

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Łysakowskiej
pt. „Nowe analogi nukleotydów zawierające naturalne
i modyfikowane nukleozasady” przedłożonej Radzie Wydziału
Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
celem uzyskania stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych**



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,
pod kierunkiem prof. dr hab. Doroty Piotrowskiej.

Obserwowany wzrost długości życia sprawia, że narastającym problemem stają się choroby, których częstość występowania i dotkliwość zależą od wieku pacjenta. Jedną z takich grup schorzeń są choroby nowotworowe. Chociaż dużym postępowaniem było poznanie genetycznych podstaw rozwoju nowotworów, to niezrozumiała heterogenność tych chorób, działania niepożądane dostępnych leków oraz lekooporność, nadal stanowią duży problem w optymalizacji skutecznych form walki z rakiem. Z podobnymi wyzwaniami mierzy się świat nauki zgłębiając problem zakażeń wirusowych. Masowe migracje ludności sprzyjają przenoszeniu wirusów poza ich naturalne granice występowania. Jednocześnie wzrasta ryzyko przenoszenia patogenu ze zwierząt na człowieka.

W świetle powyższego, podjęcie badań przez panią Magdalenę Łysakowską nad syntezą związków o potencjalnej aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej jest wysoce uzasadnione. Punktem wyjścia do sformułowania celu rozprawy doktorskiej były wyniki badań zespołu Zakładu Chemii Bioorganicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, realizowanych we współpracy z Instytutem Badań Medycznych Rega Katolickiego Uniwersytetu w Leuven (Belgia), nad analizą zależności między strukturą a aktywnością przeciwwirusową i przeciwnowotworową, w grupie izoksazolidynowych analogów nukleotydów.

Układ rozprawy jest typowy dla tego typu opracowań; składa się ze wstępu, wprowadzającego w tematykę pracy, celu pracy, omówienia wyników, wniosków, części eksperymentalnej, wykazu aktualnego piśmiennictwa. Całość poprzedzono wykazem najważniejszych skrótów, użytych w pracy oraz zestawieniem osiągnięć naukowych – Doktorantka jest współautorem 3 publikacji, w tym 2 oryginalnych publikacji, o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 6,348 oraz 9 doniesień zjazdowych.

Wprowadzając w przedmiot rozprawy, Autorka wykazała się znajomością strategii syntezy pochodnych chinazolino-2,4-dionów oraz dokonała przeglądu literatury, wskazując na wielokierunkową aktywność biologiczną preparatów opartych na rdzeniu chinazolino-2,4-dionu. W zależności od schematu podstawienia, związki te wykazują m.in. aktywność przeciwnowotworową, przeciwwirusową, przeciwbakteryjną. Potwierdza to zasadność wyboru chinazolino-2,4-dionu, jako struktury uprzywilejowanej, w podjętych przez siebie badaniach.

Cel swoich badań pani Magdalena Łysakowska zdefiniowała jako syntezę nowych izoksazolidynowych analogów homonukleotydów oraz ocenę ich aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej *in vitro* wobec wybranych linii komórkowych.

Doktorantka zaprojektowała oraz przy użyciu metod klasycznej syntezy organicznej otrzymała trzy serie nowych pochodnych. Zaplanowane modyfikacje strukturalne dotyczyły 2 fragmentów – nukleozasady i fragmentu pseudocukrowego. Zróżnicowanie strukturalne w obrębie nukleozasady polegało na wprowadzeniu analogów zasad purynowych, pirymidynowych oraz różnie podstawionych układów heterocyklicznych (seria I), fragmentów 3-benzoilo- i 3-benzyl- chinazolino-2,4-dionu (seria II) oraz analogów 1-benzyl- chinazolino-2,4-dionu (seria III); w serii II i III fragmenty benzylove dodatkowo modyfikowano przez wprowadzenie atomu fluoru. We wszystkich seriach

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Chemii

Farmaceutycznej

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 54 50

fax +48 12 620 54 58

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

fragment cukrowy stanowiła izoksazolidyna, oddalona przez mostek metylenowy od nukleozasady i dodatkowo podstawiona w pozycji N1 grupą metylową lub benzylową.

Zakres badań syntetycznych obejmował otrzymanie nitronów **16a** i **16b**, które posłużyły jako czynniki różnicujące w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji z *N*-allilowanymi nukleozasadami. W ten sposób otrzymano 42 nowe związki finalne. Choć zróżnicowanie stosowanych procesów chemicznych – reakcje kondensacji, *N*-alkilacji, cykloaddycji, nie wykracza poza typowe procedury chemii organicznej, to wyizolowanie zaplanowanych związków, w kilku przypadkach w czystej postaci izomerów *trans* i *cis*, wymagało staranności oraz dobrego opanowania technik laboratoryjnych. Warto podkreślić, że w ramach pracy Autorka przeprowadziła optymalizację warunków otrzymywania 1-allilochinazolino-2,4-dionu. Najwyższe wydajności otrzymano w reakcji odpowiednio podstawionego bezwodnika izatynowego z mocznikiem, prowadząc proces w temperaturze wrzenia *N,N*-dimetyloformamidu.

Czystość otrzymanych związków Doktorantka potwierdziła chromatograficznie (metodą TLC), a struktura chemiczna, w sposób nie budzący zastrzeżeń, została potwierdzona przez Doktorantkę przy użyciu metod magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H-, ¹³C-, ³¹P-NMR. Ustalenie konfiguracji względnej dla modelowych związków *cis*-**76a** i *trans*-**77a**, stosując widma dwuwymiarowe NOESY, umożliwiło analizę konfiguracji związków finalnych. Interesująca wydaje się obserwacja Doktorantki, że w przypadku wszystkich serii związków w przewodzie postawał izomer *trans*. Wyizolowanie przez Doktorantkę 6 czystych izomerów *trans* oraz 2 izomerów *cis* otwiera możliwość bezpośredniego porównania aktywności dwóch par izomerów *cis*-**86c** i *trans*-**87c** oraz *cis*-**88a** i *trans*-**89a**.

Ocenę aktywności biologicznej nowosyntetyzowanych izoksazolidynowych pochodnych analogów homonukleotydów prowadzono w ramach współpracy z Instytutem Badań Medycznych Katolickiego Uniwersytetu w Luven, w zespole prof. J. Balzariniego i prof. D. Scholsa. Ocenę potencjału przeciwwirusowego testowano wobec szerokiej gamy, łącznie 22 wirusów RNA i DNA, m.in. wirusa opryszczki pospolitej typu 1 i 2, wirusa ospy wietrznej-półpaśca, wirusa cytomegalii (CMV), retrowirusa typu 1, wirusa grypy A (H1N1 i H3N2), wirusa niedoboru odporności typu 1 i 2 (HIV-1 i HIV-2), a ocenę aktywności przeciwnowotworowej wobec wybranych linii komórkowych – białaczki mysiej (L1210), ludzkiej białaczki z limfocytów T (CEM), raka szyjki macicy (HeLa) oraz śródbłonna naczyniowego skóry człowieka (HMEC-1).

Pomimo, że preparaty serii I i II wykazały aktywność przeciwwirusową, przykładowo związki *cis*-**76r**, *trans*-**77r**, *cis*-**92d/trans**-**93d** względem wirusów ospy wietrznej-półpaśca, związek *cis*-**76l/trans**-**77l** względem cytomegalowirusa, związek *trans*-**87c** wobec wirusów opryszczki pospolitej typu 1 i 2, adenowirusa typu 2 i kononawirusa, to preparaty te charakteryzują się niższym lub porównywalnym profilem bezpieczeństwa do substancji referencyjnych. Związki serii I i II wykazały umiarkowaną aktywność względem linii nowotworowych, w porównaniu do 5-fluorouracylu. Brak oceny wpływu testowanych związków względem komórek normalnych, wyklucza możliwość oceny potencjału grupy w kontekście jej dalszego rozwoju. Związki należące do serii III zostały przekazane do badań biologicznych.

Wywiązując się z obowiązku recenzenta, potwierdzam wysoką staranność w opracowaniu i prezentacji wyników badań. Rozprawa została napisana precyzyjnym i przystępnym językiem, nie budzącym zastrzeżeń co do stylu, choć nie pozbawionym kilku drobnych błędów. Uwagi dotyczą określeń zastosowanych w części doświadczalnej. Nieprawidłowo zastosowano określenie „wygląd produktu”, które należałoby zastąpić sformułowaniem „postać produktu”. W preparatyce organicznej warstwę organiczną „osuszamy”, a nie „wysuszamy” za pomocą soli nieorganicznych typu siarczan sodu. Ponadto uzasadnionym wydaje się uszczegółowić w jaki sposób zatężano roztwory organiczne (str. 128).



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Chemii

Farmaceutycznej

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 54 50

fax +48 12 620 54 58

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

Poniżej przedstawiam kilka uwag edytorskich oraz merytorycznych dotyczących monografii, które wymagają wyjaśnienia i mogą posłużyć w realizacji dalszych badań:

- 1) „założenia i cel pracy” należałoby wyodrębnić jako oddzielny rozdział, a nie jak w obecnej formie, gdzie stanowią część rozdziału „Badania własne”,
- 2) wg jakich przesłanek dokonano wyboru nukleozasad, projektując cząsteczki serii 1?
- 3) celem ułatwienia analizy danych zasadnym wydaje się włączenie do tabel 9–12 wzorów ogólnych związków; wydaje się to szczególnie przydatne w analizie zależności między strukturą a aktywnością,
- 4) czy układ chinazolin-2,4-dionu można nazwać pierścieniem (str. 22)?
- 5) w kontekście zastosowanych modyfikacji strukturalnych (wiązanie C–P, funkcja estrowa) zaprojektowane związki powinny wykazywać stabilność względem fosfataz oraz enzymów metabolizujących; czy podjęto próby oceny stabilności wybranego przedstawiciela serii dietoksyfosforylowych pochodnych homonukleotydów metodami *in vitro*?
- 6) wydaje się, że podanie właściwości biologicznych dla związków referencyjnych **7a-b**, **64–67** pozwoliłoby na szerszą analizę wpływu fragmentu chinazolinowego na aktywność nowosyntetyzowanych połączeń,
- 7) w świetle zaprezentowanej analizy wyników badań biologicznych względem wirusów lub linii komórek nowotworowych, nasuwa się pytanie, kiedy możemy mówić o specyficznej aktywności przeciwwirusowej oraz przeciwnowotworowej?
- 8) czy można wytłumaczyć brak różnicy w aktywności między izomerami *cis*- i *trans*-?

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani Magdaleny Łysakowskiej, stanowiąc opracowanie badań chemiczno-biologicznych w grupie izoksazolidynowych analogów homonukleotydów o potencjalnych właściwościach przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych, potwierdza opanowanie przez Autorkę warsztatu badawczego w zakresie syntezy organicznej, analizy spektralnej oraz oceny wyników testów biologicznych. Powyższe uwagi nie umniejszają wartości rozprawy i mojej pozytywnej oceny.

Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zatem zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Łysakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 04.02.2019 r.

Prof. dr hab. Paweł Zajdel
Zakład Chemii Leków
Katedra Chemii Farmaceutycznej UJCM
tel. 012 620 54 59
e-mail : pawel.zajdel@uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Chemii

Farmaceutycznej

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 54 50

fax +48 12 620 54 58

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl