



Dr hab. Beata Żołnowska

Gdańsk, 19.06.2020

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny GUMed

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

MGR FARM., MGR BIOTECH. IZABELI JEŚKOWIAK

z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

PT. „SYNTEZA NOWYCH POCHODNYCH IZOTIAZOLU O POTENCJALNEJ AKTYWNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ”

Niezależnie od dotychczasowych osiągnięć w rozwoju klinicznie stosowanych leków przeciwnowotworowych, choroby nowotworowe są przyczyną wysokiej śmiertelności na całym świecie. Jedną z podstawowych metod leczenia nowotworów jest chemioterapia wykorzystująca leki cytotoksyczne o ogólnoustrojowym działaniu. To ogólnoustrojowe działanie obarczone jest jednak wadą z uwagi na uszkodzanie szybko dzielących się komórek zdrowych, np. szpiku kostnego, gamet czy komórek nabłonkowych. Konsekwencją takiej terapii są liczne działania niepożądane takie jak zmniejszenie odporności, mielosupresja, utrata owłosienia, nudności, wymioty, biegunki, jak również przerzuty i rozwój oporności komórek nowotworowych już po kilku cyklach terapeutycznych. Pomimo tego korzyści wynikające z chemioterapii są niezaprzeczalne i dają szansę na wyleczenie raka.

Dokonania w obszarze syntetycznych, aktywnych biologicznie związków chemicznych są olbrzymie, jednak nadal niewiele jest selektywnych cytostatyków, które mogą być stosowane klinicznie w sposób bezpieczny dla pacjenta. Dalsze prace nad syntezą nowych i aktywnych środków antyproliferacyjnych, które są bardziej selektywne pod względem cytotoksyczności wobec komórek rakowych niż zdrowych są niewątpliwie konieczne dla efektywnego leczenia ciężkich chorób nowotworowych.

W tym kontekście podjęta w recenzowanej rozprawie doktorskiej tematyka, dotycząca opracowania metod i syntezy związków będących pochodnymi izotiazolu o działaniu przeciwnowotworowym, dobrze wpisuje się w obecne trendy poszukiwań leków na drodze syntezy

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Dr hab. Beata Żołnowska | beata.zolnowska@gumed.edu.pl | Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk
58 349 12 29, sekretariat – 58 349 12 77 | organiczna@gumed.edu.pl

organicznej. Bezpośrednim celem pracy Pani mgr Izabeli Jęskowiak było otrzymanie nowych struktur zmodyfikowanych w pozycjach 4 i 5 pierścienia izotiazolu o aktywności antyproliferacyjnej. Za cel pośredni Doktorantka postawiła sobie analizę dotychczasowych doniesień naukowych wskazujących na potencjał terapeutyczny pochodnych izotiazolu ze szczególnym uwzględnieniem struktur o aktywności przeciwnowotworowej.

Ocena merytoryczna

Podjęta w przedstawionej rozprawie problematyka badawcza jest trafna, co podkreślają liczne doniesienia literaturowe opisujące szeroką aktywność biologiczną pochodnych izotiazolu (Rozdz. 3.4, 3.5) w tym przeciwnowotworową, przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, przeciwzapalną czy immunosupresyjną. W rozdziale poświęconym aktywności przeciwnowotworowej pochodnych izotiazolu (Rozdz. 3.4) Doktorantka opisuje szereg aktywnych struktur. Jednym z istotnych leków bazujących na pierścieniu izotiazolu jest CP-547, zastosowany w terapii niedrobnokomórkowego raka płuc, będący silnym inhibitorem kinazy tyrozynowej VEGFR-2 oraz kinaz czynników wzrostu fibroblastów, opatentowany przez firmę Pfizer. Kolejne struktury bazujące na pierścieniu izotiazolu to silne inhibitory receptorów VEGFR-1 i VEGFR-2, kinazy MEK1, kinazy tyrozynowej receptora tropomiozynowego TrkA, acetylotransferazy histonowej Tip60, które odgrywają istotną rolę w procesach nowotworowych. Doktorantka nawiązuje również do wcześniejszych struktur zawierających układ izotiazolu, opracowanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu przez prof. Zdzisława Machonia. Profesor Machoń otrzymał m.in. serie pochodnych o aktywności cytostatycznej wobec linii nowotworowych Erlich carcinoma i chłoniaka. Opisana przez prof. Machonia metoda syntezy kwasu 5-amino-3-metyloizotiazolo-4-karboksylowego stała się punktem wyjścia dla pracy badawczej Doktorantki. W omawianym rozdziale (Rozdz. 3.4) Doktorantka zauważa, że opisane przez Nią struktury należą do związków „bicyklicznych z czym może wiązać się powstawanie dużych ilości metabolitów o niższej aktywności od badanych związków. Istnieje zatem potrzeba syntezy związków małowcząsteczkowych pochodnych izotiazolu wykazujących pożądane działanie przeciwnowotworowe, a także charakteryzujących się małą ilością działań niepożądanych, a tym samym niewielką ilością metabolitów.” Zastosowanie w wyżej zacytowanym fragmencie terminu „związki bicykliczne” jest mylące i nie odnosi się do opisywanych przez Doktorantkę związków zawierających więcej niż jeden układ cykliczny w tym heterocykliczny czy aromatyczny. Bicykliczny układ zgodnie z nomenklaturą IUPAC to układ dwóch pierścieni cyklicznych posiadających dwa wspólne atomy.

Ponadto przedstawione w rozdziale 3.4 informacje, istotne z punktu widzenia aktywności biologicznej, mogłyby być uzupełnione o dane liczbowe. W ocenie recenzenta, uwzględnienie parametrów opisujących aktywność przeciwnowotworową wraz z wartościami liczbowymi byłoby dla czytelnika bardziej informatywne, aniżeli samo stwierdzenie posiadania przez dany typ związków aktywności przeciwnowotworowej.

Część teoretyczną rozprawy doktorskiej dopełnia opis metod syntezy pochodnych izotiazolu z wykorzystaniem związków nieheterocyklicznych i heterocyklicznych, jak również wcześniej wspomniana, opracowana przez prof. Machonia, metoda syntezy kwasu 5-amino-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego oraz opis reaktywności izotiazoli.

Wymiernym rezultatem podjętych w przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej badań jest niewątpliwie opracowanie metod syntezy oryginalnych struktur i ocena ich aktywności biologicznej. Doktorantka zsyntetyzowała 39 nowych, wcześniej nieopisanych pochodnych izotiazolu, których struktury zaplanowała w oparciu o modyfikację kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego w pozycji 4 i 5 z zachowaniem stałego fragmentu 3-metyloizotiazolu. Otrzymane dwie nowe serie związków (serie A i B) obejmowały 5-podstawione pochodne kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego (25 związków) oraz *N'*-podstawione pochodne hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego (14 związków).

Do syntezy docelowych produktów finalnych serii B, Pani mgr Izabela Jęskowiak wykorzystała znany w literaturze fachowej hydrazyn kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego, którego synteza została opisana przez Kuczyńskiego w roku 1969. Jednakże w swojej pracy Doktorantka opracowała nową metodę syntezy wspomnianego hydrazynu, ponadto opisała po raz pierwszy jego właściwości spektralne, które w publikacji Kuczyńskiego nie zostały scharakteryzowane. Pytanie, jakie nasuwa się recenzentowi w tym miejscu ocenianej pracy, jest następujące: Dlaczego Doktorantka opracowała nową metodę otrzymywania hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego i jaka jest przewaga zaproponowanej nowej metody nad metodą wcześniej opracowaną przez prof. Kuczyńskiego?

W kolejnym etapie badań Doktorantka przeprowadziła ocenę potencjalnego działania przeciwnowotworowego we współpracy z Laboratorium Doświadczalnym Terapii Przeciwnowotworowej z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Testy antyproliferacyjne przeprowadzono na czterech ludzkich liniach komórek nowotworowych: ostrej białaczki bifenotypowej mielomonocytovej MV4-11, gruczolakoraka okrężnicy LoVo, opornego na Doksorubicynę LoVo/DX gruczolakoraka okrężnicy, gruczolakoraka piersi MCF-7 oraz nienowotworowej linii komórkowej nabłonka pochodzącego z gruczołu piersiowego MCF-10A. W wyniku przeprowadzonych badań, Doktorantka wykazała, że obie serie związków A i B charakteryzują się działaniem przeciwproliferacyjnym, przy czym związki serii A charakteryzowały się zdecydowanie niższymi wartościami IC_{50} w stosunku do linii nowotworowych jelita grubego jak i nowotworu piersi w porównaniu do związków serii B. Doktorantka osiągnęła zamierzony cel, co potwierdzają wyniki badań dla szeregu związków. Trzydzieści pochodnych należących do serii A wykazało wysokie działanie hamujące proliferację komórek ludzkiej białaczki MV4-11 na poziomie wartości parametru IC_{50} powyżej 0,99 $\mu\text{g/mL}$, osiem związków prezentowało wartości IC_{50} poniżej 10 $\mu\text{g/mL}$ wobec komórek raka jelita grubego LoVo, z kolei dwanaście związków charakteryzowało się IC_{50} poniżej 4,5 $\mu\text{g/mL}$ w stosunku do komórek raka jelita grubego LoVo/DX. Rezultatem tak

interesujących wyników jest zabezpieczenie pochodnych serii A polskim i międzynarodowym zgłoszeniem patentowym. Wśród związków serii B jedynie związek oznaczony numerem **35** wyróżniał się najwyższą aktywnością antyproliferacyjną w stosunku do linii LoVo z wartością IC_{50} poniżej 8 $\mu\text{g/mL}$.

Na podstawie dogłębnej analizy SAR dla otrzymanych pochodnych 3-metyloizotiazolu Doktorantka zidentyfikowała fragmenty struktury chemicznej odpowiedzialne za aktywność antyproliferacyjną tej grupy związków, wskazując na preferencję podstawników 3-fenyloprop-2-en-1-ylidenowego bądź fenyłowego podstawionego w pozycji 3 szczególnie atomem chloru albo grupą metoksyłową, przyłączonych do wiązania azometinowego. Ponadto Doktorantka wytypowała związek **11**, jako strukturę wiodącą, bez wątplenia użyteczną do kolejnych badań mających na celu uzyskanie pożądanej substancji terapeutycznej.

Doktorantka wykazała także potencjał otrzymanych 5-podstawionych pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyłowego **9-21** do przełamania lekooporności linii lekoopornej LoVo/DX. Indeksy RI dla tych związków mieściły się w zakresie poniżej wartości 2.

W ocenie recenzenta uzyskane rezultaty badań stanowią istotne opracowanie naukowe w dziedzinie chemii medycznej i wnoszą wkład w rozwój terapii przeciwnowotworowych. Wyniki badań Doktorantka opublikowała w dwóch oryginalnych pracach naukowych i jednym artykule przeglądowym o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 6,986$ (Pkt. MNiSW = 207), a otrzymane w pracy struktury zostały objęte ochroną patentową o zasięgu krajowym i międzynarodowym (zgłoszenia patentowe w latach 2018-2019 o numerach P.426618 oraz PCT/PL2019/050045). Doktorantka aktywnie uczestniczyła w konferencjach naukowych, prezentując swoje wyniki w postaci prezentacji ustnej (2019) oraz posterów (trzy wystąpienia posterowe w okresie 2018-2019). Należy zaznaczyć, iż dwie prezentacje posterowe zostały wyróżnione i nagrodzone, w tym nagrodą w formie stażu w firmie CELON PHARMA S.A. Podkreślić należy, że pracę badawczą Pani mgr Jęskowiak zrealizowała w ramach projektu promotorskiego dla Młodych Naukowców (Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, STM D0.90.17.003).

Pod względem formalnym, praca napisana jest właściwie z uwzględnieniem poprawności formalno-językowej, stylistycznej i interpunkcyjnej. Jednakże do obowiązków recenzenta należy wskazanie zauważonych błędów formalnych, typograficznych i redakcyjnych popełnionych w trakcie przygotowywania manuskryptu rozprawy. Uwagi dotyczą następujących zagadnień:

- dostrzeżone błędy gramatyczne (lub literowe): str. 16 (3 wiersz, jest „3,5-dipodstawionego”, powinno być „3,5-dipodstawionej”), str. 27 (wiersz 9, jest „powstał”, powinno być „powstała”), str. 34 (wiersz 21, powinno być „estrem 4-bromo-2,6-difluorobenzylowym”), str. 39 (wiersz 7, powinno być „pełnią”, wiersz 26, powinno być „indukcję”), str. 48 (wiersz 9, powinno być „acetyloamino”), str. 56 (wiersz 5, powinno być „zminimalizowania”), str. 62 (wiersz 5, powinno być „w wyniku”), str. 69 (wiersz 1, powinno być „otrzymał”);

- błędy w nazewnictwie chemicznym: str. 16 (schemat 10, jest „nafraten-2-yl”, powinno być „naftalen-2-yl”), str. 28 (7 wiersz, nazwa związku powinna zawierać przyrostek –ylo, a nie -ilo), str. 28 (wiersz 14, w nazwie związku brakuje myślnika i członu nazwy „benzylo”), str. 29 (wiersz 3, poprawna nazwa powinna brzmieć (4,5-dichloroizotiazol-3-ylo)fenylometanol; wiersz 8, 11, 14 w nazwach chemicznych obecne są niepotrzebne spacje), str. 31 (wiersz 16 i 20, nazwy związków powinny zawierać przyrostek –ylo, a nie -ilo), str. 34 (wiersz 11, poprawna nazwa brzmi 2,2-bismetoksykarbonylo-1-metylosulfonyloetenotiolu), str. 34 (wiersz 31, poprawne brzmienie członu nazwy powinno być „pirolidyno-1-ylobutylo”), str. 38 (podpis schematu, poprawna nazwa związku brzmi „3-hydroksy-*N*-[2-hydroksy-1-(metylo)etylo]-5-(4-fenoksyfenyloamino)izotiazolo-4-karboksymidoamid”), str. 43 (wiersz 10, poprawne brzmienie „5-aminoacetylowych”), str. 45 (wiersz 13, poprawna nazwa to „sól cykloheksyloamoniowa”), str. 53 (podpis rysunku 5 powinien zawierać poprawny człon nazwy „izotiazol-5-ylo”);
- str. 20, schemat 17, w warunkach otrzymywania soli diazoniowej powinien być użyty kwas azotowy(III), a nie kwas azotowy(V);
- str. 44, schemat 36, struktura związków **162 c-e** powinna zawierać podstawnik –NHCOCH₂NHR₂ w pozycji 5 izotiazolu);
- str. 46, schemat 37, w warunkach diazowania powinien być uwzględniony kwas azotowy(III), a nie kwas azotowy(V);
- str. 51, rysunek 5, struktura **185** zawiera niekompletny wzór pierścienia benzenowego, ponadto niefortunne rozmieszczenie wzorów strukturalnych na rysunku sprawia, że jest on nieczytelny.

Pragnę podkreślić jednak, że przedstawione uwagi mają głównie charakter techniczny, redakcyjny, natomiast w żadnym stopniu nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Ocena metodologiczna

Przedstawiony w rozprawie doktorskiej przegląd literatury wskazuje, iż Doktorantka zgłębiła tematykę dotyczącą pochodnych izotiazolu, ich właściwości biologicznych i chemicznych, jak również szeregu dróg syntezy. Dobór literatury w przedstawionym opracowaniu, jak i dokonany przegląd baz struktur związków chemicznych wskazuje na umiejętność Doktorantki w wykorzystywaniu źródeł naukowych.

Zamysł nowych struktur pochodnych izotiazolu Doktorantka oparła o analizę publikacji i patentów opisujących farmakoforowy układ izotiazolu, istotny z punktu widzenia działania przeciwnowotworowego. Autorka dokonała przeglądu piśmiennictwa opierając się o bazy danych Chemical Abstracts i Reaxys. Zauważyła, iż interesujący ją typ struktur chemicznych powiązany jest głównie z aktywnością przeciwnowotworową i przeciwwirusową.

Pewien niedosyt budzi brak przejrzystości postawionej hipotezy badawczej.

W kolejnym etapie badań Doktorantka z sukcesem przeprowadziła zaplanowane syntezy 5-podstawionych pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego (seria A)

i *N'*-podstawionych pochodnych hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego (seria B). Opracowała nową metodę otrzymywania hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyowego, substratu niezbędnego do uzyskania docelowych związków serii B. Struktury chemiczne nowych związków zostały dowiedzione przez doktorantkę w sposób poprawny i jednoznaczny z użyciem technik ^1H i ^{13}C NMR, IR, MS oraz rentgenokrytalografii. Dane spektroskopowe i rentgenokrytalograficzne nie budzą wątpliwości autentyczności opisywanych struktur.

Do oceny aktywności przeciwnowotworowej zsyntetyzowanych związków Doktorantka wykorzystwała metody z użyciem testu redukcji soli tetrazolowej (MTT) oraz testu z sulforodaminą B (SRB). Związki zostały przebadane przez zewnętrzny zespół badawczy na wspomnianych już wcześniej czterech ludzkich liniach komórek nowotworowych: MV4-11, LoVo, LoVo/DX, MCF-7 oraz na prawidłowej linii MCF-10A. Jako leki referencyjne do porównania wyników testów zastosowano 5-fluorouracyl oraz cisplatynę, co z uwagi na stosowanie tych leków w terapiach nowotworów różnego typu wydaje się słuszne i zasadne.

W pierwszym kroku badań biologicznych Doktorantka oceniła aktywność związków serii A i B wobec ludzkiej białaczki bifenotypowej MV4-11 w teście MTT. Następnie zostały przeprowadzone testy SRB na liniach nowotworowych: MCF-7, LoVo i LoVo/DX oraz komórkach nienowotworowych MCF-10A.

Z punktu widzenia różnic w typie badanych komórek nowotworowych oraz różnic w stosowanych testach, było by uzasadnione wyjaśnienie przez Doktorantkę w tym miejscu omawianej metodologii badawczej, dlaczego screening związków przeprowadzono na komórkach MV4-11, i z zastosowaniem testu MTT? Dlaczego w kolejnym kroku badania aktywności antyproliferacyjnej zastosowano test z Sulforodaminą B? Czy poddyktowana była taka koncepcja badawcza?

W analizie zależności struktura-aktywność Doktorantka uwzględniła parametry takie jak hydrofobowość i charakter elektronowy podstawników. Na tej podstawie zdołała scharakteryzować pożądane dla aktywności antyproliferacyjnej elementy strukturalne oraz wytypować strukturę wiodącą. W opinii recenzenta, dopełnieniem tej części badań byłoby zamieszczenie odpowiedniej tabeli z obliczonymi stałymi hydrofobowości i stałymi Hammeta.

Do optymalizacji struktury Doktorantka zastosowała metodę Toplissa, należącą do metod krokowych i jakkolwiek jest to metoda czasochłonna, to prowadzi do uzyskania maksymalnych efektów przy minimalnej ilości syntez. W swoich rozważaniach Doktorantka szczegółowo opisała wpływ poszczególnych zamian podstawników zgodnie z zastosowanym schematem operacyjnym Toplissa. Czytelnik nie ma wątpliwości, co do słuszności doboru określonych podstawień w obrębie podstawnika R.

W przedstawionych badaniach Doktorantka zastosowała metodę nieregresyjną optymalizacji struktury. Czy była to jedyna metoda, którą doktorantka wykorzystwała? W chwili obecnej metody QSAR przestały już być wyłącznie ciekawostką teoretyczną, a stały się użytecznym narzędziem w projektowaniu nowych chemoterapeutyków. Czy Doktorantka rozważała przeprowadzenie analizy

QSAR metodami regresyjnymi dla zbadanych związków? A może próby przeprowadzenia takiej analizy były podjęte, jednak nie dały dobrych wyników?

Do roli recenzenta należy również ocena poprawności układu i struktury pracy. Podział treści pracy jest standardowy dla tego typu opracowań i zawiera wstęp, cel pracy, część teoretyczną, badania własne, wyniki badań aktywności biologicznej, część eksperymentalną, dyskusję, podsumowanie, wykaz piśmiennictwa, spis rysunków, schematów i tabel, aneks, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Pod względem redakcyjnym i graficznym praca przygotowana została starannie, liczy łącznie 178 stron numerowanych, zawiera 21 rysunków, 44 schematy, 7 tabel i 148 pozycji piśmiennictwa cytowanego. Jedynie drobna sugestia o charakterze redakcyjnym dotyczy zwrócenia uwagi w przyszłych pracach Doktorantki na przejrzystość zapisu równań reakcji chemicznych zamieszczanych na schematach. Przydatne w tym celu mogą być wytyczne do sporządzania rysunków według formatu ACS Document 1996.

Wniosek końcowy

Na podstawie analizy przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Izabeli Jęskowiak pt.: „Synteza nowych pochodnych izotiazolu o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej”, wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. Stanisława Rynga oraz Pana dr. hab. Marcina Mączyńskiego, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest osiągnięciem oryginalnym i wartościowym oraz spełnia wymagania merytoryczne i formalne stawiane dysertacjom doktorskim określone w obowiązującej ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Izabeli Jęskowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Katedra i Zakład
Chemii Organicznej**
Beata Żołnowska
dr hab. Beata Żołnowska
adjunkt

Dr hab. Beata Żołnowska