Prof. dr hab. Jarosław Polański
Instytut Chemii Uniwersytetu Śląskiego
ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice

Katowice, 27 sierpnia 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Anny Pasieki pt. „Aryloalkilowe pochodne alkanoamin jako inhibitory butyrylocholinoesterazy i betasekretazy o potencjalnej aktywności w chorobie Alzheimera"

Przedstawione w recenzowanej pracy wyniki nawiązują do tematyki badań promotora rozprawy prof. Barbary Malawskiej. Tematyka tych prac od lat związana jest między innymi właśnie z problemami syntezy i projektowania nowych leków w tytułowej klasie. Warto podkreślić także fakt, że praca finansowana była z grantów, w szczególności grantu NCN OPUS 11 2016/21/B/NZ7/01744 (2017-2021) oraz dwukrotnie z dotacji dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich w okresie 2017-2018 oraz 2019 do teraz.

Cząsteczka chemiczna jest podstawowym obiektem badań chemicznych. Mimo olbrzymich postępów synteza cząsteczek wciąż przysparza wielu trudności a chemicy wierzą, że wciąż pozostaje ona sztuką. Z drugiej strony obserwujemy stały wzrost liczby znanych i opisanych w bazach danych związków chemicznych. Ich liczba sięga setek milionów. Pociąga to za sobą inflację znaczenia związku chemicznego. Problemem jest natomiast tzw. produkcja właściwości, czyli poszukiwanie cząsteczek chemicznych o określonych właściwościach. W tak określonym zadaniu Doktorantce udało się osiągnąć sukces. Otrzymała aktywne związki potencjalnie przydatne w farmacji. Ten fakt decyduje o znaczeniu opisywanych badań. Doktorantka nie poprzestaje przy tym w pracy na pomiarze jednej właściwości biologicznej, prowadząc pomiary aktywności badanych związków w wielu różnych kierunkach.

Pracę otrzymałem w postaci książki wydanej nakładem wydawnictwa *Rozprawa doktorska, Kraków 2021*. Konstrukcja rozprawy jest typowa dla pracy doktorskiej. Składa się z trzech części: literaturowej, omówienia wyników oraz części eksperymentalnej. Pracę, która liczy 188 stron, uzupełniają cztery publikacje współautorstwa Doktorantki. Autorka cytuje 155 pozycji literaturowych.

W części literaturowej Doktorantka omawia problemy złożone z patomechanizmami choroby Alzheimera oraz dostępnymi terapiami tego schorzenia, opisanymi w literaturze hipotezami etiologii tego schorzenia jak np. teoria złogów amyloidowych. Dostępne obecnie terapie są wyłącznie objawowe. Na rysunku 2 przedstawia dostępne leki, donepezil, rywastygminę, galantaminę i memantynę, a w tekście rozprawy omawia szczegółowo ich mechanizm działania. Dalej Autorka przedstawia potencjalne nowe leki. Potencjalny lek w nomenklaturze kandydat na lek to związek chemiczny w zaawansowanym stadium badawczym. W szczególności Autorka omawia różne strategii metody projektowania ligandów w tym w szczególności strategię ligandów wielofunkcyjnych. Rysunek 7 przedstawia schemat takiej strategii dla cząsteczki ladostigilu – wielofunkcyjnego inhibitora cholinoesteraz. Ta część stanowi bardzo zgrabnie napisane studium literaturowe. Dojrzały język naukowy, poprawne sformułowania są potwierdzeniem wysokiego poziomu tego fragmentu. Dodatkowym atutem jest przeglądowa publikacja poświęcona temu tematowi współautorstwa Doktorantki, Advances toward multifunctional cholinesterase and β-amyloid aggregation inhibitors, FUTURE MEDICINAL CHEMISTRYVOL. 9, NO. 15 (2017). Publikacja ta została załączona do pracy pod numerem drugim.

W części badawczej formułuje cel pracy (str. 31), którym była synteza nowych wielofunkcyjnych ligandów hydroksyetylenoaminowych oraz badania ich aktywności biologicznej w etiopatogenezie choroby Alzheimera. Warto podkreślić, że Autorka nie zapomina przy tym omówić stosowanej metody projektowania, którą w największym skrócie można określić jako *metodę liganda wielofunkcyjnego* projektowanego w oparciu o struktury znanych aktywnych analogów monofuncyjnych. Jako cele modyfikujące choroby zostały wybrane β-amyloid i białko tau. Proces powstawania złogów amyloidu miał być blokowany na dwóch etapach: poprzez hamowanie enzymu β-sekretazy oraz przez hamowanie samego procesu agregacji. Efekt łagodzenia objawów planuje Autorka osiągnąć poprzez modulowanie neuroprzekaźnictwa: acetylocholiny (hamowanie butyrylocholinesterazy) oraz kwasu γ-aminomasłowego (blokowanie transporterów GAT). Rysunek 8 schematycznie przedstawia budowę nowych ligandów. Na stronie 33 Autorka omawia szczegółowo zadania interdyscyplinarnego projektu badawczego realizowanego przez siebie w ramach pracy doktorskiej. Ponadto na stronie 34 umieszcza schemat ilustrujący zadania opisane w

części badania własne. Ten fragment znowu napisany jest niezwykle precyzyjnie, pozwalając czytelnikowi zrozumieć stawiane cele i zadania pracy.

Strony 35-128 są opisem badań własnych Doktorantki. Ponownie czytelnika uderza ład i klarowność opisu. Rozdział 3 rozpoczyna opis projektowania syntezowanych związków. Strukturą wiodącą zwaną w tym miejscu przez Autorkę wyjściową jest związek 1, którego cząsteczka składa się z trzech elementów: fragmentu A - ugrupowania 3,3-difenylopropylowego, fragmentu B - rdzenia 2-hydroksypropylo-1-aminowy oraz fragmentu C - ugrupowania 3-tert-butylobenzyloaminy. Warto zauważyć, że podobną strategię Autorka opisała w wieloautorskiej pracy [122] opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie ACS, D. Panek, A. Więckowska, J. Jończyk, J. Godyń, M. Bajda, T. Wichur, **A. Pasieka,** D. Knez, A. Pišlar, J. Korabecny, O. Soukup, V. Sepsova, R.Sabaté, J. Kos, S. Gobec, B. Malawska, Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 1-Benzylamino-2-hydroxyalkyl Derivatives as New Potential Disease-Modifying Multifunctional Anti-Alzheimer's Agents, ACS Chem. Neurosci. 9 (2018) 1074–1094. Praca doktorska zachowuje taki schemat wielofunkcyjności cząsteczki, a charakterystyka nowych pochodnych i wprowadzanych modyfikacji jest także zgodna ze stosowaną w w/w publikacji. Jej schemat Autorka pokazuje na rysunku 10. Na rysunku 11 przedstawiono obrazowanie *in-silico* wiązania projektowanych związków (związek I) z enzymami hBACE-1 oraz eqBuChE. Seria I zaprojektowanych związków zawierała dodatkowe ugrupowanie benzylowe wprowadzone w pozycji 2 rdzenia hydroksyetylenoaminowego – fragment B (Rysunek 12). W szeregu II Autorka wyodrębnia dwie podserie, II oraz IIa, w których wprowadzono dodatkowy fragment benzylowy a wiązania aminowe łączące fragment A z fragmentem B zmodyfikowano do wiązania amidowego. Celem takiej modyfikacji było zróżnicowanie atomów azotu oraz uzyskanie podobieństwa projektowanych pochodnych do naturalnych peptydowych substratów β-sekretazy. Modyfikacje te uzasadnione były wcześniejszymi symulacjami *in silico*. Kolejne serie testowanych połączeń stanowiły seria III – amidowe pochodne związku I, seria IV – fluorenowe analogi serii II oraz seria V, w której fluoren został bezpośrednio połączony przez grupę aminową z fragmentem B. W szczególności to związek (R,S)-108 z serii V okazał się szczególnie interesujący w testach biologicznych i jego analogi (seria VI) wytypowane zostały jako przedmiot szczegółowych badań (rysunek 15). Na stronach 43-50 Autorka omawia syntezy badanych połączeń. Na stronach 51-123 omawia z kolei aktywności badanych połączeń,

zależności struktura-aktywność, konfrontując otrzymane wyniki rezultatami symulacji in silico. Warto tu podkreślić, że Autorka testuje rożne typy aktywności biologicznej badanych związków, w tym hepatotoksyczność, stabilnośc metaboliczną, farmakokinetykę, czy toksyczność ostrą. Bada także struktury krystalograficzne najaktywniejszych inhibitorów BuChE. Te ostatnie badania wykonano w jednym ze współpracujących laboratoriów francuskich.

Zastanawiam się nad znaczeniem projektowania in silico syntezowanych pochodnych. Na ile otrzymane pochodne wynikały z intuicyjnego mieszania struktur mono-funkcyjnych, a w jakim stopniu można było *a priori* prognozować ich aktywność poprzez dopasowanie do odpowiednich receptorów (enzymów). Na ile takie symulacje sprawdzają się w przypadku badanych serii.

Najważniejszym wynikiem pracy (wnioski str. 124) było zidentyfikowanie dualnych inhibitorów agregacji amyloidu-beta oraz białka tau, o niewielkiej dominacji hamowania agregacji białka tau. Znaczenie tego odkrycia podkreśla publikacja (IV), która ukazała się w 2021 roku w czasopiśmie ACS Anna Pasieka, Dawid Panek, Natalia Szałaj, Alba Espargaró, Anna Więckowska, Barbara Malawska, Raimon Sabaté, Marek Bajda, 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 Chem Neurosci. 2021 Jun 2;12(11):2057-2068.

Na uwagę zasługuje także precyzyjny opis przeprowadzonych eksperymentów w części doświadczalnej (str.129-174), gdzie Autorka opisuje metody syntez, metodę rozdziału mieszaniny racemicznej **40,** podając także widma otrzymanych połączeń. Wiele z opisywanych połączeń to struktury stereoizomeryczne. Autorka syntezuje je w postaci czystych stereoizomerów, bezpośrednio na drodze syntezy lub poprzez rozdziały chromatograficzne uzyskanych mieszanin produktów. W części doświadczalnej Doktorantka opisuje także metody badań aktywności biologicznej syntezowanych połączeń.

Na podkreślenie zasługuje ogromna liczba eksperymentów wykonanych przez Doktorantkę. W toku prac otrzymała ona około 100 związków. Ich wydzielenie, oczyszczenie, identyfikacja oraz potwierdzenie struktury potrafię docenić, ponieważ

sam zajmuję się syntezą chemiczną i doskonale wiem jak trudne to zadanie. Sama lektura opisanych w pracy eksperymentów syntetycznych jest żmudnym przedsięwzięciem. Nawet pełny zarys pracy, która opisana jest w kilku obszernych publikacjach, trudno jest omówić w tak krótkiej recenzji. Podsumowując, bardzo dobra i ciekawa praca, która prowadzi do sukcesu badawczego i publikacyjnego. Trudno znaleźć jej słabsze strony. Udało mi się np. odnaleźć błędną numerację stron (od 181-188).

Jakość pracy potwierdzają załączone publikacje, w których przedstawiono wyniki badań:

1. Monografia: Anna Pasieka, Dawid Panek, Barbara Malawska, Multifunctional Ligand Approach: Search for Effective Therapy Against Alzheimer's Disease, w: Alzheimer's Disease: Drug Discovery. Huang X (Editor). Exon Publications, Brisbane, Australia, ISBN: 978-0-6450017-0-9,
2. Dawid Panek, Tomasz, Wichur, Justyna Godyń, Anna Pasieka, Barbara Malawska, Advances toward multifunctional cholinesterase and β-amyloid aggregation inhibitors, FUTURE MEDICINAL CHEMISTRYVOL. 9, NO. 15 (2017)
3. Anna Pasieka, Dawid Panek, Jakub Jończyk, Justyna Godyń, Natalia Szałaj, Gniewomir Latacz, Julia Tabor, Eva Mezeiova, Fabien Chantegreil, José Dias, Damijan Knez, Junfeng Lu, Rongbiao Pi, Jan Korabecny, Xavier Brazzolotto, Stanislav Gobec, Georg Höfner, Klaus Wanner, Anna Więckowska, Barbara Malawska, Discovery of multifunctional anti-Alzheimer's agents with a unique mechanism of action including inhibition of the enzyme butyrylcholinesterase and γ-aminobutyric acid transporters, European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 218, 2021, 113397,
4. Anna Pasieka, Dawid Panek, Natalia Szałaj, Alba Espargaró, Anna Więckowska, Barbara Malawska, Raimon Sabaté, Marek Bajda, 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 Chem Neurosci. 2021 Jun 2;12(11):2057-2068.

W powyższym wykazie celowo zachowałem pełną formę z uwzględnieniem wszystkich autorów, by lepiej zilustrować znaczenie dorobku Doktorantki. Doskonałe czasopisma,

międzynarodowe zespoły autorskie, w których pani Anna Pasieka znajduje się często na pierwszym miejscu. To imponujący dorobek na etapie doktoratu. Dopiero jednak załączony wykaz publikacji obrazuje pełny dorobek Doktorantki: 9 publikacji, łączny IF - 34.914, Łączna ilość punktów MNiSW, 920, Indeks Hirscha, 5. To dwie publikacje w prestiżowych czasopismach ACS oraz dwie publikacje w European Journal of Medicinal Chemistry.

Konkludując, w recenzji bardzo skrótowo przeanalizowałem treści recenzowanej pracy. Zakres prowadzonych prac oraz ich wyniki budzą uznanie. Ich wykonanie wymagało biegłości w projektowaniu leków, wykonywaniu prac syntetycznych, technik identyfikacji związków organicznych, badania aktywności biologicznej leków. Praca napisana jest w sposób interesujący i przejrzysty. Można nawet powiedzieć, że jest fascynującą lekturą. Zza jej kart widać głęboką wiedzę i zaangażowanie młodej uczonej.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytułach naukowych, w związku z czym wnoszę o dopuszczenie pani Anny Pasieki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc zaś pod uwagę merytoryczną wartość pracy, sądzę, że warto wyróżnić przygotowaną przez Doktorantkę rozprawę. Wniosek o wyróżnienie uzasadniania wysoki poziom merytoryczny pracy, która wnosi istotny wkład **w chemię medyczną** dualnych inhibitorów agregacji amyloidu-beta oraz białka tau względem butyrylocholinoesterazy i betasekretazy o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera. Dorobek pani Anny Pasieki, w szczególności dziewięć (w trzech pani Pasieka jest pierwszym autorem) publikacji w prestiżowych czasopismach chemii medycznej, znacznie wykracza poza poziom wymagany na poziomie doktoratu.

Jarosław Polański