WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Kubowicz-Kwaśny, p.t. „Modelowanie metodami in vitro metabolizmu wyselekcjonowanych związków o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym", wykonanej w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum Promotor dr hab. Elżbieta Pękala, prof. UJ

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej pani mgr Pauliny Kubowicz-Kwaśny przedmiotem badań była ocena przydatności wybranych modeli alternatywnych do badania biotransformacji ksenobiotyków.

Tematyka podjęta przez Doktorantkę jest niezwykle aktualna i dotyczy poszukiwania szybkich i tanich metod skriningowych do zastosowania we wczesnych etapach badań nad rozwojem nowego leku.

Analiza metabolizmu (biotransformacji) potencjalnej substancji leczniczej jest koniecznym etapem badań przedklinicznych. Daje ona pojęcie o stabilności metabolicznej związku, strukturach i profilu aktywności metabolitów. Badania biotransformacji ksenobiotyków prowadzone są głównie metodami *in vivo*. Metoda ta obarczona jest jednak poważnymi wadami: wymaga poświęcenia ogromnej liczby zwierząt laboratoryjnych, jest kosztowna, czasochłonna, a tylko w około 50% przypadków odzwierciedla metabolizm w organizmie człowieka. Od około 30 lat trwają więc poszukiwania metod alternatywnych - *in vitro* (z wykorzystaniem mikroorganizmów, linii i frakcji komórkowych) oraz *in silico* (analiz komputerowych) - oszczędzających zwierzęta, szybszych i tańszych. Metody te nie są również doskonałe, nie oddają bowiem złożoności reakcji enzymatycznych zachodzących w organizmie człowieka, niemniej pozwalają określić stabilność metaboliczną związku chemicznego, umożliwiają wskazanie miejsc ataków enzymatycznych czy wreszcie

pozwalają przewidywać struktury powstających metabolitów. Światowe standardy skłaniają się więc do stosowania metod alternatywnych na etapie badań przedklinicznych potencjalnych substancji leczniczych.

Cytowane we wstępie dysertacji dane, dotyczące wspomnianej powyżej tematyki, stanowiły dla Doktorantki przesłankę do podjęcia badań nad biotransformacją dziesięciu zróżnicowanych pod względem struktury i lipofilowości związków o potwierdzonej w modelach zwierzęcych aktywności w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Badania przeprowadzone zostały z zastosowaniem modeli *in silico* oraz *in vitro*. Ich celem było oszacowanie stabilności metabolicznej badanych związków, określenie ścieżki biotransformacyjnej oraz wytypowanie enzymów odpowiedzialnych za przebieg procesu biotransformacji. Doktorantka zaplanowała również porównanie wyników uzyskanych różnymi metodami.

Warto podkreślić, że osiągnięcie założonego celu utrudniała zróżnicowana budowa chemiczna badanych związków, niemniej zastosowana przez Autorkę strategia badań dała pozytywne efekty.

Recenzowana dysertacja ma postać 119 stronicowej rozprawy o klasycznym układzie, zawierającej streszczenie w języku polskim i angielskim, część teoretyczną (wstęp), założenia i cel pracy, opis badań własnych, dyskusję wyników i wnioski, opis stosowanej metodyki (materiały i metody) oraz podsumowanie. Zaprezentowany w dysertacji przegląd piśmiennictwa jest szeroki; obejmuje ponad 130 pozycji, w wysokim procencie opublikowanych w okresie ostatnich 10 lat. Stanowi on czytelną podstawę dla postawionej przez doktorantkę hipotezy badawczej.

We wstępie, stanowiącym część teoretyczną rozprawy Autorka omówiła proces metabolizmu ksenobiotyków w organizmie ludzkim, w tym reakcje biotransformacji pierwszej i drugiej fazy oraz ich możliwe efekty, takie, jak powstanie aktywnych metabolitów z nieaktywnego substratu, powstanie nieaktywnych metabolitów, metabolitów o właściwościach toksycznych oraz o innym działaniu farmakologicznym. Odrębny podrozdział poświęciła alternatywnym metodom badania metabolizmu, w tym metodom *in silico* i *in vitro* – co łącznie stanowiło przedmiot jej badań eksperymentalnych. Dużą uwagę Doktorantka poświęciła szczepom mikroorganizmów stosowanych w badaniach metabolizmu ksenobiotyków, liniom komórkowym oraz ich modyfikacjom. Opisała też metody *ex vivo*, będące niejako na pograniczu metod *in vivo* i *in vitro*. Reasumując, część teoretyczna pracy uzasadnia

celowość zastosowania metod *in vitro* i *in silico* w badaniach przedklinicznych potencjalnych leków.

Badania własne przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Pauliny Kubowicz-Kwaśny są rozległe i trudne do podsumowania w krótkiej formie recenzji.

Przedmiotem badań było dziesięć nowych związków, w tym jeden w postaci izomerów R, S, oraz mieszaniny racemicznej, wszystkie o potwierdzonym działaniu w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Podobnym badaniom Autorka poddała dwa leki referencyjne, aripiprazol i zolpidem. Nowe związki otrzymane były w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej oraz w zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM.

Wybrane do badań związki były zróżnicowane co do struktury oraz kierunku działania biologicznego. Jednym z nich była aminoalkanolowa pochodna 2-aminocykloheksan-1-olu (dwa enancjomery i mieszanina racemiczna) o stwierdzonym działaniu antyepileptycznym. Dwa kolejne, to aminoalkanolowe pochodne 2-aminobutan-1-olu o działaniu analgetycznym, cztery - to pochodne aripiprazolu, związki sulfonamidowe o potwierdzonej aktywności antypsychotycznej, trzy – to pochodne imidazo[1,2-a]pirydyny (zolpidemu) o profilu antypsychotycznym. Wszystkie analizowane związki cechowała znaczna lipofilowość (log P w zakresie 2,16 – 5,03).

Biorąc pod uwagę cel i stosowaną metodykę, badania własne Autorki można podzielić na dwa kolejne etapy. Pierwszy etap pracy polegał na wstępnym wytypowaniu metabolitów badanych związków metodami *in silico* przy użyciu programu MetaSite. Dla analizowanych struktur wytypowane zostały ugrupowania najbardziej wrażliwe na przemiany biotransformacyjne oraz zaproponowane zostały ścieżki metaboliczne z uwzględnieniem udziału w reakcjach odpowiednich izoenzymów cytochromu P450.

W drugim etapie pracy, w celu zweryfikowania symulowanych metodą *in silico* ścieżek metabolicznych, Doktorantka przeprowadziła badania biotransformacji tych samych związków metodami *in vitro*. Zastosowała dwa różne modele badawcze: model mikrobiologiczny *Cunninghamella* oraz model mikrosomów wątrobowych. Aminoalkanolowe pochodne 2-aminocykloheksan-1-olu, 2-aminobutan-1-olu oraz imidazo[1,2-a]pirydyny (zolpidemu) poddano badaniom mikrobiologicznym, prowadzonym z wykorzystaniem trzech gatunków grzyba strzępkowego *Cunninghamella* (*C. elegans* 1908, *C. echinulata* 1384 oraz *C. blakesleena* 1906),

charakteryzującego się posiadaniem systemu monooksygenaz cytochromu P450 oraz enzymów II fazy metabolizmu. Przebieg biotransformacji monitorowany był technikami TLC oraz LC-MS/MS.

Dla wszystkich badanych związków Doktorantka przeprowadziła analizę procesu biotransformacji wykorzystując drugi z modeli *in vitro* – frakcje mikrosomalne dwóch gatunków gryzoni oraz mikrosomy ludzkie.

Dodatkowe badania objęły wybrane związki: dla enancjomerów oraz mieszaniny racemicznej aminoalkanolowej pochodnej 2-aminocykloheksan-1-olu Autorka przeprowadziła analizę procesu biotransformacji wykorzystując frakcje wątrobowe S9, a dla związku oznaczonego symbolem 2, czyli 2-{[2-(2-chloro-6-metylofenoksy)etylo]amino}butan-1-olu zbadała interakcje z najważniejszymi izoenzymami cytochromu P450.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że efekty symulacji metodą *in silico* przemian metabolicznych są zgodne z wynikami badań *in vitro* dla większości badanych związków. Obydwie metody pozwoliły np. stwierdzić różnice w strukturze metabolitów dla izomerów R i S aminoalkanolowej pochodnej 2-aminocykloheksan-1-olu, wykazującej aktywność przeciwdrgawkową. Doktorantka wnioskuje, że prawdopodobnie jest to przyczyną korzystniejszych parametrów antyepileptycznych jednego z izomerów. Wyniki badań pozwoliły również Autorce wyselekcjonować związki podlegające intensywnym procesom biotransformacji (cztery struktury, w tym jedna w postaci obydwóch enancjomerów) oraz te o wysokiej stabilności metabolicznej (sześć struktur). Dla pięciu z badanych związków, w tym dwóch enancjomerów jednego z nich, uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce na opisanie ich ścieżek metabolicznych.

Korelując dane dotyczące stabilności badanych związków, uzyskane metodami *in silico* i *in vitro* z obliczonymi teoretycznie wartościami log P, Autorka stwierdziła istnienie zależności pomiędzy lipofilowością a stabilnością badanych struktur. Przeprowadzone dla jednego z badanych związków (wspomnianego powyżej związku 2 o działaniu znoszącym ból neuropatyczny) badania interakcji z najważniejszymi izoenzymami cytochromu P450 pozwoliły Doktorantce stwierdzić, że jest on inhibitorem izoenzymu CYP2D6 typu mieszanego.

Reasumując, warte podkreślenia są zalety, zarówno poznawcze jak i aplikacyjne recenzowanej pracy.

1. Doktorantka wykazała istotne zalety i ograniczenia wybranych modeli alternatywnych do badania biotransformacji ksenobiotyków:

   - W znaczącej części przypadków struktury głównych metabolitów uzyskane z symulacji komputerowej i badań *in vitro* były zbieżne. Można więc wyciągnąć wniosek, że metoda *in silico* jest przydatnym lecz nie idealnym narzędziem w przewidywaniu kierunków biotransformacji w danej grupie związków.

   - Obydwa stosowane modele badań *in vitro* wykazały znaczące ograniczenia dotyczące liczby generowanych metabolitów, dawały jednak możliwość oszacowania stabilności metabolicznej związku.

   - Z przeprowadzonych badań wynika, że obydwie metody mogą być z powodzeniem stosowane na wczesnym etapie rozwoju potencjalnego leku.

2. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania nowych, aktywnych biologicznie związków - potencjalnych leków dostarczyły syntetykom danych przydatnych dla przeprojektowania cząsteczek, w celu poprawy ich parametrów farmakokinetycznych.

Uwagi krytyczne i zagadnienia wymagające dodatkowego wyjaśnienia przez Doktorantkę w mojej opinii są nieliczne.

Praca zawiera pewne błędy edycyjne oraz nieścisłe sformułowania. W mojej ocenie np. stanowi je stwierdzenie, że badaniom poddano 12 nowych struktur, biorąc pod uwagę, że trzy z nich (związki 1a, 1b i 1c) są to enancjomery R i S tego samego związku oraz mieszanina racemiczna. Są to jednak drobne błędy formalne, w żaden sposób nie pomniejszające wartości przedstawionej do recenzji pracy.

Podsumowując pragnę stwierdzić, że mgr Paulina Kubowicz-Kwaśny przedłożyła wartościową pracę, wnoszącą poważny wkład do wiedzy na temat alternatywnych metod badania metabolizmu związków biologicznie aktywnych – potencjalnych leków. Doktorantka wykazała się umiejętnością tworzenia hipotezy badawczej, zaprojektowania i przeprowadzenia złożonych eksperymentów, analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków. W mojej ocenie recenzowana rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu

Jagiellońskiego Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie pani mgr Pauliny Kubowicz-Kwaśny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę szeroki zakres i wysoki poziom recenzowanej pracy, jej walory aplikacyjne oraz fakt, że Doktorantka jest współautorką oraz pierwszą autorką publikacji o sumarycznym IF = 4,87 składam również wniosek o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Warszawa 30 maja 2016

Jadwiga Turło

dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (2) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl