

SYNERGIA BADAŃ EKSPERYMENTALNYCH I METOD MODELOWANIA MOLEKULARNEGO W RACJONALNYM PROJEKTOWANIU AKTYWNYCH BIOLOGICZNIE BICYKLICZNYCH POCHODNYCH PIROLU

**SYNERGY OF EXPERIMENTAL STUDIES
AND MOLECULAR MODELING METHODS
IN THE RATIONAL DESIGN OF BIOLOGICALLY
ACTIVE BICYCLIC PYRROLE DERIVATIVES**

**Natalia Mikluszka¹, Aleksandra Redzicka²,
Aneta Jezierska^{1*}**

¹*Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii, ul. F. Joliot-Curie 14,
50-383 Wrocław*

²*Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wydział Farmaceutyczny,
Katedra i Zakład Chemii Leków, ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław*

**e-mail: aneta.jezierska@uwr.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Klasyczne podejście eksperymentalne a chemia kombinatoryczna
2. Komputerowo-wspomagane projektowanie substancji o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym
3. Bicykliczne pochodne pirolu jako przykład synergii badań eksperymentalnych i modelowania molekularnego

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Natalia Mikluszka jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jej zainteresowania naukowe obejmują chemię teoretyczną, a także komputerowo wspomagane projektowanie leków. Interesuje się wykorzystaniem metod obliczeniowych do badania oddziaływań międzycząsteczkowych i wspierania badań eksperymentalnych. W swojej dalszej działalności naukowej planuje prowadzić badania z zakresu krystalochemii, łącząc podejście obliczeniowe z eksperymentem w celu kompleksowego opisu badanych układów.



<https://orcid.org/0009-0004-4851-7727>

Dr n. farm. Aleksandra Redzicka, profesor UMW jest zatrudniona na stanowisku profesora uczelni w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Specjalizuje się w chemii medycznej oraz w syntezie związków heterocyklicznych. Jej zainteresowania badawcze koncentrują się na projektowaniu i syntezie bicyklicznych pochodnych pirolu i pirydazyny o przewidywanej aktywności biologicznej, w szczególności przeciwzapalnej, przeciwbólowej oraz przeciwnowotworowej. Prowadzone przez nią badania mają na celu poszukiwanie nowych, potencjalnych kandydatów na leki o zwiększonej skuteczności i ograniczonych działaniach niepożądanych.



<https://orcid.org/0000-0003-1508-8327>

Dr hab. n. chem. Aneta Jezierska, prof. UW tytuł magistra chemii, jak również stopień naukowy doktora otrzymała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Swoje kwalifikacje zawodowe podnosiła w ramach staży w zagranicznych jednostkach naukowych. W ostatnich latach Jej zainteresowania skupiają się wokół zagadnień związanych z zastosowaniem metod obliczeniowych (zwłaszcza metod dynamiki *ab initio*) do opisu różnych oddziaływań niekowalencyjnych zarówno wewnątrz-, jak i międzycząsteczkowych w bardzo różnorodnych układach (np. kokryształach).



<https://orcid.org/0000-0001-6601-9124>

ABSTRACT

Over the past few decades, the approach to designing and obtaining compounds exhibiting biological activity has changed significantly. Besides traditional experimental methods, computer-based techniques are also applied, and these are currently undergoing significant development. Nowadays, we can speak of synergy between experimental and computational methods accelerating the search for new drugs. In this article, experimental and well-established computational approaches for drug discovery are briefly described. We briefly presented the role of classical synthesis with physicochemical characterization of new compounds as well as combinatorial chemistry ideas to obtain new useful substances. Concerning *in silico* methods and tools, our attention was paid to several modern approaches, which are frequently applied in recent drug design. As the last part of the study, we discuss the role of selected bicyclic pyrrole derivatives as potential candidates in anti-inflammatory and analgesic therapy. Therefore the main aim of the study is to present how experimental and theoretical approaches could be applied to rationalize and accelerate the process of design and synthesis of compounds with expected biological activity.

Keywords: combinatorial chemistry, *in vitro*, CADD, databases, cheminformatics tools, virtual screening, molecular docking, DFT, QSAR, AI, molecular dynamics, bicyclic pyrrole derivatives

Słowa kluczowe: chemia kombinatoryczna, *in vitro*, CADD, bazy danych, narzędzia cheminformacyjne, wirtualny skrining, dokowanie molekularne, DFT, QSAR, AI, dynamika molekularna, bicykliczne pochodne pirolu

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AGP** – kwaśna α_1 -glikoproteina (*ang. Alpha-1-Acid Glycoprotein*)
- AI** – sztuczna inteligencja (*ang. Artificial Intelligence*)
- BOMD** – metoda dynamiki molekularnej Borna-Oppenheimera (*ang. Born-Oppenheimer Molecular Dynamics*)
- CADD** – komputerowo-wspomagane projektowanie leków (*ang. Computer-Aided Drug Design*)
- CoMFA** – analiza porównawcza pól molekularnych (*ang. Comparative Molecular Field Analysis*)
- CoMSIA** – analiza porównawcza indeksów podobieństwa molekularnego (*ang. Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*)
- COX-1** – cyklooksygenaza 1 (*ang. Cyclooxygenase - 1*)
- COX-2** – cyklooksygenaza 2 (*ang. Cyclooxygenase - 2*)
- CP ANN** – hybrydowy model sztucznej inteligencji, który łączy uczenie nienadzorowane (*ang. unsupervised learning strategy* – sieci Kohonena) z uczeniem nadzorowanym (*ang. supervised learning strategy*) (*ang. Counter-Propagation Artificial Neural Network*)
- DFT** – teoria funkcjonału gęstości (*ang. Density Functional Theory*)
- HSA** – albumina surowicy ludzkiej (*ang. Human Serum Albumin*)
- HTS** – wysokoprzepustowe badania przesiewowe (*ang. High-Throughput Screening*)
- LBDD** – projektowanie leków w oparciu o ligand (*ang. Ligand-Based Drug Design*)
- 15-LOX** – 15-lipooksygenaza (*ang. 15-lipoxygenase*)
- MD** – dynamika molekularna (*ang. Molecular Dynamics*)
- ML** – uczenie maszynowe (*ang. Machine Learning*)
- NMR** – magnetyczny rezonans jądrowy (*ang. Nuclear Magnetic Resonance*)
- PDB** – Baza Danych Białek (*ang. Protein Data Bank*)
- PDTD** – baza danych potencjalnych celów terapeutycznych (*ang. Potential Drug Target Database*)
- QM/MM** – mechanika kwantowa/mechanika molekularna (*ang. Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*)
- QSAR** – ilościowa zależność pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną (*ang. Quantitative Structure-Activity Relationship*)
- QTAIM** – kwantowa teoria atomów w cząsteczkach (*ang. Quantum Theory of Atoms in Molecules*)
- RDG** – zredukowany gradient gęstości elektronowej (*ang. Reduced Density Gradient*)
- ROS** – reaktywne formy tlenu (*ang. Reactive Oxygen Species*)
- SAR** – zależność struktura–aktywność (*ang. Structure-Activity Relationship*)
- SBDD** – projektowanie leków oparte na strukturze celu molekularnego (*ang. Structure-Based Drug Design*)

WPROWADZENIE

Wiek XX był okresem dynamicznego rozwoju farmacji i chemii medycznej, przynoszącym odkrycie antybiotyków oraz licznych leków syntetycznych. W tym czasie intensywnie rozwijały się badania nad lekami psychotropowymi (lata 50-te), a także nastąpił przełom w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych [1]. Okres ten przyniósł również istotną zmianę w podejściu do projektowania i syntezy nowych związków o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym, związaną z rozwojem chemii kombinatorycznej [2]. Równolegle XX wiek był okresem intensywnego rozwoju technologii komputerowych oraz ich zastosowania w różnych gałęziach życia człowieka, w tym w projektowaniu związków wykazujących aktywność biologiczną [3,4]. Umożliwiło to stworzenie na przestrzeni lat synergii badań eksperymentalnych i metod *in silico* w celu przyspieszenia poszukiwania i otrzymywania nowych substancji o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym. Ma to ogromne znaczenie, gdyż pomimo znaczącego postępu w farmacji i chemii medycznej wiele współczesnych problemów zdrowotnych nadal pozostaje nierozwiązanych. Dotyczy to między innymi chorób neurodegeneracyjnych, nowotworowych, zakażeń wirusowych czy narastającego zjawiska antybiotykooporności [1,5,6].

W niniejszym opracowaniu omówimy pokrótce klasyczne podejście eksperymentalne do odkrywania i projektowania nowych substancji biologicznie czynnych oraz wspomniemy o znaczeniu biosyntezy, która odgrywa istotną rolę w otrzymywaniu wielu substancji leczniczych oraz ich modyfikacji strukturalnej. Następnie zaprezentujemy wpływ chemii kombinatorycznej na rozwój nowoczesnych strategii poszukiwania potencjalnych kandydatów na leki. Współcześnie, nieodzownym elementem procesu racjonalnego projektowania leków (*ang. drug design*) jest wykorzystanie metod komputerowych wspomagających projektowanie, optymalizację oraz ocenę właściwości biologicznych nowych związków. A zatem, pokrótce zostanie omówiona idea komputerowo wspomaganego projektowania leków (*ang. Computer-Aided Drug Design, CADD*) oraz jej znaczenie we współczesnej farmacji i chemii medycznej. W ramach niniejszego narracyjnego przeglądu zostaną przedstawione zarówno klasyczne metody eksperymentalne, jak i wybrane współczesne metody oparte na badaniach *in silico* stosowane w racjonalnym projektowaniu związków aktywnych biologicznie. W ostatnim rozdziale przedstawimy przykłady bicyklicznych pochodnych pirolu (studium przypadku) jako związków o przewidywanej aktywności przeciwpalnej i przeciwbólowej.

1. Klasyczne podejście eksperymentalne a chemia kombinatoryczna

W obecnych czasach w sposób bardzo wszechstronny podchodzi się do otrzymywania nowych związków o potencjalnym zastosowaniu farmaceutycznym. Obok klasycznej syntezy laboratoryjnej stosuje się chemię kombinatoryczną, genetykę i biotechnologię, biochemię, nanotechnologię oraz metody *in silico* (np. bioinformatyka oraz metody modelowania molekularnego). Celem takiego podejścia jest m.in. skrócenie czasu potrzebnego do opracowania nowego leku oraz ograniczenie kosztów związanych z badaniami, a także wprowadzeniem go na rynek. Innym aspektem jest spojrzenie z perspektywy tzw. medycyny spersonalizowanej, gdzie szczegółowa wiedza o organizmie jest niezbędna, stąd do farmakologii dołączyły genetyka i biotechnologia wraz z biochemią [7,8]. Na początku skupmy jednak naszą uwagę na podejściu klasycznym, czyli syntezie związków w warunkach laboratoryjnych. W procesie otrzymywania nowego leku bardzo istotny jest właściwy wybór jednostki chorobowej, gdyż pozwala on ukierunkować dalsze badania. W przypadku znanych schorzeń możliwe jest projektowanie nowych związków o mniejszej toksyczności, korzystniejszym profilu bezpieczeństwa lub skuteczności terapeutycznej. W tym kontekście warto podkreślić nową strategię badawczą tzw. repurposingu (*ang. drug repurposing*) polegającą na poszukiwaniu nowych zastosowań terapeutycznych dla już znanych leków [9,10]. Kolejnym etapem jest wybór tzw. związku wiodącego (*ang. lead compound*), który może być pochodzenia naturalnego lub syntetycznego. Powinien on jednak wykazywać określone właściwości fizykochemiczne i biologiczne, zwiększające prawdopodobieństwo uzyskania nowych pochodnych o korzystnym profilu farmakologicznym [11-14]. Właściwości te możemy modulować m.in. poprzez efekty steryczne, bądź indukcyjne, tworząc w ten sposób biblioteki analogów, jak również poprawiać oddziaływania z celem molekularnym [15]. Wybór substancji wiodącej jest początkiem projektowania związków aktywnych biologicznie zarówno w przypadku eksperymentu klasycznego, jak i badań *in silico*. W klasycznej syntezie chemicznej otrzymuje się najczęściej serię związków zawierających wspólny fragment strukturalny (*ang. core part*), różniący się rodzajem podstawników. Wprowadzanie podstawników o charakterze elektronodonorowym lub elektronoakceptorowym prowadzi do zmian rozkładu gęstości elektronowej, co może wpływać na właściwości fizykochemiczne oraz aktywność biologiczną otrzymanych pochodnych. Następnie związki poddawane są badaniom fizykochemicznym (najczęściej są to badania spektroskopowe, spektrometryczne, czy też krystalograficzne), których głównym zadaniem jest potwierdzenie struktury otrzymanych związków. W kolejnym etapie przeprowadzane są badania *in vitro* obejmujące m.in. testy biochemiczne lub komórkowe, w celu oceny, czy otrzymane związki wykazują oczekiwaną aktywność biologiczną. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do wyznaczenia dalszego kierunku badań oraz kolejnych modyfikacji strukturalnych.

Synteza chemiczna wymaga prowadzenia reakcji w kontrolowanych warunkach obejmujących dobór odpowiedniej aparatury, temperatury, ciśnienia, rozpuszczalników oraz katalizatorów. Otrzymane produkty wymagają następnie wydzielenia i oczyszczenia. Zarówno proces syntezy, jak również oczyszczenie otrzymanych związków, wiąże się z wykorzystaniem znacznych ilości odczynników i rozpuszczalników chemicznych, których stosowanie – zgodnie z zasadami Zielonej Chemii, powinno być ograniczane. Nie oznacza to jednak, że klasyczna synteza chemiczna może zostać wyeliminowana z procesu odkrywania nowych związków biologicznie czynnych. Przeciwnie, jej synergiczne połączenie z metodami komputerowo wspomaganego projektowania leków pozwala na bardziej racjonalne planowanie prac laboratoryjnych, ograniczenie liczby otrzymywanych związków, zmniejszenie zużycia substancji chemicznych oraz skrócenie czasu i kosztów związanych z identyfikacją obiecujących kandydatów na leki.

Chemia kombinatoryczna [16-18], której ideą było zsyntezowanie i testowanie możliwie dużej liczby związków, w jak najkrótszym czasie w oparciu o tę samą procedurę, stała się użytecznym narzędziem syntetycznym współczesnego projektowania leków. Zgodnie z tzw. syntezą równoległą otrzymuje się związki o zróżnicowanej strukturze poprzez systematyczne, powtarzalne i kowalencyjne łączenie różnych „elementów budulcowych” (ang. *building blocks*). W chemii kombinatorycznej można wyróżnić różne strategie syntezy, do których należą m.in. synteza równoległa oraz metoda *split-and-mix* zaproponowana przez Furkę i współpracowników [17]. Następnie otrzymane biblioteki związków są poddawane wysokoprzepustowemu skринingowi (ang. *high-throughput screening*, *HTS*), obejmującemu zautomatyzowane i równoległe testowanie dużej liczby związków pod kątem określonej aktywności biologicznej. W zależności od przyjętej strategii, HTS może mieć charakter target-based, w którym ocenie podlega aktywność związku wobec określonego celu molekularnego, lub fenotypowy (ang. *phenotypic screening*), w którym analizuje się określony efekt biologiczny bez konieczności wcześniejszego zdefiniowania konkretnego celu molekularnego [19,20]. Niewątpliwymi zaletami chemii kombinatorycznej są szybkość wynikająca z automatyzacji procesu, obniżenie kosztów syntezy oraz wysoka wydajność, przekładająca się na znaczną oszczędność czasu. Innym podejściem wykorzystywanym w pozyskiwaniu kandydatów na leki jest biosynteza [21,22], która polega na wykorzystaniu żywych komórek (grzybów i bakterii) lub enzymów, w celu wytworzenia, modyfikacji oraz produkcji substancji o znaczeniu farmakologicznym. Warto podkreślić, że w wyniku biosyntezy można otrzymać substancje, których klasyczna synteza byłaby trudna, a z finansowego punktu widzenia również nieopłacalna. Przykładem leków otrzymywanych na drodze biosyntezy są chociażby penicyliny [23].

2. Komputerowo wspomagane projektowanie substancji o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym

Ze względu na dużą liczbę dostępnych leków oraz stale rosnącą ilość danych na ich temat, konieczne jest ich odpowiednie uporządkowanie. Należy również pamiętać o związkach chemicznych, które zostały przebadane pod kątem różnych aktywności biologicznych, lecz nie znalazły zastosowania farmaceutycznego. Gromadzenie i analiza tego typu informacji są niezbędne do zwiększenia efektywności procesu poszukiwania nowych kandydatów na leki, zwłaszcza w obliczu wyzwań współczesnej medycyny, takich jak narastająca antybiotykooporność oraz choroby neurodegeneracyjne, nowotworowe i psychiczne [24-30]. Rozwój technologii informatycznych oraz superkomputerów umożliwił prowadzenie symulacji, które jeszcze kilka dekad temu były niewykonalne, a także tworzenie rozbudowanych baz danych, co znacznie ułatwia i przyspiesza skринing, który jest jednym z elementów nowoczesnego poszukiwania i projektowania związków aktywnych biologicznie [31,32]. W zależności od rodzaju przechowywanych danych oraz celu ich wykorzystania wyróżnia się różne typy baz danych. Jedną z najpopularniejszych jest DrugBank [33], umożliwiającą wyszukiwanie zarówno informacji o farmaceutykach, jak również o ich celach molekularnych. Dostępne są również bazy danych, które gromadzą informacje o konkretnych grupach związków np. należących do tradycyjnej medycyny Chińskiej (TCMBank [34]), czy też bioaktywnych cząsteczkach o właściwościach lekopodobnych, która łączy dane chemiczne i biologiczne, wspomagając proces odkrywania nowych leków (ChEMBL [35]), o cząsteczkach wykorzystywanych w projektowaniu leków, zwłaszcza małych molekułach (DrugMap Central (DMC) [36]), integrująca dane z różnych źródeł i wspomagająca poszukiwania nowych zastosowań terapeutycznych dla dostępnych leków. Istnieją również bazy danych, które oferują narzędzia analityczne umożliwiające m.in. wstępną analizę oddziaływania między lekami a ich celami biologicznymi, takie jak np. DTome [37]. Wśród najważniejszych baz danych chemicznych należy wymienić PubChem [38], zawierającą znaczną liczbę związków chemicznych oraz informacje m.in. o ich właściwościach biologicznych i fizykochemicznych. Istotnym źródłem danych strukturalnych jest także Protein Data Bank (PDB) [39], w której zgromadzone są trójwymiarowe struktury białek uzyskane metodami eksperymentalnymi, takimi jak krystalografia rentgenowska czy spektroskopia NMR. Na podstawie danych zawartych w PDB opracowano bazę danych potencjalnych celów terapeutycznych (*ang. Potential Drug Target Database, PDTD*) [40].

Komputerowo wspomagane projektowanie leków (*ang. Computer-Aided Drug Design, CADD*), jest interdyscyplinarnym podejściem łączącym elementy biologii, chemii, biochemii, baz danych, zaawansowanych metod chemii obliczeniowej, metod modelowania molekularnego oraz narzędzi cheminformatycznych [41].

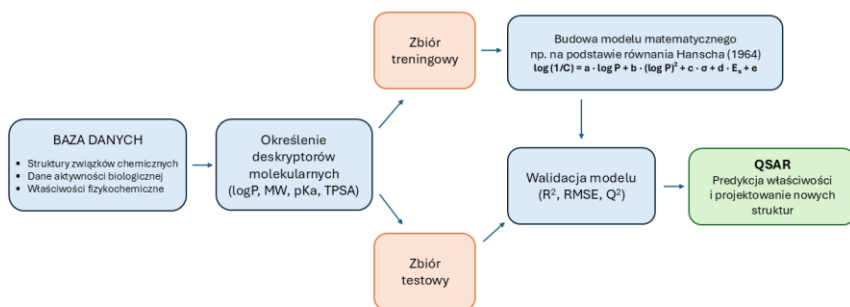
Proces projektowania nowego leku jest czasochłonny, kosztowny i wymaga wysokiej precyzji. Pomimo jednak synergii metod eksperymentalnych i *in silico* odsetek niepowodzeń pozostaje nadal wysoki, ponieważ tylko 1-2 cząsteczki na 10 000 przebadanych związków mają szansę zostać ostatecznie zatwierdzone jako leki [42-45].

Na przestrzeni ostatnich dekad CADD stało się nieodzownym elementem w nowoczesnym projektowaniu leków. Historycznie rzecz ujmując, przełom nastąpił w latach 90-tych XX wieku, kiedy to zaczęto coraz częściej wykorzystywać komputery w celu predykcji właściwości fizykochemicznych i biologicznych związków chemicznych oraz interpretacji wyników badań eksperymentalnych [46]. Połączenie badań eksperymentalnych z metodami obliczeniowymi przyczyniło się do opracowania pierwszych leków projektowanych z wykorzystaniem metod CADD, co zostało przedstawione w artykułach np. 47-49.

Proces poszukiwania nowych leków, niezależnie od tego czy opiera się na klasycznym podejściu eksperymentalnym, czy metodach *in silico* obejmuje kilka kolejnych etapów [50]. Po identyfikacji potencjalnego celu terapeutycznego przeprowadza się jego walidację, której zadaniem jest potwierdzenie związku pomiędzy aktywnością celu molekularnego a rozwojem lub przebiegiem danej jednostki chorobowej. Następnie prowadzi się poszukiwanie związków wykazujących aktywność wobec określonego celu molekularnego, czyli tzw. hitów (ang. *hit identification*). Zidentyfikowane związki poddawane są dalszej optymalizacji w ramach etapu *hit-to-lead*, którego celem jest wybór i dalsze modyfikacje związków o korzystnym profilu aktywności i właściwościach. Kolejnym etapem jest optymalizacja związku wiodącego (ang. *lead optimization*), obejmująca m.in. modyfikacje struktury chemicznej prowadzące do uzyskania odpowiedniej aktywności, selektywności oraz właściwości farmakokinetycznych i fizykochemicznych. W rezultacie otrzymany kandydat na lek może następnie zostać skierowany do dalszych etapów badań, obejmujących m.in. ocenę jego skuteczności, bezpieczeństwa, właściwości farmakokinetycznych i toksykologicznych [51]. Metody CADD mogą być wykorzystywane na różnych etapach procesu projektowania leków, m.in. podczas identyfikacji potencjalnych hitów oraz ich dalszej optymalizacji w ramach etapów *hit-to-lead* i *lead optimization*. W ramach metod CADD stosuje się dwa główne podejścia w poszukiwaniu nowych kandydatów na leki: projektowanie leków w oparciu o ligand (ang. *ligand-based drug design*, *LBDD*) oraz projektowanie w oparciu o strukturę celu molekularnego (ang. *structure-based drug design*, *SBDD*) [49]. Zastosowanie metod CADD w nowoczesnym projektowaniu leków umożliwia wspomaganie identyfikacji i charakterystyki celów terapeutycznych oraz identyfikację obiecujących ligandów, a co z tym związane skraca czas całego procesu poszukiwania nowych związków aktywnych biologicznie oraz obniża koszty związane z eksperymentalnym testowaniem dużej liczby związków chemicznych [52]. Podejście LBDD jest stosowane, gdy struktura celu molekularnego nie jest znana. Przeszukuje się bazy danych związków o znanej aktywności biologicznej z myślą o znalezieniu

odpowiednich substancji. Najczęściej stosuje się podejście oparte na podobieństwie związków chemicznych, w którym znana jest struktura aktywnych ligandów i na jej podstawie poszukuje się związków o podobnej budowie chemicznej. Wykorzystuje się również analizę ilościowych zależności pomiędzy strukturą związków a ich aktywnością biologiczną (ang. *Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR*) oraz modelowanie farmakoforowe [48,53,54]. Metoda QSAR opiera się na modelu matematycznym, który przedstawia ilościową zależność pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną cząsteczki. Kluczowa w tej metodzie jest konstrukcja bazy danych związków wykazujących tę samą aktywność biologiczną oraz deskryptorów molekularnych je opisujących. Deskryptory molekularne mogą być wyznaczane na podstawie różnych sposobów reprezentacji cząsteczki, w tym jej struktury dwu- i trójwymiarowej, a także opisywać różne aspekty jej właściwości fizykochemicznych, topologicznych, geometrycznych czy elektronowych. Mogą pochodzić zarówno z danych eksperymentalnych, jak i zostać wygenerowane za pomocą odpowiedniego oprogramowania [55,56]. Współczesne programy obliczeniowe umożliwiają wygenerowanie dla pojedynczego związku dużej liczby deskryptorów, dlatego ich odpowiednia selekcja stanowi istotny etap budowy modelu QSAR. Celem selekcji jest identyfikacja zmiennych, które wnoszą istotną informację do predykcji, przy jednoczesnym ograniczeniu liczby deskryptorów redundantnych, czyli dostarczających podobnej lub powielającej się informacji. Zbyt duża liczba zmiennych względem liczby analizowanych związków może prowadzić do przeparametryzowania modelu (ang. *overfitting*) i pogorszenia jego zdolności predykcyjnych [55,56]. Na Rysunku 1 przedstawiono ogólny schemat metody QSAR. Bazę danych dzieli się najczęściej na dwa zbiory: zbiór treningowy i zbiór testowy [56,57]. Podział danych może być przeprowadzany z wykorzystaniem różnych strategii, w tym losowego podziału danych (ang. *random sampling*) oraz metod zapewniających odpowiednią różnorodność i reprezentatywność zbiorów. Następnie poszukuje się równań matematycznych opisujących zależności pomiędzy strukturą związków w zbiorze treningowym a ich aktywnością biologiczną. Zbiór testowy służy do oceny zdolności modelu do predykcji aktywności biologicznej związków, które nie zostały wykorzystane podczas jego konstrukcji. W celu dodatkowej oceny stabilności i wiarygodności modelu stosuje się walidację krzyżową (ang. *cross-validation*), w której zbiór treningowy jest dzielony na podzbiory, a model jest kolejno konstruowany na części danych i oceniany na pozostałym podzbiore. Zastosowanie niezależnego zbioru testowego oraz odpowiednich procedur walidacyjnych pozwala na ocenę zdolności predykcyjnej modelu dla danych niewykorzystanych podczas jego konstrukcji oraz ograniczenie ryzyka jego przeparametryzowania (ang. *overfitting*) [55,58]. W metodzie QSAR do konstrukcji modeli wykorzystuje się np. metody regresji liniowej, czy też sieci neuronowych np. metodę ang. *Counter-Propagation Artificial Neural Network, CP ANN* [54,59-62].

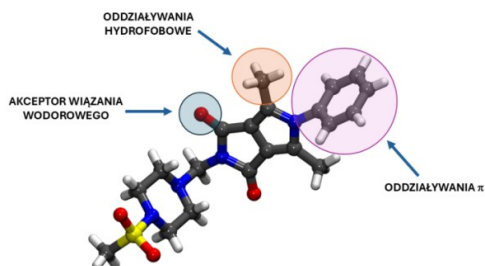
Istnieją również metody 3D QSAR. Do najbardziej znanych należą analiza porównawcza pól molekularnych (*ang. Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA*) oraz analiza porównawcza indeksów podobieństwa molekularnego (*ang. Comparative Molecular Similarity Indices Analysis, CoMSIA*) [54].



Rysunek 1. Ogólny schemat postępowania w badaniach QSAR.

Figure 1. General scheme of QSAR investigations.

W LBDD stosuje się również modelowanie farmakoforowe (Rysunek 2), którego celem jest identyfikacja przestrzennego układu cech sterycznych i elektronowych niezbędnych do zapewnienia optymalnych oddziaływań z określonym celem biologicznym oraz wywołania lub zablokowania jego odpowiedzi biologicznej [63]. Farmakofor nie stanowi zatem konkretnego fragmentu struktury chemicznej, lecz abstrakcyjny zestaw właściwości przestrzennych istotnych dla aktywności biologicznej. Analizowane są także podobieństwa strukturalne pomiędzy ligandami, co umożliwia identyfikację nowych potencjalnie aktywnych cząsteczek [54,64]. Do przykładowych cech farmakoforowych należą m.in. donory i akceptory wiązań wodorowych, obszary hydrofobowe, pierścienie aromatyczne oraz cechy o określonym charakterze elektrostatycznym [65,66].



Rysunek 2. Przykładowy model farmakoforu (opracowanie własne na podstawie [67]).

Figure 2. Example of pharmacophore model (own work based on [67]).

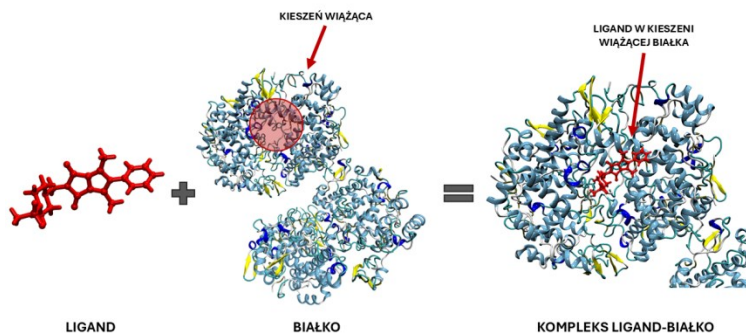
W projektowaniu opartym na strukturze celu molekularnego (*ang. structure-based drug design, SBDD*) wykorzystuje się informacje o makrocząsteczkach uzyskane metodami eksperymentalnymi takimi jak np. spektroskopia magnetycznego rezonansu jądowego (NMR) czy krystalografia rentgenowska. W początkowym etapie badań wykorzystuje się np. struktury białek czy kwasów nukleinowych zdeponowanych w bazie danych PDB. W przypadku, gdy struktura 3D celu terapeutycznego jest nieznana, możliwe jest zastosowanie modelowania homologicznego (*ang. homology modeling*) [68]. Po uzyskaniu struktury 3D celu molekularnego z baz danych lub w wyniku modelowania homologicznego, w kolejnym etapie można zastosować metodę wirtualnego skriningu, dokowania molekularnego i klasycznej dynamiki molekularnej w celu:

- i) identyfikacji odpowiednich ligandów w dostępnych bazach danych lub wykorzystania związków chemicznych otrzymanych na drodze syntezy, których aktywność biologiczna została wcześniej potwierdzona w badaniach *in vitro* lub *in vivo*;
- ii) przeprowadzenia dokowania molekularnego;
- iii) oszacowania stabilności otrzymanego kompleksu białko-ligand, oraz analizy wybranych właściwości fizykochemicznych, w oparciu o symulacje metodą klasycznej dynamiki molekularnej.

Współcześnie dokowanie molekularne (Rysunek 3) rozwija się dynamicznie i pozwala na wykonywanie zaawansowanych predykcji, takich jak np. analiza mechanizmu wiązania cząstki z białkami. Możliwe jest również identyfikowanie najbardziej optymalnego miejsca wiązania w obrębie struktury celu molekularnego [69]. Inną metodą stosowaną w ramach SBDD jest projektowanie liganda *de novo*, które polega na opracowywaniu nowych cząsteczek na podstawie mniejszych fragmentów i dopasowywaniu ich do znanego miejsca wiążącego [54,70].

Najczęściej budowę miejsca wiążącego ustala się na podstawie badań krystalograficznych, zwłaszcza kiedy znamy umiejscowienie małej cząsteczki (inhibitor, ligand) w makrocząsteczce, którą może być np. białko. Układy gość-gospodarz możemy znaleźć np. w bazie danych PDB. W kolejnym kroku usuwa się ligand/inhibitor z miejsca wiążącego i wówczas można przystąpić do projektowania leku *de novo*. Analizuje się miejsce wiążące w celu zidentyfikowania np. aminokwasów (jeśli analizujemy białko) zaangażowanych w wiązanie liganda. Określa się kluczowe i specyficzne oddziaływania odpowiedzialne za stabilizację kompleksu i aktywność biologiczną. Pozwala to na rozróżnienie kontaktów występujących w kompleksie od tych oddziaływań, które mają istotne znaczenie dla wiązania liganda i jego aktywności biologicznej [71,54,72]. W oparciu o te informacje można zaprojektować cząsteczkę o odpowiednim kształcie i objętości, posiadającą w swojej strukturze grupy funkcyjne, które będą odpowiadać za utworzenie oddziaływań stabilizujących w miejscu wiążącym. W projektowaniu *de novo* należy wziąć pod uwagę elastyczność konformacyjną projektowanych cząsteczek. Zwiększająca się wraz z liczbą rotowalnych wiązań przestrzeń konformacyjna może utrudniać efektywne przeszukiwanie możliwych konformacji [73,74]. Nie powinno się projektować cząsteczek, których

synteza jest trudna, bądź niemożliwa, a także takich które musiałyby przyjąć konformację niestabilną w miejscu wiążącym. Należy uwzględnić straty energii związane z dehydratacją oraz pamiętać o międzygatunkowych różnicach w budowie receptorów i enzymów [54].



Rysunek 3. Schemat dokowania molekularnego (opracowanie własne na podstawie [67,75]).

Figure 3. Scheme of molecular docking (own work based on [67,75]).

W wyniku zastosowania pokrótce scharakteryzowanych metod komputerowo wspomaganego projektowania leków, identyfikowane są obiecujące związki, które poddawane są dalszym badaniom *in silico*, czy też eksperymentalnym – synteza, badania *in vitro*.

Ważnym elementem badań *in silico* jest również zastosowanie narzędzi cheminformacyjnych do predykcji np. parametrów ADME (A – absorpcja (wchłanianie), D – dystrybucja, M – metabolizm (biotransformacja) i E – eliminacja (wydalanie)), opisujących los leku w organizmie od momentu podania aż do całkowitego wydalenia [76,77], jak również w klasyfikacji związków jako aktywnych lub nieaktywnych oraz przewidywania właściwości fizykochemicznych istotnych z punktu widzenia projektowania leków. Do parametrów tych należą m.in. współczynnik podziału logP, współczynnik dystrybucji logD, stała dysocjacji kwasowej pKa oraz rozpuszczalność. Predykcja tych właściwości na wczesnych etapach projektowania leków pozwala na wstępną ocenę potencjalnych właściwości projektowanych związków oraz selekcję cząsteczek o pożądanym profilu [78,79]. Jednym z powszechnie stosowanych narzędzi jest SwissADME [80], umożliwiające szybkie przewidywanie właściwości fizykochemicznych, parametrów farmakokinetycznych oraz tzw. lekopodobieństwa (*ang. drug-likeness*) związków chemicznych, czyli stopnia, w jakim ich struktura i właściwości odpowiadają cechom charakterystycznym dla potencjalnych farmaceutyków. Innym narzędziem wspomagającym ocenę bezpieczeństwa związków

chemicznych jest platforma ProTox 3.0 [81], wykorzystująca modele uczenia maszynowego do przewidywania różnych parametrów toksyczności. Umożliwia ona analizę m.in. ostrej toksyczności, toksyczności narządowej oraz potencjalnych mechanizmów toksyczności. Na podstawie struktury chemicznej związku generowany jest jego profil toksykologiczny wraz z oceną wiarygodności predykcji.

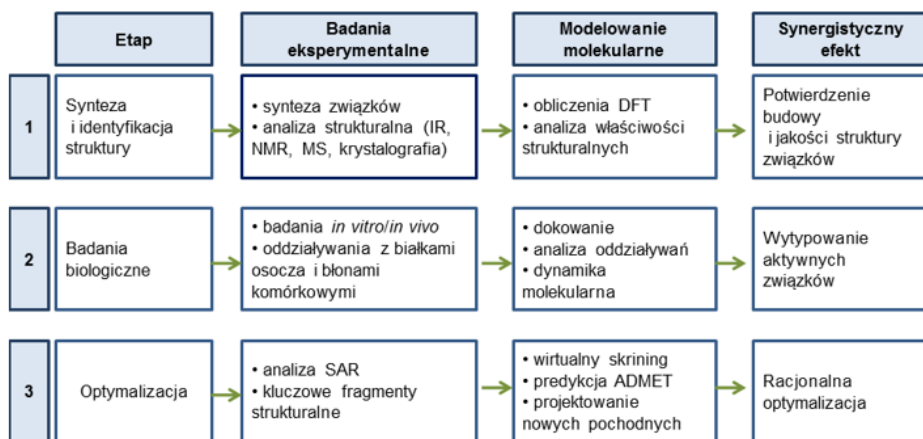
W ostatnich latach coraz większe znaczenie w projektowaniu leków zyskują również metody uczenia maszynowego (*ang. Machine Learning, ML*) oraz sztucznej inteligencji (*ang. Artificial Intelligence, AI*). Znajdują one zastosowanie m.in. w modelowaniu i predykcji aktywności biologicznej związków, klasyfikacji związków aktywnych i nieaktywnych oraz przewidywaniu ich właściwości fizykochemicznych, farmakokinetycznych i toksykologicznych. Wykorzystanie algorytmów uczenia maszynowego umożliwia analizę złożonych zależności pomiędzy strukturą związku a jego właściwościami, a także wspomaga selekcję i optymalizację potencjalnych kandydatów na leki [82,83]. Sztuczna inteligencja znajduje również zastosowanie w predykcji struktur biomolekuł. Przykładem jest AlphaFold, wykorzystujący metody głębokiego uczenia do przewidywania przestrzennej struktury białek na podstawie ich sekwencji aminokwasowej. Dostępność takich predykcji może być szczególnie istotna w przypadku białek, dla których nie są dostępne struktury eksperymentalne [84,85].

Kolejnym rozwijającym się kierunkiem jest generatywne projektowanie leków (*ang. generative drug design*), w którym modele sztucznej inteligencji są wykorzystywane do generowania nowych struktur chemicznych. Eksploracja przestrzeni generowanych cząsteczek może być łączona z modelami predykcyjnymi w celu identyfikacji nowych związków o pożądanej aktywności biologicznej. Podejścia generatywne można postrzegać jako rozwinięcie koncepcji projektowania *de novo* i potencjalne narzędzia wspomagające identyfikację nowych kandydatów na leki [86,87].

Na zakończenie należy wspomnieć o metodach chemii obliczeniowej opartych na metodach mechaniki molekularnej i kwantowej które umożliwiają tworzenie zarówno modeli statycznych, jak i dynamicznych badanych układów. Mechanika molekularna jest metodą niekwantową [88]. Najczęściej wykorzystywana jest do optymalizacji geometrii oraz przeszukań konformacyjnych w małych i dużych cząsteczkach. Pola siłowe wykorzystywane w mechanice molekularnej stanowią fundament klasycznej dynamiki molekularnej [89]. Metody obliczeniowe oparte na mechanice kwantowej pozwalają na opis parametrów geometrycznych, struktury elektronowej, jak również innych właściwości fizykochemicznych, np. spektroskopowych. Warto również zwrócić uwagę na metody hybrydowe, które łączą w sobie elementy mechaniki kwantowej i klasycznej (*ang. quantum mechanics/molecular mechanics, QM/MM*), a które najczęściej są stosowane do opisu układów gość-gospodarz w sytuacji, gdzie chcemy np. dokładniej opisać oddziaływania pomiędzy ligandem a miejscem wiążącym [90].

3. Bicykliczne pochodne pirolu jako przykład synergii badań eksperymentalnych i modelowania molekularnego

Bicykliczne układy heterocykliczne stanowią jedną z ważnych klas związków wykorzystywanych we współczesnej chemii medycznej. Dzięki zróżnicowanej budowie przestrzennej, możliwości zróżnicowanej funkcjonalizacji oraz korzystnym właściwościom fizykochemicznym, są cennym szkieletem molekularnym w racjonalnym projektowaniu nowych substancji biologicznie czynnych. Wśród nich szczególne miejsce zajmują bicykliczne pochodne pirolu, dla których opisano szerokie spektrum aktywności farmakologicznej, obejmujące między innymi działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwnowotworowe, przeciwdrobnoustrojowe oraz neuroprotektoryjne [91]. Rozwój tej grupy związków dobrze odzwierciedla współczesne podejście w poszukiwaniu nowych leków, oparte na integracji badań eksperymentalnych z metodami modelowania molekularnego. Racjonalne projektowanie nowych struktur obejmuje nie tylko syntezę i ocenę aktywności biologicznej, lecz również wykorzystanie metod *in silico* do analizy zależności struktura–aktywność (*ang. Structure–Activity Relationship, SAR*), przewidywania sposobu wiązania z celem molekularnym oraz wspomagania optymalizacji właściwości projektowanych cząsteczek, co schematycznie przedstawiono na Rysunku 4.

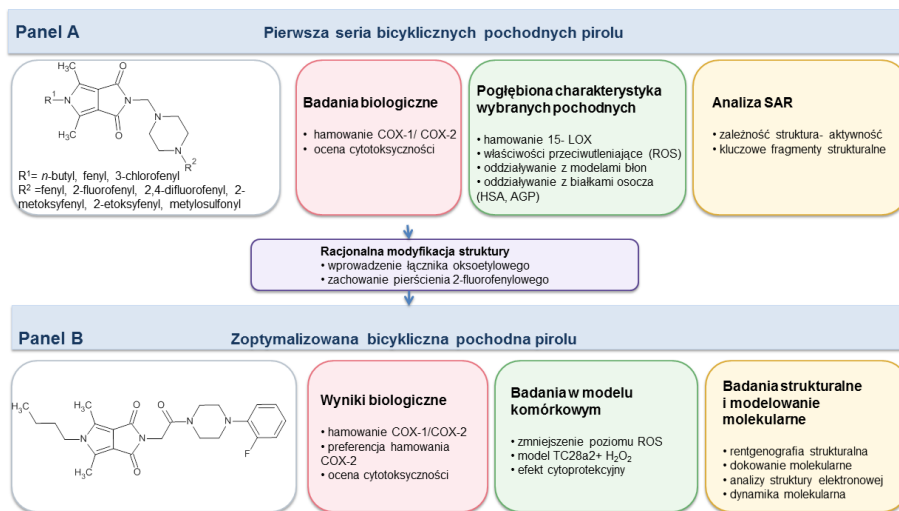


Rysunek 4. Protokół postępowania w racjonalnym projektowaniu związków o potencjalnej aktywności farmakologicznej i korzystnych właściwościach farmakokinetycznych.

Figure 4. Protocol for the rational design of compounds with potential pharmacological activity and favorable pharmacokinetic properties.

Takie zintegrowane podejście może zwiększać efektywność identyfikacji nowych kandydatów na leki i ograniczać liczbę związków wymagających syntezy oraz badań eksperymentalnych [3,4,18,21]. Przykładem takiego podejścia są badania prowadzone na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we

Wrocławiu, których celem było zaprojektowanie i otrzymanie nowych bicyklicznych pochodnych pirolu o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym. Zsyntetyzowane pochodne pirolo[3,4-c]pirolu posiadały fragment 4-arylopiperazynowy/metylosulfonylopiperazynowy spięty z układem głównym mostkiem metylenowym [67]. Wzór ogólny oraz kolejne etapy ich charakterystyki i optymalizacji przedstawiono na Rysunku 5 [67,92-94].



Rysunek 5. Etapy projektowania i optymalizacji bicyklicznych pochodnych pirolu. (Panel A) Pierwsza seria bicyklicznych pochodnych pirolu, zakres badań biologicznych i analiza SAR. (Panel B) Zoptymalizowana bicykliczna pochodna pirolu oraz zakres jej badań biologicznych, strukturalnych i molekularnych.

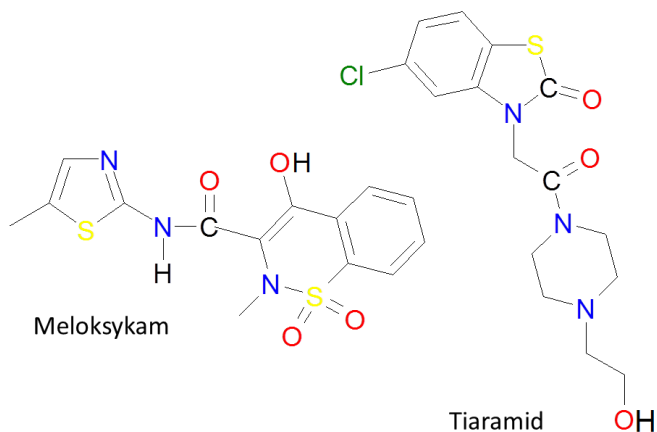
Figure 5. Design and optimization of bicyclic pyrrole derivatives. (Panel A) The first series of bicyclic pyrrole derivatives, the scope of biological studies, and SAR analysis. (Panel B) An optimized bicyclic pyrrole derivative and the scope of its biological, structural, and molecular studies.

Budowę chemiczną otrzymanych związków potwierdzono z wykorzystaniem metod fizykochemicznych, takich jak spektroskopia NMR i IR oraz rentgenografia strukturalna [67,92]. Potencjalną aktywność farmakologiczną otrzymanych związków oceniano *in vitro* na podstawie ich zdolności do hamowania COX-1 i COX-2, wyznaczając wartości IC_{50} dla obu enzymów. Badane pochodne wykazywały zróżnicowaną aktywność hamującą wobec COX-1 i COX-2. Wartości IC_{50} wobec COX-2 mieściły się w zakresie 42,5 – 53,9 μM , podczas gdy dla referencyjnego meloksikamu wynosiły 57,3 μM . Dla związków, dla których możliwe było wyznaczenie współczynnika selektywności COX-2/COX-1, jego wartości wynosiły 0,24 – 0,49, w porównaniu z 0,67 dla meloksikamu [67]. Wyniki te, wraz z analizą zależności struktura–aktywność, stanowiły podstawę do wytypowania wybranych pochodnych (sześć najaktywniejszych struktur) do pogłębionej charakterystyki [93]. Zakres badań rozszerzono o ocenę zdolności do

hamowania 15-lipooksygenazy (15-LOX), właściwości przeciwutleniających, oddziaływań z modelami błon komórkowych i białkami osocza (HSA, AGP), a także przewidywanie wybranych właściwości farmakokinetycznych z wykorzystaniem metod *in silico* [93]. Uzyskane wyniki poszerzyły charakterystykę biologiczną badanych pochodnych oraz dostarczyły dodatkowych informacji dotyczących zależności struktura–aktywność, przydatnych w dalszej optymalizacji ich struktury. W obrębie analizowanych cząsteczek serii pierwszej zwrócono również uwagę na znaczenie podstawnika w pozycji 5 układu pirolo[3,4-*c*]pirolowego. Pochodne zawierające w tej pozycji podstawnik *n*-butylowy lub *m*-chlorofenylowy wykazywały większą aktywność niż ich strukturalne analogi posiadające w tym położeniu niepodstawiony pierścień fenyłowy [67]. Obserwacja ta stanowiła jedną z przesłanek do zachowania podstawnika *n*-butylowego w strukturze projektowanej pochodnej (panel B). Dalsza optymalizacja struktury uwzględniała również wyniki wcześniejszych badań *in vivo* pochodnych pirolo[3,4-*c*]pirolu z łącznikiem etylenowym. Wśród analizowanych pochodnych arylopiperazynowych największą aktywność przeciwbólową w teście wicia u myszy wykazywał związek zawierający fragment *o*-fluorofenylopiperazynowy, dla którego wartość ED₅₀ wynosiła 9,35 mg/kg, podczas gdy dla referencyjnego kwasu acetylosalicylowego wynosiła 39,15 mg/kg [94]. Wyniki te stanowiły przesłankę do uwzględnienia fragmentu 2-fluorofenylopiperazynowego podczas dalszego projektowania. Badania biologiczne pierwszej serii (Panel A) uzupełniono analizami *in silico*, obejmującymi dokowanie molekularne, którego celem była charakterystyka przewidywanego sposobu wiązania ligandów i ich orientacji w miejscu aktywnym cyklooksygenaz. Struktury enzymów wykorzystane w badaniach pobrano z bazy danych PDB. Dokowanie molekularne wykonano do struktur COX-1 i COX-2 oznaczonych jako 1EQG [95] oraz 4M11 [75]. Wyniki wskazały, że analizowane cząsteczki zajmują kieszeń hydrofobową otoczoną polarnymi i hydrofobowymi resztami aminokwasowymi, a przewidywane kompleksy białko–ligand są stabilizowane głównie przez oddziaływania hydrofobowe oraz siły van der Waalsa. Struktura krystaliczna kompleksu COX-2 z meloksykamem (PDB: 4M11) posłużyła jako model referencyjny. Porównanie przewidywanych pozycji badanych ligandów z położeniem meloksykamu w strukturze krystalicznej wskazało, że analizowane pochodne mogą zajmować ten sam obszar kieszeni wiążącej. Analizy te umożliwiły charakterystykę przewidywanych oddziaływań ligand-enzym oraz dostarczyły informacji przydatnych w interpretacji wyników eksperymentalnych i dalszej analizie SAR.

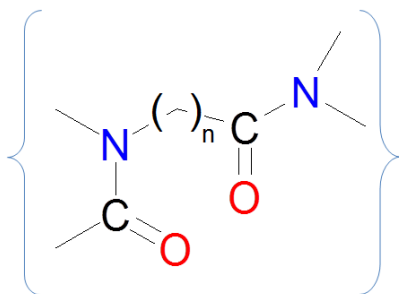
Istotnym elementem dalszego etapu projektowania było wykorzystanie odpowiednio dobranych związków odniesienia, pełniących odmienne funkcje w prowadzonych badaniach. Meloksykam zastosowano jako lek referencyjny w badaniach farmakologicznych, umożliwiający porównanie aktywności hamującej badanych pochodnych wobec COX-1 i COX-2. Tiaramid wykorzystano natomiast jako strukturalny punkt odniesienia podczas projektowania nowych pochodnych, ze względu na obecność w jego cząsteczce istotnych elementów budowy oraz udokumentowaną

aktywność biologiczną [96,97]. Wzory chemiczne obu związków przedstawiono na Rysunku 6.



Rysunek 6. Wzory chemiczne meloksikamu i tiamidu (opracowanie własne na podstawie [98,99]).
Figure 6. Chemical structures of meloxicam and tiaramide (own work based on [98,99]).

Szczególne znaczenie dla dalszej modyfikacji struktury miały badania Dogruer'a i współpracowników [100,101], w których wskazano motyw strukturalny związany z aktywnością przeciwbólową analizowanych związków. Charakterystycznym elementem tego motywu jest obecność dwóch atomów azotu połączonych łącznikiem oksoetylenowym (Rysunek7). Analogiczny motyw strukturalny występuje również w referencyjnej cząsteczce tiamidu (Rysunek 6), co stanowiło dodatkową przesłankę do uwzględnienia tego elementu podczas projektowania nowych bicyklicznych pochodnych pirolu. W pierwszej serii badanych pochodnych (Panel A) motyw ten był obecny jedynie częściowo, ze względu na brak grupy karbonylowej w łączniku.



Rysunek 7. Motyw strukturalny zaproponowany przez Dogruer'a i współpracowników na podstawie analizy związków o aktywności przeciwbólowej [101].
Figure 7. Structural motif proposed by Dogruer *et al.* based on the analysis of compounds with analgesic activity [101].

Połączenie wyników badań eksperymentalnych pierwszej serii, analizy SAR, modelowania molekularnego oraz przesłanek wynikających z wcześniejszych badań *in vivo* i danych literaturowych stanowiło podstawę do zaprojektowania zoptymalizowanej bicyklicznej pochodnej pirolu przedstawionej na Rysunku 5 (Panel B) [92]. W jej strukturze zachowano podstawnik *n*-butylowy w pozycji 5 układu pirolo[3,4-*c*]pirolowego, zastosowano fragment 2-fluorofenylopiperazynowy oraz wprowadzono łącznik oksoetylowy zachowując motyw strukturalny opisany przez Dogruer'a i współpracowników. Tym samym projektowana cząsteczka (5-butyl-4,6-dimetylo-2-[[4-(*o*-fluorofenyl)-1-piperazylo]-2-oksoetylo]-pirolo[3,4-*c*]pirolo-1,3(2*H*,5*H*)-dion) łączyła elementy wytypowane na podstawie wcześniejszych badań biologicznych i analizy SAR z przesłankami wynikającymi z badań *in vivo* oraz analizy struktur związków o udokumentowanej aktywności farmakologicznej.

Zoptymalizowaną pochodną zsyntetyzowano metodami klasycznej syntezy organicznej, a jej strukturę potwierdzono metodami spektroskopowymi oraz rentgenografią strukturalną [92]. W badaniach *in vitro* związek hamował COX-2 z wartością $IC_{50} = 39,87 \mu M$ oraz COX-1 z wartością $IC_{50} = 98,75 \mu M$. Dla referencyjnego meloksykamu wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 52,34 i 81,08 μM , natomiast współczynnik selektywności COX-2/COX-1 wynosił 0,40 dla badanego związku i 0,64 dla meloksykamu. Wyniki te wskazywały na większą preferencję hamowania COX-2 przez zoptymalizowaną pochodną w porównaniu z meloksykadem zastosowanym teście enzymatycznym [92].

W modelu komórkowym wykorzystującym chondrocyty TC28a2 poddane stresowi oksydacyjnemu indukowanemu przez H_2O_2 przy niższych badanych stężeniach związku (10 i 50 μM) obserwowano ponadto efekt cytoprotekcyjny oraz zmniejszenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) [92].

Najważniejsze wyniki kolejnych etapów badań eksperymentalnych i obliczeniowych oraz ich znaczenie dla dalszej charakterystyki i optymalizacji bicyklicznych pochodnych pirolu zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Kluczowe wyniki badań eksperymentalnych i obliczeniowych bicyklicznych pochodnych pirolu oraz ich znaczenie dla dalszych badań

Table 1. Key experimental and computational results for bicyclic pyrrole derivatives and their significance for further studies

Badane związki	Kluczowe wyniki eksperymentalne	Badania <i>in silico</i>	Znaczenie wyników
Pierwsza seria (Panel A) [67]	IC_{50} COX-1= 94,3–180,7 μM ; IC_{50} COX-2= 42,5 - 53,9 μM ; COX-2/COX-1= 0,24 - 0,49*. Meloksykam: IC_{50} COX-1= 85,8 μM ; IC_{50} COX-2= 57,3 μM ; COX-2/COX-1= 0,67.	Dokowanie molekularne do COX-1 i COX-2; analiza przewidywanego sposobu wiązania i oddziaływań ligand-enzym	Wyniki badań biologicznych i analiza SAR umożliwiły wytypowanie pochodnych do pogłębionej charakterystyki

Wybrane pochodne (Panel A) [93]	hamowanie 15-LOX, właściwości przeciwtleniające, oddziaływania z modelami błon komórkowych oraz białkami osocza (HSA, AGP)	Przewidywanie wybranych właściwości farmakokinetycznych	Poszerzenie charakterystyki biologicznej i analizy SAR oraz wskazanie kierunków dalszych modyfikacji strukturalnych
Związek (Panel B) [92]	IC ₅₀ COX-2= 39,87 μM; IC ₅₀ COX-1= 98,75 μM; COX-2/COX-1= 0,40. Meloksylam: odpowiednio 52,34 μM; 81,08 μM; 0,64. W modelu TC28a2/H ₂ O ₂ przy niższych badanych stężeniach obserwowano efekt cytoprotekcyjny i zmniejszenie ROS	Obliczenia kwantowo- chemiczne; dokowanie molekularne; analizy RDG/QTAIM; dynamika molekularna BOMD	Pogłębiona charakterystyka związku oraz interpretacja molekularnych podstaw obserwowanej aktywności biologicznej

* Dla związków, dla których możliwe było wyznaczenie współczynnika COX-2/COX-1.

W celu pogłębienia charakterystyki molekularnej zoptymalizowanej pochodnej przeprowadzono analizy *in silico*, obejmujące obliczenia kwantowo-chemiczne, dokowanie molekularne oraz symulacje metodą dynamiki molekularnej [92]. Obliczenia kwantowo-chemiczne umożliwiły analizę parametrów geometrycznych i struktury elektronowej cząsteczki. Analiza struktury krystalicznej wykazała obecność wewnątrzcząsteczkowego oddziaływania C–H···F stabilizującego jej konformację. Zastosowanie zredukowanego gradientu gęstości elektronowej (*ang.* *Reduced Density Gradient*, RDG) [102] oraz kwantowej teorii atomów w cząsteczkach (*ang.* *Quantum Theory of Atoms in Molecules*, QTAIM) [103] umożliwiło dodatkowo charakterystykę oddziaływań niekowalencyjnych występujących w badanym związku oraz związkach referencyjnych. Dokowanie molekularne przeprowadzono z wykorzystaniem struktur COX-1 i COX-2, a wyniki uzyskane dla zoptymalizowanej pochodnej porównano z wynikami dla meloksylamu, rofekoksybu i tiaramidu [92]. Analiza przewidywanego sposobu wiązania zoptymalizowanej pochodnej z ludzkim enzymem COX-2 (PDB: 5KIR) wskazała na udział oddziaływań π – π , π – σ , π –alkilowych, van der Waalsa oraz słabych wiązań wodorowych. W oddziaływaniach tych uczestniczyły m.in. reszty Phe518, Trp387, His90, Leu352, Val523, Met522, Ser353 i Arg513. Wyniki te pozwoliły na scharakteryzowanie przewidywanego sposobu wiązania badanej pochodnej w miejscu aktywnym COX-2. W końcowym etapie analiz przeprowadzono symulacje metodą dynamiki molekularnej Borna–Oppenheimera (BOMD) [92]. Symulacje prowadzono w temperaturze 300 K, w stałej objętości i temperaturze (NVT),

a czas symulacji wynosił około 19 ps z których 2 ps zostały potraktowane jako czas potrzebny na zrównoważenie układu. Analizowano rozkłady parametrów geometrycznych wiązań wodorowych występujących w badanych kompleksach. Dla kompleksu zoptymalizowanej pochodnej z COX-2 zidentyfikowano cztery wiązania wodorowe z udziałem reszt Phe518, Ser353, Met522 i Leu352. Najczęściej obserwowane odległości mieściły się w zakresie około 2,2-2,5 Å, a odpowiadające im kąty wynosiły około 130-170°. Wyniki wskazywały na udział słabych wiązań wodorowych w stabilizacji położenia badanej pochodnej w miejscu wiążącym COX-2 [92]. Łączna analiza wyników eksperymentalnych i obliczeniowych umożliwiła pogłębioną charakterystykę bicyklicznych pochodnych pirolu oraz wskazanie elementów strukturalnych i oddziaływań molekularnych mogących mieć znaczenie dla ich aktywności hamującej wobec cyklooksygenaz. Wyniki uzyskane dla pierwszej serii pochodnych, wraz z analizą SAR, wcześniejszymi wynikami badań *in vivo* oraz przesłankami wynikającymi z danych literaturowych, stanowiły podstawę racjonalnych modyfikacji strukturalnych. Zachowanie podstawnika *n*-butylowego, zastosowanie fragmentu 2-fluorofenylopiperazynowego oraz wprowadzenie łącznika oksoetylenowego doprowadziły do otrzymania zoptymalizowanej pochodnej, która w zastosowanym teście enzymatycznym wykazywała większą preferencję hamowania COX-2 niż referencyjny meloksykam. Uzupełnienie badań eksperymentalnych metodami *in silico* umożliwiło charakterystykę przewidywanego sposobu wiązania oraz oddziaływań mogących uczestniczyć w stabilizacji kompleksu z COX-2. Przedstawione badania stanowią przykład synergii badań eksperymentalnych i modelowania molekularnego w racjonalnym projektowaniu i dalszej optymalizacji nowych bicyklicznych pochodnych pirolu o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym.

UWAGI KOŃCOWE

Synergia badań eksperymentalnych i metod modelowania molekularnego w poszukiwaniu związków aktywnych biologicznie stanowi obecnie jedno z najważniejszych podejść we współczesnym odkrywaniu i projektowaniu leków. Współczesna medycyna i farmacja stają przed coraz większymi wyzwaniami, związanymi między innymi z narastającą antybiotykoopornością oraz wciąż ograniczonymi możliwościami skutecznego leczenia wielu chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych. Komputerowo wspomagane projektowanie leków (CADD) daje możliwość bardziej racjonalnego prowadzenia badań, ponieważ dzięki wykorzystaniu modeli obliczeniowych oraz wiedzy zgromadzonej w specjalistycznych bazach danych pozwala wytypować najbardziej obiecujące związki do dalszej syntezy i badań biologicznych. Dodatkowo umożliwia wstępną ocenę właściwości biologicznych i farmakokinetycznych projektowanych cząsteczek na drodze analiz *in silico*, jeszcze przed rozpoczęciem badań eksperymentalnych. Sama predykcja nie jest jednak wystarczająca i wymaga potwierdzenia w badaniach ekspery-

mentalnych. Dlatego też istotną rolę nadal odgrywają klasyczne metody syntezy organicznej, badania biologiczne oraz rozwiązania umożliwiające efektywne otrzymywanie nowych bibliotek związków, takie jak chemia kombinatoryczna. Dopiero Wzajemne uzupełnianie się metod eksperymentalnych i obliczeniowych pozwala na racjonalne projektowanie nowych substancji biologicznie czynnych. Przedstawione w niniejszym opracowaniu krótkie wprowadzenie do komputerowo wspomaganego projektowania leków oraz zaprezentowane wyniki badań nad bicyklicznymi pochodnymi pirolu pokazują, że podejście interdyscyplinarne stanowi klucz do racjonalnego projektowania związków o oczekiwanej aktywności biologicznej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Zejc, M. Gorczyca, *Chemia Leków*. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2018.
- [2] Á. Furka, *Drug Dev. Res.*, 1995, **36**, 1. <https://doi.org/10.1002/ddr.430360102>
- [3] E. Franklin, M.M. Charlton, *The History of Computing. The Telephasic Workshop*, 2024.
- [4] M.R. Hasan, A.A. Alsaiani, B.Z. Fakhurji, M.H.R. Molla, A.H. Asseri, M.A.A. Sumon, M.N. Park, F. Ahammad, B. Kim, *Molecules*, 2022, **27**, 4169. <https://doi.org/10.3390/molecules27134169>
- [5] Y. Shen, Y. Liu, T. Krafft, Q. Wang, *Med. Plus*, 2025, **2**, 100071. <https://doi.org/10.1016/j.medp.2025.100071>
- [6] M.E. Elshobary, N.K. Badawy, Y. Ashraf, A.A. Zatioun, H.H. Masriya, M.M. Ammar, N.A. Mohamed, S. Mourad, A.M. Assy, *Pharmaceuticals*, 2025, **18**(3), 402. <https://doi.org/10.3390/ph18030402>
- [7] K. Alagiakrishnan, T. Halverson, D. V. F. Olivares, C. A. Sadowski, *J. Pers. Med.*, 2026, **16**, 182. <https://doi.org/10.3390/jpm16040182>
- [8] <https://www.zwrotnikraka.pl/terapia-celowana-molekularnie-onkologia-personalizowana/>
- [9] T. Pillaiyar, S. Meenakshisundaram, M. Manickam, M. Sankaranarayanan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2020, **195**, 112275. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112275>
- [10] S. Ahuja, D. Kanwar, P. Silakari, S.K. Sahu, P. Kaur, *Ther. Innov. Regul. Sci.*, 2026, <https://doi.org/10.1007/s43441-026-01013-y>
- [11] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001, **46**, 3. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- [12] C.A. Lipinski, *Drug Discov. Today: Technol.*, 2004, **1**, 337. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- [13] H. Grosjean, P.C. Biggin, *Nat. Commun.*, 2026, **17**, 2226. <https://doi.org/10.1038/s41467-026-68941-z>
- [14] S. Verma, R.K. Pathak, Eds. D.B. Singh, R.K. Pathak, Chapter 16 – Discovery and optimization of lead molecules in drug designing. *Bioinformatics*, Academic Press, 2022, 253-267.
- [15] N.A. Meanwell, The Influence of Bioisosteres in Drug Design: Tactical Applications to Address Developability Problems. In: N. Meanwell, (eds) *Tactics in Contemporary Drug Design. Topics in Medicinal Chemistry*, 2013, 9. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7355_2013_29
- [16] H.M. Geysen, R.H. Meloan, S.J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984, **81**, 3998. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.13.3998>
- [17] Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1991, **37**, 487. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1991.tb00765.x>
- [18] R. Liu, X. Li, K.S. Lam, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2017, **38**, 117. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.017>
- [19] R. Macarron, M.N. Banks, D. Bojanic, D.J. Burns, D.A. Cirovic, T. Garyantes, D.V.S. Green, R.P. Hertzberg, W.P. Janzen, J.W. Paslay, U. Schopfer, G.S. Sittampalam, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2011, **10**, 188. <https://doi.org/10.1038/nrd3368>
- [20] J.G. Moffat, F. Vincent, J.A. Lee, J. Eder, M. Prunotto, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2017, **16**, 531. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.111>
- [21] R.L. Monaghan, J.S. Tkacz, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1990, **44**, 271. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.001415>
- [22] C.R. Hutchinson, *Curr. Opin. Microbiol.*, 1998, **1**, 319. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80036-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80036-2)
- [23] W. Kurzątkowski, M. Staniszevska, M. Bondaryk, A. Gębska-Kuczerowska, *Post. Mikrobiol.*, 2014, **53**, 366.
- [24] I. Doytchinova, *Molecules*, 2022, **27**, 1496. <https://doi.org/10.3390/molecules27051496>

- [25] G. Biala, E. Kedzierska, M. Kruk-Slomka, J. Orzelska-Gorka, S. Hmaidan, A. Skrok, J. Kaminski, E. Havrankova, D. Nadaska, I. Malik, *Pharmaceuticals* 2023, **16**, 1283. <https://doi.org/10.3390/ph16091283>
- [26] C.S. Ho, C.T.H. Wong, T.T. Aung, R. Lakshminarayanan, J.S. Mehta, S. Rauz, A. McNally, B. Kintses, S.J. Peacock, C. de la Fuente-Nunez, R.E.W. Hancock, D.S.J. Ting, *Lancet Microbe*, 2025, **6**, 100947. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.07.010>
- [27] R.N.L. Lamptey, B. Chaulagain, R. Trivedi, A. Gothwal, B. Layek, J. Singh, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, **23**, 1851. <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>
- [28] D.G. Gadhave, V.V. Sugandhi, S.K. Jha, S.N. Nangare, G. Gupta, S.K. Singh, K. Dua, H. Cho, P.M. Hansbro, K.R. Paudel, *Ageing Res. Rev.*, 2024, **99**, 102357. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102357>
- [29] H.V. Bindod, P.R. Hatwar, R.L. Bakal, V.N. Dafe, *J. Drug Delivery Ther.*, 2025, **15**, 114. <http://doi.org/10.22270/jddt.v15i5.7104>
- [30] Y. Fan, A. Fan, Z. Yang, D. Fan, *BMC Psychiatry*, 2025, **25**, 486. <https://doi.org/10.1186/s12888-025-06932-y>
- [31] <https://top500.org/>
- [32] <https://drughunter.com/resource/drug-discovery-websites-and-databases>
- [33] C. Knox, M. Wilson, C.M. Klinger, M. Franklin, E. Oler, A. Wilson, A. Pon, J. Cox, N.E.L. Chin, S.A. Strawbridge, M. Garcia-Patino, R. Kruger, A. Sivakumaran, S. Sanford, R. Doshi, N. Khetarpal, O. Fatokun, D. Doucet, A. Zubkowski, D.Y. Rayat, H. Jackson, K. Harford, A. Anjum, M. Zakir, F. Wang, S. Tian, B. Lee, J. Liigand, H. Peters, R.Q.R. Wang, T. Nguyen, D. So, M. Sharp, R. da Silva, C. Gabriel, J. Scantlebury, M. Jasinski, D. Ackerman, T. Jewison, T. Sajed, V. Gautam, D.S. Wishart, *Nucleic Acids Res.*, 2024, **52**(D1), D1265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad976>
- [34] Q. Lv, G. Chen, H. He, Z. Yang, L. Zhao, C.Y. Chen, *Signal Transduct. Target Ther.* 2023, **31**, 127. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01339-1>
- [35] A. Gaulton, L.J. Bellis, A.P. Bento, J. Chambers, M. Davies, A. Hersey, Y. Light, S. McGlinchey, D. Michalovich, B. Al-Lazikani, J.P. Overington, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **40**, D1100. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr777>
- [36] C. Fu, G. Jin, J. Gao, R. Zhu, E. Ballesteros-villagrana, S.T.C. Wong, *Bioinformatics*, 2013, **29**, 1834. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt279>
- [37] J. Sun, Y. Wu, H. Xu, Z. Zhao, *BMC Bioinformatics*, 2012, **13** (Suppl 9), S7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S9-S7>
- [38] S. Kim, J. Chen, T. Cheng, A. Gindulyte, J. He, S. He, Q. Li, B.A. Shoemaker, P.A. Thiessen, B. Yu, L. Zaslavsky, J. Zhang, E.E. Bolton, *Nucleic Acids Res.*, 2025, **53**, D1516. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1059>
- [39] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, 235. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- [40] Z. Gao, H. Li, H. Zhang, X. Liu, L. Kang, X. Luo, W. Zhu, K. Chen, X. Wang, H. Jiang, *BMC Bioinformatics* 2008, **9**, 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-104>
- [41] S.K. Niazi, Z. Mariam, *Pharmaceuticals* 2024, **17**(1), 22. <https://doi.org/10.3390/ph17010022>
- [42] C.S. Tautermann, Current and Future Challenges in Modern Drug Discovery. In: A. Heifetz, (eds) *Quantum Mechanics in Drug Discovery. Methods in Molecular Biology*, 2020, **2114**. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0282-9_1
- [43] D. Sun, W. Gao, H. Hu, S. Zhou, *Acta Pharm. Sin. B*, 2022, **12**, 3049. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>
- [44] D. Bassani, S. Moro, *Molecules*, 2023, **28**(9), 3906. <https://doi.org/10.3390/molecules28093906>
- [45] <https://www.efpia.eu/media/602709/the-pharmaceutical-industry-in-figures-2021.pdf>
- [46] S.M. Ahire, S.P. Jadhav, V.V. Shewale, P.S. Pawar, A.M. Kokande, D.P. Sonawane, D.M. Patil, *J. ReAttach Ther. Dev. Divers.*, 2023, **6**, 1573. [https://doi.org/10.53555/jrtdd.v6i10s\(2\).2169](https://doi.org/10.53555/jrtdd.v6i10s(2).2169)
- [47] M.H. Baig, K. Ahmad, S. Roy, J.M. Ashraf, M. Adil, M.H. Siddiqui, S. Khan, M.A. Kamal, I. Provnaznik, I. Choi, *Curr. Pharm. Design*, 2016, **22**, 572.
- [48] I.J. dos Santos Nascimento, T.M. de Aquino, E.F. da Silva-Júnior, *Lett. Drug Des. Discov.*, 2022, **19**, 951. <https://doi.org/10.2174/1570180819666220405225817>
- [49] A. Chandershekar, A. Bhaskar, M.R. Mekhanti, M. Rinku, *Int. J. Health Care Biol. Sci.*, 2020, **1**, 27. <https://saapjournals.org/index.php/ijhcb/article/view/15>
- [50] A.B. Deore, J.R. Dhumane, H.V. Wagh, R.B. Sonawane, *Asian J. Pharm. Res. Dev.*, 2019, **7**, 62. <http://doi.org/10.22270/ajprd.v7i6.616>
- [51] J.P. Hughes, S. Rees, S.B. Kalindjian, K.L. Philpott, *Br. J. Pharmacol.*, 2011, **162**(6), 1239. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>

- [52] A. Lavecchia, C. Di Giovanni, *Curr. Med. Chem.*, 2013, **20**(23), 2839. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990001>.
- [53] J. Shim, A.D. MacKerell, Jr, *Med. Chem. Commun.*, 2011, **2**, 356. <https://doi.org/10.1039/c1md00044f>
- [54] G. Patrick. *Chemia Medyczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2019.
- [55] A. Tropsha, *Mol. Inf.*, 2010, **29**(6–7), 476. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>.
- [56] Danishuddin, A.U. Khan, *Drug Discov. Today*, 2016, **21**, 1291. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.013>
- [57] J.T. Leonard, K.Roy, *QSAR Comb. Sci.* 2006, **25**, 235. doi:10.1002/qsar.200510161
- [58] P.M. Khan, K. Roy, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2018, **13**(12), 1075. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1542428>.
- [59] J. Li, T. Zhao, Q. Yang, S. Du, L. Xu, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2025, **256**, 105278. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2024.105278>
- [60] M. Evangelista, M. Papa, *Toxics*, 2025, **13**, 799. <https://doi.org/10.3390/toxics13090799>
- [61] M. Novič, M. Vračko, *Molecules* 2010, **15**, 1987. <https://doi.org/10.3390/molecules15031987>
- [62] Š. Župerl, G. Mlinsek, T. Solmajer, J. Zupan, M. Novič, *J. Chemometrics* 2007, **21**, 346. <https://doi.org/10.1002/cem.1046>
- [63] IUPAC, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology (Gold Book)*, 2025. <https://doi.org/10.1351/goldbook.11485>.
- [64] S. Zhao, X. Li, W. Peng, L. Wang, W. Ye, Y. Zhao, W. Yin, W.-D. Chen, W. Li, Y.-D. Wang, *RSC Adv.*, 2021, **11**, 9403. <https://doi.org/10.1039/d0ra10168k>
- [65] S.-Y. Yang, *Drug Discov. Today*, 2010, **15**(11–12), 444. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.03.013>.
- [66] T. Seidel, D.A. Schütz, A. Garon, T. Langer, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 2019, **110**, 99. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14632-0_4.
- [67] A. Redzicka, L. Szczukowski, A. Kochel, B. Wiatrak, K. Gębczak, Ż. Czyżnikowska, *Bioorganic Med. Chem.*, 2019, **27**, 3918. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.033>
- [68] F.A. Binbay, D.C. Rathod, A.A.P. George, D. Imhof, *Pharmaceuticals*, 2023, **16**(12), 1662. <https://doi.org/10.3390/ph16121662>
- [69] J.M. Paggi, A. Pandit, R.O. Dror, *Annu. Rev. Biochem.*, 2024, **93**, 389. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030222-120000>
- [70] Y. Tang, R. Moretti, J. Meiler, *J. Chem. Inf. Model.* 2024, **64**, 1794. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.4c00247>
- [71] H. Zhu, Y. Zhang, W. Li, N. Huang, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**(24), 15961. <https://doi.org/10.3390/ijms232415961>.
- [72] C. Munk, K. Harpsøe, A.S. Hauser, V. Isberg, D.E. Gloriam, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2016, **30**, 51. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.07.003>.
- [73] G. Schneider, U. Fechner, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, **4**, 649. <https://doi.org/10.1038/nrd1799>.
- [74] G. Sliwoski, S. Kothiwale, J. Meiler, E.W. Lowe Jr., *Pharmacol. Rev.*, 2014, **66**(1), 334. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>.
- [75] S. Xu, D.J. Hermanson, S. Banerjee, K. Ghebreselasie, G.M. Clayton, R.M. Garavito, L.J. Marnett, *J. Biol. Chem.* 2014, **289**, 6799. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517987>
- [76] N.E. Daoud, P. Borah, P.K. Deb, K.N. Venugopala, W. Hourani, M. Alzweiri, S.K. Bardaweel, V. Tiwari, *Curr. Drug Metab.*, 2021, **22**, 503. <https://doi.org/10.2174/1389200222666210705122913>
- [77] H. Komura, R. Watanabe, K. Mizuguchi, *Pharmaceutics* 2023, **15**, 2619. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112619>
- [78] Y. Chen, J. Kirchmair, *Mol. Inf.*, 2020, **39**, e2000171. <https://doi.org/10.1002/minf.202000171>.
- [79] J. Wang, T. Hou, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015, **86**, 11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.001>.
- [80] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- [81] P. Banerjee, E. Kemmler, M. Dunkel, R. Preissner, *Nucleic Acids Res.*, 2024, **52**, W513. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae303>
- [82] J. Vamathevan, D. Clark, P. Czodrowski, I. Dunham, E. Ferran, G. Lee, B. Li, A. Madabhushi, P. Shah, M. Spitzer, S. Zhao, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2019, **18**, 463. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0024-5>.
- [83] S. Dara, S. Dhamercherla, S.S. Jadav, CH M. Babu, M.J. Ahsan, *Artif Intell Rev.* 2021, **55**(3), 1947. doi: 10.1007/s10462-021-10058-4
- [84] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A.A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M.

- Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, *Nature*, 2021, **596**, 583. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- [85] M. Varadi, S. Anyango, M. Deshpande, S. Nair, C. Natassia, G. Yordanova, D. Yuan, O. Stroe, G. Wood, A. Laydon, A. Židek, T. Green, K. Tunyasuvunakool, S. Petersen, J. Jumper, E. Clancy, R. Green, A. Vora, M. Lutfi, M. Figurnov, A. Cowie, N. Hobbs, P. Kohli, G. Kleywegt, E. Birney, D. Hassabis, S. Velankar, *Nucleic Acids Res.*, 2022, **50**(D1), D439. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>. [86] W.P. Walters, M. Murcko, *Nat. Biotechnol.*, 2020, **38**, 143. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0418-2>.
- [87] S. Huang, T. Ou, *Computer-Aided Drug Design in Modern Drug Discovery*, Academic Press, 2026, 39–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-45105-8.00008-1>.
- [88] N.L. Allinger, *Molecular Mechanics*. In: S.J. Formosinho, I.G. Csizmadia, L.G. Arnaut, (eds) *Theoretical and Computational Models for Organic Chemistry*. NATO ASI Series, vol 339. Springer, Dordrecht. 1991. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3584-9_8
- [89] C.L. Brooks III, D.A. Case, S. Plimpton, B. Roux, D. van der Spoel, E. Tajkhorshid, *J. Chem. Phys.*, 2021, **154**, 100401. <https://doi.org/10.1063/5.0045455>
- [90] S.K. Niazi, *Int. J. Mol. Sci.* 2025, **26**, 6325. <https://doi.org/10.3390/ijms26136325>
- [91] G.L. Petri, V. Spanò, R. Spatola, R. Holl, M.V. Raimondi, P. Barraja, A. Montalbano, *Eur. J. Med. Chem.* 2020, **208**, 112783. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112783>
- [92] A. Redzicka, K. Wojtkowiak, A. Kochel, B. Wiatrak, I. Jęskowiak-Kossakowska, A. Jezierska, *J. Mol. Struct.*, 2025, **1322**, 140027. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.140027>
- [93] Ł. Szczukowski, J. Maniewska, B. Wiatrak, P. Jawień, E. Krzyżak, A. Kotynia, A. Marciniak, M. Janeczek, A. Redzicka, *Membranes*, 2023, **13**(3), 349. <https://doi.org/10.3390/membranes13030349>
- [94] W. Malinka, M. Kaczmarz, A. Redzicka, B. Filipek, J. Sapa, *Farmaco*, 2005, **60**(1), 15. doi: 10.1016/j.farmac.2004.10.002
- [95] B.S. Selinsky, K. Gupta, C.T. Sharkey, P.J. Loll, *Biochemistry*, 2001, **40**, 5172. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi010045s>
- [96] K. Tsurumi, Y. Hiramatsu, M. Nozaki, M. Hayashi, H. Fujimura, *Arzneimittel-Forschung*, 1972, **22**(4), 724.
- [97] K.E. Berkin, J.W. Kerr, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1982, **14**(4), 505. doi: 10.1111/j.1365-2125.1982.tb02020.x.
- [98] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54677470#section=2D-Structure> (dostęp, sierpień 2026)
- [99] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tiaramide#section=2D-Structure> (dostęp, sierpień 2026)
- [100] T. Önköl, D.S. Dogruer, S. Ito, M.F. Sahin, *Arch. Pharm.*, 2000, 333(10), 337. doi: 10.1002/1521-4184(200010)333:10<337::aid-ardp337>3.0.co;2-a
- [101] D.S. Dogruer, E. Kupeli, E. Yesilada, M.F. Sahin, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 2004, **337**, 303. <https://doi.org/10.1002/ardp.200200719>
- [102] E.R. Johnson, S. Keinan, P. Mori-Sánchez, J. Contreras-García, A.J. Cohen, W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6498. <https://doi.org/10.1021/ja100936w>
- [103] R.F.W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford University Press, Clarendon Press, New York, 1990. <https://global.oup.com/academic/product/atoms-in-molecules-9780198558651>

Praca wpłynęła do Redakcji 12 sierpnia 2026 r.

