



WARSZAWSKI  
UNIwersytet  
MEDYCZNY

KATEDRA TECHNOLOGII LEKÓW I BIOTECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

Warszawa, 14.03.2023

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Alicji Gawalskiej**

**o tytule**

***Wspomagane komputerowo poszukiwanie ligandów wielocelowych blokujących PDE4B, PDE8A i TRPA1 o potencjalnym zastosowaniu w farmakoterapii astmy i POChP***

**wykonanej w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej, pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Kołaczковского jako promotora oraz dr Adama Buckiego jako promotora pomocniczego.**

Poszukiwanie nowych leków to zagadnienie bardzo złożone, wymagające użycia technologii wypracowanych przez badaczy reprezentujących różne dziedziny nauki. Punktem wyjścia jest zawsze identyfikacja problemu klinicznego, poznanie jego patogenezы, a następnie wytypowanie w niej procesu, którego zahamowanie bądź pobudzenie doprowadzi do efektu terapeutycznego. Taki proces może być warunkowany aktywnością pojedynczego receptora bądź enzymu, który może być selektywnie modulowany za pomocą np. związku małowcząsteczkowego (tj. „klasycznego” leku). W innym przypadku, objaw chorobowy może być spowodowany nieprawidłową aktywnością więcej niż jednego celu molekularnego. Mówimy wtedy o chorobie wieloczynnikowej, często implikującej poszukiwanie związków działających na więcej niż jeden

enzym bądź receptor. Takimi chorobami są astma i przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP), będące przedmiotem badań zwartych w dysertacji mgr Alicji Gawalskiej.

Jako cele molekularne biorące istotny udział w patogenezie wymienionych chorób, Doktorantka wymieniła między innymi dwa enzymy: fosfodiesterazy 4B (PDE4B) i 8A (PDE8A) oraz kanał jonowy: receptor przejściowego potencjału 1A (TRP1A). Na podstawie analizy źródeł literaturowych Dyplomantka stwierdziła, że jednoczesne hamowanie wymienionych celów molekularnych może pozwolić uzyskać synergistyczne działanie rozszerzające oskrzela, efekt przeciwzapalny i dodatkowe działanie zapobiegające przebudowie dróg oddechowych w przebiegu astmy i POChP. Eksplorując ten kierunek, Doktorantka założyła możliwość zaprojektowania za pomocą metod obliczeniowych związków celujących jednocześnie w PDE4B, PDE8A i TRP1A.

Mgr Alicja Gawalska zastosowała w równoległe projektowanie w oparciu o strukturę celu biologicznego („*structure-based drug design*”) oraz o struktury znanych ligandów („*ligand-based drug design*”), w sposób metodyczny, przy użyciu określonego algorytmu postępowania. W podejściu „*structure based*” wybrała odpowiednie wysokorozdzielcze struktury białek PDE4B, PDE4A oraz TRP1A, na ich podstawie stworzyła odpowiednie modele oddziaływań ligand-receptor i modele farmakoforowe, określiła potencjalne miejsca wiązania ligandów, a następnie przeprowadziła wirtualny skrining bibliotek związków dostępnych handlowo. W podejściu „*ligand-based*”, Doktorantka przygotowała i przeanalizowała zbiory znanych ligandów wytypowanych białek, opracowała modele empiryczne na bazie uczenia maszynowego („*machine learning*”) i sztucznej inteligencji („*artificial intelligence*”), które posłużyły do przeprowadzenia procesu wirtualnego skriningu. Po przeanalizowaniu danych z obu tych podejść, oraz uwzględniając filtry lekopodobieństwa, Dyplomantka wytypowała kilkanaście handlowo dostępnych związków, które przekazała do badań w kierunku oddziaływania hamującego na trzy obrane cele molekularne.

Powyższy opis algorytmu postępowania jest bardzo skrótowy. Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest bowiem bardzo bogata pod względem zastosowanych metod a dokładny ich opis, jak również wyników cząstkowych i wniosków nie jest przedmiotem tej recenzji. Co najistotniejsze, analiza algorytmów postępowania wskazuje jednak na bardzo wysokie kompetencje Doktorantki w zakresie projektowania leków metodami wspomaganyimi komputerowo. Opis postępowania na każdym etapie, począwszy od wyboru struktur zamieszczonych w *Protein Data Bank* (PDB), ich przygotowywania, przez walidację modeli, alternatywne metody wirtualnego skriningu, analizę wyników funkcji oceniających, parametrów ADME typowanych cząsteczek, czy też uzasadnienie doboru modeli heurystycznych i

matematycznych, nie pozostawiają wątpliwości co do głębokiego zrozumienia przez Doktorantkę tych metod i umiejętności ich stosowania. Dodatkowo, całość pracy, w tym metodyka, są opisane bardzo dobrym językiem, w sposób zrozumiały i mają niemal instruktażowy charakter.

Podsumowując aspekty merytoryczne dysertacji, jej wartość oceniam bardzo wysoko. Pod względem formalnym, dysertacja ma układ klasyczny. Autorka zamieściła w niej wstęp, w którym, opisała jednostki chorobowe: POChP i astmę, podkreślając jednocześnie zasadność poszukiwania nowych leków w tym obszarze. Dalej, opisała zalety związków wielocelowych, również w kontekście obranych celów terapeutycznych. W dalszej części wstępu, szczegółowo scharakteryzowane zostały obrane cele molekularne: kanał jonowy TRP1A oraz fosfodiesterazy 4B i 8A. Wstęp teoretyczny dysertacji kończy opis metody komputerowych wykorzystywanych do projektowania nowych leków. Dalszą część pracy stanowią: cel i założenia pracy, metodyka, wyniki oraz ich podsumowanie. Bibliografia zawiera niemal 200 pozycji literaturowych, co istotne, opublikowanych prawie w całości w przeciągu ostatnich 20 lat. Praca jest napisana niezwykle starannie, bardzo dobrym językiem, jednocześnie warto podkreślić niemal wzorcową estetykę rycin i tabel.

Zagadnienia wymagające dodatkowego komentarza Doktoranta nie są liczne i zostały wypunktowane poniżej:

- 1) Jak wspomniałem, praca jest napisana niezwykle starannie i nie dopatrzyłem się w niej wielu uchybień formalnych. Jednak, są one obecne, np. strona 41: „Opracowany model wykorzystano do wyznaczenia potencjalny sposób wiązania (...)”; strona 42: „selektywnego inhibitora PDE8A o najwyższej wartości IC<sub>50</sub>.” – czy może „o najniższej wartości”? A może „o najwyższej aktywności inhibującej”?
- 2) W części wstępu odnoszącej się do metod *in silico* stosowanych w projektowaniu leków, Dyplomantka słusznie zauważa, że cząsteczki ocenia się pod kątem „(...) miejsca w rankingu, które zostały im przyporządkowane, a dokładniej czy związki aktywne zostają uplasowane przed nieaktywnymi.” Z drugiej strony, w moim odczuci zabrakło wprowadzenia w już tym miejscu pojęcia „funkcji oceniającej” ustalającej ten, jak Dyplomantka nazwała, „ranking”.
- 3) Na stronie 28 Autorka pisze: „Wszystkie związki zostały zoptymalizowane za pomocą modułu Ligprep, przy użyciu którego ustalono formę jonizacji (pH 7.4 ± 0.2) i odpowiednią konformację przestrzenną, wykorzystując następujące ustawienia: zachowano określone chiralności i wygenerowano maksymalnie 1 stereoizomer na ligand.” W zasadzie tego typu opis pojawia się również w innych eksperymentach. W mojej ocenie nie jest pewne, co

oznacza sformułowanie „odpowiednia konformacja przestrzenna”. Czy termin odnosi się wyłącznie chiralności? Czy do zoptymalizowanej geometrii pierścieni? Dodatkowo, w kontekście stwierdzenia iż „generowano maksymalnie 1 stereoizomer na ligand” nasuwa się pytanie, co w wypadku gdy związek występuje w postaci racematu? Odrzucenie jednego z enancjomerów może przecież spowodować wykluczenie związku potencjalnie aktywnego.

- 4) W trakcie projektowania związków aktywnych zastosowano dodatkowe kryteria służące doborowi cząsteczek poddawanych walidacji *in vitro*, takie jak predyktory parametrów farmakokinetycznych zawarte w platformie SwissADME: absorpcja w jelicie, możliwość hamowania enzymów z grupy CYP-450 oraz stanowienia substratu dla glikoproteiny P. W mojej ocenie brakuje opinii Doktorantki czy predyktory SwissADME mają wystarczającą dokładność, aby miały zastosowanie na tak wczesnym etapie projektowania. Nasuwa się również pytanie, czy odrzucenie puli związków ze względu na inhibicję CYP czy hERG nie doprowadzi do wykluczenia interesujących, wielofunkcyjnych ligandów, których właściwości ADME/PK można by optymalizować w dalszych etapach badań przedklinicznych? Dalej, komentując proponowany filtr ADME, brak jest uwzględnienia kryterium zawartości frakcji atomów węgla o hybrydyzacji  $sp^3$  które jest istotne do odrzucania niespecyficznych, planarnych ligandów.
- 5) Autorka przyjmuje, iż „lepsza rozdzielczość struktury eksperymentalnej wiąże się z wyższą jakością i dokładnością prezentowanej struktury enzymu, a co za tym idzie pewnością co do kształtu i formy miejsca wiązania.” Ta teza w mojej ocenie nie jest wystarczająco precyzyjna. Oczywiście, rozdzielczość struktury białka jest istotna, jednak tylko w pewnych zakresach wartości, przez co nie zawsze musi być najważniejszym kryterium wyboru. Istotne przy wyborze struktury jest jednak to, aby kontakty krystaliczne nie ingerowały w strukturę miejsca wiązania inhibitora.

Powyższe uwagi nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę walorów merytorycznych i formalnych rozprawy doktorskiej mgr Alicji Gawalskiej. Co prawda Dyplomantka przyznaje, że przeprowadzone badania nie doprowadziły do uzyskania wielofunkcyjnych ligandów PDE4B, PDE8A i TRP1A, to jednak praca wnosi istotny wkład w stan wiedzy na temat ich projektowania metodami *in silico*. Szczególnym osiągnięciem jest opracowanie modelu miejsca wiążącego liganda w białku TRP1A, którego prawidłowość potwierdzono później eksperymentalnie. W pracy wykorzystane zostały aktualne narzędzia badawcze. W mojej ocenie praca przedstawiona do recenzji ma wysokie walory naukowe i poznawcze oraz jest odważnym podejściem do trudnego

zagadnienia. Doktorantka jest współautorką wielu prac oryginalnych, w tym czterech publikacji w uznanych czasopismach w dyscyplinie nauk farmaceutycznych, które zawierają część wyników opisanych w rozprawie. Dodatkowo, bardzo pozytywnie jawi się sylwetka mgr Alicji Gawalskiej jako osoby pozyskującej i współrealizującej Granty badawcze.

Podsumowując recenzję: dysertacja pokazuje jak olbrzymia ilość zmiennych może mieć wpływ na sukces danego podejścia do projektowania leków. Stąd zgadzam się z mottem którym opatrzona jest praca: „Toniemy w danych, ale cierpimy na brak wiedzy” autorstwa Johna Naisbitta, i uważam, że wysiłek podjęty w dysertacji jest krokiem podjętym w celu pokonania tej bariery. Ze wszystkich powyższych względów, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie pani mgr Alicji Gawalskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

(dr hab. Maciej Dawidowski)