

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Singh zatytułowanej „Synteza oraz badania aktywności cytotoksycznej nowych analogów nukleozydów pirymidynowych o zmienionej konfiguracji na atomie węgla w pozycji 2' lub 3' ”

Naturalne nukleozydy i ich syntetyczne analogi ze względu na swoje unikalne właściwości biochemiczne mają długą historię zastosowań w naukach chemicznych i biomedycznych. Nukleozydy ze względu na udział w kluczowych procesach biologicznych komórki oraz cyklu replikacyjnego wirusów, głównie z uwagi na fakt, że służą jako niezbędne elementy budulcowe ich materiału genetycznego, stanowią struktury wiodące do projektowania związków o właściwościach farmakologicznych. Ich potencjalnymi celami terapeutycznymi są głównie DNA i RNA oraz enzymy uczestniczące w ścieżkach biochemicznych ich przemian metabolicznych. Obecnie znanych jest ponad 30 nukleozydów i ich analogów klinicznie dopuszczonych do stosowania w leczeniu nowotworów lub stosowanych przeciwko wirusom lub pasożytom, pasożyty, a także w wypadku infekcji bakteryjnych i grzybiczych. Są one niezwykle efektywnymi chemoterapeutykami, jednakże ze względu na lekooporność istnieje ciągła potrzeba poszukiwania i stosowania nowych zmodyfikowanych strukturalnie pochodnych nukleozydowych. Chyba najszlachetniejszym przykładem nukleozydowego leku, który początkowo rozbudził ogromną nadzieję w walce z wirusem HIV był AZT, 3'-azydo-2'.3'-dideoksytymidyna. Z wielu powodów nadzieja ta szybko zgasła, choć w dalszym ciągu AZT stosowany jest jako lek antyretrowirusowy. Niestety z tysięcy struktur jakie powstają w laboratoriach chemicznych jedynie niewielki ich ułamek dochodzi do fazy badań klinicznych, a tylko nieliczne zostają zatwierdzone jako leki. Od strony syntetycznej nukleozydy są związkami, które niezwykle trudno selektywnie modyfikować. Powodem tego jest duża liczba różnych grup funkcyjnych zarówno w obrębie pierścienia cukrowego, jak i nukleozasady.

Dobitnie pokazuje konieczność poszukiwania nowych pochodnych nukleozydowych i metod ich modyfikowania, co było tematem przewodnim badań, jakich podjęła się mgr Aleksandra Singh w swojej dysertacji. Badania prezentowane przez Doktorantkę włączają się w nurt poszukiwania nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych, choć nie wykluczone, że mogą one także wykazywać aktywność przeciwwirusową. W projektowaniu nowych pochodnych nukleozydowych o właściwościach przeciwnowotworowych Doktorantka wykorzystwała koncepcję pronukleotydów, nieaktywnych biologicznie

pochodnych nukleotydów, które w wyniku aktywacji metabolicznej uzyskują aktywność biologiczną. W tym celu wykorzystano procedury modyfikacji grupy 5'-OH do 5'-amidofosforanu. Wyjściowymi nukleozydami, które Doktorantka poddawała modyfikacjom były cytarabina, rybotymidyna i tymidyna. Większość procedur stosowanych przez Doktorantkę w celu modyfikowania nukleozydów jest często stosowana w "chemii nukleozydów", aczkolwiek jak pokazuje lektura dysertacji, nie zawsze sprawdzają się one w wypadku konkretnego nukleozydu. Stosunkowo nową od niedawna stosowaną procedurą wykorzystywaną w modyfikacjach nukleozydów jest zastosowana przez Doktorantkę chemia „klik” umożliwiająca przyłączenie do nukleozydu farmakoforu poprzez pierścień 1,2,3-triazolowy. Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Singh zatytułowanej „Synteza oraz badania aktywności cytotoksycznej nowych analogów nukleozydów pirymidynowych o zmienionej konfiguracji na atomie węgla w pozycji 2' lub 3' ” powstała w Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydów Wydziału Chemii UAM kierowanej przez prof. UAM dr hab. Lecha Celewicza. Jego wieloletnie doświadczenie w trudnej sztuce chemicznej modyfikacji nukleozydów z całą pewnością było dużą pomocą dla Doktorantki w trakcie jej badań. Recenzowana rozprawa napisana jest na 262 stronach, zawiera 4 rozdziały (w tym cel pracy) oraz streszczenie, abstrakt podsumowanie i wykaz cytowanej literatury (300 pozycji).

Praca zawiera wyniki badań Doktorantki nad modyfikacjami strukturalnymi i badaniem aktywności przeciwnowotworowej nukleozydów pirymidynowych o zmienionej (względem nukleozydów naturalnych) konfiguracji atomów węgla w pozycji 2' i 3' (nie wszystkie nukleozydy badane w pracy spełniają ten warunek). Podejście to jest jednym z klasycznych i co najważniejsze skutecznych w projektowaniu analogów nukleozydów. Niestety wiąże się ono ze wspomnianym wcześniej problemem selektywności (w tym stereochemicznej) modyfikowania/blokowania grup funkcyjnych modyfikowanego nukleozydu. Po przedstawieniu w części literaturowej aktualnego stanu wiedzy na temat właściwości wybranych nukleozydów i metod ich modyfikacji, Doktorantka przedstawia cel swoich badań i dyskutuje uzyskane wyniki.

Jednym z obiektów badań doktorantki była cząsteczka decytabiny (5-aza-2'-deoksycytydyna), nukleozydowy lek przeciwnowotworowy. Lek ten posiada poważne wady jakimi m.in. są słaba rozpuszczalność w wodzie, tendencja do anomeryzacji i otwieranie się pierścienia azapirydyny. Wszystko to powoduje, że biologiczna dostępność, a co za tym idzie farmakologiczna efektywność decytabiny jest ograniczona. Celem doktorantki było poprawienie tych właściwości poprzez chemiczne modyfikowanie decytabiny w znacznie przystępniejszą dla komórki formę pronukleotydu. Aby to osiągnąć Doktorantka zamierzała wprowadzić na grupę 5'-OH ugrupowanie fosfoamidowe. Jednakże aby osiągnąć ten etap syntezy

konieczne było wcześniejsze wprowadzenie grup blokujących reaktywne grupy funkcyjne (3', 5'-OH i egzocykliczną 4-NH₂) nukleozydu. Rodzaj grup blokujących (TMS, TBS, Cbz, Boc) został wybrany przez Doktorantkę rozsądnie, aczkolwiek próby ich selektywnego wprowadzania testowane w różnych warunkach reakcji zakończyły się niepowodzeniem. Niestety niepowodzenie zwiastowała już na samym początku słaba rozpuszczalność decytabiny w powszechnie stosowanym do modyfikowania nukleozydów medium, jakim była pirydyna. Również próby modyfikacji z zastosowaniem pochodnych sililowych (TBDMS) zakończyły się niepowodzeniem. W tym wypadku na drodze Doktorantki stanął problem wieloetapowości blokowania nukleozydów. O ile udało się jej uzyskać wyjściową pochodną 5'-O-TBDMS decytabiny, to już kolejny etap polegający na wprowadzeniu grupy Boc w pozycję 3' zakończył się niepowodzeniem. W wypadku syntezy 5-sililio 3', N4-dibenzoilowych (Bz) pochodnych decytabiny problemem okazała się deprotekcja grupy sililowej, powodująca otwieranie się pierścienia azacytozynowego. W obliczu tych trudności syntetycznych Doktorantka postanowiła nie kontynuować (moim zdaniem słusznie) prób modyfikowania decytabiny.

W wypadku kolejnego nukleozydu-cytarabiny (ara-C) Doktorantce udało się przeprowadzić całą serię jej pochodnych 5'-sililowych (TBS) oraz Cbz, Boc i Bz w pozycjach 2', 3' i 4-NH₂, a co najważniejsze udało się uzyskać pronukleotydydowe pochodne 5'-amidofosforanowe. Związki takie charakteryzują się zwiększoną biodostępnością w porównaniu z nukleotydami i są aktywowane w cytoplazmie po przekroczeniu błony komórkowej w wyniku hydrolizy wiązania fosfoamidowego. Początkowe próby wprowadzenia reszty L-alaniny do ugrupowania fosfoamidowego zakończyły się niepowodzeniem. Dopiero zastosowanie silnej zasady jaką jest t-BuMgCl (wg procedury zastosowanej przez McGuigana) pozwoliło uzyskać Doktorantce pronukleotydydową pochodną cytarabiny zawierającą resztę L-alaniny w ugrupowaniu amidofosforanowym. Tutaj również Doktorantka napotkała problemy związane z wydajnością reakcji amidowania grupy fosforanowej i oczyszczaniem produktu reakcji. Czy Doktorantka rozważała do oczyszczania kłopotliwych chronionych nukleozydów zastosowanie zamiast płyt pokrytych żelazem krzemionkowym, takich pokrytych złożami typu RP (np. C8, C18)? Znacznie większe sukcesy udało się jej osiągnąć syntezując pochodne pronukleotydydowe cytarabiny zawierające w grupie amidofosforanowej podstawniki alkilowe, alkenowe i alkinowe (Me, Et, Prop, propen i propyn) oraz wolne i chronione grupami benzolowymi (Bz) grupy funkcyjne 2'- i 3'-OH oraz 4-NH₂. Następnie Doktorantka zbadała aktywność przeciwnowotworową uzyskane pronukleotydydów na wybranych liniach komórek przeciwnowotworowych (HeLa, KB, MCF-7, U-87 MG, HDF). Na tej podstawie Doktorantce udało się wyciągnąć pewne wnioski dotyczące zależności pomiędzy budową (wprowadzonymi modyfikacjami) i aktywnością pronukleotydydów. Najbardziej aktywne okazały się pochodne zawierające ugrupowanie propyloamidowe (141c-seria blokowana i 142c-seria nieblokowana).

Oznaczone wartości IC₅₀ (rzędu kilku μM) pokazują, że uzyskane pochodne są nieco aktywniejsze lub

porównywalne z aktywnością cytarabiny (ara-C). W wypadku niektórych (pochodne 141a,b,e; 142a,b,d,e) widać jednak wyraźny spadek aktywności (IC₅₀ rzędu kilkudziesięciu μM). Natomiast oznaczona przez Doktorantkę wartość logP wyraźnie pokazuje wzrost hydrofobowości pochodnych ara-C w stosunku do niemodyfikowanego nukleozydu. Jest to przesłanka, aby w wypadku problemów z oczyszczaniem zastosować fazy odwrócone, a nie normalne. Wzrost hydrofobowości może też ułatwiać transport przez błonę komórkową.

Stosując H-fosfonian difenyłu Doktorantka otrzymała kolejną serię 5'-amidofosforanowych pronukleotydowych pochodnych ara-C chronionych grupami Cbz i Boc. Dzięki optymalizacji poszczególnych etapów udało się Doktorantce uzyskać dobre wydajności (70-90%) ich syntezy. Wprowadzone podstawniki amidowe to L-Ala-OMe, Me, Et, Prop, propen i propyn. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania aktywności biologicznej pokazały, że najaktywniejszymi (IC₅₀ rzędu kilku μM) pochodnymi były związki: 144b i 144c (seria „Boc”), zawierające podstawniki metylo- i etyloamidowy. Oba analogi wykazywały nieco większą aktywność w porównaniu do niemodyfikowanej ara-C, jednakże charakteryzowały się drastycznie zwiększoną wartością logP. Usunięcie osłon Boc w niewielkim stopniu wpłynęło na aktywność cytotoksyczną tych analogów. Seria „Cbz” okazała się znacznie mniej (IC₅₀ rzędu kilkudziesięciu do kilkuset μM) aktywna. Tu nasuwa mi się pytanie dlaczego do określenia aktywności przeciwnowotworowej Doktorantka zaproponowała wykorzystanie dwóch nowych linii komórkowych A549 i HepG2, wobec których nie były badane wcześniejsze pronukleotydy (serie 141-142)?

Kolejnym obiektem badań Doktorantki była cyklocytydyna. W tym wypadku, po pokonaniu początkowych trudności związanych z rozpuszczalnością produktów, po optymalizacji warunków reakcji udało się otrzymać 3-O-Bz analog cyklocytydyny, który następnie poddany został 5'-O- fosforylowaniu. W efekcie Doktorantka uzyskała 5'-n-propyloamido p-chlorofenylo fosforanową 3'-O-Bz blokową pochodną cyklocytydyny.

Stosując zblizoną filozofię syntezy uzyskała również serię analogów cyklorybotymidyny (jak również cyklotymidyny) zawierających pochodne amidowe: Me, Et, Prop, propen i propyn oraz podstawnik p-fluoro i p-chlorofenyłowy w grupie fosforanowej. Doktorantka bardzo sprawnie dokonała analizy typu SAR uzyskanych przez siebie analogów, porównując m.in. wpływ podstawnika amidowego i obecności innych grup blokujących na aktywność tych serii pronukleotydów. Szkoda, że w tej analizie SAR nie znalazło się porównanie wpływu atomu halogenu (F, Cl) na aktywność przeciwnowotworową. Mogłoby to być o tyle interesujące, że fluoropochodne są zdecydowanie preferowaną pochodną nukleozydową/nukleotydomową w kontekście farmaceutycznym. Przy czym w większości wypadków są to pochodne zawierające atom fluoru

związany bezpośrednio z pierścieniem cukrowym bądź nukleozasady. Poprosiłbym o dokonanie takiej analizy w trakcie publicznej obrony (także dla serii 194 i 197).

Rozdział 3 zawierający dyskusję wyników kończy część poświęcona syntezie i badaniu aktywności biologicznej pochodnych nukleozydowych otrzymanych przez Doktorantkę przy pomocy tzw. chemii klik wykorzystującą katalizowaną jonami Cu(I) lub Ru(II) reakcję cykloaddycji Husegeina (CuAAC, RuAAC). Jest to stosunkowo nowa koncepcja otrzymywania pochodnych nukleozydowych. Otrzymywane za jej pomocą ugrupowanie 1,2,3-triazolowe (w formie izomeru 1,4 lub 1,5) posiada niezwykle pożądane właściwości biologiczne i z tego powodu budzi zainteresowanie w naukach biologicznych. Doktorantka wykorzystując AZT i izomeryczne (o,m,p) pochodne etynylobenzenu jako substraty reakcji CuAAC, a następnie dokonując 5'-fosforylacji uzyskanej wcześniej pochodnej triazolowej AZT i wprowadzając resztę L-Ala do ugrupowania amidofosforanowego, uzyskała serię pronukleotydowych 3'-1,4-1,2,3-triazolopochodnych tymidyny. Analogiczna seria z wykorzystaniem RuAAC zakończyła się tylko na syntezie 3'-1,5-1,2,3-triazolowych nukleozydowych pochodnych tymidyny. Spośród „serii” analogów AZT typu 1,4-triazolowych tylko dwa 196 i 199 wykazywały wyższą aktywność, niż wyjściowy AZT. Również dla tej serii widać wyraźny wpływ modyfikacji na wzrost hydrofobowości 3'-1,4-triazolowych pochodnych w stosunku do AZT. Spośród analogów 3'-1,5-triazolowych AZT tylko związek 204 wykazywał nieco większą aktywność przeciwnowotworową w stosunku do AZT. W wypadku serii analogów AZT 3'-1,5-triazolowych Doktorantka miała problemy z oczyszczeniem produktów reakcji click ze względu na czasy retencji zbliżone do substratów. Z zestawienia uwidocznionego w tabeli 11 również widać, że 3'-1,5-triazolowe pochodne są nieco bardziej hydrofobowe, niż AZT. To sugeruje, że lepsze efekty oczyszczania związków serii 200 można by uzyskać stosując fazy odwrócone.

Ostatnim z zsyntezowanych przez Doktorantkę związków było hybrydowe połączenie za pomocą reakcji CuAAC zmodyfikowanej chloromrówczanem propargilu na grupie 4-NH₂ cytarabiny i AZT. Koniugat taki okazał się jednak mniej aktywny (za to dużo bardziej polarny) zarówno w stosunku do cytarabiny, jak i AZT. Podsumowując ocenę aktywności triazolowych pochodnych nukleozydowych zsyntezowanych przez Doktorantkę można stwierdzić, że tylko mała część grupy zsyntezowanych analogów wykazywała wyższą aktywność przeciwnowotworową, niż ich macierzyste nukleozydy. W kontekście tego, że znane są związki zawierające ugrupowanie triazolowe o silnych właściwościach przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych, poprosiłbym Doktorantkę o próbę wytłumaczenia braku pozytywnego wpływu podstawnika triazolowego na aktywność badanych pochodnych.

Podsumowując część syntetyczną i „biologiczną” pracy muszę stwierdzić, że Doktorantka wykonała ogrom pracy laboratoryjnej/syntetycznej związanej z projektowaniem i syntezą pochodnych nukleozydów. Zrealizowanie zaplanowanych badań eksperymentalnych z pewnością wymagało od Doktorantki nie tylko dużej wiedzy, lecz również dużego wysiłku i czasu spędzonego w laboratorium. Wszystkie syntezy zostały opisane w sposób umożliwiający ich powtórzenie, a produkty scharakteryzowane poprzez NMR (^1H , ^{13}C , ^{31}P) oraz ESI MS. Tym bardziej doceniam Jej pracę, że nukleozydy są jedną z najtrudniejszych do selektywnej modyfikacji grup związków organicznych ze względu na dużą liczbę reaktywnych grup funkcyjnych. Doktorantka napotkała wiele problemów syntetycznych typowych dla syntezy modyfikowanych nukleozydów takich jak, problemy z rozpuszczalnością związków, trudności z selektywnością wprowadzania i deprotekcji grup ochronnych czy problemy związane z oczyszczaniem produktów. Z większością z nich poradziła sobie doprowadzając wieloetapowe reakcje syntezy do ostatniego etapu. Pokazuje to dużą biegłość doktorantki w znajomości i zrozumieniu problemów syntezy organicznej, a w szczególności chemii nukleozydów. Pierwszym tego przejawem w trakcie czytania pracy był niezwykle profesjonalnie napisany wstęp pokazujący współczesną wiedzę związaną z modyfikowaniem nukleozydów. Prace Doktorantki mają typowy charakter badań podstawowych, ale z całą pewnością wyniki przez nią uzyskane (nawet te negatywne) będą wartościowe dla następnych chemików organicznych projektujących nowe związki farmakologicznie czynne.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam też pewne drobne uchybienia jakie znalazłem w dysertacji. Na str. 50 Doktorantka określa nienasycony substrat reakcji click jako acetylenek. Jest to o tyle niefortunne, że jest to określenie anionu, a zwykle substratem reakcji jest alkin lub związek zawierający grupę alkinową).

Str. 50. Reakcje klik () nie są stereo- lecz regiospecyficzne.

Str. 68. Wymienione efekty uboczne AZT nie są głównym ograniczeniem/zmodyfikowaniem sposobu jego stosowania w terapii anyHIV. Co jest głównym problemem?

Str. 106. Ostatni etap reakcji zachodzi (przekreślenie strzałki sugeruje, że nie), tylko pojawia się dodatkowy produkt uboczny

Str. 121. Warunki reakcji pod schematem 54 sugerują, że dodano L-Ala-OMe, a nie jak jest napisane stroną dalej HClx L-Ala

Str. 123. ...(S)-L-alanilo Albo podajemy konfigurację bezwzględną –S albo względną L, ale nie obie jednocześnie. Powinno też być alanylo

Str. 129. Sama zdolność przenikania przez błonę to za mało, aby związek miał np. właściwości cytotoksyczne.

Str. 132-133 i inne. Do niektórych rysunków nie ma odwołania w tekście np. rys. 50-52. Ta uwaga dotyczy też tabel (2-4 i inne)

Str. 148. Tabela 8 jest błędnie opisana. Seria 174 to nie są pochodne benzoilowe

Str. 172 i następne. Podawanie wartości m/z z dokładnością do pierwszego miejsca przed przecinkiem jest zbyt mało precyzyjne

Małe defekty edycyjne:

Str. 13 Skróty-brak DMA, Cbz, HDMS

Str. 39. schemat 13- nie „f₁talimidek...”

Str. 51. we wzorze siarczynu miedzi 4 powinno być w indeksie dolnym.

Str. 61 „co raz” piszemy razem

Str. 76 ...wymaga przeniesienie_ę powinno być przeniesienia

Str. 107 ...ponad płaszczyznę_ę powinno być ...płaszczyzn_ą

Str 108. ...w niepożądanym reakcjach ubocznych. A mogą być pożądane?

Str. 109,120 w tytule podrozdziału (i w innych miejscach pracy) ...alanilo-powinno być alanylo

Powyższe uwagi nie wpływają one w żaden negatywny sposób na pozytywny odbiór całej dysertacji jaką przedstawiła Doktorantka. Chciałbym również podkreślić, że jest to chyba najlepiej napisana od strony językowej dysertacja jaką recenzowałem do tej pory. A to w obecnych czasach nie zdarza się zbyt często.

Reasumując, Doktorantka postawiła przed sobą ambitne (zarówno od strony jakościowej i ilościowej) zdania badawcze z zakresu zaawansowanej syntezy organicznej i zrealizowała je niezwykle skutecznie. Wykazała się przy tym nie tylko ogromnym zasobem wiedzy, lecz również potrafiła tą wiedzę efektywnie wykorzystać w trakcie rozwiązywania pojawiających się problemów. Mgr Aleksandra Singh jest również współautorką 2 publikacji naukowych w cenionych in prestiżowych czasopismach o profilu syntetyczno/biomedycznym

Trznadel R, **Singh A**, Kleczewska N, Liberska J, Ruszkowski P, Celewicz L. Synthesis and in vitro anticancer activity of new gemcitabine-nucleoside analogue dimers containing methyltriazole or ester-methyltriazole linker. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019 Sep 15;29(18):2587-2594; Kleczewska N, Ruszkowski P, **Singh A**, Trznadel R, Celewicz L. Synthesis and anticancer activity of 3'-[4-fluoroaryl-(1,2,3-triazol-1-yl)]-3'-deoxythymidine analogs and their phosphoramidates. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2019, 38(9):605-641.

Czyni to z Doktorantki doświadczonego i samodzielnego badacza. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja zawiera istotne elementy nowości naukowej, 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 Wydziału Chemii UAM o dopuszczenie mgr Aleksandry Singh do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Piotr Mucha