCA) as Multifunctional Agents for Alzheimers Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *150*, 292-306.
- P25.** Benek, O.; Musilek, K.; Horova, A.; Dohnal, V.; [Dolezal, R.](#); Kuca, K. Preparation, in vitro Screening and Molecular Modelling of Monoquaternary Compounds Related to the Selective Acetylcholinesterase Inhibitor BW284c51. *Medicinal Chemistry* **2014**, *11(1)*, 21-29.

- P26.** Spilovska, K.; Korabecny, J.; Horova, A.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Drtinova, L.; Gazova, Z.; Siposova, K.; [Dolezal, R.](#); Jun, D.; Kuca, K. Design, Synthesis and in Vitro Testing of 7-Methoxytacrine-Amantadine Analogues: a Novel Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Medicinal Chemistry Research* **2015**, *24* (6), 2645–2655.
- P27.** Spilovska, K.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; [Dolezal, R.](#); Mezeiova, E.; Soukup, O.; Kuca, K. Multitarget Tacrine Hybrids with Neuroprotective Properties to Confront Alzheimer's Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2017**, *17*, 1006-1026.
- P28.** Spilovska, K.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Jun, D.; Hrabnova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Soukup, O.; Janockova, J.; Kucera, T.; [Dolezal, R.](#); Mezeiova, E.; Kaping, D.; Kuca, K. Novel Tacrine-Scutellarin Hybrids as Multipotent Anti-Alzheimer's Agents: Design, Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* **2017**, *22* (6), 1006.
- P29.** Chalupova, K.; Korabecny, J.; Bartolini, M.; Monti, B.; Lamba, D.; Caliandro, R.; Pesaresi, A.; Brazzolotto, X.; Gastellier, A.-J.; Nachon, F.; Pejchal, J.; Jarosova, M.; Hepnarova, V.; Jun, D.; Hrabnova, M.; [Dolezal, R.](#); Karasova, J. Z.; Mzik, M.; Kristofikova, Z.; Misik, J.; Muckova, L.; Jost, P.; Soukup, O.; Benkova, M.; Setnicka, V.; Habartova, L.; Chvojkova, M.; Kleteckova, L.; Vales, K.; Mezeiova, E.; Uliassi, E.; Valis, M.; Nepovimova, E.; Bolognesi, M. L.; Kuca, K. Novel Tacrine-Tryptophan Hybrids: Multi-Target Directed Ligands as Potential Treatment for Alzheimers Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *168*, 491–514.
- P30.** Chlebek, J.; Korabecny, J.; [Dolezal, R.](#); Stepankova, S.; Perez, D. I.; Hostalkova, A.; Opletal, L.; Cahlikova, L.; Macakova, K.; Kucera, T.; Hrabnova, M.; Jun, D. In Vitro and In Silico Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Thalictricavine and Canadine and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier. *Molecules* **2019**, *24*, 1340-1351.
- P31.** Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Hepnarova, V.; Jun, D.; [Dolezal, R.](#); Muckova, L.; Jost, P.; Soukup, O.; Janockova, J.; Pham, N. L.; Nguyen, T. D.; Valis, M.; Kuca, K. N-alkylated Tacrine Derivatives as Potential Agents in Alzheimer's Disease Therapy. *Current Alzheimer Reserch* **2019**, *16*, 333-343.
- P32.** Mezeiova, E.; Spilovska, K.; Nepovimova, E.; Gorecki, L.; Soukup, O.; [Dolezal, R.](#); Malinak, D.; Janockova, J.; Jun, D.; Kuca, K.; Korabecny, J. Profiling Donepezil Template into Multipotent Hybrids with Antioxidant Properties. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2018**, *33* (1), 583–606.
- P33.** Mezeiova, E.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Hrabnova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Kucera, T.; [Dolezal, R.](#); Misik, J.; Spilovska, K.; Pham, N.; Pokrievkova, L.; Roh, J.; Jun, D.; Soukup, O.; Kaping, D.; Kuca, K. Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1265.
- P34.** Korabecny, J.; Soukup, O.; [Dolezal, R.](#); Spilovska, K.; Nepovimova, E.; Andrs, M.; Nguyen, T. D.; Jun, D.; Musilek, K.; Kucerova-Chlupacova, M.; Kuca, K. From Pyridinium-based to Centrally Active Acetylcholinesterase Reactivators. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2014**, *14*, 215-221.
- P35.** [Dolezal, R.](#); Karaskova, N.; Musil, K.; Novak, M.; Maltsevskaya, N. V.; Malinak, D.; Kolar, K.; Soukup, O.; Kuca, K.; Karasova, J. Z. Characterization of the Penetration of the Blood-Brain Barrier by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Stationary Phase with an Immobilized Artificial Membrane. *Analytical Letters* **2017**, *51*, 2401-2141.
- P36.** Hroch, L.; Guest, P.; Benek, O.; Soukup, O.; Janockova, J.; [Dolezal, R.](#); Kuca, K.; Aitken, L.; Smith, T. K.; Gunn-Moore, F.; Zala, D.; Ramsay, R. R.; Musilek, K. Synthesis and Evaluation of Frentizole-Based Indolyl Thiourea Analogues as MAO/ABAD Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25* (3), 1143–1152.
- P37.** Benek, O.; Hroch, L.; Aitken, L.; [Dolezal, R.](#); Guest, P.; Benkova, M.; Soukup, O.; Musil, K.; Kuca, K.; Smith, T. K.; Gunn-Moore, F.; Musilek, K. 6-Benzothiazolyl Ureas, Thioureas and Guanidines Are Potent Inhibitors of ABAD/17 β -HSD10 and Potential Drugs for Alzheimer's Disease Treatment: Design, Synthesis and in Vitro Evaluation. *Medicinal Chemistry* **2017**, *13* (4), 345–358.

- P38.** Hroch, L.; Benek, O.; Guest, P.; Aitken, L.; Soukup, O.; Janockova, J.; Musil, K.; Dohnal, V.; Dolezal, R.; Kuca, K.; Smith, T. K.; Gunn-Moore, F.; Musilek, K. Design, synthesis and in vitro evaluation of benzothiazole-based ureas as potential ABAD/17beta-HSD10 modulators for Alzheimer's disease treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26*, 3675-3678.
- P39.** Honegr, J.; Dolezal, R.; Malinak, D.; Benkova, M.; Soukup, O.; Almeida, J.; Franca, T.; Kuca, K.; Prymula, R. Rational Design of a New Class of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Tryptamine Related Agonists by Means of the Structure- and Ligand-Based Virtual Screening for Vaccine Adjuvant Discovery. *Molecules* **2018**, *23* (1), 102.
- P40.** Honegr, J.; Malinak, D.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Benkova, M.; Hroch, L.; Benek, O.; Janockova, J.; Kuca, K.; Prymula, R. Rational Design of Novel TLR4 Ligands by in Silico Screening and Their Functional and Structural Characterization in Vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *146*, 38-46.
- P41.** Honegr, J.; Soukup, O.; Dolezal, R.; Malinak, D.; Penhaker, M.; Prymula, R.; Kuca, K. Structural Properties of Potential Synthetic Vaccine Adjuvants - TLR Agonists. *Current Medicinal Chemistry* **2015**, *22*, 3306-25.
- P42.** Nepovimova, E.; Janockova, J.; Misik, J.; Kubik, S.; Stuchlik, A.; Vales, K.; Korabecny, J.; Mezeiova, E.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Kobrlova, T.; Pham, N. L.; Nguyen, T. D.; Konecny, J.; Kuca, K. Orexin supplementation in narcolepsy treatment: A review. *Medicinal Research Reviews* **2019**, *39*, 961-975.
- P43.** Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Melikova, M.; Kuca, K. Structure-Based Virtual Screening for Novel Modulators of Human Orexin 2 Receptor with Cloud Systems and Supercomputers. In: Król D., Nguyen N., Shirai K. (eds.) *Advanced Topics in Intelligent Information and Database Systems. ACIIDS 2017. Studies in Computational Intelligence* **2017**, *710*, 161-171.
- P44.** Janockova, J.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Kobrlova, T.; Benkova, M.; Kuca, K.; Konecny, J.; Mezeiova, E.; Melikova, M.; Hepnarova, V.; Ring, A.; Soukup, O.; Korabecny, J. Investigation of New Orexin 2 Receptor Modulators Using In Silico and In Vitro Methods. *Molecules* **2018**, *23* (11), 2926.
- P45.** Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Nguyen, T. D.; Jun, D.; Soukup, O.; Pasdiorova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Malinak, D.; Gorecki, L.; Musilek, K.; Kuca, K. A 7-methoxytacrine-4-pyridinealdoxime hybrid as a novel prophylactic agent with reactivation properties in organophosphate intoxication. *Toxicology Research* **2016**, *5*, 1012-1016.
- P46.** Kuca, K.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Soukup, O.; Gorecki, L.; Musilek, K. Tetroxime: reactivation potency-in vitro and in silico study. *RSC Advances* **2017**, *7*, 7041-7045.

8.2. Citace literatury ostatních autorů

1. Munos, B. Lessons from 60 Years of Pharmaceutical Innovation. *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, 8 (12), 959–968.
2. DiMasi, J. A.; Grabowski, H. G.; Hansen, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics* **2016**, 47, 20-33.
3. PPD. About Drug Development. Citováno: 1.5.2019. <https://www.ppd.com/About/About-Drug-Discovery-and-Development>
4. Kuchař, M. *Výzkum a vývoj léčiv*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2008. 166 s; ISBN 978-80-7080-677-7.
5. Certara. Certara Supported 90+ Percent of US FDA Novel New Drug Approvals for Fourth Consecutive Year. Citováno: 1.5.2019. https://www.certara.com/pressreleases/certara-supported-90-percent-of-us-fda-novel-new-drug-approvals-for-fourth-consecutive-year/?ap%5B0%5D=1&UTM_LeadSource=1
6. FAD. Speech to the Regulatory Affairs Professionals Society (RAPS) 2017 Regulatory Conference - 09/11/2017 | FDA. Citováno: 1.5.2019. <https://www.fda.gov/news-events/speeches-fda-officials/speech-regulatory-affairs-professionals-society-raps-2017-regulatory-conference-09112017>
7. Ban, T. A. The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **2006**, 8, 335-344.
8. Mandal, S.; Moudgil, M.; Mandal, S. K. Rational drug design. *European Journal of Pharmacology* **2009**, 625, 90-100.
9. Kumar, A.; Jha, A. Chapter 7 - Drug Development Strategies. In *Anticandidal Agents*, Kumar, A.; Jha, A., Eds. Academic Press: 2017; pp 63-71.
10. O'Rourke, M., Hughes, J., River, Ch. The New Age of Drug Development. Citováno: 1.5.2019. <https://www.rdmag.com/article/2018/07/new-age-drug-development>
11. Lahana, R. How many leads from HTS? *Drug Discovery Today* **1999**, 4, 447-448.
12. Kubinyi, H. Success Stories of Computer-Aided Design. In *Computer Applications in Pharmaceutical Research and Development*, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; pp. 377-424.
13. Hurlle, M. R.; Yang, L.; Xie, Q.; Rajpal, D. K.; Sanseau, P.; Agarwal, P. Computational drug repositioning: from data to therapeutics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2013**, 93, 335-41.
14. Talele, T. T.; Khedkar, S. A.; Rigby, A. C. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2010**, 10, 127-41.
15. Clark, D. E. What has computer-aided molecular design ever done for drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery* **2006**, 1, 103-110.
16. Badrinarayan, P.; Sastry, G. N. Virtual high throughput screening in new lead identification. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2011**, 14, 840-60.
17. Van Drie, J. H. Computer-aided drug design: the next 20 years. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2007**, 21, 591-601.
18. Yu, W.; MacKerell, A. D., Jr. Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods in Molecular Biology* **2017**, 1520, 85-106.
19. Ekins, S.; Mestres, J.; Testa, B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology* **2007**, 152, 9-20.
20. Ramesha, C. S. How many leads from HTS? – Comment. *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 43-44.
21. Cerqueira, N. M.; Gesto, D.; Oliveira, E. F.; Santos-Martins, D.; Brás, N. F.; Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Receptor-Based Virtual Screening Protocol for Drug Discovery. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2015**, 582, 56–67.
22. Patel, H. M.; Noolvi, M. N.; Sharma, P.; Jaiswal, V.; Bansal, S.; Lohan, S.; Kumar, S. S.; Abbot, V.; Dhiman, S.; Bhardwaj, V. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies as strategic approach in drug discovery. *Medicinal Chemistry Research* **2014**, 23, 4991-5007.
23. Macalino, S. J. Y.; Gosu, V.; Hong, S.; Choi, S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research* **2015**, 38, 1686-1701.
24. Klebe, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today* **2006**, 11, 580-94.
25. Chen, Y.-C. Beware of Docking! *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, 36 (2), 78–95.
26. Topliss, J. G. A manual method for applying the Hansch approach to drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* **1977**, 20, 463-9.

27. 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. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3-26.
28. Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today Technologies* **2004**, *1*, 337-41.
29. Perera, T. P. S.; Jovcheva, E.; Mevellec, L.; Vialard, J.; De Lange, D.; Verhulst, T.; Paulussen, C.; Van De Ven, K.; King, P.; Freyne, E.; Rees, D. C.; Squires, M.; Saxty, G.; Page, M.; Murray, C. W.; Gilissen, R.; Ward, G.; Thompson, N. T.; Newell, D. R.; Cheng, N.; Xie, L.; Yang, J.; Platero, S. J.; Karkera, J. D.; Moy, C.; Angibaud, P.; Laquerre, S.; Lorenzi, M. V. Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-42756493 (Erdafitinib), a Functionally Selective Small-Molecule FGFR Family Inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics* **2017**, *16*, 1010-1020.
30. Kubinyi, H. Drug research: myths, hype and reality. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 665-8.
31. Lo, Y.-C.; Rensi, S. E.; Torng, W.; Altman, R. B. Machine learning in chemoinformatics and drug discovery. *Drug Discovery Today* **2018**, *23*, 1538-1546.
32. Boyd, D. B.; Milosevich, S. A. F. Supercomputing and drug discovery research. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **1993**, *1*, 345-358.
33. Schneider, G. Virtual screening: an endless staircase? *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9*, 273-6.
34. Lodola, A.; De Vivo, M. The increasing role of QM/MM in drug discovery. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **2012**, *87*, 337-62.
35. Leelananda, S. P.; Lindert, S. Computational methods in drug discovery. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2016**, *12*, 2694-2718.
36. Katsila, T.; Spyroulias, G. A.; Patrinos, G. P.; Matsoukas, M.-T. Computational approaches in target identification and drug discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2016**, *14*, 177-184.
37. Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery. *Science* **2004**, *303*, 1813-8.
38. Terstappen, G. C.; Reggiani, A. In silico research in drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* **2001**, *22*, 23-6.
39. Baig, M. H.; Ahmad, K.; Rabbani, G.; Danishuddin, M.; Choi, I. Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative Disorders. *Current Neuropharmacology* **2018**, *16*, 740-748.
40. Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2012**, *52*, 1757-68.
41. Vyas, V. K.; Ukawala, R. D.; Ghate, M.; Chintha, C. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *74*, 1-17.
42. Balupuri, A.; Balasubramanian, P. K.; Cho, S. J. 3D-QSAR, docking, molecular dynamics simulation and free energy calculation studies of some pyrimidine derivatives as novel JAK3 inhibitors. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**.
43. Yu, W.; Lakkaraju, S. K.; Raman, E. P.; MacKerell, A. D., Jr. Site-Identification by Ligand Competitive Saturation (SILCS) assisted pharmacophore modeling. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2014**, *28*, 491-507.
44. Schneider, G. Breaking the data barrier in computational medicinal chemistry. *Future medicinal chemistry* **2014**, *6*, 245-6.
45. Schneider, G.; Fechner, U. Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 649-63.
46. Bienstock, R. J. Computational methods for fragment-based ligand design: growing and linking. *Methods Mol Biol* **2015**, *1289*, 119-35.
47. Durrant, J. D.; Lindert, S.; McCammon, J. A. AutoGrow 3.0: An improved algorithm for chemically tractable, semi-automated protein inhibitor design. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2013**, *44*, 104-112.
48. Miranker, A.; Karplus, M. Functionality maps of binding sites: a multiple copy simultaneous search method. *Proteins* **1991**, *11*, 29-34.
49. Hoffer, L.; Renaud, J. P.; Horvath, D. In silico fragment-based drug discovery: setup and validation of a fragment-to-lead computational protocol using S4MPLE. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2013**, *53*, 836-51.
50. Pophale, R.; Daeyaert, F.; Deem, M. W. Computational prediction of chemically synthesizable organic structure directing agents for zeolites. *Journal of Materials Chemistry A* **2013**, *1*, 6750-6760.

51. Sun, H.; Tawa, G.; Wallqvist, A. Classification of scaffold-hopping approaches. *Drug Discovery Today* **2012**, *17*, 310-324.
52. Filikov, A. V.; Mohan, V.; Vickers, T. A.; Griffey, R. H.; Cook, P. D.; Abagyan, R. A.; James, T. L. Identification of ligands for RNA targets via structure-based virtual screening: HIV-1 TAR. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2000**, *14*, 593-610.
53. Ma, D. L.; Chan, D. S.; Lee, P.; Kwan, M. H.; Leung, C. H. Molecular modeling of drug-DNA interactions: virtual screening to structure-based design. *Biochimie* **2011**, *93*, 1252-66.
54. Chen, S. B.; Tan, J. H.; Ou, T. M.; Huang, S. L.; An, L. K.; Luo, H. B.; Li, D.; Gu, L. Q.; Huang, Z. S. Pharmacophore-based discovery of triaryl-substituted imidazole as new telomeric G-quadruplex ligand. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 1004-9.
55. Evans, D. A.; Neidle, S. Virtual Screening of DNA Minor Groove Binders. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 4232-4238.
56. Agatonovic-Kustrin, S.; Kettle, C.; Morton, D. W. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *106*, 553-565.
57. Wachtel, M.; Schafer, B. W. PAX3-FOXO1: Zooming in on an "undruggable" target. *Seminars in Cancer Biology* **2018**, *50*, 115-123.
58. Lazo, J. S.; Sharlow, E. R. Drugging Undruggable Molecular Cancer Targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2016**, *56*, 23-40.
59. Ambure, P.; Roy, K. CADD Modeling of Multi-Target Drugs Against Alzheimer's Disease. *Current Drug Targets* **2017**, *18*, 522-533.
60. Alcaro, S.; Bolognesi, M. L.; Garcia-Sosa, A. T.; Rapposelli, S. Editorial: Multi-Target-Directed Ligands (MTDL) as Challenging Research Tools in Drug Discovery: From Design to Pharmacological Evaluation. *Frontiers in Chemistry* **2019**, *7*, 71.
61. Kumar, A.; Tiwari, A.; Sharma, A. Changing Paradigm from one Target one Ligand Towards Multi-target Directed Ligand Design for Key Drug Targets of Alzheimer Disease: An Important Role of In Silico Methods in Multi-target Directed Ligands Design. *Current Neuropharmacology* **2018**, *16*, 726-739.
62. Fauman, E. B.; Rai, B. K.; Huang, E. S. Structure-based druggability assessment--identifying suitable targets for small molecule therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*, 463-8.
63. Laurie, A. T.; Jackson, R. M. Methods for the prediction of protein-ligand binding sites for structure-based drug design and virtual ligand screening. *Current Protein & Peptide Science* **2006**, *7*, 395-406.
64. Le Guilloux, V.; Schmidtke, P.; Tuffery, P. Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 168.
65. Cruzeiro, V. W. D.; Roitberg, A. E. Multidimensional Replica Exchange simulations for Efficient constant pH and Redox Potential Molecular Dynamics. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2019**, *15*, 871-881.
66. Huber, T.; Van Gunsteren, W. F. SWARM-MD: Searching conformational space by cooperative molecular dynamics. *The Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 5937-5943.
67. Rauh, D.; Klebe, G.; Stürzebecher, J.; Stubbs, M. T. ZZ made EZ: influence of inhibitor configuration on enzyme selectivity. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *330*, 761-770.
68. Schafferhans, A.; Klebe, G. Docking ligands onto binding site representations derived from proteins built by homology modelling. *Journal of Molecular Biology* **2001**, *307*, 407-27.
69. Jelesarov, I.; Bosshard, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition* **1999**, *12*, 3-18.
70. Stewart, J. J. P. An investigation into the applicability of the semiempirical method PM7 for modeling the catalytic mechanism in the enzyme chymotrypsin. *Journal of Molecular Modeling* **2017**, *23*, 154.
71. Gunther, J.; Bergner, A.; Hendlich, M.; Klebe, G. Utilising structural knowledge in drug design strategies: applications using Relibase. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *326*, 621-36.
72. Jacquemard, C.; Drwal, M. N.; Desaphy, J.; Kellenberger, E. Binding mode information improves fragment docking. *Journal of Cheminformatics* **2019**, *11*, 24.
73. Zuegg, J.; Cooper, M. A. Drug-likeness and increased hydrophobicity of commercially available compound libraries for drug screening. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2012**, *12*, 1500-13.

74. Wang, X.; Huang, S. Y. Integrating bonded and nonbonded potentials in the knowledge-based scoring function for protein structure prediction. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2019**.
75. Li, J.; Fu, A.; Zhang, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences* **2019**.
76. Feng, T.; Chen, F.; Kang, Y.; Sun, H.; Liu, H.; Li, D.; Zhu, F.; Hou, T. HawkRank: a new scoring function for protein-protein docking based on weighted energy terms. *Journal of Cheminformatics* **2017**, *9*, 66.
77. Guedes, I. A.; Pereira, F. S. S.; Dardenne, L. E. Empirical Scoring Functions for Structure-Based Virtual Screening: Applications, Critical Aspects, and Challenges. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *9*, 1089.
78. Gabel, J.; Desaphy, J.; Rognan, D. Beware of machine learning-based scoring functions-on the danger of developing black boxes. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2014**, *54*, 2807-15.
79. Gissinger, J. R.; Jensen, B. D.; Wise, K. E. Modeling chemical reactions in classical molecular dynamics simulations. *Polymer* **2017**, *128*, 211-217.
80. Yeon, J.; Adams, H. L.; Junkermeier, C. E.; van Duin, A. C. T.; Tysoe, W. T.; Martini, A. Development of a ReaxFF Force Field for Cu/S/C/H and Reactive MD Simulations of Methyl Thiolate Decomposition on Cu (100). *The Journal of Physical Chemistry B* **2018**, *122*, 888-896.
81. Matus, M. F.; Luduena, M.; Vilos, C.; Palomo, I.; Mariscal, M. M. Atomic-level characterization and cilostazol affinity of poly(lactic acid) nanoparticles conjugated with differentially charged hydrophilic molecules. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2018**, *9*, 1328-1338.
82. Hansch, C.; Maloney, P. P.; Fujita, T.; Muir, R. M. Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients. *Nature* **1962**, *194* (4824), 178-180.
83. Hansch, C.; Muir, R. M.; Fujita, T.; Maloney, P. P.; Geiger, F.; Streich, M. The correlation of biological activity of plant growth regulators and chloromycetin derivatives with Hammett constants and partition coefficients. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2817-2824.
84. Hansch, C.; Fujita, T. ρ - σ - π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86*, 1616-1626.
85. Hansch, C.; Hoekman, D.; Leo, A.; Weininger, D.; Selassie, C. D. Chem-Bioinformatics: Comparative QSAR at the Interface between Chemistry and Biology. *Chemical Reviews* **2002**, *102*(3), 783-812.
86. Barigye, S. J.; Marrero-Ponce, Y.; Santiago, O. M.; Lopez, Y. M.; Perez-Gimenez, F.; Torrens, F. Shannon's, mutual, conditional and joint entropy information indices: generalization of global indices defined from local vertex invariants. *Current Computer-Aided Drug Design* **2013**, *9*, 164-83.
87. Galvez, J.; Villar, V. M.; Galvez-Llompert, M.; Amigo, J. M. Chemistry explained by topology: an alternative approach. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. **2011**, *14*, 279-83.
88. Todeschini, R.; Consonni, V. *Handbook of molecular descriptors*. John Wiley & Sons: 2008; Vol. 11.
89. Ponec, R.; Amat, L.; Carbo-Dorca, R. Molecular basis of quantitative structure-properties relationships (QSPR): a quantum similarity approach. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1999**, *13*, 259-70.
90. Khan, K.; Khan, P. M.; Lavado, G.; Valsecchi, C.; Pasqualini, J.; Baderna, D.; Marzo, M.; Lombardo, A.; Roy, K.; Benfenati, E. QSAR modeling of *Daphnia magna* and fish toxicities of biocides using 2D descriptors. *Chemosphere* **2019**, *229*, 8-17.
91. Fernandez-de Gortari, E.; Garcia-Jacas, C. R.; Martinez-Mayorga, K.; Medina-Franco, J. L. Database fingerprint (DFP): an approach to represent molecular databases. *Journal of Cheminformatics* **2017**, *9*, 9.
92. Muegge, I.; Mukherjee, P. An overview of molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2016**, *11*, 137-48.
93. von Behren, M. M.; Rarey, M. Ligand-based virtual screening under partial shape constraints. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2017**, *31*, 335-347.
94. Gramatica, P. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR & Combinatorial science* **2007**, *26*, 694-701.

95. Cherkasov, A.; Muratov, E. N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, II; Cronin, M.; Dearden, J.; Gramatica, P.; Martin, Y. C.; Todeschini, R.; Consonni, V.; Kuz'min, V. E.; Cramer, R.; Benigni, R.; Yang, C.; Rathman, J.; Terfloth, L.; Gasteiger, J.; Richard, A.; Tropsha, A. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 4977-5010.
96. Tropsha, A.; Gramatica, P.; Gombar, V. K. The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. *QSAR & Combinatorial Science* **2003**, *22*, 69-77.
97. Clark, R. D.; Fox, P. C. Statistical variation in progressive scrambling. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2004**, *18*, 563-76.
98. Abuhammad, A.; Taha, M. O. QSAR studies in the discovery of novel type-II diabetic therapies. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2016**, *11*, 197-214.
99. Pan, W. Akaike's information criterion in generalized estimating equations. *Biometrics* **2001**, *57*, 120-5.
100. Rosenthal, R. An application of the Kolmogorov-Smirnov test for normality with estimated mean and variance. *Psychological Reports* **1968**, *22*, 570.
101. Royston, J. P. Some techniques for assessing multivariate normality based on the Shapiro-Wilk W. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)* **1983**, *32*, 121-133.
102. Danishuddin; Khan, A. U. Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design. *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 1291-1302.
103. Chen, H.; Engkvist, O.; Wang, Y.; Olivecrona, M.; Blaschke, T. The rise of deep learning in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2018**, *23*, 1241-1250.
104. Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 5959-5967.
105. Melo-Filho, C. C.; Braga, R. C.; Andrade, C. H. 3D-QSAR approaches in drug design: perspectives to generate reliable CoMFA models. *Current Computer-Aided Drug Design* **2014**, *10*, 148-59.
106. Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37*, 4130-4146.
107. Klebe, G.; Abraham, U. Comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1999**, *13*, 1-10.
108. Guido, R. V. C.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Structure-and ligand-based drug design approaches for neglected tropical diseases. *Pure and Applied Chemistry* **2012**, *84*, 1857-1866.
109. Hopfinger, A. J.; Wang, S.; Tokarski, J. S.; Jin, B.; Albuquerque, M.; Madhav, P. J.; Duraiswami, C. Construction of 3D-QSAR models using the 4D-QSAR analysis formalism. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 10509-10524.
110. Andrade, C. H.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, E. I.; Hopfinger, A. J. 4D-QSAR: Perspectives in Drug Design. *Molecules* **2010**, *15*.
111. Damale, M. G.; Harke, S. N.; Kalam Khan, F. A.; Shinde, D. B.; Sangshetti, J. N. Recent advances in multidimensional QSAR (4D-6D): a critical review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2014**, *14*, 35-55.
112. Vedani, A.; Dobler, M. 5D-QSAR: the key for simulating induced fit? *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 2139-2149.
113. Jaroslaw, P. Receptor Dependent Multidimensional QSAR for Modeling Drug - Receptor Interactions. *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16*, 3243-3257.
114. Radhika, V.; Jaraf, H. A.; Kanth, S. S.; Vijjulatha, M. Integrating Multiple Receptor Conformation Docking and Multi Dimensional QSAR for Enhancing Accuracy of Binding Affinity Prediction. *Current Computer-Aided Drug Design* **2017**, *13*, 127-142.
115. Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS Chemical Neuroscience* **2010**, *1*, 435-49.
116. Baell, J. B.; Nissink, J. W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017-Utility and Limitations. *ACS Chemical Biology* **2018**, *13*, 36-44.
117. Irwin, J. J.; Duan, D.; Torosyan, H.; Doak, A. K.; Ziebart, K. T.; Sterling, T.; Tumanian, G.; Shoichet, B. K. An Aggregation Advisor for Ligand Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 7076-87.

118. Jiang, Y.; Gao, H. Pharmacophore-based drug design for the identification of novel butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Phytomedicine* **2019**, *54*, 278-290.
119. Taminau, J.; Thijs, G.; De Winter, H. Pharao: pharmacophore alignment and optimization. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **2008**, *27*, 161-9.
120. Vuorinen, A.; Engeli, R.; Meyer, A.; Bachmann, F.; Griesser, U. J.; Schuster, D.; Odermatt, A. Ligand-based pharmacophore modeling and virtual screening for the discovery of novel 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 5995-6007.
121. Selvaraj, C.; Singh, S. K. Validation of potential inhibitors for SrtA against Bacillus anthracis by combined approach of ligand-based and molecular dynamics simulation. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2014**, *32*, 1333-49.
122. Kawai, K.; Nagata, N.; Takahashi, Y. De Novo Design of Drug-Like Molecules by a Fragment-Based Molecular Evolutionary Approach. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2014**, *54*, 49-56.
123. Kawai, K.; Takahashi, Y. [In Silico Drug Design Using an Evolutionary Algorithm and Compound Database]. *Yakugaku Zasshi* **2016**, *136*, 107-12.
124. Bajusz, D.; Rácz, A.; Héberger, K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *Journal of Cheminformatics* **2015**, *7*, 20-20.
125. Consonni, V.; Ballabio, D.; Todeschini, R. Evaluation of model predictive ability by external validation techniques. *Journal of chemometrics* **2010**, *24*, 194-201.
126. Gramatica, P.; Sangion, A. A Historical Excursus on the Statistical Validation Parameters for QSAR Models: A Clarification Concerning Metrics and Terminology. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2016**, *56*, 1127-31.
127. Majumdar, S.; Basak, S. C. Editorial: Beware of Naïve q2, Use True q2: Some Comments on QSAR Model Building and Cross Validation. *Current Computer-Aided Drug Design* **2018**, *14* (1), 5-6.
128. Verma, R. P.; Hansch, C. An approach toward the problem of outliers in QSAR. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 4597-621.
129. Todeschini, R.; Ballabio, D.; Grisoni, F. Beware of Unreliable Q(2)! A Comparative Study of Regression Metrics for Predictivity Assessment of QSAR Models. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2016**, *56*, 1905-1913.
130. Topliss, J. G.; Costello, R. J. Change correlations in structure-activity studies using multiple regression analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* **1972**, *15*, 1066-8.
131. Topliss, J. G.; Edwards, R. P. Chance factors in studies of quantitative structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* **1979**, *22*, 1238-44.
132. Uesawa, Y. Quantitative structure-activity relationship analysis using deep learning based on a novel molecular image input technique. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *28*, 3400-3403.
133. Kurup, A. C-QSAR: a database of 18,000 QSARs and associated biological and physical data. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2003**, *17*, 187-96.
134. Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews* **2013**, *66* (1), 334-395.
135. Oprea, T. I.; Gottfries, J. Toward minimalistic modeling of oral drug absorption. *Journal Of Molecular Graphics & Modelling* **1999**, *17*, 261-74, 329.
136. Goh, G. B.; Hodas, N. O.; Vishnu, A. Deep learning for computational chemistry. *Journal of Computational Chemistry* **2017**, *38*, 1291-1307.
137. Ghasemi, F.; Mehridehnavi, A.; Perez-Garrido, A.; Perez-Sanchez, H. Neural network and deep-learning algorithms used in QSAR studies: merits and drawbacks. *Drug Discovery Today* **2018**, *23*, 1784-1790.
138. Guha, R.; Jurs, P. C. Interpreting computational neural network QSAR models: a measure of descriptor importance. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2005**, *45*, 800-6.
139. Centner, V.; Massart, D. L.; de Noord, O. E.; de Jong, S.; Vandeginste, B. M.; Sterna, C. Elimination of uninformative variables for multivariate calibration. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 3851-8.
140. Grimme, S.; Schreiner, P. R. Computational Chemistry: The Fate of Current Methods and Future Challenges. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *57* (16), 4170-4176.
141. George, V.; Dave Mullally and Knute, C. Trends in High-Performance Computing Requirements for Computer- Aided Drug Design. *Current Computer-Aided Drug Design* **2008**, *4*, 2-12.

142. Mishra, B. S. P.; Dehuri, S. Parallel computing environments: A review. *IETE Technical Review* **2011**, *28*, 240-247.
143. Baker, M.; Fox, G. C.; Yau, H. W. Cluster computing review. *Northeast Parallel Architecture Center*, **1995**, *33*, 1-90.
144. Qian, D.; Luan, Z. High Performance Computing Development in China: A Brief Review and Perspectives. *Computing in Science & Engineering* **2019**, *21*, 6-16.
145. Banegas-Luna, A. J.; Imbernón, B.; Llanes Castro, A.; Perez-Garrido, A.; Ceron-Carrasco, J. P.; Gesing, S.; Merelli, I.; D'Agostino, D.; Perez-Sanchez, H. Advances in distributed computing with modern drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2019**, *14*, 9-22.
146. Ballard, C.; Gauthier, S.; Corbett, A.; Brayne, C.; Aarsland, D.; Jones, E. Alzheimer's disease. *The Lancet* **2011**, *377*, 1019-1031.
147. Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *The Lancet* **2006**, *368*, 387-403.
148. Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Sczufca, M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet* **2005**, *366*, 2112-2117.
149. Mount, C.; Downton, C. Alzheimer disease: progress or profit? *Nature Medicine* **2006**, *12*, 780.
150. Public Health England. Deaths from Alzheimer's Disease, Dementia and Senility in England. Citováno: 1.5.2019. http://www.endoflifecare-intelligence.org.uk/resources/publications/deaths_from_alzheimers
151. Davis, M.; O'Connell, T.; Johnson, S.; Cline, S.; Merikle, E.; Martenyi, F.; Simpson, K. Estimating Alzheimer's Disease Progression Rates from Normal Cognition Through Mild Cognitive Impairment and Stages of Dementia. *Current Alzheimer Research* **2018**, *15*, 777-788.
152. Brookmeyer, R.; Abdalla, N.; Kawas, C. H.; Corrada, M. M. Forecasting the prevalence of preclinical and clinical Alzheimer's disease in the United States. *Alzheimer's & Dementia* **2018**, *14*, 121-129.
153. Kern, S.; Zetterberg, H.; Kern, J.; Zettergren, A.; Waern, M.; Höglund, K.; Andreasson, U.; Wetterberg, H.; Börjesson-Hanson, A.; Blennow, K.; Skoog, I. Prevalence of preclinical Alzheimer disease. *Neurology* **2018**, *90*, e1682.
154. Brasure, M.; Desai, P.; Davila, H.; et al. Physical activity interventions in preventing cognitive decline and alzheimer-type dementia: A systematic review. *Annals of Internal Medicine* **2018**, *168*, 30-38.
155. Erkinen, M. G.; Kim, M.-O.; Geschwind, M. D. Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2018**, *10*, a033118.
156. Reitz, C.; Mayeux, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology* **2014**, *88*, 640-651.
157. Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H. M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* **2007**, *3*, 186-191.
158. Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C. P. The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis. *Alzheimers & Dementia* **2013**, *9* (1), 63-75.e2.
159. Leung, G. M.; Yeung, R. Y.; Chi, I.; Chu, L. W. The economics of Alzheimer disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* **2003**, *15*, 34-43.
160. Cummings, J.; Aisen, P. S.; DuBois, B.; Frölich, L.; Jack, C. R., Jr.; Jones, R. W.; Morris, J. C.; Raskin, J.; Dowsett, S. A.; Scheltens, P. Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025. *Alzheimer's Research & Therapy* **2016**, *8*, 39-39.
161. Wenk, G. L. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Psychiatry* **2003**, *64* Suppl 9, 7-10.
162. Drew, L. An Age-Old Story of Dementia. *Nature* **2018**, *559* (7715), 2-3.
163. Tiraboschi, P.; Hansen, L. A.; Thal, L. J.; Corey-Bloom, J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* **2004**, *62*, 1984-9.
164. Swerdlow, R. H. Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging* **2007**, *2*, 347-359.
165. Kocahan, S.; Doğan, Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-Methyl-D-Aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* **2017**, *15* (1), 1-8.
166. Sanabria-Castro, A.; Alvarado-Echeverría, I.; Monge-Bonilla, C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Annals of Neurosciences* **2017**, *24*, 46-54.

167. Van Broeck, B.; Van Broeckhoven, C.; Kumar-Singh, S. Current insights into molecular mechanisms of Alzheimer disease and their implications for therapeutic approaches. *Neurodegenerative Diseases* **2007**, *4*, 349-65.
168. Reitz, C.; Mayeux, R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemistry & Pharmacology* **2014**, *88*, 640-51.
169. Colović, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Vasić, V. M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology* **2013**, *11*, 315-335.
170. Mehta, M.; Adem, A.; Sabbagh, M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, *2012*, 728983.
171. Zhou, Y.; Wang, S.; Zhang, Y. Catalytic reaction mechanism of acetylcholinesterase determined by Born-Oppenheimer ab initio QM/MM molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 8817-8825.
172. Greenblatt, H. M.; Dvir, H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* **2003**, *20*, 369-83.
173. Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Horova, A.; Pohanka, M.; Gunn-Moore, F.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Mono-oxime bisquaternary acetylcholinesterase reactivators with prop-1,3-diyl linkage-Preparation, in vitro screening and molecular docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 754-62.
174. Musilek, K.; Pavlikova, R.; Marek, J.; Komloova, M.; Holas, O.; Hrabnova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. The preparation, in vitro screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2E)-en-1,4-diyl connecting linkage. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2011**, *26*, 245-53.
175. Johnson, G.; Moore, S. W. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Current Pharmaceutical Design* **2006**, *12*, 217-25.
176. Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 5128-32.
177. Gilson, M. K.; Straatsma, T. P.; McCammon, J. A.; Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* **1994**, *263*, 1276-8.
178. Tai, K.; Shen, T.; Börjesson, U.; Philippopoulos, M.; Mccammon, J. A. Analysis of a 10-Ns Molecular Dynamics Simulation of Mouse Acetylcholinesterase. *Biophysical Journal* **2001**, *81* (2), 715-724.
179. Bui, J. M.; Tai, K.; McCammon, J. A. Acetylcholinesterase: enhanced fluctuations and alternative routes to the active site in the complex with fasciculin-2. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 7198-205.
180. Sanson, B.; Colletier, J.-P.; Xu, Y.; Lang, P. T.; Jiang, H.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Weik, M. Backdoor Opening Mechanism in Acetylcholinesterase Based on X-Ray Crystallography and Molecular Dynamics Simulations. *Protein Science* **2011**, *20* (7), 1114-1118.
181. Wiesner, J.; Kriz, Z.; Kuca, K.; Jun, D.; Koca, J. Influence of the acetylcholinesterase active site protonation on omega loop and active site dynamics. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2010**, *28*, 393-403.
182. Telting-Diaz, M.; Lunte, C. E. Distribution of tacrine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats using in vivo microdialysis sampling. *Pharmaceutical Research* **1993**, *10*, 44-8.
183. Patocka, J.; Jun, D.; Kuca, K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. *Current Drug Metabolism* **2008**, *9*, 332-5.
184. Hamulakova, S.; Janovec, L.; Soukup, O.; Jun, D.; Janockova, J.; Hrabnova, M.; Sepsova, V.; Kuca, K. Tacrine-coumarin and Tacrine-7-chloroquinoline Hybrids with Thiourea Linkers: Cholinesterase Inhibition Properties, Kinetic Study, Molecular Docking and Permeability Assay for Blood-brain Barrier. *Current Alzheimer Research* **2018**, *15*, 1096-1105.
185. Kametani, F.; Hasegawa, M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* **2018**, *12*, 25-25.
186. Hardy, J.; Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **1991**, *12*, 383-8.

187. Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353-356.
188. Mudher, A.; Lovestone, S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in Neurosciences* **2002**, *25*, 22-6.
189. Murphy, M. P.; Levine, H. Alzheimers Disease and the Amyloid- β Peptide. *Journal of Alzheimers Disease* **2010**, *19* (1), 311-323.
190. Dementia. Pathophysiology, Alzheimer's Disease. Citováno: 1.5.2019. <https://cognitivedisorders.weebly.com/pathophysiology.html>
191. Vassar, R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* **2004**, *23*, 105-14.
192. Das, B.; Yan, R. Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. *Translational Neurodegeneration* **2017**, *6*, 23-23.
193. Vassar, R. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy* **2014**, *6*, 89.
194. Neumann, U.; Ufer, M.; Jacobson, L. H.; Rouzade-Dominguez, M. L.; Huledal, G.; Kolly, C.; Lüönd, R. M.; Machauer, R.; Veenstra, S. J.; Hurth, K.; Rueeger, H.; Tintelnot-Blomley, M.; Staufenbiel, M.; Shimshek, D. R.; Perrot, L.; Friauff, W.; Dubost, V.; Schiller, H.; Vogg, B.; Beltz, K.; Avrameas, A.; Kretz, S.; Pezous, N.; Rondeau, J. M.; Beckmann, N.; Hartmann, A.; Vormfelde, S.; David, O. J.; Galli, B.; Ramos, R.; Graf, A.; Lopez Lopez, C. The BACE-1 inhibitor CNP520 for prevention trials in Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine* **2018**.
195. Coimbra, J. R. M.; Marques, D. F. F.; Baptista, S. J.; Pereira, C. M. F.; Moreira, P. I.; Dinis, T. C. P.; Santos, A. E.; Salvador, J. A. R. Highlights in BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Frontiers in Chemistry* **2018**, *6*, 178-178.
196. Ran, Y.; Hossain, F.; Pannuti, A.; Lessard, C. B.; Ladd, G. Z.; Jung, J. I.; Minter, L. M.; Osborne, B. A.; Miele, L.; Golde, T. E. γ -Secretase inhibitors in cancer clinical trials are pharmacologically and functionally distinct. *EMBO Molecular Medicine* **2017**, *9*, 950-966.
197. Doody, R. S.; Raman, R.; Farlow, M.; Iwatsubo, T.; Vellas, B.; Joffe, S.; Kieburtz, K.; He, F.; Sun, X.; Thomas, R. G.; Aisen, P. S.; Siemers, E.; Sethuraman, G.; Mohs, R. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* **2013**, *369*, 341-50.
198. Cook, N.; Basu, B.; Smith, D.-M.; Gopinathan, A.; Evans, J.; Steward, W. P.; Palmer, D.; Propper, D.; Venugopal, B.; Hategan, M.; Anthony, D. A.; Hampson, L. V.; Nebozhyn, M.; Tuveson, D.; Farmer-Hall, H.; Turner, H.; McLeod, R.; Halford, S.; Jodrell, D. A phase I trial of the γ -secretase inhibitor MK-0752 in combination with gemcitabine in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* **2018**, *118*, 793.
199. Wu, Z.; Ni, J.; Liu, Y.; Teeling, J. L.; Takayama, F.; Colcutt, A.; Ibbett, P.; Nakanishi, H. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* **2017**, *65*, 350-361.
200. Embury, C. M.; Dyavarshetty, B.; Lu, Y.; Wiederin, J. L.; Ciborowski, P.; Gendelman, H. E.; Kiyota, T. Cathepsin B Improves ss-Amyloidosis and Learning and Memory in Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **2017**, *12*, 340-352.
201. Sundelof, J.; Sundstrom, J.; Hansson, O.; Eriksdotter-Jonhagen, M.; Giedraitis, V.; Larsson, A.; Degerman-Gunnarsson, M.; Ingelsson, M.; Minthon, L.; Blennow, K.; Kilander, L.; Basun, H.; Lannfelt, L. Higher cathepsin B levels in plasma in Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Journal of Alzheimer's Disease* **2010**, *22*, 1223-30.
202. Mueller-Steiner, S.; Zhou, Y.; Arai, H.; Roberson, E. D.; Sun, B.; Chen, J.; Wang, X.; Yu, G.; Esposito, L.; Mucke, L.; Gan, L. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* **2006**, *51*, 703-14.
203. Ruan, H.; Hao, S.; Young, P.; Zhang, H. Targeting Cathepsin B for Cancer Therapies. *Horizons in Cancer Research* **2015**, *56*, 23-40.
204. Hook, G.; Hook, V.; Kindy, M. The cysteine protease inhibitor, E64d, reduces brain amyloid- β and improves memory deficits in Alzheimer's disease animal models by inhibiting cathepsin B, but not BACE1, β -secretase activity. *Journal of Alzheimer's Disease* **2011**, *26*, 387-408.
205. Satoyoshi, E. Therapeutic trials on progressive muscular dystrophy. *Internal Medicine* **1992**, *31*, 841-6.
206. LaFerla, F. M.; Green, K. N.; Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* **2007**, *8*, 499-509.

207. Bayer, T. A.; Wirths, O. Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* **2010**, *2*, 8-8.
208. Kienlen-Campard, P.; Miolet, S.; Tasiaux, B.; Octave, J. N. Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid-beta peptides, induces neuronal apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 15666-70.
209. Cruz, E.; Kumar, S.; Yuan, L.; Arikath, J.; Batra, S. K. Intracellular amyloid beta expression leads to dysregulation of the mitogen-activated protein kinase and bone morphogenetic protein-2 signaling axis. *PLoS One* **2018**, *13*, e0191696.
210. Pagani, L.; Eckert, A. Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *International Journal of Alzheimer's Disease* **2011**, 2011, 925050-925050.
211. Mossmann, D.; Vogtle, F. N.; Taskin, A. A.; Teixeira, P. F.; Ring, J.; Burkhart, J. M.; Burger, N.; Pinho, C. M.; Tadic, J.; Loreth, D.; Graff, C.; Metzger, F.; Sickmann, A.; Kretz, O.; Wiedemann, N.; Zahedi, R. P.; Madeo, F.; Glaser, E.; Meisinger, C. Amyloid-beta peptide induces mitochondrial dysfunction by inhibition of preprotein maturation. *Cell Metabolism* **2014**, *20*, 662-9.
212. Chen, J. X.; Yan, S. S. Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **2010**, *20* Suppl 2, S569-78.
213. Camilleri, A.; Zarb, C.; Caruana, M.; Ostermeier, U.; Ghio, S.; Högen, T.; Schmidt, F.; Giese, A.; Vassallo, N. Mitochondrial membrane permeabilisation by amyloid aggregates and protection by polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828*, 2532-2543.
214. Pinho, C. M.; Teixeira, P. F.; Glaser, E. Mitochondrial import and degradation of amyloid- β peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2014**, *1837*, 1069-1074.
215. Yan, S. D.; Stern, D. M. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of amyloid-beta peptide alcohol dehydrogenase (ABAD). *International Journal of Experimental Pathology* **2005**, *86*, 161-71.
216. Marques, A. T.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. ABAD: a potential therapeutic target for Abeta-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2009**, *9*, 1002-8.
217. Borger, E.; Aitken, L.; Du, H.; Zhang, W.; Gunn-Moore, F. J.; Yan, S. S. Is amyloid binding alcohol dehydrogenase a drug target for treating Alzheimer's disease? *Current Alzheimer Research* **2013**, *10*, 21-9.
218. Valaasani, K. R.; Sun, Q.; Hu, G.; Li, J.; Du, F.; Guo, Y.; Carlson, E. A.; Gan, X.; Yan, S. S. Identification of human ABAD inhibitors for rescuing A β -mediated mitochondrial dysfunction. *Current Alzheimer Research* **2014**, *11*, 128-136.
219. Yao, J.; Du, H.; Yan, S.; Fang, F.; Wang, C.; Lue, L. F.; Guo, L.; Chen, D.; Stern, D. M.; Gunn Moore, F. J.; Xi Chen, J.; Arancio, O.; Yan, S. S. Inhibition of amyloid-beta (Abeta) peptide-binding alcohol dehydrogenase-Abeta interaction reduces Abeta accumulation and improves mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* **2011**, *31*, 2313-20.
220. Benek, O.; Hroch, L.; Aitken, L.; Gunn-Moore, F.; Vinklarova, L.; Kuca, K.; Perez, D. I.; Perez, C.; Martinez, A.; Fisar, Z.; Musilek, K. 1-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-3-phenylureas as dual inhibitors of casein kinase 1 and ABAD enzymes for treatment of neurodegenerative disorders. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2018**, *33*, 665-670.
221. Xie, Y.; Deng, S.; Chen, Z.; Yan, S.; Landry, D. W. Identification of small-molecule inhibitors of the Abeta-ABAD interaction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 4657-60.
222. Kissinger, C. R.; Rejto, P. A.; Pelletier, L. A.; Thomson, J. A.; Showalter, R. E.; Abreo, M. A.; Agree, C. S.; Margosiak, S.; Meng, J. J.; Aust, R. M.; Vanderpool, D.; Li, B.; Tempczyk-Russell, A.; Villafranca, J. E. Crystal structure of human ABAD/HSD10 with a bound inhibitor: implications for design of Alzheimer's disease therapeutics. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *342*, 943-52.
223. Mandrekar-Colucci, S.; Landreth, G. E. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* **2010**, *9*, 156-167.
224. Navarro, V.; Sanchez-Mejias, E.; Jimenez, S.; Muñoz-Castro, C.; Sanchez-Varo, R.; Davila, J. C.; Vizuete, M.; Gutierrez, A.; Vitorica, J. Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Frontiers in Aging Neuroscience* **2018**, *10*, 140-140.
225. Hansen, D. V.; Hanson, J. E.; Sheng, M. Microglia in Alzheimer's disease. *The Journal of Cell Biology* **2018**, *217*, 459.
226. Sarlus, H.; Heneka, M. T. Microglia in Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Investigation* **2017**, *127*, 3240-3249.

227. Walter, S.; Letiembre, M.; Liu, Y.; Heine, H.; Penke, B.; Hao, W.; Bode, B.; Manietta, N.; Walter, J.; Schulz-Schuffer, W.; Fassbender, K. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2007**, *20*, 947-56.
228. Lehnardt, S.; Lachance, C.; Patrizi, S.; Lefebvre, S.; Follett, P. L.; Jensen, F. E.; Rosenberg, P. A.; Volpe, J. J.; Vartanian, T. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *The Journal of Neuroscience* **2002**, *22*, 2478-86.
229. Park, B. S.; Song, D. H.; Kim, H. M.; Choi, B. S.; Lee, H.; Lee, J. O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **2009**, 458, 1191-5.
230. Park, B. S.; Lee, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine* **2013**, *45*, e66-e66.
231. Xia, Y.; Yamagata, K.; Krukoff, T. L. Differential expression of the CD14/TLR4 complex and inflammatory signaling molecules following i.c.v. administration of LPS. *Brain Research* **2006**, *1095*, 85-95.
232. Huang, N. Q.; Jin, H.; Zhou, S. Y.; Shi, J. S.; Jin, F. TLR4 is a link between diabetes and Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* **2017**, *316*, 234-244.
233. Qin, Y.; Liu, Y.; Hao, W.; Decker, Y.; Tomic, I.; Menger, M. D.; Liu, C.; Fassbender, K. Stimulation of TLR4 Attenuates Alzheimer's Disease-Related Symptoms and Pathology in Tau-Transgenic Mice. *The Journal of Immunology* **2016**, *197*, 3281-3292.
234. De Paola, M.; Sestito, S. E.; Mariani, A.; Memo, C.; Fanelli, R.; Freschi, M.; Bendotti, C.; Calabrese, V.; Peri, F. Synthetic and natural small molecule TLR4 antagonists inhibit motoneuron death in cultures from ALS mouse model. *Pharmacological Research* **2016**, *103*, 180-187.
235. Molteni, M.; Bosi, A.; Rossetti, C. Natural Products with Toll-Like Receptor 4 Antagonist Activity. *International Journal of Inflammation* **2018**, 2018, 2859135.
236. Gao, W.; Xiong, Y.; Li, Q.; Yang, H. Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in Physiology* **2017**, *8*, 508-508.
237. Peri, F.; Piazza, M. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists. *Biotechnology Advances* **2012**, *30*, 251-260.
238. Wang, X.; Smith, C.; Yin, H. Targeting Toll-like receptors with small molecule agents. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 4859-4866.
239. Bajo, M.; Montgomery, S. E.; Cates, L. N.; Nadav, T.; Delucchi, A. M.; Cheng, K.; Yin, H.; Crawford, E. F.; Roberts, A. J.; Roberto, M. Evaluation of TLR4 Inhibitor, T5342126, in Modulation of Ethanol-Drinking Behavior in Alcohol-Dependent Mice. *Alcohol and Alcoholism* **2016**, *51*, 541-548.
240. Marshall, J. D.; Heeke, D. S.; Rao, E.; Maynard, S. K.; Hornigold, D.; McCrae, C.; Fraser, N.; Tovchigrechko, A.; Yu, L.; Williams, N.; King, S.; Cooper, M. E.; Hajjar, A. M.; Woo, J. C. A Novel Class of Small Molecule Agonists with Preference for Human over Mouse TLR4 Activation. *PLoS One* **2016**, *11*, e0164632.
241. Chong, F. P.; Ng, K. Y.; Koh, R. Y.; Chye, S. M. Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2018**, *38*, 965-980.
242. Mehta, D.; Jackson, R.; Paul, G.; Shi, J.; Sabbagh, M. Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2017**, *26*, 735-739.
243. Rosenmann, H.; Blum, D.; Kaye, R.; Ittner, L. M. Tau protein: function and pathology. *International Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, 2012, 707482-707482.
244. Guo, T.; Noble, W.; Hanger, D. P. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica* **2017**, *133*, 665-704.
245. Patterson, K. R.; Remmers, C.; Fu, Y.; Brooker, S.; Kanaan, N. M.; Vana, L.; Ward, S.; Reyes, J. F.; Philibert, K.; Glucksman, M. J.; Binder, L. I. Characterization of Prefibrillar Tau Oligomers in Vitro and in Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 23063-23076.
246. Sarkar, S. Neurofibrillary tangles mediated human neuronal tauopathies: insights from fly models. *J Genet* **2018**, *97*, 783-793.
247. Gong, C. X.; Iqbal, K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Current Medicinal Chemistry* **2008**, *15*, 2321-2328.
248. Lau, L. F.; Schachter, J. B.; Seymour, P. A.; Sanner, M. A. Tau protein phosphorylation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2002**, *2*, 395-415.

249. Wang, J. Z.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *The European Journal of Neuroscience* **2007**, *25*, 59-68.
250. Torrent, L.; Ferrer, I. PP2A and Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research* **2012**, *9*, 248-56.
251. Tell, V.; Hilgeroth, A. Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2013**, *7*, 189-189.
252. McClinch, K.; Avelar, R. A.; Callejas, D.; Izadmehr, S.; Wiredja, D.; Perl, A.; Sangodkar, J.; Kastrinsky, D. B.; Schlatzer, D.; Cooper, M.; Kiselar, J.; Stachnik, A.; Yao, S.; Hoon, D.; McQuaid, D.; Zaware, N.; Gong, Y.; Brautigam, D. L.; Plymate, S. R.; Sprenger, C. C. T.; Oh, W. K.; Levine, A. C.; Kirschenbaum, A.; Sfakianos, J. P.; Sears, R.; DiFeo, A.; Ioannou, Y.; Ohlmeyer, M.; Narla, G.; Galsky, M. D. Small-Molecule Activators of Protein Phosphatase 2A for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Research* **2018**, *78*, 2065-2080.
253. Toop, H. D.; Dun, M. D.; Ross, B. K.; Flanagan, H. M.; Verrills, N. M.; Morris, J. C. Development of novel PP2A activators for use in the treatment of acute myeloid leukaemia. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 4605-16.
254. Hooper, C.; Killick, R.; Lovestone, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **2008**, *104*, 1433-1439.
255. Llorens-Martín, M.; Jurado, J.; Hernández, F.; Avila, J. GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Frontiers in molecular neuroscience* **2014**, *7*, 46-46.
256. An, N.; Lin, H. M.; Yang, C. Y.; Zhang, T.; Tong, R. H.; Chen, Y. H.; Qu, F. Y. Gated magnetic mesoporous silica nanoparticles for intracellular enzyme-triggered drug delivery. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2016**, *69*, 292-300.
257. Cai, Z.; Zhao, Y.; Zhao, B. Roles of glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* **2012**, *9*, 864-79.
258. Hanger, D. P.; Byers, H. L.; Wray, S.; Leung, K. Y.; Saxton, M. J.; Seereeram, A.; Reynolds, C. H.; Ward, M. A.; Anderton, B. H. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 23645-54.
259. Engel, T.; Hernandez, F.; Avila, J.; Lucas, J. J. Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *The Journal of Neuroscience* **2006**, *26*, 5083-90.
260. Martinez, A.; Alonso, M.; Castro, A.; Perez, C.; Moreno, F. J. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1292-9.
261. Palomo, V.; Soteras, I.; Perez, D. I.; Perez, C.; Gil, C.; Campillo, N. E.; Martinez, A. Exploring the binding sites of glycogen synthase kinase 3. Identification and characterization of allosteric modulation cavities. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 8461-70.
262. Palomo, V.; Perez, D. I.; Roca, C.; Anderson, C.; Rodriguez-Muela, N.; Perez, C.; Morales-Garcia, J. A.; Reyes, J. A.; Campillo, N. E.; Perez-Castillo, A. M.; Rubin, L. L.; Timchenko, L.; Gil, C.; Martinez, A. Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3 beta: Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 4983-5001.
263. Wagner, F. F.; Bishop, J. A.; Gale, J. P.; Shi, X.; Walk, M.; Ketterman, J.; Patnaik, D.; Barker, D.; Walpita, D.; Campbell, A. J.; Nguyen, S.; Lewis, M.; Ross, L.; Weiwer, M.; An, W. F.; Germain, A. R.; Nag, P. P.; Metkar, S.; Kaya, T.; Dandapani, S.; Olson, D. E.; Barbe, A. L.; Lazzaro, F.; Sacher, J. R.; Cheah, J. H.; Fei, D.; Perez, J.; Munoz, B.; Palmer, M.; Stegmaier, K.; Schreiber, S. L.; Scolnick, E.; Zhang, Y. L.; Haggarty, S. J.; Holson, E. B.; Pan, J. Q. Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3 with Exquisite Kinome-Wide Selectivity and Their Functional Effects. *ACS Chemical Biology* **2016**, *11*, 1952-63.
264. Duda, P.; Wisniewski, J.; Wojtowicz, T.; Wojcicka, O.; Jaskiewicz, M.; Drulis-Fajdasz, D.; Rakus, D.; McCubrey, J. A.; Gizak, A. Targeting GSK3 signaling as a potential therapy of neurodegenerative diseases and aging. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2018**, *22*, 833-848.
265. Pandey, M. K.; DeGrado, T. R. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)-Targeted Therapy and Imaging. *Theranostics* **2016**, *6*, 571-593.
266. Unzeta, M.; Esteban, G.; Bolea, I.; Fogel, W. A.; Ramsay, R. R.; Youdim, M. B.; Tipton, K. F.; Marco-Contelles, J. Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* **2016**, *10*, 205.

267. de Freitas Silva, M.; Dias, K. S. T.; Gontijo, V. S.; Ortiz, C. J. C.; Viegas, C., Jr. Multi-Target Directed Drugs as a Modern Approach for Drug Design Towards Alzheimer's Disease: An Update. *Current Medicinal Chemistry* **2018**, *25*, 3491-3525.
268. Lao, K.; Ji, N.; Zhang, X.; Qiao, W.; Tang, Z.; Gou, X. Drug development for Alzheimer's disease: review. *Journal of Drug Targeting* **2018**, 1-10.
269. Cummings, J.; Lee, G.; Mortsdorf, T.; Ritter, A.; Zhong, K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimer's & Dementia* **2017**, *3*, 367-384.
270. Patel, C. N.; George, J. J.; Modi, K. M.; Narechania, M. B.; Patel, D. P.; Gonzalez, F. J.; Pandya, H. A. Pharmacophore-based virtual screening of catechol-o-methyltransferase (COMT) inhibitors to combat Alzheimer's disease. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2017**, 1-20.
271. da Silva, C. H.; Carvalho, I.; Taft, C. A. Virtual screening, molecular interaction field, molecular dynamics, docking, density functional, and ADMET properties of novel AChE inhibitors in Alzheimer's disease. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2007**, *24*, 515-24.
272. Lin, W.; Zheng, X.; Fang, D.; Zhou, S.; Wu, W.; Zheng, K. Identifying HQC Inhibitors of Alzheimer's Disease by Effective Customized Pharmacophore-Based Virtual Screening, Molecular Dynamic Simulation, and Binding Free Energy Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2018**, *187* (4), 1173-1192.
273. Lin, C.-H.; Hsieh, Y.-S.; Wu, Y.-R.; Hsu, C.-J.; Chen, H.-C.; Huang, W.-H.; Chang, K.-H.; Hsieh-Li, H. M.; Su, M.-T.; Sun, Y.-C.; Lee, G.-C.; Lee-Chen, G.-J. Identifying GSK-3 β kinase inhibitors of Alzheimer's disease: Virtual screening, enzyme, and cell assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *89*, 11-19.
274. Roy, S.; Kumar, A.; Baig, M. H.; Masařík, M.; Provazník, I. Virtual screening, ADMET profiling, molecular docking and dynamics approaches to search for potent selective natural molecules based inhibitors against metallothionein-III to study Alzheimer's disease. *Methods* **2015**, *83*, 105-110.
275. Rodrigues, R. P.; Silva, C. H. T. P. d. Discovery of potential neurodegenerative inhibitors in Alzheimer's disease by casein kinase 1 structure-based virtual screening. *Medicinal Chemistry Research* **2017**, *26*, 3274-3285.
276. Sopkova-de Oliveira Santos, J.; Lesnard, A.; Agondanou, J.-H.; Dupont, N.; Godard, A.-M.; Stiebing, S.; Rochais, C.; Fabis, F.; Dallemagne, P.; Bureau, R.; Rault, S. Virtual Screening Discovery of New Acetylcholinesterase Inhibitors Issued from CERMN Chemical Library. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2010**, *50*, 422-428.
277. Susimair, P.-M.; Vinicius, B. D. S.; Carlton, A. T. a. C. H. T. P. D. S. Pharmacophore-based Drug Design of Novel Potential Tau Ligands for Alzheimer's Disease Treatment. *Current Physical Chemistry* **2014**, *4*, 35-44.
278. Semighini, E. P. In Silico Design of Beta-Secretase Inhibitors in Alzheimer's Disease. *Chemical Biology & Drug Design* **2015**, *86*, 284-90.
279. Zhang, W.-T.; Jiang, F.-C.; Liu, D.; Du, G. Pharmacopore hypothesis generation of BACE-1 inhibitors and pharmacophore-driven identification of potent multi-target neuroprotective agents. *Medicinal Chemistry Research* **2012**, *21*, 3656-3668.
280. Dileep, K. V.; Remya, C.; Tintu, I.; Sadasivan, C. Designing of multi-target-directed ligands against the enzymes associated with neuroinflammation: an in silico approach. *Frontiers in Life Science* **2013**, *7*, 174-185.
281. Hui, A.-l.; Chen, Y.; Zhu, S.-j.; Gan, C.-s.; Pan, J.; Zhou, A. Design and synthesis of tacrine-phenothiazine hybrids as multitarget drugs for Alzheimer's disease. *Medicinal Chemistry Research* **2014**, *23*, 3546-3557.
282. Choubey, S. K.; Jeyakanthan, J. Molecular dynamics and quantum chemistry-based approaches to identify isoform selective HDAC2 inhibitor - a novel target to prevent Alzheimer's disease. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* **2018**, *38*, 266-278.
283. Kacker, P.; Bottegoni, G.; Cavalli, A. Computational methods in the discovery and design of BACE-1 inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 6095-111.
284. Speck-Planche, A.; V Kleandrova, V.; Luan, F.; Cordeiro, N. D. S. Multi-target inhibitors for proteins associated with Alzheimer: in silico discovery using fragment-based descriptors. *Current Alzheimer Research* **2013**, *10*, 117-124.
285. Fang, J.; Li, Y.; Liu, R.; Pang, X.; Li, C.; Yang, R.; He, Y.; Lian, W.; Liu, A. L.; Du, G. H. Discovery of multitarget-directed ligands against Alzheimer's disease through systematic prediction of chemical-protein interactions. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2015**, *55*, 149-64.

286. Abad, V. C.; Guilleminault, C. New developments in the management of narcolepsy. *Nature and Science of Sleep* **2017**, *9*, 39-57.
287. Dauvilliers, Y.; Montplaisir, J.; Molinari, N.; Carlander, B.; Ondze, B.; Besset, A.; Billiard, M. Age at onset of narcolepsy in two large populations of patients in France and Quebec. *Neurology* **2001**, *57*, 2029-33.
288. Ross, A. J.; Medow, M. S.; Rowe, P. C.; Stewart, J. M. What is brain fog? An evaluation of the symptom in postural tachycardia syndrome. *Clinical Autonomic Research* **2013**, *23*, 305-311.
289. Chen, M. Brain fog: The race for criptistemology. *Journal of Literary & Cultural Disability Studies* **2014**, *8*, 171-184.
290. Mignot, E. A commentary on the neurobiology of the hypocretin/orexin system. *Neuropsychopharmacology* **2001**, *25*, S5-13.
291. Canellas, F.; Lin, L.; Julia, M. R.; Clemente, A.; Vives-Bauza, C.; Ollila, H. M.; Hong, S. C.; Arboleya, S. M.; Einen, M. A.; Faraco, J.; Fernandez-Vina, M.; Mignot, E. Dual cases of type 1 narcolepsy with schizophrenia and other psychotic disorders. *Journal of Clinical Sleep Medicine* **2014**, *10*, 1011-8.
292. Huang, Y. S.; Hsiao, I. T.; Liu, F. Y.; Hwang, F. M.; Lin, K. L.; Huang, W. C.; Guilleminault, C. Neurocognition, sleep, and PET findings in type 2 vs type 1 narcolepsy. *Neurology* **2018**, *90*, e1478-e1487.
293. Mahlios, J.; De la Herran-Arita, A. K.; Mignot, E. The autoimmune basis of narcolepsy. *Current Opinion in Neurobiology* **2013**, *23*, 767-73.
294. de Lecea, L.; Kilduff, T. S.; Peyron, C.; Gao, X.; Foye, P. E.; Danielson, P. E.; Fukuhara, C.; Battenberg, E. L.; Gautvik, V. T.; Bartlett, F. S., 2nd; Frankel, W. N.; van den Pol, A. N.; Bloom, F. E.; Gautvik, K. M.; Sutcliffe, J. G. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 322-7.
295. Tsuneki, H.; Kon, K.; Ito, H.; Yamazaki, M.; Takahara, S.; Toyooka, N.; Ishii, Y.; Sasahara, M.; Wada, T.; Yanagisawa, M.; Sakurai, T.; Sasaoka, T. Timed Inhibition of Orexin System by Suvorexant Improved Sleep and Glucose Metabolism in Type 2 Diabetic db/db Mice. *Endocrinology* **2016**, *157*, 4146-4157.
296. Scammell, T. E.; Winrow, C. J. Orexin receptors: pharmacology and therapeutic opportunities. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2011**, *51*, 243-266.
297. Palasz, A.; Lapray, D.; Peyron, C.; Rojczyk-Golebiewska, E.; Skowronek, R.; Markowski, G.; Czajkowska, B.; Krzystanek, M.; Wiaderkiewicz, R. Dual orexin receptor antagonists - promising agents in the treatment of sleep disorders. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* **2014**, *17*, 157-68.
298. Liguori, C. Orexin and Alzheimer's Disease. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* **2017**, *33*, 305-322.
299. Davies, J.; Chen, J.; Pink, R.; Carter, D.; Saunders, N.; Sotiriadis, G.; Bai, B.; Pan, Y.; Howlett, D.; Payne, A.; Randeve, H.; Karteris, E. Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 12584-12584.
300. Mavanji, V.; Butterick, T. A.; Duffy, C. M.; Nixon, J. P.; Billington, C. J.; Kotz, C. M. Orexin/hypocretin treatment restores hippocampal-dependent memory in orexin-deficient mice. *Neurobiology of Learning and Memory* **2017**, *146*, 21-30.
301. Karteris, E.; Chen, J.; Randeve, H. S. Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2004**, *89*, 1957-62.
302. Xu, T. R.; Yang, Y.; Ward, R.; Gao, L.; Liu, Y. Orexin receptors: multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders. *Cell Signal* **2013**, *25*, 2413-23.
303. Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R. M.; Tanaka, H.; Williams, S. C.; Richardson, J. A.; Kozlowski, G. P.; Wilson, S.; Arch, J. R.; Buckingham, R. E.; Haynes, A. C.; Carr, S. A.; Annan, R. S.; McNulty, D. E.; Liu, W. S.; Terrett, J. A.; Elshourbagy, N. A.; Bergsma, D. J.; Yanagisawa, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **1998**, *92*, 573-85.
304. Wang, C.; Wang, Q.; Ji, B.; Pan, Y.; Xu, C.; Cheng, B.; Bai, B.; Chen, J. The Orexin/Receptor System: Molecular Mechanism and Therapeutic Potential for Neurological Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2018**, *11*, 220-220.

305. Zeitzer, J. M.; Nishino, S.; Mignot, E. The neurobiology of hypocretins (orexins), narcolepsy and related therapeutic interventions. *Trends in Pharmacological Sciences* **2006**, *27*, 368-74.
306. Takenoshita, S.; Sakai, N.; Chiba, Y.; Matsumura, M.; Yamaguchi, M.; Nishino, S. An overview of hypocretin based therapy in narcolepsy. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2018**, *27*, 389-406.
307. Arias-Carrion, O.; Murillo-Rodriguez, E. Cell transplantation: a future therapy for narcolepsy? *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* **2009**, *8*, 309-14.
308. Norman, J. L.; Anderson, S. L. Novel class of medications, orexin receptor antagonists, in the treatment of insomnia - critical appraisal of suvorexant. *Nature and Science of Sleep* **2016**, *8*, 239-247.
309. Connor, K. M.; Ceesay, P.; Hutzelmann, J.; Snavely, D.; Krystal, A. D.; Trivedi, M. H.; Thase, M.; Lines, C.; Herring, W. J.; Michelson, D. Phase II Proof-of-Concept Trial of the Orexin Receptor Antagonist Filorexant (MK-6096) in Patients with Major Depressive Disorder. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* **2017**, *20*, 613-618.
310. Coleman, P. J.; Gotter, A. L.; Herring, W. J.; Winrow, C. J.; Renger, J. J. The Discovery of Suvorexant, the First Orexin Receptor Drug for Insomnia. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2017**, *57*, 509-533.
311. Hirose, M.; Egashira, S.; Goto, Y.; Hashihayata, T.; Ohtake, N.; Iwaasa, H.; Hata, M.; Fukami, T.; Kanatani, A.; Yamada, K. N-acyl 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline: the first orexin-2 receptor selective non-peptidic antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 4497-9.
312. Levy, K. A.; Brodник, Z. D.; Shaw, J. K.; Perrey, D. A.; Zhang, Y.; Espana, R. A. Hypocretin receptor 1 blockade produces bimodal modulation of cocaine-associated mesolimbic dopamine signaling. *Psychopharmacology (Berl)* **2017**, *234*, 2761-2776.
313. Perrey, D. A.; Decker, A. M.; Zhang, Y. Synthesis and Evaluation of Orexin-1 Receptor Antagonists with Improved Solubility and CNS Permeability. *ACS Chemical Neuroscience* **2018**, *9*, 587-602.
314. Takai, T.; Takaya, T.; Nakano, M.; Akutsu, H.; Nakagawa, A.; Aimoto, S.; Nagai, K.; Ikegami, T. Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *Journal of Peptide Science* **2006**, *12*, 443-54.
315. Yin, J.; Mobarec, J. C.; Kolb, P.; Rosenbaum, D. M. Crystal structure of the human OX2 orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant. *Nature* **2015**, *519*, 247-50.
316. Yin, J.; Babaoglu, K.; Brautigam, C. A.; Clark, L.; Shao, Z.; Scheuermann, T. H.; Harrell, C. M.; Gotter, A. L.; Roecker, A. J.; Winrow, C. J.; Renger, J. J.; Coleman, P. J.; Rosenbaum, D. M. Structure and ligand-binding mechanism of the human OX1 and OX2 orexin receptors. *Nature Structural & Molecular Biology* **2016**, *23*, 293-9.
317. Nagahara, T.; Saitoh, T.; Kutsumura, N.; Irukayama-Tomobe, Y.; Ogawa, Y.; Kuroda, D.; Gouda, H.; Kumagai, H.; Fujii, H.; Yanagisawa, M.; Nagase, H. Design and Synthesis of Non-Peptide, Selective Orexin Receptor 2 Agonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 7931-7.
318. Irukayama-Tomobe, Y.; Ogawa, Y.; Tominaga, H.; Ishikawa, Y.; Hosokawa, N.; Ambai, S.; Kawabe, Y.; Uchida, S.; Nakajima, R.; Saitoh, T.; Kanda, T.; Vogt, K.; Sakurai, T.; Nagase, H.; Yanagisawa, M. Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2017**, *114*, 5731-5736.
319. Lee, J.; Reddy, M. M.; Kodadek, T. Discovery of an Orexin Receptor Positive Potentiator. *Chemical Science* **2010**, *1* (1), 48.
320. Turku, A.; Rinne, M. K.; Boije Af Gennas, G.; Xhaard, H.; Lindholm, D.; Kukkonen, J. P. Orexin receptor agonist Yan 7874 is a weak agonist of orexin/hypocretin receptors and shows orexin receptor-independent cytotoxicity. *PLoS One* **2017**, *12*, e0178526.
321. Turku, A.; Borrel, A.; Leino, T. O.; Karhu, L.; Kukkonen, J. P.; Xhaard, H. Pharmacophore Model To Discover OX1 and OX2 Orexin Receptor Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 8263-75.
322. Heifetz, A.; Bodkin, M. J.; Biggin, P. C. Discovery of the First Selective, Nonpeptidic Orexin 2 Receptor Agonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 7928-30.
323. Manglik, A.; Kobilka, B. The role of protein dynamics in GPCR function: insights from the beta2AR and rhodopsin. *Current Opinion in Cell Biology* **2014**, *27*, 136-43.

324. Trzaskowski, B.; Latek, D.; Yuan, S.; Ghoshdastider, U.; Debinski, A.; Filipek, S. Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 1090-109.
325. Heifetz, A.; Morris, G. B.; Biggin, P. C.; Barker, O.; Fryatt, T.; Bentley, J.; Hallett, D.; Manikowski, D.; Pal, S.; Reifegerste, R.; Slack, M.; Law, R. Study of human Orexin-1 and -2 G-protein-coupled receptors with novel and published antagonists by modeling, molecular dynamics simulations, and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **2012**, *51*, 3178-97.
326. Heifetz, A.; Barker, O.; Morris, G. B.; Law, R. J.; Slack, M.; Biggin, P. C. Toward an understanding of agonist binding to human Orexin-1 and Orexin-2 receptors with G-protein-coupled receptor modeling and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **2013**, *52*, 8246-60.
327. Heifetz, A.; Aldeghi, M.; Chudyk, E. I.; Fedorov, D. G.; Bodkin, M. J.; Biggin, P. C. Using the fragment molecular orbital method to investigate agonist-orexin-2 receptor interactions. *Biochemical Society Transactions* **2016**, *44*, 574-581.
328. Fedorov, D. G.; Nagata, T.; Kitauro, K. Exploring chemistry with the fragment molecular orbital method. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14*, 7562-77.
329. Fedorov, D. G.; Kitauro, K. Extending the power of quantum chemistry to large systems with the fragment molecular orbital method. *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 6904-14.
330. Moore, D. H.; Clifford, C. B.; Crawford, I. T.; Cole, G. M.; Baggett, J. M. Review of nerve agent inhibitors and reactivators of acetylcholinesterase. In *Enzymes of the cholinesterase family*, Springer: 1995; pp 297-304.
331. Chai, P. R.; Hayes, B. D.; Erickson, T. B.; Boyer, E. W. Novichok agents: a historical, current, and toxicological perspective. *Toxicology Communications* **2018**, *2*, 45-48.
332. Brimijoin, S.; Hammond, P. Butyrylcholinesterase in Human Brain and Acetylcholinesterase in Human Plasma: Trace Enzymes Measured by Two-Site Immunoassay. *Journal of Neurochemistry* **1988**, *51*, 1227-1231.
333. Huang, Y. J.; Huang, Y.; Baldassarre, H.; Wang, B.; Lazaris, A.; Leduc, M.; Bilodeau, A. S.; Bellemare, A.; Cote, M.; Herskovits, P.; Touati, M.; Turcotte, C.; Valeanu, L.; Lemee, N.; Wilgus, H.; Begin, I.; Bhatia, B.; Rao, K.; Neveu, N.; Brochu, E.; Pierson, J.; Hockley, D. K.; Cerasoli, D. M.; Lenz, D. E.; Karatzas, C. N.; Langermann, S. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 13603-8.
334. Lockridge, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics* **2015**, *148*, 34-46.
335. Brimijoin, S.; Chen, V. P.; Pang, Y. P.; Geng, L.; Gao, Y. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 271-275.
336. Chen, V. P.; Gao, Y.; Geng, L.; Brimijoin, S. Butyrylcholinesterase regulates central ghrelin signaling and has an impact on food intake and glucose homeostasis. *International Journal of Obesity* **2017**, *41*, 1413-1419.
337. Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 9031-5.
338. Bajaj, P.; Tripathy, R. K.; Aggarwal, G.; Datusalia, A. K.; Sharma, S. S.; Pande, A. H. Refolded Recombinant Human Paraoxonase 1 Variant Exhibits Prophylactic Activity Against Organophosphate Poisoning. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2016**, *180*, 165-76.
339. Vale, A.; Lotti, M. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. *Handbook of Clinical Neurology* **2015**, *131*, 149-68.
340. Mercey, G.; Verdelet, T.; Renou, J.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Nachon, F.; Jean, L.; Renard, P. Y. Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 756-66.
341. Aurbek, N.; Herkert, N. M.; Koller, M.; Thiermann, H.; Worek, F. Kinetic analysis of interactions of different sarin and tabun analogues with human acetylcholinesterase and oximes: is there a structure-activity relationship? *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187*, 215-9.
342. Kovarik, Z.; Macek, N.; Sit, R. K.; Radic, Z.; Fokin, V. V.; Barry Sharpless, K.; Taylor, P. Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *203*, 77-80.

343. Louise-Leriché, L.; Paunescu, E.; Saint-Andre, G.; Baati, R.; Romieu, A.; Wagner, A.; Renard, P. Y. A HTS assay for the detection of organophosphorus nerve agent scavengers. *Chemistry* **2010**, *16*, 3510-23.
344. Franjesevic, A. J.; Sillart, S. B.; Beck, J. M.; Vyas, S.; Callam, C. S.; Hadad, C. M. Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Chemistry* **2019**, *25*, 5337-5371.
345. Zhuang, Q.; Franjesevic, A. J.; Corrigan, T. S.; Coldren, W. H.; Dicken, R.; Sillart, S.; DeYong, A.; Yoshino, N.; Smith, J.; Fabry, S.; Fitzpatrick, K.; Blanton, T. G.; Joseph, J.; Yoder, R. J.; McElroy, C. A.; Ekici, O. D.; Callam, C. S.; Hadad, C. M. Demonstration of In Vitro Resurrection of Aged Acetylcholinesterase after Exposure to Organophosphorus Chemical Nerve Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61*, 7034-7042.
346. Xu, Y.; Cheng, S.; Sussman, J. L.; Silman, I.; Jiang, H. Computational Studies on Acetylcholinesterases. *Molecules* **2017**, *22*.
347. Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, *253*, 872-9.
348. Xu, Y.; Shen, J.; Luo, X.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Chen, K.; Jiang, H. How does huperzine A enter and leave the binding gorge of acetylcholinesterase? Steered molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 11340-9.
349. Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, J. A. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 10572-7.
350. Sirin, G. S.; Zhou, Y.; Lior-Hoffmann, L.; Wang, S.; Zhang, Y. Aging mechanism of soman inhibited acetylcholinesterase. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 12199-207.
351. Sirin, G. S.; Zhang, Y. How is acetylcholinesterase phosphonylated by soman? An ab initio QM/MM molecular dynamics study. *The Journal of Physical Chemistry A* **2014**, *118*, 9132-9.
352. Lo, R.; Chandar, N. B.; Kesharwani, M. K.; Jain, A.; Ganguly, B. In silico studies in probing the role of kinetic and structural effects of different drugs for the reactivation of tabun-inhibited AChE. *PLoS One* **2013**, *8*, e79591.
353. Liu, J.; Zhang, Y.; Zhan, C. G. Reaction pathway and free-energy barrier for reactivation of dimethylphosphoryl-inhibited human acetylcholinesterase. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 16226-36.
354. Driant, T.; Nachon, F.; Ollivier, C.; Renard, P. Y.; Derat, E. On the Influence of the Protonation States of Active Site Residues on AChE Reactivation: A QM/MM Approach. *ChemBiochem* **2017**, *18*, 666-675.
355. da Silva Goncalves, A.; Franca, T. C.; Caetano, M. S.; Ramalho, T. C. Reactivation steps by 2-PAM of tabun-inhibited human acetylcholinesterase: reducing the computational cost in hybrid QM/MM methods. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2014**, *32*, 301-7.
356. Giacoppo, J. O.; T, C. C. F.; Kuca, K.; da Cunha, E. F.; Abagyan, R.; Mancini, D. T.; Ramalho, T. C. Molecular modeling and in vitro reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2015**, *33*, 2048-58.
357. de Almeida, J. S.; Cuya Guizado, T. R.; Guimaraes, A. P.; Ramalho, T. C.; Goncalves, A. S.; de Koning, M. C.; Franca, T. C. Docking and molecular dynamics studies of peripheral site ligand-oximes as reactivators of sarin-inhibited human acetylcholinesterase. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2016**, *34*, 2632-2642.
358. Kuca, K.; Jun, D.; Junova, L.; Musilek, K.; Hrabanova, M.; da Silva, J. A. V.; Ramalho, T. C.; Valko, M.; Wu, Q.; Nepovimova, E.; Franca, T. C. C. Synthesis, Biological Evaluation, and Docking Studies of Novel Bisquaternary Aldoxime Reactivators on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon. *Molecules* **2018**, *23*.
359. da Silva, J. A. V.; Nepovimova, E.; Ramalho, T. C.; Kuca, K.; Celmar Costa Franca, T. Molecular modeling studies on the interactions of 7-methoxytacrine-4-pyridinealdoxime, 4-PA, 2-PAM, and obidoxime with VX-inhibited human acetylcholinesterase: a near attack conformation approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2019**, *34*, 1018-1029.
360. Berberich, J. A.; Stouch, T. R.; Manepalli, S.; Esposito, E. X.; Madura, J. D. Biological Testing of Organophosphorus-Inactivated Acetylcholinesterase Oxime Reactivators Identified via Virtual Screening. *Chemical Research in Toxicology* **2016**, *29*, 1534-40.
361. Bhattacharjee, A. K.; Marek, E.; Le, H. T.; Ratcliffe, R.; DeMar, J. C.; Pervitsky, D.; Gordon, R. K. Discovery of non-oxime reactivators using an in silico pharmacophore model of reactivators

- for DFP-inhibited acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *90*, 209-20.
362. Bhattacharjee, A. K.; Marek, E.; Le, H. T.; Gordon, R. K. Discovery of non-oxime reactivators using an in silico pharmacophore model of oxime reactivators of OP-inhibited acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *49*, 229-38.
 363. Ochoa, R.; Rodriguez, C. A.; Zuluaga, A. F. Prediction of Ligands Binding Acetylcholinesterase with Potential Antidotal Activity: A Virtual Screening Approach. *Mol Inform* **2019**, –.
 364. Katalinic, M.; Macek Hrvat, N.; Baumann, K.; Morasi Pipercic, S.; Makaric, S.; Tomic, S.; Jovic, O.; Hrenar, T.; Milicevic, A.; Jelic, D.; Zunec, S.; Primozic, I.; Kovarik, Z. A comprehensive evaluation of novel oximes in creation of butyrylcholinesterase-based nerve agent bioscavengers. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2016**, *310*, 195-204.
 365. Veselinovic, A. M.; Veselinovic, J. B.; Toropov, A. A.; Toropova, A. P.; Nikolic, G. M. QSAR models for the reactivation of sarin inhibited acetylcholinesterase by quaternary pyridinium oximes based on Monte Carlo method. *Current Computer-Aided Drug Design* **2014**, *10*, 266-73.
 366. Mager, P. P.; Weber, A. Structural bioinformatics and QSAR analysis applied to the acetylcholinesterase and bispyridinium aldoximes. *Drug Design and Discovery* **2003**, *18*, 127-50.
 367. Ochoa, R.; Rodriguez, C. A.; Zuluaga, A. F. Perspectives for the structure-based design of acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2016**, *68*, 176-183.
 368. Vitorović-Todorović, M. D.; Cvijetić, I. N.; Juranić, I. O.; Drakulić, B. J. The 3D-QSAR study of 110 diverse, dual binding, acetylcholinesterase inhibitors based on alignment independent descriptors (GRIND-2). The effects of conformation on predictive power and interpretability of the models. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2012**, *38*, 194-210.
 369. Vitorović-Todorović, M. D.; Juranić, I. O.; Mandić, L. M.; Drakulić, B. J. 4-Aryl-4-oxo-N-phenyl-2-aminylbutyramides as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. Preparation, anticholinesterase activity, docking study, and 3D structure-activity relationship based on molecular interaction fields. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 1181-1193.
 370. Cevatemre, B.; Botta, B.; Mori, M.; Berardozi, S.; Ingallina, C.; Ulukaya, E. The plant-derived triterpenoid tingenin B is a potent anticancer agent due to its cytotoxic activity on cancer stem cells of breast cancer in vitro. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *260*, 248-255.
 371. Herrup, K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature Neuroscience* **2015**, *18*, 794-9.
 372. Svajger, U.; Brus, B.; Turk, S.; Sova, M.; Hodnik, V.; Anderluh, G.; Gobec, S. Novel toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists identified by structure- and ligand-based virtual screening. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *70*, 393-9.
 373. Neve, J. E.; Wijesekera, H. P.; Duffy, S.; Jenkins, I. D.; Ripper, J. A.; Teague, S. J.; Campitelli, M.; Garavelas, A.; Nikolakopoulos, G.; Le, P. V.; de, A. L. P.; Pham, N. B.; Shelton, P.; Fraser, N.; Carroll, A. R.; Avery, V. M.; McCrae, C.; Williams, N.; Quinn, R. J. Euodenine A: a small-molecule agonist of human TLR4. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 1252-75.
 374. Gieleciak, R.; Polanski, J. Modeling robust QSAR. 2. iterative variable elimination schemes for CoMSA: application for modeling benzoic acid pKa values. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2007**, *47*, 547-56.
 375. Ban, F.; Dalal, K.; Li, H.; LeBlanc, E.; Rennie, P. S.; Cherkasov, A. Best Practices of Computer-Aided Drug Discovery: Lessons Learned from the Development of a Preclinical Candidate for Prostate Cancer with a New Mechanism of Action. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2017**, *57*, 1018-1028.

9. PODÍL PŘEDKLADATELE HABILITAČNÍ PRÁCE NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH

9.1. Původní práce

- P1. Hlavní autor, tvorba manuskriptu, návrh konceptu, molekulární docking
- P2. Hlavní autor, tvorba manuskriptu, kompilace programů, výpočty s využitím HPC
- P3. Hlavní autor, tvorba manuskriptu, geometrické a energetické výpočty, SBVS
- P4. Hlavní autor, tvorba manuskriptu, QSAR, QM výpočty
- P5. Hlavní autor, tvorba manuskriptu, syntéza všech látek, QSAR, QM výpočty
- P6. Hlavní autor, tvorba manuskriptu, QSAR, QM výpočty, statistické výpočty
- P7. Hlavní autor, tvorba manuskriptu, design neuronové sítě, programování, výpočty
- P8. Spoluautor, výpočet molekulárních deskriptorů, podíl na tvorbě manuskriptu
- P9. Spoluautor, QSAR, tvorba příslušné části manuskriptu
- P10. Spoluautor, QSAR, tvorba příslušné části manuskriptu
- P11. Spoluautor, QSAR, tvorba příslušné části manuskriptu
- P12. Spoluautor, QSAR, tvorba příslušné části manuskriptu
- P13. Spoluautor, všechny QM výpočty, tvorba příslušné části manuskriptu
- P14. Spoluautor, všechny QM výpočty, tvorba příslušné části manuskriptu
- P15. Hlavní autor, tvorba manuskriptu, design neuronové sítě, všechny výpočty
- P16. Hlavní autor, tvorba manuskriptu, všechny QM a 3D QSAR výpočty
- P17. Spoluautor, doplnění části o SAR, podíl na tvorbě manuskriptu
- P18. Spoluautor a školitel hlavního autora, návrh koncepce, interpretace výsledků
- P19. Spoluautor a školitel hlavního autora, návrh koncepce, interpretace výsledků
- P20. Spoluautor, geometrická analýza proteinů, výpočet RMSD
- P21. Spoluautor, všechny výpočty, molekulární docking, QSAR, tvorba manuskriptu
- P22. Spoluautor, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu
- P23. Spoluautor, kompletní metabolická studie, molekulární docking, tvorba manuskriptu
- P24. Spoluautor, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu
- P25. Spoluautor, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu
- P26. Spoluautor, molekulární docking, diskuze SAR, podíl na tvorbě manuskriptu
- P27. Spoluautor, podíl na tvorbě manuskriptu

- P28.** Spoluautor, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu
- P29.** Spoluautor, stanovení HRMS, farmakokinetická analýza, molekulární docking
- P30.** Spoluautor, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu
- P31.** Spoluautor, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu
- P32.** Spoluautor, podíl na tvorbě manuskriptu
- P33.** Spoluautor, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu
- P34.** Spoluautor, podíl na tvorbě manuskriptu
- P35.** Hlavní autor, tvorba manuskriptu, design experimentů, všechny HPLC analýzy
- P36.** Spoluautor, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu
- P37.** Spoluautor, všechny QSAR výpočty a celá farmakoforová analýza
- P38.** Spoluautor, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu
- P39.** Spoluautor, design *in silico* experimentů, kompletní SBVS, tvorba manuskriptu
- P40.** Spoluautor, všechny *in silico* simulace a výpočty, tvorba manuskriptu
- P41.** Spoluautor, podíl na tvorbě manuskriptu
- P42.** Spoluautor, podíl na tvorbě manuskriptu
- P43.** Hlavní autor, tvorba manuskriptu, kompletní provedení SBVS na HPC
- P44.** Ekvivalentní hlavní autor, tvorba manuskriptu, SBVS a všechny výpočty
- P45.** Spoluautor, preparativní HPLC, molekulární docking, interpretace SAR
- P46.** Spoluautor, QM výpočty, molekulární docking, podíl na tvorbě manuskriptu

9.2. Původní práce nezahrnuté v habilitační práci

P47. Pospisilova, M., Andrs, M., Seifrtova, M., Havelek, R., Jun, D., Tomsik, P., Prchal, L., Dolezal R., Tichy, A., Kucera, T., Korabecny, J., Rezacova, M. Novel quinazolin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity. *Bioorganic Chemistry* **2019**, *82*, 204-210.

Podíl na publikaci: HRMS analýza

P48. Marek, J., Joskova, V., Dolezal, R., Soukup, O., Benkova, M., Fucikova, A., Malinak, D., Bostikova, V., Kuca, K. Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethyl-substituted Pyridinium Salts. *Letters in Drug Design & Discovery* **2018**, *15*, 828-842.

Podíl na publikaci: Statistické výpočty, QSAR

P49. Marek, J., Malinak, D., Dolezal, R., Soukup, O., Benkova, M., Nachtigal, P., Vavral, P., Kuca, K. Novel Series of Quaternary Ammonium Surfactants Based on 2,3-Dihydro-[1,4]dioxino[2.3-b]pyridin-7-ol Ring: Synthesis, Analysis and Antimicrobial Evaluation. *Letters in Organic Chemistry* **2018**, *15*, 3-9.

Podíl na publikaci: Výpočet molekulárních deskriptorů

P50. Havlicek, J., Myska, K., Tejchman, W., Karaskova, N., Dolezal, R., Maltsevskaya, N.V., Kolar, K. Microwave synthesis of sulfanilic acid. *Chemistry-Didactics-Ecology-Metrology* **2017**, *22*, 93-98.

Podíl na publikaci: Psaní manuskriptu, část o Green Chemistry

P51. Valis, M., Masopust, J., Vysata, O., Hort, J., Dolezal, R., Tomek J., Misik, J., Kuca, K., Karasova J.Z. Concentration of donepezil in the cerebrospinal fluid of AD patients: Evaluation of dosage sufficiency in standard treatment strategy. *Journal of the Neurological Sciences* **2017**, *381*, 1027-1027.

Podíl na publikaci: HPLC analýza

P52. Kalasz, H., Hunyadi, A., Tekes, K., Dolezal, R., Karvaly, G. HPLC analysis and blood-brain penetration of 20-hydroxyecdysone diacetone. *Acta Chromatographica* **2017**, *29*, 375-383.

Podíl na publikaci: HPLC analýza

P53. Valis, M., Masopust, J., Vysata, O., Hort, J., Dolezal, R., Tomek, J., Misik, J., Kuca, K., Karasova, J.Z. Concentration of Donepezil in the Cerebrospinal Fluid of AD Patients: Evaluation of Dosage Sufficiency in Standard Treatment Strategy. *Neurotoxicity Research* **2017**, *31*, 162-168.

Podíl na publikaci: HPLC analýza

P54. Mesicek, J., Zdarsky, J., Dolezal, R., Krejcar, O., Kuca, K. Simulations of Light Propagation and Thermal Response in Biological Tissues Accelerated by Graphics Processing Unit. In: Nguyen N., Iliadis L., Manolopoulos Y., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. ICCCI 2016. *Lecture Notes in Computer Science* **2016**, *9876*, 242-251.

Podíl na publikaci: Korektury článku, úprava Úvodu

P55. Andrs, M., Muthna, D., Rezacova, M., Seifrtova, M., Siman, P., Korabecny, J., Benek, O., Dolezal, R., Soukup, O., Jun, D., Kuca, K. Novel caffeine derivatives with antiproliferative activity. *RSC Advances* **2016**, *6*, 32534-32539.

Podíl na publikaci: HPLC analýza

P56. Lee, S.K., Park, M.K., Jhang, H.E., Yi, J.J., Nahm, K., Cho, D.W., Ra, C.S., Musilek, K., Horova, A., Korabecny, J., Dolezal, R., Jun, D., Kuca, K. Preparation of 7-Methoxy Tacrine Dimer Analogs

and Their In vitro/In silico Evaluation as Potential Cholinesterase Inhibitors. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2015**, *36*, 1654–1660.

Podíl na publikaci: Molekulární docking

- P57. Kalasz, H., Dolezal, R., Tekes, K., Magyar, K., Csermely, T., Hosztafi, S. Comparative Lipophilicity of Morphine Derivatives. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* **2015**, *28*, 126–132.

Podíl na publikaci: HPLC analýza

- P58. Marek, J., Malinak, D., Dolezal, R., Soukup, O., Pasdiorova, M., Dolezal, M., Kuca, K. Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-aldoxime Based Salts. *Molecules* **2015**, *20*, 3681–3696.

Podíl na publikaci: Výpočet molekulárních deskriptorů

- P59. Balik, L., Horalek, J., Hornig, O., Sobeslav, V., Dolezal, R., Kuca, K. Endpoint Firewall for Local Security Hardening in Academic Research Environment. In: Núñez M., Nguyen N., Camacho D., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. *Lecture Notes in Computer Science* **2015**, *9330*, 246–255.

Podíl na publikaci: Revize manuskriptu, konzultace

- P60. Malinak, D., Gonda, J., Korabecny, J., Dolezal, R., Honegr, J., Soukup, O., Buzga, M., Kuca, K. A Review of the Total Synthesis of (+)-Lactacystin and its Analogs. *Current Organic Chemistry* **2015**, *19*, 1980–2001.

Podíl na publikaci: Tvorba grafiky, molekulární modelování

- P61. Malinak, D., Dolezal, R., Marek, J., Salajkova, S., Soukup, O., Vejsova, M., Korabecny, J., Honegr, J., Penhaker, M., Musilek, K., Kuca, K. 6-Hydroxyquinolinium salts differing in the length of alkyl side-chain: Synthesis and antimicrobial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 5238–5241.

Podíl na publikaci: HPLC analýza, korelační studie, tvorba manuskriptu

- P62. Korabecny, J., Janovec, L., Musilek, K., Zemek, F., Horova, A., Nepovimova, E., Dolezal, R., Opletalova, V., Hroudova, J., Fisar, Z., Jung, Y.S., Kuca K. Comparison of Novel Tacrine and 7-MEOTA Derivatives with Aromatic and Alicyclic Residues: Synthesis, Biological Evaluation and Docking Studies. *Letters in Organic Chemistry* **2013**, *10*, 291–297.

Podíl na publikaci: Konzultace

- P63. Malinak, D., Korabecny, J., Soukup, O., Gorecki, L., Nepovimova, E., Psoška, M., Dolezal, R., Nguyen, T.D., Mezeiova, E., Musilek, K., Kuca, K. A Review of the Synthesis of Quaternary Acetylcholinesterase Reactivators. *Current Organic Chemistry* **2018**, *22*, 1619–1648.

Podíl na publikaci: Sepsání části o SAR & QSAR

- P64. Soukup, O., Korabecny, J., Malinak, D., Nepovimova, E., Pham, N.L., Musilek, K., Hrabínova, M., Hepnarova, V., Dolezal, R., Pavek, P., Jost, P., Koblíková, T., Janockova, J., Gorecki, L., Psoška, M., Nguyen, T.D., Box K., Outhwaite, B., Ceckova, M., Sorf, A., Jun, D., Kuca, K. In vitro and in silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning – a New Hope or a Blind Alley? *Medicinal Chemistry* **2018**, *14*, 281–292.

Podíl na publikaci: Konzultace

10. SOUBOR VYBRANÝCH PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH PRACÍ

Publikace jsou seřazeny tematicky, jak na ně bylo odkazováno v komentáři. Plné texty publikací jsou v případě [P3] doplněné i o Supporting Information, protože obsahují informace o některých výsledcích, které byly získány CADD metodami. Všechny uvedené publikace, včetně Supporting Information, je možné získat v příslušných databázích na internetu.

- P1.** Dolezal, R.; Sobeslav, V.; Hornig, O.; Balik, L.; Korabecny, J.; Kuca, K. HPC Cloud Technologies for Virtual Screening in Drug Discovery. In: Nguyen N., Trawiński B., Kosala R. (eds.) Intelligent Information and Database Systems. ACIIDS 2015. *Lecture Notes in Computer Science* **2015**, 9012, 440–449.
- P2.** Dolezal, R.; Ramalho, T. C.; França, T. C.; Kuca, K. Parallel Flexible Molecular Docking in Computational Chemistry on High Performance Computing Clusters. In: Núñez M., Nguyen N., Camacho D., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. *Lecture Notes in Computer Science* **2015**, 9330, 418–427.
- P3.** Korabecny, J.; Dolezal, R.; Cabelova, P.; Horova, A.; Hrubá, E.; Ricny, J.; Sedlacek, L.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Andrs, M.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Sepsova, V.; Ripova, D.; Kuca, K. 7-MEOTA–Donepezil like Compounds as Cholinesterase Inhibitors: Synthesis, Pharmacological Evaluation, Molecular Modeling and QSAR Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 82, 426–438.
- P4.** Korabecny, J.; Andrs, M.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Horova, A.; Malinak, D.; Mezeiova, E.; Gorecki, L.; Sepsova, V.; Hrabínova, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Kuca, K. 7-Methoxytacrine-p-Anisidine Hybrids as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer’s Disease Treatment. *Molecules* **2015**, 20 (12), 22084–22101.
- P5.** Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Ondrejicek, A.; Jun, D.; Sepsova, V.; Horova, A.; Hrabínova, M.; Soukup, O.; Bukum, N.; Jost, P.; Muckova, L.; Kassa, J.; Malinak, D.; Andrs, M.; Kuca, K. Tacrine–Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58 (22), 8985–9003.
- P6.** Hepnarova, V.; Korabecny, J.; Matouskova, L.; Jost, P.; Muckova, L.; Hrabínova, M.; Vykoukalova, N.; Kerhartova, M.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Mezeiova, E.; Pham, N.; Jun, D.; Staud, F.; Kaping, D.; Kuca, K.; Soukup, O. The Concept of Hybrid Molecules of Tacrine and Benzyl Quinolone Carboxylic Acid (BQCA) as Multifunctional Agents for Alzheimers Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 150, 292–306.
- P7.** Spilovska, K.; Korabecny, J.; Horova, A.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Drtinova, L.; Gazova, Z.; Siposova, K.; Dolezal, R.; Jun, D.; Kuca, K. Design, Synthesis and in Vitro Testing of 7-Methoxytacrine-Amantadine Analogues: a Novel Cholinesterase

Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Medicinal Chemistry Research* **2015**, *24* (6), 2645–2655.

- P8.** Spilovska, K.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Jun, D.; Hrabnova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Soukup, O.; Janockova, J.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Mezeiova, E.; Kaping, D.; Kuca, K. Novel Tacrine-Scutellarin Hybrids as Multipotent Anti-Alzheimer's Agents: Design, Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* **2017**, *22* (6), 1006.
- P9.** Mezeiova, E.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Hrabnova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Misik, J.; Spilovska, K.; Pham, N.; Pokrievkova, L.; Roh, J.; Jun, D.; Soukup, O.; Kaping, D.; Kuca, K. Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1265.
- P10.** Chalupova, K.; Korabecny, J.; Bartolini, M.; Monti, B.; Lamba, D.; Caliandro, R.; Pesaresi, A.; Brazzolotto, X.; Gastellier, A.-J.; Nachon, F.; Pejchal, J.; Jarosova, M.; Hepnarova, V.; Jun, D.; Hrabnova, M.; Dolezal, R.; Karasova, J. Z.; Mzik, M.; Kristofikova, Z.; Misik, J.; Muckova, L.; Jost, P.; Soukup, O.; Benkova, M.; Setnicka, V.; Habartova, L.; Chvojkova, M.; Kleteckova, L.; Vales, K.; Mezeiova, E.; Uliassi, E.; Valis, M.; Nepovimova, E.; Bolognesi, M. L.; Kuca, K. Novel Tacrine-Tryptophan Hybrids: Multi-Target Directed Ligands as Potential Treatment for Alzheimers Disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *168*, 491–514.
- P11.** Mezeiova, E.; Spilovska, K.; Nepovimova, E.; Gorecki, L.; Soukup, O.; Dolezal, R.; Malinak, D.; Janockova, J.; Jun, D.; Kuca, K.; Korabecny, J. Profiling Donepezil Template into Multipotent Hybrids with Antioxidant Properties. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2018**, *33* (1), 583–606.
- P12.** Dolezal, R.; Melikova, M.; Mesicek, J.; Kuca, K. Rational Discovery of GSK3-Beta Modulators Aided by Protein Pocket Prediction and High-Throughput Molecular Docking. In: Nguyen N., Iliadis L., Manolopoulos Y., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. ICCCI 2016. *Lecture Notes in Computer Science* **2016**, *9876*, 429–439.
- P13.** Benek, O.; Hroch, L.; Aitken, L.; Dolezal, R.; Guest, P.; Benkova, M.; Soukup, O.; Musil, K.; Kuca, K.; Smith, T. K.; Gunn-Moore, F.; Musilek, K. 6-Benzothiazolyl Ureas, Thioureas and Guanidines Are Potent Inhibitors of ABAD/17 β -HSD10 and Potential Drugs for Alzheimer's Disease Treatment: Design, Synthesis and in Vitro Evaluation. *Medicinal Chemistry* **2017**, *13* (4), 345–358.

- P14.** Hroch, L.; Guest, P.; Benek, O.; Soukup, O.; Janockova, J.; Dolezal, R.; Kuca, K.; Aitken, L.; Smith, T. K.; Gunn-Moore, F.; Zala, D.; Ramsay, R. R.; Musilek, K. Synthesis and Evaluation of Frentizole-Based Indolyl Thiourea Analogues as MAO/ABAD Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25* (3), 1143–1152.
- P15.** Honegr, J.; Malinak, D.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Benkova, M.; Hroch, L.; Benek, O.; Janockova, J.; Kuca, K.; Prymula, R. Rational Design of Novel TLR4 Ligands by in Silico Screening and Their Functional and Structural Characterization in Vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *146*, 38–46.
- P16.** Honegr, J.; Dolezal, R.; Malinak, D.; Benkova, M.; Soukup, O.; Almeida, J.; Franca, T.; Kuca, K.; Prymula, R. Rational Design of a New Class of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Tryptamine Related Agonists by Means of the Structure- and Ligand-Based Virtual Screening for Vaccine Adjuvant Discovery. *Molecules* **2018**, *23* (1), 102.
- P17.** Dolezal, R.; Trejbal, J.; Mesicek, J.; Milanov, A.; Racakova, V.; Krenek, J. Designing QSAR Models for Promising TLR4 Agonists Isolated from *Euodia Asteridula* by Artificial Neural Networks Enhanced by Optimal Brain Surgeon. In: Nguyen N., Iliadis L., Manolopoulos Y., Trawiński B. (eds.) Computational Collective Intelligence. ICCCI 2016. *Lecture Notes in Computer Science* **2016**, *9876*, 271–281.
- P18.** Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Melikova, M.; Kuca, K. Structure-Based Virtual Screening for Novel Modulators of Human Orexin 2 Receptor with Cloud Systems and Supercomputers. In: Król D., Nguyen N., Shirai K. (eds.) Advanced Topics in Intelligent Information and Database Systems. ACIIDS 2017. *Studies in Computational Intelligence* **2017**, *710*, 161–171.
- P19.** Janockova, J.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Koblrova, T.; Benkova, M.; Kuca, K.; Konecny, J.; Mezeiova, E.; Melikova, M.; Hepnarova, V.; Ring, A.; Soukup, O.; Korabecny, J. Investigation of New Orexin 2 Receptor Modulators Using In Silico and In Vitro Methods. *Molecules* **2018**, *23* (11), 2926.
- P20.** Dolezal, R.; Korabecny, J.; Malinak, D.; Honegr, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Ligand-Based 3D QSAR Analysis of Reactivation Potency of Mono- and Bis-Pyridinium Aldoximes toward VX-Inhibited Rat Acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2015**, *56*, 113–129.