

Prof. dr hab. inż. Piotr Kowalski,
Instytut Chemii i Technologii Organicznej
Politechnika Krakowska

Kraków, 24.07.2018 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz
pt. „Poszukiwanie antagonistów receptora serotoninowego 5-HT₇
w grupie pochodnych 5,5-dipodstawionej hydantoiny”
wykonanej Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych
Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UJ
pod kierunkiem dr hab. Jadwigi Handzlik, prof. UJ

Podstawą wydania oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz jest pismo dr hab. Jacka Sapy, prof. UJ, Dziekana Wydziału Farmaceutycznego, z dnia 22 czerwca 2018.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana przez mgr Katarzynę Kucwaj-Brysz w Zespole Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UJ pod kierunkiem dr hab. Jadwigi Handzlik, prof. UJ. Tematyka opisywanych badań, rozwijana przez Zespół Katedry od wielu lat i odnosząca się do poszukiwań nowych biologicznie aktywnych struktur z grupy pochodnych hydantoiny, jest dobrze znana w naukowym środowisku krajowym i zagranicznym. Wiele znakomitych publikacji o tej i podobnej tematyce zostało opublikowanych zarówno przez Promotora jak i innych Pracowników Katedry w najlepszych czasopismach fachowych.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz podejmuje bardzo ważną i aktualną tematykę związaną z badaniami nowych pochodnych hydantoiny mających zastosowanie w leczeniu zaburzeń OUN. W swoich eksperymentach skupiła się na poszukiwaniu nowych antagonistów receptora 5-HT₇, którym przypisuje się szczególne działanie w terapii depresji i towarzyszącym im stanom lękowym czy zaburzeniom poznawczym.

Układ hydantoiny daje szerokie możliwości modyfikacji struktury poprzez podstawienie dwóch atomów azotu występujących w cząsteczce jak również atomu węgla w pozycji 5. Synteza jej pochodnych stwarza duże możliwości dopasowania uzyskanych połączeń do modeli farmakoforowych ligandów receptorów sprzężonych z białkami G.

Jako cel pracy Doktorantka wyznaczyła sobie modyfikację struktury związku o symbolu MF-8 (5-(4-fluorofenylo)-3-(2-hydroksy-3-(4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo)propylo)-5-

metyloimidazolino-2,4-dionu), który będąc fenylopiperazynową pochodną hydantoiny wykazywał szczególnie wysokie powinowactwo i selektywność do receptora serotoninowego 5-HT₇.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa cechuje się wyjątkowo dużą spójnością tematyczną i zawiera bogaty materiał eksperymentalny obejmujący syntezę organiczną, ewaluację farmakologiczną oraz wspomaganą komputerowo analizę zależności struktura-aktywność. Została ona przygotowana w formie trzech monotematycznych publikacji naukowych, opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach naukowych z zakresu chemii medycznej (P1 - Eur. J. Med. Chem. 2016, P2 - Eur. J. Med. Chem. 2018, P3 – MedChemCom 2018). We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką, co potwierdza kluczową rolę, jaką odegrała w przygotowaniu materiału badawczego oraz w stworzeniu koncepcji prezentowanych wyników. Kopie prac poprzedza, podzielony na sześć części, przewodnik po rozprawie. W pierwszej części, *Wprowadzenie*, przedstawiono rolę receptora 5-HT₇ w perspektywie leczenia zaburzeń OUN. W kolejnych dwóch częściach zdefiniowano cel, zakres i metodologię badań. W ostatniej części przewodnika przedstawiono opis uzyskanych wyników oraz bibliografię, na którą składa się 112 pozycji literaturowych. Przewodnik po rozprawie został uzupełniony o streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz źródeł finansowania pracy oraz o spis dorobku publikacyjnego i patentowego Doktorantki.

Większość stosowanych w badaniach związków Doktorantka otrzymywała w reakcjach kondensacji oksiranów, powstających w procesach alkilacji pochodnych hydantoiny za pomocą 1-chloro-2,3-epoksypropanu, z arylopiperazynami. Tożsamość i czystość wszystkich pochodnych została potwierdzona analizami widm ¹H NMR, ¹³C NMR oraz UPLC/MS.

Badania biologiczne Doktorantka rozpoczęła od analizy właściwości 14 analogów struktury wiodącej MF-8 (seria A), w których w miejsce grupy 2-metoksyfenylowej, obecnej w MF-8, wprowadzono różnie podstawione grupy fenylowe; w jednym przypadku grupę difenylo-metylową. Analiza wyników testów radioreceptorowych uzyskanych połączeń wykazała, że najwyższe powinowactwo do receptora 5-HT₇ wykazują pochodne będące *orto* podstawionymi pochodnymi fenylopiperazyny. Ich aktywność $K_i < 50$ nM, była jednak niższa niż aktywność związku referencyjnego MF-8 (5-HT₇ $K_i = 3$ nM). Wszystkie związki serii A wykazywały antagonistyczny mechanizm działania i charakteryzowały się selektywnością w powinowactwie do receptora 5-HT₇ względem receptorów D₂ i 5-HT_{1A}. Spośród badanych ligandów z serii A szczególnie odmienne właściwości od pozostałych związków wykazywała pochodna z grupą difenylo-metylową, oznaczona w pracy symbolem KKB16. Związek ten,

pomimo, że cechował się słabą aktywnością do receptora 5-HT₇ ($K_i = 79$ nM), wykazywał, jak do tej pory, najwyższą selektywność, w odniesieniu do receptora 5-HT_{1A} (71-krotną).

Drugim kierunkiem modyfikacji struktury MF-8 było określenie właściwości pochodnych, różniących się między sobą, podstawnikami w pozycji 5 hydantoiny. W tym etapie badań poddano analizie 16 nowo zsyntezowanych ligandów, określonych w pracy serią B. Największą grupę związków serii B, stanowiły analogi MF-8, w których w miejsce grupy 4-fluorofenylowej wprowadzono różnie podstawione ugrupowania fenyłowe. W tej grupie związków znalazły się również dwie difenyłowe pochodne oraz dwa analogi strukturalne liganda KKB16. Z badań powinowactwa do receptora 5-HT₇ związków serii B wynika, że najaktywniejszymi połączeniami są *para* fenylo podstawione ligandy oraz, że najbardziej znaczący i jednocześnie niekorzystny wpływ na powinowactwo miała obecność dwóch grup fenyłowych w położeniu 5 hydantoiny. Selektywność wiązania do receptora 5-HT₇ związków z serii B, względem receptorów D₂ i 5-HT_{1A}, była analogiczna do tej obserwowanej dla związków z serii A. Testy behawioralne na myszach, przeprowadzone dla czterech wybranych związków, charakteryzujących się wysokim powinowactwem do 5-HT₇ ($K_i = 7 \div 12$ nM), potwierdziły ich działanie przeciwdepresyjne, przy jednoczesnym braku działania przeciwlękowego.

Wspomagana komputerowo analiza SAR dla związków z serii A i B, uwzględniająca dodatkowo wyniki badań *in vitro* w połączeniu z właściwościami ADMED *in vitro*, pozwoliła wytypować strukturę KKB16 do ostatniego kierunku modyfikacji MF-8, której celem była ocena wpływu ilości i wzajemnego położenia pierścieni aromatycznych w cząsteczce na rozważaną aktywność i selektywność do receptora 5-HT₇. W ramach tych badań otrzymano 15 nowych pochodnych hydantoiny, oznaczonych w pracy serią C. Najaktywniejszymi związkami z tej serii okazały się pochodne zawierające grupę 1- lub 2-naftyłową w pozycji 5 hydantoiny. W odniesieniu do struktury KKB16, badania stabilności metabolicznej najaktywniejszych pochodnych z serii C, wskazały jednak znacznie mniej satysfakcjonujące wyniki.

Na zakończenie badań Doktoranta prezentuje wyniki, nie ujęte w przedstawionych do oceny publikacjach, potwierdzające znaczenie konfiguracji absolutnej przy atomie węgla łącznika propylowego związanego z grupą hydroksylową, na aktywność i selektywność do receptorów 5-HT₇ i 5-HT_{1A}.

Podsumowując, z prezentowanych w pracy badań wynika, że założony cel pracy, polegający na znalezieniu struktury, wykazującej lepsze właściwości biologiczne niż przyjęta do modyfikacji struktura MF-8, nie został w pełni osiągnięty. Tym niemniej, uzyskane wyniki

pozwoły na identyfikację fragmentów strukturalnych, w szeregu pochodnych hydantoiny, niezbędnych do uzyskania wysokiego powinowactwa i selektywności do receptora 5-HT₇.

Z ciekawości, ale i z roli oceniającego pracę chciałbym zapytać Doktorantkę, dlaczego w modyfikacjach struktury MF-8, nie badano pochodnych będących jej izomerami, w których w miejsce grupy metylowej przy atomie węgla 5 hydantoiny wprowadzony by był inny podstawnik alkilowy lub jego pochodna, lub analogów MF-8 bez grupy metylowej w tym położeniu?. Mam nadzieję, że na tak postawione pytanie uzyskam odpowiedź w czasie obrony.

Przechodząc do opiniowania dysertacji stwierdzam, że charakteryzuje ją bardzo bogaty warsztat badawczy, odnoszący się nie tylko do projektowania i syntezy nowych połączeń, lecz również do zagadnień modelowania molekularnego, badań krystalograficznych, testów funkcjonalnych i radioreceptorowych oraz analizy SAR. Opisane w dysertacji rezultaty badań są na bardzo wysokim poziomie i w pełnym zakresie spełniają warunek oryginalności. Moja ocena merytoryczna pracy jest zatem bardzo wysoka. Podobnie wysoko oceniam wiedzę Autorki rozprawy, jej umiejętność planowania i wykonywania eksperymentów oraz rzetelność w prezentacji i dyskusji uzyskanych wyników, co świadczy bardzo korzystnie o Jej uzdolnieniach naukowych.

Wartym podkreślenia jest fakt, że w dorobku naukowym Doktorantki oprócz trzech publikacji stanowiących podstawę opiniowanej rozprawy, znajdują się jeszcze cztery publikacje ogłoszone w fachowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym i dwa zagraniczne zgłoszenia patentowe. Mgr Katarzyna Kucwaj-Brysz uczestniczyła także w realizacji projektów badawczych. Była Kierownikiem grantu Preludium finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. O Jej aktywności naukowo-badawczej świadczy również sześciomiesięczny staż w Instytucie Chemii Organicznej i Analitycznej w Orleanie (Francja), współpraca z Uniwersytetem Santiago de Compostela (Hiszpania) a także współpraca nie tylko z Pracownikami Wydziału Farmaceutycznego CMUJ, lecz również Pracownikami Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie.

W zakończeniu z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz spełnia wszelkie wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UJ o dopuszczenie Mgr Katarzyny Kucwaj-Brysz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W świetle całkowitego dorobku naukowego oraz w kontekście wartości uzyskanych wyników naukowych składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

T. Kowalski