

Gdańsk, dn. 1 października 2016 r.

Dr hab. Jarosław Sączewski
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny z OML
Gdański Uniwersytet Medyczny

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ VITTORIO CANALE PT.
"ARYLSULFONAMIDE DERIVATIVES OF (ARYLOXY)ETHYL ALICYCLIC
AMINES AS SELECTIVE AND POTENT 5-HT₇ RECEPTOR ANTAGONISTS WITH
PSYCHOTROPIC PROPERTIES"**

Depresja, czyli stopniowa utrata radości życia i odczuwania przyjemności, umiejętności cieszenia się rzeczami i wydarzeniami, które do tej pory były odczuwane jako radosne, aż do całkowitego ich zaniku, jest jedną z wiodących przyczyn niesprawności psychofizycznej i niezdolności do pracy na świecie. W praktyce lekarskiej jest jednym z najczęściej spotykanych zaburzeń afektywnych, które w krajach rozwiniętych dotyka kilkunastu procent populacji osób dorosłych. Do najważniejszych czynników etiologicznych depresji należą wciąż mało poznane predyspozycje genetyczne, wiążące się z różną ekspresją genów związanych z układami neuroprzekaźników w ośrodkowym układzie nerwowym.

Jakkolwiek arsenał leków przeciwdepresyjnych - wpływających na wrażliwość synaptyczną lub ekspresję genów - jest bogaty, wiele z nich wywołuje niepożądane działania uboczne, w tym zagrażające życiu pacjentów: kardio- i hepatotoksyczność, ryzyko samobójcze, oraz rzadziej - zespół serotoninowy. Stąd, poszukiwanie leków przeciwdepresyjnych o nowym mechanizmie działania jest ważnym celem działania chemików medycznych.

Autor recenzowanej rozprawy doktorskiej, mgr Vittorio Canale, zwrócił swoją uwagę na hipotezę, w myśl której odkryte w roku 1983. receptory serotoninowe 5-HT₇ są zaangażowane w regulację nastroju, a zatem związki o działaniu antagonistycznym mogą stanowić skuteczną alternatywę dla leków stosowanych obecnie, co więcej, mogłyby być pomocne terapii zaburzeń poznawczych i lękowych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska nosi dość rozbudowany tytuł: „*Arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)ethyl alicyclic amines as selective and potent 5-HT₇*

receptor antagonists with psychotropic properties”, co w tłumaczeniu na język polski brzmi: „Arylosulfonamidowe pochodne (aryloksy)etylo alicyklicznych amin jako selektywni antagoniści receptorów 5-HT₇ wykazujący właściwości psychotropowe”. Napisana w języku angielskim praca została wykonana pod kierunkiem dra hab. Pawła Zajdla w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego i jest jednym z najnowszych produktów programu badawczego, dotyczącego projektowania struktur oraz syntezy nowych ligandów receptorów serotoninowych typu siódmego (5-HT₇).

Jest regułą, iż prace w zakresie chemii medycznej bazują przypadkowym odkryciu, lub popartym racjonalnymi przesłankami zaprojektowaniu „struktury wiodącej”, którą następnie poddaje się modyfikacjom w celu uzyskania leku o pożądanym profilu farmakologicznym i korzystnych właściwościach farmakokinetycznych. W przypadku recenzowanej pracy, strukturą wiodącą był otrzymany wcześniej w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM 4-fluoro-*N*-{1-[2-(2-izopropylfenoksy)etylo]piperdyn-4-yl}benzeno-sulfonamid, oznaczony symbolem PZ-766, który charakteryzuje się nanomolarnym powinowactwem i działaniem antagonistycznym względem receptorów 5-HT₇, wysoką aktywnością wobec innych receptorów monoaminoergicznych, a w badaniach z użyciem modeli zwierzęcych wykazuje pożądaną działanie prokognitywne i przeciwdepresyjne. Związek PZ-766 jest analogiem długołańcuchowych arylopiperazynowych ligandów receptorów serotoninowych (LCAP), a zadaniem Doktoranta była optymalizacja struktury w celu uzyskania nowej klasy selektywnych antagonistów receptorów 5-HT₇ na drodze syntezy analogów różniących się podstawnikami grupy arylowej i sulfonamidowej, budową aminy alicyklicznej oraz obecnością grup funkcyjnych – amidowej, sulfonamidowej lub mocznikowej. Obok syntezy chemicznej, przeprowadzone badania obejmowały ocenę aktywności wewnętrznej względem receptorów serotoninowych, badanie stabilności chemicznej i metabolicznej, a także testy *in vivo* z wykorzystaniem modeli zwierzęcych depresji.

By nie wywoływać zbędnego napięcia, stwierdzę na wstępie, iż cel pracy został osiągnięty, co jednak nie zwalnia recenzenta z obowiązku dokonania oceny merytorycznej uzyskanych wyników.

Tekst rozprawy obejmuje łącznie 60 stron maszynopisu, z których 34 Autor poświęcił wyczerpującej dyskusji uzyskanych wyników oraz wyciągniętym na tej podstawie wnioskom.

Nie mamy tu do czynienia z formą klasyczną rozprawy doktorskiej, lecz z komentarzem do trzech, stanowiących integralną całość, publikacji ogłoszonych drukiem w czasopismach: *MedChemComm*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* oraz *European Journal of Medicinal Chemistry*. Tekst zawiera również liczący 103 pozycje spis odnośników literaturowych. Opisy syntez i dane eksperymentalne związków, które nie zostały ujęte w załączonych publikacjach znajdujemy natomiast w czternastostronicowym suplemencie, zatytułowanym *Supporting Information, for review only*. Taka forma rozprawy ma istotną zaletę - znaczna część materiału faktograficznego została wcześniej pozytywnie oceniona przez recenzentów renomowanych czasopism naukowych.

W oparciu o lekturę 'wprowadzenia' (Introduction and Background of the thesis) oraz treść załączonych publikacji należy stwierdzić, że Autor wykazał doskonałą znajomość obszernego piśmiennictwa dotyczącego problematyki związanej z tematem rozprawy doktorskiej. Wybrał przy tym zagadnienia wspólnie najważniejsze, przedstawiając je w sposób przejrzysty i zwięzły, co świadczy o właściwym przygotowaniu do realizacji zaplanowanych badań.

W kolejnym rozdziale swojej pracy (Aim of the thesis) p. Vittorio Canale precyzyjnie zdefiniował cel i zakres eksperymentów, które zamierzał przeprowadzić. Z uznaniem należy podkreślić, iż badania miały charakter interdyscyplinarny, obejmując projektowanie struktury oraz syntezę ośmiu serii związków nie opisanych uprzednio w literaturze chemicznej, analizę spektroskopową i oznaczanie właściwości fizykochemicznych otrzymanych połączeń, komputerowe modelowanie molekularne, badanie właściwości biologicznych (zarówno *in vitro* jaki i *in vivo*), a wreszcie - analizę zależności pomiędzy strukturą związków a ich aktywnością biologiczną (SAR).

W kontekście projektowania nowych struktur na podkreślenie zasługuje wykorzystanie nowoczesnych technik komputerowo-wspomagane projektowania leków (ang. *Computer-Aided Drug Design*), które zastosowano przed podjęciem syntezy ligandów zawierających ugrupowania arylosulfonamidowe, amidowe i mocznikowe. Zgodnie z obowiązującym paradygmatem CADD, przeprowadzono analizę komputerową z użyciem wirtualnej biblioteki 680 dostępnych amin drugorzędowych [Virtual Combinatorial Libraries (VCL)] oraz skryning wirtualny (Virtual Screening (VS) protocol) z zastosowaniem homologicznych modeli receptorów 5-HT₇. Badania te zostały przeprowadzone przy udziale dra Rafała Kurczaba z

Zakładu Chemii Leków, Instytutu Farmakologii, Polskiej Akademii Nauk, kierowanego przez prof. Andrzeja Bojarskiego.

Samodzielnym osiągnięciem p. Vittorio Canale jest bez wątpienia synteza 88 nowych analogów związku PZ-776. Jakkolwiek metodologia prac w tym zakresie wydaje się standardowa, otrzymanie zaplanowanych związków w czystej postaci nie było łatwe i wymagało dużego nakładu pracy, staranności oraz bardzo dobrego opanowania technik laboratoryjnych, w tym techniki syntezy na fazie stałej. Syntezę chemiczną Autor potraktował jako oczywiste narzędzie chemii medycznej, gdyż w pracy nie znajdujemy odnośników literaturowych do wykorzystywanych w pracy metod syntezy organicznej. Czystość otrzymanych związków została analizowana chromatograficznie stosując technikę UPLC, natomiast budowę chemiczną uzyskanych połączeń Doktorant potwierdził jednoznacznie przy użyciu metody magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H - i ^{13}C -NMR oraz spektrometrii mas. Tym samym wykazał pełne kompetencje w zakresie syntezy i analizy strukturalnej leków.

Z obowiązku recenzenta należy odnotować, iż opisane w pracy 4-fluoro-2-izopropyl-1-metoksybenzen, 1-metoksy-2-(1,1,1-trifluoropropan-2-yl)benzen oraz związki **110-113**, **120-123**, **130**, **131**, są znane i w większości dostępne komercyjnie. Jakkolwiek przedstawienie w pracy doktorskiej procedur syntezy znanych substratów i półproduktów jest uzasadnione, opisom powinno towarzyszyć odniesienie do aktualnego stanu wiedzy, zwłaszcza jeśli posłużono się metodami opracowanymi wcześniej przez innych autorów.

Opisy widm NMR są dokonane rzetelnie i w pełni potwierdzają budowę chemiczną uzyskanych związków. Być może Doktorant powinien jedynie uzasadnić brak sygnałów protonów OH w widmach ^1H -NMR związków **113**, **120**, **121** oraz sygnałów protonów NH w widmach związków **119**, **126-129**, **136-143**. Prawdopodobne jest to spowodowane znacznym poszerzeniem linii rezonansowych w widmach rejestrowanych w chloroformie. Domyślam się również, że w opisach widm ^1H -NMR 4-(2-metoksyfenyl)pirydyny oraz związków **121** i **123** podanie przez Autora dwóch stałych sprzężenia dla dubletów reprezentujących protony wicynalne $\text{HC}=\text{CH}$ nie jest błędem, lecz wynika z obserwowanej w praktyce niedokładności urządzenia rejestrującego widma NMR.

W dalszym etapie zaplanowanych prac eksperymentalnych, przy udziale dra Marka Żylewskiego oraz dra Grzegorza Żuchowskiego z Katedry Chemii Organicznej UJ, przeprowadzono badania trwałości chemicznej otrzymanych związków wykazując ich trwałość w

warunkach fizjologicznych tj. w $\text{pH} = 7.4$. Ponadto we współpracy pracowników Zakładu Biochemii Farmaceutycznej badano stabilność metaboliczną zsyntetyzowanych pochodnych w użyciu mysich mikrosomów wątrobowych. Wykazano, że otrzymane pochodne w większości ulegają hydroksylacji w aryloksylowym fragmencie cząsteczki, a wprowadzenie podstawnika pirydylowego w pozycję 2 tej grupy znacząco zwiększa stabilność metaboliczną cząsteczki.

W ramach kolejnych badań *in vitro*, prowadzonych we współpracy z Zakładem Chemii Leków Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, oznaczono powinowactwo otrzymanych związków do receptorów serotoninowych 5-HT₇, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i 5-HT₆ oraz receptorów dopaminowych D₂. Przeprowadzono również testy biofunkcjonalne, by na podstawie obserwowanej aktywności wewnętrznej zidentyfikować związki wykazujące działanie antagonistyczne względem receptorów serotoninowych 5-HT₇.

Wyselekcjonowane tym sposobem związki zostały przekazane do Zakładu Farmacji Klinicznej UJ oraz Zakładu Badań Nowych Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, gdzie przeprowadzono badania farmakologiczne *in vivo*. Działanie przeciwdepresyjne badano przy zastosowaniu testu wymuszonego pływania (FST) oraz testu zawieszenia za ogon (TST), efekt przeciwlękowy badano z użyciem testu czterech płytek (FPT), natomiast wpływ na zdolności poznawcze określono w teście rozpoznania nowego obiektu (NOR).

Związki o numerach **15**, **52**, **79** i **83** wykazały wyraźne działanie przeciwdepresyjne i przeciwlękowe w dawkach porównywalnych lub niższych od związków referencyjnych SB-269970, citalopramu i diazepamu. Ponadto otrzymane związki w dawce 1 mg/kg zwiększały zdolności poznawcze badanych zwierząt. Intrygujące, iż wymienione powyżej analogi wykazują niższe powinowactwo, słabszą aktywność antagonistyczną i niższą selektywność działania względem receptorów 5-HT₇ niż struktura wiodąca PZ-766, a mimo to zostały określone w pracy jako związki najbardziej obiecujące. Może to oznaczać, że w przypadku leków przeciwdepresyjnych przeprowadzone badania *in vitro* mają charakter jedynie orientacyjny, lub receptory 5-HT₇ nie odgrywają decydującej roli w etiopatogenezie tej choroby.

Wywiązując się z obowiązków recenzenta powinienem odnieść się także do szaty graficznej i sposobu prezentacji wyników badań. Pod tym względem praca napisana jest bardzo starannie, bowiem można doszukać się jedynie kilku drobnych uchybień typograficznych i nomenklaturowych, których Autorowi nie udało się uniknąć w trakcie korekty maszynopisu. Przykładowo, związki **116**, **117**, **124** i **125** są estrami *tert*-butylowymi kwasu węglowego, a więc

ich nazwy powinny być zapisane rozdzielnie: *tert*-butyl carbamate. Na Rysunku 12 (strona 26) powinno być $X = CO$ (nie CO_2), we wzorze ogólnym **VI** brakuje atomu wodoru, a na Schemacie 1 (strona 29) numeracja niektórych podstawników R jest błędna. Wspomniane przeoczenia i drobne uchybienia nie obniżają wartości merytorycznej pracy.

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej p. Vittorio Canale w pełni potwierdzają wyrażoną wcześniej opinię, iż zamierzony cel, jakim było zastosowanie współczesnych narzędzi chemii medycznej w procesie poszukiwania nowej klasy leków przeciwdepresyjnych na drodze optymalizacji struktury wiodącej PZ-766, został osiągnięty. W tym kontekście, obok aspektów natury poznawczej, należy zwrócić uwagę na walor dydaktyczny ambitnego programu badawczego. Dzięki doskonale funkcjonującemu zespołowi naukowemu Doktorant mógł uczestniczyć w realizacji szeregu badań przedklinicznych o charakterze rozwojowym, co w połączeniu z faktem, iż jest współautorem 10. publikacji naukowych, czyni Go wysoko kwalifikowanym specjalistą w zakresie chemii medycznej.

Podsumowując, z uznaniem stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska jest osiągnięciem oryginalnym, wnosi wiele elementów nowości naukowej do wiedzy w zakresie chemii medycznej leków przeciwdepresyjnych i pod każdym względem spełnia wymagania określone w aktualnej ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych. Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie magistra Vittorio Canale do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej, bowiem spełnia ona wszystkie wymagania zawarte w *Regulaminie Wyróżniania Rozpraw Doktorskich*.

Dr hab. Jarosław Sączewski

Katedra Zakład
Chemii Organicznej
Jarosław Sączewski
dr hab. Jarosław Sączewski
adiunkt