



# UNIWERSYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Chemii Organicznej i Technologii Leków

**Dr hab. Marcin Mączyński, profesor Uczelni**

Wrocław 10.08.2022

## Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr farm. Marietty Ślusarczyk**

wykonanej w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej Collegium  
Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

pt. „**SYNTEZA NOWYCH AMIDOWYCH I HYDRAZYDOWYCH POCHODNYCH  
PURYNO-2,6-DIONU I BENZIMIDAZOLU JAKO ANTAGONISTÓW  
KANALU TRPA1 O POTENCJALNEJ AKTYWNOŚCI  
PRZECIWBÓLOWEJ I PRZECIWZAPALNEJ**”

Poszukiwanie związków biologicznie czynnych w kierunku leczenia bólu przewlekłego, w tym neuropatycznego, w różnych grupach chemicznych, jest tematem cały czas aktualnym. W ciągu ostatnich lat zanotowano ogromny postęp w leczeniu bólu, ale pomimo tego dostępne analgetyki nie są w pełni skuteczne. Jedną z nowych propozycji w leczeniu bólu neuropatycznego są antagoniści kanału TRPA1, którzy blokują odpowiedź bólową obwodowo. Oprócz samego poszukiwania nowych związków istotnym problemem są działania niepożądane analgetyków oraz uzależnienie i tolerancja po ich stosowaniu, dlatego podjęta przez Doktorantkę tematyka jest z całą pewnością zasadna.

W tym kontekście podjęta w recenzowanej rozprawie doktorskiej tematyka dotycząca:

- projektowania i syntezy nowych amidowych i hydrazydowych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu oraz 1*H*-benzimidazolu,
- oceny aktywności antagonistycznej wobec kanału TRPA1 *in vitro*,
- analizy zależności struktura-aktywność (SAR),
- określenia za pomocą modelowania molekularnego potencjalnego sposobu wiązania w kanale jonowym TRPA1 wyselekcjonowanych pochodnych,
- oceny aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej

dobrze wpisuje się w obecne trendy poszukiwań leków na drodze syntezy organicznej. Bezpośrednim celem pracy Pani mgr Marietty Ślusarczyk była kilkietapowa synteza nowych amidowych i hydrazydowych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu oraz 1*H*-benzimidazolu oraz określenie ich aktywności antagonistycznej względem kanału TRPA1 *in vitro*.

Praca posiada ogólnie przyjęty układ dla tego typu dysertacji, obejmuje 171 stron, na których w tekście ulokowane są także ryciny w liczbie 34, tabele w liczbie 22 oraz schematy w liczbie 10. Merytorycznie praca poparta jest 173 pozycjami piśmiennictwa. Piśmiennictwo jest prawidłowo dobrane, co potwierdza bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki w omawianym temacie. Dodatkowo Doktorantka na końcu monografii przedstawiła informacje o swoim dorobku naukowym. Doktorantka jest współautorką 9 publikacji w czasopismach posiadających współczynnik wpływu, ale niestety mgr Marietta Ślusarczyk w żadnej pracy nie jest ani pierwszym ani korespondencyjnym autorem.

Podjęta w przedstawionej rozprawie problematyka badawcza, jak wspomniałem wcześniej, jest trafna i aktualna. We wstępie Doktorantka przedstawiła informacje dotyczące bólu neuropatycznego, charakterystykę kanału TRPA1 jako celu molekularnego dla nowych analgetyków, przegląd znanych klas antagonistów TRPA1 o potencjalnym zastosowaniu w terapii bólu przewlekłego oraz badania modelowania molekularnego nad określeniem sposobu wiązania antagonistów kanału TRPA1. W ocenie Recenzenta ten fragment jest pozbawiony części dotyczącej metod syntezy związków należących do różnych klas antagonistów TRPA1, ponieważ badania prowadzone przez Doktorantkę dotyczyły w większości syntezy nowych związków. Uzupełnienie wstępu o część syntetyczną z pewnością wzbogaciłoby ten fragment pracy.

W rozdziale „Cel pracy” Pani mgr Marietta Ślusarczyk krótko opisała celowość podjęcia badań, na które składały się:

1. zaprojektowanie i synteza kilku serii amidowych i hydrazydowych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu (serie Ia i Ib), 8-amino- i 8-alkoksy-1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu (serie IIa i IIb oraz IIIa i IIIb), 1*H*-benzimidazolu (serie IVa i IVb), 2-piperydino-1*H*-benzimidazolu (serie Va i Vb) jako antagonistów kanału TRPA1.
2. Analiza lekopodobieństwa zaprojektowanych związków *in silico*.
3. Oznaczenie aktywności antagonistycznej względem kanału TRPA1 dla otrzymanych związków *in vitro* oraz badania SAR.

4. Zaproponowanie sposobu wiązania reprezentantów otrzymanych antagonistów w kanale TRPA1 przy użyciu metod modelowania molekularnego.

5. Określenie aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej wyselekcjonowanych antagonistów *in vivo* w testach bólu: formalinowym, bólu neuropatycznego wywołanego oksaliplatyną (testy von Frey'a i zimnej płytki) u myszy oraz zapalenia: test karageninowy u szczura.

Doktorantka słusznie zauważyła, że otrzymane przez nią wyniki mogą pomóc w projektowaniu nowych i skutecznych antagonistów TRPA1.

W rozdziale „Wyniki i dyskusja” Doktorantka przedstawiła i zinterpretowała wyniki badań odnoszących się do poszczególnych wyżej wymienionych celów pracy:

Ad 1. Doktorantka projektując nowe związki modyfikowała strukturę selektywnego antagonisty kanału TRPA1 – modelowego związku HC-030031. Modyfikacje struktury polegały na zmianach:

- w podstawniku w położeniu 7 układu 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu zachowano ugrupowanie amidowe (serie Ia-IIIa) lub zastąpiono go ugrupowaniem hydrazydowym (serie Ib-IIIb),

- w podstawniku w położeniu 7 zachowano metylenowy łańcuch alifatyczny lub wydłużono go do trimetylenowego i/lub rozgałęziono do metylometylenowego (serie Ia-IIIa oraz Ib-IIIb),

- w podstawniku w położeniu 7 zachowano lub modyfikowano fragment anilidowy przez wprowadzenie różnych podstawników do pierścienia fenyłowego o zróżnicowanych właściwościach sterycznych i elektronowych lub zastąpiono anilinę różnie podstawionym ugrupowaniem *N*-benzyloaminowym (serie Ia-IIIa),

- zachowano niepodstawiony atom wodoru w położeniu 8 układu 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu (serie Ia i Ib) lub wprowadzono w to położenie różnego rodzaju podstawniki aminowe (serie IIa i IIb) lub alkoksylowe (serie IIIa i IIIb).

- zastąpiono układ 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu układem 1*H*-benzimidazolu z ugrupowaniem amidowym (seria IVa), hydrazydowym (seria IVb) oraz układem 2-podstawionego 1*H*-benzimidazolu z ugrupowaniem amidowym (seria Va), hydrazydowym (seria Vb).

Spośród 135 zaprojektowanych nowych związków Doktorantka wszystkie zsyntezowała w wyniku kilkietapowych syntez prowadzonych metodami klasycznymi lub przy zastosowaniu syntezatora mikrofalowego. Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie opisywane pochodne są to związki finalne, do syntezy których mgr Marietta Ślusarczyk zsyntezowała wiele

produktów pośrednich, wykonując ogromną pracę laboratoryjną. Wykorzystała do tego dostępną metodologię, którą odpowiednio modyfikowała aby osiągnąć zamierzony cel pracy. Dużo uwagi poświęciła różnym wariantom tworzenia wiązania amidowego (synteza pochodnych amidowych) polegającym na aktywacji grupy karboksylowej kwasu przy użyciu odpowiednich czynników sprzęgających (CDI, T<sub>3</sub>P, HATU, COMU). Pochodne hydrazydowe Doktorantka otrzymała w wyniku trój etapowej syntezy stosując standardowe metody. Strukturę i czystość wszystkich otrzymanych związków Doktorantka poprawnie potwierdziła odpowiednio metodami analizy spektralnej (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR), analizy elementarnej oraz UPLC/MS. Według Recenzenta analiza opisu widm przedstawiona w niniejszej pracy w pełni potwierdza strukturę chemiczną i czystość otrzymanych związków. Szczegółowa analiza danych potwierdza bardzo dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki.

Ad. 2. W analizie lekopodobieństwa z użyciem znanych modeli i narzędzi *in silico* Doktorantka określiła właściwości fizykochemiczne związków za pomocą programu SwissADME oraz właściwości molekularne regułą pięciu Lipińskiego oraz regułą Veber'a. Na podstawie tych analiz mgr Marietta Ślusarczyk otrzymała wiele informacji, których dokładna interpretacja potwierdziła celowość dalszych badań. Badania *in silico* przy użyciu SwissADME pokazały, że zaprojektowane pochodne 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu nie przekraczają bariery krew-mózg, natomiast pochodne 1*H*-benzimidazolu przenikają do ośrodkowego układu nerwowego. Predykcja parametrów fizykochemicznych dla zaprojektowanych związków wskazała na ich dobre właściwości lekopodobne, co było obiecujące dla dalszych badań, a analiza porównująca właściwości fizykochemiczne i cząsteczkowe otrzymanych związków ze związkiem modelowym może być znacząca w aspekcie ich aktywności w stosunku do określonego celu molekularnego.

Ad. 3. Oznaczenie aktywności antagonistycznej względem kanału TRPA1 *in vitro* Doktorantka przedstawiła dla 135 związków. Na podstawie otrzymanych wyników Autorka przedstawiła zależności SAR w omawianych seriach związków, które z pewnością wykorzysta planując kolejne eksperymenty. W grupie amidowych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu (7-26) badania wykazały, że związki generalnie zachowały charakterystyczną dla HC-030031 aktywność antagonistyczną. Natomiast wydłużenie łańcucha alifatycznego z jednowęglowego do trzywęglowego prowadziło do spadku aktywności antagonistycznej (7-10 vs. 21-24). Wśród fenyloacetamidów wprowadzenie do pierścienia fenylowego podstawnika 4-*tert*-butylowego, 4-trifluorometylowego oraz 4-*tert*-butoksykarbonylowego prowadziło do wzrostu aktywności antagonistycznej w porównaniu ze związkami z podstawnikiem 4-izopropylowym (7, 9, 10 vs. HC-030031). Największą

aktywność antagonistyczną, silniejszą od HC-030031 miały fenyloacetamidy z podstawnikami 4-*tert*-butylovym (7), 4-trifluoro-metylovym (9) i 4-*tert*-butoksykarbonylovym oraz 2-fenylopropanamid z podstawnikiem 4-*n*-butylovym (15). W grupie amidowych pochodnych 8-amino-1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu (51-78), największą aktywność, silniejszą od HC-030031 wykazały 8-piperydynowe pochodne (52, 55), odpowiednio z podstawnikami 4-*tert*-butylo-fenylovym oraz 4-*tert*-butoksykarbonylofenylovym. Wydłużenie łańcucha alifatycznego z jednowęglowego do trzywęglowego prowadziło do znacznej utraty aktywności antagonistycznej. Wśród amidowych pochodnych 8-alkoksy-1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu (93-119) najaktywniejsze (ok. 3-krotnie silniejsze od HC-030031) były fenyloacetamidy (94, 102, 103). Pozostałe modyfikacje strukturalne w tej serii prowadziły do spadku aktywności. W grupie hydrazydowych pochodnych 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu (123-134) największą aktywność, nieznacznie wyższą od HC-030031 miał acetohydrazyd (126) oraz 2-propanohydrazyd (129). Wydłużenie łańcucha alifatycznego z jednowęglowego do trzywęglowego prowadziło podobnie jak w analogach amidowych do spadku aktywności antagonistycznej. W grupie hydrazydowych pochodnych 8-metoksy-1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu (141-143) największą aktywność antagonistyczną, silniejszą od HC-030031 miał acetohydrazyd (143) z podstawnikiem 5-*tert*-butylo-2- hydroksylovym. Badania SAR przeprowadzone w grupie amidowych pochodnych 1*H*-benzimidazolu (150-170) wykazały, że zastąpienie 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu układem 1*H*-benzimidazolu, znacznie osłabiło aktywność antagonistyczną. W pozostałych zsyntezowanych grupach Doktorantka nie uzyskała związków o zadowalającej aktywności. Badania biologiczne *in vitro* pozwoliły na wyselekcjonowanie szeregu związków o właściwościach antagonistycznych względem kanału TRPA1. Najbardziej aktywne związki (7, 9, 10, 15, 52, 55, 94, 102, 103, 126, 129, 143) były silniejsze od modelowego HC-030031.

Ad. 4. Sposób potencjalnego wiązania z kanałem TRPA1 Doktorantka wykonała dla czterech wybranych pochodnych (94, 102, 142, 143) przy użyciu modelowania molekularnego. Mgr Marietta Ślusarczyk stwierdziła, że wszystkie badane związki lokują się w miejscu wiążącym, tworzonym przez fragmenty transmembranowe dwóch monomerów, w strukturze tetramerycznej. Układ 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dionu zajmuje zewnętrzną część kieszeni wiążącej i jest stabilizowany wiązaniem wodorowym pomiędzy tlenem grupy karbonylowej w pozycji 2 i Ser-943D, natomiast podstawnik w pozycji 7 wchodzi do wewnętrznej części kieszeni wiążącej. Otrzymane wyniki pozwoliły Doktorantce

na wysunięcie wniosków dotyczących wymagań strukturalnych dla tej klasy antagonistów, zapewniających optymalne wiązanie z tym celem biologicznym.

Ad. 5. Aktywność przeciwbólową i przeciwzapalną w testach farmakologicznych *in vivo* Doktorantka określiła dla wyselekcjonowanych związków (94, 102), których efekt przeciwbólowy w teście formalinowym był ok. 13-krotnie silniejszy od referencyjnego związku HC-030331. Właściwości antyalloodyczne prezentowanych związków w modelach bólu neuropatycznego indukowanego oksalipiatyną, wobec pregabaliny, jako leku referencyjnego w teście von Frey'a były umiarkowane, a w teście zimnej płytki związki wykazały istotne właściwości antyalloodyczne. Z kolei w teście karageninowym wobec ketoprofenu określono aktywność przeciwzapalną (przeciwobrzękową) związków (94, 102), które wykazały silne właściwości przeciwzapalne (przeciwobrzękowe). Aktywność przeciwzapalna badanych związków była wyższa niż referencyjnego związku HC-030031 odpowiednio o 48,2% i 48,3%.

Reasumując, w wyniku modyfikacji strukturalnych modelowego antagonisty mgr Marietta Ślusarczyk uzyskała związki o silniejszych właściwościach blokowania kanału TRPA1 od modelowego HC-030031. Pochodne (94, 102) wykazały w badaniach *in vivo* silniejszy od niego efekt przeciwbólowy i przeciwzapalny.

W części „Wnioski ogólne” Doktorantka krótko przedstawiła wnioski ze swoich badań, które w recenzji zostały omówione wyżej przy poszczególnych celach pośrednich. Wszystkie potwierdzają założony przez Doktorantkę cel pracy i pełną realizację zamierzonych badań. Przedstawiona dokładna analiza ich treści potwierdza dużą wiedzę mgr Marietty Ślusarczyk w obszarze chemii medycznej.

W ocenie Recenzenta uzyskane rezultaty badań stanowią istotne opracowanie naukowe w dziedzinie chemii medycznej i wnoszą wkład w rozwój badań nad poszukiwaniem nowych amidowych i hydrazydowych pochodnych puryno-2,6-dionu i benzimidazolu jako antagonistów kanału TRPA1 o potencjalnej aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej. Do obowiązków recenzenta należy wskazanie zauważonych błędów formalnych, typograficznych, redakcyjnych popełnionych w trakcie przygotowywania manuskryptu rozprawy, a także zasugerowanie rzeczy, które powinny zostać wyjaśnione lub uzupełnione. Moje uwagi dotyczą następujących zagadnień:

- w wykazie skrótów na str. 11 wszystkie nazwy powinny być ujednolicone w języku polskim, skróty CGRP, PBD są wyjaśnione w języku angielskim,
- zapis literatury w tekście w całej pracy powinien być ujednolicony, raz jest np. [19,20] a raz [19-20],

- str. 24 i inne, zapis związków powinien być ujednoczony, albo wszystkie zapisane pogrubieniem albo nie,
- str. 33, brak wyjaśnienia w „Celu pracy” zasadności wykonania analizy lekopodobieństwa zaprojektowanych związków *in silico*,
- str. 46 i inne, na schematach jest brak numeru/nazwy pierwszego substratu,
- str. 53, schemat 4, w syntezie związków 120-122 czy konieczne jest utrzymywanie t.w. mieszaniny przez 20 godzin w zastosowanych warunkach prowadzenia reakcji,
- Recenzent nie znalazł w pracy wyjaśnienia, dlaczego zastosowano jako kontrolę pozytywną pregabalinę (pochodną kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego), która strukturalnie odbiega od syntezowanych przez Doktorantkę związków,
- str. 82 i inne, Doktorantka używa określenia „odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem”, a powinno być oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem,
- str. 114 i inne, brakuje informacji ilu % wodzian hydrazyny użyto do reakcji,
- str. 140, brakuje numeru zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach UJ w Krakowie,
- str. 143-163, bibliografia, brak jest daty wejść przy cytowanych pozycjach ze stron internetowych,

Pragnę jednak podkreślić, że przedstawione uwagi wskazują sugestie, natomiast nie wpływają na wartość merytoryczną recenzowanej pracy.

Mając na uwadze oryginalność oraz wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Marietty Ślusarczyk pt. „Synteza nowych amidowych i hydrazydowych pochodnych puryno-2,6-dionu i benzimidazolu jako antagonistów kanału TRPA1 o potencjalnej aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej” stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane dysertacjom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki jak również w §6 ust. 3 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Marietty Ślusarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Marcin Mączyński, prof. Uczelni