



Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej

90-924 Łódź
ul. Żeromskiego 116
Prof. dr hab. inż. Aleksandra Olma
e-mail: aleksandra.olma@p.lodz.pl

Łódź, 18. 01. 2018 r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Alenowicz

**PROJEKTOWANIE I SYNTEZA KONIUGATÓW PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH KOMÓRKĘ
Z BIOLOGICZNIE AKTYWNYMI CZĄSTECZKAMI O KORZYSTNIEJSZYCH
WŁAŚCIWOŚCIACH FARMAKOLOGICZNYCH**

Praca doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Alenowicz została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, w Katedrze Biochemii Molekularnej, w Pracowni Chemii Związków Biologicznie Czynnych pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Rekowski. Celem rozprawy były próby poprawy właściwości terapeutycznych dwóch leków, znanych od wielu lat: cisplatyny (cytostastyku stosowanego w chemioterapii wielu rodzajów nowotworów) oraz wankomycyny (antybiotyku glikopeptydowego o szerokim spectrum działania, stosowanego również na szczepy gronkowca złocistego odpornego na metycylinę). Poszukiwanie leków przeciwdrobnoustrojowych, jak również przeciwnowotworowych, jest jednym z głównych celów współczesnej chemii medycznej, a wśród testowanych obecnie związków, potencjalne leki onkologiczne zajmują czołowe miejsce. W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są równoległe badania nad transportem znanych leków do komórki, w tym przeciwnowotworowych (np. doksorubicyna, metotreksat czy paklitaksel), co pozwala na stosowanie mniejszych dawek, zwiększa ich skuteczność oraz redukuje efekty niepożądane. Jedną z najbardziej obiecujących metod jest wykorzystanie do tego celu odkrytych stosunkowo niedawno peptydów penetrujących komórkę CPP (*Cell Penetrating Peptides*). Doktorantka w swojej dysertacji włączyła się w ten bardzo aktualny nurt badań.

Praca licząca 122 strony ma typowy układ dla tego typu opracowań. Przegląd literaturowy liczący 27 stron składa się z pięciu nie związanych ze sobą rozdziałów, poświęconych omówieniu na dość podstawowym poziomie peptydów penetrujących komórkę, transportu 10, chemii „click” oraz właściwości cisplatyny i wankomycyny, które mają stanowić wprowadzenie do badań własnych. Moim zdaniem, korzystniejsze dla rozprawy byłoby poświęcenie części literaturowej szerszemu omówieniu peptydów penetrujących komórkę, ich wykorzystaniu w chemii medycznej i farmakologii.

Natomiast krótkie informacje dotyczące wankomycyny, cisplatyny i chemii „click” powinny być wstępami do odpowiednich rozdziałów w badaniach własnych.

Mgr inż. Alenowicz postawiła sobie ambitny cel jakim było zaprojektowanie i synteza peptydów z grupy CPP z sondami fluorescencyjnymi oraz zbadanie ich właściwości biologicznych. Do znakowania peptydów wybrała dwie sondy fluorescencyjne: 6-karboksytetrametylorodaminę (TAMRA) oraz 6-karboksyfluoresceinę. Peptydy wykorzystane w badaniach otrzymała na nośniku polimerowym (żywica TentaGel S Ram) według strategii Fmoc/Boc z użyciem syntezy półautomatycznego lub automatycznego. Po usunięciu z żywicy wszystkie peptydy zostały oczyszczone a ich charakterystyka nie budzi zastrzeżeń. Do wybranych peptydów penetrujących komórkę wprowadzona została reszta alkinowa, natomiast TAMRA zawierała linker z grupą azydkową, co pozwoliło przeprowadzić zaplanowaną reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena. Fluoresceina była użyta w postaci estru sukcyimidowego. Doktorantka otrzymała 22 modyfikowane peptydy, analogi fragmentu białka Tat(47-57) wirusa HIV (PTD4), sekwencji translokacji membranowej (MTS), transportanu (TP) oraz transportanu 10 (TP10), które wykorzystwała do dalszych badań. Do syntezy kowalencyjnych koniugatów z użyciem chemii „click” niezbędna była synteza pochodnej wankomycyny z ugrupowaniem azydkowym. Doktorantka wybrała opisaną w literaturze dla antybiotyków glikopeptydowych selektywną reakcję redukcyjnego alkilowania grupy aminowej aminocukru. Nie udało się jednak zrealizować utlenienia azydoalkoholu (N_3 -PEG₄(CH₂)₂OH) do azydoaldehydu za pomocą bis(acetoksyjodobenzenu) wobec TEMPO jako katalizatora. Mimo zastosowania różnych warunków reakcji - głównym wyizolowanym produktem był kwas karboksylowy. Szkoda, że nie podjęła ona próby wykorzystania innych metod utlenienia alkoholi pierwszorzędowych do aldehydów opartych na aktywacji dimetylosulfotlenku, takich jak utlenianie Swerna`a, Pfizner–Moffatt`a czy Parikha-Doeringa lub reakcji z użyciem nadjodanu Dess–Martin`a, czy odczynnika Corey`a (chlorochromian pirydyny). Wobec napotkanych niepowodzeń, mgr inż. Alenowicz zmieniła strategię wprowadzenia funkcji azydkowej do cząsteczki, wankomycyny. Zdecydowała się na acylowanie wankomycyny za pomocą komercyjnie dostępnego N₃PEG₄OSu. Po optymalizacji warunków reakcji doktorantka otrzymała produkt zawierający jedno ugrupowanie azydkowe. We współpracy z dr. Sowińskim z Międzyuczelnianego Laboratorium NMR Politechniki Gdańskiej podjęła próbę ustalenia struktury wankomycyny z linkerem PEG₄-N₃ przy użyciu technik NMR. Na podstawie przeprowadzonej analizy jedno- i dwuwymiarowych widm ¹H NMR zaproponowała miejsca wiązania linkera z wankomycyną. Z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że jest on połączony z antybiotykiem poprzez wiązanie amidowe utworzone z udziałem funkcji aminowej aminocukru. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia dodatkowymi badaniami. Badania aktywności biologicznej otrzymanych

związków, wykonano w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, we współpracy z dr Rusiecką z Katedry i Zakładu Farmakologii kierowanego przez prof. Kocića.

Testy na aktywność przeciwnowotworową niekowalencyjnych koniugatów cisplatyny z wybranymi CPP zawierającymi sondę fluorescencyjną jak i bez sondy przeprowadzono na różnych liniach komórkowych (HEK293, HEL299, HeLa i OS143B). Badania dowiodły, że peptydy TP10 oraz PTD4 wykazują selektywność przenikania do wybranych komórek nowotworowych, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi. Podanie TP10 z cisplatyną wywołało silniejszy efekt cytotoksyczny niż sam lek, co wskazywałoby na poprawę transportu do komórek nowotworowych. Zastosowanie peptydu z sondą fluorescencyjną potwierdziło jego przenikanie do komórki. Ponieważ wyniki badań dają jedynie obraz jakościowy, możliwość podawania cisplatyny w połączeniu z TP10 wymaga przeprowadzenia dalszych, poszerzonych badań.

Badanie kowalencyjnych koniugatów wankomycyny na aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazały, że wszystkie otrzymane związki posiadały wyższą aktywność niż sama wankomycyna oraz szersze spektrum działania. Obiecujące wyniki uzyskano dla [Lys⁷(PEG₄-VAN)]TP10 (wysoka aktywność względem szczepów MRSA oraz najniższe wartości MIC dla enterokoków) stąd związek ten został wytypowany do badań na modelu zwierzęcym dla sprawdzenia zdolności przenikania bariery krew-mózg. Badania z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej wykazały jego obecność w mózgu, choć sama wankomycyna, mimo słabej przenikalności stosowana jest także w infekcjach mózgu. Ten fragment uważam za najcenniejszy wynik spośród uzyskanych w dysertacji mgr inż. Alenowicz. Czy planowane jest w dalszych badaniach porównanie stężeń jakie są osiągnęte dla leku i koniugatu w mózgu?

Mgr inż. Magdalena Alenowicz dobrze porusza się w zakresie wiedzy chemicznej i biologicznej, wykazała się biegłością warsztatową, zarówno jeśli chodzi o syntezę peptydów na fazie stałej, reakcję „click”, metody oczyszczania peptydów oraz potwierdzenia struktury związków za pomocą spektrometrii mas.

Praca napisana jest logicznie, poprawnym językiem, zawiera nieliczne usterki redakcyjne.

Z obowiązku recenzenta przedstawię kilka wybranych uwag:

- „cykloaddycja pomiędzy alkinem i azydkiem wewnętrznym” – wewnętrzny może być alkin (dipodstawiony acetylen) a nie azydek (str 27)
- „aminokwasy zawierające aminokwasy ugrupowanie alkilowe lub azydkowe” – powinno być ugrupowanie alkinowe (str 27)
- Nie wiem z jakiego powodu doktorantka zmieniła warunki dla chromatografii HPLC, przy opracowaniu reakcji acylowania wankomycyny za pomocą N₃-PEG₄-OSu, (stąd inne czasy retencji na rys 55 i tabeli 10 oraz na rys 51)
- W podpisach pod rysunkami 64, 65 i 66 - powinno być ¹H a nie H¹ czy H1

- błędna numeracja nieznakowanych koniugatów na str 98, TP10-Ala(PEG₄-VAN) to związek II, a [Lys⁷(PEG₄-VAN)]TP10 to związek III (co zauważyłam dzięki zamieszczonej wkładce z numerami modyfikowanych peptydów, która bardzo ułatwiła mi czytanie pracy). Związki IV i V to znakowane pochodne

Całkowity dorobek naukowy doktorantki jest bardzo dobry, składa się z 10 publikacji o sumarycznym IF 12.587, z których tylko jedna jest związana z rozprawą. Praca obejmująca badania opisane w dysertacji została wysłana do druku. Niestety w żadnej publikacji doktorantka nie jest pierwszym autorem. Mgr inż. Alenowicz jest również współautorką 34 komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych. Do osiągnięć doktorantki należy zaliczyć uzyskanie stypendium dla doktorantów w ramach projektu „Kształcimy najlepszych –kompleksowego programu rozwoju doktorantów, młodych doktorów i akademickiej kadry dydaktycznej UG” oraz stypendium z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych, oraz zajęcie I miejsca za poster na I Ogólnopolskiej Konferencji Studentów i Doktorantów Nauk Ścisłych „Człowiek-Natura-Środowisko” w 2012 roku.

W podsumowaniu stwierdzam, że

- Temat podjęty przez doktorantkę jest z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego wysoce aktualny
- Doktorantka dobrze zaplanowała swoje badania i wykazała się dojrzałym podejściem do realizowanego tematu oraz interpretacji otrzymanych wyników
- Wyniki przedstawione w pracy poszerzają naszą wiedzę na temat transportu leków do komórki z udziałem peptydów penetrujących komórkę

Na tej podstawie z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja mgr inż. Magdaleny Alenowicz pt. „Projektowanie i synteza koniugatów peptydów penetrujących komórkę z biologicznie aktywnymi cząsteczkami o korzystniejszych właściwościach farmakologicznych” spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Tytule Naukowym i Stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Alenowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Aleksandra Orma