

Elżbieta Magdalena Stefaniuk, dr hab. n. med., prof. UŁ
Uczelnia Łazarskiego w Warszawie
Wydział Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Aleksandry Dąbrowskiej pt.: „Nowe związki anty – HIV. Aktywność i mechanizm działania – modelowanie, synteza, badania biologiczne” wykonanej w Zakładzie Biotechnologii Leków i Bioinformatyki Narodowego Instytutu Leków pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Zdzisława Chilmonczyka i promotora pomocniczego dr hab. n. farm. Katarzyny Wiktorskiej, prof. Narodowego Instytutu Leków.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera wyniki i analizę badań wykonanych przez doktorantkę mgr Aleksandrę Dąbrowską, dotyczących jakże wciąż aktualnego zagadnienia poszukiwania związków o potencjalnej aktywności anty-HIV z klasy inhibitorów odwrotnej transkryptazy HIV.

Mimo upływu ponad 35 lat od wprowadzenia do terapii pierwszego leku – Zydowudyny ciągle istnieje potrzeba otrzymania związków o większej skuteczności terapeutycznej i mniejszej toksyczności dla organizmu ludzkiego. Rozwojowi prac badawczych w tym zakresie sprzyja ciągły postęp technik laboratoryjnych, syntetycznych i modelowania *in-silico*. Czynnikiem sprzyjającym jest również fakt, że w badaniach aktywności i toksyczności wykorzystuje się modele komórkowe, a nie np. modele zwierzęce, których ograniczanie wykorzystywania jest ogólnie obserwowaną tendencją. Świadczy o tym między innymi fakt wycofania przez amerykańską agencję Food and Drug Administration konieczności wykonywania badań przedklinicznych na zwierzętach, przed wejściem w fazę badań klinicznych z udziałem ludzi - zdrowych ochotników bądź pacjentów. W konsekwencji, badania na zwierzętach przestały być obowiązkowe przy rejestracji nowych leków w USA. W tej sytuacji jednak, tam gdzie to możliwe, modele komórkowe odgrywają zasadniczą rolę. I tak, w ramach recenzowanej pracy Doktorantka we wstępie, w sposób przejrzysty i wyczerpujący, opisała aktualną sytuację w zakresie terapii anty-HIV w skali ogólnościowej, w szczególności odnosząc się do stosowania nowych leków, jak i prowadzonych prac badawczo-rozwojowych w tym zakresie. Wstęp obejmuje 15 stron maszynopisu dotyczących opisu i analizy takich zagadnień jak dane epidemiologiczne, budowa wirusa niedoboru odporności, cykl życiowy wirusa HIV, leki dotychczas stosowane w terapii anty-HIV, nowe strategie w poszukiwaniu związków chemicznych o działaniu anty-HIV oraz opis pochodnych fosforowych glikozydów, pochodnych fosforowych związków naturalnych oraz analogów fosforowych Zydowudyny zawierających fragment fulerenowy. Omawiane

zagadnienia są zilustrowane wieloma rycinami i uzupełnione informacjami przedstawionymi w czytelnej formie tabelarycznej i oparte są na wiedzy Doktorantki oraz 41 odnośnikach.

Celem recenzowanej pracy było opracowanie nowej klasy związków - inhibitorów odwrotnej transkryptazy HIV w oparciu o identyfikację w badaniach biologicznych determinantów odpowiedzialnych za ich aktywność. Aby zrealizować cel przeprowadzono badania biologiczne szeregu związków zarówno syntetycznych jak i naturalnych z grupy związków fosforoamidowych oraz nukleozydowych pochodnych fulerenowych C₂₀, co stanowi ważny element rozwijania strategii syntezy inhibitorów RT HIV, które wytyczały kierunek prac syntetycznych. Cel pracy został w pełni zrealizowany i zaowocował wieloma publikacjami i zgłoszeniami patentowymi, a także stworzył podwaliny do dalszych prac w kierunku otrzymania mało toksycznych i skutecznych w walce z HIV związków.

Doktorantka prawidłowo zaplanowała, wykonała, przeanalizowała i zinterpretowała badania aktywności anty-HIV oraz toksyczności komórkowej syntetyzowanych *de novo*, bądź modyfikowanych związków naturalnych, na limfoidalnych liniach komórkowych otrzymanych z NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program, podatnych na zakażenie HIV. Wirus CVF użyty do badań to laboratoryjny izolat tzw. szczepu „dzikiego” o fenotypie indukującym syncycja, otrzymany od pacjenta HIV pozytywnego w Pracowni Wirusologii Narodowego Instytutu Leków i namnażany w hodowlach komórkowych linii CEMT4. Stężenie wirusa niezbędne do zakażenia komórek Doktorantka ustaliła doświadczalnie.

Brakuje tutaj nieco komentarza, czy w związku ze zmiennością wirusa HIV zastosowanie wirusa innego pochodzenia mogłoby wpłynąć na rezultaty przeprowadzonych badań, a także głębszego komentarza na temat doboru hodowli komórkowej, co przeciętnemu czytelnikowi umożliwiłoby zrozumienie warsztatu pracy z wirusem HIV i uniwersalności otrzymywanych w takich badaniach wyników.

Wyniki badań biologicznych, wykonanych w ramach niniejszej pracy w Narodowym Instytucie Leków, stały się podstawą do kształtowania strategii projektowania, syntezy, badań chemicznych i biologicznych nowych, potencjalnie aktywnych środków anty-HIV. W ramach pracy przebadano i opisano związki o obiecujących parametrach biologicznych i toksykologicznych. Dla części zaprojektowanych i zsyntetyzowanych związków, jak podaje Doktorantka, badań biologicznych nie udało się przeprowadzić m.in. ze względu na ich słabą rozpuszczalność. Mimo to, zaprezentowano wyniki pełnych badań dla 90-ciu związków, spośród których wytypowano te najbardziej aktywne i najmniej toksyczne.

Doktorantka na różnych etapach syntezy przebadła związki z pięciu klas chemicznych, w tym pochodne kwasu H-fosfonowego – (N-arylo)fosforoamidaty, pochodne kwasu H-fosfonowego - (N-heteroarylo)fosforoamidaty, fosforoamidowe diestry zawierające ugrupowania amino- i hydroksypirydynowe fosforowe pochodne Bewirytmu oraz fosforowe analogi kwasu 3-karboksybetulinowego.

Należy podkreślić, że przeprowadzone badania biologiczne pozwoliły stwierdzić, iż analizowane, nowo otrzymane analogi nukleozydowe zawierające dodatkowo ugrupowania aromatyczne i heteroaromatyczne działają jako pronukleotydy. Najbardziej aktywne pochodne Zydowudyny zawierają ugrupowanie metylofenylowe i pirydynowe przyłączone odpowiednio w pozycji p- i m-. Postanowiono zatem zaprojektować pochodne fosfonukleozydowe o zwiększonej lipofilowości, co ma fundamentalne znaczenie dla biodostępności leków.

Wszystkie badane pochodne okazały się być bardziej aktywne od związku macierzystego - AZT. Najbardziej aktywne pochodne AZT zawierają 5-amino-2-cyjanopirydynę i aminotiazol. W przypadku 2', 3'-dideoksurydyny jedynie pochodna 3-aminochinonowa wykazała istotną aktywność.

Wśród pochodnych Stawudyny najbardziej aktywna okazała się być pochodna aminometylotiazolowa. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki przeprowadzonych badań biologicznych - wysoką aktywność anty-HIV i bardzo niską toksyczność badanych 2,3'-dideoksynukleozydo(Nheteroarylo) fosforoamidatów oraz ich wydajną syntezę, stabilność, rozpuszczalność podjęto decyzję, aby w ramach niniejszej pracy przeprowadzić dalsze badania w tej klasie związków, jako potencjalnych leków przeciwwirusowych. Ponadto przeprowadzone badania biologiczne pozwoliły stwierdzić, że podjęcie syntezy i badań biologicznych w zakresie toksyczności i aktywności anty-HIV fosforamidatów zawierających AZT i ddU serii G i H zawierających różne kombinacje 2-,3-,4-aminopirydyny i ugrupowania 2-,3-,4-hydroksypirydynowe wydaje się szczególnie uzasadnione. W rezultacie prowadzonych badań opracowano (N-pirydylo)fosforamidaty AZT jako nowy typ pronukleotydów. Okazało się, że wśród pochodnych AZT ugrupowania fenylowe i pirydynowe zwiększają ich aktywność, przy czym wiązanie ze związkiem macierzystym powinno występować w pozycji o- lub m- pierścienia pirydynowego. Na dalszym etapie prac przeprowadzone badania biologiczne pozwoliły ocenić aktywności anty-HIV nowych pochodnych związków naturalnych, uzyskanych w drodze syntezy w oparciu o strukturę kwasu 3-O-(3',3'-dimetylosukcynylo)betulinowego znanego jako Bewirynt-BWM, modyfikowanego przez bezpośrednie wprowadzenie podstawnika fosfonianowego lub fosforanowego do układu triterpenowego. Dla BWM i najbardziej aktywnych związków wytypowanych w badaniach biologicznych Boryczko i wsp. przeprowadzili dodatkowo dokowanie tych związków do miejsc aktywnych białka HIV CA CTD-SP1. W wyniku badań biologicznych oraz badań *in silico* wprowadzano modyfikacje struktury Betuliny i kwasu betulinowego na atomie węgla C3, C28 oraz C30, co doprowadziło do otrzymania związków o większej aktywności anty-HIV. Wśród leków stosowanych w leczeniu infekcji wirusowych znajdują się związki zawierające fosforany lub ugrupowanie fosfonianowe, które w ich strukturze są ważnymi elementami warunkującymi aktywność antywirusową. Aktywność anty-HIV odnotowano również dla analogów BWM, które zawierają podstawnik fosforanowy lub fosfonianowy w ugrupowaniu izopropenylowym.

Ze względu na przedstawione przez Doktorantkę trudności syntetyczne pochodnych C₂₀-fulerenowych na obecnym etapie rozwoju metod syntezy organicznej porzeczono na wytypowaniu

potencjalnie aktywnych struktur do dalszych badań syntetycznych. Nie mniej jednak, dane z badań *in-silico* wskazują na dobre właściwości anty-HIV modelowanych struktur i stanowią również oryginalny wkład w rozwój wiedzy na temat pochodnych fulerenowych w ogólności. Okazuje się, że analogi C₂₀-fulerenowe Zydowudyny oddziałują z HIV-RT silniej, kiedy cytozyna łączy się z pięcioczłonowym pierścieniem fulerenu poprzez ugrupowanie metylenowe. Szkoda jednak, że synteza pochodnych fulerenowych-C₂₀ na obecnym etapie rozwoju metod syntetycznych stanowi trudne wyzwanie dla chemików syntetyków i tych ważnych spostrzeżeń badawczych z modelowania *in-silico* nie można na obecnym etapie potwierdzić w badaniach biologicznych.

Reasumując, przeprowadzone badania aktywności biologicznej pozwoliły w skuteczny sposób ukierunkować prace syntetyczne na otrzymywanie związków o spodziewanej aktywności anty-HIV. Okazało się przy tym, że w każdym przypadku niezbędne jest zachowanie części fosforanowej i wprowadzenie do struktury badanych związków fragmentu heteroaromatycznego pirymidynowego, aminotiazolowego chinolinowego lub izochinolinowego. Dotyczy to zarówno związków syntetycznych jak i naturalnych pochodnych Bewirymatu oraz 3-karboksybetuliny.

Przedstawiona do recenzji praca stanowi spójny cykl badań prowadzonych w kierunku otrzymania nowych, potencjalnie aktywnych związków anty-HIV. Wyniki tych prac zostały opublikowane w 6-ciu pracach zamieszczonych w czasopismach o cyrkulacji międzynarodowej i wysoko impaktowanych, o łącznym współczynniku Impact Factor 39,221, zatem podległy już wcześniej wnikliwej analizie i recenzji naukowej. Zgłoszenia patentowe z udziałem Doktorantki świadczą również o walorze praktycznym prowadzonych prac. Wyniki badań były również prezentowane na krajowych i zagranicznych Konferencjach Naukowych. Uzupełniające badania biologiczne modelowanie molekularne stanowi dopełnienie stanowiące o oryginalności i wartości naukowej przeprowadzonych prac badawczych.

Interesujące jest, czy podjęto działania w kierunku komercjalizacji zgłoszonych patentów, tym bardziej, że stosowanie leków przeciwwirusowych stoi przed problemem rosnącej lekooporności szczepów. Dlatego tak ważne jest stosowanie innowacyjnych strategii w odkrywaniu leków przeciwwirusowych, opartych na wiarygodnych badaniach biologicznych.

Wyniki prac badawczych Doktorantka przedstawia w sposób bardzo skondensowany na ponad 100 stronach maszynopisu, rysunki, ryciny i tabele pozwalają w klarowny sposób podążać za głównym nurtem prowadzonych prac mimo dużej liczby badanych związków. Cytowana literatura obejmująca 126 odnośników literaturowych jest spójna z omawianą tematyką i stanowi uzupełnienie opisywanych wyników prac badawczych.

Wychwycone przeze mnie nieliczne błędy edytorskie nie wpływają na merytoryczną wartość pracy. Oceniając zatem walory naukowe pragnę podkreślić, że Doktorantka wykazała się dużą samodzielnością i umiejętnością formułowania hipotez badawczych, doбором odpowiedniej metodyki badawczej oraz wyciąganiem wniosków na podstawie analizy uzyskanych wyników.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, w mojej opinii, spełnia warunki nowości naukowej oraz formalno-ustawowe warunki stawiane rozprawom dla uzyskania stopnia doktora nauk medycznych w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, dlatego wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie niniejszej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na walory naukowe dysertacji, duży dorobek naukowy Doktorantki, całkowity IF wszystkich opublikowanych prac = 64,216, Indeks Hirscha = 7, liczba cytowań = 130, a także ze względu na unikalność prowadzonych badań z komórkami zakażonymi żywym wirusem niedoboru oporności - HIV, a jako diagnosta laboratoryjny specjalista II stopnia w dziedzinie mikrobiologii wiem, że jest to nietatwe i unikalne w skali kraju, oraz że ze względu na aktualność tematyki, udokumentowanej w tym przypadku wieloma publikacjami i patentami z udziałem Doktorantki, wnioskuję również o wyróżnienie *suma cum laude* dla recenzowanej przez mnie pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Dąbrowskiej.

