UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
dr hab. n. farm. Iwona Elżbieta Głowacka

Łódź, 27 czerwca 2018 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz

pt. *„Poszukiwanie antagonistów receptora serotoninowego 5-HT$_7$ w grupie pochodnych 5,5-dipodstawionej hydantoiny"*

przedstawiona Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum w celu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum pod kierunkiem dr hab. Jadwigi Handzlik, profesora UJ oraz dr Rafała Kurczaby pełniącego rolę promotora pomocniczego.

Od wielu lat ludzkość zmaga się z chorobami afektywnymi w tym, w głównej mierze z depresją. Według WHO depresja dotyka już około 5 procent populacji, dlatego też tak istotne są jej skuteczne terapie. Z uwagi na fakt, że receptory serotoninowe znajdują się zarówno w obrębie ośrodkowego jak i obwodowego układu nerwowego, stanowią one ważny cel terapeutyczny odpowiadający m.in. za regulację neuroprzekaźnictwa, stany emocjonalne, rytm całodobowy, procesy uczenia się i zapamiętywania. Związki oddziałujące z tą grupą białek pełnią zatem ważną rolę w terapii takich schorzeń jak depresja, lęk, schizofrenia czy deficyty poznawcze. Z tego względu wiele zespołów naukowych zajmuje się badaniami nad układem serotoninergicznym koncentrując swoje prace na poszukiwaniu nowych leków przeciwdepresyjnych, w szczególności efektywnych ligandów receptorów serotoninowych, które jednocześnie blokują SERT. Doniesienia literaturowe z ostatnich lat wykazały istotną rolę receptora serotoninowego 5-HT$_7$, miedzy innymi w procesach regulacji cyklu dobowego, czy też uczenia się i zapamiętywania. Ponadto wyniki badań przedklinicznych wskazują, że hamowanie jego aktywności może mieć istotny wpływ w leczeniu depresji. Stąd też poszukiwanie selektywnych antagonistów receptora 5-HT$_7$ stanowi tak ważne wyzwanie dla medycyny, a prace mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz nad syntezą oraz oceną aktywności biologicznej ligandów

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mail: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

receptora 5-HT_7 doskonale wpisują się w ten wysoce aktualny, zwłaszcza w chemii medycznej, nurt badań.

Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi spójny tematycznie cykl 3 współautorskich prac opublikowanych w latach 2016–2018 i została podzielona na dwie zasadnicze części. Pierwszą z nich jest 40-stronicowy autoreferat, który obejmuje krótkie streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie w podjętą tematykę, cel oraz metodologię badań, opis przeprowadzonych prac badawczych, podsumowanie uzyskanych wyników oraz spis literatury cytowanej.

W skład drugiej części rozprawy wchodzą trzy artykuły naukowe stanowiące podstawę dysertacji, w których Doktorantka jest pierwszym autorem (dwie prace opublikowane w *European Journal of Medicinal Chemistry* oraz jedna praca w *MedChemComm*, sumaryczny IF=11,646, 105 MNiSW). Oświadczenia współautorów jednoznacznie określają ich udział we wspólnych interdyscyplinarnych pracach i nie pozostawiają wątpliwości co do dominującego udziału Doktorantki w wykonaniu badań, opracowaniu i interpretacji wyników. Należy również podkreślić, że na całkowity dorobek Doktorantki składa się łącznie 7 prac oryginalnych (sumaryczny IF=26,116, punktacja MNiSW = 225), dwa zgłoszenia patentowe oraz doniesienia i komunikaty zaprezentowane na zjazdach krajowych i międzynarodowych. Pani mgr Kucwaj-Brysz uzyskała wyróżnienie za poster na „5th Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network", 03-05 lipiec 2015, Kraków. Ponadto Pani mgr Katarzyna Kucwaj-Brysz w latach 2015–2018 była kierownikiem projektu Preludium UMO2014/15/N/NZ7/03072, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz projektu celowego K/DSC/002868.

Przed przystąpieniem do oceny wyników uzyskanych przez mgr Katarzynę Kucwaj-Brysz należy zwrócić uwagę na fakt, że zostały one już opublikowane w renomowanych czasopismach z tzw. Listy Filadelfijskiej i merytorycznie ocenione przez niezależnych recenzentów. Moje zadanie jako recenzentki sprowadza się zatem do oceny zakresu i tematyki prowadzonych badań, a w niniejszej recenzji skoncentruję się głównie na merytorycznej ocenie części autoreferatowej, bowiem jest ona autorskim opracowaniem Doktoranki.

W części wprowadzającej autoreferatu mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz wyróżnia się kilka podrozdziałów. W pierwszym z nich Doktorantka przedstawiła krótką charakterystykę serotoniny uwzględniając historię odkrycia, syntezę oraz jej znaczenie jako celu terapeutycznego. W kolejnych podrozdziałach tej części pracy Autorka zaprezentowała obecny stan wiedzy na temat receptora serotoninowego 5-HT_7 oraz leków o działaniu antagonisty receptora 5-HT_7, jak również związków będący na etapie badań przedklinicznych. W kolejnym podrozdziale części wprowadzającej mgr Kucwaj-Brysz opisuje dwie strategie wspomagania komputerowego wykorzystywane w poszukiwaniu antagonistów receptora 5-HT_7. Całość

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mail: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

doskonale uzasadnia zakres prac realizowanych przez Doktorantkę i stanowi bardzo dobre wprowadzenie w podjętą tematykę badawczą. Podsumowując tę część pracy uważam, że jest ona logiczna i spójna pod względem merytorycznym i została przygotowana bardzo starannie.

W rozdziale „Cel i zakres badań" mgr Kucwaj-Brysz w bardzo przejrzysty sposób przedstawiła cel pracy oraz zakres prowadzonych badań, który obejmuje: zaprojektowanie oraz syntezę nowych hydantoinowych ligandów receptora serotoninowego 5-HT_7 o spodziewanej wysokiej aktywności i selektywności w oparciu o strukturę wiodącą, jaką jest 5-(4-fluorofenylo)-3-(2-hydroksy-3-(4-(2-metoksyfenylo)piperazyno-1-ylo)propylo-5-metylohydantoina (związek oznaczony symbolem **MF 8**); przeprowadzenie wieloaspektowej, wspomaganej komputerowo analizy SAR mającej na celu identyfikację fragmentów strukturalnych, niezbędnych dla uzyskania wysokiego powinowactwa do receptora serotoninowego 5-HT_7 oraz selektywności względem konkurencyjnych receptorów GPCR.

Doktoranta umiejętnie wykorzystuje doświadczenia i wyniki wcześniejszych prac prowadzonych w macierzystym zespole jak również własne studia literatury przedmiotu.

W kolejnym rozdziale pracy zatytułowanym „Metodologia badań" można wyróżnić kilka istotnych fragmentów. Pierwszy dotyczy zaprojektowania i syntezy chemicznej nowych analogów związku **MF-8**, w których niezmiennym fragmentem struktury był układ hydantoiny zawierający w pozycji 3 podstawnik 2-hydroksypropylowy. Doktorantka zaplanowała dwa główne kierunki modyfikacji chemicznej struktury wiodącej, a mianowicie modyfikacje podstawników przy atomie azotu w pierścieniu piperazyny (seria A, 14 analogów), a następnie przy zachowaniu najbardziej korzystnych podstawników (wyselekcjonowanych związków z serii A), modyfikacje podstawienia w pozycji 5 ugrupowania hydantoinowego (seria B, 16 związków). Wyboru kierunków modyfikacji Doktorantka dokonała w oparciu o wspomaganą komputerowo analizę SAR uwzględniającą wyniki badań receptorowych oraz symulację oddziaływania ligand-receptor. Na podstawie analizy SAR dla serii A i B z uwzględnieniem dodatkowo wyników badań *in vivo* w połączeniu z właściwościami ADMET *in vitro* związek oznaczony symbolem **KKB16** wytypowany został jako struktura wiodąca II generacji. Należy w tym miejscu podkreślić dojrzałość mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz w interpretacji uzyskanych wyników i opracowaniu dalszej drogi modyfikacji najbardziej aktywnej struktury.

Związek **KKB16** został wybrany do ostatniego etapu (seria C, 15 związków), mającego na celu zbadanie wpływu ilości oraz wzajemnego położenia pierścieni aromatycznych w cząsteczce na aktywność i selektywność w stosunku do receptora 5-HT_7.

Aby zbadać wpływ konfiguracji przy obydwu centrach stereogenicznych w związku **MF-8** na powinowactwo do receptora 5-HT_7, mgr Kucwaj-Brysz otrzymała cztery stereoizomery.

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mail: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

W sumie Doktorantka zsyntetyzowała ponad 100 nowych połączeń, w tym 45 związków finalnych oraz 4 diastereoizomery struktury wiodącej.

Należy również podkreślić, że Doktorantka w swojej pracy wykorzystuje proste dwu- i trójetapowe procedury syntezy nowych połączeń, co z punktu widzenia chemii medycznej ma duże znaczenie.

Rozdział zatytułowany „Opis uzyskanych wyników" stanowi rdzeń przedstawionej pracy, w którym Doktoranta opisuje oraz analizuje otrzymane wyniki badań wspierając się materiałami opublikowanymi. Rozdział ten podzielony jest na trzy części zgodne z prowadzonymi modyfikacjami w strukturze związku **MF-8** (seria A, B) oraz **KKB16** (seria C) oraz czwartą część poświęconą wpływowi konfiguracji absolutnej centrów stereogenicznych w związku **MF-8** na aktywność (dane nieopublikowane).

Na podkreślenie zasługuje niezwykle szeroki zakres prac badawczych, które mgr Kucwaj-Brysz zaplanowała w sposób logiczny i w pełni przemyślany. Za szczególnie ważne osiągniecie projektu należy uznać fakt, że spośród 45 zsyntetyzowanych przez Doktorantkę związków ponad 15 hydantoinowych pochodnych wykazywało wysokie nanomolowe powinowactwo do receptora 5-HT_7 (K_i < 20 nM), w tym szczególnie wysokie (K_i < 10 nM) dla 12 związków. Większość pochodnych wykazywała selektywność względem receptorów 5-HT_{1A} i D_2, jednak niższą niż dla struktury wiodącej **MF-8**. Spośród wszystkich pochodnych hydantoiny jedynie związek **KKB16** wykazywał najwyższą selektywność w odniesieniu do receptora 5-HT_{1A}. Przebadane związki wykazywały działanie antagonistyczne w testach funkcjonalnych, natomiast przeprowadzone dla czterech spośród najbardziej aktywnych związków (związki o numerach **5–8**, Tabela 9) oraz związku **KKB16** testy behawioralne *in vivo* na myszach potwierdziły ich działanie przeciwdepresyjne.

Doktorantka w swojej pracy przy współudziale promotora pomocniczego (dr Rafał Kurczab) doskonale posługuje się technikami modelowania molekularnego w analizie SAR, co umożliwiło jej zidentyfikowanie fragmentów strukturalnych niezbędnych do występowania powinowactwa do receptora 5-HT_7 w badanej klasie związków oraz ocenę selektywności w odniesieniu do konkurencyjnych celów białkowych z uwzględnieniem stereoizomerii. Uzyskane przez mgr Kucwaj-Brysz wyniki potwierdziły wysoki potencjał 5,5-dwupodstawionych pochodnych hydantoiny jako silnych i selektywnych ligandów receptora 5-HT_7, jednocześnie wskazując dalsze kierunki poszukiwań w tej grupie połączeń.

Pomimo że wszystkie nowe pochodne (45 związków) zostały otrzymane jako mieszaniny racemiczne, to wyniki uzyskane dla czterech stereoizomerów struktury wiodącej **MF-8** potwierdziły znaczenie konfiguracji absolutnej dla powinowactwa do receptora 5-HT_7 i 5-HT_{1A}, wskazując tym samym na preferencję konfiguracji *R* przy atomie węgla związanym z grupą

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mail: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

hydroksylową. Konfiguracja przy atomie węgla C5 hydantoiny również determinuje aktywność farmakologiczną; szkoda więc, że nie udało się ustalić, która z nich jest wyższa.

Warto podkreślić, że dokonane przez Doktorantkę podsumowanie wyników własnych badań jest inspiracją dla następnych celów badawczych. Doktorantka zaznacza, że dalsze badania będą miały na celu zoptymalizowanie warunków rozdzielania poszczególnych stereoizomerów wykorzystując technikę krystalizacji z zastosowaniem chiralnych kwasów organicznych o zdefiniowanej konfiguracji (np. kwas winowy lub jego pochodne), co miejmy nadzieję w niedalekiej przyszłości zaowocuje przeprowadzeniem zarówno badań *in vivo* potwierdzających wpływ konfiguracji na efekt przeciwdepresyjny, jak również badań krystalograficznych prowadzących do określenia wszystkich konfiguracji, a co za tym idzie związki enancjomerycznie czyste zostaną w dalszym etapie, przebadane pod względem stabilności metabolicznej oraz profilu bezpieczeństwa (mutagenność, cytotoksyczność).

Podsumowując część autoreferatową należy podkreślić, że została ona napisana bardzo starannie, poprawnym językiem. Z obowiązku recenzenta wspomnieć muszę jedynie o drobnych pomyłkach/nieścisłościach:

– str. 28, rysunek 4. W strukturze chemicznej lurazydonu brak zaznaczenia jednego centrum stereogenicznego;

– str. 33, zwrot „asymetryczny atom węgla" już od dawna nie jest używany i został zastąpiony przez „centrum stereogeniczne", ewentualnie „centrum chiralności";

– str. 43, rysunek 15, we wzorze związku KKB16 zamiast podstawnika „3HC" powinna być grupa metylowa zapisana jako CH_3 albo H_3C;

– str. 44, „R- i S-epichlorhydrynę" powinno być (*R*)- i (*S*)-epichlorohydrynę;

– w tabeli skrótów brak wyjaśnienia dla linii komórkowych HEK-293 i HepG2;

– str. 49, „Dodatkowo zaobserwowano, że wydłużenie grupy metoksylowej (**1**) do grupy etoksylowej (**6**)....." – dość niefortunne użycie słowa <u>wydłużenie</u> w odniesieniu do konkretnego podstawnika, lepiej byłoby użyć sformułowania: *zamiana grupy metoksylowej na etoksylową*;

– w całej pracy używane jest sformułowanie „pierścień fenylowy" – fenyl to nazwa podstawnika, powinno być zatem podstawnik fenylowy albo pierścień benzenowy;

– str. 69, Załącznik 1. Brak zgodności tekstu ze schematem; w przekształceniu *ii* użyto epichlorohydryny, a nie tak jak opisano w tekście 2,3-epoksypropan-1-olu;

– str. 76, Załącznik 1. Tabela 1, jak twierdzi Autorka, zawiera *„Zestawienie wartości nadmiarów enancjomerycznych dla wszystkich otrzymanych stereoizomerów"*, podczas gdy w rzeczywistości określono nadmiary diastereoizomeryczne (d.e.);

– Autorka w autoreferacie kilkakrotnie używa pojęcia „czystość optyczna" w odniesieniu do otrzymanych przez siebie stereoizomerów. Czystość optyczną oblicza się porównując wartości

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mail: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

skręcalności właściwych otrzymanych zawiązków i czystych enancjomerów, a wartości dla tych ostatnich Doktorantka nie zna. Ponieważ proporcje poszczególnych stereoizomerów Autorka oznaczyć mogła jedynie w oparciu o analizy chromatograficzne na chiralnych kolumnach, poprawne zatem jest posługiwanie się pojęciem nadmiar enancjomeryczny/czystość enancjomeryczna.

Wspomniane w tym miejscu drobne uchybienia w niczym nie umniejszają wartości przedstawionej rozprawy, która w opinii recenzenta zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Tak zaplanowany tok badań, jak i umiejętność wyciągania wniosków świadczą o dojrzałości naukowej mgr Kucwaj-Brysz. Należy podkreślić, że ustalając budowę chemiczną nowo zsyntetyzowanych połączeń Doktorantka wykazała się biegłością w interpretacji widm NMR i wykorzystywaniu danych spektralnych w analizie strukturalnej. Struktura oraz czystość wszystkich zsyntetyzowanych przez mgr Kucwaj-Brysz związków została potwierdzona na podstawie wyników analizy widm ^{1}H, ^{13}C NMR oraz UPLC/MS. Badania aktywności przeprowadzone zostały w ramach szerokiej współpracy z naukowymi ośrodkami w kraju jak i zagranicą, zapewniając tym samym interdyscyplinarny charakter prowadzonych prac.

Chciałabym podkreślić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz prezentuje bardzo wysoki poziom. W mojej ocenie wyniki uzyskane przez Doktorantkę mają bardzo dużą wartość naukową, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym. Dotychczasowe osiągnięcia Doktorantki wskazują, że jest ona naukowcem o wysokim potencjale dalszego rozwoju.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Katarzyny Kucwaj-Brysz spełnia wymagania ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. z 2003r. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnoszę zatem do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom przeprowadzonych badań, aktualność tematyki badawczej oraz potencjalną wartość aplikacyjną uzyskanych wyników, zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum z wnioskiem o wyróżnienie pracy.

ADIUNKT
Zakładu Chemii Bioorganicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Głowacka
dr hab. n. farm. Iwona E. Głowacka

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mail: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl