prof. dr hab. Jarosław Sławiński
Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Gdańsk, dnia 27 stycznia 2017 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Szafrańskiego pt. „***Synthesis of 1,2,3-triazole derivatives and their evaluation as potential CB1 receptor ligand***" wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Cegły.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Przemysława Szafrańskiego dotyczy istotnego i aktualnego na gruncie chemii medycznej problemu projektowania i syntezy nowych związków, które w przyszłości mogłyby znaleźć zastosowanie jako potencjalne substancje lecznicze. Bezpośrednim celem badań było poszukiwanie nowych aktywnych ligandów receptora kannabinoidowego CB1 reprezentujących szereg ligandów nie-klasycznych tego receptora.

Rola układu kannabinoidowego w fizjologii i patofizjologii ośrodkowego układu nerwowego jest na dzień dzisiejszy dobrze poznana. Kannabinoidy wywierają działanie biologiczne przez dwa typy receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2. Receptory CB1 występują głównie w ośrodkowym układzie nerwowym (o.u.n.), a receptury CB2 znajdują się w komórkach układu immunologicznego. Oba typy należą do grupy receptorów metabotropowych sprzężonych z białkiem G. Receptory CB1 występują głównie w o.u.n., ale też w narządach takich jak: macica, jądra, nasieniowód, pęcherz moczowy, serce, płuca, grasica, śledziona, a także w tkance tłuszczowej, układzie pokarmowym, komórkach układu immunologicznego i w łożysku. Ekspresję tych receptorów wykazano również w oku, astrocytach, komórkach glejowych i w przednim płacie przysadki mózgowej.

Kannabinoidy ze względu na działanie euforyczne i halucynogenne dość często, i w sposób jednoznaczny kojarzone są z problemami narkomanii, wiadomo jednak, że np. tetrahydrokannabinol (THC) i jego analog - nabilon od 1985 roku są dopuszczone przez FDA do lecznictwa, jako leki zwalczające wymioty i nudności towarzyszące chemioterapii nowotworów. W późniejszych latach zatwierdzono też w kilku krajach europejskich wskazanie – na anoreksję u chorych na AIDS oraz jako leki przeciwbólowe i poprawiające

samopoczucie u pacjentów chorych na AIDS i nowotwory. Warto podkreślić fakt, że perspektywy wykorzystania kannabinoidów w lecznictwie są znacznie szersze. Pojawiają się doniesienia o możliwości uzyskania leków o unikatowym profilu terapeutycznym np. działających przeciwbólowo, przeciwzapalnie i jednocześnie przeciwwrzodowo, a wynika to z istotnej roli endogennego układu kannabinoidowego w fizjologii i patofizjologii człowieka.

W tę interesującą tematykę wpisuje się niniejsza praca doktorska, podejmująca próbę znalezienia potencjalnych ligandów receptora CB1 i oceny ich aktywności biologicznej.

Kanwą tych badań stały się wcześniejsze prace Katedry Chemii Organicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum w zakresie m.in. projektowania i syntezy związków o potencjalnej aktywności biologicznej, nakierowane na układ nerwowy oraz badań nad nowymi ligandami receptorów kannabinoidowych. Stanowią one ich kontynuację pod kierunkiem Promotora - prof. Marka Cegły w zakresie poszukiwań nowych obiecujących układów heterocyklicznych o znacznym prawdopodobieństwie znalezienia związków obdarzonych aktywnością biologiczną.

Układ rozprawy mgr. Przemysława Szafrańskiego jest typowy dla prac doktorskich z tej dziedziny. Składa się na nią *Wstęp, Część literaturowa, Cel pracy, Dyskusja otrzymanych wyników, Podsumowanie i Wnioski, Część eksperymentalna, Streszczenie.* Pracę zamyka wykaz cytowanego piśmiennictwa liczący 175 pozycji uwzględniający oryginalne publikacje naukowe, podręczniki i opracowania przeglądowe, większość, bo 132 pozycje pochodzą z okresu po roku 2000, co świadczy o ich aktualności. Pod względem redakcyjnym i graficznym praca przygotowana została wyjątkowo starannie, liczy łącznie 126 stron numerowanych, zaopatrzona została w szczegółowy wykaz: akronimów i skrótów, figur (21), schematów (33) oraz tabel (8) wraz ze wskazanym numerem strony, co niewątpliwie ułatwia sprawne poruszanie się po obszernej dysertacji. Wart podkreślenia jest fakt, że praca została napisana w języku angielskim, co dobitnie wskazuje na swobodę poruszania się doktoranta w tym języku i znajomości fachowej terminologii z zakresu chemii organicznej, chemii medycznej oraz metod analitycznych i bioanalitycznych.

Omówienie badań własnych Autor poprzedza ogólnym wprowadzeniem w realizowaną tematykę opisując rolę i znaczenie systemu endokannabinoidowego (ECS), systematyzuje i omawia szczegółowo ligandy receptorów kannabinoidowych i przedstawia ogólne wprowadzenie do koncepcji „*click chemistry*" koncentrując się również nad opisem katalizowanej miedzią(I) reakcji cykloaddycji azydków i terminalnych alkinów. Ta część

dysertacji stanowi wartościowe opracowanie przydatne w lekturze dalszych części rozprawy, stanowiąc zarazem przyczynek do podjęcia przedstawionych badań.

Podstawowe przesłanki i hipotezy badawcze uzasadniające podjęcie tematu badań doktorant przedstawił w sposób przejrzysty i logiczny, a założony cel pracy, którym była synteza biblioteki potencjalnych ligandów receptora kannabinoidowego wśród bicyklicznych pochodnych 1,2,3-triazolu, reprezentujących szereg nie-klasycznych ligandów tego receptora Autor postanowił zrealizować w reakcjach cykloaddycji azydków i alkinów katalizowanej miedzią(I) z wykorzystaniem interesującej koncepcji „*chemii-klik*" przedstawionej przez K.B. Sharplessa w 2001 r.

W rozdziale zatytułowanym *Dyskusja otrzymanych wyników* Autor wykazał, że zamierzone układy 1,4-dipodstawionych 1,2,3-triazoli (JCC2-11 – JCC2-41) zawierające w pozycji 1 cykloalifatyczne pierścienie 5-7 członowe, a w pozycji 4 nierozgałęzione alifatyczne łańcuchy C-6 do C-8 mogą być uzyskane z umiarkowanymi lub dobrymi wydajnościami w reakcjach cykloaddycji odpowiednich azydocykloalkanów i dostępnych handlowo terminalnych alkinów w typowych warunkach katalizy jonami miedzi(I) wg. standardowej procedury CuAAC (*ang. copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition of azides and alkynes*) z wykorzystaniem askorbinianu sodu w środowisku DMSO-woda 4:1 lub alternatywnie DMF-woda 4:1 – ułatwiającym zarówno proces ekstrakcji jak i usunięcia polarnego rozpuszczalnika organicznego.

Dalsza optymalizacja warunków polegająca na zastosowaniu innego środowiska reakcji tj. mieszaniny woda-etanol 2:1 pozwoliła przede wszystkim na zredukowanie stosunku molowego katalizatora miedziowego bez niekorzystnego wpływu na wydajność reakcji. Natomiast istotnym osiągnięciem Autora było poznanie nowego rozpuszczalnego w wodzie liganda chelatowego o budowie 2-[4-(dimetyloaminometylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo]cykloheksan-1-olu i symbolu AMTC, którego zastosowanie pozwoliło na zwiększenie wydajności katalizowanej miedzią(I) cykloaddycji azydków i alkinów przy jednoczesnej znacznej redukcji stosunku molowego miedzi(I) i poprawie warunków izolacji czystego produktu. W konsekwencji Autor zaproponował wydajne procedury syntetyczne z wykorzystaniem AMTC, które zweryfikował w kolejnych reakcjach cykloaddycji prowadzących do kilku serii 1,2,3-triazoli posiadających w pozycji 4 łańcuchy alkilowe (JCC1-44 – 70), łańcuchy alkilotiometylowe (JCC2-95 oraz JCC2-102 i 105), bądź tetraalkiloamoniowe (JCC3-2 – 5).

Obecność protonu przy atomie węgla sp^2 w pozycji 5 1,2,3-triazolu stwarzała możliwość dalszej funkcjonalizacji pierścienia w reakcjach elektrofilowego podstawienia, którą Autor umiejętnie wykorzystał początkowo uzyskując pochodną litoorganiczną, którą następnie potraktował elektrofilami takimi jak: oksiran, paraformaldehyd, *N,N*-dimetyloformamid czy *N,N*-dimetylobenzamid i uzyskał zamierzone związki z dobrą lub umiarkowaną wydajnością (JCC2-62, -65, -89, -91, -93 i -94).

Pewien niedosyt jednak pozostawia zamieszczona w *Dyskusji otrzymanych wyników* na str. 61 relacja z prób wprowadzenia ugrupowania etanoloaminowego w pozycję 5-triazolu, która sygnalizuje co prawda pojawiające się trudności z uzyskaniem czystego produktu, lecz docelowy związek w efekcie nie został opisany i scharakteryzowany.

W prowadzonych badaniach Autor posługuje się sprawnie współczesnymi metodami analitycznymi wykorzystując standardowo magnetyczny rezonans jądrowy (^{1}H i ^{13}C NMR), chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas LC-MS, wysokosprawną chromatografię cieczową w fazach odwróconych RP-HPLC, spektroskopię w podczerwieni, UV-Vis i analizę elementarną C,H,N,S. Z dużą wnikliwością podchodzi do zagadnień związanych ze stereochemią uzyskanych połączeń. Przykładowo, rozwiązując kwestię względnej konfiguracji diastereoizomerów 1,3-dipodstawionego pierścienia cykloheksanu posługuje się danymi eksperymentalnymi diagnostycznych protonów z widm ^{1}H NMR zestawia je z obliczonymi wartościami przesunięć chemicznych metodą DFT-GIAO, ostatecznie weryfikując konfigurację *cis-*, *trans-* widmami 2D NOESY. Stosuje też tradycyjne metody chromatograficzne, chromatografię cienkowarstwową w monitorowaniu przebiegu reakcji i ocenie jednorodności produktów oraz chromatografię kolumnową w trakcie izolacji i oczyszczaniu związków finalnych.

W podsumowaniu należy podkreślić, że wymiernych efektów pracy jest wiele, wśród nich jest uzyskanie biblioteki 30 oryginalnych nowych 1,4-bicyklicznych pochodnych 1,2,3-triazolu w tym 4 rozdzielonych par diastereoizomerów. W obszarze metod syntezy niewątpliwe osiągnięcie to odkrycie rozpuszczalnego w wodzie liganda chelatowego (AMTC) zwiększającego wydajność katalizowanej miedzią(I) cykloaddycji azydków i alkinów. Cenne z punktu widzenia nauk farmaceutycznych informacje uzyskał badając właściwości fizykochemiczne, w tym lipofilowość, stabilność chemiczną w różnych warunkach i stabilność metaboliczną w modelu *in vitro* dla reprezentatywnego związku JCC1-45.

Dwadzieścia cztery nowo otrzymane pochodne 1,2,3-triazolu Autor poddał ocenie powinowactwa do receptora CB1. Uzyskane wyniki wskazały związek JCC2-65 jako antagonistę receptora CB1 o *Ki* = 1,5 μM i względnie wysokiej lipofilowości logD – wyznaczonej teoretycznie. W tym przypadku wskazane byłoby porównanie z wartościami eksperymentalnymi, tym bardziej, że autor przeprowadził takie badania dla kilku innych związków. Badania powinowactwa pozwoliły też na znalezienie pewnych istotnych zależności struktura-aktywność w obrębie testowanej biblioteki połączeń heterocyklicznych.

Może warto w tym miejscu przypomnieć, że z antagonistami receptora CB1 związane są nadzieje ich terapeutycznych zastosowań, np. do leczenia zaburzeń łaknienia, deficytów pamięci, a także jako czynników zapobiegających wytwarzaniu zależności od opiatów oraz innych substancji psychoaktywnych.

Obowiązkiem recenzenta jest wskazanie niektórych zauważonych uchybień formalnych, typograficznych lub redakcyjnych popełnionych w trakcie przygotowywania manuskryptu rozprawy. Uwagi te dotyczą następujących zagadnień:

1. str. 53 – zamiast grupa sulfonowa, powinno być grupa sulfidowa
2. str. 59 – umieszczenie na Schemacie 7-7 podstawnika R2 = 3-pirydoiliowego może wprowadzać w błąd, bowiem takiej pochodnej Autorowi nie udało się uzyskać.
3. str. 69 – Tabela 7-5, kolumna 2, wiersz 9. – powinno być *cis*-JCC2-40
4. str. 85 – „redukcja grupy aldehydowej", ... właściwiej byłoby - redukcja grupy formylowej....
5. str. 111. – ogólnie, uwaga dotyczy polskiej pisowni grupy związków organicznych o nazwie *kannabinoidy*
6. Lektura dysertacji i analiza zamieszczonych wyników byłaby znacznie łatwiejsza gdyby Autor zastosował konsekwentną – chronologiczną numerację kolejno opisywanych związków, co jest ogólnie przyjętym sposobem prezentacji wyników w pracach naukowych z tej dziedziny.
7. Nieliczne błędy typograficzne znaleziono na stronach: str. 69 linia 2 od dołu, str. 111 linia 3 oraz linie pozostałe ze słowem „kanabinoidy".

Pragnę podkreślić jednak, że przedstawione w mojej ocenie uwagi mają głównie charakter techniczny, redakcyjny oraz porządkujący, natomiast w żadnym stopniu nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą jak już wcześniej wspomniałem oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu swojej recenzji z przekonaniem stwierdzam, że mgr Przemysław Szafrański w pełni zrealizował postawione przed sobą niełatwe zadanie badawcze w dziedzinie syntezy związków heterocyklicznych o potencjalnej aktywności biologicznej. Wymagało to dużego nakładu pracy i dobrej współpracy w wielu obszarach kompetencji naukowych. Doktorant wykazał się doskonałym opanowaniem nowoczesnych metod syntezy i analizy oraz znajomością technik separacyjnych, jak też umiejętnością korzystania z piśmiennictwa z przedmiotowego zakresu.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest osiągnięciem oryginalnym i bardzo wartościowym oraz spełnia wymagania określone w obowiązującej ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z dnia 14.03.2003 r. z uwzględnieniem zmian wprowadzonych – Dz. U. z 2016 r. poz. 882 z dnia 3.06.2016 r.).

Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr. Przemysława Szafrańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie korzystając z przysługujących recenzentowi uprawnień wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej na podstawie obowiązującego *Regulaminu wyróżniania rozpraw doktorskich* z dnia 28 września 2015 r. W uzasadnieniu pragnę zwrócić uwagę nie tylko na wysoką wartość naukową ocenianej dysertacji lecz również na dorobek publikacyjny mgr. Przemysława Szafrańskiego. Jest on bowiem pierwszym autorem trzech prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR, których tematyka jest bezpośrednio związana z przedstawionymi badaniami.

Gdańsk, dnia 27 stycznia 2017 r.

prof. dr hab. Jarosław Sławiński

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej
prof. dr hab. n. farm. Jarosław Sławiński

Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Gdański Uniwersytet Medyczny