

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Roksany TRZNADEL
pt. „Synteza nowych pochodnych gemcytabiny o charakterze pronukleotydów i hybryd
molekularnych oraz badania ich aktywności cytotoksycznej”**

Praca doktorska mgr Roksany TRZNADEL została przygotowana pod kierunkiem Pana Dr. hab. Lecha CELEWICZA, Prof. Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w Zakładzie Chemii Medycznej UAM.

W zespole badawczym prof. Lecha CELEWICZA prowadzone były od wielu lat badania syntezy nukleozydów, nukleotydów i ich analogów, oraz badania ich właściwości biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych zastosowań jako związków przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych.

Nukleozydy i nukleotydy, składniki DNA i RNA, a przede wszystkim ich analogi, od dziesiątek lat badane są jako potencjalne źródło leków o właściwościach cytostatycznych i przeciwwirusowych. Analogi nukleozydów i nukleotydów mogą być substratami dla enzymów metabolizujących kwasy nukleinowe i ich komponenty, albo ich inhibitorami, albo mogą i w inny jeszcze sposób zaburzyć metabolizm komórkowy stwarzając organizmowi pacjenta szansę na odzyskanie homeostazy. Zasadniczym problemem tego podejścia medycznego jest obserwowana wysoka toksyczność tego typu leków względem komórek normalnych (za niski indeks selektywności – SI), a przede wszystkim przeżywalność komórek nowotworowych opornych na zastosowany lek, będąca źródłem wznowy choroby nowotworowej, bo nowotwory nie tylko nie są jednorodne genetycznie ale charakteryzuje je w tym względzie wysoka zmienność.

Profesor Lech CELEWICZ i jego współpracownicy w Zakładzie Chemii Medycznej UAM badają te problemy od lat. Próbuje, na drodze modyfikacji analogów, których właściwości antynowotworowe zostały już rozpoznane, zwiększyć ich aktywność i selektywność działania, a poprzez wykorzystanie koncepcji tzw. proleków zwiększyć ich stabilność w organizmie pacjenta, jednocześnie ułatwić ich przenikanie przez błony komórkowe.

Zasadniczym celem pracy doktorskiej mgr Roksany TRZNADEL było opracowanie syntezy grupy proleków będących pochodnymi gemcytabiny, czyli znanego od lat analogu cytydyny (2',2'-difluoro-2'-deoksycytydyny), które miałyby wyższy indeks selektywności, lepszą biodostępność i utrzymywałyby dłużej efekt terapeutyczny w organizmie pacjenta. Doktorantka swoją uwagę skupiła przede wszystkim na chronionych (blokowanych) 5'-fosforanowych pochodnych gemcytabiny.

W swojej pracy doktorskiej podjęła zatem dwie koncepcje budowy nowych związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym: proleków nukleozydów (pronukleotydów) oraz molekuł bifunkcyjnych (tzw. *twin drugs*) otrzymanych przede wszystkim na drodze addycji ugrupowania alkinu do grupy azydkowej w reakcji Huisgena.

W tym momencie należy podkreślić fakt, że właściwości biologiczne praktycznie wszystkich otrzymanych przez Doktorantkę związków zostały zbadane pod kątem ich cytotoksyczności na

wielu nowotworowych liniach komórkowych. Badania te przeprowadził Pan dr Piotr RUSZKOWSKI z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, z którym Prof. CELEWICZ współpracuje od wielu lat.

Rozprawa doktorska mgr TRZNADEL zawiera wstęp, bardzo obszerną część literaturową, cele pracy, wyniki badań własnych z dyskusją (Dyskusja wyników), podsumowanie, część doświadczalną, oraz spis literatury (636 pozycji) i jest poprzedzona streszczeniem w języku angielskim oraz spisem treści, oraz skrótów. Praca została opisana na 476 numerowanych stronach i nie zawiera spisu schematów, rysunków oraz tabel. Układ pracy jest tradycyjny.

Część literaturowa rozprawy doktorskiej jest bardzo obszerna i obejmuje m. in. zwięzłe omówienie budowy kwasów nukleinowych, wpływu zastąpienia atomów wodoru atomami fluoru na właściwości biologiczne tak modyfikowanych związków, które stanowią coraz szerzej wykorzystywane przez współczesną medycynę zasób substancji leczniczych. Zakres szczegółowych zagadnień, którym Doktorantka poświęciła najwięcej miejsca i uwagi to omówienie koncepcji proleków, szczególnie w wariacie *Pro-Tide*. Przegląd dotychczas opisanych w literaturze przykładów tej koncepcji zajmuje najwięcej miejsca. Jest to rzetelne i kompetentne wprowadzenie dla prezentacji wyników badań własnych opisanych w kolejnym rozdziale pracy doktorskiej.

Pani mgr Roksana TRZNADEL zrealizowała liczne szczegółowe cele pracy doktorskiej. Nie sposób ich wszystkich wymienić, bo rzeczywiście liczba nowych pochodnych, które otrzymała jest imponująca. To bardzo dobry przykład badań z obszaru chemii medycznej.

Ogólny wzór docelowych związków, które otrzymała mgr TRZNADEL to 5'-fosforanowe alkilobądź L-alanyloamidodiestry aryłowe gemcytabiny. Etapem wstępnym wszystkich syntez było przygotowanie odpowiednich substratów nukleozydowych do 5'-fosforylacji. Autorka zdecydowała się, o ile to było możliwe, wprowadzać zaplanowane grupy blokujące korzystając ze ścieżek syntezy prowadzących bezpośrednio do zaplanowanych pochodnych. Nie zawsze było to skuteczne i dlatego wykorzystywała w tej preparatyce pośrednie blokady silylowe, *tert*-butylodimetylo- lub trimetylosilylowe. Użyłem określenia „grup blokujących” i dalej zamierzam z niego korzystać, chociaż w badaniach prowadzonych przez zespół prof. CELEWICZA i koncepcji proleków jako takiej, te tzw. grupy blokujące mają pełnić funkcje „bioochronne”, chronić potencjalne leki przed zbyt szybką degradacją, czy ułatwiać transport przez błony komórkowe *itd. itp.* A zatem funkcje gemcytabiny, które były chronione to 3'-hydroksylowa (3'-OH) reszty cukrowej oraz 4-aminowa (4-NH₂) reszty cytozynowej. Lista blokad, które na tym etapie swoich badań wykorzystywała Doktorantka jest następująca: benzoilowa (Bz), *tert*-butoksykarbonylowa (Boc), benzyloksykarbonylowa (Cbz). Kolejnym etapem było wprowadzenie grupy fosforanowej w położenie 5' gemcytabiny. W tym celu wykorzystano dwa warianty syntetyczne: (1) reakcję fosforylacji za pomocą di(1,2,4-triazolilo-1)fosforanu 4-chlorofenyłowego z kolejnym etapem reakcji z odpowiednią aminą, lub (2) fosfitylację za pomocą H-fosfonianianu difenyłu (DPHP) i oksydacyjne aminowanie w reakcji Athertona-Todda. Obie te serie pochodnych, p-chlorofenyłowa i fenyłowa poszerzają się, gdy uwzględnić listę podstawników funkcji aminowej: metyl, etyl, 2,2,2-trifluoroetyl, n-propyl, allil, propargil, reszta estru metylowego L-alaniny, oraz niepodstawiona grupa aminowa. Teoretycznie prowadziłoby to nawet do 144 pochodnych choć chyba nie wszystkie zostały otrzymane i zbadane, bo Tabela 6 na str. 220 zawiera ich 116.

Listę potencjalnych proleków Doktorantka poszerzyła otrzymując kilka pochodnych triestrowych w serii p-chlorofenyłowej, gdzie w miejscu podstawnika amidowego znalazły się reszty alkoholowe następujących związków: metronidazol (1-(2-hydroksyetylo)-2-metylo-5-nitroimidazol, MTZ), cholesterol, chinina, 5'-reszta 3'-azydo-3'-deoksytymidyny (AZT), oraz 3'-reszta gemcytabiny. Dodatkowo mgr TRZNADEL otrzymała też metforminową (metylobisguanidyna) pochodną 5'-p-chlorofenylofosfordiestru gemcytabiny.

Drugi nurt pracy doktorskiej mgr Roksany TRZNADEL obejmował otrzymanie bifunkcyjnych koniugatów (tzw. *twin drugs*) przede wszystkim na drodze addycji ugrupowania alkinu do grupy azydkowej w reakcji Huisgena. W tym celu Doktorantka otrzymała cały szereg pochodnych (głównie gemcytabiny), które wyposażyła w funkcje azydkowe i acetylenowe. Podstawniki azydkowe zostały wprowadzone w pozycję 5' gemcytabiny, tymidyny, 5-fluoro-2'-deoksyurydyny, oraz 3' tymidyny, przy czym odpowiednie grupy hydroksylowe reszty cukrowej były albo wolne albo chronione za pomocą grupy Boc. Podobnie grupa 4-aminowa reszty cytozyny była albo wolna albo chroniona za pomocą grupy Cbz. Komponent alkinowy stanowiła 4-N-propargiloksykarbonylogemcytabina lub 4-N-propargilogemcytabina. (W tym momencie trudno się oprzeć pokusie zacytowania źródeł, *pro domo sua*, ponieważ metoda wprowadzenia podstawnika propargilowego w pozycję 4-N reszty cytozynowej poprzez pochodną 4-N-tosylową użyta za Wnukiem i wsp. (pozycja 603), który co prawda cytuję naszą pracę z 2012, w której z niej skorzystaliśmy, ale warto nadmienić, że ma już lat prawie 40 od kiedy wprowadziłem ją do chemii cytydyny: Markiewicz, W. T.; Kierzek, R.; Hernes, B. A New Method of Synthesis of 4-N-Alkyl Substituted Cytosine Derivatives via 4-N-Arylsulfonyl or Alkylsulfonyl Intermediates. *Nucleosides and Nucleotides*, **1987**, 6 (1–2), 269–272. <https://doi.org/10.1080/07328318708056202>. Podobnie ma się sprawa cytowania źródłowej metody syntezy H-fosfonianów nukleozydów, którą wprowadził A. Kraszewski wraz z zespołem: Jankowska, J.; Sobkowski, M.; Stawiński, J.; Kraszewski, A. Studies on Aryl H-Phosphonates. I. An Efficient Method for the Preparation of Deoxyribo- and Ribonucleoside 3'-H-Phosphonate Monoesters by Transesterification of Diphenyl H-Phosphonate. *Tetrahedron Letters*, **1994**, 35 (20), 3355–3358. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)76906-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)76906-1).)

Na drodze koniugacji w reakcji Huisgena z otrzymanych substratów azydkowych i acetylenowych Doktorantka otrzymała zaplanowane produkty i te, których ilości były wystarczające dla przeprowadzenia badań biologicznych zbadał dr Piotr RUSZKOWSKI. Naturalnie, zanim badania te były podjęte, wcześniejsza charakteryzacja z pomocą metod spektralnych potwierdziła ich strukturę. W całej pracy widoczna jest biegłość w posługiwaniu się analizą widm NMR. Opracowanie syntezy tak wielu nowych pochodnych nukleozydowych stanowi ważne i bardzo interesujące osiągnięcie.

Na uwagę zasługuje jeszcze jedno oryginalne osiągnięcie, które stosunkowo rzadko jest obecne w publikacjach z chemii medycznej. Otóż Doktorantka podjęła udaną próbę monitorowania przebiegu procesów degradacji biologicznej jednego z otrzymanych przez siebie koniugatów: połączenia 4-N-propargiloksykarbonylogemcytabiny z AZT (**477**) z powodzeniem wykorzystując analizę HPLC w połączeniu ze spektrometrią mas wysokiej rozdzielczości. Przy tej okazji podzielę się uwagą, że w części doświadczalnej rozprawy mgr TRZNADEL znaleźć można tylko dane MS niskiej rozdzielczości. Czy to jakieś niedopatrzenie?

Doktorantka bardzo dobrze opanowała metody syntezy organicznej nukleozydów i nukleotydów stosowane w macierzystym Zakładzie. Wszystkie szczegółowe cele pracy doktorskiej zostały osiągnięte.

Oceniając rozprawę pod względem formalnym i językowym chciałbym jednak zgłosić kilka ogólnych uwag krytycznych. Doktorantka w bardzo obszernym tekście nie ustrzegła się przed popełnieniem błędów stylistycznych. Niektóre z nich miały charakter użycia żargonu laboratoryjnego, inne były dość irytujące i wskazywałyby na potrzebę skorzystania z lepszej korekty edytorskiej i stylistycznej. To co bywa barwnie brzmiącym idiomem w anglojęzycznych publikacjach, jeśli trafia do języka polskiego pokazuje ubóstwo językowe w tekstach źródłowych, które z pewnością nie powinny być wzorcem dla poprawnej komunikacji językowej, w której najważniejsze powinny pozostać precyzja, jasność i zwięzłość przekazu w dyskursie naukowym. Pogoń za wielosłowiem uważam za niewskazaną. Przykładem pozostawiającym pole do poprawy w tym względzie w przyszłości niech będzie niby precyzyjne, ale wielorakie identyfikowanie w

tekście tych samych związków poprzez użycie dla nich różnych nazw. Jest to szczególnie łatwe kiedy pisze się o różnych pochodnych nukleozydowych będących już lekami itp. Niepotrzebne jest nieprecyzyjne, albo częściej niekonsekwentne, użycie terminów takich, jak modyfikacja, pochodna czy grupa ochronna/blokująca itp. Samoograniczenie w tym względzie piszącego poprawia jasność przekazu. Jak już wspominałem tekst jest bardzo obszerny. W rozdziale DYSKUSJA WYNIKÓW narracja prowadzona jest bardzo szczegółowo i w zasadzie „historycznie”. Wydaje mi się, że oddzielenie etapów syntezy od charakteryzowania właściwości otrzymanych związków, pogrupowanie informacji na temat syntezy nukleozydów, potem pochodnych fosforanowych nie tylko pozwoliłoby znacznie skrócić tekst, ale pomogłoby lepiej uwypuklić osiągnięcia pracy i zidentyfikować problemy i ułatwić znalezienie ich rozwiązania.

Przechodząc do merytorycznej części recenzji chciałbym podkreślić, że praca jest bardzo interesująca i z tego powodu zachęca do stawiania pytań. Chciałbym prosić Doktorantkę o rozwinięcie dyskusji na temat przebiegu syntezy fosforoamidodiestrów gemcytabiny w zależności od rodzaju aminy itp. Sądzę że wydajności preparatywne nie są najlepszą miarą przebiegu tych reakcji. Wśród czynników decydujących o ostatecznym rezultacie syntezy mogą być różne inne czynniki np. sposób przerobu mieszaniny poreakcyjnej, sposób przeprowadzenia izolacji chromatograficznej, czystość produktu końcowego decydująca o stabilności związku podczas jego przechowywania itd. itp.

Na zakończenie chciałbym powiedzieć, że te uwagi nie obniżają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej mgr Roksany TRZNADEL. Doktorantka dobrze opanowała metody chemii organicznej, ze szczególnym uwzględnieniem chemii kwasów nukleinowych. Dyskusja ciekawych wyników poddanych wcześniej krytycznej ocenie doprowadziła w efekcie do ciekawych ustaleń naukowych o dużym znaczeniu praktycznym.

Reasumując, chciałbym stwierdzić, że uzyskane i przedstawione w pracy doktorskiej wyniki mają wysoką rangę naukową i w mojej ocenie praca doktorska mgr Roksany TRZNADEL spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w *Ustawie z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* w art. 13 ust. 1. Przedstawiam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego i przeprowadzenie publicznej obrony tej pracy.



Prof. dr hab. Wojciech T. MARKIEWICZ
emerytowany profesor Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN
61-704 Poznań; tel.: 601 793 527
e-mail: markiewicz.wojciech@gmail.com
Wojciech.Markiewicz@ibch.poznan.pl