

**Prof. dr hab. Adam Prahł**  
**Pracownia Chemii Peptydów**  
**Katedra Chemii Organicznej**  
**Wydział Chemii UG**

Gdańsk, 05.01.2018 r.

### **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

***mgr Magdaleny Alenowicz pt. „Projektowanie i synteza koniugatów peptydów penetrujących komórkę z biologicznie aktywnymi cząsteczkami o korzystniejszych właściwościach farmakologicznych”***

Nowoczesna, efektywna farmakoterapia opiera się na dwóch fundamentalnych założeniach – stosowaniu racjonalnie dobranego leku oraz optymalnym dostosowaniu jego właściwości, takich jak: dawka, sposób podawania/przyjmowania, droga podawania i wreszcie jego postać. O ile pierwsze z założeń sprowadza się po prostu do wyboru konkretnego preparatu, to w drugim przypadku mamy do czynienia z możliwością modyfikowania każdego z czterech wymienionych elementów składowych. Obecnie, w wielu przypadkach, dostępne są nowoczesne leki w postaciach o zaawansowanym, kontrolowanym sposobie i stopniu uwalniania. Modyfikując postać leku, wpływa się na takie parametry farmakokinetyczne, jak: stężenie maksymalne, czas do osiągnięcia stężenia maksymalnego, czas działania leku czy biodostępność. Poprawa wszystkich z wymienionych cech przekłada się na znaczącą poprawę efektywności i bezpieczeństwa stosowanej terapii (ten drugi aspekt ma związek zarówno z rozwinięciem lekooporności wśród drobnoustrojów chorobotwórczych, jak i z polekowym zatruciem organizmu). Stosowane, konkretne zabiegi ukierunkowane są z jednej strony na zmniejszenie stężenia maksymalnego, co prowadzi do ograniczenia czasu, w którym lek może, czy też musi się znajdować w zakresie stężeń przekraczających zakres terapeutyczny, z drugiej na wydłużenie czasu jego działania, co z kolei umożliwia modyfikację dawkowania i redukcję dawek leku stosowanych w ciągu doby. Oba aspekty związane są nierozdzielnie ze sposobem dostarczenia leku w miejsce bezpośredniego działania i możliwością przenikania barier biologicznych. Wszystkie zasygnalizowane zagadnienia wydają się być istotnym przedmiotem zainteresowania współczesnej medycyny i farmakologii. Wiele grup badawczych na całym świecie włączona jest w badania naukowe mające na celu jedno – polepszenie właściwości terapeutycznych już stosowanych i nowo opracowywanych leków.

Przedstawiona do oceny praca doktorska osadzona jest również w tej tematyce badawczej i bezpośrednio dotyczy dwóch farmaceutyków: cisplatyny i wankomycyny. Celem badań jest wykorzystanie peptydów penetrujących komórkę jako nośników i modulatorów zwiększających aktywność farmakologiczną preparatów.

Praca doktorska zrealizowana została w Pracowni Chemii Związków Biologicznie Czynnych, Katedry Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką prof. dra hab. Piotra Rekowskiego. Opracowanie obejmuje 122 strony, podzielone (trochę nietypowo i chyba niepotrzebnie) na 11 rozdziałów, poprzedzonych spisem treści, wykazem stosowanych skrótów i jednostronicowym wstępem. Po zasadniczej części pracy jako załączniki znajdują się: bibliografia (obejmująca 255 pozycji literaturowych – chyba trochę zbyt dużo jak dla niespełna stustronicowego opracowania tego typu), spis ilustracji (w całej pracy jest ich 68 i nazywane są rysunkami) oraz spis 15 tabel i wykaz dorobku naukowego Kandydatki. Dodatkowym elementem podziału jest wyszczególnienie „przeglądu literatury”, obejmującego 5 pierwszych i „badań własnych”, jako kolejne sześć rozdziałów. Podałem w tym miejscu podział pracy odnosząc się do jej spisu treści. Sam układ i sformatowanie tekstu pozwala dokonać tego podziału w zupełnie inny sposób.

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk

tel. +48 523 50 10, fax +48 523 50 12, email: dziekanat.chemia@ug.edu.pl

Pierwsze pięć rozdziałów pracy zatytułowanych kolejno: „*CPP – peptydy penetrujące komórkę*”, „*Transportan 10*”, „*Chemia „click”*”, „*Cisplatyna*”, „*Wankomycyna*” to teoretyczne wprowadzenie w tematykę badawczą wyszczególnione jako „Przegląd literatury”. Kolejno, Doktorantka przedstawiła w nich najważniejsze aspekty związane z właściwościami, klasyfikacją oraz mechanizmami penetrowania komórki i transportu przez błonę komórkową innych cząsteczek wybranych tzw. peptydów penetrujących komórkę. Na szczególne wyróżnienie w postaci osobnego rozdziału zasłużył transportan 10. W opisie znalazły się również sposoby łączenia transporterów z transportowanymi cząsteczkami. Podobnie jak w przypadku charakterystyki peptydów penetrujących komórkę znów jedna z metod koniugacji – zastosowanie chemii „click” – została dokładniej scharakteryzowana w osobnej części. Dwa ostatnie rozdziały przeglądu literatury to charakterystyka dwóch leków będących przedmiotem badań – cisplatyny i wankomycyny. Odnosząc się do ilości rozdziałów w pracy użyłem słowa „niepotrzebnie” i ma to swoje szczególne zastosowanie do tej części pracy. Wszystkie te rozdziały powinny być podrozdziałami jednego zatytułowanego na przykład – przeglądu literatury (jest to i tak zastosowane w pracy do pewnego rodzaju usystematyzowania).

Kolejne dwa rozdziały to „Cel pracy” i „Plan pracy”. Tutaj też plan pracy mógł być tak naprawdę ostatnim akapitem w rozdziale opisującym jej cel. Co do samego opisu celu mam też pewne uwagi, ponieważ zapoznanie się z jego treścią nie daje pełnego obrazu co do zaplanowanych badań. Utrudnia to przede wszystkim tabela przedstawiająca strukturę zaprojektowanych peptydów oraz koniugatów z wankomycyną. Znalazły się w niej nie tylko peptydy będące rzeczywiście przedmiotem badań, ale również te, które należało otrzymać na etapach pośrednich. Pełny obraz zaplanowanych i wykonanych badań można uzyskać dopiero po lekturze dalszych rozdziałów pracy, w których kolejno opisane zostały: metodologia i wykorzystana aparatura („Metody, materiały i aparatura”), badania dotyczące wpływu otrzymanych analogów na transport do wnętrza komórki i właściwości biologiczne cisplatyny („Zastosowanie CPP do poprawy właściwości terapeutycznych cisplatyny”) i wankomycyny („Zastosowanie CPP do penetracji wankomycyny do ośrodkowego układu nerwowego”) oraz uzyskane wyniki („Omówienie wyników i wnioski”). W trakcie realizacji prac Doktorantka zaplanowała otrzymanie pięciu znakowanych fluorescencyjnie (jako sonda wybrana została 6-karboksytetrametylorodamina) peptydów mających zdolność do przenikania do wnętrza komórki. Jako modele wybrane zostały: analog fragmentu białka Tat(47-57) wirusa HIV-1, białko Tat, sekwencje białek translokacji błonowej, transportan i transportan 10. Otrzymane, zmodyfikowane peptydy zostały wstępnie przebadane pod kątem ich zdolności do wnikania do wnętrza wybranych komórek nowotworowych (HeLa – komórki nowotworu szyjki macicy i OS143B – komórki kostniakomięsaka) i nienowotworowych (HEK293 – komórki nerkowe ludzkiego zarodka i HEL299 – komórki płuc ludzkiego zarodka), przy zachowaniu niskiej cytotoksyczności. Spośród wszystkich peptydów najlepsze właściwości wykazały pochodne TP10 oraz PTD4 i to one poddane zostały dalszym kompleksowym badaniom sprawdzającym ich wpływ na aktywność przeciwnowotworową cisplatyny, zdolność do wnikania do wnętrza komórek i cytotoksyczność długoterminową (5-dniową). Kilka uwag i pytań do tej części badań. Jak już wspomniałem w celu pracy nie zostało jasno określone, że to właśnie te pochodne peptydów będą poddane badaniom sprawdzającym ich wpływ na właściwości farmakologiczne cisplatyny. Całość staje się jasna dopiero po zapoznaniu się z ostatnim rozdziałem pracy, w którym zostały omówione wyniki. Wcześniej nie ma żadnej wzmianki, ani żadnych danych dotyczących wyników badań biologicznych dla pochodnych Tat, MTS i TP (w pracy znajdują się jedynie opisy syntez i charakterystyka fizykochemiczna peptydów). Pytania do tej partii badań dotyczą wyboru przedmiotu testów biologicznych – dlaczego wykorzystane zostały znaczone fluorescencyjnie peptydy a nie ich wolne postacie? Rozumiem wprowadzenie sond dla monitorowania zdolności przenikania przez błony komórkowe przy wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej, natomiast w przypadku sprawdzenia efektu zwiększenia

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk

tel. +48 523 50 10, fax +48 523 50 12, email: dziekanat.chemia@ug.edu.pl



aktywności cisplatyny chodziło raczej o same peptydy. Podejście zaproponowane w pracy i tak wymusiło sprawdzenie aktywności niezmodyfikowanego peptydu i sondy, a właściwie sondy przygotowanej do połączenia z peptydem. W tym miejscu kolejne dwie uwagi – na rysunkach ze stron 56-59 pojawiają się gwiazdki, których znaczenie nie jest wyjaśnione (wyjaśnienie znajduje się w publikacji odnoszącej się do tych badań), natomiast w opisie na str. 57 znajduje się informacja, że badaniom poddana była sonda (TAMRA) natomiast badana była sonda z przyłączonym linkerem. W opisach wykresów brakuje dodatkowo nawiasów przy % określających przeżywalność komórek, natomiast w przypadku rysunków na stronach 58 i 59 oś X nie jest funkcją stężenia jak to opisano. Wystąpił też błąd w opisie rysunku 28 na str. 57 (dwa razy podana informacja o 24 godzinnej inkubacji).

Druga część badań poświęcona była sprawdzeniu w jaki sposób przyłączenie cząsteczki TP10 do wankomycyny wpłynie na jej profil farmakologiczny i czy taki koniugat posiada zdolność do przenikania bariery krew – mózg. W tym celu zostały zaprojektowane i otrzymane koniugaty TP10 z wankomycyną przyłączoną do N-końca, C-końca i środka peptydu (poprzez resztę lizyny w pozycji 7). Ostatni z wymienionych koniugatów oraz TP10 z resztą lizyny w pozycji 7 zmodyfikowaną propargilem zostały dodatkowo połączone z sondą fluorescencyjną (tym razem była nią 6-karboksyfluoresceina). TP10 oraz trzy jego koniugaty z wankomycyną pozbawione sond fluorescencyjnych poddane zostały badaniom mikrobiologicznym z wykorzystaniem dwóch szczepów enterokoków (faecium i faecalis) i trzech metycylinoopornych szczepów gronkowca złocistego. Analogi znakowane fluorescencyjnie zostały poddane badaniom z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Badano ich zdolność do przenikania do mysiego mózgu. Dodatkowym celem tej części rozprawy było otrzymanie i potwierdzenie struktury pochodnej wankomycyny zdolnej do połączenia się ze zmodyfikowanym TP10.

Wszystkie analogi zostały otrzymane z wykorzystaniem SPPS przy użyciu taktyki Sheparda (Fmoc/tBu). Ponieważ do połączenia peptydów z 6-karboksytetrametylorodaminą oraz wankomycyny z TP10 wykorzystana została reakcja „click” – reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, substraty wymagały odpowiedniego przygotowania. Peptydy były modyfikowane poprzez wprowadzenie na ich N-koniec, C-koniec lub w przypadku TP10 również łańcuch boczny lizyny w pozycji 7 ugrupowania alkinowego. Z kolei sonda fluorescencyjna oraz wankomycyna zostały zmodyfikowane poprzez wprowadzenie do ich cząsteczek grupy azydkowej z krótkim łańcuchem glikolu polietylenowego (odpowiednio 3 lub 4 segmenty). Oczyszczanie wszystkich analogów odbywało się z wykorzystaniem HPLC, natomiast analiza i potwierdzenie jednorodności – HPLC i MS. Poprawność wykonanych syntez nie budzi zastrzeżeń. W pracy kilka razy pojawia się sformułowanie, że zidentyfikowano oczekiwane jony molekularne. Czy rzeczywiście tak było?

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki w trakcie realizacji prac zaliczyłbym:

- poprawną syntezę wszystkich substratów niezbędnych dla uzyskania zaprojektowanych w pracy koniugatów (na szczególną uwagę zasługują tu pochodne wankomycyny);
- wykazanie, że TP10 i jego analog z przyłączoną sondą fluorescencyjną wzmacniają działania cisplatyny, nie powodując śmierci zdrowych komórek;
- wykazanie zdolności modyfikowanego TP10 do transportu cisplatyny przez błonę komórkową;
- otrzymanie aktywnych wobec metycylinoopornych szczepów gronkowca złocistego koniugatów TP10 z wankomycyną, zdolnych do przenikania bariery krew-mózg.

W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na jeszcze kilka rzeczy. Po pierwsze praca niefortunnie napisana jest w trybie bezosobowym. Moim zdaniem dużo jaśniej i przejrzyściej byłoby wszystkie czynności, które wykonała Doktorantka opisać w formie osobowej. Jeżeli chodzi o stronę edytorską

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk

tel. +48 523 50 10, fax +48 523 50 12, email: dziekanat.chemia@ug.edu.pl



opracowania wspomniałem już na wstępie, że spis treści niekoniecznie odzwierciedla późniejsze formatowanie samych rozdziałów i podrozdziałów. Nie mogłem również przyzwyczaić się do przyjętej przez Doktorantkę typografii pracy zakładającej brak wycięcia w akapitach znajdujących się bezpośrednio po tytułach lub śródtytułach. Generalnie w tekstach pisanych w języku polskim każdy z akapitów powinien zaczynać się od wycięcia. Odstęp jako wyróżnienie to naleciałość anglosaska, która jest powszechnie stosowana i akceptowana w tekstach internetowych. W pracy wszystkie pierwsze akapity w rozdziałach i podrozdziałach są wyróżnione poprzez odstępowanie po tytule, natomiast kolejne wycięciem od lewej strony. Uważam, że niepotrzebnie został wykorzystany w pracy inny rodzaj czcionki do nazywania podrozdziałów. Pozostając przy czcionce a dokładnie jej rozmiarze, to dużym utrudnieniem dla zapoznania się z treścią pracy jest jej zbyt mały rozmiar użyty do edycji dwóch tabel i spisu treści. O ile w przypadku tabel można znaleźć rozsądne wytłumaczenie tego faktu, o tyle w przypadku spisu treści już nie. W pracy znalazło się sporo literówek, błędów językowych i interpunkcyjnych. Wymienię ich tylko kilka (pierwszy z każdej kategorii, który pojawił się w pracy):

- str. 4 – dwa razy użyty cudzysłów zamykający słowo „click”;
- str. 7-8 – niestaranne wyrównanie przy wyjaśnieniach skrótów BBB, DMAP, TBTU;
- str. 8 – skrót MIC przetłumaczony został jako najmniejsze stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów – dosłownie powinno być „minimalne”; uważam też, że jako zamiennik „minimalne” należy stosować słowo „najniższe” a nie „najmniejsze”, chociaż obie formy występują zamiennie w literaturze;
- str. 10 – po raz pierwszy (nie ostatni) w pracy pojawia się sformułowanie „ulepszenie właściwości” – powinno chyba być „poprawa właściwości”;
- str. 10 – w pierwszym zdaniu ostatniego akapitu po słowie „wielolekooporne” zabrakło dwóch kolejnych: „szczepy bakterii”;
- str. 11 – w trzecim akapicie na 11 liniach 10 razy pojawia się słowo „komórka” lub przymiotnik od niego utworzony; w ostatnim akapicie na tej stronie przed rokiem 1988 pojawiła się jedyńka zamiast literki „w”;
- str. 14 – zdanie „W niektórych przypadkach, często ze względu na budowę transportowanego związku (np. zawadę przestrzenną), zastosowanie łącznika (tzw. linkera) przy połączeniu z CPP jest niezbędne (rys. 2).” powinno brzmieć „W niektórych przypadkach, często ze względu na budowę transportowanego związku (np. zawadę przestrzenną), niezbędne jest zastosowanie łącznika (tzw. linkera) (rys. 2).”, zwłaszcza, że w zdaniu poprzedzającym jest mowa o peptydach i białkach połączonych z CPP;
- str. 17 – zdanie kończące pierwszy akapit: „Inne badania sugerowały natomiast, że obecność GAG na powierzchni komórek nie ułatwia przenikania CPP, a ich brak nie utrudnia penetracji błony komórkowej [65, 70, 71].”, użyte w kontrze do wcześniejszego sformułowania „Wiele badań potwierdziło istotną rolę GAG w procesach endocytozy...” nie spełnia swojego zadania, ponieważ nie wyklucza sytuacji, w której obecność GAG na powierzchni komórek utrudnia przenikanie CPP, a ich brak ułatwia penetrację błony komórkowej; z kontekstu wynika, że chodzi o sytuację, w której obecność GAG nie ma wpływu na penetrację błony komórkowej i tak powinno ono brzmieć;
- str. 18 – sformułowanie zawarte w zdaniu „W ostatnich latach zanotowano wzrost zastosowań CPP do transportu rozmaitych makromolekuł takich jak białka, peptydy, kwasy nukleinowe, liposomy, nanocząstki, micelle i niewielkie cząstki do wnętrza komórek...” jest użyte, czy też powtórzone przynajmniej kilka razy;
- str. 33 – kilka razy brakowało mi przecinków w zdaniach złożonych, w momencie, kiedy zauważyłem ich brak przed słowem „które”, postanowiłem zamieścić ten fakt w uwagach;



- str. 43 – w opisach dotyczących wykonanych badań i eksperymentów pojawiło się dużo zwrotów wynikających ze stosowania żargonu chemicznego – np.: „Do oczyszczania otrzymanych związków zastosowano:

a) półpreparatywną chromatografię cieczową firmy Knauer z kolumną Kromasil C8 o wymiarach 250 x16 mm, wielkość ziaren 5  $\mu\text{m}$ , obierając liniowy gradient fazy ruchomej.”, czy też: „Dane z testów MTT zostały wyrażone jako średnie z trzech niezależnych pomiarów przeprowadzonych trzykrotnie dla danego stężenia.”.

Przy okazji opisu aparatury i eksperymentów niepotrzebnie za każdym razem były powtarzane podobne detale. Przynajmniej w przypadku peptydów sama synteza powinna być opisana jako jedna dla wszystkich, otrzymanych w trakcie realizacji prac, z wyszczególnieniem różnic dla otrzymanych w sposób niestandardowy.

Wszystkie te uwagi nie obniżają mojej pozytywnej oceny pracy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Alenowicz. W swoich badaniach wykazała się Ona sporą wiedzą i umiejętnościami czego efektem jest szereg odkryć. Potrafiła znakomicie wywiązać się z zadań syntetycznych, wyciągając prawidłowe wnioski z przeprowadzonych eksperymentów. Były one z kolei siłą napędową kolejnych planowanych prac. Chciałbym w tym miejscu pochwalić również pomysł Doktorantki z zamieszczeniem tabeli z zaplanowanymi do syntez analogami jako dodatku na rozkładanej kartce w formacie A3. Pozwoliło to w mieć cały czas dostęp do struktury peptydów bez konieczności powrotu do określonego miejsca w pracy.

W załączonej do pracy doktorskiej dokumentacji znalazł się wykaz dorobku naukowego Doktorantki, z którego wynika, że jest ona współautorką 9 publikacji (7 z nich to publikacje z listy JCR), kolejna praca została wysłana do redakcji czasopisma *Molecular Pharmaceutics*. Mgr Magdalena Alenowicz jest również współautorką 35 prezentacji konferencyjnych, większość dotyczy konferencji krajowych. Mniej więcej połowa publikacji znajdujących się w dorobku kandydatki bezpośrednio dotyczy tematyki rozprawy doktorskiej.

Wobec powyższego uważam, że praca doktorska mgr Magdaleny Alenowicz spełnia wszelkie wymagania zwyczajowe i ustawowe (określone Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 (tekst jednolity wg Dz. 2016 r. poz. 882, 1311)) i tym samym, po spełnieniu pozostałych wymogów, stanowi podstawę nadania jej stopnia naukowego doktora. Zwracam się zatem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Magdaleny Alenowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Adam Frahm*