UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD TECHNOLOGII CHEMICZNEJ ŚRODKÓW LECZNICZYCH

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-30
fax: 61 854-66-39
e-mail: syntezy@ump.edu.pl

Poznań, dnia 15 sierpnia 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: **Novel anilide and benzylamide derivatives as 5-HT$_{1A}$/5-HT$_7$ receptor ligands and phosphodiesterase type 4 and 7 inhibitors with potential precognitive and antidepressant activity**

Imię i nazwisko: **mgr Agnieszka Jankowska**

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: **Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum**

Promotor: **dr hab. Grażyna Chłoń-Rzepa, prof. UJ**

W ramach pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszka Jankowska podjęła się poszukiwań **nowych anilidowych i benzyloamidowych pochodnych amin cyklicznych jako ligandów dla receptorów 5-HT$_{1A}$/5-HT$_7$ i zarazem inhibitorów fosfodiesterazy typu 4 i 7 o potencjalnej aktywności prokognitywnej i przeciwdepresyjnej.** Tematyka badawcza wydaje się niezwykle istotna w obliczu dużego zapotrzebowania na skuteczne i bezpieczne leki do rozwikłania problemu chorób, z którymi boryka się neurologia i psychiatria. Tematyka badawcza jest tym bardziej uzasadniona, że problem kondycji psychicznej, leczenia i zapobiegania chorobom neurologicznym i psychicznym jest wciąż aktualny, a obecnie pogłębiony trudnym doświadczeniem COVID-19 i następstwami zdrowotnymi przebycia tej choroby. Dysertacja włącza się w tematykę z jednej strony zagadnień czysto poznawczych zmierzających do opracowania ligandów wielofunkcyjnych o zdolności do działania z kilkoma celami molekularnymi. Z drugiej strony stwarza perspektywy praktyczne znalezienia nowych substancji aktywnych farmaceutycznie o działaniu prokognitywnym i przeciwdepresyjnym. Należy podkreślić, że ten multidyscyplinarny temat jest rozwijany od wielu lat z bardzo interesującymi rezultatami w Katedrze Chemii Farmaceutycznej pod kierunkiem promotora niniejszej pracy, Pani dr hab. Grażyny Chłoń-Rzepa, prof. UJ.

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Jankowskiej stanowi spójne tematycznie 157 stronicowe opracowanie, które zostało napisane bardzo poprawnym naukowym językiem angielskim. Doktorantka na początku dysertacji zawarła kilka ważnych informacji dotyczących sposobu finansowania badań, rozpowszechniania wyników i swojego rozwoju naukowego. Dowiadujemy się więc, że przedstawione badania powstały dzięki wsparciu finansowemu uzyskanemu z Narodowego Centrum Nauki i były realizowane w ramach projektu Preludium 13. Wsparcia finansowego udzieliła ponadto Naukowa Fundacja Polpharmy oraz na wielu płaszczyznach macierzysty Uniwersytet Jagielloński i uniwersyteckie programy realizowane przy wsparciu Unii Europejskiej. Na kolejnych stronach Doktorantka zawarła informację o już częściowym opublikowaniu badań eksperymentalnych z pierwszym autorstwem w trzech czasopismach o uznanej renomie,

jak *Eur. J. Med. Chem.* w 2020 r., *Curr. Med. Chem.* w 2021 r. oraz *Future Med. Chem.* w 2021 r. (ostatnia praca w recenzji w momencie składania dysertacji, została opublikowana online 13.07.2021 r.). Studia literaturowe Doktorantki zostały również doskonale opublikowane w *Curr. Med. Chem.* w 2017, 2018 i dwukrotnie 2020 r. Warto dodać, że poza publikacjami związanymi z pracą doktorską, mgr Agnieszka Jankowska jest współautorką 11 publikacji w czasopismach z chemii medycznej i chemii, a w 7 z nich jest pierwszym lub drugim autorem, a także współautorką 38 wystąpień konferencyjnych. Łączny IF wszystkich publikacji Doktorantki jest doskonały i wynosi 58,081, co przekłada się na 1235 pkt. MNiSW oraz indeks Hirscha 6 i świadczy o Jej dużym zaangażowaniu w naukę.

Praca doktorska zawiera wszystkie wymagane rozdziały, w tym wykaz skrótów, streszczenia w języku angielskim i polskim, wprowadzenie, cel pracy, wyniki i ich dyskusję, wnioski, część eksperymentalną, bibliografię. Kolejność rozdziałów w rozprawie i cytowane piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Rozprawa zawiera starannie przygotowane 41 rycin i 15 tabel, które znacznie ułatwiają zrozumienie omawianych wyników. Piśmiennictwo liczy 224 odnośniki literaturowe, które zostały odpowiednio dobrane i odnoszą się do czasopism naukowych z ostatnich 20 lat.

Doktorantka dokonała właściwego wyboru tematyki do **wprowadzenia**, w którym nakreśliła bardzo obszernie problematykę zaburzeń poznawczych i zaburzeń psychicznych oraz ich terapii. Rozpoczęła od przedstawienia kwestii tych chorób w ujęciu epidemiologicznym wskazując konkretne jednostki chorobowe i ich warianty. Dalej zasygnalizowała istnienie swoistej luki badawczej, związanej z koniecznością opracowania nowych leków z uwagi na brak działania lub zbyt słabe działanie na istniejące schorzenia neurologiczne i zaburzenia psychiczne. Następnie skupiła się na analizie określonych miejsc działania – targetów dla istniejących i potencjalnych substancji aktywnych farmaceutycznie, wskazując szeroko rozumiane białka biorące udział w regulacji stężenia wewnątrzkomórkowego cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu (cAMP) w obszarach mózgu zaangażowanych w procesy związane z pamięcią i nastrojem. Dalej zdefiniowała wśród owych białek receptory serotonionowe i enzymy z grupy fosfodiesteraz (PDE). W kolejnych podrozdziałach zebrała informacje na temat receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT_7, jak i fosfodiesterazy 4 i 7. Doktorantka omówiła agonistyczne i antagonistyczne efekty działania wybranych związków konkludując omówione efekty agonistycznego i antagonistycznego działania na oba receptory jako swego rodzaju paradoks terapeutyczny. *Podczas lektury tej części pracy zastanawiałem się, które z obserwowanych efektów zbliżyłyby nas bardziej do znalezienia substancji czynnej o pożądanym działaniu. Prosiłbym Doktorantkę na publicznej obronie o rozwinięcie tej kwestii.* W kolejnych podrozdziałach Pani mgr Agnieszka Jankowska omówiła fosfodiesterazy 4 i 7, a następnie tematykę leków wielocelowych, określanych także wielofunkcyjnymi – MTDL, w kontekście chorób związanych z zaburzeniami kognitywnymi i nastroju, najpierw skupiając się na wpływie na neurotransmisję serotoninergiczną, a następnie na hamowanie fosfodiesteraz. Zebrany materiał literaturowy został krytycznie przedyskutowany, stąd doskonale wprowadza w kolejne podrozdziały dysertacji. Sprawia, że podjęte w dalszych częściach pracy zagadnienia, zdefiniowany cel, wyniki i ich omówienie oraz wnioski interesująco łączą się z poruszonymi zagadnieniami.

Zaplanowane w **założeniach i celu** pracy badania dotyczyły najpierw zaprojektowania, a następnie otrzymania metodami syntezy chemicznej anilidowych i benzyloamidowych pochodnych amin cyklicznych jako ligandów wielofunkcyjnych receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT_7 oraz inhibitorów fosfodiesteraz PDE_4 i PDE_7 o spodziewanym działaniu prokognitywnym i przeciwdepresyjnym. Cel ten miał był realizowany szczegółowo poprzez (*i*) zaprojektowanie nowych związków z wykorzystaniem modelowania, (*ii*) analizę lekopodobieństwa, (*iii*) otrzymanie związków metodami syntezy chemicznej, (*iv*) analizę SAR, (*v*) wytypowanie najbardziej obiecujących związków do badań biologicznych *in vitro* i *in vivo* oraz (*vi*) dyskusję uzyskanych wyników.

Na początku rozdziału **wyniki i dyskusja**, Pani mgr Agnieszka Jankowska uzasadniła wybór przedmiotu badań i przyjętą strategię MTDL. Badania zostały zaplanowane bardzo racjonalnie. Potencjalne ligandy wielofunkcyjne serii A-D, Doktorantka wyprowadziła od związku hybrydowego H-1. Związek H-1, posiadający w swojej strukturze cechy ligandów działających na receptory 5-HT_{1A}/5-HT_7 oraz inhibitorów PDE_{4B}/PDE_{7A} został opracowany w oparciu o strategię hybrydyzacji molekularnej, wspomaganej badaniami modelowania molekularnego i analizą lekopodobieństwa. Podczas wnikliwej analizy Doktorantka w strukturze H1 wyodrębniła 3 główne fragmenty strukturalne tj. motyw aminowy, motyw alifatycznego łącznika i pierścienia aromatycznego połączonego z grupą amidową i zaproponowała syntezę 4 serii związków z fragmentem arylopiperazynowym w seriach A-C lub 6,7-dimetoksy-1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny w serii D.

W kolejnym etapie mgr Agnieszka Jankowska przystąpiła do studiów syntetycznych. Liczba związków w każdej grupie została bardzo dobrze dobrana biorąc pod uwagę zakładane dalej badania biologiczne i analizę SAR, a więc w serii A 33 związki, w serii B 24 związki, w serii C 20 związków, a w serii D 13 związków. Bibliotekę 90 związków serii A, B, C i D zawierającą zarówno pochodne anilidowe, jak i benzyloamidowe, Doktorantka uzyskała metodami trójetapowej syntezy chemicznej, złożonej z procesów takich jak N-alkilacja, hydroliza zasadowa i kondensacja. Reakcje zostały zoptymalizowane pod względem stosowanych reagentów, szczególnie reakcja kondensacji, jak i wydajności uzyskanych w poszczególnych etapach: N-alkilacja 65-90%, hydroliza zasadowa 50-65% i końcowa kondensacja wraz z przekształceniem produktów po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej w odpowiednie chlorowodorki 55-75%. Poza syntezą klasyczną Doktorantka posiłkowała się syntezą dwuetapową prowadzącą najpierw do otrzymania pochodnych 5-bromo-N-fenylopentamidowych z wydajnościami 85-95%, które dalej kondensowała z pochodnymi fenylopiperazyny stosując metody mikrofalowe i przekształcała w sole z wydajnościami 65-75%. Związki pośrednie i końcowe zostały poddane wnikliwej charakterystyce fizykochemicznej w zakresie tożsamości chemicznej i czystości z wykorzystaniem technik ^1H i ^{13}C NMR, UPLC/MS i analizy elementarnej.

Wszystkie związki serii A-D zostały ocenione w badaniach przesiewowych *in vitro* pod względem powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_7 oraz zdolności do hamowania enzymów PDE_{4B} i PDB_{7A}. Dla biblioteki związków Doktorantka określiła powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_7, różnicując je jako wysokie, umiarkowane i niskie, a także zdolności do inhibicji PDE_{4B} i/lub PDE_{7A}. Bardzo ważna część badań dotyczyła określenia zależności struktura-aktywność w badanych seriach związków z uwzględnieniem konkretnych motywów strukturalnych, takich jak fragment aminowy, długość łącznika alifatycznego i sposobu

podstawienia pierścienia aromatycznego przy grupie amidowej na ich profil farmakologiczny. Zaproponowane modyfikacje związku hybrydowego H-1 znacząco wpłynęły na aktywność związków serii A-D.

Z kolei testy funkcjonalne *in vitro*, które zostały przeprowadzone dla najsilniejszych ligandów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_7 pozwoliły na wyselekcjonowanie najsilniejszych antagonistów receptora 5-HT_{1A} o zróżnicowanych właściwościach antagonistycznych wobec receptora 5-HT_7. Najsilniejsi antagoniści wspomnianych receptorów, którzy wykazywali aktywności hamujące wobec PDE_{4B} i/lub PDE_{7A}, należący do serii A (związki 45, 46, 48) i B (związki 72, 75 i 85) zostali poddani badaniom parametrów ADME, w tym biodostępności i stabilności metabolicznej *in vitro*. Testem PAMPA oceniono zdolność związków do przechodzenia przez błonę biologiczną na zasadzie dyfuzji, a uzyskane wartości współczynnika P_e pozwoliły zaklasyfikować związki jako charakteryzujące się wysoką przenikalnością po podaniu doustnym. Z kolei badania z użyciem frakcji wątrobowej mikrosomów szczurzych zawierających cytochromy P450 pozwoliły na wytypowanie związków o wysokiej stabilności metabolicznej. Doktorantka przeanalizowała także wpływ sposobu podstawienia pierścienia benzenowego we fragmencie amidowym na podatność badanych anilidów na procesy I fazy biotransformacji. *Podczas lektury tej części pracy pojawiła się kwestia kryteriów włączenia związku 91 należącego do serii C do dalszych badań, skoro z Tabeli 12 wynika, że nie określono dla niego parametrów ADME in vitro. Jak została dokonana predykcja, o której wspomina Doktorantka na stronie 66?* Doktorantka wybrała najbardziej obiecujące pochodne anilidowe 48, 72 i 91 do badań *in vivo* na szczurach w zakresie właściwości prokognitywnych i przeciwdepresyjnych. Co jest bardzo istotne, badane związki odwracały zaburzenia pamięci indukowane podaniem MK-801 w teście rozpoznawania nowego obiektu u szczurów, a także wykazywały właściwości przeciwdepresyjne, skracając czas bezruchu w teście wymuszonego pływania. Wielodyscyplinarne badania nabierały coraz większego tempa, a Doktorantka w trakcie realizacji pracy stawiała sobie kolejne wyzwania. Dla związków 48, 72 i 84 mgr Agnieszka Jankowska wykazała właściwości neuroprotekcyjne metodami *in vitro*. Co ważne, wymienione związki z grupy pochodnych anilidowych zmniejszały poziom reaktywnych form tlenu w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu H_2O_2. Przeprowadzone badania *in vitro* i *in vivo* pozwoliły na wytypowanie związków o najkorzystniejszych właściwościach – 48 i 72, który wykazały się właściwościami zarówno prokognitywnymi, jak i przeciwdepresyjnymi i neuroprotekcyjnymi.

W rozdziale **podsumowanie** Pani mgr Agnieszka Jankowska dokonała wnikliwej dyskusji najważniejszych wyników i zwróciła uwagę na istotne aspekty przeprowadzonych badań. W **części doświadczalnej** zawarła ogólną charakterystykę procedur chemicznych, preparatykę związków niepublikowanych, opisała metodykę szczegółowych procedur syntezy oraz ocenę tożsamości nowych związków. Część procedur i charakterystyk została umieszczona w opublikowanych już pracach oryginalnych.

Treść rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Jankowskiej jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Podjęty cel pracy został poprawnie zrealizowany w części eksperymentalnej, przedstawiony w wynikach i ich dyskusji, a także podsumowany. Hipoteza zawarta na początku badań dotycząca w szerokiej perspektywie znalezienia **nowych pochodnych anilidowych i benzyloamidowych amin cyklicznych jako ligandów dla receptorów 5-HT_{1A}/5-HT_7 i zarazem inhibitorów fosfodiesterazy typu 4 i 7 o potencjalnej aktywności prokognitywnej**

i przeciwdepresyjnej na styku stosowania zaawansowanych metod chemii medycznej, chemii organicznej i farmakologii, wydawała się bardzo racjonalna. W miarę postępu prac badawczych została pozytywnie zweryfikowana i doprowadziła do bardzo interesujących wniosków. Wykonane przez mgr Agnieszkę Jankowską multidyscyplinarne badania pozwoliły na zidentyfikowanie interesujących związków aktywnych farmaceutycznie, które zdolne są do jednoczesnej interakcji z receptorami 5-HT_{1A} i 5-HT_7, przy równoczesnym hamowaniu enzymów PDE_{4B} i/lub PDE_{7A}. W świetle obecnego stanu wiedzy tego typu kompleksowe działanie stwarza duże perspektywy aplikacyjne w terapii zaburzeń poznawczych i depresyjnych, towarzyszących zarówno chorobom neurodegeneracyjnym, jak i psychicznym. Dysertacja jest bogata warsztatowo, pokazuje bardzo metodyczne podejście przy otrzymywaniu nowych potencjalnych związków aktywnych farmaceutycznie, począwszy od projektowania, poprzez syntezę chemiczną realizowaną metodami syntezy klasycznej i mikrofalowej, charakterystykę fizykochemiczną nowych ligandów oraz kompleksową ocenę właściwości biologicznych metodami *in vitro*, jak i *in vivo*. Dane eksperymentalne uzyskane w badaniach biologicznych dla nowych związków zostały także krytycznie omówione w kontekście światowego piśmiennictwa i wcześniejszych doświadczeń Współpracowników. Doktorantka bardzo starannie udokumentowała przeprowadzone badania, a także dokonała wnikliwej ich analizy zarówno w zakresie przeprowadzonych syntez, jak i badań biologicznych.

Wyniki przedstawione w dysertacji mają dużą wartość poznawczą dla chemii leków i z pewnością są dobrym punktem wyjścia do planowania dalszych prac. Recenzowana praca wyróżnia się w kilku aspektach: (*i*) Badania zostały przeprowadzone według dobrze przemyślanego schematu i objęły projektowanie, analizę lekopodobieństwa, syntezę chemiczną anilidowych i benzyloamidowych pochodnych amin cyklicznych jako ligandów wielofunkcyjnych o aktywności antagonistycznej względem receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}/5-HT_7 z dodatkową aktywnością hamującą fosfodiesterazę PDE4B lub PDE7A, wraz z analizą SAR oraz badaniami biologicznymi *in vitro* i *in vivo* i pogłębioną dyskusją uzyskanych wyników, (*ii*) Badania doprowadziły do wymiernego efektu poznawczego jakim stało się wyselekcjonowanie dwóch aktywnych związków o aktywności prokognitywnej i przeciwdepresyjnej oraz neuroprotekcyjnej, a uzyskane wyniki dla biblioteki 90 związków są doskonałym punktem wyjścia do dalszych badań poznawczych oraz aplikacyjnych w zakresie ligandów wielofunkcyjnych receptorów serotoninowych i inhibitorów fosfodiesteraz, (*iii*) Doktorantka zastosowała i umiejętnie wykorzystała nowoczesny warsztat badawczy chemii medycznej, zarówno pod względem doboru reagentów, technik syntezy chemicznej, charakterystyki fizykochemicznej oraz prowadzonych badań aktywności biologicznej, (*iv*) Część wyników przedstawionych w dysertacji została doskonale opublikowana w czasopismach z chemii medycznej o uznanej renomie, zarówno w postaci prac oryginalnych, jak i przeglądowych.

Dysertacja jest napisana bardzo poprawnym językiem, zwracam uwagę na drobne kwestie, na które napotkałem w pracy: (*i*) s. 5 – „zsyntetyzowane" - to galizm (fr. *synthétiser*), zalecam po prostu syntezować, (*ii*) s. 9, Fig. 1 – w strukturze befiradolu powinna się znajdować grupa 5-metylopiryd-2-ylometyloaminowa w miejsce pokazanej 4-metylobenzyloaminowej, (*iii*) s. 21, Fig. 13 – w strukturze arypiprazolu grupa 4-[4-(2,3-dichlorofenylo)piperazynylo]butoksylowa jest podstawiona w pozycji 7 pierścienia dihydrochinolin-2-onu, a nie jak pokazano na rysunku w pozycji 6, (*iv*) zarówno w tytule, jak i kilku

miejscach pracy zabrakło doprecyzowania wyrażenia „anilidowych i benzyloamidowych pochodnych", poprzez połączenie z chociażby „amin cyklicznych", (v) Część doświadczalna - Przy przedstawianiu danych ^{1}H NMR, sugerowałbym podawanie stałej *J* po zaokrągleniu do najbliższej wartości 0,5 celem uniknięcia rozbieżności w odczycie stałych *J* z widm na poziomie znacznie przekraczającym błąd ostatniej cyfry znaczącej.

Reasumując uważam, że Pani mgr Agnieszka Jankowska doskonale zmierzyła się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazała się znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym. Moja wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia przez Doktorantkę wiedzy z zakresu syntezy chemicznej i chemii leków. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie mgr Agnieszki Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny z wnioskiem o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.

Tomasz Gośliński

prof. dr hab. Tomasz Gośliński