

Gdańsk, 08.07.2024

Recenzja pracy doktorskiej mgr Roksany Trznadel zatytułowanej „Synteza nowych pochodnych gemcytabiny o charakterze pronukleotydów i hybryd molekularnych oraz badania ich aktywności cytotoksycznej” wykonanej w Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydów Wydziału Chemii UAM pod kierunkiem prof. dr hab. Lecha Celewicza.

Nukleozydy i ich pochodne ze względu swój udział m.in. w syntezie kwasów nukleinowych, są szeroko stosowane w biomedycynie. Z tego powodu wiele z nich znalazło zastosowanie jako leki blokujące wzrost komórek nowotworowych i replikację wirusów. Są one niezwykle efektywnymi chemoterapeutykami, niestety z powodu pojawiania się komórkowej oporności na leki nukleozydowe/nukleotydowe, istnieje ciągła potrzeba opracowywania syntezy ich nowych pochodnych. Z powodu złożoności struktury chemicznej przejawiającej się m.in. w obecności wielu reaktywnych grup funkcyjnych oraz centrów asymetrii, synteza pochodnych nukleozydów i nukleotydów przyczyniła się do rozwinięcia wielu procedur syntetycznej chemii organicznej umożliwiających selektywne blokowanie lub modyfikowanie określonych fragmentów ich struktur. „Wąskim gardłem” farmakologicznego zastosowania pochodnych nukleozydów jest fakt, że są one aktywne dopiero po 5'-O-fosforylacji (docelowo 5'-O-trifosforylacji). Niestety, w większości wypadków pochodne nukleozydów są słabymi substratami dla wewnątrzkomórkowych kinaz, co znacząco ogranicza ich potencjał farmakologiczny. Fosforylacja pochodnej nukleozydu na etapie syntezy chemicznej nie jest wyzwaniem syntetycznym, jednakże generuje problem niemożności przekroczenia bariery błony komórkowej przez obdarzoną ładunkiem ujemnym pochodną nukleotydową. Rozwiązaniem tego wydawałoby się wewnętrznie sprzecznego problemu okazała się koncepcja tzw. proleków/pronukleotydów, gdzie ujemny ładunek grupy fosforanowej będący głównym ograniczeniem przenikalności przez błonę komórkową, jest w pewnym sensie maskowany przez labilne fizjologicznie ugrupowanie amidofosforanowe wprowadzane na etapie syntezy chemicznej do struktury pronukleotydu.

W ten nurt badań wpisuje się dysertacja mgr Roxany Trznadel. Większość zaprezentowanej w niej wyników dotyczy syntezy nowych pronukleotydowych pochodnych analogów gemcytabiny–2',2'-difluoro-2'-deoksycytydyny, przeciwnowotworowego leku cytostatycznego z grupy antymetabolitów pirymidynowych. Praca została wykonana w Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydów Wydziału Chemii UAM pod kierunkiem prof. dr hab. Lecha Celewicza, posiadającego wieloletnie doświadczenie w syntezie pochodnych nukleozydów i oznaczaniu ich aktywności biologicznej. Ponieważ nowotwory stały się jednym z głównych zdrowotnych problemów cywilizacyjnych, badania przeprowadzone przez Doktorantkę wpisują się w aktualne problemy współczesnej syntezy organicznej i szeroko rozumianej biomedycyny.

Głównym celem dysertacji było zaprojektowanie i zoptymalizowanie syntezy nowych analogów gemcytabiny, wpisujących się w koncepcję pronukleotydów, czyli związków, które dopiero po przekroczeniu bariery błony komórkowej uwalniają aktywny biologicznie metabolit-modyfikowany nukleotyd. Badania prezentowane przez Doktorantkę wpisują się w nurt poszukiwania nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych.

Formalna ocena dysertacji. Recenzowana rozprawa napisana jest na 479 stronach (jest niezwykle obszerna), zawiera 4 numerowane rozdziały (Przegląd literaturowy-obszerny str. 33-145, Cel pracy, Dyskusja wyników i Część eksperymentalna) oraz dodatkowe nienumerowane rozdziały (Streszczenie- nie ujęte w spisie treści, Spis treści, Wykaz skrótów i symboli, Wstęp, Przegląd literaturowy, Podsumowanie, Wykaz cytowanej literatury (636 pozycji) oraz Wykaz dorobku naukowego powstałego w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej). Układ pracy nie jest całkiem typowy dla dysertacji chemicznych. Bezpośrednio po Wstępie, Przeglądzie literaturowym i Celu pracy, Doktorantka prezentuje uzyskane wyniki w rozdziale Dyskusja wyników. W rozdziale tym znajduje się też opis wybranych zagadnień związanych z oznaczaniem aktywności farmakologicznej związków. Dopiero po nim następuje Część eksperymentalna zawierająca opis stosowanych metod i charakterystykę fizykochemiczną uzyskanych związków. Przypomina to układ często stosowany w publikacjach naukowych. Idea Doktorantki nie zaburza spójności zaprezentowanego materiału badawczego. Rozmiary dysertacji można by było zredukować usuwając np. część materiału nie związanego bezpośrednio z badaniami prowadzonymi przez Doktorantkę, jak np. podstawowe informacje o budowie kwasów nukleinowych, część dotyczącą

bioortogonalnej chemii click czy informacje nt. DNAzymów. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie co Doktorantka miała na myśli pisząc (str. 34): „*Pod względem budowy chemicznej DNAzymy nie stanowią stricte kwasu nukleinowego. Są one bowiem tzw. oligonukleotydami, czyli krótkimi odcinkami DNA...*”-czyli są kwasami nukleinowymi.

Merytoryczna ocena dysertacji. W rozdziale Dyskusja wyników Doktorantka przedstawia cel swoich badań i dyskutuje uzyskane wyniki. Głównym celem dysertacji była synteza i optymalizacja jej parametrów nowych analogów gemcytabiny (2',2'-difluoro-2'-deoksycytydyny, dFdC), w celu otrzymania nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych wpisujących się w koncepcję pronukleotydów/proleków. Zamierzeniem Doktorantki było otrzymanie związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej, jednakże o lepszym profilu farmakologicznym od znanych pochodnych gemcytabiny. Synteza takich analogów wymagała od Doktorantki dobrej znajomości chemii nukleozydów, gdyż konieczne było wprowadzenie selektywnych osłon na grupy 5'- i 3'-hydroksylowe pierścienia deoksyrybofuranozowego, a dodatkowo ochrony egzocylicznej grupy (Doktorantka często stosuje określenie „funkcji”) 4-aminowej cytozyny. Z wyników prezentowanych przez Doktorantkę wynika, że dobrze panuje ona nad „chemią wprowadzania i deprotekcji” semipermanentnych grup ochronnych takich jak benzoilowa (Bz), benzoksykarbonylowa (Cbz), butoksykarbonylowa (Boc), izopropylloksykarbonyloksymetylowa (POC) czy tertbutylodimetylosililowa (TBDMS). Doktorantka wykazała się też znajomością „chemii fosforu”, co umożliwiło jej selektywne wprowadzenie ugrupowania 5'-*O*-amidofenylo(lub chlorofenylo)fosforanowego, a następnie jego substytucję na amidowym atomie azotu. Pomimo tego, że Doktorantka stosowała znane procedury syntezy, to w wielu przypadkach wymagały one modyfikacji czy optymalizacji. Należy też docenić przedstawienie przez Doktorantkę swoich „syntetycznych niepowodzeń”, gdyż są to również cenne informacje dotyczące możliwości modyfikowania nukleozydów. Poza umiejętnościami związanymi z syntezą organiczną, Doktorantka wykazała się także znajomością technik umożliwiających charakterystykę fizykochemiczną i strukturalną uzyskanych przez siebie związków (IR, UHPLC/ESI MS, MALDI QTOF, ¹H, ¹³C ¹⁹F ³¹P NMR). Umożliwiło to Doktorantce identyfikację uzyskanych produktów, rozwiązanie niektórych zagadek/problemów związanych z syntezą tych związków czy scharakteryzowania niektórych ich aspektów strukturalnych. Doktorantka w wielu wypadkach

zamieściła też informacje nt. stabilności (możliwości przechowywania) zsyntezowanych analogów. Stosując metody *in silico* Doktorantka wyznaczyła wybrane parametry fizykochemiczne zsyntezowanych pronukleotydów korelujące w ramach reguły Lipińskiego z ich aktywnością farmakologiczną. Wyznaczono wartości następujących parametrów: log współczynnika podziału (logP), liczby akceptorów wiązania wodorowego (HBA), liczby donorów wiązania wodorowego (HBD) oraz topologicznej powierzchni polarnej (TPSA). Doktorantka scharakteryzowała również aktywność cytotoksyczną i przeciwnowotworową zsyntezowanych związków na wybranych liniach komórkowych. W ramach współpracy z zespołem dra Piotra Ruskowskiego z Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Doktorantka scharakteryzowała również aktywność cytotoksyczną i przeciwnowotworową zsyntezowanych związków na wybranych liniach nowotworowych (HeLa, KB, A549, U87, HepG2) oraz zdrowej linii ludzkich fibroblastów (HDF). W ramach tych badań wyznaczyła także parametr selektywności, co jest niezwykle istotne w kontekście toksyczności związków przeciwnowotworowych. Dysponując takim zestawem danych, Doktorantka dokonała analizy QSAR umożliwiającej skorelowanie wprowadzonych modyfikacji strukturalnych z aktywnością przeciwnowotworową pronukleotydu. Umożliwiło to Doktorantce wyciągnięcie wniosków nt. tego które modyfikacje są obiecujące w kontekście aktywności przeciwnowotworowej, a które ścieżki syntezy można zarzucić.

Drugą serią modyfikacji gemcytabiny, którą eksplorowała Doktorantka były hybrydowe-dinukleotydowe połączenia z pochodnymi tymidyny i cytydyny. W tym wypadku Doktorantka wykorzystwała chemię click do połączenia obu nukleozydów, stosując odpowiednią kombinację grup ochronnych (Boc, Cbz, Poc) grup 5'/3'-OH i 4-NH₂ gemcytabiny, a następnie wprowadzając w pozycje 5'- i 4- ugrupowanie alkinowe-propargil, z wykorzystaniem łączników węglanowo diestrowych i uretanowych (karbaminianowych). Oba są stosunkowo labilne w warunkach fizjologicznych. Mimo kilku niepowodzeń w syntezie, Doktorantce udało się otrzymać zaplanowane związki hybrydowe oraz kilka „nadmiarowych” nieplanowanych struktur. Doktorantka napotkała też problemy przy syntezie niektórych substratów, a także podczas samej reakcji click. Pokazuje, to, że (parafrazując opis reakcji click Sharplessa) nawet tak „proste, łatwe i przyjemne” reakcje jak click, nie zawsze przebiegają zgodnie z oczekiwaniem eksperymentatora.

Doświadczenie Doktorantki w posługiwaniu się technikami strukturalnymi (NMR) pozwoliło m.in. na identyfikację nietypowych i nieoczekiwanych produktów, takich jak hybrydowe diynowe pochodne dinukleotydów. Doktorantka potrafiła wyciągnąć wnioski z tych niepowodzeń modyfikując warunki reakcji lub zaprzestając kolejnych prób, gdy zmiana warunków okazywała się nieskuteczna. W tej części pracy, Doktorantka wykazała się umiejętnościami syntezy chemicznej odpowiednio dobierając grupy ochronne reaktywnych grup funkcyjnych oraz optymalizując warunki reakcji w celu otrzymania zaprojektowanych struktur. W tym miejscu chciałbym poprosić Doktorantkę, aby w odpowiedziach na uwagi recenzenta odniosła się do ograniczeń stosowalności łącznika 1,2,3-triazolowego w syntezie potencjalnych leków. Czy Doktorantka takowe dostrzega?

Doktorantka zsyntezowała także serię chronionych 5'-*O*-fosfortriestrowych pochodnych gemcytabiny wykorzystując ditrazolofosforan *p*-chlorofenyłu. Pochodne takie maskują ładunek ujemny generowany przez grupę fosforanową, utrudniający transport związku przez błonę komórkową. I tu uwaga - formalnie pochodna z przyłączoną metforminą (zw. 548, jakkolwiek interesująca z uwagi na aktywność biologiczną) formalnie nie jest triestrem (Schemat 83). Docenić należy pomysłowość Doktorantki pozyskania metforminy z popularnego leku diabetycznego, a nie kupienie komercyjnego związku. 5'-*O*-fosfortriestrowe pochodne (zwłaszcza pochodna zawierająca resztę metforminy) charakteryzowały się większą cytotoksycznością wobec linii komórek nowotworowych, niż natywna dFdC czy inne niemodyfikowane pochodne nukleozydów zastosowane jako związki odniesienia. Co warte podkreślenia, w większości wypadków pochodne te wykazywały znacznie większą cytotoksyczność wobec wybranych linii komórek nowotworowych (HeLa, KB, A549, U87, HepG2), niż wobec „zdrowej” linii ludzkich fibroblastów (HDF). Jest to jedno z podstawowych wymagań jakie stawia się przed związkami przeciwnowotworowymi o potencjalnym zastosowaniu farmakologicznym.

Zsyntezowana została także (po kilku nieudanych próbach) 2,3'-anhydropochodna (mostkowana) gemcytabiny. Doktorantka założyła-rozsądnie, że pochodna taka umożliwi łatwe otrzymanie (stereoselektywnie) 3'-azydo - oraz 5'-*O*-fosforanowych (bez konieczności blokowania grupy 3'-OH) pochodnych gemcytabiny. Rzeczywistość syntezy organicznej zweryfikowała pierwotne założenia Doktorantki. Udało się jej otrzymać mostkowaną 2,3'-anhydropochodną gemcytabiny, jednakże o innej strukturze, niż pierwotnie zakładała. Co ciekawe, jej aktywność

była wyższa (choć nie wobec wszystkich linii komórkowych) od wzorcowych/kontrolnych nukleozydów. Wybrane analogi z obu tych grup charakteryzowały się lepszymi parametrami aktywności biologicznej w stosunku natywnej gemcytabiny, co potwierdziło słuszność idei wprowadzenia zaprojektowanych modyfikacji w strukturę gemcytabiny. Podsumowując tą część recenzji muszę stwierdzić, że Doktorantka wykonała ogromną pracę syntezując i charakteryzując fizykochemicznie oraz oznaczając aktywność ok. 160 nowych (niewielką ich część Doktorantka resyntezyowała w oparciu o wyniki uzyskane w ramach swojej pracy magisterskiej) pochodnych gemcytabiny.

Doceniając dużą wiedzę syntetyczną Doktorantki i ogrom pracy włożony w syntezę i badania pochodnych gemcytabiny, w trakcie recenzowania dysertacji nasunęło mi się kilka krytycznych uwag. Mimo, że praca napisana jest poprawnym językiem, Doktorantka w kilku miejscach nie ustrzegła się zastosowania niefortunnnych zwrotów lub żargonu laboratoryjnego. Przykłady:

Str. 156 ...odbezpieczoną (niechronioną byłoby lepszą opcją) w pozycji 5' pochodną gemcytabiny...

Str 157 ...reakcja uwalniania protekcji TBDMS...; ...wprowadzenie grupy Cbz na funkcję (lepszą opcją byłoby na grupę) NH_2 ...

Str 160 przebieg reakcji z udziałem soli Cu(II) był bardzo czysty; ...jednostka podstawiona na funkcjach 5'-OH oraz 4- NH_2 ...

str 163 (i inne) Zamiast używania terminu funkcja (fosforanowa, Cbz, hydroksylowa czy aminowa) (np.) lepiej zastosować określenie grupa

str. 197 Hydrolizę benzoili prowadzono...; ...zsyntetyzowano najwydajniej.

Str. 200 ...zmniejszenie generowanego balastu ; ...z zachowaniem ostrożnego spadku gradientu; ...zarejestrowano deprotonowany pik...

Str. 245. W tym celu do eksperymentu zaangażowano bufory...; ...sporządzono dwa skrajne układy... ; Str 262. ...wyizolowany scalony produkt...

Str. 263 (i inne) Po 10 minutach argonowania... lub w innym wariantcie ...plukanie/przepłukiwanie argonem

Uwagi merytoryczne do zaprezentowanych wyników badań Doktorantki.

Str 160,260. W wypadku analizy TLC na płytce ze znacznikiem fluorescencyjnym, brak fluorescencji nie jest spowodowany jej gaszeniem lecz fizycznym maskowaniem (przykryciem) fluoroforu przez analit, co blokuje promieniowanie UV. Efekt końcowy jest taki sam (ciemna plama), lecz mechanizm jest inny.

Str. 164 ...zastosowano 5 ekwiwalentów nukleofilowego katalizatora w postaci 1,2,3-triazolu (321)- to nie jest 1,2,3-triazol

Str. 246. Rys. 69 nie pokazuje warunków testu, a jedynie fiolki zawierające próbki. Chyba, że Doktorantka ma na myśli fakt, że ciemne szkło, z którego wykonano fiolki, nie dopuszczają światła do próbek. Bez obniżenia wartości merytorycznej pracy można było nie prezentować tego rysunku.

Str. 175/176 Podczas syntezy pochodnej z n-propylowym nośnikiem (?)...

Str. 250,260,262. W wyniki zaplanowanej kondensacji alkinowych i azydkowych komponentów- click nie jest reakcją kondensacji.

Str. 272/271. ...z utworzeniem pochodnej gemcytabiny notabene w postaci homodimeru... Związek 533 (na rys. 71) pomimo tego, że zawiera dwie reszty gemcytabiny nie jest homodimerem

Str. 319. Analizę (dot. UHPLC) przeprowadzono z udziałem 12 minutowego programu- czy to jest opis zastosowanego gradientu?

Str. 321 (i inne) Doktorantka pisze: „Mieszaninę (zawierającą głównie DMF) pozostawiono w atmosferze gazu obojętnego. Po tym czasie zatężono ją na wyparce rotacyjnej.” Co było źródłem próżni? Pompka wodna nie pozwoli usunąć tego rozpuszczalnika. W jaki sposób Doktorantce udało się odparować „do sucha” roztwór DMF-u?

Str. 430 Doktorantka podała błędne nazwy związków chem.: Synteza 4-azydobutanu etylu (538) powinno być:4-azydobutylrylanu etylu; Synteza chlorku 4-azydobutanowego (540)-w tytule brakuje informacji, że jest to chlorek kwasu...

Praca jest przygotowana bardzo dobrze pod względem edytorskim. Jedyne drobne uwagi dotyczące edycji to: Rys.54 -używanie żółtego koloru do oznaczania czegokolwiek z powodu małego kontrastu/intensywności nie jest dobrym rozwiązaniem; Rys. 70. Widma IR są zbyt małe lub zbyt mało kontrastowe aby odczytać jakiegokolwiek wartości

Reasumując, Doktorantka postawiła w swojej dysertacji przed sobą ambitne cele z zakresu zaawansowanej syntezy organicznej i je zrealizowała. Wykazała się przy tym nie tylko ogromną wiedzą z zakresu syntezy organicznej, lecz również potrafiła tą wiedzę efektywnie wykorzystać rozwiązując pojawiające się w trakcie eksperymentów problemy. Mgr Roxana Trznadel może wykazać się także dorobkiem naukowym. Jest współautorką 2 publikacji naukowych z tzw. listy filadelfijskiej (w jednej z nich jest pierwszym autorem), jednej „nieimpaktaktorowanej”, 3 artykułów monograficznych i 2 zawartych w materiałach konferencyjnych. Doktorantka prezentowała również w postaci komunikatów ustnych wyniki swoich badań na konferencjach międzynarodowych (trzykrotnie) i krajowych (sześciokrotnie). Sześciokrotnie prezentowała również swoje dokonania naukowe w postaci posterów. Jedno z jej ustnych wystąpień konferencyjnych zostało wyróżnione. Jest także laureatką stypendium Rektora UAM dla najlepszych studentów (2019/2020). Jako doktorantka i uczestniczka projektu INNChem uzyskała 27-miesięczne stypendium naukowe. Pokazuje to, że mgr Roxana Trznadel jest młodym lecz już ze sporym doświadczeniem naukowcem, wykazującym się dużą dozą samodzielności.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja mgr Roksany Trznadel zawiera istotne elementy nowości naukowej, a także spełnia ustawowe (zgodnie z art. 13 ust. 1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Wydziału Chemii UAM o dopuszczenie mgr Roxany Trznadel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Piotr Mucha