



Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej
Zakład Chemii Biomateriałów
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

dr hab. n. farm. Marcin Sobczak

Tel: (+48 22) 57 20 755

E-mail: marcin.sobczak@wum.edu.pl

Warszawa, dn. 29.05.2017 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Martynty Korcz pt. "Synteza i badania biologiczne in vitro nowych pochodnych chinoliny o potencjalnym działaniu chemioterapeutycznym" wykonanej w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych.

Przedstawiona do oceny praca doktorska pt. "Synteza i badania biologiczne *in vitro* nowych pochodnych chinoliny o potencjalnym działaniu chemioterapeutycznym" stanowi kontynuację badań nad syntezą związków heterocyklicznych o właściwościach farmakologicznych prowadzonych od wielu lat przez Zespół Pana Profesora Franciszka Sączewskiego.

Jako główny cel pracy, Doktorantka postawiła sobie otrzymanie nowych pochodnych chinoliny oraz przeprowadzenie wstępnych badań biologicznych, w pierwszym rzędzie pod kątem ich wpływu na wzrost komórek nowotworowych, a następnie działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybowego. Jak wiadomo, pierścień chinoliny stanowi podstawę wielu związków wykazujących działanie przeciwnowotworowe (stosowanych m.in. w leczeniu nowotworów jajnika i szyjki macicy, tarczycy, nerek i białaczek), przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe. Badania nad otrzymywaniem nowych pochodnych chinoliny stanowią wciąż bardzo aktualną tematykę współczesnej chemii medycznej.

W części literaturowej pracy, Autorka przedstawiła wyczerpujące studium dotyczące pochodnych chinoliny, triazolu i benzotriazolu o potwierdzonej aktywności biologicznej. Doktorantka, w kolejnych rozdziałach, przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat aktywności przeciwnowotworowej, przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybowej, przeciwpasożytniczej i przeciwzapalnej pochodnych chinoliny, aktywności przeciwnowotworowej, przeciwwirusowej i przeciwbakteryjnej pochodnych 1,2,4-triazolu oraz aktywności przeciwnowotworowej i przeciwwirusowej benzotriazolu. Magister Martyna Korcz przedstawiła kluczowe informacje dotyczące najbardziej perspektywicznych z punktu widzenia zastosowań medycznych wyżej wymienionych grup związków cytując najważniejsze piśmiennictwo związane z tematem (58 pozycji literaturowych). Doktorantka z dużym

M. Sobczak

wyczuciem porusza się w zagadnieniach dotyczących syntezy pochodnych chinoliny, triazolu i benzotriazolu. **Literaturowa część pracy jest napisana bardzo dobrze. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną, umiejętnością prawidłowego doboru źródeł literaturowych i selekcji informacji. Magister Korcz bardzo umiejętnie uzasadniła konieczność podjęcia badań stanowiących przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej.**

W ramach pracy eksperymentalnej, Doktorantka otrzymała nowe pochodne chinoliny i dokonała ich charakterystyki strukturalnej. Następnie, przeprowadziła badania stabilności otrzymanych związków w środowisku wodnym, a wybrane związki poddała badaniom właściwości cytostatycznych z użyciem linii komórkowych nowotworów ludzkich. Na Schemacie 1, Autorka w sposób bardzo czytelny pokazała zaplanowane kolejne etapy syntezy prowadzące do otrzymania pochodnych chinoliny **Serii A** (zawierających grupę -NH-O-SO₃H), **Serii B** (zawierających pierścień 1,2,4-triazolu) i **Serii C** (zawierających pierścień benzotriazolu).

W pierwszym etapie pracy, Doktorantka badała przebieg reakcji 2-chlorochinolino-3-karbaldehydu (**I**) z kwasem hydroksyloamino-*O*-sulfonowego (**HOSA**). Autorce nie udało się jednak otrzymać oczekiwanego produktu - pochodnej hydroksyloaminy (**II**), która miała posłużyć jako półprodukt do dalszej syntezy związków **Serii A**. Produktem wspomnianej reakcji była 2-chloro-3-cyjanochinolina. Doktorantka zaproponowała mechanizm zachodzącego procesu (Schemat 6) prowadzącego do powstania 2-chloro-3-cyjanochinoliny. Chciałbym podkreślić, że wyjaśnienie mechanizmu reakcji stanowi duże osiągnięcie z punktu widzenia badań podstawowych. Pochodne hydroksyloaminy **Serii A** zostały otrzymane z wykorzystaniem zsyntezowanych wcześniej pochodnych izoksazolo[3,4-*b*]chinolin-3(*1H*)-onu (**E**). Związki typu **E** poddano reakcji z nadmiarem halogenku alkilowego lub aryloalkilowego w obecności sproszkowanego NaOH otrzymując różne pochodne hydroksyloaminy **2**. Struktura otrzymanych pochodnych typu **2** została potwierdzona metodą FT-IR, NMR i rentgenograficzną monokryształów. Doktorantka w oparciu o wyniki eksperymentalne oraz obliczenia teoretyczne zaproponowała również mechanizm reakcji otrzymywania pochodnych hydroksyloaminy **2**. Zasluguje to na duże uznanie.

W kolejnym etapie pracy, Autorka otrzymała 2-(1,2,4-triazol-1-yl)chinolino-3-karbaldehyd (**III**) i 2-(benzotriazol-1-yl)-chinolino-3-karbaldehydu (**IV**) jako półprodukty do syntezy pochodnych chinoliny **Serii B** i **Serii C**. Aldehyd **III** otrzymano w reakcji 2-chlorochinolino-3-karbaldehydu z 1,2,4-triazolem w roztworze DMF w obecności bezwodnego K₂CO₃. Doktorantka zaobserwowała, że pochodną **IV** można otrzymać z dużą wydajnością (> 90%) podczas ogrzewania substratów we wrzącym etanolu bez konieczności stosowania czynnika zasadowego. Bardzo ciekawym fragmentem tych badań było ustalenie struktury związku **IV**, który był otrzymywany z benzotriazolu mogącego występować w dwóch formach tautomerycznych *1H* i *2H*, co nierzadko prowadzi do wytworzenia mieszaniny

H. Sok

produktów N-podstawionych. Doktorantka dokonała analizy strukturalnej związku **IV**, dodatkowo wspomagając się wynikami obliczeń kwantowo-chemicznych i wykazała, że pierścień bezotriazolu jest podstawiony przy atomie azotu N1.

W dalszej części pracy, Autorka prowadziła badania nad syntezą hydrazonów pochodnych chinolino-3-karbaldehydu **III** i **IV**. Związki **III** i **IV** wykorzystano jako substraty do syntezy **hydrazonów Serii B** (pochodnych 1,2,4-triazolu) oraz **hydrazonów Serii C** (pochodnych benzotriazolu) o zróżnicowanej lipofilowości. Proces kondensacji związków **III** i **IV** z pochodnymi hydrazyny prowadzono w rozpuszczalnikach protonowych w temperaturze otoczenia. Następnie, Doktorantka otrzymała N-acylohydrazony **Serii B** oraz **Serii C**. Jako substraty wykorzystwała różne hydrazydy aromatyczne i heteroaromatyczne oraz hydrazyd kwasu cyklopentylkarboksylowego. Dla jednego z otrzymanych hydrazonów, Autorka wykonała obliczenia teoretyczne mające na celu określenie jego konfiguracji. Stwierdziła, że w warunkach fizjologicznych powinny istnieć oba izomery (*Z* i *E*), co z kolei stwarza możliwość oddziaływania izomeru *Z* z mikrotubulami komórek nowotworowych.

W dalszej części pracy, Doktorantka otrzymała kolejne pochodne chinoliny: N-sulfonylohydrazony. Przeprowadziła reakcję kondensacji związków **III** i **IV** z arylosulfonylohydrazydami stwierdzając, że proces wymaga dużo bardziej drastycznych warunków reakcji niż miało to miejsce w przypadku reakcji związków **III** i **IV** z hydrazydami.

W następnym etapie, magister Korcz wykorzystując związki **III** i **IV** przeprowadziła syntezę semikarbazonów i tiosemikarbazonów. Poszczególne reakcje przebiegały z różną wydajnością od 26 do 71%. Wszystkie otrzymane pochodne zostały scharakteryzowane strukturalnie przy wykorzystaniu spektroskopii NMR i FT-IR. Dodatkowo, Autorce udało się potwierdzić strukturę jednego z semikarbazonów (**10a**) techniką rentgenografii monokryształów.

Doktorantka otrzymała również serię oksymów i pochodnych 3-alkoksyiminochinoliny. Dla otrzymanego aldoksyimu **11a**, Autorka wykonała obliczenia kwantowo-chemiczne próbując ustalić, który z izomerów *syn* czy *anti* będą mogły istnieć w warunkach fizjologicznych.

Kolejne badania dotyczyły syntezy pochodnych kwasu chinolino-3-karboksylowego. W celu otrzymania wspomnianych związków, Doktorantka podjęła próbę opracowania metody umożliwiającej wydajne utlenianie aldehydów **III** i **IV** do odpowiednich kwasów chinolino-3-karboksylowych. Jako utleniacz wykorzystwała NaClO₂, natomiast H₂O₂ jako substancję neutralizującą powstające jony ClO⁻ (stanowiące produkt uboczny procesu utleniania). Zastosowana metoda pozwoliła otrzymać powyższe pochodne z wydajnością 75-95%. W dalszym etapie, otrzymane pochodne zostały poddane procesowi estryfikacji przy użyciu chlorku tionylu. Następnie, otrzymany ester metylowy kwasu 2-okso-1,2-

M. Sob

dihydrochinolino-3-karboksylowego wykorzystano do syntezy hydrazynu. Z kolei, otrzymany hydrazyn poddano reakcji z aldehydami aromatycznymi otrzymując nie opisane dotychczas w literaturze pochodne o budowie *N*-acylohydrazonów.

W rozdziale III.3., Doktorantka przedstawiła wyniki badań stabilności otrzymanych związków w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Na podstawie uzyskanych rezultatów, Autorka podzieliła wspomniane substancje na trzy kategorie: związki ulegające powolnemu wytrącaniu z roztworu, związki stabilne chemicznie i dobrze rozpuszczalne w wodzie oraz związki ulegające stopniowej dekompozycji w środowisku wodnym.

W rozdziale IV.4, Doktorantka omówiła wyniki badań właściwości cytostatycznych względem linii komórkowych nowotworów ludzkich (raka trzustki, raka płuc, raka gruczołowego szyjki macicy). Badania biologiczne były prowadzone we współpracy z Zespołem Profesora Patricka Bednarskiego z Uniwersytetu w Greifswaldzie. Z badań biologicznych wykluczono związki odznaczające się brakiem stabilności chemicznej. Wykonała wstępne badania biologiczne, a następnie dla wybranych związków badania poszerzone wyznaczając wartości IC_{50} . Najsilniejsze działanie cytotoksyczne względem badanych linii komórkowych wykazały 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-3-[(2-(pirydyn-2-yl)hydrazono)metylo]chinolina oraz *N*'-{[2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)chinolin-3-yl]metyleno}benzoilohydrazyn. Jak stwierdziła Doktorantka, mogą one stanowić struktury wiodące dla poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych.

Ostatni rozdział pracy stanowią bardzo dobrze sformułowane i logiczne wnioski. Doktorantka w sposób rzeczowy i wyważony określiła ewentualne kierunki przyszłych prac dotyczących nowych pochodnymi chinoliny.

Z obowiązku recenzenta mam kilka drobnych uwag formalnych i krytycznych.

- 1) Jednostką masy molowej jest kg/mol lub g/mol, a nie Da (np. str. 14).
- 2) Na schemacie 1, pochodna zawierająca pierścień 1,2,4-triazolu powinna być oznaczona jako III, a nie II (str. 18).
- 3) Na stronie 59, Autorka nie kończy ostatniego i bardzo ważnego zdania rozdziału III.1.2.
- 4) Autorka nie stosuje w całym tekście zalecanego przez UPAC nazewnictwa związków nieorganicznych (stosuje nieaktualną nomenklaturę, np.: chloryn ..., podchloryn ..., siarczan ... itd.).
- 5) Na wykresach 1-3, Autorka powinna podać legendę (opis) kolejnych widm i czas, po jakim je zarejestrowano (str. 72-73).
- 6) Na widmach UV-Vis obserwujemy pasma, a nie piki (str. 73).
- 7) Schematy przedstawione na stronie 18 i 28 mają ten sam numer (oznaczono je jako Schemat 1).

Autorka redagując pracę nie ustrzegła się drobnych błędów edytorskich i niezręcznych sformułowań. Na przykład:

M. Dob...

- ... 2'-arylopodstawionych ...; powinno być: 2'-arylopodstawione (str. 6);
- ... Unii...; powinno być: Unia (str. 6);
- ... oksywów ...; powinno być: oksymów (str. 8);
- ... zawierających a położeniu ...; powinno być: zawierających w położeniu (str. 8);
- ... matodami ...; powinno być: metodami (str. 9);
- W zamirzeniach ...; powinno być: W zamierzeniach (str. 9);
- ... wymagasty; powinno być: wymagały (str. 43);

Chciałem podkreślić, że wymienione wyżej drobne uchybienia nie wpływają w istotny sposób na wysoką wartość merytoryczną niniejszej pracy.

Generalnie, rozprawa została zredagowana w sposób staranny. Pracę czyta się dobrze. Układ treści jest bardzo logiczny i spójny. Z pewnością przydałoby się zestawienie tabelaryczne wszystkich otrzymanych związków z informacją dotyczącą warunków i uzyskanych wydajności poszczególnych syntez. Pozwoliłoby to zaobserwować pewne zależności pomiędzy strukturą substratów i półproduktów a ich reaktywnością oraz wydajnością poszczególnych reakcji.

Zakres pracy doktorskiej jest bardzo obszerny. Doktorantka otrzymała 70 nie opisanych wcześniej w literaturze naukowej pochodnych chinoliny. Świadczy to o dużej pracowitości i konsekwencji Autorki. Niektóre z wykonanych syntez wymagały dużego doświadczenia, co jest dowodem wysokich kwalifikacji Doktorantki w tym zakresie. Pani magister Martyna Korcz uczestniczyła również w wykonywaniu badań biologicznych otrzymanych związków, realizowanych w ramach współpracy z Zakładem Chemii Farmaceutycznej i Medycznej Uniwersytetu w Greifswaldzie. Autorka bardzo starannie opisała metodykę prowadzonych badań. Każdy kolejny etap pracy został poprzedzony uzasadnieniem oraz określeniem szczegółowych celów badań. Dane eksperymentalne zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny. Wszystkie wyniki zostały logicznie skomentowane w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy (zacytowano 52 pozycje literaturowe). W badaniach strukturalnych, Doktorantka wykorzystwała szereg metod analitycznych: spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H i ^{13}C), spektroskopię w podczerwieni, spektrometrię mas z jonizacją rozpyleniową w polu elektrycznym oraz analizę rentgenostrukturalną monokryształów. Ponadto, Doktorantka wykorzystwała w swoich badaniach metodę analizy elementarnej oraz przeprowadziła obliczenia kwantowo-chemiczne (modelowanie profili energetycznych, optymalizacja geometrii struktur). **Doktorantka dokonała prawidłowej interpretacji dużej liczby danych eksperymentalnych, co świadczy o jej biegłej znajomości wymienionych wcześniej technik analitycznych. Chciałbym również podkreślić imponującą wszechstronność magister Korcz, która w ramach swojej pracy doktorskiej wykonała liczne syntezы, przeprowadziła badania strukturalne, biologiczne oraz obliczenia kwantowo-chemiczne.**

M. Sob...

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Korcz jest wartościowym i oryginalnym opracowaniem naukowym. Uzyskane wyniki badań wzbogacają wiedzę szeroko rozumianej chemii medycznej. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i wykonywania eksperymentów, interpretowania i krytycznej dyskusji wyników badań oraz formułowania logicznych wniosków. Bez wątpienia, magister Korcz jest już dojrzałym pracownikiem naukowym.

Reasumując z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr inż. Martyny Korcz pt. "Synteza i badania biologiczne *in vitro* nowych pochodnych chinoliny o potencjalnym działaniu chemioterapeutycznym" spełnia wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 z dn. 16.04.2003r., poz. 595). W związku z tym, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr inż. Martyny Korcz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Biomateriałów

dr hab. inż. Marcin Sobczak