

Tytuł: „Modelowanie metodami *in vitro* metabolizmu wyselekcjonowanych związków o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym”

Autor: Paulina Kubowicz-Kwaśny

Promotor: dr hab. Elżbieta Pękala, prof. UJ

Badania nad biotransformacją leków do lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku prowadzono wykorzystując zwierzęta laboratoryjne. Według Europejskiego Centrum Walidacji Metod Alternatywnych do różnego rodzaju testów poświęca się nawet do 10 milionów zwierząt rocznie, z czego ponad 60% do badań w fazie przedklinicznej. Oprócz względów humanitarnych argumentami przemawiającymi przeciwko badaniom *in vivo* są względy ekonomiczne, czas potrzebny na ich przeprowadzenie oraz jedynie 50% szansa na odzwierciedlenie wyników uzyskanych w modelach zwierzęcych w późniejszych badaniach z udziałem ludzi. Zwłaszcza we wczesnych fazach rozwoju leku bardziej stosowne i odpowiednie wydają się tzw. metody alternatywne spełniające kryteria wprowadzonej przez Russela i Burcha zasady 3R (replacement, reduction, refinement). W filozofię zasady 3 R wpisują się badania biotransformacji *in silico* oraz *in vitro*, w tym badania z wykorzystaniem mikroorganizmów oraz wątrobowych frakcji subkomórkowych.

Projekt realizowany w ramach pracy doktorskiej objął badania nad biotransformacją dwunastu wyselekcjonowanych, zróżnicowanych pod względem strukturalnym związków otrzymanych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej oraz w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM o potwierdzonej aktywności w obrębie ośrodkowego układu nerwowego w modelach na zwierzętach. Wśród związków badanych były pochodne aminoalkanolowe (**1_(a-c)**-**3**) o aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej, pochodne aripirazolu (**4-7**) obdarzone działaniem antypsychotycznym oraz pochodne zolpidemu (**8-10**) z aktywnością nasenną oraz antypsychotyczną. Badania biotransformacji przeprowadzono stosując model *in silico* (program MetaSite) oraz *in vitro*, w tym model mikrobiologiczny (3 różne gatunki grzyba strzępkowego *Cunninghamella elegans*, *echinulata*, *blakesleeana*), jak również model mikrosomów wątrobowych (mysz, szczur, człowiek) oraz frakcji S9. Postęp reakcji monitorowano wykorzystując metodę LC/MS.

Na podstawie uzyskanych wyników opisano kierunki przemian biotransformacyjnych oraz struktury metabolitów testowanych związków (**1_(a-c)**-**10**), wytypowano enzymy uczestniczące w ich powstawaniu, oszacowano stabilność metaboliczną wyznaczając okres półtrwania $t_{1/2}$ oraz klirens wewnętrzny Cl_{int} , wykryto różnice międzygatunkowe dotyczące kierunków przemian i ich szybkości (związek **7**). Interakcje typu lek-lek z najważniejszymi izoenzymami CYP450 ustalono dla związku **2**, który okazał się inhibitorem mieszanym CYP2D6 ($K_i=1.701 \mu\text{M}$).

Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na wysunięcie wniosków dotyczących pewnych zależności pomiędzy lipofilowością, a stabilnością badanych połączeń. Wysoką trwałością metaboliczną charakteryzowały się związki **2** i **3** oraz **8-10**, których lipofilowość mieściła się w zakresie $\log P$ 2.16-3.0, związki o $\log P > 3$ wskazywały stabilność od średniej do niskiej. Związki lipofilowe o $\log P > 4$ (**4** i **5**) preferowały biotransformację polegającą na rozpadzie cząsteczki macierzystej na drodze N-dealkilacji, O-dealkilacji lub rzadziej C-dealkilacji, pozostałe struktury o niższym niż $\log P$ (**1_(a-c)**-**3,7,9**) preferowały biotransformację, która odbywała się na drodze przemian oksydacyjnych nie związanych z rozpadem cząsteczki macierzystej testowanego związku.

Otrzymane wyniki mają charakter aplikacyjny, pozwoliły wyłonić spośród badanej puli związki stabilne metabolicznie (**6,8,10**) przyczyniając się w ten sposób do racjonalnej selekcji testowanych połączeń o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym do dalszych badań. Z kolei wytypowanie ugrupowań podatnych na działanie enzymów biotransformacyjnych w związkach niestabilnych metabolicznie (**1_(a-c)-4,5,7**) przyczyniło się do podjęcia modyfikacji strukturalnych przez współpracujące grupy syntetyków w celu uzyskania struktur wykazujących wyższą trwałość.