



ZAKŁAD FARMAKOLOGII
Wydział Nauk o Zdrowiu
UNIwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin
tel./fax. (81) 448-67-72
e-mail: tomasz.plech@umlub.pl
Kierownik:
dr hab. Tomasz Plech, prof. uczelni

Lublin, dnia 13.04.2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Nowe związki hybrydowe pochodne pirolidynonu
i pirolidynodionu o aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej”
autorstwa mgra farm. Michała Abrama**

Rozprawa doktorska mgra Michała Abrama została przygotowana w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM pod promotorską opieką dra hab. n. farm. Krzysztofa Kamińskiego, prof. UJ. Badania stanowiące kanwę tej rozprawy zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki, w ramach grantu SONATA BIS, i widać w nich rozmach, multidyscyplinarne podejście do analizowanego problemu oraz logikę w planowaniu kolejnych etapów eksperymentów.

Nawiązując do tytułu recenzowanej pracy można stwierdzić, że również jej charakter jest „hybrydowy”. Rozprawa doktorska bazuje bowiem na cyklu 4 artykułów naukowych, 3 oryginalnych i 1 artykule typu mini-review, opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych (*ACS Chemical Neuroscience*, *Bioorganic Chemistry*, *Epilepsia*, *ChemMedChem*). Cykl ten został opatrzone wprowadzeniem, prezentacją koncepcji i celu badań, omówieniem wyników badań własnych oraz badań *in-vitro* i *in-vivo* przeprowadzonych w ramach współpracy z innymi zespołami naukowymi lub w ramach usług komercyjnych, opisem zależności struktura – aktywność oraz podsumowaniem. W rozprawie zawarte zostały także wyniki dotychczas niepublikowane a wnoszące dodatkowy wkład w poruszaną tematykę. Im, między innymi, poświęcony jest rozdział 12 rozprawy. Całość kończy spis literatury, która została przez Doktoranta dobrana adekwatnie do omawianej tematyki. Choć do rozprawy doktorskiej nie dołączono oświadczeń współautorów

poszczególnych artykułów naukowych to jednak Doktorant bardzo wyraźnie i realnie określił zakres swojego zaangażowania w poszczególne etapy badań, jak również wyraźnie wskazał udział innych badaczy w tym projekcie naukowym. Zasługuje na docenienie fakt, że w rozprawie doktorskiej Doktorant w największym stopniu skupił się na przedstawieniu wyników tej części badań, w których osobiście brał udział.

Celem rozprawy doktorskiej było poszukiwanie nowych kandydatów na leki przeciwpadaczkowe oraz skuteczne w terapii bólu, głównie neuropatycznego, rekrutujących się z grupy związków o strukturze hybrydowej. Terapia obu wspomnianych schorzeń nastrocza wielu trudności w praktyce klinicznej. Pomimo wprowadzenia na rynek wielu nowych leków przeciwpadaczkowych, odsetek pacjentów cierpiących na lekooporną odmianę choroby nie zmienił się praktycznie od lat 60. ubiegłego wieku i wciąż wynosi około 30%. Etiologia zjawiska lekooporności jest złożona, tak samo jak złożona jest etiopatogeneza samej padaczki. Skutkiem tego zjawiska jest, niestety, gorsza jakość życia pacjentów, postępujące w toku choroby zaburzenia funkcji intelektualnych oraz zwiększona umieralność. W jeszcze większym stopniu zjawisko lekooporności uwidacznia się w trakcie terapii bólu neuropatycznego. Tu zaledwie połowa pacjentów deklaruje zmniejszenie odczuwania bólu w efekcie zastosowanej farmakoterapii. Z tego więc względu tematyka poruszana w rozprawie doktorskiej mgra Michała Abrama jest niezwykle ważna a zaprezentowane wyniki mogą mieć realny wpływ na zmianę tych niekorzystnych statystyk. O możliwości praktycznego wykorzystania wyników uzyskanych przez Doktoranta świadczy chociażby fakt, iż stały się one podstawą międzynarodowego zgłoszenia patentowego (WIPO PCT/PL2020/050001).

U podstaw badań Doktoranta legło założenie, że wieloczynnikowa etiologia zarówno padaczki, jak i bólu neuropatycznego wymaga poszukiwania kandydatów na leki w grupie związków hybrydowych, zwanych również wielocelowymi (*multitarget drugs*), wielofunkcyjnymi (*multifunctional drugs*) lub bifunkcjonalnymi. Związki takie, łącząc w swej strukturze różne fragmenty farmakoforowe, mogą wpływać na różne mechanizmy odpowiadające za rozwój choroby. W procesie projektowania struktur docelowych związków o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym Doktorant wykorzystał wyniki uzyskane wcześniej przez innych badaczy, w tym swojego Promotora, z Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM. Do struktur docelowych Doktorant wprowadził również elementy pochodzące z leków przeciwpadaczkowych (lakoamidu, lewetyracetamu, etosuksymidu) oraz związku BCTC, będącego selektywnym blokerem receptorów

waniloidowych TRPV1 i wykazującego aktywność przeciwbólową. Zaprojektowane serie związków i proponowane kierunki modyfikacji chemicznej Doktorant w bardzo przejrzysty sposób zawarł na rycinie 13 (str. 36). W tym miejscu pragnę podkreślić, że szata graficzna całej rozprawy doktorskiej stoi na wysokim poziomie i znacząco ułatwia jej lekturę. W toku realizacji zamierzeń badawczych Pan mgr Michał Abram wykazał się kunsztem chemika syntetyka, co widać szczególnie dobrze na etapie syntezy asymetrycznej. Strukturę wszystkich otrzymanych związków, łącznie 61. (nie licząc półproduktów), Doktorant scharakteryzował metodami spektralnymi i fizykochemicznymi adekwatnymi do problemu badawczego. W kolejnym etapie badań zsyntetyzowane związki zostały poddane kompleksowej ocenie aktywności biologicznej i neurotoksyczności *in-vivo* (testy MES, 6 Hz – odmiana 32 i 44 Hz, scPTZ, rotarod). Dla wyselekcjonowanych związków, odznaczających się najkorzystniejszym profilem aktywności i toksyczności, przeprowadzono również ocenę właściwości antynocyceptywnych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant wytypował związek nr **22** i jego enancjomer – **(R)-69**, do dalszych eksperymentów mających ocenić ich molekularny mechanizm działania, parametry farmakokinetyczne i parametry ADME-Tox. Tym, co budzi wielkie uznanie jest szeroko zakrojony panel testów *in-vitro* i *in-vivo*, jakie wykorzystano dla jak najlepszego scharakteryzowania potencjału związków kandydujących do miana leków. Oceniono bowiem potencjalne powinowactwo wytypowanych związków do miejsc wiążących ligandy w kanałach sodowych, wapniowych, potasowych, białku transportera GABA, jak również ich wpływ na funkcje receptora TRPV1 i napięciowo-zależnych kanałów sodowych i wapniowych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant wysunął wniosek o powiązaniu aktywności przeciwdrgawkowej analizowanych związków z blokowaniem neuronalnych prądów sodowych. O wielokierunkowym, na poziomie molekularnym, działaniu wspomnianych związków świadczą również wyniki badań z wykorzystaniem radioligandów. Nie stwierdzono co prawda korelacji między wynikami eksperymentów *in-vitro* i *in-vivo*, ale pokazano potencjał tej klasy związków. Myślę, że czynnikiem, który utrudniał wnioskowanie na temat molekularnego podłoża aktywności tych pochodnych mógł być dobór stężeń poszczególnych związków w badaniach skriningowych *in-vitro*, nieadekwatny do stężeń obserwowanych w osoczu i mózgu zwierząt (*notabene* wyniki analiz farmakokinetycznych również są elementem rozprawy doktorskiej).

W ostatnim etapie badań Pan mgr Michał Abram, dysponując bogatą biblioteką danych farmakologicznych dotyczących zsyntetyzowanych pochodnych, przeprowadził rzetelną i konkluzywną analizę zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością przeciwdrgawkową

badanej klasy związków. Jako niezbędną dla szerokiego spektrum aktywności przeciwdrgawkowej wskazał obecność układu pirolidyno-2,5-dionu połączonego fragmentem acetamidowym z układem fenylopiperazyny. Dodatkowo, Doktorant wytypował korzystny kierunek podstawienia układu aromatycznego fenylopiperazyny i charakter chemiczny podstawników warunkujących lepszą aktywność w zwierzęcych modelach padaczki. Z punktu widzenia bezpieczeństwa korzystniejsze okazały się enancjomery R, natomiast odwrotny efekt – silniejsze zaburzenie koordynacji ruchowej w teście *rotarod* – obserwowano w przypadku rozpuszczalnych w wodzie chlorowodorków. Obrazowym podsumowaniem analizy SAR jest rycina 20 (str. 71). Dodatkową wartością rozprawy doktorskiej mgra Michała Abrama są niepublikowane dotąd wyniki. Zarówno w części chemicznej, jak i farmakologicznej (Tab. 5) dają one podstawę do stworzenia bardzo dobrej publikacji naukowej.

Pomimo mojej wysokiej oceny warsztatu naukowego Doktoranta i stworzonej przez Niego rozprawy doktorskiej, z recenzenckiego obowiązku odniosę się również do tych elementów rozprawy, które w mojej opinii budzą niejasności lub, po prostu, mogły zostać lepiej opracowane:

- 1) podrozdział 1.1 („Padaczka i ból neuropatyczny – charakterystyka schorzeń”) przedstawia bardziej rys epidemiologiczny dotyczący padaczki i bólu neuropatycznego aniżeli samą charakterystykę schorzeń, rozumianą jako opis ich patogenezę;
- 2) w bardzo interesującym podrozdziale 1.2 („Związki hybrydowe w rozwoju nowych leków”), na stronie 24 Doktorant stwierdza, że wemurafenib jest jedynym z dopuszczonych do obrotu lekiem stosowanym u pacjentów z czerniakiem, u których występuje mutacja V600E w genie BRAF. Obecnie jednak dostępne są również inne leki, np. encorafenib i dabrafenib, stosowane we wspomnianym wskazaniu.
- 3) również w podrozdziale 1.2 Doktorant mógł pokusić się o bardziej szczegółowe przedstawienie wyników badań klinicznych dla padsevonilu (np. wyniki badań klinicznych o akronimie DUET i ARISE) i peksidartinibu (szczególnie w kontekście odmowy przyznania przez European Medicines Agency w czerwcu 2020 roku pozwolenia na dopuszczenie do obrotu leku Turalio) – wyniki te ukazują bowiem jak skomplikowaną materią jest leczenie chorób o podłożu wieloczynnikowym, nawet przy zastosowaniu leków o strukturze hybrydowej.
- 4) przy omawianiu wyników aktywności przeciwdrgawkowej (podrozdział 5.1) Doktorant nie odniósł się do ciekawych, skądinąd, efektów porównania aktywności związku nr **22** (będącego mieszaniną racemiczną) z aktywnością jego enancjomerów R i S w testach

MES, scPTZ i 6 Hz. Z czego, w ocenie Doktoranta, może wynikać fakt, że oba enancjomery charakteryzują się aktywnością niższą aniżeli mieszanina racemiczna?

5) jakie były kryteria doboru stężeń związków w badaniach powinowactwa i ADME-Tox?

Czy stężenia te były powiązane z poziomem związku **22** oznaczonym we krwi lub mózgu zwierząt laboratoryjnych w trakcie badań farmakokinetycznych?

Sformułowane powyżej zastrzeżenie i uwagi nie umniejszają niewątpliwym walorom naukowym rozprawy doktorskiej mgr Michała Abrama. Nie ulega wątpliwości, że założony cel badań został osiągnięty, nawet z nadstatkiem. Zastosowane modyfikacje struktury chemicznej pochodnych pirolidynonu i pirolidynodionu pozwoliły na otrzymanie związków o silniejszej od związku wyjściowego **KA-11** aktywności przeciwdrgawkowej i antynocyceptywnej. Co istotne, aktywność ta była również utrzymana w zwierzęcym modelu padaczki lekoopornej (test 6 Hz, 44 mA). Jednak nawet gdyby efekt zastosowanych modyfikacji był inny (tj. słabszy), to już sam proces dochodzenia do wyników, sposób planowania kolejnych etapów badań i formułowanie właściwych wniosków świadczą o dojrzałości naukowej Doktoranta i dają niepodważalną podstawę do nadania Mu stopnia doktora nauk farmaceutycznych. W związku z tym przedkładałam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ wniosek o dopuszczenie mgr farm. Michała Abrama do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie mając na uwadze bardzo wysoki poziom naukowy przedstawionych badań, doniosłość zaprezentowanych wyników, możliwość ich praktycznego wykorzystania oraz ich publikację w prestiżowych czasopismach naukowych, z pełnym przekonaniem i nieukrywaną satysfakcją składam do Wysokiej Rady wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa mgr farm. Michała Abrama.

Kierownik
Zakładu Farmakologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Tomasz Plech
dr hab. n. farm. Tomasz Plech
profesor uczelni