

Prof. zw. dr hab. Włodzimierz Lewandowski
Politechnika Białostocka
Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii

Recenzja rozprawy doktorskiej
Mgr Aleksandry Dąbrowskiej

„Nowe związki anti-HIV. Aktywność i mechanizm działania-modelowanie, synteza, badania biologiczne” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Zdzisława Chilmonczyka i promotora pomocniczego – dr hab. n. farm. Katarzyny Wiktorskiej

Recenzowana praca została poświęcona opracowaniu oraz ocenie aktywności nowej klasy związków- inhibitorów odwrotnej transkryptazy HIV. Opracowanie nowych leków w terapii HIV jest niezwykle istotne z kilku powodów. Wirus HIV jest odpowiedzialny za zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS), który prowadzi do osłabienia układu odpornościowego i zwiększonej podatności na infekcje oraz choroby oportunistyczne. Pomimo znaczących postępów w terapii przeciwwirusowej, zakażenie HIV pozostaje nieuleczalne, a leczenie skupia się na kontrolowaniu replikacji wirusa i związanych z nim powikłań.

Podstawowymi problemami badawczymi doktoratu było zaprojektowanie, synteza, przeprowadzenie badań chemicznych i biologicznych nowych, potencjalnie aktywnych środków anti-HIV.

Fosforowe analogi nukleozydów, pochodne betuliny i kwasu 3-karboksybetulinowego oraz analogi C2-fulerenowe Zydowudyny to grupa związków chemicznych o potencjalnych właściwościach przeciwwirusowych, w szczególności anti-HIV. Fosforowe analogi nukleozydów są syntetycznymi związkami chemicznymi, które naśladują strukturę naturalnych nukleozydów. Wyróżniają się tym, że zawierają modyfikację w grupie fosforanowej, co może prowadzić do zwiększenia ich aktywności przeciwwirusowej. W terapii przeciwwirusowej, zwłaszcza w leczeniu HIV, stosuje się nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI), które blokują powstawanie łańcucha DNA wirusa, hamując tym samym jego replikację. Pochodne betuliny, jak i pochodne kwasu 3-karboksybetulinowego, charakteryzują się strukturą chemiczną zbliżoną do betuliny, ale z różnymi modyfikacjami, które mogą wpływać na ich właściwości farmakologiczne. Te związki wykazują aktywność przeciwwirusową poprzez blokowanie procesów związanych z penetracją wirusa do komórki, integracją jego materiału genetycznego oraz replikacją. Zydowudyna (AZT) to jeden z pierwszych leków stosowanych w leczeniu HIV, należący do grupy NRTI. Analogi C2-fulerenowe Zydowudyny to związki, w których struktura Zydowudyny zostaje połączona z fulerem - dużą cząsteczką węgla o strukturze kulistej. Modyfikacja ta może prowadzić do zwiększenia lipofilności związku, co pozwala na lepszą penetrację bariery komórkowej i potencjalnie zwiększa efektywność działania przeciwwirusowego. Wspólnym celem działania tych związków jest hamowanie replikacji wirusa HIV, jednak realizują go na różne sposoby. Fosforowe analogi nukleozydów i analogi C2-fulerenowe Zydowudyny działają głównie

poprzez inhibicję odwrotnej transkryptazy, podczas gdy pochodne betuliny i kwasu 3-karboksybetulinowego blokują różne procesy związane z penetracją wirusa do komórki, integracją materiału genetycznego oraz replikacją. Wszystkie te związki łączy potencjalne działanie przeciwwirusowe skierowane przeciwko HIV, ale różnią się strukturą chemiczną i mechanizmami działania. Dlatego mogą one oferować różne korzyści w terapii przeciwwirusowej, w tym synergistyczne efekty, gdy są stosowane razem, co może prowadzić do zmniejszenia oporności na leki.

W przypadku badanych związków, takich jak fosforowe analogi nukleozydów, pochodne betuliny i kwasu 3-karboksybetulinowego oraz analogi C2-fulerenowe Zydowudyny, Doktorantka bardzo słusznie rozważa możliwość ich zastosowania w ramach strategii PROTAC i TCI, aby opracować nowe, bardziej efektywne i selektywne leki przeciwwirusowe.

W oparciu o aktualną literaturę naukową, mgr Aleksandra Dąbrowska podkreśla, że dla strategii PROTAC, badane związki mogą służyć jako inspiracja do projektowania dwufunkcyjnych cząsteczek, które łączą się zarówno z docelowym białkiem, np. odwrotną transkryptazą HIV, jak i z maszyną proteolityczną. Takie połączenie może prowadzić do degradacji białka celu, co skutkować będzie inhibicją replikacji wirusa. W tym przypadku badane związki mogą być wykorzystane jako budulce lub elementy strukturalne do opracowania nowych, efektywniejszych cząsteczek PROTAC. W odniesieniu do strategii TCI, badane związki mogą stanowić punkt wyjścia do syntezy inhibitorów kowalencyjnych, które tworzą trwałe wiązania z docelowymi białkami zaangażowanymi w cykl życiowy wirusa HIV, takimi jak odwrotna transkryptaza, integraza czy proteaza. Wówczas można opracować modyfikacje chemiczne badanych związków, które pozwolą na trwałe i selektywne oddziaływanie z kluczowymi aminokwasami w miejscu aktywnym białka celu.

Mimo rozbudowanego tła literaturowego, warto zwrócić uwagę na konieczność precyzyjniejszego opisanie motywacji wyboru badanych związków (fosforowych analogów nukleozydów, pochodnych betuliny i kwasu 3-karboksybetulinowego oraz analogów C2-fulerenowe Zydowudyny), spośród szerokiej gamy dostępnych preparatów o potencjalnym działaniu anty-HIV. Doktorantka powinna uzasadnić, dlaczego konkretnie te molekuly zostały wybrane do badań, jak reprezentują szerszą grupę związków oraz jakie są oczekiwane korzyści wynikające z ich modyfikacji w kontekście aktualnie prowadzonych badań klinicznych. W pracy doktorskiej zawarto określenia takie jak "kluczowa rola" lub "wzrastające zainteresowanie naukowe", jednak te argumenty nie są wystarczające i przekonujące dla takiego wyboru związków, biorąc pod uwagę, że w rozdziale I.4 opisano, iż "gama stosowanych leków anty-HIV ulega systematycznemu powiększeniu, co ułatwia ich dostępność". Ważne jest, aby w pracy doktorskiej przedstawić czytelne i przekonujące argumenty, które wyjaśnią, jak badane substancje mogą przyczynić się do rozwoju terapii anty-HIV oraz dlaczego warto skupić się na nich, a nie na innych potencjalnie obiecujących związkach przedstawionych w zestawieniach tabelarycznych. Podkreślenie tego aspektu może pomóc w zrozumieniu znaczenia badań prowadzonych przez doktorantkę, a także wskazać ich wartość naukową i potencjalne zastosowanie w przyszłości.

Stwierdzenie, że cykl replikacji HIV ma istotne znaczenie w opracowaniu nowych terapii antyretrowirusowych (rozdział I.5.), może być nie do końca trafne. W rzeczywistości, w

opracowaniu skutecznej terapii antyretrowirusowej kluczowe są metody syntezy związków, a także ich skuteczność wykazana w testach *in vitro* i *in vivo*. Niemniej, niewątpliwie cykl replikacyjny wirusa posiada charakterystyczne cechy, których poszczególne elementy mogą stanowić precyzyjny cel specyficznego działania leku antyretrowirusowego. Mimo że użyte przez doktorantkę określenie może nie oddać pełnego obrazu istoty opracowywania terapii antyretrowirusowych, nie wpływa to negatywnie na odbiór i czytelność wstępu do pracy. Praca w dalszej części prezentuje szczegółowe informacje na temat badanych związków, ich syntezy oraz wyników badań *in vitro* i *in vivo*, co pozwala na pełne zrozumienie tematyki badawczej i celów pracy doktorskiej.

W recenzowanej pracy, istotne jest uwzględnienie preparatyki w chemii organicznej. Warto zwrócić uwagę na brak informacji dotyczących czystości uzyskanych związków oraz dokładności zastosowanych metod w określaniu ich składu i struktury molekularnej. Kontrola czystości i jakości syntetyzowanych związków ma kluczowe znaczenie dla wiarygodności wyników testów biologicznych i wartości naukowej pracy. W przyszłych publikacjach autorka powinna uwzględnić szczegółowe informacje na temat zastosowanych technik kontroli czystości oraz jakości uzyskanych związków, co pozwoli na lepszą ocenę wartości naukowej oraz potencjalnych zastosowań badanych preparatów w kontekście terapii przeciwwirusowej skierowanej przeciwko HIV.

W kontekście rosnącego zainteresowania naukowego w dziedzinie badań nad nowymi inhibitorami odwrotnej transkryptazy, praca ta wnosi istotny wkład do literatury naukowej, prezentując nowe możliwości i potencjalne kierunki badań w dziedzinie terapii anty-HIV. Szczególną wartość pracy stanowi analiza szerokiej gamy związków oraz ich porównanie w kontekście struktury, mechanizmu działania, skuteczności *in vitro* i *in silico*, co może stanowić solidne podstawy do dalszych badań, w tym potencjalnych badań klinicznych. Integracja różnych metod badawczych pozwala na dogłębne zrozumienie badanych zjawisk, zwłaszcza w dziedzinie tak skomplikowanej jak badanie mechanizmów działania nowych leków przeciwwirusowych. Wykorzystanie synergii między różnymi dziedzinami nauki pozwala na szybsze i bardziej efektywne osiąganie celów badawczych, a także na większą elastyczność w podejściu do rozwiązania napotkanych problemów.

Zastosowanie takiego podejścia w pracy doktorskiej wskazuje na zdolność doktorantki do pracy w interdyscyplinarnym zespole badawczym oraz do poszukiwania nowatorskich rozwiązań. Umiejętność łączenia różnych dziedzin nauki oraz wiedzy teoretycznej z praktycznymi umiejętnościami laboratoryjnymi zasługuje na duże uznanie i świadczy o wysokim potencjale naukowym doktorantki. Warto również podkreślić, że syntezy związków oraz badania modelowania molekularnego prowadzone były we współpracy z renomowanymi polskimi ośrodkami badawczymi, takimi jak Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, Politechnika Poznańska oraz Wydział Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Ponadto, współpraca z Zakładem Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu oraz Zakładem Fizyki Ciała Stałego Międzyuczelnianego Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych w Chorzowie stanowi dowód na wysoką jakość oraz interdyscyplinarne podejście w pracy doktorantki. Współpraca z tak licznymi i uznanymi ośrodkami naukowymi jest niewątpliwie

dużym wyróżnieniem dla pracy oraz dowodzi wysokiego stopnia zaawansowania i zaangażowania naukowców z różnych dziedzin. Przenikanie się wiedzy i doświadczeń z różnych specjalności pozwoliło na osiągnięcie lepszych rezultatów w opracowywaniu nowej klasy związków - inhibitorów odwrotnej transkryptazy HIV. To wszystko świadczy o kompetencji i zaangażowaniu doktorantki, co niewątpliwie przyczyniło się do wartości naukowej pracy.

Mgr Aleksandra Dąbrowska w rozdziale *IV.5.2. Omówienie wyników badań* wskazuje, że związek J-87 wydaje się być najbliższy spełnienia reguł Lipińskiego, co sugeruje, że właściwości tych związków mieszczą się w granicach zdefiniowanych dla potencjalnych leków. Jednakże warto zauważyć, że definicje te są bardzo szerokie. Reguła Lipińskiego, obejmująca zasady dotyczące właściwości molekularnych wpływających na biodostępność doustną, jest jednym z wielu kryteriów oceny potencjalnych leków. Choć ważna, nie uwzględnia istotnych aspektów, takich jak transportery białkowe. W rzeczywistości, tylko około 50% nowych substancji doustnych przestrzega tej reguły. Nowoczesne podejście obejmuje szereg dodatkowych reguł, takich jak Ghose, Veber, Egan i Muegge, które uwzględniają różne właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. Warto zauważyć, że niektóre produkty naturalne nie przestrzegają reguł chemicznych stosowanych w regule Lipińskiego. Autorka sama zwraca uwagę na fakt, że niska kwasowość monoestrów fosforoamidowych może prowadzić do istnienia mieszanek różnych form (naładowanych i nienaładowanych) w warunkach fizjologicznych. Znaczenie miejsca protonowania oraz wartości pKa wymaga dokładnych analiz, aby lepiej zrozumieć, jak te czynniki wpływają na potencjalne właściwości farmakologiczne badanych preparatów. Dlatego warto stosować holistyczne podejście, uwzględniające różnorodne reguły i metody, takie jak dokowanie molekularne, aby uzyskać pełniejszy obraz potencjalnych właściwości farmakologicznych badanych związków. Badania *in silico* stanowią istotną zaletę tej pracy, jednak brakuje informacji na temat niektórych aspektów związanych z optymalizacją struktury badanych związków. W szczególności, nie zostało jasno określone, czy związki utworzone z fulerenu C₂₀ oraz fragmentu Zydowudyny na podstawie struktur nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy zostały uprzednio zoptymalizowane (optymalizacja struktury) oraz jaką metodą zostało to przeprowadzone. Ponadto, nie zostało wyjaśnione, czy wykorzystanie optymalizacji w polu siłowym podobnym do pola siłowego Dreiling'a obejmowało wszystkie analizowane pochodne.

W recenzowanej pracy doktorskiej przedstawiono badania *in silico* zoptymalizowanych struktur, które wykazały, że ich skuteczność hamująca może być satysfakcjonująca, co sugeruje potencjalne zastosowania w terapii anty-HIV. W związku z tym, warto rozważyć dalsze prace skupiające się nad problematyką tzw. systemu dostarczania leków. Niniejsza sugestia nie wpływa na ocenę merytoryczną pracy, lecz stanowi wskazówkę do rozwijania podjętego, ważnego tematu. Autorka wykorzystwała metody modelowania molekularnego obok generowania danych *in vitro* w celu stworzenia modelu oraz jego przetestowania, co pozwoliło na odkrywanie i optymalizację nowych cząsteczek o powinowactwie do celu, wyjaśnianie właściwości absorpcji, dystrybucji, metabolizmu, wydalania i toksyczności oraz charakterystyki fizykochemicznej. W przypadku terapii anty-HIV problemem często nie jest sam brak aktywności związku wobec celu molekularnego, lecz droga jego dotarcia, metabolizm

i ogólnie pojęta biodostępność. Zdecydowaną zaletą tej pracy jest zwrócenie się ku pojęciom lipofilności i przenikalności przez błony, co świadczy o kompleksowym podejściu do tematyki nowych leków antywirusowych.

Mimo drobnych uwag dotyczących struktury i treści recenzowanej pracy, uważam, że cel rozprawy został osiągnięty, a stosowane metody badawcze nie budzą zastrzeżeń. Praca jest napisana w sposób zrozumiały i fachowy, uzupełniona o niezbędne tabele, rysunki i wykresy, które prezentują porównanie uzyskanych wyników badań. Nie zauważono istotnych błędów stylistycznych ani językowych, co świadczy o rzetelności i staranności w przygotowaniu rozprawy.

Na zakończenie pracy, mgr Aleksandra Dąbrowska przedstawiła wykaz wszystkich publikacji (12 pozycji), a wyniki obejmujące tematykę pracy doktorskiej zostały przedstawione w 6 punktowanych międzynarodowych publikacjach. Ponadto doktorantka jest współautorem komunikatów naukowych oraz trzech patentów.

Dodanie informacji o udziale autorskim mgr Aleksandry Dąbrowskiej z pewnością ułatwiłoby rzetelną ocenę całego dorobku, który zasługuje na wyróżnienie. Szczególnie imponujący jest duży dorobek naukowy doktorantki, który świadczy o jej zaangażowaniu, motywacji i cechach młodego naukowca. Współpraca z innymi naukowcami, działalność naukowa oraz interdyscyplinarna współpraca są dowodem na jej zdolności do pracy w zespole oraz umiejętności komunikacji między różnymi dziedzinami nauki.

Mgr Aleksandra Dąbrowska wykazała się wysokim poziomem kompetencji naukowych, umiejętnością twórczego myślenia oraz zaangażowania w realizację swojego projektu badawczego. Jej praca stanowi wartościowy wkład w dziedzinę badań nad HIV, co potwierdzają liczne publikacje, patenty i prezentacje na konferencjach naukowych.

W świetle powyższych informacji, z przyjemnością wyrażam pozytywną opinię o doktorantce mgr Aleksandrze Dąbrowskiej. Jej wkład w naukę, kompetencje oraz umiejętności świadczą o tym, że jest ona godna uzyskania stopnia naukowego doktora, a jej praca doktorska zasługuje na uznanie i wyróżnienie.

Zdaniem recenzenta praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ust. z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003r., nr 65 poz. 695 z późniejszymi zmianami). Wnoszę zatem, aby Wysoka Rada dopuściła mgr Aleksandrę Dąbrowską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Włodzimierz Lewandowski