



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław | Poland

tel. +48 71 375 28 89

www.biotech.uni.wroc.pl

Wrocław 28.07.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Oliwii Gorzeń pt.

„Projektowanie, synteza i analiza nowej generacji proleków przeciwnowotworowych
aktywowanych przez proteazy”

Nowotwory są drugą główną przyczyną zgonów na świecie. W 2024 roku z powodu nowotworów zmarło w Polsce ponad 100 000, a na świecie około 9,7 miliona osób. Jednym z najważniejszych wyzwań w terapii nowotworów jest ich duża heterogenność. Komórki nowotworowe w obrębie jednego guza mogą różnić się pod względem genetycznym i molekularnym, co utrudnia opracowanie skutecznych metod leczenia. W terapii nowotworów stosuje się różnorakie metody, klasyczne typu chirurgia, radioterapia lub chemioterapia oraz nowoczesne, redukujące skutki uboczne typu immunoterapia, terapia celowana lub terapia hormonalna. Opracowanie nowych, skutecznych terapii celowanych minimalizujących skutki uboczne leczenia, jest olbrzymim wyzwaniem dla przemysłu farmaceutycznego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Oliwii Gorzeń stanowi próbę znalezienia nowych, skuteczniejszych metod selektywnego niszczenia komórek nowotworowych. Praca badawcza została przeprowadzona w bardzo dobrym zespole badawczym Katedry Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod bezpośrednią opieką dr hab. inż. Marcina Poręby prof. PWr. Zespół posiada bardzo bogate doświadczenie w projektowaniu oraz syntezie związków dla celowanej terapii, co w połączeniu z zasobami będącymi w dyspozycji Katedry w efektywny sposób przyczyniły się do powstania tej, pod wieloma względami atrakcyjnej dysertacji.

Rozprawa doktorska Pani mgr Oliwii Gorzeń jest obszerna, liczy 217 stron. Praca rozpoczyna się od streszczeń, po których znajduje się rozdział „WSTĘP TEORETYCZNY” zajmujący 37 stron, następnie „CEL PRACY” oraz rozdział „BADANIA WŁASNE” w który doktorantka zamieściła wynik oraz komentarze do wyników. Ten rozdział liczy aż 120 stron. Dalej w rozprawie zamieszczony został rozdział „CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA”, gdzie doktorantka opisała metody eksperymentalne użyte w rozprawie. Następnie w pracy znajduje się dwustronicowy opis dodatkowych badań, które prowadziła doktorantka w trakcie realizacji rozprawy oraz siedmiostronicowe podsumowanie prowadzonych badań, informacje o publikacjach doktorantki oraz spisy rysunków, tabel oraz literatury. Bibliografia jest obszerna, liczy 194 pozycje, w większości cytowane są nowe, nie starsze niż 10 lat prace. Zastosowany przez Panią mgr Gorzeń podział pracy jest rzadko spotkany w rozprawach doktorskich, przypomina raczej

formę stosowaną w publikacjach. Niemniej, układ rozprawy jest logiczny i pozwala na prześledzenie toku eksperymentów oraz podjętych przez doktorantkę kroków podczas prowadzenia badań.

We wstępie do pracy, doktorantka w sposób należyty zawarła wszystkie niezbędne do zrozumienia tematyki rozprawy informacje. Celem badań było opracowanie skuteczniejszych związków selektywnie niszczących komórki nowotworowe, z tego powodu Pani mgr Gorzeń rozpoczyna wstęp od ogólnej charakterystyki procesu nowotworzenia oraz epidemiologii nowotworów. W dalszej części opisuje kluczowe cechy nowotworów oraz przechodzi do szczegółowego opisu nowotworów piersi, ich charakterystyki i podtypów. Informacje są przedstawione w sposób wystarczająco szczegółowy i dostarczają niezbędną wiedzę czytelnikowi. Druga część wstępu poświęcona jest terapiom przeciwnowotworowym, główna część opisu skupia się na terapiach celowanych. Szczególny nacisk doktorantka kładzie na przedstawienie przeciwciał koniugowanych z cytostatykami (*antibody-drugconjugates*, ADC). Ta część pracy jest bardzo dobrze napisana, w tekście znajduje się dużo informacji, poczynwszy od historii rozwoju ADC, poprzez mechanizm ich działania, wady i zalety, do przykładów zastosowania oraz badań klinicznych terapii nowotworów piersi. Rozdział kończy się opisem prób obejścia mechanizmów oporności nowotworów z użyciem nowych technologii ADC lub terapii skojarzonych. Doktorantka relatywnie dużo miejsca poświęciła technologii ADC w stosunku do danych na temat proleków, którymi głównie zajmuje się w swojej pracy. Przesunięcie proporcji zamieszczonych ilości informacji poprawiłoby odbiór całej pracy.

Opis metod eksperymentalnych używanych podczas realizacji pracy znajduje się w rozdziale pt. „CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA”. Procedury są opisane należycie, autorka rozprawy z dobrą szczegółowością opisała metody używane w pracy. Ilość procedur jest duża, Pani mgr Oliwii Gorzeń stosuje spory wachlarz technik: syntezy peptydów oraz ich pochodnych z toksynami, związkami fluorogennymi lub glikolem polietylenowym (PEG); analizy kinetyki enzymatycznej, hydrolizy pochodnych peptydów; badanie aktywności cytotoksycznej z użyciem hodowli komórkowych, syntezy koniugatów przeciwciał z pochodną aurystatyny oraz metody chromatograficzne. Znajomość oraz umiejętność użycia licznych metod badawczych bardzo dobrze świadczy o przygotowaniu warsztatu badawczego doktorantki.

Do najważniejszych wyników otrzymanych Przez Panią mgr Oliwię Gorzeń zaliczam:

Syntezę proleków, które zawierały peptydowe łączniki selektywne dla katepsyn B i L. Związki te potencjalnie miały być hydrolizowane przez enzymy obecne w środowisku guza (np. HER2-dodatnie komórki nowotworowe). Dzięki technologii HyCoSuL doktorantka mogła zoptymalizować sekwencje peptydów tak, aby były one rozpoznawane wyłącznie przez katepsyny B i L co zostało potwierdzone z użyciem testów enzymatycznych.

Weryfikację aktywności proleków z użyciem linii komórkowych MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 oraz HEK-293-T. Niespodziewanie, proleki wykazywały aktywność cytotoksyczną niezależną od aktywności katepsyn, co wykazano stosując niespecyficzny inhibitor katepsyn, doktorantka wnioskuje, że musi istnieć niezależny mechanizm internalizacji proleków, który skutkuje ich toksycznością. Brak różnic w aktywności proleków, pomimo wykazanej specyficzności wobec katepsyn, skłonił autorkę pracy do zastosowania opracowanych łączników w koniugatach przeciwciał z monometyloaurystatyną E.

Opracowanie specyficznych i optymalnych sekwencji peptydowych rozpoznawanych przez katepsynę S. Doktorantka przeszukując biblioteki substratów fluorogennych zmapowała wpływ podstawień naturalnych i nienaturalnych aminokwasów w pozycjach P4–P2 na selektywność rozpoznawania przez enzym. Przeprowadzone przez Panią mgr Gorzeń analizy kinetyczne z użyciem katepsyny S pozwoliły na wybór selektywnych sekwencji peptydowych do dalszych badań.

Otrzymanie proleków zawierających wysoce selektywne sekwencje peptydowe dla katepsyny S. Doktorantka wykonała syntezę peptydów zawierających specyficzne sekwencje, a następnie skoniugowała je z MMAE. Specyficzność uwalniania toksyny z otrzymanych proleków została potwierdzona z użyciem testów enzymatycznych z katepsyną S.

Weryfikację aktywności proleków z użyciem linii komórkowych MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 oraz HEK-293-T. Podobnie jak dla proleków zawierających sekwencje selektywne dla katepsyn B i L, badane związki wykazywały aktywność cytotoksyczną niezależną od aktywności katepsyn. Sugeruje to niezależny mechanizm translokacji proleków, który skutkuje ich toksycznością. Z tego powodu, również te sekwencje autorka postanawia zastosować w koniugatach przeciwciał z MMAE.

Otrzymanie koniugatów przeciwciał zawierających nowe specyficzne sekwencje rozpoznawane przez katepsyny B, L i S oraz związek cytotoksyczny - MMAE. Doktorantka przeprowadziła syntezę odpowiednich łączy peptydowych, zawierających opracowane w trakcie realizacji pracy sekwencje, połączyła je z MMAE, a następnie koniugowała do przeciwciała anty-HER2. Analiza aktywności biologicznej otrzymanych ADC z użyciem linii komórkowej BT-474 wykazały wyższą skuteczność dla łączy projektowanych dla katepsyny B w stosunku do linkerów hydrolizowanych przez katepsynę L. Otrzymane wyniki pokazują, że optymalizacja hydrolizowanych łączy w ADC może poprawić ich potencjał terapeutyczny. Niestety obserwacje aktywności biologicznej ADC z łącznikiem specyficznym dla katepsyny S nie dostarczyły jednoznacznych wniosków.

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań oraz uwag:

Czy sprawdzano toksyczność proleków przy innych czasach pomiędzy ekspozycją komórek na prolek, a wykonaniem testu MTT?

Czy sprawdzono stabilność peptydowych proleków w pH, w którym robiono analizy enzymatyczne z użyciem katepsyn?

Czy weryfikowano ekspresję katepsyn w używanych liniach komórkowych (w medium znad komórek), jeśli nie, w jaki sposób można to zweryfikować? Czy sprawdzano stabilność proleków i ADC w medium znad komórek?

Czy weryfikowano DAR przez MS lub spektrofotometrycznie?

Jakie były końcowe stężenia DMSO podczas badania kinetyki hydrolizy proleków, czy wpływało to na szybkość reakcji?

Czy można porównać IC_{50} dla otrzymanych w pracy ADC z danymi literaturowymi dla ADC z linkerem Val-Cit i toksyną MMAE. W jaki sposób było liczone IC_{50} ?

Dlaczego na rysunkach 72 i 73 na osi Y jest względna aktywność, a nie szybkość reakcji?

Czy są dowody, że prolek (peptyd koniugowany z MMAE) może wiązać się z tubuliną?

Na rysunku 31 proleki 298 i 299 wydają się lepsze w obecności inhibitora, proszę o komentarz.

Co oznacza: „Intensywność fluorescencji (RFU) uwolnionego ACC mierzone, wykonując pełną hydrolizę piątej partii substratów fluorogenicznych o znanym stężeniu”, rozdział 5.1.4.2.

Wydaje mi się, że w rozdziale 5.1.1.4 Sprzęganie z monometyloaurystatyną E zabrakło opisu, kiedy i w jakiej ilości dodawana jest MMAE.

Jako kontroli zamiast wolnego MMAE, dla lepszego obrazu powinien być użyty MMAE z fragmentem pozostałym po hydrolizie katepsyną.

Na chromatografach widoczne są szczyty o nie piki; na rysunku 29 zabrakło legendy; co oznaczają zielone kwadraty na rysunku 76?; na stronie 96 glutamina jest określona jako aminokwas zasadowy; obcojęzyczne wyrazy powinny być pisane kursywą; majtanzynoid DM4 pojawia się jako inhibitor mikrotubul i czynnik uszkodzający DNA (Rys. 4); na rysunkach 101 i 102 zamieszczono obraz rozdziału elektroforetycznego, a nie elektroforezę; rozdział 5.1.4 kończy się tytułem kolejnego rozdziału.

W rozdziale „BADANIA WŁASNE” zostawiłbym reprezentatywne analizy MS oraz wybrane struktury proleków, pozostałe przeniósłbym do suplementu co poprawiłoby czytelność rozdziału.

Podsumowując, badania przeprowadzone przez Panią mgr Oliwię Gorzeń dostarczają wielu wartościowych wyników o dużym potencjale aplikacyjnym. Pomimo niepowodzenia ambitnego planu wykazania, że proleki posiadające sekwencje hydrolizowane przez katepsyny B, L i S są specyficzne w niszczeniu wybranych linii komórkowych, wywodzących się z raka piersi, opracowane sekwencje mogą znaleźć praktyczne zastosowanie. Zostało to częściowo udowodnione przez autorkę rozprawy w skonstruowanych przez nią koniugatach przeciwciał anty-HER2 z MMAE, gdzie użyła opracowane przez siebie peptydowe łączniki.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej „Projektowanie, synteza i analiza nowej generacji proleków przeciwnowotworowych aktywowanych przez proteazy” jest wysoka, a rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). Wnoszę o dopuszczenie magister Mgr Oliwii Gorzeń przez Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, mając na uwadze olbrzymią ilość wykonanej pracy oraz poziom przedstawionej rozprawy wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Daniel Krowarsch

