Review Article

การพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีครีเทสเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคอัลไซม์เมอร์

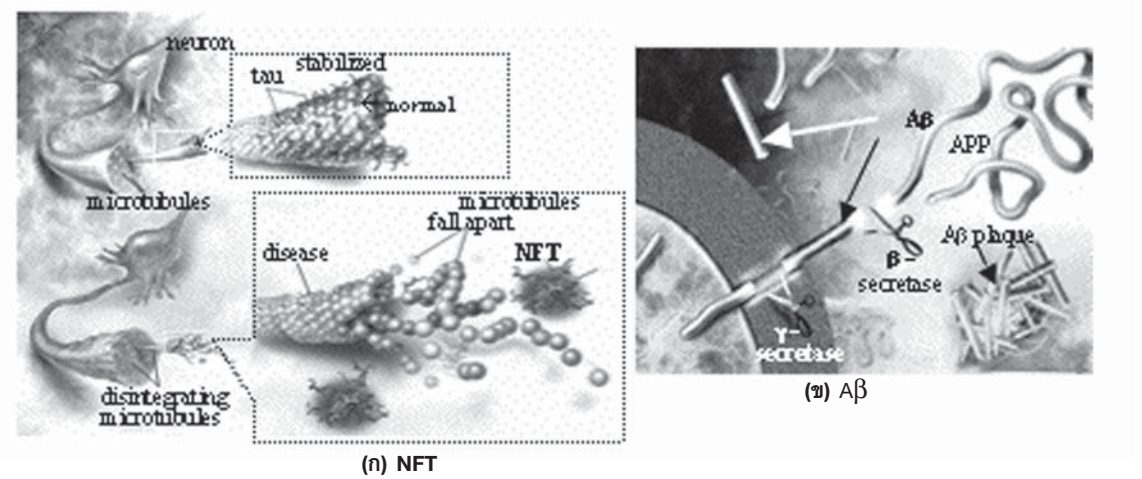
Development of β-secretase Inhibitor as Drug for Alzheimer's Disease

โอภา วัชระคุปต์[1]
Opa Vajragupta[1]

[1]ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

โรคอัลไซม์เมอร์ (Alzheimer's disease, AD) อัลไซม์เมอร์เป็นโรคที่สมองมีความผิดปกติและเป็นสาเหตุสำคัญของโรคสมองเสื่อมในผู้สูงอายุ จำนวนผู้ป่วยโรคอัลไซม์เมอร์ทั่วโลกมีประมาณ 24 ล้านคน และคาดว่าจะเพิ่มมากขึ้นถึง 81 ล้านคนในปี ค.ศ. 2040 อาการของโรคสมองเสื่อมคือมีความจำเสื่อม และการไม่รู้หน้าที่ทำให้ไม่สามารถดำเนินกิจวัตรประจำวันได้ สาเหตุของการเกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด แต่กลไกของการเกิดโรคจากการศึกษาพบว่ามีโปรตีนสองชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค คือ โปรตีนเบต้าแอมีลอยด์ (beta-amyloid, Aβ) และโปรตีน tau (Citron, 2004; Higuchi et al., 2005) การเกิดโรคสมองเสื่อมเกิดจากการที่เซลล์ประสาทในสมองถูกทำลายอันเนื่องมาจาก (ก) การสะสมการรวมตัวของโปรตีนเบต้าแอมีลอยด์เป็นแผ่นของเส้นใยไฟเบอร์ที่ไม่ละลายเรียกว่า '*Aβ plaques*' ในเซลล์ประสาทหรือในผนังของหลอดเลือดในสมอง ร่วมกับ (ข) การมีการสะสมของกลุ่มเส้นใยของเส้นประสาท (neurofibrillary tangle, NFT) ที่เซลล์ประสาท อันเนื่องจากโปรตีน tau ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไป (รูปที่ 1) ทำให้เซลล์ประสาทในสมองไม่สามารถทำงานสื่อประสาท (Best et al., 2005; 2006; 2007) ร่วมกับมีการสร้างอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบทำให้เกิดการทำลายเซลล์ในสมอง เซลล์ประสาทตาย (Mandel et al., 2005) การที่เซลล์ในสมองถูกทำลายมีผลให้มีการผลิตสารสื่อประสาทที่สำคัญลดลง อันได้แก่ acetylcholine และ dopamine เป็นต้น ปัจจุบันยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซม์เมอร์ ได้แก่ ยาในกลุ่มที่มีกลไกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ทำให้เพิ่มปริมาณ acetylcholine และ ยาในกลุ่ม NMDA (N-methyl-D-aspartate) antagonist ซึ่งลดการกระตุ้นและทำลายเซลล์ประสาท ซึ่งยาทั้ง 2 กลุ่มช่วยบรรเทาอาการของโรคเท่านั้นและมีอาการข้างเคียงสูง (Rojo et al., 2006) ดังนั้นการยับยั้งการเกิด Aβ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคจึงเป็นแนวทางในการพัฒนายาเพื่อรักษาโรคอัลไซม์เมอร์ในปัจจุบัน

*ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้: โอภา วัชระคุปต์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โทรศัพท์ 02-6448677 ต่อ 5402 โทรสาร 02-6448695,
email: pyovj@mahidol.ac.th



(ก) NFT **(ข)** Aβ

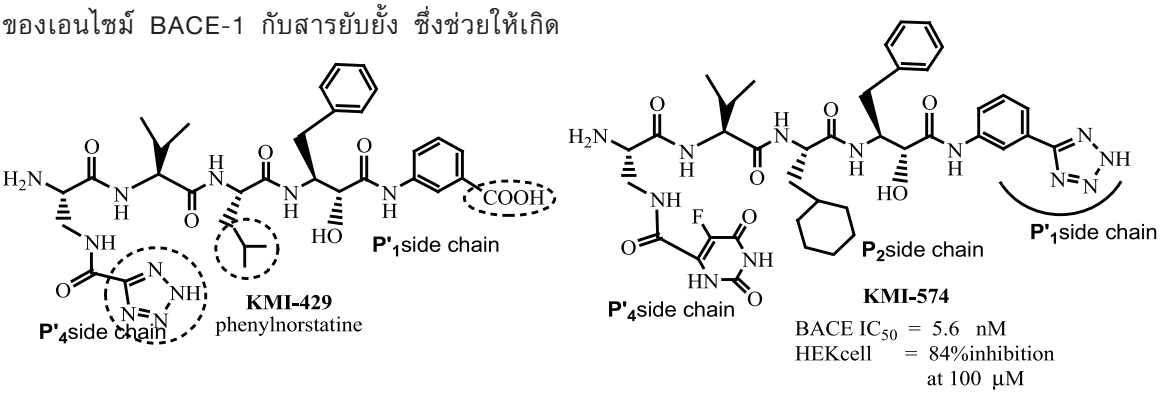
รูปที่ 1 สาเหตุของการเกิดโรคสมองเสื่อม (ก) โปรตีนเบต้าแอมีลอยด์ (Aβ) ที่เกิดจากการที่โปรตีนเอพีพี (amyloid precursor protein, APP) ถูกเอนไซม์ซีครีเทสย่อย และ Aβ มารวมกลุ่มกันเป็นเป็นแผ่นของเส้นใยไฟเบอร์ (ข) เกิดจากการที่โปรตีน tau ถูกเติมฟอสเฟตมากเกินไป ทำให้เกิดไมโครทูบบูลที่ผิดปกติแยกออกจากกัน โปรตีน tau จึงหลุดออกจากไมโครทูบบูลและพันรวมตัวกันเป็นแผ่น neurofibrillary tangles (NFT) ทำให้ไม่สามารถทำงานสื่อประสาทได้ (ดัดแปลงจาก http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Neurological/Alzheimer__Tau.htm)

โปรตีนเบต้าแอมีลอยด์ (Aβ) เกิดจากการที่โปรตีนต้นกำเนิด APP (amyloid precursor protein) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โพรทิเอส 2 ชนิด คือ เอนไซม์เบต้าซีครีเทส หรือ BACE-1 (β-site APP cleaving enzyme) และ เอนไซม์แกมมาซีครีเทส เอนไซม์ทั้ง 2 จะย่อยหรือตัดโปรตีน APP ได้เป็นโปรตีน Aβ หลายชนิด Aβ ที่เป็นตัวการที่มีพิษก่อให้เกิดโรคเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 40 และ 42 ตัว เรียกว่า โปรตีน $A\beta_{40}$ และโปรตีน $A\beta_{42}$ โดย APP จะถูก BACE-1 ย่อยก่อนได้เป็นโปรตีนที่มีส่วนปลายเป็นคาร์บอนประกอบด้วยกรดอะมิโน 99 ตัว (APP-CTF หรือ C99) หลังจากนั้นโปรตีน C99 นี้จะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาซีครีเทสที่ตำแหน่ง 711 หรือ 713 เกิดเป็นโปรตีน $A\beta_{40}$ และโปรตีน $A\beta_{42}$ (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค AD เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจึงเป็นชีวโมเลกุลเป้าหมาย (target) ในการพัฒนายารักษาโรค AD โดยการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ทำให้ไม่เกิดแผ่น Aβ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรค (Asai et al., 2006; Freskos et al., 2007a; Pietrak et al., 2005)

รูปที่ 2 ตำแหน่งที่โปรตีนต้นกำเนิด APP ถูกตัด (↑) โดยเอนไซม์เบต้าซีครีเทส (β) แกมมาซีครีเทส (γ) และ แอลฟาซีครีเทส (α) และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Aβ (จาก Findeis, 2007)

เอนไซม์เบต้าซีครีเทสหรือ BACE-1 มีชื่อเรียกอื่นๆ อีกคือ Asp2 และ memapsin 2 เอนไซม์ BACE-1 เป็นเอนไซม์ชนิด aspartyl protease BACE-1 มีความสำคัญเพราะขั้นตอนที่ APP ถูกย่อยโดย BACE-1 เป็นขั้นตอนที่กำหนดอัตราการเกิด Aβ หรือเป็น rate limiting step (Mancini et al., 2007; Maillard et al., 2007) เอนไซม์นี้ได้รับความสนใจจากนักวิจัยและบริษัทยา ในการหายาใหม่ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ถึงแม้ว่าจะมีการรายงานถึงสารยับยั้ง BACE-1 บ้างแล้ว แต่เมื่อนำทดสอบฤทธิ์โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง พบว่ายังมีฤทธิ์ในการยับยั้งไม่ดีพอ และเมื่อทดสอบในสัตว์ทดลองสารยับยั้ง BACE-1 จำนวนมากยังประสบปัญหายาไม่สามารถผ่านเข้าสู่สมอง หรือผ่านได้น้อย แต่เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานผลการเอ็กซ์เรย์ผลึกของเอนไซม์ BACE-1 กับสารยับยั้ง ซึ่งช่วยให้เกิดความเข้าใจถึงการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารยับยั้งขนาดเล็กและเอนไซม์ ส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการพัฒนายาโดยเฉพาะการออกแบบยาโดยใช้เป้าหมายยาเป็นหลัก (target based drug design) การออกแบบพัฒนาสารยับยั้ง BACE-1 เพื่อใช้เป็นยารักษาโรค AD ที่สำคัญมีดังนี้คือ

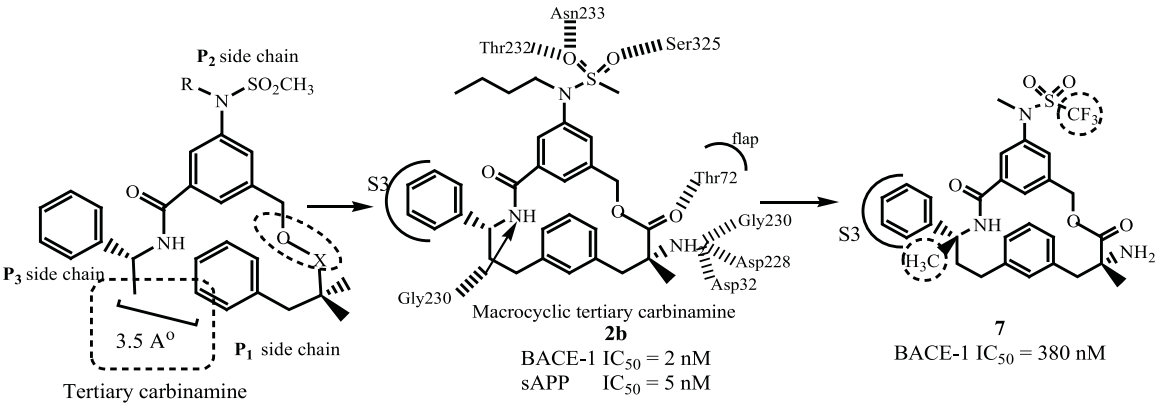
(ก) การออกแบบสารให้มีรูปร่างคล้ายคลึงกับซับสเตรต (transition state analog) ขณะที่เปลี่ยนเป็น C99 บริเวณที่ถูก BACE-1 ย่อยคือบริเวณ P4 - P'_4 (EVKM*DAEF) กลุ่มนักวิจัยญี่ปุ่นได้ออกแบบสารต้นแบบเป็นสาร HMC (hydroxymethylcarbonyl) ที่มีกรดอะมิโนสังเคราะห์คือ phenyl norstatin (KMI-429) อยู่ในโครงสร้างและบริเวณ P'_1 และ P'_4 (รูปที่ 3) (Asai et al., 2006)



รูปที่ 3 การออกแบบสารยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีครีเทสให้มีลักษณะคล้ายคลึงกับซับสเตรตของเอนไซม์เบต้าซีครีเทสขณะกำลังถูกย่อยไปเป็น APP-CTF หรือ C99 ที่มีกรดอะมิโนสังเคราะห์คือ phenyl norstatin (KMI-429) และตำแหน่งที่มีการดัดแปลงโครงสร้าง (⋯) ไปเป็นสาร KMI-574 ที่มีฤทธิ์ดีขึ้น (วาดใหม่จาก Asai et al., 2006; Hamada et al., 2006)

สาร KMI-429 ยับยั้งการเกิด Aβ ทั้งชนิดที่ละลายและไม่ละลาย และลดการผ่านออกของ sAPPβ (soluble APP fragment ที่เกิดจาก BACE-1) ไปยังภายนอกเซลล์ ฤทธิ์ยับยั้ง BACE-1 ในเซลล์ HEK 293 sAPPβ ลดลง และเมื่อทดสอบกับหนูพบว่า KMI-429 เมื่อฉีดเข้าสมองสามารถลดปริมาณ sAPPβ และ CTFβ APP ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสทั้งในหนูธรรมดาและหนู Tg 2576 ที่ตัดต่อพันธุกรรม มีค่า IC_{50} = 42.8 nM (Asai et al., 2006) ปัจจุบันได้พัฒนายาต่อจนได้สาร KMI-574 ที่มีบริเวณ P'_1 และ P'_4 มีขนาดพอเหมาะจับกับเอนไซม์ได้แน่น ส่งผลให้มีฤทธิ์ยับยั้งแรงขึ้น โดยมีค่า IC_{50} = 5.6 nM (Hamada et al., 2006)

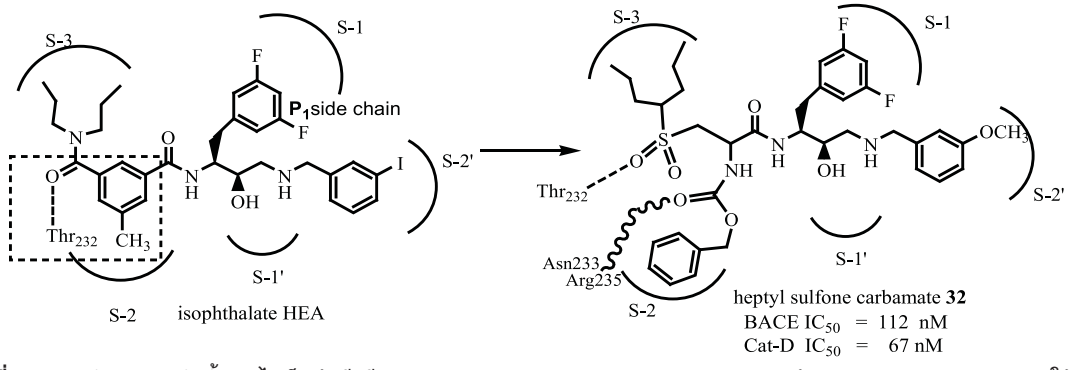
(ข) การออกแบบเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นวงขนาดใหญ่ สารต้นแบบคือ tertiary carbinamine ซึ่งมีโครงสร้างไม่คล้ายคลึงกับโครงสร้างของซับสเตรตในขณะที่เปลี่ยนสภาพ แต่ดัดแปลงโดยทำให้โครงสร้างเป็นวงโดยการเชื่อมหมู่ฟังก์ชันระหว่าง P_1 และ P_3 จากการพบว่าระยะห่างระหว่าง 2 ส่วนนี้เท่ากับ 3.5 A° จึงได้ดัดแปลงโดยเชื่อมส่วนนี้ได้เป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นวง ขนาดใหญ่ คือ สาร 2b พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง BACE-1 โดยสามารถลดปริมาณ sAPP ได้มีค่า IC_{50} = 2 nM (รูปที่ 4) (Lindsley et al., 2007; Rajapakse et al., 2006)



รูปที่ 4 การพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีครีเทสจาก tertiary carbinamine ได้เป็นสารโครงสร้างเป็นวงขนาดใหญ่ (macrocyclic) และดัดแปลงต่อเป็นสาร 7 เพื่อเพิ่มประสิทธิผล (วาดใหม่จาก Lindsley et al., 2007)

นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาโครงสร้างให้ยาสามารถผ่าน blood brain barrier เข้าสู่สมองโดยการเติมหมู่ $-CF_3$ และการพัฒนาให้มีการปั๊มยากลับ (efflux) ลดลงโดยการเพิ่มหมู่ (α-CH_3 ที่ตำแหน่ง P_3 ได้เป็นสาร 7 ซึ่งได้ผลตามคาด คือ ผ่านเข้าสมองได้ดี และลดการเกิดการปั๊มกลับ แต่มีข้อเสียคือฤทธิ์ของยาลดลง 10 เท่า (Lindsley et al., 2007)

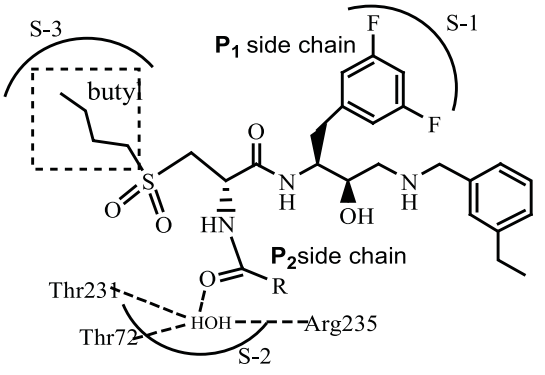
(ค) การออกแบบยาจากสารต้นแบบประเภท hydroxyethyl amine (HEA) จากการดัดแปลงโครงสร้างให้คล้ายคลึงกับโครงสร้างในสภาพกำลังเปลี่ยนแปลง หรือ สภาวะทรานซิชัน (transition state intermediates) โดยนักวิจัยบริษัทไฟเซอร์ พบว่าการดัดแปลงที่ P_1 โดยการเติมอะตอมฟลูออรีนที่วงเบนซีนจะเพิ่มฤทธิ์ และเมื่อทำการดัดแปลงต่อที่บริเวณ S-2 และ S-3 เพื่อให้จับกับเอนไซม์ได้ดี



รูปที่ 5 การพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีครีเทส heptyl sulfone carbamate 32 จากสารต้นแบบ isophthalate HEA ให้มีแรงยึดจับกับเอนไซม์ได้แน่นขึ้น โดยการเพิ่มอันตรกริยาผ่านตัวทำละลายที่ Asn233 และ Arg235 จากเดิมมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างยากับเอนไซม์ที่ Thr233 (⋯) (วาดใหม่จาก Freskos et al., 2007a)

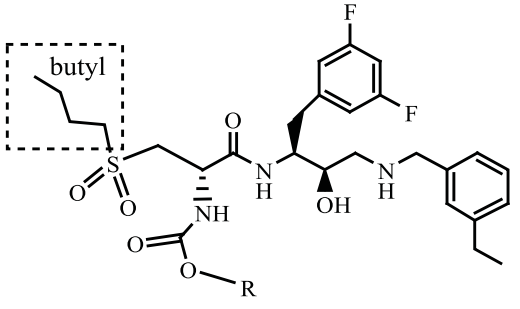
ทั้งนี้จากสารต้นแบบเริ่มต้นคือชุดอนุพันธ์เอไมด์ isophthalate HEA ที่ได้ดัดแปลงโครงสร้างที่ P_1 โดยการเติมหมู่ -F ที่วงเบนซีนเพื่อเพิ่มการละลายในลิพิดทำให้ยาสามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ดี และต่อมาทำการดัดแปลงที่ P_2 เป็นซัลโฟนและซัลโฟนาไมด์ เพื่อให้มีขนาดที่ฟิตพอดีกับช่อง S-2 และ S-3 ของเอนไซม์ และเพิ่มความเฉพาะเจาะจงโดยให้ยับยั้งเฉพาะเอนไซม์ BACE-1 เท่านั้น โดยทำเป็นชุดอนุพันธ์ heptyl sulfone amide และ heptyl sulfone carbamate ได้เป็นสาร **32** (Freskos et al., 2007a) ซึ่งอะตอมออกซิเจน

ของหมู่ซัลโฟนเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond) กับ N**H** ของ Thr233 (3.0 A°) และมีการยึดกันผ่านโมเลกุลของตัวทำละลายกับ Asn233 (3.7A°) และ Arg235 (รูปที่ 5) การที่ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนโดยตรงกับ Arg235 ทำให้ไม่มีความเฉพาะเจาะจงทำให้ **32** ยับยั้งเอนไซม์คาเทบซิน-ดี (Cat-D)ได้ด้วย และเพื่อลดน้ำหนักโมเลกุลลงจึงดัดแปลงหมู่ heptyl ที่ S-3 ไปเป็นชุดอนุพันธ์ butyl sulfone amide และ butyl sulfone carbamate พบว่าสาร **13** และสาร **27** ในชุดอนุพันธ์ดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มขึ้น และเจาะจงกับ BACE-1 มากกว่า BACE-2 และ Cat-D (รูปที่ 6) (Freskos et al., 2007b)



Butyl sulfone amides

13 R = 2-pyridyl
BACE IC_{50} = 2 nM
Cat-D IC_{50} = 474 nM
HEKcell = 2 nM
clog D= 4.04, clog P=4.16



Butyl sulfone carbamates

27 R = -CH_2-pyridyl
BACE IC_{50} = 10 nM
Cat-D IC_{50} = 444 nM
HEKcell = 0.6 nM
clog D= 4.3, clog P=4.26

รูปที่ 6 สาร 13 และสาร 27 ในชุดอนุพันธ์ butyl sulfone amide และ butyl sulfone carbamate โดยดัดแปลงเป็นหมู่ butyl ที่ S-3 (⋯) เพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์เบต้าซีครีเทส (วาดใหม่จาก Freskos et al., 2007b)

การพัฒนายาสำหรับโรค AD โดยใช้เอนไซม์แกมมาซีครีเทสเป็นโมเลกุลเป้าหมายนั้น มีการพัฒนาโดยนักวิจัยหลายกลุ่มจากบริษัทยาชั้นนำเช่น สาร BMS-433796 โดยบริสตอลไมเออร์สควิปป์ (Best et al., 2007; Lindsley et al., 2007) สาร MRK-560 โดยบริษัทเมอร์ก (Best et al., 2006, 2007) และ สาร LY411, 575 โดยบริษัทเซอริงพลาว (Best et al., 2005, 2006; Hyde et al., 2006) แต่ยังประสบปัญหาในเรื่องความเป็นพิษและอาการข้างเคียงที่เกิดจากการยับยั้งที่ไม่เจาะจงเฉพาะแกมมาซีครีเทสแต่ไปมีผลกับรีเซบเตอร์ที่เซลล์เมมเบรนอื่นๆ เช่น การตัดโปรตีนโดยเอนไซม์แกมมาซีครีเทสทำให้เกิด APP intracellular domain (AICD) ซึ่งมีหน้าที่หลากหลายภายในเซลล์ โดยเฉพาะไปยับยั้งและรบกวนการสื่อสัญญาณของ Notch-1 (Takeshita et al., 2007; Asberom et al., 2007; Fassa et al., 2007) ซึ่งมีความสำคัญในการเติบโตและเปลี่ยนสภาพเซลล์ เช่น B-cell และ T-cell และการเกิด goblet cell ที่ลำไส้ส่วน ileum และการฝ่อของม้าม และต่อมไทมัส (Best et al., 2007) ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์นี้อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงมากมาย (Citron, 2002, 2004; Higuchi et al., 2005) รวมถึงการเกิดพิษจากการสะสมของสาร C-99 ด้วย (Yeon et al., 2007)

จากการพัฒนายาเพื่อรักษาโรคอัลไซม์เมอร์โดยบรรดาบริษัทยาชั้นนำของโลกที่ปัจจุบันมีการแข่งขันกันสูงมาก เป็นที่เชื่อว่าจะมียาโรคอัลไซม์เมอร์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ซีครีเทสในอนาคตอันใกล้นี้

เอกสารอ้างอิง

Asai M, Hattori C, Iwata N, et al. 2006. The novel beta-secretase inhibitor KMI-429 reduces amyloid beta peptide production in amyloid precursor protein transgenic and wild-type mice. *J Neurochem* 96 (2): 533-540.

Asberom T, Bara TA, Clader JW, et al. 2007. Tetra hydroquinoline sulfonamides as gamma-secretase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17(1): 205-207.

Best JD, Jay MT, Otu F, Churcher I, et al. 2006. In vivo characterization of Abeta(40) changes in brain and cerebrospinal fluid usingn the novel gamma-secretaseinhibitor N-[cis-4-[(4-chlorophenyl)sulfonyl]-4-(2,5-difluoro-phenyl)cyclohexyl]-1,1, 1-trifluoromethane-sulfonamide (MRK-560) in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 317(2): 786-790.

Best JD, Jay MT, Otu F, et al. 2005. Quantitative measurement of changes in amyloid-beta(40) in the rat brain and cerebrospinal fluid following treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411575 [N2-[(2S)-2-(3,5-difluoro-phenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide]. *J Pharmacol Exp Ther* 313(2): 902-908.

Best JD, Smith DW, Reilly MA, et al. 2007. The novel gamma secretase inhibitor N-[cis-4-[(4-chlorophenyl) sulfonyl]-4-(2,5-difluoro phenyl) cyclohexyl]-1,1, 1-trifluoromethanesulfonamide (MRK-560) reduces amyloid plaque deposition without evidence of notch-related pathology in the Tg2576 mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 320(2): 552-558.

Citron M. 2004. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5(9):677-685.

Citron, M. 2002. Emerging Alzheimer's disease therapies: inhibition of β-secretase. *Neurobiol Aging* 23(6): 1017-1022.

Fassa A, Parisiadou L, Robakis NK, et al. 2007. Novel processing of Notch 1 within its intracellular domain by a cysteine protease. *Neurodegener Dis* 4(2-3): 148-155.

Findeis, M. A. 2007. The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 116(2): 266-286.

Freskos JN, Fobian YM, Benson TE, et al. 2007a. Design of potent inhibitors of human beta-secretase. Part 1. *Bioorg Med Chem Lett* 17(1): 73-77.

Freskos JN, Fobian YM, Benson TE, et al. 2007b. Design of potent inhibitors of human beta-secretase. Part 2. *Bioorg Med Chem Lett* 17(1): 78-81.

Hamada Y, Igawa N, Ikari H, et al. 2006. Beta-Secretase inhibitors: Modification at the P4 position and improvement of inhibitory activity in cultured cells. *Bioorg Med Chem Lett* 16(16): 4354-4359.

Higuchi M, Iwata N, Saido TC. 2005. Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: Progress toward therapeutic interventions. *Biochim Biophys Acta* 1751(1): 60-67.

http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Neurological/Alzheimer__Tau.htm

Hyde LA, McHugh NA, Chen J, et al. 2006. 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* 319(3): 1133-1143.

Lindsley SR, Moore KP, Rajapakse HA, et al. 2007. Design, synthesis, and SAR of macrocyclic tertiary carbinamine BACE-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17(14): 4057-4061.

Maillard MC, Hom RK, Benson TE, et al. 2007. Design, synthesis, and crystal structure of hydroxyethyl secondary amine-based peptidomimetic inhibitors of human beta-secretase. *J Med Chem* 50(4): 776-781.

Mancini F, Naldi M, Cavrini V, et al. 2007. Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors. *Anal Bioanal Chem* 388(5-6): 1175-1183.

Mandel S, Weinreb O, Amit T, et al. 2005. Mechanism of neuroprotective action of the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives. *Brain Res Brain Res Rev* 48(2): 379-387.

Pietrak BL, Crouthamel MC, Tugusheva K, et al. 2005. Biochemical and cell-based assays for characterization of BACE-1 inhibitors. *Anal Biochem* 342(1): 144-151.

Rajapakse HA, Nantermet PG, Selnick HG, 2006. D iscovery of oxadiazoyl tertiary carbinamine inhibitors of beta-secretase (BACE-1). *J Med Chem* 49(25): 7270-7273.

Rojo I, Martin JA, Broughton H, et al. 2006. Macrocyclic peptidomimetic inhibitors of beta-secretase (BACE): first X-ray structure of a macrocyclic peptidomimetic-BACE complex. *Bioorg Med Chem Lett* 16(1): 191-195.

Takahashi Y, Fuwa H, Kaneko A, et al. 2006. Novel gamma-secretase inhibitors discovered by library screening of in-house synthetic natural product intermediates. *Bioorg Med Chem Lett* 16(14): 3813-3816.

Takeshita K, Satoh M, Ii M, et al. 2007. Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circ Res* 100(1): 70-78.

Yeon SW, Jeon YJ, Hwang EM, et al. 2007. Effects of peptides derived from BACE1 catalytic domain on APP processing. *Peptides* 28(4): 838-844.