

dr hab. Aneta Pogorzelska
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 15.06.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły

z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej i Technologii Leków
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

pt. *Synteza nowych pochodnych 5-amino-4-karbonitrylu
i oksazolo[5,4-d]pirmidyny o potencjalnej aktywności biologicznej*

Oceniana rozprawa doktorska mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły porusza problem projektowania i syntezy oryginalnych związków o potencjalnej aktywności biologicznej, które w przyszłości mogłyby znaleźć zastosowanie jako potencjalne substancje lecznicze. Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest bez wątpienia istotna i aktualna w kontekście zarówno rozwoju nauk farmaceutycznych, jak też w aspekcie społecznym.

Układy oksazolu, izoksazolu i oksazolopirymidyny stanowią rozpowszechniony element struktur wielu naturalnych i syntetycznych związków wykazujących szerokie spektrum aktywności biologicznej. Wśród potencjalnych właściwości terapeutycznych diskutowanych heterocykli wyróżnić można aktywność przeciwdrobnoustrojową, przeciwzapalną, przeciwbólową, przeciwcukrzycową oraz przeciwnowotworową. Co istotne, związki te charakteryzują się różnorodnym mechanizmem działania wskutek wiązania się z szeregiem receptorów czy też enzymów, głównie na drodze oddziaływań niekwalencyjnych. Biorąc pod uwagę szeroki zakres aktywności biologicznych pięcioczłonowych pierścieni zawierających atom azotu i tlenu, badania dedykowane poszukiwaniu nowych związków strukturalnie opartych o tego typu fragmentu znajduje pełne uzasadnienie.

Niniejsza praca doktorska stanowi kontynuację badań nad reaktywnością kwasu 5-amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego prowadzonych od lat w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej i Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły stanowi podsumowanie dwóch oryginalnych prac eksperymentalnych i dwóch prac przeglądowych o sumarycznym wskaźniku oddziaływania IF wynoszącym 22,637 (MEiN – 560). We wszystkich publikacjach składających się na cykl będący podstawą rozprawy, Doktorantka jest pierwszym autorem, w trzech jest również autorem korespondencyjnym. Wiodący wkład Autorki potwierdzają także jednoznacznie załączone oświadczenia współautorów cyklu prac. Warty podkreślenia jest także całkowity dorobek naukowy mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły, na który składa się dziewięć

prac o łącznym współczynniku oddziaływania IF równym 46,753 (MEiN – 779), całkowitej liczbie cytowań 87, co przekłada się na indeks H = 5. Doktorantka jest również współautorem patentu nr PAT.229424 z 2018 r. zatytułowanego *Nowa pochodna kwasu 5-amino-3-metyloizoksazolo-4-karboksylowego, sposób jej wytwarzania i zastosowanie* oraz 17 doniesień konferencyjnych.

Pod względem redakcyjnym i graficznym praca doktorska mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły została przygotowana bardzo starannie. Nie uwzględniając załączników, liczy 46 stron tekstu zawierającego 12 rysunków i 2 schematy, 45 pozycji cytowanego piśmiennictwa oraz wykaz skrótów. Dysertacja jest praktycznie pozbawiona błędów typograficznych, zdarzają się jedynie bardzo nieliczne błędy literowe.

Rozprawa mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły podzielona została w sposób czytelny i bez wątplenia ułatwiający sprawne poruszanie się po dysertacji. Omówienie badań własnych Autorka poprzedza krótkim, rzeczowym wprowadzeniem w podjętą tematykę. W dalszej części rozprawy Doktorantka szczegółowo przedstawia cele i hipotezy badawcze a następnie omawia metodologię przeprowadzonych badań. Kolejny rozdział stanowi podsumowanie cyklu prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej Autorki. Dysertację zamyka część zatytułowana *Podsumowanie i wnioski, Streszczenie* w języku polskim i angielskim, podsumowanie całkowitego dorobku naukowego oraz *Bibliografia*. W pracy załączone są również kopie publikacji stanowiących podstawę rozprawy, wraz z suplementami, oraz oświadczenia współautorów podsumowujące ich procentowy udział w badaniach i przygotowaniu manuskryptów. Autorka rozprawy definiuje także swój wkład w poszczególnych pracach omawianego cyklu, który w zakresie eksperymentalnym polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu syntez, wykonaniu badań strukturalnych oraz interpretacji danych. W pracach przeglądowych Autorka deklaruje, iż uczestniczyła w opracowaniu koncepcji oraz dokonała wyboru i omówienia literatury, zarówno w aspekcie przygotowania tekstu manuskryptu, jak również jego oprawy graficznej.

Jako główne cele badawcze Autorka definiuje zaprojektowanie oraz syntezę pochodnych 5-aminooksazolo-4-karbonitrylu i oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny oraz przeprowadzenie przeglądu literatury obejmującego leki zarejestrowane po 2010 r. do leczenia nowotworów złośliwych. Postawiona hipoteza zakładała połączenie kilku fragmentów farmakoforowych w jeden związek hybrydowy, co wpisuje się w znaną z piśmiennictwa metodologię projektowania substancji biologicznie aktywnych. Na podstawie przeprowadzonej analizy piśmiennictwa, Autorka założyła ponadto, że zsyntetyzowane związki mogą być potencjalnymi inhibitorami ludzkiego VEGFR2.

Realizacja celów eksperymentalnej części pracy mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły obejmowała uzyskanie trzech serii pochodnych charakteryzujących się obecnością pierścienia izoksazolu w pozycji 2 fragmentu oksazolowego. Zaplanowane pochodne Doktorantka otrzymała na drodze kilkuetapowej syntezy, wykorzystując 5-amino-2-(5-amino-3-metyloizoksazol-4-ilo)oksazolo-4-karbonitryl **S1** jako substrat do otrzymania kolejnych zaprojektowanych serii związków. Reakcja grup aminowych w wyjściowym karbonitrylu **S1** z odpowiednimi ortoestrami pozwoliła uzyskać pochodne **S2** i **S3**, które dalej zostały przekształcone w oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny **P1** i **P4** w wyniku cyklizacji zachodzącej pod wpływem pierwszorzędowych amin alifatycznych. W wyniku

przeprowadzonych syntez, mgr Aleksandra Sochacka-Ćwikła otrzymała 27 nowych, nieopisanych wcześniej związków heterocyklicznych, których struktury potwierdziła z wykorzystaniem metod spektroskopowych (IR, ^1H i ^{13}C NMR) oraz spektrometrii mas. Jednoznacznego potwierdzenia struktury analogów **P1** dostarczyła analiza rentgenostrukturalna wykonana we współpracy z jednostką macierzystą Doktorantki oraz jednostką zewnętrzną (Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski)

Badania aktywności biologicznej oksazolo[5,4-*d*]pirymidyn **P1** i **P4** posłużyły do weryfikacji postawionej hipotezy badawczej. Zaplanowane doświadczenia *in vitro* obejmowały ocenę aktywności przeciwnowotworowej dla obu serii związków oraz przeciwwirusowej i immunomodulującej dla pochodnych **P1**. Badania te zostały wykonane w ramach współpracy z jednostkami zewnętrznymi (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Katedra i Zakład Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu).

Spośród pochodnych serii **P1**, mgr Aleksandra Sochacka-Ćwikła wskazuje dwa związki, które odznaczały się szczególnie interesującym profilem aktywności biologicznej obejmującym właściwości immunoregulacyjne, wirusobójcze wobec wirusa opryszki pospolitej HHV-1 oraz hamujące wzrost komórek nowotworowych niektórych linii komórkowych. Autorka słusznie konkluduje, w kontekście uzyskanych wyników, że najistotniejszym elementem struktury wpływającym na aktywność biologiczną związków **P1** jest lipofilowość podstawnika znajdującego się w pozycji 7 szkieletu oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny. Pogłębione badania biologiczne dla wyselekcjonowanych dwóch związków obejmowały poszukiwanie mechanizmu działania pochodnych. *Wyniki w mojej ocenie wskazują jednak, że wyciągnięte przez Autorkę wnioski są nieco zbyt ogólne i wymagają większego uszczegółowienia. Biorąc pod uwagę, że każdy z badanych związków wykazał inny wpływ na ekspresję badanych cząsteczek sygnałowych, wybór struktur wiodących do dalszych modyfikacji powinien być bardziej precyzyjny i skoncentrowany na określonej aktywności biologicznej.*

Badania związków serii **P4** koncentrowały się na określeniu ich aktywności cytotoksycznej wobec komórek należących do czterech linii nowotworowych. Spośród przebadanych związków najwyższą aktywność, zwłaszcza wobec komórek raka jelita grubego HT29, wykazała pochodna z podstawnikiem 3-(*N,N*-dimetyloamino)propylowym w pozycji 7 ugrupowania oksazolo[5,4-*d*]pirymidynowego. Dalsze badania biologiczne wykazały, że związek ten hamuje migrację komórek HT29 oraz indukuje śmierć komórek poprzez zewnętrzny szlak apoptozy. Na podstawie uzyskanych wyników badań biologicznych, Doktorantka prawidłowo formułuje wnioski dotyczące zależności między strukturą a aktywnością związków serii **P4** wskazując, że modyfikacja pozycji 7 grupami zawierającymi co najmniej sześć atomów niebędących donorami protonów znacząco podnosi aktywność związków, w szczególności wobec komórek linii HT29. Wartościowym uzupełnieniem badań biologicznych było wykorzystanie modelowania molekularnego w celu określenia możliwości wiązania się pochodnych **P4** z receptorem VEGFR2, co pozwoliło na wyznaczenie cech farmakoforowych pochodnych istotnych dla wiązania się z receptorem. Autorka zauważa, że istotnym elementem strukturalnym związków serii **P4** jest występowanie grupy metinowej w pozycji 5 układu oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny, która jest donorem wiązania wodorowego

w oddziaływaniu z Asp1046 w domenie DFG receptora. Ponadto, według Doktorantki, w strukturze powinno być obecne ugrupowanie hydrofobowe penetrujące kieszeń allosteryczną oraz płaskie ugrupowanie heteroaromatyczne tworzące wiązanie wodorowe z regionie zawiasowym. *W tym miejscu nasuwa mi się pewna wątpliwość związana głównie ze sformułowaniem „płaskie ugrupowanie heteroaromatyczne”. Otóż z definicji związek aromatyczny powinien być płaski. W świetle wykonanego modelowania konkluzja dotycząca hydrofobowości podstawnika wydaje się również zbyt mało precyzyjna, gdyż niewykonane lub niezamieszczone zostały wyniki dokowania uwzględniające w pozycji 7 grupy hydrofilowe.*

Aktywność cytotoksyczna uzyskanych przez mgr Aleksandrę Sochacką-Ćwikłę pochodnych skłoniła Doktorantkę do wnikliwej analizy aktualnego stanu wiedzy dotyczącego terapii przeciwnowotworowych zatwierdzonych przez FDA po 2010 roku. Autorka rozprawy podsumowuje w dwóch pracach przeglądowych trendy i postępy w projektowaniu leków stosowanych w leczeniu nowotworów złośliwych. Ten niezwykle obszerny materiał Autorka podzieliła na terapie obejmujące nowotwory hematologiczne oraz guzy lite. Doktorantka dokonała analizy leków zarówno pod kątem ich struktury jak i mechanizmu działania oraz opisała szczegółowo specyficzne dla nich cele molekularne. W publikacji prezentującej zestawienie środków leczniczych stosowanych w leczeniu złośliwych nowotworów hematologicznych Autorka opisała 52 związki. Szczegółowa analiza budowy nowych leków pozwoliła Doktorantce wykazać, że wśród substancji małowcząsteczkowych znacząco przeważają związki zawierające pierścienie heterocykliczne z atomami azotu. Podkreśla Ona jednak, że przeważającym trendem w poszukiwaniu skutecznych i mało toksycznych terapii nowotworów hematologicznych jest projektowanie substancji o strukturze makromolekuł. Praca przeglądowa dotycząca środków wprowadzonych do leczenia złośliwych guzów litych obejmowała charakterystykę 62 związków małowcząsteczkowych. Przegląd literatury pozwolił Autorce stwierdzić, że struktury nowo zarejestrowanych leków w przeważającej większości zawierają układy heterocykliczne z atomami azotu. Doktorantka przeprowadziła także gruntowną analizę mechanizmów działania nowych leków i zauważyła, że dominują substancje charakteryzujące się działaniem selektywnym. W podsumowaniu przeglądu mgr Aleksandra Sochacka-Ćwikła przedstawiła główne kierunki rozwoju i wyzwania w projektowaniu małowcząsteczkowych środków przeciwnowotworowych.

W kontekście trafnie postawionych hipotez badawczych i realizacji zaplanowanych celów, rozprawę mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły oceniam jak najbardziej pozytywnie. Wnikliwa analiza całości ocenianej dysertacji nasuwa mi jednak kilka kwestii, co do których mam pewne, nieujęte powyżej, uwagi bądź wątpliwości:

- W przypadku serii **P1** Doktorantka opisuje określenie mechanizmu działania związków. Biorąc pod uwagę szerokie spektrum opisywanych aktywności tych pochodnych należałoby doprecyzować, dla których właściwości biologicznych uzyskane wyniki dot. mechanizmu są najbardziej istotne. W tej części Autorka opisuje indukcję szlaków prowadzących do apoptozy. Czy tego typu badania miały na celu poszukiwanie mechanizmu działania cytotoksycznego wobec komórek nowotworowych? Jeśli tak, to czy nie bardziej adekwatnym byłby model związany z najbardziej wrażliwą linią komórkową a nie komórki wykorzystane w badaniach (Jurkat czy też WEHI-231)?

- Str. 29 cyt.: „Na przykładzie związku 3g, który jest najsilniejszym z zaprojektowanych inhibitorów” – niejasne jest co Autorka miała konkretnie na myśli. Czy chodzi o aktywność biologiczną, czy o wyznaczone w dokowaniu szacunkowe parametry?
- Czy dokonano oceny czystości związków przekazanych do badań *in vitro* metodą inną niż TLC (np. HPLC)? Jest to aspekt istotny w kontekście rzetelności uzyskanych wyników.
- Zdefiniowanie celu jako przeprowadzenie przeglądu literaturowego jest w mojej opinii zbyt potoczne. Celem samym w sobie wydaje się opis aktualnego stanu wiedzy, przeprowadzenie samego przeglądu odpowiada bardziej metodzie badawczej.
- Str. 12 cyt.: „W przypadku pierścieni izoksazolu i oksazolu jest to działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwwirusowe, ..., przeciwgrzybicze, przeciw pasożytnicze...” – czy w definicji aktywności przeciwdrobnoustrojowej nie zawierają się te wymienione w dalszej kolejności?
- Str. 25 cyt.: „wszystkie opisane środki małowcząsteczkowe były aromatycznymi związkami aromatycznymi” – już pobieżna analiza wskazuje, że w zdecydowanej większości substancje te nie były związkami aromatycznymi, aczkolwiek w ich strukturze takowe możemy odnaleźć.
- Przykładowo str. 20, 23: Autorka formułuje zwroty *hamowały wzrost wybranych linii komórek nowotworowych* czy też *badanie żywotności wybranych linii komórkowych*; terminologia w pracach naukowych powinna być nieco bardziej precyzyjna: *hamowały wzrost komórek wybranych linii komórkowych* lub *badanie żywotności komórek wybranych linii komórkowych*.
- Str. 22, rys 5: strzałka odpowiada strukturom rezonansowym, nie tautomerycznym.
- Zapis zwrotów łacińskich powinien być stosowany konsekwentnie w całej rozprawie; Doktorantka stosuje kursywę dla zapisu *in vitro*, *in silico* jest już pisane czcionką normalną.

Chciałabym jednak podkreślić, że przedstawione przeze mnie wątpliwości i powyższe uwagi mają jedynie charakter polemiczny i w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy. Stanowią one jedynie sugestię, którą Autorka może wykorzystać w przyszłości przy planowaniu badań bądź też prezentacji ich wyników.

W podsumowaniu stwierdzam, że mgr Aleksandra Sochacka-Ćwikła wykazała się znajomością tematyki badawczej oraz umiejętnością interpretacji przeprowadzonych badań, dotyczących syntezy związków organicznych o potencjalnej aktywności biologicznej. W swojej pracy zaprezentowała zróżnicowany warsztat metodyczny, zaś uzyskane wyniki są perspektywiczne w kontekście dalszych badań. Klarowne sformułowanie hipotez i konsekwentna realizacja celów badawczych potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, podobnie jak manuskrypty będące podstawą niniejszej rozprawy.

Powyższa konkluzja uzasadnia jednoznacznie pozytywną odpowiedź na pytanie „czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w określonej dyscyplinie?”. Mogę zatem stwierdzić, że **rozprawa**

doktorska mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły stanowi oryginalne i wartościowe dla rozwoju dyscypliny nauki farmaceutyczne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o **przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



PODPIS ZAUFANY

ANETA AGNIESZKA
POGORZELSKA

23.06.2023 13:24:43 (GMT+2)

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

**Katedra i Zakład
Chemii Organicznej**

Aneta Pogorzelska
**dr hab. Aneta Pogorzelska
adiunkt**