

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, 2019-08-23

## **Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Bartłomieja Fedorczyka zatytułowanej „Triazolopeptydowe inhibitory kompleksu VEGF<sub>165</sub>/NRP-1”**

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego jest jednym z najważniejszych czynników odpowiedzialnych za proces angiogenezy. Obecnie uważa się, że substancje hamujące oddziaływanie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego 165 (VEGF<sub>165</sub>) z neuropiliną 1 (NRP-1) są potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi, gdyż mogą hamować angiogenezę nowotworową. Wśród wielu znanych inhibitorów kompleksu VEGF<sub>165</sub>/NRP-1 duże nadzieje budzi tetrapeptyd o sekwencji KPPR, i jego analogi strukturalne, odkryte przez zespół naukowy prof. dr hab. Misickiej-Kęsik we współpracy z badaczami z Université Paris XIII. Szczególnie aktywne okazały się analogi zawierające resztę homoargininy (Har) przyłączoną do łańcucha bocznego N-terminalnej reszty lizyny (H-K(Har)PPR-OH, Lys(Har)Dab-ΔPro-Arg i Lys(Har)-Dab-Oic-Arg). Niestety, okazało się, że w peptydy te nie są dostatecznie trwałe w ludzkim osoczu, gdyż ulegają stosunkowo szybkiej degradacji enzymatycznej. Dlatego konieczne stało się zaprojektowanie nowych analogów odpornych na proteolizę.

Pan mgr Bartłomiej Fedorczyk włączył się w nurt tych badań i pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik wykonał pracę doktorską poświęconą zaprojektowaniu i syntezie serii związków opartych o strukturę H-Lys(Har)-Xaa-Xaa-Arg-OH, zawierających układy triazolowe w łańcuchu peptydowym. Tematyka badawcza przedstawiona w pracy doktorskiej mgra Bartłomieja

Fedorczyka jest więc zgodna z jej tytułem. Ponadto jest aktualna i ciekawa zarówno z naukowego jak i utylitarne punktu widzenia. Praca została wykonana w Pracowni Peptydów Zakładu Chemii Organicznej i Technologii Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Rozprawa doktorska mgra Bartłomieja Fedorczyka liczy 135 stron i składa się z sześciu zasadniczych części: *Wstępu* (3 strony), *Części literaturowej* (24 strony), *Cele pracy* (4 strony), *Badań własnych* (28 stron), *Części doświadczalnej z dyskusją wyników* (20 stron) oraz *Wnioski* (4 strony). Ponadto Autor przedstawił dwustronicowe streszczenie pracy w języku angielskim (*Abstract*), oraz *Dodatek* (31 stron), w którym przedstawił *Stosowaną aparaturę oraz odczynniki chemiczne, Charakterystyki związków, Krzywe typu dawka-odpowiedź dla najsilniejszych inhibitorów triazolopeptydowych oraz Dorobek naukowy autora pracy*. Rozprawę kończy *Bibliografia* (141 pozycj1)

W mojej opinii proporcja między częścią literaturową i częścią badawczą jest prawidłowa. Układ pracy doktorskiej mgra Bartłomieja Fedorczyka i struktury podziału treści są poprawne, chociaż połączenie części doświadczalnej z dyskusją wyników w jeden rozdział może utrudnić czytanie rozprawy. Natomiast z uznaniem odnoszę się do pomysłu Autora na wprowadzenia do manuskryptu suplementu pracy ("*Dodatek*"), który zawiera między innymi chromatogramy i widma MS wszystkich zsyntezowanych substancji.

W *Części literaturowej* Autor krótko omówił neuropiliny, opisał układ VEGFR-2/VEGF<sub>165</sub>/NRP-1 i inhibitory jego tworzenia ze szczególnym uwzględnieniem inhibitorów peptydowych. Rozdział ten zawiera wiele cennych i umiejętnie dobranych informacji naukowych. Zawarte w nim treści dowodzą dużej znajomości bieżącej literatury na temat inhibitorów oddziaływania VEGF<sub>165</sub> z NRP-1. Informacje zostały przedstawione językiem zrozumiałym dla szerokiego grona czytelników. Rozdział ten zawiera wszystkie informacje niezbędne do wyjaśnienia celu pracy. Dlatego bardzo wysoko oceniam tą część rozprawy doktorskiej mgra Bartłomieja Fedorczyka.

Celem recenzowanej pracy doktorskiej było zaprojektowanie, synteza chemiczna oraz badania stabilności nowych inhibitorów kompleksu VEGF<sub>165</sub>/NRP-1 o wzorze ogólnym H-Lys(Har)-Xaa-Xaa-Arg-OH. W celu zwiększenia stabilności otrzymanych peptydów w ludzkim osoczu Doktorant zdecydował się na wzmocnienie labilnego

fragmentu inhibitora przez wprowadzenie reszt aminokwasowych zawierających 1,4-, dipodstawione 1,2,3-triazole. Stanowiły one nietypowe bioizostery wiązań peptydowych, które miały być odporne na proteolizę. Zrealizowanie badań przedstawionych w celu pracy wymagało wykonania wieloetapowych syntez chemicznych, oczyszczania i analizy otrzymanych połączeń oraz przeprowadzenia analizy ich stabilności w ludzkim osoczu. Doktorant musiał zatem opanować i zastosować wiele nowoczesnych metod badawczych, takich jak: synteza peptydów na nośniku polimerowym, synteza organiczna w roztworze, wysokosprawna chromatografia cieczowa, spektrometria mas, magnetyczny rezonans jądrowy i badania stabilności związków chemicznych w osoczu.

Z kolejnych rozdziałów wynika, że struktury peptydów zostały prawidłowo zaprojektowane, syntezy oraz badania stabilności otrzymanych produktów były fachowo przeprowadzone, a następnie opisane. Doktorant zsyntezował 23 triazolopeptydy na nośniku stałym. Były to trudne i czasochłonne syntezy, gdyż peptydy zawierały niebiałkowe reszty aminokwasowe zawierające pierścienie triazolowe, otrzymane na drodze 1,3-dipolarnej cykloaddycji. Opis przeprowadzonych syntez był bardzo dokładny, chociaż momentami zbyt szczegółowy. Taka szczegółowość jest nietypowa dla publikacji naukowych lub rozpraw doktorskich, więc rozdział ten mógłby zostać skrócony. Z drugiej strony nawet niedoświadczony czytelnik będzie mógł z łatwością powtórzyć syntezy przeprowadzone przez mgra Bartłomieja Fedorczyka. Dokładny opis i szczegółowe wytłumaczenie przeprowadzanych operacji laboratoryjnych świadczy o zamiłowaniach dydaktycznych Autora rozprawy i umiejętności wyjaśniania problemów syntetycznych. Dlatego pozytywnie oceniam tą część recenzowanej rozprawy.

Należy podkreślić, że Doktorant przeprowadził wiele eksperymentów mających na celu poprawę wydajności poszczególnych etapów syntezy oraz obniżenia jej kosztów. Wykazał się przy tym krytyczną analizą wyników uzyskanych w poszczególnych krokach syntezy i dość dobrą umiejętnością poprawnego wyciągania wniosków. Otrzymane przez Doktoranta triazolopeptydy zostały skutecznie oczyszczone za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej a ich tożsamość jednoznacznie potwierdzona za pomocą spektrometrii mas. Następnie, za pomocą chromatografii cieczowej

sprężonej z detektorem UV i ze spektrometrem mas, Autor przeprowadził badania odporności triazolopeptydów na enzymy obecne w osoczu ludzkim.

Zsyntezowane triazolopeptydy zostały przekazane dr Annie Puszek z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w celu określenia aktywności inhibitorowej z wykorzystaniem odpowiednich testów ELISA. Natomiast wpływ związku nr. 4 na żywotności komórek szpiku kostnego został zbadany przez dr Wioletę Dudkę-Ruszkowską w Pracowni Cytometrii, Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN. Ponadto, w celu wyjaśnienia aktywności inhibitorowej triazolopeptydu 3 w stosunku do NRP-1, zostały przeprowadzone symulacje dynamiki molekularnej przez dra Piotra Lipińskiego w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Autor dokładnie opisał te badania. Powyższe wymienione badania zostały przeprowadzone przez innych badaczy, więc metodologia tych badań nie wymaga mojej oceny.

W *Części Doświadczalnej z Dyskusją Wyników* przedstawiono eksperymenty i omówiono wyniki badań aktywności inhibicyjnej triazolopeptydów w teście immunoenzymatycznym ELISA, symulacji dynamiki molekularnej pozwalającej na ustalenie zależności struktura-aktywność inhibicyjna oraz badania żywotności komórek szpiku kostnego w obecności jednego z wybranych związków. Interpretacje uzyskanych wyników są prawidłowe. Autor bardzo dokładnie opisał te badania, choć z treści rozprawy doktorskiej nie wynika, że w nich uczestniczył. Świadczy to o dużej ciekawości naukowej Autora i chęci zdobycia jak największej wiedzy od osób, z którymi współpracuje. Ostatnią część pracy stanowi *Podsumowanie*, w którym Autor w sposób zadowalający przedstawił swoje osiągnięcia.

Na podstawie różnic aktywności inhibicyjnych zmierzonych dla zsyntetyzowanych związków Doktorant wskazał najaktywniejsze analogi. Wprawdzie ich aktywności inhibitorowe były niższe od aktywności pierwowzoru (peptydu A7R), lecz ich stabilności w środowisku ludzkiego osocza były bardzo wysokie. Potwierdziło to wcześniejsze założenie Autora, że wprowadzenie układu triazolowego do łańcucha głównego peptydu zwiększy jego stabilność w płynach ustrojowych. Ponadto, otrzymane wyniki badania żywotności komórek szpiku kostnego pozwoliły wyciągnąć wniosek, że badany triazolopeptyd 4 nie wpływał na zdolność przeżycia tych komórek.

W mojej opinii, uzyskane wyniki wykonanych badań są ciekawe i wartościowe, a cel pracy został osiągnięty. Wysoko oceniam ilość, różnorodność i wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań. Doktorant wykazał się krytycznym sposobem interpretowania wyników i ostrożnym wyciąganiem wniosków, co świadczy o Jego dojrzałości badawczej.

Rozprawa została napisana na ogół poprawnym językiem. Na uwagę zasługuje jej estetyczny wygląd i pomysłowe rysunki. W pracy natrafiłem na kilka błędów literowych i nietrafnych sformułowań. Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej niektóre z nich i dołączam kilka uwag:

- Str. 52. Fragment opisu syntezy: "Niewłocznie mieszaninę zaciągnięto do naczynia wypełnionego peptydylo-żywicą" jest nieściśły i przez to niezrozumiały.
- Str. 55. Nie jest jasne, co Autor rozumie przez "THF (bez wcześniejszego przygotowania)".
- Str. 57. Stwierdzenie " Spektrogramy zostały wykonane przy użyciu spektrometru masowego z pułapką jonową i detektorem typu czas przelotu..." jest niepoprawne. Podobny błąd jest na str. 95.
- Str. 59. Nie jest jasne, w jaki sposób Autor obliczył wydajności sumaryczne przedstawione w Tabeli 11.
- Tamże. Mam zastrzeżenia do stwierdzenia: "Wszystkie analizy zachodziły w sposób ilościowy według testów barwnych...".
- Str. 61 i 62. Autor twierdzi, że "widoczny pik przed sygnałem od badanego analitu pochodzi z układu chromatograficznego – tło". Proszę o wskazanie możliwych przyczyn pojawienia się tego piku.
- Str.90. Trudno zgodzić się z takim stwierdzeniem: "Wszystkie etapy syntezy na stałym nośniku zachodzą z wydajnością ilościową, co zostało potwierdzone przez testy: Kaisera oraz Kaisera z dodatkiem trifenylofosfiny". Negatywny wynik tych testów może świadczyć tylko o zaniku substratu, co nie musi oznaczać, że właściwy produkt został otrzymany z "wydajnością ilościową".
- Tamże. Autor pisze, że "analiza surowego produktu wykazywała obecność niewielkiej ilości zanieczyszczeń, które w łatwy sposób można oddzielić metodami chromatografii wysokociśnieniowej w skali preparatywnej". Czy Autor próbował

zidentyfikować te zanieczyszczenia? Jeśli tak, to czy były one produktami ubocznymi powstałymi podczas poszczególnych etapów syntezy?

- Str. 131. Publikacja, która ukazała się w roku 2017 w czasopiśmie *J. Pept. Sci.* nie powinna być ciągle uważana za publikację znajdującą się w stadium drukowania ("in press").

Powyższe uwagi nie podważają wysokiej wartości merytorycznej rozprawy i nie wpływają na moją ocenę tej pracy. Większość z moich uwag należy traktować jako zagajenie do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej mgra Bartłomieja Fedorczyka.

Biorąc pod uwagę ciekawe wyniki uzyskane przez Doktoranta, Jego umiejętności prawidłowego korzystania ze źródeł literaturowych i bardzo dobre opanowanie syntezy pochodnych peptydów oraz interpretacji wyników badań biologicznych, recenzowaną pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Na wyróżnienie zasługuje imponujący dorobek naukowy mgra Bartłomieja Fedorczyka, który obejmuje dziewięć prac badawczych, dwa patenty i jedno zgłoszenie patentowe. W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgra Bartłomieja Fedorczyka zatytułowana „Triazolopeptydowe inhibitory kompleksu VEGF<sub>165</sub>/NRP-1” stanowi cenny wkład naukowy i spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym. Dlatego stawiam wniosek do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pana mgra Bartłomieja Fedorczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*L. Huran*