



Instytut Farmakologii  
Polskiej Akademii Nauk

Zakład Chemii Leków

INSTYTUT FARMAKOLOGII  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
ul. Smętna 12  
31-343 Kraków  
**Dyrektor**  
telefon: (12) 662 32 96  
(12) 637 48 93

**Centrala**  
telefon: (12) 662 32 20  
(12) 637 40 22  
fax: (12) 637 45 00  
**e-mail:** ifpan@if-pan.krakow.pl  
www.if-pan.krakow.pl

Kraków, 31-08-2015

## Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Wrony wykonanej pod kierunkiem prof. Tadeusza Holaka w Zakładzie Chemii Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Praca doktorska Pani mgr Ewy Wrony została napisana po angielsku i nosi tytuł: "Small-molecule inhibitors of the Mdm2-p53 protein-protein interaction. Substituted 1,5-dihydro-2*H*-pyrrol-2-ones and tetrazoles". Opisuje ona syntezę związków z grup 1,5-dihydro-2*H*-pirol-2-onu i tetrazolu oraz analizę ich aktywności jako potencjalnych inhibitorów białek Mdm2-p53. Interakcja białek p53-Mdm2 oraz próby jej zahamowania, są szeroko opisywane w literaturze naukowej w kontekście tworzenia potencjalnej nowoczesnej, niegenotoksycznej terapii przeciwnowotworowej. Tematyka przedstawionej dysertacji dotyczy istotnych zagadnieniach współczesnej nauki z dziedziny chemii organicznej oraz chemii medycznej.

Prezentowana rozprawa doktorska składa się z czterech części opisanych na 208 stronach. W kilkunastostronicowej części pierwszej, Doktorantka przedstawia biochemiczne podstawy stojące za syntezą prezentowanych inhibitorów białek Mdm2-p53, poparte przez 86 pozycji literaturowych, zarówno źródłowych, jak i o charakterze przeglądowym. Szczególny nacisk Doktorantka kładzie na opis wzajemnej interakcji białek Mdm2-p53 oraz analizę oddziaływań pomiędzy znanymi inhibitorami a docelowym białkiem. Wybór prezentowanych inhibitorów wydaje się być trafny i przedstawia przekrój pomiędzy najstarszymi aktywnymi inhibitorami oraz najnowszymi, będącymi obecnie w testach klinicznych. Dwa ostatnie opisywane związki odnoszą się bezpośrednio do pracy prezentowanej w dalszej części rozprawy. Pierwszy z nich ilustruje możliwość tworzenia dimerów białka Mdm2, a drugi nowy, 4-punktowy model oddziaływania, stworzony dzięki indukowanemu powiększeniu kieszeni wiążących białka Mdm2. Warto podkreślić, że Doktorantka jest współautorką pracy opisującej ten ostatni przykład. Całość dobrze i zwięźle przedstawia ogólny mechanizm i stan wiedzy w przedstawianej tematyce, ułatwiając dalszą lekturę.

W części drugiej i trzeciej pracy Autorka opisuje przeprowadzone syntezy oraz analizę otrzymanych pochodnych. Część drugą – opisującą pochodne 1,5-dihydro-2*H*-pirol-2-onu – Doktorantka przedstawia jako główną część swojej pracy, natomiast część trzecia obejmuje pochodne tetrazolu, która jako grupa związków jest nadal w trakcie rozwoju. Ilość końcowych połączeń otrzymanych w tych dwóch projektach to odpowiednio 14 i 24 nowe związki, przy czym ta dysproporcja wynika z innego podejścia syntetycznego zastosowanego w obu grupach – syntezy linowej dla pochodnych pirol-2-onu oraz syntezy wieloskładnikowej w przypadku pochodnych tetrazolu. Warto zauważyć, że syntezę pochodnych tetrazolu Doktorantka prowadziła w ramach projektu Etiuda w grupie prof. Alexandra Dömlinga (Groningen, NL).

Część opisująca pochodne pirol-2-onu rozpoczyna się od krótkiego wstępu przedstawiającego idee przyświecające syntezie zaproponowanych pochodnych w kontekście dostępnej wiedzy. Główna część tego projektu została podzielona w sposób logiczny na dwa podrozdziały: pierwszy, opisujący syntezę oraz drugi, aktywność otrzymanych związków. Część syntetyczna rozpoczyna się od bardzo szczegółowego opisu dostępnych metod syntezy pochodnych

5-hydroxy-1,5-dihydro-2H-pirol-2-onu, ilustrowanej licznymi schematami oraz odnośnikami literaturowymi, z czego żaden nie dotyczył pozycji przeglądowych. W następnym etapie Doktorantka przedstawia wykorzystaną przez siebie syntezę z użyciem jednego z prezentowanych wcześniej podejść – addycji związków metaloorganicznych do grupy karbonylowej podstawionych maleimidów lub alternatywnie ich redukcji. Jednakże większość opisu badań własnych nie odnosi się bezpośrednio do tych reakcji lecz do syntezy odpowiednich prekursorów. Poszukiwane podstawione maleimidy Doktorantka otrzymuje z użyciem dwóch dróg syntetycznych, wykorzystując znane przemiany stosowane w syntezie analogicznych układów. Interesującym jest fakt, że Autorka potrafi przekształcić wady zaprojektowanej syntezy w jej zalety. Mowa tu o otrzymywaniu w wyniku reakcji Gringarda dwóch izomerycznych produktów, które Doktorantka rozdziela, oczyszcza i osobno analizuje. Cecha ta pojawia się również w innych aspektach prezentowanej syntezy, a konkretnie wykorzystanie produktów ubocznych, tj. izolowanych tlenowych analogów otrzymanych maleimidów, a w konsekwencji pochodnych 1,5-dihydro-2H-furan-2-onu oraz pochodnych metylowanych na atomie azotu pierścienia indolowego. W przeprowadzonej syntezie, zastanawiającym jest jednakże wybór grupy zabezpieczającej zawierającej w swojej strukturze ugrupowanie karbonylowe, w szczególności w kontekście prowadzonej reakcji Gringarda. Pomimo faktu, że uzyskane wydajności reakcji są raczej średnie, Doktorantce udaje się w pełni scharakteryzować oraz przeanalizować wszystkie otrzymane pochodne. Dodatkowo, struktury końcowych par izomerów zostały przypisane i rozróżnione za pomocą metod rentgenograficznych oraz dwuwymiarowego jądrowego rezonansu magnetycznego (NOESY).

Po opisanie syntezy zaprojektowanych związków Doktorantka przechodzi do opisu analizy aktywności otrzymanych pochodnych. Do wyznaczenia wartości parametrów wiązania do białka Mdm2 wykorzystuje metodę dwuwymiarowego jądrowego rezonansu magnetycznego ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC), której główne założenia najpierw przedstawia w formie krótkiego wstępu literaturowego. Przeprowadzone przez siebie badania Doktorantka szczegółowo opisuje ilustrując i objaśniając wszystkie etapy pracy z wykorzystaniem licznych rysunków, ułatwiających odbiór całości. Na podstawie otrzymanych danych wyciąga wnioski odnośnie zależności aktywności od struktury otrzymanych pochodnych. Generalnie, wynikiem prowadzonych prac na tym etapie jest identyfikacja dwóch związków posiadających stałą wiązania do badanego białka poniżej  $1\ \mu\text{M}$ , a będących w stosunku do siebie izomerycznymi strukturami o pierścieniach 1,5-dihydro-2H-pirol-2-onu oraz furan-2-onu. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę, że zastosowana przez Doktorantkę metoda oznaczenia aktywności zsyntezowanych związków nie należy do standardowych, co oczywiście nie jest wadą *per se*, jednakże brak wyników dla związków referencyjnych badanych równoległe jako kontrola testu, nie pozwala na rzeczywistą ocenę siły ich aktywności. Porównanie wartości dla najaktywniejszych pochodnych **1a** i **2a** wyznaczone na poziomie  $K_d < 1\ \mu\text{M}$ , do przytoczonych przez Doktorantkę w części teoretycznej związków charakteryzujących się przeważnie powinowactwem rzędu kilku- kilkunastu lub kilkudziesięciu nanomoli (wyznaczonym za pomocą różnych technik) sugeruje raczej umiarkowaną potencjał nowej grupy inhibitorów. Powstaje także pytanie o zakres stosowalności metody NMR przy podanej 30% precyzji.

Sposób oddziaływania najaktywniejszych otrzymanych przez Doktorantkę pochodnych z białkiem Mdm2 zostaje następnie opisany i przeanalizowany na podstawie wyników badań rentgenostrukturalnych. W części tej zamieszczono wyczerpujący opis obserwowanych interakcji ilustrowany licznymi wysokiej jakości rysunkami. Jako najważniejsza, nowatorska cecha otrzymanych pochodnych, zostaje przedstawiona ich zdolność do powodowania dimeryzacji białka Mdm2. W celu potwierdzenia tego zjawiska Doktorantka prezentuje dodatkowe badania, oparte na analizie widm protonowych białka Mdm2 miareczkowanego jednym z ligandów. Dodatkowo, w części tej pojawiają się propozycje dotyczące dalszej optymalizacji otrzymanych pochodnych.

Podsumowując, prezentowane w tej części badania zawierają szczegółowy opis syntezy oraz analizy otrzymanych pochodnych, a jej wyniki zostały przedstawione w Polskim Urzędzie Patentowym jako zgłoszenie patentowe oraz są przygotowywane do dalszej publikacji.

Kolejna część pracy zawiera opis badań dotyczących syntezy pochodnych tetrazolu. Struktura prezentowanych wyników jest analogiczna do tej z poprzedniej części – zaczyna się od krótkiego wstępu opisującego projekt syntezy pochodnych oraz jego główne założenia, w tym wykorzystanie 4-punktowego modelu wiązania, a część główna została podzielona na opis syntezy oraz analizę aktywności otrzymywanych pochodnych. Część syntetyczną poprzedza krótki opis wykorzystywanego podejścia – reakcji wieloskładnikowej (MCR), ze szczególnym uwzględnieniem prowadzonej reakcji Ugi oraz jej zastosowania w syntezie pochodnych tetrazolu. Tak jak poprzednio, fragment ten jest ilustrowany licznymi odnośnikami literaturowymi i przedstawia logiczne podkreślenie wykorzystania reakcji wieloskładnikowych w kontekście chemii medycznej. W następnej kolejności Doktorantka prezentuje przeprowadzoną syntezę, zaczynając od ogólnego schematu reakcji oraz metod stosowanych w otrzymywaniu potrzebnych prekursorów, z głównym naciskiem położonym na syntezę izocyjanków. Autorka w sposób przejrzysty i trafny dzieli otrzymane przez siebie izocyjanki na 3 grupy, na podstawie różnic ich struktur (izocyjanki otrzymane na bazie podstawionych anilin, benzyloksy anilin oraz benzyloksy benzyloamin). Schematy syntezy oraz wydajności poszczególnych izocyjanków Doktorantka przedstawia za pomocą schematów i tabel, które dobrze ilustrują przeprowadzone badania. Wprowadzony podział, zachowany jest również w opisie prowadzonej reakcji Ugi oraz hydrolizy otrzymanych produktów kondensacji, a otrzymane wyniki prezentowane są w trzech tabelach. Niewątpliwy sukces zastosowania metody reakcji wieloskładnikowej owocuje otrzymaniem 24 nowych połączeń. W tym miejscu nasuwa się pytanie czy Doktorantka w swojej pracy próbowała zastosować tego typu podejście również w syntezie pochodnych piroli, gdzie zastosowana synteza liniowa znacząco obniżyła wydajność i w konsekwencji, liczbę otrzymanych połączeń. Należy zwrócić uwagę, że struktura wszystkich prezentowanych pochodnych jest oparta na fragmencie indolowym wprowadzonym do reakcji Ugi jako komponent karbonylowy. Z szerokiej gamy wykorzystanych izocyjanków o konsekwentnie wybranych strukturach, Doktorantka przeprowadziła co najmniej dwie reakcje Ugi wykorzystując aminy: amylową i cykloheksylometylową oraz dla niektórych również inne aminy (4-chlorobenzyloaminę, cyklobutyloaminę, 2-morfolinoetyloaminę). Rezultatem takiego podejścia jest grupa pochodnych dających możliwość dokładnej analizy aktywności w zależności od struktury potencjalnych inhibitorów.

Aktywność pochodnych tetrazolu została tym razem zmierzona poprzez zastosowanie metody fluorescencyjnej, a badania te przeprowadzono na Wydziale Biotechnologii, Biochemii i Biofizyki UJ. W tym miejscu natychmiast nasuwa się pytanie, dlaczego w przypadku otrzymanych w poprzednim projekcie związków, nie przeprowadzono analogicznych badań, choćby dla najbardziej aktywnych połączeń? Pozwoliłoby to na porównanie wyników aktywności obu grup pochodnych. Niestety, znów brakuje aktywności związków referencyjnych i ich porównania z wynikami dla otrzymanych inhibitorów.

Otrzymane dane zaprezentowano w czytelny sposób, przedstawiając struktury z kolorowymi fragmentami składowych reakcji Ugi oraz wyznaczoną aktywnością związków. Również tutaj zachowany jest wprowadzony podział na trzy serie. Na podstawie prezentowanych danych Doktorantka opisała kilka tendencji i wniosków odnośnie zależności struktura-aktywność badanych pochodnych. Jako najważniejsze potencjalne inhibitory wyróżnione zostały pochodne oparte na wydłużonym izocyjanku, zsyntetyzowanym na bazie podstawionej benzyloksy benzyloaminy, a których wartości stałej inhibicji znajdują się poniżej 100 nM (dla pochodnej fluorowej 20 nM). Należy zwrócić uwagę, że wszystkie otrzymane pochodne wykazują aktywność w badanym układzie ze stałymi inhibicji w przedziale 36,0–0,02  $\mu$ M. Cały rozdział zakończony jest podsumowaniem otrzymanych wyników oraz opisem badań planowanych do przeprowadzenia w

kontekście szerszej i dokładniejszej analizy zsyntezowanych pochodnych jako potencjalnych inhibitorów Mdm2-p53, prezentując interesujący kierunek dalszych badań.

Podsumowując wyniki prezentowane w części II i III należy zwrócić uwagę na liczbę nowych związków (38 końcowych połączeń), konsekwentny i kreatywny sposób otrzymywania oraz dokładną analizę ich właściwości. Główną uwagą, jaka nasuwa się podczas lektury, jest wspomniany już wyżej fakt, że prezentowane związki nie zostały przebadane pod kątem aktywności w jednorodny sposób oraz że nie włączono do testów żadnego związku referencyjnego, na co uczulam Doktorantkę w perspektywie planowanych przez nią dalszych badań.

Ostatnia, część pracy, opisana na 72 stronach, zawiera szczegółowo zaprezentowane dane eksperymentalne i analizy otrzymanych pochodnych. Dotyczą one zarówno charakterystyki wszystkich połączeń chemicznych, opisu i szczegółowych wyników prowadzonych pomiarów miareczkowania metodą  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, jak i dodatkowe dane krystalograficzne. Prezentowane dane nie budzą żadnych zastrzeżeń i w pełni uzupełniają przedstawione wyniki w częściach II i III.

Na końcu dysertacji znajduje się spis figur, tabel oraz bibliografia składająca się z 236 pozycji (która niestety nie zawiera tytułów artykułów).

Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Wrony w sposób interesujący i jasny przedstawia prowadzone przez Nią badania z dziedziny chemii medycznej – syntezę i badania aktywności inhibitorów białek Mdm2-p53 o potencjalnym zastosowaniu przeciwnowotworowym. Jako dodatkowy atut należy uznać, iż praca została przedstawiona w komunikatywnym języku angielskim; chociaż zawiera sporą liczbę drobnych błędów językowych i edycyjnych. Nie wymieniam ich, ponieważ zasadniczo nie mają one wpływu na ocenę merytoryczną dysertacji, natomiast czuję się w obowiązku podnieść jedną z istotnych formalnych pomyłek, a mianowicie zamianę nazw Wydziału i Zakładu Alma Mater Doktorantki, która to widnieje na tytułowej stronie rozprawy. Zatem powinno być Faculty of Chemistry (zamiast Faculty of Organic Chemistry) i odpowiednio dla Zakładu Chemii Organicznej – Department of Organic Chemistry (a nie Department of Chemistry).

Podsumowując, recenzowana praca doktorska Pani mgr Ewy Wrony w pełni spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Ewy Wrony do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Bzajka