

Sosnowiec, 09.11.2022

Prof. dr hab. n. farm. Stanisław Boryczka
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

OCENA

pracy doktorskiej mgr inż. Łukasza Tomorowicza, pt.: „Synteza i ocena aktywności przeciwnowotworowych nowych pochodnych arylosulfonamidu”, wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej, Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem promotora prof. dr hab. n. farm. Jarosława Sławińskiego oraz promotora pomocniczego dr hab. Beaty Żołnowskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy poszukiwania nowych pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidów, ważnych ze względu na możliwości znalezienia wśród nich układów o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Wiadomo od dawna, że sulfonamidy stanowią dużą grupę związków o szerokim spektrum ich aktywności biologicznej (przeciwhistaminowe, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe), a zainteresowanie nimi wciąż trwa, o czym świadczy ilość ukazujących się publikacji.

Ważnym elementem, który w istotny sposób decyduje o powodzeniu w zakresie otrzymywania nowych związków, jest dysponowanie wydajnymi metodami syntezy, co stwarza podstawę projektowania nowych struktur, reprezentujących określony profil działania. Wykorzystanie przez Doktoranta tak interesującego układu, jakim jest niedostępny w handlu 1,1-ditlenek 3-metylotio(lub 3-amino)-6-chloro-7-metylo-1,4,2-benzoditiazyny otwiera szerokie możliwości syntetyczne w zakresie poszukiwań nowych substancji w wielu grupach aktywności farmakologicznej. Stąd wybór tematyki pracy obejmującej syntezę, badania strukturalne, ocenę aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* wraz z elementami mechanistycznymi, analizę struktura-aktywność (SAR i QSAR) połączoną z projektowaniem nowych hybrydowych układów 2-merkaptobenzenosulfonamidów jest całkiem uzasadniony i zasługuje na uznanie oraz dobrze wpisuje się w dokonania zespołu prowadzonego przez Promotora.

Zaplanowana przez mgr inż. Łukasza Tomorowicza oryginalna koncepcja badań stanowi przemyślany i starannie zaplanowany panel eksperymentów pozwalający na szeroką

DWF wpt
17.11.2022
W. B.

analizę założonego problemu badawczego. Zrealizowanie głównego celu pracy wymagało od Doktoranta w pierwszej kolejności przeprowadzenia syntez dwóch serii związków o strukturze 2-merkaptobenzenosulfonamidu zawierającego układy heterocykliczne, odpowiednio grupy 1,3,5-triazynylową i imidazolidynylową lub 1,3,5-triazynylową i benzimidazolidynylową. Przyjęta strategia działania została podparta głęboką analizą danych literaturowych dotyczących modulowania aktywności przeciwnowotworowej przez powyższe układy heterocykliczne. W pierwszym panelu syntez Doktorant skupił się na otrzymywaniu imidazolidynowych pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu, zawierających grupy 1,3,5-triazynylowe w trójetapowym procesie, używając jako substratu 1,1-ditlenek 3-metylotio-6-chloro-7-metylo-1,4,2-benzoditiazyny. Związek ten w reakcji z 1,2-diaminoetanem lub jego pochodnymi (w przypadku produktów z pierścieniem tetrahydropirymidynowym użyto podstawionych 1,3-diaminopropanów) przekształcił w imidazolidynowe pochodne 2-merkaptobenzenosulfonamidu, następnie w reakcji S-alkilowania bromooctanem etylu otrzymał estry, które w reakcji cyklokondensacji z odpowiednimi chlorowodorkami biguanidu prowadzą do końcowych produktów z wydajnościami 19 - 95 %. Taka sekwencja reakcji, przy doborze diamin i chlorowodorków biguanidu o zróżnicowanej budowie, pozwoliła na dokonanie zaplanowanych modyfikacji strukturalnych w szerokim zakresie, obejmujących pozycje *N*-1 i *N*-3 w pierścieniu imidazolidynowym (lub *N* - 1 tetrahydropirymidynowym) oraz C-6 w pierścieniu triazynowym końcowych produktów. Drugi wariant modyfikacji obejmował pochodne, w których podstawnik imidazolidynylowy zastąpiono benzoimidazolidynylowym. Syntezę przeprowadzono wykorzystując jako substrat 1,1-ditlenek 3-amino-6-chloro-7-metylo-1,4,2-benzoditiazyny, który poprzez sól potasową i reakcję z *o*-fenylenodiaminami przekształcono w odpowiednie estry, a następnie w reakcji z chlorkami biguanidu otrzymano końcowe produkty z wydajnościami 10 – 58%. W tym panelu syntez modyfikacje strukturalne obejmowały pozycję C-6 pierścienia 1,3,5-triazyny oraz przy węglu C-5 pierścienia benzimidazolidynowego.

Budowę związków Doktorant wyczerpująco udokumentował w oparciu o spektroskopię ¹H i ¹³C NMR, IR a także techniki 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC), spektrometrię mas (HRMS/ESI-TOF, MALDI/TOF-TOF) oraz analizę elementarną (dla C, H, N). Dla jednego związku, oznaczonego w pracy jako **11**, wykonano analizę krystalograficzną, potwierdzając jednocześnie występowanie tautomeru o strukturze *N*-(imidazolidyno-2-ylidenowej). Należy podkreślić, że w sumie otrzymał imponującą ilość, ponad 200 nowych związków. W tym względzie należy wysoko ocenić uzyskane przez mgr inż. Łukasza

Tomorowicza rezultaty, który realizując ogromny zakres badań laboratoryjnych, biorąc pod uwagę wielokierunkowy przebieg badanych procesów, założony cel osiągnął.

Aktywność cytotoksyczną związków oceniano wobec trzech linii ludzkich komórek nowotworowych: jelita grubego (HCT-116), piersi (MCF-7), szyjki macicy (HeLa) oraz nienowotworowej linii ludzkich komórek keratynocytów (HaCaT). Dodatkowo w badaniach rozszerzonych wykorzystano również linie ludzkich komórek raka jajnika (A2780, SOKV-3) i piersi (T47D). Badania przeprowadzono przy użyciu testu MTT wobec cis-platyny jako wzorca w 13 grupach związków o zróżnicowanych właściwościach strukturalnych, co znacznie ułatwiło przeprowadzenie analizy zależności struktura-aktywność. W wyniku przeprowadzonych testów Doktorant wykazał, że spośród przebadanych związków najkorzystniejszą aktywność przeciwnowotworową, zbliżoną do cis-platyny, posiadają związki oznaczone jako **149-162**, które zawierają grupę 3,5-bis(trifluorometylo)benzylową przy atomie *N*-1 pierścienia imidazolidynowego ($IC_{50} = 3,6 - 11,0 \mu M$ wobec HCT-116). W grupie tych pochodnych obserwuje się wpływ charakteru podstawnika przy atomie C-6 pierścienia 1,3,5-triazynylowego na aktywność. Najbardziej optymalnymi podstawnikami są; 4-fenylopipezazynyl, 4-(podstawionyfenylo)pipezazynyl, 4-benzylpipezazynyl lub 4-(4-benzyl)pipezazynyl. Pochodne posiadające jedną grupę trifluorometylową zarówno w pozycji 4- lub 3- układu benzyloвого połączone z pierścieniem imidazolidynowym lub tetrahydropirydynylowym posiadają zbliżone wartości IC_{50} ale nieco wyższe od pochodnych z dwoma grupami trifluorometylowymi. Natomiast większość związków zawierających niepodstawiony pierścień imidazolidynowy wykazuje umiarkowaną aktywność cytotoksyczną wobec wszystkich zastosowanych linii komórek nowotworowych. W tym przypadku różnice w aktywności są determinowane podstawnikiem w pozycji C-6 pierścienia 1,3,5-triazynowego. Wprowadzenie podstawnika benzyloвого do pierścienia imidazolidynowego wpływa na podwyższenie aktywności wobec wszystkich linii komórkowych, natomiast obecność dwóch grup benzyloowych objawia się brakiem aktywności. Pochodne benzimidazolidynowe posiadają umiarkowaną i mało zróżnicowaną aktywność wynikającą z podstawników przy pierścieniu 1,3,5-triazynowym.

Interesujący fragment badań dotyczy poznania prawdopodobnego mechanizmu działania na przykładzie związków **36** i **130** i wykazanie, że hamują one cykl komórkowy odpowiednio w fazie G_0/G_1 i G_2/M w komórkach raka piersi MCF-7 a także indukują proces apoptozy w komórkach T47D.

W kolejnej części swojej pracy mgr inż. Łukasz Tomorowicz przeprowadził ilościową analizę zależności pomiędzy strukturą a aktywnością przeciwnowotworową, wobec linii

komórkowych HCT-116, MCF-7 i HeLa. Odpowiednie modele matematyczne QSAR otrzymano metodą stopniowej liniowej regresji (MLR) w oparciu o program Statistica 13, stosując wybrane deskryptory molekularne obliczone przy użyciu programu MOE (Molecular Operating Environment). Wartościowym osiągnięciem w tej grupie problemów jest wykorzystanie uzyskanych modeli QSAR, o statystycznie istotnej zdolności prognostycznej, do zaprojektowania i syntezy kolejnych struktur zawierających podstawniki: benzyłowy, fluoro- lub bromobenzyłowy, trifluorometylobenzyłowy, bis(trifluorometylo)- benzyłowy, naftylometyłowy w pierścieniu imidazolidynowego czy grupę fenylopiperazynową w pierścieniu triazynowym o korzystniejszych aktywnościach cytotoksycznych. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki posiadają duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne, stanowią solidną podstawę do projektowania i syntezy nowych pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidów o interesujących właściwościach przeciwnowotworowych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Tomorowicza liczy ogółem 295 stron, podzielona jest na 8 rozdziałów, zawiera 48 rycin oraz 29 tabel i stanowi zwartą logiczną całość, napisaną w sposób przejrzysty, należycie zilustrowaną wzorami chemicznymi. Pracę uzupełnia *Streszczenie* w języku polskim i angielskim oraz *Wykaz używanych skrótów i symboli*. Opis własnych dokonań Autor poprzedza ogólnym wstępem wprowadzającym w realizowaną tematykę (*Część teoretyczna* licząca 45 str.), w zakresie aktywności sulfoamidów ze szczególnym uwzględnieniem aktywności przeciwnowotworowej w odniesieniu do poszczególnych celów molekularnych. Oceniając część teoretyczną należy stwierdzić, że jest ona napisana poprawnie, a zawarte w niej wiadomości są przydatne w czytaniu dalszych części dysertacji i stanowią odpowiednie uzasadnienie przeprowadzonych badań.

W następnym rozdziale Doktorant jasno i przekonująco przedstawił założenia i cel pracy, główne kierunki zaplanowanych syntez, badań strukturalnych, właściwości chemicznych i aktywności przeciwnowotworowej, zakres analizy struktura-aktywność (SAR i QSAR) nowych 2-merkaptobenzenosulfonamidów.

W części zatytułowanej *Badania własne*, podzielonej na 8 podrozdziałów, Autor opisał otrzymane wyniki badań syntetycznych, dobrze udokumentowane w postaci dużej ilości rycin, schematów, analiz widm ^1H i ^{13}C NMR, IR z ich szczegółową interpretacją. Stosując metody spektroskopowe, jak i analizę rentgenostrukturalną Doktorant w sposób jednoznaczny określił struktury uzyskanych produktów. Na podkreślenie zasługuje nie tylko umiejętność realizacji trudnej pracy preparatywnej, ale również swobodne poruszanie się w tematyce związanej z badaniami strukturalnymi otrzymanych produktów.

Obszerny rozdział liczący 39 stron zatytułowany *Omówienie wyników badań biologicznych* zawiera ocenę aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* oraz próby wyjaśnienia mechanizmu działania przeciwnowotworowego badanych związków. Na uwagę zasługuje dokładna analiza zależności struktura-aktywność w poszczególnych grupach pochodnych, określenie istotnych elementów strukturalnych determinujących aktywność, a także wytypowanie struktur wiodących do dalszej optymalizacji. Na uwagę zasługuje graficzny sposób przedstawienia wpływu kierunków modyfikacji strukturalnych pierścienia imidazolidynowego na aktywność cytotoksyczną (Rycina 11).

Następny rozdział *Modele QSAR* zawiera analizę ilościowej zależności struktura-aktywność w oparciu o matematyczne modele QSAR z wykorzystaniem deskryptorów molekularnych obliczonych dla każdego związku. Należy zaznaczyć, że badania aktywności przeciwnowotworowej i analiza struktura-aktywność przyniosły wiele interesujących uogólnień o znaczeniu praktycznym i wnoszą istotny wkład w rozwój badań w zakresie projektowania *in silico* nowych arylosulfonamidów o korzystniejszych właściwościach farmakologicznych.

Rozdział *Synteza*, liczący 121 stron, obejmuje szczegółowe opisy stosowanych metod, preparatykę, badania fizykochemiczne imponującej liczby 220 nowych związków. Należy podkreślić ogrom pracy preparatywnej jaką wykonał Doktorant, a sposób realizacji części eksperymentalnej w zakresie rozwiązywania trudnych problemów syntetycznych, budzi uznanie i zasługuje na wysoką ocenę.

Pozytywnie oceniam zarówno przedstawione podsumowanie, jak również wyciągnięte z otrzymanych wyników wnioski.

Rozprawę zamyka *Piśmiennictwo* (154 pozycje), w znaczącym zakresie uwzględniające publikacje oryginalne, podręczniki i opracowania przeglądowe. W tym zestawieniu większość pozycji pochodzi z ostatniej dekady, co dobrze świadczy o aktualności piśmiennictwa. Dobór literatury i sposób korzystania z niej nie nasuwa większych zastrzeżeń.

Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym. Należy podkreślić staranną korektę tekstu i dużą dbałość o stronę graficzną pracy a także dobre udokumentowanie otrzymanych wyników w postaci dużej ilości tabel i rycin.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Tomorowicza, pt.: „Synteza i ocena aktywności przeciwnowotworowych nowych pochodnych arylosulfonamidu”, oparta jest na niezwykle obszernym materiale doświadczalnym, jest pracą wartościową i wnosi nowe elementy poznawcze w zakresie chemii i biologii pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidów. Potwierdzeniem wysokiej wartości

merytorycznej dysertacji doktorskiej jest opublikowanie wyników badań w postaci dwóch oryginalnych prac, w których Doktorant jest pierwszym autorem, w czasopismach z listy filadelfijskiej o wysokich wartościach IF. Uważam, że praca spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2018 r., poz. 1668 z póź. zm.). Potwierdza ona również wysokie kwalifikacje Doktoranta, jego kompetencje, wiedzę i zdolności eksperymentatorskie oraz wyjątkową dokładność w przedstawieniu danych. Z pełnym przekonaniem wnoszę do Szanownego Pana Przewodniczącego i Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr inż. Łukasza Tomorowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab.n.farm. Stanisław Boryczka

Sosnowiec, 10.11.2022

Katedra i Zakład
Chemii Organicznej

ul. Jagiellońska 4,
41-200 Sosnowiec
www.sum.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm.
Stanisław Boryczka

tel.: (+48 32) 364 16 05
fax: (+48 32) 364 16 05

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 364 16 00
fax: (+48 32) 364 16 00
chemorg@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Przewodniczący
Rady Nauk Farmaceutycznych
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Prof. dr. hab. n. farm. Wiesław Sawicki

Szanowny Panie Profesorze,

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Tomorowicza, pt.: „Synteza i ocena aktywności przeciwnowotworowych nowych pochodnych arylosulfonamidu” dotyczy interesującej tematyki badawczej, która dobrze wpisuje się w ogólny nurt poszukiwań nowych sulfonamidów, ważnych ze względu na możliwości znalezienia wśród nich układów o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Należy podkreślić, że praca oparta jest na niezwykle obszernym materiale doświadczalnym, jest pracą wartościową i wnosi nowe elementy poznawcze w zakresie chemii i biologii a także projektowania *in silico* nowych arylosulfonamidów o korzystniejszych właściwościach farmakologicznych. Potwierdzeniem wysokiej wartości merytorycznej dysertacji doktorskiej jest opublikowanie wyników badań w postaci dwóch oryginalnych prac, w których Doktorant jest pierwszym autorem, w czasopismach z listy filadelfijskiej o wysokich wartościach IF.

Biorąc powyższe pod uwagę wnoszę do Szanownego Pana Przewodniczącego i Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr inż. Łukasza Tomorowicza.

Z wyrazami szacunku,



Prof. dr hab. n. farm. Stanisław Boryczka