Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych z Pracownia Modelowania Komputerowego

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin,
Tel./fax. 0-81-4487270/4487272

Chair and Department of Synthesis and Chemical Technology of Pharmaceutical Substances with Computer Modeling Lab

Faculty of Pharmacy with Division of Medical Analytics
Medical University of Lublin
4A Chodzki str., 20-093 Lublin, Poland
*Phone/fax *048-81-4487270/4487272*

Lublin, 15-02-2017

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Przemysława SZAFRAŃSKIEGO

z Zakładu Chemii Organicznej, Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutyczny Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

pt. „Synthesis of 1,2,3-triazole derivatives and their evaluation as potential CB1 receptor ligands."

Projektowanie nowych leków to fascynująca dyscyplina badawcza aczkolwiek wymaga od badacza szerokiej wiedzy i specyficznych predyspozycji. Nasza wiedza o możliwych przyczynach chorób poszerza się każdego dnia. Pozwala to na coraz lepsze poznawanie etiologii chorób a poprzez to coraz skuteczniejsze ich leczenie. Chociaż jednocześnie musimy sobie zdawać sprawę, że niestety nie zawsze wiedza idzie w parze ze skutecznością. Dopiero teraz poznajemy prawdziwą złożoność systemów regulacji i wzajemnej koegzystencji różnych układów białkowych, których aktywność zależy od wielu czynników a najtrudniejszym do osiągnięcia efektem jest selektywność włączania poszczególnych szlaków sygnałowych.

Praca doktorska mgr Szafrańskiego dotyczy badań w obszarze receptorów kanabinoidowych, z których przynajmniej jeden kanał jonowy TRPV1 (potencjalny receptor CB3) może sterować innymi receptorami na przykład poprzez niesymetryczną symulację wydzielania kwasu glutaminowego. Receptor CB1, który jest zasadniczym

tematem rozprawy doktorskiej pełni także bardzo ważną rolę szczególnie w przenoszeniu termicznego i bólowego stimuli, na przykład przez heterodimeryzację a poszukiwanie nowych ligandów tego receptora jest w związku z tym bardzo istotne.

Praca P. mgr Szafrańskiego przedstawiona do recenzji została skonstruowana według typowego dla projektów chemii medycznej schematu, łącząc elementy syntetyczne, informatyczne i biologiczne. Jest także nowym elementem, szerszego programu badawczego prowadzonego od lat w Katedrze Chemii Organicznej w zespole prof. Marka Cegły.

Projekt przedstawiony w pracy doktorskiej jest nowatorski zarówno ze strony celu molekularnego (receptor kanabinoidowy CB1) jak i chemizmu wykorzystanego w części syntetycznej. Chemizm wykorzystany przez doktoranta w pracy obejmował katalizowaną przez miedź cykloaddycję azydków i alkinów. Taka cykloaddycja określana jest także jako „chemia zatrzaskowa" (ang. click-chemistry). Trudno jest przetłumaczyć zgrabnie określenie „click-chemistry" na język polski i chyba rozumiem dlaczego autor podjął się trudu opracowania rozprawy w języku angielskim. Nie musiał już tego zwrotu tłumaczyć.

Reakcję tą zaliczyć można do znacznie szerszej grupy reakcji „tzw. orbitali frontalnych", a obecnie jest bardzo szeroko stosowana nie tylko w syntezie 1,2,3-triazoli ale także w procesach funkcjonalizacji układów makro, także żywych od poziomu białek po komórki, czy tkanki.

W przeglądzie literatury źródłowej doktorant przedstawił wiele struktur ligandów receptora CB1 opartych na układach heterocyklicznych pirazolu oraz triazolu (1,2,4- i 1,2,3-). Potwierdza to przydatność układu 1,2,3-triazolu jako podstawy strukturalnej dla ligandów receptora CB1. Doktorant zaplanował modyfikacje w dwóch (1 i 4) lub trzech (1, 4 i 5) pozycjach stosując odpowiednie farmakoforowe podstawniki – polarne i niepolarne. W sumie doktorant opisał syntezę 34 produktów końcowych oraz 5 produktów pośrednich. Wszystkie związki zostały kompleksowo scharakteryzowane spektralnie – H i C NMR, IR, analiza elementarna. Metodyka syntezy, rozdziału i oczyszczania jest skrupulatnie opisana i zapewnia wystarczającą ilość informacji dla łatwego jej powtórzenia. W opisie związków zaprezentowano jedynie dane spektralne bez żadnych informacji fizykochemicznych, ale w ostatnim czasie coraz więcej czasopism nie wymaga już tak szczegółowych informacji. Osobiście w opisie związków widziałbym jeszcze krótki opis spektrum MS – jon molekularny, najtrwalszy jon. W takiej formie opis spektralny byłby wówczas stuprocentowy. Numeracja otrzymanych

pochodnych jest także niejasna. Trudno połączyć długość łącznika alifatycznego z obecnością innych podstawników, tym bardziej, że numeracja nie jest kolejna, chociaż rosnąca.

Następnym etapem było wyznaczenie powinowactwa 25 z otrzymanych pochodnych, w tym także rozdzielonych izomerów geometrycznych, do receptora CB1. Zastosowano metodę wypierania radioligandu. Wyniki nie były jednoznaczne, chociaż uzyskano dane wskazują na powinowactwo. Problemem był stopień wypierania radioligandu, który tylko dla jednej pochodnej przekroczył 70%. Kształt krzywych wypierania może sugerować częściowy agonizm, ale niestety w tekście nie rozważono takiej możliwości i nie prowadzono żadnych badań w tym kierunku.

Bardzo pomocne w tym względzie byłoby modelowanie oddziaływań ligandów z białkiem receptorowym, ale one także nie zostały przeprowadzone.

Natomiast wykorzystano modelowanie molekularne na kilku innych etapach pracy. Przy pomocy oprogramowania MarvinSketch doktorant zoptymalizował strukturę 3D otrzymanych ligandów oraz dwóch znanych ligandów receptora CB1 – CP55,940 (agonista) oraz Rimonabant (antagonista). Zostały one wykorzystane do zbadania wzajemnego nałożenia struktur (ang. alignment) oraz obliczenia wartości logD, które dla niektórych pochodnych potwierdzono eksperymentem (shake-flask). Oprogramowanie MetaSite 5.03 było wykorzystane do przewidzenia stabilności metabolicznej. Zostało to potwierdzone badaniami eksperymentalnymi w modelach mikrobiologicznych. Natomiast oprogramowanie Gaussian 09 na poziomie ab initio metodą funkcjonału gęstości wykorzystano do przewidzenia wartości przesunięć chemicznych w widmach HNMR, szczególnie pomocnych przy identyfikacji izomerów geometrycznych.

Badania dodatkowe, służące określeniu parametrów farmakokinetycznych objęły określenie stabilności metabolicznej – przewidywanie kierunku rozpadu metabolicznego, oraz rozpuszczalność co dla związków o wysokiej lipofilowości może stanowić poważny problem. Dodanie elementu farmakokinetycznego jest bardzo istotnym rozszerzeniem problemu, o którym bardzo często się zapomina na początkowych etapach badań R&D. Farmakokinetyka decyduje o losach cząsteczki leku w organizmie oraz o jego biodostępności. Gdy jest za słaba jest najczęstszą przyczyną rezygnacji z kontynuacji badań klinicznych. Wczesna wiedza może więc ograniczyć niepotrzebnie ponoszone koszty.

Cel, który postawił sobie doktorant, czyli utworzenie biblioteki potencjalnych ligandów receptora CB1, określenie ich aktywności i pewnych parametrów farmakokinetycznych został w całości zrealizowany.

Praca jest zaprezentowana w sposób zwięzły i jasny. Zawiera krótki ale bardzo dobrze opracowany wstęp literaturowy, a metodyka wszystkich etapów badawczych, jest także zaprezentowana w sposób wystarczający. Dyskusja obejmuje tylko najważniejsze elementy bez zbędnych dłużyzn, a wnioski uwypuklają najważniejsze ustalenia dyskusji.

Poziom pracy formalnie i merytorycznie jest bardzo wysoki, jednakże chciałbym zwrócić uwagę doktorantowi na kilka problemów, które zauważyłem czytając pracę:

- uwagi językowe sugerujące następującą formułę „large body of evidence confirms that…(str. 5)"; "studies reviled that… (str. 6); "…model can be derived…(str. 13); "…paved the road …(str. 16); "…significantly lower potency…(str. 20); "…aimed at antagonism…(str. 20); "…compliance of them with the non-classical…(str. 44)
- brak odnośników literaturowych w obu akapitach na stronie 9;

przytaczam jedynie z obowiązku recenzenta, aby przy przygotowaniu publikacji uwagi te można było uwzględnić. W referencjach znalazłem trzy publikacje doktoranta ale tylko jedna dotyczyła częściowo tematu rozprawy doktorskiej (zw. JCC1-45). Z tego wnioskuję, że odpowiednie publikacje są jeszcze w przygotowaniu i jest to najlepszy moment na ich ewentualną korektę.

Pomimo przedstawionych wyżej uwag moja ocena rozprawy doktorskiej mgr Przemysława Szafrańskiego jest pozytywna ponieważ postawione cele badawcze i poznawcze zostały zrealizowane, a doktorant wykazał się znakomitym opanowanie warsztatu badawczego i umiejętnością właściwego i skutecznego planowania badań. Uważam, że spełnia ona wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Składam zatem wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Przemysława Szafrańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Syntezy i Technologii
Chemicznej Środków Leczniczych
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. inż. Dariusz Matosiuk
profesor zwyczajny