



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Stanisław A. Ryng, Prof. dr hab..n. farm.

Katedra i Zakład Chemii Organicznej,
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu,
Ul. Borowska 211A,
50-556 Wrocław
Telefon # 48 71 784 03 40
Fax# 48 71 784 03 41,
e-mail: stanislaw.ryng@umed.wroc.pl

Wrocław, 2019-09-08

Recenzja

Rozprawy Doktorskiej Pani mgr farm. Anny Juszcak

Rozprawa doktorska Pani mgr farm. Anny Juszcak p.t.: "Trwałość peryndoprylu w fazie stałej oraz synteza nowych pochodnych inhibitorów konwertazy angiotensyny" powstała na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej.

Obszerna, wielodyscyplinarna praca Pani mgr farm Anny Juszcak, której Promotorem jest Pani dr hab. n. farm. Beata Jadwiga Staniszk, prof.UM, a Promotorem pomocniczym Pan dr n. farm. Wojciech Szczęółko jest produktem harmonijnej, wielodyscyplinarnej współpracy.

Teza rozprawy mieści w sobie dwa zadania:

- Badanie trwałości peryndoprylu w fazie stałej
- Syntezę nowych pochodnych inhibitorów konwertazy angiotensyny

Peryndopryl jest cząsteczką czynną wielu preparatów farmaceutycznych o działaniu przeciwnadciśnieniowym. Substancja czynna zawarta w formie farmaceutycznej jest inhibitorem konwertazy angiotensyny (I-ACE).

Struktura chemiczna tej cząsteczki warunkuje cenną aktywność biologiczną, ale również jest powodem jej nietrwałości na skutek podatności na reakcje hydrolizy i cyklizacji. Przemiany te następują w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności.

W toku prac eksperymentalnych została przeprowadzona analiza trwałości dwóch soli kwasu (2*S*,3*aS*,7*aS*)-1-[(2*S*)-2-{{(2*S*)-1-etoksy-1-oksopentan-2-yl}amino]propanoilo}-2,3,3*a*,4,5,6,7,7*a*-oktahydroindolo-2-karboksylowego:

1. tert-butyloaminą
2. arginina

Analizy przeprowadzono dla soli peryndoprylu w czystej substancji, w tabletkach oraz w obecności hydrochlorotiazydu, stosowanego często w terapii skojarzonej z I-ACE.

Przeprowadzono również badania właściwości antyoksydacyjnych testowanych połączeń.

Dodatkowo, w celu wzbogacenia części eksperymentalnej, dokonano opracowania sposobu otrzymywania, a następnie syntezy serii dziewięciu nowych połączeń I-ACE. Otrzymane preparaty zaplanowano w ten sposób, aby wyeliminować wiązania najbardziej podatne na degradację.

Nowosyntetyzowane związki także przebadano w zakresach: trwałości, aktywności biologicznej, analizie siły wiązań (*in silico*) z enzymem konwertującym angiotensynę, oraz analizie potencjału antyoksydacyjnego.

Prace te przeprowadzono w celu wzbogacenia bazy danych przydatnych w projektowaniu substancji leczniczych o trwalszej strukturze i lepszych indeksach terapeutycznych.

Mając świadomość złożoności zadań czekających na wyjaśnienie i rozwiązanie przestudiowano literaturę przedmiotu zarówno w dostępnej literaturze obcej (poz. 1, 9, 20-41 i in), jak i dorobku własnego Środowiska naukowego (poz.3-8; 18-19; 87 i in. załączonej Bibliografii).

W pierwszym etapie pracy dokonano badań trwałości soli peryndoprylu z tert-butyloaminą i arginina. Na wstępie przeprowadzono walidację metody RP-HPLC

oceniając: selektywność, liniowość, limit wykrywalności, limit oznaczalności, precyzję na poziomach niskim i wysokim oraz dokładność. Stwierdzono spełnienie wszystkich kryteriów rewalidacyjnych.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza obydwie sole badane *in pure* z hydrochlorotiazydem rozkładały się według tych samych mechanizmów: sól z tert-butyloaminą – autokatalitycznie, natomiast w pochodnej z arginina zgodnie z mechanizmem reakcji I-rzędu.

Dodatek hydrochlorotiazydu nie ma wpływu na mechanizm dekompozycji badanych substancji ani na jakościowy skład produktów powstałych w procesie rozkładu.

Z przeprowadzonych badań wynika, że kompozycja peryndoprylu z hydrochlorotiazydem w jednym preparacie (tabletcie) będzie korzystna zarówno ze względu na gotową kompozycję w terapii kombinowanej, jak i trwałość peryndoprylu, zwłaszcza w postaci soli z tert-butyloaminą.

Doktorantka oceniła też potencjał antyoksydacyjny wybranych I-ACE w porównaniu z kwasem L-askorbinowym szacując poziom hamowania wolnych rodników dla badanych połączeń. Stwierdzony efekt przeciwutleniający jest szczególnie cenny w przebiegu terapii chorób przewlekłych.

W drugim etapie pracy dokonano syntezy dziewięciu nowych pochodnych I-ACE.

W zaprojektowanej, nowej serii dziewięciu nowych struktur weliminowano dwa elementy budowy, które warunkowały nietrwałość peryndoprylu: wiązanie estrowe oraz bliskość pierścienia i grupy aminowej. Istotnie też zmieniono ugrupowanie oktahydroindolowe (w pełni uwodornione) na częściowo aromatyczne (a tym samym planarne), co zmieniło właściwości tej części struktury.

Tożsamość nowych związków potwierdzono na drodze spektralnej: UV, MS ES, ^1H i ^{13}C NMR, a czystość chromatograficznie przy użyciu HPLC. Dodatkowo wykonano dwuwymiarowe widma NMR: $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC.

Po ustaleniu struktury nowych połączeń dokonano oceny: lipofilowości, trwałości, właściwości antyoksydacyjnych i biologicznych w zakresie hamowania acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BuChE).

W cyklu badań aktywności stwierdzono wysoką aktywność antyoksydacyjną w teście hamowania wolnych rodników.

W cyklach badań trwałości, realizowanych jak w pochodnych peryndoprylu, stwierdzono, że wszystkie nowe cząsteczki są trwalsze od pochodnych badanych w pierwszej serii.

W badaniach *in silico* zdolności wiązania z enzymem konwertującym angiotensynę stwierdzono możliwość dokowania pomiędzy pierwszą pozą związku a kieszenią enzymu, co zostało wykazane w stosownej grafice.

Praca doktorska w części eksperymentalnej została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu we współpracy z:

- Katedrą i Zakładem Technologii Chemicznej Środków Leczniczych tej Uczelni oraz
- Panem dr n. farm Jackiem Kujawskim z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej UMed
- Panem dr hab. n. farm. Pawłem Ramosem z Katedry i Zakładu Biofizyki Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
- Panem Prof. dr hab. n. farm Tomaszem Goślińskim

Współpracownikom Pani Doktorantka stosownie podziękowała.

Rozprawa doktorska Pani mgr farm. Anny Juszcak została napisana starannie z widoczną dbałością o styl i poprawność językową.

W skład rozprawy wchodzi:

1. Wstęp
2. Część teoretyczna, zawierająca opis mechanizmu działania inhibitorów konwertazy angiotensyny wraz ich klasyfikacją, Opis trwałości leku w fazie stałej, opis metody analitycznej zastosowanej do badań stabilności substancji **28 stron**

3. Systemy terapeutyczne z I-ACE, możliwości i kierunki rozwoju **11 stron**
4. Cel badań tożsamy z tytułem rozprawy
5. Preparaty i metody badań **80 stron**
6. Synteza i analiza oraz właściwości nowych pochodnych I-ACE **54 strony**, w tym koncepcja i schemat z opisem i charakterystyki otrzymanych produktów
7. Badania biologiczne i fizykochemiczne (wyliczenie LogP, badanie właściwości antyoksydacyjnych, aktywności z acetylocholinoesterazą i butyrylocholinoesterazą)
8. Opracowanie walidacja metody HPLC do oceny trwałości nowych związków w tym: selektywność metody, liniowość metody, granice wykrywalności i oznaczalności
9. Warunki badań kinetycznych i porównanie trwałości badanych związków z solami peryndoprylu
10. Badania *in silico*
11. Omówienie wyników poszczególnych etapów eksperymentów
12. Wnioski wynikające z prac laboratoryjnych i ich interpretacja w liczbie 7, w tym 4 z pierwszego etapu prac, oraz 3 z drugiego etapu
13. Bibliografia zawierająca **181** pozycji literaturowych, głównie z ostatnich 7 lat
14. W załącznikach: widma NMR dowodzące struktury i czystości badanych, nowych związków
15. Streszczenia polsko- i angielskojęzyczne
16. Wykaz oryginalnych publikacji eksperymentalnych współautorstwa Doktorantki: **6** pozycji literaturowych o sumarycznym IF = **14,431** oraz prac poglądowych 7, wystąpień zjazdowych **13** (1 ustne, 12 posterowych)

Doktorantka zawarła w rozprawie doktorskiej:
 metody otrzymywania, badania fizykochemiczne, widmowe oraz badania nowych antagonistów receptorów I-ACE,
 wśród obszarów badań: wiązania i dokowania, cykle badań farmakologicznych,
 wszystkie badania w zakresie przemian, jak i stabilności metabolicznej.

W zakresie syntezy nowej rodziny ligandów I – ACE, poczynając od otrzymywania, modyfikacje strukturalne, poprzez testowanie aktywności biologicznych, z uwzględnieniem oddziaływań z obszarami wiążącymi.

Rozprawa doktorska Pani mgr farm Anny Juszcak z d. Wzgarda wykazała Jej ogólną wiedzę i biegłość w podjętej tematyce badawczej, oraz pracy naukowej. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie tezy badawczej, co spełnia warunki określone w art. 13 ust 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i Tytule Naukowym, oraz o Stopniach i Tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami: tekst jednolity – Dz. U z 27 września 2017 r. poz. 1789.

W związku z powyższym rekomenduję Panu Dziekanowi i Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

WNIOSEK

o przeprowadzenie dalszej procedury, prowadzącej do nadania Pani mgr farm.

Annie Juszcak z domu Wzgarda Stopnia Naukowego Doktora Nauk

Farmaceutycznych.

