

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, 2018-04-17

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Grabowskiej zatytułowanej „Cykliczne peptydy o aktywności antyangiogennej”

Choroby nowotworowe są obecnie jedną z głównych przyczyn zgonów ludzi i ciągle daje się obserwować systematyczny wzrost liczby zachorowań na nowotwory złośliwe. Z tego powodu intensywnie rozwija się profilaktyka i nowe metody leczenia tych chorób. Współczesna terapia wykorzystuje wiele różnorodnych leków przeciwnowotworowych, o bardzo zróżnicowanych mechanizmach działania. Szczególne nadzieje wiąże się z lekami o działaniu antyangiogennym, które hamując proces tworzenia się naczyń włosowatych w obrębie guza nowotworowego ograniczają jego rozrost oraz przerzutowanie.

Ustalono, że inhibitory oddziaływania czynnika wzrostu śródbłonna naczyń VEGF 165 z receptorem NRP-1 mogą hamować angiogenezę, przez co są potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi. Dlatego w wielu ośrodkach badawczych na świecie prowadzi się intensywne badania nad nowymi inhibitorami układu VEGF/VEGFR.

Pani mgr. Karolina Grabowska włączyła się w nurt tych badań i pod kierunkiem Profesor Aleksandry Misickiej-Kęsik, wykonała pracę doktorską poświęconą projektowaniu, syntezie oraz badaniom biologicznym cyklicznych pochodnych peptydu LPPR, będących inhibitorami oddziaływania VEGF165 z NRP-1. Praca została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W moim przekonaniu, tematykę badawczą mgr Karoliny Grabowskiej należy uznać za aktualną i ważną z naukowego punktu widzenia.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Grabowskiej liczy 171 stron i składa się z rozdziałów typowych dla prac doktorskich z chemii: wstępu (1 strona), przeglądu

literatury (56 stron), założeń i celu pracy (3 strony, badań własnych (56 stron) oraz części eksperymentalnej (33 strony). Doktorantka zamieściła również spis rysunków i tabel, wykaz stosowanych skrótów, wykaz literatury cytowanej (167 pozycji) oraz kopie swoich dwóch publikacji. Układ pracy doktorskiej mgr Karoliny Grabowskiej jest prawidłowy.

Przegląd literatury zawiera podstawowe informacje o budowie chemicznej peptydów ze szczególnym uwzględnieniem peptydów cyklicznych. Autorka przedstawiła metody cyklizacji peptydów oraz ich wykorzystanie w farmakoterapii. Osobny rozdział został poświęcony omówieniu angiogenezy i związanymi z nią chorobami oraz przedstawieniu substancji hamujących proces angiogenezy. Przegląd literaturowy został opisany starannie i treściwie. Rozdział ten świadczy o rozległej wiedzy Doktorantki na temat cyklopeptydów oraz angiogenezy i bardzo dobrze przygotowuje czytelnika do czytania badań wykonanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Wysoko oceniam część teoretyczną Rozprawy. Uważam, że zawiera ona wszystkie informacje niezbędne do uzasadnienia celu pracy, którym było zaprojektowanie i zsyntezowanie serii cyklicznych analogów tetrapeptydowego fragmentu EG3287, jako odpornych na proteolizę potencjalnych inhibitorów układu VEGF 165 /NRP-1.

Zadanie badawcze przedstawione w celu pracy było niełatwe do wykonania, gdyż cyklizacje krótkich peptydów często prowadzą do otrzymania dimerycznych lub oligomerycznych produktów ubocznych w wyniku międzycząsteczkowych reakcji sprzęgania. Realizacja tych badań wymagała od Doktorantki opanowania warsztatu pracy w zakresie syntezy chemicznej na nośniku stałym, oczyszczania związków za pomocą preparatywnej wysokosprawnej chromatografii ciekowej i analizie otrzymanych związków za pomocą spektrometrii mas. Konieczna też była duża skrupulatność w przeprowadzeniu badań i interpretacji wyników, a także wytrwałość.

Z części eksperymentalnej i badań własnych wynika, że opisane w pracy syntezy zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone, a budowa chemiczna otrzymanych połączeń została potwierdzona za pomocą spektrometrii mas. Pani mgr Karolina Grabowska zsyntezowała na nośnikach stałych cykliczne analogi peptydu o sekwencji LPPR, poprzez podstawienie Leu¹ i Pro³ resztami umożliwiającymi połączenie ich łańcuchów bocznych mostkiem amidowym. Przeprowadziła też syntezy cyklicznych

peptydów przez połączenie reszty Glu³ z grupą alfa aminową N-końcowej reszty aminokwasowej. Okazało się, że próby syntezy peptydów z pierścieniami 12-13 członowymi prowadziły głównie do produktów cyklodimerycznych. Doktorantka optymalizowała syntezy cyklicznych monomerów stosując różne rodzaje żywic i środków sprzęgających, zmieniając konfiguracje reszt aminokwasowych w pierścieniu oraz wykorzystując wspomaganie mikrofalami.

Wszystkie zsyntezowane przez Autorkę związki zostały prawidłowo zanalizowane i opisane. Oczyszczone produkty poddano odpowiednim testom ELISA w celu określenia stopnia inhibicji układu VEGF165/NRP-1. Wyniki testów biologicznych były porównywane z wartościami otrzymanymi dla peptydu A7R, który pełnił funkcję standardu. Dla wybranych peptydów Doktorantka przeprowadziła badania cytostatyczne i stabilności w surowicy krwi.

Otrzymane peptydy cyklizowane metodą „łańcuch boczny do łańcucha bocznego” wykazały w testach ELISA aktywność inhibitorową wyższą od peptydu A7R. Najbardziej aktywne okazały się peptydy o sekwencji H-c[Lys-Pro-Glu]-Arg-OH H-c[Glu-Pro-Lys]-Arg-OH, zawierające 15 atomów w pierścieniu. Ich aktywność okazała się ponad 30 razy większa od aktywności peptydu A7R. Ponadto, związki te charakteryzowały się brakiem cytotoksyczności i wykazywały dużą stabilność proteolityczną w surowicy krwi. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem modelowania komputerowego sugerowały podobny sposób oddziaływania otrzymanych cyklopeptydów z domeną b1 NRP-1 jak u tuftsyny. Z dużym uznaniem odnoszę się do tych wyników uzyskanych przez Doktorantkę i uważam, że cyklopeptydy przez nią otrzymane będą mogły stanowić substancje wyjściowe do zaprojektowania aktywnych inhibitorów oddziaływania VEGF165/NRP-1, które będzie można zastosować w terapii przeciwnowotworowej.

Mam dwie drobne uwagi do tych wyników uzyskanych przez Doktorantkę. Uważam, że wybór peptydu A7R jako jedyne go związku referencyjnego w badaniach biologicznych nie był odpowiedni. Zaproponowana metoda cyklizacji peptydów wymagała zastąpienia dwóch reszt aminokwasowych (Leu¹ i Pro³) w skróconym analogu A7R (o sekwencji H-Leu-Pro-Pro-Arg-OH) resztami Lys (lub Orn) i Glu (lub Asp) a następnie połączeniu łańcuchów bocznych tych reszt wiązaniem amidowym. W mojej

opinii aby sprawdzić wpływ cyklizacji na aktywności inhibitorowe otrzymanych cyklopeptydów właściwszym byłoby zastosowanie liniowego związku referencyjnego zawierającego podobne grupy chemiczne co cykliczne peptydy, np. H-Lys(Ac)-Pro-Ala-Arg-OH lub H-Nleu-Pro-Gln-Arg-OH. Uważam też za wskazane przeprowadzenie badań fizykochemicznych pozwalających na określenie konformacji cyklicznych peptydów w roztworze. Określenie wpływu przeprowadzonych cyklizacji na konformację otrzymanych peptydów ułatwiłoby interpretację uzyskanych wyników badań biologicznych.

W recenzowanej rozprawie znalazło się kilka drobnych błędów literowych i nietrafnych sformułowań. Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej niektóre z nich:

1. Stwierdzenie (str. 2) "*Kąt psi występuje pomiędzy Ca -C, kąt phi pomiędzy N-Ca natomiast kąt omega znajduje się pomiędzy atomami -C-N-*" jest niepoprawne.
2. Trudno zgodzić się z Autorką, że cyklopeptydy opisane na str. 110. są peptydami z typem cyklizacji "głowa-do-ogona"
3. Peptyd B na Rys 13 nie zawiera wiązania CH₂-CH₂
4. Zdanie "*Obecność zredukowanego wiązania w strukturze peptydu powoduje wydłużenie czasu półtrwania związku*" jest niezrozumiałe.
5. Wprawdzie obydwa terminy: "wiązanie disulfidowe" i "wiązanie disiarczkowe" są poprawne w języku polskim, lecz stosowanie ich zamiennie w tej samej tabeli (Tab. 6) jest nieuzasadnione.
6. Rys. 65. Mostek A należałoby wyjaśnić jako -CO-NH- lub -NH-CO-.

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 cyklicznych peptydów oraz technik analitycznych, recenzowaną pracę doktorską oceniam bardzo pozytywnie. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka opublikowała swoje wyniki badań w dwóch publikacjach, które ukazały się w *Bioorganic & Medicinal Chemistry* i *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.

W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgr Karoliny Grabowskiej zatytułowana *Cykliczne peptydy o aktywności antyangiogennej* stanowi cenny wkład naukowy i spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym. Dlatego stawiam wniosek do Rady Wydziału Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Grabowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką wartość merytoryczną badań wykonanych przez Doktorantkę, niezwykle staranny sposób ich wykonania i opisanie, jak również zaprezentowanie wyników w dwóch publikacjach naukowych zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie tej pracy.

L. Hawara