



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

ul. Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-30  
fax: 61 854-66-39  
e-mail: syntezy@ump.edu.pl

Poznań, dnia 28 stycznia 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: **Nowe analogi nukleotydów zawierające naturalne i modyfikowane nukleozasady**

Imię i nazwisko: **mgr Magdalena Łysakowska**

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: **Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi**

Promotor: **prof. dr hab. Dorota G. Piotrowska**

Tematyka badawcza, podjęta przez Panią mgr Magdalenę Łysakowską w pracy doktorskiej, mieści się w zakresie szeroko rozumianej chemii medycznej, w tym chemii bioorganicznej, opierając się na zaawansowanych metodach syntezy chemicznej, fizykochemicznych i biologicznych. Jest rozwijana od kilku lat z bardzo interesującymi rezultatami w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem promotora niniejszej pracy, Pani prof. dr hab. Doroty Piotrowskiej. Sformułowany w temacie pracy obszar badań, dotyczący **nowych analogów nukleotydów zawierających naturalne i modyfikowane nukleozasady**, z jednej strony dotyka szeregu zagadnień szczegółowych zmierzających do poszerzenia wiedzy na temat chemii pochodnych i analogów nukleotydów, a w szerszym znaczeniu poznania chemii związków, które są unikalnymi elementami budulcowymi kwasów nukleinowych o kluczowej funkcji biologicznej. Przeprowadzone badania stwarzają tym samym liczne perspektywy aplikacyjne dla zastosowań w naukach medycznych i farmaceutycznych. Modyfikowane nukleotydy znane są od kilkudziesięciu lat, ale wciąż odkrywają przez badaczami wiele tajemnic, zarówno w obszarze syntezy chemicznej, właściwości fizykochemicznych, jak i biologicznych. Szczególnie ciekawe i często zaskakujące, bo wciąż trudne do przewidzenia na drodze modelowania komputerowego, są systematycznie odkrywane właściwości zarówno przeciwnowotworowe, jak i przeciwwirusowe analogów nukleotydów. Z tego względu tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę jest bardzo aktualna, a dokonany wybór tematu uważam za bardzo uzasadniony. Podjęte zagadnienia i wysoki poziom przeprowadzonych badań może też skłaniać do głębszej refleksji, w którym kierunku podąża chemia elementów budulcowych kwasów nukleinowych, ile jest jeszcze ciekawych odkryć przed nami. Ta refleksja jest poparta także tym, że minęło ponad 40 lat od opublikowania w *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* przez późniejszą laureatkę Nagrody Nobla, Gertrude Belle Elion i współautorów, artykułu o odkryciu właściwości przeciwwirusowych acyklowiru, co dało znaczący impuls do dokonanych później, ale i dokonywanych obecnie odkryć w obszarze leków przeciwwirusowych.

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Łysakowskiej stanowi spójne tematycznie 188 stronicowe opracowanie, które zostało napisane bardzo poprawnym językiem naukowym. Doktorantka na początku dysertacji zawarła kilka ważnych informacji dotyczących osiągnięć naukowych. Dowiadujemy się więc, że jest współautorką opublikowanych artykułów w *Archiv der Pharmazie*, *Wiadomościach Chemicznych* oraz *European Journal of Medicinal Chemistry*, a także 9 komunikatów konferencyjnych. Praca doktorska zawiera wszystkie wymagane rozdziały tj. wstęp, część literaturową, badania własne zawierające zdefiniowane założenia pracy, podsumowanie wyników, wnioski, część doświadczalną, oraz piśmiennictwo. Na początku pracy został umieszczony wykaz najważniejszych skrótów. Kolejność rozdziałów w rozprawie i cytowane piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Rozprawa zawiera starannie przygotowane: 33 rysunki, 30 schematów i 19 tabel, które znacznie ułatwiają zrozumienie omawianych wyników. Piśmiennictwo liczy 134 odnośniki literaturowe, które zostały odpowiednio dobrane i odnoszą się do czasopism naukowych, spośród których 88 zostało opublikowanych w bieżącym stuleciu. Warto podkreślić, że Doktorantka sięgnęła bardzo wnikliwie do źródeł naukowych, często dość odległych czasowo, jak np. *Journal für praktische Chemie* z 1910 r.

Doktorantka dokonała właściwego wyboru tematyki do **Wstępu**, w którym omówiła rolę analogów nukleozydów jako najliczniejszej grupy związków stosowanych w leczeniu różnego typu nowotworów oraz zwalczaniu infekcji wirusowych. Pani Magister zwróciła uwagę na rozmach jaki dokonał się w poszukiwaniach nowych analogów nukleozydów w ostatnich 30 latach, związany z ich wykorzystaniem w leczeniu chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Podkreśliła rolę badań związanych z poszukiwaniami nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej i przeciwwirusowej w kontekście rosnącej oporności, ograniczonej selektywności i towarzyszących efektów ubocznych. Dużą część opisu, co jest zrozumiałe, poświęciła wprowadzeniu do tematyki nukleozydów i nukleotydów ze zmodyfikowaną izoksazolidynową częścią cukrową, a także aktywności związków zawierających w strukturze chinazolino-2,4-dion.

**Część literaturowa** rozpoczyna się od wprowadzenia do budowy chemicznej, metod otrzymywania i właściwości biologicznych, w tym farmakologicznych pochodnych chinazolino-2,4-dionu. Doktorantka omówiła bardzo szczegółowo metody syntezy tego układu. Następnie przedstawiła leki pochodne chinazolino-2,4-dionu. Bardzo ciekawie omówiła właściwości i syntezy leków o już ustalonej renomie w farmakologii, jak zenarestat i ketanseryna. Następnie, w kolejnych podrozdziałach przedyskutowała zależności struktura aktywność dla wybranych aktywnych pochodnych chinazolino-2,4-dionu o działaniu przeciwnowotworowym (m.in. co warto podkreślić, zauważając kluczową w obecnie prowadzonych badaniach rolę szlaku sygnałowego Wnt), przeciwwirusowym, przeciwbakteryjnym, hipotensyjnym i o działaniu na OUN. Przedstawiony materiał literaturowy został starannie zebrany, stanowiąc tym samym zwarte oraz kompletne kompendium, które sprawia, że podjęte w dalszych częściach pracy zagadnienia, badania własne i podsumowanie wyników oraz wnioski wydają się naturalnie wpisywać w poruszane problemy.

Zdefiniowane na końcu **Wstępu** i w pierwszym podrozdziale **Badań własnych, Założenia projektu i cel pracy** objęły zaprojektowanie, otrzymanie i przeprowadzenie pełnej charakterystyki fizykochemicznej oraz biologicznej izoksazolidynowych analogów nukleozydów i nukleotydów oraz chinazolino-2,4-dionów. W założeniu Doktorantki połączenie zasady z pseudocukrem poprzez mostek metylenowy miało zapewnić trwałość

enzymatyczną związku, z kolei zastąpienie wiązania O-P wiązaniem C-P miało zagwarantować odporność na działanie fosfataz, zaś dalsze przeprowadzenie kwasu fosfonowego w ester miało poprawić lipofilowość. Ocena aktywności przeciwnowotworowej i przeciwwirusowej miała zostać przeprowadzona we współpracy z Katolickim Uniwersytetem w Leuven w Belgii. W mojej ocenie jako miejsce badań biologicznych wybrano jedno z najlepszych laboratoriów na świecie, prowadzone wcześniej przez prof. Jana Balzariniego, a obecnie prof. Dominique Scholsa. Należy podkreślić, że zaproponowane badania w świetle dostępnej literatury i przeprowadzonej na jej podstawie analizy struktura-aktywność zbliżonych strukturalnie związkw wydawały się jak najbardziej racjonalne.

Prace badawcze zostały przeprowadzone wg dobrze przemyślanego schematu, obejmującego zaprojektowanie docelowych związkw chemicznych, wykonanie i zoptymalizowanie ich syntezy chemicznej, łącznie z wydzieleniem i charakterystyką fizykochemiczną oraz biologiczną. Punktem wyjścia do syntezy było przygotowanie odpowiednich pochodnych nitronów, które następnie zostały użyte wraz z N-allilowanymi związkami heterocyklicznymi w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji, prowadzącej do dwóch serii *cis*- i *trans*- izoksolidynowych analogów homonukleotydów. W tym miejscu warto zwrócić uwagę na bardzo kompleksowe, z punktu widzenia później planowanych badań biologicznych, przygotowanie dużej serii N-allilonukleozad, opartych nie tylko na naturalnych purynach i pirymidynach, ale także heterocyklach. Należy podkreślić, że do otrzymania tej liczącej 19 związkw serii, Doktorantka zastosowała różne warianty reakcji alkilowania, które specjalnie na potrzeby prowadzonych procesów modyfikowała i skalowała z użyciem: różnych rozpuszczalników, zasad, temperatur, jedno- lub dwufazowego medium reakcyjnego, a także z zastosowaniem grup ochronnych. W reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Doktorantka otrzymywała mieszaniny diastereoizomerycznych *cis*- i *trans*- izoksolidynowych analogów homonukleotydów, których skład określała z użyciem widm  $^{31}\text{P}$  NMR w surowych mieszaninach poreakcyjnych, a następnie posługując się chromatografią kolumnową wydzieliła wybrane czyste izomery *cis* i *trans* oraz ich mieszaniny. Otrzymane związki zostały poddane wnikliwej analizie NMR z użyciem widm jedno- i dwuwymiarowych. Bardzo ciekawe są wyniki badań NMR, które pozwoliły na ustalenie konfiguracji względnych serii *cis*- i *trans*-izoksazolidyn. Metodologię zastosowaną do ustalenia konfiguracji jednej pochodnej, opierającą się na eksperymencie NOESY, zastosowała do przeanalizowania konfiguracji względnych pozostałych pochodnych. Zastanawiam się, czy Doktorantka swoją analizę widma NOESY ograniczyła do przeanalizowania sprzężeń dipolarnych pomiędzy wzbudzonymi atomami, czego rezultatem były omówione w dyskusji sygnały korelacyjne, czy też rozważała określanie lokalnych konformacji poprzez analizę wicynalnych stałych sprzężeń spinowo-spinowych  $J$  (równanie Karplusa), czego nie ujęła w dyskusji? Chciałbym też zwrócić uwagę Doktorantki, że poza możliwymi zmianami konformacji pierścienia izoksazolidynowego, bardzo ciekawa jest kwestia charakterystyki konformacji wokół wiązania glikozydowego pomiędzy pseudocukrem a zasadą. W kolejnym etapie Doktorantka przetestowała we współpracy z ośrodkiem zagranicznym uzyskane związki wobec szerokiej gamy wirusów DNA i RNA, stosując jako związki referencyjne uznane leki przeciwwirusowe. Uzyskane wyniki aktywności przeciwwirusowej badanych związkw określiła wartościami  $\text{EC}_{50}$ , dodatkowo podając wartości stężeń wywołujących redukcję wzrostu komórek, na których oznaczono cytotoksyczność związkw  $\text{CC}_{50}$  oraz minimalne stężenie substancji, przy którym dochodzi do zmian morfologicznych MCC. Najwyższą, mikromolową aktywność odnotowała dla homonukleotydów *cis* i *trans*

pochodnych 3-benzoilochinazolino-2,4-dionu, względem wirusa ospy wietrznej-półpaśca. Warta zauważenia jest 4-5 krotnie wyższa aktywność uzyskanych pochodnych, w porównaniu do związków referencyjnych (acyklowir, brywudyna), względem mutantów VZV pozbawionych kinazy tymidynowej (szcypy VZV TK<sup>-</sup>). Bardzo wysoką mikromolową aktywność względem dwóch szczepów cytomegalowirusa w porównaniu ze związkami referencyjnymi (gancyklowir, cydofowir), wykazały także odpowiednie mieszaniny diastereoizomerycznych izoksazolidyn pochodnych 5,6-dimetylobenzimidazolu i 3-acetyloindolu. Dopełnieniem bardzo wnikliwych studiów w zakresie aktywności przeciwwirusowej, były dalsze badania aktywności cytostatycznej, wykonane na trzech liniach komórek nowotworowych, podczas których dla badanych związków określono stężenie hamujące proliferację komórek w 50% IC<sub>50</sub> względem referencyjnego 5-fluorouracylu. Rozszerzeniem serii izoksazolidyn z pierścieniem 3-benzoilochinazolino-2,4-dionu o wysokiej aktywności względem wirusa VZV, było otrzymanie analogów ze zmodyfikowaną nukleozasadą, zawierających w pozycji N3 pierścienia chinazolino-2,4-dionu grupę benzoilową lub benzyloową, a także analogów ze zmodyfikowanym pierścieniem izoksazolidyny, w których grupę metyloową w pozycji N2 zastąpiono podstawnikiem benzylovym. Warto podkreślić bardzo ciekawą dyskusję dotyczącą preparatyki i skalowania syntezy półproduktu, 1-allilochinazolino-2,4-dionu, a także serii jego 3-benzoilu i 3-benzylo pochodnych. W tym miejscu proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, jakie przesłanki kierowały doborom czynników acylujących i alkilujących, są to bowiem związki zawierające fluor. Czy Doktorantka kierowała się przesłankami literaturowymi, odnoszącymi się do roli fluoru w strukturze potencjalnych API? Od kilku lat bowiem zwraca się uwagę na efekty wywoływane przez fluor w strukturze API, w odniesieniu do oddziaływań we wnękach farmakoforowych i enzymatycznych, wpływie na transport czynny i bierny, a tym samym rolę w poprawie właściwości farmakinetycznych i farmakodynamicznych substancji aktywnych farmaceutycznie? Na stronie 58, w rozdziale 3.3.4. Doktorantka poruszyła kwestię zasadności zamiany grypy benzoilowej na benzyloową w pozycji 3 fragmentu chinazolino-2,4-dionu. Czy Doktorantka dysponuje danymi literaturowymi lub badaniami własnymi na poparcie tezy, że owa wymiana wpływa na poprawę rotacji, mniejsze zawady przestrzenne w obrębie badanego lub zbliżonego strukturalnie motywu strukturalnego? Uzyskane związki, zarówno czyste izomery *cis* i *trans*, jak i mieszaniny diastereoizomerycznych izoksazolidyn *cis/trans* zostały poddane badaniom biologicznym w kierunku aktywności przeciwwirusowej i cytostatycznej. Na podkreślenie zasługuje wysoka mikromolowa aktywność wybranych przedstawicieli tych związków względem wirusa VZV, tylko 4-6 razy niższa od referencyjnego acyklowiru względem szczepów TK<sup>+</sup> i aż 10-14 razy wyższa względem szczepów TK<sup>-</sup>. Dodatkowo, stwierdzono że mieszaniny diastereoizomerycznych izoksazolidyn *cis/trans*, pochodne posiadające w pozycji N3 pierścienia chinazolino-2,4-dionu grupę benzyloową hamowały na poziomie mikromolowym namnażanie cytomegalowirusa. Aktywność ta była znacząco wyższa niż wcześniej opisanych analogów N-metyloizoksazolidynowych. Warta podkreślenia jest jeszcze aktywność przeciwwirusowa izoksazolidynowego analogu homonukleotydowego z podstawnikiem 4-fluorobenzylowym ukierunkowana na różne szczepy HSV-1 i 2 oraz adenowirusa typu 2 oraz ludzkiego koronawirusa. Należy zauważyć, że w całej serii *cis*- i *trans*-izoksazolidyn wyższą aktywność antyproliferacyjną wykazały pochodne posiadające w pozycji N3 chinazolino-2,4-dionu grupę benzyloową w miejscu benzoilowej. Wielodyscyplinarne badania nabierały coraz większego tempa, a Doktorantka w trakcie realizacji pracy stawiała sobie nowe cele. Ostatnia część badań, dotyczyła zaprojektowania i uzyskania serii

izoksazolidynowych analogów homonukleotydów, zawierających jako modyfikowaną nukleozasadę pierścienia chinazolino-2,4-dionu, w którym dokonano zamiany podstawników pomiędzy pozycjami N1 i N3, uzyskując tym samym nowe analogi 1-benzylchinazolino-2,4-dionu połączonego z izoksazolidyną przez atom azotu N3. Związki te zostały przekazane do oceny aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej. W całym rozdziale **Badań własnych** Doktorantka krytycznie dyskutowała różne ograniczenia prowadzonych syntez, procesów rozdzielczych i charakterystyki fizykochemicznej. Sprawia to, że niniejsza dysertacja, z uwagi na staranność przeprowadzonych eksperymentów i ich opisu nie zamyka i nie wyczerpuje tematu, ale otwiera ciekawe perspektywy badawcze na przyszłość.


W rozdziale **podsumowanie wyników badań objętych rozprawą doktorską** Pani Magister dokonała skrupulatnego omówienia najważniejszych wyników, które dodatkowo zostały zebrane w kolejnym rozdziale **Wnioski** w 17 punktach. W **części doświadczalnej** zawarła dokładny opis preparatyki związków uzyskanych w pracy wraz z ich charakterystyką fizykochemiczną. Niemal każdy z nowo uzyskanych związków został scharakteryzowany z użyciem temp. topnienia, IR,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR oraz analizy elementarnej.

Zwracam uwagę na drobne kwestie, które pojawiły się podczas czytania pracy i poproszę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony, podobnie jak do dwóch podniesionych wcześniej w recenzji zagadnień o charakterze dyskusyjnym: (i) W podpisach rycin – nazwa części sugerowana od rysunek, warto stosować określenie budowa chemiczna w miejsce struktura, gdyż określenie to częściej rezerwują do opisu krystalografowie, (ii) s. 14 i s. 40 – Czy zdaniem Doktorantki zastosowana funkcja estrowa dotyczy kwasu fosfonowego czy fosforylowego?, (iii) s. 40 i s. 81 oraz inne miejsca w pracy – Czy zdaniem Doktorantki w reakcji 1,3-dipolarnej addycji związki określane jako 16a-b są N-podstawionymi C-(dietoksyfosfonylo)nitronami, czy C-(dietoksyfosforylo)nitronami?, (iv) Doktorantka, często używa w pracy słowa syntetyzować, to galizm (fr. *synthétiser*), zalecam po prostu syntezować, (v) Czy do rozdziału diastereoizomerów brano pod uwagę żel krzemionkowy o innej granulacji np. Silica gel 60 (0,040-0,063)?, (vi) 6.2.2. - Czy brak sygnału grupy aminowej w widmie  $^1\text{H}$  NMR wynika z faktu jego nałożenia z sygnałem resztkowym rozpuszczalnika użytego do rejestracji widma  $\text{CDCl}_3$ , czy też wynika z wymiany z wodą obecną w próbce?, (vii) 6.4. - Czy w preparatyce, podczas oczyszczania związku, toluen dodano po odparowaniu DMF? Czy celem dodania toluenu było wysuszenie suchej pozostałości w kolbie po odparowaniu DMF?

Treść rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Łysakowskiej jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Podjęty cel pracy został wzorcowo zrealizowany w części eksperymentalnej, przedstawiony w badaniach własnych i posumowaniu wyników, a także zebrany we wnioskach. Hipoteza zawarta na początku badań dotycząca w szerokiej perspektywie znalezienia potencjalnych **nowych analogów nukleotydów zawierających naturalne i zmodyfikowane nukleozasady** na styku stosowania zaawansowanych metod chemii medycznej wydawała się bardzo racjonalna. W miarę postępu prac badawczych została bardzo pozytywnie zweryfikowana i doprowadziła do interesujących wniosków. Dane eksperymentalne uzyskane w badaniach biologicznych dla nowych związków zostały także krytycznie omówione w kontekście światowego piśmiennictwa i odniesione do stosowanych standardów terapeutycznych. Uzyskane wyniki i ich dyskusja mają więc duże znaczenie aplikacyjne i poznawcze, wnosząc tym samym ważne przesłanki do projektowania nowych związków aktywnych farmaceutycznie,

o potencjalnym zastosowaniu w terapii, przede wszystkim chorób wirusowych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska posiada następujące płaszczyzny pozwalające ją analizować jako nowatorską: (i) podjęcie zagadnień bardzo aktualnych naukowo i społecznie poprzez włączenie się w nurt poszukiwania nowych i skuteczniejszych leków przeciwwirusowych, (ii) zastosowany nowoczesny warsztat badawczy, zarówno pod względem doboru reakcji i reagentów, technik syntetycznych, charakterystyki fizykochemicznej i biologicznej oraz (iii) duży potencjał poznawczy i aplikacyjny przeprowadzonych badań związany z opracowaniem kilkunastu związków aktywnych przeciwwirusowo, które mogą stać się przyczynkiem do kontynuacji prac o znaczeniu dla nauk podstawowych, ale także do nawiązania kooperacji z sektorem farmaceutycznym.

**Reasumując uważam, że Pani mgr Magdalena Łysakowska doskonale zmierzyła się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazała się bardzo dobrą znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym. Moja wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia wiedzy przez Doktorantkę z zakresu chemii medycznej, syntezy organicznej i farmakologii. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 - O stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki - Dz.U. RP nr 65, poz. 595 z 2003 r. wraz z późniejszymi zmianami, w tym Ustawą z dnia 28 kwietnia 2017 r. – O zmianie ustawy o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – Dz.U. RP poz. 859 z 2017 r., dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Łysakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z wnioskiem o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.**

  
prof. dr hab. Tomasz Gośliński