



POLITECHNIKA ŁÓDZKA

INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Tel: 42-636-25-42, 42- 631-31-40, Fax: 42-636-55-30

prof. dr hab. inż. Zbigniew J. Kamiński,

tel: 42-631-32-24; e-mail: zbigniew.kaminski@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Wieczorek

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska zatytułowana „Synteza i badania biologiczne ferrocenyłowych modulatorów polimeryzacji tubuliny” wykonana w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego przez mgr Annę Wieczorek. Promotorem pracy jest dr hab. Damian Płażuk.

Struktura pracy jest zgodna z nowymi wymaganiami, co oznacza, że podstawę manuskryptu rozprawy stanowi przewodnik po zbiorze dorobku naukowego wraz z kopiami publikacji Doktorantki. Przewodnik liczący 16 stron, uzupełniony jest 7 stronicowym rejestrem literatury cytowanej i spisem przedstawiającym całkowity dorobek naukowy Doktorantki. Uzupełnienie stanowią oświadczenia wszystkich współautorów publikacji tworzących merytoryczny trzon rozprawy oraz pełne teksty wszystkich czterech publikacji wraz z suplementami. Przedstawione opracowanie posiada przejrzystą strukturę co pozwala na jego merytoryczną i formalną ocenę.

Obszar badawczy prezentowany w rozprawie jest spójny i dostosowany do osiągnięcia postawionego celu jakim jest pokonanie bariery oporności wielolekowej komórek nowotworowych na leki wpływające na proces polimeryzacji tubuliny. Obiektami badań są indukujące polimeryzację tubuliny analogi paklitakselu i docetakselu modyfikowane pochodnymi ferrocenu oraz analogi inhibitora polimeryzacji tubuliny - plinabuliny również modyfikowane pochodnymi ferrocenu.

Założeniem pracy było, że wprowadzenie ferrocenu do związków o dobrze znanej aktywności przeciwnowotworowej dla których obserwowano odporność wielolekową licznych linii komórek nowotworowych pozwoli przezwyciężyć to ograniczenie. Źródłem oczekiwanego efektu miała być obecność jonów żelaza wprowadzonych wraz z fragmentem ferrocenu stymulujących procesy redox, co w dalszej kolejności prowadzić powinno do zaburzenie procesów prowadzących do dezaktywacji cytostatyków. Obiektami badań były taksany modyfikowane poprzez monoacylowanie drugorzędowych grup hydroksylowych w

pozycji 7 pierścienia bakatyny lub funkcji hydroksylowej bądź aminowej fragmentu fenyloizoseryny działaniem kwasów ferrocenyloalkanowych.

Taki wybór tematyki badawczej pozwala z pełnym przekonaniem ocenić ją jako racjonalnie uzasadnioną, ambitną, wysoce aktualną i atrakcyjną. Pomyślna realizacja zadań badawczych sformułowanych w pracy wymagała skoordynowanej i efektywnej współpracy trzech zespołów badawczych i została zrealizowana na trzech poziomach: syntezy nowych związków, badania ich wpływu na polimeryzację tubuliny i wreszcie działań interpretacyjnych wiążących obserwowaną aktywność biologiczną ze strukturą zsyntezowanych obiektów. Fakt ten nie stanowi jednak żadnej przeszkody w określeniu zakresu udziału Doktorantki we wszystkich pracach dzięki precyzyjnym i jednoznacznie zadeklarowanym zakresom partycypacji w badaniach przez wszystkich współautorów publikacji.

Pierwszą grupę badanych związków stanowiły analogi paklitakselu, w których grupa aminowa fenyloizoseryny acylowana była kwasami ferrocenylokarboksylowymi. Synteza tych analogów została przeprowadzona według klasycznego schematu Ojima-Holtona z wykorzystaniem ferrocenowych pochodnych azetydynonów jako odczynnika acylującego i grupy trietylosililowej do ochrony funkcji hydroksylowej bakatyny i w azetydynonie.

Drugą grupę analogów stanowiły pochodne paklitakselu i docetakselu, w których kwasy ferrocenylokarboksylowe acylowały grupę hydroksylową reszty fenyloizoserynowej. Jako odczynnik kondensujący do sprzęgania kwasu z funkcją hydroksylową stosowany był DIC. W syntezie zastosowano substraty z niechronioną grupą hydroksylową. Budzi to moje zastrzeżenia ponieważ brak jest potwierdzenia jednorodności otrzymanych produktów a moje doświadczenie w pracy z taksanami wskazuje, że niebezpieczeństwo reakcji ubocznej zachodzącej z niechronioną funkcją powinno być brane pod uwagę. Brak wyników analizy HPLC a nawet wyników analizy TLC wzbudza w tym przypadku dodatkowe zaniepokojenie. Co więcej, nawet pobieżna analiza widm NMR zamieszczonych w suplementie wskazuje na zauważalny udział produktu ubocznego (*Med. Chem Commun.*, Supplement, p. 2 i widmo p. 10; ¹H-NMR – sygnał 1.25 nie jest singletem; 2,03 3H w rzeczywistości to dwa sygnały; 4.15 są dodatkowe sygnały; 4.47 to raczej 4H niż 3H itd.). Pomimo przedstawionego zastrzeżenia, ten fragment pracy wnosi istotne informacje potwierdzające poprawność założeń o korzystnym wpływie obecności fragmentu ferrocenowego na przewyciężanie efektu oporności komórek nowotworowych na taksany. Nawet w liniach komórkowych wykazujących nadekspresję białek ABC, taksany, po dołączeniu fragmentu ferrocenowego wykazywały większą aktywność niż struktury macierzyste, choć należy zwrócić uwagę, że

docetaksel niemodyfikowany wykazywał cytotoksyczność wyższą w stosunku do linii podstawowej (co jest błędnie skomentowane na str. 11 opracowania).

Trzecia grupa taksanów została zmodyfikowana poprzez acylowanie grupy hydroksylowej w pozycji 7 rdzenia bakatynowego kwasami ferrocenoalkanowymi i ferrocenoiloalkanowymi w klasycznych warunkach przy użyciu DIC i DMAP-u jako zestawu odczynników kondensujących i osłonie TBS grupy hydroksylowej fragmentu fenyloizoserynowego. Ten kierunek badawczy okazał się jednak mało produktywny, bowiem otrzymane związki modyfikowane w pozycji O7 nie posiadały zwiększonej aktywności.

Naturalne podsumowanie tej części pracy stanowiły próby wymodelowania oddziaływań pomiędzy ferrocenowanymi taksanami i tubuliną wskazujące na nieco odmienną wzajemną orientację wzajemna obu komponentów, nawet w przypadkach analogów o zwiększonej cytotoksyczności.

Drugi nurt poszukiwań koncentrował się wokół syntezy ferrocenowych analogów plinabuliny aktywnej jako inhibitor polimeryzacji tubuliny. Na „pierwszy rzut oka” stosunkowo prosta budowa cyklicznej cząsteczki plinabuliny, będącej diketopiperazynową pochodną dehydrofenyloalaniny i modyfikowanej dehydrohistydyny nie obiecywała wyrafinowanej i niezwykle ciekawych przekształceń chemicznych. Kondensacja ferrocenokarboaldehydu z *N,N'*-diacetylodiketopiperazyną co prawda pozwoliła z dobrą wydajnością wprowadzić fragment ferrocenylometylidenowy do pierścieni (związek 40) jednak dalsze próby reakcji z imidazolokarboaldehydem w środowisku alkalicznym okazały się niewydajne. Słuszna interpretacja tego faktu przypisująca przyczynę trudności syntetycznych obecności kwasowego amidowego atomu wodoru wskazała na rozwiązanie polegające na jego acetylowaniu. Okazało się jednak, że tak logicznie zaplanowany proces prowadził do azlaktanu ferrocenylodehydroalaniny z podstawnikiem 2,5-dimetylooksazolin-4-ylowym w pozycji 2. Struktura produktu tego wysoce interesującego przegrupowania diketopiperazyny do dwóch połączonych wzajemnie pierścieni 1,3-oksazolowych (związek 42) została jednoznacznie określona. Zaproponowany mechanizm tej złożonej transformacji jest przekonujący, ale zapowiedziane działania zmierzające do jego udokumentowania są zasadne.

Efektywny dostęp do plinabuliny został otwarty poprzez zmodyfikowanie pierwotnej ścieżki syntetycznej. Modyfikacja polegała na zmianie kolejności wprowadzania łańcuchów bocznych do macierzystego układu *N,N'*-diacetylodiketopiperazyny. Kluczowe dla powodzenia syntezy było wprowadzenie w pierwszej kolejności 5-alkilo-1*H*-imidazo-4-karboaldehydu w reakcji Knoevenagla i dopiero następnie wykonanie kondensacji z

ferrocenokarbalddehydem zachodzącej w obecności węgla cezu. Badanie aktywności cytostatycznej wszystkich czterech analogów plinabuliny potwierdziły poprawność założeń o korzystnym wpływie obecności układu ferrocenowego. Aktywność wobec podstawowych linii komórkowych utrzymywała się na niezmiennym poziomie natomiast w wyniku inhibowania białek ABC obserwowano aktywność antyproliferacyjną względem linii wykazujących oporności wielolekowej a nawet przywrócenie ich wrażliwości na inne, klasyczne cytostatyki takie jak np. doksorubicyna.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań w pełni zgodnego z aktualnymi potrzebami współcześnie prowadzonych poszukiwań nowych skutecznych sposobów zwalczania procesów chorobowych. Dysertacja daje wyczerpujące i kompetentne odpowiedzi na szereg niezmiernie ważnych i aktualnych pytań dotyczących zwalczania oporności wielolekowej. Na szczególne uznanie zasługuje zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych oraz trudny, interdyscyplinarny charakter wykonanych prac niezbędnych dla zrealizowania wszystkich zadań badawczych. Na podkreślenie zasługuje również sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi. We wszystkich przypadkach wnioskowanie jest dobrze poparte materiałem eksperymentalnym a przy tym analiza wyników eksperymentów jest krytyczna co wzbudza zaufanie do wyciąganych wniosków.

Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki. Wysoko oceniam postępy jakie recenzowana rozprawa wnosi w rozwój nowoczesnych metod projektowania i badania złożonych układów organicznych. Z pełnym przekonaniem uznaję, że dysertacja przedstawiona do oceny spełnia wymagania określone w ustawie i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Anny Wieczorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie dysertacji.



Zbigniew J. Kamiński

Łódź 26 sierpnia 2016