Prof. dr hab. Monika Wujec
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 28.08.2016

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Płoszaj wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Znanych jest wiele sposobów projektowania nowych leków. Dość częstą praktyką jest poszukiwanie aktywnych związków poprzez syntezę analogów związków znanych, o udokumentowanej aktywności. Czasami subtelna zmiana w strukturze cząsteczki powoduje kolosalną zmianę w aktywności biologicznej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pod tytułem: "Synteza i aktywność biologiczna hydrazydu kwasu 5-amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego i jego pochodnych" doskonale wpisuje się w ten nurt.

Nadrzędnym celem pracy była synteza pochodnych izoksazolu o aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest opracowana w sposób klasyczny. Zawiera wprowadzenie, część teoretyczną, będącą uzasadnieniem podjęcia tematu, badania własne, wyniki badań biologicznych, podsumowanie i wnioski. W części wprowadzającej Autorka opisuje znaczenie izoksazolu i jego pochodnych w chemii medycznej, dane literaturowe dotyczące aktywności biologicznej pochodnych izoksazolu, jak też metody syntezy izoksazolu, z uwzględnieniem najnowszych trendów w syntezie organicznej. Ta część pracy została oparta na 147 pozycjach literaturowych.

Uzasadnienie podjęcia kierunku badań opisane jest w sposób wyczerpujący.

Część syntetyczna pracy zawiera optymalizację syntezy wcześniej opisanego przez Rynga i wsp. hydrazydu kwasu 5-amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego. Zoptymalizowane warunki reakcji Pani Paulina Płoszaj opisała w zastrzeżeniu patentowym. Hydrazyd kwasu 5-

amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego posłużył Doktorantce jako substrat do otrzymania N-podstawionych pochodnych hydrazydu w reakcji z odpowiednimi aldehydami oraz do syntezy pochodnych skondensowanych 5-amino-3-metylo-izoksazolo[5,4-d]pirymidyn-4onu. Wszystkie syntezy zostały przeprowadzone w oparciu o wyniki prac prof. Rynga oraz dr Mączyńskiego, z nieznacznymi modyfikacjami syntezy. W przypadku pochodnych skondensowanych optymalizacja warunków reakcji pozwoliła na otrzymanie trzech związków finalnych z wydajnością wyższą o 12-22%. Ponadto, Doktorantka otrzymała również (E)-N-(3-metylo-4H-izoksazolo[5,4-d]pirymidyn-4-on-5-ylo)imidomrówczan etylu, 5-amino-3,6-dimetyloizoksazolo[5,4-d]pyrimidin-4-on oraz (E)-N-(3,6-dimetylo-4-okso-izoksazolo[5,4-d]pirymidyn-5(4H)-ylo)imidooctan etylu. Pochodne te są efektem prób zsyntetyzowania bicyklicznego układu izoksazolo[5,4d]pirymidyn-4-onów w sposób inny niż dotychczas (cyklizując hydrazyd kwasu 5-amino-3metylo-4-izoksazolokarboksylowego ortoestrami, a następnie kondensując z aldehydami). Przeprowadzone syntezy, nie doprowadziły jednak do zamierzonego efektu.

W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na opis eksperymentów. Napisanie, iż mieszanina reakcyjna powinna być utrzymywana w temperaturze nie wyższej niż 145°C jest nieprecyzyjne (synteza związku 5). Dodatkowo, Doktorantka w przypadku związków serii 2 oraz 3 pisze, że czas reakcji wynosił w przypadku pierwszym od 0,5 do 5 godzin i w przypadku związków serii 3 od 1 do 4 godzin. bardziej właściwe byłoby umieszczenie w tabeli lub przy danych fizykochemicznych każdego ze związków czasu reakcji. Nazwy kilku pochodnych są nieprawidłowe tzn. 2j, 3j, 4d, 4e, 4h oraz 6j (powinno być 4j).

Wszystkie otrzymane związki mgr Płoszaj scharakteryzowała fizykochemicznie (temperatura topnienia) i spektralnie (IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR). Drobna uwaga w tym miejscu, stosując skrót dla magnetycznego rezonansu protonowego i węglowego piszemy ^{1}H oraz ^{13}C a nie H1 i C13.

Pani Paulina Płoszaj wykorzystała w swojej pracy program komputerowy PASS. Program ten wykorzystuje podobieństwo struktury nowosyntetyzowanych związków do stosowanych leków i na tej podstawie określa prawdopodobieństwo aktywności biologicznej.

Większość opisanych w pracy związków została sklasyfikowana jako struktury prawdopodobnie aktywne przeciwko *Mycobacterium tuberculosis*.

Badania biologiczne opisane w rozprawie Pani Pauliny Płoszaj obejmowały określenie profilu ekspresji genów w komórce przez strukturę wiodącą i wytypowanie możliwych schematów aktywności biologicznej, zbadanie wszystkich otrzymanych związków w kierunku

aktywności przeciwmykobakteryjnej oraz przeciwbakteryjnej, kompleksowe sprawdzenie toksyczności a także możliwości wiązania pochodnych izoksazolu z albuminami.

Pochodne hydrazydu kwasu 5-amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego posiadają udokumentowane działanie immunomodulacyjne. W związku z tym przeprowadzono badanie ekspresji genowej w panelu obejmującym szeroki zestaw mediatorów pro- i przeciwzapalnych oraz komórek biorących udział w reakcjach autoimmunologicznych.

Zaobserwowano liczne podobieństwa w regulacji genów przez badany hydrazyd oraz leflunomid, użyty jako lek referencyjny. Zaobserwowano również stymulację genów kodujących interleukinę 17F, odgrywającą znaczącą rolę w patogenezie gruźlicy. Stanowiło to dodatkową przesłankę do dalszych badań nad hydrazydem kwasu 5-amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego w panelu przeciwprątkowym.

Aktywność przeciwmykobakteryjna wszystkich otrzymanych związków została zbadana na szczepach *Mycobacterium fortuitum* w standardowym teście oceny aktywności MABA (Microplate Alamar Blue Assay). Wyniki badań eksperymentalnych w większości przypadków pokrywają się z wynikami obliczeń programu PASS. Najbardziej aktywne wobec *Mycobacterium fortuitum* okazały się być pochodne serii 2, dla których wartości MIC wynosiły16 μg/ml dla związków 2e i 2g. Struktura 2e była typowana, jako najbardziej aktywna spośród wszystkich sprawdzonych analizą PASS. Pochodne serii 3 i 4 oraz związki 5, 6, 7 wykazały umiarkowaną aktywność lub brak aktywności w niskich zakresach stężeń.

W Tabeli 4 Doktoranta umieściła obok wartości minimalnych stężeń hamujących również wartości współczynnika podziału logP. Szkoda, że nie ma żadnego komentarza na temat ewentualnych korelacji pomiędzy aktywnością przeciwprątkową a lipofilowością.

Dla związków aktywnych wobec *Mycobacterium fortuitum* (2e, 2h, 2g) przeprowadzono badania toksyczności *in vitro* na dwóch liniach komórkowych: linii ludzkich komórek nabłonkopodobnych płuc A549 oraz linii mysich fibroblastów L929. Badane związki okazały sie być nietoksyczne, co dobrze rokuje dla tej grupy pochodnych.

Pochodne izoksazolo[5,4-d]pirymidyn z uwagi na udokumentowaną aktywność przeciwbakteryjną poddano badaniom aktywności w stosunku do szczepów bakterii gram-ujemnych: *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* oraz gram-dodatnich *Listeria monocytogenes*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*. Również wyjściowy hydrazyd kwasu 5-amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego, jak i jego N-podstawione pochodne poddano badaniom mikrobiologicznym. Aktywność związków

wyrażono podając wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii MIC różnicując MIC_{50} i MIC_{90}.

Niestety, trudno jest stwierdzić na ile badane związki są aktywne ponieważ Autorka podaje stężenie w mg/ml, podczas gdy w metodyce znajdujemy μg/ml.

Z uwagi na fakt, iż albumina jest białkiem odgrywającym ważną rolę w transporcie aminokwasów, kwasów tłuszczowych i leków Pani Paulina Płoszaj zbadała możliwość wiązania hydrazydu kwasu 5-amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego z albuminą wołową BSA. Uzyskane wyniki sugerują, że badany hydrazyd słabo wiąże sie z albuminą.

Ostatnim etapem badań Doktorantki była analiza konformacyjna trzech nowych pochodnych, najbardziej aktywnej z serii 2 - pochodnej 2,4-dichlorofenylowej oraz po jednej pochodnej serii 3 i 4. Obliczenia przeprowadzono, wykorzystując metodę B3LYP oraz bazę funkcyjną 6-311++G(df,pd). Doktorantka przedstawiła w rozprawie opis tylko dla jednego związku, pisząc , że analizę wykonano dla trzech. Dlaczego? Założenie było słuszne, mając obliczenia dla struktury najbardziej aktywne oraz dla 2 nieaktywnych można było spróbować opisać zależności pomiędzy strukturą a aktywnością.

Reasumując, uważam iż praca mgr Pauliny Płoszaj jest przykładem dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej. Autorka przeprowadziła dyskusję wyników, wykazując się przy tym umiejętnością wyciągania adekwatnych wniosków.

Praca doktorska mgr Płoszaj napisana jest poprawnym językiem, jednak Autorka nie ustrzegła sie błędów, o których została poinformowana ustnie. W żaden sposób nie umniejszają one jednak wartości pracy.

Podsumowując, rozprawę doktorską uważam za interesującą oraz nowatorską, spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Pauliny Płoszaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nadanie jej tytułu doktora nauk farmaceutycznych.

Kierownik
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej
Prof. dr hab. Monika Wujec