



Warszawa, dn. 24.09.2022

Prof. dr hab. Sławomir Filipek,
Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,
Uniwersytet Warszawski,
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa
Tel. 22-55-26405,
E-mail: sh.filipek@uw.edu.pl

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr. Wojciecha Pietrusia, pt.

Rola i znaczenie fluoru w racjonalnym projektowaniu leków na przykładzie wybranych receptorów klasy A GPCR

Recenzowana rozprawa jest oparta na 5-ciu publikacjach, które stanowią integralną część tej rozprawy. Zostały one opublikowane w następujących czasopismach: *Spectrochimica Acta A* (2021), *ChemPhysChem* (2021), *Biomolecules* (2021), *European Journal of Medicinal Chemistry* (2021), oraz *Molecules* (2022). Wszystkie te czasopisma mają wysokie współczynniki oddziaływania, w zakresie 3,1–6,5, natomiast Doktorant jest pierwszym autorem w większości z tych publikacji, co dowodzi ogromnego wkładu pracy włożonego w otrzymanie i analizę wyników. Wstęp do tych publikacji jest napisany po polsku, liczy 62 strony, i obejmuje wstęp literaturowy (16 stron), stosowane metody (opisane bardziej ogólnie we wstępie oraz szczegółowo w osobnym rozdziale – 7 stron), uzyskane wyniki z podziałem na poszczególne publikacje – 21 stron, oraz wnioski i część bibliograficzną obejmującą 129 odnośników literaturowych. Wstęp ten jest napisany przejrzysto, poprawnym językiem naukowym, ze zwróceniem szczególnej uwagi na cechy charakterystyczne halogenowców, które sprawiają, że te pierwiastki tworzą unikalne oddziaływania. Odnośniki literaturowe są dobrane poprawnie, ze znaczną liczbą nowych prac, co wskazuje na bardzo dobrą orientację Doktoranta w temacie będącym przedmiotem rozprawy.

Cele badań są obszerne i obejmują: określenie wpływu podstawnika fluorowego na oddziaływania międzycząsteczkowe, zbadanie korelacji ze zmianami w widmach FT-IR oraz ramanowskich, wyznaczenie energii tych oddziaływań, określenie roli i znaczenia fluoru w



racjonalnym projektowaniu leków, oraz opracowanie nowych zasad racjonalnego projektowania nowych leków dla wymiany wodoru na atom fluoru. Wpływ podstawników fluorowych na właściwości związków biologicznie aktywnych jest trudny do przewidzenia, dlatego takie badania są bardzo cenne. Przedstawione cele nie znajdują jednak odzwierciedlenia w tytule pracy, który jest ograniczony tylko do projektowania leków i to tylko dla receptorów GPCR, podczas gdy te receptory są tematem badawczym tylko w jednej z przedstawionych publikacji. Wszystkie wybrane publikacje będące podstawą doktoratu są spójne tematycznie obejmując różnorodne aspekty badań nad podstawnikami halogenowymi, zatem temat rozprawy powinien to odzwierciedlać.

Do realizacji wyznaczonych zadań wykorzystano zarówno metody eksperymentalne (spektroskopię w podczerwieni, oraz spektroskopię Ramana, a także rentgenowską analizę strukturalną) jak również metody teoretyczne (obliczenia kwantowo-chemiczne oraz metody modelowania molekularnego), co sprawia że otrzymane wyniki są wiarygodne i szeroko charakteryzują badane zjawiska. Wszystkie prace są wieloautorskie lecz zakres prac wykonanych przez Doktoranta został jasno zdefiniowany i jest znaczący.

Tematem pierwszej pracy było określenie wpływu fluoru na wiązania wodorowe w układzie modelowym aniliny, a konkretnie zbadano wpływ miejsca podstawienia fluorem w anilinie na właściwości donorowo-akceptorowe grupy aminowej. Na podstawie obliczeń map powierzchni potencjału elektrostatycznego oraz ładunków Mullikena, a także doświadczalnych widm Ramana i w podczerwieni, oraz analizy struktur krystalicznych aniliny i jej pochodnych, oszacowano wpływ jaki wywierają te podstawniki na oddziaływania zmodyfikowanej aniliny. Na rys. 9 przedstawiono mapy potencjału elektrostatycznego na powierzchni molekularnej badanych cząsteczek. Zmiany potencjału w zależności od pozycji podstawnika są wyraźnie widoczne lecz przedstawiona skala nie obejmuje wartości ujemnych tego potencjału; przedstawiony zakres to 0,038–0,38 jednostek atomowych. Biorąc pod uwagę, że na rys. 1, również przedstawiającym takie mapy, zakres potencjału obejmuje wartości ujemne może oznaczać, że skala na rys. 9 jest błędna. Ponadto, użycie jednostek atomowych na rys. 9 nie jest zgodne ze skalą na rys. 1 gdzie użyto jednostek [kcal/mol]. Jednostka [kcal/mol] jest bardziej adekwatna do badanych zjawisk bowiem wielkość dziury sigma, którą mierzy się jako różnicę potencjału elektrostatycznego na powierzchni molekularnej, jest podawana w pracy właśnie w kcal/mol. Szkoda także, że we wstępie literaturowym nie zdefiniowano w jaki sposób jest mierzona wielkość dziury sigma. Brak także definicji ładunków Mullikena. Na rys. 9 wartości ładunków Mullikena dla atomów



wodoru są bliskie zero, co zupełnie nie odzwierciedla wielkości dodatniego potencjału elektrostatycznego pokazanego na mapie. Dla innych pochodnych aniliny pokazanych na rys. 12, ładunki te wynoszą ok. +0,3 co jest poprawną wartością. Skala na rys. 12 także jest w jednostkach atomowych ale przynajmniej obejmuje już ujemne wartości: -0,038 – 0,005. Tym niemniej, wydaje się, że dodatnia wartość potencjału 0,005 a.u. jest zbyt mała i nie obejmuje potencjałów pokazanych graficznie na rysunku. Ogólnie rzecz ujmując, skala potencjału powinna być mniej więcej symetryczna w stronę wartości ujemnych jak i dodatnich, co jest dobrze pokazane na rys. 1.

W drugiej pracy badano inne pochodne aniliny aby określić w jaki sposób obecność fluoru w pozycji orto w stosunku do grupy aminowej moduluje właściwości wiązań wodorowych i halogenowych. Potwierdzono, że wielkość σ -dziury zwiększa się ze wzrostem masy halogenu oraz wykazano, że cięższe halogeny wykazują mniejszą zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, co jest prawdopodobnie związane ze zmniejszeniem elektroujemności oraz osłabieniem ujemnego pasa potencjału wokół atomu halogenu. W przeciwieństwie do pochodnych aniliny opisanych w pierwszej pracy, fluor ma odmienny wpływ na własności sąsiadującej grupy aminowej, ponieważ przyciąga on wolną parę elektronową azotu i przesuwa ją w kierunku pierścienia aromatycznego, co skutkuje zmniejszeniem ładunku Mullikena na atomie azotu. Szkoda, że nie zanalizowano tego efektu na atomach wodoru połączonych z tym atomem azotu, bowiem to właśnie atomy wodoru tworzą wiązania wodorowe. Znany problem z ładunkami Mullikena polega na tym, że wartości tych ładunków znacznie się zmieniają nawet przy małej zmianie funkcji bazy. Lepszym rozwiązaniem byłoby użycie ładunków otrzymywanych przez procedurę dopasowania do potencjału elektrostatycznego badanej cząsteczki.

Na rys. 13 pokazano powierzchnie Hirshfelda wygenerowane dla badanych struktur krystalicznych 4-halogenoanilin. Powierzchnie te dobrze ilustrują tworzone oddziaływania niekwalencyjne pomiędzy cząsteczkami. Szkoda jednak, że we wstępie nie zdefiniowano co to są powierzchnie Hirshfelda, ani z jakich wielkości fizycznych się je wyznacza.

Trzecia praca dotyczyła statystycznej analizy międzycząsteczkowych wiązań wodorowych z fluorem w układach biologicznych na podstawie struktur z bazy Protein Data Bank. Badania wykonano pod kątem preferencji geometrycznych, częstości występowania i energii wiązań wodorowych z udziałem fluoru. Otrzymano bardzo ciekawe wyniki świadczące, że liczba wiązań wodorowych C–H \cdots F była zdecydowanie większa niż O–H \cdots F oraz N–H \cdots F, oraz że te oddziaływania były dwukrotnie liczniejsze dla fluoru w układach



aromatycznych niż alifatycznych. Przeprowadzona analiza statystyczna jest bardzo obszerna i obejmuje mapy rozkładu gęstości parametrów geometrycznych, statystykę oddziaływań z poszczególnymi aminokwasami oraz obliczenia energii wiązań wodorowych z fluorem. Wyciągnięte wnioski są spójne i dają szeroki obraz oddziaływań tworzonych przez fluor w układach biologicznych.

Dwie kolejne publikacje dotyczą badania modulowania aktywności biologicznej ligandów poprzez wprowadzenie atomu halogenu. Jedną z tych publikacji dotyczy ligandów aminergicznych receptorów GPCR, natomiast druga inhibitorów transportera serotoniny (SERT). Dla badania ligandów receptorów GPCR zastosowano formalizm tzw. klifów aktywności tj. dużej zmiany aktywności biologicznej po wprowadzeniu do związku atomu fluoru. Analiza wykazała jednak, że nie ma wyraźnej zależności między miejscem podstawienia fluoru w pierścieniu aromatycznym, a aktywnością biologiczną tych cząsteczek. Tym niemniej badania są istotne bo przeprowadzono je na dużej grupie ligandów, natomiast wpływ postawienia być może da się przewidzieć używając bardziej wyrafinowanych metod.

Z kolei w celu wyjaśnienia roli halogenowców w wiązaniu się ligandów do SERT, zaprojektowano oraz zsyntezowano 22 analogi strukturalne fluoksetyny i fluwoksaminy podstawione atomami fluoru, chloru, bromu i jodu. Takie podstawienie powodowało na ogół wzrost powinowactwa do SERT. Aby wyjaśnić te zmiany aktywności, związki były dokowane do SERT, oraz wykonano także symulacje dynamiki molekularnej dla najbardziej aktywnych pochodnych. Obliczone wartości rozmiaru σ -dziury dobrze korelowały z aktywnością monopodstawionych pochodnych. Zastosowane metody kwantowo-chemiczne wykazały, że obok wiązań halogenowych, istotny udział w stabilizacji układu ligand-białko miały wiązania wodorowe oraz także hybrydowe oddziaływania wodorowo-halogenowe. Chociaż nie udało się znaleźć prostych reguł projektowania leków zawierających halogenowce, to jednak uzyskane wyniki mogą wskazywać kierunek, którym należy podążać aby te cele osiągnąć.

Ponieważ fluorowanie, czy wprowadzanie innych halogenowców, do badanych związków stało się standardową praktyką przy projektowaniu leków to przedstawiona rozprawa doktorska ma znaczenie nie tylko poznawcze ale także praktyczne. Wiąże się to z tym, że tak zmodyfikowane związki mają większą biodostępność, mają wydłużony czas życia w organizmie, oraz w większości przypadków także zwiększoną aktywność biologiczną. Jak się szacuje, tylko w ostatniej dekadzie niemal 30% leków zatwierdzonych do użycia w USA zawierało fluor, co wskazuje na coraz bardziej istotną rolę halogenowców w nowych lekach.



Z tego powodu cieszy fakt, że badania są kontynuowane, a kilka nowych publikacji Doktoranta jest w przygotowaniu.

Podsumowując, rozprawa dotyczy trudnego lecz bardzo istotnego problemu naukowego o dużym znaczeniu praktycznym. Wyżej wymienione niedociągnięcia nie przesłaniają znaczącej wartości naukowej rozprawy, oraz bardzo dobrego przygotowania merytorycznego Doktoranta. Zatem, z pełnym przekonaniem 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, z uwagi na uzyskanie przez Doktoranta ciekawych wyników opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, zastosowanie wielu technik badawczych, oraz staranne przygotowanie rozprawy, wnoszę o jej wyróżnienie.

Sławomir Filipek