



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Chemii Organicznej i Technologii Leków

Dr hab. Marcin Mączyński, profesor Uczelni

Wrocław 4.12.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Łukasza Tomorowicza

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

**pt. „SYNTEZA I OCENA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWYCH
NOWYCH POCHODNYCH ARYLOSULFONAMIDU”**

Poszukiwanie związków biologicznie czynnych w kierunku leczenia chorób nowotworowych jest problemem jak najbardziej aktualnym. Wiele nowotworów wykrytych na wczesnym etapie można wyleczyć, ale istnieje bardzo duża grupa, wobec której leczenie jest nieskuteczne. Modyfikowane systemy terapeutyczne powodują bardzo dużo działań niepożądanych, mogą być stosowane u pacjentów w dobrym stanie fizycznym, dlatego poszukiwanie małowadzących leków syntetycznych musi być kontynuowane.

Praca posiada ogólnie przyjęty układ dla tego typu dysertacji, choć jest bardzo obszerna. Obejmuje 295 stron, na których w tekście ulokowane są także ryciny w liczbie 48, tabele w liczbie 29 oraz schematy w liczbie 11. Merytorycznie praca poparta jest 153 pozycjami piśmiennictwa. Piśmiennictwo jest prawidłowo dobrane, co potwierdza bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktoranta w omawianym temacie. Niestety Doktorant nie przedstawił informacji o swoim wykształceniu, aktywności i dorobku naukowym. Z uzyskanych informacji wynika, że Doktorant jest współautorem 2 publikacji w czasopismach posiadających współczynnik wpływu. W pracach tych mgr inż. Łukasz Tomorowicz jest pierwszym autorem.

W części teoretycznej pracy Doktorant przedstawił przegląd pochodnych sulfonamidowych wykazujących aktywność biologiczną. Podział ten jest dokonany w oparciu o aktywność wobec różnych celów biologicznych. W opinii recenzenta Doktorant, którego badania bezpośrednio dotyczą syntezy związków, mógł przedstawić to w ujęciu modyfikacji

struktura-aktywność układów zawierających fragment sulfonamidowy, które doprowadziły do otrzymania określonych pochodnych. Myślę, że mgr inż. Łukasz Tomorowicz mógłby pochwalić się swoją wiedzą syntetyczną przygotowując opis takich modyfikacji i je interpretując.

W części „Cel pracy” Doktorant przedstawił cele główne i poboczne. Celem głównym była synteza dwóch serii pochodnych 2-(4-amino-6-R¹-1,3,5-triazyn-2-ylometylotio)-N-(1-R²-3-R³-imidazolidyn-2-ylideno)-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (typ I) oraz 2-(4-amino-6-R¹-1,3,5-triazyn-2-ylometylotio)-N-(5-R⁴-benzo[*d*]imidazolidym-2-ylideno)-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (typ II) oraz określenie ich właściwości przeciwnowotworowych w badaniach *in vitro* na liniach komórkowych raka okrężnicy, piersi i szyjki macicy. Celami dodatkowymi było:

- przeprowadzenie modelowania molekularnego z wykorzystaniem programów Molecular Operating Environment (MOE) oraz GAMESS w oparciu o metody mechaniki molekularnej, semiempiryczne oraz *ab initio* Haetree-Fock, które Doktorant wykorzystał w celu opracowania modeli QSAR przydatnych w projektowaniu *in silico* nowych związków z aktywnością cytotoksyczną
- potwierdzenie struktury chemicznej otrzymanych związków metodami spektroskopowymi, analizy elementarnej, spektrometrii mas oraz rentgenokrytalograficznymi
- przeprowadzenia badania aktywności cytotoksycznej związków *in vitro*
- opracowanie biblioteki nowych pochodnych sulfonamidów o aktywności przeciwnowotworowej.

Mgr inż. Łukasz Tomorowicz swoje badania oparł na wynikach badań zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Jarosława Sławińskiego w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Nowe związki są połączeniami hybrydowymi dwóch układów farmakoforowych, mianowicie 2,4,6-tripodstawionej 1,3,5-triazyny oraz fragmentu 2-merkaptobenzenosulfonamidowego. Decyzję o celowości syntezy takiej hybrydy Doktorant bardzo dobrze uzasadnił cytowanym piśmiennictwem. Analiza literatury świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta w projektowaniu i syntezie związków.

Kilkuetapowa synteza rozpoczęła się od modyfikacji 1,1-ditlenku 3-metylotio-6-chloro-7-metylo-1,4,2-benzoditiazyny (A) prowadząc do finalnych związków typu I oraz 1,1-ditlenku 3-amino-6-chloro-7-metylo-1,4,2-benzoditiazyny (D) dając związki typu II. Synteza wymagała od Doktoranta dużego doświadczenia i zaangażowania laboratoryjnego, co przez pryzmat

otrzymania ponad dwustu związków hybrydowych, wskazuje na ogromne doświadczenie laboratoryjne mgr inż. Łukasza Tomorowicza. Kierunki modyfikacji związków typu I i II Doktorant uzasadniał cytowanym piśmiennictwem, a polegały one na:

- zmianie fragmentu aminowego R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazyny
- braku lub obecności oraz różnorodności podstawników przy atomach azotu N-1 oraz N-3 (podstawniki R² i R³) pierścienia 2-imidazolidynowego
- zmianie pierścienia heterocyklicznego oraz podstawnika R⁴ przy atomie azotu grupy sulfonamidowej.

W części „Badania własne” Doktorant szczegółowo opisał przeprowadzenie syntez dla określonych grup nowych związków 4-28, 33-61, 62-69, 74-103, 108-139, 142-146, 149-162, 165-175, 181-224. Wzbogaceniem tej części pracy są zamieszczone dane w postaci analizy rentgenokrytalograficznej związku (11) oraz widm ¹³C NMR, HSQC, COSY, HMBC dla związku (130) i ich interpretacja. Doktorat wykazał tym swoje doświadczenie i wiedzę w obszarze znajomości i zastosowania różnych metod spektroskopowych w określaniu struktury związków.

W rozdziale „Omówienie wyników badań biologicznych” mgr inż. Łukasz Tomorowicz przedstawił i zinterpretował wyniki badań biologicznych wykonanych we współpracy z Międzyuczelnianym Wydziałem Biotechnologii UG-GUMed w Gdańsku oraz z Narodowym Instytutem Onkologii w Warszawie. Ocenie poddano wpływ związków na aktywność cytotoksyczną *in vitro* wobec linii komórkowych ludzkich nowotworów: okrężnicy (HCT-116), piersi (MCF-7), szyjki macicy (HeLa), a selektywność zbadano wobec nienowotworowej linii komórkowej ludzkich keratynocytów (HaCaT). Dodatkowe badania wytypowanych związków wykonano wobec linii komórkowych ludzkich nowotworów: jajnika (A2780, SOKV-3) oraz piersi (T47D). Przedstawione badania dotyczyły związków zakwalifikowanych do różnych grup ze względu na wyżej opisane modyfikacje strukturalne:

- spośród pochodnych *N*-(imidazolidyn-2-ylideno)-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (4-28), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, najlepszą aktywność przeciwnowotworową wobec linii HCT-116 oraz MCF-7 wykazał związek (20) z podstawnikiem R¹ 4-(4-chlorofenylo)piperazyńlowym. Analizując zmiany podstawników wobec związku (20) Doktorant przeprowadził krótką interpretację SAR wśród powyższych pochodnych, gdzie głównym wnioskiem było stwierdzenie, że zamiana pierścienia piperazyńowego w związkach (16, 26) pierścieniem piperydynowym (27) lub 1,2,3,6-tetrahydropiperydynowym (28) skutkowałą wzrostem aktywności cytotoksycznej wobec badanych linii.

- wśród pochodnych *N*-(1-benzylimidazolidyn-2-ylideno)-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (33-61), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, najaktywniejszym wobec HCT-116, MCF-7 oraz HeLa był związek (49) z podstawnikiem R¹ 4-(3-trifluorometylofenylo)piperazynyłowym. W tej grupie zamiana podstawnika R¹ na inny nie wpłynęła na zmianę aktywności przeciwnowotworowej. Generalnie wprowadzenie fragmentu benzylowego w pozycji *N*-1 pierścienia imidazolidynowego w związkach (33-61) w znaczący sposób spowodowała wzrost aktywności przeciwnowotworowej wobec wszystkich badanych linii, w porównaniu do serii (4-28), które zawierały niepodstawiony atom azotu *N*-1.

- w grupie związków *N*-[1-(metylo-1-naftylo)imidazolidyn-2-ylideno]-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (62-69), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, największą aktywność wobec linii HCT-116, MCF-7 i HeLa wykazała pochodna (62) z podstawnikiem R¹ indolinyłowym. W opisie *SAR* korzystne były zmiany, wobec związku (62), na podstawnik fenyloaminowy (63), 4-(4-benzyl)piperazynyłowy (69) czy 4-(4-trifluorometylofenylo)piperazynyłowy (66). W tej grupie związków wprowadzenie do azotu *N*-1 podstawnika 1-naftyłometylowego nie spowodowało wzrostu aktywności.

- wśród pochodnych *N*-[1-(4-fluorobenzyl)imidazolidyn-2-ylideno]-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (74-93), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, wykazały umiarkowaną aktywność cytotoksyczną, a najaktywniejszy był związek (88) zawierający podstawnik R¹ 4-(4-chlorofenylo)piperazynyłowy. Tu podstawienie azotu *N*-1 podstawnikiem 4-fluorobenzylowym znacząco zwiększyło aktywność cytotoksyczną. Modyfikacja polegająca na wprowadzeniu atomu fluoru podyktowana była wcześniejszymi analizami QSAR, które Doktorant przeprowadził.

- spośród pochodnych *N*-[1-(4-bromobenzyl)imidazolidyn-2-ylideno]-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (94-103), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, najaktywniejsza była pochodna (103) z podstawnikiem R¹ 4-(4-benzyl)piperidynyłowym. Pozostałe modyfikacje w tej grupie związków nie wpłynęły znacząco na wzrost aktywności cytotoksycznej, ale związki tej serii były bardziej selektywne wobec linii MCF-7.

- w grupie związków *N*-{1-[4-(trifluorometylo)benzylimidazolidyn-2-ylideno]}-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (108-133), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, większość charakteryzowała się umiarkowaną lub wysoką

aktywnością cytotoksyczną wobec wszystkich zastosowanych modeli badawczych. Najaktywniejsze były związki (125, 126, 132, 133). Ich selektywność była skierowana na linię HCT-116. Dla trzech związków z tej serii (124, 128, 130) wykonano dodatkowe badania w kierunku aktywności cytotoksycznej wobec raka jajnika i piersi (A2780, SKOV-3, T47D). Wyniki pokazały największą skuteczność wszystkich pochodnych wobec linii A2780.

- w grupie pochodnych *N*-{1-[3-(fluorometylo)benzylimidazolidyn-2-ylideno]}-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (134-139), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, najaktywniejsza była pochodna (136) zawierająca podstawnik R¹ 4-(4-trifluorometylofenylo)piperazyńlowy wobec wszystkich trzech standardowo zastosowanych linii. Pozostałe modyfikacje strukturalne nie wpłynęły znacząco na wzrost aktywności czy selektywność.

- grupa związków *N*-[1-(4-trifluorometylo)benzylotetrahydropirydyn-2-ylideno]-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (142-146), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, charakteryzowała się umiarkowaną lub wysoką aktywnością cytotoksyczną wobec wszystkich zastosowanych modeli badawczych, a związek (142), posiadający podstawnik R¹ 3,4-dihydrochinolin-2(2*H*)-ylowy, był wyjątkowo aktywny wobec linii HeLa.

- pochodne *N*-{1-[3,5-bis(trifluorometylo)benzylimidazolidyn-2-ylideno]}-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (149-162), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, wykazały większą umiarkowaną lub wysoką aktywność cytotoksyczną wobec linii HCT-116 oraz MCF-7. Związek (161) z podstawnikiem R¹ 4-(4-benzyl)piperazyńlowym charakteryzował dużą selektywność wobec linii komórkowej HeLa. Z kolei związek (155) posiadający ugrupowanie R¹ 4-fenylopiperazyńlowe wykazał aktywność wobec linii HCT-116 oraz MCF-7 porównywalną do leku referencyjnego Cisplatyny. Seria ta wykazała największą aktywność cytotoksyczną wobec zastosowanych linii komórkowych spośród wszystkich otrzymanych i przebadanych przez Doktoranta związków.

- spośród serii związków *N*-[(*N*¹,*N*³-di(benzyl)imidazolidyn-2-ylideno)]-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (165-175), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, nie odnotowano związków o znaczącej aktywności cytotoksycznej wobec linii komórkowych HCT-116, MCF-7 czy HeLa.

- wśród pochodnych *N*-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)ylideno)-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (181-207), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec linii HeLa wykazała pochodna (197) zawierająca podstawnik R¹ 4-(4-trifluorometylofenylo)piperazyń-1-

ylowy. Pozostałe związki wykazały umiarkowaną aktywność w zastosowanych modelach badawczych.

- w grupie pochodnych *N*-(5-fluoro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)ylideno)-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (208-215), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, najwyższą aktywność cytotoksyczną we wszystkich modelach wykazał związek (213) z podstawnikiem R¹ 4-(4-chlorofenylo)piperazyńlowym.

- wśród pochodnych *N*-(5-chloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2(3*H*)ylideno)-4-chloro-5-metylobenzenosulfonamidu (216-224), zróżnicowanych podstawnikiem R¹ w pozycji 6 pierścienia 1,3,5-triazynowego, najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec linii HCT-116, MFC-7 i HeLa prezentował związek (221) z podstawnikiem R¹ 4-(4-fluorofenylo)piperazyńlowym.

Kolejno przeprowadzono badania wpływu wybranych związków (36) oraz (130) na cykl komórkowy oraz na indukowanie apoptozy. Otrzymane wyniki wykazały, że oba związki hamują cykl komórkowy w fazie G₀/G₁ przy stężeniu 10 μM, a związek (130) także hamuje cykl komórkowy w fazie G₂/M przy stężeniu 25 μM. Z kolei w badaniu zdolności indukowania apoptozy, wobec linii zawierających zmutowane białko p53 (linie T47D, SKOV-3) jak i linii MCF-7 z normalną ekspresją białka p53, wykazano zależny od stężeń wzrost komórek apoptotycznych.

W rozdziale „Modele QSAR” mgr inż. Łukasz Tomorowicz wygenerował modele QSAR i pokazał zależności struktura-aktywność oraz na ich podstawie zaproponował syntezę kolejnych serii związków. Doktorant przedstawił modele mające na celu przewidywanie wartości IC₅₀ linii komórkowych HCT-116, MCF-7 i HeLa dla serii związków (4-28, 33-61, 74-93). Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant wyciągnął szereg wniosków, które wykorzystał przy projektowaniu innych serii (108-133, 134-139, 142-146, 149-162). Interpretacja wyników wskazuje na dużą wiedzę Doktoranta w opisywanym temacie.

W rozdziale „Synteza” Doktorant szczegółowo przedstawił opisy syntezy i wyniki badań spektroskopowych wszystkich otrzymanych przez siebie związków. Pochodne otrzymał w wyniku kilkietapowych syntez prowadzonych metodami klasycznymi. Wykorzystał do tego dostępną metodologię, którą odpowiednio modyfikował aby osiągnąć zamierzony cel pracy. Strukturę i czystość wszystkich otrzymanych związków Doktorant poprawnie potwierdził odpowiednio wynikami analizy spektroskopowej (IR, NMR), dwuwymiarowych widm korelacyjnych (COSY) i heterokorelacyjnych (HSQC, HMBC), analizy elementarnej oraz spektrometrii MS, HRMS (ESI-TOF), MALDI/TOF-TOF oraz analizy rentgenokrytalograficznej. Według Recenzenta analiza opisu widm przedstawiona

w niniejszej pracy w pełni potwierdza strukturę chemiczną i czystość otrzymanych związków. Szczegółowa analiza danych potwierdza bardzo dobre przygotowanie merytoryczne Doktoranta. W tym miejscu muszę stwierdzić, że Pan mgr inż. Łukasz Tomowrowicz wykonał olbrzymią pracę syntetyczną otrzymując tak dużą liczbę czystych związków. Z wielkim uznaniem analizowałem tą część pracy.

W części „Podsumowanie i wnioski” Doktorant krótko przedstawił wnioski ze swoich badań, które w recenzji zostały omówione wyżej. Wszystkie potwierdzają założony przez Doktoranta cel pracy i pełną realizację zamierzonych badań. Przedstawiona dokładna analiza ich treści potwierdza dużą wiedzę mgr inż. Łukasza Tomowrowicza w obszarze chemii medycznej.

W ocenie Recenzenta uzyskane rezultaty badań stanowią istotne opracowanie naukowe w dziedzinie chemii medycznej i wnoszą wkład w rozwój badań nad poszukiwaniem nowych hybrydowych pochodnych 2-merkaptobenzenosulfonamidu i 1,3,5-triazyny. Do obowiązków recenzenta należy wskazanie zauważonych błędów formalnych i redakcyjnych popełnionych w trakcie przygotowywania manuskryptu rozprawy, a także przedstawienie sugestii. Moje uwagi dotyczą następujących zagadnień:

- brak wyjaśnienia w pracy, które serie związków należą do typu I i II
- w części teoretycznej w tytułach są „związki sulfonamidowe działające na...”, należało zapisać sulfonamidy o aktywności wobec..., określenie „związki sulfonamidowe” jest niefortunne
- w części teoretycznej należało opisać albo metody syntezy pochodnych sulfonamidowych, albo metody modyfikacji prowadzące do najaktywniejszych pochodnych, co uzasadniłoby cel badań podjęty przez Doktoranta
- w części teoretycznej pracy nie ma numeracji związków
- w części teoretycznej pracy, w tytułach rozdziałów, raz skróty są wyjaśnione, a raz nie
- cel pracy, dane opisowe poparte cytowaniem można zamieścić w części teoretycznej
- str. 75, cel pracy, na rycinie 14 są zaznaczone podstawniki R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a w opisie badań własnych Doktorant tylko odnosi się do R^1 , pozostałe nazywa inaczej bez skrótów R^2 , R^3 , R^4
- str. 77, cel pracy, Doktorant odnosi się do „modyfikacji sposobu podstawienia atomów azotu *N*-1 i *N*-3 pierścienia 2-imidazolidynowego”, a w pracy opisano rodzaj podstawnika w tych pozycjach, a nie sposób ich wprowadzenia
- str. 103, badania własne, Doktorant niepotrzebnie umieścił opis wyników badań biologicznych, które dopiero w dziale „omówienie wyników badań biologicznych” str. 107-145 były prezentowane


- na podstawie tak dużej biblioteki związków oraz wyników aktywności biologicznej można przedstawić dużo więcej zależności SAR, pokazana analiza pozostawia niedosyt dla czytelnika, Doktorant opisał głównie zależności związane z obecnością lub brakiem podstawnika przy atomach azotu *N*-1 i *N*-3 pierścienia 2-imidazolidynowego
- str. 107, jest informacja o wynikach aktywności dla związków 4-175, a opis wyników w pracy dotyczy badań biologicznych dla związków 4-28, 33-61, 62-69, 74-93, 94-103, 108-133, 134-139, 142-146, 149-162, 165-175, 181-207, 208-215, 216-224
- str. 117, w tekście jest $IC_{50\text{ MCF-7}}=13\mu\text{M}$, a powinno być $IC_{50\text{ HeLa}}=13\mu\text{M}$ co wynika z ryciny
- str. 117, jest 1-(naftylometylowym), powinno być bez nawiasu 1-naftylometylowym
- str. 125, na rycinie 33 są wyniki aktywności związków 125, 126, 132, 133, a w tekście brakuje interpretacji wyników dla związków 125 i 126
- str. 138, 140, w opisie nazw związków jest zdublowane wyrażenie „benzenosulfonamidu”
- Doktorant nie określił dokładnie ile otrzymał związków, ile przekazał do badań biologicznych, recenzent znalazł w różnych miejscach pracy tylko informacje ogólne „ponad dwieście”, „ponad sto siedemdziesiąt”

Pragnę jednak podkreślić, że przedstawione uwagi wskazują sugestie, natomiast nie wpływają na wartość merytoryczną recenzowanej pracy.

Mając na uwadze oryginalność oraz wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Łukasza Tomorowicza pt. „SYNTEZA I OCENA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWYCH NOWYCH POCHODNYCH ARYLOSULFONAMIDU” 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 Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Łukasza Tomorowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Marcin Mączyński, prof. Uczelni

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


dr hab. Marcin Mączyński, prof. uczelni