Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych z Pracownia Modelowania Komputerowego

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin,
Tel./fax. 0-81-535 73 55

Chair and Department of Synthesis and Chemical Technology of Pharmaceutical Substances with Computer Modeling Lab

Faculty of Pharmacy with Division of Medical Analytics
Medical University of Lublin
4A Chodzki str., 20-093 Lublin, Poland
*Phone/fax *048-81-535 73 55*

Lublin, 20-04-2018

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Joanny ŚNIECIKOWSKIEJ

z Zakładu Chemii Leków, Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutyczny Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

pt. „Novel functionally selective agonists of the serotonin 5-HT$_{1A}$ receptor".

Już od 15 lat oceniam doktoraty w dziedzinie chemii medycznej. Doświadczenie (25 recenzji), które zdobyłem pozwala mi na pewne uogólnienia zmian, które się dokonały. Zmiany, które obserwuję są jakościowe i ilościowe. Jakość to pełniejsze wykorzystanie wiedzy o możliwych przyczynach chorób, to wybór właściwych celi molekularnych. Ilość to różnorodność badań, które są wykonywane aby nie tylko udowodnić aktywność ale także potwierdzić skuteczność, czyli brak działań ubocznych. Zwiększa to wymagania w stosunku do doktorantów. Wiedza i umiejętności. Bez tego nie można prawidłowo zaplanować, wykonać i zanalizować wyników żadnego projektu. Nie jest to proste ponieważ wymagania obejmują różne dziedziny – synteza, badania funkcjonalne, badania behawioralne, bioinformatyka. Sporo tego. Na szczęście możemy korzystać z dobrych przykładów – krajowych i zagranicznych. Odpowiednia aparatura to także nie problem. Stąd prace są coraz

lepsze, coraz obszerniejsze (na szczęście nie objętościowo, bo to zmora recenzentów) i uwieńczone odkryciem struktur wiodących i dobrych kandydatów na leki.

Praca P. mgr Śniecikowskiej przedstawiona do recenzji została skonstruowana według tego schematu, łącząc elementy syntetyczne, informatyczne i biologiczne. Mieści się również w szerokim programie badawczym prowadzonym od lat w Zakładzie Chemii Medycznej Katedry Chemii Farmaceutycznej w zespole prof. Marcina Kołaczkowskiego. Program ten dotyczy poszukiwania nowych ligandów receptorów serotoninowych.

Celem pracy mgr Śniecikowskiej była synteza oraz ocena aktywności nowych biased (stronniczych) agonistów receptorów $5HT_{1A}$ z grupy pochodnych 4-amino-metylo-1-benzoilopiperydyny jako potencjalnych leków przeciwko depresji, chorobie Parkinson'a oraz chorobie Rett'a. Praca została bardzo szczegółowo zaplanowana i zrealizowana łącząc w sobie zarówno skomplikowany, wieloetapowy element syntetyczny (65 nowych związków), bioinformatyczny (modelowanie oddziaływań ligand-białko) jak i funkcjonalny (powinowactwo oraz cztery testy potwierdzające preferencje aktywacji receptora). Farmakokinetyczne i farmakodynamiczne efekty wybranych pochodnych zostały również zbadane potwierdzając selektywny wpływ na wybrane regiony mózgu (regioselektywność).

Struktura podstawowa w projekcie mgr Śniecikowskiej została zaczerpnięta z wcześniejszych badań prowadzonych przez dr Bernarda Vacher'a w Pierre Fabre Research Center w Castres, Francja. Badania te doprowadziły do odkrycia befiradolu (wykluczonego po II fazie badań klinicznych) oraz dwóch biased agonistów (F13714 i F15599). Pomimo bardzo szerokich prac rozwojowych prowadzonych w wielu ośrodkach a przedstawionych szczegółowo w części wstępnej rozprawy pozostało jeszcze wiele możliwości chociażby wprowadzenie fragmentu aryloksyetylo-aminowego i dalszy rozwój tych struktur jak to zostało wykorzystane w doktoracie.

Szczegółowo zaplanowane modyfikacje obejmujące przede wszystkim fragment aromatyczny ale również linker. Poszczególne modyfikacje wprowadzane były sukcesywnie w oparciu o wyniki wirtualnego dokingu i potwierdzane wynikami powinowactwa do receptora $5\text{-}HT_{1A}$. Zbadano również powinowactwo do receptora alfa1 i D2 aby sprawdzić selektywność działania. Związki wykazywały bardzo dobrą selektywność. Aktywność farmakologiczna skorelowana została z parametrami lekopodobności. Zostały one umieszczone w tabelach ale musiałem się długo

naszukać co oznaczają skróty FSP, LELP czy MPO. Powinny być wyjaśnione przy pierwszej tabeli.

W kolejnym etapie określono możliwość „rozwoju" badanych struktur, zarówno w oparciu o podejście bioinformatyczne jak i *in vitro* określając zarówno możliwe działania „off-target" jak i parametry ADMET. Potwierdzono potencjalne bezpieczeństwo związków przy znacznej selektywności.

Ostatecznie przeprowadzono badania funkcjonalne i behawioralne dla potwierdzenia wpływu na parametry podstawowego szlaku sygnałowego (ERK1/2, cykliczny AMP, beta-arestyna i napływ wapnia). Określono powinowactwo do każdego etapu oraz ich wzajemne sprzężenie. Co najmniej 17 z otrzymanych pochodnych wykazało zróżnicowany biased agonizm. Dwie z nich o odmiennym spektrum sprzężenia w testach farmakodynamicznych (zw. 20 z niewielką przewagą biased agonizmu ERK oraz zw. 47 ze znaczną przewagą biased agonizmu beta-arestyny) wykazało interesujące działanie, w dużej mierze selektywne i specyficzne dające się wyjaśnić w oparciu o powinowactwo do poszczególnych etapów szlaku sygnałowego oraz siłę tego powinowactwa. Na tym etapie potwierdzono, że konkretne testy behawioralne (test Porsolt'a, usuwania dolnej wargi oraz wpływ na katalepsję haloperidolową) mogą być połączone z poszczególnymi typami biased powinowactwa.

Znaczącym sukcesem projektu jest otrzymanie 48 pochodnych o działaniu subnanomolowym. I tu dygresja. Angielskiemu „molar" odpowiada polski „molowy" a nie „molarny" (polski abstrakt). Oraz jednej pochodnej o powinowactwie subpikomolowym (femtomolowym, pKi = 12.8), najsilniej działającego znanego w literaturze liganda serotoninowego 5-HT_{1A}.

Wszystkie związki znalazły się w patencie międzynarodowym WO/2017/ /220799, co potwierdza zabezpieczenie praw do własności intelektualnej dla twórców. Każda z otrzymanych pochodnych została scharakteryzowana spektralnie (MS, 1H, 13C i 19F NMR, 2D HSQC dla zw. 48). Opisano również szczegółowo syntezę na poszczególnych etapach oraz proces oczyszczania produktów. Opisy są jasne i umożliwiają powtarzalność.

Praca napisana jest zwięźle, jasno i klarownie. Wnioski są uzasadnione i dobrze umotywowane. Planowanie, realizacja badań, opis a przede wszystkim dyskusja świadczą o znakomitym przygotowaniu doktorantki do pracy naukowej. Należy podkreślić, że cała praca napisana jest po angielsku dobrym i zrozumiałym językiem z kilkoma małymi literówkami, które nie mają wpływu na ogólną jakość prezentacji.

W związku z funkcją recenzenta chciałbym zwrócić doktorantce uwagę na pewne zagadnienia, które wymagałyby wyjaśnienia. W pracy przedstawiono 65 nowych związków o różnorodnej strukturze, dla których zbadano aktywność. Dla tak licznej grupy dobrze zdefiniowanych pochodnych aż prosi się o wykonanie analizy CoMFA lub CoMSIA. Ciekaw jestem, czy analiza doprowadziłaby także do odkrycia zw. 48. Inne uwagi to brak wyjaśnienia dla kodu kolorów w figurach prezentujących doking, szczególnie gdy na jednym rysunku nakładano na siebie kilka związków. Łączenie razem i próba wyjaśnienia wpływu na aktywność podstawników fluorowego, chlorowego oraz metoksy w oparciu o wielkość podstawnika (str. 58) jest trudne do przyjęcia ponieważ mają one różny charakter elektroindukcyjny i będą inaczej wpływać na gęstość elektronów pi w pierścieniu aromatycznym. Ostatnia uwaga to zróżnicowanie stężeń subnanomolowych i pikomolowych na str. 61, chociaż określają one ten sam zakres stężeń.

Pomimo przedstawionych wyżej uwag moja ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Śniecikowskiej jest pozytywna ponieważ postawione cele badawcze i poznawcze zostały zrealizowane, a doktorantka wykazała się znakomitym opanowanie warsztatu badawczego i umiejętnością właściwego i skutecznego planowania badań oraz oceny ich wyników. Uważam, że spełnia ona wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Składam zatem wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego CM UJ w Krakowie o dopuszczenie mgr Joanny Śniecikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Syntezy i Technologii
Chemicznej Środków Leczniczych
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

prof. dr hab. n. farm. Dariusz Matosiuk
profesor zwyczajny

WNIOSEK

Z uwagi na bardzo szeroki zakres zaplanowanych i zrealizowanych badań oraz gruntowną analizę ich wyników a także nowatorski cel molekularny (biased agonizm) uważam, że rozprawa ta stanowi bardzo istotny wkład w poszukiwanie nowych leków działających na receptory serotoninowe. Wyniki zostały opublikowane oraz opatentowane patentem międzynarodowym a projekt był realizowany w ramach projekty NCN oraz współpracy z przemysłem. Uważam, że praca ta w pełni zasługuje na wyróżnienie.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Syntezy i Technologii
Chemicznej Leków Leczniczych
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

prof. dr hab. n. farm. Dariusz Matosiuk
profesor zwyczajny