



Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Analitycznej i Biomateriałów
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa



prof. dr hab. inż. Marcin Sobczak

Tel: (+48 22) 57 20 784; E-mail: marcin.sobczak@wum.edu.pl

Warszawa, dn. 13.12.2021 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Kamili Agnieszki Butowskiej pt. "Wybrane koniugaty doksorubicyny jako potencjalne układy w terapii przeciwnowotworowej"

Pomimo dużego postępu w ciągu ostatnich lat jaki dokonał się w zakresie nauk medycznych, farmaceutycznych i przyrodniczych, choroby nowotworowe nadal stanowią jedno z najpoważniejszych wyzwań stojących przed współczesną nauką. Podstawowym problemem związanym z farmakoterapią przeciwnowotworową jest wysoka i niespecyficzna toksyczność cytostatyków, wiążąca się z występowaniem poważnych działań niepożądanych. Jedną z koncepcji poprawy efektywności i profilu bezpieczeństwa farmakologicznej terapii przeciwnowotworowej jest ograniczenie biodystrybucji cytostatyków jedynie do tkanki docelowej. Zastosowanie w terapii onkologicznej nowych, „inteligentnych” nośników leków przeciwnowotworowych jest jednym z perspektywicznych rozwiązań dających nadzieję na zwiększenie skuteczności leczenia. Przedstawiona do oceny praca doktorska pt. "Wybrane koniugaty doksorubicyny jako potencjalne układy w terapii przeciwnowotworowej" wykonana przez Panią mgr Kamilę Butowską (pod opieką dr hab. Jacka Piosika, prof. UG oraz prof. dr hab. Janusza Raka) bardzo dobrze wpisuje się w aktualne trendy badań nad innowacyjną postacią leków przeciwnowotworowych.

Niniejsza praca doktorska stanowi cykl trzech publikacji, dwóch oryginalnych prac i jednej przeglądowej. Ponadto wyniki badań stanowią przedmiot kolejnych dwóch publikacji oryginalnych przedłożonych do recenzji.

Jako główny cel pracy Doktorantka postawiła sobie zaprojektowanie i otrzymanie nowych nośników doksorubicyny (DOX), będących potencjalnymi układami do zastosowania w terapii przeciwnowotworowej. W części literaturowej pracy, Autorka przedstawiła w sposób bardzo syntetyczny najważniejsze informacje dotyczące systemów dostarczania substancji leczniczych otrzymywanych z polimerów naturalnych i syntetycznych oraz materiałów nieorganicznych. W kolejnym rozdziale Doktorantka omówiła farmakologię DOX oraz nowe

strategie terapeutyczne w zakresie leczenia nowotworów. Pani mgr Kamila Butowska zacytowała najważniejsze piśmiennictwo związane z tematem. Rozwinięciem części teoretycznej dysertacji jest bardzo ciekawy artykuł przeglądowy (Publikacja P5) wchodzący w skład cyklu, przedmiotem którego są polimerowe nośniki DOX. Oceniając tę część dysertacji uważam, że Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną, umiejętnością prawidłowego doboru źródeł literaturowych i selekcji informacji. Magister Kamila Butowska bardzo umiejętnie uzasadniła konieczność podjęcia badań stanowiących przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej.

W ramach pracy eksperymentalnej, Doktorantka przeprowadziła:

- syntezę koniugatu typu fuleren C_{60} -DOX (Ful-DOX);
- syntezę koniugatu wrażliwego na działanie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej;
- syntezę nanocząstek lipidowych z kowalencyjnie połączoną DOX i enkapsulowanym małym interferującym kwasem rybonukleinowym;
- analizę strukturalną i fizykochemiczną otrzymanych nośników oraz identyfikację kluczowych parametrów do wydajnego dostarczania DOX;
- badania *in vitro* toksyczności nośników wobec wybranych ludzkich linii komórkowych;
- badania *in vivo* efektów terapeutycznych najlepiej rokującego nośnika.

W pierwszym etapie części eksperymentalnej, Doktorantka postanowiła otrzymać koniugat Ful-DOX stosując jako łącznik malonian bis(14,14-dimetylo-12-oxo-3,6,9,13-tetraoxopentadekanowy) (Publikacja P1). Do otrzymania wspomnianego koniugatu wykorzystwała reakcję Bingela-Hirsha. Struktura otrzymanego produktu została potwierdzona przy użyciu spektrometrii mas MALDI-TOF, spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i spektrofotometrii UV-Vis. Ponadto wykonane zostały obliczenia teoretyczne metodą teorii funkcjonału gęstości (DFT). Eksperymentalne dane spektroskopowe wykazały dobrą korelację z wynikami obliczeń DFT. Doktorantka, wykorzystując technikę dynamicznego rozpraszania światła (DLS), stwierdziła tendencję do niekorzystnego (z punktu widzenia aplikacyjnego) tworzenia agregatów o promieniu hydrodynamicznym około 800 nm. Zgodnie z wcześniejszymi podejrzeniami, badania *in vitro* przeprowadzone na liniach komórkowych raka piersi (MCF-7, T47D i MDA MB 231) oraz raka prostaty (PC3) przy zastosowaniu dwóch testów cytotoksyczności – SRB i WST-1, potwierdziły brak aktywności przeciwnowotworowej otrzymanego koniugatu.

W kolejnym etapie badań, Doktorantka otrzymała koniugat DOX z tetrapeptydem (4-pep) leucyna₅-alanina₆-glicyna₇-glicyna₈ posiadający dodatkowo grupę protekcyjną Fmoc (grupę fluorenylometoksykarbonylową) w celu tymczasowej ochrony grupy α -aminowej *N*-końcowego aminokwasu (Fmoc-4-pep) (Publikacja P2 i P3). Wcześniej, Autorka postanowiła sprawdzić czy oktapeptyd glicyna₁-prolina₂-leucyna₃-glicyna₄-leucyna₅-alanina₆-glicyna₇-glicyna₈ (8-pep) jest odpowiednim substratem do opracowania nośnika DOX wrażliwego

na metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs). Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdziła, że hydroliza wiązania peptydowego zachodzi w pozycji –glicyna₄–leucyna₅–. Ponadto po przeprowadzeniu analizy ilościowej Doktorantka potwierdziła, że zaproponowany 8–pep jest odpowiednim substratem do opracowania nośnika DOX wrażliwego na MMP. Proces koniugacji 4–pep i DOX przeprowadziła wykorzystując reakcję kondensacji chloromrówczanu isobutyłu (ClCOO*i*Bu) z *N*-chronionym 4–pep w obecności trietyloaminy (TEA) w dimetyloformamidzie (DMF), a następnie reakcji z chlorowodorkiem DOX z TEA w DMF. Następnie, Fmoc–4–pep–DOX został poddany procesowi deprotekcji. W kolejnym etapie, Doktorantka przeprowadziła badania oddziaływań finalnego produktu koniugacji (4–pep–DOX) oraz DOX z fragmentem DNA o długości 20 par zasad. W tym celu wykorzystowała spektrofotometrię UV-Vis, spektrofluorymetrię oraz izotermiczną kalorymetrię miareczkową. Wykonane eksperymenty pozwoliły Doktorantce stwierdzić, że produkt pośredni hydrolizy jest w stanie oddziaływać z DNA. Ponadto, na podstawie otrzymanych wyników, mgr Kamila Butowska zaproponowała hipotezę jakoby uwolnienie DOX z produktu przejściowego nie jest konieczne do efektywnego działania cytotoksycznego związku i już sam 4–pep–DOX może znacząco zaburzać procesy komórkowe. Kierując się tym, Doktorantka w kolejnym etapie badań postanowiła otrzymać nośnik wrażliwy na działanie MMP, wykorzystując PEG–8–pep–DOX. W celu otrzymania koniugatu PEG–8–pep–DOX przeprowadziła trzyetapową syntezę składającą się z: a) koniugacji Fmoc–8–pep z DOX, b) usunięcia osłony Fmoc, c) reakcji 8–pep–DOX z estrem aktywnym. Strukturę PEG–8–pep–DOX Autorka potwierdziła metodą spektrometrii mas MALDI-TOF. Dodatkowo, badania potencjału zeta wykazały, że koniugat PEG–8–pep–DOX wykazywał ujemny ładunek, co może osłabiać wychwyt komórkowy ze względu na również ujemnie naładowaną błonę komórkową. Analiza morfologii koniugatu metodą mikroskopii sił atomowych wykazała, że powstają agregaty o kształcie fibryli o rozmiarach 6-24 nm. Doktorantka słusznie stwierdziła, że zaobserwowana zdolność do agregacji może skutkować obniżoną aktywnością biologiczną PEG–8–pep–DOX. Dodatkowo, mgr Kamila Butowska postanowiła zbadać mechanizm agregacji w celu sprawdzenia czy wiązanie peptydowe ulegające hydrolizie w wyniku działania MMP, jest dostępne dla enzymu pomimo tworzenia fibryli. Doktorantka wykorzystowała symulację dynamiki molekularnej (MD) dla monomeru, dimeru, tetrameru oraz oktameru PEG–8–pep–DOX. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziła, że struktura agregatów i eksponowanie fragmentu peptydowego może świadczyć o tym, że pomimo agregacji fragment peptydowy wrażliwy na działanie MMP jest dostępny dla efektywnego działania enzymu. W celu weryfikacji postawionych tez, przeprowadziła testy działania cytotoksycznego koniugatu wykorzystując trzy linie komórek nowotworowych: włókniako-mięsaka HT-1080, raka piersi MDA-MB-436 (linię wykazującą wysoką ekspresję MMP) oraz raka piersi MCF-7 (linię

wykazującą niską ekspresję MMP). Okazało się, że PEG-8-pep-DOX wykazywał właściwości cytotoksyczne względem linii HT-1080 i MDA-MB-436. Efekt ten nie był obserwowany w przypadku linii MCF-7, co może być bezpośrednio związane z brakiem wzmożonej ekspresji MMP.

W kolejnym etapie pracy eksperymentalnej, Doktorantka otrzymała nanocząstki lipidowe (LNP) zawierające RNA oraz DOX. Magister Kamila Butowska zdecydowała się na użycie siRNA (mały interferujący kwas rybonukleinowy) powodującego represję genu *Bcl-2* i deregulację ekspresji antyapoptycznego białka *Bcl-2*. W pierwszym etapie, zoptymalizowała proces otrzymywania LNP zawierających siRNA. Średni promień hydrodynamiczny otrzymanych LNP mieścił się w zakresie od 65 do 95 nm, a nanocząstki charakteryzowały się niewielkim ładunkiem ujemnym. Następnie, Autorka dokonała weryfikacji aktywności biologicznej otrzymanych układów stosując linię komórkową chłoniaka Burkitt'a (Raji), wykazującą wysoką aktywność genu reporterowego lucyferazy. Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych badań Doktorantka wytypowała LNP2 jako układ o najkorzystniejszych parametrach fizykochemicznych, nie wywołujący efektów cytotoksycznych oraz prowadzący do wydajnego wyciszenia genu lucyferazy. W celu przyłączenia DOX do powierzchni LNP2 użyła klinicznie przebadanej Aldorubicyny, posiadającej w strukturze grupę maleinową oraz wiązanie hydrazonowe, które może sprzyjać selektywnemu uwalnianiu DOX w obniżonym pH. W kolejnym etapie, mgr Kamila Butowska przeprowadziła badania uwalniania cytostatyku z otrzymanych LNP. Test został wykonany w warunkach fizjologicznych oraz przy pH 5.1, które odpowiada pH obserwowanemu w endosomach lub późnych lizosomach. Z kolei ocenę wychwytu komórkowego i uwalniania DOX *in vitro* przeprowadziła z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Ponadto Doktorantka przeprowadziła badania (stosując metodę Western Blot) mające na celu potwierdzenie wygaszenia genu *Bcl-2*, a tym samym obniżenie ekspresji białka *Bcl-2*. Autorka zaobserwowała znaczące obniżenie poziomu ekspresji białka *Bcl-2* wynoszące 55% w porównaniu do siLuc LNP2. Okazało się jednak, że wyciszenie genu *Bcl-2* było niewystarczające do osiągnięcia efektów cytotoksycznych, co wykazały wyniki testu CellTiter-Glo. Dopiero siBcl2 LNP2 z przyłączoną DOX (siBcl2 LNP2-DOX) przejawiały właściwości cytotoksyczne. W końcowym etapie badań, Doktorantka przeprowadziła badania analizy potencjału terapeutycznego siBcl2 LNP2-DOX na mysim modelu nowotworowym (dojrzałe samce myszy szczepu NSG charakteryzujące się dysfunkcją układu immunologicznego). Badania zakończono 11 dni po rozpoczęciu terapii. Wielkość guza przez cały okres trwania eksperymentu monitorowano poprzez pomiar bioluminescencji, a następnie otrzymane dane normalizowano względem dnia 0. Otrzymane wyniki wskazały na znaczący wzrost guza w grupie kontrolnej; zarejestrowany ostatniego dnia badań sygnał luminescencji pochodzący z guza był 10-krotnie intensywniejszy w porównaniu do dnia 0. Grupa poddana terapii przy użyciu siLuc LNP2 wykazywała podobny trend w przyroście guza,

co sugeruje brak aktywności przeciwnowotworowej. Warto podkreślić, że po 11 dniach terapii z użyciem siBcl2 LNP2-DOX rozmiar guza nie wykazywał przyrostu.

W ostatniej części dysertacji, Doktorantka na podstawie krytycznej dyskusji sformułowała spójne, wyważone i logiczne wnioski.

Reasumując, dysertacja została zredagowana w sposób bardzo staranny. Pracę czyta się dobrze. Układ treści jest logiczny i spójny. Zakres pracy doktorskiej jest bardzo obszerny. Warty podkreślenia jest fakt, że praca stanowi cykl 2 publikacji oryginalnych oraz 1 pracy przeglądowej o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 11,433$. Ponadto część wyników stanowi przedmiot kolejnych dwóch artykułów przedłożonych do recenzji. Niewątpliwie, jest to bardzo duże osiągnięcie Doktorantki. Magister Kamila Butowska jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach. We wszystkich pracach widoczny jest udział Doktorantki w koncepcji, koordynacji badań oraz przygotowaniu manuskryptu. Świadczy to o wiodącej roli Doktorantki w publikacjach wchodzących w skład cyklu. Magister Kamila Butowska przeprowadziła bardzo dużą liczbę syntez, badań strukturalnych, fizykochemicznych, analitycznych i biologicznych, co wskazuje na dużą pracowitość i konsekwencję Autorki. Niektóre z wykonanych badań wymagały dużego doświadczenia, co jest dowodem wysokich kwalifikacji Doktorantki. Dane eksperymentalne zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny i prawidłowo zinterpretowane. Wszystkie wyniki zostały logicznie skomentowane w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. Doktorantka dokonała prawidłowej interpretacji dużej liczby danych eksperymentalnych, co świadczy o jej biegłej znajomości zastosowanych metod i technik badawczych. Jestem również pod ogromnym wrażeniem tak dużego ogólnego dorobku naukowego mgr Kamili Butowskiej, rzadko spotykanego na tym etapie kariery akademickiej.

Prosiłbym Doktorantkę o komentarz/informację dotyczący/cą następujących kwestii:

- 1) Lekki niedosyt w ocenie recenzenta pozostawia dyskusja dotycząca profilu uwalniania DOX z LNP2-DOX. Niewykluczone, że dopasowanie danych eksperymentalnych do modeli kinetycznych, pozwoliłoby Doktorantce na sformułowanie wniosków dotyczących mechanizmu i kontroli uwalniania cytostatyku z otrzymanych LNP. W ocenie recenzenta (na postawie przedstawionego wykresu) uwolnienie substancji leczniczej nie jest zbyt wysoce kontrolowane, co może mieć wpływ na biobezpieczeństwo i skuteczność terapii.
- 2) Czy zdaniem Doktorantki, próby wykorzystania fulerenów i ich pochodnych jako nośników substancji przeciwnowotworowych są zasadne?
- 3) Czy przeprowadzono badania stabilności koniugatu PEG-8-pep-DOX i nanocząstek RNA-LNP-DOX?
- 4) Czy zaobserwowano działania uboczne otrzymanych nośników w badaniach na myszach?

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Kamili Butowskiej jest wartościowym, oryginalnym i interdyscyplinarnym opracowaniem naukowym. Uważam, że uzyskane wyniki badań wzbogacają wiedzę w obszarze nauk biologicznych, chemicznych i farmaceutycznych. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i wykonywania eksperymentów, interpretowania i krytycznej dyskusji wyników badań oraz formułowania logicznych wniosków.

Reasumując z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Kamili Butowskiej pt. *"Wybrane koniugaty doksorubicyny jako potencjalne układy w terapii przeciwnowotworowej"* z nadmiarem spełnia wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Kamili Butowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy oraz opublikowanie wyników badań w uznanych czasopismach naukowych, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Kamili Butowskiej.

KIEROWNIK
Katedry Chemii Analitycznej i
Biomateriałów


prof. dr hab. n. farm. Inż. Marcin Sobczak