



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-30
fax: 61 854-66-39
e-mail: syntezy@ump.edu.pl

Poznań, dnia 7 stycznia 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: Synteza pochodnych 4-arylopirydo[1,2-c]pirymidyny, związków o podwójnej wiązalności do receptora 5-HT_{1A} oraz transportera serotoniny 5-HTT

Imię i nazwisko: mgr farm. Grzegorz Ślifirski

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: Katedra Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Marek Król

Pan mgr Grzegorz Ślifirski podczas realizacji pracy doktorskiej włączył się w tematykę **syntezy pochodnych 4-arylopirydo[1,2-c]pirymidyny, związków o podwójnej wiązalności do receptora 5-HT_{1A} oraz transportera serotoniny 5-HTT**, która jest rozwijana od dekady z bardzo interesującymi rezultatami w Katedrze Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej pod kierunkiem promotora niniejszej pracy, Pani prof. dr hab. Jadwigi Turło i promotora pomocniczego Pana dr Marka Króla. Zagadnienie badawcze sformułowane w temacie pracy dotyczy szeregu aspektów szczegółowych zmierzających do poszerzenia wiedzy na temat 2H-pirydo[1,2-c]pirymidyn i tetrahydropirydo[1,2-c]pirymidyn połączonych z ugrupowaniami 3-(piperydyn-3-ylo)-1H-indolu. Jednakże w szerszym znaczeniu pozwala na pogłębienie wiedzy na temat aktywności potencjalnych substancji aktywnych farmaceutycznie o podwójnej wiązalności do receptorów 5-HT_{1A} oraz transportera serotoniny 5-HTT, włączając się w ten sposób w nurt poszukiwań nowych substancji aktywnych farmaceutycznie o działaniu przeciwdepresyjnym. Temat badań jest bardzo aktualny naukowo, gdyż w modulacji przekazywania serotoniny w mózgu dopatruje się wciąż możliwości znalezienia nowych leków do leczenia depresji. Ponadto zagadnienie badawcze jest obecnie bardzo uzasadnione społecznie, gdyż problem kondycji psychicznej, leczenia i zapobiegania depresji jest powiązany z trudnym doświadczeniem COVID-19 i coraz częściej poruszonymi następstwami zdrowotnymi przebiegu tej choroby w postaci long- i post-COVID. Wiedza jaką mamy na temat serotoniny, czyli „hormonu szczęścia”, układu serotonergicznego, rodzin i podtypów receptorów serotoninowych w ośrodkowych synapsach serotonergicznym, a także efektów wynikających z ich aktywacji lub blokady, jest coraz większa. Niemniej jednak, zaproponowane w pracy doktorskiej podejście wnika w samo zagadnienie jeszcze bardziej, gdyż Doktorant włącza się w nurt badań służących opracowaniu substancji aktywnych farmaceutycznie, wykorzystujących podwójną wiązalność jednocześnie do receptorów 5-HT_{1A} oraz transportera serotoniny 5-HTT.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Grzegorza Ślifirskiego stanowi spójny tematycznie zbiór trzech publikacji opatrzonych: Streszczeniami w języku polskim i angielskim, Wstępem, Celem pracy, Wykazem prac i Wprowadzeniem. Każda z włączonych do rozprawy publikacji została krótko scharakteryzowana oraz podsumowana głównymi wnioskami i oświadczeniami współautorów. Na końcu Doktorant zawarł Podsumowanie i Wykaz prac stanowiących dorobek naukowy autora rozprawy przed doktoratem. Poszczególne rozdziały i publikacje zostały napisane poprawnym językiem naukowym. Kolejność przedstawiania danych i cytowane w pracach piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta.

Doktorant dokonał właściwego wyboru tematyki do **Wprowadzenia**, w którym zawarł informacje na temat serotoniny i jej roli fizjologicznej oraz uzasadnił wybór tematu pracy doktorskiej. Zaplanowane przez Doktoranta w **Celu** pracy badania miały doprowadzić do otrzymania związków o potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej w grupie 2H-pirydo[1,2-*c*]pirymidyn i tetrahydropirydo[1,2-*c*]pirymidyn połączonych z ugrupowaniami 3-(piperydyn-3-ylo)-1H-indolu o podwójnej wiązalności do receptorów 5-HT_{1A} oraz transportera serotoniny 5-HTT. Należy dodać, że modyfikacje polegające na wprowadzeniu podstawników do części terminalnej oraz farmakoforowej związków zostały zaplanowane w oparciu o analizę SAR wcześniej opublikowanych struktur o poszukiwanym profilu farmakologicznym. Cel ten był konsekwentnie realizowany poprzez badania zaprezentowane w trzech publikacjach. Sposób przedstawiania badań i ich interpretacji zawarty w **Publikacjach wchodzących w zakres rozprawy** oraz poprzedzających je krótkich charakterystykach i kończących podsumowaniach wskazują na biegłość Doktoranta w stosowanej metodologii i dokumentowaniu wyników.

Szczegółowy problem badawczy znajdujący się w poddanej ocenie **Publikacji 1** – *International Journal of Molecular Sciences* 22, 2021, 9015 – dotyczy przeglądu literatury na temat receptorów 5-HT i poszukiwań nowych leków przeciwdepresyjnych. Na początku publikacji Doktorant dokonał wprowadzenia do tematyki depresji i leków stosowanych w jej terapii. Dalej zawarł dane na temat roli układu serotonergicznego w opracowaniu nowych i skutecznych terapii przeciwdepresyjnych, w tym opartych na połączeniu inhibicji 5-HTT z dodatkowymi mechanizmami aktywności farmakologicznej. Bardzo ciekawie przedstawił zagadnienie istotne z punktu widzenia prowadzonych badań własnych, a dotyczące znaczenia receptorów 5-HT_{1A}. Omówił ważną rolę autoreceptorów 5-HT_{1A}, zarówno w utrzymaniu homeostazy, jak i w procesach regulacyjnych w obrębie neuronów 5-HT, a także rolę heteroreceptorów 5-HT_{1A}. Należy podkreślić, że publikacja oparta na 285 odnośnikach literaturowych stanowi doskonałe kompendium, w którym dokonano wnikliwej analizy koncepcji badań i poszukiwań nowych leków przeciwdepresyjnych w kontekście modulacji siedmiu podtypów receptorów serotoninowych. Praca ta sprawia, że zagadnienia eksperymentalne omawiane w dalej przedstawionych publikacjach oryginalnych są lepiej zrozumiałe w kontekście starannie zebranego stanu wiedzy ze światowego piśmiennictwa.

Motywy przewodnim badań zawartych w **Publikacjach 2 i 3** – *European Journal of Medicinal Chemistry* 166, 2019, 144 oraz *European Journal of Medicinal Chemistry* 180, 2019, 383, stało się użycie ugrupowania pirydo[1,2-*c*]pirymidynowego jako syntonu do dalszych modyfikacji, prowadzących do serii 2H-pirydo[1,2-*c*]pirymidyn i tetrahydropirydo[1,2-*c*]pirymidyn połączonych z ugrupowaniami 3-(piperydyn-3-ylo)-1H-indolowymi. Nowe związki opracowano w oparciu o wcześniej zaprojektowane struktury,

w których największych zmian dokonano w części farmakoforowej zawierającej fragment 3-(piperydyn-3-ylo)-1H-indolu. Część eksperymentalna pracy została opracowana bardzo racjonalnie i opierała się na następujących etapach: (i) syntezie syntonów do dalszych reakcji, w tym pochodnych bromobutylowych 4-arylo-pirydo[1,2-c]pirymidyny oraz analogów uwodornionych w motywie pirydo[1,2-c]pirymidynowym oraz pochodnych 3-(piperydyn-3-ylo)-1H-indolu, (ii) syntezie struktur końcowych na drodze reakcji kondensacji, (iii) kompleksowej ocenie właściwości fizykochemicznych związków końcowych i półproduktów, (iv) ocenie aktywności biologicznej związków końcowych w badaniach receptorowych *in vitro* oraz *in vivo*, w tym z użyciem wybranych testów behawioralnych, a także (v) analizie SAR. Przy lekturze artykułu opublikowanego w *European Journal of Medicinal Chemistry* 166, 2019, 144 nasunęło mi się kilka kwestii o których wyjaśnienie poproszę Doktoranta podczas publicznej obrony pracy: (i) Czy dokonując zmiany fragmentu z 4-(piperydyn-4-ylo)-1H-indolu na 3-(piperydyn-3-ylo)-1H-indolu zakładano badania powstających racematów oraz wchodzących w ich skład enancjomerów? Czy może planowane są prace preparatywne dotyczące wyodrębnienia poszczególnych enancjomerów z racematów, dla których stwierdzono najwyższe aktywności biologiczne? (ii) Jakie przesłanki przemawiały za wprowadzeniem atomów fluoru do badanych związków? Pytam o to, gdyż rola fluoru w strukturze neuroleptyków, a także przeciwdepresantów, w tym fluoksetyny i jej pochodnych została dobrze określona w literaturze. (iii) Badania dotyczące wiązania związków do transportera serotoniny SERT wyraźnie wskazały na znaczenie fluoru w pozycji 5 fragmentu 3-(piperydyn-3-ylo)-1H-indolowego – związek 9.10. Zastanawiam się czy związek ten został poddany testom stabilności metabolicznej i jakie były kryteria włączenia związków do tych testów? Na podkreślenie zasługuje fakt, że w artykule opublikowanym w *European Journal of Medicinal Chemistry* 166, 2019 Doktorant przedstawił syntezę oraz charakterystykę fizykochemiczną i biologiczną 27 końcowych związków pochodnych 4-arylo-pirydo[1,2-c]pirymidyny z fragmentem 3-(3-piperydynylo)-1H-indolowym, 5-fluoro-3-(3-piperydynylo)-1H-indolowym oraz 5-metoksy-3-(3-piperydynylo)-1H-indolowym. Dla siedmiu związków stwierdzono ponadto bardzo wysokie powinowactwa wyrażone wartością K_i na poziomie nanomolowym względem celów molekularnych jakimi są receptor 5-HT_{1A} i białko 5-HTT. Podczas lektury artykułu opublikowanego w *European Journal of Medicinal Chemistry* 180, 2019, 383 zastanawiałem się jak otrzymano monokryształ do badań XRD? Czy którykolwiek ze związków końcowych analizowano na kolumnie z wypełnieniem chiralnym? Pytanie nawiązuje do podjętej wcześniej kwestii badania związków końcowych, które posiadają centrum chiralne. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w artykule opublikowanym w *European Journal of Medicinal Chemistry* 180, 2019, 383 Doktorant przedstawił syntezę oraz charakterystykę fizykochemiczną i biologiczną 27 końcowych związków pochodnych tetrahydropirydo[1,2-c]pirymidyny z fragmentami 3-(3-piperydynylo)-1H-indolowym, 5-fluoro-3-(3-piperydynylo)-1H-indolowym oraz 5-metoksy-3-(3-piperydynylo)-1H-indolowym. Dla siedmiu związków stwierdzono bardzo wysokie powinowactwa wyrażone wartością K_i na poziomie nanomolowym względem celów molekularnych jakimi są receptor 5-HT_{1A} i białko 5-HTT. Ponadto w odniesieniu do wcześniej przeprowadzonych badań stwierdzono, że tetrahydropirydo[1,2-c]pirymidyny są aktywniejsze od swoich nienasyconych analogów. Najważniejsze wyniki i wnioski z badań zostały następnie przedstawione w Podsumowaniu.

Treść rozprawy doktorskiej Pana mgr Grzegorza Ślifirskiego zawarta w cyklu trzech artykułów naukowych jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Praca była realizowana według dobrze przemyślanego schematu, co pozwoliło na zweryfikowanie wielu hipotez. Hipoteza zawarta na początku badań dotycząca poszukiwań ligandów o podwójnej wiązalności do receptora 5-HT_{1A} oraz transportera serotoniny 5-HTT w miarę postępu badań została pozytywnie zweryfikowana i doprowadziła do bardzo interesujących wniosków. Przeprowadzone prace eksperymentalne pozwoliły na uzyskanie metodami syntezy chemicznej i wnikliwej charakterystyki fizykochemicznej 54 pochodnych pirydo[1,2-*c*]pirymidyny, z czego 27 w szeregu 2H-pirydo[1,2-*c*]pirymidyny i 27 w szeregu 5,6,7,8-tetrahydropirydo[1,2-*c*]pirymidyny. Związki te zostały poddane pełnej analizie SAR podsumowującej badania biologiczne *in vitro* i *in vivo*. Wszystkie dane zostały w przedstawionych do oceny pracach krytycznie omówione w kontekście światowego piśmiennictwa i bezpośrednich doświadczeń Zespołu. Uzyskane wyniki mają więc duże znaczenie poznawcze i stanowią istotny wkład do chemii medycznej z uwagi na zaobserwowaną wysoką wiązalność związków obu serii do zakładanych celów molekularnych. Należy dodać, że w świetle załączonych oświadczeń współautorów, wkład Pana mgr Grzegorza Ślifirskiego w powstanie publikacji jest znaczący. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawione i już opublikowane dane eksperymentalne posiadają wysoką wartość merytoryczną, gdyż Doktorant (*i*) zastosował nowoczesny warsztat badawczy, który pozwolił na poszerzenie wiedzy na temat możliwości syntezy, charakterystyki fizykochemicznej i biologicznej 2H-pirydo[1,2-*c*]pirymidyn i tetrahydropirydo[1,2-*c*]pirymidyn połączonych z ugrupowaniami 3-(piperydyn-3-ylo)-1H-indolu; (*ii*) podjął się prowadzenia badań bardzo aktualnych naukowo w chemii medycznej, a co najważniejsze skutecznie je zrealizował, co pozwoliło na wyselekcjonowanie związków o podwójnej wiązalności do receptorów 5-HT_{1A} oraz transportera serotoniny 5-HTT; (*iii*) uzyskał wyniki stwarzające perspektywy opracowania substancji o potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej spośród pochodnych pirydo[1,2-*c*]pirymidyny, a więc o dużym znaczeniu społecznym. Należy podkreślić, że sumaryczny współczynnik oddziaływania IF trzech prac wchodzących w skład rozprawy wynosi 17,069, co przekłada się na 420 punktów MNiSW, a uzyskane wyniki zostały także zaprezentowane na siedmiu konferencjach krajowych i zagranicznych.

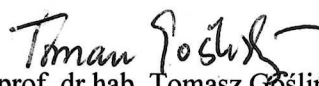
Pan mgr Grzegorz Ślifirski posiada w mojej ocenie bardzo dobry dorobek naukowy, jest pierwszym autorem czterech publikacji w czasopismach takich jak *Biul. Wydz. Farm. WUM*, *Int. J. Mol. Sci.*, dwukrotnie *Eur. J. Med. Chem.* Ponadto jest współautorem publikacji w *Med. Chem. Res.*, *Int. J. Mol. Sci.*, *J. Chromatogr. A* oraz *Microchem. J.* Ponadto jest współautorem dziesięciu komunikatów zjazdowych, będąc równocześnie w dziewięciu z nich pierwszym autorem. Jest ponadto wykonawcą grantu OPUS z Narodowego Centrum Nauki. Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF Jego prac wynosi 34,292, co przekłada się na 755 punktów MNiSW.

Wszystkie rozdziały i publikacje zawarte w dysertacji zostały napisane bardzo poprawnym językiem naukowym. Zwracam uwagę na drobne kwestie, na które natrafiłem podczas czytania pracy: (*i*) s. 5 – „zsyntetyzowano” – to galizm (*fr. synthétiser*), sugeruję po prostu syntezować, (*ii*) s. 57, Schemat 1 – w (v.) zapewne chodziło o związki 8.1-8.3, (*iii*) s. 83, na Schemacie 3 uwodornione pirymidyny oznaczono 5.1'-5.9', stąd wnioskuję, że w tekście powyżej schematu chodzi o związki ze wskazaną numeracją.

Reasumując uważam, że Pan mgr Grzegorz Ślifirski doskonale zmierzył się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazał się znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem

warsztatowym. Moja wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia przez Doktoranta wiedzy z zakresu syntezy chemicznej i chemii leków. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Grzegorza Ślifirskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny z wnioskiem o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.


prof. dr hab. Tomasz Gośliński