UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel. 061 854 66 70
fax 061 854 66 80
e-mail: jacekkuj@ump.edu.pl

Poznań, dnia 6.03.2020 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgra Jakuba Jończyka pt. „Projektowanie metodami modelowania molekularnego wielofunkcyjnych związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera" wykonanej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem dr hab. Marka Bajdy, prof. UJ

Zagadnienie mechanizmu działania leków jest niezwykle istotnym problemem współczesnej farmakoterapii. Zrozumienie, w jaki sposób dana substancja lecznicza wywołuje zmiany czynności komórki, tkanki, narządu czy organizmu umożliwia efektywne i bardziej bezpieczne stosowanie substancji leczniczych, a w niektórych stanach patologicznych pozwala na lepsze zrozumienie zmian biochemicznych zachodzących w przebiegu danej jednostki chorobowej. W dynamicznie rozwijającym się nurcie poszukiwania nowych substancji farmakologicznie aktywnych znamienną rolę odgrywa chemia obliczeniowa płynnie przenikająca się wzajemnie z osiągnięciami stale rozwijającej się krystalochemii. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, której myśl przewodnia wiązała się z zagadnieniami terapii choroby Alzheimera (AD), przyjęła postać komentarza autorskiego do cyklu **7** publikacji z punktacją Impact Factor zawierającego jedną przeglądową pracę oraz sześć oryginalnych – o łącznej punktacji **IF** wynoszącej **25,40**. Analiza wkładu twórczego Doktoranta oraz współautorów nie budzi wątpliwości w zakresie zaangażowania i dojrzałości naukowej Dyplomanta. Na liczące 212 stron opracowanie składają się: a) wykaz skrótów, b) bogaty i niezwykle rzeczowo ujęty wstęp (traktujący m.in. o etiopatogenezie AD, naturze ligandów wielocelowych (ang. *multi-target directed ligands*, MTDL), metodologii projektowania leków wraz z przykładami jej stosowalności), c) omówienie założeń pracy, d) część pierwsza – projektowanie związków będących inhibitorami β-sekretazy i cholinoesteraz oraz ograniczających agregację β-amyloidu i białka tau (serie związków **I–IV**), e) część druga – zastosowanie metod modelowania molekularnego w celu wyłonienia związków wielofunkcyjnych blokujących aktywność receptora histaminowego H_3 oraz hamujących acetylo- i butyrylocholinoesterazę, f) podsumowanie oddające najważniejsze aspekty poruszane w pracy oraz g) piśmiennictwo obejmujące 68 trafnie dobranych, recenzowanych,

zagranicznych pozycji literaturowych. Całość dysertacji wieńczy wykaz **publikacji I–VII** oraz przedruk **plakatu** o wyraźnie zarysowanej nucie prognostycznej w kontekście dalszych planów badawczych Kandydata do stopnia naukowego. Już lektura wstępu w sposób niebudzący wątpliwości wskazuje na wysokie zaangażowanie się Doktoranta oraz znajomość poruszanej problematyki, przy czym na uwagę zasługuje fakt, iż na niewielu stronach w jakże czytelny i sentencjonalny sposób oddał On złożoność zagadnień współczesnej chemii farmaceutycznej dotyczącej terapii AD (**publikacja I**), a sama jego treść mogłaby być z powodzeniem wykorzystana również jako rzetelne opracowanie dla studentów Wydziału Farmaceutycznego CM UJ. Bogata szata graficzna, czytelność wzorów dokumentujących strukturę omawianych bibliotek połączeń chemicznych oraz tabelaryczne ujęcie uzyskiwanych wyników *in vitro* stanowi niewątpliwy atut niniejszej dysertacji.

Celem badań mgra Jończyka było zasadniczo wykorzystanie metod modelowania molekularnego w projektowaniu nowych związków wielofunkcyjnych łączących aktywność względem enzymu β-sekretazy (BACE-1) lub receptora H_3 z innego typu profilem aktywności jako podejście umożliwiające przeciwdziałanie postępowi oraz objawom choroby Alzheimera. W oparciu o wyniki modelowania komputerowego przeprowadzono stopniową modyfikację otrzymanych wcześniej inhibitorów acetylo- (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BuChE), wprowadzając elementy zapewniające zdolność do hamowania enzymu BACE-1. Opracowano serie **I–IV** o zróżnicowanej zdolności do hamowania cholinoesteraz i enzymu BACE-1 oraz wykazujące wysoki potencjał antyagregacyjny względem β-amyloidu (Aβ) i białka tau (**publikacje II–V** oraz **plakat**). Serie ligandów **II–III** omawiane w **publikacjach II–IV** składają się z trzech elementów strukturalnych, tj. dwóch analogicznych (układu bezyloaminy - jako fragmentu A oraz pierścieni ftalimidu bądź sacharyny - jako fragmentu C) oraz jednego różnicującego linkerowego fragmentu B (pierścieni amin cyklicznych w serii **I**, łańcucha hydroksyetyloaminowego HEA w odniesieniu do serii **II**). W strukturze biblioteki połączeń typu **SIII** (**publikacja V**) odnotować można analogiczny do poprzednio omawianych pochodnych fragment A , układ HEA jako fragment B oraz system 2,2-difenyloetyloaminy bądź 3,3-dipropylofenyloaminy bądź N-podstawionej piperazyny (jako fragment C). W odniesieniu do serii **I** badanych przez Doktoranta pochodnych (**publikacja III**) w oparciu o zaproponowany przez Niego w badaniach *in silico* tryb wiązania (ang. binding mode; czy nie lepiej powiedzieć „sposób wiązania"?) z cholinoesterazami odnotowano dwie najważniejsze składowe ligandów odpowiedzialne za wiązanie z centrum aktywnym tych enzymów. Fragment benzyloaminowy (fragment A), podobnie jak w związkach wyjściowych, wiązał się z aminokwasami w obrębie katalitycznego miejsca

anionowego (CAS) kieszeni makrocząsteczki. Drugi układ aromatyczny tworzony przez ftalimid lub sacharynę (fragment C) okazał się istotny z punktu widzenia interakcji z peryferyjnym miejscem anionowym (PAS) AChE. Co istotne, znalazło to odzwierciedlenie w wynikach testów biologicznych, w których najaktywniejsza pochodna (**SI_26**) posiadała zdolność hamowania AChE na poziomie 830 nM. Doktorant zauważył również, iż wprowadzenie aminy cyklicznej w obrębie łącznika (fragment B) modyfikowało jednak aktywność względem BuChE. Najaktywniejszy związek (**SI_29**) w stężeniu 10 μM powodował jedynie zahamowanie 47,49% tegoż enzymu. Analiza sposobu wiązania ligandów z BuChE uzyskana przy pomocy wirtualnego dokowania pokazała, iż usztywnienie związków uniemożliwiło optymalne dopasowanie aromatycznych fragmentów stanowiących najistotniejszy przyczynek oddziaływania do miejsca aktywnego BuChE. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie odnośnie cząsteczek „conserved water" (Rysunek 7 na str. 20; podobnie na str. 26, itp.). Skąd bierze się obecność tychże „mostkowych" cząsteczek wody w kontekście przygotowywania struktury celu biologicznego (pobranego w bazy Protein Data Bank, PDB) do procesu dokowania? Poza tym jaki był zakres energetyczny jako cut off używany w tej fazie badań w pakiecie *Gold 5.1* w kontekście oprogramowania konkurencyjnego (np. *AutoDock Vina*, *PLANTS* itp.)? Czy Pan mgr Jończyk przewiduje w ramach kontynuacji prac badawczych udokładnianie kompleksów ligand–białko choćby w podejściu hybrydowym QM:MM lub półempirycznym (w oparciu o analizę 'heta of formation' względem funkcjonału PM7) bądź analizę relaksacji liganda i stabilności kompleksów ligand–białko w reżimie m.in. klasycznej dynamiki molekularnej (MD)? Ponadto w **publikacji III** stwierdzono, iż geometria serii pochodnych heksahydroksypirymidyny oraz 3-aminopiperydyny nie była linearna. Jak skomentowałby Doktorant wpływ hybrydyzacji atomów azotu cyklicznych amin oraz konformacji ich pierścieni na wyprowadzane w pracy wnioski w zderzeniu z danymi z piśmiennictwa? W oparciu o jakie przesłanki Autor zauważa, iż związki **SIII_26** i **SIII_52** wykazują selektywność względem AChE przy wartości IC_{50} wynoszących odpowiednio: 0,83 i aż 6,47 μM? Należy ponadto podkreślić, iż cennym zabiegiem było zastosowanie od **publikacji IV** jako fragmentu B łańcucha HEA, jak również znaczna modyfikacja fragmentu C w **publikacji V**, a już wniosek, iż względem BuChE bardziej aktywne okazały się pochodne difenyloetyloaminy niż piperazyny - poparty obserwacjami w oparciu o analizę *in silico* - dowodzi wysokiego kunsztu badawczego mgra Jończyka i wysokiej operatywności Jego wiedzy, uwypuklającej jednocześnie wyraźnie zaznaczony w cyklu prowadzonych badań związek przyczynowo-skutkowy. Kierowany jedynie ciekawością pragnąłbym się dodatkowo

uprzejmie zapytać, w jaki sposób w kontekście obecności w układzie HEA centrum stereogenicznego Doktorant zapatruje się na wyniki prac w rozumieniu czystości enancjomerycznej analitu?

W drugiej części badań metody modelowania komputerowego Doktorant skupiał się na poszukiwaniu ligandów wielocelowych oddziałujących z receptorem histaminowym H_3 (jako receptorem związanym z białkiem G) i cholinoesterazami, trafnie zauważając, iż w wyniku wskazanego w pracy połączenia pól aktywności można byłoby oczekiwać zwiększenia ograniczonej przez postępującą neurodegenerację ilości acetylocholiny jako neuroprzekaźnika na poziomie OUN. Mając powyższe na względzie, uznał On, iż kluczowym elementem badań byłaby próba wyjaśnienia sposobu oddziaływania wybranych ligandów z celami biologicznymi (np. Rys. 24 na str. 47). Pierwszy etap przeprowadzonych badań mający na celu przygotowanie oraz zwalidowanie modelu receptora H_3 stanowi esencję **publikacji VI**. Okazał się on wieloetapowym procesem polegającym na przygotowaniu rozległej biblioteki modeli homologicznych różniących się sposobem uliniowienia, użytymi strukturami wzorcowymi oraz oprogramowaniem służącym przygotowaniu samego modelu. Do przygotowania uliniowień wykorzystano dwa białka wzorcowe (matryce): ludzki receptor histaminowy H_1 (hH1R, 4U15.pdb) posiadający 30% identycznych i 56% podobnych aminokwasów oraz szczurzy receptor muskarynowy M_3 (rM3R, 3RZE.pdb) posiadający 31% identycznych i 54% podobnych aminokwasów. W tym miejscu należy z całą mocą podkreślić, iż swoboda, z jaką Pan Jończyk mierzył się ze złożonością stosowanego w literaturze protokołu, umiejętne „żonglowanie" wachlarzem możliwości oferowanych przez zastosowane narzędzia informatyczne, w tym niewątpliwie stosowanie skryptów w *Python* czy koncepcji podejścia KNIME, oraz wielowątkowe, całościowe spojrzenie na uzyskiwane wyniki i wyciągane wnioski, budzą u Recenzenta pełne uznanie i dowodzą wysokich kompetencji naukowych i interpersonalnych (w kontekście pracy zespołowej) cechujących Autora ocenianej rozprawy. W publikacji **VI** mgr Jończyk nakreślił sposób wiązania dla każdego z użytych ligandów referencyjnych, tj. imidazolowych i nieimidazolowych antagonistów/odwrotnych agonistów receptora H_3: A331440, A349821, ABT239, ciproksyfanu, klobenpropitu, JNJ520785, tioperamidu. Badane ligandy układały się pionowo, wzdłuż helisy piątej (TMH5). Istotne wg Autora wydały się trzy elementy zapewniające dopasowanie do miejsca wiązania receptora: protonowana grupa aminowa w układzie heterocyklicznym, atom tlenu w alifatycznym łączniku oraz rozbudowany układ aromatyczny. Bardzo ważnym wnioskiem okazało się stwierdzenie, iż elementy owe stanowią farmakofor powtarzający się w wielu antagonistach receptora H_3. W tym miejscu pragnąłbym jedynie

nadmienić, iż odwoływanie się w trakcie omawiania wyników do odpowiednich rysunków dokumentujących strukturę omawianych pochodnych w zdecydowany sposób ułatwiłoby lekturę jakże ciekawego tekstu. Ponadto sądzę, iż zwroty typu „Zakładając protonowanie obu amin,..." (str. 38, linia 4) wydają się być niefortunne i powinny raczej wskazywać na atomy azotu (wszakże aminy są klasą połączeń chemicznych, a protonowaniu ulegają w nich heteroatomy). Jednocześnie kierowany ciekawością oczekiwałbym w trakcie dyskusji podczas obrony komentarza co do tego, w jaki sposób Doktorant zapatruje się na analizę ewentualnych słabych wiązań wodorowych w relacji ligand–aminokwas w oparciu o generowane (wszakże na gruncie mechaniki kwantowej, MM) w procedurze dokowania rankingi póz w sytuacji, w której rozdzielczość użytych w pracy plików PDB receptorów M_3 i H_3 wynosiły odpowiednio 2,8 i 3,1 Å?

Znana łacińska maksyma „finis coronat opus" znalazła swoje pełne odzwierciedlenie w **publikacji VII** będącej niejako ukoronowaniem cyklu prac składających się na rozprawę doktorską mgra Jakuba Jończyka. W publikacji tej (nawiasem mówiąc, nie wskazanej w omawianym rozdziale dysertacji) zastosowane testy *in vitro* pozwoliły określić aktywność badanych związków serii A (pochodne 1-[2-tiazolo-5-ylo-(2-aminoetylo)]-4-*n*-propylopiperazyny), B (pochodne 1-[2-tiazolo-4-ylo-(2-aminoetylo)]-4-*n*-propylopiperazyny) bądź C (pochodne 1-fenoksyalkilo-4-(amino)alkilopiperazyny) względem acetylocholinoesterazy (indeks cytotoksyczności IC_{50} osiągał wartości pomiędzy 4,45–48,64 μM) oraz butyrylocholinoesterazy (IC_{50} pomiędzy 3,27–39,68 μM). Cennym spostrzeżeniem okazało się, iż seria A cechowała się większą aktywnością względem AChE, a z kolei seria B – w odniesieniu do BuChE, przy czym niska rozpuszczalność analogów **C8**, **C10**, **C19**, **C21** i **C22** uniemożliwiła praktycznie eksperymentalne wyznaczenie ich IC_{50}. Wyniki dokowania molekularnego badanych układów (białka PDB: 1EVE.pdb i 1POI.pdb o rozdzielczości 2,5 Å odnoszące się odpowiednio do AChE i BuChE) wskazywały, iż związek **A13** w zaobserwowanym ułożeniu wiązał się zarówno w obrębie katalitycznego miejsca aktywnego (CAS) jak i peryferyjnego miejsca anionowego (PAS) acetylocholinoesterazy. Nie bez znaczenia okazała się rola cząsteczki wody 1254. Omawiane w publikacji interakcje odznaczały się istotnym stopniem podobieństwa z zachowaniem referencyjnego donepezylu w kieszeni makroukładu 1EVE.pdb. Z kolei jeden z najbardziej lipofilowych związków (**C20**) okazał się najsilniejszym inhibitorem BuChE w badanej grupie ligandów. Poza tym pochodna **A12** okazała się najsilniejszym antagonistą badanego receptora H_3. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, iż mgr Jończyk pokusił się również o estymację parametrów fizyko-chemicznych mających na względzie przedyskutowanie przenikalności analizowanych

ligandów przez barierę krew mózg, BBB (moduł *QikProp* implementowany w pakiecie *Schrödinger Suite 2017–3*), a następnie swoje wnioski weryfikował na gruncie eksperymentalnych testów PAMPA (ang. *parallel artificial membrane permeability assay*). Optymizm Doktoranta zawarty we wnioskach cytowanej pracy wydaje się zatem być w pełni uzasadniony i balansowany jest poprzez Mickiewiczowskie spojrzenie „szkiełka i oka" i naukową roztropność obejmującą całość wysnutych wniosków, co uznać należy na swoistą kropkę nad „i" w kontekście jakże spójnych i rzeczowych rozważań dotyczących natury interakcji projektowanych przez Autora pochodnych.

W tym miejscu pragnąłbym nadmienić, iż ww. spostrzeżenia oraz refleksje, jak i również dostrzeżone usterki natury lingwistycznej, interpunkcyjnej czy ortograficznej (nierozerwalnie wiążące się z możliwością zaistnienia w przypadku tak wielowątkowych opracowań) mają charakter wyłącznie dyskusyjny i w żadnym stopniu nie umniejszają osiągnięć Doktoranta. Oceniana rozprawa jest owocem wzorowego synergizmu: złożoności zagadnień komputerowego projektowania leków (CADD), wysokiej operatywności Doktoranta, który w wyśmienity sposób dokumentuje na kolejnych stronach dysertacji swój kunszt badawczy, oraz trafnie dobranej metodologii w zakresie chemii obliczeniowej i w ogólnym kształcie egzemplifikuje niewątpliwe wsparcie Pana Promotora i Współpracowników zespołu badawczego. Gratulując osiągnięć, nadmieniam, iż rozprawa doktorska mgra Jakuba Jończyka spełnia kryteria ustawodawcy stawiane tego typu opracowaniom w rozumieniu *ustawy* z dnia 14 marca 2003 r. *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. 2017 r. poz. 1789). Jednocześnie z pełnym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pana mgra Jończyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego zmierzających do skutecznego nadania Mu zasłużonego stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych. Ponadto z racji spełnienia kryteriów stawianych rozprawom doktorskim przez Wysoką Radę Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ wnioskuję o wyróżnienie ocenianej dysertacji, przedstawiając uzasadnienie w osobno załączonym wniosku.

Jacek Kujawski

dr hab. Jacek Kujawski