

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

Warszawa 06.02.2018

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Krystiana Kołodzieja

p.t. „Badania syntetyczne i aplikacyjne nukleozydo (N-arylo)amidofosforanów – potencjalnych pronukleotydów anty-HIV”

Analogi nukleotydów oraz nukleozydów stanowią niezwykle istotną grupę substancji aktywnych przeciw chorobom zagrażającym życiu, włączając w to choroby wirusowe i nowotworowe. Szereg z tych związków przeszedł pozytywnie badania kliniczne i są stosowane w leczeniu tych chorób, ratując i przedłużając życie milionom ludzi. W większości przypadków związki te są podawane w postaci proleków, które muszą zostać ufosforylowane do 5' trifosforanów nukleozydów, stając się wówczas substratami dla polimeraz zależnych od kwasów nukleinowych, a dzięki wprowadzonym modyfikacjom (najczęściej w obrębie rybozy i/lub zasady nukleinowej) hamują elongację syntetyzowanego kwasu nukleinowego. Mimo wielkiego sukcesu niektórych tych cząsteczek, wciąż potrzebne są nowe analogi o poprawionych właściwościach terapeutycznych, wyższej aktywności biologicznej, wykazujące mniej skutków ubocznych. Strategie terapeutyczne z zastosowaniem proleków pozwalają często na ominięcie słabych ogniw wykorzystania pewnych grup czynników aktywnych, na co jest również szereg pozytywnych przykładów w przypadku terapeutyków na bazie pochodnych nukleotydów i nukleozydów. Rozprawa doktorska Pana magistra Krystiana Kołodzieja wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem Prof. Michała Sobkowskiego, doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy. Magister Kołodziej podjął się trudnego zadania jakim była synteza szeregu nukleozydo (N-arylo)amidofosforanów – które miały zostać zbadane jako potencjalne pronukleotydy

o aktywności anty-HIV. Inspiracją do podjęcia tych badań były wcześniejsze obiecujące wyniki opisane w pracach Prof. Adama Kraszewskiego i jego współpracowników.

Praca doktorska ma klasyczny układ i liczy 144 strony, a więc jest dziełem dość zwartym, jak na standardy rozpraw w tej dziedzinie co samo w sobie nie musi być wadą. Na rozprawę składa się wstęp literaturowy oraz badania własne opisane w rozdziale „Wyniki i dyskusja” oraz części eksperymentalnej. W pracy zamieszczono 35 rysunków, 31 schematów, 4 wykresy oraz 9 tabel, starannie przygotowanych pod względem edytorskim, które są bardzo pomocne w śledzeniu toku rozumowania Autora rozprawy. W pracy zacytowano 132 pozycji literaturowych, które w znakomitej większości stanowią prace oryginalne oraz przeglądowe opublikowane w wiodących czasopismach naukowych z chemii medycznej i bioorganicznej oraz dziedzin pokrewnych. Cała praca jest starannie przygotowana pod względem edytorskim i nie budzi poważniejszych zastrzeżeń.

Zgodnie z wymaganiami Ustawy o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw Nr 65, poz. 595, Art. 13) przedmiotem mojej oceny są następujące elementy Rozprawy: a) ogólna wiedza Kandydata w uprawianej dziedzinie naukowej, b) Umiejętność prowadzenia badań naukowych, c) oryginalność rozwiązanego problemu naukowego.

Celem pracy postawionym przed Doktorantem było zaprojektowanie, synteza i zbadanie fizykochemicznych właściwości nowych (N-arylo)amidofosforanów nukleozydów zawierających różne komponenty aminowe w ugrupowaniu amidofosforanowym. Do tego celu zastosowano dwa podejścia syntetyczne: a) fosforylacja nukleozydów poprzez H-fosfoniany lub b) synteza amidofosforanów z zastosowaniem fosforanotriamidu tris-triazolowego. Związki miały następnie zostać poddane badaniom fizykochemicznym oraz biologicznym.

W części literaturowej Autor opisuje szczegółowo, a przy tym w sposób dojrzały naukowo różne podejścia w syntezie pronukleotydów o aktywności anty-HIV ze szczególnym uwzględnieniem związków hamujących namnażanie się materiału genetycznego wirusa w procesie odwrotnej transkrypcji. Autor przytacza w tej części między innymi prace z grup Imbacha, Wagnera, Meiera, McGuigana, swojej rodzimej grupy i wielu innych. Autor krytycznie opisuje wady i zalety poszczególnych podejść. I choć ta część rozprawy jest bardzo interesująca to mamy tu do czynienia z pewnym minimalizmem. Zabrakło mi tu bardziej ogólnego obrazu na czym polega infekcja wirusa HIV, jakie są mechanizmy działania leków stosowanych obecnie w terapii anty HIV, jakie są dla nich cele terapeutyczne, czy w końcu na czym polega mechanizm utraty skuteczności działania poszczególnych czynników terapeutycznych. Te informacje są niezbędne dla uzasadnienia powstawania nowych terapeutyków anty HIV, oraz ich racjonalnego projektowania. Ograniczenie się wyłącznie do nukleotydowych terminatorów odwrotnej transkrypcji zakłamuje nieco problem terapii przeciwko tej

groźnej chorobie. To tym bardziej istotne, że sukces obecnie stosowanej terapii HAART opiera się na zastosowaniu mieszanki czynników aktywnych, działających według różnych mechanizmów.

Część poświęcona badaniom własnym to ciekawy materiał badawczy, w którym Autor przedstawił dwie drogi syntezy N-Arylowych pochodnych amidofosforanów kilku znanych leków nukleozydowych (AZT, d4T, ddU, 3TC oraz ABC) różniących się podstawnikami aryłowymi przy ugrupowaniu amidofosforanowym. Efektywność syntezy pochodnych nukleotydowych przy użyciu zaproponowanych metod była silnie skorelowana z zasadowością użytych amin aromatycznych. Doktorant otrzymał, oczyścił i scharakteryzował pod względem spektroskopowym szereg związków końcowych, które następnie wykorzystał w badaniach fizykochemicznych i przekazał dalej do badań biologicznych. Należy przy tym stwierdzić, że z całą pewnością otrzymane przez Doktoranta związki ze względu na amfifilowy charakter nie należą do najłatwiejszych w syntezie i oczyszczaniu. Sam zresztą Autor zauważył szereg różnych ciekawostek i problemów związanych na przykład z przeciwnymi reszty amidofosforanowej, które dla Recenzenta tej pracy nie są specjalnie zaskakujące. Co istotne z punktu widzenia potencjalnych zastosowań Doktorant wykazał, że otrzymane związki charakteryzują się wysoką trwałością chemiczną w mediach biologicznych. Bardzo interesujące były wyniki otrzymane w badaniach na liniach komórkowych gdzie niektóre z analogów wykazały bardzo wysoką aktywność, istotnie wyższą niż związki referencyjne. Wyniki te pozwalają wierzyć, że warto kontynuować badania tych związków w kierunku zastosowań terapeutycznych. Dużym wzmocnieniem wykonanej przez Doktoranta pracy badawczej byłby dowód, że otrzymywane pronukleotydy są rzeczywiście przekształcane do odpowiednich trifosforanów, a następnie wbudowywane do transkryptów syntetyzowanych przez odwrotną transkryptazę wirusa HIV. Prosiłbym o komentarz podczas publicznej obrony jak Doktorant widziałby możliwość wykonania eksperymentu potwierdzającego te założenia. Jakich metod w tym celu należało by użyć? Bez tego typu potwierdzenia nie należy wykluczyć innego mechanizmu działania otrzymanych przez Pana mgr Kołodzieja związków.

Przykry obowiązek recenzenta to również wykazanie słabości rozprawy przedstawionej do oceny, tych na szczęście w recenzowanej pracy jest niewiele. Zaskakuje bardzo lakoniczna część eksperymentalna, którą w większości stanowi opis widm NMR otrzymanych związków. Ta część pracy jest niezwykle ważna, jej celem w pracach badawczych jest opisanie procedur, które umożliwiają odtworzenie eksperymentu. W przypadku recenzowanej pracy, uważam że wiele istotnych procedur eksperymentalnych została opisana zbyt lakonicznie. Jestem też przekonany, że część ta nie odzwierciedla ilości pracy włożonej w przeprowadzone badania. Nie byłem również w stanie odnaleźć podstawowych informacji na temat tego na jakich układach przeprowadzono badania biologiczne dla otrzymanych związków, a to z kolei niezwykle istotne z punktu widzenia interpretacji i znaczenia tych wyników.

Na rysunkach 33 i 34 przedstawiających widma ^1H NMR Doktorant w sposób nieprawidłowy opisał sygnał przy około 4,7 ppm jako pochodzący od D_2O . Proszę Doktoranta na publicznej obronie o skorygowanie tej informacji.

Autor nie ustrzegła się sporadycznych błędów gramatycznych, braku znaków interpunkcyjnych, czy tzw. literówek, co oczywiście nie obniża bardzo wysokiej wartości pracy zarówno pod względem edytorskim, a tym bardziej pod względem merytorycznym. Do ulubionych pomyłek recenzenta należy zaliczyć tytuł podrozdziału 2.7 w rozdziale „Wyniki i dyskusja” gdzie Autor pisze o utracie „kanionów trietyloamoniowych”. Podobnie literówka pojawia się w tytule rozdziału III.3 zatytułowanego „Pronuklotydy”.

Bogaty materiał doświadczalny, uzyskany podczas realizacji pracy jest interesujący z punktu widzenia metod syntezy pochodnych nukleotydowych, jak również może być wartościowy z punktu widzenia zastosowań terapeutycznych. Szkoda jedynie, że czasem przyjęta forma rozprawy ma naturę zbyt skondensowaną. Jednak trzeba również przyznać, że recenzowana rozprawa wnosi istotny wkład w badania nad syntezą i właściwościami amidofosforanów N-arylowych ważnych terapeutycznie nukleozydów i ich wykorzystanie w podejściu pronukleotydowym. Warto podkreślić dorobek publikacyjny Doktoranta, w który wchodzi trzy prace w renomowanych czasopismach (J. Med. Chem., Eur. J. Med. Chem. oraz Anal. Bioanal. Chem.) i w dwóch z nich Pan mgr Kołodziej jest pierwszym autorem. W konkluzji z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia wszelkie warunki określone w Ustawie i wnioskuje do Rady Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Krystiana Kołodzieja do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

