

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr farm., inż. Jakub Mikołajewski

Kinetyka przemiany treosulfanu i jego epoksytransformerów w warunkach *in vitro*

Treosulfan (TREO) jest prolekiem należącym do cytostatyków alkilujących, stosowanym od lat 80. XX wieku w kilku krajach europejskich w terapii drugiego rzutu zaawansowanego, platynoopornego raka jajnika. Dzięki właściwościom mieloablacyjnym i relatywnie niskiej toksyczności narządowej, w 2019 roku został zarejestrowany w całej Unii Europejskiej do terapii kondycjonującej przed allogenicznym przeszczepieniem macierzystych komórek krwiotwórczych. Aktywność farmakologiczną TREO warunkują jego epoksy pochodne (EBDM i DEB), które powstają kolejno w wyniku dwuetapowej, wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej. Reakcja ta ma charakter nieenzymatyczny i może zachodzić zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*, a jej szybkość uzależniona jest od warunków pH i temperatury.

Celem niniejszej pracy było zbadanie kinetyki rozkładu TREO, EBDM i (±)-DEB w zakresie pH 1 – 12 i temperaturze 40 – 80 °C, w tym wyznaczenie profili $\log k_{pH} = f(pH)$ i parametrów termodynamicznych reakcji.

Do oznaczania TREO, EBDM i (±)-DEB w roztworach wodnych wykorzystano metodę HPLC z detekcją refraktometryczną. Przeprowadzona walidacja metody potwierdziła jej selektywność liniowość, precyzję (współczynnik zmienności 0,7 – 8,7%) oraz dokładność (błąd% 0,1 – 5,3%). Granica oznaczalności dla TREO, EBDM i (±)-DEB wynosiła odpowiednio 20,0, 34,8 i 50,0 $\mu\text{mol/L}$. W ramach badań kinetycznych rozkład związków prowadzono w roztworach wodnych HNO_3 (pH 1,0 i 2,0), buforze octanowym (pH 4,0 i 5,0), fosforanowym (pH 6,0 i 7,5) i węglanowym (pH 9,0 i 10,0) oraz roztworach NaOH (pH 11,0 – 12,3) o temperaturze 40 – 80 °C oraz sile jonowej 0,16 mol/L. Wszystkie badane reakcje przebiegały zgodnie z modelem procesu pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Po raz pierwszy wykazano, że w roztworze o pH < 5,0 TREO rozkłada się głównie na drodze hydrolizy neutralnej pod wpływem wody, tym samym wykazując największą trwałość. Powyżej pH 5,0 dominujący udział w rozkładzie proleku miała reakcja wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej, prowadząca do powstania EBDM. Monoepoksyd ulegał hydrolizie katalizowanej jonami H^+ w zakresie pH 1,0 – 4,0. EBDM był najbardziej trwały w zakresie pH

pH 4,0 – 5,0, w którym ulegał głównie hydrolizie neutralnej. Powyżej pH 5,0 dominujący udział w rozkładzie EBDM miała jego przemiana do DEB, stanowiąca drugi etap aktywacji TREO. (±)-DEB ulegał hydrolizie katalizowanej jonami H^+ i OH^- w pH odpowiednio $< 4,0$ oraz $> 10,0$. W zakresie pH 4,0 – 10,0 związek posiadał największą trwałość. Ponadto reakcje rozkładu EBDM i (±)-DEB podlegały ogólnej katalizie kwasowo-zasadowej – efekt katalityczny wykazywały składniki wszystkich buforów wykorzystywanych w badaniach. Wykresy Arrheniusa wyznaczone na podstawie uzyskanych stałych szybkości reakcji hydrolizy TREO i jego epoksydów (k_{H_2O} , k_{H^+} , k_{OH^-}) oraz aktywacji (epoksydacji) TREO do EBDM (k_1) i EBDM do DEB (k_2) charakteryzowały się wysokimi współczynnikami korelacji liniowej ($R > 0,9965$). Wyznaczone wartości energii aktywacji (E_a) dla reakcji TREO \rightarrow EBDM i EBDM \rightarrow DEB wynosiły odpowiednio $120,0 \pm 2,0$ i $107,5 \pm 7,9$ kJ/mol i były zbliżone do energii naprężenia pierścienia epoksydowego (116 kJ/mol). Hydroliza neutralna TREO charakteryzowała się wyższą E_a (114,2 kJ/mol) niż analogiczna reakcja busulfanu (wartość literaturowa E_a 80,0 kJ/mol), co można tłumaczyć większymi zawadami przestrzennymi w sąsiedztwie wiązania sulfonowego TREO. Wysokie wartości współczynników częstotliwości dla przemiany TREO \rightarrow EBDM i EBDM \rightarrow DEB odzwierciedlały wewnątrzcząsteczkowy charakter tych reakcji. Wyznaczone profile $\log k_{pH} = f(pH)$ i wykresy Arrheniusa pozwalają na przewidywanie trwałości TREO i jego epoksytransformerów w roztworach wodnych w szerokim zakresie temperatury i pH.

Poznań, dn. 23.11.2021

Jelena Mikolajczyk