UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Zakład Biotechnologii
15-089 Białystok, ul. Kilińskiego 1
Tel. (85) 748-57-00, FAX (85) 879-57-18

Anna.Bielawska@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bielawska **Białystok, 31.07.2023**

Ocena pracy doktorskiej mgr Annamarii Lubelskiej pt. "**Ocena parametrów ADMET wybranych ligandów receptorów serotoninowych z grupy pochodnych hydantoiny i 1,3,5-triazyny**"

Na przestrzeni dziesięcioleci właściwości związków związane z absorpcją, dystrybucją, metabolizmem, wydalaniem i toksycznością (ADMET) stały się jednym z najważniejszych zagadnień w ocenie oddziaływania leków na ludzki organizm. Pod koniec lat 90-tych XX wieku wykazano, że słaba farmakokinetyka i toksyczność związków wiodących jest jedną z głównych przyczyn kosztownych niepowodzeń przemysłu farmaceutycznego na ostatnich etapach wprowadzania leku na rynek. Stało się nowym paradygmatem, że badania te powinny być brane pod uwagę na jak najwcześniejszym etapie odkrywania leków. Ponadto, konieczność wycofania kilkunastu preparatów z rynku z powodu słabych parametrów ADMET zwiększyło presję na regulacje prawne i przemysł farmaceutyczny, aby poprawić testy bezpieczeństwa przedklinicznego potencjalnych leków. Można tu nadmienić, takie preparaty jak : Rosiglitazone (Avandia) - lek na cukrzycę, wycofany z rynku ze względu na związek ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym, Lapatinib (Tykerb) – wycofany lek na raka piersi, gdyż obserwujemy poważne wysypki skórne oraz wysokie ryzyko zakażenia i uszkodzenia płodu. Exenatide (Byetta)- lek na cukrzycę został wycofany z rynku ze względu na jego słabe właściwości farmakokinetyczne i potencjalny niekorzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Ponadto, Sibutramine (Meridia) - lek na odchudzanie został wycofany z rynku ze względu na jego właściwości ADMET, które prowadziły do zwiększonego ryzyka poważnych problemów kardiologicznych. Badania ADMET mają więc kluczowe znaczenie dla akceptacji leku, co potwierdza obserwowane w ostatnich latach ograniczenie liczby odrzuconych związków na końcowych etapach akceptacji rynkowej leków po włączeniu badań ADMET do

wczesnych etapów poszukiwania kandydatów na nowe chemioterapeutyki. Zanim badania ADMET zostały w latach 90-tych XX wieku formalnie wprowadzone do procesu optymalizacji przedklinicznej, około 40% związków wiodących odpadało z powodu niepożądanej farmakokinetyki u ludzi. W chwili obecnej liczba odrzuconych związków na końcowym etapie badań spadła do około 10%. Gdy badania ADMET *in vitro* stają się coraz bardziej pracochłonne i czasochłonne, tańsze techniki *in silico* są rutynowo stosowane w ich zastępstwie. Wyniki tych badań dają empiryczną podstawę do uszeregowania związków planowanych do syntezy organicznej i otrzymania związku wiodącego w mniejszej liczbie iteracji syntetycznych. Jednocześnie należy pamiętać, że w ostatnich latach chemia kombinatoryczna i wysokowydajne badania przesiewowe dostarczają nam wzrastającej liczby potencjalnych kandydatów na leki i badania ADMET stają się pierwszym testem eliminującym związki nieprzydatne do dalszych badań.

Coraz częściej badania ADMET w przemyśle farmaceutycznym są przeprowadzane poprzez szeregi zautomatyzowanych testów *in vitro* przy zastosowaniu robotyki i miniaturyzacji. Ponadto wykorzystuje się modele *in silico* przetestowane na zbiorach związków z wykorzystaniem algorytmów sztucznej inteligencji. Dobre modele predykcyjne parametrów ADMET zależą w znacznym stopniu od wyboru odpowiedniego podejścia matematycznego, odpowiednich deskryptorów molekularnych i wystarczająco dużego zestawu danych eksperymentalnych dla walidacji modelu predykacyjnego. Stale pogłębia się zrozumienie, które z dostępnych deskryptorów i narzędzi bioinformatycznych są najbardziej odpowiednie dla tego typu badań, chociaż często wydaje się, że istnieją różne opcje obliczeniowe o podobnej mocy predykcyjnej. Według niedawno opublikowanego raportu na temat technologii *in silico*, do 2030 roku ok. 25% wydatków na badania i rozwój farmaceutyczny będzie przeznaczonych na symulacje komputerowe i modelowanie, a odsetek ten ma wzrosnąć do 30% do 2050 roku. Wydaje się jasne, że jako całość, krajobraz badań i rozwoju przemysłu farmaceutycznego będzie się dalej zmieniał, a metody ADMET będzie częścią tej zmiany. W ciągu kolejnych 10 lat stopień automatyzacji w tradycyjnych działach badających metabolizm leków będzie nadal wzrastał, a w pełni zautomatyzowane testy *in vitro* o średniej i dużej przepustowości będą wykorzystywane obok modelowania *in silico* i metaanaliz baz danych.

W świetle przytoczonych faktów wybór tematu pracy doktorskiej mgr Annamarii Lubelskiej pt. "Ocena parametrów ADMET wybranych ligandów receptorów serotoninowych z grupy pochodnych hydantoiny i 1,3,5-triazyny" jest istotny, aktualny i interesujący, o dużych walorach praktycznych. Tematyka doktoratu obejmuje istotny terapeutycznie temat poszukiwania nowych ligandów serotoninowych receptorów 5-HT_6 i 5-HT_7. Serotonina jest

głównym neuroprzekaźnikiem wywołującym szereg istotnych efektów biologicznych poprzez interakcję z siedmioma populacjami receptorów 5-HT, od 5-HT_1 do 5-HT_7. Prace nad receptorami 5-HT doprowadziły do wprowadzenia szeregu leków, zaś kolejne związki są w badaniach klinicznych. Szczególnie istotne z terapeutycznego punktu widzenia są ligandy receptorów 5-HT_6 i 5-HT_7. Receptory te są zaangażowane w szereg procesów chorobotwórczych w tym: schizofrenię, zaburzenia konwulsyjne, zakłócenia pamięci, ograniczenie funkcji poznawczych, błędne przetwarzanie sensoryczne, zakłócenie rytmu okołodobowego i niefunkcjonalność układu sercowo-naczyniowego. Przedmiotem niniejszego doktoratu było wstępne wyznaczenie najważniejszych parametrów ADMET dla dziesięciu nowych ligandów 5-HT_6 oraz siedmiu ligandów 5-HT_7 w grupie związków 1,3,5-triazyny oraz pochodnych hydantoiny z wykorzystaniem zarówno metod *in vitro* jak i metod *in silico*. Kryterium wyboru związków do testów było ich powinowactwo i selektywność do głównego celu białkowego, stwierdzone uprzednio w testach radioreceptorowych i funkcjonalnych.

Układ przedstawionej do recenzji pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, z podziałem na rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, cel i zakres pracy, wyniki badań własnych, dyskusja, podsumowanie, cześć eksperymentalna, literatura oraz aneks. Rozprawa doktorska mgr Annamarii Lubelskiej liczy 194 stron tekstu, w których zawartych jest 58 rysunków i 19 tabel. Tabele i rysunki umieszczono w tekście, co znacznie ułatwia korzystanie z nich w czasie czytania. Doktorantka posługuje się precyzyjnym, zrozumiałym językiem naukowym, naturalnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Zwraca uwagę niezwykle wielka staranność graficzna i edytorska pracy, lektura dysertacji jest ogromną przyjemnością. Piśmiennictwo liczy 137 pozycji i jest właściwie dobrane i cytowane.

We wstępie pracy Doktorantka przedstawia informacje szeroko naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W rozdziałach tych Autorka szeroko i dokładnie omawia budowę receptorów 5-HT_6 i 5-HT_7 oraz ich ligandów. Zdaniem Recenzentki, rozdział 6 wstępu obejmujący tylko 1 stronę tekstu pt. „Skrining ADMET w badaniach nad lekiem", powinien być szerzej rozbudowany. W części obejmującej wyniki badań własnych Doktorantka wspomina np. o regułach Lipinskiego, Ghose, Vebera, Egana i Muegge, których znaczenie i ograniczenia powinne być omówione we wprowadzeniu do badań.

W pierwszej części badań własnych Doktorantka omawia wyniki skriningu ADMET dla serii dziesięciu analogów 1,3,5-triazyny o wysokim powinowactwie do receptorów 5-HT_6 (Ki<127 nM). Substancje wpływające na funkcję receptora 5-HT_6 wykazują właściwości prokognitywne i mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu zaburzeń poznawczych

towarzyszących chorobom neurodegeneracyjnym, w tym chorobie Alzheimera i Parkinsona. Zaplanowane badania obejmowały symulację parametrów ADMET *in silico,* z wykorzystaniem trzech programów bioinformatycznych: pkCSM Pharmacokinetics, SwissADME i MetaSite. Z kolei zastosowane metody *in vitro* obejmowały następujące zagadnienia: badanie przenikalności związków przez błony biologiczne, badanie ich powinowactwa do glikoproteiny P (Pgp), wyznaczanie stopnia wiązania związków z białkami osocza, badanie ich stabilności metabolicznej, ocenę interakcji lek-lek związaną z działaniem związków na aktywność wybranych izoform cytochromu P450. Ponadto, zbadano związki pod kątem ich cytotoksyczności, hepatotoksyczności, oraz mutagenności. Otrzymane wyniki potwierdzają właściwości lekopodobne pochodnych triazynowych, dając duże nadzieje na znalezienie leku w tej klasie związków chemicznych. Badane związki wykazały znakomitą przepuszczalność przez błony biologiczne, dobrą dystrybucję, wyższą niż związek referencyjny - warfaryna. Wszystkie osiągnęły niski klirens (z wyjątkiem pochodnej tioeterowej), dobre $t_{1/2}$ oraz wykazały niskie ryzyko interakcji lek-lek. Badana grupa związków cechowała się dobrym profilem bezpieczeństwa, żaden ze związków nie był obarczony ryzykiem działania cytotoksycznego ani mutagennego. Doktorantka podsumowując wyniki otrzymane z badań ADMET oraz skriningu farmakologicznego *in vitro* oraz *in vivo* wskazała dwie struktury - MST-4 i TR-12 o najbardziej korzystnych parametrach lekopodobieństwa idących w parze z pożądanym profilem farmakologicznym. Wskazane związki powinny zostać skierowane do dalszych badań.

W przypadku siedmiu pochodnych hydantoiny, będących ligandami receptora 5-HT_7 badania ADMET w przypadku metod *in silico* były identyczne jak dla ligandów receptora 5-HT_6, natomiast badania *in vitro* nie objęły badań do oceny powinowactwa do glikoproteiny P oraz wyznaczenia stopnia wiązania związków z białkami osocza. Ostatnie doniesienia naukowe wskazują, że zakłócenia sygnalizacji 5-HT_{7R} w mózgu, jelitach i komórkach odpornościowych uczestniczą w etiologii niektórych chorób psychiatrycznych indukowanych poprzez układ odpornościowy i stan zapalny mózgu oraz jelit. Ponadto, wyniki badań przedklinicznych świadczą o związku receptora 5-HT_{7R} z układem limbicznym mózgu i zaangażowaniem tego receptora w indukcję snu, procesy termoregulacji oraz procesy uczenia się. Badane w pracy doktorskiej pochodne hydantoiny wykazały się dobrymi właściwościami lekopodobieństwa oraz bardzo dobrym profilem bezpieczeństwa. Związki wykazały dobre parametry przepuszczalności przez błony biologiczne (z wyjątkiem związku KKB-15) oraz satysfakcjonujące klirensy wewnętrzne. Nie niosą one za sobą wystąpienia wysokiego ryzyka interakcji lek-lek. Żadna z pochodnych nie wykazała działania mutagennego. Jednak związki

KKB-15 oraz KKB-41 we wstępnych badaniach poziomu ATP w komórkach HepG2 wykazały ryzyko hepatotoksyczności. Doktorantka wskazuje na związek MF-8, a drugiej kolejności na związek KKB-16 jako potencjalne kierunki dalszych badań farmakologicznych w tej klasie struktur chemicznych. Należy wspomnieć, że hydantoinowa pochodna MF-8 jest owocem wieloletnim prac syntetyczno-badawczych w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM kierowanym przez prof. Jadwigę Handzlik. Związek MF-8 cechuje wysoka aktywność i selektywność do receptora 5-HT_7.

Przeprowadzone badania są doskonale zaplanowane, przemyślane, wykonane i precyzyjnie opisane w recenzowanej dysertacji, co potwierdza, iż Doktorantka pracowała w zespole badawczym kierowanym przez wybitną naukowczynię - Profesor Jadwigę Handzlik.

Reasumując, eksperymenty zawarte w rozprawie doktorskiej prowadzone w oparciu o głęboką wiedzę, intuicję i zdolności organizacyjne Doktorantki mgr Annamarii Lubelskiej i Jej opiekunów naukowych, prof. Jadwigi Handzlik i dr hab. Gniewomira Latacza.

Z wielką przyjemnością Recenzentka zapoznała się z rozdziałem Dyskusja, w którym Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę uzyskanych wyników oraz pośrednio dokonała konfrontacji badań własnych z osiągnięciami innych zespołów badawczych. Praca doktorska mgr Annamarii Lubelskiej zdaniem recenzentki ma charakter nowatorski i wnosi istotny wkład w tematykę poszukiwania nowych ligandów receptorów serotoninowych typu 5-HT_6 i 5-HT_7.

Można uznać, że choć podjęte przez Doktorantkę badania mają charakter podstawowy to mogą mieć one konsekwencje aplikacyjne, czego potwierdzeniem jest, że badania przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane ze środków: Grantu Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM oraz dwóch dotacji celowych na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Należy również podkreślić fantastyczny dorobek naukowy mgr Annamarii Lubelskiej. Jest Ona autorem, lub współautorem 29 znaczących prac naukowych o wysokich współczynnikach oddziaływania IF (łączny IF=111,8). Wyniki swoich badań Doktorantka prezentowała zarówno w formie prezentacji ustnych, jak i posterów na licznych konferencjach naukowych w kraju i zagranicą (20 komunikatów zjazdowych).

Przedstawiony w pracy doktorskiej materiał badawczy skłania Recenzentkę do zadania następujących pytań:

1. Dlaczego wstępną ocenę cytotoksyczności w przypadku analogów 1,3,5-triazyny ograniczono tylko do 6 związków, zaś w przypadku wstępnej oceny hepatoksyczności

jedynie do 4 związków? (Autorka na str. 98 podaje, że badania cytotoksyczności ograniczono do 5 związków, ale wykres 4 na tej samej stronie przedstawia wyniki dla 6 związków.) Jakie kryteria wyboru zostały zastosowane przy wyborze związków do tych badań?

2. Liczba wykonanych testów ADMET dla pochodnych 1,3,5-triazyny i pochodnych hydantoiny była różna. W przypadku pochodnych hydantoiny nie objęły one badań do oceny powinowactwa do glikoproteiny P oraz wyznaczenia stopnia wiązania związków z białkami osocza. Prowadzi to do podstawowego pytania w zakresie procedur badawczych ADMET. Jakie testy ADMET i w jakiej kolejności (istotności), zdaniem Doktorantki, powinny być dokonane, aby zoptymalizować i skrócić proces selekcji ligandów receptorów serotoninowych do dalszych badań prowadzących do wyznaczenia kandydatów na nowe leki?

Reasumując przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Annamaria Lubelskiej pt. „Ocena parametrów ADMET wybranych ligandów receptorów serotoninowych z grupy pochodnych hydantoiny i 1,3,5-triazyny" cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktorantkę. Lektura dysertacji sprawiła Recenzentce ogromną przyjemność. Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam za niezwykle interesującą oraz nowatorską. Stanowi ona samodzielny dorobek naukowy, jest na najwyższym naukowym poziomie i w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym. Ze względu na te walory, pragnę rekomendować Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ rozprawę doktorską mgr Annamaria Lubelskiej do wyróżnienia.

KIEROWNIK
Zakład Biotechnologii
Anna Bielawska
prof. dr hab. Anna Bielawska