

Dr hab. Jacek Jemielity, Prof. UW
Laboratorium Chemii Bioorganicznej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: jacekj@biogeo.uw.edu.pl
tel. 22 5543774

Warszawa 16.05.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kleczewskiej

p.t. „Synteza analogów nukleozydów i pronukleotydów z zastosowaniem reakcji Huisgena katalizowanej jonami miedzi(I) oraz badania ich aktywności biologicznej”

Badania nad syntezą i właściwościami nukleozydów i ich analogów o znaczeniu terapeutycznym oraz ich koniugatami z innymi biologicznie aktywnymi cząsteczkami chemicznymi należą do jednych z najintensywniej rozwijanych dziedzin chemii bioorganicznej. Znajduje to odzwierciedlenie w dużej aktywności publikacyjnej w tej dziedzinie, a także dużym zainteresowaniu przemysłu farmaceutycznego tego typu obiektami chemicznymi. Przedstawiona do recenzji praca doktorska magister Natalii Kleczewskiej bardzo dobrze wpisuje się w ten nurt badawczy. Praca została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką Prof. UAM dr hab. Lecha Celewicza, którego laboratorium od lat z powodzeniem prowadzi badania w tym zakresie.

Praca doktorska ma klasyczny układ i liczy 300 stron, a więc jest obszernym materiałem naukowym. Na rozprawę składa się "Część literaturowa", która stanowi nieco ponad 1/3 objętości całej pracy, "Dyskusja wyników", która oprócz dyskusji otrzymanych rezultatów zawiera również same wyniki uzyskane przez Doktorantkę oraz "Część eksperymentalna". Dodatkowo wyodrębniono, krótki wstęp, cele pracy, a na końcu podsumowanie. W pracy zamieszczono 121 schematów obrazujących przekształcenia chemiczne, 88 rysunków oraz 39 tabel, wszystkie te elementy są bardzo pomocne w śledzeniu toku rozumowania Autorki rozprawy i zostały przygotowane z dużą starannością edytorską. W pracy zacytowano 294 pozycje literaturowych, które w większości stanowią

prace oryginalne oraz przeglądowe opublikowane w wiodących czasopismach naukowych z chemii, biochemii i medycyny oraz dziedzin pokrewnych.

Zgodnie z wymaganiami Ustawy o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw Nr 65, poz. 595, Art. 13) przedmiotem mojej oceny są następujące elementy Rozprawy: a) ogólna wiedza Kandydata w uprawianej dziedzinie naukowej, b) Umiejętność prowadzenia badań naukowych, c) oryginalność rozwiązanego problemu naukowego.

Celami postawionymi przed Autorką rozprawy były synteza i charakteryzacja spektroskopowa nukleozydów oraz ich biokoniugatów, stanowiących pochodne trzech ważnych nukleozydów stosowanych w leczeniu chorób nowotworowych i/lub wirusowy: 3'-azydo-3'-deoksytymidyny, 5-fluoro-2'-deoksyurydyny oraz gemcytabiny. Wymienione choroby zaliczają się do chorób zagrażających życiu, a stosowane przeciwko nim terapie są w dużej mierze niedoskonałe, co objawia się w ograniczonej skuteczności leków, nabywaniu odporności, ograniczonej selektywności, co prowadzi do licznych skutków ubocznych. To sprawia, że poszukiwanie nowych leków o poprawionych właściwościach jest niezwykle ważne nie tylko ze względów naukowych ale również społecznych. Doktorantka podjęła się trudnego zadania, poddając modyfikacjom trzy wyżej wspomniane leki nukleozydowe, stosując do tego celu przede wszystkim sztandarową reakcję typu *click chemistry*, czyli katalizowaną jonami miedzi cykloaddycję azydkowo-alkinową. Reakcja ta została wykorzystana przez mgr Natalię Kleczewską do otrzymywania między innymi biokoniugatów nukleozydów zawierających grupę azydkową w pozycjach 3' lub 5' z różnego rodzaju związkami aktywnymi biologicznie, w tym alkaloidami kory chinowej, pochodnymi akrydyny, jonoforami karboksylowymi oraz pochodnymi aminocukrowymi zawierającymi ugrupowanie alkinowe. Ponadto, Autorka rozprawy wykorzystwała tę samą reakcję do modyfikacji grupy 3'-azydo-nukleozydów poprzez przyłączanie małych cząsteczek organicznych, w tym takich zawierających atom(y) fluoru. Część pracy poświęcono również otrzymywaniu związków, które miały działać w komórkach jako pronukleotydy. Związki scharakteryzowano spektroskopowo stosując spektrometrię mas, magnetyczny rezonans jądrowy, a w niektórych przypadkach również spektroskopię w podczerwieni. Dla związków ostatecznych wyznaczono współczynniki podziału pomiędzy fazę wodną i n-oktanol, w przypadku każdej grupy związków zwieńczeniem pracy syntetycznej były badania cytotoksyczności przeprowadzone na szeregu linii komórek nowotworowych oraz linią komórek zdrowych. Badania komórkowe, choć nie były wykonane przez samą Doktorantkę są istotnym elementem jej doktoratu, gdyż pozwalają na ocenę w jakim stopniu zastosowana modyfikacja spełniła wcześniejsze założenia. Należy docenić różnorodność otrzymanych związków oraz ich ilość. Nie mam wątpliwości, że wymagało to wielu miesięcy spędzonych w laboratorium. Warto również podkreślić, że dziedzina której praca doktorska dotyczy jest nacechowana bardzo wysoką konkurencyjnością, co wynika z

dużego potencjału komercyjnego ewentualnych odkryć. Sama doktorantka wspomina w swej pracy o wartości komercyjnej niektórych leków, jakkolwiek w przypadku gemcytabiny przeszacowała roczne przychody z tytułu jej sprzedaży o trzy rzędy wielkości dosłownie tłumacząc z języka angielskiego "billion dollars", co odpowiada w języku polskim miliardowi, a nie bilionowi dolarów.

W części literaturowej Autorka opisuje w sposób wyczerpujący leki nukleozydowe, komentując mechanizmy ich działania, przedstawia następnie istniejące w literaturze metody syntezy tych związków. Szczegółowo opisane są grupy ochronne stosowane w chemii nukleozydów, a następnie równie obszernie opisane literaturowe strategie otrzymywania proleków nukleozydowych i nukleotydowych przybliżające osiągnięcia na tym polu m. in. Imbacha i Gosselina, Meiera, McGuigana i innych. W części literaturowej poświęcono również miejsce koncepcji *click chemistry* (chemii "click") oraz bioortogonalnym metodom tworzenia koniugatów z nukleozydami, znaczeniu fluoru w chemii medycznej, reakcjom fluorowania, biokoniugacji, strategii "twin drugs" oraz skrótowo omówiono grupy związków które potem zostały wykorzystane przy tworzeniu biokoniugatów. Poszczególne części pracy czyta się dobrze i wiele aspektów chemii składników kwasów nukleinowych opisano w sposób interesujący i wyczerpujący. Jednakże, czytając część literaturową bez znajomości kolejnych części rozprawy trudno oprzeć się wrażeniu, że poszczególne podrozdziały tworzą pewien przypadkowy zlepek różnych zagadnień. Zabrakło pewnej preambuły do takiej dawki informacji, która wyjaśniałaby dlaczego z punktu widzenia pracy doktorskiej poszczególne zagadnienia są ważne i w jaki sposób są ze sobą powiązane. Mam też wrażenie, że nieco zaburzone są proporcje pomiędzy poszczególnymi podrozdziałami, niektóre zostały potraktowane zbyt skrótowo np.: rozdziały 1.6.1 Koniugaty i biokoniugaty oraz 1.6.2 Podejście twin-drugs, inne z kolei są nadto rozbudowane w stosunku do zagadnień poruszanych w badaniach własnych (np.: grupy zabezpieczające i proleki).

Część poświęcona badaniom własnym to bardzo bogaty materiał badawczy, w którym autorka podjęła się trudnego zadania poprawy właściwości farmakokinetycznych jak i farmakodynamicznych leków nukleozydowych. Trudno w recenzji, która musi mieć racjonalną długość, omówić wszystkie aspekty pracy, skupię się więc na najciekawszych lub najbardziej kontrowersyjnych aspektach rozprawy. Zadania syntetyczne zostały przez Doktorantkę zrealizowane w sposób profesjonalny, z wykorzystaniem znanych metod syntezy nukleozydów i ich koniugatów. Otrzymano po kilka przykładowych związków dla każdej z kilkunastu grup związków otrzymanych i opisanych w przedstawionej do oceny rozprawie.

Warto podkreślić, że dla wielu klas opisanych związków wykazano ciekawe właściwości biologiczne uzyskując w badaniach komórkowych cytotoksyczność porównywalną do standardów stosowanych w terapii.

Wśród otrzymanych związków najwyższe aktywności uzyskano dla koniugatów nukleozydów z akrydyną. Dla niektórych z tych związków uzyskano wartości IC_{50} o 2 rzędy mniejsze niż dla wyjściowych nukleozydów, czy też pochodnych akrydyny z przyłączonym linkerem. Co ciekawe związki te wykazywały zwiększoną selektywność wyrażoną jako indeks selektywności. Bardzo ciekawą aktywność wykazuje związek nr **261d**. Jest to pochodna AZT, w której do ugrupowania 3'-azydkowego przyłączono pochodną akrydyny poprzez linker sześciowęglowy. Wyniki badań komórkowych bardzo silnie zależą od długości linkera, niestety w pracy nie doszukałem się próby wyjaśnienia tego zjawiska. Chciałbym poprosić o komentarz na ten temat podczas publicznej obrony. Ciekawy wynik uzyskano również dla koniugatu AddFU z jednym z jonoforów (**270**), który wykazywał zwiększoną aktywność i selektywność w stosunku do niektórych komórek nowotworowych.

Przykry obowiązek recenzenta to również wykazanie słabości rozprawy przedstawionej do oceny. Autorka nie ustrzegła się błędów edytorskich, takich jak błędy na schematach, sporadyczne błędy gramatyczne, brak znaków przestankowych, tzw. literówki, czyli brakujące lub niewłaściwe pojedyncze litery. W całej pracy niekonsekwentnie stosowane są separatory dziesiętne, przy czym w większości przypadków, Autorka stosuje nieprawidłowe w języku polskim kropki zamiast przecinków.

Poniżej przedstawiam komentarze o charakterze ogólnym jak również wybrane szczegółowe uwagi dotyczące rozprawy.

Zabrakło mi w pracy pogłębionej analizy wskazującej jak struktura planowanych do syntezy związków ma wpłynąć na ich pożądane właściwości cytotoksyczne. Szkoda również, że autorka pracy nie podjęła się iteracyjnego planowania struktury związków, czyli podejścia, w którym najlepsze związki z pierwszej serii badań biologicznych, są punktem wyjścia dla dalszych modyfikacji chemicznych, co daje szansę na uzyskiwanie produktów o coraz lepszych właściwościach.

Podczas obrony prosiłbym Autorkę rozprawy o przedyskutowanie następujących dwóch kwestii. Pierwsza dotyczy tego, jaka była motywacja do syntezy związków modyfikowanych w reakcji CuAAC w pozycji 5'? Jaki zakładano mechanizm działania tych związków, bo fakt fizjologicznej stabilności ugrupowania triazolowego wyklucza raczej przekształcanie tych związków do trifosforanów i działanie zgodnie z mechanizmem typowym dla terminatorów syntezy kwasów nukleinowych? Drugie zagadnienie do przedyskutowania, to prośba o przedstawienie i omówienie widm ^{19}F NMR dla związków **212f** lub **213f** oraz omówienie wpływu obecności atomów fluoru na pozostałe widma NMR tych związków.

Nie jestem przekonany co do sposobu prezentacji płytek chromatograficznych w postaci rysunków, gdzie związki są przedstawione w postaci kropek charakteryzujących się pewną wartością parametru R_f . Jest to obraz wyidealizowany z jednej strony, a z drugiej część informacji jest gubiona podczas

takiej prezentacji, zdecydowanie bardziej informatywne byłyby zdjęcia płytek z odpowiednimi opisami.

Na niektórych schematach pojawiają się błędy, nieprawidłowe struktury związków, brak warunków reakcji, czy niezdefiniowane podstawniki, a w opisach schematów reakcji zdarzają się odniesienia do związków o nieprawidłowych numerach lub innych reagentów niż przedstawione na schematach. Przykładowo na schemacie 13 związkiem wyjściowym jest tymidyna zamiast 2' deoksyurydyny, jest też niezgodność jeśli chodzi o czynnik fluorujący - na schemacie jest podfluoryn acetylu, a w tekście wymieniono podfluoryn trifluoroacetylu.

Na stronie 56 na rysunku 13 przedstawiono acetalowe grupy ochronne grup 2' i 3' hydroksylowych: grupy benzylidenową i izopropylidenową, w opisie rysunku grupę izopropylidenową błędnie nazwano diizopropylidenową, a co może istotniejsze, zasugerowano że obydwie te grupy ulegają usunięciu w wyniku hydrogenolizy, podczas gdy jest to prawda jedynie dla grupy benzylidenowej.

Na schemacie 22 przedstawiono mechanizm CuAAC, jednym z etapów jest tam użycie zasady w celu oderwania protonu od struktury II, jednak nie znajduje to odzwierciedlenia na strukturze III.

Na niektórych schematach są błędnie zdefiniowane warunki poszczególnych etapów reakcji oznaczone rzymskimi liczbami. Przykładowo na schemacie 4 od przekształcenia związku **20** w **21** warunki v, vi są błędnie zdefiniowane, a warunków oznaczonych vii nie zdefiniowano. Podobne błędy są na schemacie 53.

Zauważyłem też pewną niekonsekwencję w numeracji związków. W niektórych przypadkach pojedynczemu numerowi przypisana jest ściśle zdefiniowana struktura, a w innych przypadkach jest to grupa struktur. Przykładowo, związek **95** na schemacie 48 ma ściśle zdefiniowaną strukturę podczas gdy na schemacie 49 związek oznaczony numerem **95** w grupie arylowej ma podstawnik X i przypisane mu są trzy różne podstawniki, a więc pod tym numerem kryją się trzy różne związki. Na tym samym schemacie w końcowym produkcie nr **97** mamy dwa podstawniki R_1 i R_2 , co sugeruje użycie w etapie podstawienia podstawnika triazolowego aminą drugorzędową podczas gdy w warunkach reakcji jest wymieniona amina pierwszorzędowa zawierająca jedynie podstawnik R_1 .

W pracy zdarzają się również pewne nieścisłości natury chemicznej oraz błędne nazwy związków. Przykładowo na stronie 98 w opisie schematu 54, związek oznaczony jako IV określono diestrem amidofosforanu, podczas gdy mamy do czynienia z monoestrem amidofosforanu. Z kolei na stronie 147 Doktorantka tłumacząc różnice stabilności pomiędzy grupami Boc i Cbz zabezpieczającymi nukleozyd, stwierdza że grupa Boc zawiera dwa wiązania estrowe, podczas gdy Cbz tworzy wiązanie amidowe, opisując w ten sposób ugrupowania węglanowe i karbaminianowe. Podrozdział 3.2.4 nosi nazwę: "Badania aktywności cytostatycznej 3'-azydonukleozydów" podczas gdy opisane są 5'-

azydonukleozydy. Podobnie nieprawidłowo określono nazwę związków badanych w podrozdziale 1.5.3.2.3 N-halogeno-5'-amidofosforany.

Chciałbym stwierdzić, że wskazane drobne braki i niedociągnięcia nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy. Bogaty materiał doświadczalny, uzyskany podczas realizacji pracy jest cenny z punktu widzenia zastosowań terapeutycznych i planowania kolejnych struktur prowadzących do substancji o jeszcze ciekawszych właściwościach. Niektóre z wyników uzyskanych podczas realizacji doktoratu zostały już opublikowane (dwie prace w *Eur. J. Med. Chem.* oraz jedna w *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*). Choć w pracach tych Doktorantka nie jest pierwszą współautorką to jej udział wydaje się istotny. Nie mam wątpliwości, że wiele z pozostałych wyników, w tym synteza i właściwości pochodnych nukleozydów skoniugowanych z azyrydyną doczeka się publikacji w renomowanych czasopismach naukowych.

W konkluzji z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie mgr Natalii Kleczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jacek Jemioła