

Imię i nazwisko: Tomasz Wichur

Tytuł pracy: Synthesis and characterization of novel multifunctional ligands aiming at symptoms and causes of Alzheimer's disease

### Streszczenie

Choroba Alzheimera jest nieuleczalnym schorzeniem neurodegeneracyjnym, które ze względu na stale rosnącą liczbę osób nim dotkniętych, staje się poważnym wyzwaniem społecznym, medycznym i ekonomicznym. Zaprezentowana praca doktorska podejmuje tematykę o kluczowym znaczeniu – poszukiwanie potencjalnej terapii choroby Alzheimera. Opisane w pracy badania obejmowały zaprojektowanie dwóch grup nowych związków o wielokierunkowym mechanizmie działania, ich syntezę, analizę spektralną oraz opis wyników testów *in vitro* i *in silico*.

Badania w obrębie pierwszej grupy miały na celu opracowanie inhibitorów beta-sekretazy i cholinesteraz o właściwościach antyagregacyjnych wobec beta amyloidu (A $\beta$ ) i białka tau, opartych na szkielecie 1-benzylpiperolidyno-3-aminy. Związki zsyntetyzowano, a ich aktywność biologiczną oceniono w następujących testach: Ellmana (hamowanie cholinesteraz), hamowania beta-sekretazy wykorzystującym zjawisko FRET, tioflawinowym T/S *in vitro* i *in cellulo* (agregacja A $\beta$  i tau), FRAP i ABTS (właściwości przeciwutleniające) oraz spektrofotometrycznym teście oceniającym zdolność do chelatowania jonów metali. Spośród otrzymanych związków, na szczególną uwagę zasługują **24b** i **25b**, ze względu na ich właściwości antyagregacyjne wobec A $\beta$  i tau (45%, 49% hamowania agregacji A $\beta$  i 53%, 54% hamowania agregacji tau, przy stężeniu przesiewowym 10  $\mu$ M) oraz hamowanie butyrylocholinoesterazy (IC<sub>50</sub> odpowiednio 2,39  $\mu$ M i 1,94  $\mu$ M). Dodatkowo wspomniane związki wykazały zdolność do usuwania wolnych rodników, aktywność przeciwutleniającą i właściwości chelatujące jony miedzi(II). Wyniki tej części badań zostały opublikowane w pracy T. Wichur et al., *1-Benzylpyrrolidine-3-amine-based BuChE inhibitors with anti-aggregating, antioxidant and metal-chelating properties as multifunctional agents against Alzheimer's disease*, Eur. J. Med. Chem., 2020: 187, 111916.

Grupę drugą opracowano jako związki łączące w sobie aktywność antagonistyczną wobec receptora 5-HT<sub>6</sub> i hamującą cholinesterazy. Ich budowa bazuje na fragmentach znanych indolowych ligandów receptora 5-HT<sub>6</sub>, które połączono z ugrupowaniami *N*-benzyloaminy i tetrahydroakrydyny, znanymi z inhibitorów cholinesteraz – donepezilu i takryny. Zastosowane modyfikacje strukturalne miały na celu optymalizację nie tylko oddziaływań z wyżej wymienionymi celami biologicznymi, ale również poprawę parametrów fizyko-chemicznych związków. W sumie otrzymano 74 nowe ligandy, których aktywność biologiczną zbadano w teście Ellmana i badaniach radioreceptorowych (powinowactwo do receptora 5-HT<sub>6</sub>), a dla wybranych pochodnych przeprowadzono testy tioflawinowe T i S *in vitro* i *in cellulo*. Na podstawie tych badań zidentyfikowano szereg związków o zoptymalizowanej aktywności

wobec założonych celów biologicznych. Przykładami takich ligandów o zrównoważonym profilu aktywności wobec BuChE i receptora 5-HT<sub>6</sub> są związki **115** i **124** (wartości IC<sub>50</sub> i K<sub>i</sub> odpowiednio równe 90 i 6 nM oraz 5 i 6 nM); związek **115** dodatkowo cechuje się korzystnymi parametrami fizykochemicznymi (spełnia reguły Lipińskiego i Vebera). Na uwagę zasługuje również związek **62** – inhibitor BuChE (IC<sub>50</sub> = 454 nM), antagonist receptor 5-HT<sub>6</sub> (K<sub>i</sub> = 15 nM) o wyraźnych właściwościach hamujących agregację Aβ (68% w teście *in vitro*) i tau (79% w teście *in cellulo*) w stężeniu 10 μM.

Podsumowując, opisany projekt badawczy pozwolił na identyfikację nowych, interesujących związków o wielokierunkowym mechanizmie działania. Związki te stanowią doskonały punkt wyjścia do dalszych badań nad możliwością zastosowania ligandów wielofunkcyjnych w terapii choroby Alzheimera.

### *Abstract*

The growing prevalence of Alzheimer's disease (AD), coupled with the lack of effective treatment, make this condition a serious social, medical and economic challenge that urgently requires new therapeutic solutions. The presented thesis describes interdisciplinary research on new multifunctional ligands with potential application in AD therapy. The research included the design of two distinct groups of novel multifunctional ligands, their synthesis, analytical characteristics as well as the assessment of the results of *in vitro* and *in silico* evaluation.

The design of group I aimed at the development of 1-benzylpyrrolidine-3-amine-based β-secretase and cholinesterase inhibitors with anti-aggregating properties against Aβ peptide and tau protein. The compounds were synthesized and their biological activity was assessed in the following assays: Ellman's (inhibition of cholinesterases), FRET-based (BACE1 inhibition), thioflavin T/S *in vitro* and *in cellulo* (Aβ and tau aggregation), FRAP and ABTS (antioxidant activity) and spectrophotometric to assess chelating properties. Compounds **24b** and **25b** were selected as the most interesting due to their anti-aggregating properties towards Aβ and tau (45%, 49% inhibition against Aβ, and 53%, 54% of inhibition against tau protein at 10 μM respectively), BuChE inhibition (IC<sub>50</sub> of 2.39 μM and 1.94 μM respectively) and significant free radical scavenging capacity, antioxidant activity and Cu(II)-chelating properties. The results of this part of the thesis are included in the publication T. Wichur et al., *1-Benzylpyrrolidine-3-amine-based BuChE inhibitors with anti-aggregating, antioxidant and metal-chelating properties as multifunctional agents against Alzheimer's disease*, Eur. J. Med. Chem., 2020: 187, 111916.

The group II was developed as dual-acting 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists and cholinesterase inhibitors. Their structure is based on fragments of known indole-based 5-HT<sub>6</sub> receptor ligands, which were combined with *N*-benzylamine and tetrahydroacridine moieties derived from cholinesterase inhibitors – donepezil and tacrine. The applied structural modifications aimed at optimization of

interactions within BuChE active site and improvement of physicochemical properties while maintaining activity against 5-HT<sub>6</sub> receptors. In total 10 series of compounds, comprising of 74 new ligands were developed. Biological activity of the compounds was assessed in Ellman's and radioligand binding assays, and for several ligands, A $\beta$  and tau anti-aggregating properties were evaluated in thioflavin T and S assays. This allowed for the identification of several compounds with interesting biological properties. Compound **115** – an example of the merged multifunctional ligand with *eq*BuChE IC<sub>50</sub> of 90 nM and 5-HT<sub>6</sub>R K<sub>i</sub> of 5 nM as well as optimized physicochemical properties complying with Lipinski and Veber rules. Ligand **124**, with perfectly balanced potencies against targets of interest (5-HT<sub>6</sub>R K<sub>i</sub> and *eq*BuChE IC<sub>50</sub> equal 6 nM). Compound **62** – potent BuChE inhibitor (IC<sub>50</sub> = 454 nM), 5-HT<sub>6</sub>R antagonist (K<sub>i</sub> = 15 nM) with impressive anti-aggregating properties against A $\beta$  *in vitro* and tau *in cellulo* (68% and 79% of inhibition at 10  $\mu$ M respectively).

In summary, the described research project has allowed the identification of new, interesting compounds with a multidirectional mechanism of action. These compounds are an excellent starting point for further research on application of multifunctional ligands in the treatment of Alzheimer's disease.