

POLSKA AKADEMIA NAUK



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 0 61 852 85 03, sekretariat 0 61 852 89 19
fax: 0 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327
NIP 777-00-02-062

Dr hab. Marcin K. Chmielewski, prof. nadzw. IBCh PAN

Poznań, 20.11.2024

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

Ul. Noskowskiego 12/14

61-704 Poznań

RECENZJA

Pracy doktorskiej mgr Przemysława Biegańskiego

pt. "Metaloorganiczne pochodne typu „click” ertotynibu oraz AZT – synteza i aktywność biologiczna"

Przedstawiona do recenzji dysertacja Pana mgr Przemysława Biegańskiego została wykonana w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Konrada Kowalskiego. Rozprawa doktorska została zaprezentowana jako monotematyczny cykl publikacji wraz z komentarzem i dotyczy opracowania syntezy metaloorganicznych pochodnych ertotynibu (leku przeciwnowotworowego) oraz 3'-azydo-3'-deoksytymidyny (leku przeciwwirusowego) w celu zbadania ich aktywności przeciwnowotworowej oraz jako potencjalnego inhibitora wejścia wirusów SARS-CoV-1/2 do komórek ludzkich. Cykl publikacji składa się z dwóch opublikowanych artykułów w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Bioorganic Chemistry* i *Inorganic Chemistry*) oraz jednego manuskryptu w trakcie recenzji (*Organometallics*). Oprócz tych opracowań Pan Biegański jest współautorem jeszcze jednej publikacji (*RSC Chemical Biology*) tematycznie nie związanej z rozprawą doktorską. W opinii recenzenta dwie publikacje to bezwzględne minimum opublikowanego cyklu monotematycznego, natomiast trzeciej publikacji nie można uwzględnić gdyż nie została opublikowana (nie nadano jej numeru DOI) w momencie przesłania pracy do recenzji. Na korzyść Doktorant przemawia fakt, że jest on pierwszym autorem opublikowanych artykułów,

M.Ch.

które zostały opublikowane w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej. Dodatkowo współautorzy wskazali na kluczowe zaangażowanie Doktoranta w ich przygotowanie.

Na obecnym etapie rozwoju chemii syntetycznej, synteza metaloorganicznych pochodnych stanowi ważne i coraz częściej stosowane podejście. Dzieje się tak dlatego, że związki metaloorganiczne oferują często lepsze i unikalne właściwości. Jednakże ta droga syntezy nie należy do łatwych, ponieważ łączy w sobie elementy chemii organicznej i nieorganicznej, biochemii i katalizy oraz wymaga od adepta szerokiej wiedzy z tych właśnie dziedzin. Doktorant zatem wybrał temat niełatwy, o zdecydowanym charakterze interdyscyplinarnym ale jednocześnie bardzo interesujący. Celem szczegółowym przedstawionej do oceny rozprawy było wykorzystanie reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji katalizowanej miedzią lub rutenem (zwanej potocznie „*click chemistry*”) do syntezy pochodnych erlotynibu (leku przeciwnowotworowego) oraz 3'-azydo-3'-deoksytymidyna (AZT) (inhibitora odwrotnej transkryptazy, stosowanych w terapiach przeciwko wirusowi HIV). W dalszych planach było zbadanie otrzymanych pochodnych pod kątem ich aktywności przeciwnowotworowej oraz jako tzw. inhibitorów wejścia wirusów SARS-CoV-1/2 do komórek ludzkich. Idea przyświecająca wyborowi tych modyfikacji opierała się na pomysłе wprowadzenia drugiego mechanizmu aktywności przeciwnowotworowej (niezależnego od mutacji w genie EGFR) polegającym na generowaniu aktywnego tlenu i wywołaniu stresu oksydacyjnego. Dla wyjaśnienia występowanie mutacja w genie EGFR powoduje iż dotychczas stosowane leki stają się nieskuteczne. Wystąpienie stresu oksydacyjnego czyli nadmierny poziom rodników ma destrukcyjny wpływ na żywotność komórek. Aktywność przeciwnowotworową dla syntetyzowanych przez siebie związków Doktorant planował wykazać na komórkach raka płuc. Choroby, która jest bardzo groźna i często występuje w naszym społeczeństwie.

Rozprawa doktorska została zamieszczona na 162 stronach i zawiera typowe dla tego typu opracowań części takie jak: wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie literaturowe, hipotezę badawczą, omówienie wyników w formie komentarza, podsumowanie i wnioski, część eksperymentalną, bibliografię (która zawiera 302 pozycje) oraz życiorys i działalność naukową Doktoranta wraz ze spisem publikacji naukowych wchodzących w skład rozprawy. Do pracy dołączono również oświadczenia współautorów o roli Pana Biegańskiego w przygotowaniu opublikowanych publikacji. Praca Doktorska została przygotowana z najwyższą starannością, o czym świadczy wysoka estetyka prezentacji oraz dbałość o detale. Na szczególne wyróżnienie zasługuje interdyscyplinarność podejścia gdzie obok wzorowo zaprezentowanych syntez organicznych doktorant z dużą sprawnością prezentuje charakterystykę spektralną otrzymanych związków oraz wyniki badań elektrochemicznych. Prezentuje także znajomość tematyki wirusologii molekularnej i przedstawia wyniki badań nad aktywnością przeciwnowotworową otrzymanych preparatów

M.Ch.

wobec ludzkich komórek nowotworów płuc. Dodatkowo Doktorant udowodnił, że niektóre z nich są potencjalnymi inhibitorami wejścia wirusów SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 do komórek modelowych. Wnioski takie wyciągnął analizując otrzymane wyniki od współpracujących laboratoriów.

Dzięki przejrzystości poruszanie się po rozprawie nie sprawia dużych problemów, a jedynym dostrzeżonym przez recenzenta mankamentem jest fakt, nie zaprezentowania zbiorczej tabeli ze wszystkimi nowo otrzymanymi związkami. Dzięki temu łatwiej można byłoby wyodrębnić te wyniki syntetyczne, które stanowią o oryginalności rozprawy doktorskiej. Wprowadzona numeracja jest również myląca, gdyż miesza w sobie numery związków z wprowadzenia literaturowego oraz z wyników badań własnych co powoduje, że numery omawianych związków czasami nie występują po sobie. Jest to dodatkowa trudność w analizie wyników (np. schematy 22, 24 czy 27).

Wprowadzenie literaturowe przybliży czytelnikowi tematykę z zakresu chorób nowotworowych, czynników je wywołujących oraz leków stosowanych w terapiach leczniczych. Doktorant przedstawił także rozdział dotyczący podejścia „*click chemistry*”, które wykorzystywał w swojej pracy badawczej. W dalszej części wprowadzenia opisuje wyzwania współczesnej cywilizacji w obliczu pandemii Covid-19 przytaczając przykłady związków niskocząsteczkowych stosowanych do zwalczania wirusa SARS-CoV-2.

W kolejnym akapicie przedstawia hipotezę badawczą a następnie przechodzi do omawiania wyników badań własnych dążąc do potwierdzenia stawianych na początku rozprawy doktorskiej tez.

Pan Przemysław Biegański w trakcie prac badawczych otrzymał 16 nowych związków metaloorganicznych i organicznych, które były pochodnymi przewodnich leków (erlotynibu i 3'-azydo-3'-deoksytymidyny). Struktura 4 związków została potwierdzona za pomocą rentgenografii strukturalnej. Przebadał aktywność otrzymanych pochodnych wobec linii komórkowych, wykazując dla niektórych zwiększoną aktywność. Natomiast dla jednej pochodnej ferrocenylowa nr **104** wykazał około 13-krotnie wyższą aktywność w porównaniu do jej organicznego analogu nr **132** (badania wobec linii A549). Stanowi to rewelacyjny wynik potwierdzający hipotezę badawczą stawianą na początku rozprawy oraz wykazujący sens prowadzenia prac badawczych nad nowymi pochodnymi znanych już związków aktywnych. Doktorant wykazał także, że mechanizm działania ferrocenylowych pochodnych **125** – **127** opiera się zarówno na wiązaniu z receptorem EGFR jak i również na generowaniu reaktywnych form tlenu oraz, że rutenocenylowa pochodna **128** wykazuje zdolność do inhibicji wejścia wirusów SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 do komórek człowieka. Syntetyzowane kompleksy **119**,

M.Ch.

120, 122 i 124 przebadal (spektro)elektrochemicznie metoda woltamperometrii cyklicznej oraz woltamperometrii fali prostokątnej wykazując zjawisko komunikacji elektronowej.

Na tym etapie oceny chciałbym poprosić doktoranta o dyskusję w następującym zakresie tematycznym:

1. Otrzymując związek **106** z substratu **7** należało zastosować podwyższenie temperatury do 60 °C. Wiadomo że „click chemistry” jest reakcją, która zazwyczaj przebiega w łagodnych warunkach w temperaturze pokojowej. Dlaczego w tym przypadku jak i w innych opisanych w pracy syntezach była potrzeba zwiększenia temperatury? Reakcja innych azydków (**109** i **110**) z substratem **7** nie potrzebuje podwyższenia temperatury. Jak Doktorant może to wyjaśnić? Zaznaczę, że dzieje się tak w przypadku reakcji katalizowanych zarówno przez miedź jak i ruten.
2. Dlaczego nie udało się otrzymać produktów **119** i **122** na drodze podstawienia nukleofilowego jodopochodnych **121** i **123**. Chciałbym poznać opinie doktoranta na ten temat.
3. czy ma Pan jakieś podejrzenie albo może Pan to wyjaśnić dlaczego ferrocenyłowe pochodne **125** – **127** oraz rutenocenyłowa pochodna **129** wykazały ostrą toksyczność wobec komórek linii MDCK oraz HEK-293T

Sposób prezentacji wyników pokazuje, że doktorant rozumie i potrafi wyjaśnić zachodzące przemiany chemiczne zarówno w zakresie preparatyki jak i mechanizmów chemicznych. Dodatkowo wykazał się znajomością technik stosowanych w chemii medycznej, spektroskopii oraz badaniach biologicznych. Przekształcenia chemiczne poparte są dogłębną analizą widm rezonansu jądrowego dla jąder wodorowych i węglowych oraz spektrometrią mas. W tym miejscu należy docenić wysiłek, jaki doktorant włożył w analizy i opis preparatyki wykazując tym samym biegłą znajomość technik NMR oraz technik masowych, które są obecnie niezbędnym narzędziem chemika-syntetyka. Uwaga techniczna w sekcji część eksperymentalna poszczególne preparatyki powinny być oddzielone tytułami umieszczonymi nad strukturą opisywanego związku w celu lepszej czytelności.

Na zakończenie analizy dysertacji, spełniając obowiązek recenzenta, chciałbym zwrócić doktorantowi uwagę na nieliczne drobne błędy językowe oraz niedociągnięcia merytoryczne. Należy stwierdzić, że jest ich tak niewiele, że w żaden sposób nie mogą wpłynąć na pozytywną ocenę rozprawy. Dla przykładu je wymieniam:

Strony 42 literówka w słowie „istnieje”

Strona 61 „chromatografii kolumnowej na SiO₂” to jest za duży skrót należy podać jaki rodzaj SiO₂ Uwaga odnosi się do wielu miejsc w pracy oraz także preparatyki.

M.Ch.

Strona 62, 65 i dalsze. Tabela opis „Wydajność reakcji” powinna brzmieć „wydajność otrzymanych produktów”. Uwaga odnosi się do wielu miejsc w pracy.

Strona 62 „Analitycznie czyste związki” jakimi analizami potwierdzono tę czystość? To nie jest poprawne sformułowanie, jeżeli mówimy o „czystości” to lepiej zastosować stwierdzenie „Związki o czystości 98% potwierdzonej analizą HPLC”. Uwaga odnosi się do wielu miejsc w pracy.

Strona 67 stwierdzenie „na drodze reakcji CuAAC” powinno być „na drodze reakcji katalizowanej za pomocą CuAAC”

Strona 69 „procesy utlenienia-redukcji” powinno być „procesy utleniania-redukcji”

Strona 75 schemat 26. Dwa różne związki mają te sam numer. Jeden powinien mieć nr 141?

Strona 80 „natomiast najsłabszą analog” powinno być natomiast najsłabszym analogiem”

Nie znalazłem także żadnych informacji, które świadczyłyby o tym, że autorzy przed publikacją wyników w ogólnodostępnym czasopiśmie naukowym podjęli próby ochrony prawnej otrzymanych wyników naukowych. Ponieważ otrzymane nowe związki posiadają potencjalne zastosowania farmaceutyczne, uważam za zasadne, podjęcie kroków w celu uzyskania ochrony własności intelektualnej wytworzonej w toku procesu badawczego chociażby w postaci zgłoszenia patentowego. Bardzo proszę o wyjaśnienie i ustosunkowanie się do tej uwagi.

Szeroka i ambitna tematyka badawcza, jak również rzetelne przedstawienie uzyskanych wyników syntetycznych oraz analitycznych zaprezentowanych w dysertacji pozwala mi stwierdzić, że Pan mgr inż. Przemysław Biegański w pełni osiągnął poziom naukowy wymagany do uzyskania tytułu naukowego doktora nauk chemicznych. Po lekturze rozprawy jestem przekonany, że jest on sprawnym eksperymentatorem, który rozumie potrzebę interdyscyplinarnego podejścia do rozwiązywania problemu naukowego.

Za najważniejsze oryginalne osiągnięcia naukowe uznaję:

1. Otrzymanie nowych metaloorganicznych pochodnych erlotynibu oraz ich pełną charakterystykę.
2. Udowodnienie, że trzy z otrzymanych związków (**104**, **107** i **108**) mają zdolność do przełamania lekooporności komórek linii H1650 i H1975 i wykazują niską cytotoksyczność. Wykazanie, że związek **104** ma 13-krotnie wyższą aktywność niż jego organiczny analog **132** wobec komórek linii A549.
3. Wykazanie, że jedna z otrzymanych pochodnych rutenocenyłowych erlotynibu (związek nr **128**) hamuje wnikanie wirusów SARS-CoV-1/2 do niezmienionych nowotworowo komórek człowieka HEK293T.

M.Ch.

4. Wykazanie, że diferrocenylową pochodną AZT (związek nr **119**), posiada wyższą niż *cisPt* aktywność wobec komórek linii A549 i zbliżoną wobec linii H1975.

Na podstawie dokonanej recenzji rozprawy doktorskiej pod tytułem „*Metaloorganiczne pochodne typu „click” erlotynibu oraz AZT – synteza i aktywność biologiczna*” autorstwa pana mgr inż. Przemysława Biegańskiego stwierdzam, że spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z póź. zm.) i *Ustawę z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2018 poz 1669 z póź. zm.). Należy zaznaczyć, że została przygotowywana pod opieką promotora, i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie chemii organicznej oraz biochemii. Kandydat zaprezentował szeroką wiedzę teoretyczną w dziedzinie oraz praktyczne umiejętności przeprowadzając opisane w rozprawie syntezy organiczne w tym metaloorganiczne, badania ich aktywności na modelowych liniach komórkowych oraz analizę aktywności przeciwwirusowej, co poprawnie udokumentował. W związku z powyższym wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o dopuszczenie kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem



dr hab. Marcin K. Chmielewski