

Prof. dr hab. Zbigniew Szewczuk
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: +48-71-3757212
e-mail: zbigniew.szewczuk@chem.uni.wroc.pl

Wrocław, 2018-09-11

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kozłowskiej
z tytułem „Synteza koniugatów transportanu 10 z cząsteczkami o
działaniu biologicznym”**

Poprawienie parametrów farmakokinetycznych leków, w tym biodostępności i specyficzności ich działania jest jednym z najważniejszych zadań współczesnej chemii medycznej. Odkryte w ostatnich latach peptydy penetrujące komórki (CPP) umożliwiły transport przez błony komórkowe wielu różnych biologicznie czynnych związków chemicznych, w tym makrocząsteczek. Obudziło to uzasadnione nadzieje na zaprojektowanie nowych leków będących koniugatami CPP z biomodulatorami, mogących pokonywać bariery błon komórkowych bez ich uszkodzenia. Dlatego w wielu ośrodkach naukowych prowadzi się intensywne badania nad metodami otrzymywania i właściwościami biologicznymi takich koniugatów.

Pani mgr Agnieszka Kozłowska włączyła się w nurt tych badań i pod kierunkiem Profesora Piotra Rekowskiego, wykonała pracę doktorską poświęconą projektowaniu, syntezie oraz badaniom biologicznym nowych koniugatów jednego z CPP - transportanu 10 z wybranymi biomodulatorami. Praca została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem pomocniczym był Doktor Jarosław Ruczyński. W mojej opinii tematyka badawcza Pani Magister Agnieszki Kozłowskiej jest oryginalna, aktualna i ważna zarówno z naukowego jak i użytecznego punktu widzenia.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Kozłowskiej liczy 160 stron i składa się z rozdziałów typowych dla prac doktorskich z chemii: *Wprowadzenia* (1 strona),

1

Przeglądu literaturowego (44 strony) i *Badań własnych* (94 strony). Ostatni z tych rozdziałów zawiera, poza opisem przeprowadzonych badań, *Cel pracy* i *Plan pracy* oraz krótkie *Omówienie wyników i wnioski* (6 stron). Doktorantka zamieściła również spis rysunków i tabel, wykaz stosowanych skrótów oraz wykaz literatury cytowanej (140 pozycji). Streszczenie pracy w języku polskim zostało dołączone do rozprawy na osobnej kartce. Wprawdzie układ recenzowanej pracy doktorskiej mgr Agnieszki Kozłowskiej należy uznać za poprawny, lecz zalecałbym uzupełnienie tej rozprawy o krótkie streszczenia pracy w języku angielskim.

W *Przeglądzie literaturowym* Autorka zawarła podstawowe informacje o wybranych chorobach cywilizacyjnych oraz o lekach na te choroby. Następnie omówiła tzw. peptydy penetrujące komórkę (w tym transportany) i ich zastosowania. Osobny rozdział został poświęcony reakcji typu „click chemistry”, ze szczególnym uwzględnieniem 1-3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena.

Przegląd literaturowy został opisany starannie i treściwie. Tematyka badawcza recenzowanej pracy doktorskiej lokuje się na pograniczu chemii i biologii, co wymagało od Doktorantki zgłębienia obu tych dziedzin, czego wynikiem jest dobrze uporządkowany przegląd najnowszych prac naukowych. Rozdział ten świadczy o rozległej wiedzy Doktorantki i umiejętności prawidłowego wykorzystania źródeł literaturowych.

Wysoko oceniam tą część Rozprawy. Uważam, że zawiera ona wszystkie informacje niezbędne do uzasadnienia celu pracy i bardzo dobrze przygotowuje czytelnika do zapoznania się z badaniami wykonanymi w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Celem pracy było zaprojektowanie i synteza nowych koniugatów transportanu 10 (TP10) ze związkami biologicznie aktywnymi, które byłyby zdolne do pokonania bariery krew-mózg i wywołać efekt terapeutyczny. W ramach syntezy Doktorantka przyłączała TP10 to cząsteczek wankomycyny, dopaminy i imatinibu za pomocą 1,3-dipolarnej reakcji cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami miedzi Cu(I). Zadanie badawcze przedstawione w celu pracy było niełatwe do wykonania z uwagi na bardzo złożone struktury użytych biocząsteczek, a zwłaszcza wankomycyny.

Realizacja tych badań wymagała od Doktorantki opanowania warsztatu pracy w zakresie syntezy chemicznej zarówno na nośniku stałym jak i w roztworze, oczyszczania związków za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej i analizie otrzymanych związków za pomocą spektrometrii mas. Konieczna też była duża skrupulatność w przeprowadzeniu badań i interpretacji wyników, a także wytrwałość w optymalizowaniu warunków reakcji i sposobu łączenia składników koniugatów

Z części eksperymentalnej i badań własnych wynika, że opisane w pracy syntezy zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone, z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi badawczych. Pani mgr Agnieszka Kozłowska zsyntezowała po dwa koniugaty z wankomycyną i imatinibem oraz jeden z dopaminą. Okazało się, że wstępne próby bezpośredniego przyłączenia wankomycyny do TP10 zakończyły się niepowodzeniem z powodu zawaad przestrzennych wankomycyny i peptydu. Natomiast zastosowanie przez Doktorantkę odpowiedniego łącznika zawierającego PEG do połączenia peptydu z wankomycyną umożliwiło wydajne otrzymanie koniugatu, który dodatkowo charakteryzował się zwiększoną rozpuszczalnością. Podobne żmudne optymalizowanie strategii syntezy doprowadziło do otrzymania koniugatu imatinibu z TP10. Wszystkie zsyntezowane przez Autorkę związki zostały prawidłowo zanalizowane i opisane. Ich czystość chemiczną i budowę chemiczną potwierdziła za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej i spektrometrii mas.

Oczyszczone koniugaty wankomycyny z TP10 zostały poddane odpowiednim testom biologicznym sprawdzającym aktywność przeciwdrobnoustrojową i hemolityczną oraz zdolność do pokonywania bariery krew-mózg. Pozostałe koniugaty poddano badaniu powinowactwa do receptorów dopaminowych D1, D2 i podatności na reakcję transmetylacji katalizowanej przez katechol-*O*-metylotransferazy oraz testom behawioralnym.

Analiza wyników przeprowadzonych badań biologicznych pozwoliła na uzyskanie kilku ciekawych wyników. Do najważniejszych zaliczyć należy odkrycie wyższej aktywności przeciwbakteryjnej i biodostępności koniugatów TP10 z wankomycyną od aktywności samej wankomycyny. Równie obiecujące są wyniki badania nad koniugatem TP10 z dopaminą, które są w stanie pokonywać barierę krew-

mózg i łączyć się z receptorami dopaminy D1 i D2. Ponadto, koniugaty te okazały się odporniejsze na degradację enzymatyczną od dopaminy. Istotnym jest, że obecność pierścienia 1,2,3-triazolowego, wprowadzanego do cząsteczek koniugatów w wyniku reakcji typu *click chemistry*, nie prowadziła do utraty aktywności biologicznych analizowanych koniugatów.

Z dużym uznaniem odnoszę się do tych wyników uzyskanych przez Doktorantkę, gdyż uważam, że koniugaty przez Nią otrzymane będą mogły stanowić substancje wyjściowe do zaprojektowania nowej generacji leków do walki z chorobą Parkinsona lub z drobnoustrojami.

W rozdziale *Omówienie wyników i wnioski* Autorka krótko przedstawiła swoje najważniejsze osiągnięcia. Na pochwałę zasługuje krytyczna interpretacja uzyskanych wyników, świadcząca o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Przechodząc do oceny formalnej rozprawy, pragnę podkreślić jej estetyczny wygląd. Niestety, w recenzowanej rozprawie znalazło się kilka drobnych błędów literowych i nietrafnych sformułowań, które niekiedy utrudniały jej czytanie. Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej niektóre z nich:

1. Ze schematu reakcji na rys. 28 wynika, że reakcję przeprowadzono na peptydzie a nie na peptydylozywicy.
2. Nazwy związków: "*N,N'*-diizopropylodetyloamina", "*N,N'*-dimetyloformamid" są nieprawidłowe
3. Skrót "Br-AcO" nie należy tłumaczyć jako "kwas bromooctowy" a L-DOPA jako "L-3,4-dihydroksyfenyloalanina"
4. Czy na stronie 139 nazwy Imat-Ac-TP10 i Imat-TP10 dotyczą tego samego związku?
5. W tabeli 144 (powinno być 14) na str. 142 w kolumnie 3 nie podano wartości mas cząsteczkowych wyrażonych w g/mol lecz wartości *m/z* jonów wyrażone w thomsonach (*Th*)

Należy zwrócić uwagę, że błędy te nie umniejszają wartości naukowej recenzowanej pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę istotne wyniki uzyskane przez Doktorantkę, bardzo dobre opanowanie syntezy koniugatów peptydów oraz technik analitycznych, recenzowaną pracę doktorską oceniam bardzo pozytywnie.

W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgr Agnieszki Kozłowskiej zatytułowana "*Synteza koniugatów transportanu 10 z cząsteczkami o działaniu biologicznym*" stanowi cenny wkład naukowy i spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym. Dlatego stawiam wniosek do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Kozłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2. Kozłowska