



Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Biofarmacji
ul. Chodźki 4a 20-093 Lublin

Lublin, dn. 21.08.2022

dr hab. n. farm. Anita Płazińska, prof. UM w Lublinie
Zakład Biofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
e-mail: anita.plazinska@umlub.pl

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Pietrusia

pt.: *The role and importance of fluorine in the rational drug design on the example of selected class A GPCR receptors,*

(*Rola i znaczenie fluoru w racjonalnym projektowaniu leków na przykładzie wybranych receptorów klasy A GPCR*),

wykonanej pod opieką naukową dr hab. Rafała Kurczaba oraz dr hab. Justyny Kalinowskiej-Tłuścik

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk z dnia 21.VI.2022.

Metody obliczeniowe służące do projektowania struktur związków, badania struktury i konformacji biomolekuł, jak również zajmujące się analizą oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych mają ugruntowaną pozycję w dziedzinie nauk biologicznych, chemicznych oraz biochemicznych. Z uwagi na dużą złożoność badanych układów biologicznych oraz kompleksowość procesów w nich zachodzących, równoległe z badaniami skupionymi na konkretnych układach podejmowane są liczne starania mające na celu ulepszenie dokładności i wydajności dostępnych metodologii oraz towarzyszących im narzędzi obliczeniowych.

Recenzowana rozprawa doktorska, napisana przez Pana mgr Wojciecha Pietrusia, poświęcona jest ocenie wpływu fluoru na właściwości fizykochemiczne cząsteczek zawierających ten pierwiastek oraz na ich aktywność biologiczną.

Przedstawiona do oceny rozprawa skonstruowana jest w formie kompilacji pięciu artykułów oryginalnych opublikowanych w uznanych czasopismach o zasięgu



międzynarodowym, znajdujących się na liście filadelfijskiej. Do kolekcji artykułów dołączony jest wstęp, w którym Autor przedstawił wybrane zagadnienia związane bezpośrednio z tematyką przeprowadzonych badań a także skondensowany opis celów oraz rezultatów pracy.

Artykuły o łącznym IF wynoszącym 23,004 opublikowane zostały w: *Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (IF = 4,098, punkty MEiN = 140), *ChemPhysChem* (IF = 3,102, punkty MEiN = 100), *Molecules* (IF = 4,411, punkty MEiN = 140), *Biomolecules* (IF = 4,879, punkty MEiN = 100) oraz *European Journal of Medicinal Chemistry* (IF = 6,514, punkty MEiN = 140).

Autor określił udział w realizacji wszystkich prac w sposób opisowy. Z opisu tego wynika, że jego rola w realizacji powyższych prac dotyczyła badań teoretycznych, w szczególności wykonania obliczeń kwantowo-mechanicznych dla serii cząsteczek, w tym obliczenia potencjału elektrostatycznego, analizy wibracyjnej widm teoretycznych, przeprowadzenia symulacji metodą dynamiki molekularnej, analizowania otrzymanych wyników, a także pisania manuskryptów oraz przeprowadzania analizy literatury. Pan Wojciech Pietruś w ramach swojej pracy doktorskiej przeprowadził również badania eksperymentalne dotyczące krystalizacji niefluorowanych, mono- i di-fluoropochodnych *para*-halogenoanilin oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej powyższych związków.

Tematem wiążącym wszystkie prace jest zastosowanie wybranych metod obliczeniowych w celu zaprojektowania oraz badania mechanizmu oddziaływania związków zawierających halogeny, głównie fluor. Cel zdefiniowany we wstępie przez Autora rozprawy dotyczy ośmiu głównych aspektów.

Szczegółowe cele pracy związane są określeniem wpływu podstawnika fluorowego na: (i) energię międzycząsteczkowych wiązań halogenowych i wodorowych w układach modelowych oraz w układach biologicznych, (ii) zbadaniem korelacji między energią wewnątrzcząsteczkowych i międzycząsteczkowych oddziaływań z fluorem a zmianami w widmach ramanowskich oraz FT-IR, (iii) wpływem fluoru na parametry σ -dziury, (iv) oddziaływania międzycząsteczkowe obserwowane w strukturach zdeponowanych w bazie PDB, (v) racjonalne projektowanie nowych związków, potencjalnych leków, jak również (vi) opracowanie zasad projektowania nowych leków w oparciu o analizę klifów aktywności dla transformacji wymiany atomu wodoru na atom fluoru. Ponadto, kolejny cel badań przeprowadzonych przez Pana Wojciecha Pietrusia dotyczył krystalizacji zsyntetyzowanych związków i analizy rentgenostrukturalnej monokryształów mono- i difluoropochodnych benzenu. Realizacja powyższych celów miała dostarczyć nowych informacji na temat wpływu podstawnika fluorowego w związkach na ich właściwości fizykochemiczne i farmakodynamiczne.



Dołączony do zestawu publikacji wstęp jest dość zwięzły lecz pokazuje, że Autor rozprawy doskonale porusza się w tematyce prowadzonych przez siebie badań. Treść wstępu podzielono kilka sekcji, dotyczących m.in. istotnych informacji na temat fluoru, tworzonych przez niego typu wiązań, jego wpływu na właściwości fizykochemiczne związków chemicznych oraz jego znaczeniu w chemii medycznej. Kolejne rozdziały dotyczą problematyki symulowania układów biologicznych. Autor pokrótce omówił wybrane metody obliczeniowe, które wykorzystał w swoich badaniach m.in. metodę dynamiki molekularnej, kwantową teorię atomów w cząsteczkach, metodę dekompozycji energii, klify aktywności (ang. *activity cliffs*) pomocną w racjonalnym projektowaniu leków. Całość każdej z tych sekcji stanowi dość spójny ciąg, w którym Autor wprowadza czytelnika w zagadnienia istotne dla opisanych później badań. Następnie precyzowane są szczegółowe cele badawcze oraz metodyka prowadzonych badań teoretycznych i eksperymentalnych. Na końcu prezentowane są (w sposób skondensowany w porównaniu do oryginalnych artykułów naukowych) wyniki uzyskane w toku badań. Prezentację wyników podzielono w analogii do artykułów, w których się one oryginalnie ukazały. Zakończenie wstępu stanowią wnioski będące podsumowaniem najważniejszych wyników uzyskanych w toku badań opisanych w niniejszej rozprawie.

Poniżej omawiam badania i ich wyniki, zawarte w pracach będących podstawą rozprawy. Omówienie to jest dość pobieżnie z uwagi m.in. na to, że prace wchodzące w skład rozprawy były już recenzowane. Dodatkowo, z racji faktu, iż niektóre prace dotyczą badań multidyscyplinarnych, skupiam się na elementach dotyczących bezpośrednio recenzowanej rozprawy.

- W pracy **P1** [W. Pitruś i wsp., *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 252, 119536] przeprowadzone obliczenia i analiza map powierzchni potencjału elektrostatycznego wyjaśniły wpływ podstawienia aniliny atomem fluoru na właściwości cząsteczki, w tym tendencję do tworzenia oddziaływań międzycząsteczkowych w danym układzie. Badania wykazały, że silnie elektroujemny atom fluoru podstawiony do cząsteczki aniliny decyduje o zwiększeniu kwasowości atomów wodoru w grupie aminowej, jednocześnie maleje dostępność wolnej pary elektronowej na atomie azotu. Powyższe efekty zależne są od miejsca podstawienia atomu fluoru w układzie aromatycznym aniliny. Na podstawie analizy map powierzchni potencjału elektrostatycznego z obliczonymi ładunkami Mullikena dla trzech monofluorowych pochodnych aniliny określono, iż 3-fluoroanilina jest najstabilniejszym izomerem, charakteryzującym się najwyższą entalpią dysocjacji wiązania N-H, co czyni grupę aminową w tym izomerze najsłabszym donorem wiązania wodorowego w porównaniu z



pozostałymi dwoma monofluorowymi pochodnymi aniliny. Dla wszystkich trzech monofluorowych pochodnych aniliny przeprowadzono badania spektroskopowe, które potwierdziły iż przyłączenie fluoru do cząsteczki aniliny powoduje osłabienie powstawania wiązań wodorowych z udziałem grupy aminowej.

- Badania ujęte w kolejnej pracy (**P2**) [W. Pieruś i wsp., ChemPhysChem. 2021, 22, 2115] są kontynuacją prowadzonych badań i dotyczą wpływu obecności halogenu (atom chloru, bromu lub jodu) w pozycji *-para* w cząsteczce aniliny i jej pochodnych tj. mono- i difluoroanilinie na geometrię cząsteczki oraz na występujące w niej międzycząsteczkowe wiązania niekowalencyjne. Przy zastosowaniu kwantowej teorii atomów w cząsteczkach (QTAIM) oraz na podstawie wyznaczonych mapach EPS oraz analizy spektroskopowej (FT-IR) autorzy wykazali, że wraz ze wzrostem masy halogenu zwiększają się wymiary σ -dziury. Ponadto, największy wpływ fluoru na oddziaływania międzycząsteczkowe oraz zmianę charakteru fluoru odnotowano dla 2,6-difluoro pochodnych aniliny.
- W publikacji **P3** [Pietruś w. i wsp., Molecules, 2022, 27(3), 1005] przedstawiono statystyczną analizę struktur zdeponowanych w bazie PDB zawierających fluorowane ligandy pod kątem preferencji geometrycznych, częstości występowania i częstości wiązań tworzonych z udziałem fluoru. Analiza wykazała, że ilość obserwowanych wiązań wodorowych (HB) C-H \cdots F przewyższała liczebność wiązań N-H \cdots F oraz O-H \cdots F. Na siłę HB tworzonych z udziałem fluoru wpływa głównie długość wiązania HB. Ponadto, określono z jakim resztami aminokwasowymi oddziałują ligandy zawierające „aromatyczny” lub „alifatyczny” fluor. Autorzy wykazali, że fluor preferuje hydrofobowe otoczenie w badanych układach biologicznych.
- W kolejnej publikacji z cyklu (**P4**) [Pietruś W. i wsp., Biomolecules 2021, 11,1647] zastosowano metodykę klifów aktywności do badania fluorowanych ligandów zdeponowanych w bazie ChEMB, wykazujących aktywność wobec receptorów aminergiczynej klasy A GPCR. Badania wykazały, że obecność atomu fluoru w pozycji *orto*- w pierścieniu aromatycznym liganda powodować może nawet dwukrotne większe prawdopodobieństwo wzrostu aktywności danego związku. Natomiast fluor przyłączony do węgla alifatycznego pięciokrotnie częściej wpływał na zmniejszenie aktywności biologicznej (pKi) badanych związków wyjściowych.
- Ostatnia publikacja z cyklu (**P5**) obejmuje badania interdyscyplinarne, łączące syntezę chemiczną i badania *in vitro* z badaniami teoretycznymi. Celem badań było zbadanie wpływu miejsca podstawienia atomem halogenu pierścienia fenyłowego pochodnych fluoksetyny i fluwoksaminy na ich aktywność biologiczną [Staroń J. i wsp., European



Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 220, 113533]. W pracy Autorzy skupili się na selektywnych inhibitorach wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) i ich wiązaniu do transportera serotoniny (SERT). Zaprojektowano i zsyntetyzowano 22 pochodne fluoksetyny i fluoksaminy, dla których wyznaczono powinowactwo wobec SERT. Ponadto, w celu wyjaśnienia wpływu halogenu w cząsteczkach nowych związków na powinowactwo do SERT, przeprowadzono analizę SAR, obliczenia kwantowo-mechaniczne, dokowanie nowych związków do SERT (PDB: 5I6X) oraz dynamikę molekularną dla otrzymanych układów ligand-SERT. Badania teoretyczne pozwoliły na identyfikację dwóch partnerów do tworzenia wiązań z halogenami tj. atomów tlenu karbonylowego reszt aminokwasowych: E493 i T497. Reszty te uczestniczyły w największej liczbie utworzonych wiązań halogenowych z ligandami. Ponadto stwierdzono, że związki o cięższych atomach halogenu wiążą się z SERT w inny sposób, nie opisany do tej pory w literaturze. Analiza XSAR doprowadziła do syntezy dwóch najbardziej aktywnych związków posiadających silne powinowactwo do SERT, tj. $K_i = 5$ nM (K_i 6.2 razy niższe od związku wyjściowego, fluoksetyny) i $K_i = 9$ nM (K_i 50.8 razy niższe od związku wyjściowego, fluoksaminy). Jest to znakomity przykład wykorzystania narzędzia - analizy XSAR [R. Kurczab, i wsp. J. Med. Chem. 61 (19) (2018) 8717e8733] - w identyfikacji optymalnego podstawienia atomów halogenu w cząsteczce potencjalnego leku.

Niezależnie od faktu, iż powyższe prace stanowiące podstawę rozprawy oraz wyniki w nich zawarte były już uprzednio recenzowane, szczegółowa analiza prac, wliczając w to dołączony wstęp ujawniła pewne niejasności, które z obowiązku recenzenta przedstawiam w formie następujących uwag:

- Drobne pomyłki merytoryczne (np. przypisywanie pojedynczej cząsteczce barwy i zapachu (str. 10), nieprawidłowa relacja między kątami θ na Rys. 2, błąd w równaniu (1), polegający na nieprawidłowo wyrażonej zredukowanej masie, błędne cytacje dla pól siłowych GROMOS i CHARMM (podano odnośniki do pakietów noszących te same nazwy), niesłuszne rozróżnienie pomiędzy AIMD i klasyczną MD na podstawie kryterium częstości obliczenia energii w trakcie symulacji, błędne kryteria klasyfikacji efektów fluorowania na str. 45. lub używanie J jako symbolu chemicznego jodu).
- Metodologia symulacji AIMD w pracy **P1** nie jest do końca jasna. Liczba cząsteczek i objętość komórki symulacyjnej dość znacząco (~25%) odbiegają od realnych gęstości badanych związków w stanie cieczy, brak również informacji o kontroli ciśnienia, co



sugeruje stałą objętość komórki podczas symulacji. Użycie programu Packmol nie determinuje początkowej konfiguracji układu, która może odpowiadać strukturze *quasi*-kryształicznej bądź zupełnie losowej; nie jest jasne jaką strukturę wybrano do symulacji. Ponadto, nasuwają się pytania odnośnie zbieżności symulacji wobec jej ograniczonej długości, tj. 20 ps (co, nawet jeśli chodzi o równowagę termodynamiczną cieczy, nie jest zbyt długim czasem). Dodatkowe wyjaśnienia byłyby pożądane z uwagi na znakomitą zgodność pomiędzy teoretycznymi a eksperymentalnymi widmami zilustrowaną w oryginalnej pracy (Fig. 4) oraz potencjał zastosowanej metodologii w analogicznych obliczeniach prowadzonych dla innych układów.

- o Praca **P3** w dużej mierze opiera się na analizie energii wiązań wodorowych zachodzących z udziałem fluoru. Niezależnie od schematu obliczenia energii takich oddziaływań, zawsze brano pod uwagę całą cząsteczkę liganda oraz jego otoczenie. Jednakże ciężko zakładać, że cała energia oddziaływań ligand-proteina ma źródło w badanych wiązaniach wodorowych. Stąd też uzyskane i analizowane energie składają się z wielu różnych elementów, w tym także z poszukiwanego wkładu wiązań wodorowych. Na ile uzasadnione jest założenie dużej korelacji pomiędzy tymi wielkościami (ew. dominującej kontrybucji badanych wiązań wodorowych)? Czy, biorąc pod uwagę zmienne rozmiary ligandów, można w ogóle założyć taką relację?
- o W tej samej pracy przedstawiono analizę wiązań wodorowych z udziałem fluoru z podziałem na rodzaj aminokwasu tworzących wiązania z ligandami. Czy wspomniana normalizacja (panele B i D, Rys. 15) dotyczy częstości występowania danego aminokwasu w całej populacji protein, ich analizowanego podzbioru lub jeszcze innego (nie wymienionego w pracy) kryterium?
- o Na stronie 47 rozprawy, w tekście nawiązującym do publikacji **P4**, Autor podkreślił, że „pojedyncze podstawienie fluorem może prowadzić do znacznych zmian w selektywności związków bioaktywnych, a także zmiany ich funkcji biologicznej np. z odwrotnego agonisty na antagonistę”. Pożądane byłoby rozwinięcie tego ważnego tematu o przykłady takich podstawień poparte cytacjami.

Wyniki zawarte w ww. pracach oceniam jako wartościowe i wnoszące istotny wkład w dziedzinę modelowania biomolekularnego. Warto podkreślić, iż cele badawcze deklarowane przez Doktoranta zostały w pełni zrealizowane.

Oprócz dyskutowanej powyżej rozprawy doktorskiej oraz wyników w niej zawartych, należy także docenić dużą aktywność badawczą Doktoranta, na którą składa się 12 artykułów



Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Biofarmacji
ul. Chodźki 4a 20-093 Lublin

oryginalnych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, zacytowanych 55 razy (wg. Scopus). Łączny *Impact Factor* wynosi 63,764.

Podkreślić warto aktywność Doktoranta na innych polach związanych z nauką. W szczególności chodzi tu o zaangażowanie w realizowanie projektu Preludium 2019/35/N/NZ7/04312 pt. „Podstawienie fluorem – nowy algorytm zwiększania aktywności biologicznej” oraz SONATA UMO-2016/21/D/NZ7/00620 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki.) oraz naukowy staż zagraniczny odbyty w Bonn-Aachen International Center for Information Technology (b-it) Life Science Informatics.

Oceniając wysoko poziom badań naukowych będących podstawą recenzowanej rozprawy, w podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o dopuszczenie mgr. Wojciecha Pietrusia do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ponadto, biorąc pod uwagę szereg czynników pozytywnie wyróżniających pracę naukową oraz aktywność naukową Doktoranta, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Uzasadniam to przede wszystkim poziomem naukowym prezentowanym w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską Pana mgra Wojciecha Pietrusia.

Z poważaniem,

dr hab. n. farm. Anita Płazińska, prof. UM Lublin