WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

KATEDRA TECHNOLOGII LEKÓW I BIOTECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

Warszawa, 17.08.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Marty Olszak-Płachty

o tytule

Antagoniści receptora 5-HT6 z grupy pochodnych pirydynylopiperazyny o działaniu na ośrodkowy układ nerwowy

wykonanej w

Centrum Badawczo-Rozwojowym Innowacyjnych Leków Ryvu Therapeutics S.A.
pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Bojarskiego

Receptory serotoninowe (5-HTRs) pełnią wiele rozmaitych funkcji w organizmie człowieka. Bodajże najważniejsze procesy regulowane przez te receptory zachodzą w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), stąd są one częstym celem poszukiwań nowych leków o zastosowaniu m. in. w terapii zaburzeń neurologicznych i neurodegeneracyjnych. Istnieje 7 typów tych receptorów, o znacznym stopniu homologii, co znacznie utrudnia poszukiwanie selektywnych modulatorów. Dodatkowo, związki wiążące się z 5-HTRs często wpływają na funkcję innych receptorów monoamin, np. receptorów dopaminowych, adrenergicznych, histaminowych, co może w konsekwencji powodować działania niepożądane w OUN. Niejednokrotnie, w strukturach ligandów 5-HTRs obecne są farmakofory charakterystyczne dla blokerów kanału potasowego hERG, co podnosi ryzyko występowania groźnych zmian w czynnościach elektrofizjologicznych

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.tsl.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 647
faks: +48 22 57 20 631
tsl@wum.edu.pl

serca. Z tego względu, kluczowym aspektem w projektowaniu nowych leków modulujących 5-HTRs jest selektywność, która warunkuje nie tylko pożądany efekt terapeutyczny ale i bezpieczeństwo stosowania. To trudne zagadnienie podejmuje w swojej dysertacji mgr Marta Olszak-Płachta, która za cel swoich badań stawia poszukiwanie nowych związków o potencjalnym działaniu na OUN, będących selektywnymi antagonistami 5-HT_6R.

Dysertacja składa się z 6 rozdziałów: *Wprowadzenia, Celu i planu pracy, Omówienia wyników biologicznych, Części eksperymentalnej, Podsumowania* i *Bibliografii.* W rozdziale *Wprowadzenie* Doktorantka omawia role 5-HT_6R w organizmie, zaznaczając potencjalne wskazania terapeutyczne dla jego ligandów. Dalej, opisuje skrótowo mechanizmy neurochemiczne aktywności modulatorów 5-HT_6R. W kolejnych fragmentach *Wprowadzenia,* Dyplomantka omawia ogólny model farmakoforowy oraz kolejno opisuje najważniejsze grupy znanych antagonistów tego receptora, dzieląc je na: sulfony i sulfonamidy bis-arylowe, indole, pochodne typu indolowego, związki niezawierające grupy sulfonowej, pochodne pirydyny oraz 1,3,5-triazyny. Dalej, Doktorantka omawia kanał potasowy hERG, skupiając się na jego roli w fizjologii serca, strukturze oraz efektów wywieranych przez leki. Pod względem merytorycznym, treść *Wprowadzenia* nie budzi zastrzeżeń i omawia zagadnienia najważniejsze z punktu widzenia badań własnych zawartych w pracy. Być może, warto by w tym właśnie rozdziale wymienić elementy strukturalne i parametry farmakochemiczne charakterystyczne dla związków o działaniu hamującym na kanał potasowy hERG.

Kolejny rozdział dysertacji opisuje *Cel pracy*, jakim była synteza nowych tri-podstawionych pochodnych pirydyny wykazujących selektywne działanie antagonistyczne na 5-HT_6R względem D_2R, H_1R oraz α_1R. Za punkt wyjściowy do projektowania nowych związków obrano pochodną piperazyny **63**, opatentowaną przez Promotora dysertacji w roku 2010. Jest to więc projektowanie w oparciu o strukturę znanego ligandu i znany model farmakoforowy, mające na celu . Wybór cząsteczki inicjującej badania jest uzasadniony, ponieważ jak Doktorantka nadmienia we *Wstępie* pracy, posiada ona wysokie powinowactwo do 5-HT_6R. Zaplanowane modyfikacje dotyczyły trzech podstawników w pozycjach 2, 4 i 6 pirydyny, w oparciu o znany model farmakoforowy antagonistów 5-HT_6R. W pracy zaplanowano zbadanie kardiotoksyczności niektórych otrzymywanych związków, co jest uzasadnione ponieważ pochodne arylopiperazyn podobne do zaplanowanych często mają właściwości hamujące kanał potasowy hERG. Dodatkowo, dla wyselekcjonowanych związków zaproponowano weryfikację *in vitro* przenikania przez membrany biologiczne i barierę krew-mózg, oraz inhibicji wybranych izoform cytochromu P450. Te z kolei parametry są niezwykle istotne przy kwalifikowaniu cząsteczek do badań przedklinicznych *in*

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.tsl.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 647
faks: +48 22 57 20 631
tsl@wum.edu.pl

216

vivo. Biorąc pod uwagę ilość współczynników optymalizowanych przez Doktorantkę, możemy mówić o optymalizacji wieloparametrycznej. Swój wkład w badania stanowiące przedmiot dysertacji Dyplomantka określa jako przeprowadzenie syntezy i analizę uzyskanych wyników. Ogólnie, cele pracy są prawidłowo sformułowane, jednak w moim odczuciu brakuje szerszego komentarza odnośnie pożądanego profilu receptorowego zoptymalizowanej cząsteczki. Po pierwsze, nie został wytłumaczony wybór receptorów wobec których selektywność badano. Oczywiście, wykonywanie szerokich paneli receptorowych jest kosztowne, jednak jak Doktorantka wspomina w we *Wstępie* pracy, analogi związku **63** mają również działanie na 5-$HT_{2A}R$ i 5-HT_7. Czy selektywność wobec tych receptorów nie była by pożądana? Inne, ważne pytanie dotyczy bardziej szczegółowej definicji, jakiego rzędu selektywność była by satysfakcjonująca aby stwierdzić że cel pracy został uzyskany lub aby zakwalifikować związki do dalszych badań (przed)klinicznych.

Kolejną część pracy stanowi *Omówienie wyników badań biologicznych* 62 nowych tri-podstawionych pochodnych pirydyny które otrzymała Dyplomantka. W pierwszej część tego obszernego rozdziału Doktorantka opisuje zależność aktywności ligandów (wyrażonej jako stała inhibicji Ki i/lub stała równowagi dysocjacji antagonista-receptor Kb) na 5-HT_6R, D_2R, H_1R, α_1R oraz selektywność międzyreceptorową. Ta część jest bardzo szczegółowa i bogata we wnioski. W podsumowaniu, Dyplomantka ukazuje drogę do otrzymania związków określonych jako najaktywniejsze i najbardziej selektywne, m.in. związków **75**, **96** oraz **98**. Związki te cechowały się bardzo wysoką aktywnością i selektywnością, przykładowo dla **98** współczynniki Kb dla 5-HT_6R, D_2R, H_1R, α_1R wynosiły odpowiednio 0.57, 2000, 5000 i 265 nM. Kilka związków (**75**, **82**, **96**, **98**, **114** i **122**) zostało poddanych bardziej szczegółowej charakteryzacji *in vitro*, w badaniach przenikania przez membrany biologiczne (Caco-2) i barierę krew-mózg (PAMPA), oraz inhibicji wybranych izoform cytochromu P450: 1A2, 2B6, 2D6, 2C19, 2C9, 3A4. Najkorzystniejsze charakterystyki w tych testach miała pochodna **98**, która odznaczała się bardzo dobrą przenikalnością w modelach Caco-2 i PAMPA oraz hamowała jedynie cytochrom 2C19, w umiarkowanym stopniu. W ostatniej części tego rozdziału Dyplomantka analizuje wpływ budowy tri-podstawionych pochodnych pirydyny na ich oddziaływanie z kanałem potasowym hERG mierzona za pomocą techniki *patch-clamp*. Większość z przebadanych związków charakteryzowała się umiarkowanie silnym działaniem na hERG, które oscylowało w przedziale IC_{50} = 0.73-8.87 μM. Analizując lipofilowość (mierzona jako clogP) cząsteczek, jej wzrost powodował silniejszą aktywność wobec hERG, choć trend ten nie zawsze był jednoznaczny. Z kolei wzrost zasadowości (mierzonej jako pKa najbardziej zasadowego atomu azotu reszty w pozycji 2 pierścienia pirydyny) korelowała z

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.tsl.wum.edu.pl
tel.: +48 22 57 20 647
faks: +48 22 57 20 631
tsl@wum.edu.pl

3/6

wzrostem aktywności pochodnych wobec hERG, co jest zgodne z obecnym stanem wiedzy. Doktorantka zauważa, że próby obniżenia siły hamowania tego kanału przez obniżenie zasadowości cząsteczki powodują niejednokrotnie spadek powinowactwa do 5-HT_6R. Podsumowując ten rozdział pracy, stwierdzam, że jest on bogaty, napisany w sposób ciekawy i logiczny co nie jest łatwe w przypadku próby opisania wyników optymalizacji wieloparametrycznej. Z drugiej strony, Dyplomantka nie ustrzegła się kilku błędów i nieścisłości, które należy w tym momencie wymienić. 1) Stwierdzenie, że *„Zgodnie z oczekiwaniami obydwa związki* [**68** i **69**] *wykazały powinowactwo do receptora 5-HT6 (...), przy czym tylko związek **68** wykazał dobrą selektywność względem receptorów D2, H1 i α1."* (strona 38) wydaje się nie do końca uzasadnione. Po pierwsze, w tabeli 3.2 podano wartości Ki/Kb dla wszystkich wymienionych receptorów dla związku **68**, natomiast dla związku **69** wartości Ki/Kb dla receptorów H1 i α1 w ogóle nie podano. Po drugie, iloraz Kb D2/Kb 5HT6 wynosi dla związków **68** i **69** odpowiednio 92 oraz 618, co świadczyło by o większej selektywności tego drugiego; 2) Dyplomantka twierdzi, że „związek **74** (...) nie był wystarczająco selektywny wobec D2 i α1." (strona 38) Należało by sprecyzować jakiego rzędu selektywność była by optymalna/wystarczająca. Ogólnie, dyskusja wyników badań farmakologicznych była by prostsza do śledzenia, gdyby za każdym razem podawano (również w tabelach) jakim współczynnikiem wyrażała się selektywność (ilorazem wartości których stałych: Ki? Kb?); 3) Z tabeli 3.3 (strona 40) wynika że **79** i **82** charakteryzują się podobnym profilem receptorowym, podczas gdy związek **82** ma o rząd wielkości korzystniejszy współczynnik Kb wobec receptora 5HT6. Dlaczego więc dla związków umieszczonych w tabeli 3.4 nie zdecydowano się kontynuować badań w obrębie pochodnych cykloheksylometylowych a zdecydowano się na „krok w tył" czyli badania w obrębie mniej analogów cykloheksylowych?; 4) Na stronie 42 Dyplomantka stwierdza, że do dalszych badań in vitro zostały wybrane związki **75** i **96** jako najsilniejsze i najbardziej selektywne. O ile dla pochodnej **75** można się z tą selekcją zgodzić, to związek **96** jest mniej selektywny niż np. **82**; 5) *„Związek **98** wykazał nieco niższą aktywność wobec receptora 5-HT6 w odniesieniu do cząsteczki **96** (Ki = 16,6 nM, clogP = 4,3)"* (strona 43), podczas gdy w tabeli 3.7 (strona 44) wartość Ki wynosi 1,6 nM. Autorka pracy nie tłumaczy też dlaczego od tego momentu używa parametru clogP w dyskusji wyników badań receptorowych; 6) Związek **121**, pochodna oktahydropirolo[1,2-*a*]pirazyny jest związkiem chiralnym (strona 45). Czy to był racemat? Autorka nie oznaczyła centrów stereogenicznych ani nie podała konfiguracji absolutnych na odpowiednich atomach węgla.

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.tsl.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 647
faks: +48 22 57 20 631
tsl@wum.edu.pl

Kolejny rozdział dysertacji to *Część eksperymentalna*, w której opisana została synteza 62 nowych pochodnych pirydynylopiperazyny, będąca bez wątpienia najbardziej pracochłonnym elementem badań wykonanych przez Doktorantkę. Synteza została oparta na metodzie opracowanej przez Prof. Alana Katrizkiego, polegającej na kondensacji α,β-nienasyconych ketonów i 1*H*-benzotriazolo-1-acetonitrilu z odpowiednimi pochodnymi piperazyn, czemu towarzyszy wytworzeniem pierścienia pirydynowego. Niezbędne półprodukty, tj. α,β-nienasycone ketony Dyplomantka otrzymywała za pomocą reakcji Hornera-Wadswortha-Emmonsa, lub reakcji aldolowych z odwodnieniem przejściowych β-hydroksyketonów. Niektóre ze wspomnianych półproduktów, tj. α,β-nienasycone ketony, były otrzymywane z niskimi wydajnościami, z dobrą bądź umiarkowaną czystością. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że taki materiał był odpowiedni aby poddać go kolejnym reakcjom prowadzącym do otrzymania finalnych pochodnych z zadowalającą wydajnością i wysoką czystością. Ogólnie, synteza jest prawidłowo zaplanowana, tak aby w krótkim czasie dostarczyć odpowiednią ilość związków finalnych do wstępnych badań receptorowych, ADME oraz *in vivo*. Związki finalne zostały scharakteryzowane w sposób podstawowy, tj. techniką LC/MS oraz ^{1}H NMR, co również jest prawidłowym postępowaniem, zważywszy na to iż mamy tu do czynienia z szeroką biblioteką bliskich analogów strukturalnych otrzymanych za pomocą powtarzalnej syntezy.

W *Podsumowaniu* Doktorantka typuje związek **98** jako pochodną o optymalnie najkorzystniejszych parametrach: powinowactwie do 5-HT$_6$R i selektywności wobec D$_2$R, H$_1$R, α$_1$R (Kb odpowiednio: 0.57, 2000, 5000 i 265 nM), bardzo dobrej przenikalności barier biologicznych w modelach PAMPA i Caco-2, braku znacznej aktywacji izoform cytochromu P-450, oraz umiarkowanej aktywności inhibującej kanał hERG. Doktorantka opisuje również wyniki dokowania pochodnej **98** do modelu 5-HT$_6$R, które zostało wykonane w firmie w której jest zatrudniona.

Całości dopełnia *Bibliografia*, zawierająca 91 pozycji w większości opublikowanych po 2010 roku. Odnośniki literaturowe są dobrze osadzone w tekście, jedynym wyjątkiem jest podanie referencji nr [81] zamiast [85] w podpisie schematu pokazującego mechanizm reakcji Katritzkiego (strona 77).

Pod względem formalnym, praca jest napisana prawidłowym językiem. Literówki i błędy w nazewnictwie występują w niewielkiej ilości (np. *Carboksyamidu*, strona 15; *methlobutylo-*, strona 35; *z podstawnikiem metylocykloheksylowym w miejsce R2 (związek **81**)* (strona 39), powinno być „cykloheksylometylowym"). Również pozostałe nieścisłości w pracy są nieliczne, np.: 1)

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.tsl.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 647
faks: +48 22 57 20 631
tsl@wum.edu.pl

5/6

Doktorantka pisze że *za cel pracy postawiono również zbadanie kardiotoksyczności zsyntezowanych związków* (strona 36). Żaden ze związków nie został jednak przebadany *in vivo* pod kątem powodowania zaburzeń rytmu pracy serca (badanie ECG). Precyzyjniej było by napisać o potencjalnej kardiotoksyczności wynikającej z inhibicji kanału hERG *in vitro*; 2) Autorka dysertacji pisze że zaplanowane są *testy PAMPA i Caco-2 w celu określenia przenikalności przez barierę krew-mózg, a także inhibicję enzymów cytochromu P450* (strona 36). Według wiedzy recenzenta, testy Caco-2 nie są predyktorami przenikalności bariery krew-mózg. Również, bardziej prawidłowo było by pisać o określeniu stopnia inhibicji izoform cytochromu P450.

Poczynione przeze mnie uwagi nie wpływają znacząco na moją pozytywną opinię na temat rozprawy doktorskiej mgr Marty Olszak-Płachty. Podsumowując, poziom prac będących przedmiotem dysertacji jest wysoki i wnoszą one znaczny wkład w stan wiedzy na temat nowych selektywnych inhibitorów 5-HT_6R. Badania opisane w ocenianej rozprawie doktorskiej są szerokie, mają charakter multidyscyplinarny, z jasno sprecyzowanym wkładem Doktorantki. Należy zwrócić również uwagę na złożoność dyskusji wyników wieloparametrycznej optymalizacji, na imponującą ilość związków otrzymanych przez Dyplomantkę i przebadanych *in vitro*. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Marty Olszak-Płachty do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

.....

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.tsl.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 647
faks: +48 22 57 20 631
tsl@wum.edu.pl