



**8Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków
Lecznicych z Pracownia Modelowania Komputerowego**

*Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin,
Tel./fax. 0-81-4487270/4487272*



**Chair and Department of Synthesis and Chemical Technology
of Pharmaceutical Substances with Computer Modeling Lab**

*Faculty of Pharmacy with Division of Medical Analytics
Medical University of Lublin
4A Chodźki str., 20-093 Lublin, Poland
Phone/fax *048-81-4487270/4487272*

Lublin, 06-03-2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Marka JAMROZIKA

**z Zakładu Chemii Leków, Katedry Chemii Farmaceutycznej
Wydziału Farmaceutyczny Collegium Medicum,
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie**

**pt. „Wspomagane komputerowo poszukiwanie inhibitorów reduktaz
antybiotyków antracyklinowych w celu optymalizacji farmakoterapii
przeciwnowotworowej.”**

Wraz z bardzo szybkim rozwojem populacji ludzkiej, a wkrótce osiągnie ona liczbę 8 miliardów, ilość zachorowań bakteryjnych oraz chorób nowotworowych zaczyna także rosnać lawinowo. Poszukiwania nowych antybiotyków oraz celi molekularnych w działaniu przeciwbakteryjnym/przeciwnowotworowym stają się oczekiwane pod wielką presją, głównie z uwagi na szybkie uodpornianie się szczepów bakteryjnych na antybiotyki oraz pojawianie się coraz większej liczby szczepów lekoopornych. W kwestii nowotworzenia nasza wiedza o etiologii nowotworów oraz uodpornianiu się komórek nowotworowych na chemioterapię daje możliwość wprowadzania nowych cząsteczek do badań i leczenia. W ostatnim okresie dominującym celem molekularnym w terapii przeciwnowotworowej stały się kinazy, zarówno błonowe jak i cytozolowe, których nadekspresja jest bardzo często typowa dla nowotworzenia. Problem z kinazami wiąże się jednak z tym, że szlaki kinaz

przekazują sygnalizację z zewnątrz komórki do jądra i krzyżują się w wielu miejscach. Ich blokowanie w cytozolu może silnie upośledzać ten mechanizm także w zdrowych komórkach. Coraz częstsze są więc prace z innymi enzymami – anhidraza węglanowa, dehydrogenaza pirogronianowa, kinaza syntazy glikogenu (GSK3beta), żeby wymienić tylko kilka najczęściej wymienianymi. A co dalej?

Bardzo ciekawa obserwacja stała się podstawą ocenianej pracy.

Praca doktorska mgr Jamrozika dotyczy badań nad antybiotykami antracyklinowymi stosowanymi szeroko w leczeniu guzów litych i nowotworów hematologicznych, posiadającymi jednak szereg działań ubocznych. Najgroźniejszym z nich jest kardiotoxycznosc wywoływana przez metabolity antracyklin. Najważniejszymi enzymami produkującymi te metabolity są reduktazy – karbonylowa 1 (CBR1) oraz aldo-keto reduktaza 1C3 (AKR1C3). Zablokowanie tych enzymów może więc prowadzić do zwiększenia skuteczności antracyklin i ograniczenie ich kardiotoxycznosci. Poszukiwanie leków – inhibitorów tych reduktaz stanowiło główny cel poznawczy rozprawy magistra Jamrozika. Wykorzystał w tym celu komputerową optymalizację struktur krystalograficznych reduktaz oraz wirtualny skrining w poszukiwaniu najaktywniejszych pochodnych z liczącej ponad 2 miliony związków bazy danych ZINC. Wytypowane związki zostały zakupione a ich aktywnosc potwierdzona w testach biologicznych/komórkowych. Przeprowadził również optymalizację pierwszej grupy pochodnych – inhibitorów CBR1 oraz dalsze poszukiwanie dualnych inhibitorów zawierających elementy strukturalne wytypowanych blokerów CBR1 oraz ASP9521 - blokeru AKR1C3 i wywołujących efekty na obie reduktazy.

Praca P. mgr Jamrozika przedstawiona do recenzji została skonstruowana według typowego dla prac farmaceutycznych schematu, łącząc elementy chemiczne, analityczne i biologiczne. Nowatorstwo tej pracy polega na oparciu tych badań o wstępne modelowanie komputerowe zarówno celi białkowych, oddziaływań cząsteczek potencjalnych inhibitorów z tymi białkami oraz wirtualny skrining. Poprzez takie podejście znacznie skrócono czas pomiędzy odkryciem struktury najaktywniejszych pochodnych a potwierdzeniem ich aktywnosci.

Projekt przedstawiony w pracy doktorskiej jest z tego względu bardzo nowatorski.

W przeglądzie literatury źródłowej doktorant omówił znaczenie antybiotyków antracyklinowych oraz reduktazę karbonylową 1 (CBR1) i aldo-keto reduktazę 1C3

(AKR1C3), skupiając się przede wszystkim na strukturze ich domen aktywnych. Przedstawił także teoretyczne podstawy wykorzystania inhibicji reduktaz w kierunku poprawy skuteczności i bezpieczeństwa stosowania antracyklin. Dodatkowo doktorant zaprezentował założenia wspomaganego komputerowo projektowania leków.

Celem pracy magistra Jamrozika było: (1) poszukiwanie nowych inhibitorów CBR1; (2) ocena możliwości hamowania CBR1 przez związek ASP9521; (3) poszukiwanie dualnych inhibitorów CBR1-AKR1C3.

Metodyka badań oparta została na sekwencyjnym schemacie rozpoczynającym się wyborem struktur krystalicznych i ligandów do optymalizacji, przez retrospektywny wirtualny skrining, po prospektywny wirtualny skrining wsparty przewidywaniem parametrów ADMET. Badania były prowadzone przy pomocy pakiety Schrodinger z wykorzystaniem programów Small Molecule Drug Discovery Schrodingera, MarvinSketch, Desmond, Ligand Scout, Glide a także ADMET Predictor i SwissADME. Do wizualizacji stosował program Maestro 2018-4.

W części komputerowej w etapie pierwszym doktorant przeprowadził optymalizację struktury krystalograficznej reduktazy CBR1 przy pomocy 14 małych cząsteczkowych ligandów tego enzymu a następnie zoptymalizował jego miejsce wiążące korzystając z 22 ligandów narzędziowych. Podobnie postąpił z drugą reduktazą. Po optymalizacji możliwe było utworzenie farmakoforu dla każdego miejsca aktywnego oraz przeprowadzenie wirtualnego skriningu. Modele zostały zwalidowane retrospektywnie przez grupę związków aktywnych i nieaktywnych w oparciu o szereg funkcji oceniających oraz dynamikę molekularną 20 ns (CBR1) lub 50 ns (CBR1/AKR1C3), a następnie posłużyły do wyboru nowych struktur z bazy ZINC (50 dla CBR1). W celu weryfikacji wyboru najlepszych potencjalnie chemotypów po wirtualnym skriningu doktorant przeprowadził analizę parametrów ADMET. Ostatnim etapem pracy były badania *in vitro* przeprowadzone w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej. Objęły one testy inhibicji obu enzymów (hamowanie rekombinowanych enzymów w obecności NADPH) oraz wpływ na linię komórkową A549.

Oszacowanie parametrów ADMET, a szczególnie potencjalnych efektów toksycznych pozwoliło na wybór 9 związków, które przebadano jako inhibitory reduktazy CBR1. Jedna z badanych pochodnych zawierająca układ 2-fenylchinazolino-4-onu posiadała aktywność mikromolową. Wirtualny skrining ponad 2000 analogów strukturalnych tego układu pozwoliło na wytypowanie kolejnych 9

pochodnych. Po przeprowadzeniu badań *in vitro* pochodna z dodatkową grupą hydroksylową wykazała najsilniejsze działanie na poziomie poniżej 1 mikromola (0.68).

Wielowątkowy wirtualny skrining w poszukiwaniu dualnych inhibitorów obu reduktaz doprowadził ostatecznie do wyboru 36 pochodnych, które po poddaniu predykcji parametrów ADMET zostały zredukowane do 27. Badania *in vitro* pozwoliły określić ich powinowactwo do enzymów. Dla kilku działanie było faktycznie podwójne ale obejmowało związki z pierwszego etapu badań – w pracy określone jako seria C. Brak było silnego podwójnego działania w związkach po wirtualnym skriningu do drugiego modelu farmakoforowego CBR1/AKR1C3. Jednocześnie stwierdzono, że jeden z chemotypów – benzoilopiperydyny (oznaczone w pracy jako seria P1-P22), stanowi obiecującą grupę związków wartą dalszych badań.

Ostatni etap badań – wpływ na działanie daunorubicyny na linii komórkowej A549, wykazał, że jedynie dwie pochodne z serii P nasiliły w sposób istotny statystycznie działanie antracykliny, natomiast żadna z pochodnych serii C tego nie dokonały pomimo potwierdzonego powinowactwa do obu reduktaz.

Cel, który postawił sobie doktorant, czyli identyfikacja selektywnych i dualnych inhibitorów reduktazy CBR1 i CBR1/AKR1C3 dzięki wirtualnemu skriningowi i weryfikacja praktyczna ich aktywności został z sukcesem osiągnięty. Jednocześnie pewne niekonsekwencje związane z aktywnością biologiczną wymagają dalszych badań

Praca jest zaprezentowana w sposób logiczny i jasny. Zawiera krótki ale bardzo dobrze opracowany wstęp literaturowy, a metodyka wszystkich etapów badawczych, jest także zaprezentowana w sposób wyczerpujący. Dyskusja chociaż obszerna jest rzeczowa i obejmuje tylko najważniejsze elementy bez zbędnych dłużyzn, a wnioski uwypuklają najważniejsze ustalenia dyskusji. Pewnym problemem jest obszerność programu badawczego oraz olbrzymia ilość danych eksperymentalnych. Oczywiście nie jest to problem negatywny obniżający jakość pracy a wprost przeciwnie, podnosi ją niewspółmiernie chociaż niestety nie ułatwia pracy recenzentowi.

Poziom pracy formalnie i merytorycznie jest bardzo wysoki, jednakże chciałbym zwrócić uwagę doktorantowi na kilka problemów, które zauważyłem czytając pracę:

- w Streszczeniu stwierdzenie „hydrofobowe oddziaływania pi-pi” jest zbyt daleko posuniętą generalizacją ponieważ każde z nich wiąże się z bardzo różnym typem oddziaływań – usuwanie cząsteczek wody z przestrzeni zajmowanej przez hydrofobowe ugrupowania oraz pi-pi elektronowy staking

pierścienia aromatycznych lub tworzenie wiązań wodorowych słabych z pierścieniami aromatycznymi;

- w rozdziale 4.1.4 omawiającym wybór nowych chemotypów dla inhibitorów reduktazy CBR1 nie przedstawiono struktur a jedynie nazwy, co jest mniej czytelne, chociaż część z nich doktorant zaprezentował w kolejnym rozdziale (Ryc. 20); jednocześnie nazwa w pkt. 7 powinna brzmieć 4H,10H-6,7,8,9-terahydro-;

Uwagi te przytaczam jedynie z obowiązku recenzenta, aby przy przygotowaniu publikacji można je było uwzględnić.

Pomimo przedstawionych wyżej uwag moja ocena rozprawy doktorskiej mgr Marka Jamrozika jest bardzo pozytywna ponieważ postawione cele badawcze i poznawcze zostały zrealizowane, a doktorant wykazał się znakomitym opanowaniem warsztatu badawczego i umiejętnością właściwego i skutecznego planowania badań. Uważam, że spełnia ona wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim, w związku ze spełnieniem wszystkich wymogów ustawowych artykułu 221, ust. 10 ustawy z dnia 10 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., nr 1668 z późniejszymi zmianami, Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późniejszymi zmianami) oraz art. 219, ust. 1, pkt. 1-3 przytoczonej ustawy. Składam zatem wniosek do Rady ds. Stopni i Tytułów w Dyscyplinie Nauk Farmaceutycznych, Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Marka JAMROZIKA do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dn. 2023-03-06

WNIOSEK

Z uwagi na bardzo szeroki zakres zaplanowanych i zrealizowanych badań oraz gruntowną analizę ich wyników uważam, że rozprawa ta stanowi bardzo istotny wkład w temat poszukiwania nowych, potencjalnych leków, ze szczególnym uwzględnieniem inhibitorów reduktaz przy pomocy metod komputerowych. Praca doktorska była finansowana z grantu NCN PRELUDIUM19 (2020/37/N/N7/01097) oraz dwóch grantów dotacji celowej MNiSW na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich CM UJ (N42/DBS/000058, N42/DBS/000188). Doktorant dysponuje także publikacjami, które odnoszą się do tematyki rozprawy. W związku z tym proponuję przyznanie tej rozprawie wyróżnienia.