



Prof. dr hab. Barbara Nawrot  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych  
Polska Akademia Nauk  
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź  
Tel: 42-6816970; Fax: 42-6815483  
[bnawrot@cbmm.lodz.pl](mailto:bnawrot@cbmm.lodz.pl)

Łódź, 24 sierpnia 2015

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Lewandowskiej  
p.t. „Synteza nowych pochodnych 5'-amidofosforanów 5-fluoro-2'-deoksyurydyny  
o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej”**

Rozprawa doktorska mgr Marty Lewandowskiej została wykonana w Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydów, na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem profesora UAM dr hab. Lecha Celewicza. Obszarem badawczym zespołu profesora Celewicza jest synteza analogów nukleozydów i nukleotydów, z grupy tzw. proleków, o potencjalnej aktywności biologicznej, szczególnie o aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej. W tym nurcie utrzymane są również badania stanowiące treść rozprawy doktorskiej mgr Marty Lewandowskiej.

Celem tych badań było opracowanie warunków syntezy nowych analogów 5'-fosforanów czterech pochodnych 5-fluoro-2'-deoksyurydyny (znanego leku przeciwnowotworowego) i ich koniugatów z resztami alkaloidów i steroidów, oraz zbadanie aktywności biologicznej uzyskanych połączeń w wybranych modelach komórek nowotworowych. W badaniach wykorzystano znane w chemii nukleozydów podejścia syntetyczne oraz reakcje typu „click”. Zastosowano standardowe w chemii nukleozydów i peptydów grupy ochronne. Otrzymano około 70 nowych związków, dla których przeprowadzono analizę fizykochemiczną i zbadano cytotoksyczność. W efekcie wyselekcjonowano nowe proleki, wykazujące korzystne właściwości cytostatyczne, lepsze od właściwości leków dotychczas stosowanych. Tym samym osiągnięto założony cel Rozprawy.

**Pod względem formalnym** dysertacja ma układ typowy dla tego typu prac naukowych i liczy łącznie 255 stron. W początkowej części po 4-stronicowym streszczeniu w języku angielskim, wykazie używanych skrótów i symboli oraz 2,5-stronicowym Wstępie zawiera pokaźną Część literaturową, liczącą 73 strony. Następnie, kolejno przedstawiony jest Cel badań (2 strony), Dyskusja wyników (67 stron), Część eksperymentalna (74 strony), Podsumowanie (5 stron), oraz liczący 154 pozycje Wykaz cytowanej literatury. Rozprawę uzupełnia zamieszczona na końcu lista publikacji, patentów oraz komunikatów konferencyjnych. Mgr Marta Lewandowska ma zauważalny dorobek naukowy. Jest współautorką 3 publikacji – dwóch w *Eur. J. Med. Chem.* (IF 3,43) (w jednej jako pierwszy autor), oraz jednej w *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* (IF 1,018), oraz czterech artykułów w materiałach konferencyjnych. Wszystkie te prace związane są z tematyką rozprawy. Jest też współautorką trzech zgłoszeń patentowych, w tym dwóch światowych i jednego polskiego oraz 23 plakatów na konferencjach naukowych, w tym ośmiu jako autorka prezentująca.

**Ocena merytoryczna Dysertacji:**

**Część literaturowa** jest obszerna, przedstawia stan wiedzy w obszarach mniej lub bardziej odnoszących się do tematyki rozprawy. W pierwszej kolejności opisane są syntetyczne podejścia do otrzymywania nukleozydów zawierających podstawnik fluorowy, azydkowy lub modyfikowany pierścień 2',3'-dideoksyrybozy. Następnie Autorka bardzo skrótowo omawia grupy ochronne stosowane w chemii nukleozydów, a więc grupy ochronne dla funkcji hydroksylowych w części cukrowej i grupy ochronne

nukleozasad. Kolejno poświęca nieco uwagi chemicznym metodom fosforylacji nukleozydów, a właściwie są to metody amidofosforylacji, w oparciu o chemię fosforu P(III) i P(V), po czym dosyć pobieżnie przedstawia koncepcję proleków i prezentuje właściwości przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe wybranych pronukleotydów. W rozdziale tym, pod względem merytorycznym najbardziej istotnym dla rozprawy, podaje jedynie trzy różne podejścia dla projektowania pronukleotydów. Są to amidofosforany McGuigana, podstawione amidosfosforany Borchy i cykliczne 3',5'-amidofosforany Kalmana i Jaina. Pomija tak reprezentatywne struktury pronukleotydów jak pochodne triestrowe cycloSal Chrisa Meiera, czy koncepcję pronukleotydów z grupami SATE, zaproponowaną przez Jean-Louisa Imbacha a rozwiniętą przez Christiana Perigauda. Część literaturowa zawiera także wzmiankę o alkaloidach kory chinowej użytych do syntezy koniugatów. Ten fragment można byłoby pominąć, zwłaszcza, że nie omówiono właściwości i struktury steroli, zastosowanych w tym samym celu. Ostatni temat, omówiony w tej części dysertacji dotyczy generalnie reakcji typu „click”, z bardziej szczegółowym omówieniem reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, zachodzącej pomiędzy komponentem azydkowym i komponentem alkinowym w obecności jonów miedzi. Podkreślona została duża użyteczność tego typu reakcji dla modyfikacji leków nukleozydowych, zwłaszcza, że tworzące się pochodne 1,2,3-triazoli wykazują niską toksyczność w organizmach żywych. Wstęp ten przygotowuje czytelnika do lektury kolejnych rozdziałów dysertacji. W mojej opinii wstęp ten mógłby być nieco krótszy, ale powinien bardziej dogłębnie traktować wybrane zagadnienia (np. koncepcję proleków). Poza tym, Doktorantka powinna zwrócić większą uwagę na poprawność cytowanej literatury oraz poprawność struktur w schematach syntetycznych i wzorach chemicznych związków. W części tej znalazłam wiele pomyłek, które w oddzielnym pliku przekazałam do wiadomości Doktorantce.

W kolejnym rozdziale **Dyskusja wyników**, który poprawnie powinien być nazwany **Omówienie i Dyskusja wyników**, Doktorantka w sposób systematyczny opisuje poszczególne schematy syntetyczne otrzymania zaplanowanych analogów 5'-amidofosforanów nukleozydów o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Obiektem jej zainteresowania są pochodne zawierające 5-fluorouracyl, a więc znany lek 5'-fluoro-2'-deoksyurydyna (FdU), oraz jej 3'-azydo-pochodna (AddFU) i analog 2',3'-didehydro-3'-deoksy (d4FU). Ostatnim obiektem zainteresowań jest 2,3'-anhydro-pochodna FdU. Dla każdej serii związków szczegółowo opisane są warunki syntezy zarówno samych pochodnych FdU, jak i ich 5'-amidofosforanów. Opisy poszczególnych syntez są *de facto* powtórzeniem przepisów umieszczonych w części eksperymentalnej, natomiast zabrakło mi, przynajmniej w niektórych opisach, komentarza na temat mechanizmu przeprowadzanej reakcji. Na przykład nie ma słowa na temat przeprowadzanej kilkakrotnie reakcji amidowania H-fosfonianów i jej mechanizmu, a jest to przecież ważna w chemii fosforu reakcja Athertona-Todda. Proszę o komentarz, jaki jest mechanizm tej reakcji i jakie odczynniki halogenujące są w niej stosowane. W opisach nie ma też żadnych komentarzy na temat ewentualnych problemów syntetycznych. Czy faktycznie była to chemia łatwa, lekka i przyjemna? W opisach podawana jest natomiast wydajność reakcji, obraz TLC substratu i produktu oraz skład układu eluującego, jeśli była robiona chromatografia kolumnowa na żelu krzemionkowym. Dane te, powtarzające się dla danej serii związków, powinny raczej znaleźć się w części eksperymentalnej, a komentarz powinien dotyczyć tylko tych właściwości związków, które potwierdzającą ich strukturę (np. przesunięcie sygnału  $^{31}\text{P}$  NMR w porównaniu do substratu). Zabrakło mi też jakiegokolwiek dyskusji na temat właściwości spektralnych otrzymanych związków, np. porównania przesunięć sygnału jądra fluoru w widmach  $^{19}\text{F}$  NMR, w zależności od podstawników w reszcie cukrowej, czy też przesunięć sygnału jądra fosforu w amidofosforanach. Związki te, ze stereogenicznym atomem fosforu, występują w postaci mieszaniny diastereomerów. Tutaj również nie znalazłam żadnego komentarza wyjaśniającego krotkość obserwowanych w widmie  $^{31}\text{P}$  NMR sygnałów. W tej części rozprawy Doktorantka otrzymała 4 pochodne FdU (AddFU, d4FU, anhydroFdU i 3'-BOC-FdU) wykorzystując opisane w literaturze podejścia. Warte podkreślenia jest opracowanie dwuetapowej syntezy pochodnej 3'-azydo-FdU tj. AddFU z FdU, poprzez pochodną 2,3'-anhydro-FdU (schemat 53), w której pożądaný produkt otrzymano z wydajnością 65%. Następnie, związki te poddane zostały reakcji 5'-amidofosforylacji, głównie według ulepszonej w Zespole Profesora Celewiczca procedury oryginalnie zaproponowanej przez Chatopadhyaya i Reesa. Przeprowadzono też badania nad reakcją amidowania FdU w oparciu o chemię P(III). W ten sposób łącznie otrzymano około 50 związków, w tym zdecydowana

większość to związki nowe (aczkolwiek w rozprawie nie ma dokładnej informacji, które związki są już znane, a które nowe).

Ponadto, w warunkach opracowanych przez Bary'ego Sharplessa przeprowadzono reakcję typu „click” pomiędzy alkinowymi pochodnymi wybranych komponentów hydrofobowych (dwóch steroli i dwóch diastereomerów chinuklidyny) a azydo-nukleozydami (AZT i AddFU) lub pomiędzy alkinowymi pochodnymi dwóch steroli i amidofosforanów **160g** i **160i** modyfikowanych grupą alkiloazydową (dla alkilu o  $n=3$  lub  $4$ ). W ten sposób otrzymano kolejne serie 20 nowych związków. Podsumowując tę część pracy muszę podkreślić, że Doktorantka wykonała tytaniczną pracę syntetyczną otrzymując tak wiele nowych związków. Pracę tę wykonała w sposób profesjonalny. Wykazała się umiejętnością prowadzenia procesów chemicznych, wyodrębniania i oczyszczania produktów reakcji metodami chromatograficznymi (chromatografia TLC i kolumnowa), a także znajomością metod spektralnych ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{19}\text{F}$  NMR i spektrometrii mas techniką ESI), które wykorzystała do zbadania struktury otrzymanych związków. Odpowiednie dane spektralne cytowane są w części eksperymentalnej rozprawy.

Otrzymane związki zostały przebadane pod względem ich właściwości toksycznych w stosunku do wybranych linii komórek nowotworowych. W sumie oznaczono cytotoksyczność związków w stosunku do pięciu linii komórkowych, tj. raka nosogardzieli (KB), raka szyjki macicy (HeLa), piersi (MCF-7), oraz raka kości (143B) także w wersji TK, tj. bez ekspresji genu kinazy tymidynowej, a w kilku przypadkach dodatkowo w stosunku do linii raka płuc (A549). Wyznaczono też logarytm współczynnika podziału (LogP) dla każdego związku dla układu  $n$ -oktanol/woda. Badania te zostały wykonane w Zakładzie Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przez dr. Piotra Ruszkowskiego z zastosowaniem sulforodaminy B (testu SRB). Badania te pozwoliły na sformułowanie wniosków dotyczących wpływu poszczególnych elementów strukturalnych na właściwości biologiczne badanych związków i możliwości ich zastosowania jako proleków. Najciekawsze wyniki tych badań to stwierdzenie, że niektóre z wytworzonych pochodnych FdU i ich 5'-amidofosforanów wykazują wyższą aktywność niż wyjściowy FdU, niezależną od obecności kinazy tymidynowej, enzymu o charakterze fosforotransferazy, odpowiedzialnego za wprowadzenie pierwszej reszty fosforanowej na grupę 5'-OH nukleozydu. W ten sposób wyselekcjonowano co najmniej kilka związków (**159f**, **160c**, **160f** i **168b**), które spełniają kryteria proleków. Interesujące jest również stwierdzenie (na podstawie analizy toksyczności związków **159j** i **160j**), że podstawnik chlorowy w pierścieniu fenyłowym znacząco zwiększa aktywność cytostatyczną, w porównaniu do związków bez halogenu, odpowiednio, **174** i **175**. Oznacza to, że podstawnik chlorowca ułatwia odejście grupy fenyłowej poprzez hydrolizę triestru amidofosforanowego w środowisku komórki. Proszę o komentarz, dlaczego obserwuje się taki efekt. Szkoda, że Doktorantka nie podjęła się zbadania stabilności wytworzonych amidofosforanów w środowisku wodnym w różnym pH, co dałoby wskazówki o podatności porównywanych związków na hydrolizę. W rozprawie nie przeanalizowano także wpływu funkcji 3'-OH w związkach **159** i **160** (z ochroną BOC i bez niej) na ich aktywność cytostatyczną. Poza tym wykazano, że koniugaty azydo-nukleozydów i liopofilowych steroli posiadają właściwości znacznie bardziej liopofilowe niż ich nukleozydowe prekursorzy, co determinuje ich niską rozpuszczalność w płynach fizjologicznych i niską aktywność cytotoksyczną. Przeciwnie wyniki uzyskano dla koniugatów z alkaloidami, dla których współczynnik LogP przyjmuje niskie wartości (związki hydrofilowe), co wiąże się z kolei z niską efektywnością transportu przez błony komórkowe i tym samym, z niską cytotoksycznością.

W rozprawie zabrakło mi opisu procedury oznaczania cytotoksyczności i lipofilowości związków. Pomimo, że Doktorantka nie wykonywała osobiście tych doświadczeń, to jednak powinna znać podstawy teoretyczne każdego doświadczenia i opisać ich wykonanie, podać jak obliczana jest wartość LogP i  $\text{IC}_{50}$ . Mam też wątpliwość co do zaproponowanego mechanizmu usuwania grupy azydkowej (Schemat 60) za pomocą cytochromu P450. Produkty tej reakcji można było zidentyfikować metodą spektrometrii mas i wiedzieć, czy istotnie P450 metabolizuje *in vitro* grupę azydkową do aminowej. Generalnie, brakowało też porównania właściwości otrzymanych proleków z innymi stosowanymi prolekami, a także informacji, które ze związków są już znane i zbadane pod względem ich właściwości cytotoksycznych. Proszę o komentarz do powyższych uwag w czasie publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

W tekście recenzji zaznaczyłam uwagi krytyczne, które wymagają wyjaśnienia. Ponadto mam jeszcze kilka drobnych uwag merytorycznych, o wyjaśnienie których proszę podczas publicznej obrony. Pozostałe uwagi (głównie edytorskie) przekazuję Doktorantce poza protokołem.

#### Uwagi krytyczne wymagające wyjaśnienia:

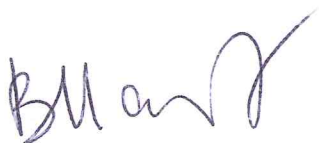
1. Str. 20 – grupy blokujące na „atomie fosforu” czy raczej na funkcji fosforanowej?
2. Niepoprawnie jest wielokrotnie użyty zwrot „substrat wyjściowy” – „substrat” zawsze oznacza związek wyjściowy
3. Co oznacza „stara nić RNA”? str. 32
4. Str. 38 - co to jest dimer 3-7?
5. Str. 48 – czy poprawna jest nazwa „blokada” dla grupy ochronnej?
6. Str. 103 - Czy istotnie produkt **45** w postaci białego osadu oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej?
7. Proszę o komentarz, według jakiej procedury otrzymano i jak zidentyfikowano produkty **154** i **155**

Praca napisana jest poprawnym językiem polskim, porządnie opracowane są dane eksperymentalne, bardzo systematycznie opisane są wyniki badań własnych.

Wykaz cytowanej literatury liczący 154 pozycje dotyczy prac opublikowanych w literaturze przedmiotu w ciągu ostatnich 50 lat. Szkoda, że odnośniki literaturowe nie są podawane wraz z tytułami, co ogromnie ułatwiłoby sprawdzenie poprawności cytowania.

**Podsumowując**, Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia badań naukowych i oryginalnością rozwiązanego problemu naukowego. Dobrze porusza się w problematyce pronukleotydów o właściwościach przeciwnowotworowych. Zna metodykę badań strukturalnych i umie prowadzić syntezy organiczne. Otrzymane wyniki biologicznie poprawnie zinterpretowała, porównując je do wyników wzorca oraz związków wyjściowych. Wykazała, że kilka z otrzymanych związków może być traktowanych jako potencjalne proleki przeciwnowotworowe. Krytyczne uwagi służą wskazaniu Doktorantce, na jakie zagadnienia, zarówno merytoryczne, jak i edytorskie powinna zwrócić uwagę w przyszłych swoich badaniach.

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



Prof. dr hab. Barbara Nawrot

Łódź, 24 sierpnia 2015 roku