

prof. dr hab. Adam Prahl
Pracownia Chemii Peptydów
Katedra Chemii Organicznej
Wydział Chemii UG

Gdańsk, 07.11.2024 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Karoliny Ciesielskiej pt.: „Synteza, badania strukturalne i aktywność przeciwnowotworowa nowych fluorowanych α -aminofosfonianów”

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, prof. dra hab. Macieja Kubickiego z dnia 11.10.2024 zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii UAM z tego samego dnia.

Projektowanie i otrzymywanie kwasów aminofosfonowych oraz ich pochodnych stanowi niezwykle istotny kierunek badań we współczesnej chemii medycznej. Strukturalne podobieństwo tej grupy związków do naturalnie występujących aminokwasów czyni je idealnymi kandydatami do poszukiwania nowych substancji leczniczych, charakteryzujących się takimi cechami jak relatywnie niska toksyczność, wysoka lipofilowość oraz stosunkowo duża stabilność połączenia C–P (warunki hydrolizy w środowisku kwaśnym i zasadowym, odporność na hydrolizę enzymatyczną). Na przestrzeni blisko 80 lat (pierwsze doniesienia literaturowe dotyczące tej grupy związków datowane są na początek lat czterdziestych ubiegłego wieku) opublikowano wiele prac dotyczących ich syntezy i aktywności biologicznej. Przeprowadzone badania wykazały, że związki te posiadają szerokie spektrum właściwości począwszy od przeciwnowotworowych, przeciwdrobnoustrojowych i przeciwwirusowych poprzez przeciwutleniające, a kończąc na wykorzystaniu ich do hamowania aktywności różnych enzymów. W nurt tych badań wpisują się również prace przeprowadzone przez mgr Karolinę Ciesielską w ramach rozprawy doktorskiej. Celem projektu była synteza nowych α -aminofosfonianów modyfikowanych atomami fluoru jako związków wykazujących właściwości przeciwnowotworowe. Fluor jako podstawnik w pierścieniu aromatycznym został wytypowany ze względu na swoje właściwości elektronoakceptorowe i niewielki rozmiar, co z jednej strony daje możliwość elektrostatycznego oddziaływania tej części cząsteczki z kluczowymi miejscami cząsteczek enzymów czy receptorów, z drugiej strony nie generuje niekorzystnych zaważ sterycznych. Doktorantka wskazuje w pracy trzy główne aspekty prowadzonych prac: syntezę nowych, fluorowanych α -aminofosfonianów w oparciu o diastereoselektywną reakcję Pudovik’a, badania strukturalne mające na celu określenie poprawności przeprowadzonych syntez oraz potwierdzenie struktury nowo otrzymanych związków (również z ustaleniem konfiguracji absolutnej powstającego centrum chiralności) i wreszcie ocena aktywności biologicznej otrzymanych analogów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Każda z tych trzech głównych aktywności składała się z kilku mniejszych kroków, które należało zrealizować, aby osiągnąć wyznaczony cel. Zostaną one przybliżone w dalszej części recenzji.

Praca doktorska została zrealizowana w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką dr hab. Donaty Pluskoty-Karwatki, prof. UAM. Funkcję promotora pomocniczego sprawował dr Dariusz Wawrzyniak. Opracowanie obejmuje 303 strony maszynopisu podzielone na 7 rozdziałów poprzedzonych spisem treści, wykazem stosowanych skrótów, streszczeniem w języku polskim i angielskim, wprowadzeniem i celem pracy. Pierwszą część pracy stanowi rozdział zatytułowany „Część literaturowa” (40 stron) poświęcony przybliżeniu tematyki i przedmiotu badań. W rozdziale tym Doktorantka, po wprowadzeniu dotyczącym α -aminofosfonianów, ich budowy, właściwości biologicznych i zastosowania skupia się na dokładnym opisie metod otrzymywania tych związków (reakcja Kabachnik’a-Fields’a, reakcja Pudovik’a). Uzupełnieniem tej części są podrozdziały poświęcone kolejno wykorzystaniu fluoru do modyfikacji związków organicznych (jako potencjalnych leków) oraz urokinazie – enzymowi, którego nadekspresja związana jest z nasileniem przebiegu choroby nowotworowej (rozwój nowotworu i przerzuty). Zahamowanie aktywności tego właśnie białka zostało wytypowane jako jedna z dróg określenia aktywności przeciwnowotworowej zaprojektowanych i otrzymanych pochodnych (terapia celowana).

Rozdział drugi zatytułowany „Wyniki i dyskusja” zawiera zestawienie i opis przeprowadzonych badań oraz wyników otrzymanych w trakcie realizacji tych prac. Otrzymanie fluorowanych α -aminofosfonianów wymagało przygotowania odpowiednich substratów w postaci imin. W tym celu opracowana została przez Panią Karolinę Nową, mechanochemiczna metoda ich syntezy. Przy jej wykorzystaniu zeszyntezowanych zostało 36 imin (12 z nich to nowe, nieopisane w literaturze związki). Do otrzymania imin zostały wykorzystane fluorowane pochodne aldehydu benzoowego oraz pochodne aniliny, zawierające w pierścieniu aromatycznym aminy podstawniki o różnym charakterze chemicznym w różnym położeniu lub chiralne pochodne benzyloaminy ((R)- α -metylobenzyloamina i (R)-4-metoksy- α -metylobenzyloamina). Metoda okazała się niezwykle skuteczna zarówno w małej jak i zwiększonej skali, dając często produkty z lepszymi wydajnościami niż przy użyciu klasycznych metod wspomaganych niejednokrotnie katalizatorami, odpowiednim doбором rozpuszczalników i podwyższoną temperaturą. Kolejnym krokiem była synteza α -aminofosfonianów, które Doktorantka otrzymała na drodze hydrofosfonylacji imin. Do otrzymania imin wykorzystanych zostało pięć fluorowanych aldehydów (2-fluorobenzaldehyd; 4-fluorobenzaldehyd; 2,4-difluorobenzaldehyd; 2,4,6-trifluorobenzaldehyd i 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyd) oraz trzy chiralne aminy ((R)- α -metylobenzyloamina, (R)-4-metoksy- α -metylobenzyloamina i (S)-3,3-dimetylo-2-butyloamina). Produkty pierwszego etapu syntezy poddane zostały następnie reakcji hydrofosfonylacji z zastosowaniem trzech fosforynów (fosforynu dimetylu, fosforynu dietylu lub fosforynu diizopropylu). Taki zestaw odczynników pozwala na otrzymanie 45 α -aminofosfonianów, otrzymanych zostało 19. Bardzo proszę o dwa komentarze – pierwszy dotyczy doboru zestawu substratów, drugi wyboru konkretnych 19 produktów przeprowadzonych syntez. Wszystkie związki otrzymane na obu etapach syntezy po oczyszczeniu (jeżeli było to wymagane) zostały szczegółowo scharakteryzowane z wykorzystaniem metod spektroskopowych (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR, ^{31}P NMR) i spektrometrycznych (HRMS). W przypadku gdy imina (cztery związki) lub α -aminofosfonian (trzy związki) otrzymane zostały w formie krystalicznej do analizy ich struktury została wykorzystana rentgenografia strukturalna. Do syntezy zaprojektowanych α -aminofosfonianów zastosowane zostały przez Doktorantkę chiralne aminy o znanej konfiguracji absolutnej,

dlatego produkty otrzymywane były w postaci mieszanin diastereoizomerów (wyjątek stanowi jeden ze związków oznaczony w pracy jako 2.13, który został wyodrębniony w postaci jednego diastereoizomeru – udało się to uzyskać na etapie przygotowania kryształów do pomiarów z wykorzystaniem dyfraktometru). Badania strukturalne z wykorzystaniem rentgenografii strukturalnej oraz w oparciu o technikę 2D NMR (NOESY) pozwoliły ustalić konfigurację absolutną nowego centrum chiralności, powstającego w trakcie otrzymywania α -aminofosfonianów. Stereoselektywność reakcji otrzymywania α -aminofosfonianów została wyjaśniona przez mgr Ciesielską w oparciu o model Ahn'a-Eisenstein'a, który zakłada antyperiplanarne położenie największej grupy w pozycji α iminy oraz atak nukleofila od strony mniejszej zawady sterycznej. Zatem konfiguracja absolutna atomu węgla α w powstających na drodze takiej reakcji α -aminofosfonianach zależy tylko od struktury iminy.

Zaprojektowane związki w większości udało się Doktorantce uzyskać z „bardzo dobrą i dobrą” wydajnością oraz „bardzo dobrym i dobrym” stosunkiem diastereoizomerycznym. Jedynie w przypadku związków zawierających w strukturze tri- i pentafluorowane układy aromatyczne odnotowane zostały niższe wartości. Doktorantka podjęła się próby wyjaśnienia tej obserwacji z wykorzystaniem obliczeń kwantowochemicznych, które wykazały, że różnica energii pomiędzy dwoma konformerami iminy ulegającej reakcji jest mniejsza w substracie niefluorowanym niż trifluorowanym.

W ten sposób zrealizowane zostały dwa pierwsze zadania, o których wspomniałem na wstępie recenzji i przygotowany został materiał do badań biologicznych. Przed przystąpieniem do nich Doktorantka dokonała oceny zaprojektowanych analogów pod kątem wykorzystania ich jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Posłużyło do tego oprogramowanie SwissADME, dzięki któremu w oparciu o strukturę i właściwości fizykochemiczne można ocenić prawdopodobieństwo wykorzystania małych cząsteczek jako farmaceutyków. Przeprowadzone analizy potwierdziły taki potencjał nowych, fluorowanych α -aminofosfonianów. Kolejnym krokiem było oznaczenie cytotoksyczności (*in vitro*) na dziesięciu liniach komórkowych ludzkich nowotworów: glejaka (U-87 MG, U-118 MG, U-251 MG), raka płuc (A549), raka piersi (MDA-MB-231), raka wątroby (HepG2), raka jelita grubego (Caco-2), raka jajników (OVCAR-3, SK-OV-3) oraz raka szyjki macicy (HeLa). Jako linia referencyjna wybrana została linia komórek prawidłowych (MRC-5) pochodzących z fibroblastów płuc. Do wyznaczenia aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych α -aminofosfonianów Pani Karolina wybrała kolorometryczny test MTT. Punktem odniesienia dla aktywności przeciwnowotworowej nowych analogów była aktywność 5-fluoro-2'-deoksyurydyny (FdU), często stosowanego leku przeciwnowotworowego, który również został poddany ocenie aktywności cytotoksycznej. Wszystkie przebadane α -aminofosfoniany charakteryzowały się wysoką cytotoksycznością względem linii komórkowej raka szyjki macicy i raka jelita grubego. Dobra aktywność wykazana została również dla jednej z linii glejaka i jednej raka jajników. Co ciekawe w wielu przypadkach badane α -aminofosfoniany okazały się być bardziej aktywne niż lek referencyjny. Porównanie otrzymanych wyników ze strukturą badanych związków pozwoliło Doktorantce stwierdzić, że wyższą cytotoksycznością charakteryzują się α -aminofosfoniany zawierające mniejszą liczbę atomów fluoru jako podstawniki w pierścieniu aromatycznym pochodzącym z tak modyfikowanego aldehydu benzoesowego użytego do syntezy. Dla określenia działania długoterminowego α -aminofosfonianów wykonany został też test klonogenny (jedna losowo wybrana linia komórek nowotworowych i linia komórek prawidłowych). Wyniki wskazały

jednoznacznie na obniżenie klonogenności w obu przypadkach, przy czym większy był spadek zdolności tworzenia kolonii w przypadku komórek nowotworowych.

Otrzymane α -aminofosfoniany Doktorantka przebadła również pod kątem inhibicji enzymatycznej, typując jako enzym wspomnianą wcześniej urokinazę, białko biorące udział w degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej, co związane jest z rozwojem choroby nowotworowej i z przerzutami. Zdolność hamowania aktywności urokinazy oznaczona została poprzez wykonanie zmodyfikowanego fluorometrycznego testu aktywności enzymatycznej. Jako substancję referencyjną Doktorantka wybrała amiloryd, preparat stosowany jako lek. Dziesięć z przebadanych analogów charakteryzowało się aktywnością o wartości IC_{50} poniżej 1 mM. Tym razem żaden nie zbliżył się do aktywności preparatu stosowanego w medycynie. Ponowne porównanie aktywności ze strukturą analogów pozwoliło stwierdzić Pani Karolinie, że obecność w strukturze α -aminofosfonianu fragmentu pochodzącego od (R)-4-metoksy- α -metylobenzyloaminy korzystnie wpływa na jego zdolność do inhibicji urokinazy. Potwierdziły to również badania dokowania molekularnego przeprowadzone dla najaktywniejszych α -aminofosfonianów. Wykazały one, że grupa metoksylova w pozycji para pierścienia aromatycznego będąca elementem strukturalnym aminy użytej do syntezy α -aminofosfonianów jest fragmentem, który jest odpowiedzialny za odpowiednie wpasowanie się w kieszeń wiążącą enzymu, prowadząc tym samym do zahamowania jego aktywności.

Zamieszczony jako kolejny rozdział trzeci „Ważniejsze osiągnięcia i wnioski” stanowi syntetyczne podsumowanie badań opisanych w rozdziale drugim i podsumowanie ich w postaci wniosków wyciągniętych na podstawie uzyskanych wyników. Nie będę w tej chwili odnosił się do wszystkich osiągnięć wymienionych przez Panią Karolinę, zostały one bowiem przytoczone powyżej. Patrząc globalnie na całość wykonanych badań i ich rezultatów oceniłbym, że opracowanie nowej mechanochemicznej metody do syntezy fluorowanych α -aminofosfonianów oraz wskazanie elementów strukturalnych w ich cząsteczkach, nadających im pożądane właściwości przeciwnowotworowe to są właśnie najważniejsze osiągnięcia. Pod tym drugim hasłem kryje się oczywiście wysoka aktywność niektórych analogów względem kilku linii komórek nowotworowych (wyższa od aktywności preparatu stosowanego jako lek) no i aktywność wobec komórek glejaka co z kolei związane jest ze zdolnością przenikania bariery krew-mózg.

Po rozdziale stanowiącym podsumowanie przeprowadzonych prac i wnioski z uzyskanych wyników następuje rozdział czwarty „Część eksperymentalna” poświęcony krótkim opisom dotyczącym metod syntezy zaprojektowanych związków, wykonaniu analiz i ich wyników oraz przeprowadzonych badań teoretycznych i biologicznych. Kolejny rozdział o numerze pięć zatytułowany „Literatura” liczy 185 odnośników. Należy zwrócić uwagę, że tylko 19 spośród nich, czyli niewiele więcej niż 10% pochodzi z ubiegłego wieku. Biorąc pod uwagę to co przytoczyłem na początku recenzji, a więc 80 lat pracy nad analogami kwasów aminofosfonowych oraz ich pochodnymi można z przekonaniem stwierdzić, że zaproponowane przez Doktorantkę badania opierają się na nowościach naukowych ostatnich lat. Ostatni, szósty rozdział „Załączniki” to zbiór widm przedstawiający wyniki analiz z wykorzystaniem metod spektroskopowych (1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR, ^{31}P NMR, 2D NMR (NOESY)). Należy w tym miejscu zauważyć, że wszystkie widma zostały zamieszczone z bardzo dużą starannością.

Zaplanowane i przeprowadzone w ramach realizacji rozprawy doktorskiej badania charakteryzują się wysokim poziomem naukowym – bezpośrednim dowodem na to są publikacje naukowe i prezentacje na

konferencjach naukowych, będące efektem tych prac. Szata graficzna opracowania jest również na wysokim poziomie. Zamieszczone rysunki, schematy i tabele są przygotowane bardzo starannie a trzeba zauważyć, że w całym opracowaniu jest ich naprawdę dużo. Jeżeli miałbym spojrzeć na całość bardzo krytycznie to kilka rysunków opisanych jest z wykorzystaniem języka angielskiego albo inaczej – opisy oryginalnych rysunków nie zostały zmienione na polskie. Nie do końca jestem też przekonany do zbyt częstego używania przecinków, czasami do opisu wykorzystywane są krótkie i precyzyjne sformułowania innym razem bardzo rozbudowane myśli. Sporo jest w pracy drobnych potknięć językowych (przykłady: raz występuje pierścień benzenowy innym razem fenyłowy, czy sformułowanie „mniej często stosowane”). W całym tekście znalazłem także zdania, które napisałbym inaczej stylistycznie, jednak styl Doktorantki jest stosowany konsekwentnie w całej pracy i z racji braku kwalifikacji językowych na odpowiednim poziomie, nie chcę poddawać ich dyskusji. Bezosobowa forma przyjęta do napisania pracy nie pozwala na określenie, które z opisanych badań Doktorantka wykonała sama, w elementach składowych opracowania, które wymieniłem w recenzji nie ma też informacji dotyczących ewentualnej współpracy. Wspomniane powyżej niedociągnięcia dotyczą strony edytorskiej i w żaden sposób nie mają wpływu na jakość przedstawionych w pracy badań. To, że zostały wytknięte ma na celu uświadomienie Kandydatce do stopnia doktora, że czasami warto zwrócić również uwagę na formę prezentacji wyników prac.

Oprócz wymienionych wyżej niedociągnięć i słabszych stron dysertacji trzeba zauważyć i docenić ogrom pracy i wysiłku włożony przez Doktorantkę w jej powstanie. Prace łączące badania z zakresu różnych dyscyplin i stosowanie różnorodnych technik nie należą do prostych i wymagają szerokiej i różnorodnej wiedzy. Takimi umiejętnościami wykazała się w trakcie realizacji kolejnych zadań Pani mgr Karolina Ciesielska. Uzyskane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej wyniki wnoszą wiele nowych i cennych informacji dotyczących zarówno wpływu chemicznej modyfikacji struktury wybranych do badań α -aminofosfonianów na ich aktywność, jak i informacji dotyczących procedur samych syntez. Docenić należy także, że w trakcie realizacji prac opracowane zostały nowe ścieżki syntezy wpisujące się doskonale w procedury i zasady zielonej chemii.

Dorobek naukowy mgr Karoliny Ciesielskiej to cztery publikacje w recenzowanych czasopismach naukowych z listy JCR (kolejna, z tego co wiem najważniejsza praca znajduje się na etapie recenzji) oraz dziewięć komunikatów zaprezentowanych na konferencjach naukowych (pięć z nich to wystąpienia ustne). Część z nich to konferencje o zasięgu międzynarodowym. Na szczególną uwagę zasługuje również fakt, iż publikowane i prezentowane wyniki odnoszą się bezpośrednio do efektów eksperymentów wchodzących w skład recenzowanej pracy.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Karoliny Ciesielskiej zatytułowana „Synteza, badania strukturalne i aktywność przeciwnowotworowa nowych fluorowanych α -aminofosfonianów” spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane kandydatom w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Ciesielskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Adam Prah