

Recenzja pracy doktorskiej mgr Jacka Mularskiego

Rozprawa doktorska autorstwa Pana mgr Jacka Mularskiego zatytułowana „Projektowanie i synteza nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych” została wykonana w Zakładzie Chemii Organicznej Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem dr hab. inż. Roberta Musioła.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Jacka Mularskiego ma charakter klasyczny i składa się z wprowadzenia, w którym sformułowano cel pracy, części poświęconej opisowi aktualnego stanu wiedzy, opisu badań własnych, wniosków, części eksperymentalnej i spisu cytowanej literatury, na który składa się 231 pozycji. Analizując cytowaną literaturę da się zauważyć, że autor dokonał szerokiego przeglądu literatury opierając się zarówno na doniesieniach sprzed 2000 roku, jak i bazując głównie na pozycjach z lat 2001-2015 oraz uzupełniając te dane najnowszymi doniesieniami z lat 2016-2019 (tych pozycji jest najmniej, doliczyłam się ich zaledwie 17). Pozytywnie odbieram dodanie po sformułowaniu wniosków rozdziału zatytułowanego „Dalsze plany badawcze”, co nie jest ogólnie przyjęte w pracach doktorskich, jednak podkreśla, że autor badań ma wizję na najbliższą przyszłość i zdaje sobie sprawę, że w trakcie realizacji swojej pracy doktorskiej nie wyczerpał założonego tematu.

Kinazy tyrozynowe, będące założonym celem molekularnym dla projektowanych w ramach pracy doktorskiej związków, stanowią podklasę kinaz białkowych odpowiedzialnych za transfer reszty fosforanowej z wysokoenergetycznego substratu, jakim najczęściej jest ATP, do określonego białka powodując jego fosforylację. W przypadku kinaz tyrozynowych fosforylacji ulega grupa w łańcuchu bocznym tyrozyny obecnej w fosforylowanym białku. Fosforylacja ta prowadzi do zmiany konformacji białka i tym samym wpływa na pełnione przez nie funkcje. Kinazy tyrozynowe są głównymi modulatorami przesyłania sygnałów związanych z podstawowymi funkcjami komórki. Pośredniczą w regulacji większości dróg przenoszenia sygnału zewnątrzkomórkowego, a także kontrolują wiele procesów komórkowych takich jak regulacja wzrostu i różnicowania, w tym także patologicznego, kontrola cyklu komórkowego, sygnalizacja transbłonowa i wewnątrzkomórkowa, kontrola licznych szlaków metabolicznych, regulacja transkrypcji, regulacja działania kanałów jonowych oraz receptorów niektórych neurotransmiterów. Ze względu na kluczową rolę kinaz tyrozynowych w złożonym procesie przenoszenia sygnałów, regulacja ich aktywności warunkuje prawidłowe funkcjonowanie wszystkich komórek organizmu. W przypadku licznych chorób, zwłaszcza nowotworowych, stwierdzono zaburzenia w przekazie sygnału przez te enzymy.

W wielu przypadkach, na skutek mutacji i nadekspresji genów kodujących kinazy, dochodzi do niekontrolowanego wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych oraz do ich przerzutowania. Dlatego regulacja aktywności kinaz tyrozynowych może mieć zasadnicze znaczenie w terapii przeciwnowotworowej.

Właśnie tą tematyką zajął się mgr Jacek Mularski w swojej pracy doktorskiej. Już we wstępie tej pracy, autor zwraca uwagę, że inhibitory kinaz białkowych są znanymi lekami przeciwnowotworowymi i od lat prowadzone są w tym zakresie badania zarówno podstawowe, jak i wdrożeniowe. Autor zwraca również uwagę, że enzymy te lokują się wśród najpopularniejszych celów molekularnych. Ponadto, autor pracy podkreśla, że często leki skierowane na jeden cel nie wywierają złożonych efektów i dlatego istotne jest projektowanie leków wielocelowych, w tym przypadku zdolnych do jednoczesnego hamowania kilku onkogennych kinaz.

Przedstawiona do recenzji praca powstała w oparciu o wyniki badań, których celem była weryfikacja możliwości wykorzystania układów styrylochinazoliny w projektowaniu inhibitorów kinaz tyrozynowych o poszerzonym profilu selektywności. Według koncepcji doktoranta, układy styrylochinazolony stanowią rdzeń do syntezy serii 4-aminochinazolin oraz 4-sulfanylochinazolin, których aktywność biologiczną postanowiono przetestować zarówno pod kątem zdolności do hamowania aktywności ośmiu wybranych enzymów z grupy kinaz, jak i pod kątem zdolności do hamowania proliferacji siedmiu wybranych linii nowotworowych. Autor postanowił określić również toksyczność otrzymanych związków względem komórek normalnych fibroblastów skóry NHDF.

Część literaturowa pracy jest dość obszerna (47 stron) i podzielona została na części, z których pierwsza poświęcona jest zagadnieniom związanym z racjonalnym projektowaniem leków i obejmuje zarówno projektowanie zorientowane na znane fragmenty molekularne, jak i problem zróżnicowanej aktywności konformerów. Autor omawia również pojęcie i znaczenie bioizosteryzmu oraz idei struktur uprzywilejowanych w projektowaniu leków, a także metodę łączenia szkieletów wykorzystywaną w projektowaniu ligandów wielocelowych. W kolejnej części autor przedstawia opisane w literaturze inhibitory kinaz począwszy od Saracatinibu, poprzez szeroka gamę innych opatentowanych lub opisanych w literaturze struktur. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na niekonsekwencję w stosowaniu nazwy leku, który raz pojawia się jako „Saracatynib” a kiedy indziej jako „Saracatinib”. Osobny rozdział jest poświęcony już stosowanym w leczeniu inhibitorom kinaz tyrozynowych, z uwzględnieniem konkretnego celu molekularnego i podaniem wskazań do leczenia. Kolejny fragment części literaturowej poświęcony został kinazom z uwzględnieniem opisu ich funkcji, budowy, działania oraz możliwych mutacji. Ostatni rozdział części literaturowej poświęcony został tematyce związanej z wielocelową terapią onkologiczną.

O ile studia literaturowe zostały przeprowadzone gruntownie, a zaproponowany układ tej części pracy wydaje się słuszny i stanowi wprowadzenie oraz uzasadnienie do wyboru tematyki opisywanych w kolejnej części badań, o tyle słownictwo i czasami zbyt wyrafinowany język użyte w tej części pracy nieco utrudnia czytelnikowi lekturę tego fragmentu pracy doktorskiej. Nie udało się również uniknąć doktorantowi zarówno błędów gramatycznych jak i błędów edytorskich. W pracy po **Rysunku 24** pojawia się na str. 37 od razu **Rysunek 26**. Po nim z kolei pojawia się **Rysunek 31**, a następnie w pracy znaleźć można serię **Rysunków 29** (od a do f) oraz **Rysunek 30**. Na **Wykresie 2** (str. 37) przedstawiono korelację ilości występujących domen SH2 w kinomach



różnych gatunków, jednak skróty gatunków przedstawionych na wykresie jedynie częściowo zgadzają się z opisem po prawej stronie wykresu. Jedynie pięć z dwunastu przedstawionych na wykresie skrótów gatunków znalazło rozwinięcie skrótu w opisie do wykresu. Z kolei cztery gatunki opisane po prawej stronie wykresu nie znalazły się na wykresie. Na stronie 43 w tekście znalazło się odwołanie do **Rysunku 27c**, którego w ogóle nie ma. Mam również wątpliwości natury nomenklaturowej w stosunku do określenia, które autor użył w odniesieniu do inhibitorów opartych na szkielecie 9-(arenoetenilo)puryny przedstawionych na **Rysunku 2**, a opisanych jako „struktury 2,6-dwupodstawionych fragmentów adeniny”.

Omówienie wyników badań własnych mgr Jacek Mularski rozpoczyna od przedstawienia informacji pozwalających na uzasadnienie wyboru 2-styrylochinazoliny jako szkieletu do syntezy serii związków mających wykazywać określoną aktywność biologiczną. Następnie autor omawia jak manipulowanie wprowadzanymi podstawnikami może wpływać na właściwości elektronowe samego rdzenia chinazoliny oraz uzasadnia kwestiami związanymi z farmakokinetyką wybór wprowadzanego do niektórych związków ugrupowania 1,3-benzodioksolu. Po tym wprowadzeniu, w kolejnym podrozdziale doktorant omawia już kwestie związane z kilkietapową syntezą poszczególnych związków bazując na znanych i opisanych w literaturze reakcjach. W początkowej fazie konieczne było otrzymanie 2-metylo-4(3H)chinazonu oraz jego pochodnej zawierającej chlor w pozycji C-7 w dwuetapowej sekwencji reakcji z wykorzystaniem pochodnych kwasu 2-aminobenzoowego jako substratu. Kolejnym krokiem była reakcja kondensacji z odpowiednim aldehydem prowadząca do uzyskania serii 2-(*E*)-styrylochinazonów, dla której to reakcji autor omawia dobór warunków pozwalających na uzyskanie najlepszych wydajności pożądaných produktów. Testowano zarówno skład medium reakcyjnego, jak również czas i temperaturę prowadzonej reakcji. W tym miejscu zastanawia mnie zamieszczone w tekście sformułowanie „po ochłodzeniu mieszaniny, przemywano ją gorącym Et₂O”. Co autor rozumie pod pojęciem „gorącego eteru dietylowego” biorąc pod uwagę, że temperatura wrzenia tego rozpuszczalnika to 34,6 °C? Autor zwraca również uwagę, że „w wariacie reakcji prowadzonych w polu mikrofalowym zauważalnie skraca się czas do osiągnięcia podobnego poziomu wydajności jak tej uzyskiwanej konwencjonalnie”. Jednak autor nie zastanawia się, czy wpływ na taki stan rzeczy ma zastosowanie mikrofal, czy też może mieszanina reakcyjna potraktowana określoną mocą promieniowania mikrofalowego po prostu ogrzała się do wyższej temperatury. Warto o tym wspomnieć tym bardziej, że ani w opisie badań własnych, ani w części eksperymentalnej nie ma informacji na temat temperatury mieszaniny reakcyjnej w reaktorze mikrofalowym.

W kolejnym etapie otrzymane 2-styrylochinazoliny poddane zostały funkcjonalizacji fragmentem benzenosulfonowym w reakcji z odpowiednim chlorkiem benzenosulfonowym prowadzonej w obecności zasady. Autor zwraca uwagę, że zastosowanie „*N,N*-diizopropylaminy” (powinno być *N,N*-diizopropylaminy) zamiast trietyloaminy korzystnie wpływa na wydajność i czystość otrzymanych pochodnych, jednak nie zadaje sobie trudu aby wyjaśnić z czego może to wynikać.

Ostatnim etapem syntezy zaplanowanych związków zawierających szkielet 2-styrylochinazoliny było podstawienie grupy arylosulfonowej odpowiednimi aryloaminami bądź aryliolami (dostępnymi komercyjnie lub uzyskanymi z odpowiednich chlorków sulfonowych



w wyniku reakcji redukcji). W efekcie autor otrzymał gamę 4-*N*-podstawionych lub 4-*S*-podstawionych pochodnych 2–styrylochinazoliny. W tym miejscu zabrakło mi tabelarycznego zestawienia struktur wszystkich syntezowanych związków z przypisanymi im odpowiednimi numerami i wydajnościami, z jakimi je otrzymano.

Po zakończeniu części syntetycznej, mgr Jacek Mularski przeszedł do omawiania wyników badań biologicznych poprzedzając tę część wprowadzeniem, w którym zdefiniowano pojęcia wartości IC_{50} i K_i . Autor dodał w tej części przypis informujący o tym, że badania aktywności biologicznej zostały wykonane we współpracy z dr Katarzyną Malarz. Ponieważ nie znalazłam w pracy opisu procedur stosowanych do badań nad hamowaniem aktywności kinaz oraz do określania cytotoksyczności związków, pojawia się pytanie czy ta współpraca polegała na tym, że wszystkie badania biologiczne wykonała dr Katarzyna Malarz, a autor jedynie zamieścił w pracy doktorskiej uzyskane wyniki i je zinterpretował, czy też może mgr Jacek Mularski uczestniczył w wykonywaniu badań biologicznych. Wydaje mi się jednak, że niezależnie od odpowiedzi na to pytanie, warto było w części eksperymentalnej zamieścić krótki opis postępowania przy tych badaniach. Tym bardziej, że doktorant wspomina, że badania pod kątem zdolności otrzymanych związków do inhibicji wybranych kinaz prowadzono jedynie aby określić poziom zahamowania enzymów przy jednym stężeniu badanych związków, nie podaje jednak jakie to było stężenie. Tylko dla najbardziej obiecujących związków przeprowadzono rozszerzone pomiary pozwalające na wyznaczenie parametru IC_{50} . Również w tym przypadku nie podano stężeń, dla których prowadzono pomiary oraz nie podano jak wyglądała procedura prowadzenia reakcji enzymatycznych oraz analityki uzyskanych próbek. Jest to o tyle istotne, że patrząc na wyniki IC_{50} zebrane w Tabeli 11 zauważa się wyjątkowo wysokie wartości odchyłeń standardowych, co sprawia że można mieć wątpliwości co do prawidłowości i dokładności wykonanych oznaczeń. Nurtuje mnie również pytanie, czy w przypadku przedstawienia procentowego udziału efektów hamujących dla poszczególnych kinaz tyrozynowych (Tabela 12) z rozmysłem nie podano wyników badań biologicznych dla niektórych otrzymanych związków i podyktowane to było całkowitym brakiem ich aktywności, czy też nie wszystkie otrzymane związki poddano tym badaniom. Intryguje mnie również, dlaczego nie wytypowano związku 1c do wyznaczenia parametru IC_{50} , skoro wyniki uzyskane dla tego związku przedstawione w Tabeli 12 były równie dobre jak w przypadku związku 6b, dla którego parametr IC_{50} wyznaczano.

Bazując na uzyskanych wynikach, autor starał się przeanalizować i omówić zależności obserwowanej aktywności biologicznej od struktury badanych związków i poświęcił tym rozważaniom dość sporo uwagi, podpierając się przy tym również wynikami dokowania wybranych związków do czterech kinaz.

Oprócz zdolności otrzymanych związków do hamowania aktywności określonych kinaz, autor zbadał również ich aktywność przeciwnowotworową w warunkach *in vitro* wobec siedmiu linii komórek nowotworowych oraz zbadał ich cytotoksyczność względem komórek normalnych fibroblastów skóry NHDF. Wśród kilku najaktywniejszych związków znalazły się zarówno 4-*N*-podstawione chinazoliny, 4-*S*-podstawione chinazoliny jak i benzenosulfoniany pochodne 2–styrylochinazoliny. Niestety, większość tych związków okazała się być również toksyczna względem komórek zdrowych. Na uwagę zasługuje jednak pochodna 2a, która jest aktywna wobec



wszystkich testowanych linii nowotworowych przy jednoczesnej umiarkowanej toksyczności wobec komórek zdrowych. Szczególnie w przypadku komórek białaczki i raka trzustki indeks selektywności dla tego związku jest zadowalający.

Część eksperymentalna napisana jest bardzo zwięźle, co momentami można uznać za wadę w przypadku, gdyby ktoś chciał powtórzyć jakąś procedurę. Przykładowo na str. 89 autor pisze o "zachowaniu stężeniu substratów 0,2", nie podaje jednak o jakie stężenie chodzi. Dopiero porównując procedurę z jej omówieniem w części badawczej można zauważyć, że chodzi o stężenie molowe. Jeśli chodzi o metody spektroskopowe wykorzystane do scharakteryzowania nowych związków to brakuje tutaj konsekwencji. Dla niektórych związków wykonano jedynie widma ^1H NMR, dla innych widma ^1H i ^{13}C NMR, dla jeszcze innych do danym uzyskanych z widm NMR dołączono dane HRMS. W części eksperymentalnej zapomniano opisać związek **2a**, który wszakże musiał być otrzymany, skoro potem z niego otrzymano pochodne **2b** i **2c**. Podobnie w części eksperymentalnej pominięto związek **5c**, dla którego wyniki badań biologicznych ujęto w **Tabeli 12** oraz w **Tabeli 16**. Zaintrygował mnie również skrót „appt” wielokrotnie użyty do określenia multipletowości sygnałów na widmach ^1H NMR. Jest to co prawda skrót uznany przy opisie widm NMR lecz nie stosowany zbyt często. Przy tej okazji nasuwa się myśl, że wskazane byłoby umieszczenie na początku pracy spisu stosowanych w niej skrótów.

Podsumowując należy stwierdzić, że mgr Jacek Mularski osiągnął założony przez siebie cel i po zaprojektowaniu w racjonalny sposób określonych struktur związków opartych na szkielecie 2-styrylochinazoliny, w wyniku przeprowadzonych syntez uzyskał te związki i potwierdził ich strukturę na podstawie analizy danych spektroskopowych. Przeprowadzony screening właściwości biologicznych wykazał, że uzyskano dwa typy związków, których właściwości można podzielić ze względu na wywoływany przez nie efekt. Jedna grupa obejmuje związki o dobrych właściwościach przeciwnowotworowych wykazujących jednocześnie mniejszą zdolność do hamowania aktywności testowanych kinaz tyrozynowych. W drugiej grupie znajdują się związki będące efektywnymi inhibitorami kinaz tyrozynowych lecz o niższej aktywności cytotoksycznej względem testowanych linii nowotworowych. Szczególnie zasługują na podkreślenie niskie wartości parametru IC_{50} uzyskane dla niektórych związków podczas oznaczania ich aktywności przeciwnowotworowej.

Mimo wymienionych uprzednio uwag, pracę mgr Jacka Mularskiego oceniam pozytywnie. Uzyskał on wiele wartościowych wyników wykazując się przy tym umiejętnościami zarówno jeśli chodzi o warsztat syntetyczny, jak i umiejętnością przeprowadzenia oraz interpretacji wyników badań biologicznych. Uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszelkie warunki ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie mgr Jacka Mularskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gabriela Pastuch

