Prof. dr hab. Jan K. Ludwicki

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. Joanny Ziemskiej pt.:
„Charakterystyka nowych, zaprojektowanych metodami chemii obliczeniowej inhibitorów aminopeptydazy leucynowej"

Wprowadzenie nowego leku do lecznictwa trwa kilkanaście lat, a koszty takiego przedsięwzięcia zwykle przekraczają 1 mld dolarów. Szacuje się, że mniej więcej 1 na 40 000 związków chemicznych zbadanych na zwierzętach doświadczalnych dociera do etapu badań klinicznych na ludziach, zakończonych wprowadzeniem nowego leku. Poszukiwanie nowych środków leczniczych jest więc jednym z największych wyzwań dla przemysłu farmaceutycznego, który przed wprowadzeniem technik komputerowych, bazował głównie na intuicji naukowej wynikającej z doświadczenia chemików i farmakologów.

Dziś, zastosowanie wspomaganych komputerowo metod projektowania leków umożliwia obniżenie nakładów, skrócenie czasu trwania tego procesu i, co jest równie ważne, ograniczenie użycia zwierząt do badań. Metodyka komputerowego wspomagania projektowania leków polega na przeszukiwaniu chemicznych baz danych strukturalnych i korzystaniu z programów obliczających parametry geometryczne cząsteczek, modelowanie ilościowej zależności między strukturą związku a jego aktywnością oraz ostateczne wyznaczanie modelu farmakoforowego polegającego na określeniu podstawowych elementów strukturalnych, niezbędnych do rozpoznania ligandu przez receptor, co, inaczej mówiąc, ma doprowadzić do określenia struktury rokującej nadzieje określonego działania biologicznego.

Doktorantka, jak sama podkreśla we wstępie, zainteresowała się tematyką projektowania nowych substancji chemicznych o spodziewanym działaniu leczniczym już na studiach farmaceutycznych. Zainteresowania te mogła rozwijać w późniejszej pracy w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego – Państwowym Zakładzie Higieny, w czym znacznie jej pomogła realizacja grantu dotyczącego poszukiwań nowych antybiotyków. W wyniku tych badań podążyła tropem, który wkrótce doprowadził wykonawców grantu do licznej grupy pochodnych izochinoliny o

obiecujących właściwościach biologicznych chociaż, jak to często bywa w badaniach naukowych, innych niż oczekiwane działanie biobójcze. Okazało się bowiem, że mgr Ziemska, dysponując odpowiednimi umiejętnościami i mając dostęp do narzędzi umożliwiających badanie zależności między strukturą chemiczną związków chemicznych a ich aktywnością biologiczną, podjęła poszukiwania takich zależności skupiając się na kinazach aminopeptydowych.

Ta tematyka stała się przedmiotem pracy doktorskiej mgr Joanny Ziemskiej, która do urzeczywistnienia swoich fascynacji naukowych wybrała narzędzia i metody stosowane w chemii obliczeniowej. Wyniki tych badań przedstawiła w postaci szeregu publikacji naukowych, które zaproponowała jako podstawę doktoratu. W teoretycznym wprowadzeniu do rozprawy w sposób zwięzły, lecz przy tym wyczerpujący, opisała proces projektowania nowej substancji leczniczej zwracając uwagę na punkty o znaczeniu krytycznym dla jego przebiegu.

Rolę kinaz aminopeptydowych w przyspieszaniu proliferacji, a następnie migracji komórek nowotworowych różnych typów raka Doktorantka opisała w pierwszej publikacji pt. „*Tyrosine kinase, Aurora kinase and leucine aminopeptidase as attractive drug targets in initiating therapy – characterization of their inhibitors*", w której omówiła znaczenie aminopeptydaz leucynowej, tyrozynowej i kinaz Aurora w cyklu komórkowym, ze szczególnym uwzględnieniem procesu nowotworowego. Omawiając te zagadnienia zwróciła uwagę na nadspodziewanie wysoką ekspresję tych enzymów towarzyszącą procesowi nowotworzenia. Podkreśliła przy tym potencjalną rolę inhibitorów aktywności tych enzymów w leczeniu raka. Artykuł ten, którego mgr Ziemska jest pierwszą autorką, stanowi nie tylko wyczerpujący przegląd piśmiennictwa, ale także włącza się w naukowy dyskurs o inhibitorach kinaz jako potencjalnych lekach przeciwnowotworowych. W tym artykule, opublikowanym w czasopiśmie Roczniki Państwowego Zakładu Higieny w 2016 r. Doktorantka wskazuje na potrzebę poszukiwań zmierzających do poprawy indeksu terapeutycznego nowych inhibitorów kinaz aminopeptydowych. Publikacja ta była cytowana m.in. przez międzynarodowy zespół badawczy z Uniwersytetów w USA i w Chinach w czasopiśmie *EBioMedicine* należącym do grupy *Lancet*. Pozwala to nabrać przekonania, że wiedza teoretyczna mgr Ziemskiej, znajomość tematu i umiejętność włączenia się do międzynarodowego dyskursu naukowego dały dobre podstawy do racjonalnego sformułowania zadań, jakie zamierzała podjąć w najbliższej przyszłości.

Ich cele określiła jako zaprojektowanie i scharakteryzowanie nowych inhibitorów aminopeptydazy leucynowej, jako kandydatów do dalszych studiów nad potencjałem tych związków w leczeniu raka. Cel ten postanowiła osiągnąć wykonując szereg badań, które stanowiąc cele pośrednie, stopniowo, etapami przybliżały ją do mety. Analiza dokonań na poszczególnych etapach oraz ich chronologia świadczy, że Doktorantka dobrze sobie radzi z planowaniem naukowym. Mam tu na myśli wytyczenie mapy drogowej postępowania, która w jasny sposób określa logiczny ciąg poszukiwań, badań i eksperymentów, na końcu której pojawia się charakterystyka aktywności biologicznej pochodnych izochinoliny wytypowanych do dalszych badań. Mgr Ziemska zaczęła od utworzenia modelu określającego przestrzenne rozmieszczenie atomów oraz grup funkcyjnych pochodnych izochinoliny w celu optymalizacji potencjału wiązania się z odpowiednim receptorem aminopeptydazy leucynowej. Wymagało to wykorzystania wspomaganych komputerowo metod teoretycznych. Mając już taki farmakofor Doktorantka przystąpiła do wirtualnego przeszukiwania chemicznych baz danych w celu znalezienia odpowiednich pochodnych izochinoliny. W następnej kolejności określiła najbardziej prawdopodobną strukturę 3D wykorzystując do tego celu metodę dokowania molekularnego, którą umożliwia dopasowanie cząsteczki do miejsca docelowego aminopeptydazy leucynowej. Uwagę zwraca biegłość mgr Ziemskiej w posługiwaniu się odpowiednimi programami komputerowymi, a sam opis parametrów oceny usadowienia badanych związków w centrum aktywnym aminopeptydazy leucynowej świadczy o jej biegłości przy interpretacji wyników wirtualnego przeszukiwania.

Podobne odczucia towarzyszą podczas lektury opisu następnego etapu poszukiwań, którym było modelowanie ilościowej zależności pomiędzy strukturą badanych związków a ich aktywnością. W tej części Doktorantka przeprowadziła obliczenia 3D-QSAR wykorzystując oprogramowanie umożliwiające oszacowanie oczekiwanego zahamowania aktywności aminopeptydazy leucynowej. Doprowadziło to do wyłonienia pochodnych izochinoliny o spodziewanych właściwościach inhibitorów tego enzymu, jako kandydatów do dalszych badań. Dalsze etapy badań wymagały od Doktorantki dodatkowych umiejętności organizacyjnych ponieważ, niezależnie od potrzeby zsyntetyzowania wytypowanych metodą 3D-QSAR pochodnych izochinoliny, konieczne było przeprowadzenie badań potwierdzających działanie antyproliferacyjne *in vitro* na różnych liniach komórkowych i udowodnienie, że wynika ono z zahamowania aktywności aminopeptydazy leucynowej, a także

zbadanie jak wyłoniona w tych badaniach cząsteczka oddziałuje na cykl komórkowy i, co ma w tym przypadku szczególne znaczenie, czy śmierć komórki następuje w drodze apoptozy. Badania te doprowadziły do jednego kandydata (*3,3-dikarboksylan 6,8-dibenzyloksy-3,4-dihydroizochinoliny*), który miał posłużyć jako substancja modelowa, reprezentująca większą liczbę pochodnych izochinoliny i który mgr Ziemska poddała kolejnym badaniom, tym razem toksykologicznym, w warunkach *in vivo* w celu wykazania ewentualnego działania uczulającego, drażniącego, zbadania ostrej toksyczności dermalnej i po narażeniu drogą pokarmową. Wreszcie potwierdziła, że związek ten hamuje aktywność mikrosomalnej aminopeptydazy leucynowej wyizolowanej z soczewki oka wołu. Wszystkie te badania opublikowała w czasopiśmie *Bioorganic and Medicinal Chemistry* w jednym bardzo obszernym artykule naukowym, mającym fundamentalne znaczenie dla ocenianej rozprawy doktorskiej. W opinii recenzującego materiał opublikowany w tym artykule z powodzeniem wystarczyłby na co najmniej trzy publikacje w dobrych czasopismach naukowych. Nie jest jednak rzeczą recenzenta ingerować w strategię publikacyjną Doktorantki.

Oddzielnych publikacji doczekała się część teoretyczna, włączona przez mgr Ziemską do cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej. Mam tu na myśli opublikowany w czasopiśmie *Chemical Papers* artykuł dotyczący wykonanych przez nią badań teoretycznych, w którym szczegółowo przedstawiła metodologię wykorzystaną *in silico* przy projektowaniu serii pochodnych izochinoliny, kwasów fosfinowego i fosfonowego jako potencjalnych inhibitorów aminopeptydazy leucynowej, przy dokowaniu molekularnym badanych związków do centrum aktywnego enzymu, utworzeniu farmakoforu, analizie 3D-QSAR, analizie map konturowych cząsteczek i w końcu obliczeniach umożliwiających określenie niektórych właściwości toksykologicznych zaprojektowanych cząsteczek. Lektura tego artykułu pozwala zrozumieć, jak rozległych poszukiwań wstępnych wymagało przeszukanie licznych chemicznych baz danych pod kątem wytypowania związków, co do których można było mieć nadzieję, że spełnią kryteria dokowania do centrum aktywnego aminopeptydazy leucynowej. Rezultaty wieloetapowego odfiltrowywania *in silico* substancji niespełniających kolejnych, coraz ostrzejszych kryteriów doprowadziły Doktorantkę do 35 związków o bardzo dobrej dokładności dopasowania w modelu 3D-QSAR i następnie do zaledwie 9 dodatkowo zapewniających odpowiednią siłę tego dokowania wyrażaną funkcją opisującą właściwości fizykochemiczne kompleksu receptor-ligand. Badania te zostały zwieńczone kolejną publikacją złożoną na

początku tego roku do czasopisma *Molecules* i opublikowaną już w kwietniu br. Artykuł dotyczył dokowania *3,3-dikarboksylanu 6,8-dibenzyloksy-3,4-dihydroizochinoliny* do centrum aktywnego aminopeptydazy leucynowej i został zilustrowany grafikami komputerowymi wygenerowanymi przez oprogramowanie umożliwiające wizualizację interakcji badanych związków z centrami aktywnymi enzymu.

Niezależnie od tych badań Doktorantka przedstawiła wyniki oceny prawdopodobieństwa, że badana cząsteczka spełni podstawowe wymagania dla leku, to jest wykaże odpowiednie właściwości w badaniach ADME *in silico*, które pozwalają przewidywać losy badanej substancji w ustroju. Udokumentowała także bardzo dobre dopasowanie pomiędzy wynikami hamowania enzymu w zależności od stężenia inhibitora otrzymanymi w drodze eksperymentu i metodą *in silico*.

Podsumowując opis dokonań podczas tych badań warto zwrócić uwagę na zasięg przeprowadzonego screeningu, który obejmował początkowo ok. 200 milionów substancji zgromadzonych w trzech największych bazach danych chemicznych, by po kolejnych zawężaniach kryteriów, otrzymać w końcu jedną pochodną izochinoliny, którą można było wytypować jako inhibitor aktywności aminopeptydazy leucynowej, rokujący nadzieję na nową substancję leczniczą w niektórych postaciach raka.

Zaprezentowany jako praca doktorska cykl badań mgr Ziemska zwieńczyła sześcioma wnioskami. Wszystkie one znajdują potwierdzenie w wynikach przeprowadzonych badań. Na uwagę zasługuje wniosek nr 4, w którym wyraża przekonanie, że następnym etapem prac będzie synteza najbardziej obiecujących pochodnych izochinoliny i badania *in vitro* na liniach komórkowych oraz toksykometryczne na zwierzętach doświadczalnych. Dobrze to świadczy o badaniach, które dając odpowiedź na pytanie zadane przed ich rozpoczęciem, ukazują po ich zakończeniu kolejne problemy do rozwiązania. Doktorantce można tylko pogratulować, że je dostrzegła i zamierza się z nimi uporać w przyszłości.

Należy tu jeszcze podkreślić, że poszukiwania Doktorantki (wraz z zespołem) zostały zwieńczone dwoma patentami, polskim i europejskim. Z obowiązku recenzenta należy także dodać, że we wszystkich publikacjach wytypowanych przez Doktorantkę jako podstawa rozprawy doktorskiej rola mgr Ziemskiej była wiodąca.

Nie dostrzegłem też w autoreferacie żadnych usterek, które mogłyby wpłynąć na moją wysoką oceny dotychczasowych dokonań naukowych i praktycznych mgr Joanny Ziemskiej.

Podsumowując, z satysfakcją wyrażam przekonanie, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Joanny Ziemskiej pt.: „*Charakterystyka nowych, zaprojektowanych metodami chemii obliczeniowej inhibitorów aminopeptydazy leucynowej*" spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim.

Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny wniosek o dopuszczenie mgr farm. Joanny Ziemskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną i poznawczą tej pracy, wnioskuję o jej wyróżnienie uzasadniając to nowatorskim podejściem do rozwiązywania problemów badawczych, innowacyjnością i wysokim poziomem naukowym dorobku naukowego przedstawionego jako podstawa niniejszej oceny.

.....
Prof. dr hab. farm. Jan K. Ludwicki

Warszawa, grudzień 2020 r.