



POLITECHNIKA ŁÓDZKA
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

dr hab. Beata Kolesińska, prof. PŁ,

tel: 42-631-31-49; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kozłowskiej

Magister Agnieszka Kozłowska swoją rozprawę doktorską zatytułowaną „Synteza koniugatów transportanu 10 z cząsteczkami o działaniu biologicznym” wykonała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Pracowni Chemii Związków Biologicznie Czynnych, pod opieką prof. dr hab. Piotra Rekowskiego i dr Jarosława Ruczyńskiego, który pełnił funkcję promotora pomocniczego.

Przedstawiona do recenzji praca posiada złożoną, wielopoziomową strukturę, konsekwentnie dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań realizowanych w grupie badawczej, który można określić jako projektowanie, synteza i badanie nowych peptydów/peptydomimetyków bądź ich koniugatów jako substancji o zróżnicowanej aktywności biologicznej. Szczególnie intensywnie badaną grupą peptydów i ich pochodnych są peptydy charakteryzujące się zdolnością przenikania błon komórkowych (ang Cell Penetrating Peptides). Zaproponowano dla nich wiele różnorodnych zastosowań, jednak główne ich wykorzystanie dotyczy transportu związków leczniczych i obrazujących. CPPs charakteryzują się wysoką skutecznością *in vitro* w dostarczaniu do komórek fluoroforów, małowcząsteczkowych leków, białek, peptydów, kwasów nukleinowych czy nanocząstek. Mimo licznych propozycji zastosowań CPP w terapii i diagnostyce, popartych obiecującymi *in vitro* i *in vivo* wynikami wstępnych badań, do tej pory nie ma jeszcze żadnej terapii wykorzystującej peptydy penetrujące do komórek. Należy jednak dodać, że kilkanaście pochodnych jest w trakcie badań klinicznych. Z pełnym przekonaniem można więc wyrazić opinię o aktualności i o wysokiej randze tematyki podjętej w rozprawie.

Uzyskane wyniki badań zostały opisane w pracy liczącej 151. Układ pracy, dostosowany do jednoznacznie zdefiniowanego celu badawczego, jest standardowy i obejmuje sześć głównych rozdziałów: Wprowadzenie, Przegląd literatury, Badania Własne, Spis literatury cytowanej, Spis ilustracji oraz Spis tabel. Wydaje mi się, że korzystne byłoby uzupełnienie rozprawy o Streszczenie pracy oraz Wykaz dorobku naukowego Doktorantki. Część referatową pracy stanowi 42 stronicowy zbiór esejów prezentujących przeglądy



DZIEKANAT

Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 13.09.2018

L.dz. 8010-HCh/KC-1863/18

literaturowe stanowiące wprowadzenia do kolejnych tematów badawczych rozwijanych w rozprawie. Obejmują one zagadnienia dedykowane:

- chorobom cywilizacyjnym: chorobom neurodegeneracyjnym, chorobom nowotworowym oraz rozwojowi lekooporności,
- wpływowi związków biologicznie czynnych na rozwój chorób cywilizacyjnych,
- peptydom penetrującym błony komórkowe,
- chemii klik.

Dobór materiału literaturowego obejmuje w sumie 118 pozycje. Jest on głęboko przemyślany i prezentuje wszystkie najważniejsze publikacje, co pozwoliło na rzetelną i dogłębną prezentację stanu wiedzy. Na wyróżnienie zasługuje precyzja wyboru referowanych tekstów i zwięzłość wywodu, które pozwoliły na stworzenie wysoce przydatnych skoncentrowanych opracowań multi-dyscyplinarnych, kosztem pominięcia prac o mniejszym znaczeniu. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność narracji dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Pozwala to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy. Jedyne moje zastrzeżenie budzi nazwanie rozdziału 2 „Wpływ związków biologicznie czynnych na rozwój chorób cywilizacyjnych”, takie sformułowanie sugeruje, że diskutowany będzie bądź pozytywny bądź negatywny wpływ czy to na prewencję rozwoju chorób cywilizacyjnych czy też na patogenezę ich rozwoju. Tym czasem, w rozdziale tym Doktorantka omawia właściwości Wankomycyny, Dopaminy oraz jeden rozdział poświęca kinazom tyrozynowym i ich inhibitorom, w tym w szczególności Imatinibu. W przeglądzie literaturowym zabrakło mi również informacji na temat danych literaturowych wskazujących na zdolność przenikania bariery krew-mózg przez CPP lub ich koniugaty. Proszę o ustosunkowanie się do tego zagadnienia w trakcie obrony.

Jak należało oczekiwać, sam cel pracy został postawiony dopiero po wprowadzeniu literaturowym dającym uzasadnienie dla wszystkich jego elementów składowych na tle współczesnego stanu badań. Podjęte zadanie badawcze obejmowały:

- syntezę dwóch koniugatów Wankomycyny z transportanem 10, syntezę dwóch koniugatów TP10 z Imatinibem oraz jednego koniugatu TP10 z Dopaminą. We wszystkich przypadkach zastosowano narzędzia chemii klik do uzyskania założonych koniugatów.
- przeprowadzenie badań biologicznych z zsyntezowanymi koniugatami,

Badania te obejmowały: testy mikrobiologiczne sprawdzające aktywność przeciwdrobnoustrojową koniugatów Wankomycyny z TP10, badanie aktywności hemolitycznej koniugatów z Wankomycyną oraz badanie zdolności pokonywania bariery krew-mózg obydwu koniugatów TP10 z Wankomycyną. W odniesieniu do koniugatów z dopaminą, badania biologiczne obejmowały: zdolność pokonywania bariery krew-mózg, badanie powinowactwa do receptorów D1 i D2, testowanie podatności na reakcję transmetylacji pod działaniem katechol-*O*-metylotransferazy oraz badania behawioralne (test słupa).

Na pochwałę zasługuje wprowadzenie rozdziału 6 „Plan pracy”, w którym zawarte zostały wszystkie zaplanowane do realizacji etapy prac badawczych. Pierwszy etap badań obejmował syntezę analogów TP10 zawierających resztę kwasu propynowego oraz kwasu azydooctowego. W ramach tego etapu prac badawczych, Doktorantka otrzymała też dwie pochodne Wankomycyny: zawierającą resztę azydową pochodną będącą produktem sprzęgnięcia Wankomycyny z estrem N-hydroksysukcynimidowym kwasu 15-azydo-4,7,10,13-tetraoksapentadekanowego (N₃-PEG₄-NHS) oraz z 1-amino-11-azydo-3,6,9-trioksoundekanu (N₃-PEG₃-NH₂). Do grupy niezbędnych do otrzymania koniugatów TP10 z wybranymi substancjami czynnymi należy również pochodna dopaminy z N₃-PEG₄-NHS oraz pochodna Imatinibu z N₃-PEG₃-NH₂.

W kolejnym etapie Doktorantka otrzymane bloki budulcowe zastosowała jako substraty reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji katalizowanej jonami miedzi (I). Jako źródło jonów Cu(I) zastosowano zredukowany askorbinianem sodu siarczan miedzi (II). Zaplanowane do otrzymania koniugaty TP10 z substancjami aktywnymi otrzymane zostały z wydajnościami od 43% do 85%, przy czym wydajność zależna była od stechiometrii reakcji. Na pochwałę zasługuje bardzo rzetelna charakterystyka otrzymanych wszystkich związków. Doktorantka wykazała, że zastosowana przez nią koniugacja z wykorzystaniem „chemii klik” nie prowadzi do utraty aktywności biologicznej zarówno TP10 jak i przyłączonych związków. Okazało, że, że uzyskane koniugaty mają zazwyczaj „lepszą” aktywność biologiczną w porównaniu do pojedynczych składowych. Koniugaty TP10 z Wankomycyną charakteryzują się zwiększoną aktywnością w porównaniu do samego antybiotyku, w tym również względem szczepów lekoopornych. Doktorantka wykazała, że koniugat Van-PEG₄-TP10 pokonuje efektywnie barierę krew mózg (stężenie koniugatu w mózgu było 500 razy wyższe w porównaniu do Wankomycyny). Wynik ten niewątpliwie otwiera drogę do rozpoczęcia badań nad nowymi pochodnymi antybiotyków użytecznych w leczeniu stanów zapalnych ośrodkowego układu nerwowego wywołanego patogenami.

Koniugat Dopaminy z TP10 (Dop-PEG₄-TP10) charakteryzuje się obniżoną podatnością na *O*-metylowanie reszty dopaminy pod działaniem katecholo-*O*-metylotransferazy. Po czasie 24 godzin obserwowano około 50% nie przereagowanego koniugatu. Koniugat ten charakteryzuje się wysokim powinowactwem do receptorów D1 i D2 oraz jego relatywnie wysoką specyficznością. Z badań *in vitro* (test słupa) wynika jednak, że obserwuje się tylko nieznaczne zmniejszenie objawów związanych z zaburzeniami ruchowymi.

Lektura tekstu rozprawy uznaję za stymulującą do dalszej dyskusji i głębszych przemyśleń. Wśród pytań, które mi się nasunęły chciałabym postawić trzy następujące:

1. Czym było uzasadnione stosowanie zróżnicowanej stechiometrii reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji katalizowanej jonami miedzi (I) finalnych koniugatów TP10 z substancjami aktywnymi farmakologicznie? Przyjmując przedstawiony przez Doktorantkę mechanizm tej reakcji, stechiometria reagentów alkinowego i azydowego wynosi 1:1 (strona 53).

2. Jakie były przesłanki do stosowania testu chloranilowego do kontrolowania postępu sprzęgania pochodnych kwasów karboksylowych do *N*-terminalnej grupy aminowej TP10, w miejsce testu Kaisera lub TNBS, które to są raczej rekomendowane dla amin pierwszorzędowych?

3. Czy wniosek, że koniugat Dop-PEG₄-TP10 może stanowić alternatywę dla L-DOPA i może stanowić nową klasę leku w leczeniu objawów choroby Parkinsona w oparciu o uzyskane wyniki (lepsza biodostępność, zwiększona selektywność działania na receptor D1 oraz zmniejszona podatność na *O*-metylowanie) nie jest zbyt daleko idącym na tym etapie badań? W tym miejscu chciałabym również prosić o wyjaśnienie dotyczące obserwowanego znaczącego obniżenia stężenia dopaminy w mózgach myszy w przypadku podania Dop-PEG₄-TP10 w porównaniu do stężenia w próbie kontrolnej z solą fizjologiczną.

Od strony edytorskiej rozprawa jest przygotowana bardzo starannie. Wszystkie rysunki i tabele zostały zredagowane jasno i czytelnie. W pracy nie ma w zasadzie literówek (jedynie na stronie 49 jest „niek toksyczny” w miejsce nietoksyczny, oraz w kilku miejscach brak jest kropek w literze ż). Autorka ustrzegła się również od stosowania sformułowań żargonowych oraz mało precyzyjnych określeń.

Powyższe fakty świadczą, że redakcja tekstu rozprawy znajduje się na poziomie powyżej progu wymagań standardowych. Dysertacja daje wyczerpujące i kompetentne odpowiedzi na szereg niezmiernie ważnych i aktualnych pytań. Dokumentuje w sposób bezsprzeczny, że zastosowanie chemii klik do syntezy koniugatów TP10 z wybranymi substancjami aktywnymi nie powoduje utraty ich aktywności biologicznej i dodatkowo

proceeds to derivatives with improved pharmacological parameters. Undoubtedly an important achievement is demonstrating that the conjugate TP10 with Wankomycin and Dopamine possess the ability to cross the blood-brain barrier, which opens access to the rational design of conjugates based on TP10 with a built-in appropriate linker ensuring the release of the drug in a specific location. It should be noted that the studies with Imatinib ended only with the synthesis of its conjugates with TP10.

Summing up, I highly value the choice of an ambitious research topic, fully in line with current trends in research, both in terms of basic and applied aspects. I also highly value the use of differentiated and modern research methods, the interdisciplinary character of the work, which is necessary for the realization of all research tasks. Particular recognition is due not so much to the fluency in the use of a wide range of synthetic methods and efficiency in the use of complex, modern analytical techniques, which the Doctoral Candidate was able to implement in biological research. These skills testify to the best knowledge and maturity of the Doctoral Candidate. I highly value the contribution of the reviewed thesis to the development of peptide chemistry, especially to the development of penetrating peptides and CPP conjugates with drugs.

The publication record of mgr Agnieszki Kozłowskiej consists of two articles in indexed journals (JCR). The results of the research work of the Doctoral Candidate were presented at conferences of national and international scope (20 communications).

Taking into account the above facts, I am fully convinced that the submitted thesis meets the statutory and customary criteria for doctoral theses according to the Act of March 14, 2003 on scientific degrees and titles, as amended. In connection with this, I propose to the Faculty of Chemistry of the Gdańsk University to allow mgr Agnieszki Kozłowskiej to proceed to the next stages of the doctoral process.

Beata Kolesińska

Beata Kolesińska