



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Chemii Organicznej i Technologii Leków

Dr hab. Marcin Mączyński, profesor Uczelni

Wrocław 25.04.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. Joanny Warguły

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**pt. „SYNTEZA NOWYCH INDAZOLOPOCHODNYCH O DZIAŁANIU
PRZECIWNOWOTWOROWYM I PRZECIWBAKTERYJNYM”**

Poszukiwanie związków biologicznie czynnych, w różnych grupach chemicznych, jest tematem cały czas aktualnym. W ciągu ostatnich lat zanotowano ogromny postęp w leczeniu wielu chorób, ale pomimo tego choroby nowotworowe wciąż charakteryzują się dużą śmiertelnością. Oprócz samego poszukiwania nowych związków istotnym problemem jest brak wiedzy na temat szczegółowych mechanizmów działania leków. Z kolei problem lekooporności na stosowane leki jest coraz bardziej narastający, a powiększająca się liczba opornych patogenów stanowi poważny problem kliniczny, dlatego podjęta przez Doktorantkę tematyka jest z całą pewnością zasadna.

W tym kontekście podjęta w recenzowanej rozprawie doktorskiej tematyka dotycząca:

1. projektowania z wykorzystaniem technik *in silico* oraz wybranych programów komputerowych, stosowanych do predykcji właściwości biologicznych i fizykochemicznych związków organicznych,
 2. syntezy czterech serii skondensowanych pirazolopochodnych,
 3. oceny aktywności cytotoksycznej a także badania aktywności przeciwbakteryjnej
- dobrze wpisuje się w obecne trendy poszukiwań leków na drodze syntezy organicznej. Bezpośrednim celem pracy Pani mgr Joanny Warguły była kilkuetapowa synteza wybranych, nowych pochodnych indazolu i skondensowanego pirazolu w oparciu o wyniki chemii obliczeniowej oraz potwierdzenie aktywności i poprawności wyboru związków do syntezy

poprzez wykonanie badań farmakologicznych. Badania Doktorantki dostarczyły dodatkowych informacji na temat aktywności przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej pochodnych indazolu.

Praca posiada ogólnie przyjęty układ dla tego typu dysertacji, obejmuje 208 stron, na których w tekście ulokowane są także rysunki w liczbie 59, tabele w liczbie 15 oraz schematy w liczbie 6. Merytorycznie praca poparta jest aż 301 pozycjami piśmiennictwa. Piśmiennictwo jest prawidłowo dobrane, co potwierdza bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki w omawianym temacie. Przegląd ten jest swojego rodzaju zbiorem opisującym aktywność pochodnych indazolu i skondensowanych pochodnych pirazolu, pirydyny, diazyn, triazyn z lat 2010-2020. Dodatkowo Doktorantka na końcu monografii przedstawiła informacje dotyczące Jej osoby obejmujące wykształcenie, doświadczenie naukowe i zawodowe oraz dorobek naukowy.

Podjęta w przedstawionej rozprawie problematyka badawcza, jak wspomniałem wcześniej, jest trafna i aktualna. We wstępie Doktorantka opisała aktywność biologiczną wybranych skondensowanych pochodnych pirazolu: indazoli, pirazolopirydyn, pirazolopirydazyn, pirazolopirymidyn, pirazolopirazyn i pirazolotriazyn. Poparte to zostało licznymi doniesieniami literaturowymi. W ocenie Recenzenta ten fragment jest zbyt rozbudowany o część biologiczną, analizując badania syntetyczne prowadzone przez Doktorantkę, który dotyczy syntezy tylko pochodnych indazolu i skondensowanego pirazolu, a nie innych, wymienionych wyżej, skondensowanych pochodnych pirazolu. W opinii Recenzenta można było ograniczyć część biologiczną dotyczącą innych pirazolopochodnych i zamieścić tutaj dodatkowo przegląd literatury dotyczący metod syntezy pochodnych indazolu, co z pewnością wzbogaciłoby ten fragment pracy.

W rozdziale „Cel pracy” Pani mgr farm. Joanna Warguła krótko opisała celowość podjęcia tematu badań, a także przedstawiła zasadność wykorzystania technik *in silico* oraz wybranych programów komputerowych do syntezy czterech serii skondensowanych pirazolopochodnych zakwalifikowanych jako pochodne sulfonowe, nitrylowe, morfolinowe i metyloanilinowe, a także badanie ich aktywności przeciwnowotworowej, przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej. Zaplanowana synteza składała się z czterech etapów:

1. reakcji syntezy pochodnej nitrowej odpowiedniego prekursora karboanionu,
2. przeprowadzenie reakcji VNS (reakcji zastępczej substytucji nukleofilowej atomu wodoru),
3. reakcji redukcji grupy nitrowej,
4. reakcji cyklizacji pochodnej aminowej do odpowiedniej pochodnej indazolowej.

Doktorantka nawiązała też do badań prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu na temat syntezy związków azaheterocyklicznych.

W rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja” Doktorantka najpierw omówiła wykorzystanie narzędzi chemii obliczeniowej celem wytypowania indazolopochodnych do syntezy i dalszej analizy *in vitro* ich aktywności biologicznych, następnie przedstawiła syntezę pochodnych, a na końcu zaprezentowała wyniki badań aktywności biologicznej. Zaprojektowanie związków posłużyło także do wstępnej analizy struktura-aktywność. Doktorantka użyła następujących programów komputerowych:

- *PASS Inet*. (predykcja prawdopodobieństwa potencjalnej aktywności biologicznej). Otrzymane wyniki Doktorantka przeanalizowała i stwierdziła, że *pochodne sulfonowe serii a* mogą charakteryzować się aktywnością anksjolityczną oraz w zakresie poprawy nastroju i funkcji poznawczych, a *pochodne nitrylowe, morfolinowe, metyloanilinowe serii b-d* powinny wykazywać aktywność przeciwnowotworową;

- *ALOGSPS* (predykcja potencjalnych właściwości fizykochemicznych, parametrów logP (informacja o lipofilowości związku) i logS (informacja o rozpuszczalności związku w wodzie)). Uzyskane wyniki wykazały szereg zależności, a najważniejszym wydaje się problem rozpuszczalności w wodzie syntezowanych indazoli, co może wpływać na wyniki aktywności biologicznej *in vitro*;

- *OSIRIS* (predykcja potencjalnych właściwości biologicznych). Otrzymane wyniki Doktorantka przeanalizowała i wysunęła poprawne wnioski potwierdzające cel Jej badań;

- *antiBac-pred* (predykcja potencjalnych właściwości przeciwbakteryjnych). Wcześniejsze badania Doktorantki nie wykazały na wystąpienie takiej aktywności biologicznej w przypadku pochodnych indazolowych. Jednak rosnąca antybiotykooporność patogenów wymusza konieczność poszukiwania nowych leków, a w przypadku obecności podstawnika sulfonowego w związkach *serii a*, czy sulfonamidowego w *związkach serii c i d*, w pełni uzasadnia zaproponowany przez Doktorantkę szlak badawczy. Analiza wyników pokazała, że największy potencjał przeciwbakteryjny mają pochodne nitrylowe i morfolinowe (*seria b i c*).

Po przeprowadzeniu badań obliczeniowych Doktorantka przeprowadziła syntezę wytypowanych związków: prekursorów karboanionów (związki 1-4), nitrozwiązków (związki 5-15), tosyłowych pochodnych indazolu (związki 47-55), tosyłowych pochodnych skondensowanego pirazolu (związki 56-60), nitrylowych pochodnych indazolu (związki 71-75), morfolinosulfonowych pochodnych indazolu (związki 86-87), morfolinosulfonowych pochodnych skondensowanego pirazolu (związki 88-89), sulfonamidowych pochodnych

indazolu (związki 98-100), sulfonamidowej pochodnej skondensowanego pirazolu (związek 100).

Finalnie spośród wielu związków otrzymanych przez Doktorantkę tylko 16 było nowymi, których strukturę Doktorantka poprawnie zinterpretowała różnymi metodami spektroskopowymi.

Syntezę związków Doktorantka wykonywała według znanych metod określonych w publikacjach naukowych, przepisach preparatywnych, którą twórczo modyfikowała celem optymalizacji warunków reakcji, a także według zaproponowanych nowych metod syntezy. Zaproponowanie nowej metody syntezy, optymalizacja jej warunków, a także proces oczyszczania związków jest procesem bardzo czasochłonnym. Pani mgr farm. Joanna Warguła poradziła sobie z tym bardzo dobrze, patrząc na przedstawione opisy analizy spektroskopowej otrzymanych związków. Sama Doktorantka zwraca w pracy uwagę na niemożliwość ujednoczenia warunków reakcji dla syntezy wszystkich pochodnych. Autorka dla wielu reakcji przeprowadzała indywidualną optymalizację warunków w celu poprawy wydajności reakcji i czystości związków. Kolejnym krokiem badawczym, który mgr farm. Joanna Warguła omówiła było przedstawienie wyników aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej 14 zsyntezowanych indazolopochodnych. Związki zostały przebadane wobec szczepów należących do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Analiza wyników pokazała nieselektywną i porównywalną aktywność wobec powyższych rodzajów bakterii. Najaktywniejszą wobec *Staphylococcus aureus* była *pochodna pirazolu 49*, ponieważ jej strefa zahamowania była porównywalna do strefy hamowania przez lek referencyjny - Amikacynę. Te same 14 pochodnych indazolu Doktorantka przebadła w kierunku aktywności przeciwgrzybiczej wobec *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus*, lekiem referencyjnym był Itrakonazol. Związki wykazały znacznie mniejszą aktywność przeciwgrzybiczą niż przeciwbakteryjną oraz nieselektywną wobec grzybów rodziny *Saccharomycetes* i *Trichocomaceae*.

Następnie wybrane *indazolopochodne serii a* Doktorantka oceniła pod kątem aktywności cytotoksycznej w teście żywotności MTS zgodnie z protokołem PROMEGA wobec komórek raka jelita grubego HCT116 i komórek białaczki K562. Uzyskane wyniki wykazały, że niektóre związki mają silne działanie cytotoksyczne. Analiza *in vitro* wykazała, że *indazolopochodne 50 (3,5-dimetylopirazolowa)*, *54 (indolowa)* i *55 (karbazolowa)* wykazały najlepszą aktywność przeciwnowotworową w stosunku do obydwu zastosowanych linii, co jak zauważyła Doktorantka, jest zgodne z oszacowanym parametrem IC₅₀. Z kolei kolejne badania wykazały, że *związek 55 (karbazol)* wykazał najlepsze właściwości proapoptotyczne dla obu

zastosowanych linii komórkowych. Wadą *związku 55* jest bardzo słaba rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych i praktycznie nierozpuszczalność w wodzie. Dodatkowo wykonano dokowanie do onkogennej kinazy receptora tropomiozyny A (TRKA) dla *związków 50, 54 i 55*. Tylko dla *pochodnych 50 i 54* zaobserwowano słabe wiązanie wodorowe pomiędzy azotem pirolowym pierścienia indazolu a tlenem kwasu glutaminowego 590. Brak silnych oddziaływań w kieszeni receptorowej TRKA może wpływać na stosunkowo niską aktywność tych związków wobec badanych linii. Doktorantka słusznie stwierdziła, że *indazolopochodne 50 i 54* mogą stanowić związki wiodące w poszukiwaniu nowych inhibitorów wzrostu komórek nowotworowych i w związku z tym celowe wydają się badania prowadzące do modyfikacji strukturalnych *pochodnych 50 i 54*.

„Część doświadczalna” pracy obejmuje metodologię badań syntetycznych oraz aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej, cytotoksycznej. Doktorantka szczegółowo opisała syntezę wszystkich otrzymanych przez Nią związków. Dla związków znanych Autorka przedstawiła wyznaczone temperatury topnienia i porównała je z danymi literaturowymi, a także zamieściła informację, że otrzymane przez Nią widma ^1H NMR tych związków są zgodne z danymi literaturowymi. Dla nowych związków Doktorantka podała analizę spektroskopową ^1H NMR, MS, analizę elementarną, a dla niektórych dodatkowo analizę widm ^{13}C NMR. Według Recenzenta analiza widm przedstawiona w niniejszej pracy w pełni potwierdza strukturę chemiczną i czystość opisywanych związków. Szczegółowa analiza widm świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym mgr farm. Joanny Warguły.

W części „Wnioski” Doktorantka przedstawiła sześć szczegółowych wniosków ze swoich badań. Wszystkie potwierdzają założony przez Doktorantkę cel pracy i pełną realizację zamierzonych badań. Analiza ich treści potwierdza dużą wiedzę mgr farm. Joanny Warguły w obszarze chemii medycznej. W opinii Recenzenta miała na to wpływ szeroka współpraca naukowa Doktorantki oraz odbyte staże naukowe.

W ocenie Recenzenta uzyskane rezultaty badań stanowią istotne opracowanie naukowe w dziedzinie chemii medycznej i wnoszą wkład w rozwój badań nad poszukiwaniem nowych pochodnych indazolu o określonej aktywności biologicznej. Do obowiązków recenzenta należy wskazanie zauważonych błędów formalnych, typograficznych i redakcyjnych popełnionych w trakcie przygotowywania manuskryptu rozprawy. Uwagi dotyczą następujących zagadnień:

- w całej pracy są drobne błędy edytorskie, które powinny być poprawione;
- str. 12, określenie „dopiero rozwijanych pochodnych” jest mało zrozumiałe;
- str. 78, brak odnośnika literaturowego po serii informacji;
- str. 80, sformułowanie „praca powinna dostarczyć” powinno brzmieć „praca dostarczyła”;

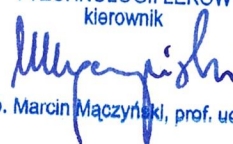
- str. 81, sformułowanie „finalne indazolopochodne można by zaliczyć do” powinno brzmieć „...indazolopochodne zaliczamy do” ponieważ tak jest przyjęte;
- str. 86 i inne, raz jest pogrubiona czcionka w określeniach „serii a czy b czy c”, a raz nie, powinno to być ujednolicone;
- str. 87, słowo „cząsteczki” powinno brzmieć „cząsteczki”, poza tym określenie „...wprowadzenie dodatkowej grupy metylowej do cząsteczki” powinno zawierać dokładną informację o miejscu wprowadzenia dodatkowej grupy czy podstawnika;
- str. 87, informacja „...wpływu obecności dodatkowego atomu azotu w cząsteczce” powinna zawierać jakiego typu jest to atom azotu;
- str. 93, sformułowanie „ogromna większość potencjalnych leków charakteryzuje się parametrem logS większym od -4” powinna być opatrzona odnośnikiem literaturowym;
- str. 95, sformułowanie „...roli pierścieni sześciocyklicznych” jest niejasne, informacja nie jest poparta odnośnikiem literaturowym;
- str. 96, w tekście jest informacja o leku Meropenem, którego struktura powinna być na rys. 4.6, niestety schemat tego wzoru nie zawiera;
- str. 98, wyrażenie „nitrofenylo-hydrazyną” powinno być zapisane bez łącznika nitrofenylohydrazyną;
- str. 98, wyrażenie „...ulegają tej substytucji” jest skrótem myślowym, powinno być „...ulegają tej reakcji substytucji”;
- str. 102, schemat 3 i inne, nad strzałką jest „HNO₂” a w opisie na str. 103 i innych jest informacja o użyciu „kwasu octowego i azotynu izopentyłu”;
- str. 103 i inne, sformułowanie „pochodna chlorowa”, a powinno być pochodna chlorowcowa;
- str. 107, sformułowanie „brom” a powinno być bromu;
- str. 122 i inne, sformułowanie „proapoptopowe” powinno być proapoptotyczne;
- str. 129 i inne, sformułowanie „sulfonu chlorometylo-p-toluilowego” pozycja *para* powinna być zapisana kursywą;
- str. 129 i inne, sformułowanie „odparowano rozpuszczalnik” powinno brzmieć oddestylowano rozpuszczalnik;

Pragnę jednak podkreślić, że przedstawione uwagi mają głównie charakter techniczny oraz redakcyjny, natomiast w żadnym stopniu nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Mając na uwadze oryginalność oraz wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Joanny Warguły pt. „Synteza nowych indazolopochodnych o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwbakteryjnym” stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane dysertacjom

doktorskim określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki jak również w §6 ust. 3 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789). Na tej podstawie wnoszę do Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr farm. Joanny Warguły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ
I TECHNOLOGII LEKÓW
kierownik



dr hab. Marcin Mącznyński, prof. uczelni