



Prof. dr hab. Wojciech Kamysz

Gdańsk, 14.02.2019

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej

Wydział Farmaceutyczny

Gdański Uniwersytet Medyczny

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Modyfikacje chemiczne amfoterycyny B i nystatyny A₁”,

wykonanej przez Panią magister inżynier Kornelię Skarbek

Zakażenia stanowią częstą przyczynę zgonów wśród pacjentów i są głównie wywoływane przez patogeny bakteryjne. Rzadziej są to przypadki o etiologii grzybiczej. Grupą szczególnie narażoną na tego typu zakażenia są pacjenci o obniżonej odporności oraz po przebytej antybiotykoterapii. Niemniej jednak nie można bagatelizować problemu grzybicy, szczególnie jeśli weźmie się pod uwagę zjawisko nabywania przez patogeny odporności na stosowane leki. Doktorantka w swej pracy skupiła się na otrzymaniu pochodnych amfoterycyny B (AmB) i nystatyny A₁ (NYS). Oba te związki należą do grupy makrolidów polienowych. Zbudowane są one z 38-członowego pierścienia laktonowego zawierającego układ sprzężonych wiązań podwójnych oraz grupy hydroksylowe a także przyłączoną poprzez wiązanie glikozydowe mykozaminę. Obecność fragmentu hydrofobowego jak i hydrofilowego skutkuje tym, że cząsteczka wykazuje charakter amfifilowy. Celem molekularnym tych leków jest błona komórkowa grzybów. Ich aktywność związana jest z oddziaływaniem z ergosterolem oraz tworzeniem kanałów transbłonowych i zwiększeniem przepuszczalności błony komórkowej patogenów, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki. Niestety istotnym problemem pozostaje toksyczność tych związków, gdyż różnice pomiędzy ergosterolem a cholesterolem, występującym w błonie komórek ludzkich, nie są wystarczające by zapobiec temu zjawisku. Celem pracy było zbadanie możliwości przeprowadzenia modyfikacji chemicznych AmB i NYS, które obejmują wymianę reszty mykozaminy oraz wykorzystanie tzw. parasoli molekularnych. Pracom tym poza zbadaniem samej możliwości wprowadzania owych modyfikacji przyświecała myśl, że mogą one doprowadzić do otrzymania związków o lepszych właściwościach terapeutycznych – tzn. o obniżonej toksyczności oraz zachowaniu i/lub zwiększeniu aktywności przeciwgrzybowej. Praca doktorska składa się ze 151 stron, w tym streszczenia w języku polskim oraz



angielskim, spisu treści, wykazu stosowanych skrótów, 14 rysunków, 44 schematów oraz 5 tabel. Praca została podzielona na część literaturową, opis celu i zakresu pracy, wyniki i dyskusję, część eksperymentalną oraz bibliografię.

W części teoretycznej została przedstawiona struktura chemiczna AmB i NYS, ich mechanizm działania oraz oporność na leki z tej grupy. Autorka obszernie opisała chemiczne modyfikacje makrolidów polienowych. Opisane modyfikacje dotyczą grupy aminowej jednostki cukrowej, grupy karboksylowej, modyfikacje aglikonu i innych. We wstępie ogólnie przedstawiono problem grzybic i oporności na leki polienowe, przez co podkreślono aktualność i znaczenie prowadzonych badań. Opisano szczegółowo *N*-acylowe, *N*-alkilowe oraz *N*-glikozydowe pochodne, a także estry, amidy, hydrazydy oraz pochodne mocznikowe makrolidów polienowych, co uświadamia czytelnikowi mnogość potencjalnych modyfikacji, które można przeprowadzić. Uważam, że cel i zakres pracy został przedstawiony w sposób jasny, aczkolwiek brakuje w nim odniesienia się do badań mających na celu określenie aktywności przeciwrzybowej oraz toksyczności, które przecież weszły w zakres wykonanych prac, których wyniki zostały opisane i przedyskutowane w rozprawie. Opis materiałów i metod wskazuje na bogaty warsztat i duże umiejętności Doktorantki, które bez wątpienia przyczyniły się do wysokiej jakości prowadzonych badań.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania doprowadziły m.in. do opracowania metody syntezy pochodnych z modyfikowanym aglikonem polienowym (wymiana mykozaminy). Ustalono, że w zastosowanych warunkach zasadowych nie jest możliwe otrzymanie analogu AmB z odpowiednimi pochodnymi związanymi poprzez wiązanie eterowe, gdzie wykorzystanymi do reakcji substratami są: *N*-*tert*-butoksykarbonylo-*m*-fluoroanilina, 3-(*N*-*tert*-butoksykarbonylo)amino-*O*-mesylo-1-propanol i bromek 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-*D*-glukopiranozyli. Należy jednak podkreślić, że Doktorantka wykazała się umiejętnością wprowadzeniem odpowiednich grup ochronnych. Umiejętność ta została wielokrotnie wykorzystana co zaowocowało otrzymaniem ciekawych związków. Udało się opracować odpowiednie warunki dehydratacyjnej glikozylacji, co doprowadziło do otrzymania chronionego aglikonu AmB z cząsteczkami cukrów. Niestety reakcje te miały bardzo niską wydajność a produkty cechowała niska trwałość co uniemożliwiło otrzymanie pochodnych bez grup ochronnych. Ciekawą grupą związków, które udało się otrzymać są 2,6-dideoksy-6-sulfo-*D*-glukozamina oraz analogi 6-sulfo-*D*-glukitolu będącymi potencjalnymi inhibitorami syntazy GlcN-6-P (GFAT). Na uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań nad tą grupą związków zostały opublikowane w czasopiśmie Carbohydrate Research. Pytanie, które się nasuwa jest następujące – Dlaczego pomimo obiecujących wyników badań (wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej) nie podjęto prób otrzymania odpowiednich analogów AmB, gdzie pochodne cukrowe przyłączone byłyby do aglikonu? Kolejną obiecującą grupą związków, są niewątpliwie koniugaty AmB i NYS z nanośnikami, czyli tzw. „parasolami



molekularnymi". W efekcie otrzymano trzy koniugaty wykazujące wyższy indeks selektywnej toksyczności niż AmB. Dla części związków przeprowadzono badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej w stosunku do wybranych szczepów z rodzaju *Candida* oraz *Saccharomyces cerevisiae*, oraz wybranych szczepów bakteryjnych. Ponadto dla części związków oznaczono toksyczność w stosunku do erytrocytów oraz linii komórek ssaczyh. Doktorantka zastosowała wiele technik mających na celu analizę związków, m.in.: NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR), MS, TLC, wyznaczanie temperatury topnienia oraz skręcalności optycznej. Spośród osiągnięć chciałbym wyróżnić te, które moim zdaniem są najbardziej doniosłe:

- Cząsteczki AmB i NYS pomimo zbliżonej budowy nie są równie dobrymi substratami do prowadzenia syntezy z wykorzystaniem ugrupowań siliolowych – NYS jest nietrwały zaś pochodna AmB może być stosowana do dalszych reakcji modyfikacji podstawnika cukrowego.
- Docenić należy także ogrom pracy włożony w wieloetapową syntezę 3-azydo pochodnych D-glukozy oraz D-allozy.
- Łączenie makrolidów polienowych z nanonośnikami tzw. „parasolami molekularnymi” na bazie pochodnych kwasów żółciowych może doprowadzić do obniżenia toksyczności związków, a aktywność przeciwrzybowa jest związana z długością zastosowanego łącznika ω -aminokwasowego.

Istotnym zadaniem Recenzenta, poza dostrzeżeniem walorów ocenianej rozprawy jest także zwrócenie uwagi na mankamenty pracy, których nie sposób się ustrzec. Niedociągnięcia, które znajdują się w niniejszej rozprawie są następujące:

- Praca wymaga uporządkowania edytorskiego, pod względem zastosowania numeracji podrozdziałów; ponadto Doktorantka w całej pracy jako znak oddzielający cyfrę jedności od cyfry części dziesiętnych wykorzystywała kropkę, zaś w języku polskim przejęte jest, że używa się przecinka;
- Niestety układ pracy utrudnia analizę uzyskanych wyników. W części „Wyniki i dyskusja” w pierwszej kolejności opisane jest przygotowanie pochodnych AmB oraz NYS. W przypadku AmB udało się Autorce uzyskać chronioną pochodną, która posiada wolną grupę hydroksylową związaną z atomem C19. W przypadku NYS podobne prace nie przyniosły sukcesu. Następnie autorka opisuje przygotowanie 3 pochodnych, które miały służyć do przyłączenia do uzyskanego aglikonu. Kolejny podrozdział opisuje przyłączanie wspomnianych pochodnych do cząsteczki AmB. Także w tej części wykorzystane zostały kolejne pochodne cukrów m.in. zawierające ugrupowanie azydkowe (Schemat 27). Jednakże przygotowanie tych pochodnych cukrowych opisane jest dopiero 15 stron dalej;



- Zaskakujący jest dość obszerny fragment dotyczący przeglądu literatury, który znajduje się w części „Wyniki i dyskusja” (strony 70-79);
- W pracy zastosowano dużo niepoprawnych zwrotów jak i nie uniknięto żargonu, m.in.: „intermediaty”, „wodny Acetonitryl” (strona 86), czy też „ochrony” w odniesieniu do grup ochronnych;
- Jak autorka tłumaczy niepowodzenia przyłączenia cząsteczek bromku 2,3,4,6-tetra-O-Acetylo-D-glukopiranozyli? Dlaczego nie zastosowano innych katalizatorów w reakcji glikozylacji np.: triflanu srebra lub węglanu, trifluorku boru, soli rtęci?
- Pomimo tego, że podstawą niniejszej rozprawy nie były badania biologiczne, to jednak jeśli są one wykonane a ich wyniki zawarte są w pracy to ich wykonanie należałoby odpowiednio opisać. Podobnie rzecz ma się z opisem szczepów.

Biorąc pod uwagę wszystkie zauważone niedoskonałości oraz owoce ciężkiej pracy wykonanej przez Doktorantkę z całą stanowczością stwierdzam, że te pierwsze nie obniżają w sposób istotny wartości niniejszej rozprawy. Pomimo, że nie udało się otrzymać koniugatów o wyższej aktywności przeciwgrzybowej, to jednak niektóre z nich wykazywały zwiększoną selektywną toksyczność. Ponadto głównym celem było zbadanie możliwości modyfikacji chemicznych AmB i NYS. Wskazanie ścieżek syntezy, które nie cechują się wysoką wydajnością nie ujmuje w żaden sposób pracy. Ustalenie tego, że niektóre z reakcji są nieefektywne bądź w ogóle nie zachodzą jest również wartościowe i wnosi nową wiedzę do badanego zagadnienia. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo dobrze wykorzystany warsztat syntezy organicznej, którym niewątpliwie Doktorantka dysponuje. W związku z tym, że udało się określić możliwości przeprowadzenia wybranych modyfikacji chemicznych badanych makrolidów polienowych, stwierdzam że cel pracy został osiągnięty.

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Na tej podstawie składam do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej prośbę o przyjęcie wniosku o dopuszczenie Pani magister inżynier Kornelii Skarbek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej

Kamysz
prof. dr hab. Wojciech Kamysz