



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej

Warszawa, 6 kwietnia 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Michała Abrama

***„Nowe związki hybrydowe pochodne piroolidynonu i piroolidynodionu o aktywności
przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej”***

**wykonanej w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM,
pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Kamińskiego, prof. UJ.**

Epilepsja jest często występującą i trudną w leczeniu chorobą neurologiczną. Niektóre jej odmiany cechują się wysokim stopniem lekooporności, stąd istnieje potrzeba poszukiwania nowych związków aktywnych które przyniosły by remisję napadów nie poddających się klasycznej farmakoterapii. To zadanie jest trudne, ponieważ choroba ma złożony i nie do końca jasny patomechanizm. Jednym z możliwych kierunków poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych jest wprowadzanie modyfikacji strukturalnych w obrębie cząsteczek znanych leków. Z perspektywy historycznej, tego typu podejście skutkowało nie tylko uzyskaniem leków o lepszych właściwościach farmakologicznych (np. cechach ADME czy korzystniejszej farmakokinetyce), lecz także, dosyć przypadkowo, leków o zupełnie nowych mechanizmach działania w porównaniu do podobnych strukturalnie

terapeutyków macierzystych. Co więcej, z czasem odkrywano również dodatkowe wskazania dla takich leków, np. terapia bólu neuropatycznego.

Stosunkowo nowym trendem w poszukiwaniu związków aktywnych przeciwpadaczkowo jest projektowanie tzw. hybryd molekularnych, które stanowią połączenie elementów farmakoforowych kilku różnych substancji i w ten sposób charakteryzują się działaniem wielokierunkowym. Mogą więc działać przez więcej niż jeden mechanizm molekularny, a przez to mieć szerokie spektrum aktywności *in vivo*, obejmować swym spektrum lekooporne typy epilepsji, a nawet znaleźć potencjalne zastosowanie w innych obszarach terapeutycznych.

W ten trend wpisują się badania opisane w dysertacji mgr Michała Abrama. Dyplomant, bazując na wynikach wcześniejszych eksperymentów prowadzonych w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM, zaprojektował hybrydy molekularne, pochodne piroolidynonu i piroolidynodionu, posiadające cechy strukturalne leków o różnych mechanizmach działania i spektrach terapeutycznych, mianowicie: Etosuksimidu, Lakozamidu i Lewetyracetamu. Dodatkowo, Doktorant inkorporował w zaprojektowane pochodne fragment arylopiiperazynowy, charakterystyczny dla związku o kryptonimie BCTC, selektywnego blokera receptorów waniloidowych typu 1 (TRPV1), o udowodnionym działaniu w modelach bólu neuropatycznego. Dyplomant podzielił zaplanowane związki na 8 grup pochodnych, które następnie zsyntetyzował, scharakteryzował fizykochemicznie i przekazał do badań *in vitro* i *in vivo*.

Warsztat naukowy zawarty w recenzowanej dysertacji jest niezwykle bogaty. Pan mgr Michał Abram przeprowadził wieloetapową syntezę aż 69 nowych pochodnych o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym, a wliczając związki pośrednie, 128 substancji chemicznych. Niektóre z zastosowanych przekształceń nie należały do technicznie łatwych, np. reakcje katalizowane kompleksami palladu, wymagające użycia warunków absolutnych. Należy zaznaczyć iż związki otrzymywane przez mgr Michała Abrama są chiralne – zawierają stereochemicznie labilną resztę fenyloglicyny, a niektóre z nich Dyplomant otrzymał w postaci enancjomerycznie czystej, co znacznie podnosi walory pracy i jest też, bez wątpienia, sporym wyzwaniem, któremu Doktorant sprostał. Ogólnie, sekwencje reakcji prowadzących do zaplanowanych pochodnych o zróżnicowanej budowie zostały zaprojektowane w sposób prawidłowy, a oparte były m. in. na tworzeniu wiązania

amidowego, cyklizacji intramolekularnej, deprotekcji amin, addycji aza-Michaela czy wspomnianym już procesie Buchwalda-Hartwiga.

Związki otrzymane przez Doktoranta zostały poddane licznym badaniom *in vitro* i *in vivo*. Przede wszystkim, została określona ich wstępna aktywność w mysich modelach drgawek: teście maksymalnego elektrowstrząsu (MES), podskórnego Pentetrazolu (scPTZ) oraz modelu 6Hz drgawek lekoopornych indukowanych impulsem elektrycznym o niskiej częstotliwości. Dla wybranych pochodnych przeprowadzono testy ilościowe, polegające na wyznaczeniu wartości ED₅₀ w poszczególnych modelach. W obranym przez Dyplomanta schemacie wykorzystującym wymienione przesiewowe testy *in vivo* istotna jest weryfikacja indeksów terapeutycznych, a więc odniesienie siły działania związków do ich neurotoksyczności. W tym celu mgr Michał Abram zaplanował użycie testu obracającego się pręta. Dwa związki cechujące się najkorzystniejszą aktywnością przeciwdrgawkową zostały również przebadane pod kątem aktywności antynocyceptywnej w modelach bólu u myszy: formalinowym, kapsaicynowym oraz w modelu neuropatii obwodowej indukowanej Oksaliplatyną.

W dalszej kolejności wyselekcjonowane związki zostały poddane badaniom *in vitro* mającym na celu określenie ich prawdopodobnych mechanizmów działania, ocenę ich parametrów ADME, toksyczności, farmakokinetyki. Pragnę nadmienić iż ilość danych *in vitro* i *in vivo* uzyskanych przez Doktoranta w celu analizy struktura-aktywność jest imponująca i nie jest możliwa do przedstawienia w tej krótkiej recenzji. W podsumowaniu owych wyników, Doktorant wytypował związek wiodący – **(R)-69**. Substancja ta, będąca eutomerem racemicznej pochodnej **22**, wykazała wysoką aktywność w zwierzęcych modelach drgawkowych, tj. ED₅₀ (MES) = 36 mg/kg, ED₅₀ (6 Hz [32 mA]) = 39 mg/kg, ED₅₀ (scPTZ) = 55 mg/kg. Ponadto substancja ta była skuteczna w modelu napadów lekoopornych 6 Hz (44 mA) - ED₅₀ = 117 mg/kg oraz charakteryzowała się wysokim profilem bezpieczeństwa w teście obracającego się pręta (rotarod) - TD₅₀ = 468 mg/kg. Dodatkowo, pochodna **(R)-69** wykazała wyraźną aktywność w obu fazach testu formalinowego, teście kapsaicynowym, oraz w modelu neuropatii obwodowej indukowanej Oksaliplatyną, co świadczy o jej możliwym zastosowaniu w terapii bólu.

W testach *in vitro* pochodna **(R)-69** okazała się hamować potencjałozależne neuronalne prądy sodowe i wykazała właściwości antagonistyczne w stosunku do receptorów TRPV1 oraz kanału wapniowego typu Cav1.2 (typ L), co Dyplomant logicznie

typuje jako ważne dla aktywności przeciwdrgawkowej i antynocyceptywnej testowanej klasy związków. Analizując profil ADMET badanej substancji, mgr Michał Abram stwierdza, iż nie jest ona blokerem kanału potasowego hERG, nie wpływa w sposób wyraźny na izoformy 3A4, 2D6 i 2C9 cytochromu P450, nie ma wpływu hepatotoksycznego oraz wykazuje wysoką stabilność metaboliczną. Ten fragment dysertacji Doktorant konkluduje słusznym wnioskiem, iż związek **(R)-69** wykazuje korzystne właściwości ADME-Tox w badaniach *in vitro*.


Podsumowując dysertację od strony merytorycznej, jej wartość oceniam bardzo wysoko. Biorąc pod uwagę inne, niemerytoryczne aspekty, przede wszystkim ma ona bardzo przejrzysty układ. Można w niej wyróżnić krótkie, choć wystarczające, wprowadzenie, w którym Dyplomant charakteryzuje obrane wskazania terapeutyczne - epilepsję oraz ból neuropatyczny, słusnie wskazując potrzebę poszukiwaniu kolejnych terapeutyków działających na te schorzenia. Dalej, Doktorant wyjaśnia znaczenie hybryd molekularnych w poszukiwaniu nowych leków, podając konkretne przykłady takich związków celujących w różne obszary terapeutyczne. Wstęp teoretyczny dysertacji mgr Michała Abrama kończy wzmianka na temat wpływu chiralności na aktywność związków przeciwdrgawkowych, co jest logiczne ponieważ otrzymuje on cząsteczki zawierające centra sterogeniczne. Temat ten został w znacznym stopniu poszerzony w dołączonej do dysertacji publikacji przeglądowej współautorstwa Dyplomanta: „*Chirality as an important factor for the development of new antiepileptic drugs*” (publikacja D-4). Dalsze części rozprawy stanowią: Założenie, cel i koncepcja badań; Koncepcja i projektowanie struktur związków hybrydowych; Opis badań własnych – syntezy zaprojektowanych połączeń hybrydowych; dalej Podsumowanie istotnych wyników badań farmakologicznych *in vivo*; Badania farmakologiczne *in vitro* powinowactwa i funkcji; Badania elektrofizjologiczne *in vitro*; Badania *in vitro* ADME-Tox; Analiza zależności struktura-aktywność przeciwdrgawkowa; oraz Podsumowanie uzyskanych wyników. Mgr Michał Abram zawarł w dysertacji kopie publikacji stanowiących jej podstawę, przedstawił również podrozdział „*Synteza półproduktów i związków finalnych nieopublikowanych oraz ich dane fizykochemiczne i spektralne*”. Praca jest estetyczna, a czytelność wzorów, rycin i schematów jest wręcz doskonała. Praca jest zaopatrzona w spis literatury zawierający 96 pozycji.

Zagadnienia wymagające w mojej opinii dodatkowego komentarza Doktoranta nie są liczne:

- 1) Uwaga formalna: zdarza się że Doktorant używa zwrotów dosłownie przeniesionych z języka angielskiego, np. „Schemat 4. Synteza wyjściowych, niekomercyjnych pochodnych...”, zamiast „Schemat 4. Synteza wyjściowych pochodnych niedostępnych handlowo”; „koncentracja” zamiast „stężenie”. W opisie fizykochemicznym niepublikowanych związków nazwa pochodnej **108** jest w języku angielskim. W zasadzie nie dopatrzyłem się innych błędów, pracę oceniam ogólnie jako przygotowaną bardzo starannie.
- 2) Fenyloglicyna, której pochodne są używane w syntezie, jest aminokwasem podatnym na racemizację. W tym kontekście pojawia się pytanie dlaczego Autor dysertacji używa aktywatorów grupy karboksylowej (DCC) bez dodatku supresorów racemizacji (np. HOBt czy HOAt) bądź innych mieszanin czynników sprzęgających, nie powodujących racemizacji (np. EDC/HOBt, EDC/Oxyma, HATU). Czy była prowadzona optymalizacja warunków pod kątem zminimalizowania racemizacji na stereocentrum fenyloglicyny?
- 3) Na schemacie 7 Doktorant przedstawia syntezę związków **(C1-R)-104-106** gdzie atom węgla pochodzący od fenyloglicyny ma zdefiniowaną konfigurację absolutną (*R*). Z kolei, w reakcji addycji amin do wiązania podwójnego maleimidu powstaje nowe centrum stereogeniczne na atomie węgla C-3, a więc produktem reakcji jest mieszanina diastereoizomerów. Czy zostały podjęte próby ich rozdzielenia?
- 4) Niektóre pochodne, w tym **(R)-69**, otrzymano w postaci stereochemicznie jednorodnej. Czy zostało ocenione ryzyko ich (częściowej) racemizacji w organizmie żywym (np. pod wpływem białek osocza)?
- 5) Związek **(R)-69** wykazuje dobrą aktywność przeciwdrgawkową i przeciwbólową. Jaki dalszy kierunek rozwoju tej cząsteczki Doktorant mógłby zaproponować? Czy istnieją bardziej złożone testy *in vitro* lub *in vivo* które pomogły by dokładniej oszacować potencjał kliniczny tej pochodnej?

Powyższe uwagi mają przeważnie charakter dyskusji naukowej i, być może, sugestii co do możliwych przyszłych badań nad omawianymi pochodnymi. Uwagi te nie wpływają więc na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Michała Abrama. Ilość wykonanych syntez oraz zaplanowanych testów farmakologicznych jest imponująca. Poziom dysertacji jest bezsprzecznie bardzo wysoki i zawarte w niej wyniki wnoszą wkład w stan wiedzy na

temat poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych i przeciwbólowych, w oparciu o kilka komplementarnych mechanizmów działania, w tym jednego unikalnego. Badania opisane w ocenianej rozprawie doktorskiej mają charakter multidyscyplinary, z jasno sprecyzowanym, dużym wkładem Doktoranta. Wiele przedstawionych wyników zostało już opisanych w znakomitych pracach opublikowanej w czasopismach o wysokich współczynnikach bibliometrycznych. Wydaje się bardzo prawdopodobnym, że pozostałe dane zostaną opublikowane w równie dobrych pracach. Doktorant jest współautorem licznych doskonałych prac spoza zakresu niniejszej rozprawy. Z tych względów przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie pana mgr Michała Abrama do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wniosek o wyróżnienie rozprawy.


.....
dr hab. n. farm. Maciej Dawidowski

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 721, 57 20 646
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl

ADIUNKT
Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej
dr hab. n. farm. Maciej Dawidowski



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej

Warszawa, 6 kwietnia 2021

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

mgr Michała Abrama

„Nowe związki hybrydowe pochodne pirolidynonu i pirolidynodionu o aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej”

**wykonanej w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM,
pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Kamińskiego, prof. UJ.**


Wysoka Rado,

W odniesieniu do dokumentu 'Regulamin wyróżniania rozpraw doktorskich przez Radę Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ' oraz zawartych w nim kryteriów wyróżnienia, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Michała Abrama „Nowe związki hybrydowe pochodne pirolidynonu i pirolidynodionu o aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej” wykonanej w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM, pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Kamińskiego, prof. UJ.

W mojej opinii rozprawa ta spełnia wszystkie kryteria które Wysoka Rada stawia wyróżnianym rozprawom, tj.: a) bezspornie prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy i dotyczy ważnego zagadnienia jakim jest poszukiwanie nowych związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii epilepsji i bólu neuropatycznego. Wkład pracy Doktoranta i jakość przeprowadzonych badań uważam za ponadstandardowe w tym obszarze badawczym.

Dysertacja jest przygotowana starannie, otrzymane wyniki zostały wnikliwie przeanalizowane a wnioski zostały odpowiednio sformułowane; b) wyróżnia się oryginalnością zastosowanych narzędzi i metod badawczych. Przejawia się to realizacją koncepcji związków hybrydowych, a więc zawierających elementy farmakoforowe znanych leków i związków w badaniach klinicznych. Metodyka pracy jest oryginalna, ponieważ dotyczy projektowania i syntezy związków o unikalnych strukturach chemicznych. Badania przeprowadzone przez Dyplomanta doprowadziły do otrzymania modulatorów kanału TRPV1 o działaniu przeciwdrgawkowym i przeciwbólowym. Obrany cel molekularny nie został wyeksplorowany przez innych badaczy, co w istotny sposób wpływa na innowacyjny charakter dysertacji; c) praca ma szczególne walory poznawcze i aplikacyjne, ponieważ dotyczy stadiów przedklinicznych w poszukiwaniu nowego, oryginalnego leku we wskazaniach w obszarze neurologii; d) podsumowaniem powyższych punktów jest fakt, iż część wyników została już opublikowana w postaci czterech prac oryginalnych w wiodących periodykach z dziedziny chemii medycznej i neurologii, o znakomitych wskaźnikach bibliograficznych (wszystkie o punktacji MNiSW przynajmniej 100). Dyplomant jest pierwszym współautorem trzech wymienionych artykułów. Dysertacja zawiera również dane niepublikowane, które będą źródłem kolejnych, w moim mniemaniu równie dobrych prac naukowych.

Z poważaniem,



.....

(dr hab. n. farm. Maciej Dawidowski)

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 721, 57 20 646
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl

ADIUNKT
Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej
dr hab. n. farm. Maciej Dawidowski