



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, 10.03.2023 r.

Prof. dr hab. Marek Bajda
Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku
Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9
tel. +48 12 620 54 52
e-mail: marek.bajda@uj.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra farm. Adama Stasiulewicz pt. „Poszukiwanie ligandów receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 wśród substancji leczniczych, związków pochodzenia naturalnego i związków syntetycznych”, wykonanej w Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Interdyscyplinarnym Laboratorium Modelowania Układów Biologicznych Centrum Nowych Technologii na Uniwersytecie Warszawskim

Odkrycie układu endokannabinoidowego było ważnym wydarzeniem w badaniach nad nowymi lekami. Jego zaangażowanie w regulację wielu istotnych procesów sprawiło, iż stał się on obiektem zainteresowania grup badawczych, zajmujących się poszukiwaniem leków przeciwdrgawkowych, przeciwbólowych, leków na otyłość czy leków przeciwnowotworowych. Izolacja Δ^9 -tetrahydrokannabinolu i kannabidiolu z konopii siewnych przyczyniła się do zidentyfikowania receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 oraz poznania endogennych kannabinoidów, takich jak anandamid czy 2-arachidonylglicerol. Możliwość wpływu na receptory kannabinoidowe, stanowiąca potencjalny mechanizm działania leków w terapii różnych chorób, stała się siłą napędową do prowadzenia badań w zakresie poszukiwania nowych związków bioaktywnych, ingerujących w działanie tego układu. Nasza wiedza na temat ligandów receptorów CB1 i CB2 oraz ich roli w leczeniu wciąż ewoluuje, a publikowane artykuły naukowe dostarczają informacji o nowych aktywnych związkach. Istotny wkład w ten proces wniósł Pan mgr Adam Stasiulewicz, wykorzystując



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

metody modelowania molekularnego w poszukiwaniu ligandów receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 wśród substancji leczniczych, związków pochodzenia naturalnego i związków syntetycznych. Prowadzone przez doktoranta badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Preludium, którego był kierownikiem.

Recenzowana rozprawa została przygotowana w formie autoreferatu wraz z załącznikami. Na początku autor przedstawił wykaz swojego dorobku oraz umieścił streszczenia. Autoreferat został podzielony na rozdziały, które obejmują kolejno wstęp, cele pracy, komentarz do publikacji, podsumowanie i wnioski. Całość autoreferatu zamyka spis piśmiennictwa. Cytowane źródła zostały starannie dobrane, składa się na nie 141 pozycji, głównie z ostatnich lat. Do autoreferatu dołączono publikacje prezentujące uzyskane wyniki oraz oświadczenia współautorów.

Podstawę rozprawy doktorskiej Pana mgra Adama Stasiulewicza stanowi cykl trzech, powiązanych tematycznie, prac opublikowanych w latach 2020-2023 o sumarycznym wskaźniku *Impact Factor (IF)* wynoszącym 17,866 i łącznej punktacji MEiN: 340. Pierwsza publikacja jest pracą przeglądową na temat układu endokannabinoidowego, a dwie pozostałe są pracami eksperymentalnymi. We wszystkich pracach Pan mgr Stasiulewicz jest pierwszym autorem, co jest związane z jego wysokim udziałem procentowym (45-60%), obejmującym współtworzenie koncepcji, analizę literatury, opracowanie metodyki, przeprowadzenie badań *in silico*, analizę wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptów.

We wstępie autoreferatu doktorant przedstawił kluczowe informacje na temat układu endokannabinoidowego. Scharakteryzował jego główne komponenty, skupiając się na receptorach kannabinoidowych. Ponadto przedstawił najważniejsze ligandy tych receptorów oraz przeanalizował możliwości ich zastosowania w terapii. Przejrzyście przygotowany wstęp pozwolił doktorantowi na płynne przejście do kolejnych części, w których określił cele pracy oraz przedstawił komentarz do poszczególnych publikacji.

W recenzowanej pracy zostały zdefiniowane trzy główne cele naukowe. Były to kolejno:

- identyfikacja substancji leczniczych lub ich metabolitów oddziałujących z receptorem CB1,
- identyfikacja ligandów receptora CB1 wśród związków pochodzenia naturalnego i pokrewnych związków syntetycznych,
- identyfikacja nowych ligandów receptora CB2.



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Doktorant, aby zrealizować postawione cele, przeprowadził najpierw szczegółową analizę danych literaturowych, co zaowocowało pracą przeglądową pt. „A Guide to Targeting the Endocannabinoid System in Drug Design”, opublikowaną w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. Na szczególną uwagę w tej publikacji zasługuje bardzo szerokie omówienie chorób, w których ligandy receptorów kannabinoidowych mogą znaleźć zastosowanie. Są to m.in. ból, padaczka, lęk, depresja, zaburzenia kognitywne, choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, Parkinsona), stany zapalne i choroby autoimmunologiczne, otyłość, cukrzyca oraz nowotwory.

Wyniki prac badawczych, powiązanych z dwoma pierwszymi celami naukowymi, zostały przedstawione w publikacji oznaczonej numerem dwa. Poszukiwanie ligandów receptora CB1 wymagało od autora rozprawy opracowania i zwalidowania wieloetapowej procedury wirtualnego screeningu. Doktorant przeprowadził dwa powtórzenia procedury, za drugim razem znacznie rozbudowując metodę przesiewu oraz zwiększając startową bibliotekę związków. Takie działanie pozwoliło na wyłonienie 45 związków (22 z pierwszego powtórzenia oraz 23 z drugiego), które zostały przebadane *in vitro* w teście wypierania radioliganda. Spośród nich siedem pochodnych, w tym jedna substancja lecznicza tj. trawoprost i jeden związek pochodzenia naturalnego (ginkgetyna), wykazało powinowactwo do receptora CB1 na poziomie mikromolowym lub submikromolowym; dla najaktywniejszego związku **30**, K_i wyniosło 0,8 μM . W dalszym etapie oceniono aktywność wewnętrzną, wskazując, że związek **30** jest mieszanym częściowym agonistą / antagonistą, a pozostałe związki są antagonistami.

Poszukiwanie ligandów receptora CB2 opisane w trzeciej publikacji było także prowadzone z wykorzystaniem wielopoziomowego wirtualnego screeningu. Metoda przesiewu została oparta na wcześniejszych doświadczeniach z poszukiwania ligandów receptora CB1. Po przeanalizowaniu bazy, obejmującej 7 milionów związków, wyłoniono 16 kandydatów, których następnie przebadano w testach *in vitro*. W przypadku tej grupy ligandów, poza powinowactwem do receptora oraz aktywnością wewnętrzną, zwrócono także uwagę na selektywność. Przeprowadzone badania pozwoliły na zidentyfikowanie czterech selektywnych antagonistów receptora CB2, wśród których najaktywniejszy związek **AS-7** wykazał powinowactwo na poziomie nanomolowym ($K_i = 65 \text{ nM}$).

Przygotowane przez autora rozprawy podsumowanie jest szerokie, a wyciągnięte wnioski w pełni uzasadnione. Mając na uwadze dużą wartość uzyskanych wyników, chciałbym jako recenzent zadać doktorantowi kilka pytań:



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

- Jakie są dalsze plany względem wyłonionych cząsteczek o potwierdzonej aktywności wobec receptorów kannabinoidowych?
- Czy dla wyłonionych w wirtualnym screeningu substancji leczniczych i związków pochodzenia naturalnego, połączenie ich podstawowej aktywności z wpływem na receptory kannabinoidowe jest korzystne z punktu widzenia terapii?
- Jakie byłyby optymalne właściwości fizykochemiczne dla ligandów receptorów kannabinoidowych, biorąc pod uwagę wiązanie z receptorem, drogę podania i miejsce działania?
- Czy opracowane metody wirtualnego screeningu, po odpowiednim dopasowaniu, mogłyby znaleźć szerokie zastosowanie w poszukiwaniu substancji biologicznie aktywnych? Jakie są ograniczenia w stosowaniu tych metod?

Podsumowując, rozprawa doktorska mgra Adama Stasiulewicza podejmuje ważne zagadnienia z punktu widzenia poszukiwania nowych leków. Autor na przykładzie receptorów kannabinoidowych udowodnił, iż zastosowanie metod modelowania molekularnego może ułatwić znalezienie aktywnych związków, które po dalszej optymalizacji mogą stać się kandydatami na nowe leki. Wyłonione na obecnym etapie związki cechują się istotną aktywnością i z pewnością warto poświęcić im dalszą uwagę. W mojej ocenie poruszane w rozprawie zagadnienia są interesujące i oryginalne, a wyniki uzyskane przez doktoranta mają dużą wartość naukową. Potwierdzeniem tej wartości są prace oryginalne, opublikowane w czasopismach *ACS Chemical Neuroscience* oraz *Journal of Chemical Information and Modeling* o wysokich współczynnikach oddziaływania, w których doktorant jest pierwszym autorem. **Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe i wnoszę o dopuszczenie mgra Adama Stasiulewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, uwzględniając wspomnianą wysoką wartość naukową prowadzonych przez doktoranta badań oraz całociowy dorobek, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku

prof. dr hab. Marek Bajda