

## PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

## Inhibitory gamma-sekretázy v terapii Alzheimerovej choroby

### Gamma-secretase inhibitors in Alzheimer's disease therapy

Katarína Špilovská • Jan Korábečný • Kamil Kuča • Kamil Musílek

Došlo 16. februára 2012 / Prijato 28. mája 2012

#### Súhrn

Amyloidné plaky, ktoré sa nachádzajú v mozgu pacientov s Alzheimerovou chorobou (AD) sú zložené prevažne z peptidu so 40 alebo 42 aminokyselinovými zvyškami a sú označované ako beta-amyloidné plaky ( $A\beta$ ).  $A\beta$  peptidy sú výsledkom enzymatického štiepenia beta amyloidného prekursorového proteínu (APP). V tzv. amyloidogénnej ceste sa tohto štiepenia zúčastňuje enzým  $\beta$ -sekretáza, ktorý poskytuje proteínový fragment (C99) a ten je následne metabolizovaný za účasti ďalšieho enzýmu  $\gamma$ -sekretázy. Z monomérnych jednotiek vzniknutého  $A\beta$  vznikajú v ďalšej fáze oligomérne formy, ktoré sú príčinou smrti neuronálnych buniek u pacientov s AD. Predkladaná práca je zameraná na inhibitory  $\gamma$ -sekretázy, ktoré tak môžu pozastaviť tvorbu a ukladanie patologických depozít  $A\beta$ . Podrobne sú popísané inhibitory  $\gamma$ -sekretázy, ktoré dosiahli klinické štúdie, a taktiež sú predstavené ďalšie zaujímavé skupiny týchto zlúčenín.

**Kľúčové slová:** Alzheimerova choroba • beta amyloid • sekretáza • inhibítor

#### Summary

Neuritic plaques, which are situated in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients, are composed mainly of peptides containing 40 or 42 amino acid residues known as  $\beta$ -amyloid plaques ( $A\beta$ ). The  $A\beta$  peptide is the result of the enzymatic cleavage of the amyloid precursor protein (APP). In the so-called amyloidogenic pathway, the  $\beta$ -secretase enzyme releases a protein fragment (C99), which is subsequently metabolized by the enzyme  $\gamma$ -secretase. Monomer forms of  $A\beta$  are turned into oligomer forms, which are the main cause of cellular

neuronal death in AD patients. The following study is focused on  $\gamma$ -secretase inhibitors that can slow down the production or accumulation of pathologic  $A\beta$  deposits.  $\gamma$ -secretase inhibitors that reached different phases of clinical trials are particularly reported as well as other promising groups of these analogues.

**Keywords:** Alzheimer's disease • beta amyloid • secretase • inhibitor

#### Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD – Alzheimer's disease) je neurodegeneratívne ochorenie charakterizované stratou kognitívnych funkcií a je sprevádzané zmenami v správaní. Je to najbežnejší typ demencie u starších ľudí. Pri veku nad 85 rokov trpí štatisticky jeden z dvoch ľudí AD. V roku 2000 malo okolo 5 miliónov ľudí AD na celom svete, napriek tomu väčšina neboli diagnostikované a liečené. Do roku 2050 by sa mal počet ľudí trpiacich na AD v USA zvýšiť na 13 miliónov<sup>1)</sup>.

Demencia je spôsobená degeneráciou neurónov v mozgovej kôre. Neuropatologické zmeny spájané s AD zahŕňujú objavenie amyloidných plakov a neurofibrilárnych spletenecov. Hlavnou zložkou amyloidných plakov je malý peptid (beta-amyloid;  $A\beta$ ), ktorý vzniká proteolytickým štiepením z  $\beta$ -amyloidného prekursorového proteínu ( $\beta$ -APP) prostredníctvom aspartyl-proteázových enzýmov  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy.

$A\beta$  je vo svojej monomérnej forme zložený zo 40- alebo 42-aminokyselinového peptidu, ktorý spôsobuje atrofiu neurónov pri AD<sup>2, 3)</sup>.

$\gamma$ -sekretáza sprostredkuje aj vnútramolekulové štiepenie viacerých transmembránových proteínov. Spomedzi známych substrátov  $\gamma$ -sekretázy je významný Notch receptor. Proteolýzou je uvoľňovaná intracelulárna časť Notch receptora, známa ako intracelulárna Notch doména (NICD; z angl. Notch Intracellular Domain). NICD sa premiestňuje do jadra a je aktívatorm viacerých signálov pre transdukciu. Zistilo sa, že inhibitory  $\gamma$ -sekretázy, ktoré neovplyvňujú Notch, pôsobia v gastrointestinálnych a T bunkách a sú pova-

K. Špilovská • J. Korábečný • K. Kuča  
Univerzita obrany Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotníctví,  
Katedra toxikológie

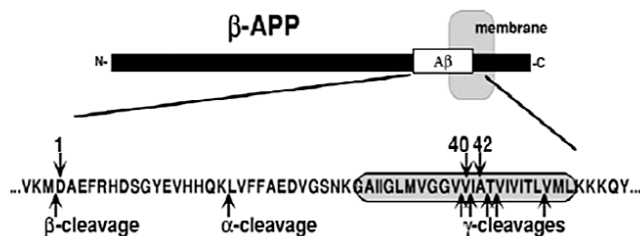
doc. Ing. Kamil Kuča, Ph.D. (✉)  
Fakultní nemocnice Hradec Králové  
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Česká republika  
e-mail: kucakam@pmfhk.cz

K. Musílek  
Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, Katedra chemie

žované za terapeuticky významné. Za selektívne inhibítory  $\gamma$ -sekretázy považujeme také zlúčeniny, ktoré vykazujú viac ako 15-násobnú selektivitu pre inhibíciu APP voči Notch<sup>4)</sup>.

### Biochemická a genetická charakteristika $\gamma$ -sekretázy

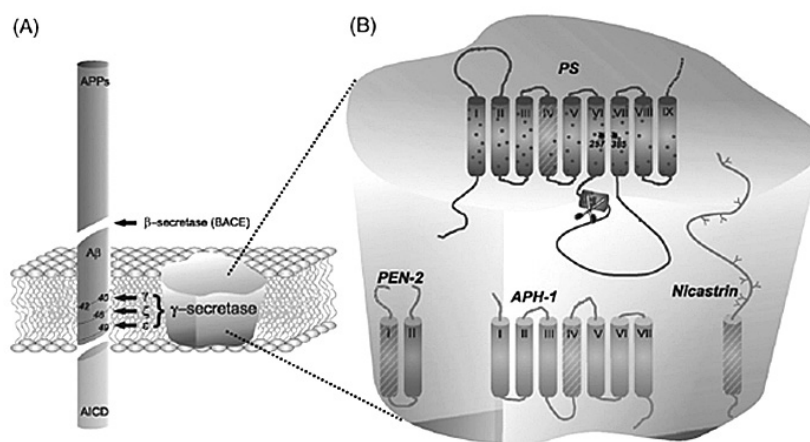
Dva enzýmy sa zúčastňujú uvoľňovania  $A\beta$  z  $\beta$ -APP. Sú to proteolytické enzýmy  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretáza. Najprv dochádza ku štiepeniu N-konca  $\beta$ -sekretázou z  $\beta$ -APP za uvoľnenia časti  $A\beta$  označovanej ako C99, a potom dochádza ku štiepeniu C-konca  $\gamma$ -sekretázou.  $\beta$ -sekretáza, označovaná aj ako BACE (z angl.  $\beta$ -site cleaving enzyme), bola identifikovaná prostredníctvom biochemických a genetických metód ako aspartyl proteáza (Asp 2), čo je transmembránový proteín typu 1 kódovaný génom BACE1.  $\gamma$ -sekretáza sa zúčastňuje proteolytického štiepenia C-koncov  $A\beta$  molekúl v oblasti  $\beta$ -APP (obr. 1).



Obr. 1.  $\beta$ -amyloidný prekurzorový proteín ( $\beta$ -APP)<sup>5)</sup>

Na obrázku 1 je znázornený transmembránový proteín typu 1 zložený z 695-770 aminokyselín, ktoré sú kódované génmi na chromozóme 21. Oblasť molekuly vložená do membrány je zobrazená šedou. N-koniec z  $\beta$ -APP je vylučovaný z buniek na základe štiepenia v  $\alpha$ - alebo  $\beta$ - mieste. Metaloproteázy ako napríklad ADAM-10 (z angl. A disintegrin and metalloprotease) alebo TACE (z angl. TNF  $\alpha$ -converting enzyme) sa štiepia na  $\alpha$ -strane. Metaloproteázy sú proteolytické enzýmy obsahujúce kov. BACE sa zúčastňuje štiepenia na  $\beta$ -strane. Produkty na C-konci, ktoré obsahujú celý alebo časť  $A\beta$  peptidu a cytoplazmatický chvost, zostávajú v membráne a sú substrátmi pre  $\gamma$ -sekretázu. Hlavným miestom štiepenia sa zdá byť Val40, no boli objavené aj ďalšie strihy po Ala42, Thr43, Val39 a Leu49. Jedenásť odlišných mutácií nachádzajúcich sa blízko  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -štiepiacich miestach spôsobujú patogenézu<sup>5)</sup>.

$\gamma$ -sekretáza je tvorená najmenej štyrmi proteínmi: presenilín (PS), nikastrín, anterior pharynx (Aph-1) a presenilín enhancer (Pen-2). Presenilíny majú patofyziologický význam, pretože viac ako 150 autozomálnych dominantných mutácií je známych v týchto proteínoch, z ktorých všetky spôsobujú rané štádium AD. Tieto mutácie majú za následok zvý-



Obr. 2. Proces štiepenia  $\beta$ -APP (vľavo),  $\gamma$ -sekretázový komplex (vpravo)<sup>8)</sup>

šenú produkciu  $A\beta_{1-42}$ . Inhibícia presenilínu pomocou enzymatického komplexu  $\gamma$ -sekretázy sa zdá byť vhodnou stratégiou proti hromadeniu  $A\beta$  v mozgu u pacientov s AD<sup>6)</sup>. Avšak  $\gamma$ -sekretáza štiepi aj mnohé iné dôležité substráty než len  $\beta$ -APP, z čoho vyplývajú aj možné nežiaduce účinky inhibitorov  $\gamma$ -sekretázy<sup>7)</sup>.

Obrázok vľavo predstavuje proces štiepenia  $\beta$ -APP amyloidnou cestou.  $\beta$ -sekretáza (BACE) uvoľňuje rozpustný proteínový fragment APPs (z angl. soluble APP) a následne  $\gamma$ -sekretáza uvoľňuje amyloidné peptidy  $A\beta_{40}$  a  $A\beta_{42}$ . Na obrázku vpravo sú znázornené zložky  $\gamma$ -sekretázového komplexu<sup>8)</sup>.

### Zloženie $\gamma$ -sekretázového komplexu

#### Presenilín

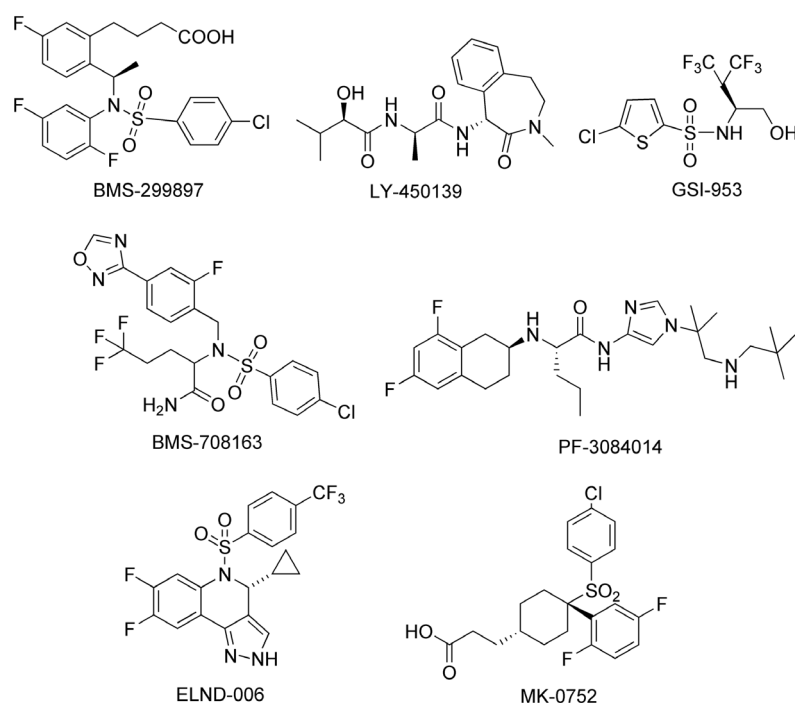
Presenilín-1 (PS-1) a presenilín-2 (PS-2) obsahujú katalytickú doménu. Ide o 476- a 448-aminokyselinové proteíny, ktoré pozostávajú z 9 transmembránových domén (TMDs). Tieto domény sú endoproteolyticky štiepené na  $A\beta$  molekuly z  $\beta$ -APP, ktoré majú N- a C-konce. Každý z týchto koncov obsahuje aspartátové aktívne miesto. Štiepenie nastáva v cytoplazme medzi TMD6 a TMD7 vnútri krátkej hydrofóbnej domény, ktorá sa nachádza v membráne. Táto endoproteolýza predstavuje autoproteolytický jav<sup>9)</sup>.

#### Nikastrín

Nikastrín bol objavený biochemicky afinitnou chromatografiou ako hlavný PS-interagujúci proteín. Je to 709-aminokyselinový glykoproteín typu 1 s veľkou ektodoménou, ktorá môže pôsobiť ako substrátový receptor  $\gamma$ -sekretázy. Existuje hypotéza, že voľný N-koniec substrátu  $\gamma$ -sekretázy sa ako prvý viaže na ektodoménu nikastrínu. Potom interaguje so spojovacím miestom presenilínu a premiestňuje sa do aktívneho miesta PS, kde je štiepený<sup>9)</sup>.

#### Aph-1 a Pen-2

Aph-1 proteíny majú 7 TMDs s N- a C-koncami smerom k lumeniu a cytozolu. Jeho úloha v aktivite  $\gamma$ -sekretázy nie je celkom jasná, ale je to najstabilnejšia zložka komplexu a mohla by s najväčšou pravdepodobnosťou slúžiť ako počiatok pre zhromaždenie tohto enzýmu.

Obr. 3. Inhibitory  $\gamma$ -sekretázy

U ľudí existujú dva Aph-1 gény, Aph-1a a Aph-1b<sup>10</sup>). Pri génovej duplikácii hľadavcov z Aph-1b bol stanovený tretí gén, a to Aph-1c, ktorý vykazuje 96% podobnosť s Aph-1b na úrovni nukleotidov.

Pen-2 je najmenší membránový proteín  $\gamma$ -sekretázy s dvoma TMDs. Jeho úlohou je stabilizácia PS v  $\gamma$ -sekretázovom komplexe<sup>9</sup>).

#### Inhibitory $\gamma$ -sekretázy v klinickom vývoji

$\gamma$ -sekretáza je racionálny cieľ pre liečbu AD, lebo reguluje posledný krok pri vzniku a uvoľňovaní  $A\beta$ . Doteraz bolo objavených niekoľko účinných inhibitorov tohto proteolytického komplexu. Štúdiá u transgénnych a netransgénnych zvierat naznačili, že inhibitory  $\gamma$ -sekretázy podané orálne alebo parenterálne sú schopné znižovať mozgovú hladinu  $A\beta$ <sup>11</sup>).

Šesť zlúčenín (LY-450139, MK-0752, BMS-708163, PF-3084014, GSI-953 a ELND-006), ktoré sa nachádzajú v rôznych štádiách klinického testovania, je aktívne študovaných na ľuďoch s AD. Je charakterizovaný ich farmakodynamický profil, nielen podľa merania hladiny  $A\beta$  v plazme a CSF v čase po podaní, ale aj stanovením účinnosti týchto zlúčenín na  $A\beta$ <sup>9</sup>).

Historicky prvým inhibítorom  $\gamma$ -sekretázy, ktorý sa dostal do klinického testovania bol BMS-299897. Táto zlúčenina bola pripravená v biofarmaceutickej spoločnosti Bristol-Myers Squibb. Testovanie na ľuďoch začalo v roku 2001, ale klinické údaje neboli nikdy úplne publikované. Kvôli dlhotrvajúcim nedostatkom informácií v klinickom vývoji bolo testovanie ukončené<sup>12</sup>).

Najmenej 6 ďalších inhibitorov  $\gamma$ -sekretázy sa dostalo do klinického testovania. Ide o zlúčeniny s označením LY-450139, MK-0752, BMS-708163, PF-3084014, GSI-953 a ELND-006. Iba pre zlúčeninu LY-450139 boli klinické údaje úplne publikované (obr. 3)<sup>9</sup>).

#### LY-450139 (Semagacestat)

Benzoazepinónový derivát LY-450139 je inhibítor  $\gamma$ -sekretázy vyvinutý v spoločnosti Eli-Lilly. Je trojnásobne selektívny pri inhibícii štiepenia APP s ohľadom na Notch štiepenie (APP:  $IC_{50} = 15$  nM, Notch:  $EC_{50} = 49$  nM).  $IC_{50}$  je koncentrácia inhibítora, pri ktorej je inhibovaný 50 % enzýmu.  $EC_{50}$  označuje strednú efektívnu koncentráciu potrebnú na dosiahnutie 50% efektu. Ide o najlepšie zdokumentovaný inhibítor  $\gamma$ -sekretázy, ktorý dosiahol klinické testovanie (fáza I, II, III)<sup>13</sup>).

Pri testovaní na zvieratách bol u LY-450139 zistený vplyv na hladinu  $A\beta$  v mozgu, CSF a plazme. Dobre pozorovaný bol predovšetkým u transgénnych a netransgénnych myši, morčiat a psoch. Liečivo však zlyhalo pri transgénnych myšiach. Bola u nich zistená neurotoxicita. K dispozícii nie sú ani žiadne údaje o behaviorálnych pochodoch u zvierat pri použití LY-450139<sup>14</sup>).

LY-450139 efektívne znižuje hladinu  $A\beta$  v CSF u zdravých ľudí. Tento inhibítor dosiahol fázu III klinického testovania. Kvôli zhoršeným kognitívnym funkciám a zvyšovaniu výskytu rakoviny kože u ľudí trpiacich AD bolo testovanie prerušené<sup>15</sup>).

#### MK-0752

Spoločnosť Merck vyvinula inhibítor  $\gamma$ -sekretázy nesúci označenie MK-0752, ktorý je neselektívny k APP a Notch. Toto liečivo znižovalo hladinu  $A\beta_{1-40}$  v CSF u zdravých dobrovoľníkov. Nevýhodou bolo inhibovanie Notch štiepenia a značná gastrointestinálna toxicita. Tento inhibítor dosiahol fázu I klinického testovania, no testovanie na AD bolo pozastavené<sup>16</sup>).

#### BMS-708163

Benzenový sulfonamid BMS-708163, v ktorom je oxidazolybenzyllová skupina pripojená k sulfonamidovému dusíku, je účinný inhibítor  $\gamma$ -sekretázy vyvinutý v Bristol-

Myers Squibb. *In vitro* testovania ukázali, že liečivo má 193-násobnú selektivitu k Notch štiepeniu ( $A\beta_{1-40}$ :  $IC_{50} = 0,3$  nM a Notch:  $EC_{50} = 58$  nM). Štúdie u potkanov ukázali znižovanie amyloidu  $A\beta_{1-40}$  v mozgu a CSF bez Notch-súvisiacej gastrointestinálnej toxicity. Štúdie u psov preukázali znižovanie  $A\beta_{1-40}$  hladiny v mozgu a CSF. Po perorálnom podaní došlo k znižovaniu hladín  $A\beta$  o 75 % v CSF a 50 % v kortexe v priebehu 24 hodín. U zdravých dobrovoľníkov bolo pozorované znižovanie  $A\beta$  hladiny v CSF. V súvislosti s týmto inhibítorom je však nedostatok údajov o ukladaní  $A\beta$  plakov v mozgu u transgénnych myší, ako aj o ich behaviorálnych pochodoch. Ľudia trpiaci AD vykazovali zlú toleranciu na liečivo obsahujúce túto látku. BMS-708163 dosiahol fázu I-klinického testovania, v súčasnosti prebieha II. fáza<sup>17)</sup>.

#### PF-3084014

Nový aminotetraľínový derivát PF-3084014 vyvinutý firmou Pfizer je účinný inhibítor  $\gamma$ -sekretázy, bez vplyvu na Notch. *In vitro* je to nekompetitívny, reverzibilný inhibítor  $\gamma$ -sekretázy s  $IC_{50} = 6,2$  nM<sup>18)</sup>. V tkanivových kultúrach je hodnota  $IC_{50} = 1915$  nM a javí sa ako slabý inhibítor voči Notch. Výhodou je dobrý prienik cez hematoencefalickú bariéru, dlhotrvajúci efekt na redukcii hladiny  $A\beta$  u zvierat a žiadny rebound fenomén pre plazmatický amyloid  $A\beta$ . Podobne ako pri BSM-708163 je aj pre tento inhibítor nedostatok údajov o ukladaní  $A\beta$  plakov v mozgu u transgénnych myší, ako aj o ich behaviorálnych pochodoch. Testovanie tohto inhibítora na AD bolo tiež prerušené.

#### GSI-953 (Begacestat)

Tiofénový sulfonamid je účinný inhibítor  $\gamma$ -sekretázy vyvinutý firmou WEYTH. Inhibuje produkciu  $A\beta$  a jeho inhibičná koncentračná účinnosť sa prejavuje *in vitro* ( $IC_{50} = 8$  nM) aj *in vivo* ( $A\beta_{1-42}$ :  $IC_{50} = 15$  nM)<sup>19)</sup>. Bunkové štúdie Notch štiepenia ukázali, že táto zlúčenina je 17-násobne selektívna pre inhibíciu štiepenia APP. (Notch  $EC_{50} = 208,5$  nM). Pri Tg2576 myšiach spôsobili vysoké dávky zníženie  $A\beta_{1-40}$  hladiny v mozgu (60% inhibícia), v CSF (90% inhibícia) a v plazme. Nižším dávkovaním sa tieto hladiny zredukovali len v mozgu a plazme. GSI-953 zlepšuje pamäť u transgénnych myší, no neznižuje  $A\beta_{1-40}$  hladinu v CSF u ľudí s AD. Toto liečivo je v druhej fáze klinického testovania.

#### ELND-006

Je to inhibítor  $\gamma$ -sekretázy vyrobený spoločnosťou Elan Pharmaceuticals. U bunkových a enzymatických štúdiách ukazuje ELND-006 selektivitu pre APP, inhibíciu APP a štiepenie Notch s  $IC_{50} = 0,34$  a  $5,3$  nM<sup>20)</sup>. Výhodou tejto látky je to, že je bez Notch vplyvu, má dobrú mozgovú priechodnosť a znižuje hladiny  $A\beta$  v mozgu u transgénnych myší. Nevýhodou je rebound fenomén v plazme u zvierat a nedostatok údajov o behaviorálnych pochodoch u AD modeloch zvierat. ELND-006 sa v súčasnosti nachádza v prvej fáze klinického testovania.

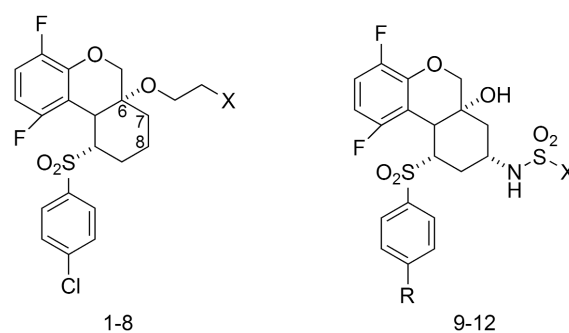
#### Vývoj ďalších potenciálne účinných inhibítorov $\gamma$ -sekretázy

K ďalším zaujímavým inhibítorom  $\gamma$ -sekretázy patria tricyklické sulfóny<sup>21)</sup>. Ich inhibičná aktivita bola skúma-

ná *in vitro* stanovením agregácie  $A\beta_{40}$  a niektoré deriváty boli vybrané pre *in vivo* testy na myšiach<sup>22, 23)</sup>. Štruktúry tricyklických sulfónov, ktoré vykazovali najlepšiu aktivitu, sú znázornené na obrázku 4 a ich príslušné hodnoty  $IC_{50}$  sú zhrnuté v tabuľke 1.

Pozoruhodné hodnoty  $IC_{50}$  vykazovali tricyklické sulfóny, ktoré mali naviazané substituenty v polohe C-6 alebo išlo o kombináciu hydroxy skupiny na uhlíku 6 a sulfonamidovej skupiny na uhlíku 8.

Z derivátov, ktoré mali naviazané substituenty v polohe C-6 boli najúčinnnejšie deriváty **1–8** s hodnotami  $IC_{50}$  v rozmedzí 8–50 nM. Pri porovnaní týchto analógov sa zistilo, že sulfonamidové analógy **4** a **5** boli 5-násobne menej aktívne než ich sulfónové analógy **1–3**. Aj aminoskupina má významnú úlohu pre aktivitu. Primárny amín **6** mal  $IC_{50} = 12$  nM, no sekundárny amín **7** a terciárny amín **8** boli 3-násobne menej aktívne.



Obr. 4. Tricyklické sulfóny ako inhibítory  $\gamma$ -sekretázy

Tab. 1. Deriváty tricyklických sulfónov a ich inhibičné aktivity<sup>21)</sup>

Derivát	X	R	IC50 (nM)
1	SO <sub>2</sub> Et	H	15
2	SO <sub>2</sub> iPr	H	8
3	SO <sub>2</sub> Me	H	9
4	SO <sub>2</sub> NHMe	H	37
5	SO <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>	H	50
6	NH <sub>2</sub>	H	12
7	NHMe	H	40
8	NMe <sub>2</sub>	H	31
9	CF <sub>3</sub>	Cl	21
10	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Cl	29
11	CF <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	23
12	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub>	Cl	212

Pri použití kombinácie hydroxy skupiny na uhlíku 6 a sulfonamidovej skupiny na uhlíku 8 bola pripravená séria tricyklických sulfónov, z ktorých 3 látky vykazovali hodnoty  $IC_{50}$  v nanomolárnej koncentrácii. Ide o deriváty **9** ( $IC_{50} = 21$  nM), **10** ( $IC_{50} = 29$  nM) a **11** ( $IC_{50} = 23$  nM). Zistilo sa, že nahradením cyklopropylsulfonamidu u látky **10** za cyklobutylsulfonamid u látky **12** dôjde k 7-násobnému poklesu inhibičnej aktivity.

Aj napriek dobrým hodnotám  $IC_{50}$  u analógov substitovaných v polohe C-6, tieto neboli testované *in vivo* na

Tab. 2. Hodnoty inhibičných aktivít pri *in vitro* a *in vivo* testovaní<sup>21)</sup>

Derivát	IC <sub>50</sub> (nM) na membráne	IC <sub>50</sub> (nM) na Aβ <sub>40</sub> , Aβ <sub>42</sub>	Aβ <sub>40</sub> redukcia v kortexe a plazme (%)
9	21	11, 33	33, 58
10	29	3, 9	71, 77
11	23	80, 51	48, 59

Tab. 4. *In vitro* a *in vivo* hodnotenie diamido-amino imidazolov<sup>28)</sup>

Derivát	R <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> (nM)	Aβ redukcia v kortexe a plazme (%)
21		1,2	32
22		0,9	43
23		1,1	50, 60

Tab. 3. Hodnoty IC<sub>50</sub> APP/Notch selektivita a metabolická stabilita derivátov 13–20<sup>24)</sup>

Derivát	R	R1	R2	R3	IC <sub>50</sub> (nM)	APP/Notch selektivita	% látky metabolicky oxidovanej
13	H	H	H	H	2	90	16,46
14		H	H	H	14	276	16,69
15		H	H	H	16	262	33,37
16		H	H	H	29	282	1,0
17		F	H	H	4	147	37,50
18		H	F	H	10	195	55,76
19		H	H	F	22	191	68,92
20		H	H	H	8	216	55,72

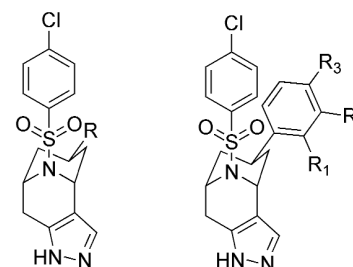
myšiach. Zaujímavá kombinácia hydroxy skupiny na C-6 a sulfonamidovej skupiny na C-8 poskytla deriváty, ktoré boli vybrané pre *in vivo* testovanie. Výsledky sú znázornené v tabuľke 2. Najlepšie výsledky vykazovala molekula **10**, ktorá inhibovala 77 % hladiny Aβ<sub>40</sub> v plazme a 71% hladiny Aβ<sub>40</sub> v kortexe 3 hodiny po orálnom aplikovaní myšiam (30 mg/kg) (tab. 2).

Ďalšiu skupinu nových inhibítorov γ-sekretázy predstavujú [3.3.1] bicyckické sulfonamidové pyrazoly<sup>24)</sup>. Na obrázku 5 sú znázornené bicyckické sulfonamidové pyrazoly, ktoré vykazujú vysokú účinnosť, dobrú APP/Notch selektivitu a sú metabolicky stabilné. Hodnoty IC<sub>50</sub>, APP/Notch selektivita aj metabolická stabilita sú znázornené v tabuľke 3.

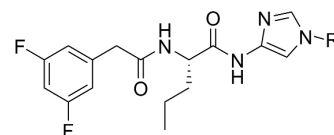
Jedným z derivátov, ktoré vykazujú vysokú *in vitro* účinnosť aj primeranú APP/Notch selektivitu je derivát **13**. V *in vivo* testoch u myší dokázal zredukovať 36 % hladiny Aβ<sub>40</sub> v kortexe<sup>25)</sup>. Testy *in vivo* s použitím potkaních a ľudských mikrozómov z pečene poukázali na metabolickú stabilitu tohto derivátu<sup>26)</sup>.

Zavedenie lipofilnej elektronakceptornej skupiny v para polohe sulfonamidu poskytlo 3 deriváty bicyckických pyrazolov (**14–16**)<sup>27)</sup>. Začlenenie fluóru na uhlík 6 fenylového jadra zohráva dôležitú úlohu pri aktivite resp. stabilite. Deriváty **17** a **18** majú vysoké hodnoty IC<sub>50</sub> aj dobrú metabolickú stabilitu, no mierny pokles APP/Notch selektivity. Derivát **19** je najlepšou kombináciou účinnosti, oxidačnej stability aj APP/Notch selektivity.

U látky **20**, pri ktorej bol do polohy 6 naviazaný heteroarylový substituent, bola zistená dobrá stabilita, účinnosť aj selektivita. Táto látka spolu s analógom **19** boli testované *in vivo* u myší. Zvieratám sa podávala perorál-



Obr. 5. Bicyckické sulfonamidové pyrazoly



Obr. 6. Diamido-amino imidazoly

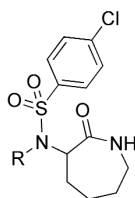
ne dávka 10 mg/kg. Po 3 hodinách sa u látky **19** zistila 21% redukcia Aβ<sub>40</sub> a u látky **20** 3% redukcia Aβ<sub>40</sub> v kortexe.

Do série ďalších potenciálne účinných inhibítorov γ-sekretázy patria diamido-amino imidazoly<sup>28)</sup>. DAPT (*N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester), aktívny inhibítor γ-sekretázy, je zaujímavý pre svoju dobrú inhibičnú aktivitu (0,02 μM) a nízku molekulovú hmotnosť<sup>29)</sup>. Na základe farmakokinetických vlastností sa však zistilo, že jeho *tert*-butyl esterová skupina je potenciálne nestabilná. Z tohto dôvodu boli pripravené nové deriváty DAPT, pri kto-

rých sa nahradila esterová skupina inými funkčnými skupinami. Ide o sériu inhibítorov, ktoré obsahujú  $\beta$ -amín na imidazole (obr. 6).

Tieto molekuly boli testované *in vitro* metódou na sledovanie ovplyvnenia hladiny  $A\beta$  a aj *in vivo* metódou na morčatách<sup>14, 30</sup>. Zo série pripravených derivátov mali najlepšiu účinnosť deriváty **21**, **22** a **23**. Najlepšie hodnoty sú spájané s tým, že substituenty naviazané na molekule majú rozvetvený reťazec. Pri *in vivo* testovaní na morčatách v priebehu 3 hodín bola u derivátu **21** zaznamenaná 32% redukcia  $A\beta_{40}$  a u pyrrolidinového derivátu **22** to bola 43% redukcia  $A\beta_{40}$  v mozgu. Pri naviazaní sekundárneho amínu mal najlepšiu hodnotu  $IC_{50}$  (1,1 nM) analóg **23**. Pri tomto analógu sa zistila 60% redukcia amyloidu v plazme a 50% v kortexe (tab. 4). *In vivo* štúdiá naznačili nutnosť ďalšej optimalizácie selektívneho profilu alebo distribučných vlastností na získanie terapeutického indexu.

Analógy amino-kaprolaktámu predstavujú ďalšiu skupinu potenciálne účinných inhibítorov  $\gamma$ -sekretázy<sup>31</sup>.



Obr. 7. Amino-kaprolaktámové inhibítory  $\gamma$ -sekretázy

Tab. 5. Hodnoty inhibičnej aktivity a APP/Notch selektivity derivátov 24–32<sup>32</sup>

Derivát	R	$IC_{50}$ (nM)	APP/Notch selektivita	Redukcia $A\beta$ (%)
24		1700	–	–
25		81	–	–
26		3	–	–
27		12	–	–
28		7	6	–
29		9	2	–
30		8	3	32
31		6	0,6	20
32		15	2	26

Tieto molekuly boli odvodené od amino-kaprolaktám-benzénsulfonamidu **24**, ktorý mal priaznivú hodnotu  $IC_{50}$  (1,7  $\mu$ M). Deriváty amino-kaprolaktámu, ktoré vykazovali priaznivé účinnosti, boli pripravené substitúciou benzylového kruhu u sulfonamidu **24** za inú funkčnú skupinu (obr. 7).

Najlepšie účinnosti dosiahli deriváty **25**, **26** a **27**. Kvôli priaznivým hodnotám  $IC_{50}$  boli pripravené aj analógy týchto troch derivátov. Substitúcia derivátu **25** poskytla analóg **28**, ktorý ukazoval najlepšiu kombináciu účinnosti a selektivity, ale zaznamenal oxidačnú metabolickú nestabilitu. Benzylamid **29** má najlepšiu účinnosť ( $IC_{50}$  = 9 nM) a APP/Notch selektivitu. Tri analógy odvodené z derivátu **27** vykazovali nízku nanomolárnu účinnosť (tab. 5). Išlo o analógy **30**, **31**, **32** a boli poskytnuté na *in vivo* testovanie aj napriek svojej relatívnej APP/Notch selektivitě.

V tabuľke 5 sú tiež zobrazené 3 inhibítory  $\gamma$ -sekretázy, ktoré boli testované *in vivo* pre redukciu  $A\beta_{40}$  v mozgu u myši. U všetkých troch inhibítoroch bola pozorovaná redukcia hladiny  $A\beta_{40}$ .

Táto séria inhibítorov  $\gamma$ -sekretáz dokázala, že okrem toho, že ide o látky, ktoré neovplyvňujú Notch, tak dokážu redukovať  $A\beta$  v mozgu<sup>32</sup>.

## Záver

$A\beta$  je vytváraný proteolytickými pochodmi z transmembránového peptidu APP. Tento peptid môže byť štiepený dvoma proteázami označovanými ako  $\alpha$ - a  $\beta$ -sekretázy. Dominantnú úlohu v priebehu AD preberá predovšetkým  $\beta$ -sekretáza. Takéto štiepenie na N-konci vedie k tvorbe rozpustného fragmentu (sAPP $\beta$ ) a produktu spojeného s membránou, C-koncového fragmentu, ktorý následne podlieha hydrolyze za účasti  $\gamma$ -sekretázy vytvárajúcej  $A\beta_{40}$  a  $A\beta_{42}$ . Účast oboch enzýmov je pre patologický priebeh AD špecifická a vedie tak k tvorbe  $\beta$ -amyloidných plakov. Z týchto dôvodov je venované značné úsilie k nájdeniu inhibítorov  $\beta$ - s  $\gamma$ -sekretázy.

$\gamma$ -sekretáza je nukleoproteínový komplex zložený zo 4 častí, presenilín (PS)-1 a (PS)-2 sa zdajú byť zodpovedné za enzymatické pochody zúčastňujúce sa štiepenia APP. Z predstavených látok dosiahlo 6 klinického testovania (LY-450139, MK-0752, BMS-708163, PF-3084014, GSI-953 a ELND-006) a ďalšie látky ako napr. amino-kaprolaktámové deriváty alebo bicycké sulfónové pyrazoly sľubujú zaujímavý terapeutický profil. Napriek týmto faktom sa doteraz nepodarilo žiadny z inhibítorov  $\gamma$ -sekretázy zaviesť do klinickej praxe pre boj s AD.

Konflikt záujmu: žiadny.

## Literatúra

1. Alzheimer's Association. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2011; 7, 208–244.
2. Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K. H.: A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 2006; 440, 352–357.
3. Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A.,

- Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., Selkoe, D. J.: Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 2008; 14, 837–842.
4. Gordon, W. R., Arnett, K. L., Blacklow, S. C.: The molecular logic of Notch signaling- a structural and biochemical perspective. *J. Cell. Sci.* 2008; 121, 3109–3119.
  5. Roberts S. B.:  $\gamma$ -Secretase inhibitors and Alzheimer's disease. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 2002; 54, 1579–1588.
  6. Imbimbo, B. P.: Therapeutic potential of  $\gamma$ -secretase inhibitors and modulators. *Curr. Top. Med. Chem.* 2008; 8, 54–61.
  7. Lleo, A.: Activity of  $\gamma$ -secretase on substrates other than APP. *Curr. Top. Med. Chem.* 2008; 8, 9–16.
  8. Tolia, A., De Strooper, B.: Structure and function of  $\gamma$ -secretase. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2009; 20, 211–218.
  9. Imbimbo, B. P., Giarda, G. A. M.:  $\gamma$ -Secretase Inhibitors and Modulators for the Treatment of Alzheimer's Disease: Disappointments and Hopes. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011; 11, 1555–1570.
  10. Serneels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horre, K., Van Houtvin, T., Esselmann, H., Paul, S., Schafer, M. K., Berezovska, O., Hyman, B. T., Sprangers, B., Scot, R., Moons, L., Jucker, M., Yang, Z., May, P. C., Karran, E., Wilfang, J., D'hooge, R., De Strooper, B.:  $\gamma$ -Secretase heterogeneity in the A $\beta$ 1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science.* 2009; 324, 639–642.
  11. Guardia-laquarta, C., Pera, M., Lleo, A.: Gamma-secretase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Curr. Drug. Targets.* 2010; 11, 506–517.
  12. Zheng, M., Wang, J., Lubinski, J., Flint, O. P., Krishna, R., Yao, M., Pursley, J. M., Thakur, A., Boulton, D. W., Santone, K. S., Barten, D. M., Anderson, J. J., Felsenstein, K. M., Hansel, S. B.: Studies on the pharmacokinetics and metabolism of a gamma-secretase inhibitor BMS-299897, and exploratory investigation of CYP enzyme induction. *Xenobiotica.* 2009; 39, 544–555.
  13. Henley, D. B., May, P. C., Dean, R. A., Siemers, E. R.: Development of semagacestat (LY450139), a functional gamma-secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacol.* 2009; 10, 1657–1664.
  14. Lanz, T. A., Karmilowicz, M. J., Wood, K. M., Pozdnyakov, N., Du, P., Piotrowski, M. A., Brown, T. M., Nolan, C. E., Richter, K. E., Finley, J. E., Fei, Q., Ebbinghaus, C. F., Chen, Y. L., Spracklin, D. K., Tate, B., Geoghegan, K. F., Lau, L. F., Auperin, D. D., Schachter, J. B.: Concentration-dependent modulation of A $\beta$  *in vivo* and *in vitro* using the  $\gamma$ -secretase inhibitor, LY-450139. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 319, 924–933.
  15. Imbimbo, B. P., Peretto, I.: Semagacestat, a gamma-secretase inhibitor for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Investig. D.* 2009; 10, 721–730.
  16. Bai, F., Tagen, M., Colotta, C., Miller, L., Fouladi, M., Stewart, C. F.: Determination of the  $\gamma$ -secretase inhibitor MK-0752 in human plasma by online extraction and electrospray tandem mass spectrometry (HTLC-ESI-MS/MS). *J. Chromatogr. B.* 2010; 878, 2348–2352.
  17. Gillman, K. W., Starrett, J. E., Parker, M. F., Xie, K., Bronson, J. J., Marcin, L. R., McElhone, K. E., Bergstrom, C. P., Mate, R. A., Williams, R., Meredith Jr., J. E., Burton, C. R., Barten, D. M., Toyn, J. H., Roberts, S. B., Lents, K. A., Houston, J. G., Zaczek, R., Albright, C. F., Decicco, C. P., Macor, J. E., Olson, R. E.: Discovery and evaluation of BMS-708163, a potent, selective and orally bioavailable  $\gamma$ -secretase inhibitor. *Med. Chem. Lett.* 2010; 1, 120–124.
  18. Lanz, T. A., Wood, K. M., Richter, K. E., Nolan, C. E., Becker, S. L., Pozdnyakov, N., Martin, B. A., Du, P., Oborski, C. E., Wood, D. E., Brown, T. M., Finley, J. E., Sokolowski, S. A., Hicks, C. D., Coffman, K. J., Geoghegan, K. F., Brodney, M. A., Liston, D., Tate, B.: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the  $\gamma$ -secretase inhibitor PF-3084014. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010; 334, 269–277.
  19. Martone, R. L., Zhou, H., Atchison, K., Comery, T., Xu, J. Z., Huang, X., Gong, X., Jin, M., Kreft, A., Harrison, B., Mayer, S. C., Aschmies, S., Gonzales, C., Zaleska, M. M., Riddell, D. R., Wagner, E., Lu, P., Sun, S. C., Sonnenberg-Reines, J., Oganessian, A., Adkins, K., Leach, M. W., Clarke, D. W., Huryn, d., Abou-Gharbia, M., Magolda, R., Bard, J., Frick, G., Raje, S., Forlow, S. B., Balliet, C., Burczynski, M. E., Reinhart, P. H., Wan, H. I., Pangalos, M. N., Jacobsen, J. S.: Begacestat (GSI-953): a novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein  $\gamma$ -secretase for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009; 331, 598–608.
  20. Quinn, K., Gullapalli, R. P., Merisko-Liversidge, E., Goldbach, E., Wong, A., Liversidge, G. G., Hoffman, W., Sauer, J. M., Bullock, J., Tonn, G.: A formulation strategy for gamma secretase inhibitor ELND006, a BCS class II compound: Development of a nanosuspension formulation with improved oral bioavailability and reduced food effects in dogs. *J. Pharmacol. Sci.* 2012; 101, 1462–1474.
  21. Su, J., Tang, H., McKittrick, B. A., Xu, R., Clader, J. W., Greenlee, W. J., Hyde, L., Zhang, L.: Synthesis and SAR study of tricyclic sulfones as  $\gamma$ -secretase inhibitors: C-6 and C-8 positions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21, 3447–3451.
  22. Zhang, L., Song, L., Terracina, G., Liu, Y., Pramanik, B., Parker, E.: Biochemical characterization of the gamma-secretase activity that produces beta-amyloid peptides. *Biochemistry.* 2001; 40, 5049–5055.
  23. Hyde, L. A., McHugh, N. A., Chen, J., Zhang, Q., Manfra, D., Nomeir, A. A., Josien, H., Bara, T., Clader, J. W., Zhang, L., Parker, E. M., Higgins, G. A.: Studies to investigate the *in vivo* therapeutic window of the gamma-secretase inhibitor N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide (LY411,575) in the CRND8 mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 319, 1133–1143.
  24. Aubele, D. L., Truong, A. P., Dressen, D. B., Probst, G. D., Bowers, S., Mattson, M. N., Semko, Ch. M., Sun, M., Garofalo, A. W., Konradi, A. W., Sham, H. L., Zmolek, W., Wong, K., Goldbach, E., Quinn, K. P., Sauer, J.-M., Brigham, E. F., Wallace, W., Nguyen, L., Bova, M. P., Hemphill, S. S., Basi, G.: Design, synthesis and structure-activity relationship of novel [3.3.1] bicyclic sulfonamide-pyrazoles as potent  $\gamma$ -secretase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21, 5791–5794.
  25. Zhao, B., Yu, M., Neitzel, M., Marugg, J., Jagodzinski, J., Lee, M., Hu, K., Schenk, D., Yednock, T., Basi, G.: Identification of gamma-secretase inhibitor potency determinants on presenilin. *J. Biol. Chem.* 2008; 283, 2927–2938.
  26. Truong, A. P., Aubele, D. L., Probst, G. D., Neitzel, M. L., Semko, C. M., Bowers, S., Dressen, D., Hom, R. K., Konradi, A. W., Sham, H. L., Garofalo, A. W., Keim, P. S., Wu, J., Dappen, M. S., Wong, K., Goldbach, E., Quinn, K. P., Sauer, J. -M., Brigham, E. F., Wallace, W., Nguyen, L., Hemphill, S. S., Bova, M. P., Basi, G.: Design, synthesis, and structure-activity relationship of novel orally efficacious pyrazole/sulfonamide based dihydroquinoline gamma-secretase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009; 19, 4920–4923.
  27. Ye, X. M., Konradi, A. W., Smith, J., Aubele, D. L., Garofalo, A. W., Marugg, J., Neitzel, M. L., Semko, C. M., Sham, H. L., Sun, M., Truong, A. P., Wu, J., Zhang, H., Goldbach, E., Sauer, J.-M., Brigham, E. F., Bova, M., Basi, G. S.: Discovery of a novel sulfonamide-pyrazolopiperidine series as potent and efficacious gamma-secretase inhibitors (Part II). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20, 3502–3506.
  28. Brodney, M. A., Auperin, D. D., Becker, S. L., Bronk, B. S., Brown, T. M., Coffman, K. J., Finley, J. E., Hicks, C. D., Karmilowicz, M. J., Lanz, T. A., Liston, D., Liu, X., Martin, B. -A., Nelson, R. B., Nolan, Ch. E., Oborski, Ch. E., Parker, Ch. P., Richter, K. E. G., Pozdnyakov, N., Sahagan, B. G., Schachter, J. B., Sokolowski, Sh. A., Tate, B., Van Deusen, J. W., Wood, L. E., Wood, K. M.: Diamide amino-imidazoles: A novel series of  $\gamma$ -secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21, 2631–2636.
  29. May, P. C., Altstiel, L. D., Bender, M. H., Boggs, L. N., Britton, T. C., Clemens, J. C., Czilli, D. L., Dieckman-McGinty, D. K., Droste, J. J., Fuson, K. S., Gitter, B. D., Hyslop, P. A., Johnstone, E. M., Li, W. Y., Little, S. P., Mabry, T. E., Miller, F. D., Ni, B., Nissen, J. S., Porter, W. J., Potts, B. D., Reel, J. K., Stephenson, D., Su, Y., Shipley, L. A., Whitesitt, C. A., Yin, T., Audia, J. E.: Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* 2001; 76, 173–181.
  30. Lanz, T. A., Salatto, C. T., Semproni, A. R., Marconi, M., Brown, T. M., Richter, K. E., Schmidt, K., Nelson, F. R., Schachter, J. B.: Peripheral elevation of IGF-1 fails to alter A $\beta$  clearance in multiple *in vivo* models. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 75, 1093–1103.

31. Thompson, L. A., Liauw, A. Y., Ramanjulu, M. M., Kasireddy-Polam, P., Mercer, S. E., Maduskuie, T. P., Glicksman, M., Roach, A. H., Meredith, J. E., Liu, R. -Q., Combs, A. P., Higaki, J. N., Cordell, B., Seiffert, D., Zaczek, R. C., Robertson, D. W., Olson, R. E.: Synthesis and evaluation of succinoyl-caprolactam gamma-secretase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 2357–2363.
32. Neitzel, M. L., Aubele, D. L., Marugg, J. L., Jagodzinski, J. J., Konradi, A. W., Pleiss, M. A., Szoke, B., Zmolek, W., Goldbach, E., Quinn, K. P., Sauer, J. -M., Brigham E. F., Wallace, W., Bova, M. P., Hemphill, S., Basi, G.: Amino-caprolactam  $\gamma$ -secretase inhibitors showing potential for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21, 3715–3720.

## Z ČINNOSTI FARMACEUTICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

### ● Pod ochranou sv. Dymphy – LIV. sympozium z historie farmacie a veterinární medicíny

Jarní setkání historiků farmacie, zvěrolékařství a medicíny, konané 4. dubna 2012 v sále divadla Za plotem v areálu Psychiatrické léčebny Bohnice v Praze 8 bylo věnováno oslavě životních jubileí osobností české farmaceutické historiografie – RNDr. Zdeňka Hanzlíčka a RNDr. Pavla Drábka. Na organizaci se podílely Sekce dějin farmacie České farmaceutické společnosti (ČFS) a Společnosti pro dějiny věd a techniky, České farmaceutické muzeum, Česká lékárnická komora, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno a Psychiatrická léčebna Bohnice.

Po zahájení sympozia a zdravicích ředitele Psychiatrické léčebny Bohnice M. Hollého, místopředsedy výboru ČFS P. Grodzy a viceprezidenta České lékárnické komory S. Havlíčka zazněla laudatia obou oslavenců (P. Drábek a M. Lisá). Poděkování za Státní ústav pro

kontrolu léčiv se ujala O. Hanzlíčková. První část programu uzavřel milým příspěvkem a blahopřáním J. Solich. Odbornou část programu otevřela H. Richtarová, která se věnovala životu svaté Dymphy, patronky (nejen) duševně nemocných. L. Nováček vystoupil s přednáškou Farmacie v Praze a Brně, J. Květina přítomně seznámil s publikací Farmakologické curriculum na území Čech, Moravy a Slezska. Příspěvek E. Baranyiové Zvířata a Freudovo kanapíčko byl zaměřen na behaviorální poruchy zvířat a vývoj jejich léčby. Vliv pravděpodobného psychického onemocnění na tvorbu sochaře F. X. Messerschmidta ve své práci analyzoval M. Maršálek. Osobě sv. Dymphy a dějinám psychiatrické péče se věnoval také J. Pomykacz. Přednáškové odpoledne uzavřel K. Černý příspěvkem Farmakoterapie v evropské lékařské literatuře o moru v období 1480–1730.

Program završila exkurze areálem a některými odděleními Psychiatrické léčebny Bohnice pod vedením Mgr. Jana Pomykacze, kterému také za organizaci sympozia patří zvláštní poděkování. Příští, 55. sympozium, se uskuteční 21. listopadu 2012 v prostorách VFU Brno.

Jan Babica