

dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG

Gdańsk, 31 sierpnia 2023 r.

Wydział Chemii

Uniwersytetu Gdańskiego

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marii Różanowskiej

zatytułowanej „Nowe cykliczne analogi wybranych peptydów opioidowych - wpływ ugrupowania biarylowego na właściwości konformacyjne, stabilność proteolityczną i aktywność biologiczną”

Krótkie peptydy mają ograniczone zastosowanie jako potencjalne środki farmaceutyczne ze względu na labilność konformacyjną, a także podatność na degradację proteolityczną. Nie bez powodu więc, badania dotyczące peptydów cyklicznych cieszą się w ostatnich dziesięcioleciach coraz większą popularnością. Cykliczne peptydy wykazują szereg korzystnych właściwości w porównaniu ze swoimi liniowymi odpowiednikami. Po pierwsze są bardziej odporne na degradację enzymatyczną, co powoduje wzrost stabilności metabolicznej. Dodatkowo, cyklizacja ogranicza liczbę możliwych konformacji peptydów, co może wpływać na wzrost selektywności oraz powinowactwa względem odpowiednich receptorów oraz białek docelowych. Istnieje wiele metod otrzymywania cyklicznych peptydów, a szczególnie ciekawe wydają się te, które dotyczą reakcji łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych należących do peptydu. [Do tego nurtu badań można włączyć przedłożoną mi do recenzji pracę doktorską mgr Marii Różanowskiej, wykonaną pod kierunkiem dr. hab. Marka Lisowskiego. Tematykę pracy uważam za aktualną i ważną.

Recenzowana rozprawa napisana została na 165 stronach, a jej układ jest typowy dla prac chemicznych. W rozprawie wyróżniono kilka części. Na początku znajduje się wstęp teoretyczny, po nim Doktorantka przedstawiła cel pracy, następnie jest rozdział zatytułowany „Materiały i metody”, w którym opisane zostały zastosowane metody analityczne, oraz procedury przeprowadzonych badań i syntez. Kolejne rozdziały to „Wyniki i dyskusja” oraz „Podsumowanie”. Dalej znajduje się spis rysunków i tabel, a na końcu spis literatury cytowanej

– 303 pozycje. Do pracy Doktorantka dołączyła płytkę CD zawierającą suplement (106 stron), w którym umieszczono chromatogramy HPLC, LC-MS, widma ESI-MS, ESI-MS/MS i widma CD. W Suplemencie znajdują się także tabele z przesunięciami chemicznymi protonów, atomów węgla i azotu otrzymanymi z pomiarów NMR, wykonanych dla otrzymanych związków. Dołączony suplement jest dowodem dużej liczby analiz i badań, wykonanych w czasie realizacji pracy doktorskiej.

Wstęp teoretyczny, zawierający pięć podrozdziałów, dobrze wprowadza w tematykę badań własnych Kandydatki. Znajduje się w nim charakterystyka peptydów opioidowych i ich cyklicznych analogów, opis związków biarylowych, a także naturalnych peptydów, w których ugrupowanie biarylowe występuje. Na końcu tego rozdziału Doktorantka omówiła mechanizm reakcji Suzukiego-Miyaury i warunki jej zastosowania do cyklizacji peptydów. Poziom merytoryczny tej części rozprawy jest właściwy dla prac doktorskich i dobrze przygotowuje do czytania rozdziału, w którym omówione zostały badania własne. Umieszczone w pracy rysunki, schematy reakcji i tabele, ułatwiają lekturę tekstu.

Głównym celem pracy doktorskiej mgr Różanowskiej była synteza, a następnie analiza konformacyjna nowych cyklicznych analogów wybranych peptydów opioidowych. Cyklizacja została wprowadzona poprzez utworzenie mostka biarylowego (czyli wiązania między atomami węgla w pozycji *meta* lub *para* pierścieni aromatycznych Tyr i Phe), w wyniku przeprowadzenia reakcji Suzuki-Miyuury, a wpływ obecności mostka biarylowego na konformację peptydu zbadano wykorzystując metodę dichroizmu kołowego i NMR. Dodatkowymi celami pracy było zbadanie wpływu wprowadzonej cyklizacji na trwałość proteolityczną, fragmentację peptydów, a także na powinowactwo do receptora opioidowego μ .

Pierwszym etapem pracy była synteza liniowych peptydów na fazie stałej. W wypadku peptydów P1-P16, zawierających Phe jako ostatni aminokwas tzw. sekwencji wiadomości, reakcję borylowania Miyaury przeprowadzono bezpośrednio na nośniku stałym. Po reakcji borylowania do peptydów na ich *N*-końcu przyłączono odpowiednią, zawierającą atom jodu w pierścieniu, pochodną Tyr (Boc-Tyr(3-J,But), Phe (Fmoc-Phe(4-J) lub Fmoc-Phe(3-J)). W wypadku peptydów P17-P19 borylowanie na nośniku nie powiodło się, dlatego na *N*-końce syntetyzowanych peptydów wprowadzono otrzymane wcześniej pochodne boronowe tyrozyny lub fenyloalaniny. Po zakończonych syntezach peptydy poddano cyklizacji na fazie stałej, przeprowadzając reakcję Suzuki-Miyaury. Cykliczne peptydy odszczepiono od fazy stałej i oczyszczono. W efekcie syntez Doktorantka otrzymała 19 nowych cyklicznych peptydów,

zawierających ugrupowanie biarylowe i dodatkowo 9 peptydów liniowych, które posłużyły jako peptydy odnośnikowe w przeprowadzonych badaniach (CD i biologiczne). Wszystkie otrzymane związki zostały zidentyfikowane z wykorzystaniem spektrometrii mas (ESI-MS), tandemowej spektrometrii mas (ESI-MS/MS) oraz pomiarów NMR, a ich jednorodność sprawdzono wykonując analizy HPLC. Wszystko wydaje się takie proste dopóki nie rozpoczniemy czytania rozdziału pod tytułem „Wyniki i dyskusja”. Czytając ten rozdział dowiadujemy się, że Doktorantka musiała rozwiązać wiele problemów, a w wypadku jodopochodnych aminokwasów właściwie od podstaw zaprojektować metodę ich otrzymywania. Efektem pracy jest opracowanie nowej metody syntezy jodopochodnej estru metylowego Fmoc- i Boc-Tyr(Bu^t) z wykorzystaniem soli srebra w środowisku zasadowym. Doktorantka też jako pierwsza, zastosowała osłonę tert-butyłową na grupie fenyłowej jodopochodnej Tyr biorącej udział w reakcji Suzuki-Miyaura. Wszystkie przeprowadzone eksperymenty są szczegółowo udokumentowane poprzez wykonanie szeregu analiz, których wyniki (widma, chromatogramy) zestawione zostały w pracy bądź suplemencie. Jestem pod wrażeniem ogromu prac wykonanych podczas dobierania warunków reakcji borylowania Miyaura, a następnie cyklizacji metodą Susuki-Miyaura na fazie stałej. Doktorantka pokazała, że bardzo dobrze radzi sobie w laboratorium, potrafi analizować otrzymane wyniki i optymalizować warunki reakcji tak, aby uzyskać zaplanowany produkt z optymalną wydajnością. Mgr Różanowska wykazała się pracowitością i cierpliwością. Dobieranie warunków reakcji prowadzonej na fazie stałej jest dosyć uciążliwe, bo aby się dowiedzieć jaki jest wynik reakcji otrzymywania produktu pośredniego, musimy każdorazowo odszczepić peptyd od nośnika i dopiero wtedy poddać go analizie.

Otrzymane cykliczne analogi peptydów opioidowych zawierających mostek bifenyłowy zostały poddane badaniom konformacyjnym, podczas których wykorzystano spektroskopię dichroizmu kołowego i NMR. Badania CD pokazały, że na kształt widm duży wpływ ma konfiguracja utworzonego mostka biaryłowego, natomiast mniejszy wielkość pierścienia wynikająca z różnej liczby aminokwasów tworzących strukturę cykliczną. Wyniki badań NMR pokazały, że omawiane peptydy przyjmują w roztworze konformację β -zgięcia typu IV, które nie jest jednak stabilizowane przez wiązanie wodorowe, a peptydy, w utworzeniu mostka biaryłowego uczestniczy atom węgla w pozycji *para* pierścienia Phe, charakteryzują się mniejszą swobodą konformacyjną.

W wypadku peptydu P4 i jego liniowego odnośnika, Met-enkefaliny, wykonano badania dokowania molekularnego. Wyniki badań pokazały, że biaryłowy analog nie przyjmuje bioaktywnej konformacji Met-enkefaliny, czym można wytłumaczyć niskie powinowactwa otrzymanych cyklicznych analogów peptydów opioidowych względem receptora opioidowego μ .

Lektura rozdziałów trzeciego, w którym zebrane zostały opisy przeprowadzonych syntez i w szczególności czwartego, zawierającego wyniki przeprowadzonych eksperymentów, liczne chromatogramy i widma uzyskane podczas przeprowadzonych syntez i badań upewnia, że mgr Maria Różanowska zrealizowała zakładane cele pracy doktorskiej.

Rozprawa została napisana w logiczny sposób, na ogół poprawnym językiem, jednak znajduje się w niej trochę błędów literowych, niepotrzebnie wprowadzonych w tekst słów angielskich oraz niefortunnnych zwrotów. W trakcie czytania pracy nasunęło mi się kilka uwag oraz znalazłam trochę błędów. Jedną z uwag jest ta, że spis otrzymanych cyklicznych peptydów, który znajduje się na początku rozdziału „Wyniki i dyskusja” powinien być umieszczony również w celu pracy, bo to ułatwiłoby jej czytanie. Jeśli chodzi o błędy, to niektóre z nich, z obowiązku recenzenta, przedstawiłam poniżej:

1. Jeśli badamy wpływ związków na grzyby, to badamy aktywność przeciwgrzybową, a nie przeciwgrzybiczą.
2. Str. 43, widma CD rejestruje się zazwyczaj stosując spektropolarymetr, a w pracy jest napisane, że w tym celu użyto spektrofotometry, proszę o wyjaśnienie.
3. Str. 48 test chloranilowy wykonujemy stosując roztwór chloranilu, a nie p-chloroaniliny.
4. Kilka razy Doktorantka umieściła w tekście niewłaściwe zapisy pochodnych i tak na str. 55 (13 linia od dołu) zamiast zapisu estru metylowego pochodnej boronowej jest zapis produktu hydrolizy (Boc-Tyr(3-Bpin, ^tBu)-OH), na str. 56 (7 linia od dołu), zamiast zapisu estru metylowego pochodnej boronowej Phe - Boc-Phe(4-Bpin)-OMe umieszczono zapis estru metylowego jodopochodnej Phe - Boc-Phe(4-I)-OMe.
5. Str. 70, w tytule podrozdziału III.3.2.2.2. umieszczono zapis pochodnej Boc-Phe(4-I)-OH, a powinien być Boc-Phe(4-Bpin)-OH.
6. Na str. 71 napisano, że w trakcie syntezy peptydu P18 użyto Boc-Tyr(3-Bpin, ^tBu)-OH, a powinno być Boc-Phe(4-Bpin). Podobnej zamiany dokonano na str. 72, do syntezy peptydu P19 użyto Boc-Tyr(3-Bpin, ^tBu)-OH, a nie jak podano Boc-Phe(4-Bpin)-OH.
7. Na rys. 45, umieszczonym na str. 90 są dwa błędy. Po potraktowaniu peptydydylowicy roztworem TFA, oznaczonym na schemacie syntezy cyfrą 7, nie powinno już być grupy tritylowej na *N*-końcowej grupie aminowej peptydu. Brakuje też grupy Boc na *N*-końcu otrzymanego pentapeptydu.
8. Na str. 98 znalazłam błędy w tabeli 7. W wypadku peptydu P5 otrzymanego po odszczepieniu od nośnika, na jego *N*-końcu powinno być ugrupowanie Fmoc, natomiast grupy tej nie powinno być w wypadku peptydu P9 (ta sama kolumna tabeli). W wypadku peptydu P16 nie powinno już być ugrupowania Boc na *N*-końcu odszczepionego peptydu.

9. Błędy znalazłam również na rys. 54 umieszczonym na str. 100. W pokazanym wzorze peptydu, którego sekwencję zapisano w podpisie rysunku, zamieniono miejscami jodopochodną Tyr i jej pochodną boronową, która to powinna znajdować się na *N*-końcu peptydu. Dodatkowo w podpisie rysunku w sekwencji peptydu na *C*-końcu powinna być Leu, a nie Ile.

Dostrzeżone przeze mnie usterki i nieścisłości w żadnym razie nie mają wpływu na wartość naukową pracy, a prawdopodobnie wynikają z dużej liczby zarówno otrzymanych związków jak i rysunków, które się znajdują w pracy i suplemencie.

Podsumowując, wysoko oceniam poziom merytoryczny badań przedstawionych w rozprawie. Zostały one dobrze zaplanowane i wykonane. Zakres wykonanych badań jest szeroki: od pracochłonnych syntez chemicznych i oczyszczania ich produktów, przez fizykochemiczne analizy otrzymanych liniowych i cyklicznych peptydów, do badań strukturalnych i biologicznych. Na uznanie zasługuje bardzo duża ilość wykonanych analiz, które są dowodem przeprowadzonych syntez, wiedza która umożliwiła interpretację uzyskanych wyników, a także sposób ich prezentacji i prowadzenia dyskusji przy ich omawianiu. Wszystkie umiejętności jakimi wykazała się Doktorantka pozwalają stwierdzić, że jest ona dobrze przygotowana do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marii Różanowskiej zatytułowana „Nowe cykliczne analogi wybranych peptydów opioidowych - wpływ ugrupowania biarylowego na właściwości konformacyjne, stabilność proteolityczną i aktywność biologiczną” stanowi cenny wkład w naukę i spełnia wszystkie kryteria ustawowe (Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65 poz. 595), dlatego zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Marii Różanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.