



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Dr hab. Marcin Mączyński

Wrocław 29.01.2021

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Góry

wykonanej w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

pt. „SYNTEZA I BADANIA CHEMICZNO-FARMAKOLOGICZNE NOWYCH POCHODNYCH 1,3-PODSTAWIONEGO PIROLIDYNO-2,5-DIONU O POTENCJALNEJ AKTYWNOŚCI PRZECIWDRGAWKOWEJ”

Padaczka (epilepsja) to rodzaj zaburzeń neurologicznych będących wynikiem chwilowej niesprawności mózgu, która objawia się nagłymi i napadowymi wyładowaniami wewnątrz komórek nerwowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Napadom padaczkowym towarzyszą objawy kliniczne różnego rodzaju zaburzeń, od ruchowych, zmysłowych, pamięciowych, poznawczych, wegetatywnych do kombinacji tych zaburzeń. Analizując dane WHO padaczka stanowi jedną z najczęściej występujących chorób neurologicznych, a farmakoterapia jest podstawową metodą jej leczenia. Leczenie farmakologiczne rozpoczyna się mając na uwadze częstotliwość występowania napadów, ich rodzaj oraz liczbę parametrów współistniejących. Głównym celem leczenia jest osiągnięcie jak najlepszej kontroli napadów przy jak najmniejszych działaniach niepożądanych. Mając na uwadze różnorodność i częstotliwość napadów, a także lekooporność na leczenie podstawowe, celowe jest poszukiwanie nowych leków przeciwpadaczkowych o różnorodnej strukturze, różnym mechanizmie działania, a także o znikomych działaniach niepożądanych.

W tym kontekście podjęta w recenzowanej rozprawie doktorskiej tematyka, dotycząca opracowania metod syntezy związków będących pochodnymi 1,3-dipodstawionego pirolidyno-2,5-dionu o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej, dobrze wpisuje się w obecne trendy poszukiwań leków na drodze syntezy organicznej. Bezpośrednim celem pracy Pani mgr

Małgorzaty Góry było otrzymanie serii nowych pochodnych 1,3-dipodstawionego pirolidyno-2,5-dionu. Modyfikacje strukturalne znanych struktur dotyczyły podstawnika w pozycji 3 układu pirolidyno-2,5-dionu, łącznika pomiędzy tym układem a różnie podstawioną arylopiperazyną oraz zastąpienia arylopiperazyny morfoliną, a także zbadania wpływu tych zmian na aktywność przeciwdrgawkową. Za cel pośredni Doktorantka postawiła sobie przeprowadzenie dla wybranych pochodnych badań aktywności przeciwbólowej, badań radioreceptorowych *in vitro* i hepatotoksyczności, a także oszacowanie właściwości fizykochemicznych *in silico*.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani Małgorzaty Góry jest kontynuacją badań prowadzonych przez zespół pod kierownictwem Pani prof. dr hab. Jolanty Obniskiej, która jest wybitnym specjalistą zajmującym się syntezą nowych związków o aktywności przeciwdrgawkowej w grupie pochodnych pirolidyno-2,5-dionu.

Praca posiada ogólnie przyjęty układ dla tego typu dysertacji, obejmuje 112 stron, na których w tekście ulokowane są także ryciny w liczbie 33 i tabele w liczbie 16. Merytorycznie praca poparta jest 128 pozycjami piśmiennictwa, z których 92 pozycje pochodzą z ostatnich 10 lat. Piśmiennictwo jest prawidłowo dobrane, co potwierdza dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki do wykonywania części doświadczalnej. Dodatkowo Doktorantka na końcu monografii przedstawiła swój dorobek publikacyjny od 2016 roku, stanowiący 6 publikacji pełnotekstowych, których jest współautorem.

Podjęta w przedstawionej rozprawie problematyka badawcza jest trafna i aktualna. We wstępie Doktorantka opisała zarówno metody projektowania leków przeciwpadaczkowych, jak i podała opis stosowanych leków oraz związków będących w fazach badań klinicznych z uwzględnieniem krótkiego opisu ich mechanizmu działania. Doktorantka przedstawiła słuszny wniosek, że opisywane przez Nią związki są różnorodne pod względem struktury chemicznej jak i że istnieje wiele celów molekularnych zaangażowanych w powstawanie i rozprzestrzenianie się napadów padaczkowych. Poparte to zostało licznymi doniesieniami literaturowymi. W ocenie Recenzenta brakuje w tej części pracy nazw chemicznych opisywanych związków, co z pewnością wzbogaciłoby ten fragment pracy.

W rozdziale założenia i cel badań Pani mgr Małgorzata Góra krótko opisała celowość podjęcia tematu badań, a także przedstawiła zasadność modyfikacji układu pirolidyno-2,5-dionu w kontekście poszukiwania związków o aktywności przeciwdrgawkowej. Doktorantka nawiązała też do badań prowadzonych w Katedrze Chemii Farmaceutycznej WF UJ CM na temat pochodnych 1,3-dipodstawionego pirolidyno-2,5-dionu o stwierdzonej aktywności przeciwdrgawkowej. Kontynuując badania prowadzone w jednostce Doktorantka określiła cel

badania jako „badanie wpływu modyfikacji strukturalnych nowych pochodnych 1,3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu na ich aktywność przeciwdrgawkową i przeciwbólową, oraz określenie prawdopodobnego mechanizmu działania w badaniach *in vitro* oraz oszacowanie właściwości fizykochemicznych i hepatotoksycznych najaktywniejszych pochodnych”. W wyniku wieloetapowych syntez Doktorantka otrzymała finalnie 51 związków będącymi pochodnymi pirolidyno-2,5-dionu o zmodyfikowanej pozycji 3, z czego 16 charakteryzowało się aktywnością przeciwdrgawkową. Dla tych 16 wytypowanych związków wykonano badania ilościowe na myszach. Doktorantka wszystkie otrzymane związki zakwalifikowała do siedmiu serii. Modyfikacje pozycji 3 układu pirolidyno-2,5-dionu polegały na wprowadzeniu różnego rodzaju podstawników (benzhydrylowego, *sec*-butyloвого, 2-chlorofenyloвого, 3-chlorofenyloвого, 3-metylotiofen-2-yloвого, benzo[*b*]tiofen-2-yloвого), zastosowaniu składowej zasadowej (arylopiperazyny lub morfoliny) oraz rodzaju i długości łącznika pomiędzy tą komponentą a imidowym atomem azotu w pirolidyno-2,5-dionie. Analizując szlak syntezy Doktorantka otrzymała finalne związki w oparciu o metody opisane w piśmiennictwie, wprowadzając konieczne modyfikacje. Autorka otrzymała najpierw odpowiednio podstawione w pozycji 3 różnie podstawione kwasy bursztynowe, które w wyniku reakcji cyklokondensacji z kwasem aminoctowym przekształciła w odpowiednie 3-podstawione kwasy pirolidyno-2,5-dionooctowe. Następnie Doktorantka otrzymała cztery serie związków (I-IV) przeprowadzając reakcje pomiędzy arylopiperazynami a 3-podstawionymi kwasami pirolidyno-2,5-dionooctowymi. Syntezę związków pozostałych trzech serii (V-VII) Doktorantka rozpoczęła od otrzymania w wyniku kilkuetapowej syntezy kwasów 2-(3-metylotiofen-2-ylo) i 2-(benzo[*b*]tiofen-2-ylo)bursztynowych. Następnie kwas 2-(3-metylotiofen-2-ylo)bursztynowy w reakcji cyklokondensacji z kwasem aminoctowym przekształciła w kwas 2-(3-metylotiofen-2-ylo)pirolidyno-2,5-dionooctowy, a kolejno w reakcji z 1-fenylopiperazyną lub morfoliną uzyskała odpowiednie pochodne amidowe. Z kolei związki zawierające morfolinę czy 1-fenylopiperazynę połączoną różnej długości łańcuchem alkilowym z azotem imidowym pirolidyno-2,5-dionu Doktorantka otrzymała w reakcji cyklokondensacji kwasu 2-(3-metylotiofen-2-ylo)bursztynowego lub kwasu 2-(benzo[*b*]tiofen-2-ylo)bursztynowego z odpowiednio 2-morfolinoetano-1-aminą, 3-morfolinopropano-1-aminą lub z otrzymanymi wcześniej podstawionymi 3-(4-fenylopiperazyn-1-ylo)propano-1-aminami.

Struktury chemiczne i czystość wszystkich nowo otrzymanych związków Doktorantka potwierdziła analizując widma ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz LC/MS. Analiza widm przedstawiona w niniejszej pracy w pełni potwierdza strukturę chemiczną opisywanych związków. Z kolei

uwagę Recenzenta zwrócił sposób potwierdzenia czystości związków przekazanych do badań farmakologicznych. Według Recenzenta w pracy powinny być zamieszczone całe widma MS badanych związków, co ułatwiłoby ocenę/analizę czystości związków. Same wartości przy jakich występują jony pseudomolekularne, które odpowiadają masom cząsteczkowym badanych związków są niewystarczające. Jediną pewną metodą służącą do określenia czystości związków jest przeprowadzenie analizy elementarnej badanych pochodnych, która pozwoli na ustalenie składu pierwiastkowego badanych związków.

Kolejnym etapem badań mgr Małgorzaty Góry było wykonanie zaplanowanych badań farmakologicznych. Wszystkie otrzymane nowe związki zostały przebadane w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej w Katedrze Farmakodynamiki WF UJ CM w oparciu o trzy podstawowe testy: test maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES), test drgawek psychomotorycznych 6Hz, test drgawek wywołanych podskórnym podaniem pentylenotetrazolu (*sc*PTZ), a także oceniono neurotoksyczność związków w teście obracającego się pręta. Analizując wyniki badań skринingowych przeprowadzonych *in vivo* na myszach Doktorantka wyselekcjonowała 16 z 51 związków, które wykazały aktywność przeciwdrgawkową. Dla tych związków wykonano badania ilościowe na myszach wyznaczając dawkę efektywną (ED_{50}), dawkę toksyczną (TD_{50}) oraz indeks ochronny (PI). Z otrzymanych wyników i analizy struktura-aktywność Autorka wysunęła wnioski, że najbardziej aktywne okazały się pochodne zawierające odpowiednio fragment 3-metylotiofen-2-ylowy lub benzo[*b*]tiofen-2-ylowy w położeniu 3 układu piroolidyno-2,5-dionu, łącznik propylowy oraz morfolinę (związki 2f, 1g, 2g), a w grupie pochodnych amidowych związek zawierający fragment 4-fluorofenylowy (związek 2c).

Wytypowane w testach przeciwdrgawkowych związki zostały poddane badaniom w kierunku aktywności przeciwbólowej, także w Katedrze Farmakodynamiki WF UJ CM, w trzech modelach bólu: teście gorącej płytki, teście formalinowym i teście przeciągania. Najaktywniejsze w tych testach okazały się związki 3a oraz 7f. Na stronie 60 Doktorantka napisała, że „wszystkie związki, które wykazywały aktywność przeciwdrgawkową w testach *in vivo* zostały przekazane do badań na aktywność przeciwbólową”. Recenzent analizując wyniki badań stwierdził, że w teście gorącej płytki zbadano 7 związków (3a, 7a, 3b, 1f, 2f, 4f, 7f), w teście formalinowym 5 związków (3a, 7a, 3b, 2c, 7d), w teście przeciągania 4 związki (1f, 2f, 4f, 7f). W sumie badaniu poddano tylko 9 różnych związków z 16 aktywnych przeciwdrgawkowo. Pewien niedosyt budzi brak informacji o aktywności przeciwbólowej pozostałych 7 związków, pomimo przekazania ich do badań biologicznych.

Następnie Autorka podjęła próbę wyjaśnienia prawdopodobnego mechanizmu działania przeciwdrgawkowego wytypowanych pochodnych. Doktorantka przeprowadziła badania radioreceptorowe: powinowactwa związków do kanałów sodowych i wapniowych, powinowactwa kilku pochodnych do receptorów GABA_A i transportera GABA (GAT), a dla związków wykazujących aktywność przeciwbólową powinowactwa do receptorów TRPV1. Analizując wyniki Doktorantka stwierdziła, że mechanizm działania przeciwdrgawkowego najaktywniejszych związków 2f, 1g i 2g jest bardziej złożony i nie został wyjaśniony w wyniku przeprowadzonych badań, a blokowanie kanałów sodowych czy wapniowych może być tylko jedną z komponent ich aktywności *in vivo*. Autorka wykluczyła także udział receptorów GABA_A i transportera GABA (GAT) w mechanizmie działania przeciwdrgawkowego a także stwierdziła wysokie powinowactwo związków 4f i 7f do receptorów TRPV1.

Kolejnym celem była ocena właściwości hepatotoksycznych wytypowanych 12 spośród otrzymanych 51 związków w badaniach *in vitro* na liniach komórkowych HepG2. Doktorantka tymi badaniami potwierdziła brak działania cytotoksycznego na wymienione komórki.

Na zakończenie Doktorantka dokonała oceny właściwości fizykochemicznych związków w celu opisu ich farmakokinetyki w oparciu o zasady Lipińskiego i Vebera narzędziami SwissAdme. Analizując wyniki 17 najaktywniejszych przeciwdrgawkowo pochodnych Doktorantka wytypowała 5 związków (2c, 2f, 7f, 1g, 2g), które mogą charakteryzować się dobrą biodostępnością.

Podsumowaniem badań jest gruntownie przeprowadzona analiza zależności pomiędzy strukturą otrzymanych związków (6a, 7a, 3b, 4b, 3d, 7d, 4e, 7e, 1f, 2f, 4f, 7f, 1g, 2g) a wynikami ich aktywności przeciwdrgawkowej *in vivo* (SAR). Doktorantka przedstawiła szereg zależności, które z pewnością wykorzysta podczas projektowania kolejnych eksperymentów.

W ocenie Recenzenta uzyskane rezultaty badań stanowią istotne opracowanie naukowe w dziedzinie chemii medycznej i wnoszą wkład w rozwój leczenia padaczki. Do obowiązków recenzenta należy wskazanie zauważonych błędów formalnych, typograficznych i redakcyjnych popełnionych w trakcie przygotowywania manuskryptu rozprawy. Uwagi dotyczą następujących zagadnień:

- tytuł pracy i w całej pracy, jest 1,3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu powinno być 1,3-dipodstawionego pirolidyno-2,5-dionu
- str. 13 i inne, drobne błędy edytorskie
- str. 16, we wzorze Zonisamidu nieprawidłowo zaznaczono wiązania podwójne w pierścieniu benzenowym

- str. 18, brak wzoru opisywanej likarbazepiny
- str. 19, nazwa „receptor kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego” powinna brzmieć receptor kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metyloizoksazolo-4-propionowego
- str. 21, w opisie lewetyracetam Autorka opisuje aktywność enancjomeru S w stosunku do racematu, a jest brak informacji o aktywności enancjomeru R
- str. 21, w opisie pregabaliny nie ma informacji o aktywności enancjomeru R
- str. 24, stwierdzenie, że retygabina jest strukturalnym analogiem flupirtyny, a brak jest wzoru flupirtyny aby to stwierdzić
- str. 29, wyrażenie, że ganaksolon jest strukturalnym analogiem allopregnanolonu, a nie ma wzoru allopregnanolonu aby to stwierdzić
- str. 35, w sformułowaniu „przy imidowym azotu” powinno być „przy imidowym atomie azotu”
- str. 35, wyrażenie, że 3-metylotiofen obecny jest w cząsteczce jest nieprecyzyjne, powinno być określone, którym atomem jest połączony i powinien być określony jako podstawnik
- str. 36, wyrażenie „morfolina obecna jest w strukturze imepitoiny....związki naśladują strukturalnie modelowy lek imepitoinę” a nie ma wzoru imepitoiny aby to stwierdzić
- str. 39 i inne, zamiast „otrzymane kwasy bursztynowe” powinno być otrzymane odpowiednio podstawione kwasy bursztynowe, a także jest błąd w określeniu lokantu (jest 2 a ma być 3).
- str. 40 i inne, jest wyrażenie karbaldehydu a powinno być karboaldehydu,
- str. 69, stwierdzenie, że „hepatotoksyczność leku jest jednym z najczęstszych działań niepożądanych obserwowanych podczas badań klinicznych, a także główną przyczyną ich niepowodzeń” jest zbyt dużym skrótem myślowym
- str. 69, jest Farmakobilogii a powinno być Farmakobiologii
- str. 80 i inne, w opisach syntez powinny być oprócz ilości molowych także ilości w mg, g czy ml.
- str. 84 i inne, w opisie danych spektralnych jest „monoisotopic mass” a powinna być nazwa w języku polskim

Pragnę jednak podkreślić, że przedstawione uwagi mają głównie charakter techniczny, redakcyjny, natomiast w żadnym stopniu nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Mając na uwadze oryginalność oraz wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Góry pt. „Synteza i badania chemiczno-farmakologiczne nowych pochodnych 1,3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej” stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane dysertacjom doktorskim określone w obowiązującej ustawie

o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego Collegium Medicum w Krakowie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Małgorzaty Góry do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a także wnioskuję o jej wyróżnienie.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ
kierownik


dr hab. Marcin Małczyński