



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Tomasza Wichura

„Synthesis and characterization of novel multifunctional ligands aiming at symptoms and causes of Alzheimer's disease”

wykonanej w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej,
pod kierunkiem dr hab. Anny Więckowskiej.

Pierwszym i zarazem najważniejszym etapem poszukiwania nowego leku jest wytypowanie właściwego celu molekularnego – zazwyczaj receptora lub enzymu uczestniczącego w patomechanizmie danej choroby. Najczęściej typuje się pojedynczy cel molekularny, którego funkcjonowanie ma zostać zahamowane lub pobudzone za pomocą odpowiednio zaprojektowanego ligandu. Z drugiej strony, w niektórych schorzeniach o złożonej etiologii celowe może być wytypowanie dwóch lub więcej celów molekularnych. W takich wypadkach, możemy zastosować politerapię. Jest to podejście szeroko stosowane, jednak w celu uniknięcia potencjalnych problemów związanych m.in. z niejednakową farmakodynamiką i farmakokinetyką różnych cząsteczek chemicznych, można zaprojektować pojedynczy ligand zdolny do modulowania wszystkich obranych celów molekularnych.

W ten kierunek wpisują się badania przedstawione w pracy doktorskiej mgr Tomasza Wichura, których celem jest poszukiwanie nowych związków o wielokierunkowym działaniu na enzymy, receptory i procesy związane z etiologią choroby Alzheimera. Jak Autor słusznie zaznacza już w tytule swojej dysertacji, tego typu związki powinny nie tylko znosić symptomy choroby, ale również eliminować jej przyczyny. Badania opisane w pracy obejmują

mw

zaprojektowanie dwóch grup nowych związków o wielokierunkowym mechanizmie działania, ich otrzymanie na drodze syntezy chemicznej, analizę spektralną oraz opis i interpretację wyników testów *in vitro* i *in silico*. Pierwszą grupę cząsteczek aktywnych stanowią inhibitory β -sekreazy 1 (BACE1) oraz cholinoestereaz (ChE), pochodne 1-benzylopirolidyno-3-aminy. Punkt wyjściowy w projektowaniu tej klasy związków stanowiła pochodna AWJ89, inhibitor BACE1 i BuChE odkryty w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej CM UJ. W swojej pracy, mgr Tomasz Wichur wytypował trzy regiony cząsteczki macierzystej które postanowił modyfikować w sposób racjonalny, przy użyciu klasycznych metod chemii medycznej oraz dokowania molekularnego. Zaprojektowane związki Dyplomant otrzymał na drodze wieloetapowej syntezy chemicznej, stosując sekwencje reakcji takich jak: *N*-alkilowanie, *N*-acylowanie, reakcja Grignarda, redukcja glinowodorkiem litu czy debenzylacja katalizowana palladem. Sekwencje zostały zaplanowane w sposób prawidłowy, oparte są na (przynajmniej teoretycznie) stosunkowo prostej chemii, co w rezultacie umożliwiło otrzymanie odpowiedniej liczby czystych, scharakteryzowanych fizykochemicznie związków (24 związki finalne i 13 związków pośrednich) na potrzeby testów biologicznych i analizy SAR. Wpływ otrzymanych związków na aktywność enzymatyczną została określona za pomocą metod typowo stosowanych, a więc w teście Ellmana (hamowanie ChE) oraz przez pomiar bezpromienistego transferu energii metodą FRET (hamowanie BACE1). W chorobie Alzheimera istotnymi procesami patofizjologicznymi są agregacja amyloidu i białka tau. W związku z tym, w dysertacji słusznie zamieszczono wyniki odpowiednich badań w tym kierunku. Są to badania *in vitro*, oraz, co warto podkreślić, również testy w modelu *in cellulo* przy użyciu bakterii *Escherichia coli* produkujących rekombinowane białka tworzące agregaty. Całość dopełniają wyniki testów w kierunku działania przeciwutleniającego, chelatującego jony metali oraz określenie zdolności otrzymanych związków do usuwania wolnych rodników. Podsumowując swoje badania nad pochodnymi 1-benzylopirolidyno-3-aminy, Doktorant typuje związki **24b** i **25b** jako najbardziej obiecujące, ze względu na silne właściwości antyagregacyjne wobec A β i tau (45%, 49% hamowania agregacji A β i 53%, 54% hamowania agregacji tau, przy stężeniu przesiewowym 10 μ M) oraz hamowanie butyrylocholinoesterazy (IC₅₀ odpowiednio 2,39 μ M i 1,94 μ M). Zaznacza również, że aktywność tej serii pochodnych w kierunku inhibicji BACE1 wymaga dalszej optymalizacji.

Drugą grupę związków aktywnych opisanych w recenzowanej pracy doktorskiej stanowią pochodne indoli będące antagonistami receptora 5-HT₆ o jednoczesnym działaniu inhibującym cholinoesterazy. Podobnie jak w przypadku wcześniej omawianych 1-benzylpiperolidyno-3-amin, punkt wyjściowy przy projektowaniu nowych pochodnych stanowił związek odkryty wcześniej w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej CM UJ, pochodna oznaczona cyfrą **XXI**. W wypadku tej grupy pochodnych indolowych, Dyplomant za cel postawił sobie optymalizację wieloparametryczną, tzn. utrzymanie silnego powinowactwa związku macierzystego do receptorów 5-HT₆, z jednoczesnym zwiększeniem stopnia inhibicji cholinoesteraz i polepszeniem właściwości farmakochemicznych (mierzonych teoretycznymi parametrami 'lekopodobności' Lipinskiego i Vebera). To bardzo trudne zadanie Doktorant realizował przez szereg modyfikacji, dzieląc nowo otrzymane pochodne na dziesięć serii, wykonując syntezę imponującej liczby łącznie 74 finalnych pochodnych. W skrócie można powiedzieć że modyfikacje związku **XXI** były prowadzone w oparciu o klasyczne metody chemii medycznej (m.in. zmiana swobody konformacyjnej, wprowadzanie farmakoforów charakterystycznych dla znanych inhibitorów cholinoesteraz, wprowadzanie grup bioizosterycznych, schemat decyzyjny Toplissa, zwiększanie frakcji atomów węgla sp³ poprzez zmniejszanie ilości pierścieni aromatycznych). W trakcie postępów prac, Doktorant dysponował również dodatkowymi danymi, które umożliwiły projektowanie w oparciu o strukturę kompleksów białko-receptor. Dane te zostały uzyskane przez analizę struktury krystalograficznej białka hBuChE w kompleksie ligandem **84** oraz przez liczne informacje płynące z dokowania molekularnego. Syntezę zaplanowanych związków Dyplomant prowadził wykorzystując prawidłowo obrane sekwencje reakcji (m.in. reduktywne aminowanie, redukcja indoli, *N*- oraz *O*-alkilowanie, *N*-arylowanie, redukcja katalityczna, karbonylowanie), które często wymagały użycia odpowiednich grup protekcyjnych. Przy tej okazji należy zwrócić uwagę na imponującą ilość syntez oraz bogactwo zastosowanej metodyki, której nie sposób omówić dokładnie w krótkim tekście. Otrzymane finalne związki zostały przebadane pod kątem inhibicji cholinoesteraz (metoda Ellmana), wiązalności z receptorem 5-HT₆ (badania radioreceptorowe), inhibicji powstawania agregatów amyloidu i białka tau. W końcu, mgr Tomasz Wichur przedstawia profil właściwości farmakochemicznych otrzymanych przez siebie cząsteczek, opisując je i oceniając pod kątem reguł 'lekopodobności' Lipinskiego i Vebera. Analiza wyników powyższych badań i ich powiązanie ze strukturą badanych

związków (*Structure-Activity Relationship*, SAR) jest niezwykle bogata i odnosi się wrażenie, iż żadna prawidłowość nie ucieka uwadze Doktoranta. W podsumowaniu, Dyplomant typuje najbardziej interesujące związki z omawianych serii pochodnych, m.in. **115** i **124** o zrównoważonym profilu aktywności wobec BuChE i receptora 5-HT₆ (wartości IC₅₀ i K_i odpowiednio równe 90 i 6 nM oraz 5 i 6 nM), z których pierwszy dodatkowo cechuje się korzystnymi parametrami fizykochemicznymi (spełnia reguły Lipińskiego i Vebera). Jeśli chodzi o właściwości antyagregacyjne, Dyplomant zwraca uwagę na związek **62** – silny inhibitor BuChE (IC₅₀ = 454 nM) i antagonistę receptora 5-HT₆ (K_i = 15 nM) o wyraźnych właściwościach hamujących agregację Aβ (68% w teście *in vitro*) i tau (79% w teście *in cellulo*), w stężeniu 10 μM.

Oceniając inne, bardziej techniczne aspekty dysertacji, jest ona lekturą obszerną (ponad 150 stron nie licząc części eksperymentalnej która zawiera dodatkowo ponad 50 stron), jednak lekturą przyjemną. Praca ma bardzo przejrzysty układ i zasadniczo można w niej wyróżnić wstęp teoretyczny, w którym Dyplomant szczegółowo analizuje podejścia terapeutyczne i typuje interesujące cele molekularne w chorobie Alzheimera, a następnie: zwięzły cel pracy, dyskusję wyników i część eksperymentalną. Ta ostatnia jest sporządzona bardzo starannie i zawiera szczegółowy opis użytych metod i pełną charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych pochodnych. Praca jest estetyczna, a czytelność wzorów, rycin i schematów jest wręcz przykładowa. Narracja jest ciekawa, tekst ma odpowiednią płynność a Doktorant doskonale operuje językiem angielskim. Praca jest zaopatrzona w spis literatury zawierający aż 241 pozycji, w zdecydowanej większości opublikowanych w przeciągu ostatniej dekady. W dysertacji nie dopatrzyłem się literówek ani błędów interpunkcyjnych.

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

- 1) Autor dysertacji podsumowuje badania, typując związki Jego zdaniem o najkorzystniejszych aktywnościach, np. **24b**, **25b**, **64**, **115**, **124**. Związki te mają w zasadzie różne profile np. pod względem wiązalności do obranych celów molekularnych. W różnym stopniu mogą hamować agregację beta amyloidu, białka tau, czy chelatować jony. Niektóre związki zostały również wytypowane jako zoptymalizowane pod względem parametrów farmakochemicznych. Nasuwa się tu pytanie – jaki jest pożądany efekt końcowy w badaniach nad tego typu

związkami działającymi wielokierunkowo. Które z wymienionych przez siebie charakterystyk otrzymanych związków Dyplomant uważa za najważniejsze? Czy któryś ze związków uważa za dobrego kandydata do badań klinicznych?

- 2) W wypadku syntezy związków **135-137**, Autor dysertacji zaznacza iż reduktywne aminowanie związku **83** nie przebiegało zbyt dobrze w obecności kwasu octowego, a lepsze wyniki otrzymał On stosując nadmiar DABCO, co jest to dosyć zaskakujące. Czy Dyplomant znajduje wytłumaczenie tego faktu?
- 3) Pewna część badań otrzymanych związków pod kątem ich działania antyagregacyjnego wobec amyloidu i białka tau jest prowadzona *in cellulo* w bakteriach *Escherichia coli*. Autor podkreśla jednoznacznie wady i zalety takich modeli, brak jest jednak informacji na temat czy badane pochodne nie wykazują działania bakteriobójczego/bakteriostatycznego i czy ewentualna aktywność tego typu nie powodowała by zakwalifikowania związków jako *false-negatives*?
- 4) Dyplomant określa otrzymane pochodne związku **XXI** jako antagonistów receptora 5-HT₆. Czy ich aktywność wewnętrzna została zbadana czy też Autor dysertacji zakłada że wprowadzone zmiany w stosunku do cząsteczki macierzystej nie spowodują zmiany aktywności wewnętrznej?

Powyższe uwagi mają raczej charakter dyskusji naukowej i być może sugestii co do możliwych przyszłych badań nad omawianymi pochodnymi. Przez to te uwagi nie wpływają w żaden sposób na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Wichura. Poziom opisanych prac jest bezsprzecznie bardzo wysoki i wnoszą one wkład w stan wiedzy na temat poszukiwania nowych leków przeciw chorobom neurodegeneracyjnym. Badania opisane w ocenianej rozprawie doktorskiej mają charakter multidyscyplinarny, z jasno sprecyzowanym, dużym wkładem doktoranta. Wykorzystane zostały aktualne narzędzia badawcze. W mojej ocenie praca przedstawiona do recenzji ma wysokie walory naukowe i poznawcze. Doktorant przy pomocy wielodyscyplinarnego zespołu zaprojektował, otrzymał i przebadął imponującą ilość związków, w tym pochodne o unikalnych profilach farmakologicznych. Część przedstawionych wyników została już opisana w znakomitej pracy opublikowanej w czasopiśmie *European Journal of Medicinal Chemistry*, wydaje się również że pozostałe dane zostaną opublikowane w równie dobrych publikacjach. Doktorant jest współautorem licznych dobrych prac spoza zakresu niniejszej rozprawy, w tym takich o

charakterze dydaktycznym. Był uczestnikiem międzynarodowych konferencji naukowych. Z tych względów przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie pana mgr Tomasza Wichura do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz dodatkowo wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Warszawa, 31 sierpnia 2020



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

ADIUNKT
Katedra i Zakład Technologii Leków
: Biotechnologii Farmaceutycznej

dr hab. n. farm. Maciej Dawidowski