

Prof. dr hab. Jacek Jemielity
Laboratorium Chemii Biologicznej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: j.jemielity@cent.uw.edu.pl
tel. 22 5543774

Warszawa 29.07.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Anny Skrzypczak

p.t. „Modyfikacje rdzenia benzochinonowego naturalnego makrolaktamu – geldanamycyny oraz ich wpływ na właściwości przeciwnowotworowe”

Wprowadzenie do powszechnego użytku antybiotyków to bezsprzecznie jedno z największych osiągnięć medycyny. Jednak już odkrywca penicyliny, Alexander Fleming, szybko zauważył, że nieumiejętne stosowanie tego leku może prowadzić do oporności bakterii na jego działanie, o czym mówił podczas swego wykładu noblowskiego. Od tamtego czasu dokonał się olbrzymi postęp w rozwijaniu nowych antybiotyków oraz rozumieniu mechanizmów ich działania. Jednak słowa Fleminga okazały się prorocze i obecnie nasza cywilizacja stoi na progu bardzo poważnego kryzysu związanego z postępującą opornością bakterii na antybiotykoterapię. Towarzyszy temu spowolnienie rozwoju nowych antybiotyków, pogłębione dodatkowo przez pandemię COVID-19. Według corocznych analiz WHO, w 2021 roku w fazie rozwoju klinicznego było tylko 27 nowych antybiotyków przeciwko priorytetowym patogenom, a warunki leków innowacyjnych spełniało wśród nich tylko 6. Pomimo że zbliżamy się do setnej rocznicy odkrycia penicyliny, potrzeba rozwijania nowych antybiotyków i lepsze rozumienie ich aktywności pozostają niezwykle aktualne i cywilizacyjnie bardzo potrzebne. Badania przeprowadzone przez Panią magister Natalię Skrzypczak, wykonane pod kierunkiem Profesora Piotra Przybylskiego w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych, Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu doskonale się w te potrzeby wpisują. Bardziej precyzyjnie, projekt doktorski dotyczy syntezy różnych typów nowych pochodnych geldanamycyny, reprezentanta grupy

antybiotyków ansamycynowych, oraz zbadanie wpływu rodzaju modyfikacji na zależność między strukturą, a ich aktywnością.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pani mgr Natalii Skrzypczak została w przygotowana w formie tradycyjnej rozprawy doktorskiej i ma układ klasyczny, typowy dla prac eksperymentalnych z dziedziny chemii i nauk pokrewnych. Początkowe przerażenie recenzenta wzbudziła jej objętość, ponieważ stron numerowanych jest w niej 473. Jednak już pobieżna analiza powoli opanowała stres recenzenta gdy okazało się, że niemal połowę tej objętości stanowią stabelaryzowane dane analityczne dotyczące nowych związków, wzory strukturalne oraz kopie widm NMR i IR. Na rozprawę składa się przegląd literatury nazwany „Wstępem teoretycznym”, gdzie opisano stan wiedzy na temat antybiotyków ansamycynowych, ich biosyntezy, struktury oraz właściwości biologicznych, przy czym najwięcej uwagi poświęcono geldanamycynie (GDM), co w kontekście tytułu rozprawy było wyborem dość oczywistym. W kolejnych rozdziałach Doktorantka opisuje swoje osiągnięcia dokonane w trakcie realizacji projektu badawczego – „Wyniki i dyskusja”, natomiast w „Części eksperymentalnej” opisuje jak tego dokonała oraz jakie ma na to dowody. Całość kończy się krótkim podsumowaniem uzyskanych wyników. W pracy zamieszczono 136 rysunków, starannie przygotowanych pod względem edytorskim, które są pomocne w śledzeniu toku rozumowania Autorki rozprawy oraz 38 tabel w których zestawiono uzyskane wyniki badań spektroskopowych i biologicznych.

Wstęp teoretyczny rozprawy napisany jest w sposób przejrzysty, a duża jego część została już opublikowana w dwóch pracach przeglądowych, które ukazały się w *Natural Product Reports* (IF 15.111). Pierwsza z nich poświęcona została benzenoidowym, a druga naftalenoidowym pochodnym ansamycyn. Fakt ten należy bardzo pozytywnie ocenić i docenić. Tę część rozprawy oceniam pozytywnie, dobrze przygotowuje ona czytelnika do zrozumienia zasadniczej części rozprawy, która dotyczy badań prowadzonych przez Doktorantkę. Dobór treści, choć to zawsze kwestia indywidualnego i subiektywnego wyboru autora pracy, wydaje się być jak najbardziej logiczny i właściwy. Stan wiedzy dotyczący projektu doktorskiego, został przedstawiony z należytą starannością, nie mniej jednak przy prezentacji danych literaturowych zdarzyły się pewne potknięcia i niedociągnięcia o czym nieco więcej w dalszej części recenzji.

Najważniejszą część pracy, czyli wyniki uzyskane przez Kandydatkę opisano w kolejnym rozdziale. W trakcie realizacji projektu doktorskiego Pani magister Skrzypczak otrzymała i scharakteryzowała pod kątem struktury 100 pochodnych geldanamycyny. Biorąc pod uwagę złożoność struktury tego typu związków jest to imponująca ilość materiału naukowego i imponująca ilość pracy, która była niezbędna do osiągnięcia tych wyników. Na tę liczbę analogów geldanamycyny złożyło się 33 nowe analogi C(17) aminowe, 10 związków tego typu opisanych w literaturze, które służyły jako substraty do dalszych modyfikacji, 5 analogów z rozerwanym mostkiem ansamycynowym, 5 soli N-alkiloamoniowych geldanamycyny podstawionych w pozycji C(17) ugrupowaniem

aminochinuklidynowym, 31 pochodnych triazolowych, 4 hybrydy z kolchicyną oraz 12 nowych pochodnych ansamycynowych zawierających nowy rdzeń benzo[d]oksazolowy. Związki te zostały w pracy ponumerowane od GDM-1 do GDM-100. Związki zostały bardzo dokładnie scharakteryzowane przy użyciu różnorodnych technik NMR, FT-IR i ESI-MS. Dla 77 związków zbadano ich aktywność przeciwnowotworową oraz ich wpływ na nienowotworową linię komórkową. 17 związków otrzymano w postaci krystalicznej co pozwoliło na zbadanie ich struktury metodami rentgenografii strukturalnej. Zestawienie struktury związków i aktywności biologicznej pozwoliło Doktorantce wyciągnięcie pewnych związków na temat zależności między strukturą a aktywnością, co z pewnością może być bardzo cenną wiedzą z punktu widzenia racjonalnego projektowania antybiotyków o jeszcze większym potencjale terapeutycznym.

Motywacją do syntezy analogów GDM modyfikowanych w pozycji C(17) było otrzymanie związków o zmniejszonej toksyczności. Jedną z postulowanych przyczyn cytotoksyczności jest reakcja grupy SH w glutationie z podwójnym wiązaniem w ugrupowaniu chinonowym w pozycji C(19). Dane literaturowe sugerują iż modyfikacje w C(17) powodują mniejszą reaktywność w stosunku do glutationu. Ten wniosek rodzi pytanie, czy możnaby wprowadzić niewielką modyfikację w pozycję C(19) aby zablokować reakcję odpowiedzialną za toksyczność? Proszę o komentarz do tej uwagi podczas publicznej obrony.

Na szczególne docenienie zasługuje analiza widm NMR, która dla tak złożonych układów nie jest rzeczą trywialną. Doktorantka na przykładzie związku GDM-27 pokazała drogę dedukcji, która pozwoliła na przyporządkowanie sygnałów krok po kroku i udowodnienie struktury tego związku. Wykonanie tej pracy dla tak wielu związków jest z pewnością dużym osiągnięciem doktorantki. Ten aspekt rozprawy zasługuje moim zdaniem na szczególne uznanie. Z kolei pewien niedosyt pozostawia omówienie syntezy związków GDM-1 – GDM-28, które powstały w wyniku addycji 1,4-Michaela pomiędzy GDM i odpowiednią aminą, co przedstawiono na schemacie 14. Zabrakło mi tutaj pewnej dyskusji na temat reaktywności poszczególnych amin, czy choćby informacji o wydajnościach syntez poszczególnych związków (można to było w sposób przejrzysty zamieścić w tabeli lub choćby na wspomnianym schemacie 14). Z części eksperymentalnej wynika, że wydajności wahają się od 23-do 95%, jednak w rozprawie nie udało mi się odnaleźć informacji, czy to wynika z różnego stopnia konwersji substratów, czy raczej efektywności procesu oczyszczania.

Kolejny problem związany z aktywnością biologiczną pochodnych geldanamycyny to rozpuszczalność w wodzie. W celu poprawy tej właściwości istotnej z punktu widzenia biodostępności farmaceutyku powstała seria pochodnych zawierających ugrupowanie czwartorzędowe ugrupowanie amoniowe, powstałe w wyniku alkilowania trzeciorzędowej aminy. Przy opisie tej grupy związków zastosowano ten sam schemat, w największym stopniu skupiając się na opisie widm NMR. W tym przypadku zabrakło informacji, czy udało się osiągnąć cel, czyli zwiększyć rozpuszczalność w wodzie.

W następnej kolejności Doktorantka opisała syntezę i analizę spektroskopową triazolowych pochodnych antybiotyku (efekt reakcji cykloaddycji Huisgena) oraz hybryd z alkaloidem kolchicyną, (powstałych w wyniku reakcji Hecka). Ostatnią grupę pochodnych GDM stanowią pochodne benzo[d]oksazolowe, które powstały w wyniku cyklizacji para podstawionych pochodnych benzytowych. Zjawisko cyklizacji zaobserwowano jako reakcję uboczną, a struktury otrzymanych związków potwierdzono metodami rentgenograficznymi. Doprowadziło to do otrzymania nowej klasy związków, a metodę ich syntezy optymalizowano testując różne zasady i rozpuszczalniki. Cały proces optymalizacji wpływu struktury substratu i warunków reakcji został bardzo dobrze przedyskutowany w rozprawie, efektem tych badań było zaproponowanie mechanizmu tego procesu.

Ostatni podrozdział badań własnych dotyczy badania właściwości otrzymanych związków. Jest to zwięźczone olbrzymiego wysiłku związane z syntezą i dowodzeniem struktury otrzymanych związków, które dodatkowo w tym przypadku charakteryzowały się istotną złożonością strukturalną. Etap ten często przynosi rozczarowania, bo okazuje się, że mimo olbrzymich wysiłków nie udaje się uzyskać pożądaných właściwości biologicznych. Gdyby tak było w tym przypadku praca wciąż byłaby ciekawa, ponieważ zawiera wiele ciekawych aspektów z punktu widzenia chemii antybiotyków ansamycynowych oraz badań strukturalnych tak złożonych związków. Ale na szczęście tak nie jest w przypadku tej pracy, ponieważ spośród stu związków, z których niektóre zwiększają aktywność inne mniej lub bardziej obniżają aktywność/selektywność udało się scharakteryzować jeden, który podnosi aktywność oraz selektywność o rząd wielkości we wszystkich badanych nowotworowych liniach komórkowych jednocześnie nie zmieniając cytotoksyczności w referencyjnych komórkach nabłonka, co prowadzi do bardzo wysokiego współczynnika selektywności SI ~30. Związkiem tym jest analog GDM-27, który można określić jako HIT. Muszę przyznać, że zaskoczony jestem w pewnym stopniu interpretacją wyników badań, bo wprawdzie autorka docenia właściwości tego związku ale jego ewidentna przewaga nad pozostałymi związkami jest w moim odczuciu zbyt mało podkreślona w rozprawie, a nawet można powiedzieć rozmywa się podczas analizy innych związków. A już największym zaskoczeniem jest dla mnie fakt, że o związku GDM-27 nie ma ani słowa w podsumowaniu pracy. Odsuwając jednak na bok kwestie akcentów inaczej położonych w pracy niżby to sobie recenzent wyobrażał, należy podkreślić bardzo ciekawe wyniki dla związku GDM-27. Co również ciekawe związek GDM-26 jest bardzo podobny strukturalnie, a takich wyjątkowych właściwości już nie wykazuje (karbaminian t-butyłowy vs. etylowy). Doktorantka sięgnęła po szereg technik aby móc ten wynik wyjaśnić stosując m. in. dokowanie, ITC, porównanie reaktywności z glutationem, jednak żadne z tych badań nie dało jasnej odpowiedzi, bo nie stwierdzono ani znaczących różnic w powinowactwie do celu molekularnego (Hsp90), ani szczególnych właściwości lipofilowych. Może zatem warto porównać stabilność metaboliczną GDM 26 i 27? Z reguły rozbudowane sterycznie podstawniki spowalniają

reakcje enzymatycznej hydrolizy. Tak z całą pewnością jest w przypadku estrów, być może podobnie jest z hydrolizą ugrupowania karbaminianowego.

Praca została przygotowana z dużą starannością i poprawnie pod względem merytorycznym, nie mniej jednak w każdej obszernej rozprawie znajdują się pewne błędy, czy kontrowersyjne sformułowania. Z obowiązku recenzenta kilka z nich pozwolę sobie przytoczyć, być może w niektórych przypadkach prowokując dyskusję podczas publicznej obrony:

a) Strona 28: „Badania naukowe wskazują, że powstawanie nowotworów spowodowane jest nadekspresją białek, co może być związane np. z ich nieprawidłowym fałdowaniem” - jest to nieuprawnione uogólnienie i zawężenie jednocześnie, przyczyny nowotworów są dużo bardziej złożone, nieprawidłowe fałdowanie białek jest tylko jednym z wielu możliwych powodów.

b) Strona 33: „Inhibitory Hsp90 zyskały na popularności ponieważ wykazano, że mogą one służyć jako cel molekularny w leczeniu chorób takich jak: zaburzenia neurologiczne, malaria oraz leiszmanioza.” - To białko jest celem molekularnym nie jego inhibitory.

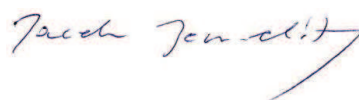
c) „Geldanamycyna jest inhibitorem glutationu i wiąże się z nim w sposób nieodwracalny na drodze 1,4-sprzężonej addycji grupy tiolowej glutationu do układu chinonowego rdzenia benzenoidowego,” termin inhibicja zarezerwowany jest do spowalniania reakcji z udziałem (bio)katalizatora, którym glutation nie jest.

d) W rozprawie Autorka powołuje się na badania kliniczne, i takie rzeczywiście są odnotowane na clinicaltrials.gov, jednak brakuje informacji jakie były wyniki badań klinicznych nad wykorzystaniem analogów GDM?

e) Strona 42: „Oczekiwano, że po aktywacji in vivo przez β -galaktozydazę, na drodze hydrolizy uwolniona zostaje pochodna, która powinna wiązać się z Hsp90 podobnie jak 17-AG (KD17-AG= 34,1 [kcal/mol], KD=27,4 [kcal/mol]).” Przedstawione wartości wyrażone w kcal/mol po pierwsze powinny mieć wartość ujemną a po drugie jest to energia wiązania a nie KD czyli stała dysocjacji. Przy tej okazji chciałbym prosić Doktorantkę aby podczas publicznej obrony zdefiniowała energię wiązania (tworzenia kompleksu) oraz równowagową stałą dysocjacji i wykazała jak są ze sobą matematycznie powiązane te wielkości oraz w jakich jednostkach podawane są stałe dysocjacji dwuskładnikowego kompleksu. Z kolei podawanie wartości IC_{50} bez odniesienia do związku referencyjnego jest nie do końca poprawne ponieważ parametr ten nie jest bezwzględny i silnie zależy od zastosowanego testu dlatego należy go zestawiać z wartością dla związku kontrolnego np. GDM

Bogaty materiał doświadczalny, uzyskany podczas realizacji pracy obejmuje zarówno rozwijanie metod syntezy chemicznej, jak również analizę spektroskopową uzyskanych produktów, a następnie ich charakterystykę biofizyczną, komórkową i elementy modelowania molekularnego. Ilość wyników oraz sposób ich publikacji są w mojej ocenie imponujące. Sposób prezentacji wyników jest dobry, choć nie pozbawiony mankamentów. Praca bez wątpienia wnosi istotny wkład w badania nad modyfikacjami antybiotyków ansamycynowych. Na szczególny komentarz zasługuje dorobek publikacyjny wynikający bezpośrednio z realizacji projektu doktorskiego. O dwóch pracach przeglądowych w Natural Product Reports dotyczących badań literaturowych już wspominałem. Wyniki opisane w badaniach własnych ukazały się w trzech publikacjach zamieszczonych w uznanych czasopismach (European Journal of Medicinal Chemistry oraz Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry x2). W czterech z pięciu artykułów mgr Skrzypczak jest pierwszą współautorką w jednym drugą. Dodatkowo kolejna praca została wysłana do redakcji, a jeszcze kolejna jest w przygotowaniu. Biorąc to wszystko pod uwagę, dorobek ten należy uznać na tym etapie kariery za imponujący.

W konkluzji z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia wszelkie warunki określone w stosownej Ustawie i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych UAM o dopuszczenie mgr Natalii Skrzypczak do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wagę uzyskanych wyników naukowych w szczególności istotny wkład w badania nad ważną klasą związków biologicznie aktywnych jakimi są antybiotyki ansamycynowe, z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Dyscypliny o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani magister Skrzypczak. Uzasadnienie tego wniosku zamieszczam w odrębnym piśmie załączonym do niniejszej recenzji.



Prof. dr hab. Jacek Jemielity
Laboratorium Chemii Biologicznej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: j.jemielity@cent.uw.edu.pl
tel. 22 5543774

Warszawa 29.07.2022

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Natalii Anny Skrzypczak

p.t. „Modyfikacje rdzenia benzochinonowego naturalnego makrolaktamu – geldanamycyny oraz ich wpływ na właściwości przeciwnowotworowe”

Zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Chemicznych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o rozważenie wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani magister Natalii Anny Skrzypczak zatytułowanej „Modyfikacje rdzenia benzochinonowego naturalnego makrolaktamu – geldanamycyny oraz ich wpływ na właściwości przeciwnowotworowe”.

Badania przeprowadzone przez Natalię Skrzypczak dotyczą poszukiwania nowych analogów naturalnych antybiotyków ansamycynowych o potencjale przeciwnowotworowym, dotyczą więc ważnych problemów cywilizacyjnych. Na szczególne wyróżnienie zasługują trzy aspekty związane z realizacją projektu doktorskiego:

- a) Imponujący materiał badawczy obejmujący syntezę, analizę struktury oraz właściwości biologicznych 100 analogów geldanamycyny, związku naturalnego o bardzo złożonej strukturze i dużym potencjale terapeutycznym.
- b) Godna zauważenie skuteczność w projektowaniu, syntezie i charakterystyce związków o interesujących terapeutycznie związkach, czego efektem jest związek GDM 27. Związek ten wykazał niezwykle obiecujące właściwości przeciwnowotworowe w badaniach na 6 różnych nowotworowych liniach komórkowych oraz jednocześnie nie zmieniając cytotoksyczności w referencyjnych komórkach nabłonka, co prowadzi do bardzo

wysokiego współczynnika selektywności $SI \sim 30$. Zwiększenie o rząd wielkości, w sposób selektywny aktywności przeciwnowotworowej w stosunku do geldanamycyny, czyni go bardzo obiecującym związkiem wiodącym (ang. lead), w drodze do opracowania leku przeciwnowotworowego.

- c) Trzeci aspekt zasługujący na wyróżnienie, to znakomity dorobek naukowy uzyskany podczas realizacji projektu doktorskiego obejmujący dwie prace przeglądowe opublikowane w prestiżowym Natural Product Reports dotyczące bezpośrednio wstępu literaturowego oraz trzy publikacje oryginalne zamieszczonych w uznanych czasopismach takich jak European Journal of Medicinal Chemistry oraz Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry (dwie prace), które są bezpośrednio związane z treścią rozprawy. W czterech z pięciu artykułów mgr Skrzypczak jest pierwszą współautorką co podkreśla jej wiodący wkład w powstanie tych publikacji. Dodatkowo kolejna praca została wysłana do redakcji, a jeszcze jedna jest w przygotowaniu. Biorąc pod uwagę renomę czasopism, oraz wiodący udział Doktorantki ten dorobek należy uznać na tym etapie kariery za imponujący.

W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych UAM o rozważenie wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani magister Skrzypczak.

Jacek Jewiel