

Prof. dr hab. inż. Wiesław Szeja

Politechnika Śląska

Wydział Chemiczny

Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii

Gliwice, 23 luty 2015 r.

### Recenzja

Pracy doktorskiej mgr inż. Szymona Kłossowskiego pt. „**Synteza nowych inhibitorów układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny**”

Każda ocena twórczości naukowej, w tym także pracy doktorskiej jest obarczona pierwiastkiem subiektywnym. Dlatego przyjmuje się kryteria, które minimalizują wpływ tego czynnika. Dla mnie takimi wyznacznikami obiektywnymi są aktualność prowadzonych badań, oryginalność proponowanych rozwiązań, i szeroki zakres stosowania uzyskanych wyników. Wprawdzie recenzent uzyskując zlecenie na recenzję pracy doktorskiej zwykle koncentruje uwagę na wynikach przedstawionych w rozprawie. Moim zdaniem takie podejście pomija rolę promotora, a przecież wybór tematyki i metodyki jest przywilejem promotora i warunkuje niejednokrotnie końcowy wynik. W opiniowanej pracy udział promotora, co zaznaczył doktorant jest znaczący. I na ten czynnik zwróciłem uwagę, starając się ocenić nie tylko poziom rozprawy ale także jej umiejscowienie w nurcie zasadniczych kierunków badawczych. Recenzowana rozprawa doktorska, moim zdaniem mieści się w obszarze dynamicznie rozwijającej się dyscypliny naukowej, jaką jest chemia medyczna. Można ją ulokować na ważnym kierunku badań jakim jest projektowanie i synteza związków oddziaływujących z tak zwanym „celem terapeutycznym”, zwykle białkiem odgrywającym kluczową rolę w procesach komórkowych. Liczne są prace wskazujące na potencjalne możliwości uzyskania na tej drodze nowych leków skutecznych w terapii nowotworowej. Ten zamysł jest osią badań przedstawionych w recenzowanej pracy. Podstawowym celem badań było otrzymanie inhibitorów układu enzymatycznego tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny (Trx-TrxP) i ocena ich aktywności przeciwnowotworowej. Taki projekt można wstępnie ocenić jako ambitny i perspektywiczny, ale można było oczekiwać, że będzie trudny i czasochłonny, zwłaszcza z uwagi na planowane badania biologiczne. Kluczem do pomyślnej

realizacji pracy doktorskiej był wybór struktury wiodącej i określenie metodyki syntezy biomimetyków, na tyle efektywnej, że uzyskanie biblioteki związków aktywnych w ilościach potrzebnych do badań biologicznych będzie możliwe. To zadanie zostało zaplanowane i zrealizowane racjonalnie poprzez wytypowanie i zaprojektowanie peptydomimetyków jako potencjalnych inhibitorów oraz wykorzystanie multikomponentowej reakcji Ugi jako metody syntezy. Uważam, że pomyślna realizacja projektu otwierająca nowe drogi syntezy peptydomimetyków rozszerzyła możliwości otrzymania modelowych związków do badań biologicznych i zrozumienia molekularnych podstaw oddziaływań ligand-enzym..

Jak szczegółowo opisano w recenzowanej pracy mimetyki  $\alpha$ -aminokwasów i odpowiednich peptydów, wykazują wysoką i różnokierunkową aktywność terapeutyczną. Peptydomimetyki projektowane są tak, aby wykazywały większą odporność na proteazy (np. poprzez zastosowanie nienaturalnych aminokwasów) oraz lepszą przenikalność przez błony w porównaniu do naturalnych peptydów (np. przez zmianę polarności). Dzięki temu, związki te mogą posiadać aktywność biologiczną taką jak peptydy, jednocześnie wykazując lepsze parametry farmakokinetyczne. W cytowanej literaturze doktorant zwrócił uwagę na właściwości antybakteryjne, antywirusowe (m.in. anty-HIV), antyrakowe peptydomimetyków. Celem wykonywanych badań było znalezienie nowego inhibitora układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny ( Trx-TrxR) o strukturze peptydomimetyku. W tym kontekście, szczególnie interesująca byłaby możliwość łatwej i efektywnej syntezy. Wytypowano multikomponentową reakcję Ugi spełniającą ten warunek. Należy zwrócić uwagę, że takie podejście syntetyczne posiada bardzo istotne zalety:

- Substraty stosowane w tej reakcji są obszerną, dostępną grupą związków i stanowią szeroką i zróżnicowaną strukturalnie bibliotekę surowcową dla syntezy peptydomimetyków różniących się strukturalnie.
- Opracowanie wysoce stereoselektywnego wariantu otrzymywania enancjomerycznie i diastereomerycznie czystych połączeń otwiera szerokie możliwości otrzymania peptydomimetyków wykazujących szczególną bioaktywność.

Moim zdaniem, właściwe ujęcie tematu badawczego w zakresie chemii organicznej powinno być oparte na krytycznej analizie danych literaturowych. Studia literaturowe są, bowiem istotnym etapem poprzedzającym realizację pracy doktorskiej, gdyż warunkują oryginalność projektu badawczego, są pomocne przy właściwym zaplanowaniu eksperymentów i analizie uzyskanych wyników. Badania zostały poprzedzone obszernymi studiami literaturowymi. Część literaturowa omawia zasadnicze dla tematyki pracy zagadnienia, takie jak omówienie

reakcji Ugięgo tak w wariacie racemicznym jak i enancjo- i diastereomerycznym, wykorzystanie enzymów w reakcjach ukierunkowanych na uzyskanie optycznie czystych produktów. Omówiono funkcje układu tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny ( układ Trx-TrxR) w procesach komórkowych i uzasadniono zasadność syntezy inhibitorów tych enzymów, jako celu terapeutycznego w komórkach nowotworowych. Szczególnie wiele uwagi doktorant poświęcił studiom reakcji Ugi. Nie jest to fotograficzny zapis danych literaturowych, ale krytyczna analiza wyników badań, stanowiąca punkt wyjścia do planowania doświadczeń. Przeprowadzone studia literaturowe potwierdzają zasadność planowanych badań, ponieważ omówione w części teoretycznej publikacje wskazują, że nie są znane inhibitory układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny o strukturze peptydomimetyku. Rozdział ten jest zwarty i zawiera omówienie zasadniczych kierunków badawczych związanych z pracą doktorską. dokonano właściwego wyboru istotnych pozycji i wątków badawczych z ogromu danych na temat reakcji Ugi. Dobrze świadczy to o przygotowaniu Doktoranta do realizacji pracy eksperymentalnej. Bardzo czytelnie i logicznie omówiono wykorzystanie enzymów jako katalizatorów homochiralnych i ich aplikacje w syntezie wysoce stereoselektywnej. Literatura na ten temat jest bardzo szeroka i na uwagę zasługuje selekcja publikacji kluczowych dla planowanych decyzji syntetycznych. Przykładem może być szczegółowe omówienie syntezy chiralnych amin I-rzędowych substratów potrzebnych do realizacji wysoce stereoselektywnej syntezy diastereomerycznie czystych peptydomimetyków. W sposób przekonujący opisano funkcje i schemat działania układu tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny ( Trx – TrxR). Na podstawie tych danych zaplanowano sposób dezaktywacji Trx i wyjaśniono oczekiwany efekt terapeutyczny w leczeniu chorób nowotworowych wynikający z blokowania Trx, białka odpowiedzialnego za hamowanie apoptozy komórek nowotworowych.

Realizacja projektu została bardzo dobrze zaprogramowana. Wyróżnić tu można kilka istotnych zadań syntetycznych decydujących o sukcesie. Są to moim zdaniem:

Zastosowanie reakcji Ugi w syntezie biblioteki peptydomimetyków, inhibitorów Trx, zawierających ugrupowania podatne na reakcje z tiolami. Realizacja tego zadania została pomyślnie zrealizowana poprzez zaprojektowanie i otrzymanie kwasu, substratu w reakcji Ugi, zawierającego grupy hydroksylowe, ulegające łatwo transformacji do podstawników elektrofilowych.

Opracowanie stereoselektywnej metody syntezy inhibitorów Trx. Realizacja wymienionych celów syntetycznych była uwarunkowana uzyskaniem chiralnej, 1-(2,4-dimetoksybenzylo)etyloaminy enancjomerycznie czystej. Racemiczną aminę otrzymano w sekwencji reakcji: reakcja Leukcharta-hydroliza amidu wobec mocnej zasady. Wykazano, że amina jest chiralnym ekwiwalentem amoniaku w reakcji Ugi. Kinetyczny rozdział mieszaniny racemicznej z użyciem komercyjnie dostępnej lipazy ( Nowozym 435) doprowadził do uzyskania oczekiwanych produktów z dobrą wydajnością i wysoką regioselektywnością. Zaletą opracowanej metody jest możliwość syntezy w skali gramowej. Związek ten został wykorzystany z powodzeniem jako nowy pomocnik chiralny w reakcji Ugiego. Otrzymano z wysoką stereoselektywnością chiralne nieracemiczne  $\beta$ -acyloksymetakryloamidy. Zastosowanie enzymu jako katalizatora pozwoliło uniknąć obecności metali ciężkich w produktach co miałyby miejsce w przypadku użycia konwencjonalnej, wysoce stereoselektywnej metody otrzymywania związków enancjomerycznie czystych z użyciem katalizatorów metaloorganicznych.

Szczególną uwagę zwraca propozycja syntezy  $\alpha$ -aminoamidów w reakcji Ugi katalizowanej przez komercyjnie dostępną immobilizowaną lipazę ( Nowozym 435). Uzyskano wprawdzie mieszaninę racemiczną, ale jest nowe cenne rozwiązanie syntetyczne trójkomponentowej reakcji Ugi.

W sposób modelowy zrealizowano główny cel niniejszej pracy, jakim było opracowanie efektywnej metody otrzymywania peptydomimetykóe zdolnych do reakcji z tiolami. Szczególną zaletą tych metod, poza dobrą wydajnością oraz prostotą, jest niezwykle obszerna i zróżnicowana strukturalnie baza reagentów, jaką stanowią substraty w reakcji Ugi. Związki przebadano w testach enzymatycznych i w badaniach *in vitro* na wybranych liniach komórek nowotworowych. Analiza uzyskanych danych pozwoliła na określenie relacji struktura-aktywność biologiczna. Wiele, spośród otrzymanych związków było efektywnymi inhibitorami układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny. Ich aktywność biologiczna była porównywalna do aktywności związku PX-12, który jest pierwszym inhibitorem tioredoksyny dopuszczonym do badań klinicznych. Sprawia to, że grupa  $\beta$ -acyloksometakrylowa jest niezwykle interesującym farmakoforem. Wynikiem tych badań było wyselekcjonowanie najbardziej aktywnego inhibitora **123b**. Tym samym w pełni zrealizowano założony cel pracy doktorskiej.

Recenzowana praca doktorska zredagowana jest w sposób typowy dla prac eksperymentalnych z chemii organicznej. Czytałem ją z przyjemnością, ponieważ napisana jest bardzo dobrze. Analizę struktury otrzymanych związków prowadzono z użyciem

efektywnych metod takich jak spektroskopia IR,  $^1\text{H}$ . NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, analiza rentgenostrukturalna, wysokorozdzielcza spektrometria masowa. Kompleksowe zastosowanie tych metod pozwoliło na jednoznaczne określenie budowy otrzymanych połączeń, ich geometrii. Ten fragment pracy świadczy o bardzo dobrej znajomości współczesnych technik instrumentalnych wykorzystywanych w badaniach związków. Sposób prowadzenia badań nie budzi zastrzeżeń. Na uwagę zasługuje zaangażowanie doktoranta w realizację trudnego zadania badawczego. Różnorodność stosowanych technik w badaniach strukturalnych, sposób analizy wyników pomiarów dowodzi bardzo dobrego przygotowania doktorantki do pracy naukowej.

Jak już zaznaczyłem praca napisana jest w sposób jasny, czytelny i bardzo staranny. Jak w każdej bardzo obszernej pracy znajdują się błędy korektorskie, ale z zasady nie wymieniam tych pomyłek. Natomiast niektóre z zapisów nie są właściwe i z obowiązku recenzenta podaję kilka przykładów.

W wykazie skrótów grupę  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$  nazwano grupą acylową. W literaturze powszechne jest określenie grupa acetylowa.

Na stronie 7 błędnie określono konfigurację cukru. Wzór odpowiada pochodnej  $\beta$ -D-Galaktopyranozyloaminy, a nie jak zapisano izomerowi  $\alpha$ -D-.

Na stronie 7 Doktorant stwierdza: Wadą opracowanej metody była możliwość otrzymania wyłącznie jednego enancjomeru peptydomimetyku **5**, ponieważ autorzy nie dysponowali drugim enancjomerem aminocukru **3**. Cukry różniące się jedynie konfiguracją  $\alpha$ - i  $\beta$ - nie są enancjomerami. Sygnalizowane błędy tłumaczą tym, że Doktorant nie jest specjalista z chemii węglowodanów. A z doświadczenia wiem, że nomenklatura sacharydów jest nieprosta.

Mam też kilka uwag do stwierdzeń zawartych w pracy.

Schemat 35 Możliwe mechanizmy działania związku **64**. Przedstawiono warianty mechanizmu reakcji inhibitorów z Trx. Wydaje się, że biorąc pod uwagę strukturę związku **111** możliwy jest mechanizm w którym tworzy się stabilny kation allilowy, reaktywny w odniesieniu do tioli.

Z pewnym dystansem odnoszę się do tłumaczenia mechanizmu przenoszenia inhibitora omówionego na stronie 78. Jeżeli jest on poprawny, to inhibitor korzystnie byłoby wprowadzać jako produkt reakcji z białkiem, nośnikiem leku.

Przedstawiona ocena pracy jest kolejną recenzją twórczości naukowej mgr inż. Szymona Kłossowskiego, ponieważ większość wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej była

pozytywnie opiniowana przez redakcje czołowych czasopism , takich jak Organic Letters, Tetrahedron, Journal of Medical Chemistry.

Biorąc pod uwagę wyniki przedstawione przez mgr inż. Szymona Kłossowskiego pt. **„Synteza nowych inhibitorów układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny”** z całym przekonaniem stwierdzam, że spełnione są wymagania stawiane pracom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytułach naukowych i wnioskuję o dopuszczenie Pana Szymona Kłossowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom pracy oraz dorobek naukowy Doktoranta wnioskuję o jej wyróżnienie. Wprawdzie czas realizacji pracy jest dłuższy niż standardowo planowany w IChO PAN, ale jest bardzo proste tłumaczenie tego faktu. Badania biologiczne zawsze są czasochłonne i wymagają wielu powtórzeń aby uzyskać wiarygodne wyniki.

Wiesław Szeja

