Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Dr hab. n. farm. Beata Morak-Młodawska, prof. SUM
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec
bmlodawska@sum.edu.pl
tel. 32 364 16 04

Sosnowiec, 20.07.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Pasieka zatytułowanej:

„Aryloalkilowe pochodne alkanoloamin jako inhibitory butyrylocholinoesterazy i beta-sekretazy o potencjalnej aktywności w chorobie Alzheimera"

przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Pasieka została przygotowana w Katedrze Chemii Farmaceutycznej z Zakładem Fizykochemicznej Analizy Leku, Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum w Krakowie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. farm. Barbary Malawskiej. Badania Pani Profesor od wielu lat są skoncentrowane na poszukiwaniu nowych związków organicznych mogących wykazywać potencjał biologiczny w chorobie Alzheimera. Problematyka to jest ściśle związana z badaniami behawioralnymi, dając tym samym możliwość wysokiej aplikacyjności.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Pasieka została przygotowana w formie 188-stronicowej dysertacji zawierającej: informacje o źródłach finansowania projektu, spis treści, streszczenie i anglojęzyczny abstrakt będący kwintesencją prowadzonych badań, spis publikacji objętych rozprawą doktorską, listę stosowanych skrótów, wprowadzenie w tematykę badawczą oparte na wnikliwym przeglądzie literaturowym, jasno sprecyzowany cel rozprawy z postawionymi hipotezami badawczymi, szczegółowy opis badań własnych podzielony na dwie części, z których każda opatrzona jest wyciągniętymi trafnie wnioskami, całościowe podsumowanie wyników, część eksperymentalną, bibliografię oraz dołączone publikacje współautorstwa Doktorantki.

Wymowne są cytowane słowa W. Churchilla: *„Sukces polega na przechodzeniu od porażki do porażki bez utraty entuzjazmu”*, które wskazują, iż Autorka ma pełną świadomość nadzwyczaj trudnej i mozolnej pracy badawczej w interdyscyplinarnym zespole naukowców. Bardzo uprzejme jest również podziękowanie jakie składa Doktorantka Pani Promotor i osobom zaangażowanym w realizacje projektu, które potwierdza istotę zespołowej pracy naukowej. Dodatkowo zostało wskazane zewnętrzne źródło finansowania NCN OPUS 11 Grant Nr. 2016/21/B/NZ7/01744 jak i dwie dotacje dla młodych naukowców dzięki którym, badania mogły zostać zrealizowane.

Rozprawa doktorska została przygotowana w sposób bardzo staranny i przejrzysty. Dobrze zostały uwypuklone uzyskane wyniki uwzględniające zaproponowane metod syntezy organicznej poprzedzone badaniami modelowania molekularnego, wykonane dowody strukturalne, nowatorsko zaprojektowane i otrzymane związki oraz szeroki wachlarz badań biologicznych *in vitro*, *in vivo* i *in cellulo*.

Rozprawę rozpoczyna krótki i bardzo jasno napisany rozdział „Wstęp” poświęcony przeglądowi literaturowemu, w którym na początku Autorka opisuje złożoność choroby Alzheimera, dostępne terapie, kierunki poszukiwań nowych leków oraz najnowsze trendy w terapii złożonej, uwzględniającej strategię ligandów wielofunkcyjnych. Do przygotowania tej części rozprawy Doktorantka wykorzystała 121 pozycji literaturowych z 155 cytowanych, doceniając równocześnie wkład naukowy w tą dziedzinę badań zespołu Pani Promotor. Większość prac cytowanych w tej części tyczy ostatniego dwudziestolecia co jest wskazówką, iż realizowany temat wiąże się z nowoczesnymi trendami badawczymi. Ów przegląd literaturowy jest ściśle związany z publikacją I jak i II współautorstwa Doktorantki:

I. Pasieka A., Panek D., Malawska B. Multifunctional Ligand Approach: Search for Effective Therapy Against Alzheimer's Disease. In: Alzheimer's Disease: Drug Discovery. Huang X (Editor). Exon Publications, Brisbane, Australia. ISBN: 978-0-6450017-0-9, 2020, 181-203,

II. Panek D., Wichur T., Godyń J., Pasieka A., Malawska B. Advances toward multifunctional cholinesterase and β-amyloid aggregation inhibitors. Future Medicinal Chemistry, 2017, 9(15), 1835-1854,

które są przeglądem najnowszych, najbardziej obiecujących ligandów wielofunkcyjnych modulujących przebieg choroby Alzheimera.

W dalszej kolejności zostaje ukazany „Cel i założenia doktoratu”, który bezpośrednio jest związany z rozdziałem „Badania własne”. Praca doktorska skupia się wokół syntezy i badań

właściwości biologicznych nowych, wielocelowych ligandów opartych strukturalnie na molekule wiodącej będącej pochodną hydroksyetylenoaninową, która stała się swoistą inspiracją w podjętych badaniach. Związek ten został wcześniej otrzymany w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku UJ CM w Krakowie, wykazując wysoce obiecujące wyniki hamowania aktywności β-sekretazy, butyrylocholinoesterazy oraz agregacji β-amyloidu jak i białka tau oraz wykazywał równocześnie penetracje przez barierę krew - mózg w teście przepuszczalności przez sztuczną błonę.

Wykorzystując molekułę wiodącą Doktorantka wprowadziła szereg modyfikacji strukturalnych ukierunkowanych na poprawę jak i zrównoważenie aktywności biologicznych. Pochodne miały być inhibitorami β-sekretazy, modulować neuroprzekaźnictwa przekaźników: acetylocholiny (hamowanie butyrylocholinesterazy) oraz kwasu γ-aminomasłowego, co bezpośrednio przekłada się na redukcję złogów β-amyloidu i białka tau. Badania naukowe Doktorantka podzieliła na dwie części:

I. Poszukiwanie nowych ligandów wielofunkcyjnych o potencjalnym wpływie na chorobę Alzheimera, które obejmowały:

projektowanie nowych cząsteczek uwzględniające otrzymane wcześniej wyniki i wsparcie modelowaniem molekularnym; wykonanie syntez biblioteki związków organicznych, dopracowanie warunków, sposobu oczyszczania nowych związków, potwierdzenie ich struktury nowoczesnymi metodami spektroskopowymi; badania biologiczne *in vitro* (test Ellmana w celu oceny hamowania cholinesteraz, fluorymetryczny test typu FRET – hamowanie β-sekretazy, test tioflawinowy w celu określenia właściwości antyagregacyjnych, test wychwytu [3H] GABA – hamowanie transporterów GAT); analizę otrzymanych wyników i przeprowadzenie analizy zależności struktura-aktywność jak i badania krystalograficzne, toksyczność, stabilność metaboliczna, wpływ na izoformy CYP450; badania *in vivo* (ocena parametrów farmakokinetycznych, badania farmakologiczne).

II. Ocena właściwości antyagregacyjnych *in cellulo* przy użyciu rekombinowanych bakterii *Escherichia coli* z nadekspresją określonego białka (tau, β-amyloidu) dla wcześniej otrzymanych związków, które skupiły się na testach i szczegółowej analizie zależności struktura-aktywność.

Doktorantka wykonując pracę chemika syntetyka, organika, otrzymała bibliotekę 96 nowych pochodnych, które zostały oczyszczone chromatograficznie prze użyciu chromatografii kolumnowej typu *flash* jak i HPLC, scharakteryzowane strukturalnie, z

wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi spektralnych tj analiz: ^{1}H, ^{13}C NMR, LC-MS jak i analizą rentgenostrukturalną związku **74**. Doktorantka dodatkowo zetknęła się z trudnym zadaniem rozdziału związków enancjomerycznych **39**, **40** (*S*) i (*R*), które dokonała w oparciu o wysokosprawną chromatografię cieczową. Pragnę zwrócić uwagę, że otrzymanie takiej liczby nowych związków organicznych, a zwłaszcza synteza była zadaniem trudnym. Została zaprojektowana wnikliwie i logicznie z dużą wiedzą chemii organicznej, związaną z mechanizmami przebiegających reakcji i zrealizowana w sposób wysoce profesjonalny.

W dalszej kolejności dla wszystkich otrzymanych związków zostały wykonane badania biologiczne *in vitro*, oceniające aktywność biologiczną w kierunku hamowania cholinoesteraz, BACE-1 oraz agregacji β-amyloidu, a dla wybranych pochodnych zahamowania transporterów GABA oraz agregacji białka tau. Wszystkie uzyskane wyniki potwierdziły, poprawność założeń, a wykonane modyfikacje strukturalne poprawiły aktywność biologiczną nowych cząsteczek wobec wybranych celów biologicznych. Doktorantka wybrała najbardziej aktywne pochodne, dla których opisała zależność struktura - aktywność. Na podstawie szerokiej gamy badań biologicznych wskazała trzy nadzwyczaj obiecujące pochodne o zbalansowanym działaniu w chorobie Alzheimera tj.: związki **60**, **94** oraz (*R,S*)-**108,** które w obszernej bibliotece pochodnych można nazwać swoistymi „brylantami". Na uwagę zasługuje fakt, iż cząsteczka (*R,S*)-**108** uzyskała ochronę patentową, a badania nad nią są kontynuowane w projekcie PRELUDIUM 19 „*Nowe lekopodobne ligandy wielofunkcyjne działające na cele biologiczne związane z objawami i przyczynami choroby Alzheimera*" finansowanym przez NCN oraz projekcie TANGO 4 „*Opracowanie i rozwój innowacyjnej cząsteczki JT-3 jako zastosowaniestrategii ligandów wielofunkcyjnych w farmakoterapii choroby Alzheimera*" finansowanym przez NCBiR.

Dodatkowo 24 pochodne hydroksyalkiloaminowe zostały poddane badaniom *in cellulo* przy użyciu rekombinowanych bakterii *Escherichia coli* z nadmierną ekspresją amyloidu Aβ42 lub białka tau o pełnej długości łańcucha polipeptydowego. Badania te pozwoliły Doktorantce wskazać silnie dualne inhibitory agregacji z niewielką przewagą w kierunku hamowania agregacji białka tau. Autorka wskazała związek **121**, jako najbardziej obiecującą molekułę. W opinii recenzenta ta ścieżka badawcza jest wysoce interesująca i stanowi kolejny aspekt rozwojowy tego kierunku badań.

Należy zwrócić uwagę, iż opisane badania zostały wykonane w kooperacji ze światowymi jednostkami naukowymi tj.:

- Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic,
- Departement de Toxicologie et Risques Chimiques, Institut de Recherche, Bretigny sur Orge, France,
- Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia,
- Department of Pharmacology & Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, China,
- Department of Pharmacy - Center for Drug Research, Ludwig-Maximilians-Universiteat München, Munich, Germany,
- Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical-Chemistry, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Spain
- Institute of Nanoscience and Nanotechnology, Barcelona, Spain,

oraz z uruchomieniem trzech źródeł finansowania (tym grantu NCN), co wskazuje na wysoką rangę prowadzonych badań. Dodatkowo materiał ten jest tematem kolejnych dwóch publikacji naukowych III, IV zaprezentowanych na łamach światowej rangi czasopism:

III. Pasieka A., Panek D., Jończyk J., Godyń J., Szałaj N,. Latacz G., Tabor J.,Mezeiova E., Chantegreil F., Dias J., Knez D., Lu J., Pi R., Korabecny J.,Brazzolotto X., Gobec S., Höfner G., Wanner K., Więckowska A.,Malawska B. Discovery of multifunctional anti-Alzheimer's agents with aunique mechanism of action including inhibition of the enzyme butyrylcholinesterase and γ-aminobutyric acid transporters. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 218, 113397,

IV. Pasieka A., Panek D., Szałaj N., Espargaró A., Więckowska A., Malawska, B., Sabaté R., Bajda M. Dual inhibitors of amyloid-β and tau aggregation with amyloid-β disaggregating properties: extended in cellulo, in silico and kinetic studies of multifunctional anti-Alzheimer's agents. ACS Chemical Neuroscience, 2021, 12, 11, 2057–2068.

Całość rozprawy została zwieńczona rozdziałem *„Podsumowanie"*, w którym Autorka precyzuje starannie wnioski z wykonanych prac badawczych oraz potwierdza pozytywną weryfikację hipotezy badawczej. Można śmiało stwierdzić, iż uzyskane wyniki badawcze są nowatorskie, innowacyjne i wysoce obiecujące. Jako Recenzent wysoko oceniam ogrom pracy syntetycznej zrealizowany przez Doktorantkę w laboratorium chemii organicznej, umiejętność dokonywania wnikliwych analiz strukturalnych jak i pracy w interdyscyplinarnym zespole naukowców. Dodatkowo przeprowadzone badania bardzo właściwie wpisują się w aktualną tendencję związaną z chorobami cywilizacyjnymi.

Czytając rozprawę doktorską przygotowaną przez Panią mgr Annę Pasieka należy podkreślić, iż została ona napisana bardzo starannie. Z obowiązku Recenzenta wspomnieć muszę o drobnych błędach edytorskich: zapis danych NMR w języku polskim powinien zawierać przecinki a nie kropki tak jak to ma miejsce w języku angielskim, nazwisko Chrisa A. Lipinskiego twórcy „reguły pięciu" powinno być pisane z literą „n" a nie „ń". Błędy te w niczym nie umniejszają wartości przedstawionej rozprawy, która w opinii Recenzenta zasługuje na bardzo wysoką ocenę.

Analizując czas realizacji badań wykonanych przez Doktorantkę (lata 2016-2021), okres światowej pandemii jak i rozpatrując całkowity dorobek naukowy Doktorantki, w którego skład wchodzi dziewięć prace opublikowanych w czasopismach o zasięgu ogólnoświatowym w latach 2016-2021 o sumarycznym **IF=34,914 (Indeks Hirscha = 5)**, współautorstwo dwóch zgłoszeń patentowych, udział w monografii, uczestnictwo w konferencjach naukowych jak i krótki staż naukowy na Uniwersytecie w Barcelonie, w Hiszpanii, stwierdzam, iż dorobek ten jest wysoce imponujący. Prace te już zostały odnotowane w literaturze co potwierdza Indeks Hirscha, co jest dużym osiągnięciem jak na tak młodego badacza. Doktorantka podnosiła także swoje kwalifikacje, co uważam, że pozytywnie wpłynęło na jej rozwój osobowy.

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pani mgr Anny Pasieka spełnia wszelkie wymagania Ustawy o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych. Zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze oryginalność przedstawionych badań, ich multidyscyplinarny charakter jak również ogólnie bardzo wysoki dorobek naukowy Doktorantki zwracam się do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Pasieka. Wniosek o wyróżnienie przesyłam również w odrębnym dokumencie.

Sosnowiec, dnia 20 lipiec 2021 r. Dr hab. n. farm. Beata Morak-Młodawska, prof. SUM

PROFESOR SUM BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
dr hab. n. farm.
Beata Morak-Młodawska prof. SUM