



UNIwersytet  
Opolski

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45-052, Opole  
tel. 077 452 71 00  
fax 077 452 71 01  
chemia@uni.opole.pl  
www.chemia.uni.opole.pl

Dr hab. Małgorzata Broda, prof. UO  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Opolski  
Ul. Oleska 48  
45-052 Opole  
Tel.: 77 542 7132

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Karola Jędrzejczaka

Praca doktorska Pana mgr inż. Karola Jędrzejczaka zatytułowana „Analogi Cyklolinopeptydu A modyfikowane gamma-aminokwasami” została wykonana w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem dr hab. inż. Beaty Kolesińskiej (promotor) i dr inż. Krzysztofa Hubena (promotor pomocniczy).

Przedstawiona do oceny praca związana jest z zaprojektowaniem i syntezą liniowych jak i cyklicznych analogów cyklolinopeptydu A (CLA), w których w miejsce reszt L-fenyloalaniny we fragmencie Pro-Pro-Phe-Phe wprowadzono do łańcucha peptydowego nienaturalne aminokwasy:  $\gamma^2$ -bis(homo-fenyloalaninę),  $\gamma^3$ -bis(homo-fenyloalaninę) oraz  $\gamma^4$ -bis(homo-fenyloalaninę) w obu konfiguracjach. Intencją tych prac było uzyskanie analogu CLA o poprawionych właściwościach immunosupresyjnych.

Pomimo, że wiele peptydów wykazuje aktywność biologiczną, ich bezpośrednie wykorzystanie w farmakoterapii jest ograniczone z powodu znacznej podatności na degradację proteolityczną, niskiej lipofilności i związanych z tym trudnościami w przechodzeniu przez błony biologiczne. Stąd też duże nadzieje pokłada się w modyfikacjach strukturalnych endogennych peptydów. Cyklolinopeptyd A to naturalny nonapeptyd wyizolowany z oleju lnianego, posiadający właściwości immunosupresyjne podobne do cyklosporyny A, która jest lekiem z wyboru w transplantologii. Ze względu na liczne efekty uboczne stosowanych obecnie w medycynie leków immunosupresyjnych ciągle poszukuje się nowych struktur, o polepszonych właściwościach farmakokinetycznych. Stąd też tematykę pracy związaną z modyfikacją struktury CLA w celu polepszenia jego właściwości

biologicznych uważam za aktualną i uzasadnioną z naukowego oraz praktycznego punktu widzenia.

Bardzo obszerna, bo licząca 229 stron, zawierająca 30 tabel, 22 wykresy, 128 rysunków i schematów oraz 207 pozycji literaturowych rozprawa doktorska Pana mgr inż. Karola Jędrzejczaka napisana została według układu klasycznego. Dzieli się na część literaturową (nazwaną referatową), badania własne i część eksperymentalną. Autor zamieścił też zestawienie swojego dorobku naukowego i użyteczny spis stosowanych skrótów.

Po krótkim wprowadzeniu dotyczącym leków immunosupresyjnych, zostały przedstawione jasno, aczkolwiek w moim odczuciu dość lakonicznie, cel i założenia pracy. W części referatowej praca zawiera obszerne, 60-cio stronicowe, oparte na 172 pozycjach literaturowych, wprowadzenie do metod syntezy gamma-aminokwasów i ich zastosowania w projektowaniu peptydów o określonej strukturze drugorzędowej. Następnie szeroko zostały opisane metody cyklizacji peptydów prowadzone zarówno w roztworze jak i na nośnikach stałych oraz klasyfikacja cyklicznych peptydów pochodzenia roślinnego zakończona szerszym omówieniem cyklolinopeptydów i analogów CLA opisanych w literaturze.

Pewien niepokój może budzić stosunkowo niewielka ilość cytowań najnowszych publikacji (tylko ok. 11% cytowanych pozycji literaturowych pochodzi z lat 2010-2016) co może nasunąć czytelnikowi błędny wniosek, że tematyka badawcza, którą zajmuje się Doktorant jest mało aktualna. Pomimo tej uwagi wysoko oceniam tą część rozprawy. Uważam, że sposób przedstawienia informacji w *Części referatowej* świadczy o dużej wiedzy Autora na temat metod syntezy peptydów, a ponadto zawiera wszelkie informacje niezbędne do zrozumienia przeprowadzonych przez Niego badań.

W rozdziale 4. *Badania Własne* przedstawiono zaprojektowane i przeprowadzone przez Doktoranta wieloetapowe syntezy enancjomerycznie jednorodnych pochodnych  $\gamma$ -bis(homo-fenyloalanin), co było niezbędnym etapem realizacji postawionego na wstępie celu pracy, ponieważ te aminokwasy nie są handlowo dostępne. Otrzymane aminokwasy wykorzystane zostały w syntezie 24 liniowych prekursorów i 24 cyklicznych analogów CLA.

W tym fragmencie rozprawy intrygująca była różnica w widmach  $^1\text{H-NMR}$  roztworów w deuterowanym metanolu (MeOD) dwóch enancjomerów: aminokwasów **325** i **326**. Doktorant uczciwie przyznał się, że nie potrafi tego faktu wyjaśnić i zaproponował hipotezę o zróżnicowanej zawartości wody w badanych próbkach. Taką hipotezę łatwo jest zweryfikować - dodając kroplę wody do roztworu związków **325** lub **326** i sprawdzając czy

ich widma NMR ulegają zmianie. Czy taki test został przeprowadzony? I jeśli tak – jaki był jego wynik?

Synteza tak dużej liczby peptydów zawierających niestandardowe reszty aminokwasowe  $\gamma$ -bis(homo-fenylalaniny) należy uznać za najważniejsze osiągnięcie Doktoranta. Otrzymane związki zostały poddane testom mającym na celu oznaczenie ich aktywności immunosupresyjnej, cytotoksyczności oraz aktywności przeciwzapalnej. Ponadto przeprowadzono badania konformacyjne z wykorzystaniem różnorodnych (jedno i dwuwymiarowych) technik NMR, co pozwoliło wyciągnąć wnioski dotyczące konformacyjnych preferencji badanych analogów CLA a ponadto zależności pomiędzy aktywnością biologiczną otrzymanych analogów CLA a ich strukturą.

W tej części pracy zwróciło moją uwagę pewne stwierdzenie w rozprawie dotyczące swobody konformacyjnej badanych analogów peptydowych. Na stronie 112 Kandydat napisał „w przeciwieństwie do liniowych prekursorów cykliczne analogi CLA charakteryzują się dużą swobodą konformacyjną, co objawia się poszerzeniem sygnałów NMR”. Muszę przyznać, że jest to sprzeczne z intuicją chemiczną, przynajmniej z moją intuicją. Cyklizacja peptydów jest jednym ze sposobów ograniczania swobody konformacyjnej peptydów często stosowanym przy szukaniu peptydowych analogów o ulepszonych właściwościach farmakokinetycznych. Cyklizacja oprócz ograniczenia swobody konformacyjnej peptydu powoduje zwiększenie selektywności działania, stabilności i biodostępności. [np.: C. Adessi, C. Soto *Curr. Med. Chem.*, 20029, 963-978; J.S. Davies, *J. Pept. Sci.* 2003, 9, 471–501]. Proszę o ustosunkowanie się do tej uwagi.

Część pracy zatytułowana „Badania własne” kończy się 3-stronicowym *Podsumowaniem*, w którym spodziewałam się pewnej dyskusji i wniosków końcowych dotyczących relacji pomiędzy konformacją otrzymanych analogów a ich aktywnością biologiczną. Zamiast tego Doktorant wymienił jeszcze raz etapy swojej pracy. Na szczęście pewne próby takiej analizy otrzymanych wyników znalazły się z poprzedzającym *Podsumowaniem* rozdziale zatytułowanym „*Poszukiwanie zależności pomiędzy aktywnością biologiczną a konformacją analogów CLA wyznaczoną na podstawie badań NMR*”.

Poza tą uwagą nie mam istotnych zastrzeżeń merytorycznych dotyczących pracy doktorskiej Pana mgr Karola Jędrzejzaka. Uważam, że syntezy zostały dobrze zaplanowane, konsekwentnie przeprowadzone. Autor uzyskał szereg ważnych i ciekawych rezultatów, ponadto wykazał umiejętność posługiwania się wieloma nowoczesnymi metodami badawczymi i interpretacji uzyskanych wyników. Wyniki przedstawione w rozprawie

znacząco poszerzają wiedzę na temat zależności pomiędzy budową analogów CLA a ich aktywnością biologiczną.

Przedstawiony w rozdziale „Część eksperymentalna” opis syntez i procesów oczyszczania otrzymanych związków jest bardzo staranny i rzetelny. Każdy z otrzymanych produktów jest scharakteryzowany za pomocą protonowych i węglowych widm NMR oraz widm IR i masowych. Ta dokładna charakterystyka nie pozostawia wątpliwości, że Pan mgr inż. Karol Jędrzejczak zsyntezował zaplanowane związki chemiczne.

Jak w każdej recenzowanej pracy doszukać się można różnych uchybień i niejasności. Z obowiązku recenzenta kilka z nich wymienię:

Str. 80, ostatnia linia: jest „nie w łańcuchu bocznym”, powinno być: „nie tylko w łańcuchu bocznym”.

Str. 81, linia 4g: jest: „w odniesieniu do jego aktywności biologicznej determinujących jego aktywność biologiczną”, powinno być np.: „determinujących jego aktywność biologiczną”

Str. 85, Podpis pod rysunkiem 41 informuje, że jest to zakres alifatyczny widm NMR związków 325 i 326. Natomiast w tekście czytamy, że różnice występują w widmach związków 323 i 324 w MeOD.

Str. 94, linia 1g: jest „zderywatywizowane odczynnikiem Marfeya”, powinno być: „uzyskałem pochodną stosując odczynnik Marfeya”

Str. 97, linia pierwsza pod rysunkiem. Zdanie „W badaniach zastosowałem obydwie enancjomery, Boc- $\gamma^3$ -bis(homo-fenylalaniny) oraz Boc- $\gamma^4$ -bis(homo-fenylalaniny).” Jest powtórzone dwa razy.

Str. 110, linia 1g oraz str. 155, linia 8g: jest: „resztą”, powinno być „resztę”

Str. 110, Podpis pod rysunkiem 64, jest: „dodatkowy sygnał w niskim polu” powinno być: „dodatkowy sygnał w wysokim polu”

Str. 115, linia 2 pod tabelą 19, jest: „scharakteryzowanie charakterystycznych sprzężeń”, powinno być np.: „scharakteryzowanie specyficznych sprzężeń”

Str. 158, linia 7d: jest „dwych” , powinno być: „dwóch”

Str. 159, linia 16d: jest „enajcomerycznych” , powinno być: „enancjomerycznych”

Str. 227, linia 4g: jest „Wieczorel”, powinno być: „Wieczorek”.

Powyższe drobne błędy literowe, interpunkcyjne oraz żargonowe określenia oczywiście nie mają wpływu na wysoki poziom merytoryczny recenzowanej pracy. Przedstawione wyniki wskazują, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane, a uzyskane dane strukturalne i dotyczące aktywności biologicznej istotnie poszerzają wiedzę w zakresie wpływu wybranych niestandardowych reszt aminokwasowych na właściwości analogów Cyklolinopeptydu A .

Część wyników badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej została opublikowana w dwóch pracach w czasopismach z listy filadelfijskiej a trzecia jest w trakcie recenzji. Doktorant prezentował wyniki swojej pracy na kilku konferencjach krajowych.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa mgr inż. Karola Jędrzejczaka spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z warunkami określonymi w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r. (Dz. U. z 2014 r., poz. 1852; Dz. U. z 2015 r., poz. 249) roku oraz w Rozporządzeniu MNiSW z dnia 26.09.2016 r. (Dz. U. z 2016 r., poz. 1586) w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora i zwracam się do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej z jednoznacznym wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Karola Jędrzejczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

24.01.2017



Małgorzata Broda