



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

RECENZJA

pracy doktorskiej mgra inż. Piotra Krzeczyńskiego pt. „Nowe, małowcząsteczkowe związki chemiczne hamujące biologiczną aktywność interleukiny 15 (IL-15)”, wykonanej w Zakładzie Chemii Instytutu Farmaceutycznego oraz w Zakładzie Immunologii, Biochemii i Żywienia Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Terapia chorób o podłożu autoimmunologicznym jest istotnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Obecnie wielu pacjentów cierpi z powodu reumatoidalnego zapalenia stawów, łuszczycy, choroby Leśniowskiego-Crohna, czy stwardnienia rozsianego. Chociaż w terapii tych chorób funkcjonują pewne schematy leczenia, często nie są one wystarczająco skuteczne, dlatego istotne staje się poszukiwanie nowych leków. Jedną z atrakcyjnych możliwości terapeutycznych jest ingerencja w układ cytokin.

Recenzowana praca skupia się na poszukiwaniu związków hamujących aktywność prozapalnych cytokin, takich jak interleukina 15 i stanowi odpowiedź na wyzwania współczesnej nauki. Autor kontynuuje badania rozpoczęte w ramach projektu zatytułowanego „Identyfikacja związku chemicznego hamującego biologiczne efekty interleukiny 15 (IL-15) poprzez selektywne blokowanie receptora IL-15 α ”, a finansowanego przez Fundację na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny – Polpharma. Cała praca liczy 91 stron. Rozpoczyna się od krótkiego wstępu, przedstawiającego występowanie, budowę i funkcje interleukiny 15, a także przykłady poszukiwania inhibitorów blokujących jej wiązanie z receptorem. Następnie autor definiuje cel pracy, po czym omawia metody i wyniki. W dalszej części doktorant rozpoczyna dyskusję, która przechodzi w podsumowanie. Całość zamyka spis literatury, obejmujący 148 pozycji, z czego około jedną trzecią stanowią odnośniki do baz danych.

Celem pracy doktorskiej Pana mgra inż. Krzeczyńskiego było zaprojektowanie i synteza inhibitorów IL-15 wiążących się z podjednostką α receptora dla tej interleukiny. Blokowanie interakcji IL-15 z jej receptorem można osiągnąć poprzez zastosowanie związków, które będą wiązać się z samą interleukiną lub z jej receptorem. Autor, znając budowę kompleksu IL-15 – IL-15R α oraz bazując na dotychczasowych wynikach badań zespołu, do wszystkich pochodnych wprowadził dwie grupy karboksylowe, które miały zapewnić wiązanie z receptorem. Finalnie doktorant zaproponował do syntezy 20

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Chemii Farmaceutycznej

Zakład Fizykochemicznej
Analizy Leku

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 54 50

faks +48 12 620 54 50

pochodnych, które na tym etapie podzielił na trzy grupy. Zasadniczo związki te należały do dwóch serii. Były to *N*-acylowe pochodne kwasów aminobenzoesowych (R2V-11, -16, -61, -62, -63, -64, -65, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -72, -73 i -74) oraz *N,N*-diacylowe pochodne fenyletyloaminy (R2V-57, -58, -59, -60). Wszystkie zaprojektowane pochodne zostały zadokowane do struktury receptora, celem oceny ich powinowactwa. Wyniki badań *in silico*, zgodnie z założeniami, potwierdziły możliwość oddziaływania zaprojektowanych związków z receptorem IL-15R α , a przewidziane wartości stałych inhibicji K_i , z pięcioma wyjątkami, były na poziomie subnanomolarnym. Dodatkowo autor wykonał przewidywania właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych, podkreślając, że większość planowanych do syntezy związków wykazuje właściwości lekopodobne.

Obiecujące wyniki przewidywań aktywności i właściwości przemawiały za syntezą wszystkich zaprojektowanych pochodnych. Doktorant prowadził syntezę związków sześcioma metodami A – F. Metody A, B, C i E można uznać za tożsame, podobnie jak metodę D i F, ponieważ w poszczególnych metodach zmieniano substraty, a warunki reakcji pozostawiano zasadniczo takie same. W pierwszej grupie metod produkty otrzymywano w reakcji fenyletyloaminy lub kwasów aminobenzoesowych z bezwodnikiem kwasu bursztynowego lub maleinowego, natomiast w drugiej grupie metod kwasy aminobenzoesowe acylowano chlorkami monoestrów kwasu bursztynowego i maleinowego, po czym hydrolizowano estry do wolnych kwasów. Wszystkie pochodne zostały otrzymane z wydajnościami w zakresie od 40 do 97%. Produkty zostały scharakteryzowane metodami spektroskopowymi: IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ i MS. Na tym etapie należy podkreślić, że aż 13 spośród zaprojektowanych związków zostało już wcześniej otrzymanych, a niektóre z nich można zakupić u komercyjnych dostawców. Dodatkowo analiza literatury przeprowadzona przez autora pracy wskazywała, że aż 11 związków było badanych pod kątem różnych aktywności biologicznych (np. związki R2V-63 i -64, które hamowały acetylocholinoesterazę z wartościami IC_{50} równymi odpowiednio 92,5 oraz 357 nM). Doktorant podkreślił, że żaden z otrzymanych przez niego związków nie był badany w kierunku hamowania aktywności IL-15.

Dla zsyntezowanych pochodnych doktorant zaplanował i wykonał szereg badań biologicznych. Jako pierwszą zbadał cytotoksyczność. Choć autor pisze, że testy wykonano dla całej serii związków w trzech stężeniach: 0,5 mM, 2 mM i 5 mM, to faktycznie badanie to objęło 19 spośród 20 związków. W badanych stężeniach żadna z testowanych pochodnych nie wykazała działania cytotoksycznego względem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). Takie wyniki były przesłanką do kontynuowania badań. W następnym etapie doktorant przeprowadził test BrdU w celu oceny wpływu wszystkich dwudziestu związków na proliferację komórek PBMC. Pochodne były badane w trzech stężeniach: 5 mM, 300 μM i 50 μM . Wyniki uzyskane dla najwyższego stężenia były intrygujące. Dwanaście badanych związków hamowało proliferację komórek stymulowanych IL-15 do poziomu, jaki uzyskano dla kontroli z komórkami niestymulowanymi. Paradoksalnie dwa związki nasilały efekt proliferacyjny, natomiast pozostałe nie różniły się statystycznie od kontroli pozytywnej tj. komórek

stymulowanych interleukiną 15. W niższych stężeniach tj. 300 μM i 50 μM nie obserwowano już działania odwrotnego. Na 20 sprawdzonych pochodnych proliferację hamowało odpowiednio 18 i 15 związków. Dalsze badania objęły ocenę, czy otrzymane pochodne są także inhibitorami uwalniania TNF- α oraz IL-17. Komórki PBMC pod wpływem IL-15 uwalniają TNF- α i IL-17, dlatego doktorant postanowił sprawdzić, czy zastosowanie wyłonionych we wcześniejszym teście inhibitorów proliferacji będzie prowadzić do zmniejszenia uwalniania innych cytokin. Po przebadaniu 15 związków w stężeniu 50 μM wykazano, że wszystkie hamują uwalnianie TNF- α , natomiast tylko siedem wpływa na poziom IL-17.

W toku dalszych prac autor przeprowadził analizę zależności struktura – aktywność dla otrzymanych i przebadanych pochodnych. Chociaż, jak zaznacza doktorant, nie można wysnuć w pełni jednoznacznych wniosków w kontekście wpływu elementów strukturalnych na aktywność, to istnieją pewne przesłanki, które warto wziąć pod uwagę przy projektowaniu kolejnych pochodnych np. w grupie pochodnych fenylenodiamin silniej działają pochodne kwasu maleinowego. W podsumowaniu Pan mgr inż. Krzeczyński podkreśla, iż zastosowanie modelowania *in silico* oraz prostych testów screeningowych zwiększa szanse na wytypowanie cząsteczek o dużym potencjale terapeutycznym.

Korzystając z przywileju recenzenta chciałbym zadać doktorantowi kilka pytań, które pojawiły się w trakcie lektury jego pracy:

1. Dlaczego w dokowaniu giętkim uwzględniono ruchomość tylko 4 reszt aminokwasowych, a nie wszystkich znajdujących się w pewnym promieniu od liganda?
2. Jak zaznacza autor, rzeczywista aktywność związków (hamowanie proliferacji) była na poziomie mikromolowym, a przewidywana (wartości K_i) na pikomolowym, co wskazuje na dużą różnicę między wynikami obliczonymi a wyznaczonymi eksperymentalnie. Czy brano pod uwagę możliwość zastosowania ponownej oceny tzw. *rescoringu*, aby metody *in silico* lepiej odwzorowywały aktywność biologiczną?
3. Według tabeli 4 zaprojektowane związki (a dokładniej ich układy aromatyczne) oddziałują z resztą argininy tworząc oddziaływania hydrofobowe (zaznaczone kolorem jasnoróżowym). Czy zaobserwowano oddziaływania kation – π pomiędzy tą resztą aminokwasową a pierścieniami aromatycznymi?
4. Niektóre spośród zaprojektowanych pochodnych można zakupić u komercyjnych dostawców. Dlaczego zdecydowano, że wszystkie pochodne będą syntezowane, zamiast zakupić gotowe związki? Czy decydowały o tym aspekty ekonomiczne?
5. Dlaczego nie podano wyników oznaczeń w teście cytotoksyczności dla związku R2V-71?
6. Autor wspomina, iż niektóre związki były według danych literaturowych wcześniej badane pod kątem innych aktywności. Czy zatem te inne udowodnione aktywności nie stanowiły problemu w trakcie wykonywania badań biologicznych zaplanowanych w niniejszej pracy? Czy inne

aktywności na wyższym poziomie niż aktywność antyproliferacyjna nie będą przeszkodą w dalszych badaniach?

7. Czy nowe pochodne, otrzymane w ramach tej pracy działają silniej niż związki wcześniej otrzymane w zespole lub związki referencyjne (np. Y-320, 76 z rysunku 14)?

Funkcja recenzenta zobowiązuje mnie także do wskazania pewnych niedoskonałości w pracy. Są to głównie drobne uwagi i nie zmniejszają one wartości merytorycznej pracy:

1. na stronie 7 autor używa określenia „farmakofory miejsc wiążących w receptorze oraz ligandzie” – jest to pewien skrót myślowy; lepiej byłoby użyć określenia „farmakofory ligandów wiążących się z receptorem lub interleukiną”,
2. na tej samej stronie jest napisane: „ Analiza wyników badań biologicznych doprowadziła do wniosku, że 12 spośród nich skutecznie hamowało (...) syntezę TNF- α oraz IL-17. Dziewięć (9) z nich (...) poprzez blokowanie IL-15R α , natomiast pozostałe cztery (4) na skutek wiązania z IL-15. Zgodnie z zasadami arytmetyki: 4 + 9 = 13,
3. na str. 13 autor używa słowa „klaster” na określenie siatki reprezentującej miejsce wiązania – lepiej używać określenia „siatka” (ang. *grid, box*),
4. strona 16: kwas 1,4-aminobenzoesowy powinien być nazwany kwasem 4-aminobenzoesowym lub kwasem *p*-aminobenzoesowym – nie jest potrzebne podawanie 1 w lokantach w nazwie,
5. na schemacie 6 zamiast grupy –NH₂ pojawia się grupa –NH₃,
6. na rysunku 4 w strukturach tymidyny i jej analogu brakuje jednego atomu azotu.

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Piotra Krzeczyńskiego podejmuje ważne zagadnienia z punktu widzenia terapii chorób autoimmunologicznych. Autor zrealizował postawiony cel pracy, otrzymując 20 pochodnych o ogólnej strukturze kwasów dikarboksylowych jako potencjalnych inhibitorów IL-15 wiążących się z jej receptorem. Dla części z nich doktorant wykazał aktywność antyproliferacyjną oraz zdolność do hamowania uwalniania TNF- α i IL-17. W mojej ocenie wyniki te mogą stanowić istotny element w dalszych badaniach nad inhibitorami IL-15. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe i wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Piotra Krzeczyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku

Marek Bajda
dr hab. Marek Bajda, prof. UJ

Kraków, 30.01.2020

dr hab. Marek Bajda, prof. UJ