

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Oliwii Gorzeń

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

Rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem dr hab. inż. Marcina Poręby, prof. uczelni w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej

W ostatnich latach medycyna spersonalizowana zyskała na znaczeniu, stając się jednym z kluczowych obszarów badań i praktyki klinicznej, szczególnie w kontekście terapii nowotworowych. W miarę jak nasza wiedza o biologii nowotworów oraz mechanizmach ich oporności na leczenie rośnie, coraz bardziej dostrzegamy potrzebę opracowywania innowacyjnych strategii terapeutycznych, które będą bardziej skuteczne i mniej toksyczne dla pacjentów. W tym kontekście, proleki peptydowe stanowią obiecującą klasę związków, które mogą być wykorzystane do precyzyjnego dostarczania leków przeciwnowotworowych, a ich aktywacja przez specyficzne proteazy otwiera nowe możliwości w zakresie celowanej terapii.

Proleki, definiowane jako nieaktywni prekursorzy leków, które po przekształceniu w organizmie stają się aktywne, zyskują na znaczeniu w kontekście terapii nowotworowych. Dzięki możliwości modyfikacji ich struktury chemicznej, proleki mogą być projektowane w taki sposób, aby były aktywowane jedynie w obecności określonych enzymów, co pozwala na osiągnięcie wysokiego stopnia selektywności. Kluczowym elementem tego podejścia jest zrozumienie, które proteazy są nadmiernie ekspresjonowane w określonych typach nowotworów, co umożliwia projektowanie proleków, które będą aktywowane tylko w ich obecności. Taka strategia nie tylko zwiększa skuteczność terapii, ale również minimalizuje działania niepożądane, co jest szczególnie istotne w kontekście terapii nowotworowych, gdzie pacjenci często doświadczają poważnych skutków ubocznych.

Proleki peptydowe aktywowane przez proteazy stanowią innowacyjne podejście w terapii nowotworowej, które łączy w sobie zalety zarówno terapii celowanej, jak i terapii opartej na prolekach. Poprzez połączenie proleków z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi na receptor HER2, możliwe jest stworzenie synergicznych strategii terapeutycznych, które mogą prowadzić do bardziej efektywnego i bezpiecznego leczenia pacjentek z rakiem piersi. W kontekście nowotworów piersi, receptor HER2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2) odgrywa kluczową rolę w patogenezie i progresji choroby. Kluczowe jest więc zrozumienie mechanizmów aktywacji proleków przez specyficzne proteazy, co pozwoli na optymalizację ich działania oraz zwiększenie skuteczności terapii.

Rozwój proleków peptydowych aktywowanych przez proteazy to nie tylko obiecująca strategia terapeutyczna, ale także krok w stronę bardziej spersonalizowanej i efektywnej medycyny. Dzięki możliwości precyzyjnego dostosowania terapii do specyficznych potrzeb pacjentów, możemy zyskać nowe narzędzia w walce z rakiem, które będą bardziej skuteczne i mniej inwazyjne. W miarę jak badania nad tymi nowymi związkami będą postępować, istnieje nadzieja na znaczące postępy w leczeniu nowotworów i poprawę jakości życia pacjentów. W ten nurt badań nad poszukiwaniem nowych proleków, wrażliwych na działanie wybranych enzymów wewnątrzkomórkowych wpisuje się praca doktorska mgr Oliwii Gorzeń. Praca mieści się w nurcie poszukiwań nowoczesnych, bardziej selektywnych metod leczenia nowotworów, mających na celu ograniczenie toksyczności systemowej i poprawę profilu bezpieczeństwa terapii.

Rozprawa doktorska mgr Oliwii Gorzeń liczy 217 stron maszynopisu i posiada układ zgodny z konwencją rozpraw doktorskich z zakresu nauk chemicznych i biomedycznych. Praca została podzielona na 6 głównych części, z czego za zasadniczą treść naukową uznać można rozdziały: *Wstęp teoretyczny*, *Cel pracy*, *Badania własne*, *Część eksperymentalna* oraz *Podsumowanie*, *Bibliografia*. Strukturę tę uzupełniają: *Streszczenie po polsku i angielsku*, *Projekty dodatkowe*, *Dorobek naukowy autorki*, *Spis schematów i rysunków*, *Spis tabel* oraz *Wykaz stosowanych skrótów*. Treść rozprawy wzbogacona została o liczne wysokiej jakości kolorowe rysunki oraz zestawienia tabelaryczne w tym bardzo poglądowe mapy cieplne. Z punktu widzenia edytorskiego rozprawa została przygotowana z bardzo dużą starannością. W kilku miejscach odnotowałam jedynie drobne uchybienia językowe.

Na szczególną uwagę zasługuje bardzo rozbudowany przegląd literatury (*Wstęp teoretyczny*, strony 6–46), który obejmuje aktualny stan wiedzy w zakresie biologii nowotworów, terapii celowanych oraz koncepcji i rozwoju koniugatów typu przeciwciało–lek (ADCs). Doktorantka zawarła w nim szczegółowe omówienie mechanizmów działania, ograniczeń oraz najnowszych technologii związanych z projektowaniem i klinicznym zastosowaniem ADCs. Autorka wykazała się bardzo dobrą orientacją w bieżącej literaturze specjalistycznej, co nadaje tej części pracy dużą wartość przeglądową i rozdział ten mógłby stanowić artykuł na przykład w *Wiadomościach Chemicznych*.

Celem głównym pracy doktorskiej mgr Oliwii Gorzeń było opracowanie nowej generacji selektywnych peptydowych proleków przeciwnowotworowych oraz koniugatów przeciwciało–lek (ang. Antibody-Drug Conjugates, ADC), aktywowanych przez wybrane proteazy (katepsyny B, L i S), w celu zwiększenia precyzji dostarczania leku do komórek nowotworowych, poprawy efektywności terapeutycznej i ograniczenia toksyczności wobec zdrowych tkanek. Doktorantka wyznaczyła sobie również kilka celów szczegółowych które wymieniła w rozdziale *Cel pracy*. Autorka postawiła sobie za cel stworzenie systemów terapeutycznych, które charakteryzowałyby się zarówno wysoką skutecznością przeciwnowotworową, jak i ograniczoną toksycznością dla zdrowych tkanek, co jest jednym z najistotniejszych wyzwań współczesnej onkologii molekularnej.

Praca ma charakter interdyscyplinarny przez to że łączy zaawansowaną chemię medyczną, enzymologię, projektowanie substratów oraz bioanalizę z praktycznym ukierunkowaniem na zastosowania kliniczne. Zastosowane podejście badawcze obejmuje zarówno koncepcję projektowania cząsteczek na poziomie molekularnym, jak i ich funkcjonalną ocenę w warunkach biologicznych, co znacząco podnosi wartość aplikacyjną pracy.

W pierwszym etapie badań autorka skupiła się na opracowaniu proleków zawierających peptydowe łączniki, które ulegają hydrolizie pod wpływem wybranych proteaz tj. katepsyn B i L, znanych z podwyższonej aktywności w mikrośrodkowisku wielu typów nowotworów. Zaprojektowane struktury oparła na analizie specyficzności substratowej tych enzymów z wykorzystaniem biblioteki HyCoSuL, co pozwoliło na precyzyjne dopasowanie sekwencji tetrapeptydowych odpowiedzialnych za selektywne uwalnianie leku. W jej przypadku monometyloaurystatyny E (MMAE), silnego inhibitora mikrotubul, choć planowana była początkowo doksorubicyna (DOX) ale z uwagi na niską stabilność została wymieniona na MMAE.

Doktorantka przeprowadziła szereg analiz enzymatycznych, które wykazały, że zaprojektowane łączniki ulegają selektywnej hydrolizie przez odpowiednie katepsyny. Kolejne etapy badań obejmowały testy cytotoksyczności na liniach komórkowych, które miały zweryfikować skuteczność terapeutyczną opracowanych proleków. Pomimo zadowalających wyników pod względem selektywności enzymatycznej, efekt cytotoksyczny nie był tak silny, jak zakładała. Wyniki sugerowały alternatywny mechanizm działania, niezależny od proteolizy, na przykład wynikający z bezpośredniego przenikania nieaktywowanych cząsteczek przez błonę komórkową i ich działania na mikrotubule wewnątrzkomórkowe. Dodatkowo, zastosowanie inhibitora katepsyn (E64d) nie wpływało istotnie na cytotoksyczność, co stanowiło podstawę do postawienia hipotezy o mechanizmie niezależnym od enzymatycznej aktywacji.

W odpowiedzi na powyższe obserwacje, mgr Oliwia Gorzeń rozszerzyła zakres badań o projektowanie i syntezę koniugatów przeciwciało–lek (ADCs), które miały umożliwić bardziej kontrolowane i selektywne dostarczanie substancji czynnej do komórek nowotworowych, szczególnie tych wykazujących nadekspresję receptora HER2. W tym celu zastosowała te same sekwencje łącznikowe, co w prolekach, jednak tym razem połączone z przeciwciałem anty-HER2, umożliwiającym internalizację kompleksu do wnętrza komórki. Zgodnie z założeniem, aktywacja

miała zachodzić dopiero w kwaśnym środowisku lizosomalnym, gdzie aktywne katepsyny mogłyby rozciąć łącznik i uwolnić lek.

Badania nad koniugatami ADC wykazały wyraźnie zwiększoną cytotoksyczność w porównaniu do samych proleków, co potwierdziło słuszność kierunku modyfikacji strategii terapeutycznej. Co więcej, eksperymenty z zastosowaniem D-aminokwasów w łączniku pokazały, że wprowadzenie trudniej hydrolizowanych elementów obniża skuteczność terapii co potwierdziło, że enzymatyczna aktywacja w lizosomach ma kluczowe znaczenie dla działania koniugatu.

Na szczególną uwagę zasługują również badania nad katepsyną S, enzymem o bardziej ograniczonej ekspresji, ale potencjalnie interesującym jako cel terapeutyczny. W odróżnieniu od poprzednich etapów, Doktorantka samodzielnie przeprowadziła analizę specyficzności substratowej katepsyny S, wykorzystując bibliotekę substratów fluorogenicznych. Na podstawie tych wyników zaprojektowała dwa nowe łączniki, które następnie wykorzystała w strukturach proleków i ADCs. Choć testy przeprowadzone na linii BT-474 (o niskiej ekspresji katepsyny S) nie przyniosły jednoznacznych wyników wskazujących na aktywację przez ten enzym, autorka trafnie zauważyła konieczność dalszych badań na innych liniach komórkowych, takich jak SKOV-3 czy A-431, gdzie katepsyna S jest bardziej obecna.

Końcowa część pracy stanowi próbę uogólnienia uzyskanych wyników i sformułowania zaleceń do dalszych badań. Autorka zwróciła uwagę na potencjalne możliwości zastosowania narzędzi takich jak CRISPR/Cas9 w celu wyciszenia ekspresji konkretnych proteaz, co mogłoby pozwolić na bardziej precyzyjne określenie mechanizmów aktywacji koniugatów ADC. Ponadto, zaproponowała wykorzystanie selektywnych inhibitorów proteaz jako narzędzi wspierających walidację projektowanych systemów terapeutycznych.

Tematyka pracy doktorskiej jak i jej wykonanie bardzo mi się podoba. Podczas lektury nasunęły mi się następujące pytania:

- (1) Czy badania z inhibitorem E64d rzeczywiście wystarczająco potwierdzają brak aktywacji enzymatycznej? Czy były rozważane inne inhibitory lub strategie obniżenia ekspresji proteaz?
- (2) W opisie syntezy peptydowych proleków zawierających doksorubicynę (str. 54), Doktorantka wspomina, że syntezę prowadziła metodą SPPS z użyciem żywicy 2-CTC, a następnie pisze o uwalnianiu peptydu z żywicy amidowej Rink. Proszę o doprecyzowanie, na której żywicy faktycznie przeprowadzono syntezę tetrapeptydów i czy nie doszło tu do pomyłki w opisie. Jeśli Doktorantka zastosowała różne żywice w różnych etapach lub dla różnych związków, proszę wskazać, czym się kierowała przy ich wyborze i jakie miało to znaczenie dla późniejszej funkcjonalizacji peptydu.
- (3) Czy zastosowanie technologii HyCoSuL przy doborze łączników nie ograniczało różnorodności chemicznej możliwej do przetestowania? Jak Doktorantka oceniła, że uzyskane łączniki są rzeczywiście optymalne?

- (4) Na przedstawionych chromatogramach LC-MS (Rys. 11) widoczny jest stopniowy wzrost sygnału dla wolnej DOX oraz spadek sygnału odpowiadającego prolekowi (PEPTYD–PABC–DOX) w czasie inkubacji z katepsyną B. Proszę o doprecyzowanie, które z pozostałych pików obserwowanych po 10 godzinach inkubacji odpowiadają fragmentom peptydu powstałym w wyniku hydrolizy łącznika. W szczególności, czy Doktorantka zidentyfikowała sygnał odpowiadający peptydowi pozbawionemu DOX, oraz czy przeprowadzona została analiza masowa tych produktów w celu potwierdzenia ich tożsamości?
- (5) W przedstawionym chromatogramie LC-MS (Rys. 24) dla hydrolizy proleku Ac-Cha-Leu-hSer(Bzl)-Cit-PABC-MMAE brakuje jednoznacznej informacji, który kolor krzywej odpowiada konkretnemu czasowi inkubacji (5, 30 lub 60 minut). Proszę o doprecyzowanie, jak przypisać poszczególne przebiegi do czasu inkubacji, ponieważ bez tej informacji trudno jednoznacznie ocenić przebieg hydrolizy oraz stopień uwalniania MMAE.
- (6) W tekście znajduje się stwierdzenie, że komórki HEK-293T wykazywały najwyższy poziom przeżywalności spośród wszystkich badanych linii komórkowych (Rys. 39–41). Proszę o doprecyzowanie, czy zostało to statystycznie potwierdzone oraz czy można byłoby przedstawić dane z testów cytotoksyczności w formie zbiorczego wykresu porównawczego (np. wykresu słupkowego z wartościami IC_{50} lub % przeżywalności przy wybranym stężeniu proleku), co pozwoliłoby mi łatwiej zweryfikować tę obserwację. W obecnej formie trudno jest bezpośrednio porównać dane z osobnych rycin.
- (7) Czy zastosowane koniugaty ADC były porównywane z istniejącymi na rynku lub w badaniach klinicznych (np. T-DM1)?
- (8) Dlaczego mimo wysokiej selektywności enzymatycznej Doktorantka nie zaobserwowała spodziewanej cytotoksyczności proleków? Czy Doktorantka rozważała wpływ stabilności związków w osoczu lub problemy z penetracją komórkową?
- (9) Jakie były największe ograniczenia techniczne lub koncepcyjne, z jakimi Doktorantka się zmierzyła podczas wykonywania swojej pracy doktorskiej?

Część eksperymentalna pracy doktorskiej zawiera szczegółowy opis zastosowanych metod, procedur syntezy, testów biologicznych i warunków analitycznych. Została przygotowana w sposób przejrzysty i wystarczająco szczegółowy, umożliwiając powtórzenie eksperymentów. Badania obejmowały zarówno aspekty chemiczne (syntezę związków), jak i biologiczne (testy aktywacji enzymatycznej, cytotoksyczności, elektroforezę, analizy z inhibitorem E64d), a także ocenę efektywności systemów dostarczania leków w kontekście endocytozy i aktywacji w lizosomach. Ciekawe i warte odnotowania jest również to, że autorka zasygnalizowała inne potencjalne kierunki badawcze, będące naturalnym rozwinięciem głównego nurtu pracy, w tym badania nad prolekami aktywowanymi przez legumainę oraz selektywnymi inhibitorami katepsyny S. Choć ze względu na

ograniczony czas przewidziany na realizację doktoratu nie zostały one rozwinięte eksperymentalnie, ich uwzględnienie świadczy o szerokim spojrzeniu autorki na problematykę i zrozumieniu dynamicznego charakteru badań naukowych, które nieustannie generują nowe pytania i hipotezy. Podsumowanie zostało dobrze zredagowane i trafnie syntetyzuje wyniki badań własnych, odnosi się do celów pracy i jasno wskazuje potencjał dalszego rozwoju projektu.

Wyniki recenzowanej pracy doktorskiej znalazły finał w postaci jednej publikacji naukowej znajdującej się obecnie w recenzji. Doktorantka jest również współautorką innej publikacji opublikowanej w wysoko punktowanym czasopiśmie z listy JCR tj. *Current Opinion in Chemical Biology* (2024). Dodatkowo, pani Oliwia Gorzeń jest współautorką czterech wystąpień konferencyjnych, z których dwa zaprezentowała osobiście w formie wystąpień ustnych. Miałam przyjemność uczestniczyć w jednej z tych prezentacji podczas Polskiego Sympozjum Naukowego w 2023 r., co pozwoliło mi zapamiętać Doktorantkę jako osobę wyjątkowo zaangażowaną w realizację swoich badań, potrafiącą jasno i przekonująco przedstawić ich cele oraz znaczenie.

Podsumowując, recenzowana rozprawa spełnia wszystkie ustawowe kryteria przewidziane dla rozpraw doktorskich, a jej wartość merytoryczna, nowatorstwo podejścia, jakość danych oraz staranność opracowania graficznego i redakcyjnego pozwalają z pełnym przekonaniem stwierdzić, że mgr Oliwia Gorzeń zasługuje na nadanie jej stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne. Jej dysertacja stanowi przykład dojrzałego, kompleksowego podejścia do problemu celowanego dostarczania leków w terapii przeciwnowotworowej. Autorka wykazała się umiejętnością formułowania hipotez badawczych, samodzielnością w projektowaniu eksperymentów oraz elastyczną zdolnością do przystosowania założeń eksperymentalnych w odpowiedzi na uzyskane wyniki. Wartość naukowa pracy jest wysoka, a jej wyniki mogą stanowić solidną podstawę do dalszych badań nad nowymi generacjami koniugatów ADC o zwiększonej selektywności enzymatycznej. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr Oliwii Gorzeń do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny oraz oryginalność rozprawy mgr Oliwii Gorzeń, wnoszę o przyznanie jej pracy doktorskiej wyróżnienia. Dysertacja wnosi istotny wkład w rozwój nowoczesnych terapii celowanych poprzez zaprojektowanie selektywnych proleków i koniugatów ADC aktywowanych przez proteazy. Szczególne uznanie budzi kompleksowe podejście łączące syntezę, badania enzymatyczne i biologiczne oraz samodzielne opracowanie łączników

selektywnych, zwłaszcza dla katepsyny S. Uzyskane wyniki mają wysoką wartość naukową i aplikacyjną.

