



Wrocław, 12.09.2025

Prof. dr hab. inż. Julita Kulbacka
Kierownik Katedry i Zakładu Biologii
Molekularnej i Komórkowej
Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Oliwii Gorzeń

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

Przedstawiona mi do oceny rozprawa Pani mgr Oliwii Gorzeń została przygotowana pod kierunkiem dr hab. inż. Marcina Poręby, profesora PWiR w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, w zakresie dyscypliny nauk chemicznych.

Struktura pracy, tematyka badawcza i cele rozprawy

Nowotwory nieustannie są w polu zainteresowań badaczy, nie tylko nauk klinicznych, ale także nauk podstawowych. Problematyka nieefektywnych terapii, związanej z tym oporności lekowej powoduje, że poszukiwanie bezpiecznego i selektywnego leku jest ciągle aktualne. Już od pierwszych stron dysertacja wykazuje wyraźną orientację w kierunku chemii medycznej oraz bioorganicznej z istotnym komponentem analitycznym i elementami onkologii eksperymentalnej. Doktorantka podejmuje ważną i aktualną tematykę leczenia nowotworów,

słusznie wskazując jej złożoność na którą składa się wiele czynników genetycznych, środowiskowych i morfologicznych. Struktura rozprawy jest raczej zgodna z międzynarodowym standardem, odbiega nieco od typowych dysertacji – po rozbudowanym streszczeniu i wprowadzeniu teoretycznym autorka formułuje cel pracy, prezentuje część badawczą (proleki i ADC, w tym szczegółowe profilowanie specyficzności katepsyny S z wykorzystaniem biblioteki HyCoSuL), następuje szczegółowy opis eksperymentalny, podsumowanie, dorobek naukowy oraz aparaty pomocnicze (spisy, bibliografia). Brakuje w tym miejscu rozdziału dyskusji, a którym Doktorantka odniosłaby otrzymane wyniki do osiągnięć innych badaczy, jest to dość kluczowy moment rozprawy. W krótkim podsumowaniu Autorka syntetyzuje wnioski oraz wskazuje dalsze kierunki rozwoju projektu.

W bogatym wstępie teoretycznym Doktorantka definiuje czym są nowotwory, opisuje ich epidemiologię i biologię, finalnie skupia się na raku piersi i dostępnych metodach leczenia. Jak sama Autorka wskazuje, obecnie mamy wiele dostępnych terapii m.in. chirurgię, chemioterapię i radioterapię, które wciąż stanowią leczenie pierwszego wyboru. Dostępne są też terapie celowane, które Autorka wskazuje we wstępie projektowane w celu blokowania receptorów, kinaz tyrozynowych czy mechanizmów naprawy DNA. W tym zakresie zainteresowań plasuje się zakres badawczy rozprawy. Autorka podejmuje się zaprojektowania nowych selektywnych proleków, które mogą być lekami nowej generacji. Autorka zakłada, że leki będą aktywowane przez wybrane proteazy, takie jak katepsyny B, L i S, względem komórek raka piersi. Dobrze opracowany wstęp w zakresie technologii wytwarzania leków cytostatycznych skoniugowanych z przeciwciałem potwierdza ugruntowaną wiedzę i przygotowanie do podjęcia samodzielnych prób syntezy takich leków. Doktorantka zauważa istotne aspekty tego procesu związane z farmakokinetyką, biodostępnością leków ADC, oraz na ciekawy efekt „bystander”, gdzie sąsiednie komórki również są narażone na działanie leku, mimo iż nie były na niego ekspozycjonowane bezpośrednio. Taki efekt może być korzystny w przypadku stosowania leków ADC. Doktorantka w swojej rozprawie wskazała wiele korzyści z wykorzystania leków celowanych, wskazuje też pewne utrudnienia wynikające ze zmiennej ekspresji proteaz w nowotworach, interakcji z innymi mechanizmami proteolitycznymi, degradacji w mikrośrodowisku nowotworu a także może powodować działania niepożądane.

Wyniki badań, metodologia i część doświadczalna

Autorka jednoznacznie określiła zadania badawcze, a mianowicie: zaprojektowanie i syntezę selektywnych peptydowych łączników dla katepsyn B, L i S (z wykorzystaniem nienaturalnych aminokwasów), skonstruowanie proleków i koniugatów ADC z MMAE oraz wykazanie przewagi selektywności nad łącznikami typu Val-Cit. Doktorantka zaplanowała kilka najważniejszych etapów m.in. syntezę peptydowych proleków i optymalizacją, ocenę aktywacji enzymatycznej, walidację skuteczności leków i aktywności przeciwnowotworowej *in vitro*, analizę wydajności działania proleków w zależności od aktywacji przez proteazy, oraz analizę otrzymanych koniugatów. Już na początku określania celów Autorka wskazuje z jakimi problemami się mierzyła w czasie ich realizacji, m.in. dokonała zmiany z doksorubicyny na monometyloaurystatynę E (MMAE), ze względu na brak stabilności pierwszej substancji.

Dość niestandardowo w tym miejscu rozprawy Autorka formułuje wnioski gdzie stwierdza, że MMAE była dobrym wyborem i daje stabilny, efektywny ładunek cytotoksyczny dla proleków. Autorka wskazuje, że otrzymane proleki wykazały oczekiwany efekt przeciwnowotworowy, oraz że mogą one działać niezależnie od proteolizy ze słabszą aktywnością. Finalnie wskazuje nowo opracowane koniugaty jako obiecujące w strategiach przeciwnowotworowych.

Doktorantka dwutorowo dokonała weryfikacji otrzymanych konstrukcji. Po pierwsze, hydrolizę proleków selektywnych względem katepsyn B/L monitorowała za pomocą LC-MS i widm ESI-MS, precyzyjnie dokumentując mechanizm aktywacji oraz wzrost sygnału MMAE w funkcji czasu inkubacji. Po drugie, cytotoksyczność oceniła metodą testu MTS, z zastosowaniem kontrolnych inhibitorów katepsyn i wariantów z D-aminokwasami, co jednoznacznie łączy projekt chemiczny z potwierdzonym efektem biologicznym. W kontekście ADC Autorka przedstawia procedury syntezy, koniugacji i oczyszczania trastuzumab–MMAE z wykorzystaniem maleimid-PEG2, a weryfikacja koniugacji elektroforezą SDS-PAGE wykazuje heterogeniczność pasm typową dla zmiennych wartości DAR.

Na uwagę zasługuje część enzymologiczna doświadczeń, dotycząca katepsyny S, gdzie autorka, wykorzystując technologię HyCoSuL, rzetelnie argumentuje jej przewagę nad klasycznymi bibliotekami substratowymi (PS-SCL, FPPS, IQF) w zakresie profilowania preferencji kieszeni enzymatycznych. Wyniki uzyskane dla katepsyny S zaprezentowane są w sposób nowoczesny i stanowią solidną podstawę dla dalszego projektowania selektywnych łączników enzymatycznych.

Walory naukowe i wnioski końcowe

Na szczególną uwagę zasługuje dojrzała krytyka rozdziału dotyczącego katepsyny S – autorka uczciwie wskazuje ograniczenie linii BT-474 względem aktywności S i proponuje dalszą weryfikację na modelach z wysoką ekspresją (SKOV-3, A-431). Z punktu widzenia standardów farmaceutycznych sugerowane są dwa uzupełnienia: ilościowa analiza DAR (np. HIC-HPLC, LC-MS, dekonwolucja UV) oraz pełne raportowanie wartości IC_{50} z przedziałami ufności, co pozwoliłoby na ilościowe porównania efektów terapeutycznych. W kontekście oceny selektywności względem Val-Cit rekomendowane byłoby także przeprowadzenie testów stabilności w osoczu oraz badań podatności na proteazy pozalizosomalne, Autorka sygnalizuje te kwestie, jednak nie przedstawia własnych rezultatów, co może być kierunkiem dalszych badań.

Doktorantka wykorzystała szeroki wachlarz metodologiczny, wykorzystanie strategii SPPS, aktywacji PABC, profilowania substratowego HyCoSuL oraz metod analitycznych (LC-MS/ESI-MS, SDS-PAGE, testów cytotoksyczności) jest właściwe, pokazuje kompleksowe podejście do tematu projektowania leków i zapewniają solidne dane eksperymentalne. Jako naturalne wzmocnienie aspektu farmakologicznego można zastosować równoległą kontrolę na linii HER2-ujemnej (kontrola swoistości transportu). Dobrze byłoby wykorzystać metody obrazowania/cytometrii dla oceny internalizacji leków w komórkach.

Z obowiązku recenzenta pozwalam sobie drobne pytania, uwagi i komentarze.

- (1) Jaka jest stabilność nowych proleków, Autorka wskazuje pewne ograniczenia w tym zakresie jednak nie znajduję w rozprawie takich danych. Dla proleków z nienaturalnymi aminokwasami przydałaby się stabilność w PBS pH 7,4 i w 10% FBS (37°C) oraz w homogenatach lizosomalnych – zwłaszcza jeśli celem jest zastosowanie *in vivo* (takich danych brak).
- (2) W części doświadczalnej Autorka wykorzystała różne stężenia proleku w zależności od metody, przykładowo w badaniu kinetyki aktywacji przez rekombinowane katepsyny podano 50 μ M enzymu i 50 μ M proleku (1:1). Natomiast w badaniach *in vitro* stężenia leku oscylują w zakresie 5-10 nM. Czy można te niezależne badania porównywać? Jak ten wybór wpływa na ekstrapolację do warunków fizjologicznych?

- (3) W przypadku badania kinetyki aktywacji proleków Autorka pisze, cytując: „Pomiary przeprowadzono za pomocą LC-MS, a następnie zmierzono pole powierzchni piku na chromatogramie odpowiadającego wolnej formie MMAE”, czy stosowano krzywe wzorcowe i wewnętrzne standardy?
- (4) Dlaczego wykorzystano nieselektywny inhibitor E64d skoro nie zmieniał znacząco efektu? Jakie przesłanki wcześniej za tym stały? Czy wykorzystanie selektywnych inhibitorów dla B/L/S poprawiłyby aktywność leków?
- (5) Jakie są wartości IC_{50} ($\pm$ SEM) proleków i wolnej MMAE dla każdej linii? Czy różnice „ $\pm$ E64d” są statystycznie istotne?
- (6) Jak możnaby ocenić ryzyko pozalizosomalnych proteaz (np. katepsyna G, elastaza neutrofilowa) dla stabilności łączników w tkance guza?
- (7) Autorka oceniła cytotoksyczność proleku po 4 dniach, skąd taki wybór? Standardowym czasem w badaniach przesiewowych jest 24h, w przypadku braku aktywności wykonuje się dodatkowe pomiary. Czy krótsza ekspozycja w testach komórkowych nie powodowała żadnego efektu?
- (8) Autorka wskazuje, że MMAE wpływa na polimeryzującą mikrotubul, w pracy graficznie zaznaczono to działanie, ale brak testów funkcjonalnych, czy takie badania były prowadzone? W rozprawie Autorka wskazuje że może to prowadzić do śmierci komórki, czy Autorka przewiduje jaki typ śmierci komórkowej mogą indukować nowe proleki?
- (9) Czy wskazany w rozprawie efekt „bystender” może być również indukowany przez proleki opracowane przez Autorkę? Jakie mechanizmy mogą być włączone w mikrośrodowisku guza w indukowanie tego zjawiska?

Podsumowując, rozprawa mgr Oliwii Gorzeń stanowi oryginalny, spójny i wartościowy wkład w dziedzinę nauk chemicznych, prezentując nowatorskie podejście do projektowania selektywnych łączników proteazowych w prolekach i ADC. Autorka zweryfikowała swoje tezy bardzo solidnym warsztatem metodologicznym oraz dokonała oceny biologicznej. Cele dotyczące katepsyn B oraz L zostały w pełni zrealizowane zarówno na poziomie chemicznym, jak i funkcjonalnym, natomiast tematyka dotycząca katepsyny S jest otwarta do dalszych badań. Pomimo drobnych uwag i wątpliwości, które mają charakter wyłącznie uzupełniający, nie podważają one wartości merytorycznej pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Oliwii Gorzeń pt.: *"Projektowanie, synteza i analiza nowej generacji proleków przeciwnowotworowych aktywowanych przez proteazy"*, spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2022 poz. 574 ze zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej **o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie Pani Oliwii Gorzeń do dalszych etapów postępowania dotyczącego nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne**. Jednocześnie, biorąc pod uwagę znaczenie wyników, szeroki zakres wykonanych badań, nowatorskie podejście Doktorantki w ich uzyskaniu, składam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne **o przyznanie wyróżnienia** Autorce dysertacji.



Prof. dr hab. inż. Julita Kulbacka