



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 31-07-2019

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych**

**Pani mgr Anny Juszcak**

**pt. „Trwałość peryndoprylu w fazie stałej oraz synteza nowych pochodnych inhibitorów konwertazy angiotensyny”**

**wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej**

**Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

**pod kierunkiem Pani dr hab. Beaty Stanisł i dr Wojciecha Szczęółko**

Celem badań prezentowanych w niniejszej rozprawie była ocena trwałości chemicznej jednego z inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE) peryndoprylu w fazie stałej, w warunkach obniżonej i podwyższonej wilgotności względnej powietrza oraz podwyższonej temperatury, jako czystej substancji czynnej, w obecności substancji pomocniczych obecnych w preparacie farmaceutycznym oraz w obecności hydrochlorotiazylu. Drugim celem było otrzymanie nowych pochodnych o potencjalnym działaniu hamującym ACE, oszacowanie ich powinowactwa do enzymu i lipilowości *in silico*, zbadanie ich trwałości, a także dodatkowej aktywności, tj. potencjalnego działania przeciwutleniającego i hamującego aktywność cholinoesteraz, acetylocholinoesterazy (AChE) oraz butyrylocholinoesterazy (BChE).

Trwałość odnosi się do substancji leczniczej lub produktu farmaceutycznego, w których substancja lecznicza lub substancja lecznicza i substancje pomocnicze nie ulegają zmianom, a ich formuła odpowiada określonym standardom w danym okresie czasu. Odpowiednia trwałość gwarantuje prawidłowe działanie leku i zapobiega tworzeniu się niepożądanych produktów rozkładu. W ramach badań nad lekami przeprowadza się między innymi testy wymuszonej degradacji. Pomagają one opracować odpowiednie metody oceny stabilności oraz określić szlaki i produkty rozkładu substancji leczniczej, jakie mogłyby tworzyć się podczas wytwarzania czy przechowywania. Uzyskane w ten sposób informacje ułatwiają wprowadzenie na rynek farmaceutyczny produktu leczniczego o odpowiedniej jakości.

Według danych piśmiennictwa, spośród licznej grupy znanych inhibitorów ACE, niektóre cechują się niezadowalającą trwałością chemiczną. Z uwagi na ich olbrzymie znaczenie w lecznictwie wciąż podejmowane są próby otrzymania lepszych pochodnych. Jednocześnie należy je projektować tak, aby optymalizować biodostępność, a więc nowe pochodne powinny charakteryzować się, między innymi, odpowiednią lipofilowością. Z uwagi na doniesienia piśmiennictwa o pozytywnych działaniach inhibitorów ACE w różnych problemach terapeutycznych (np. w chorobach nerek, serca, chorobach neurologicznych), warto dokładniej poznać ich potencjalne dodatkowe aktywności, np. właściwości przeciwutleniające czy hamujące aktywność cholinoesteraz. 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 teoretyczna, cel pracy, część doświadczalna, omówienie wyników, wnioski, bibliografia (181 pozycji) i streszczenie (w języku polskim i angielskim). Załączono także wykaz stosowanych skrótów, spis rycin i tabel oraz dodatkowo widma NMR badanych związków.

Z punktu widzenia celu pracy bardzo istotna jest część literaturowa. Doktorantka omówiła w niej mechanizm działania układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA), który bierze udział w regulacji ciśnienia tętniczego i stanowi główny punkt uchwytu dla inhibitorów ACE. Bardzo interesująca jest część poświęcona potencjalnym nowym kierunkom stosowania inhibitorów ACE, np. w chorobach nerek, niewydolności mięśnia sercowego, w zaburzeniach neurologicznych i chorobach nowotworowych. Kolejna część poświęcona jest problematyce trwałości chemicznej leków, a szczególnie trwałości inhibitorów ACE i zagadnieniom związanym z walidacją metody analitycznej, konieczną dla prawidłowej oceny trwałości danego leku. W dalszej części Doktorantka omawia właściwości peryndoprylu i jednocześnie potwierdzone w literaturze możliwości modyfikacji struktury inhibitorów ACE, ze szczególnym uwzględnieniem ugrupowań odpowiedzialnych za przyspieszony rozkład chemiczny. Nawiązuje też do metod wyznaczania lipofilowości związków aktywnych biologicznie. Jak wiemy ta cecha jest istotna dla prawidłowego wchłaniania i działania substancji leczniczej, a jednocześnie nie zawsze łatwa do osiągnięcia w procesie otrzymywania nowych substancji leczniczych.

Tak opracowana część literaturowa dostarcza bardzo ciekawych informacji dotyczących układu RAA i leków wpływających na ten układ. Podsumowując część teoretyczną można

stwierdzić, że jest ona dobrze przemyślana, zwięzła, piśmiennictwo w niej cytowane jest właściwe i jako całość bardzo dobrze wprowadza czytelnika do części doświadczalnej pracy.

Pierwszym celem badawczym Doktorantki była szczegółowa analiza trwałości peryndoprylu (peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz arginianu peryndoprylu w substancji czystej oraz odpowiednich tabletkach, a także w mieszaninach modelowych z hydrochlorotiazidem). Wymuszona degradacja została przeprowadzona w fazie stałej w warunkach podwyższonej lub obniżonej wilgotności względnej powietrza i podwyższonej temperatury. Procesy degradacji Doktorantka oceniła ilościowo przy użyciu zwalidowanej metody HPLC, a otrzymane wyniki wykorzystała do kinetycznej oceny rozkładu w poszczególnych warunkach wilgotności i temperatury. Wykonano także analizę metodą ESI/MS w celu identyfikacji powstających produktów rozkładu.

W drugim etapie pracy zaplanowano i przeprowadzono syntezę 9 nowych pochodnych opartych o strukturę indolu. Podstawowym założeniem było otrzymanie pochodnych pozbawionych elementów struktury najmocniej obniżających trwałość chemiczną, tj. wiązania estrowego i grupy aminowej położonej blisko pierścienia. Otrzymane pochodne oczyszczono chromatograficznie i potwierdzono ich budowę metodami UV, MS i NMR. Czystość została potwierdzona chromatograficznie i przez oznaczenie temperatury topnienia. Dodatkowo strukturę analizowano przy użyciu dwuwymiarowych widm NMR. Dalsze badania dotyczyły trwałości chemicznej i zostały przeprowadzone według schematu użytego dla peryndoprylu, z ilościowym oznaczeniem zwalidowaną metodą HPLC i oceną kinetyczną procesów degradacji. Przy użyciu metod obliczeniowych oszacowano lipofilowość nowych pochodnych oraz potencjalną zdolność wiązania ze strukturą ACE.

Istotną częścią badań była ocena aktywności badanych związków w zakresie działania przeciwutleniającego, którą przeprowadzono metodą spektrofotometryczną z użyciem 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu i kwasu askorbowego jako substancji odniesienia. Drugi istotny aspekt to ocena aktywności badanych związków jako inhibitorów dwóch cholinesteraz, AChE i BChE, metodą spektrofotometryczną z użyciem odczynnika Ellmana.

Analiza trwałości peryndoprylu w fazie stałej pozwoliła na wyznaczenie parametrów kinetycznych i termodynamicznych reakcji rozkładu dla substancji czystej, dla tabletek i w mieszaninach z hydrochlorotiazidem. Analizując rozkład peryndoprylu z *tert*-butyloaminą oraz arginianu peryndoprylu Doktorantka stwierdziła, że zarówno wilgotność jak i temperatura mają negatywny wpływ na trwałość obydwu związków, ale w dużo wyższym

stopniu dotyczy to peryndoprylu z *tert*-butyloaminą. Stwierdziła też, że hydrochlorotiazyd zmniejsza podatność na rozkład obydwu związków, a szczególnie peryndoprylu z *tert*-butyloaminą, co może mieć znaczenie przy projektowaniu odpowiednich dwuskładnikowych preparatów farmaceutycznych.

Badania trwałości zsyntezowanych pochodnych pokazały, że cechują się one wyższą trwałością niż peryndopryl w postaci soli. Analiza *in silico* wykazała, że zsyntezowane związki mogą wiązać się z właściwym miejscem ACE, a tym samym hamować jej aktywność. Wykazano też, że wartości lipofilowości mieszają się w zakresie zapewniającym zadowalającą biodostępność. Dodatkowo otrzymano obiecujące wyniki w odniesieniu do ich działania przeciwutleniającego. Mniej zadowalające okazały wyniki badania aktywności hamującej wobec cholinoesteraz.

Wszystkie przeprowadzone eksperymenty są dobrze opisane, a ich wyniki czytelnie przedstawione na bardzo licznych wykresach i w tabelach. Wynika z nich jasno, że Doktorantka 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 nowych pochodnych, ich odpowiedniego oczyszczenia, a następnie zbadania właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Należy też podkreślić, że wszystkie metody HPLC opracowane przez Doktorantkę do oznaczeń ilościowych zostały poddane rewalidacji, co gwarantuje wiarygodność prezentowanych wyników. Recenzowana praca odzwierciedla kompleksowość chemii leków jako nauki, łącząc elementy syntezy chemicznej oraz różnych aspektów analitycznych, a w efekcie końcowym umożliwiając ocenę nowych pochodnych jako potencjalnych kandydatów na leki.

Podsumowując, 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. W rezultacie praca jest ciekawa w aspekcie teoretycznym, 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 bardzo ważnej grupy leków, jaką są inhibitory ACE.

Z obowiązku recenzenta muszę wykazać zauważone w pracy drobne usterki, chociaż, chcę wyraźnie podkreślić, że niektóre z nich mogą stanowić kwestię do dyskusji.

Niektóre skróty zostały pominięte w wykazie skrótów, np. skrót RAS, A $\beta$ , MDA i inne. Podobnie, Ryc. 2.5 zawiera kilka skrótów podanych bez odpowiednich objaśnień. Niektóre skróty czy terminy są używane niekonsekwentnie, np. CV i Wz dla współczynnika zmienności czy „poses” i pozy dla zadokowanych struktur. Używane są podwójne określenia peryndoprylu z *tert*-butyloaminą lub peryndopryl *tert*-butyloaminy.

Można też poprawić niektóre użyte terminy i określenia, np. reabsorpcja zwrotna, tlenek aluminium, woda bidestylowana, terapia kombinowana czy udokładnienie.

Na str. 20, w rozdziale o stosowaniu inhibitorów ACE w leczeniu uzależnień pojawiło się zdanie dotyczące korzyści stosowania inhibitorów ACE u pacjentów zarażonych wirusem HIV, bez odpowiedniego komentarza.

W Tabelach 4.1 i 4.2 podane są niewłaściwe wartości LOD.

Definicje dotyczące  $t_{0,1}$  i  $t_{0,5}$  pojawiły się na str. 23, a ich wyjaśnienie umieszczono dopiero na str. 162 w opisach dotyczących etapu II.

Brak jest niektórych odczynników w punkcie Stosowane rozpuszczalniki i reagenty, szczególnie w części II.

Brak wyjaśnienia, w jaki sposób określono odstępy czasu przy pobieraniu poszczególnych prób do oznaczeń ilościowych w badaniach trwałości.

Str. 147, część wyników dotyczącą lipofilowości można przenieść do omówienia wyników, podobnie w części dotyczącej modelowania molekularnego na str. 184-188, aby uniknąć istniejących obecnie powtórzeń.

Mam także kilka uwag, których w żaden sposób nie należy traktować jako zarzutów. Powoduje mną przede wszystkim własna ciekawość i zainteresowania badawcze. Bardzo interesująca jest obserwacja dotycząca różnicy trwałości pomiędzy połączeniem peryndoprylu z *tert*-butyloaminą a arginianem peryndoprylu. Co może być tego przyczyną? Równie interesująca jest kwestia „ochronnego” działania hydrochlorotiazydu na tę nietrwałą substancję. Jaki może być mechanizm przeciwutleniającego działania badanych inhibitorów ACE, a szczególnie nowej pochodnej VIII?

Te nieliczne uwagi i/lub sugestie mają charakter jedynie dyskusyjny i w żadnym stopniu nie umniejszają osiągnięć Doktorantki. Jestem przekonana, że praca Pani mgr Anny Juszcak pt. „Trwałość peryndoprylu w fazie stałej oraz synteza nowych pochodnych inhibitorów konwertazy angiotensyny” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę

o stopniach naukowych i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wartość pracy oraz opublikowanie części wyników w czasopismach branżowych posiadających współczynnik oddziaływania IF wnoszę o wyróżnienie pracy. Odpowiedni wniosek składam do Pana Dziekana i Wysokiej Rady Wydziału w odrębnym piśmie.

Lublin, 2019-07-31

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

