

dr hab. Marcin Kołaczkowski, prof. UJ
Zakład Chemii Leków, Katedra Chemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Ocena

pracy doktorskiej pt. „Synteza i aktywność fosfonowych inhibitorów kinazy polifosforanowej 2”, wykonanej przez mgr Małgorzatę Burdę-Grabowską, absolwentkę studiów doktoranckich, w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Artura Muchy, jako promotora.

Ogromny postęp cywilizacyjny, który dokonał się w ciągu ostatnich dwustu lat, całkowicie zmienił obraz świata. Jednym z jego elementów stało się wprowadzenie powszechnej farmakoterapii, nigdy wcześniej nie występującej na podobną skalę w historii ludzkości. Prace takich geniuszy nauki jak Koch, Pasteur, Semmelweis, Ehrlich, Domagk, czy Flemming, dały podwaliny pod zrozumienie istoty chorób infekcyjnych, mechanizmów ich powstawania i zwalczania, a także dostarczyły pierwowzory leków przeciwbakteryjnych. Dalsze prace niezliczonych badaczy z ośrodków akademickich i firm farmaceutycznych doprowadziły do opracowania leków zdolnych do zwalczenia niemal wszystkich znanych bakterii. Problem większości zakażeń bakteryjnych, w tym tych najbardziej trapiących ludzkość w przeszłości, jak dżuma, kiła, czy gruźlica, wydawał się rozwiązany. Jednakże, tego rączego rumaka, jakiego mianem można by określić dynamicznie rozwijającą się w drugiej połowie XX wieku antybiotykoterapię, ewidentnie poniosło... Olbrzymie zużycie antybiotyków i chemioterapeutyków, a także niejednokrotnie wątpliwa adekwatność, czy prawidłowość ich stosowania, stały się jednym z głównych czynników wytworzenia antybiotykooporności. Pojawienie się bakterii wielolekoopornych, szczególnie w warunkach szpitalnych, stało się dla ludzkości ogromnym zagrożeniem, zwiastując nadejście w nowoczesnym świecie „nowej ery przedantybiotykowej”, mogącej całkowicie zmienić obraz otaczającej nas rzeczywistości. W tym kontekście, konieczne jest stałe współdziałanie naukowców z wielu dziedzin i środowisk, dostarczających swoją pracą coraz to nowych informacji na temat możliwych działań, które pozwoliłyby wyrównać szanse ludzkości w walce z ciągle mutującymi drobnoustrojami. W ten nurt doskonale wpisuje się tematyka recenzowanej

rozprawy doktorskiej, stanowiącej składową szerszych prac badawczych, prowadzonych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Artura Muchy. Opracowanie nowych fosfonowych inhibitorów kinazy polifosforanowej 2 (PPK2), może bowiem pomóc w jeszcze lepszym poznaniu jego roli fizjologicznej, określeniu możliwości zastosowania blokady tego enzymu w terapii chorób infekcyjnych, a także stanowić podstawy dla opracowania nowych leków przeciwbakteryjnych, o innowacyjnym mechanizmie działania. W świetle wyżej przytoczonych argumentów, należy stwierdzić, iż wybór tematyki rozprawy doktorskiej był jak najbardziej prawidłowy.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska liczy 169 stron i została opracowana w formie jednolitego manuskryptu, o klasycznym układzie rozdziałów, obejmującym: wstęp (poprzedzony wykazem skrótów), cel pracy, wyniki i dyskusję, metodykę i procedury preparatywne oraz bibliografię. Całość kończy wykaz publikacji, w których umieszczone zostały elementy rozprawy doktorskiej oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Licząca 51 stron część wstępna, stanowi imponujące w objętości i szczegółowości treści kompendium wiedzy, w którym Doktorantka zawarła właściwie wszystkie informacje konieczne do prawidłowego zrozumienia i interpretacji wyników badań własnych, zaprezentowanych w dalszych częściach rozprawy. Na uwagę zasługuje szeroki zakres poruszanej tematyki, obejmującej zarówno aspekty czysto chemiczne, związane ze strukturą polifosforanu nieorganicznego, czy też inhibitorów enzymów biorących udział w jego metabolizmie, jaki i bardzo szeroki opis kontekstu biologicznego. Doktorantka szczegółowo opisała rolę polifosforanu nieorganicznego w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych, nawiązując do fizjologii oraz szczegółowo traktując aspekty biochemiczne. Co godne uznania, wiele uwagi poświęciła roli polifosforanu nieorganicznego w fizjologii bakterii, a także aspektom związanym z problematyką rozwoju infekcji bakteryjnych oraz nowoczesnymi podejściami do ich zwalczania. Szczególną uwagę poświęciła, istotnym z punktu widzenia tematyki pracy, zjawiskom tworzenia biofilmu, wirulencji, czy *quorum sensing*. Na uznanie wskazuje biegłość Doktorantki w opisywaniu tematyki z tak wielu różnych dziedzin, świadcząca o jej interdyscyplinarnym przygotowaniu do pracy naukowej. W tym miejscu chciałbym zadać pytanie na temat możliwego mechanizmu działania przeciwbakteryjnego polifosforanu nieorganicznego, o którym Doktorantka wspomina na stronie 35. Jest to o tyle interesujące, że na wcześniejszych kilkudziesięciu stronach opisana została jego istotna rola dla życia (a nie śmierci) bakterii.

Wiele miejsca w części wstępnej pracy poświęca Doktorantka samym enzymom z grupy kinaz polifosforanowych, zwracając uwagę na, bardzo istotny z punktu widzenia poszukiwania nowych celów dla leków przeciwinfekcyjnych, fakt ich występowania u bakterii, przy braku ich identyfikacji jak dotąd u człowieka. Stanowi to bowiem możliwe źródło, bodajże najistotniejszej dla efektywnej i przede wszystkim bezpiecznej chemioterapii infekcji, tzw. selektywnej toksyczności. W świetle powyższego, a także nielicznych jak dotąd publikacji poświęconych inhibitorom kinaz polifosforanowych, cel rozprawy, obejmujący kilkietapowe prace mające zaowocować skutecznymi inhibitorami PPK2, został zdefiniowany właściwie.

Na kolejnych stronach rozprawy, doktorantka szczegółowo opisuje wieloetapowe badania własne, wzbogacone o wyniki uzyskane we współpracy z naukowcami z kraju i zagranicy. Na uznanie zasługuje racjonalnie uporządkowany ciąg badań, poprzedzających samo opracowanie nowych inhibitorów, koniecznych do przeprowadzenia, w przypadku eksploracji nowego tematu, o ograniczonej liczbie doniesień literaturowych oraz braku dostosowanej metodyki w rodzimym laboratorium. Z uwagi na duże doświadczenie Zakładu Chemii Organicznej PWr w pracach nad pochodnymi fosforowymi oraz dużej bibliotece własnej Zakładu, obejmującej także kwasy fosfonowe, słusznym był wybór 23 z nich do wstępnego screeningu w poszukiwaniu pierwszych tzw. „hitów”, czyli w tym wypadku nawet suboptymalnie aktywnych inhibitorów PPK2, mogących stanowić punkt wyjścia do dalszych prac. Co więcej, słusznym i koniecznym był również wybór do dalszych badań najbardziej stabilnych PPK2, spośród tych pochodzących od różnych mikroorganizmów, a także próby ustalenia optymalnych warunków oznaczeń (temperatury i pH). Kluczowym był także wybór odpowiedniej metody do badania inhibicji enzymatycznej. Szczegółowe porównanie metod wykorzystujących spektrofotometryczne oznaczanie efektów reakcji enzymatycznej, z oznaczaniem adenozynefosforanów metodą chromatografii wysokosprawnej, wskazało na wyższość tej ostatniej. Pomimo dużej czasochłonności, metoda ta nie wymagała wykluczania inhibicji przez badane związki innych enzymów wchodzących w sekwencję reakcji enzymatycznych (np. heksokinazy), nie będąc również wrażliwą na generowane przez badane związki silnego tła pomiaru.

Istotną wartość dodaną dla badań prowadzonych przez Doktorantkę samodzielnie, były wyniki badań krystalograficznych, uzyskane od dr. Bogusława Nocka z Argonne National Laboratory (USA). Otrzymane kryształy kompleksów PPK2 z *Cytophaga hutchinsonii* (*ChPPK2*) ze zidentyfikowanymi przez Doktorantkę, jako inhibitory tego enzymu, dwoma kwasami α -aminobisfosfonowymi oraz jednym kwasem α -hydroksyfosfonowym, posłużyły do określenia sposobu ich wiązania w celu biologicznego. Należy podkreślić, że tego typu

informacje są bardzo pożądane w nowoczesnym, racjonalnym poszukiwaniu substancji biologicznie aktywnych, istotnie wspierając symulacyjne metody modelowania molekularnego. Na podstawie tak zidentyfikowanych kompleksów enzym-inhibitor, Doktorantka dość szczegółowo opisała sposób wiązania poszczególnych związków z PPK2, bazując przy tym na szeroko opisanej w części wstępnej topografii enzymu. Niestety, rysunki zamieszczone w tym rozdziale (nr 24 i 25) są mało wartościowe, gdyż ich poziom szczegółowości jest niski oraz nie są odpowiednio opisane. Nie sposób ich, w związku z tym, odnieść do szczegółowych opisów wiązania, zamieszczonych w treści rozdziału, co jest dużą stratą i znacząco utrudnia czytelnikowi zbudowanie sobie odpowiedniego obrazu interakcji enzym-inhibitor. Oprócz ogólnego umiejscowienia w enzymie, zasadnym byłoby umieszczenie ryciny pokazującej konkretne oddziaływania, tak jak to miało miejsce w przypadku rysunku nr 29, przygotowanego zapewne we współpracy z dr hab. Łukaszem Berlickim. Na podstawie analizy kompleksów, Doktorantka zaproponowała modyfikację struktury, obejmującą wprowadzenie ugrupowania zasadowego w pozycję *meta* pierścienia arylowego. Druga grupa modyfikacji podyktowana była analogią między ligandami. W rezultacie tych rozważań, Doktorantka zaproponowała 6 nowych związków, jako potencjalnych inhibitorów PPK2. W związku z dosyć zdawkowym opisem argumentacji towarzyszącej projektowaniu, a także wspomnianym wcześniej słabym zobrazowaniem kompleksów enzym-inhibitor, trudno jest ocenić, czy potencjał wynikający z dostępu do struktur krystalicznych własnych związków w badanym enzymie został w pełni wykorzystany. Całościowo, rozdział ten odbiega nieco szczegółowością rozważań i jakością opisu przeprowadzonych badań od pozostałych części pracy, sugerując, że nie jest to główny obszar ekspertyzy Doktorantki. Nie stanowi to jednak zarzutu, biorąc pod uwagę bardzo szeroki wachlarz różnorodnych technik zastosowanych i opisanych w rozprawie doktorskiej.

W kolejnym rozdziale opisana jest synteza 17 pochodnych fosfonowych, z których ostatecznie udało się otrzymać 14 związków. Składają się na nie 4 związki resyntezywane, spośród wcześniej wytypowanych 23 pochodnych z kolekcji Zakładu Chemii Bioorganicznej PWr (zw. 30, 34b, 37c i d), 3 związki, spośród 6 zaprojektowanych w poprzednim rozdziale (zw. 37m, n, o), 1 związek uboczny, powstały podczas prób otrzymania zaprojektowanego związku 39a (zw. 39b) oraz 6 nowych związków, nie wspomnianych wcześniej w treści rozprawy (34e, 37p, r, s, 38d, e). Muszę przyznać, że ich pojawienie się w rozdziale poświęconym syntezie nieco mnie zaskoczyło, gdyż, tak jak wspomniałem wyżej, związki te nie zostały opisane we wcześniejszych rozdziałach rozprawy. W związku z ich podobieństwem do związków badanych wcześniej oraz do związków zaplanowanych, nie sposób

zakwestionować zasadności ich otrzymania. Szkoda jednak, że grupa związków, których synteza została podjęta, nie została zebrana wcześniej w sposób całościowy, wraz z uzasadnieniem włączenia do syntezy każdej z pochodnych. Nie ułatwia to odbioru tego etapu prac eksperymentalnych, który skądinąd został przeprowadzony bardzo poprawnie i opisany w sposób nie budzący zastrzeżeń. Na uznanie zasługuje zarówno zakres, jak i rzetelność sprawozdania wykonanych prac, wraz ze szczegółowym opisem działań zarówno zakończonych, jak i niezakończonych sukcesem. Rozdział poświęcony syntezie zamyka szczegółowy opis otrzymania dwóch trwałych fosfinowo-fosfonowych analogów polifosforanu nieorganicznego (zw. 70 i 71), jako ligandów do krystalizacji z enzymem.

Kolejnym etapem prac eksperymentalnych opisanych w rozprawie, było otrzymanie drugiego, obok PPK2 enzymu, o istotnym znaczeniu dla metabolizmu fosforanu nieorganicznego, a mianowicie kinazy polifosforanowej 1 (PPK1). Podjęcie badań z użyciem PPK1 należy uznać za w pełni uzasadnione, z uwagi na istotną rolę tego enzymu, a także możliwość określenia selektywności badanych związków wobec PPK2. Prace objęły wyizolowanie DNA z otrzymanych plazmidów, transformację bakterii kompetentnych oraz ekspresję i oczyszczanie białka. Uwzględnienie w pracy doktorskiej kolejnej, zaawansowanej techniki badawczej, zasługuje na szczególne uznanie. Otrzymany enzym PPK1 został następnie użyty do zbadania aktywności związków, badanych również pod kątem inhibicji PPK2. Badania te poprzedziło wyznaczenie parametrów kinetycznych obu enzymów.

Ostatnim etapem prac eksperymentalnych było zbadanie szerokiej grupy 50 związków fosforoorganicznych, pod względem zdolności do blokowania PPK2 i PPK1. Oprócz wspomnianych wcześniej związków użytych w badaniach wstępnych oraz związków otrzymanych w ramach rozprawy, do badań włączono również 23 inne związki, o strukturze fosfonowej i fosfinowej, z kolekcji Zakładu Chemii Bioorganicznej PWr. Badania przeprowadzone, wybraną na wcześniejszym etapie, metodą HPLC, pozwoliły na identyfikację 4 związków o wyraźnym ($<100 \mu\text{M}$) powinowactwie do PPK2, co było jednym z głównych celów rozprawy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że 2 z nich (zw. 37m i o), zostały zaprojektowane przez Doktorantkę, w oparciu o analizę wykrystalizowanych kompleksów enzym-inhibitor, sugerujących zasadność wprowadzenia grupy aminowej w pozycji *meta* pierścienia fenylowego. Pośród przebadanych związków, udało się także zidentyfikować 4 związki o analogicznym poziomie powinowactwa ($<100 \mu\text{M}$) wobec PPK1. Warto także podkreślić, że związki (37e i 38f) wykazały wysoką (powyżej rzędu wielkości) selektywność wobec, odpowiednio, PPK2 i PPK1, mogąc tym samym dostarczyć wskazówek do projektowania inhibitorów selektywnych. Otrzymanie aktywnych inhibitorów słabo

eksplorowanego, jak dotąd enzymu, należy określić jako duży sukces, szczególnie biorąc pod uwagę korzystniejsze właściwości fizykochemiczne, w kontekście „lekoopodobieństwa” zidentyfikowanych związków, w porównaniu z inhibitorami wcześniej opisanymi w literaturze.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska włącza się w bardzo istotny, z naukowego, medycznego i społecznego punktu widzenia, nurt badań poświęconych poszukiwaniu nowych terapii przeciwbakteryjnych. Stanowi ona także wartościowe rozwinięcie prac prowadzonych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej PWr, będącym wiodącym ośrodkiem naukowym w tematyce opracowywania nowych związków fosforoorganicznych, jako inhibitorów enzymatycznych, o potencjalnej aktywności terapeutycznej. Tło naukowe rozprawy zostało przedstawione klarownie, w oparciu o liczne, adekwatne i aktualne cytowania. Cel pracy został sformułowany prawidłowo i jasno zaprezentowany, a użyta metodyka jest szeroka, właściwie dobrana i opisana. Uzyskane wyniki są oryginalne i przedstawione w sposób rzetelny, a dyskusja oparta na solidnych podstawach naukowych. Na uwagę zasługuje również współpraca zarówno wewnątrzuczelniana, jak i międzynarodowa, która przyczyniła się do znaczącego podniesienia jakości badań. Praca napisana jest poprawną polszczyzną, a sposób wypowiedzi jest klarowny i precyzyjny, co znacznie ułatwia odbiór rozprawy doktorskiej. Autorka posługuje się fachowym słownictwem, potwierdzając dobrą orientację w eksplorowanej dziedzinie nauki. Co również godne podkreślenia, strona edytorska pracy stoi na wysokim poziomie, chociaż Doktorantka nie ustrzegła się nielicznych błędów literowych oraz nieco liczniejszych błędów interpunkcyjnych.

Z obowiązku recenzenckiego, muszę zwrócić uwagę na kilka problematycznych sformułowań, których korekta może okazać się korzystna, w przypadku dalszego publikowania elementów rozprawy. I tak, na stronie 44, pada sformułowanie „wygenerowanie farmakoforów i zadokowanie ich do kieszeni wiążącej”, będące ewidentnym skrótem myślowym. Słowo „farmakofor”, samo będące określeniem niepełnym i uproszczonym, w takiej formie odnosi się bowiem raczej do modeli farmakoforowych, będących zestawem cech strukturalnych, odpowiednio rozlokowanych w przestrzeni, nie posiadających tożsamości fizycznej, a więc niemożliwych do zadokowania. Czasami taki skrót bywa stosowany także wobec elementów farmakoforowych związku chemicznego, a więc fizycznie istniejących ugrupowań, kluczowych dla aktywności. Ich jednak też nie da się samodzielnie zadokować (chyba, że ktoś miałby na myśli szczególną formę *fragment-based design*). Domyślam się, że Autorce chodziło o zadokowanie do miejsca aktywnego PPK1 związków spełniających kryteria wygenerowanych wcześniej hipotez farmakoforowych, które to związki zostały zidentyfikowane z użyciem tych hipotez w przeszukiwaniu bazach danych. Podobnie, na

stronie 59, pojawia się sformułowanie że "enzym konwertujący angiotensynę podwyższa ciśnienie tętnicze krwi". Jest to również oczywisty skrót myślowy, gdyż enzym ten bierze udział w produkcji angiotensyny II, która to podwyższa ciśnienie tętnicze krwi. Ponadto, określenie inhibitora konwertazy angiotensyny, fozynoprylu, jako „jedyne dostępne handlowo związku fosfinowy wykazujący taką aktywność”, jest niefortunna. Można powiedzieć, że jest to „jedyne lek o strukturze fosfinowej zarejestrowany w tym wskazaniu”. Dostępnych komercyjnie „związków” o takiej aktywności jest zapewne więcej, biorąc pod uwagę mnogość źródeł związków chemicznych.

Z drobnych błędów literowych wskazałbym:

Wykaz skrótów: literówka wyrazie kinaza polifosforanowa 2

Strona 11: chyba chodziło o 1000 lat, jeżeli odnosimy się do starożytności?

Strona 27: powinno być antybiotyki Beta-laktamowe, a nie L-laktamowe

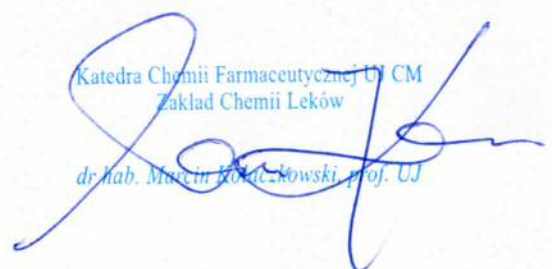
Angielskie słowo "micromolar" tłumaczy się w języku polskim na „mikromolowy”, a nie „mikromolarny”.

Strona 71: ma być CL= 1,0 mM (zgubione mili).

Całościowo, należy podkreślić, że oceniana rozprawa doktorska stoi na bardzo wysokim poziomie merytorycznym, a wskazane niedociągnięcia, czy drobne uchybienia, mają w zdecydowanej większości charakter edytorski i nie umniejszają wartości naukowej rozprawy.

Pracę uważam za w pełni odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk chemicznych i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, o jej przyjęcie i dopuszczenie jej Autorki, Pani mgr Małgorzaty Burdy-Grabowskiej, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Chemii Leków
dr hab. Marcin Kończowski, prof. UJ



Kraków, 19.07.2019

dr hab. Marcin Kołaczkowski, prof. UJ
Zakład Chemii Leków, Katedra Chemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Burdy-Grabowskiej pt. „Synteza i aktywność fosfonowych inhibitorów kinazy polifosforanowej 2” cechuje się wysoką wartością merytoryczną. Opisane w niej badania są w pełni oryginalne i rzetelnie sprawozdane. Otrzymane wyniki są ciekawe pod względem naukowym, a ze względu na bardzo dobre osadzenie badań w realnej problematyce współczesnej medycyny, posiadają również wyraźny charakter aplikacyjny. Na szczególne wyróżnienie zasługuje również fakt, że elementy rozprawy zostały opublikowane w czasopismach międzynarodowych z *impact factor*, a rola doktorantki w ich powstaniu jest istotna. Mając na uwadze powyższe, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, o wyróżnienie rozprawy doktorskiej p. mgr Małgorzaty Burdy-Grabowskiej.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJCM
Zakład Chemii Leków

dr hab. Marcin Kołaczkowski, prof. UJ

