

Prof. dr hab. Monika Wujec
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 31.07.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Sulika pt. „Synteza i badanie aktywności biologicznej pochodnych związków pochodzenia naturalnego: iwermektyny i monenzyny”
wykonanej w Zakładzie Chemii Medycznej Wydziału Chemii UAM w Poznaniu

Promotor: prof. dr hab. Adam Huczyński

Promotor pomocniczy: prof. UAM dr hab. Michał Antoszczak

Pomimo znaczącego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie terapii nowotworów, choroby nowotworowe pozostają niestety jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Każdego roku w Polsce na choroby nowotworowe umiera kilkadziesiąt tysięcy osób, a prognozy demograficzno-epidemiologiczne na kolejne dekady są jeszcze bardziej niepokojące. Szacuje się, że w ciągu najbliższych piętnastu lat liczba nowych zachorowań na nowotwory przekroczy 30 milionów rocznie w skali globalnej.

Oprócz chorób nowotworowych wciąż ogromnym problemem zdrowia publicznego są choroby infekcyjne a wśród nich choroby pasożytnicze chociaż w krajach rozwiniętych bywają postrzegane jako problem marginalny lub odległy. Tymczasem, mimo że Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny została przyznana w 2015 roku za odkrycie artemizyny, stosowanej w leczeniu malarii, „Big Pharma” w ograniczonym zakresie inwestuje w rozwój nowych leków przeciwpasożytniczych, głównie z powodów ekonomicznych i niskiej opłacalności takich przedsięwzięć. Niestety, w dobie intensywnego rozwoju turystyki i globalizacji obserwuje się wzrastające ryzyko przenoszenia chorób pasożytniczych na obszary, gdzie dotychczas one nie występowały.

W świetle powyższych faktów nie dziwi rosnące zainteresowanie środowiska naukowego zarówno tematyką onkologiczną, jak i parazytologiczną. Oba te obszary badań mają istotne znaczenie dla zdrowia publicznego i wymagają dalszych, interdyscyplinarnych działań badawczych.

Współczesna chemia medyczna dysponuje licznymi strategiami projektowania nowych leków. Jednym z powszechnie stosowanych podejść jest synteza analogów związków o udokumentowanej aktywności biologicznej. Modyfikacje strukturalne znanych cząsteczek, nawet niewielkie, mogą prowadzić do istotnych zmian w ich właściwościach farmakologicznych, w tym do znacznego zwiększenia lub zmniejszenia aktywności biologicznej. Innym, coraz częściej wykorzystywanym podejściem jest repozycjonowanie leków, polegające na zastosowaniu już dopuszczonych do obrotu substancji aktywnych w nowych wskazaniach terapeutycznych. Strategia ta stanowi atrakcyjną alternatywę dla klasycznego procesu opracowywania leków, zwłaszcza ze względu na skrócenie czasu i obniżenie kosztów związanych z badaniami klinicznymi.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska doskonale wpisuje się w ten nurt.

Praca doktorska Pana Michała Sulika została przedstawiona do recenzji w formie cyklu siedmiu (!) publikacji opublikowanych w latach 2023-2025, w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 28,4$, opatrzonej 75 stronicowym komentarzem w języku polskim. Prace mają charakter opracowań wieloautorskich. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem. Jego udział w powstanie prac wynosi od 30 do 70%.

Komentarz zawiera wykaz skrótów stosowanych w pracy, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, cele pracy, wstęp, badania własne opisujące przedmiot badań i komentarze do przeprowadzonych eksperymentów, podsumowanie i wnioski oraz literaturę.

W części literaturowej Doktorant wskazuje na konieczność poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych, jak również przeciwpasożytniczych. Zwraca uwagę na powszechną technikę stosowaną w przemyśle farmaceutycznym a mianowicie repozycjonowanie znanych leków, porównując czas oraz koszty wprowadzenia nowego z takimi samymi parametrami dla leków repozycjonowanych. Ponadto, szczegółowo opisuje zarówno budowę, jak i mechanizm działania iwermektyny oraz monenzyny, znanych leków przeciwpasożytniczych o udokumentowanej w literaturze przedmiotu aktywności przeciwnowotworowej, których modyfikacje strukturalne stanowią podstawę prezentowanej rozprawy doktorskiej. Jest to w zupełności wystarczający, skompensowany fragment komentarza wskazujący na zasadność prowadzonych badań, jak i ich znaczenie praktyczne.

Cele realizowanej pracy badawczej opisane są w sposób szczegółowy, wyczerpujący i klarowny.

Nadrzędnym celem pracy była synteza nowych związków o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej i przeciwpasożytniczej.

Trzy pierwsze publikacje zostały poświęcone analogom iwermektiny. Na podstawie doniesień literaturowych i po analizie zależności struktura-aktywność Doktorant jako miejsce modyfikacji iwermektiny wybrał pozycję C13. Otrzymał w sumie 34 nowe pochodne. Wśród nich serię 22 nowych C13-*epi*-amidowych pochodnych iwermektiny, syntezowanych na drodze amidowania prekursora C13-*epi*-aminowego a także 2 pochodne będące produktami przegrupowania układu heksahydrobenzofuranowego IWR i jej aglikonu. Zarówno sam plan modyfikacji struktury, jak i ich przeprowadzenie wskazują na doskonały warsztat syntetyczny Doktoranta oraz umiejętność wyciągania adekwatnych wniosków z prowadzonych doświadczeń. Oprócz syntezy spodziewanych analogów otrzymał związki, które wskazały nowy, możliwy kierunek modyfikacji. Wszystkie otrzymane pochodne zostały scharakteryzowane metodami spektralnymi oraz wybrane analizą rentgenostrukturalną.

Wszystkie nowe związki zostały zbadane pod kątem aktywności przeciwpasożytniczej *in vitro* na modelu trypanosomatozy afrykańskiej we współpracy z dr. Dietmarem Steverdingiem z Norwich Medical School w Wielkiej Brytanii. Większość otrzymanych pochodnych wykazała wyższą aktywność oraz lepszą selektywność działania wobec pasożyta niż prekursor czyli niemodyfikowana chemicznie iwermektyna. Dwa nowe związki, przegrupowany oraz nieprzegrupowany amid 2-chloroacetylowy wykazały około 230-krotnie wyższą aktywność *in vitro* niż związek wyjściowy, porównywalną z lekami stosowanymi w leczeniu odpowiednio śpiączki afrykańskiej.

Sześć związków zostało również zbadanych pod kątem aktywności przeciwmalarycznej wobec wątrobowego stadium *Plasmodium berghei* we współpracy z prof. Miguelem Prudêncio z Uniwersytetu w Lizbonie. Amid acetylowy przegrupowanej iwermektiny okazał 2,5-krotnie bardziej aktywny wobec *P. berghei* niż niemodyfikowana chemicznie iwermektyna.

Nowe związki poddano także ocenie cytotoksyczności. Do badań użyto komórek linii nowotworowych: raka piersi niezależnego od estrogenów, płuc jelita grubego oraz raka prostaty a także komórek prawidłowych - keratynocytów. Żaden z otrzymanych związków nie okazał się bardziej aktywny niż doksorubicyna zastosowana w badaniach jako lek referencyjny, jednak wszystkie otrzymane analogi wykazały wyższą selektywność działania. Otrzymane wyniki są wartościowe, wskazują na dalsze możliwe kierunki modyfikacji celem otrzymania aktywnych związków. Ponadto, podjęto próbę określenia prawdopodobnego mechanizmu działania cytotoksycznego syntezowanych pochodnych. Z uwagi na zastosowanie w badaniach komórek różnych linii nowotworowych mechanizmy działania mogą być całkowicie odmienne. Analizowano apoptozę, cykl komórkowy, poziom

interleukiny 6 oraz stres oksydacyjny. Wykazano, że pochodne iwermektyny mogą hamować wzrost komórek nowotworowych i indukować apoptozę poprzez zależną od mitochondriów produkcję reaktywnych form tlenu, jak również działać jako inhibitory interleukiny 6.

Kolejnym etapem pracy była synteza nowych hybryd iwermektyny z substancjami wykazującymi wysoką aktywność biologiczną. Zastosowano alkaloidy kory chinowca (chinina, chinidyna, cynchonina, cynchonidyna), floksurydynę i azydotymidynę jako analogi nukleotydów, *N*-deacetylotiokolchicynę, kwas betulinowy, artezunat i metronidazol. Wszystkie te związki posiadają dobrze udokumentowaną aktywność biologiczną. Dzięki zastosowaniu różnych podejść syntetycznych Doktorant otrzymał serię 10 biokoniugatów, które zostały następnie zbadane pod kątem ich aktywności *in vitro* wobec komórek nowotworowych oraz komórek pasożyta *Trypanosoma brucei brucei*.

Substratem wyjściowym do syntezy wszystkich związków był blokowany w pozycji C5 aglikon iwermektyny. Syntezę koniugatów zaplanowano przy użyciu trzech metod. Pierwsza z użyciem trifosgeny w obecności trietyloaminy pozwoliła na otrzymanie połączeń z alkaloidami kory chinowca oraz *N*-deacetylotiokolchicyną, w których blokowany aglikon połączono z wybranym związkiem za pomocą ugrupowania węglanowego lub uretanowego. Metoda ta okazała się nieskuteczna w syntezie koniugatów z analogami nukleozydów oraz metronidazolem. Wobec czego otrzymano aktywowany prekursor iwermektyny w reakcji blokowanego aglikonu z karbonylodiimidazolem, który następnie połączono z wybranymi związkami aktywnymi. Wszystkie otrzymane hybrydy Doktorant poddał reakcji z kwasem *para*-toluenosulfonowym w celu usunięcia grupy silylowej w pozycji C5, co pozwoliło na otrzymanie końcowych produktów. Synteza biokoniugatów z kwasem betulinowym i artezunatem obejmowała zastosowanie reakcji „klik”, tj. 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami Cu(I). Wobec braku możliwości bezpośredniego wprowadzenia grupy azydowej w miejsce grupy hydroksylowej w pozycji C13 aglikonu iwermektyny blokowany aglikon poddano reakcji estryfikacji z chlorkiem chloroacetyl, a następnie przeprowadzono reakcję substytucji nukleofilowej z azydkiem sodu.

Wszystkie otrzymane koniugaty zostały scharakteryzowane za pomocą metod spektroskopowych (¹H NMR, ¹³C NMR) oraz spektrometrycznych (ESI MS). Otrzymane hybrydy, jak również wszystkie związki użyte do połączeń zostały zbadane pod kątem ich aktywności przeciwpasożytniczej oraz antyproliferacyjnej. Badania biologiczne przeprowadzono w ramach współpracy z zespołem prof. Marty Strugi z Katedry i Zakładu Biochemii Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz współpracy ze wspomnianym wcześniej dr. Dietmarem Steverdingiem. Większość

otrzymanych koniugatów wykazała wyższą aktywność w zwalczaniu pasożytów *T. b. brucei* niż niemodyfikowana iwermektyna, a wartości GI50 wahały się w przedziale od 1,3 do 2,4 μM . Połączenie iwermektyny z alkaloidami kory chinowca, nukleozydami oraz metronidazolem okazało się skuteczną metodą zwiększenia aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek raka prostaty. Spośród wszystkich otrzymanych połączeń koniugat iwermektyny z artezunatem charakteryzował się najlepszym profilem aktywności biologicznej i najwyższym współczynnikiem selektywności, więc pomimo zdecydowanie niższej aktywności niż doksorubicyna oraz leki przeciwpasożytnicze może posłużyć jako struktura wiodąca do dalszych badań w kontekście poszukiwania nowych kandydatów na leki przeciwnowotworowe i/lub przeciwpasożytnicze.

Kolejne trzy prace traktują o modyfikacjach strukturalnych monenzyny. Pierwsza to przedstawienie starannie zaplanowanej strategii mającej na celu wprowadzenie związku chemicznego bezpośrednio do mitochondrium za pomocą „nośnika”, zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej a tym samym wprowadzenie komórki na szlak apoptozy. Doktorant otrzymał 12 nowych koniugatów monenzyny z kationem trifenylofosfoniowym („nośnikiem”) za pomocą wiązania estrowego przy zastosowaniu łączników alifatycznych o różnej długości. Poza trifenylofosfiną, do syntez użyto także analogów z różnymi podstawnikami w pierścieniach aromatycznych oraz fosfinę alifatyczną (tributylofosfinę). Celem wykluczenia wpływu samej estryfikacji przeprowadzono syntezę estru benzyłowego monenzyny. Wszystkie otrzymane połączenia przekazano do badań aktywności antyproliferacyjnej na komórkach pięciu linii ludzkich nowotworów, tj. nowotworu jelita grubego, nowotworu prostaty, nowotworu piersi oraz nowotworu płuc. Jako zdrowe linie referencyjne wybrano ludzkie keratynocyty oraz fibroblasty płuc chomika chińskiego. Wszystkie sole fosfoniowe monenzyny wykazały wysoką aktywność w wobec testowanych komórek linii nowotworowych, w tym wiele z nich było bardziej aktywnych niż niemodyfikowany jonofor oraz doksorubicyna. Niestety związki wykazały efekt cytotoksyczny również wobec komórek prawidłowych, chociaż słabszy niż wobec komórek nowotworowych. Zastosowanie różnych soli fosfoniowych pozwoliło na wyciągnięcie wartościowych zależności pomiędzy budową a aktywnością co w przyszłości pozwoli na racjonalne projektowanie kolejnych analogów. Również w przypadku tego typu pochodnych postanowiono proponować mechanizm działania cytotoksycznego i tutaj także w zależności od zastosowanej linii nowotworowej zaobserwowano różne mechanizmy działania. Jednak głównym celem przeprowadzonych badań było udowodnienie, że otrzymane hybrydy mogą

być selektywnie kierowane do mitochondriów komórek nowotworowych, co zostało potwierdzone.

Kolejna praca poświęcona została makrocyklicznym pochodnym monenzyny. Modyfikując warunki reakcji mgr Sulik otrzymał trzy makrocykliczne pochodne: dwie zawierające układ 1,2,3-triazolu za pomocą reakcji „klik” zgodnie z protokołem Meldala oraz trzeci związek, będący produktem makrolaktamizacji aminowej pochodnej monenzyny. Struktury związków zostały określone metodami spektralnymi oraz dla azydku i dwóch związków makrocyklicznych wykonano analizę krystalograficzną. Kolejno oceniono zdolność nowych związków do koordynowania kationów metali. Doktorant zastosował roztwory soli nadchloranowych metali pierwszej (LiClO_4 , NaClO_4 , KClO_4 , RbClO_4 -lub CsClO_4) i drugiej grupy ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Sr}(\text{ClO}_4)_2$ lub $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$). Tworzenie związków kompleksowych potwierdził za pomocą spektrometrii mas ESI MS. Dodatkowo we współpracy z zespołem prof. Joanny Wietrzyk z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu wykonano również badania aktywności antyproliferacyjnej. Do badań użyto komórek czterech linii ludzkich nowotworów: A549 (nowotwór płuc), MCF-7 (nowotwór piersi), LoVo (nowotwór okrężnicy), LoVo/DX (nowotwór okrężnicy oporny na działanie doksorubicyny) oraz linię mysich fibroblastów BALB/3T3 jako prawidłową. Wszystkie pochodne makrocykliczne wykazały niższą aktywność antyproliferacyjną niż niemodyfikowana monenzyna, jednak charakteryzowały się lepszą selektywnością w stosunku do komórek linii nowotworowych. Jeden ze związków, pochodna estrowa z układem 1,2,3-triazolu wykazała wysoką aktywność wobec lekoopornej linii LoVo/DX, wyższą niż cisplatyna.

Wcześniejsze doświadczenia promotora w syntezie związków aktywnych wobec zarodźca malarii zaowocowały powstaniem ostatniej z cyklu publikacji Doktoranta. Substratem do syntez była pochodna monenzyny mająca grupę aminową w pozycji C26. Doktorant otrzymał trzy nowe związki, pochodną benzamidową, pochodną mocznika oraz amid z kationem trifenylfosfoniowym. Strukturę związków potwierdzono metodami spektralnymi oraz dla dwóch pochodnych wykonano analizę krystalograficzną. Syntezowane pochodne oraz trzy wcześniej otrzymane związki o potencjalnej aktywności przeciwmalarycznej poddano badaniom wobec wątrobowego stadium pasożyta *P. berghei*. Badania przeprowadzono w ramach współpracy z prof. Miguelem Prudêncio z Uniwersytetu w Lizbonie. Wszystkie otrzymane pochodne wykazały wielokrotnie wyższą aktywność przeciwmalaryczną niż lek referencyjny - prymachina, a niektóre z nich były bardziej aktywne niż monenzyna. Analiza zależności struktura-aktywność pozwoliła na stwierdzenie, że pochodne otrzymane w wyniku

chemicznej modyfikacji pozycji C26 były zdecydowanie skuteczniejsze w zwalczaniu pasożytów *P. berghei* niż pochodne w pozycji C1. Połączenie monenzyny z kationem trifenylofosfoniowym, niezależnie od tego, czy było przeprowadzone w pozycji C1 czy C26, nie wpłynęło pozytywnie na właściwości przeciwmalaryczne jonoforu. Wartości stężenia hamującego IC₅₀ zarówno dla amidu, jak i pochodnej mocznika były bardzo niskie i wносиły odpowiednio 6,4 nM oraz 2,9 nM. Najbardziej aktywnym związkiem okazał się wcześniej otrzymany uretan, który wykazał aktywność poniżej 1 nM (IC₅₀ = 0,7 nM). Ponadto, co istotne związki charakteryzowały się selektywnością działania, preferencyjnie działając na komórki pasożyta.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorant wykonał imponującą, niezwykle wartościową pracę syntetyczną, która świadczy o jego głębokim zrozumieniu badanego zagadnienia oraz szerokiej orientacji w literaturze przedmiotu. Przedstawiona do recenzji praca wyróżnia się nie tylko zakresem materiału, ale również dojrzałością interpretacyjną i umiejętnością wyciągania wniosków, co nadaje jej charakter swoistego podsumowania badań syntetycznych w danej dziedzinie oraz stanowi cenny wkład w dalszy ich rozwój. Tak szeroko zakrojona synteza wymagała nie tylko znakomitego warsztatu metodologicznego, ale także dużej samodzielności badawczej i intelektualnej.

Uważam, iż praca mgr Michała Sulika jest przykładem doskonale zaplanowanej (!) i wykonanej (!) pracy badawczej.

Język pracy jest poprawny, klarowny i adekwatny do charakteru rozprawy naukowej. Autor posługuje się terminologią fachową w sposób precyzyjny, unikając zarówno nadmiernego żargonu, jak i uproszczeń, co sprawia, że tekst jest przystępny, a jednocześnie utrzymany na wysokim poziomie merytorycznym.

Na szczególne uznanie zasługuje również szata graficzna pracy. Starannie dobrane rysunki i tabele nie tylko wzbogacają przekaz, ale też znacząco wspomagają zrozumienie prezentowanych treści. Estetyka opracowania, czytelność układu graficznego i konsekwencja w formatowaniu świadczą o dużej dbałości autora o formę pracy, co dodatkowo podnosi jej ogólną wartość.

Ponadto, na koniec pragnę zwrócić uwagę, na pozostały dorobek naukowy mgr. Michała Sulika. W czasie wykonywania badań własnych brał udział w innych pracach badawczych o czym świadczy jego bogaty dorobek publikacyjny. Zwraca również uwagę udział Doktoranta w projektach badawczych. Dwukrotnie był kierownikiem projektu („Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” oraz Diamentowy Grant) oraz wykonawcą (OPUS, SONATA). W trakcie kształcenia w Szkole Doktorskiej odbył cztery staże naukowe. Brał udział w

konferencjach naukowych. Jest laureatem wielu nagród i stypendiów. Jak na młodego człowieka jest to dorobek imponujący!

Z uwagi na szeroki panel badań, interdyscyplinarność oraz znaczenie uzyskanych wyników, jak również aktywność publikacyjną mgr. Michała Sulika wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, co szczegółowo uzasadniam w oddzielnym piśmie.

Podsumowując, stwierdzam, że wszystkie cele badawcze zostały zrealizowane. Rozprawę doktorską uważam za niezwykle interesującą oraz nowatorską, w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim..

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM w Poznaniu wniosek o nadanie mgr. Michałowi Sulikowi stopnia doktora nauk chemicznych.

Stanisław Hryciuk