

dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG

Gdańsk, 22 maja 2019 r.

Wydział Chemii

Uniwersytetu Gdańskiego

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Nieścioruk
z tytułem „Biokoniugaty o potencjalnej aktywności antyangiogennej”**

W procesie nowotworzenia fizjologiczny proces angiogenezy wymyka się spod kontroli, dając w efekcie warunki korzystne dla rozwoju guza. Jednym z głównych czynników proangiogennych jest białko VEGF₁₆₅, które wiążąc się do receptora VEGF-R oraz jego koreceptora neuropiliny-1 (NRP-1), występujących na powierzchni komórek endotelialnych naczyń krwionośnych, powoduje zapoczątkowanie wzrostu naczyń włosowatych. Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że oddziaływanie VEGF₁₆₅ z NRP-1 jest główną przyczyną patologicznej angiogenezy i w następstwie przyczyną rozrostu tkanki nowotworowej. Poszukiwanie związków mogących selektywnie blokować to oddziaływanie stało się przedmiotem badań wielu grup naukowych. Do tego nurtu badań można włączyć przedłożoną mi do recenzji pracę doktorską mgr Anny Nieścioruk, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik i dr Doroty Niecieckiej, pełniącej funkcję promotora pomocniczego.

Głównym zadaniem jakie postawiono przed Doktorantką były badania mające na celu otrzymanie dwóch rodzajów koniugatów o potencjalnej aktywności antyangiogennej, zaprojektowanych tak, aby selektywnie oddziaływały one z neuropiliną-1 (NRP-1). Pierwsze z nich to koniugaty peptydów lub peptydomimetyków z nanocząstkami magnetycznymi, drugi rodzaj to koniugaty heptapeptydu A7R z lekiem przeciwnowotworowym - 5-fluorouracylem (5-FU). W czasach intensywnego poszukiwania związków mogących stać się lekami przeciwnowotworowymi temat podjęty przez Doktorantkę uważam za bardzo aktualny i

ważny, a także ambitny, biorąc pod uwagę trudności na jakie może napotkać chemik chcący połączyć peptydy z nanocząstkami, oraz fakt wykorzystania w badaniach szeregu różnorodnych technik, umożliwiających scharakteryzowanie otrzymanych koniugatów.

Recenzowana rozprawa napisana została na 142 stronach. W rozprawie wyróżniono sześć części. Na początku znajduje się rozdział, w którym Doktorantka przedstawiła założenia i cel pracy, po nim przegląd literaturowy oraz rozdział poświęcony badaniom własnym, przedstawiający ogólny plan pracy i omawiający przeprowadzone syntezy i badania. Dalej znajduje się część eksperymentalna zawierająca opisy procedur zastosowanych podczas przeprowadzonych syntez, a po niej podsumowanie. Na końcu rozprawy znajduje się spis literatury cytowanej – 178 pozycji.

Część literaturowa, zawierająca siedem rozdziałów, dobrze wprowadza w tematykę badań własnych Kandydatki. Znajduje się w nich opis nośników substancji terapeutycznych, mechanizmów dostarczania leków, charakterystyka koniugatów i stosowanych w celu ich utworzenia linkerów i wiązań chemicznych, a także opis metod fizykochemicznych stosowanych do charakteryzowania nośników leków. 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 i tabele, ułatwiają lekturę tekstu.

Głównym celem pracy doktorskiej mgr Anny Nieścioruk było opracowanie skutecznych metod łączenia peptydów z nanocząstkami magnetycznymi i w efekcie synteza koniugatów. Peptydomimetyk użyty w tym celu przez Doktorantkę został wybrany z grupy otrzymanych przez pracowników Pracowni Peptydów Zakładu Chemii Organicznej i Technologii Chemicznej Wydziału Chemii UW związków o dużej aktywności antyangiogennej. Peptydy te zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencję heptapeptydu A7R, wykazującego aktywność antyangiogeną. Kolejnym celem było otrzymanie koniugatów heptapeptydu A7R z lekiem przeciwnowotworowym - 5-fluorouracylem (5-FU). Doktorantka zaplanowała również badania biologiczne, oraz cały szereg analiz wykorzystujących różnorodne techniki umożliwiające dokonanie charakterystyki koniugatów peptydów z nanocząstkami magnetycznymi.

W rozdziale pt: „Badania Własne” Doktorantka w szczegółowy sposób wyjaśniła wybór do koniugacji z nanocząstkami peptydomimetyku o sekwencji – H-Lys(hArg)-Dab-

Pro-Arg-OH (WAW 9), wybór linkerów posiadających ugrupowania umożliwiające koniugację oraz miejsc ich przyłączenia do peptydomimetyku.

Pierwszym etapem pracy była synteza na fazie stałej, sześciu peptydomimetyków i trzech peptydów. Peptydomimetyki te zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencję WAW 9, a każdy z nich miał przyłączony inny związek umożliwiający jego koniugację z nanocząstkami, bądź taki sam związek, ale przyłączony w innym miejscu peptydomimetyku. Przyłączone związki to: kwas pent-4-ynowy (w pierwszym wypadku przyłączony do grupy α -aminowej *N*-końcowej L-lizyny, w drugim do grupy α -aminowej L-argininy, przyłączonej do grupy ϵ -aminowej *N*-końcowej L-lizyny), grupa dansylowa przyłączona do grupy α -aminowej *N*-końcowej L-lizyny), Fmoc-Cys, L-cysteina i kwas 6-malemidoheksanowy (przyłączone do grupy α -aminowej L-argininy, przyłączonej do grupy ϵ -aminowej *N*-końcowej L-lizyny). Zsyntetyzowane peptydy to A7R i jego dwa analogi, uzyskane przez przyłączenie do *N*-końca peptydu cząsteczki kwasu pent-4-ynowego lub cząsteczki kwasu pent-4-ynowego, a następnie do niej $H_2N-PEG(3)N_3$. Miejsce przyłączenia Fmoc-Cys, L-cysteiny i kwasu 6-malemidoheksanowego do peptydomimetyku Doktorantka ustaliła po wykonaniu immunoenzymatycznego testu ELISA, któremu poddane zostały peptydomimetyki z przyłączonym kwasem pent-4-ynowym.

W następnym etapie pracy, mgr Nieścioruk przeprowadziła cały szereg reakcji, które pozwoliły na opracowanie procedury przyłączania peptydu A7R i peptydomimetyku WAW 9 do nanocząstek magnetycznych, zbudowanych z ferrytu niklowo-cynkowego o ogólnym wzorze $Ni_{0,5}Zn_{0,5}Fe_2O_4$, których powierzchnia została zmodyfikowana kwasem sebacynowym. W celu dokonania połączenia składników koniugatu przez utworzenie pierścienia triazolowego do nanocząstek przyłączony został wiązaniem amidowym $H_2N-PEG(3)-N_3$.

Doktorantka otrzymała nowe koniugaty: dwa peptydowe i jeden peptydomimetyku z nanocząstkami magnetycznymi oraz dwa peptydy z 5-fluorouracylem. Trzy pierwsze zbudowane są z:

- peptydu A7R połączonego z nanocząstką wiązaniem amidowym utworzonym przez grupę α -aminową *N*-końcowej L-alaniny peptydu i grupę karboksylową kwasu sebacynowego, którym modyfikowana była powierzchnia nanocząstek,
- peptydu A7R połączonego z nanocząstką przez pierścień triazolowy utworzony przez kwas pent-4-ynowy, przyłączony do grupy α -aminowej *N*-końcowej L-alaniny peptydu i azydek ($H_2N-PEG(3)$) przyłączony do nanocząstki modyfikowanej kwasem sebacynowym

- peptydomimetyku WAW 9 połączonego z nanocząstką przez pierścień triazolowy utworzony przez kwas pent-4-ynowy, przyłączony do grupy α -aminowej L-argininy i azydek ($H_2N-PEG(3)$) przyłączony do nanocząstki modyfikowanej kwasem sebacynowym, koniugat ten zawierał również grupę dansylową przyłączoną do grupy α -aminowej N-końcowej L-lizyny.

Kolejne dwa, to koniugaty peptydu A7R z 5-fluorouracylem. Koniugaty te różnią się zastosowanym do utworzenia łączącego oba składniki wiązania amidowego linkerem (kwas chlorooctowy lub bezwodnik kwasu bursztynowego).

Kolejny etap to wybór odpowiednich technik umożliwiających wykonanie charakterystyki otrzymanych koniugatów. W tym miejscu należy zauważyć, że wykorzystane do tego celu metody fizykochemiczne nie są powszechnie stosowane przez chemików zajmujących się syntezą peptydów i ich koniugatów. Przeprowadzone badania i ich wyniki pokazują jednak, że Doktorantka nie tylko umiejętnie się nimi posłużyła i potrafiła prawidłowo zinterpretować uzyskane wyniki, ale i udowodniła, że potrafi nawiązać współpracę z innymi naukowcami, w celu wszechstronnego zbadania problemu naukowego.

Trzy z otrzymanych koniugatów zostały poddane badaniom cytotoksyczności na dwóch liniach komórkowych: nowotworowej (MDA-MB-231) i normalnej (HUVEC) z ekspresją NRP-1. Przeprowadzone badania pokazały, że koniugat peptydu A7R z nanocząstkami magnetycznymi, uzyskany w wyniku utworzenia wiązania amidowego między nimi, powoduje spadek żywotności komórek HUVEC o 40-50% dla wyższych stężeń żelaza. Niestety połączenie 5-fluorouracylu z peptydem A7R nie spowodowało zmniejszenia jego toksycznego działania wobec normalnych komórek.

Lektura rozdziałów trzeciego, zawierającego wyniki przeprowadzonych eksperymentów oraz liczne widma FTIR, EDS i termogramy uzyskane w czasie badań koniugatów, oraz czwartego, w którym zebrane zostały opisy przeprowadzonych syntez upewnia, że mgr Anna Nieścieruk zrealizowała zakładane cele pracy doktorskiej. Pewien niedosyt stanowi fakt, że doktorantka nie podjęła próby otrzymania koniugatów z zsyntetyzowanymi analogami WAW 9, zaprojektowanymi w celu uzyskania innego połączenia składników niż przez pierścień triazolowy czy wiązanie amidowe, czego powodem był jak się domyślam brak wyników ich badań biologicznych i pewnie czasu. Proszę także o informację, czy otrzymane koniugaty zostały przebadane w teście ELISA pod kątem zdolności do hamowania wiązania się VEGF-A₁₆₅ do NRP-1.

Doktorantka nie przedstawiła żadnego z chromatogramów otrzymanych podczas analiz HPLC oczyszczonych peptydów, peptydomimetyków, czy koniugatów z 5-fluorouracylem, a

dostarczyłoby to informacji na temat jednorodności związków użytych do koniugacji czy też utworzonych koniugatów.

Podsumowując, wysoko oceniam poziom merytoryczny badań przedstawionych w rozprawie. Zostały one dobrze zaplanowane i wykonane, mimo iż grupa prof. Misickiej-Kęsik nie miała żadnego doświadczenia w pracy z nanocząstkami. Zakres wykonanych badań jest szeroki: od pracochłonnych syntez chemicznych i oczyszczania ich produktów, przez fizykochemiczne analizy koniugatów, do badań biologicznych. Na uznanie zasługuje także sposób prezentacji wyników i prowadzenia dyskusji przy ich omawianiu. Wszystkie umiejętności jakimi wykazała się Doktorantka pozwalają stwierdzić, że jest ona dobrze przygotowana do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych. Efektem wykonanych przez Kandydatkę syntez i badań jest również publikacja w czasopiśmie z listy JCR.

Pracę mgr Nieścioruk przeczytałam z dużym zainteresowaniem, co przyczyniło się do znalezienia kilku nieścisłości i niefortunnych według mnie określeń, które z obowiązku recenzenta przedstawię.

Na str. 4 znajduje się rysunek 1, który wydaje mi się nie do końca zgodny z podpisem. Nieprecyzyjny jest też podpis części B) inhibicja VEGF₁₆₅ przez heptapeptyd A7R.

Rysunek 16 na str. 25 przedstawia wzory strukturalne, a nie struktury koniugatów z doksorubicyną.

Na str. 50 Doktorantka napisała „grupa aminowa łańcucha bocznego kwasu α , γ -diaminobutanowego wpływa na zdolność inhibicji VEGF₁₆₅ do NRP-1”. Co to właściwie oznacza? Wydaje mi się też, że czasem lepiej pasuje polskie słowo hamowanie niż inhibicja, tak jak hamuje zamiast inhibituje (str. 3). Podobnie, na następnej stronie Doktorantka użyła określenia „reakcja guanidynyacji”, poprawnie powinno zostać napisane, reakcja guanidynyłowania czy też guanidynowania.

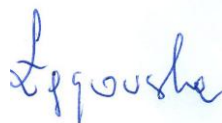
Jeśli używa się pięciokrotnego nadmiaru jakiegoś związku w reakcji, to nie jest to „dodatek”, nie można więc napisać, że „Kolejne pochodne aminokwasów przyłączono metodą soli uroniowych z zastosowaniem TBTU jako czynnika sprzęgającego z dodatkiem DIPEA” tak jak ma to miejsce na str. 53. Wielokrotnie Doktorantka napisała też, że jakiś związek np. kwas 6-malemidoheksanowy przyłączono np. z 2,5-krotnym nadmiarem, powinno być ”związek przyłączono stosując 2,5-krotny nadmiar”.

W sposób niewłaściwy zatytułowano rozdział 3.4. Część B: a mianowicie „Synteza koniugatów nanocząstek magnetycznych modyfikowanych peptydem lub peptydomimetykiem o właściwościach antyangiogennych”, bo nanocząstki były

modyfikowane kwasem sebacynowym, a nie peptydem czy peptydomimetykiem, które to były składnikami koniugatów.

Dostrzeżone przeze mnie usterki i nieścisłości w żadnym razie nie mają wpływu na wartość naukową pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska 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) wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017, poz. 1789), rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego: w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 19 stycznia 2018 r. (Dz. U. z 30 stycznia 2018 r., poz. 261)) i zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Anny Nieścioruk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'L. G. G. G. G.', is centered on the page. The signature is written in a cursive style and is set against a light blue rectangular background.