



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

**Recenzja rozprawy doktorskiej p. mgra inż. Damiana Kułagi,
pt. „Poszukiwanie nowych ligandów receptorów 5-HT_{1A}/5-HT₇
działających na ośrodkowy układ nerwowy, z grupy
długołańcuchowych arylopiperazyn i aminotriazyn”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska p. mgra inż. Damiana Kułagi została wykonana w Katedrze Chemii i Technologii Organicznej, Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, pod kierunkiem Promotora - p. dr hab. inż. Radomira Jasińskiego oraz pod opieką Promotora Pomocniczego – p. dr Jolanty Jaśkowskiej. Wyniki badań doktorskich zostały opublikowane w postaci cyklu 6-ciu publikacji oryginalnych o zasięgu międzynarodowym i łącznym współczynniku oddziaływania IF=25.323, w których Doktorant pełni rolę pierwszego Autora, zaś jego znaczący wkład w ich powstanie (70-85%) został potwierdzony stosownymi oświadczeniami współautorów. Już na podstawie samej analizy bibliometrycznej, zauważyć można że doktorat stanowi nieprzeciętne i dużych rozmiarów przedsięwzięcie naukowo-badawcze, przekraczające wymagania stawiane, nie tylko doktoratom, ale i cykлом habilitacyjnym.

Doktorant jest ponadto współautorem 5 publikacji, w tym 4 o zasięgu międzynarodowym (w takich czasopismach, jak: *Current Chem. Lett.*, *Catalysts*, czy *J. Mol. Str.*). Jest współautorem 27 doniesień konferencyjnych, w tym wygłosił 6 komunikatów ustnych. Jest również współtwórcą trzech patentów krajowych oraz jednego zgłoszenia patentowego, w którym jest pierwszym autorem, a także współautorem 2 wdrożeń przemysłowych. Kierował 4 grantami obliczeniowymi, projektem NCBiR LIDER XII (2022-23) oraz 2 projektami subwencji N+B służącymi rozwojowi młodych naukowców. Badania, które przeprowadził w ramach doktoratu były dodatkowo finansowane z dwóch projektów kierowanych przez Promotora Pomocniczego, a do wzbogacenia doktoratu wynikami interdyscyplinarnych badań przyczyniła się współpraca Doktoranta z trzema ośrodkami naukowo-badawczymi z Krakowa i Lublina. Doktorant odbył również 3 staże naukowe: w firmie Selvita, Instytucie Farmakologii PAN im. J. Maja oraz na Uniwersytecie Sapienza w Rzymie. **Wszechstronna aktywność naukowo-badawcza p. mgra inż. Damiana Kułagi zasługuje, zatem, na słowa wysokiego uznania i przekłada się na poziom naukowy całej dysertacji.**

Głównymi obszarami zainteresowań naukowych Doktoranta, którym dał ujście w swojej dysertacji doktorskiej, są interdyscyplinarne badania z pogranicza chemii i technologii organicznej oraz chemii medycznej, skoncentrowane na poszukiwaniu leku chorób neuropsychiatrycznych czy neurodegeneracyjnych, działającego

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

za pośrednictwem receptorów serotoninowych, w tym podtypu 5-HT_{1A} i 5-HT₇.

Współczesny stan medycyny i nauk farmaceutycznych w leczeniu schorzeń OUN silnie akcentuje ważną rolę serotoniny i układu serotonergicznego oraz związanych z nim białkowych celów terapeutycznych takich jak reprezentujące klasę GPCR typy 1,2 i 4-7 receptora serotoninowego, kanały jonowe reprezentowane przez typ 5-HT₃ czy transportery SERT. Te cele w różnej kombinacji stanowią punkt uchwytu istniejących od lat i wprowadzonych ostatnio na rynek farmaceutyczny leków OUN, które jednak nie są w pełni satysfakcjonujące z powodu niewystarczającej selektywności czy profilu farmakokinetycznego i bezpieczeństwa, co przekłada się na niedoskonałą biodostępność i wciąż nie wystarczające efekty terapeutyczne. Nadmienić przy tym należy, że liczba osób dotkniętych schorzeniami neuropsychiatrycznymi i neurodegeneracyjnymi gwałtownie wzrasta, o czym świadczą statystyki i prognozy WHO. Stąd, poszukiwanie nowych grup chemicznych związków, które mogą przynieść poprawę istniejących terapii, jest bardzo ważnym wyzwaniem współczesnych nauk farmaceutycznych, chemicznych i technologicznych. W takich poszukiwaniach cel białkowy, jakim jest podtyp 5-HT₇ receptora serotoninowego, jest szczególnie interesujący, ponieważ jest to jeden z najpóźniej zidentyfikowanych podtypów, będący heteroreceptorem, który ze względu na pełnione funkcje fizjologiczne w OUN jest wysoce obiecującym punktem uchwytu dla terapii takich schorzeń jak depresja, schizofrenia, stany lękowe, demencja czy ból neuropatyczny. Dodatkowym argumentem potwierdzającym atrakcyjność tego celu w poszukiwaniu innowacyjnego leku, jest fakt, że do tej pory nie ma na rynku farmaceutycznym ani jednego leku działającego jako selektywny ligand 5-HT₇R. **Wybór kierunku badań, który podjął p. mgr inż. Damian Kułaga w swoim doktoracie – obejmujący poszukiwania ligandów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇, ale zmierzający do uzyskania selektywności do tego drugiego, jest bardzo trafny w świetle obecnego stanu wiedzy i zapotrzebowania współczesnej terapii.**

Na słowa uznania zasługuje też logiczny i szeroko zakrojony plan badawczy oraz użyte narzędzia i metody, których podstawę stanowi wykorzystanie chemicznej syntezy organicznej z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego, a także wspomagane komputerowo projektowanie, w których uczestniczył Doktorant oraz skirining farmakologiczny z elementami tzw. „lekopodobieństwa” wykonany przez Kooperantów.

Doktorant zebrał wyniki swoich badań w cyklu publikacji, który został ułożony w logicznej kolejności z podziałem na następujące prace:

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

D01. Kułaga D, Jaśkowska J, Jasiński R. Microwave-Assisted Solvent-Free Synthesis of Ipsapirone. *J. Heterocyclic Chem.* 2019, 56: 1498-1504 (IF=1.399)

D02. Kułaga D, Jaśkowska J, Satała G. Radioligand and computational insight in structure - Activity relationship of saccharin derivatives being ipsapirone and revospirone analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* 2021, 42:128028 (IF=2.774)

D03. Kułaga D, Jaśkowska J, Satała G. Design, synthesis and biological evaluation of novel serotonin and dopamine receptor ligands being 6-bromohexyl saccharine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019, 29: 126667 (IF=2.774)

D04. Kułaga D, Drabczyk AK, Satała G, Latacz G, Rózga K, Plażuk D, Jaśkowska J. Design and synthesis of new potent 5-HT₇ receptor ligands as a candidate for the treatment of central nervous system diseases. *Eur J Med Chem.* 2022, 227:113931 (IF=6.427)

D05. Kułaga D, Drabczyk AK, Satała G, Latacz G, Boguszewska-Czubara A, Plażuk D, Jaśkowska J. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1,3,5-Triazines: Effect of Aromatic Ring Decoration on Affinity to 5-HT₇ Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(21):13308 (IF=6.628)

D06. Kułaga D, Jaśkowska J, Satała G, Latacz G, Śliwa P. Aminotriazines with indole motif as novel, 5-HT₇ receptor ligands with atypical binding mode. *Bioorg Chem.* 2020, 104: 104254 (IF=5.321)

Dysertacja, zaś stanowi skrótowo i logicznie przygotowany przewodnik do tych publikacji, uzasadniający podjęty temat, a także wskazujący na racjonalne działania przeprowadzone przez Doktoranta i zespół Kooperantów, wykorzystane metody i narzędzia badawcze, uzyskane wyniki oraz płynące z nich wnioski. Doktorant zawarł to w ramach 67-stronicowego opisu, w którym odniósł się do 135 pozycji literaturowych, nie licząc cytowań w samych publikacjach cyklu. We wstępie przedstawił krótką i przekrojową charakterystykę wykorzystania promieniowania mikrofalowego w syntezie organicznej z przykładami reakcji prowadzonych w rozpuszczalniku, stanie suchym oraz reakcji w układzie heterogenicznym z zastosowaniem katalizatorów przeniesienia międzyfazowego (PTC). Następnie zwięźłą charakterystykę receptorów 5-HT, ze szczególnym uwzględnieniem podtypu 5-HT_{1A} i 5-HT₇ oraz wybrane grupy chemiczne długołańcuchowych arylopipezyn (LCAPs) wykorzystywanych w leczeniu i fazie poszukiwań, wraz ze skrótową analizą SAR. W „Celu i zakresie pracy” określił założenia swoich badań, dla których punktem wyjściowym i strukturą wiodącą był ipsapiron, natomiast dodatkową inspirację stanowiły pochodne aminotriazyny, co w połączeniu dało szansę na tworzenie związków hybrydowych w poszukiwaniu selektywnego liganda 5-HT₇. Zaplanowane modyfikacje chemiczne zostały podzielone na 5 serii, w tym ostatnia jeszcze dodatkowo na trzy podserie, zaś struktury związków do syntezy były racjonalnie projektowane w oparciu o wspomaganą komputerowo analizę SAR na bazie wyników skryningu biologicznego prowadzonego po poszczególnych etapach syntezy. Doktorant przedstawił

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

to szczegółowo w rozdziale „Metodologia badań”, a w następującym po nim rozdziale „Opis uzyskanych wyników” zamieścił szczegółowe informacje odnośnie profilu farmakologicznego otrzymywanych związków z uwzględnieniem symulacji oddziaływań z celem białkowym, pełnego skringingu receptorowego, a dla wybranych aktywnych związków - aktywności funkcjonalnej, profilu ADMET, a także działań *in vivo* w modelu rybim (Danio pręgowany).

Pierwsza z prac cyklu (D01) – ma najbardziej technologiczny charakter, ponieważ jej przedmiotem jest opracowanie i optymalizacja warunków najbardziej wydajnej metody otrzymywania ipsapironu i jego pochodnych. W publikacjach D02-D03 związki uzyskane z wykorzystaniem zoptymalizowanej syntezy, w której przeważały metody bezrozpuszczalnikowe w środowisku mikrofalowym, zostały poddane skringingowi receptorowemu oraz wspomaganą komputerowo analizie SAR, z której wynika, że przeprowadzone modyfikacje z zachowaniem szkieletu ipsapironu nie sprzyjają selektywności w stronę receptora 5-HT₇ a raczej wielocelowym działaniom z preferencją receptora 5-HT_{1A} i D₂ dopaminowego. Stąd w dalszym toku badań przedstawionych w publikacjach D04-D06, przedmiotem rozważań są już struktury hybrydowe odchodzące od układu azaspiironu, w których układowi arylopiperazyny towarzyszy rdzeń aminotriazyny. O ile wprowadzenie dłuższego linkera do 4,6-diaminotriazyny (seria 2) nie przyniosło wzrostu selektywności w kierunku 5-HT₇R, a połączenie piperazyny bezpośrednio z pierścieniem triazynowym (seria 4) przyniosło raczej spodziewany spadek powinowactwa do wszystkich badanych celów, o tyle dodatkowe podstawienie triazyny tryptaminą (seria 3) zaowocowało już wyraźnym wzrostem powinowactwa do 5-HT₇R w przypadku niepodstawionych piperazyn, mimo że selektywność, wciąż jeszcze nie była znacząca (D04). Ten kierunek rozwijano dalej zastępując ugrupowanie piperazyny bioizosterem liniowym w trzech wariantach opisanych odpowiednio w publikacjach D05 i D06, gdzie największy sukces uzyskano wprowadzając układ aminoetyloaniliny lub fenylopropyloaminy (seria 5a) czy fenyloetyloaminy przy jednoczesnym podstawieniu fluorem antypodalnego układu indolu (seria 5b, związek 131). Ostatnia podseria (5c) opisana w publikacji D06 nie przyniosła spektakularnych wyników, wskazując na brak korzyści ze skrócenia linkera czy wprowadzenia doń heteroatomu tlenu. Zamykający przewodnik rozdział „Podsumowanie” skrótkowo zestawia jakościową analizę zależności struktura-aktywność w kontekście przeprowadzonych modyfikacji, co umożliwiło wytypowanie związków o najkorzystniejszych profilu farmakologicznym.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych doktoratu należy: (i) wzbogacenie światowej biblioteki długołańcuchowych arylopiperazyn seria 71 oryginalnych aktywnych połączeń o zróżnicowanym profilu farmakologicznym i farmakokinetycznym, (ii) opracowanie

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



i optymalizacja metod ich otrzymywania – nie tylko efektywnych, ale też przyjaznych środowisku, (iii) dogłębna analiza profilu receptorowego wraz z wyjaśnieniem mechanizmów molekularnych oddziaływania ligand-receptor z wykorzystaniem zaawansowanych metod modelowania molekularnego oraz (iv) identyfikacja sześciu wysoce aktywnych związków, w tym: trzech przedstawicieli pochodnych ipsapironu o zróżnicowanym profilu receptorowym (selektywnego liganda 5-HT_{1A} i dwóch multifunkcyjnych ligandów receptorów 5-HT/D) oraz trzech selektywnych antagonistów 5-HT₇ w grupie indolowych pochodnych aminotriazyny. Związki te mogą stanowić struktury wiodące do dalszych modyfikacji chemicznych oraz szerszych badań farmakologicznych w poszukiwaniu innowacyjnego leku OUN.

W swoich badaniach Doktorant wykorzystywał różnorodne metody syntezy m. in.: różne warianty alkilowania, kondensacji, syntezę amin pierwszorzędowych metodą Gabriela, formylowanie Vilsmeiera-Haacka, kondensację Henry'ego czy redukcję. Nie tylko prowadził syntezy, ale również badał wpływ warunków na wydajność prowadzonych procesów (wykorzystania mikrofal, zasad oraz czasu prowadzenia syntez, użytych rozpuszczalników lub bezrozpuszczalnikowo) by wyznaczyć optymalne metody ich otrzymywania. Świadczy to o wiedzy i szerokim doświadczeniu w zakresie chemii i technologii organicznej Doktoranta. Ponadto, uczestnicząc w badaniach modelowania molekularnego, nabył umiejętności posługiwania się narzędziami bioinformatycznymi, w tym komercyjnymi (Maestro, Schrodinger, Flare/Forge, Cresset) lub dostępnymi w internecie (SWISS-MODEL). **Takie doświadczenia naukowo-badawcze potwierdzone dodatkowo publikacjami w prestiżowych recenzowanych czasopismach JCR w pełni kwalifikują p. mgra inż. Damiana Kułagę do ubiegania się o stopień doktora.**

Pod względem redakcyjnym dysertacja stanowi bardzo estetycznie wydaną książkę formatu B5, w której, oprócz 100-stronicowego przewodnika, drugą połowę stanowią załączone publikacje oraz oświadczenia współautorów. Na przyjemną estetykę składa się dodatkowo bogata szata graficzna (28 rysunków, 15 tabel). Jediną słabszą stroną dysertacji jest stosunkowo duża ilość drobnych błędów gramatycznych w przedstawionych opisach (niemal na każdej stronie) – przykładowe podaję poniżej.

Przykładowe uchybienia gramatyczne i językowe:

- Str. 15 - „Do najczęstszych PTC, które stosowane są w syntezie, należy wymienić...”
„inny z kolei przykład, który można tu przytoczyć, jest synteza diarylo...”
- Str. 17 - str. 34 – skrót „oun” powinien być pisany z dużych liter „OUN”
- Str. 17 - „może pływać”, a powinno być „może wpływać”
- Str. 17 - „oraz inhibicję” powinno być „oraz inhibicja”

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

Natknęłam się również na niewielkie uchybienia merytoryczne oraz nasunęły mi się następujące pytania:

-Str. 17 – wspomniano o 15 podtypach receptora 5-HT, zgodnie z moją wiedzą jest ich 14. **Czy w ostatnim czasie udało się zidentyfikować nowy podtyp? Chętnie bym o nim usłyszała w czasie obrony.**

- Str. 32 – „wiązania hydrofilowe typu π - π ”

- Str. 48 – „zostały przeprowadzone testy mające na celu wyznaczenia potencjału agonistycznego (aktywacja receptora) i agonistycznego (hamowanie...)”

- Str. 49 – „testy oceniające stabilność metaboliczną oraz aktywność izoenzymamów CYP3A4, CY2D6 ...” raczej powinno być „wpływ związków na aktywność izoenzymów...”

- Str. 49 - Ryba „Zebrafish” – polska nazwa to „Danio pręgowany”

Dlaczego w przypadku związku 85 (D02-03) badano aktywność wewnętrzną w kierunku 5-HT_{1A}, a nie do D₂ gdzie powinowactwo było wyższe?

Powyższe drobne uchybienia i niejasności nie wpływają jednak na moją bardzo wysoką ocenę tej dysertacji oraz znakomitych kwalifikacji Doktoranta w zakresie chemii i technologii organicznej oraz chemii medycznej.

Zwracam się, zatem, do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej o dopuszczenie pana mgra inż. Damiana Kułagi do finalnych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bogaty dorobek publikacyjny tworzący cykl doktoratu, jego wysoki poziom naukowy oraz ważny wkład w światowe badania nad poszukiwaniem leku OUN o serotoninowym punkcie uchwytu, a w tym dominujący udział Doktoranta, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej p. mgra inż. Damiana Kułagi.

Kraków, 12 czerwca 2023

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