

Prof. dr hab.
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 26.04.2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Janas

pt.: „Synteza i ustalenie korelacji struktura-aktywność biologiczna nowych pochodnych 14- i 15-członowych antybiotyków makrolidowych zawierających przebudowane ramiona sacharydowe” wykonanej w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

(promotor: prof. dr hab. Piotr Przybylski, promotor pomocniczy: dr Krystian Pyta)

Obecnie, wszyscy jesteśmy świadkami wielkiego i przyspieszonego eksperymentu, podczas którego wirus SARS-CoV-2 mutuje po to aby lepiej dostosować się do otoczenia i zwiększyć swoje szanse na przetrwanie. Po niespełna roku od wybuchu epidemii w 2019 roku w mieście Wuhan na świecie pojawiło się kilkanaście różnych odmian genetycznych tego wirusa. Umożliwiają mu one przetrwanie i być może spowodują, że będzie istniała potrzeba opracowania nowych szczepionek i nowych testów diagnostycznych. Widzimy również, że pomimo zaangażowania wielu środków i licznych naukowców nie udało się znaleźć skutecznego, taniego i niskotoksycznego leku hamującego namnażanie się wirusa SARS-CoV-2. Pojawianie się coraz to nowych jego odmian jest groźne dla zdrowia ludzi i dla systemu opieki zdrowotnej. Podobny eksperyment, ale nieco bardziej rozciągnięty w czasie i którego bohaterami są bakterie a nie wirusy ma również dzisiaj miejsce. Jest to eksperyment w którym to bakterie a nie wirusy zmieniają się (mutują) po to aby wymknąć się spod działania antybiotyków i przetrwać. Bakterie potrzebują nieco więcej czasu na dokonanie zmian w swoim materiale genetycznym niż wirus SARS-CoV-2, co daje nam (ludziom) czas na poszukiwania nowych i skutecznych antybiotyków. Czas ten jednak przyspiesza i coraz częściej pojawiają się na świecie bakterie odporne na wszystkie znane ludziom antybiotyki. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) już dzisiaj ostrzega, że antybiotykooporność jest jednym z największych zagrożeń dla globalnego zdrowia, bezpieczeństwa żywnościowego i rozwoju. Oporność na antybiotyki może dotknąć każdego, w każdym wieku i w każdym kraju. Prowadzi ona do dłuższych pobytów w szpitalu, wyższych kosztów leczenia i zwiększonej śmiertelności. Mam wielką nadzieję, że nigdy nie nastąpi dzień w którym ludzkość będzie musiała się mierzyć z opornymi bakteriami w takiej skali jak dzisiaj mierzy się z wirusem SARS-CoV-2. Nadzieję tą mam dzięki takim ludziom jak mgr Anna Janas, która postanowiła zająć się problemem istniejącej antybiotykooporności i której tematem pracy doktorskiej stało się poszukiwanie nowych antybiotyków makrolidowych. Problem badawczy postawiony w jej pracy doktorskiej dotyczy znalezienia chemicznych czynników strukturalnych, zwiększających aktywność przeciwbakteryjną oraz posiadających lepsze parametry farmakologiczne (lepsza rozpuszczalność, mniejsza cytotoksyczność) w stosunku do znanych dzisiaj antybiotyków makrolidowych. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska odpowiada na obecne potrzeby ludzkości, co w mojej opinii w pełni uzasadnia celowość jej realizacji.

Rozprawa doktorska została wykonana w grupie prof. dr hab. Piotra Przybylskiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką promotora pomocniczego dra Krystiana Pyty. Całość rozprawy obejmuje 422! strony maszynopisu i podzielona jest na 11 głównych rozdziałów (tj. cel pracy, część literaturowa – 5 głównych podrozdziałów, wyniki i dyskusje, część eksperymentalna, podsumowanie, literatura i załączniki w postaci widm NMR i). Rozdziały te poprzedza wykaz używanych skrótów. Spis piśmiennictwa obejmuje 245 pozycji uwzględniających pełne dane wraz z numerem DOI. W pracy umieszczono kilkanaście tabel, kolorowych rysunków i schematów reakcji chemicznych, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Praca ma układ typowy dla prac z zakresu chemii, choć nietypowe jest umieszczenie celu pracy jako pierwszego rozdziału rozprawy. W pracy znalazłam nieliczne błędy edycyjne i stylistyczne (np. „sygnał integrujący się na 3H”, str. 136 – sygnał nie może sam się zintegrować; „...kluczowym czynnikiem jest sposób ich wiązania z ich molekularnym target.”, str. 286; nie wiem dlaczego opisy na rysunkach przedstawiających struktury są w języku angielskim) ale w żaden sposób nie umniejszają one wysokiej wartości dysertacji. Do pracy zostały dołączone osobne (zalamowane) kartki z kolorowymi strukturami zsyntetyzowanych związków i ich nazwami wraz z numeracją poszczególnych atomów. Zastosowane rozwiązanie było bardzo pomocne podczas lektury pracy doktorskiej.

Mgr Anna Janas na początku przedstawiła cel główny swojej pracy, którym było zaprojektowanie, zsyntetyzowanie i zbadanie zależności SAR (ang. structure - activity relationship) nowych pochodnych 14- i 15-członowych laktonowych antybiotyków makrolidowych, zawierających zmodyfikowane fragmenty cukrowe.

W kolejnych rozdziałach (2-4) Doktorantka wprowadziła czytelnika w tematykę antybiotyków makrolidowych, które stanowią bardzo dużą grupę związków o działaniu bakteriostatycznym i bakteriobójczym. Antybiotyki te stosuje się w klinice przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym a można je podzielić według kilku kryteriów, które zostały w rozprawie przedstawione. Najważniejszym z punktu widzenia recenzenta jest ich podział ze względu na wielkość makrocyklicznego pierścienia antybiotyku. Doktorantka w sposób skondensowany i bardzo przystępny opisała naturalną ścieżkę biosyntezy znanego przedstawiciela tej klasy antybiotyków – erytromycyny, następnie przedstawiła molekularny sposób działania antybiotyków makrolidowych (odwracalne wiązanie się do podjednostki 50S rybosomu w tunelu rybosomalnym) oraz istniejące mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki makrolidowe. W kolejnych dwóch podrozdziałach części teoretycznej mgr Janas bardzo szczegółowo opisała budowę, sposób syntezy chemicznej oraz działanie zmodyfikowanych chemicznie 14- i 15-członowych antybiotyków makrolidowych. Dokonany przez nią przegląd literaturowy pokazał, że obecnie istnieje niezliczona ilość zmodyfikowanych antybiotyków makrolidowych a po lekturze tej części rozprawy pomyślałam, że trudno jest zaproponować nowe rodzaje modyfikacji tych antybiotyków, biorąc pod uwagę ograniczone przestrzenne miejsce wiązania się tych związków z celem molekularnym. Z ciekawością więc czekałam na nowe propozycje modyfikacji chemicznych wymyślone przez Doktorantkę. Tą część rozprawy doktorskiej (opis istniejących modyfikacji chemicznych antybiotyków makrolidowych oraz ich wpływ na aktywność przeciwbakteryjną) oceniam bardzo wysoko, gdyż w sposób bardzo przejrzysty wprowadza czytelnika w problematykę dysertacji. Po lekturze tej części rozprawy doktorskiej zastanowiło mnie jedynie czy dla innych znanych właściwości biologicznych antybiotyków makrolidowych (tj. aktywność przeciwmalaryczna lub przeciwnowotworowa), istnieją dane SAR tak jak dla aktywności przeciwbakteryjnej. Przegląd literaturowy został dokonany niezwykle starannie, a cytowane prace pochodzą z ostatnich pięciu lat i obejmują blisko 150 pozycji literaturowych. Dodatkowo, każdy omawiany związek został przez Doktorantkę starannie narysowany (z zaznaczoną numeracją atomów), co sprawiło, że czytelnik nie miał wątpliwości w którym miejscu cząsteczki została wprowadzona omawiana modyfikacja. Dla mnie osobiście ta część

pracy doktorskiej stała się inspiracją do zaprojektowania modyfikacji chemicznych w związkach, którymi sama się zajmuję. Dwa ostatnie podrozdziały części teoretycznej pracy doktorskiej obejmują opisy mechanizmów reakcji chemii „click” oraz sposoby syntezy czwartorzędowych soli amoniowych. Reakcje te zostały opisane z uwagi na fakt stosowania ich przez Doktorantkę w części eksperymentalnej pracy doktorskiej.

Kolejny główny rozdział rozprawy doktorskiej zatytułowany został „Wyniki i dyskusja”. Rozdział ten został przez Doktorantkę podzielony na trzy zasadnicze części tj.: (i) dwa podrozdziały poświęcone modyfikacjom azytromycyny (AZM) w pozycji C(2') i C(3') deozaminy; (ii) dwa podrozdziały poświęcone modyfikacjom klarytromycyny (CLA) w pozycji C(3') deozaminy oraz otrzymywanie jej pochodnych; (iii) wyniki badań biologicznych zsyntezowanych pochodnych i analiza SAR. W pierwszej części rozdziału „Wyniki i dyskusja” Doktorantka uzasadniła i zaproponowała nowe modyfikacje chemiczne AZM. Podstawową zmianą było usunięcie kładynozy oraz wydłużenie „ramienia” deozaminowego. Na początku Doktorantka przeprowadziła reakcję hydrolizy, pozbywając się kładynozy z AZM. Uzyskany produkt hydrolizy AZM-OH w pełni scharakteryzowała pod względem strukturalnym. Do tego celu wykorzystwała techniki MS i 2D NMR a przeprowadzona analiza strukturalna (NMR) została dokonana w sposób **absolutnie wzorowy!** Następnie opisała sposób syntezy alkinowej pochodnej AZM i w podobny sposób potwierdziła uzyskany produkt, który posłużył do przeprowadzenia syntezy nowych pochodnych (AZM-1 do AZM-19) z wykorzystaniem reakcji chemii „click”. W tym samym podrozdziale uzasadniła i opisała sposób syntezy hybrydowej pochodnej AZM w pozycji C(2') i kolchiceiny (COL), uzyskując dwa związki (AZM-1-COL-1 oraz AZM-1-COL-2) o potencjalnych właściwościach przeciwbakteryjnych (AZM) i przeciwzapalnych (COL). Dodatkowo dla związku AZM-1-COL-2 Doktorantka przeprowadziła analizę kontaktów NOE na podstawie widma NOESY, pokazując przestrzenny sposób ułożenia względem siebie pierścieni AZM i COL (Rys. 105, str. 125). Z przedstawionego opisu nie wywnioskowałam w jaki sposób wyznaczona została struktura przestrzenna tej cząsteczki. Czy do obliczeń DFT wykorzystane zostały więzy odległościowe NOE? Jeśli nie to czy pokazana struktura została wybrana poprzez najlepsze dopasowanie do więzów NOE? Pytanie to dotyczy również wszystkich kolejnych struktur badanych związków. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii. Kolejny podrozdział to uzasadnienie i opis kolejnych modyfikacji AZM w pozycji C(3') deozaminy, polegające przeprowadzeniu związków w czwartorzędowe sole amoniowe. Modyfikacje te miały na celu zwiększenie hydrofilowości związków i ułatwienie wiązania się z celem molekularnym. Doktorantka otrzymała i scharakteryzowała pochodne AZM uzyskując związki AZM-20 do AZM-44. Wszystkie prowadzone reakcje były monitorowane techniką HPLC. W kolejnych dwóch podrozdziałach Doktorantka uzasadniła i opisała modyfikacje chemiczne CLA w pozycji C(3') deozaminy prowadzące (podobnie jak dla AZM) do uzyskania czwartorzędowych soli amoniowych (związki CLA-1 do CLA-6), wybierając podobnie jak wcześniej dla AZM bromki jako substraty. Uzyskane produkty w pełni scharakteryzowała pod względem strukturalnym wykorzystując technikę HPLC, MS i 2D NMR. Kolejne podrozdziały przedstawiają kolejne, dobrze uzasadnione modyfikacje chemiczne CLA tj.: pochodna α,β -nienasycona (CLA-7 o potwierdzonej konformacji (E)-*s-trans*) oraz pochodne α,β -nienasycone utlenione w pozycji C(3) z acetylowaną grupą hydroksylową O(2')H (CLA-8 do CLA-10). Związki te, podobnie jak wcześniejsze zostały w pełni scharakteryzowane pod względem fizykochemicznym i strukturalnym z włączeniem dodatkowych technik tj. spektroskopii FT-IR oraz techniki rentgenostrukturalnej (dla związku CLA-10). Kolejne opisane przez mgr Janas syntezy dotyczyły uzyskania hybrydowej pochodnej (podobnie jak dla AZM) ketonowej związku (CLA-10) i pochodnej COL z funkcją azydkową (COL-2). Wykorzystując ponownie reakcje chemii „click” uzyskała nową pochodną CAL-12-COL-2, która podobnie jak wszystkie wcześniejsze produkty została w pełni scharakteryzowana a struktura tej pochodnej przypomina strukturę związku AZM-1-COL-2 z rozsuniętymi w przestrzeni pierścieniami CAL i COL. Ostatnią modyfikacją CAL jaką opisała Doktorantka była reakcja prowadząca do uzyskania układu bicyklicznego

składającego się z 3-oksoaglikonu spinającego atomy C(11) i C(12) karbaminianem (związki CLA-13 → CLA-X → CLA-Y) jako gotowa platforma do dalszych modyfikacji chemicznych. Następnie wykorzystując związek CLA-13 Doktorantka przeprowadziła reakcję z aminą o krótkim łańcuchu węglowym, posiadającą w swojej strukturze grupę funkcyjną, którą można wykorzystać do dalszych modyfikacji. Uzyskała nową pochodną CLA-14 która po scharakteryzowaniu okazała się stabilnym tautomerem enolowym (forma „laktenuolowa”). Wyjaśniła również zaskakująco wysoką hydrofobowość tej pochodnej. Ciekawe byłoby, czysto poznawczo, przeprowadzenie dodatkowych analiz IR i NMR w innych rozpuszczalnikach oraz w szerszym zakresie temperaturowym (NMR), mających na celu określenie wpływu tych parametrów fizykochemicznych na zaistniałą równowagę. Ostatnia część rozdziału „Wyniki i dyskusja” przedstawionej do oceny rozprawy zawiera wyniki badań przeciwbakteryjnych dla uzyskanych związków oraz modelowanie ich oddziaływań w tunelu rybosomalnym. Wyniki badań biologicznych pokazały, że wszystkie pochodne AZM pozbawione w wyniku hydrolizy cukru - kładnozy - nie były nieaktywne oraz, że wybrane sole amoniowe AZM i CAL wpływają korzystnie na ich właściwości przeciwbakteryjne a jednocześnie wykazują niską cytotoksyczność. Uzyskane wyniki badań biologicznych zostały potwierdzone w modelu dokowania tychże związków w tunelu rybosomalnym, gdzie zaangażowane są w energetycznie korzystne oddziaływania. Lektura tej części pracy doktorskiej budzi mój pewnie niedosyt z uwagi na bardzo skąpy opis metodologii dokowania oraz bardzo „zagnatwany” sposób prezentacji graficznej uzyskanych wyników. Doktorantka uzyskała również ciekawy brak korelacji pomiędzy aktywnością biologiczną niektórych związków a ich lipofilowością i rozpuszczalnością, co rozsądnie wyjaśniła. Ta część rozprawy została wzbogacona tabelami ze szczegółowymi danymi spektroskopowymi i schematami reakcji chemicznych. Po lekturze tej części pracy nasunęło mi się następujące pytanie: Czy planowane są badania aktywności przeciwmalarycznej i przeciwnowotworowej wszystkich zsyntetyzowanych przez Doktorantkę związków?

Przedostatni rozdział dysertacji został zatytułowany „Część eksperymentalna” i zawiera opis metod oraz procedur syntetycznych stosowanych przez Doktorantkę. W mojej opinii Pani mgr Anna Janas zastosowała właściwe metody i procedury wymagane od chemika syntetyka i analityka. Wszystkie procedury syntezy, wydajności oraz pełna charakterystyka fizykochemiczna poszczególnych związków zostały szczegółowo i bardzo precyzyjnie opisane oraz nie budzą moich wątpliwości.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie” Doktorantka przedstawiła najważniejsze wnioski swojej pracy doktorskiej. Do najważniejszych osiągnięć pracy stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam **zaprojektowanie, syntezę, charakterystykę fizykochemiczną i strukturalną nowych związków makrolidowych o właściwościach przeciwbakteryjnych**. Na szczególną uwagę zasługuje fakt przeprowadzenia przez Doktorantkę wieloetapowych syntez chemicznych oraz bardzo precyzyjny i estetyczny opis przeprowadzonych eksperymentów. Na szczególną pochwałę zasługuje wzorowy opis analizy widm 2D NMR i FT-IR prowadzący do pełnoatomowej charakterystyki uzyskanych nowych związków chemicznych.

Uważam, że tematyka pracy jest bardzo interesująca, część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki zinterpretowane poprawnie. Reasumując, uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa mgr Anny Janas zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z artykułem 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011r. Nr 84, poz. 455). W tym odniesieniu wnoszę do Rady

Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM o dopuszczenie mgr Anny Janas do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w uzyskanie nowych antybiotyków makrolidowych oraz ich pełnej charakterystyki strukturalnej i biologicznej, zwracam się także do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Z poważaniem,



Sylwia Rodziejczak-Mokonińska