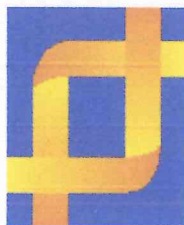


POLSKA AKADEMIA NAUK



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ

Noskowskiego 12, 61-704 Poznań
tel.: +48 61 8528503, +48 61 8528919
fax: +48 61 8520532, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl

Poznań, 9 maja 2016

***Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii KLECZEWSKIEJ
pt. „Synteza analogów nukleozydów i pronukleotydydów z zastosowaniem reakcji
Huisgena katalizowanej jonami miedzi(I)
oraz badania ich aktywności biologicznej”***

Praca doktorska mgr Natalii KLECZEWSKIEJ została przygotowana pod kierunkiem Pana Dr. hab. Lecha CELEWICZA, Prof. Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydydów Wydziału Chemii.

W Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydydów Wydziału Chemii UAM w Poznaniu prowadzone są od wielu lat badania w zakresie syntezy nukleozydów, nukleotydydów i ich analogów i badania ich właściwości biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych zastosowań jako związków przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych.

Komponenty kwasów nukleinowych i ich analogi stanowią od wielu lat najliczniejszą grupę związków, wśród których udało się uzyskać bardzo wiele biologicznie aktywnych substancji o właściwościach cytostatycznych i przeciwwirusowych. Analogi nukleozydów czy nukleotydydów są albo potencjalnymi substratami dla enzymów metabolizujących kwasy nukleinowe i ich komponenty, albo ich inhibitorami, albo mogą w inny jeszcze sposób zakłócać metabolizm komórkowy. Problemem zasadniczym jest sprawa jak najniższej toksyczności względem komórek normalnych przy wysokiej aktywności względem komórek nowotworowych czy wirusów (bakterii). O wysokiej skuteczności potencjalnego leku informuje tzw. indeks selektywności (SI). Osiągnięcie wysokiego indeksu selektywności jest zadaniem niezwykle trudnym i stąd liczba skutecznych leków przeciwwirusowych czy przeciwnowotworowych jest bardzo krótka, a skuteczność tych którym dysponuje współczesna medycyna pozostawia wciąż wiele do życzenia. Problemem, który w pewien sposób wiąże się także z selektywnością działania i który przyciąga uwagę zespołów zaangażowanych w poszukiwania nowych potencjalnych leków pochodnych nukleotydydów, jest zwiększenie i zoptymalizowanie przenikalności substancji przez błony komórkowe, tak aby mogły one osiągnąć docelową lokalizację komórkową.

Profesor Lech CELEWICZ i jego współpracownicy w Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydydów Wydziału Chemii UAM badają te problemy od kilku już lat. Na drodze modyfikacji podstawowych nukleozydów czy nukleotydydów próbują, podobnie jak inni badacze, zarówno zwiększyć aktywność, selektywność działania, a poprzez wykorzystanie koncepcji tzw. proleków zwiększyć ich stabilność przed wniknięciem do komórek, jednocześnie ułatwić ich przenikanie przez błony komórkowe.

Zasadniczym celem pracy doktorskiej mgr Natalii KLECZEWSKIEJ było opracowanie syntezy grupy związków będącymi koniugatami znanych i stosowanych w praktyce terapeutycznej nukleozydowych leków przeciwnowotworowych z komponentami: bogatymi w atomy fluoru, alkaloidami kory chinowej, pochodnymi akrydyny, związkami o charakterze jonoforowym, oraz aminocukrami. W swojej pracy doktorskiej podjęła zatem dwie koncepcje budowy nowych związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym: proleków nukleozydów (pronukleotydów) oraz molekuł bifunkcyjnych tzw. *twin drugs*. Otrzymanie takich związków miało doprowadzić do zwiększenia aktywności biologicznej, m.in. poprzez wprowadzenie dodatkowego farmakoforu, poprawę transportu do miejsca docelowego w organizmie, przy jednoczesnym obniżeniu ubocznych skutków działania.

Na podkreślenie zasługuje współpraca z dr Piotrem RUSZKOWSKIM z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, który otrzymane przez Doktorantkę związki, analizował pod kątem ich cytotoksyczności względem wybranych nowotworowych linii komórkowych.

Rozprawa doktorska mgr KLECZEWSKIEJ zawiera wstęp, bardzo obszerną część literaturową, cele pracy, wyniki badań własnych z dyskusją (Dyskusja wyników), podsumowanie, część doświadczalną, oraz spis literatury (294 pozycji literaturowych) i jest poprzedzona streszczeniem w języku angielskim oraz spisem treści. W pracy umieszczony został także spis skrótów. Praca została opisana na 300 numerowanych stronach i nie zawiera spisu schematów, rysunków oraz tabel. Układ pracy jest tradycyjny. Sposób cytowania odnośników literaturowych jest typowy dla prac chemicznych, tzn. nie zawiera tytułu publikacji. Dodanie tytułu mogłoby stać się ułatwieniem dla czytającego.

Część literaturowa rozprawy doktorskiej jest bardzo obszerna i obejmuje szeroki wachlarz zagadnień z obszaru chemii kwasów nukleinowych i tzw. chemii *click*, czyli wykorzystania reakcji addycji ugrupowania alkinu do reszty azydkowej w tytułowej reakcji Huisgena katalizowanej jonami miedzi(I). Obejmuje także szczegółowe zagadnienia syntezy nukleozydów: 3'-azydo-3'-deoksytymidyny, 5-fluoro-2'-deoksyurydyny oraz gemcytabiny, których koniugaty mgr KLECZEWSKA postanowiła przygotować poprzez reakcję *click*. Autorka obszernie omawia także koncepcję pronukleotydów, a także kwestie reakcji fluorowania, koniugatów alkaloidów kory chinowej, wybrane fragmenty chemii akrydyny, chemii związków o charakterze jonoforowym i aminocukrów. Trochę tego dużo i można odnieść wrażenie pewnego nadmiaru, czy chaosu. Z drugiej strony widać w tym troskę Doktorantki, aby żadnego aspektu przydatnego dla później opisywanych własnych syntez nie pominąć. Tak więc pomimo wrażenia pewnego przesytu, zawartość tego rozdziału stanowi dobre wprowadzenie dla oceny uzyskanych rezultatów doświadczeń i ich merytorycznej dyskusji. Tym bardziej, że w trakcie przedstawiania wyników własnych i ich dyskusji, mgr KLECZEWSKA znacznie oszczędniej z przywoływania odniesień literaturowych korzysta.

Pani mgr Natalia KLECZEWSKA zrealizowała liczne szczegółowe cele pracy doktorskiej. Nie sposób ich wszystkich wymieniść, bo rzeczywiście liczba nowych pochodnych, które udało się Jej otrzymać wykorzystując reakcję Huisgena, jest imponująca. To bardzo dobry przykład badań z obszaru chemii medycznej. Reakcja *click* była najczęściej etapem ostatnim w chemicznej syntezie, za wyjątkiem syntezy 5'-amidofosforanów koniugatów 3'-azydo-3'-deoksytymidyny.

Wszystkie otrzymane koniugaty zachowały aktywność biologiczną swoich składowych 'farmakoforów' i wynik ten nie powinien budzić zdziwienia. Udało się wykazać w testach na liniach komórkowych, że koniugaty z pochodnymi chloroakrydyny wykazują wyższą aktywność od wyjściowych nukleozydów (ponad 70-krotną). Koniugat 3'-azydotymidyny z 9-aminopropargilową pochodną 6-chloro-2-metoksyakrydyny (261d) wykazał najwyższą

aktywność spośród otrzymanych związków. Niestety, związany z tym wzrost selektywności, chociaż zaobserwowane wartości SI (ponad 10), są wyższe niż w przypadku większości badanych w rozprawie doktorskiej pochodnych, wciąż jest stosunkowo mały. W tym sensie również opisane badania ilustrują dobrze w jak trudnym obszarze przychodzi działać chemikom medycznym, prowadzącym badania niezwykle pracochłonne, żmudne i wymagające doskonałego opanowania warsztatu syntezy organicznej.

Mgr KLECZEWSKA rozpoczynając swoje badania stanęła przed zadaniem opracowania syntezy całej biblioteki pochodnych nukleozydowych, chociaż w swoich badaniach nie stosowała metod chemii kombinatorycznej, to rzeczywiście zakres zbadanych struktur jest imponujący. Opracowanie syntezy taki wielu nowych pochodnych nukleozydowych stanowi ważne i bardzo interesujące osiągnięcie. Doktorantka bardzo dobrze opanowała metody syntezy organicznej nukleozydów i nukleotydów. W całej pracy widoczna jest biegłość w posługiwaniu się analizą widm NMR.

Wszystkie szczegółowe cele pracy doktorskiej zostały osiągnięte.

Praca doktorska została przygotowana starannie, także pod względem edytorskim. Naturalnie w tak obszernym tekście pojawiają się różne, zazwyczaj drobne pomyłki, których Autorce nie udało się uniknąć. Do takich zaliczam stosowanie kropki zamiast przecinka dla oddzielenia liczb całkowitych od części dziesiętnej. W części doświadczalnej brakuje informacji o wydajnościach reakcji koniugacji. Dane te są tylko w części Dyskusji wyników. Zdaniem recenzenta powinny być one powtórzone razem z charakterystyką spektralną poszczególnych związków w części doświadczalnej. Kolejna uwaga dotyczy stwierdzenia (str. 181), że „*Podczas reakcji następuje wzrost nukleofilowości atomu tlenu ...*”. To sformułowanie wydaje się niepoprawne.

Przechodząc do części dyskusyjnej recenzji chciałbym rozpocząć od uwagi o istotniejszym znaczeniu. Najważniejsze wydaje mi się pytanie czy rzeczywiście można myśleć o czynnikach przestrzennych jako tych, które mają zasadnicze znaczenie, analizując przebieg reakcji otrzymywania 5'-O-sulfonowych estrów, mesylowych/tosylowych, pochodnych gemcytabiny (str. 144)? Jakie produkty powstają w reakcji tosylowania gemcytabiny (str. 143, Schemat 83)? Przyznam, że wytłumaczenie względami sterycznymi wydaje mi się w równym stopniu, co niejasne, to niewystarczające. Oczekiwałbym dyskusji tego problemu w czasie publicznej obrony.

W trakcie lektury tak obszernej rozprawy, pojawia się oczywiście wiele pytań o praktycznej naturze. Jako przykładowe zadam pytanie: czy brano pod uwagę reakcje tosylowania bądź mesylowania (str. 202) pochodnych hydroksyalkiloaminowych akrydyny? Albo jeszcze jedno pytanie: czy próbowano zastosować w syntezie pochodnych kwasu 9-akrydynokarboksylowego zastosować niechronione diaminy (str. 198)?

Moja uwaga ogólna dotyczy też dyskusji wyników analiz właściwości biologicznych. Odniosłem wrażenie, że omawianie szczegółów tych badań przy każdej grupie otrzymanych związków nie tylko niczego nie wyjaśnia, ale wręcz utrudnia wyciągnięcie wniosków ogólniejszej natury, tym bardziej że Doktorantka na samym wstępie pracy lojalnie wyjaśnia, że badania te przeprowadził dr RUSZKOWSKI. Wyniki analiz właściwości biologicznych jednej grupy związków nie miały żadnego wpływu na realizację kolejnych podejmowanych i opisanych syntez. Natomiast napisanie odrębnego podrozdziału w Dyskusji wyników, w którym te właściwości biologiczne byłyby zestawione i omówione, mogłoby się stać podstawą do wyciągnięcia jakich ogólniejszych wniosków.

Podobnie, nie wydaje mi się właściwe umieszczanie zbyt wielu szczegółów doświadczalnych w Dyskusji wyników, bo nie mogę uznać za chromatogramy wszystkich graficznych zestawień wartości R_F poszczególnych związków. Niekiedy w opisach tych tzw. chromatogramów (np. str. 184, Rysunek 68) substraty reakcji nazywane są produktami (obok koniugatów, które są rzeczywiście produktami).

Na zakończenie chciałbym powiedzieć, że te uwagi nie obniżają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej mgr Natalii KLECZEWSKIEJ. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem metod syntetycznej 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 Natalii KLECZEWSKIEJ spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytule naukowym. Przedstawiam Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego i przeprowadzenie publicznej obrony tej pracy.

Ponadto biorąc pod uwagę bardzo szeroki zakres przedstawionych badań, oraz otrzymanie nowych związków o aktywności cytostatycznej większej od aktywności wyjściowych nukleozydów, proponuję rozważenie wyróżnienia rozprawy doktorskiej pani Natalii KLECZEWSKIEJ.



Prof. dr hab. Wojciech T. MARKIEWICZ
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polska Akademia Nauk
Noskowskiego 12, 61-704 Poznań
tel.: 61 8528503 wew. 180, faks.: 61 8520532
e-mail: Wojciech.Markiewicz@ibch.poznan.pl