



Dr hab. Donata Pluskota-Karwatka
Wydział Chemii UAM

Poznań, 30 sierpnia 2015 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani magister Marty Lewandowskiej

„SYNTEZA NOWYCH POCHODNYCH 5'-AMIDOFOSFORANÓW 5-FLUORO-2'-DEOKSYURYDINY
O POTENCJALNEJ AKTYWNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ”

wykonanej w Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydów, Wydziału Chemii,
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

pod kierunkiem profesora UAM doktora habilitowanego Lecha Celewicza.

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy stanowi kontynuację badań prowadzonych w zespole Pana Profesora Lecha Celewicza dotyczących, w bardzo ogólnym ujęciu, syntezy nowych pochodnych nukleozydowych o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. „Nukleozydowy lek ... przeciwnowotworowy (jak pisze Autorka we wstępie do swojej rozprawy), aby mógł być włączony do nowej nici DNA, musi ulec trójstopniowej fosforylacji... . Na ogół najtrudniej zachodzi pierwsza fosforylacja, dlatego współczesne badania skupiają się na otrzymaniu blokowanych 5'-monofosforanów nukleozydów, czyli tak zwanych pronukleotydów”. W tym właśnie obszarze badawczym umiejscowiona jest tematyka rozprawy doktorskiej Pani magister Marty Lewandowskiej. Podstawowym celem jaki postawiła sobie Autorka była synteza nowych analogów 5'-fosforanu 5-fluoro-2'-deoksyurudyny jako proleków, charakteryzujących się lepszymi właściwościami przeciwnowotworowymi niż stosowane w medycynie 5-fluoro-2'-deoksyurydyna oraz 5-fluorouracyl. Zadanie nie było proste. W pierwszym etapie



przeprowadzono modyfikacje strukturalne 5-fluoro-2'-deoksyurydyny polegające na zablokowaniu pozycji 3' grupą *tert*-butoksykarbonylową, na zastąpieniu grupy hydroksylowej w pozycji 3' grupą azydkową, na utworzeniu wiązania podwójnego pomiędzy atomami węgla 2'i 3', a także na utworzeniu cyklicznej struktury 2,3'-anhydronukleozydu otrzymując w ten sposób 4 komponenty do dalszych syntez. Komponenty te posłużyły otrzymaniu czterech serii odpowiednich 5'-amidofosforanowych pochodnych 5-fluorourydyny. Przeprowadzono badania aktywności przeciwnowotworowej uzyskanych związków. Aktywność zsyntezowanych związków badano wobec linii komórkowych: HeLa (cervical cancer), MCF-7 (human breast cancer), KB (oral cancer), aktywność nukleozydowych komponentów dodatkowo wobec linii komórkowych 143B (bone cancer). Badania wykonano z wykorzystaniem testu z zastosowaniem sulforodaminy B. Podjętym przez Panią magister Lewandowską zadaniem była także synteza i badania aktywności cytostatycznej koniugatów nukleozydowo-steroidowych otrzymanych w katalizowanej jonami miedzi (I) 1,3-dipolarnej cykloaddycji Hiusgena pomiędzy azydonukleozydami a steroidami zawierającymi w cząsteczkach wiązanie potrójnie oraz odpowiednio alkinami posiadającymi fragment chinuklidynowy alkaloidu kory chinowej.

Praca jest bardzo obszerna, liczy 260 stron, zbudowana jest klasycznie; zawiera niespełna trzystronicowy wstęp, zilustrowany rysunkami przedstawiającymi wybrane, charakteryzujące się działaniem cytostatycznym analogi nukleozydów pirymidynowych i purynowych, liczącą 73 strony część literaturową, 63 strony opisu wykonanych badań i dyskusji uzyskanych wyników, część eksperymentalną stanowiącą 73 strony, 4 strony podsumowania oraz wykaz cytowanej literatury obejmujący 154 pozycje. Całość poprzedzona jest spisem stosowanych skrótów i symboli oraz streszczeniem w języku angielskim. Praca zawiera także listę publikacji i zgłoszeń patentowych oraz komunikatów, których Pani magister Marta Lewandowska jest współautorką.

Część literaturowa zawiera omówienie metod syntezy nukleozydów pirymidynowych zawierających podstawnik fluorowy. Dyskutowane są metody tworzenia wiązania C-F oparte zarówno na reakcjach substytucji nukleofilowej jak i elektrofilowej z uwzględnieniem



podstawowych odczynników fluorujących. Sporo miejsca poświęca Autorka także syntezie nukleozydów pirymidynowych zawierających ugrupowanie azydkowe przedstawiając różne metody otrzymywania 3'-azydo-3'-deoksytymidyny (AZT) ale także pochodnych tymidyny z grupą azydkową w pozycji 5' czy też 3'-azydo-2',3'-dideoksy-5-fluorourydyny. Ponadto w części literaturowej omówione są metody syntezy 2',3'-didehydo-2',3'-dideoksy nukleozydów pirymidynowych, grupy blokujące stosowane w syntezie pochodnych nukleozydowych, chemiczne metody fosforylacji nukleozydów, projektowanie analogów 5'-fosforanów nukleozydów jako potencjalnych proleków, aktywność biologiczna analogów nukleozydów. Część tę zamykają rozdziały przedstawiające strukturę i właściwości alkaloidów kory chinowej oraz charakterystykę chemii „click”. Dyskutowane w tej części pracy zagadnienia nawiązują do przeprowadzonych przez Autorkę badań, świadczą o jej dobrym przygotowaniu teoretycznym dotyczącym podjętej tematyki badawczej i są pomocne w lekturze dalszych rozdziałów.

Dyskusja wyników jest rzetelnym i precyzyjnym opisem wykonanych badań. W syntezie Autorka wykorzystywała znane procedury adoptując je do swoich celów, a także niekiedy modyfikując w różnym stopniu. Należy docenić wysiłek i umiejętności warsztatowe Doktorantki. Synteza czterech nukleozydowych komponentów, a następnie ich zastosowanie do otrzymania zazwyczaj w wieloetapowych procesach w sumie 38 5'-amidofosforanowych pochodnych 5-fluoro-2'-deoksyurydyny daje wyobrażenie o ogromnym nakładzie pracy eksperymentalnej Pani magister Lewandowskiej. Biorąc ponadto pod uwagę także koniugaty uzyskane w 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena i wyizolowane produkty poszczególnych etapów przeprowadzonych syntez recenzentka doliczyła się ponad 80 otrzymanych związków, których struktury Autorka potwierdziła metodami spektroskopowymi i spektrometrycznymi. Bardzo interesujące są wyniki badań aktywności przeciwnowotworowej zsyntezowanych związków w stosunku do wybranych linii komórkowych. Ta część prac została wykonana we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu przez dr Piotra Ruszkowskiego z Zakładu Farmakologii tegoż uniwersytetu. Omówienie wyników uzyskanych z tej części badań jest silną stroną recenzowanej rozprawy - Doktorantka opracowała ten fragment bardzo wnikliwie co sprawia, że czyta się go z dużym

zainteresowaniem. Za najważniejsze i bardzo wartościowe osiągnięcie Doktorantki uważam otrzymanie wśród szeregu nowych, 5'-amidofosforanów 5-fluoro-2'-deoksyurydyny takich pochodnych, które charakteryzują się wysoką aktywnością cytostatyczną, zdolnością do przenikania przez fosfolipidową błonę komórkową i mogą być sklasyfikowane jako pronukleotydy. Związki te z pewnością zasługują na szczególną uwagę i dalsze badania.

Część eksperymentalna zredagowana została z dużą starannością. Struktura uzyskanych związków jest dobrze udokumentowana za pomocą ^1H , ^{13}C , ^{19}F i ^{31}P NMR oraz MS-ESI. Brakuje mi jednak zarówno temperatur topnienia związków otrzymanych w postaci krystalicznej (Autorka nie zawsze podaje informację dotyczącą postaci, w jakiej uzyskano związek), jak i charakterystyki za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas lub analizy elementarnej głównych produktów syntez będących nowymi związkami.

Rozdział „Podsumowanie” nie wzbudza zachwytu. Stanowi raczej streszczenie „Dyskusji wyników”, podczas gdy w tego rodzaju opracowaniu naukowym oczekiwałabym raczej podkreślenia najistotniejszych osiągnięć i sformułowania bardziej ogólnych wniosków.

Chciałabym pochwalić ładną szatę graficzną recenzowanej pracy i zasadniczo poprawny język; Autorka uniknęła kolokwializmów. Zauważyłam tylko jeden; na stronie 103 Doktorantka używa sformułowania: „w suchym DMF”. W pracy ogólnie brakuje odsyłaczy do rysunków i schematów, znaleźć można tylko bardzo nieliczne; na przykład na stronie 49 znajduje się odsyłacz do rysunku 11 ale na następnej stronie nie doszukamy się już odsyłacza do rysunku 12. Nie byłam w stanie rozszyfrować klucza według którego Autorka umieszcza lub też nie umieszcza odpowiednich odsyłaczy. Sporo zastrzeżeń budzi także strona edytorska pracy; liczba błędów w tym zakresie wydaje się świadczyć o znacznym pośpiechu w jakim pracę przygotowywano ale wynika też zapewne ze znacznej objętości rozprawy. Pomyłki językowe (głównie gramatyczne) lub edytorskie znaleźć można prawie na każdej stronie. Kilka poważniejszych pozwolę sobie wymienić poniżej.

- Na stronie 19: „Ważną rolę (...) odgrywają analogii nukleozydów”, winno być: „analogi nukleozydów”.

- Spektrometrię mas zaliczamy do metod spektrometrycznych, nie spektroskopowych (strony: 100, 103, 108, 109).
- Badań dokonuje się „za pomocą” odpowiednich technik, a nie „przy pomocy” (między innymi na stronach: 100, 105, 106, 107, 108, 109, 130, 158, 163).
- Stałą sprzężenia „J” winno się zapisywać kursywą: „J”, podobnie jak „d” w „DMSO-d₆” (część eksperymentalna).
- Na stronie 119 wzory struktur: 161, 163 i 159j (schemat 59) zawierają błąd: brakuje atomu tlenu między atomem fosforu a atomem węgla pierścienia aromatycznego.
- Znajdujący się na stronie 162 rysunek powinien mieć numer 57, nie 37.
- Kinaza tymidynowa, nie „tymidyłanowa” (strony: 128 i 244).
- Czasem w zapisie mechanizmu reakcji Autorka uwzględnia zarówno etap addycji jak i eliminacji (na przykład na stronie 55, na schemacie 22), częściej jednak zapis jest według mnie mniej poprawny, jak np. na stronie 62, na schemacie 29.

Na zakończenie tej części recenzji przytoczę jeszcze kilka niefortunnych sformułowań.

„Bardziej szybciej metabolizowane” (strona 122).

„Oznacza to, że (związki) uzyskały optymalną wartość współczynnika podziału (...), która dowodzi o lipofilowym charakterze związków i zdolności skutecznego wnikania do komórek” (strona 122).

„Z uzyskanych danych możemy zauważyć ciekawe rezultaty” (strona 135).

„Czyste frakcje zbierano przy eluencji” (strona 196).

Uchybienia językowe i edytorskie nie mają wpływu na moją końcową, bardzo wysoką ocenę przedłożonej do recenzji pracy. O wartości naukowej uzyskanych przez Doktorantkę wyników świadczy fakt, że zostały one już częściowo opisane w trzech publikacjach, które ukazały się w dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, są ponadto przedmiotem trzech zgłoszeń patentowych.

Stwierdzam, że praca Pani magister Marty Lewandowskiej spełnia wszystkie, zarówno zwyczajowe jak i ustawowe wymogi, stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem



do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie
Pani magister Marty Lewandowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Donata Pluskota