



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

**Recenzja pracy doktorskiej
p. mgr farm. Grzegorza Ślifirskiego,
pt. „Synteza pochodnych 4-arylopirydo[1,2-c]pirymidyny,
związków o podwójnej wiązalności do receptora 5-HT_{1A}
oraz transportera serotoniny 5-HTT”**

Przedłożona do oceny praca doktorska p. mgr farm. Grzegorza Ślifirskiego jest efektem badań przeprowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem Promotora, p. prof. dr hab. n. farm. Jadwigi Turło oraz Promotora pomocniczego – p. dr n. farm. Marka Króla. Badania objęte doktoratem zostały opisane w dwóch pracach oryginalnych na łamach czasopisma *European Journal of Medicinal Chemistry* w roku 2019, zaś teoretyczne podwaliny podjętego tematu badawczego Doktorant przedstawił w pracy poglądowej wydanej w 2021 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. We wszystkich tych publikacjach Doktorant pełni rolę pierwszego Autora, zaś załączone oświadczenia Współautorów wskazują na Jego znaczący udział w tworzeniu każdej z nich (35-45%). Łączny współczynnik oddziaływania IF za prace włączone w cykl wynosi ponad 18, w tym za same prace eksperymentalne ponad 11 (IF=11,146). Ponadto p. mgr Ślifirski jest współautorem 5 innych publikacji, w tym 4 prac oryginalnych w czasopismach JCR, a także 10-ciu doniesień konferencyjnych, co przekłada się na znamienność dla młodego naukowca łączny współczynnik oddziaływania dla dorobku publikacyjnego (IF=34,292). Pod względem formalnym przedstawiona do oceny dysertacja spełnia, zatem, wymagania stawiane doktoratom z cyklu publikacji, a aktywność naukowa p. mgr Ślifirskiego zasługuje na uznanie.

Na wysoką ocenę zasługuje również wybór tematyki badawczej doktoratu, bowiem poszukiwanie nowych związków chemicznych, które mogłyby skutecznie poprawić terapię depresji, jest ważnym i wysoce aktualnym wyzwaniem nauk farmaceutycznych. Depresja stanowi jedną z najpoważniejszych współczesnych chorób cywilizacyjnych, zataczającą coraz większy krąg w populacji o szerokiej rozpiętości wiekowej - dotyka zarówno młodzież, osoby w wieku produkcyjnym, jak również osoby starsze – współtowarzysząc tak poważnym dolegliwościom neurodegeneracyjnym seniora, jak choroba Parkinsona czy Alzheimer. Wagę tego problemu dodatkowo podnoszą statystyki WHO, w świetle których depresja dotyka ponad 350 milionów osób na świecie, z czego ponad 40% pacjentów jest niepodatnych na dostępne terapie, zaś aż 80% cierpi na nawrót objawów po zakończeniu leczenia. Szczególnie dotkliwym problemem terapeutycznym jest tzw. duża depresja MDD (ang. *major depressive disorder*), która niejednokrotnie prowadzi do śmierci samobójczej pacjentów. W obecnej terapii depresji głównym białkowym celem są transportery wychwyty zwrotnego

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

serotoniny – SERT (5-HTT), a dostępnymi lekami ich selektywne i nieselektywne inhibitory, zwane odpowiednio SSRI i NSRI. Mimo niewątpliwego przełomu, jaki przyniosły leki SSRI w leczeniu depresji, ich stosowanie obarczone jest licznymi niedoskonałościami – zarówno związanymi z koniecznością długotrwałego podawania, jak i z wystąpieniem różnorodnych działań niepożądanych, które pod znakiem zapytania stawiają bezpieczeństwo terapeutyczne.

Badania ostatniej dekady silnie uzasadniają podejścia polifarmakologiczne w poszukiwaniu skutecznych leków dla terapii schorzeń o złożonej etiologii, do której należy również depresja. Trafność takiego podejścia podkreśla chociażby zatwierdzenie w roku 2013 nowego leku przeciwdepresyjnego – wortioksetyny (Brintellix) o rozszerzonym spektrum molekularnych oddziaływań, obejmującym oprócz transportera SERT pięć podtypów receptorów serotoninowych, w tym receptor 5-HT_{1A}. Wysoce uzasadnionym jest zatem podjęte przez Doktoranta poszukiwanie nowych związków chemicznych, których działanie będzie skierowane nie tylko na transportery SERT, ale również na dodatkowe białkowe cele terapeutyczne.

W nawiązaniu do aktualnego stanu terapii i rynku farmaceutycznego oraz przesłanek promujących polifarmakologię w poszukiwaniu leków p. mgr Ślifirski skierował swoją uwagę właśnie na dwa szczególnie istotne dla depresji cele – transporter SERT oraz receptor 5-HT_{1A}. Wybór ten nie był przypadkowy, lecz podparty z jednej strony wynikami wcześniejszych badań prowadzonych w Jednostce macierzystej Doktoranta, z drugiej zaś dogłębną analizą możliwości poszczególnych przedstawicieli rodziny receptorów serotoninowych, jako punktu uchwytu dla leków skierowanych przeciw depresji.

Doktorant przeprowadził taką analizę w pierwszej publikacji cyklu pt. „5-HT Receptors and the development of New Antidepressants”, wydanej na łamach czasopisma *Int. J. Mol. Sci.* W tej 31-stronicowej pracy poglądowej zawarł ogólną charakterystykę układu serotonergicznego w kontekście depresji, aby następnie prześledzić w jakim stopniu lokalizacja poszczególnych podtypów receptora 5-HT oraz ich udział w regulacji sygnalizacji komórkowej dają możliwości potencjalnego wykorzystania ich ligandów w terapii depresji. Praca jest napisana bardzo logicznie, a wszelkie sugestie potencjalnego wykorzystania terapeutycznego znalazły racjonalne uzasadnienie eksperymentalne, oparte na 285 doniesieniach literaturowych. Zawarte w tym artykule treści są nie tylko podstawą teoretyczną przedstawionych dalej badań własnych Doktoranta, ale też mogą stanowić niezwykle istotne źródło aktualnej informacji dla szerszego grona naukowców poszukujących nowego leku przeciwdepresyjnego. Oprócz wykazania wybijającego się znaczenia receptora 5-HT_{1A} w poszukiwaniu nowych skutecznych antydepresantów, istotnym walorem tego artykułu jest analiza poszczególnych receptorów i ich ligandów w kontekście selektywności funkcjonalnej i regionalnej.

Dwie kolejne publikacje cyklu wydane na łamach znakomitego czasopisma *Eur. J. Med. Chem.* przedstawiają już konkretne działania

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

eksperymentalne Doktoranta i Zespołu w poszukiwaniu związków o dwoistym działaniu na białka SERT i receptory 5-HT_{1A} w grupie pochodnych 2H-pirydo[1,2-c]pirymidyny oraz 5,6,7,8-tetrahydropirydo[1,2-c]pirymidyny zawierających w części farmakoforowej ugrupowanie 3-(piperidyn-3-yl)-1H-indolu. Przedmiotem obu prac jest racjonalne projektowanie i synteza łącznie 54 nowych pochodnych, które badano *in vitro* w celu oceny powinowactwa do obu założonych celów terapeutycznych. Związki o oczekiwanej wysokiej aktywności poddano rozszerzonemu skринingowi, obejmującego ocenę powinowactwa do receptorów: 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ i D₂ oraz badanie stabilności metabolicznej, a także badania *in vivo* służące określeniu profilu funkcjonalnego ze wskazaniem regioselektywności zidentyfikowanych ligandów receptora 5-HT_{1A}, by w końcu zweryfikować potencjalne działania przeciwdepresyjne w testach behawioralnych Porsolta.

W obu pracach szczególnie bogata jest część chemiczna, która wskazuje na szeroki wachlarz prac eksperymentalnych Doktoranta w obszarze syntezy organicznej oraz analizy czystości i tożsamości uzyskanych połączeń finalnych i niezbędnych syntonów, tym samym demonstrując wysoki poziom badań własnych Doktoranta. W ramach tych badań przeprowadzono wieloetapowe syntezy obejmujące łącznie 149 odrębnych reakcji chemicznych reprezentujących 9 różnych typów procesów chemicznych, w tym reakcje substytucji nukleofilowej w pierścieniu aromatycznym, addycji, kondensacji cyklizujących, N-alkilowania oraz katalitycznego uwodornienia. Uzyskanie czystych połączeń było niejednokrotnie dużym wyzwaniem wymagającym zastosowania różnorodnych metod chromatograficznych, w tym grawitacyjnej chromatografii kolumnowej, chromatografii *flash*, planarnej chromatografii preparatywnej lub semipreparatywnej chromatografii cieczowej. Strukturę i czystość uzyskanych związków potwierdzono z wykorzystaniem spektrometrii masowej HRMS oraz magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H-NMR, ¹³C-NMR), w tym również widm korelacyjnych. Ponadto dla wybranych struktur wykonano również analizy krystalograficzne z wykorzystaniem XRD. Umiejętność przeprowadzenia tak różnorodnych reakcji chemicznych oraz poprawnej analizy ich struktury i czystości wskazuje na pełne kwalifikacje p. mgr Ślifirskiego do ubiegania się o stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Niewątpliwym osiągnięciem naukowym Doktoranta jest trafne zaprojektowanie i przeprowadzenie modyfikacji chemicznych, które zaowocowały znalezieniem sporej grupy nowych aktywnych pochodnych pirydo[1,2-c]pirymidyny o wartościach stałej wiązania $K_i < 100$ nM dla założonych celów białkowych, w tym łącznie aż 28 związków dla receptora 5-HT_{1A}, a 24 dla transportera SERT, z czego 14 związków wykazało tak wysokie powinowactwo do obu celów (SERT i 5-HT_{1A}) jednocześnie. Wszystkie aktywne połączenia cechowała przy tym selektywność działania w kierunku 5-HT_{1A} i SERT w odniesieniu do pozostałych rozważanych białek GPCR (receptorów 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

HT₇ i D₂). Najaktywniejszym związkiem okazał się 4-(4-fluorofenylo)-2-[4-[3-(1H-indol-3-yl)-1-piperidyl]butyl]-5,6,7,8-tetrahydropirydo [1,2-c]pirymidyno-1,3-dion (symbol **10.7** w pracy 3), który wykazał powinowactwo do obu założonych celów o wartościach K_i <15 nM, zaś w testach funkcjonalnych *in vivo* - profil presynaptycznego antagonisty receptora 5-HT_{1A}. Podobny profil stwierdzono też dla dwóch innych aktywnych połączeń - związków **9.7** i **10.16**. Mimo, że dla żadnego z nich nie potwierdzono aktywności w testach behawioralnych Porsolta, a także ich stabilność metaboliczna nie okazała się wysoka, związki te – w szczególności **10.7**, stanowią interesujący punkt startowy do dalszych farmakomodulacji w poszukiwaniu nowego leku przeciwdepresyjnego, w czym na pewno będzie pomocna analiza zależności struktura-aktywność, logicznie opracowana przez Doktoranta na podstawie uzyskanych wyników, a zwięźle i rzeczowo przedstawiona w niniejszej dysertacji.

Reasumując wysoko oceniam stronę naukową przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej i jej znaczenie dla rozwoju nauk farmaceutycznych.

Zagłębiając się w opisane badania nasunęło mi się następujące pytanie dotyczące profilu oddziaływania z receptorem 5-HT_{1A}:

Dlaczego przed przystąpieniem do badań *in vivo* nie podjęto próby przeprowadzenia oceny aktywności wewnętrznej w kierunku 5-HT_{1A} metodami *in vitro* (np. w teście ekworynowym lub cAMP)?

Druga niejasność dotyczy zakresu badań własnych Doktoranta w kwestii syntezy półproduktów. W pracach [2] i [3], jak i w stosownych opisach w autoreferacie napisano, że związki **2.1-2.9**, **3.1-3.9**, **4.1-4.9** i **5.1-5.9**, a także **6.1-6.9** (w pracy [3]) zostały otrzymane zgodnie z procedurami opisanymi wcześniej. **Czy Doktorant przeprowadził syntezy (resyntezy) tych półproduktów w ramach badań własnych, czy może skorzystał z gotowych związków uzyskanych uprzednio w swojej Jednostce?**

Prosiłabym, żeby Doktorant wyjaśnił te dwie kwestie w czasie obrony.

Od strony edytorskiej przedstawiona do oceny dysertacja stanowi 113-stronicowy autoreferat w języku polskim, wydany w formacie A4 (druk dwustronny). Składają się nań 24 strony obejmujące streszczenia w języku polskim i angielskim, „Wstęp”, „Cel pracy” oraz poprzedzające każdą załączoną pracę cyklu wprowadzenie, dodatkowo rozdzielone dla części teoretycznej, przedstawionej w pracy poglądowej [1] i dla badań własnych opisanych w pracach oryginalnych [2] i [3]. Po każdej pracy następuje krótki rozdział z zebranymi wnioskami, których uwieńczeniem jest 3-stronicowe „Podsumowanie”. Resztę „Rozprawy doktorskiej” stanowią załączone prace [1-3] (62 strony), oświadczenia Współautorów, dwa osobne rozdziały zawierające odpowiednio wykaz prac wchodzących do rozprawy oraz dorobek Doktoranta sprzed doktoratu, a także „Spis treści”. Dysertacja nie zawiera oddzielnego

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

spisu literatury, a z załączonych prac [1-3] wynika, że Doktorant odwołał się do ponad 350 pozycji piśmiennictwa, zacytowanych na końcu poszczególnych publikacji.

W rozprawie pojawiło się kilka drobnych błędów redakcyjnych, np.:

- na Rys. 1 (str.54) zabrakło podstawnika R_3 , o którym mowa w opisie
- na str. 55, p. 2) „bromobutyłowe” zamiast „bromobutyłowych”.

Ich ilość jest jednak znikoma i nie ma większego wpływu na moją ogólnie pochlebną opinię na temat strony edytorskiej niniejszej dysertacji, którą cechuje zwięzłość i logika przedstawienia myśli naukowej, a także staranność.

Podsumowując, pragnę wyrazić moją wysoce pozytywną opinię na temat całokształtu przedstawionej mi do oceny ”Rozprawy Doktorskiej” p. mgr farm. Grzegorza Ślifirskiego, łącząc słowa uznania dla podjętego celu badawczego, zakresu i poziomu badań własnych Doktoranta oraz Jego wkładu w rozwój polskich i światowych nauk farmaceutycznych. Dogłębna analiza przedłożonego do oceny materiału nie pozostawia wątpliwości, że wiedza, umiejętności i dotychczasowe osiągnięcia Doktoranta w pełni kwalifikują go do ubiegania się o stopień doktora nauk farmaceutycznych.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pana magistra farm. Grzegorza Ślifirskiego do finalnych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na względzie wysoki poziom publikacji naukowych, w których Doktorant jest pierwszym autorem, a także istotny wkład tych badań w światowe poszukiwania innowacyjnych leków przeciwdepresyjnych, wnioskuję o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

Kraków, 3 stycznia 2022

Katedra i Zakład Technologii
i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM

prof. dr hab. inż. Jadwiga Handzlik
kierownik

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl