



UNIWERSYTET MEDYCZNY w Lublinie  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY z Oddziałem Analityki Medycznej  
Katedra i Zakład Chemii Leków  
20-090 Lublin, ul. K. Jaczewskiego 4  
tel. 81 448 73 82, fax 81 448 73 81  
e.mail: anna.gumieniczek@umlub.pl



Lublin 27-04-2016

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych**  
**Pani mgr Moniki Agnieszki Leśniewskiej**  
**pt. „Analiza porównawcza lipofilowości oraz trwałości aktywnej przeciwwirusowo**  
 **pochodnej 9-okso-5H-imidazo-[1.2-a]puryny, jej estrów oraz estrów acyklowiru”**  
**wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej**  
**Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**  
**pod kierunkiem Pani dr hab. Izabeli Muszalskiej**

Celem badań prezentowanych w niniejszej rozprawie była ocena trwałości chemicznej, trwałości enzymatycznej oraz lipofilowości i rozpuszczalności nowych pochodnych o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym otrzymanych przez dobudowanie do struktury acyklowiru trzeciego pierścienia heterocyklicznego lub poprzez estryfikację grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym.

Z uwagi na niezadowalającą biodostępność stosowanego powszechnie acyklowiru, nowe pochodne powinny charakteryzować się większą lipofilowością niż związek macierzysty. Powinny też posiadać odpowiednią trwałość w warunkach *in vitro*, istotną w trakcie przechowywania leku, oraz odpowiednią trwałość w środowisku przewodu pokarmowego, aby zapewnić odpowiednią biodostępność. Zaprojektowanie i otrzymanie leku o optymalnej trwałości jest szczególnie istotne w przypadku pro-leków, które po wchłonięciu do krwioobiegu muszą ulec rozkładowi, chemicznemu czy enzymatycznemu, do swojej aktywnej postaci. Z tego punktu widzenia temat prezentowanej pracy oraz wszystkie wykonane eksperymenty są w pełni uzasadnione.

W ocenianej pracy są zawarte wszystkie wymagane rozdziały, a mianowicie: wstęp, część literaturowa, cel pracy, część doświadczalna, wyniki i omówienie wyników, podsumowanie, wnioski, streszczenie (w języku polskim i angielskim), spis rycin i tabel oraz piśmiennictwo. Pod względem edytorskim praca jest przygotowana bardzo starannie.

Wstęp został poświęcony krótkiemu omówieniu wirusów jako czynników chorobotwórczych oraz przedstawieniu klasyfikacji leków przeciwwirusowych według ich mechanizmu działania. Z punktu widzenia celu pracy bardzo istotna jest część literaturowa. W pierwszym rozdziale tej części pracy Doktorantka omówiła budowę oraz właściwości fizykochemiczne acyklowiru, jego mechanizm działania i farmakokinetykę, działania niepożądane i zastosowania terapeutyczne. Następnie omówiła opisane dotychczas modyfikacje cząsteczki acyklowiru, zarówno w jego części pseudocukrowej (estry aminokwasowe, peptydowe, alifatyczne, z glikolem polietylenowym) oraz modyfikacje w obrębie

struktury guanozyny. Dla tego ostatniego typu pochodnych trójcyklicznych Doktorantka omówiła zagadnienia istotne dla dalszej części pracy i Jej własnych badań, a mianowicie ich strukturę, aktywność przeciwwirusową oraz rozpuszczalność i lipofilowość. Te dwie ostatnie właściwości są szczególnie istotne dla prawidłowego wchłaniania i działania substancji leczniczej, a jednocześnie nie zawsze są łatwe do osiągnięcia w procesie otrzymywania nowych substancji leczniczych.

W kolejnym rozdziale części literaturowej Doktorantka omówiła cele projektowania pro-leków, ich budowę oraz transformację w celu uzyskania aktywnych farmakologicznie właściwych leków, a także możliwości wykorzystania pro-leków w nowych rodzajach terapii, np. enzymatycznej terapii kierowanej przeciwciałem, genem czy aktywowanej enzymatycznie terapii kierowanej lektyną.

Tak opracowana część literaturowa dostarcza bardzo ciekawych informacji dotyczących leków przeciwwirusowych, a także problematyki pro-leków i według mnie może być materiałem na dobry artykuł poglądowy w tym zakresie. Podsumowując część teoretyczną mogę z przyjemnością stwierdzić, że jest ona bardzo dobrze przemyślana, piśmiennictwo w niej cytowane jest właściwe i jako całość bardzo dobrze wprowadza czytelnika do części doświadczalnej pracy.

Celem badawczym Pani mgr Leśniewskiej była ocena wpływu modyfikacji strukturalnych w obrębie części zasadowej oraz pseudocukrowej acyklowiru na trwałość chemiczną, trwałość enzymatyczną oraz lipofilowość nowych pochodnych. W pierwszym etapie badań Doktorantka dokonała syntezy 5 estrów acyklowiru: estru acetylowego, izobutyrylowego, piwaloilowego etoksykarbonylowego i nikotynowego. Dla wszystkich otrzymanych estrów Doktorantka potwierdziła tożsamość metodą UV-Vis, IR, NMR, analizą elementarną, a czystość poprzez pomiar temperatury topnienia i opracowaną przez siebie metodą HPLC. Drugą grupę badawczą stanowiła nowa pochodna trójcykliczna acyklowiru (związek XXVII) oraz jej estry: acetylowy, izobutyrylowy, piwaloilowy, etoksykarbonylowy i nikotynowy, zsyntezowane przez Pana dr hab. Tomasza Ostrowskiego.

Dla wszystkich 12 badanych związków Doktorantka wyznaczyła lipofilowość metodą HPLC, która została wcześniej wystandaryzowana przy użyciu odpowiednio dobranych wzorców. Otrzymane wartości lipofilowości zostały porównane z wartościami obliczonymi przy użyciu oprogramowania ALOGPS 2.1, a także z dostępnymi danymi z piśmiennictwa. Otrzymane wyniki oraz statystyczna ocena ich zgodności potwierdziły możliwość zamiennego stosowania metody *shake-flask* z metodą HPLC, a także obydwu metod eksperymentalnych z metodami obliczeniowymi, co może ułatwić i przyspieszyć określanie lipofilowości dla nowych substancji. Otrzymane wyniki pozwoliły Doktorantce na wybranie estru nikotynowego związku XXVII jako kandydata na nowy potencjalny pro-lek. Jego odpowiednia lipofilowość powinna zagwarantować właściwą biodostępność po podaniu doustnym.

Kolejnym etapem badań była ocena trwałości badanych związków w różnych warunkach narażenia na rozkład. Dla każdego związku opracowano ilościową metodę HPLC w celu badania jego trwałości

w środowisku kwasowym, w osoczu oraz w osoczu w obecności esterazy wątrobowej. Poznanie kinetyki rozkładu w takich warunkach miało na celu potwierdzenie możliwości zastosowania tych nowych związków jako potencjalnych pro-leków a także ocenę ich parametrów farmakokinetycznych. W celu przeprowadzenia kinetycznych badań rozkładu dla poszczególnych związków Doktorantka oceniła szybkość reakcji hydrolizy kwasowej w zakresie pH 0,42-1,38 przy stałej wartości siły jonowej. Wyznaczyła obserwowane stałe szybkości reakcji hydrolizy, a następnie katalityczne stałe szybkości reakcji i zaproponowała mechanizmy zachodzących reakcji. Badania kinetyczne Doktorantka wykonała także w osoczu ludzkim oraz w osoczu w obecności esterazy wątrobowej w temp. 37°C, wyznaczając obserwowane stałe szybkości reakcji hydrolizy i biologiczne okresy półtrwania. Otrzymane wyniki pokazały, że szybkość hydrolizy badanych związków oraz ich trwałość i podatność na hydrolizę enzymatyczną zależy przede wszystkim od rodzaju podstawnika w części estrowej, mniej natomiast od obecności dodatkowego pierścienia w podstawowej strukturze acyklowiru. Biorąc pod uwagę badania stabilności w kwasowym środowisku oraz w osoczu, Doktorantka mogła potwierdzić, że ester nikotynowy związku XXVII może być dobrym kandydatem na nowy pro-lek. Jest on bowiem odpowiednio trwały w kwasowym środowisku żołądka, a następnie odpowiednio szybko hydrolizuje do postaci aktywnej.

Dla związku XXVII Doktorantka dokonała także oceny trwałości w teście stresowym, przyspieszonym i pośrednim z pomiarem zmian stężenia substancji metodą HPLC. Testy zostały przeprowadzone w fazie ciekłej przy różnych wartościach pH, w środowisku utleniającym i poprzez ekspozycję na światło UV-Vis oraz w fazie stałej w temperaturze 100°C i poprzez ekspozycję na światło. Dla prób stresowanych w fazie ciekłej, gdzie związek XXVII uległ istotnemu rozkładowi, Doktorantka wykonała analizę HPLC-MS/MS i udowodniła, że niezależnie od środowiska reakcji, rozkładowi związku XXVII towarzyszy tworzenie się acyklowiru. Przeprowadzone badania pozwoliły na opracowanie wymagań dotyczących przechowywania związku XXVII, który okazał się substancją fotolabilną, zwłaszcza w roztworze, i powinien być przechowywany w warunkach chroniących od światła. Analiza HPLC-MS/MS została wykonana także dla związku XXVII oraz jego estrów obecnych w osoczu ludzkim i dzięki temu wykazano, że estry związku XXVII hydrolizują w tym środowisku do związku macierzystego. Natomiast związek XXVII w tym środowisku nie ulega rozkładowi do acyklowiru, odmiennie niż w próbach stresowanych w fazie ciekłej.

Wszystkie przeprowadzone eksperymenty są bardzo dobrze opisane, a ich wyniki bardzo czytelnie przedstawione na licznych wykresach oraz w dobrze zaprojektowanych tabelach. Wynika z nich jasno, że Doktorantka bardzo starannie wykonała poszczególne etapy doświadczeń, zebrała ich wyniki, dokonała odpowiednich obliczeń oraz bardzo wnikliwej oceny statystycznej. Na uwagę zasługuje trud podjęcia pracy syntetycznej i otrzymania 5 estrów acyklowiru, ich odpowiednie oczyszczenie, a następnie szerokie badania ich właściwości fizykochemicznych. Należy podkreślić, że

wszystkie metody HPLC opracowane przez Doktorantkę do oznaczeń ilościowych zostały bardzo starannie zwalidowane, co gwarantuje wiarygodność prezentowanych wyników. Recenzowana praca jest bardzo dobrym przykładem eksperymentu odzwierciedlającego kompleksowość chemii leków, łącząc elementy syntezy chemicznej oraz różne aspekty analityczne, a w efekcie końcowym umożliwiając ocenę przydatności nowych pochodnych jako potencjalnych kandydatów na leki. W aspekcie edytorskim chciałabym podkreślić bardzo dobrze opracowaną część dotyczącą wyników badań, ich omówienie, a także podsumowanie i wnioski, co nie było łatwą kwestią przy tak wielu różnych danych.

W podsumowaniu tej części recenzji mogę stwierdzić, że Doktorantka przeprowadziła wiele różnorodnych badań, co wskazuje na Jej umiejętności prowadzenia syntezy chemicznej oraz bardzo dobre umiejętności analityczne. Jednocześnie właściwa interpretacja wyników świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki. Praca Pani mgr Leśniewskiej jest ciekawa w aspekcie teoretycznym (o czym pisałam powyżej), a jednocześnie posiada bardzo wyraźny charakter aplikacyjny, co oceniam bardzo pozytywnie. Prezentowana praca wzbogaca i uzupełnia w istotny sposób obszar wiedzy z zakresu syntezy i analizy leków przeciwwirusowych, a otrzymane wyniki mogą być interesujące dla specjalistów o różnych specjalnościach.

Z obowiązku recenzenta muszę wykazać zauważone w pracy drobne usterki, chociaż jednocześnie chcę podkreślić, że jest ich naprawdę niewiele, a niektóre mogą mieć charakter subiektywny. Na str. 18 w odniesieniu do procesu uwalniania substancji aktywnej użyto określenia prędkość, a ja wolałabym określenie szybkość. W prezentowanej pracy Doktorantka stosuje wiele skrótów, przy czym są one używane zamiennie z pełnymi nazwami. Rozumiem jednak, że Autorka miała taką właśnie intencję i kierowała się dobrym odbiorem pracy przez czytelnika. Przy okazji zauważyłam, że niektóre skróty zostały pominięte w wykazie skrótów, np. skrót VACV wprowadzony na str. 19. Na str. 145, zabrakło mi objaśnienia dla współczynników  $k_1$  oraz  $k_2$  (równanie 13). Na str. 175 napisano „w osoczu w analizowanych warunkach najszybciej ulegały rozkładowi estry izobutyrylowe i nikotynowe, bardziej stabilne były estry nikotynowe i etoksykarbylowe”. Nie sprawia to jednak problemu czytającemu, gdyż prezentowana poniżej rycina bardzo dobrze wyjaśnia tę kwestię. Doktorantka w kilku miejscach powołuje się na wytyczne ICH. Myślę, że cennym byłoby dodanie do wykazu piśmiennictwa odpowiedniego dokumentu dotyczącego tych wytycznych.

Mam także kilka uwag, których w żaden sposób nie należy traktować jako uchybienia. Powoduje mną przede wszystkim własna ciekawość i zainteresowania badawcze. Doktorantka pisze, że związek XXVII i analogi trójcykliczne wykazują aktywność przeciwwirusową. Jestem bardzo ciekawa, czy wykonywała takie badania, czy też oparła się głównie na danych z piśmiennictwa. Podczas testu stresowego związku XXVII w środowisku utleniającym, a następnie analizy chromatograficznej zaobserwowano pik substancji o czasie retencji innym niż dla pozostałych warunków testu

stresowego. Czy próbowano wyjaśnić tę różnicę? Na chromatogramach LC-MS/MS otrzymanych dla estrów związku XXVII obecnych w osoczu oraz w osoczu z dodatkiem esterazy wątrobowej pojawia się pik acyklowiru. Czy próbowano wyjaśnić jego obecność? W celu przeprowadzenia kinetycznych badań rozkładu dla związku XXVII i jego estrów Doktorantka oceniła szybkość reakcji hydrolizy kwasowej w zakresie pH 0,42-1,38. Czym kierowano się przy wyborze takiego zakresu pH?

Te nieliczne uwagi i/lub sugestie mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie umniejszają osiągnięć Doktorantki, które wyrażają się przede wszystkim elementami nowości naukowej i aspektami praktycznymi. Zaliczam do nich syntezę 5 nowych pochodnych acyklowiru, bardzo wnikliwą ocenę właściwości fizykochemicznych 12 pochodnych acyklowiru oraz wskazanie potencjalnych kandydatów na nowe leki lub pro-leki.

Jestem przekonana, że praca Pani mgr Moniki Agnieszki Leśniewskiej „Analiza porównawcza lipofilowości oraz trwałości aktywnej przeciwwirusowo pochodnej 9-okso-5*H*-imidazo-[1.2-*a*]puryny, jej estrów oraz estrów acyklowiru” spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach naukowych i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoką wartość pracy oraz opublikowanie dużej części wyników w renomowanych czasopismach branżowych posiadających współczynnik oddziaływania wnoszę o wyróżnienie pracy. Odpowiedni wniosek składam do Pana Dziekana i Wysokiej Rady Wydziału w odrębnym piśmie.

Lublin, 2016-04-27

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Chemii Leków  
  
Prof. dr hab. Anna Gumieczek