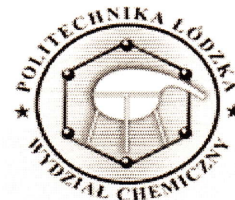




# POLITECHNIKA ŁÓDZKA

## INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ



Żeromskiego 116  
90-924 Łódź  
Tel: +42-631-31-46

Prof. dr hab. inż. Tadeusz Gajda

Łódź, 31.10.2016 r.

### RECENZJA

Pracy doktorskiej pana mgr. **Tomasza Cierpiała**  
p.t.: „**Fluorowe i selenowe analogi sulforafanu – synteza i badanie aktywności przeciwnowotworowej**”

Przedstawiona Radzie Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych w Łodzi  
celem uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja pana mgr. Tomasza Cierpiała została wykonana w Zakładzie Chemii Heteroorganicznej CBMM w Łodzi pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Piotra Kiełbasińskiego. Promotorem pomocniczym rozprawy jest dr inż. Piotr Łyżwa z tego samego Zakładu. Praca poświęcona jest syntezie i badaniu aktywności przeciwnowotworowej fluorowych i selenowych analogów sulforafanu (SFN).

Wiele roślin bada się pod kątem wykorzystania ich jako potencjalnego źródła związków o aktywności przeciwnowotworowej. Specjalną rolę odgrywają rośliny z rodziny krzyżowych do których należą między innymi brokuły, brukselka czy wasabi. Wykazano, że spożywanie tych roślin redukuje ryzyko zachorowania na raka, a wysoki potencjał przeciwnowotworowy i efekt chemoprewencyjny roślin krzyżowych związany jest z dużą zawartością obecnych w nich glukozynolanów. Biologicznie aktywne izotiocyjaniany są elementem mechanizmu obronnego roślin i powstają z glukozynolanów w wyniku ich katalitycznego rozkładu za pomocą mirozynazy. Izotiocyjaniany tworzą się także w procesie trawienia roślin krzyżowych w przewodzie pokarmowym. Naturalne izotiocyjaniany takie jak np. sulforafan, selektywnie hamują wzrost komórek nowotworowych *in vivo* i indukują ich apoptozę, charakteryzując się przy tym niską toksycznością. Badania dotyczące syntezy i aktywności biologicznej analogów SFN znajdują się w ważnym nurcie badań mających na celu znalezienie związków, które będą charakteryzowały się wyższą niż SFN aktywnością przeciwnowotworową. Cel rozprawy został precyzyjnie sformułowany. Realizacja programu badań wymagała od Doktoranta biegłości w syntezie organicznej i w chemii medycznej oraz dobrego opanowania warsztatu eksperymentalnego.

Na podkreślenie zasługuje pokaźny dorobek naukowy Doktoranta. Jest współautorem pięciu artykułów wydanych w prestiżowych czasopismach zagranicznych (*Eur. J. Med. Chem.*, *PLOS One*, *ChemMedChem*, *Tetrahedron: Asymmetry*, *J. Mol. Catal.*, *B Enzym.*) o wysokich współczynnikach wpływu (IF = 2,65–3,49). Prace opublikowane w *Eur. J. Med. Chem.*, *PLOS One* oraz w *ChemMedChem*, w której doktorant jest pierwszym autorem, są związane z tematyką rozprawy doktorskiej. Pan mgr Tomasz Cierpień jest także współautorem jednego patentu i zgłoszenia patentowego (związanych z tematyką rozprawy) oraz 11 komunikatów zaprezentowanych na konferencjach krajowych. Doktorant był kierownikiem projektu badawczego własnego finansowanego przez NCN oraz wykonawcą w trzech innych projektach finansowanych z różnych źródeł.

Układ i opis pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich. Praca liczy 181 stron ponumerowanych, z których 59 zajmuje wprowadzenie i część ogólna (literaturowa), 55 badania własne z podsumowaniem wyników badań, resztę stanowi część eksperymentalna wraz z literaturą cytowaną (206 pozycji). W pracy zamieszczono spis dorobku naukowego Autora oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Pod względem edytorskim praca wydana jest estetycznie, a widoczne w niej niedociągnięcia są ewidentnie efektem presji czasu podczas finalizacji rozprawy. Liczba uchybień związanych z nieprawidłową, moim zdaniem nomenklaturą związków organicznych i błędami edytorskimi nie przekracza średniego poziomu porządnej pracy doktorskiej. Uważam natomiast, że mankamentem rozprawy jest brak w podsumowaniu szerszej rekapitulacji wyników badań biologicznych zajmujących znaczną część pracy.

Z zainteresowaniem przeczytałem część ogólną rozprawy poświęconą sulforafanowi i jego zmodyfikowanym analogom. Zawarty tam materiał mimo, że nie ma charakteru wyczerpującego przeglądu, odzwierciedla aktualny stan wiedzy w tej dziedzinie i jest dobrym wprowadzeniem do badań własnych doktoranta. Przedstawiony przegląd byłby spójniejszy gdyby do tej części włączyć fragment poświęcony izoselenocyjanianom. Moje zastrzeżenia budzi natomiast sposób opisu związków fluoroorganicznych. Został potraktowany hasłowo, wiadomości tam zamieszczone można znaleźć w podręczniku do chemii nieorganicznej lub chemii leków, a jedynym łącznikiem z pracą autora jest to, że jego głównym bohaterem jest fluor. Uważam, że krótki fragment opisujący znaczenia fluoru w chemii medycznej mógłby równie dobrze znaleźć się w badaniach własnych.

Opis badań własnych został przedstawiony przez Doktoranta w sposób komunikatywny. Nie stawiam przed sobą zadania szczegółowego omówienia wyników badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej pana mgr. Tomasza Cierpieńa ponieważ duża część z nich została zweryfikowana publikacjami w renomowanych czasopismach.

Na podstawie analizy aktywności opisanych w literaturze pochodnych sulforafanu Doktorant założył, że swoje poszukiwania ograniczy do syntezy takich analogów, w których centralny atom siarki oddziela od grupy izotiocyjanianowej czterocząłowy i pięciocząłowy nierozgałęziony łącznik węglowy. Mając na uwadze, że obecność atomów fluoru i selenu w wielu związkach organicznych wpływa na wzrost ich aktywności biologicznej, Doktorant postanowił wprowadzić te pierwiastki do

otrzymywanych związków. Badania własne podzielono na trzy części. W pierwszej, najobszerniejszej opisano metody syntezy analogów SFN, w których grupę metylową przy centralnym atomie siarki o różnym stopniu utlenienia zastąpiono alkilowymi lub aryłowymi podstawnikami fluoroorganicznymi. Do syntezy analogów Autor zastosował dwie strategie. Kluczowe w tych ścieżkach syntetycznych sulfidy otrzymano w reakcji alkilowania polifluoroalkilo/arylo tioli handlowo dostępnymi *N*-( $\omega$ -bromoalkilo)ftalimidami. Łącznie otrzymano 13 sulfidów. Poddano je hydrazynolizie, a otrzymane aminopochodne, w większości bez wyodrębniania, przekształcono w reakcji z tiofosgenem lub DPT w izotiocyaniany – pochodne sulfidów. Utlenienie sulfidów kwasem *m*-chloroperbenzoesowym (mCPBA) dało docelowe polifluorowane pochodne sulforafanu z umiarkowanymi lub wysokimi wydajnościami (alternatywnie aminopochodne najpierw utleniono, a potem przekształcono w izotiocyaniany). Inna strategia polegała na utlenieniu pochodnych sulfidów z grupą aminową zabezpieczoną grupą ftalilową za pomocą mCPBA, hydrazynolizie otrzymanych analogów sulfinylowych do aminopochodnych i syntezie docelowych izotiocyanianów w reakcji z tiofosgenem lub DPT (wyniki badań opatentowano). Mimo, że zaprojektowane nowe związki otrzymano przez analogię do metod opisanych w literaturze, nie umniejsza to w żaden sposób twórczej roli autora w tych syntezach. W mojej opinii „sztuka syntezy” nie polega jedynie na znajdowaniu nowych metodologii (co przy postępie syntezy organicznej jest coraz trudniejsze), ale również na umiejętności zaadaptowania istniejących metod do własnych potrzeb.

Doktorant podjął także próby stereoselektywnego utlenienia sulfidowych analogów izotiocyanianów do sulfinylowych pochodnych, niestety bez pozytywnych wyników. Reakcje zachodziły niestereoselektywnie albo, jak w przypadku stosowania peroksydaz, nie obserwowano tworzenia produktu utlenienia. Sukcesem zakończyło się natomiast rozszczepienie czterech racemicznych sulfinylowych pochodnych na antypody optyczne za pomocą semipreparatywnej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC z chiralną fazą stałą. Konfigurację absolutną krystalicznych izotiocyanianów (*R*)- i (*S*)-**TC-8b** oraz ich ftalimidowych prekursorów (*R*)- i (*S*)-**TC-5a** potwierdzono za pomocą analizy rentgenograficznej. Ciekłym enancjomerom **TC-8a** konfigurację przypisano na drodze korelacji chemicznych, a dla związku **TC-8c** autor sprytnie wykorzystał dichroizm kołowy do skorelowania konfiguracji enancjomerów tego związku z konfiguracjami określonych wcześniej (*R*)- i (*S*)-**TC-8b**.

Autor włączył się także w badania metodologiczne dotyczące metod określania cytotoksyczności wykonywane przez Zespół profesora Chilmonczyka z Narodowego Instytutu Leków. Efektem współpracy był artykuł opublikowany w *Plos ONE*.

W Zakładzie Biologii Komórki NIL określono cytotoksyczność *in vitro* w stosunku do linii komórkowych czerniaka (MALME-3M) trzech par optycznie czynnych fluorowanych izotiocyanianów **TC-8a**, **TC-8b** i **TC-8c**. Nie wnikając w szczegóły, obserwowano wyższe lub zbliżone do (*R*)-SFN cytotoksyczności. Uzyskane wyniki wskazują również na to, że w przeciwieństwie do sulforafanu, brak jest korelacji pomiędzy konfiguracją absolutną a aktywnością

biologiczną otrzymanych pochodnych. Sugeruje to odmienny od sulforafanu mechanizm działania fluorowanych izotiocyjanianów (wyniki badań opublikowano w *Eur. J. Med. Chem*). Wstępne wyniki badań pozostałych, otrzymanych przez Doktoranta fluorowanych analogów SFN w stosunku do linii komórkowych MALME-3M i gruczolaka piersi (MDA-MB-231) wykazały, że ich cytotoksyczność była znacznie wyższa niż referencyjnego (*R*)-SFN. Szczególnie aktywny w stosunku do linii MDA-MB-231 był związek **TC-8I** ( $IC_{50} = 0,57 \mu M$ ; (*R*)-SFN,  $IC_{50} = 23,06 \mu M$ ). Potwierdza to tezę Autora, że inkorporacja atomów fluoru do analogów SFN wpływa w istotny sposób na wzrost ich aktywności cytotoksycznej.

W drugiej części Doktorant zajął się syntezą i analizą aktywności fluorowych pochodnych sulforafanu, w których grupę -NCS zastąpiono grupą izoselenocyjanianową. Inspiracją do podjęcia tych badań była znana z literatury, wyższa niż naturalnego SFN, cytotoksyczność takiego izoselenocyjanianowego analogu SFN w stosunku do komórek nowotworowych. Wprowadzenie grupy izoselenocyjanianowej do docelowego analogu wymagało zastosowania odmiennej strategii. Autor oparł się na precedensach literaturowych. Wykorzystał otrzymane przez siebie sulfidy  $\omega$ -aminoalkilo-polifluoroalkilo/arylowe i przekształcił je w dwuetapowej reakcji (także w wersji „one-pot”) najpierw z mrówczanem etylu w odpowiednie formamidy, które w reakcji z elementarnym selenem dały pożądane  $\omega$ -izoselenocyjanianoalkilowe pochodne sulfidów. Zsyntezowano osiem nieopisanych dotąd pochodnych. Próby przekształcenia sulfidów w pochodne sulfinyłowe zakończyły się niepowodzeniem. Sukces przyniosła zmiana strategii. Otrzymane wcześniej sulfinyłowe  $\omega$ -aminoalkilopochodne przekształcono w warunkach reakcji PTC w izonitryle, które z elementarnym selenem dały z wysokimi wydajnościami docelowe sulfinyłowe pochodne izoselenocyjanianów. Otrzymano cztery nowe, zróżnicowane strukturalnie izoselenocyjanianowe analogi SFN. Szkoda, że Doktorant w swoich rozważaniach nie wziął pod uwagę możliwości wykonania takich syntez w warunkach PTC w wersji „one-pot” (J. Zakrzewski i wsp., *Synthesis* **2016**, 48, 85.)

Otrzymane analogi poddano ocenie na aktywność przeciwnowotworową w stosunku do dwóch linii gruczolaka piersi (MCF-7 i MDA-MB-231), a analogi sulfinyłowe także w stosunku do linii komórkowej MALME-3M. Wszystkie pochodne, z wyjątkiem jednej, charakteryzowały się wyższą selektywnością ( $SI > 3$ ) oraz wyższą cytotoksycznością w stosunku do komórek nowotworowych w porównaniu z SFN. Efektem tych działań jest artykuł opublikowany w *ChemMedChem*.

Kolejnym logicznym celem Autora była synteza selenidów – fluoroorganicznych analogów sulforafanu z czterowęglowym łącznikiem, w których grupę sulfinyłową zastąpiono selenem. Autor otrzymał kluczowe selenidy 4-(*N*-ftalimido)butylo-fluoroarylowe według zmodyfikowanej procedury literaturowej w reakcji bromków aryloselenomagnezowych z *N*-(4-bromobutylo)ftalimidem. Poddał je hydrazynolizie, a otrzymane aminopochodne, przekształcił w standardowy sposób w reakcji z tiofosgenem w docelowe izotiocyjaniany. Trzy nieopisane dotąd selenidy otrzymano z umiarkowanymi wydajnościami. Dwa z nich zbadano pod kątem aktywności przeciwnowotworowej na linii komórkowej MALME-3M i MDA-MB-231. Wstępne wyniki wskazują, że mają one lepszą od

(R)-sulforafanu aktywność w stosunku do linii komórkowej gruczolaka piersi. Szczególnie silne działanie wykazywał związek oznaczony symbolem **TC-24a** (po 72 h inkubacji:  $IC_{50} = 5,69 \mu\text{M}$ ; (R)-SFN,  $IC_{50} = 26,02 \mu\text{M}$ ). Selenidy miały także lepsze od SFN aktywności w stosunku do linii komórkowej MALME-3M.

*Na zakończenie chciałbym się podzielić jeszcze kilkoma uwagami na temat przeczytanego tekstu:*

1) Zauważyłem w rozprawie pewną ilość błędów (z których wybrane wymieniam: s. 42 bis-tioamidy zamiast bis-tiomoczniki; s. 95 kataliza dwufazowa zamiast kataliza przeniesienia międzyfazowego) i uchybień edytorskich. Brakuje zwyczajowo zamieszczanego w pracach wykazu stosowanych skrótów. Niepoprawne jest moim zdaniem używanie przez autora określenie „chemioprewencja” zamiast „chemoprewencja”. W wielu schematach przy opisach reakcji pojawiają się indeksy dolne lub górne zamiast normalnego tekstu. Niektóre skróty nazw czasopism są podane nieprawidłowo. Uważam, że stosowanie w badaniach własnych dwóch różnych numerów dla tego samego związku (jednego z części ogólnej, drugiego z badań własnych) nie jest najszcześniejszym pomysłem (s. 75: „Alyssin” **68** i **TC-9b**; 4-izotiocyanianoheksan-2-on **52** i **TC-10a**).

2) Schematy reakcji zamieszczone w pracy (oczywiście poza wzorami związków biorących udział w przedstawionych transformacjach) ograniczają się wyłącznie do pokazania użytych reagentów. Brak jest szczegółów opisujących warunki syntezy oraz wydajności poszczególnych przemian (trzeba ich szukać w części eksperymentalnej). Korzystne byłoby też powiązanie w kilku miejscach schematów syntez z rysunkami otrzymanych związków.

3) Mechanizm utlenienia sulfidów do pochodnych sulfinylowych za pomocą mCPBA jest chyba znany, a umieszczenie *Schematu 55* na stronie 70 jest nieporozumieniem ponieważ już wcześniej (*Schemat 49* i *50*) taka reakcja utleniania została przez Autora opisana.

4) Czym podyktowany był wybór tiofosgeny vs DPT do syntezy izotiocyanianów.

5) W pracy zamieszczono dwukrotnie ten sam schemat - raz jako *Schemat 65* (s. 105), na następnej stronie zaś jako *Schemat 66* (s. 106).

6) *Schemat 66* (s. 106) przedstawia syntezę docelowych izotiocyanianów oznaczonych symbolem **TC-24**. Transformacje te zachodzą *via* pochodne **TC-20**, **TC-21**, **TC-19** i **TC-23**. Opis syntezy umieszczony w tekście urywa się na omówieniu otrzymywania związków **TC-19**. Ciąg dalszy syntez natomiast jest, nie wiadomo dlaczego, kontynuowany na *Schematach 68* i *69*.

7) Wykres aktywności Sulforafanu **1** w stosunku do linii komórkowej MALME-3M podano raz jako *Rysunek 18* (s. 88), a drugi raz jako *Rysunek 34* (s. 111). Analogicznie wykres aktywności SFN **1** w stosunku do linii MDA-MB-231 pokazany jest jako *Rysunek 22* (s. 89), a drugi raz jako *Rysunek 31* (s. 110).

8) Część eksperymentalna dysertacji jest opisana czytelnie. Brakuje jednak temperatur topnienia krystalicznych związków. Nie znalazłem także w części eksperymentalnej opisu referencyjnych izotiocyanianów, o których Autor wspomina w badaniach własnych.

Omówione w recenzji osiągnięcia pana mgr Tomasza Cierpiała składają się na spójny i ciekawy projekt badawczy. Należy podkreślić trafność i aktualność podjętej tematyki badawczej, a uzyskane wyniki badań mają istotne znaczenie poznawcze w projektowaniu nowych leków o działaniu przeciwnowotworowym. Miałem okazję recenzować interesującą i dobrą pracę doktorską, a przytoczone wyżej uwagi mają wyłącznie charakter formalny lub polemiczny i w niczym nie umniejszają walorów naukowych rozprawy, którą oceniam wysoko z merytorycznego punktu widzenia.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przez ustawę o stopniach i tytule naukowym i o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 14 marca 2003r z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych w Łodzi o dopuszczenie pana mgr. Tomasza Cierpiała do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na względzie wysokie walory poznawcze przedstawionej do recenzji rozprawy, spójną interpretację wyników oraz duży jak na rozprawę doktorską dorobek naukowy Doktoranta, zwracam się z dodatkowym wnioskiem o wyróżnienie powyższej pracy.

