

Gliwice 15.05.2023

## OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Prajsnar

pt. „*Opracowanie ścieżki chemicznej oraz enzymatycznej modyfikacji grupy aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez wprowadzenie do cząsteczki 3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego*”

Przedłożona do oceny praca doktorska została wykonana przez mgr Justynę Prajsnar w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Praca powstała poprzez połączenie wiedzy z zakresu biochemii i farmakologii dlatego też promotorami pracy są dr hab. Maciej Guzik (IKiFP PAN) oraz prof. dr hab. Andrzej Bojarski (IF PAN).

Głównym celem dysertacji było opracowanie metod otrzymywania nowych penicylin o wysokiej efektywności przeciwbakteryjnej poprzez wprowadzanie modyfikacji do łańcucha bocznego kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA) w pozycji C6. W tym celu zaproponowano pochodne polihydroksyalkanianów (PHA), które stanowią zróżnicowane strukturalnie źródło chiralnych (R)-3-hydroksykwasów. Wybrane monomery PHA zostały spojone z rdzeniem  $\beta$ -laktamowym wiązaniem amidowym przez połączenie grupy karboksylowej monomeru oraz grupy aminowej kwasu 6-APA. Rezultatem tego projektu było otrzymanie sześciu nowych związków  $\beta$ -laktamowych oraz ocena ich potencjału przeciwbakteryjnego.

Zaproponowana w dysertacji tematyka badań jest nowoczesna, zaliczana do tzw. „hot topics”. Współcześnie obserwuje się spadek skuteczności antybiotyków wraz z upływem czasu. Korzystanie z nich w większej ilości przyspiesza powstawanie i rozprzestrzenianie się odpornych drobnoustrojów. Tak więc poszukiwanie nowych antybiotyków  $\beta$ -laktamowych oraz inhibitorów  $\beta$ -laktamaz lub ich modyfikacja to istotne zagadnienie badawcze a zarazem duże wyzwanie. Zastosowanie w niniejszej pracy metod nie tylko chemicznych ale również enzymatycznych jest dużą wartością dodaną.

Oceniana rozprawa doktorska to przykład interesującego, dobrze zaplanowanego projektu badawczego, a jej rezultaty wnoszą istotną wartość do stanu wiedzy na temat możliwości modyfikacji penicyliny. Rezultaty pracy są bazą dla przyszłych zastosowań, w tym otrzymywania związków przeciwbakteryjnych o jeszcze wyższej efektywności poprzez wykorzystanie do modyfikacji innych monomerów PHA.

Rozprawa została podzielona na 3 zasadnicze części: wstęp teoretyczny obejmujący 26 stron, cel naukowy (1 strona) i badania własne połączone z częścią eksperymentalną składającą się z 70 stron; pracę wieńczy globalne podsumowanie wyników pracy eksperymentalnej i wykaz literatury.

Konstrukcja części badań własnych jest oryginalna. Obejmuje 3 zagadnienia: (a) otrzymywanie wybranych modyfikatorów dla kwasu 6-aminopenicylanowego; (b) otrzymywanie zmodyfikowanych penicylin na

drodze syntezy chemicznej oraz biosyntezy enzymatycznej oraz (c) ocenę aktywności biologicznych otrzymanych penicylin. Każde z zagadnień opatrzone jest odrębnym wprowadzeniem do tematu, częścią opisującą wyniki oraz podsumowaniem, tak jakby każde zagadnienie tworzyło osobną pracę. Musze przyznać, że znacznie ułatwiło to czytanie i analizę pracy. Brakuje tu wyraźnie oddzielonej części eksperymentalnej, nie mniej jednak zakres podanych w opisach informacji pozwala na dokładne odtworzenie eksperymentów. Jako dodatki znajdujemy na końcu pracy wykaz tabel i ilustracji oraz suplement ze starannie opracowaną analizą widm oraz kartą wzorów.

Tematyka pracy jest bardzo szeroko opisywana w literaturze. Tak więc wybór cytowanych pozycji to trudne wyzwanie. Doktorantka podaje najważniejsze cytowania, obejmujące głównie ostatnie dwudziestolecie (w tym 18 prac po 2020 roku), co świadczy o dużym zainteresowaniu badaczy tą tematyką. Ilość odnośników literaturowych jest odpowiednia, obejmująca 179 pozycji. Można stwierdzić, że wszystkie wymagane informacje pochodzące z przeglądu literatury, niezbędne do analizy wyników badań, zostały umieszczone w sekcji literaturowej, stanowiąc jej integralną część.

Część literaturowa dysertacji obejmuje ogólną charakterystykę antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, historię ich odkrycia oraz rodzaje i mechanizm ich działania. Charakteryzuje również inhibitory  $\beta$ -laktamaz. Druga część wstępu literaturowego zawiera ogólną charakterystykę polihydroksyalkanianów i ich modyfikacji. Autorka skupia się na opisie struktury chemicznej PHA oraz biosyntezie PHA w komórce bakteryjnej. Następna duża część analizy stanu literatury związana jest ze szlakami biosyntezy krótkołańcuchowych i średniołańcuchowych PHA. Autorka stara się usystematyzować stan wiedzy za pomocą odpowiednich schematów reakcji co ułatwia czytelnikowi śledzenie obszernego materiału. Warto podkreślić, że zadbano o poprawne cytowanie schematów, które zostały przygotowane w oparciu o inne artykuły.

W części badań własnych Doktorantka podjęła się bardzo trudnego wyzwania i konsekwentnie go realizowała. Tą część pracy czytałam z dużym zainteresowaniem.

Do modyfikacji nowych pochodnych 6-APA wykorzystano monomery PHA, które są naturalnymi polimerami o szerokim spektrum i potencjale farmakologicznym produkowane przez bakterie środowiskowe. W ścieżce obejmującej syntezę chemiczną wykorzystano kwasy karboksylowe monomerów PHA, natomiast przy biosyntezie enzymatycznej ich estry metylowe. Poprzez biosyntezę HPA i depolimeryzację otrzymano estry metylowe (R)-3-hydroksykwasów i odpowiednie kwasy, a w ścieżce chemicznej estry metylowe (rac)-3-hydroksykwasów.

Część omówienia wyników Doktorantka rozpoczyna od opisu badań dotyczących biosyntezy alifatycznych i aromatycznych polihydroksyalkanianów. Wybrano poli-3-hydroksynonanoan (P(3HN)) należący do grupy polimerów alifatycznych oraz poli-3-hydroksy-5-fenylwalerianian (P(3H5PV)) z grupy aromatycznej. Trochę zabrakło w tym miejscu argumentacji wyboru takich przedstawicieli. Badania w zakresie biosyntezy prowadzono bazując na procedurach opracowanych i opublikowanych niedawno (M. Guzik et al., *Microb. Biotechnol.* 2022) przez promotora dr hab. Macieja Guzika.

W pracy znajduje się dokładny opis metod doboru szczepów bakteryjnych, mediów hodowlanych oraz wstępnej hodowli bakteryjnej. Następnie opisano hodowlę fermentorową do produkcji P(3HN) oraz metodę oznaczenia suchej masy bakteryjnej, zawartości P(3HN) oraz stężenia fosforanów i azotanów w hodowli reaktorowej. Natomiast do produkcji P(3H5PV) wykorzystano hodowlę okresową z dozowaniem pulsacyjnym substratu. Nie wyjaśniono dlaczego w tym wypadku zastosowano dozowanie pulsacyjne.

W końcowej fazie procesu polimery PHA ekstrahowano z suchej masy bakteryjnej przy użyciu octanu etylu. Polimery następnie poddano metanolizie katalizowanej kwasem siarkowym VI, w wyniku której otrzymano estry metylowe (R)-3-hydroksykwasów. Ta prosta metoda wykorzystuje chloroform oraz kwas siarkowy, może warto jednak by było spróbować zastosować bardziej „zielone” reagenty, tak aby ten etap nie psuł całościowej oceny zrównoważonego procesu.

Do otrzymywania mieszanin racemicznych estrów 3-hydroksykwasów w syntezie chemicznej wykorzystano reakcję Reformatskiego katalizowaną metalicznym cynkiem. W reakcji tej związki  $\alpha$ -halokarbonylowe reagują z aldehydami tworząc  $\beta$ -hydroksyestry kwasów karboksylowych. Wydajności wydzielone estrów kwasu rac-3-hydroksynonanowego, rac-3-hydroksyheptanowego oraz rac-3-hydroksy-5-fenylwalerianowego były wysokie i wynosiły odpowiednio: 59%, 55% (2b) oraz 77%. W syntezie niestety wykorzystuje się kancerogeny benzen, który bezwzględnie powinien być zastąpiony innym rozpuszczalnikiem.

Finalnie (R)-3-hydroksykwas oraz rac-3-hydroksykwas otrzymano na drodze hydrolizy zasadowej estrów. Tym razem wykorzystano THF, który jest często rozpuszczalnikiem z wyboru gdy już nie ma innego, który by homogenizował reagenty.

Proszę Doktorantkę o zaproponowanie w czasie obrony pracy doktorskiej innych warunków prowadzenia reakcji estryfikacji i hydrolizy estrów ze szczególnym naciskiem na katalizatory na potrzeby *zielonej chemii* (poza biokatalizatorami).

Wydajności sześciu finalnych kwasów: (R)-3-hydroksynonanowego, rac-3-hydroksynonanowego, (R)-3-hydroksyheptanowego, rac-3-hydroksyheptanowego, (R)-3-hydroksy-5-fenylwalerianowego i rac-3-hydroksy-5-fenylwalerianowego wynosiły odpowiednio 89%, 91%, 65%, 67%, 99% i 98%.

Następnie Doktorantka przeszła do najbardziej fascynującej fazy badań, czyli otrzymywania zmodyfikowanych penicylin na drodze syntezy chemicznej oraz biosyntezy enzymatycznej. Schemat postępowania został w sposób bardzo przejrzysty umieszczony na rysunku 19. Nowe penicyliny otrzymane zostały poprzez połączenie cząstek 6-APA oraz otrzymanych pochodnych PHA w formie mieszanin racemicznych i czystych enancjomerów. Można stwierdzić, że opracowana metoda modyfikacji penicylin jest ogólna. Odpowiednia optymalizacja warunków procesu pozwala na wykorzystanie szerokiej gamy substratów.

Obie ścieżki reakcyjne zakładają stosowanie warunków bezwodnych, tak aby uniknąć reakcji hydrolizy. Do badań nie stosowano samego kwasu 6-APA lecz jego pochodną – ester benzylowy. To standardowe działanie mające na celu zwiększenie rozpuszczalności kwasu w rozpuszczalnikach organicznych. Otrzymane estry benzytowe zostały następnie poddane reakcji hydrolizy wiązania estrowego, a otrzymane penicyliny w postaci soli mogły być w łatwy sposób rozpuszczone w wodzie, jak inne komercyjnie stosowane antybiotyki. Ścieżka wykorzystująca biosyntezę polegała na zastosowaniu lipaz: CalB z *Candida antarctica* oraz TL-IM występująca u *Thermomyces lanuginosus*. Ta ostatnia wykazała najwyższą aktywność w reakcji aminolizy względem wybranych estrów metylowych 3-hydroksykwasów. W tabeli 17 przedstawiono charakterystykę 13 otrzymanych penicylin w postaci estrów benzylowych oraz soli sodowych z wydajnościami od 23-87%.

Doktorantka wykazała się wysokimi kwalifikacjami projektowania i prowadzenia eksperymentów w laboratorium chemii bioorganicznej. Wątro podkreślić, że wiele syntez wymagało biegłości w pracy laboratoryjnej, np. w warunkach bezwodnych. W ramach badań Doktorantka potwierdziła strukturę uzyskanych produktów za pomocą metod spektroskopowych UHPLC-MS/MS, NMR, RT-IR oraz CD. Na wyróżnienie zasługuje fakt, że otrzymane wyniki analiz zostały w sposób bardzo dokładny opisane i bardzo przejrzysto zobrazowane, co świadczy o dobrym opanowaniu technik przez Doktorantkę. W pracy znajduje się szereg tabel (np. tabela 10 czy 17), które w sposób obrazowy zbierają informacje o strukturze otrzymanych związków.

Doktorantka często poszukuje odpowiednich rozpuszczalników do prowadzenia syntez (np. Tabela 13) kierując się tylko parametrami fizykochemicznymi. Zabrakło w trakcie ich analizy oceny przydatności pod kątem uciążliwości dla środowiska. Firmy farmaceutyczne (Pfizer, AstraZeneca, GlaxoSmithKline) proponują specjalne przewodniki z podziałem na rozpuszczalniki, które są preferowane, użyteczne lub niepożądane w syntezie leków (API). W tej części zabrakło też krytycznego porównania stosowanych metod chemicznych z biochemicznymi.

Ostatnim ale równie ważnym krokiem było zbadanie aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanych związków  $\beta$ -laktamowych. W tym celu wyznaczono minimalne stężenia hamujące oraz bakteriobójcze. Parametry te były wyższe niż dla penicyliny G oraz ampicyliny. Można jednak stwierdzić, że związki te mają potencjał antybiotyków oraz mogą być stosowane w wyższych stężeniach niż ampicylina czy penicylina G, ze względu na ich niską cytotoksyczność oraz genotoksyczność.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej można zaliczyć:

- opracowanie efektywnej i wysokowydajnej metody syntezy chemicznej i biochemicznej (R)-3-hydroksykwasów oraz rac-3-hydroksykwasów,
- opracowanie efektywnej i wysokowydajnej metody syntezy chemicznej i biochemicznej związków  $\beta$ -laktamowych poprzez połączenie grupy karboksylowej monomeru PHA z rdzeniem  $\beta$ -laktamowym wiązaniem amidowym,
- otrzymanie sześciu nowych związków  $\beta$ -laktamowych o dużym potencjale przeciwbakteryjnym,
- zaprojektowanie ścieżki syntezy dla przyszłych modyfikacji penicylin.

Proszę Doktorantkę o zarysowanie w czasie obrony pracy doktorskiej innych potencjalnych modyfikacji jakie można w przyszłości wykonać stosując opracowaną metodę.

Pracę czyta się z przyjemnością, Doktorantka w sposób niezwykle uporządkowany przedstawia kolejne części rozprawy nawiązując do literatury i naświetlając wszystkie niezbędne problemy tak aby cel pracy i wyniki jego badań były zrozumiałe. Po każdym rozdziale pieczołowicie podsumowuje kolejne wyniki. W końcu warto również pochwalić bardzo staranną redakcję pracy. Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy badawczej, znajomością spektroskopowych metod analitycznych oraz w sposób poprawny formułowała wnioski na podstawie obszernego i wartościowego materiału doświadczalnego.

Pani mgr Justyna Prajsnar jest współautorem 8 publikacji z listy JCR powstałych w latach 2016-2022 oraz jednego zgłoszenia patentowego. Z otrzymanych informacji wynika, że 2 prace obejmujące wyniki pracy doktorskiej są w przygotowaniu. Odebrała liczne krótkie staże i szkolenia w ośrodkach krajowych i zagranicznych. Doktorantka prezentowała wyniki badań na 15 konferencjach konferencjach o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym. Rozwijała swoje zainteresowania uczestnicząc również w badaniach niezwiązanych z pracą doktorską. Doktorantka uczestniczyła w realizacji grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (SONATA) w latach 2016-2017.

Na podstawie oceny pracy doktorskiej Pani mgr Justyny Prajsnar, pt. „*Opracowanie ścieżki chemicznej oraz enzymatycznej modyfikacji grupy aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego poprzez wprowadzenie do cząsteczki 3-hydroksykwasów pochodzenia bakteryjnego*” stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z dnia 20 lipca 2018 r. (t.j. Dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.). Wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Justynę Prajsnar do dalszych etapów przewodu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk chemicznych.