



Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej

Prof. dr hab. inż. Aleksandra Olma

Łódź, 08. 08. 2017

Recenzja

Pracy doktorskiej magister inżynier Anny Adamskiej-Bartłomiejczyk zatytułowanej
„Projektowanie, synteza i badanie właściwości farmakologicznych nowych analogów peptydów opioidowych”

Przedstawiona mi do oceny dysertacja mgr inż. Anny Adamskiej-Bartłomiejczyk została wykonana w Zakładzie Chemii Bimolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Janeckiej. Zespół prof. Janeckiej, od szeregu lat prowadzi badania zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną analogów peptydów bioaktywnych i ma w tej tematyce niekwestionowane osiągnięcia. Od czasu odkrycia w 1975 roku pierwszych endogennych peptydów opioidowych (Leu- i Met-enkefalin) zsyntetyzowano i przebadano setki analogów naturalnych opioidów. Poszukiwanie nowych analgetyków, pozbawionych efektów niepożądanych, o lepszym profilu farmakologicznym, jak również poznanie mechanizmów ich oddziaływania z receptorami mi, delta i kappa jest ważnym i aktualnym kierunkiem badań. Mimo szeroko prowadzonych prac przez wiele ośrodków naukowych, żaden analog o strukturze peptydowej nie został zarejestrowany jako lek. Przeprowadzone przez doktorantkę badania aktywności biologicznej zaprojektowanych i zsyntetyzowanych liniowych analogów morficeptyny oraz liniowych i cyklicznych penta-, heksa- i heptapeptydów o aktywności opioidowej wpisują się w ten ważny nurt badań. Dysertacja mgr inż. Adamskiej-Bartłomiejczyk jest zwięzłym opracowaniem (21 stron), zgodnie z Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z załączonym spójnym tematycznie zbiorem pięciu prac (w tym jeden artykuł przeglądowy) opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych o sumarycznym IF=13,845 (130 punktów zgodnie z Punktacją Czasopism Naukowych MNiSW). Należy podkreślić, że we wszystkich publikacjach jest ona pierwszym autorem. W skład autoreferatu wchodzi CZĘŚĆ LITERATUROWA, nazwana niepoprawnie przez doktorantkę CZĘŚCIĄ TEORETYCZNĄ (10 stron), w której opisane zostały receptory opioidowe, ich budowa i aktywacja, oraz dwa ligandy receptorów opioidowych: morficeptyna i endomorfiny. W bardzo zwięzły sposób autorka omawia bioaktywną konformację morficeptyny i endomorfin, ich degradację

enzymatyczną, modyfikacje zwiększające przenikanie przez barierę krew-mózg jak również badania wiązania morficeptyny i endomorfina do receptora mi-opioidowego na podstawie analizy ich dokowania do białka receptorowego. W drugiej części autoreferatu mgr inż. Adamska-Bartłomiejczyk przedstawia założenia rozprawy doktorskiej (3 strony), obejmujące poszukiwanie peptydów o różnym profilu powinowactwa do receptorów opioidowych. Cel ten osiągnęła poprzez zaprojektowanie, syntezę i przebadanie liniowych analogów morficeptyny oraz liniowych i cyklicznych peptydów o aktywności opioidowej (trudno je nazwać analogami endomorfiny-2, jak to zrobiła autorka na str. 13). Modyfikacje obejmowały wbudowanie niekodowanych aminokwasów takich jak D i L-F₂Pro, NMePhe i NMeTyr oraz kwasów piperydino-2, 3- i 4-karboxylowych. Ostatnia część dysertacji zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim.

Pierwsza z publikacji wchodzących w skład rozprawy (*Bioorg. Med. Chem.* 2016, **24**:1582-1588) poświęcona jest analogom morficeptyny, modyfikowanym w pozycji 2 lub 4 oraz 2 i 4 resztami D i L-4,4-difluoroproliny. Otrzymane na fazie stałej, oczyszczone i scharakteryzowane w sposób nie budzący wątpliwości peptydy zostały poddane badaniom na wiązanie z receptorami opioidowymi oraz aktywności w teście funkcjonalnym, badaniom konformacyjnym i dokowaniu do receptora mi-opioidowego. Test funkcjonalny na komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO) poddanych transfekacji genami receptorów mi-, delta- i kappa-opioidowych wykazał, że badane analogi morficeptyny wykazują selektywność w stosunku do mi-opioidowego receptora. Badania konformacyjne potwierdziły, że ligandy receptora mi-opioidowego przyjmują zgiętą strukturę i konformację *trans* łańcucha bocznego Tyr¹. Najaktywniejszym był analog Tyr-F₂Pro-Phe-D-F₂Pro NH₂, wykazujący również aktywność do receptora opioidowego kappa. Podstawienie reszty Pro bardziej hydrofobową resztą F₂Pro daje silniejsze oddziaływanie ligand-receptor.

Kolejne badania opisują syntezę oraz właściwości mi-opioidowych ligandów zawierających reszty NMeTyr i NMePhe. Celem wbudowania *N*-metyloaminokwasów w łańcuch peptydowy jest poprawa właściwości farmakokinetycznych związku. Doktorantka zaprojektowała i zsyntetyzowała sześć liniowych i cyklicznych peptydów opioidowych o różnej długości zawierających od jednej do trzech reszt *N*-metyloaminokwasów (*J. Pept. Res.*, 2015, **21**:807-810). Do badań *in vitro* wybrała cztery cykliczne peptydy o różnej wielkości pierścienia (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, **27**:1644-1648). Jedynie pentapeptyd zawierający jedną endocykliczną i jedną egzocykliczną resztę *N*-metyloaminokwasu posiadał wysokie powinowactwo do receptorów mi-opioidowych i był pełnym agonistą. Badania konformacyjne i dokowanie molekularne pozwoliły na wyjaśnienie selektywności NMeTyr-c[D-Lys-Phe-NMePhe-Asp]NH₂. Heksapeptydy, peptydy o powiększonej wielkości układu makrocyclicznego, wykazywały znaczący spadek aktywności, co doktorantka tłumaczy zmianą

konformacji i względnej orientacji przestrzennej reszt aromatycznych w aminokwasach farmakoforowych.

W badaniach opublikowanych w *Bioorg. Med. Lett.*, 2017, **25**:2399-2401 doktorantka przebadła otrzymane na nośniku polimerowym cztery nowe cykliczne peptydy oparte na strukturze otrzymanego wcześniej w Zespole prof. Janeckiej, cyklopentapeptydu Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH₂, selektywnego agonisty mi i kappa-receptorów opioidowych. W strukturze wiodącej reszta fenyloalaniny w pozycji 4 została zastąpiona resztą proliny lub resztami cyklicznych α -, β - lub γ -aminokwasów (kwasem piperydino-2, 3- i 4-karboksylowym, odpowiednio: (S)-Pip, (R)-Nip i Inp). Analogi zawierające w pozycji 4 reszty α -aminokwasów (Pro i (S)-Pip) były mieszaniną izomerów *cis/trans*. W peptydach modyfikowanych resztami (R)-Nip lub Inp obecne było wiązanie pomiędzy Phe³-Xaa⁴ wyłącznie o konfiguracji *cis*. Z przeprowadzonych badań konformacyjnych wynika, że konfiguracja *cis* wiązania Phe³-Xaa⁴ wymusza orientację pierścienia aromatycznego reszty fenyloalaniny w pozycji 3, która determinuje selektywność analogów w stosunku do receptorów opioidowych.

Abstrakt graficzny tej publikacji został wybrany przez Edytora na okładkę zeszytu, gratuluję pomysłu. Wymienione prace stanowią istotny wkład w poznanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością wybranych peptydów opioidowych, oraz mechanizmu działania receptorów opioidowych.

Ostatnia wchodząca w skład rozprawy doktorskiej publikacja jest pracą przeglądową poświęconą peptydom bez końców, kolistym strukturom peptydowym w naturze (*Curr. Med. Chem.*, 2015; **22**:352-359). Omówiona została biosynteza, ich występowanie w świecie zwierząt i roślin oraz ich właściwości. Podkreślono możliwości wykorzystania ich jako struktur wiodących w poszukiwaniu nowych farmaceutyków.

Całkowity dorobek naukowy Doktorantki jest bardzo dobry, składa się z 9 publikacji, z których 5 jest bezpośrednio związanych z rozprawą, jednego wniosku patentowego oraz 15 komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych. Ponadto mgr Adamska-Bartłomiejczyk była wykonawcą w 5 projektach naukowych oraz kierownikiem jednego projektu (Projekt własny w ramach finansowania młodych pracowników nauki i studentów studiów doktoranckich finansowany przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi). Doktorantka znalazła się również w składzie zespołu, który otrzymał w 2016 roku Nagrodę Rektora za cykl publikacji „Nowe syntetyczne podejścia do potencjalnych terapeutyków o działaniu przeciwbólowym i przeciwnowotworowym”.

Mgr inż. Adamska-Bartłomiejczyk wykazała się dobrą znajomością syntezy peptydów na fazie stałej oraz metod oczyszczania peptydów. Opanowała również badanie powinowactwa peptydów do receptorów błonowych z mózgu zwierząt doświadczalnych oraz badania odporności na działanie enzymów proteolitycznych w homogenacie mózgu szczura. Badania aktywności peptydów w teście

funkcjonalnym były prowadzone we współpracy z prof. G. Calo (uniwersytet w Ferrarze), a badania konformacyjne we współpracy z prog. L. Gentilucci (Uniwersytet w Bolonii) i dr A. Borics (Węgierska Akademi Nauk).

Z obowiązku recenzenta przedstawię kilka wybranych uwag, jakie zauważyłam w tekście autoreferatu.

- Zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Farmakologii Podstawowej i Klinicznej (IUPHAR) opublikowanymi w *Br. J. Pharmacol* 2015, **172**: 317-323 dla receptorów opioidowych w języku angielskim należy używać greckich liter μ , δ κ lub μ , δ i κ jak również akronimów MOP, DOP, KOP. Doktorantka wybrała użycie łacińskiego zapisu greckich liter, ale dla receptorów μ -opiodowych określenia μ , zamiast przyjętego w języku polskim „mi”
- Sformułowanie „na bazie NMR” (str 8) jest wyrażeniem żargonowym.
- Cykliczne penta-, hekso- i heptapeptydy już trudno nazwać analogami EM-2, są to nowe peptydy o aktywności opioidowej.
- W I serii analogów (str 13) są błędy w strukturze pierwszorzędowej, we wzorach 1,2 i 4 jest zbędna reszta Pro.
- Atom azotu w nazwie *N*-Metylo powinien być pisany w całym tekście kursywą.

Błędy redaktorskie jakie znalazłam w załączonych publikacjach pominę.

Moje drobne uwagi nie mają istotnego wpływu na wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy. Podsumowując, pracę doktorską mgr inż. Anny Adamskiej-Bartłomiejczyk oceniam bardzo wysoko. Temat podjęty przez doktorantkę jest z punktu widzenia naukowego wysoce aktualny. Uzyskała ona szereg ważnych i ciekawych rezultatów obejmujących badanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością peptydów, co pozwala lepiej poznać konformacyjne wymagania miejsc wiążących receptorów opioidowych w stosunku do ich ligandów i ułatwi projektowanie nowych, skutecznych analgetyków. Wykazała również umiejętność posługiwania się wieloma nowoczesnymi metodami badawczymi i zdolnością krytycznej interpretacji uzyskanych wyników.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska zatytułowana „Projektowanie, synteza i badanie właściwości farmakologicznych nowych analogów peptydów opioidowych” spełnia wymagania ustawowe (Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) dlatego wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Anny Adamskiej-Bartłomiejczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoką ocenę recenzowanej rozprawy, w tym wartość merytoryczną przeprowadzonych badań oraz fakt opublikowania znacznej części wyników rozprawy wnoszę w osobnym piśmie o jej wyróżnienie.

Aleksandra Olma



Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej

Łódź, 8 sierpień 2017

Prof. dr hab. inż. Aleksandra Olma

**Wniosek
o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Adamskiej-Bartłomiejczyk**

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Anny Adamskiej-Bartłomiejczyk pt. „Projektowanie, synteza i badanie właściwości farmakologicznych nowych analogów peptydów opioidowych” w mojej ocenie zasługuje na wyróżnienie.

Tematyka rozprawy, dotycząca badań zależności pomiędzy strukturą a aktywnością peptydów opioidowych, jest wysoce aktualna. Uzyskane wyniki poszerzają naszą wiedzę na temat konformacyjnych wymagań miejsc wiążących receptorów opioidowych w stosunku do ich ligandów i ułatwią projektowanie nowych, skutecznych analgetyków. Przedstawiony autoreferat i załączone publikacje świadczą o dużym doświadczeniu w prowadzeniu badań jak również wysokiej sprawności intelektualnej doktorantki.

Biorąc pod uwagę wysoką ocenę recenzowanej rozprawy, w tym wartość merytoryczną przeprowadzonych badań oraz fakt opublikowania wszystkich wyników wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o jej wyróżnienie.

Aleksandra Olma