UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD BOTANIKI FARMACEUTYCZNEJ I BIOTECHNOLOGII ROŚLIN

ul. św. Marii Magdaleny 14
61-861 Poznań

tel. 061 668 78 47 (48)
fax 061 668 78 61
e-mail: jbudzian@ump.edu.pl

Ocena pracy doktorskiej pt.:

"Modelowanie metodami *in vitro* metabolizmu wyselekcjonowanych związków o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym"

wykonanej przez mgr Paulinę Kubowicz-Kwaśny

z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej

Wydziału Farmaceutycznego, Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego

Oceniana rozprawa doktorska składa się z następujących rozdziałów: Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Lista skrótów, Wstęp, Założenia i cel pracy, Badania własne, Dyskusja i wnioski, Materiały i metody, Podsumowanie, Literatura, Spis tabel i Spis rysunków.

Celem pracy było badania *in silico* i *in vitro* nad metabolizmem, a ściślej rzecz biorąc biotransformacją, zważywszy, że chodzi o ksenobiotyki, 12 syntetycznych związków - kandydatów na leki w grupie pochodnych aminoalkanoli o aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej (związki **1(a-c) - 3**), pochodnych aripiprazolu o działaniu przeciwpsychotycznym (związki **4-7**) oraz pochodnych zolpidemu o aktywności nasennej i przeciwpsychotycznej (związki **8-10**).

We Wstępie, stanowiącym część teoretyczną pracy, doktorantka przedstawiła zagadnienie metabolizmu leków, na który składają się reakcje dotyczące wszelkich ksenobiotyków, reakcje fazy I - głównie utlenianie z udziałem licznych monooksydaz – enzymów cytochromu P450 (CYP450) lub monooksydaz flawinowych, a także redukcja i hydroliza oraz reakcje fazy II – głównie sprzęganie z kwasem glukuronowym, kwasem siarkowym lub glicyną. Następnie przedstawiła wpływ enzymów wspomnianego metabolizmu (biotransformacji) na leki, którego wynikiem może być powstawanie aktywnych metabolitów z nieaktywnego substratu, zwanego wówczas prolekiem, deaktywacja, metabolity toksyczne oraz metabolity o innym działaniu farmakologicznym.

W dalszej część Wstępu omówione zostały nowe metody badań *in silico* i *in vitro* metabolizmu leków alternatywne w stosunku do tradycyjnych metod *in vivo* na zwierzętach laboratoryjnych. Badania *in silico* polegają na komputerowej symulacji pozwalającej przewidywać z dużym prawdopodobieństwem miejsce reakcji biotransformacji w zależności od enzymu (głównie izoenzymu CYP450) lub wskazanie właściwego izoenzymu odpowiedzialnego za biotransformację. Badania *in vitro* polegają na zastosowaniu mikroorganizmów posiadających zdolność biotransformacji analogiczną jak u ssaków, w szczególności grzybów z rodzaju *Cunninghamella*, subkomórkowych frakcji wątrobowych (zwierzęcych lub ludzkich), linii hepatocytów ludzkich lub raka wątroby ludzkiej, a także komórek bakterii, drożdży, owadów, ssaków transformowanych genami ludzkich enzymów cytochromu P450. We wstępie omówiono też ksenobiotyki będące induktorami lub inhibitorami izoenzymów cytochromu P450 uczestniczących w biotransformacji leków, które mogą powodować brak aktywności tych leków lub ich nadmierną aktywność czyli przekroczenie dawki. Dalsze akapity wstępu dotyczą zastosowania linii komórkowej Caco-2 w badaniach substratów i inhibitorów białek transportujących leki, badań *in situ* polegających na analizie losów leku w wątrobie pozostawionej w organizmie lub wątrobie izolowanej oraz badań *ex vivo* polegających na podawaniu leku zwierzęciu, a następnie izolacji i analizie jego wątroby.

W części doświadczalnej doktorantka użyła do badań 12 nowych związków otrzymanych w wyniku syntezy w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM:

1a - 1*R*,2*R* 2-(*trans*-{[2-(4-chlor-3-metylfenoksy) etylo]amino}cykloheksan-l-ol,

1b -1*S*,2*S* 2-(*trans*-{[2-(4-chlor-3-metylfenoksy) etylo]amino}cykloheksan-l-ol,
1c – 1*RS*, 2*RS* 2-(*trans* -{[2-(4-chlor-3-metylfenoksy) etylo]amino}cykloheksan-l-ol,
w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Katedry Chemii Organicznej UJ CM:
2 - 2-{[2-(2-chloro-6-metylfenoksy) etylo]amino}butan-l-ol,
3 - 2-{[2-(2,6-dimetylfenoksy) etylo]amino}propan-l-ol,
i w Zakładzie Chemii Leków, Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ:
4 - N-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-l-ylo)butylo)chinolino-7-sulfonamid,
5 - N-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-l-ylo)propylo)chinolino-7-sulfonamid,
6 - N-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-l-ylo)butylo)izochinolino-7-sulfonamid,
7 - 4-fluoro-N-(l-{2-[metylsulfanyl)fenoksy]etyl}pirolidyn-3-ylo) benzenosulfonamid,
8 - 2-[6-fluoro-2-(4-metylofenylo)imidazo[l,2-o]pirydyn-3-ylo]-*N,N*-dimetyloacetamid,
9 - 2-[6-fluoro-2-(4-fluorofenylo)imidazo[l,2-o]pirydyn-3-ylo]- *N,N*-dimetyloacetamid,
10 - 2-[6-metylo-2-(4-fluorofenylo)imidazo[l,2-o]pirydyn-3-ylo]- *N,N*-dimetyloacetamid,
oraz dwa związki referencyjne:
Aripiprazol -7-[4-[4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-l-ylo]butoksy]-3,4-dihydro-1*H*-chinolin-2-on i
Zolpidem - 2-[6-metylo-2-(4-metylofenylo)imidazo[l,2-a]pirydyn-3-ylo]-*N,N*-dimetyloacetamid.

W pierwszym etapie przeprowadzono badania *in silico* i w drugim etapie badania *in vitro*.

Badania *in silico* prowadzono za pomocą programu komputerowego MetaSite, w którym symulowano reakcje biotransformacji pod wpływem najważniejszych enzymów cytochromu P450, jak CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oraz CYP3AP, jak również miejsca w cząsteczce najbardziej podatne na atak enzymów biotransformujących. Symulacja wskazywała, że liczba metabolitów o określonej strukturze chemicznej powstających w wyniku utlenienia lub dealkilacji może wynosić 2 (związki **8** i **10**), 4 (związki **1**(a-c) i **7**), 5 (związek **9**, zolpidem), 6 (związki **2** i **3**), 11 (związki **4-6**) i 12 (aripiprazol), a liczba atomów węgla z określonych pozycji, mogących wchodzić w reakcję wahała się od 2 do 4.

W drugim etapie badań doświadczalnych przeprowadzono badania *in vitro* w dwóch modelach – modelu mikrobiologicznym oraz modelu frakcji wątrobowych.

W pierwszym modelu stosowano hodowle płynne dostępnych komercyjnie drożdży z rodzaju *Cunninghamella* – *C.echinulata, C.blakeesleana, C.elegans.*

W drugim modelu zastosowano dostępne komercyjnie mikrosomy mysie (MLM), szczurze (RLM) i ludzkie (HLM) stanowiące bogate źródło izoenzymów cytochromu P450, a w ograniczonym zakresie zastosowano też frakcję S9 wątroby ludzkiej zawierającą dodatkowo enzymy cytozolowe.

Po zakończeniu inkubacji, ekstrakt octanowo-etylowy z płynu pohodowlanego po oddzieleniu grzybni lub z mieszaniny z frakcją wątrobową analizowano wstępnie metodą TLC (tylko model mikrobiologiczny) na żelu krzemionkowym w fazie ruchomej toluen-metanol 1:1 oraz metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją elektrorozpylaniem (ESI) - LC-MS/MS, a ściślej UPLC-MS/MS na kolumnie z RP-18, wielkość ziarna 1,7 μm, stosując elucję gradientową mieszaniną woda-acetonitryl z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego, detekcję PDA w zakresie 200-700 nm, rejestrację widm MS w trybie jonów dodatnich, stosując energię jonizacji 30 eV. Substraty i ich metabolity identyfikowano na podstawie mas jonów macierzystych i fragmentacyjnych.

W badaniach z grzybami *Cunninghamella* stwierdzono, że związki **1**(a-c) ulegały transformacji do 1 metabolitu wskutek hydroksylacji grupy C-metylowej, związek **2** ulegał C-dealkilacji, związki **8-10** były stabilne; związków **4-7** nie badano.

W doświadczeniach z frakcjami mikrosomalnymi stwierdzono, że wynikiem biotransformacji były w przypadku: (i) związków **1(a-c)**, izomeru *S* **(1c)**, produkt hydroksylacji grupy C-metylowej, izomeru *R* **(1a)** dodatkowy metabolit, w wyniku dalszej oksydacji do grupy COOH; (ii) związków **2** i **3**: produkty C-dealkilacji, C-demetylacji, utlenienia arylowej grupy C-metylowej do grupy COOH, lub jej hydroksylacji; (iii) zolpidemu i jego analogu związku **9**: hydroksylacja arylowej grupy C-metylowej, co wymagało acetylacji metabolitu przed analizą LC-MS; (iv) aripiprazolu: 3 metabolity opisane w literaturze, a w przypadku jego pochodnych **4-7** - związku **4** – 3 metabolity, związku **5** – 1

metabolit, związku **6** – brak metabolitów; (v) związku **7** – 2 metabolity z mikrosomami gryzoni i 1 metabolit z mikrosomami ludzkimi; (vi) związków **8** i **10** : brak metabolitów.

Ponieważ wyniki biotransformacji związków **4-6** rejestrowano w trzech różnych odstępach czasu (10, 20, 30 minut), dlatego wyznaczono ich okresy półtrwania ($t_{1/2}$) oraz klirens wewnętrzny (Cl_{int}).

Dodatkowa analiza biotransformacji z frakcją S9 przeprowadzona dla związków **1(a-c)** wykazała, że powstawał tylko produkt hydroksylacji arylowej grupy C-metylowej – w przypadku izomerów *R* (**1a**) i *S* (**1c**) z wydajnością, odpowiednio - 50% i 10%.

Kolejnym eksperymentem była analiza wpływu związku **2** na aktywność izoenzymów cytochromu P450. Spośród 8 najważniejszych izoenzymów, związek **2** wchodził w interakcję tylko z CYP2D6 jako jego inhibitor, i hamował reakcję hydroksylacji bufuralolu przez ten enzym, co określono ilościowo specjalnie opracowaną metodą HPLC, oznaczając poziom produktu - hydroksybufuralolu.

W części dysertacji Dyskusja i wnioski doktorantka zestawiła wyniki badań *in silico* i *in vitro* biorąc pod uwagę również komputerowo obliczone parametry lipofilności – log P (program ACD/ChemSketch). Z zestawienia wynikło, że związki o log P > 4 ulegają głównie biotransformacji w drodze N-, O- lub, rzadziej, C-dealkilacji. Pozostałe związki, o niższym log P < 4 ulegały głównie reakcjom utleniania. Ogólnie biorąc, liczba metabolitów stwierdzonych w badaniach *in vitro* była mniejsza niż przewidywana w symulacjach *in silico*. Analizując sprawę od strony głównego metabolitu doktorantka stwierdziła w większości badanych związków wysoką zbieżność między wynikami symulacji *in silico*, a wynikami *in vitro* w modelu z frakcjami wątrobowymi; największe rozbieżności wystąpiły w przypadku związków **2** i **3**. Najbardziej stabilne (odporne na biotransformację), we wszystkich modelach badawczych, były związki **6**, **8** i **10**, co w przypadku dwóch ostatnich wymienionych przypisano obecności atomów fluoru w miejsce grup metylowych w bocznym podstawniku fenylowym.

Podjęty przez doktorantkę temat badawczy jest uzasadniony i reprezentatywny dla nauk farmaceutycznych i macierzystej jednostki naukowej doktorantki. Dotyczy ważnego problemu badań przedklinicznych związków o potencjalnym zastosowaniu leczniczym.

Oryginalnym osiągnięciem naukowym pracy doktorskiej pani mgr Pauliny Kubowicz-Kwaśny jest zbadanie po raz pierwszy 12 nowych związków o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym, kandydatów na leki, pod względem możliwych dróg ich biotransformacji w organizmie ludzkim, przewidywanych w badaniach *in silico* i badaniach doświadczalnych *in vitro* w dwóch modelach, a ponadto wyznaczenie czasu półtrwania i klirensu wewnętrznego trzech związków oraz zbadanie interakcji jednego z tych związków z określonym lekiem.

Wyniki badań własnych są klarownie przedstawione i przekonywująco uzasadnione i udokumentowane materiałem doświadczalnym w postaci licznych chromatogramów, widm masowych, schematów reakcji ze wzorami strukturalnymi (razem 42 rysunki) i 8 zestawień tabelarycznych. Uzyskane wyniki własne są poddane wnikliwej dyskusji z uwzględnieniem literatury naukowej, której lista cytowanych prac wynosi 131 pozycji z podaniem pełnej informacji bibliograficznej. Rozprawa doktorska ma poprawny układ i strukturę, napisana jest poprawnym, zwięzłym, językiem i jej redakcja jest niezwykle staranna.

Uwagi są następujące. Należało zamieścić opis sposobu interpretacji widm masowych. Zwiększenie mas wskutek wprowadzenia atomów tlenu jest oczywiste, ale pozycja w cząsteczce już nie. Z opisów badań można wydedukować, że omyłkowo związkowi **9** przypisano strukturę związku **8** i odwrotnie na stronach 45 i 95. Według nazwy chemicznej, systematycznej (str. 95) i wzoru strukturalnego (str. 45) związek **9** ma dwa atomy fluoru, natomiast na rycinie 14 (str. 60) i rycinie 26 (str. 70) ma jeden fluor, a w tabeli 8 (str. 93) jego metabolit M1 nie ma żadnego fluoru i jest taki sam jak metabolit zolpidemu (str. 92). Na stronie 49, we wzorze strukturalnym wspólnym dla związków **8-10** brakuje atomu N (grupa *N,N*-dimetyloacetamidowa). W tabeli 8 pominięto informację, że związki **8-10** były testowane z użyciem mikroorganizmu *Cunninghamella*. Uwagi te dotyczą formalnej, redakcyjnej strony pracy i w żadnym stopniu nie podważają zasadności wyników i ich interpretacji, ani nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej dysertacji. W dysertacji umieszczono aż 184

wzorów strukturalnych badanych związków, ich metabolitów, jonów fragmentacyjnych MS, stąd pomyłki nie są zaskoczeniem.

Należy zwrócić uwagę, że część wyników ocenianej pracy doktorskiej jest przedmiotem dwóch publikacji w czasopismach o obiegu światowym: w *Chirality* (2015 r., Impact Factor = 2,025), dotyczącej związków **1(a-c)**, gdzie doktorantka jest pierwszym wśród trzech współautorów oraz w *Current Drug Metabolism* (2016r., Impact Factor = 2,847), dotyczącym zagadnienia użyteczności grzybów z rodzaju *Cunninghamella* w badaniach biotransformacji leków, gdzie doktorantka jest czwartym wśród pięciu autorów.

Zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum z wnioskiem o dopuszczenie pani mgr Pauliny Kubowicz-Kwaśny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Pauliny Kubowicz-Kwaśny z powodu wysokiej rangi podjętego problemu badawczego, wysokiego poziomu jego rozwiązania wynikającego z zastosowania nowoczesnych metod doświadczalnych, perspektywy zastosowania praktycznego oraz opublikowania części wyników w dwóch czasopismach z listy filadelfijskiej.

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej
i Biotechnologii Roślin
J. Budzianowski
prof. dr hab. Jaromir Budzianowski

Poznań, 07 lipca, 2016 r.

prof. dr hab. n.farm. Jaromir Budzianowski