

Gdańsk, 17.12.2023 r.

## Recenzja

Rozprawy doktorskiej **mgr Sylwii Sudoł-Tałaj**

pt. *Pochodne 1,3,5-triazyny jako ligandy receptora serotoninowego 5-HT<sub>6</sub>*

*o potencjalnym działaniu w chorobach neurodegeneracyjnych*

Promotor: prof. dr hab. Jadwiga Handzlik

Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Kucwaj-Brysz

Demencja to termin określający kilka chorób wpływających na pamięć, myślenie i zdolność wykonywania codziennych czynności. Dotyka ona głównie osoby starsze, ale nie u wszystkich osób występuje wraz z wiekiem. Jest to zespół schorzeń, które z czasem niszczą komórki nerwowe i uszkadzają mózg, zazwyczaj prowadząc do pogorszenia funkcji poznawczych w stopniu wykraczającym poza zwykłe biologiczne konsekwencje starzenia się. Chociaż świadomość pacjenta pozostaje nienaruszona, upośledzeniu funkcji poznawczych często towarzyszą, a czasami je poprzedzają, zmiany nastroju, kontroli emocjonalnej, zachowania lub motywacji. Temat demencji związanej z chorobą Alzheimera to temat niezwykle aktualny. Wg Światowej Organizacji Zdrowia obecnie na całym świecie na demencję cierpi ponad 55 mln ludzi, z czego ponad 60% żyje w krajach o niskich i średnich dochodach. Co roku odnotowuje się prawie 10 mln nowych przypadków. Choroba Alzheimera jest najczęstszą postacią demencji i może odpowiadać za 60–70% przypadków. Jej źródło próbuje wyjaśnić kilka konkurencyjnych hipotez, m.in. cholinergiczna, amyloidowa, tau, środowiskowa, itd. Jednakże przyczyna pozostaje zasadniczo nieznaną, pomijając od 1 do 5% przypadków, w których zidentyfikowano odmienności genetyczne. Z tego powodu jest to choroba budząca lęk, zwłaszcza że jej objawy bywają niezwykle krępujące zarówno dla osoby nią dotkniętej, jak i otoczenia. Szeroka problematyka choroby Alzheimera stała się motywem przewodnim zrealizowanego w 2001 r. filmu *Iris* będącego refleksją na temat przeżyć i trudności, z jakimi musiała się zmierzyć Iris Murdoch, profesor literatury angielskiej na Oxford University od momentu wystąpienia pierwszych objawów choroby.

Demencja jest obecnie siódmą najczęstszą przyczyną zgonów i jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności i utraty samodzielności wśród osób starszych. W 2019 r. koszty demencji w skali globalnej wyniosły 1,3 biliona dolarów, przy czym około 50% tych kosztów wynika z opieki świadczonej

przez nieformalnych opiekunów (np. członków rodziny i bliskich przyjaciół), którzy zapewniają średnio 5 godzin opieki i nadzoru dziennie. Kobiety są nieproporcjonalnie częściej dotknięte demencją, zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio. Z jednej strony żyją dłużej, ale zapewniają także 70% godzin opieki nad osobami cierpiącymi na demencję. Nie dziwi zatem zainteresowanie silnie sfeminizowanego Zespołu badawczego, do którego należy mgr Sylwia Sudoł-Tałaj, tym także ważkim tematem.

Warto zauważyć, że synteza tytułowych pochodnych 1,3,5-triazyny jako ligandów receptora serotoninowego 5-HT<sub>6</sub> o potencjalnym działaniu w chorobach neurodegeneracyjnych jest jednym z kierunków bogatej tematyki badawczej Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, który wymagał nawiązania współpracy z jednostkami wydziałowymi: Katedrą Farmakodynamiki, Katedrą Farmakobiologii i Zakładem Farmacji Klinicznej CM UJ, z Zakładem Krystalochemii i Krystalofizyki Wydziału Chemii UJ oraz Zakładem Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie i Zakładem Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Praca doktorska mgr Sylwii Sudoł-Tałaj jest dowodem na owocną współpracę interdyscyplinarną na najwyższym poziomie naukowym.

Przechodząc do formalnej oceny przedłożonej rozprawy stwierdzam, że jest to dzieło w niezwykle trafny sposób skonstruowane. Dysertację stanowi cykl 3 artykułów naukowych zaopatrzonego we wprowadzenie, cel i zakres badań, metodologię badań, opis uzyskanych wyników, badania w ramach doktoratu nieobjęte cyklem, podsumowanie oraz bibliografię. Całości dopełniają informacje nt. źródeł finansowania, wykazy publikacji oraz komunikatów konferencyjnych, streszczenie w języku polskim i języku angielskim, wykaz skrótów i spis treści, zamieszczone na początku opracowania. Pracę zamyka zbiór 24 oświadczeń współautorów publikacji 1-3 stanowiących cykl w ramach pracy doktorskiej przedstawionej do recenzji. Dysertacja zaopatrzona została w 9 tabel, 11 rysunków i 3 schematy, nie wliczając tych zawartych w cyklu publikacyjnym.

*Wprowadzenie*, liczące 14 stron, jest wynikiem zainteresowań Autorki, a w szerszym kontekście potwierdzeniem przygotowania zawodowego do uczestniczenia w procesie odkrywania nowych leków, procesie interdyscyplinarnym, wymagającym wiedzy w zakresie nauk chemicznych, biologicznych i medycznych. Tak więc, obok wątków natury biologiczno-medycznej dotyczących chorób neurodegeneracyjnych, białkowych celów molekularnych, szlaków sygnałowych w mózgu, które ulegają zaburzeniom związanym z przebiegiem choroby Alzheimera, klasyfikacji receptorów związanych z białkiem G oraz klasyfikacji kinaz cyklino-zależnych, znajdujemy tu przykłady leków

stosowanych w celu kontrolowania objawów choroby i spowolnienia jej postępu. Doktorantka szczegółowo opisuje receptor 5-HT<sub>6</sub> i kinazę CDK5 jako białkowe cele w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, omawia przykłady ligandów dla tych białek, a następnie przedstawia koncepcję poszukiwania dualnych ligandów o rdzeniu 1,3,5-triazyny. Na uznanie zasługuje fakt, że ta syntetyczna część pracy napisana została w oparciu o szeroko zakrojoną kwerendę artykułów opisujących poruszane zagadnienia. Aż 66 pozycji literaturowych na 76 cytowanych w pracy przywołana została właśnie w tej części, z czego 64 pozycje (97%) obejmują publikacje, które ukazały się po roku 2000.

*Cel i zakres badań* zostały sprecyzowane w sposób jasny a koncentrowały się na zaprojektowaniu, syntezy chemicznej oraz ocenie właściwości farmakologicznych *in vitro* oraz *in vivo* nowych ligandów receptora serotoninowego 5-HT<sub>6</sub>, pochodnych 1,3,5-triazyny, a także komputerowo wspomaganą analizę zależności struktura-aktywność otrzymanych związków chemicznych. Zaplanowano również modyfikacje służące rozszerzeniu profilu farmakologicznego związków na dodatkowy cel związany z chorobą Alzheimera, wybrany spośród białek enzymatycznych, tj. cyklino-zależną kinazę CDK5/p25. Strukturą wiodącą dla przeprowadzonych modyfikacji była (RS)-4-[1-(2,5-dichlorofenoksy)propylo]-6-(4-metylopiperazyn-1-ylo)-1,3,5-triazyno-2-amina, silny i selektywny antagonist receptoru serotoninowego 5-HT<sub>6</sub>, otrzymany w wyniku wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM.

Realizacja tak ambitnego programu badawczego wymagała rozległej wiedzy w dziedzinie farmakologii, chemii medycznej, syntezy chemicznej, a także opanowania nowoczesnych metod eksperymentalnych, w tym preparatywnych. Co więcej, złożoność badanych związków stanowiła poważne wyzwanie w zakresie analizy strukturalnej związków organicznych. Należy podkreślić z uznaniem, iż w każdej z tych dziedzin mgr Sylwia Sudoł-Tańaj wykazała rzetelność i profesjonalizm. Na szczególne podkreślenie zasługuje konsekwencja z jaką Doktorantka zrealizowała przyjęte założenia badawcze, cecha rzadko spotykana na tak wczesnym etapie kariery naukowej.

W podrozdziale *Metodologia badań* opisała Autorka etap projektowania i syntezy chemicznej nowych pochodnych, wskazując kierunki modyfikacji oraz w precyzyjny sposób wskazując serie związków objętych cyklem publikacyjnym. Wskazała również eksperymenty, które zrealizowała samodzielnie oraz te, które zostały dla Niej zrealizowane przez współautorów artykułów.

W skład cyklu artykułów, na których osadzona jest praca doktorska, wchodzi 3 publikacje, w których mgr Sylwia Sudot-Tałaj pełni rolę pierwszego autora. Sumaryczny współczynnik oddziaływania dla tego cyklu wynosi  $IF = 19,422$  i 480 pkt. MEiN. Takie parametry naukometryczne najlepiej świadczą o bardzo wysokiej jakości ocenianej pracy.

W publikacji 1 autorzy opisali modyfikacje chemiczne związku wiodącego polegające na wprowadzeniu: (i) dwóch chlorów przy pierścieniu benzenowym oraz (ii) różnorodnych fragmentów łączących pierścieni 1,3,5-triazyny z eterami aromatycznymi. Finalnym efektem syntezy było 19 nowych połączeń, w pracy doktorskiej oznaczonych jako seria A, dla których wykonano badania biologiczne *in vitro* i *in vivo* oraz komputerową analizę SAR. Większość nowych triazyn wykazywała wysokie powinowactwo ( $K_i < 100$  nM) i selektywność wobec receptora 5-HT<sub>6</sub>, w odniesieniu do innych testowanych receptorów (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, D<sub>2</sub>). Badania dokowania wspomagane krystalografią, w tym dokowanie ligandów spolaryzowanych kwantowo (QPLD), wykazały, że atomy chloru mogą brać udział w różnych typach wiązań halogenowych, jednakże wydaje się, że właściwości fragmentu łączącego wpływają głównie na powinowactwo do receptora 5-HT<sub>6</sub>. W podsumowaniu autorzy wskazali 4-[1-(2,5-dichlorofenoksy)propylo]-6-(4-metylopiperazyn-1-ylo)-1,3,5-triazyn-2-aminę, która wykazała najwyższe powinowactwo ( $K_i = 6$  nM), bardzo silne działanie antagonistyczne w stosunku do 5-HT<sub>6</sub>R ( $K_B = 27$  pM), działanie prokognitywne *in vivo* w teście rozpoznawania nowych obiektów (NOR) u szczurów, bardzo dobrą przepuszczalność w modelu PAMPA i zadowalające bezpieczeństwo *in vitro* jako najsilniejszy jak dotąd środek 1,3,5-triazynowy, przydatny jako nowy kierunek do dalszych badań.

Przedmiotem publikacji 2 były badania podjęte w celu ustalenia szerszego profilu farmakologicznego dla 3 wyłonionych w publikacji 1 związków, które wyróżniły się w kompleksowym badaniu przesiewowym selektywności receptora i parametrów lekopodobnych *in vitro*, a także właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych *in vivo*. Kompleksowa analiza uzyskanych wyników wykazała istotną aktywność prokognitywną wraz z korzystnym lekopodobieństwem *in vitro* i profilem farmakokinetycznym *in vivo* oraz bezpieczeństwem stosowania dla dwóch związków: (RS)-4-[1-(2,3-dichlorofenoksy)propylo]-6-(4-metylopiperazyn-1-ylo)-1,3,5-triazyn-2-aminy i (RS)-4-(4-metylopiperazyn-1-ylo)-6-(1-fenoksypropylo)-1,3,5-triazyn-2-aminy. Główną konkluzją wyciągniętą przez autorów była ta, iż oba związki wydają się być dobrymi kandydatami na leki działające na OUN, w poszukiwaniu nowego podejścia terapeutycznego do chorób otępiennych, opartego na docelowym receptorze 5-HT<sub>6</sub>.

W publikacji 3 opisane zostało zaprojektowanie i synteza 25 kolejnych połączeń 1,3,5-triazyn będących ligandami receptora 5-HT<sub>6</sub> o dodatkowym działaniu hamującym na cyklino-zależną kinazę 5 (CDK5). Związki powstały w wyniku modyfikacji wiodącej 4-[1-(2,5-dichlorofenoksy)propylo]-6-(4-metylopiperazyn-1-ylo)-1,3,5-triazyno-2-aminy. Autorzy przeprowadzili modelowanie molekularne, syntezę, badania krystalograficzne, testy biologiczne *in vitro* i badania behawioralne *in vivo*. Nowe triazyny wykazały wysokie powinowactwo ( $K_i < 100$  nM) i selektywność wobec 5-HT<sub>6</sub>R. Najskuteczniejsza pochodna, 4-[1-(2,5-difluorofenoksy)propylo]-6-(4-metylopiperazyn-1-ylo)-1,3,5-triazyno-2-amina, wykazała silne działanie antagonistyczne wobec 5-HT<sub>6</sub>R ( $K_i = 5$  nM,  $pK_b = 8,16$ ), wpływ na procesy pamięciowe w teście rozpoznawania nowych obiektów, a także działanie przeciwlękowe w teście Elevated Plus Maze u szczurów. Ponadto wykazała działanie przeciwpłytkowe, bardzo dobrą przepuszczalność (model PAMPA), wysoką stabilność metaboliczną (RLMs) i zadowalające bezpieczeństwo *in vitro*. Badacze konkludują, że chociaż działanie hamujące CDK5 *in vitro* dla testowanych związków nie osiągnęło siły oczekiwanej na podstawie symulacji *in silico*, nowy antagonistą o bardzo zadowalającym profilu farmakologicznym i ADMET może służyć jako nowa struktura wiodąca w dalszych poszukiwaniach innowacyjnej terapii przeciw chorobie Alzheimera z objawami towarzyszącymi.

Dysertacja zawiera również podrozdział poświęcony związkom serii B i serii E, które nie zostały włączone do doktorskiego cyklu artykułów. W części tej Autorka bardzo dokładnie opisuje etap projektowania, syntezę oraz wyniki biologiczne uzyskane dla pochodnych wchodzących w skład obu serii.

W nieco ponad jednostronicowym Podsumowaniu swojej pracy zamieściła Doktorantka najistotniejsze wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań. Wymiernym efektem działań mgr Sudoł-Tałaj jest bezspornie stworzenie biblioteki 49 związków chemicznych i wnikliwa ocena ich aktywności biologicznej. Wszystkie etapy przeprowadzonych eksperymentów zostały logicznie zaplanowane i konsekwentnie wykonane. Badania przeprowadzono na najwyższym poziomie, a uzyskane wyniki wnoszą znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki farmaceutycznej. Sama dysertacja została przygotowana z ogromną starannością i poczuciem estetyki. Nie będzie zatem przesadą uznanie przedłożonej do recenzji pracy za znakomitą.

Z obowiązku recenzenta wspomnieć muszę o pomyłkach, które udało mi się dostrzec. Tabela zamieszczona na stronie 56 nosi numer 10, zamiast 9. Ponadto w opisach widm dla związków serii E

zastosowała Doktorantka kropki do oddzielenia liczb całkowitych od ułamków, co w języku polskim nie powinno mieć miejsca. W widmach  $^1\text{H}$  NMR związków E.1, E.7 i E.8 liczba atomów wodoru nie odpowiada ich liczbie we wzorach sumarycznych. Jednakże wspomniane niedociągnięcie w żaden sposób nie wpływają na mój odbiór pracy doktorskiej i są zrozumiałe z uwagi na objętość dysertacji.

Podczas obrony pracy chciałabym poprosić mgr Sylwię Sudoł-Tałaj o przedyskutowanie dwóch zagadnień:

1. Projektując związki serii A-C ograniczyła się Pni do podstawników  $\text{R}^1$  w postaci wodoru, chloru, fluoru, dwóch atomów chloru, dwóch atomów fluoru, grupy metoksylovej itp. Czy rozważyła Pani podstawniki w postaci atomu bromu czy grupy tiometylowej? Jeżeli dysponowała Pani wcześniej jakimiś prognozami na temat takich podstawników i były one niekorzystne dla nich, to jak bardzo?

2. W opisach widm związków E.4-E.8 sygnały grupy  $\text{NH}_2$  obecnej w cząsteczce są reprezentowane przez dublety w zakresie 6,18-6,32 ppm o znacznej stałej sprzężenia 49,5-65,5 Hz. Czym można tłumaczyć taką multipletowość tych sygnałów i taką wartość stałych sprzężenia?

**W podsumowaniu swojej recenzji chciałabym podkreślić, że Doktorantka w pełni zrealizowała postawione przed sobą ambitne zadania badawcze w dziedzinie poszukiwania nowych pochodnych 1,3,5-triazyny jako ligandów receptora serotoninowego 5-HT<sub>6</sub> o potencjalnym działaniu w chorobach neurodegeneracyjnych. Wykazała przy tym szeroki wachlarz umiejętności praktycznych i w sposób właściwy wykorzystwała rozległą wiedzę teoretyczną. Z uznaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest osiągnięciem oryginalnym i spełnia kryteria merytoryczne i formalne stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Sylwii Sudoł-Tałaj do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.**

Korzystając z uprawnień przysługujących recenzentowi, pragnę z satysfakcją zaproponować Wysokiej Radzie wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Sylwii Sudoł-Tałaj, która – moim zdaniem – pod względem zakresu prowadzonych doświadczeń, jakości uzyskanych wyników, a także ze względu na potencjalnie aplikacyjny charakter, przekracza ramy standardowej rozprawy. Bezsporny argument ku temu stanowi również fakt, że Doktorantka część wyników swojej pracy doktorskiej opublikowała

jako pierwszy autor w trzech artykułach naukowych w renomowanych czasopismach JCR *European Journal of Medicinal Chemistry* (Q1) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (Q1) o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF = 19,422 oraz 480 pkt. MEiN.

*prof. dr hab. Katarzyna Gobis*