



prof. dr hab. n. farm. Łukasz Komsta  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
Wydział Farmaceutyczny  
Katedra i Zakład Chemii Leków  
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, tel. 81 4487387, fax 81 4487381

## Recenzja pracy doktorskiej mgr farm. Pawła Kręcisz

### „Opracowanie metod chromatograficznych w optymalizacji projektowania oraz otrzymywania nowych farmaceutyków”

MIMO znacznego poszerzenia wiedzy z zakresu etiologii choroby ALZHEIMERA, współczesna terapia bazuje na leczeniu objawowym, głównie za pomocą takryny, rywastygminy, donepezylu, galantaminy oraz memantyny. Cele molekularne są bardzo ograniczone, a prognozy mówią o wzroście odsetka zachorowań do około 1.2% ogółu populacji w 2050 roku. Już dziś choroba ta odpowiada za połowę przypadków starczej demencji.

W Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi prowadzone są od dawna badania nad pochodnymi takryny, które stanowią potencjalne leki na to schorzenie. Znakowanie ich cząstek radioizotopami może mieć przełomowe znaczenie w diagnostyce poprzez obrazowanie obszarów mózgu, w których stężenie acetylocholiny jest największe.

Przedłożona do recenzji dysertacja mgr farm. PAWŁA KRĘCISZA stanowi część badań realizowanych w tym obszarze. Została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. PAWŁA SZYMAŃSKIEGO oraz dr n. farm. KAMILI CZARNECKIEJ jako promotora pomocniczego.

Rozprawa składa się z dwóch publikacji doświadczalnych (opublikowanych w *Biomedical Chromatography*: IF = 1.9 oraz *Journal of Chromatographic Science*: IF = 1.6), jednej obszernej pracy przeglądowej (opublikowanej w *Bioconjugate Chemistry*: IF = 4.7), jak również liczącego 24 strony polskiego komentarza, zawierającego 62 starannie dobrane pozycje literaturowe.

Pierwsza publikacja dotyczy dziewięciu produktów kondensacji N<sup>1</sup>-(1,2,3,4-tetrahydroacrydino-9-ylo)alkilodiamin o trzech długościach łańcucha alkiloaminy z izomerami kwasu jodobenzoowego o trzech położeniach jodu względem grupy karboksylowej. Prezentuje trzy wątki: spektrofotometryczne badanie  $pK_a$ , chromatograficzne badanie lipofilowości oraz opracowanie i walidację metody oznaczania ilościowego.

Współczynnik  $pK_a$  oznaczony został przez pomiar stosunku różnic absorbancji w określonym zakresie  $pH$ , a następnie wyznaczeniu miejsca zerowego zależności  $pH$  od różnicy pomiędzy  $pH$  i logarytmem tego stosunku. Cytowana praca MUSILA i wsp. w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* znalazła się tutaj prawdopodobnie omyłkowo, ponieważ dotyczy wyznaczania  $pK_a$  z całego widma metodami hard i soft modelling, a tych Autor rozprawy nie stosował. Wyniki  $pK_a$  zostały porównane z wartościami obliczonymi w oprogramowaniu ChemAxon. Nasuwa się kilka pytań, które pomogłyby zinterpretować wyniki nieco szerzej, niż w publikacji:

1. Otrzymano *in silico* identyczne wartości niższego  $pK_a$  dla wszystkich substancji — czy przyczyną tego stanu rzeczy może być coś więcej, niż „similar input data”?
2. Pomiedzy wyższymi i niższymi doświadczalnymi wartościami  $pK_a$  istnieje słaba ujemna zależność korelacyjna na granicy istotności:  $pK_{a2} = 17.6(\pm 2.9) - 0.73(\pm 0.35)pK_{a1}$ ,  $p = 0.07465$ . Czy ma to jakiegokolwiek uzasadnienie teoretyczne?
3. W przypadku doświadczalnych wartości  $\log P$  można dopasować do wyników model zakładający wyjściową lipofilowość (*intercept*) równą  $3.48 \pm 0.03$  oraz zmianę o  $0.3 \pm 0.03$  dla łańcucha dłuższego niż dwa atomy węgla, jak również zmianę o  $0.73 \pm 0.03$  w przypadku innego izomeru niż orto. Model taki wyjaśnia 99.3% całkowitej zmienności w tych wynikach. Dlaczego dodanie czwartego węgla w łańcuchu oraz zmiana izomeru z meta na para nie powoduje zauważalnej różnicy w lipofilowości?
4. Analogiczne modelowanie wyższej doświadczalnej wartości  $pK_a$  pozwala stwierdzić, że wydłużenie łańcucha do 3 lub 4 atomów węgla powoduje niewielkie obniżenie wartości  $pK_a$  o około 0.2 (na granicy istotności,  $p = 0.084$ ). Podobnie, ale zupełnie nieistotnie obniża  $pK_a$  izomer inny niż orto (o ok. 0.15;  $p = 0.21$ ). Model taki wyjaśnia tylko około 50% zmienności. Niższa doświadczalna wartość  $pK_a$  wykazuje wyłącznie istotną na granicy zmianę w przypadku izomerów para, średnio o  $0.23 \pm 0.097$ ,  $p = 0.077$ . Jak można to zinterpretować?
5. Jak zinterpretować fakt braku istotnej korelacji ( $p = 0.29$ ) pomiędzy  $pK_a$  doświadczalnym i obliczonym oraz pomiędzy  $\log P$  doświadczalnym i obliczonym ( $p = 0.58$  dla ChemAxon oraz  $p = 0.31$  dla ALOGP)?

W publikacji wykonano także walidację oznaczenia ilościowego oraz badanie stabilności części otrzymanych substancji. Chociaż sekcja 2.4 podaje użycie wyłącznie substancji 3b oraz 9Cl-THA i 6C-4-NH (domyślam się, że są to zanieczyszczenia), w dalszej części opisu i wyników pojawiają się również substancje 3a i 2c do badania selektywności metody. Analizę prowadzono izokratycznie, brak szczegółów dotyczących planu optymalizacyjnego wykorzystanego w badaniach. Dobór analitycznej długości fali wykonano na podstawie widm substancji zarejestrowanych w użytej fazie ruchomej.

Walidacja wskazuje wyłącznie na ilościową aplikację metody do substancji 3b i jest wykonana zgodnie z wszystkimi wymogami. Metoda posłużyła do oceny stabilności substancji 3b wykazując, że jest stabilna w obecności kwasu, zasady i utleniacza przez 48h, praktycznie nie rozkłada się w ciągu 8h w temperaturze 60°C, zaś rozkłada się pod wpływem światła UV w ciągu 8h, formując 6 produktów rozkładu, których struktury warto wyznaczyć w dalszych badaniach.

Druga publikacja dotyczy optymalizacji gradientu dla chromatografii *flash* na podstawie wstępnych eksperymentów na cienkiej warstwie. Doktorant zaproponował nową metodę, której kluczowym etapem jest wyznaczenie dla każdego związku takiego stężenia modyfikatora, dla którego wartość  $R_F$  jest zbliżona do 0.25 i taka jest traktowana jako optymalna. Po uwzględnieniu dodatkowej ilości eluentu wymaganej do przejścia przez całą kolumnę, istnieje możliwość skonstruowania gradientu w sposób najkorzystniejszy.

Stężenie modyfikatora modelowane jest na podstawie zmiennej nazwanej  $CV$  (*column volumes*) będącej odwrotnością współczynnika  $R_F$ . Badana jest zależność stężenia modyfikatora  $\varphi$  od  $CV$  według nowatorskiego równania  $\varphi = \varphi_0(CV)^a = \varphi_0(1/R_F)^a$ . Skuteczność wykazano na przykładzie

zachowania chromatograficznego czterech z badanych pochodnych tetrahydroakrydyny oraz mieszanin takryny lub tiorydazyny z karbamazepiną. Uzyskano lepsze rozdzielenie i kształt pików od gradientu optymalizowanego przez dedykowane oprogramowanie do użytkowanego sprzętu.

Aplikacyjność zaproponowanej metody została w pełni potwierdzona, zaś od strony teoretycznej nasuwają się następujące pytania i wnioski:

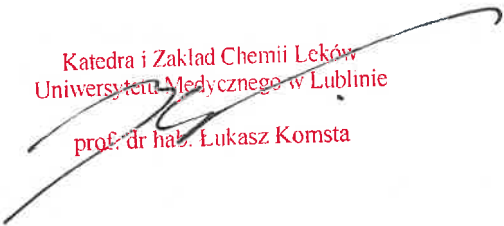
1. Równanie z publikacji:  $k = k'_0 X^{-m}$  jest niezlogarytmowaną formą równania SOCZEWIŃSKIEGO-WACHTMEISTERA:  $\log k = \log k_0 - mX$ . Dlaczego Doktorant nie zastosował tej powszechnej (zwłaszcza np. w wyznaczaniu lipofilowości) formy, z której mógłby znacznie łatwiej (regresja liniowa) określić pożądane stężenie modyfikatora?
2. Współczynnik  $CV$  jest w rzeczywistości wartością  $k$  zwiększoną o 1: skoro  $k = (1 - R_F)/R_F$ , to  $R_F = 1/(k + 1)$ , a więc  $1/R_F = k + 1$ . Jak można uzasadnić wybór zwiększonego o 1 współczynnika w przypadku modelowania nieliniowego równania bez wyrazu wolnego:  $\varphi = \varphi_0(1/R_F)^a$ ? W takim przypadku współczynnik  $\varphi_0$  oznacza stężenie modyfikatora konieczne do osiągnięcia  $R_F = 1$ , co teoretycznie nie jest wykonalne, a w praktyce może dawać wartości znacznie większe niż 100%.
3. Skoro  $(1/R_F) = (R_F)^{-1}$ , to równanie można modelować bezpośrednio z wartości  $R_F$  przez zmianę znaku  $a$ :  $\varphi = \varphi_0(R_F)^{-a}$ . Po zlogarytmowaniu obu stron równania dostajemy liniową zależność  $\log \varphi = \log \varphi_0 - aR_F$  i wystarczy do tego regresja liniowa. Dlaczego nie została tutaj zastosowana?
4. Poprzez użycie wartości  $k$  zwiększonej o 1 rozwiązanie zastosowanego równania względem  $k$  daje wynik:  $k = \sqrt[a]{\varphi/\varphi_0} - 1$ , co nie jest zależnością tożsamą z modelem SOCZEWIŃSKIEGO. Gdyby modelować oryginalne  $k = (1/R_F) - 1$ , równanie rozwiązałoby się bez końcowej jedynki:  $k = \sqrt[a]{\varphi/\varphi_0} = (\varphi/\varphi_0)^{(1/a)}$ , co po zlogarytmowaniu stronami dałoby zależność liniową:  $\log k = (\log \varphi)/a - (\log \varphi_0)/a$ . Równanie zawiera logarytm stężenia modyfikatora, czyli jest tożsame z wersją log-log (a nie semilogarytmiczną) równania SOCZEWIŃSKIEGO-WACHTMEISTERA.
5. Podstawowym celem gradientu jest zwykle (być może paradoksalnie) zmniejszenie różnic pomiędzy czasami retencji, czyli pogorszenie selektywności. Jaki jest dokładnie cel w opisanej metodzie chromatograficznej?



Trzecia publikacja stanowi bardzo obszerne i wartościowe review na temat peptydów i przeciwciał znakowanych izotopowo w medycynie. Omawia metody znakowania izotopami i używane radionuklidy. Przedstawia najnowsze badania dotyczące receptorów: somatostatyny, peptydu uwalniającego gastrynę, integrynowych, glukagonopodobnego peptydu 1, chemokinowych. W dalszej części omówione są znakowane przeciwciała monoklonalne oraz inne cele, których znakowanie ma znaczenie medyczne. Praca zawiera również przegląd prób klinicznych wraz ze statystykami.

Rozprawa stanowi wyraźnie wyodrębnioną część większego projektu badawczego i zawiera wszystkie wymagane oświadczenia współautorów. Dostrzegam w opublikowanych wynikach spory potencjał i przewiduję istotne zainteresowanie publikacjami przez inne grupy badawcze. Można również spodziewać się wielu cytowań pracy przeglądowej.

**Podsumowując, praca doktorska mgr Pawła Kręciszka spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, zawiera istotne elementy nowości naukowej i wnioskuję o dopuszczenie Doktora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Katedra i Zakład Chemii Leków  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
prof. dr hab. Łukasz Komsta

Lublin, 30 grudnia 2021.