



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Warszawa, 10.07.2022 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

[misicka@chem.uw.edu.pl](mailto:misicka@chem.uw.edu.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Marii Olkiewicz pt. *Projektowanie i synteza koniugatów peptydowych o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej***

Antybiotykooporność należy do jednych z większych zagrożeń dla zdrowia, szczególnie niebezpieczne jest występowanie w środowisku szpitalnym oporności wielolekowej. Dlatego cały czas prowadzi się poszukiwania nowych leków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, a jednym z interesujących kierunków badań jest projektowanie chemioterapeutyków poprzez połączenia stosowanych obecnie leków z fragmentem peptydowym. Stanowi to przedmiot zainteresowania wielu ośrodków badawczych, a jedną z grup z sukcesem badającą te możliwości jest zespół dr hab. Anny Łęgowskiej, prof. UG. - promotora recenzowanej pracy.

Celem pracy doktorskiej mgr Katarzyny Olkiewicz było zaprojektowanie, synteza i analiza wyników badań biologicznych koniugatów peptydowych o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska (145 stron) składa się z przeglądu literaturowego (42 stron), celu pracy (4 strony), omówienia badań wraz z opisem procedur syntetycznych (28 stron), opisu wyników i wniosków (24 strony). Rozprawa zawiera również streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, widma masowe i chromatogramy HPLC otrzymanych związków, spisy rysunków i tabel, jak również spis literatury cytowanej (247 pozycji) i spis całego dorobku naukowego doktorantki, który obejmuje 4 publikacje i 17 wystąpień konferencyjnych.

Przegląd literaturowy składa się z kilku zasadniczych części omawiających doniesienia literaturowe w zakresie zagadnień związanych z rozprawą. W części pierwszej doktorantka przedstawiła podstawowe strategie i mechanizmy nabywania oporności, w następnych omówiła strukturę i aktywność chinolonów, stosowane techniki w biokoniugacji i przedstawiła osiągnięcia w zakresie leków o budowie koniugatów peptydowych. W ostatniej części omówiła przykładowe peptydy o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (AMP), peptydy przenikające przez błony komórkowe (CPP) i peptydy naprowadzające na cel terapeutyczny.

Głównym celem badań mgr Katarzyny Olkiewicz było zaprojektowanie, opracowanie metod syntezy oraz synteza koniugatów peptydowych o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Zaprojektowane koniugaty składały się z chemioterapeutyku należącego do rodziny fluorochinolonów: lewofloksacyny (LVX) lub cyprofloksacyny (CIP) i peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (pochodne laktoferyny, katelicyny i fragmenty transportanu). Koniugaty różniły się także sposobem połączenia części składowych, które były połączone bezpośrednio przez wiązanie amidowe lub przez cząsteczkę łącznika. Zastosowanym trwałym łącznikiem było ugrupowanie metylenokarbonylowe, a jako łącznik ulegający rozszczepieniu we wnętrzu komórki zastosowano wiązanie disulfidowe. W celu sprawdzenia czy otrzymane koniugaty transportanu TP10 przechodzą przez błonę komórkową doktorantka zaplanowała syntezę fluorescencyjnego analogu odpowiedniego koniugatu CIP-CH<sub>2</sub>CO-[Lys12]TP10(Cf), oraz jego fluorescencyjnych składowych, CIP(Cf) i [Lys12]TP10(Cf). Analog ten posiadał dołączony fluorofor do grupy ε-aminowej lizyny, która zastąpiła alaninę znajdującą się w pozycji 12 oryginalnej sekwencji TP10. Na potrzeby badań biologicznych doktorantka musiała również przeprowadzić syntezę peptydów wchodzących w skład koniugatów, jak również niektórych pochodnych cyprofloksacyny i lewofloksacyny.

Otrzymane przez doktorantkę koniugaty i związki referencyjne zostały poddane wielu rodzajom badań biologicznych, które były wykonane przez zespół prof. Sławomira Milewskiego z Katedry Technologii Leków i Biochemii na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. W zakres tych badań wchodziły:

1. Badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowych koniugatów i ich składowych (oznaczenie MIC<sub>90</sub> i MIC<sub>50</sub>) wobec wybranych szczepów bakteryjnych lub grzybiczych
2. Badania trwałości koniugatu zawierającego mostek disulfidowy CIP-SS-TP10 w komórkach *S. aureus*
3. Ocena:
  - zdolności bakterii do wytwarzania oporności na działanie wybranych koniugatów,
  - cytotoksyczności wybranych związków względem komórek ssaczych,
  - zdolności komórek ssaczych do wytwarzania reaktywnych form tlenu po inkubacji z wybranymi koniugatami,
  - właściwości hemolitycznych badanych związków,
  - zdolności wybranych związków do przenikania do wnętrza drożdżaków *Candida*,
  - zdolności zsyntezowanych związków do hamowania działania topoizomerazy II drożdżaków *Candida*

Wyniki badań biologicznych wykazały, że większość zsyntetyzowanych koniugatów wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Najbardziej interesujące rezultaty uzyskano dla koniugatów transportanu 10. Okazało się bowiem, że wykazują one silną aktywność przeciwgrzybową, choć składowe koniugatu ich nie posiadały. Starannie zaplanowane badania przechodzenia wybranych koniugatów przez błonę komórki grzybowej, wykazały że w przeciwieństwie do zastosowanego chemioterapeutyku, który nie wnika do komórki grzybowej, koniugat penetruje do wnętrza komórek. Lizat komórkowy poddany analizie HPLC

wykazał obecność produktów rozszczepienia mostka -S-S-, koniugatu i dimeru części peptydowej. Przepuszczalnie wykazywanie własności przeciwgrzybowych jest spowodowane interakcją odłączoną cyprofloksacyny z bakteryjną gyrazą.

Inne badania wykazały, że otrzymane koniugaty generują mniejszą ilość reaktywnych form tlenu i wykazują zdecydowanie niższą aktywność hemolityczną. Wszystkie te spostrzeżenia mogą stanowić punkt wyjścia do następnych badań dotyczących projektowania nowych koniugatów na bazie cyprofloksacyny i lewofloksacyny (bądź ogólnie leków), poprzez ich koniugację z peptydami AMP i/lub CPP, co otwiera nowe możliwości w walce z opornymi patogenami.

Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawię pytania, które nasunęły mi się podczas czytania tej rozprawy doktorskiej i które mogą stanowić podstawę do dyskusji z doktorantką.

1. Umieszczony w pracy spis treści jest wykonany wg. nieznanymi mi zasad, doktorantka nie ponumerowała głównych części rozprawy, a ponumerowała kolejno podrozdziały występujące w głównych częściach pracy.
2. Przedstawiona na str. 37 interesująca tabela z zestawieniem przykładowych koniugatów typu peptyd-lek i ich faz klinicznych posiada odniesienia do „źródeł”. Wydawało mi się, że zgodnie w tytule tabeli odnośniki powinny zawierać informacje o aktualnym stanie badań klinicznych, ale tak nie jest. Zamieszczone są np. odnośniki z roku 2013, również cytowane prace nie zawsze odnoszą się do badań klinicznych lecz do prac naukowych. Mam nadzieję, że inne odnośniki w części literaturowej, a jest ich 230 były lepiej przez doktorantkę dobrane.
3. Str. 54 przypadkowo spojrzalam na pierwszy odnośnik w celu pracy nr. 231, niestety nie jest on prawidłowo opisany, więc nie wiadomo, co jest w cytowanej pracy.
4. Szkoda, że w celu pracy doktorantka nie umieściła rozważań dotyczących budowy zaprojektowanych koniugatów ze względu na potencjalne zmiany aktywności biologicznej, a nie tylko ze względu na budowę chemiczną. Mam nadzieję, że ten aspekt pracy przedstawi podczas obrony.
5. Str. 54 podpis rysunku 23 wskazuje, że doktorantka zaznaczyła „kluczowe dla koniugacji grupy funkcyjne”, choć na czerwono jest zaznaczona tylko grupa karboksylowa, a przecież w połowie otrzymanych koniugatów peptydy są przyłączone do atomu azotu w pierścieniu piperazynowym.
6. Skąd wynika zdecydowanie inna liczba otrzymanych koniugatów cyprofloksacyny z wykorzystaniem bezpośredniego łączenia z peptydem poprzez grupę karboksylową (2) a łączeniem za pomocą ugrupowania metylenokarbonylowego poprzez atom azotu (7)
7. Str. 57 w tabeli zastosowano podział na wewnątrzcząsteczkowe i międzycząsteczkowe wiązanie disulfidowe, kontynuowany w całej pracy, ale który nie jest dla mnie jasny, bo odnosi się raczej do sposobu syntezy, a nie do budowy koniugatów.
8. Str.70 przedstawiony chromatogram HPLC jest nieprawidłowo opisany (na pewno nie jest to czysty związek, dlaczego doktorantka nie pokazała chromatogramu czystego związku? W opisie syntezy (str. 69) jest napisane „jednorodność otrzymanego związku sprawdziłam za pomocą HPLC”).

Podsumowując, pracę doktorską mgr Olkiewicz przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Praca jest napisana dobrą polszczyzną, zwięźle i zawiera wszystkie niezbędne opisy wykonanych doświadczeń, zarówno opis syntez i warunków oczyszczania, jak i procedur badań biologicznych. Wszystkie umiejętności nabyte przez doktorantkę podczas wykonywania pracy świadczą o tym, że jest ona obecnie dobrze wyszkoloną chemiką w zakresie syntezy peptydów i koniugatów peptydowych, jak również w zakresie szeroko pojętej chemii medycznej, przygotowaną do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

Wyniki pracy mgr Olkiewicz zostały już opublikowane w 4 publikacjach w bardzo dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej (Peptides, ACS Chemical Biology i Int J Mol Sci)

**Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr Katarzyny Marii Olkiewicz zatytułowana „Projektowanie i synteza koniugatów peptydowych o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej” spełnia wszelkie wymagania stawiane ustawą o stopniach i tytule naukowym i zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Olkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*A. Bistula*