

Dr hab. Krzysztof Kamiński, Prof. UJ
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Chemii Leków
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
e-mail: k.kaminski@uj.edu.pl
Tel. 12 620 54 59



Ocena

rozprawy doktorskiej pt. „*Synteza nowych pochodnych izotiazolu o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej*” wykonanej przez mgr Izabelę Jęskowiak w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Rynga – promotora i dr hab. Marcina Mączyńskiego – promotora pomocniczego

Recenzja została przygotowana na podstawie uchwały nr 17/2020 Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z dnia 29 kwietnia 2020 r.

Powszechnie występujące choroby nowotworowe, bez cienia wątpliwości stanowią jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych i społecznych, a dodatkowo powodują poważne obciążenia dla systemów ochrony zdrowia, szczególnie w krajach wysoko uprzemysłowionych, w których są drugą, po chorobach układu krążenia, przyczyną zgonów. Dane epidemiologiczne pokazują, iż każdego roku na świecie na nowotwory zapada około 10 mln. ludzi, w Polsce jest to blisko 150 tysięcy zachorowań, z czego umiera niestety blisko połowa. Nowotwory diagnozowane są w każdej grupie wiekowej, niemniej jednak ryzyko zachorowania zwiększa się istotnie po 40 roku życia. Kluczową sprawą dla skutecznej terapii są przede wszystkim regularne badania profilaktyczne pozwalające na szybkie wykrycie zmian nowotworowych i wprowadzenie optymalnego postępowania leczniczego obejmującego chemioterapię, leczenie chirurgiczne, radioterapię, bądź dynamicznie rozwijającą się medycynę nuklearną, wykorzystującą substancje znakowane radioizotopami, tzw. radiofarmaceutyki. Istotą procesu nowotworowego są nieprawidłowości we wzroście komórek, ich nadmierna proliferacja oraz możliwość inwazji innych części ciała. Nowotwory charakteryzują się niezwykle wysoką heterogennością, uwzględniając ich etiologię i czynniki ryzyka, wyróżnia się aktualnie ponad 100 odrębnych typów. Obecnie leczenie dysponuje ogromną liczbą starszych i nowoczesnych leków przeciwnowotworowych, zróżnicowanych zarówno pod względem struktury chemicznej, mechanizmów działania oraz sposobów pozyskiwania,

których zastosowanie ma spowodować zahamowanie podziałów i docelowo śmierć komórek nowotworowych, przy możliwie minimalnym wpływie na funkcje komórek zdrowych. Wśród nich wyróżnia się między innymi substancje o ugruntowanej pozycji terapeutycznej, tj. antymetabolity, leki alkilujące, inhibitory mitozy, antyhormony, antybiotyki przeciwnowotworowe, oraz najnowsze preparaty, obejmujące inhibitory angiogenezy, inhibitory telomerazy, inhibitory deacetylazy histonowej, leki modulujące transdukcję sygnału komórkowego, przeciwciała monoklonalne oraz wspomniane wcześniej radiofarmaceutyki. Zastosowanie nowoczesnych leków, implementowanych do terapii na przestrzeni ostatnich lat, określane jest często terminem terapia celowana molekularnie, ponieważ substancje te wpływają na mechanizmy komórkowe lub receptory swoiste dla komórek nowotworowych. Alternatywnie, ukierunkowanie działania leku wyłącznie na tkankę nowotworową można osiągnąć poprzez zastosowanie liposomów lub nanocząsteczek. Tego typu strategia terapeutyczna pozwala na istotne zredukowanie ogólnoustrojowych działań niepożądanych, które towarzyszą często chemioterapii. **Warto w tym miejscu podkreślić, iż Doktorantka w sposób ciekawy opisuje wspomnianą tematykę w części teoretycznej rozprawy.** Nowe odkrycia w obszarze leków przeciwnowotworowych wynikają w głównej mierze z coraz lepszego zrozumienia patomechanizmu procesu chorobowego oraz dynamicznego rozwoju nowoczesnych metod badawczych obejmujących biologię molekularną, wysokoprzepustowe badania przesiewowe (ang. *High-throughput screening*, HTS), projektowanie leków w oparciu o budowę celu biologicznego, chemię kombinatoryjną, a co najważniejsze technikę sekwencjonowania ludzkiego genomu. Pomimo obecności na rynku farmaceutycznym ponad 100 starszych i nowych leków przeciwnowotworowych, śmiertelność z powodu nowotworów jest nadal bardzo wysoka.

Mając na uwadze powyższe fakty problematyka poruszona w niniejszej rozprawie doktorskiej, dotycząca poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej w grupie pochodnych izotiazolu jest aktualna, nowatorska i w pełni uzasadniona. Ponadto, proponowany zakres badań chemiczno-farmakologicznych stanowi kontynuację, a zarazem rozwinięcie tematyki badawczej realizowanej od wielu lat w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej tutejszego Wydziału.

Rozprawa doktorska ma formę monografii, napisana została w języku polskim, składa się z 7 rozdziałów; podsumowania, streszczenia w języku polskim i angielskim; pomocnego dla czytelnika wykazu zastosowanych skrótów (który według mnie powinien znajdować się na początku opracowania); wykazu tabel, rysunków i schematów oraz trafnie dobranego i aktualnego piśmiennictwa, które obejmuje 142 pozycje. Całość pracy doktorskiej

przedstawiona jest na 178 stronach, posiada typowy dla tego typu opracowań układ stanowiący spójną całość, tj. wstęp, część teoretyczną, badania własne, wyniki badań aktywności biologicznej, część eksperymentalną, dyskusję, podsumowanie, stosowne wykazy, piśmiennictwo oraz streszczenia. Opis uzupełnia 21 rysunków, 44 schematy i 7 tabel, które prezentują struktury otrzymanych związków oraz wyniki z badań *in vitro* działania antyproliferacyjnego. **Dyskusyjną sprawą jest natomiast umieszczenie opisu celu badań na samym początku rozprawy, tuż po krótkim wstępie, a przed obszerną częścią teoretyczną pracy.** Mając na uwadze logikę i racjonalność wywodu, fragment ten następuje zazwyczaj po części teoretycznej, która uzasadnia rangę podjętej tematyki badawczej, a dodatkowo umożliwia klarowne dla czytelnika prezentowanie hipotez badawczych oraz założeń i celów badań. Dlatego też, pomimo precyzyjnego określenia celu chemicznego i biologicznego badań, w części teoretycznej opracowania brakuje nieco silnych podstaw naukowych, które potwierdzają, iż wprowadzenie modyfikowanego fragmentu hydrazynowego jako ugrupowania aminowego (pozycja-5) lub amidowego (pozycja-4) może przyczynić się do nasilenia aktywności cytotoksycznej planowanych związków. Nie zmienia to jednak faktu, iż rola pierścienia izotiazolu jako fragmentu rdzeniowego dla związków o wielokierunkowej aktywności biologicznej, w tym przeciwnowotworowej, została udokumentowana przez Doktorantkę niezwykle wyczerpująco. Moim zdaniem, bardzo wczesne pojawienie się rozdziału „Cel pracy” determinuje dodatkowo nieco kłopotliwą i niekonsekwentną numerację, gdzie po ostatnim związku w części teoretycznej o numerze 193, otrzymane przez Doktorantkę związki serii A i B posiadają numerację odpowiednio 9–33 oraz 35–47. Mimo tej drobnej uwagi, pozostała część manuskryptu zorganizowana jest w sposób przejrzysty, co umożliwia podążanie za tokiem myślowym Autorki, szczególnie w aspekcie planowania kolejnych doświadczeń, dyskusowania danych oraz finalnie wyciągania wniosków końcowych z przeprowadzonych eksperymentów.

W części teoretycznej niniejszej rozprawy (również częściowo w Badaniach własnych), Autorka skupia się nad charakterystyką izotiazolu i jego pochodnych w aspekcie chemicznym, tj. metody otrzymywania i reaktywność, jak również biologicznym, wskazując na aktywność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, przeciwnowotworową, przeciwpłatkową, przeciwgrzybiczą, immunomodulującą, przeciwzapalną, przeciwbólową, antyagregacyjną, przeciwcukrzycową, przeciwpsychotyczną, neuroprotektoryjną, a także owadobójczą związków o tego typu strukturze. **Świadczy to niewątpliwie o wysokim i wielokierunkowym potencjale rozwojowym i aplikacyjnym pochodnych izotiazolowych.** Bardzo cenne jest również

odniesienie do doświadczeń własnych jednostki w obszarze syntezy związków „izotiazolowych”.

Podstawowym celem badań było otrzymanie dwóch serii oryginalnych pochodnym izotiazolu, tj. 5-podstawionych pochodnych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyłowego (seria A) oraz *N*-podstawionych podstawionych pochodnych hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyłowego (seria B). Dodatkowym celem chemicznym była optymalizacja metody pozyskiwania hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyłowego, będącego substratem dla drugiej serii związków, którego synteza została opisana wcześniej przez prof. dr Leonarda Kuczyńskiego. Proponowany zakres eksperymentów uzupełnia ocena aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych połączeń, która została wykonana w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. **Mając na uwadze eksperymentalny charakter rozprawy, dość dyskusyjne jest natomiast postawienie za jeden z celów badawczych dokonanie przeglądu literatury pod kątem potencjału terapeutycznego pochodnych izotiazolu. Wg mnie jest to czynność oczywista, która poprzedza planowanie i realizację prac laboratoryjnych i zadanie to według mnie nie powinno stanowić celu niniejszego opracowania.**

W badanych własnych Doktorantka otrzymała stosunkowo nieliczną bibliotekę nowych pochodnych izotiazolu, na którą składa się 38 związków finalnych, w tym 25 analogów 5-podstawionych kwasu 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyłowego (seria A) oraz 13 *N*-podstawionych pochodnych hydrazynu kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyłowego (seria B). Mniejsza ilość przedstawicieli serii drugiej wynika z faktu, iż reprezentuje ona analogi najaktywniejszych przeciwnowotworowo związków zidentyfikowanych w serii pierwszej. **W moim odczuciu dość ograniczony zakres modyfikacji chemicznych, nie pozwala na dogłębną analizę zależności struktura-aktywność antyproliferacyjna, a budowa otrzymanych pochodnych nasuwa bardzo intrygujące naukowo pytania, m.in. o wpływ uwodornianie fragmentu iminowego lub utworzenia rozpuszczalnych w wodzie soli w przypadku kwasów karboksylowych (seria A) na aktywność biologiczną tego typu połączeń. Moim zdaniem, szczególnie ciekawe mogą okazać się pochodne nasycone, w których podstawnik w położeniu 4 lub 5 izotiazolu zyska dodatkową swobodę rotacyjną. W tym miejscu zdaję sobie doskonale sprawę, iż dalsze modyfikacje i dyskusja SAR będą zapewne przedmiotem kolejnych badań i publikacji naukowych.**

Związki należące do obu serii zostały otrzymane w wyniku kilkuetapowego i nieskomplikowanego postępowania syntetycznego, co może się okazać bardzo korzystnie w przypadku wytypowania potencjalnego kandydata na lek. Substratami odpowiednio dla serii A i B był kwas 5-hydrazyno-3-metyloizotiazolo-4-karboksyłowy lub hydrazyd kwasu 5-chloro-3-metyloizotiazolo-4-karboksyłowego. Żądane pochodne otrzymano w reakcji kondensacji wspomnianych produktów pośrednich z aldehydami aromatycznymi, alifatycznymi lub acetonem. Struktury nowych pochodnych potwierdzono w oparciu o szczegółową analizę widm ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR oraz MS. Cennym wzbogaceniem części analitycznej są badania krystalograficzne, pozwalające na ocenę konfiguracji wybranych przedstawicieli obu serii pochodnych, które umożliwiły zidentyfikowanie dominującej konfiguracji cząsteczki w ciele stałym. Badania te zostały wykonane w Zakładzie Krystalografii Uniwersytetu Wrocławskiego. **W tej części rozprawy, ale również w szczegółowym opisie metod analitycznych i procedur syntetycznych, zastanawia jednak fakt braku informacji na temat czystości otrzymanych pochodnych i sposobów jej oceny, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia przekazywania substancji do późniejszych badań biologicznych.**

Wszystkie otrzymane związki zostały przebadane pod kątem aktywności antyproliferacyjnej wykorzystując do tego celu powszechnie znane i uznawane techniki oznaczania właściwości cytotoksycznych związków chemioterapeutycznych w warunkach *in vitro*, tj. test MTT, opierający się na aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej oraz test SRB, który wykorzystuje elektrostatyczne oddziaływanie sulforodaminy z białkami macierzy komórkowej. **W tym miejscu nasuwa się jednak pytanie, jakie były przesłanki do zastosowania dwóch odmiennych testów antyproliferacyjnych?** W przypadku obu serii pochodnych (A i B), badania przesiewowe przeprowadzono na linii ludzkiej bifenotypowej białaczki mielomonocytovej, a następnie dla najaktywniejszych pochodnych, rozszerzono ocenę profilu aktywności przeciwnowotworowej o kolejne linie komórek nowotworowych, tj. raka gruczołu sutkowego (MCF-7), raka jelita grubego (LoVo) oraz jego sublinii odpornej na doksorubicynę (LoVo/DX). Co istotne, selektywność substancji wobec komórek nowotworowych zbadano poprzez wykonanie analogicznych testów na prawidłowej linii komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego (MCF-10A). **Testy *in vitro* zaplanowano w sposób racjonalny, ponieważ umożliwiają z jednej strony zidentyfikowanie substancji aktywnych wobec różnych i powszechnie występujących komórek nowotworowych, w tym wykazujących oporność na doksorubicynę, będącą klasycznym chemioterapeutykiem, natomiast z drugiej strony obecność komórek zdrowych pozwala na wstępną ocenę bezpieczeństwa badanych związków. W tym miejscu**

wyjaśnienia wymaga jednak fakt wykorzystania linii ludzkiej bifenotypowej białaczki mielomonocytovej jako swoistego badania przesiewowego dla testowanych związków. Wyznaczone parametry IC_{50} , tj. stężenia powodującego zahamowanie proliferacji % komórek, posłużyły Autorce do przeprowadzenia bardzo szczegółowej (miejscami nawet zbyt szczegółowej) analizy zależności struktura – aktywność antyproliferacyjna. Dyskusja ta prowadzona jest w oparciu o znane w literaturze parametry wykorzystywane do opisywania ilościowych zależności istniejących pomiędzy budową chemiczną i aktywnością biologiczną związków w analizach QSAR. Do parametrów tych określających właściwości hydrofobowe, elektronowe i steryczne danego podstawnika, należą kolejno stała hydrofobowa, stała Hammetta oraz stała Tafta. **Mimo bardzo wnikliwej dyskusji ww. parametrów w kontekście aktywności biologicznej związków, nie pojawiają się one w formie wartości liczbowych, a dodanie takiej tabeli lub ich zamieszczenie w tabeli zestawiającej rezultaty *in vitro* ułatwiłoby ocenę wpływu danego podstawnika na obserwowany efekt biologiczny. Wszystkie doświadczenia chemiczne oraz testy *in vitro* zostały opisane przez Doktorantkę satysfakcjonująco głównie w części eksperymentalnej monografii.**

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki wynikających z przeprowadzonych badań należy przede wszystkim przeprowadzenie syntezy oraz ocena właściwości fizykochemicznych i spektralnych oryginalnych pochodnych izotiazolu, szczegółowa analiza SAR oraz wytypowanie struktury wiodącej (związek 11, seria A), charakteryzującej się nie tylko satysfakcjonującą aktywnością przeciwnowotworową, ale również wysoką selektywnością wobec linii komórek nowotworowych. Na uwagę zasługuje również fakt, iż badane związki posiadają szczególnie silną aktywność przeciwnowotworową w stosunku do linii komórek raka okrężnicy z wyindukowaną opornością na doksorubicynę, co potwierdza, że proponowane modyfikacje chemiczne mogą pozwolić na wyselekcjonowanie obiecujących kandydatów na leki przeciwnowotworowe. Warto w tym miejscu podkreślić, iż znaczna większość wyników została opublikowana w dwóch pracach oryginalnych w czasopiśmie *Bioorganic Chemistry* (2019, IF=3,926, MNISW: 100 pkt) oraz *Molecules* (2020, IF=3,06, MNISW: 100 pkt), a także jest przedmiotem 1 polskiego i 1 międzynarodowego zgłoszenia patentowego. Świadczy to niewątpliwie o wysokim potencjale aplikacyjnym prezentowanych badań. Na uznanie zasługuje również fakt, iż w każdym z wymienionych opracowań Doktorantka jest pierwszym autorem. Wyniki badań prezentowane były również w formie plakatów oraz wystąpienia ustnego, które miało miejsce podczas IV Sympozjum „Szkoła Chemii Medycznej” we Wrocławiu (2019). Mając na uwadze powyższe fakty, moim zdaniem byłoby znacznie korzystniej przedstawić rozprawę w formie krótkiego autoreferatu, z dołączonymi publikacjami

i zgłoszeniami patentowymi, a szczegółowe procedury syntetyczne i wyniki analiz fizykochemicznych i spektralnych zamieścić jedynie dla związków wcześniej nieujawnionych.

Podsumowując, uzyskane wyniki, uważam z całym przekonaniem za oryginalne i wartościowe, a formę ich dyskusji za satysfakcjonującą i na tym etapie wyczerpującą. Badania ujęte w rozprawie doktorskiej zostały zaplanowane w sposób logiczny i konsekwentnie zrealizowane. Doktorantka w sposób jasny formułuje zakładane cele, umiejętnie dobiera odpowiednie narzędzia badawcze, planuje kolejne eksperymenty, co uważam za bardzo cenne dla prac doświadczalnych.

Z obowiązku Recenzenta jestem jednak zobligowany do zwrócenia uwagi na kilka dodatkowych nieścisłości, niedopatrzeń i błędów, które znajdują się w rozprawie. Chciałbym podkreślić, iż moje uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają oryginalności, waloru poznawczego prezentowanych wyników oraz wkładu otrzymanych danych w rozwój szeroko rozumianych nauk farmaceutycznych, natomiast należy traktować je jako sugestie, które umożliwią przygotowanie kolejnych publikacji, a być może wniosku grantowego.

- W Części teoretycznej, s. 14, na Schemacie 6, obecność dodatkowych podstawników propylowego (b) i butylowego (c) nie koresponduje z tekstem; s. 16, podpis Schematu 10 wydaje się błędny ponieważ prezentowane związki to nie pochodne karbonitrylowe; s. 30, w przypadku związków prezentowanych na Schemacie 28, jedynie 120 oraz 121 c i f są karbodinitrylami, natomiast pozostałe związki to pod względem chemicznym pochodne monokarbonitrylowe; s. 36, opis syntezy przedstawiony na Schemacie 32 jest nieco mylący, ponieważ sugeruje, iż związki 141 a-f otrzymano stosując reakcję reduktywnej aminacji, co nie jest prawdą; s. 42, Schemat 35, ogólna nazwa związków 158 a-f wydaje się nieprecyzyjna ponieważ nie wszystkie są one pochodnymi 4-fenylowymi; s. 44, związek 45 na Schemacie 45 powinien mieć najprawdopodobniej numer 89. Nazwy niektórych reakcji/przebiegów chemicznych wymagają według mnie nieznacznej korekty (doprecyzowania), np. cyklizacja w obecności bromu (s. 37), na cyklizacja oksydacyjna w obecności bromu;
- W Badaniach własnych, w Tabeli 1 prezentującej struktury serii A, korzystniej byłoby jako pierwszą umieścić pochodną niepodstawioną (21), która znalazła się dopiero na 13 pozycji, a nie analog 3-metoksyłowy (9). Byłoby to znacznie bardziej logiczne, przede wszystkim z punktu widzenia analizy SAR i schematu modyfikacji chemicznych wg. Toplissa, na który powołuje się Doktorantka w dyskusji.

- W rozdziale dotyczącym analizy SAR dla serii A, pojawia się błędne określenie, stwierdzające, iż najwyższe właściwości hydrofobowe posiada związek **29** zawierający w strukturze podstawnik cyklopentylowy, bowiem wśród analogów cykloalkilowych wyższą hydrofobowością charakteryzuje się pochodna cykloheksylowa (**26**).
- Pewnym mankamentem dyskusji SAR w obu seriach jest fakt, że uwzględnia ona przede wszystkim wyniki z linii ludzkiej bifenotypowej białaczki mielomonocytovej, natomiast dane *in vitro* dla pozostałych linii komórek nowotworowych nie zostały w niej ujęte.
- Zgodnie informacjami zamieszczonymi w Części eksperymentalnej, widma masowe nie zostały wykonane wykorzystując do tego celu wysokorozdzielczą spektrometrię masową, dlatego też dokładność pomiaru do 0,0001 jest niepoprawna.
- Otwartym i według mnie kluczowym pozostaje również pytanie o mechanizm działania otrzymanych pochodnych izotiazolu. Czy badania takie są planowane, a być może już zostały wykonane? Czy na podstawie struktury związków można sugerować ich sposób działania na poziomie molekularnym? Rozwikłanie tego problemu wydaje się być kluczowe dla powodzenia dalszego rozwoju przedklinicznego, a przede wszystkim klinicznego tej grupy pochodnych.

Reasumując, pod względem merytorycznym i formalnym przedłożona do oceny praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom o stopień doktora, które określa 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 (tekst jednolity - Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), zatem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, o jej przyjęcie i dopuszczenie Autorki, Panią mgr Izabelę Jęskowiak, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 6 lipca 2020

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Chemii Leków

dr hab. Krzysztof Kamiński, prof. UJ