

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Wierzbickiej

**pt.: „Synteza peptydów cyklicznych w wyniku przeniesienia acylu z atomu azotu na atom siarki
oraz wewnątrzcząsteczkowej natywnej chemicznej ligacji”**

**wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Stefanowicza oraz
promotora pomocniczego dr Mateusza Waliczka**

Medycyna zbliża się do nowej ery, w której decyzje o leczeniu choroby będą podejmowane na poziomie informacji genetycznej i białkowej pacjenta. W nowej erze leczenia terapie białkowe będą odgrywały coraz większą rolę. Już teraz rekombinowane ludzkie białka stanowią większość zatwierdzonych przez FDA leków biotechnologicznych. Obejmują one przeciwciała monoklonalne, naturalne interferony, szczepionki, hormony, peptydy i zmodyfikowane enzymy. Przyszły potencjał takich terapii jest ogromny, biorąc pod uwagę tysiące białek produkowanych przez organizmy żywe. Ponadto, białka nie tylko zapewnią alternatywne (lub jedyne) leczenie niektórych chorób, ale mogą być również stosowane w połączeniu z małymi cząsteczkami, aby zapewnić dodatkowe lub synergiczne korzyści. Obecnie ponad 130 różnych białek lub peptydów jest zatwierdzonych do użytku klinicznego, a wiele a wiele innych jest w fazie rozwoju. Ciągłe rozwijane są nowe metody produkcji białek na skalę przemysłową. Białka terapeutyczne można pozyskać na trzy sposoby. Stosunkowo niewielka liczba terapeutyków białkowych jest izolowana i oczyszczana ze źródeł naturalnych. Większość z nich jest obecnie produkowana za pomocą technologii rekombinacji DNA i oczyszczania. Systemy produkcyjne dla białek rekombinowanych obejmują bakterie, drożdże, komórki owadów, komórki ssaków oraz transgeniczne zwierzęta i rośliny. Wybór systemu produkcyjnego może być podyktowany kosztem produkcji lub modyfikacjami białka (na przykład glikozylacja, fosforylacja lub rozszczepienie proteolityczne), które są wymagane dla aktywności biologicznej. Biosynteza sztucznych wersji tych białek to proces czasochłonny i często bardzo drogi. Trzeci sposób to synteza białka w laboratorium chemicznym. Podejście takie po raz pierwszy

przeprowadzone zostało przez Emila Fishera, który jako pierwszy zsyntezował w roztworze pierwszy osiemnastopeptyd a za swoje osiągnięcia został uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w roku 1902. Następnie metoda chemicznej syntezy peptydów udoskonalona została w latach 60. przez Bruce'a Merrifielda, który w roku 1984 również otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za pracę nad syntezą peptydów w fazie stałej. Obecnie istnieją zautomatyzowane metody do syntezy przepływowej białek (np. o długości 160 reszt aminokwasowych). Nowe technologie chemiczne mogą przyspieszyć produkcję białek na zamówienie i przyczynić się do rozwoju nowych terapii. Pomimo znacznego rozwoju aparatury służącej do syntezy białek, nadal istnieje bardzo duża potrzeba badań nad opracowaniem nowych, szybszych i tańszych metod syntezy białek lub peptydów, szczególnie takich które zawierają połączenia cykliczne. Okazuje się bowiem, że wiele peptydów czy białek cyklicznych posiada pożądaną aktywność biologiczną i terapeutyczną, jednak ich synteza chemiczna jest często skomplikowana, czasochłonna lub niemożliwa. W ten nurt tych niezwykle potrzebnych badań wpisuje się praca doktorska mgr Magdaleny Wierzbickiej, co w mojej opinii w pełni uzasadnia celowość jej realizacji.

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Stefanowicza i pod opieką dr Mateusza Waliczka na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w zespole Inżynierii Peptydów, w ramach projektów NCN PRELUDIUM 19 i OPUS 10. Całość rozprawy obejmuje 233 strony maszynopisu. Praca doktorska podzielona jest na 6 głównych rozdziałów (tj. przegląd literaturowy, cel pracy, wyniki i dyskusja, wnioski, część eksperymentalna oraz literatura). Rozdziały te poprzedza krótkie wprowadzenie dotyczące współpracy naukowej i staży naukowych odbytych przez Doktorantkę w ramach których powstała praca doktorska. Fakt ten zasługuje na pochwałę, gdyż pokazuje iż mgr Wierzbicka chętnie korzystała z doświadczeń innych grup badawczych. Na początku pracy znajduje się wykaz skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy. Natomiast końcu znajduje się wykaz dorobku naukowego Doktorantki oraz aneks. W pracy umieszczono kilkadziesiąt schematów reakcji i struktur związków a także, kilkanaście tabel, kolorowych rysunków oraz wyników analiz HPLC i MS, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Praca ma układ typowy dla prac z zakresu chemii.

W rozdziale pierwszym zatytułowanym „Przegląd literaturowy” Doktorantka dokonała przeglądu peptydów cyklicznych, ze szczególnym uwzględnieniem tych aktywnych biologicznie. Choć istnieje bardzo dużo opracowań na ten temat to rozdział ten przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Następny podrozdział zatytułowany jest „Metody syntezy peptydów”. Jest to rozdział krótki, ale bardzo rzeczowy i świadczący o dużej wiedzy mgr Wierzbickiej. W mojej opinii zawarte są w nim niezbędne informacje dotyczące metod syntezy peptydów. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisała bardzo dokładnie metody syntetyczne umożliwiające cyklizację peptydów, a także metody ligacji chemicznej. Informacje zawarte w tych rozdziałach są

wystarczające do zapoznania czytelnika z omawianymi zagadnieniami, bogato ilustrowane schematami, ale niestety ich lektura, jak zresztą całej pracy jest utrudniona przez bardzo liczne błędy literowe, skróty myślowe czy kolokwializmy.

W następnym rozdziale mgr Magdalena Wierzbicka przedstawiła cel główny swojej pracy, którym było **opracowanie nowej metody syntezy peptydów cyklicznych z zastosowaniem natywnej chemicznej ligacji**. Doktorantka ten cel zrealizowała opracowując i optymalizując sposób otrzymywania nowego prekursora tioestru – N-2-[tioetylo]glicyny, którego zastosowanie umożliwia cyklizację peptydów w warunkach natywnych na nośniku stałym. Niewątpliwą zaletą tego podejścia jest możliwość przeprowadzenia syntezy jednoreaktorowej (tzw. one-pot synthesis), w której w otrzymanym na nośniku stałym kryptotioestrze peptydu dochodzi do przeniesienia acylu N/S. Następnie związek ten jest poddawany transtioestryfikacji z jednoczesnym uwolnieniem z nośnika stałego i wewnątrzcząsteczkowej natywnej chemicznej ligacji. Opracowaną przez siebie metodologię Doktorantka zastosowała z sukcesem do syntezy naturalnych cyklopeptydów takich jak inhibitor trypsyny z nasion słonecznika SFTI-1 czy analogi Aksinelliny A, co zostało opisane w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej, a także w pracy opublikowanej w *The Journal of Organic Chemistry* w 2021 roku. Można się jedynie domyśleć, że nakład czasu, który Doktorantka poświęciła realizacji celu pracy doktorskiej był bardzo duży a uzyskane wyniki są bardzo imponującym osiągnięciem naukowym.

Kolejny główny rozdział rozprawy doktorskiej zatytułowany został „Wyniki i dyskusja”. Tą część pracy doktorskiej czyta się z wielkim trudem gdyż pojawiają się w niej bardzo liczne błędy literowe. Doktorantka nie jest konsekwentna w stosowaniu skrótów i symboli np. czasami czas retencji określany jest skrótem „Rt”, a czasami „rt”, co zgodnie z wykazem skrótów i oznaczeń przedstawionych na początku pracy oznacza temperaturę pokojową. Podobnie, w niektórych przypadkach Kandydatka podaje skrót odczynników sprzęgających począwszy od dużej litery, a niekiedy nie (np. PyOAP i pyOAP). W całej pracy Doktorantka używa określenia „obsadzenie”, podczas gdy tradycyjnie w przypadku syntez na nośnikach stałych używa się określenia „stopień osadzenia”. Pojawiają się określenia nieprecyzyjne typu: „dodając (...) na noc oraz kilka dodatkowych godzin” (str. 82) – to znaczy ile? Czytając pracę nie mogłam zrozumieć czym kierowała się Doktorantka przy wyborze/zmianie odczynników sprzęgających. Czy był to wybór wynikający z przeprowadzonych doświadczeń czy zupełnie losowy? Na stronie 89 pojawia się stwierdzenie: „Dla pierwszych 10 reszt po lewej stronie wykresu wydajności były większe niż 75%, co można uznać za wynik satysfakcjonujący. Dla pozostałych reszt warto byłoby jednak pozostać przy stosowaniu PyAOP jako odczynnika sprzęgającego.”. Skąd ten wniosek? Z wykresu przedstawionego na Ryc. 63 wynika, że sprzęganie z zastosowaniem PyAOP było przeprowadzone tylko dla dwóch ze wspomnianych dziesięciu reszt aminokwasowych. Proszę o wytłumaczenie stwierdzenia „kwasolabilność grupy Fmoc” (str. 122). Monocykliczny CLYG wg Doktorantki eluował

w czasie martwym (str. 132) co uniemożliwiło jego izolację. W jakich warunkach? Czy nie można było zastosować innych warunków wyodrębnienia tego związku? Podobnie w przypadku cyklicznego monomeru CLYRAG i cyklodimeru CLYRAGCLYRAG (str. 134) i analogicznie CLYRAAG i CLYRAAGCLYRAAG (str. 136) – czy niemożliwe było zastosowanie innych warunków chromatograficznego oczyszczania, które umożliwiłyby rozdzielenie tych form? Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób mógłby powstać układ Se-Se-Se (str. 152)? Na stronie 156 pojawia się hipoteza dotycząca utlenienia prowadzącego do powstania hydroksyloglicyny? Czy Doktorantka ma podejrzenia w jaki sposób taka reakcja mogłaby iść? Mało prawdopodobne wydaje się być rozerwanie wiązania C-C i dodatkowe utlenienie w obecności TCEP. Czy obserwowany sygnał m/z może odpowiadać innemu produktowi?

Kolejny główny rozdział rozprawy doktorskiej zatytułowany został „Część eksperymentalna” i zawiera opis metod oraz procedur analitycznych stosowanych przez Doktorantkę. W mojej opinii Pani mgr Wierzbička zastosowała właściwe i nowoczesne metody oraz procedury wymagane od chemika organika zajmującego się syntezą i analizą peptydów. Jednak opis części doświadczalnej budzi wiele moich zastrzeżeń. Eksperymenty opisane są bez podania wielu informacji niezbędnych do ich ewentualnego powtórzenia (np. wielokrotnie powtarzany zwrot: „wyrównałam pH do zadanej wartości” – czyli jakiej? To nie wynika w sposób bezpośredni z opisu eksperymentu). W opisach Doktorantka zastosowała język potoczny (co oznaczają słowa: „zmonitorowałam” czy „wystrzyknęłam”?) oraz liczne skróty myślowe (np. str. 171 i 172: „Pozostałość w kolbie rozpuściłam w octanie etylu i ekstrahowałam z 1M roztworem NaOH. Następnie przemyłam frakcję organiczną wodą, solanką, wysuszyłam nad siarczanem magnezu, odfiltrowałam i odparowałam do sucha na wyparce, a następnie zliofilizowałam.” – czy nie powinno być raczej: przemyłam 1M roztworem NaOH? Co w takim razie i w jaki sposób zostało zliofilizowane?, str. 173: „Wszystkie prekursory peptydowe zostały poddane analizie kontrolnej po uwolnieniu porcji 5 mg peptydydożywic z nośnika stałego za pomocą LC-UV-ESI-MS.” – czy na pewno słowo „uwolnienie” jest w tym wypadku właściwe, co zostało „uwolnione” czego i czy owo „uwolnienie” odbyło się za pomocą LC-UV-ESI-MS?, str. 185: „...wysuszyłam opisaną poprzednio procedurą” – procedura sama w sobie nie powoduje przecież wysuszenia, str. 187: „filtraty zostały zmierzone na spektrofotometrze UV/vis” – co dokładnie zostało zmierzone?). Dodatkowo w zapisie ułamków dziesiętnych niekiedy stosowana jest kropka, niekiedy przecinek. Często informacje zawarte na schematach reakcji nie są zgodne z opisem doświadczeń (str. 189 – na wykresie czas reakcji wynosi 72h, podczas gdy w opisie syntezy wynosi on 24h, str. 192 – na schemacie jest dodatek DTT, a w opisie TCEP, str. 193 – na schemacie jest pH 7,4, a w tekście: 8,5...).

Pracę zamyka spis literatury cytowanej w liczbie 284, a właściwie 283 pozycji, ponieważ pozycja 182 jest tożsama ze 190. Również w tej części Doktorantka nie uniknęła błędów edytorskich, takich jak chociażby w inny sposób podawane tytuły tych samych czasopism: *Nat.*

Prod. Rep. i *Natural product reports*, *Sci Rep* i *Scientific reports*, czy *J Med Chem* i *Journal of Medicinal Chemistry*. Dodatkowo część pozycji literaturowych jest napisana pogrubioną czcionką.

Część opisanych eksperymentów, ich analiza i płynące z badań wnioski zostały już wcześniej poddane ocenie recenzentów w dwóch czasopismach w których zostały opublikowane. Stąd moja rola jako recenzenta jest znacznie ułatwiona. Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone poprawnie. Poniżej, z obowiązku recenzenta, wymieniłam najważniejsze pytania oraz uwagi dotyczące dysertacji:

Str. 13 (Wykaz skrótów i oznaczeń) – Skróty (Trt)cea i (Trt)dmca wyjaśnione są w taki sam sposób

Str. 28 – „następuje hydroliza wiązań łańcucha C z pozostałymi i utworzenie dwóch międzycząsteczkowych mostków disulfidowych”

Str. 29 – „ze względu na działanie w inhibicji receptorów” – co to dokładnie oznacza?

Str.37 – Niektóre wymienione odczynniki sprzęgające nie są solami uroniowymi, a fosfoniowymi (PyBOP czy PyAOP)

Str. 39 – „i uwalniania oraz katalizatorów metali przejściowych” – Co to za katalizatory?

Str. 39 – „W innym syntezaorze: Prelude – aparat zbiera frakcje po deprotekcji Fmoc-PIP.” – Brakuje informacji w jakim celu? Co dalej dzieje się z tymi frakcjami?

Str. 43 – Pojawia się symbol aminokwasu: „O” – co to za aminokwas?

Str. 46 – Pojawia się określenie „zszywanie peptydów”. Rozumiem, że jest to próba przetłumaczenia angielskiego *stapled peptides*, ale w języku polskim powinno się raczej użyć określenia „uszywniania struktury peptydów”, ewentualnie za pomocą tzw. „zszywek” (w cudzysłowie)

Str. 52 – „... środowisko kwaśne (...) protonując azot, który staje się łatwą grupą odchodzącą” – To przecież nie sam azot jest grupą odchodzącą w ligacji chemicznej.

Str. 53, Ryc. 29 – Przeniesienie S,N-acylu to kolejny etap reakcji, a nie ten wskazany na schemacie.

Str. 68 – Pojawia się nazwa „kwas tryptofanowy” – co to takiego?

Str. 70 – „Histydyna jest szczególnym aminokwasem, którego pH jest najbardziej zbliżone do fizjologicznego.” – pH histydyny?

Str. 71 i Tabela 8 (Str. 72) – Jak wygląda wg Pani struktura orto-tiofenolu?

Str. 83 i Tabela 11 (str. 84) – Podane wydajności różnią się (od 15 do 21% vs 1,49 – 2,11 %). Poza tym skąd się wzięła wartość 1,58% w Tabeli? Wg obliczeń to raczej 2,06%?

Str. 93 – Ryc.65 i 66, podobnie Ryc. 69 (str. 97) – Nie widać linii bazowej przedstawionych chromatogramów

Str. 100 – Czy to na pewno sygnał o m/z 755,3206 jest mniejszy od 2 Da od 757,3363, jak wynika z opisu?

Str. 104 – „...od szybkości utlenienia mostków disulfidowych” – czy to mostki ulegają utlenieniu? (podobnie str. 123)

Str. 113 – „Ilości poszczególnych prekursorów biblioteki peptydowej nie były ilościowe”

Str. 133 – To nie związek odpowiada sygnałowi na chromatogramie LC-UV-MS, a odwrotnie

Str. 140 – Przedstawione na Ryc. 116 struktury nie są strukturami 3D

Str. 170 – Co to za naczynie: „zlewka erlenmeyera”?

Str. 174 – „Pozostałe żywice wysuszyłam przemywając wodą z metanolem...” – suszenie za pomocą wody?

Str. 177 – „Porcje po 10 mg peptydydożywicy (...) zostały uwolnione z nośnika stałego” – co zostało uwolnione z czego?

Str. 178 – „W Aneks 23 zamieściłam tabelę obliczonych i znalezionych czasów retencji...” – w jaki sposób oblicza się czasy retencji?

Str. 187 – Podane są wartości końcowego stężenia peptydów w jednostkach mM/g, czy nie chodzi raczej o stopień osadzenia?

Str. 201 (Aneks 10) – Przedstawiony jest schemat substytucji nukleofilowej jednocząsteczkowej podpisany jako substytucja rodnikowa.

Przytoczone uwagi krytyczne recenzowanej pracy doktorskiej nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wysokiej wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Przedstawiona do recenzji dysertacja przedstawia olbrzymi nakład pracy doświadczalnej Doktorantki. Reasumując, uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Wierzbickiej to bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Kandydatka wykazała się ponadto znajomością wielu różnorodnych technik eksperymentalnych, które z powodzeniem stosowała. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane wyniki badań opublikowane zostały w 2 publikacjach. Na opublikowany dorobek mgr Magdaleny Wierzbickiej łącznie składa się 8 artykułów opublikowanych w czasopismach indeksowanych w JCR oraz 5 wystąpień konferencyjnych. Na pochwałę zasługuje fakt uczestnictwa Doktorantki w dwóch stażach zagranicznych podczas których realizowała część swojej pracy doktorskiej. W mojej opinii jest to ponadprzeciętny dorobek publikacyjny jak na tak młodego adepta nauki.

Uważam, że tematyka pracy jest bardzo interesująca i potrzebna, część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki zinterpretowane poprawnie. Reasumując, uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane a uzyskane wyniki mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie podczas otrzymywania nowych peptydów terapeutycznych. Rozprawa mgr Magdaleny Wierzbickiej 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 Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Wierzbickiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

