
Gdańsk, dnia 19 sierpnia 2019 r.

**Ocena pracy doktorskiej mgr. Bartłomieja Fedorczyka
p.t. „Triazolopeptydowe inhibitory kompleksu VEGF₁₆₅/NRP-1”**

Opracowanie i wprowadzenie do praktyki medycznej skutecznych, celowanych terapii przeciwnowotworowych to od wielu lat jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Równolegle z pracami nad poszukiwaniem nowych leków cytostatycznych – grupy farmaceutyków stanowiących podstawę tradycyjnej chemioterapii systemowej, prowadzone są badania nad związkami ingerującymi w transmisję sygnałów w komórkach warunkujących ich funkcjonowanie. Zakłócenie równowagi komunikacji między- lub wewnątrzkomórkowej prowadzi do progresji nowotworowej. Z tego powodu związki chemiczne wiążące się z innymi receptormi lub ich ligandami charakteryzującymi się nadekspresją w komórkach nowotworowych, lub ingerujące w skomplikowane oddziaływania między elementami kompleksów sygnałowych mają duży potencjał farmakoterapeutyczny. W nurt tych badań wpisuje się recenzowana rozprawa doktorska mgr. Bartłomieja Fedorczyka. Przedmiotem zainteresowania Doktoranta był kompleks białka sygnałowego – czynnika wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych i neuropiliny-1 (VEGF₁₆₅/NRP-1), który wraz z trzecim komponentem, receptorem czynnika wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych typu 2 (RVEGF-2), uczestniczy między innymi w angiogenezie. NRP-1 pełni rolę koreceptora dla VEGF₁₆₅, warunkując, dzięki odpowiedniemu ułożeniu w przestrzeni, jego wiązanie z RVEGF-2. Wyżej wymieniony kompleks odpowiedzialny jest za proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych w komórkach nowotworowych. Zadanie postawione przed Kandydatem jakim było zaprojektowanie i otrzymanie na drodze syntezy chemicznej peptydomimetyków hamujących oddziaływania

między VEGF₁₆₅ i NRP-1 oceniam jako ambitne, a wybrane podejście nowatorskie. Temat rozprawy bez wątpienia leży w głównym nurcie współczesnej chemii biomedycznej, o czym przekonują liczne prace nawiązujące do przedstawionej powyżej problematyki, opublikowane w bardzo dobrych czasopismach z listy JCR.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska to 135 stron tekstu. Zasadnicze rozdziały pracy to: *Część literaturowa* (32 strony), *Cele pracy* (4 strony), *Badania własne* (28 stron), *Część doświadczalna z dyskusją wyników* (20 stron), *Wnioski* (5 stron) oraz rozdział zatytułowany *Dodatek* zawierający opis stosowanej aparatury i analizy HPLC i MS syntetyzowanych związków. Rozprawę uzupełniają: streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz dorobku naukowego Kandydata, wykaz skrótów oraz literatury cytowanej (141 pozycji). Opis prowadzonych eksperymentów i dyskusja wyników uzyskanych przez Kandydata stanowi ponad 50% opracowania. Proporcje takie uznaję za właściwe.

W przeglądzie literaturowym Kandydat wyróżniał pięć podrozdziałów. Prezentowane tu zagadnienia bardzo dobrze uzasadniają celowość podjętych badań. W pierwszym podrozdziale przedstawiona została zwięzła charakterystyka neuropilin – białek membranowych, jednego z trzech komponentów kompleksu sygnałowego związanego z rozwojem układu nerwowego i krwionośnego. W kontekście badań podjętych przez Kandydata szczególnie ważnym odkryciem był udział kompleksu, tworzonego przez receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych typu 2, izoformę czynnika wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych i jedną z neuropilin (RVEGF-2)/VEGF₁₆₅/NRP-1) w rozwoju chorób nowotworowych. Układ taki indukuje (w wyniku nadekspresji NRP-1) angiogenezę komórek nowotworowych, a także, wykorzystując limfocyty T gospodarza, działa immunosupresyjnie. W kolejnym podrozdziale Doktorant przedstawia możliwe mechanizmy selektywnego blokowania przekazywania sygnału przez w/w kompleks. Podaje przykłady inhibitorów RVEGF-2 (białko o aktywności kinazy tyrozynowej), przeciwciał VEGF₁₆₅ oraz inhibitorów tworzenia kompleksu VEGF₁₆₅/NRP-1. Ostatnia grupa związków stanowi przedmiot zainteresowania Doktoranta, ich charakterystyka stanowi więc zasadniczą część opracowania. Wśród badanych związków były fragmenty i analogi VEGF₁₆₅, krótkie peptydy wyselekcjonowane z bibliotek fagowych, kalata B1 (peptyd z rodziny cyklotydydów) a także peptydomimetyki i niskocząsteczkowe związki organiczne. Istotne znaczenie w projektowaniu związków hamujących tworzenie w/w kompleksu miała analiza jego struktury krystalicznej i identyfikacja miejsc bezpośredniego kontaktu obu białek. Na jej podstawie zaproponowano model oddziaływania VEGF₁₆₅ z peptydami o motywie K/RXXR/K wyselekcjonowanymi z bibliotek fagowych. Peptydy takie charakteryzowały się aktywnością antyangiogenną w

stosunku do komórek nowotworowych. Badania zależności struktura – aktywność (SAR) prowadzone w Pracowni promotorki rozprawy, prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik dowiodły, że najefektywniejszym inhibitorem tworzenia kompleksu okazał się tetrapeptyd o sekwencji KPPR. Związek ten stanowił więc strukturę wyjściową w poszukiwaniu bardziej aktywnych inhibitorów tego procesu. Rozdział kończy się szczegółowym opisem wyników badań prowadzonych w Pracowni Promotorki dysertacji. Spośród kolejno syntetyzowanych serii analogów tego peptydu wyselekcjonowano peptydy o wartościach IC_{50} , wyznaczonych w teście immunoenzymatycznym ELISA, znacznie niższych niż macierzysty związek. Najwyższą aktywność, wśród modyfikowanych w pozycjach 2 lub 3, wykazał peptyd Har-Dab-Pro-Arg ($IC_{50} = 0,8 \mu M$). Dalsze modyfikacje w pozycji 1 doprowadziły do otrzymania peptydu Lys(Har)-Pro-Dab-Arg o czterokrotnie niższej wartości IC_{50} oraz dużej odporności na działanie enzymów ludzkiego osocza ($t_{1/2} = 41$ godz.). Wyniki eksperymentalne znalazły potwierdzenie w analizie kompleksów badanych związków z NRP-1 wygenerowanych metodami dynamiki molekularnej. Uzyskane wyniki stanowią punkt wyjścia w badaniach wchodzących w zakres recenzowanej rozprawy. Należy podkreślić, że Kandydat jest współautorem prac, referujących przedstawione powyżej wyniki. Lektura tego rozdziału dowodzi, że Autor potrafi redagować tekst naukowy. Strona językowa tej części rozprawy nie budzi zastrzeżeń. Przegląd literaturowy ma charakter syntetyczny, niemniej przekonywająco uzasadnia celowość podjętych badań. W realizowanym projekcie Doktorant odpowiedzialny był za część syntetyczną. Celowym więc byłoby umieszczenie w tym rozdziale także przeglądu metod syntetycznych wykorzystujących 1,3-dipolarną cykloaddycję Huisgena, katalizowaną jonami miedzi(I) (CuAAC) typu „click”. Reakcje te były przedmiotem badań Kandydata. W rozdziale badań własnych znajdują się odwołania do warunków prowadzenia tego typu reakcji. Moim zdaniem, zagadnienie to należało bardziej szczegółowo zreferować w części literaturowej rozprawy. Związki hamujące wiązanie liganda VEGF₁₆₅ do receptora NRP-1 Autor określa terminem „*inhibitory NRP-1*”. Związki te są raczej antagonistami receptora. Termin *inhibitor* oznacza związek hamujący aktywność enzymu. Zapis w tekście układów cyklicznych w peptydach zastosowany w rozprawie (str. 15, linia 11) jest mało czytelny. Sugerowałbym zastosować propozycję zapisu Spenglera i współpr.(J. Pept. Res., 2005, 550-555).

Zagadnienia prezentowane w przeglądzie literaturowym, w pełni uzasadniają cel badań podjętych przez Doktoranta. Bardzo obiecujące wyniki dotychczasowych prac prowadzonych w jednostce macierzystej mgr. Fedorczyka doprowadziły do otrzymania inhibitorów tworzenia kompleksu VEGF₁₆₅/NRP-1 o wartościach IC_{50} dwudziestokrotnie niższych niż wyznaczone dla wyjściowego tetrapeptydu KPPR. Peptydy te charakteryzowały się też dużą trwałością w

osoczu ludzkim. Zadanie, jakiego podjął się Doktorant to zaprojektowanie i chemiczna synteza wydajnych inhibitorów tworzenia kompleksu VEGF₁₆₅/NRP-1 będących peptydomimetykami wcześniej otrzymanych związków. Modyfikacje obejmowały pozycje 2 i/ albo 3 oraz *N*-końcową resztę aminokwasową. Kandydat postanowił dokonać oceny możliwości podstawienia środkowych reszt aminokwasowych ugrupowaniem 1,4-dipodstawionego 1,2,3-triazolu stanowiącego mimetyk wiązania peptydowego. Dotychczasowe wyniki, uzyskane z badań eksperymentalnych wsparte obliczeniami teoretycznymi, stanowiły solidną podstawę wspierającą przyjętą hipotezę badawczą.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym *Badania własne*, znajduje się opis eksperymentów prowadzonych przez Kandydata. Poprzedza go przekonujące uzasadnienie modyfikacji wprowadzanych do wyjściowego pentapeptydu (Lys(Har)-Pro-Dab-Arg). W ramach rozprawy mgr Fedurczuk otrzymał dwie serie, łącznie 23 peptydomimetyki, zawierające od 1 do 3 ugrupowań 1,4-dipodstawionego triazolu. Do ich syntezy Kandydat zastosował metodę chemii *click*, opublikowaną niezależnie w roku 2001 przez grupy Meldala i Sharplessa. Optymalizując metody opisane w literaturze, Doktorant opracował wydajną metodę syntezy na nośniku stałym oligomerów zbudowanych z pochodnych triazolu. Tworzenie tego ugrupowania obejmowało: przekształcenie grupy aminowej związku przyłączonego do polimeru w grupę azydkową, jej reakcję z *N*-fluorenylometoksykarbonylo-3-aminopropynem oraz usunięciem osłony Fmoc. Optymalizacja warunków prowadzenia reakcji (dobór rozpuszczalników, składu reagentów) oraz wykorzystanie klasycznych metod syntezy peptydów na nośniku stałym pozwoliła Doktorantowi na otrzymanie z dużymi wydajnościami, jednorodnych chromatograficznie, wszystkich zaplanowanych peptydomimetyków. Przedstawiona w rozprawie charakterystyka fizykochemiczna (analizy HPLC i MS zamieszczono w *Dodatku*) przekonuje o prawidłowości przebiegu prowadzonych eksperymentów. Dwa z syntetyzowanych peptydomimetyków (oznaczone jako L/D-Lys(Har)-GlyΨ[Trl]-GlyΨ[Trl]-Arg (**3,4**)) Doktorant poddał inkubacji z osoczem krwi ludzkiej. Oba związki okazały się bardzo odporne na działanie enzymów osocza. Po 48 godz. inkubacji jedynie odpowiednio ok. 28% izomeru L i 9% izomeru D uległo rozpadowi. W tym miejscu rodzi się pytanie, czy oznaczano podatność na proteolizę syntetyzowanych związków (także tych wcześniej otrzymywanych) w surowicy? Wysoko oceniam wartość merytoryczną badań wykonanych przez Doktoranta. Opracowana w ramach rozprawy metoda tworzenia pochodnych 1,4-dipodstawionego triazolu, z uwagi na duże zainteresowanie rekcjami typu *click*, z pewnością zainteresuje wiele grup badawczych. Redakcja tego i kolejnych rozdziałów rozprawy sugeruje, że Kandydat pracował pod presją czasu, niemniej dostrzeżone

niedociągnięcia nie utrudniają lektury tekstu. Poniżej wymieniam niektóre z nich: nie wyjaśniono skrótów 6-Ahx i 5-Ava, związek oznaczony jako PEG to poli(tlenek etylenu), w opisie transformacji grupy aminowej do azydkowej (str. 52) nie podano nawet przybliżonej ilości czynnika do diazotransferu, podobnie 3-aminopropynu w opisie na str. 55, w tabelicy 8 zamiast „alkil” powinno być „alkin”, w pracy nie znalazłem specyfikacji kolumny preparatywnej oraz warunków oczyszczania, chociaż tytuł podrozdziału (2.6.1) sugeruje, że tam powinny znajdować się te informacje. W kontekście konieczności stosowania wody jako jednego z rozpuszczalników, rodzi się pytanie dlaczego Doktorant nie zdecydował się na zastosowanie w prowadzonych syntezach żywicy typu TentaGel ? Jak już wspomniałem, analizy HPLC i MS syntetyzowanych związków znajdują się w rozdziale zatytułowanym *Dodatek*. Szkoda, że Doktorant nie pokazał chociaż przykładowych chromatogramów z rozdziałów preparatywnych. Symetryczne piki na zamieszczonych chromatogramach są dosyć szerokie. Jest to zapewne związane z silnie zasadowym charakterem triazolopeptydów. Czy Kandydat podjął próbę zastosowania innej fazy ruchomej, o wyższym pH?

W rozdziale, moim zdaniem niefortunnie zatytułowanym, *Część doświadczalna z dyskusją wyników*, Autor opisał wyniki badań syntetyzowanych przez Niego peptydomimetyków przeprowadzonych przez inne osoby. Test immunoenzymatyczny ELISA mający na celu ocenę wpływu peptydomimetyków na tworzenie kompleksu VEGF₁₆₅/NRP-1 przeprowadziła dr Anna Puszko z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Niestety żaden z syntetyzowanych triazolopeptydów nie wykazał wyższej aktywności hamującej tworzenia w/w kompleksu. Najniższą wartość IC₅₀ (8,39 μM) uzyskano dla peptydomimetyku Lys(Har)-GlyΨ[Trl]-GlyΨ[Trl]-Arg (**3**). Była ona ponad 40 razy wyższa niż dla peptydu zawierającego w środkowym fragmencie reszty -Pro-Dab-. Symulacje oddziaływania metodą dynamiki molekularnej tego peptydomimetyku z NRP-1 przeprowadził dr Piotr Lipiński z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. W analizowanym kompleksie zidentyfikowano kontakty obu komponentów charakterystyczne dla wyjściowego pentapeptydu, niemniej *N*-końcowy fragment Lys(Har) w wypadku badanego peptydomimetyku wykazuje większą swobodę konformacyjną, czym tłumaczy się jego niższą aktywność. Z kolei związek (**4**), nieco mniej aktywny niż (**3**), za to o wyższej odporności na działanie enzymów osocza, w stężeniu 10 krotnie wyższym niż wartość IC₅₀ nie miał wpływu na żywotność komórek szpiku kostnego (eksperymenty przeprowadzone przez dr Wioletę Dudkę z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN). W rozdziale tym opisano także próbę oceny wpływu poszczególnych elementów strukturalnych (grup aminowych, pierścieni triazolowych, odległości między grupami guanidynowymi) na hamowanie tworzenia kompleksu. Uzyskane wyniki co prawda nie

pozwalają na ich jednoznaczną interpretację, niemniej poszerzają potencjał badawczy Kandydata. Eksperymenty opisane w tym rozdziale nie były wykonane przez Doktoranta. Zwraca jednak uwagę zarówno szczegółowy ich opis jak i dyskusja uzyskanych wyników. Świadczy to bardzo dobrze o Kandydacie, który nie ogranicza swojego zainteresowania to zadań własnych. W tym fragmencie rozprawy znalazłem niedociągnięcia, np. w związku (14) blokowana jest grupa α -aminowa Har nie Lys. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na uchybienia w spisie literatury (np. brak kilku tytułów czasopism).

Reasumując, uważam, że mgr Bartłomiej Fedorczyk przedłożył interesującą i oryginalną w treści rozprawę doktorską. Po jej lekturze stwierdzam, że jest On bardzo wykształconym chemikiem, zarówno od strony teoretycznej jak też praktycznej, tym samym przygotowany jest do prowadzenia badań naukowych. Temat podjęty przez Doktoranta jest atrakcyjny z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego, o czym świadczy między innymi fakt, że część wyników związana z tematem rozprawy, w tym wchodzące w jej zakres, została opublikowana w 4 pracach oryginalnych w czasopismach z list JCR oraz objęta ochroną w dwóch patentach. Wysoko oceniam poziom merytoryczny badań wykonanych przez Doktoranta. Opracował efektywną i wygodną metodę syntezy na nośniku stałym oligomerów zawierających 1,4-dipodstawione pierścienie triazolowe. Kandydat jest współautorem 9 prac, które ukazały się w czasopismach z listy JCR. W wypadku doktoranta, to bardzo dobry dorobek naukowy. Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe (Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami (Dz. U. 1789 z 27 września 2017 roku) oraz rozporządzenia MNiSz (w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 19 stycznia 2018 r. (Dz. U. poz. 261 z dnia 30 stycznia 2018 roku) oraz zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr. Bartłomieja Fedorczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Krzysztof Rolka