



WARSZAWSKI UNIwersYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Dawida Panka

„Synthesis and properties of novel multifunctional ligands, inhibiting cholinesterases and β -secretase as potential treatment of Alzheimer's disease”

**wykonanej w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej,
pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Maławskiej jako promotora oraz dr Anny
Więckowskiej jako promotora pomocniczego.**

Chemia medyczna to interdyscyplinarna gałąź nauki zajmująca się projektowaniem oraz otrzymywaniem nowych związków chemicznych jako aktywnych składników leku. Punktem wyjścia dla tego procesu jest analiza patogenezy choroby i wytypowanie odpowiedniego celu na poziomie molekularnym. Najczęściej takim celem molekularnym jest pojedynczy receptor lub enzym (mówiąc ogólniej: białko), z którym łączy się odpowiednio zaprojektowany ligand -pobudzający bądź hamujący jego funkcję. Inaczej jest w przypadku gdy patogeneza choroby nie jest do końca jasna i/lub uczestniczy w niej wiele różnych białek. Sytuacja taka ma miejsce m.in. w chorobie Alzheimerera, dla której zidentyfikowano szereg celów molekularnych, których modulacja może przyczynić się do zahamowania symptomów i modyfikacji przebiegu choroby. Uważa się że w takim wypadku pożądane jest otrzymanie związków wielofunkcyjnych, a więc zdolnych do efektywnego oddziaływania na różne białka.

W ten trend doskonale wpisuje się przedstawiona do recenzji rozprawa mgr inż. Dawida Panka, ponieważ jej nadrzędnym celem jest poszukiwanie nowych związków o wielokierunkowym mechanizmie działania, hamujących enzymy ważne dla etiopatogenezy choroby Alzheimerera: cholinoesterazy i β -sekretazę, oraz związane z ich aktywnością procesy:

agregację β -amyloidu i białka tau. Opisane badania zostały wykonane zgodnie z ogólnie przyjętym schematem stosowanym w chemii medycznej. Jako punkt wyjścia do projektowania takich ligandów posłużyły Doktorantowi wyniki szerszych badań prowadzonych w ostatnich latach w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej CM UJ oraz analiza elementów farmakoforowych inhibitorów otrzymanych przez inne grupy. Na podstawie tych danych Doktorant wytypował trzy elementy strukturalne ligandu odpowiedzialne za wiązanie z efektorami. W kolejnym etapie zaplanował i przeprowadził wieloetapową syntezę zaprojektowanych cząsteczek. Dalej, związki zostały przekazane do badań farmakologicznych w kierunku hamowania aktywności enzymów: acetylocholinoesterazy (z węgorka elektrycznego *EeAChE*), butyrylocholinoesterazy (z osocza końskiego *EqBuChE* i ludzkiej *hBuChE*) oraz ludzkiej β -sekretazy (*hBACE-1*). Dodatkowo została oceniona ich zdolność hamowania agregacji β -amyloidu oraz białka tau. W ostatnim etapie przeprowadzona została analiza zależności struktura – aktywność. Dla wybranych związków oceniona została przenikalność przez barierę krew – mózg w modelu *in vitro* PAMPA.

W pracy zwraca uwagę duża ilość syntez wykonanych przez doktoranta. Były one prowadzone klasycznymi metodami, jednak nie zawsze były one proste. W celu otrzymania zaplanowanych związków Doktorant musiał nabyć umiejętność stosowania odpowiedniego warsztatu badawczego, prowadzenia różnych typów reakcji oraz obierania strategii zabezpieczania grup funkcyjnych. Na szczególną uwagę zasługuje opracowanie alternatywnego sposobu otrzymania pochodnych **64**, **65**, które ze względu na międzycząsteczkową aminolizę nie mogły być uzyskane standardową metodą syntezy. Jest to dowód na posiadanie przez Doktoranta cennej dla chemika medycznego umiejętności: ominięcia problemu stojącego na przeszkodzie do uzyskania interesującej pochodnej. Ciekawym elementem rozprawy jest opracowanie nowej metody otrzymywania pochodnych 5-bromometylooxazolidyn-2-onu (schemat 9 rozprawy).

Sumarycznie, w toku pracy Doktorant otrzymał 130 związków, w tym prawie 70 czystych związków finalnych. Pośród nich znalazły się pochodne o pożądanych właściwościach farmakologicznych i odpowiednich parametrach leko-podobności. Związek **98**, [1-((3-(*tert*-butyl)amino)-3-((3,3-difenylopropyl)-amino)propan-2-ol)] wykazał zbalansowaną aktywność względem obranych celów molekularnych. Jest on inhibitorem β -sekretazy ($IC_{50} = 41.60 \mu M$), ma zdolność hamowania agregacji β -amyloidu ($IC_{50} = 3.09 \mu M$),

białka tau (55% dla stężenia 10 μM) oraz hBuChE ($\text{IC}_{50} = 7.22 \mu\text{M}$). Jest to profil unikalny wśród ligandów wielocelowych projektowanych w tym kierunku.

Podstawę ocenianej rozprawy stanowi spójny tematycznie zbiór pięciu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Trzy z nich to oryginalne prace doświadczalne w czasopismach o wysokich współczynnikach oddziaływania (*European Journal of Medicinal Chemistry, Molecules, ACS Chemical Neuroscience*; suma *IF* 11,263). Pozostałe dwa artykuły to prace przeglądowe w rozpoznawalnych periodykach z dziedziny chemii medycznej (*Current Medicinal Chemistry, Future Medicinal Chemistry*; suma *IF* 7,409). Jest to imponujące dokonanie Doktoranta i współpracowników, szczególnie że jedna z prac eksperymentalnych pochodzi z 2017 roku a wg. bazy Scopus była cytowana już 15-krotnie (dostęp z 02.04.2018).

We wszystkich pracach eksperymentalnych i jednej przeglądowej Doktorant jest pierwszym współautorem, co zasługuje na podkreślenie ze względu na to że opisane badania są wieloautorskie i prowadzone były w kilku ośrodkach. Załączone oświadczenia współautorów oraz informacje zawarte w sekcji 'Author Contribution' dodatkowo potwierdzają Jego olbrzymi wkład w powstanie publikacji. Ukazują one Doktoranta jako osobę, która wykonała najbardziej pracochłonny etap badań – przeprowadził on większość syntez, a tym samym wytworzył materiał do dalszych eksperymentów. Brał on również istotny udział m.in. w formowaniu hipotezy badawczej, planowaniu eksperymentów oraz formułowaniu wniosków.

Całość dysertacji uzupełnia 72 stronicowe podsumowanie cyklu. Zawiera ono kolejno streszczenie, wstęp teoretyczny uzasadniający celowość podjętych badań i przedstawiający obecny stan wiedzy, cel pracy, a następnie analizę osiągniętych w kolejnych etapach pracy wyników oraz wnioski. Układ taki jest logiczny, a dołączony wykaz skrótów znacznie ułatwia lekturę. Do rozprawy dołączony jest spis piśmiennictwa, który liczy 59 pozycji w większości powstałych w przeciągu ostatnich 10 lat. Całość napisana jest w języku angielskim – z przyjemnością stwierdzam, że bardzo poprawnym. W zasadzie nie dopatrzyłem się literówek ani błędów interpunkcyjnych.

Zagadnienia wymagające dodatkowego komentarza Doktoranta nie są liczne i zostały wypunktowane poniżej:

- 1) Wiele z otrzymanych związków aktywnych (w tym najkorzystniej działający **98**) to związki chiralne, otrzymywane w postaci racematów. Czy została przeprowadzona analiza możliwości otrzymania poszczególnych enancjomerów? Czy wyniki dokowania molekularnego nie wskazują zasadności przeprowadzenia syntezy asymetrycznej, bądź rozdzielenia izomerów? Nawet jeśli nie, to być może było by warto zbadać aktywność poszczególnych izomerów w celu weryfikacji hipotez wyciągniętych na podstawie dokowania?
- 2) Synteza związków **64** i **65** nie mogła być prowadzona za pomocą standardowej ścieżki. Doktorant tłumaczy to samo-aminolizą (oryg. *self-aminolysis*) prowadzącą do otwarcia pierścienia sacharyny. 'Samo-aminoliza' wydaje się tu pojęciem nie do końca zasadnym, ponieważ Doktorant sugeruje (schemat 5 rozprawy), że nie zachodzi ona wewnątrzcząsteczkowo, lecz pod wpływem drugiej cząsteczki produktu. Czy produkt uboczny został wyizolowany i scharakteryzowany, czy też jego struktura przedstawiona na schemacie 5 jest wynikiem spekulacji?
- 3) Synteza związków **64** i **65** jest przykładem inwencji wykazanej przez Doktoranta w celu ominięcia problemu związanego z otrzymywaniem zaplanowanych związków. Jest to starannie zaprojektowana sekwencja siedmioetapowa z kilkakrotnie przeprowadzanymi cyklami zabezpieczenia i odbezpieczenia grup funkcyjnych. Czy inne drogi syntezy były również brane pod uwagę? Czy Doktorant rozważał możliwość zastosowania sekwencji N-alkilowania dostępnego handlowo 3-piperydonu a następnie reduktywnego aminowania? Taka ścieżka była by krótsza, nie wymagała by użycia toksycznych bromków arylometylowych i była by zgodna z popularnym ostatnio trendem *protecting group-free synthesis* (np. *Nature Chemistry* 1, 193–205 (2009), doi:10.1038/nchem.216).
- 4) Lektura rozprawy nasuwa pytanie z którym każdy chemik medyczny mierzy się niejednokrotnie, „Co dalej?”. W wyniku wielokierunkowej optymalizacji otrzymany został związek **98** o unikalnym profilu farmakologicznym i odpowiedniej leko-podobności. Bez wątpienia może on posłużyć jako sonda molekularna w badaniach biochemicznych dotyczących np. procesów powstawania złogów β -amyloidu. Powstaje jednak pytanie o zastosowanie praktyczne. Czy zaplanowane są badania *in vivo*? Czy przeprowadzono badania

elektrofizjologiczne oddziaływania na kanał hERG? Wydaje się, że w strukturze związku **98** występują elementy mogące powodować taki efekt.

Powyższe uwagi nie wpływają w żaden sposób na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr inż. Dawida Panka. Praca wnosi istotny wkład w stan wiedzy na temat ważnego i aktualnego zagadnienia jakim jest poszukiwanie nowych leków przeciw chorobom neurodegeneracyjnym. Wykorzystane zostały aktualne narzędzia badawcze, z których na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie oryginalnych szlaków syntezy zaplanowanych związków. Zastosowane podejście do poszukiwania nowych leków przeciw chorobie Alzheimer'a, poprzez opracowanie ligandów wielofunkcyjnych, jest zgodne z najnowszymi trendami w chemii medycznej. W mojej ocenie praca przedstawiona do recenzji ma wysokie walory naukowe i poznawcze. Doktorant przy pomocy wielodyscyplinarnego zespołu opracował związek **98** o unikalnym profilu farmakologicznym. Dodatkowo, bardzo pozytywnie jawi się sylwetka Doktoranta jako osoby: prawidłowo stawiającej hipotezy badawcze, formującej wnioski, podejmującej inicjatywę w planowaniu eksperymentów, pierwszego współautora cytowanych prac eksperymentalnych w recenzowanych czasopismach naukowych o wysokich wskaźnikach oddziaływania. Z tych względów przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie pana mgr inż. Dawida Panka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz dodatkowo wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Warszawa, 13 kwiecień 2018

ADIUNKT
Katedra i Zakład Technologii Leków
: Biotechnologii Farmaceutycznej
.....*dr hab. n. farm. Maciej Dawidowski*
dr hab. n. farm. Maciej Dawidowski

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 721, 57 20 646
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl