

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Jacka Mularskiego pt. „Projektowanie i synteza nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych”, wykonanej w Zakładzie Chemii Organicznej Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Terapia chorób nowotworowych, pomimo wprowadzania na rynek nowych leków, wciąż pozostaje jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Szczególnym zagrożeniem są nowotwory złośliwe, które cechują się niskim zróżnicowaniem komórek, szybkim wzrostem oraz tendencją do rozprzestrzeniania się tj. tworzenia przerzutów. Są one drugą przyczyną zgonów w Polsce, powodując śmierć około 100 000 osób rocznie. Według danych epidemiologicznych co roku odnotowuje się około 150 000 nowych zachorowań, a prognozy wskazują, że liczba ta znacząco wzrośnie. Skomplikowana patogeniza chorób nowotworowych często wiąże się z brakiem skuteczności w leczeniu. Odpowiedzią na ten problem jest m.in. wprowadzenie do lecznictwa ligandów wielocelowych. W ostatnich latach powszechnie uznaje się, że równoległa modulacja wielu celów biologicznych może być korzystna w leczeniu chorób o złożonej etiologii. Projektowanie ligandów wielocelowych jest często trudnym zadaniem dla chemików leku, ponieważ wiąże się z koniecznością odpowiedniego zrównoważenia powinowactwa do 2 lub więcej celów przy jednoczesnym uzyskaniu właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych, które umożliwią podanie leku odpowiednią drogą oraz zapewnią właściwą dystrybucję w organizmie. Recenzowana praca wpisuje się w strategię poszukiwania związków wielofunkcyjnych i stanowi odpowiedź na wyzwania współczesnej chemii leków. Autor rozpoczął poszukiwanie nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych, a jego zmagania z tym tematem zostały przedstawione na 113 stronach rozprawy doktorskiej. Praca ta ma nietypową konstrukcję. Rozpoczyna się od przedstawienia celu, następnie doktorant przedstawia zagadnienia, związane z racjonalnym projektowaniem leków oraz kinazami jako istotnymi elementami szlaków sygnałowych, które stanowią wstęp do badań własnych i części eksperymentalnej. Ciekawym elementem jest omówienie dalszych planów badawczych, które sugeruje, iż oceniana praca jest częścią obszernego projektu badawczego. Całość zamyka spis literatury, obejmujący aż 231 pozycji głównie z lat 2000 – 2019.

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Chemii Farmaceutycznej

Zakład Fizykochemicznej
Analizy Leku

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 54 50

faks +48 12 620 54 50

Celem pracy była synteza nowych pochodnych styrylochinazoliny jako inhibitorów kinaz tyrozynowych o szerokim profilu aktywności. Pan mgr inż. Mularski zaprojektował 3 grupy związków, w których fragment chinazoliny połączono poprzez łącznik winylowy z dodatkowym układem aromatycznym. Pierwsza seria obejmowała pochodne chinazonu i stanowiła związki macierzyste dla związków drugiej i trzeciej serii tj. pochodnych 4-aminochinazoliny i pochodnych 4-sulfanylochinazoliny. W dalszych częściach pracy dowiadujemy się również o istnieniu dodatkowej serii związków – estrów arylosulfonowych, które stanowiły ogniwo pośrednie w ścieżce syntezy. Dla związków z trzech pierwszych serii oraz przedstawicieli czwartej grupy zaplanowano badania aktywności względem wybranych kinaz tyrozynowych, dzięki współpracy z Instytutem Fizyki Uniwersytetu Śląskiego. Wybór styrylochinazoliny jako odpowiedniego rdzenia do syntezy związków biologicznie aktywnych nie był przypadkowy. Wynikał on z wcześniejszych badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Organicznej oraz dogłębnej analizy literatury. W zespole badawczym, do którego należy autor rozprawy, otrzymano wiele pochodnych 2-(*E*)-styrylochinazonu, które wykazały właściwości antyproliferacyjne na wybranych liniach komórkowych. Z kolei szczegółowy przegląd literatury dostarczył pomysłów na dalszą funkcjonalizację podstawowego szkieletu. Przykładowo, reaktywator białka p53 o symbolu CP-31398 oraz inhibitor kinazy Src oznaczony jako AP24283 przyczyniły się do zaprojektowania 4-aminopochodnych, a aksytynib (zarejestrowany inhibitor kinazy tyrozynowej receptora czynnika wzrostu śródbłonna naczyń) był podstawą do otrzymania 4-sulfanylochinazolin.

Doktorant w ramach prowadzonych badań zaplanował wieloetapową ścieżkę syntezy zaprojektowanych związków. Wychodząc z kwasu 2-aminobenzoowego lub jego chloropochodnej otrzymał dwa ważne półprodukty tj. 2-metylo-4(3*H*)-chinazon oraz 7-chloro-2-metylo-4(3*H*)-chinazon, które posłużyły w reakcji kondensacji z odpowiednimi aldehydami aromatycznymi do syntezy 2-(*E*)-styrylochinazonów 1-17 i 19-21. Autor optymalizując warunki kondensacji stwierdził, że najlepiej przebiega ona w bezwodnym kwasie octowym lub z udziałem promieniowania mikrofalowego. Do grupy pochodnych 2-(*E*)-styrylochinazonu został zaliczony także związek 18, który właściwie jest produktem funkcjonalizacji z udziałem chlorku arylosulfonowego, przy czym reakcja przebiegała z bardziej reaktywną grupą fenolową w pozycji 4 podstawnika styrylowego, a nie w pozycji 4 układu chinazonu. Dalszy etap syntezy obejmował przekształcenie 2-(*E*)-styrylochinazonów w estry kwasów arylosulfonowych 1a-10a, które następnie poddano reakcji z aminami oraz tiolami, aby uzyskać związki finalne z drugiej (1b-16b) i trzeciej grupy (1c-14c). Większość uzyskanych związków została scharakteryzowana za pomocą widm ¹H-NMR, ¹³C-NMR oraz widm masowych. Dla związków 2a i 5c nie podano żadnej charakterystyki, natomiast dla niektórych pochodnych nie wykonano analiz ¹³C-NMR (np. 17, 19, 20, 6a, 1c, 4c, 8c) lub MS (np. 18, 19, 20, 1a, 3a, 6a-10a). W przypadku związków 13b-16b oraz 1c-14c nie podano wydajności reakcji.

Podsumowując etap syntezy, należy podkreślić dużą ilość otrzymanych przez doktoranta związków. Łącznie było to **61 pochodnych chinazoliny**, w tym 21 chinazonów, 10 estrów arylosulfonowych, 16 pochodnych 4-aminochinazoliny i 14 pochodnych 4-sulfanylochinazoliny.

Dzięki podjętej współpracy możliwe było oznaczenie aktywności *in vitro* dla 56 substancji. W badaniach biologicznych jako cele molekularne doktorant wybrał grupę 8 kinaz tyrozynowych. Były to kolejno: kinaza ABL1, BRK, BTK, CSK, Fyn A, Lck, Lyn B i Src. W pierwszym etapie wykonano screening, aby wyznaczyć procentowe zahamowanie aktywności poszczególnych enzymów przy stałym stężeniu badanych związków, jednak wartość tego stężenia nie została podana w pracy. Na podstawie wartości procentów hamowania kinaz autor podzielił otrzymane przez siebie związki na trzy grupy:

- 1) związki nieaktywne lub wykazujące bardzo niską aktywność np. **5**;
- 2) związki hamujące w 40-60% maksymalnie dwie kinazy np. **1**;
- 3) związki hamujące większą ilość kinaz, przy czym aktywność przynajmniej względem jednej z nich przekracza 60% np. **6**.

Dla wybranych związków (**4**, **6b**, **9b**, **10b**) zostały wyznaczone wartości IC_{50} , które porównano z wartością dla dasatynibu – inhibitora kinaz o szerokim spektrum działania. Pan mgr inż. Mularski omawiając wyniki analizy zależności struktura – aktywność, wykorzystał rezultaty wykonanych przez siebie badań modelowania cząsteczkowego. Z całej puli związków wyróżnił dwa: **6b** i **1c**, które charakteryzowały się wysoką aktywnością względem wielu kinaz. Były to odpowiednio: pochodna 2-styrylo-4-aminochinazoliny z podstawnikiem metoksyowym w pozycji *orto* fragmentu styrylowego i układem benzodioksolu przy ugrupowaniu aminowym oraz jej analog z atomem siarki zamiast grupy aminowej i podstawnikiem *o*-chlorofenylovym zamiast benzodioksolu. Zostały przedstawione tryby wiązania tych związków z kinazą ABL1. Z kolei wpływ atomu chloru w układzie chinazoliny na aktywność względem ABL1, Src, Fyn i Lck doktorant przedstawił na rysunku, wskazując, iż za różnice w sile hamowania poszczególnych kinaz odpowiada ułożenie inhibitora w miejscu wiązania oraz oddziaływania tworzone przez atom chlorowca.

W kolejnym etapie przeprowadzono badania związków na wybranych liniach komórkowych. Siedem linii stanowiły komórki nowotworów m.in. komórki ludzkiej białaczki szpikowej K562, a jedna linia była linią prawidłowych fibroblastów skóry. Efekt antyproliferacyjny wyrażano w postaci wartości IC_{50} , wyznaczonej w teście MTS. Spośród przebadanych związków najsilniejsze działanie wykazał związek **16** (z serii chinazonów), związek **2a** (z grupy estrów arylosulfonowych) i związek **16b** (z serii 4-aminochinazolin). Pochodne 4-sulfanylochinazoliny cechowały się niską aktywnością. Porównując aktywność związków względem przebadanych kinaz oraz działanie antyproliferacyjne, doktorant stwierdził, iż substancje działające silnie na liniach komórkowych cechowały się słabszym hamowaniem wybranych kinaz, zaś silniejsze inhibitory enzymatyczne wykazały mniejszą aktywność na liniach komórkowych.

We wnioskach autor podkreśla konieczność dalszego prowadzenia badań, obejmujących syntezę nowych pochodnych oraz poszerzenie panelu testów biologicznych.

Funkcja recenzenta zobowiązuje mnie do wskazania pewnych usterek w pracy. Są to głównie uwagi natury edycyjnej i nie zmniejszają one wartości merytorycznej pracy:

- autor nie zachowuje konsekwencji w spolszczaniu angielskich nazw np. wymiennie używa nazw saracatinib i saracatinib, chociaż poprawną formą jest saracatinib,
- w kilku miejscach stosuje kropki zamiast przecinków w ułamkach dziesiętnych (np. tabela 6, tabela 11),
- na str. 69 wzór imatynibu nie mieści się w komórce tabeli,
- pojawiają się drobne usterki w słowach i zdaniach (literówki, powtórzenia, brak orzeczenia) np. na str.7 „Związek z podstawnikiem -SCH₃ to inhibitor kinazy p38, który tworzy w stanie związanym tworzy układ dwupłaszczyznowy”,
- w tekście pojawiają się fragmenty w języku angielskim, które powinny być przetłumaczone np. „structure” w tabeli 12; w przepisach dotyczących syntezy „Związek 1 otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 43 % (651 mg), ttop 235 – 243 °C, using 610 mg of 2-hydroxybenzaldehyde.” lub „Związek 11b otrzymano w postaci a light - green solid in 67% yield”,
- na str.4. zamiast określenia „przestrzeń nadbłonowa” lepiej użyć terminu „zewnątrzkomórkowa”,
- na str.6 – lepiej używać określenia „struktura krystaliczna” zamiast „struktura krystalograficzna”,
- na str. 13 – autor napisał „Linia falowaną zaznaczono wiązanie względem którego określana jest chiralność”, podczas gdy na rysunku nie znajduje się linia falowana,
- na str. 15 – zamiast O₂⁻ powinno być O²⁻,
- na str. 21 – EGFR to receptor naskórkowego czynnika wzrostu, a nie „naskórkowy receptor czynnika wzrostu”,
- nagłówek rysunku 13 „Porównanie właściwości biologicznych acetalu o różnym rozmiarze pierścienia” – acetalem jest tylko związek z pierścieniem pięciocłonowym,
- rysunek 14 jest przed rysunkiem 13; w numeracji rysunków zostały pominięte numery 15,17, 27 i 28, w numeracji tabel został pominięty numer 3,
- tabela 4 zgodnie z nagłówkiem powinna zawierać inhibitory kinaz tyrozynowych, natomiast znalazł się tam np. abemacyklib i ewerolimus, których celami są kinazy serynowo-treoninowe, odpowiednio CDK4/CDK6 i mTOR,
- na str. 35 w zdaniu „Pierwszą wydzieloną i szczegółowo scharakteryzowaną kinazą była fosforylaza (phosphorylase kinase – PhK)...” zamiast fosforylaza powinno być kinaza fosforylaza,

- na str. 63 w równaniu 2 - K_m (stała Michaelisa) jest to stężenie substratu, a nie inhibitora, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej osiąga połowę wartości szybkości maksymalnej,
- dodatkową korzyścią byłoby włączenie do pracy jej streszczenia oraz krótkiego opisu metod *in silico* i *in vitro*, stosowanych w badaniach.

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Jacka Mularskiego podejmuje ważne zagadnienia z punktu widzenia terapii chorób nowotworowych. Autor zrealizował postawiony cel pracy, otrzymując szereg oryginalnych pochodnych 2-(*E*)-styrylochinazoliny o potwierdzonej aktywności hamującej względem kinaz tyrozynowych, takich jak ABL1 czy kinazy z rodziny Src. W mojej ocenie wyniki uzyskane przez doktoranta mają bardzo dużą wartość naukową, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym. Potwierdzeniem tej wartości jest publikacja, na temat części otrzymanych związków, w czasopiśmie *European Journal of Medicinal Chemistry* o wysokim współczynniku oddziaływania IF = 4,816, w której Pan mgr inż. Mularski jest pierwszym autorem. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki) i wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Jacka Mularskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku
Marek Bajda
dr hab. Marek Bajda
Adiunkt

Kraków, 24.07.2019

dr hab. Marek Bajda