

Prof. dr hab. inż. Renata Mikołajczak
Ośrodek Radioizotopów POLATOM
Narodowe Centrum Badań Jądrowych
ul. Andrzeja Sołtana 7
05-400 Otwock

18.08.2022 r

**Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Otrzymywanie celowanych radiofarmaceutyków
bazujących na antagonistach receptora NK-1 do diagnostyki i terapii
patologii onkologicznych”**

**mgr farm. Pawła Krzysztofa Halika
z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej**

**Promotor: dr hab. Ewa Gniazdowska, prof. IChTJ,
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej**

**Ko-promotor: prof. dr hab. n. farm. Grażyna Nowicka, Wydział Farmaceutyczny
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

1. Charakterystyka pracy

Rozprawa doktorska Pana mgr farm. Pawła Krzysztofa Halika opisuje badania nad otrzymywaniem potencjalnych radiofarmaceutyków do obrazowania receptorów neurokininowych typu 1 w oparciu o niepeptydowe związki wykazujące działanie antagonistyczne w stosunku do tego receptora.

Przedstawiona do oceny dysertacja stanowi zbiór 5 opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych opatrzonych autorskim opisem, w którym Doktorant przedstawił obszerną analizę tematu, wskazując na genezę oraz cel podjętych badań.

Należy zaznaczyć, że w ostatnich dekadach w medycynie nuklearnej obserwuje się znaczny wzrost zastosowań radiofarmaceutyków wykorzystujących jako wektor biologiczny cząsteczki, które po wyznakowaniu radionuklidami zachowują zdolność kierowanego przyłączania się do receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR – z ang. *G Protein-Coupled Receptor*). Pierwszy dopuszczony do stosowania w 1991 r. lek z tej grupy to znakowany indem-111 (In-111) pentetreotide (Octreoscan). ¹¹¹In-pentetreotide to analog somatostatyny, agonista receptora, którego zwiększona ekspresja występuje na komórkach nowotworów neuroendokrynych. Od tego czasu peptydowe analogi somatostatyny zrewolucjonizowały klasyczne podejście do medycyny nuklearnej, dając lekarzom możliwości zarówno precyzyjnej diagnostyki jak i leczenia onkologicznego. Szeroko zakrojone badania naukowe prowadzone są również nad analogami innych receptorów błonowych, takich jak gastryna/cholecystokina czy bombezyna, aby umożliwić obrazowanie molekularne różnych schorzeń nowotworowych. Z tej perspektywy, zaproponowane przez Doktoranta wykorzystanie receptorów neurokininy 1 (NK1R) jako celu dla projektowanych radiofarmaceutyków jest jak najbardziej słuszne i uzasadnione konkretną potrzebą medyczną. Szczególnie, że podwyższona ekspresja tych receptorów obserwowana jest m.in. w komórkach glejaka wielopostaciowego, w leczeniu którego dotychczas dostępne metody są niewystarczające. Jednak zaprojektowanie cząsteczki, która będzie selektywnie wiązać się z receptorami w organizmie pacjenta i jednocześnie trwale wiązać radiometale, takie jak gal-68 (Ga-68) o własnościach diagnostycznych, czy lutet-177 (Lu-177) o własnościach terapeutycznych, stanowi duże wyzwanie badawcze. Doktorant proponuje rozwiązanie w postaci wykorzystania jako cząsteczki wiodącej niepeptydowego antagonisty receptora NK1, wspierając się danymi o tej grupie produktów leczniczych.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy ogółem 169 stron. Z tego około 100 stron stanowią kopie powiązanych tematycznie publikacji. Wydruk tych publikacji poprzedzony został zwięzłą analizą przeprowadzoną w oparciu o bogatą bazę literaturową składającą się z 245 pozycji. Należy zwrócić uwagę, że większość cytowanych prac została opublikowana w przeciągu ostatnich 10 lat. Świadczy to o aktualności podjętej tematyki, jak również o dobrym rozeznaniu i wiedzy Doktoranta w obszarze badawczym poruszonym w rozprawie doktorskiej. Ta część dysertacji stanowi istotny wstęp do właściwych publikacji Autora umożliwiając nakreślenie szerszego kontekstu prowadzonych badań. Składa się z opisu hipotezy i celów badawczych pracy oraz części teoretycznej i praktycznej w podrozdziałach. W części teoretycznej Autor omawia, na czym polega celowana terapia radionuklidowa oraz przedstawia

zasady towarzyszące projektowaniu radiofarmaceutyków. Znaczna część przeglądu literaturowego dotyczy znaczenia receptora NK1 w medycynie oraz jego potencjalnego znaczenia jako targetu dla radiofarmaceutyków, szczególnie przy zastosowaniu znanych antagonistów tego receptora. Część praktyczna stanowi omówienie i podsumowanie uzyskanych i opublikowanych przez Doktoranta wyników, ze wskazaniem perspektyw dalszego rozwoju.

W pierwszej z zamieszczonych publikacji, w której doktorant jest drugim autorem, dokonano przeglądu literaturowego i przeprowadzono analizę stanu wiedzy dotyczącego ligandów receptora neurokininowego typu 1 stosowanych w klasycznej medycynie jak i w medycynie nuklearnej pod kątem ich potencjalnego wykorzystania w celowanej diagnostyce i radioterapii wewnętrznej. Omówiono w niej szerokie spektrum ligandów tego receptora, z różnych grup związków, zarówno peptydowych i nie-peptydowych, agonistów jak i antagonistów. Wyjściem do tej analizy jest stan wiedzy na temat wykorzystania Substancji P(1-11), agonisty receptora NK1. Analogi tego peptydu były pierwszymi ligandami, do których z powodzeniem przyłączano radionuklidy w celu wizualizacji lub niszczenia komórek nowotworowych wykazujących zwiększoną ekspresję NK1R w badaniach u zwierząt doświadczalnych i w badaniach klinicznych. Główny jednak nacisk autorzy kładą na nie-peptydowe ligandy NK1R, opierając się na doświadczeniach pochodzących z przemysłu farmaceutycznego, gdzie związki z tej grupy zostały dopuszczone do stosowania u ludzi. Cechy wskazujące na przydatność tej grupy związków to ich trwałość w warunkach fizjologicznych i brak podatności na degradację enzymatyczną, w odróżnieniu od analogów peptydowych.

Przeprowadzony przegląd literaturowy posłużył następnie doktorantowi do sformułowania hipotezy badawczej oraz nakreślenia strategii i celu pracy, którym było zbadanie, czy nie-peptydowe antagonisty takie jak SPANTIDE I, jego skrócona forma SPANTIDE I(5-11) oraz nie-peptydowe antagonisty, L732,138 czy aprepitant, mogą być nośnikami radiometali, w szczególności dla Ga-68 czy Lu-177 do zastosowań w diagnostyce i terapii onkologicznej.

Pierwsze efekty tych działań prezentuje druga z publikacji, w której mgr farm. Paweł Krzysztof Halik jest pierwszym autorem. Praca ta przedstawia propozycję modyfikacji struktury wyjściowych antagonistów. Doktorant syntezuje zaprojektowane związki a następnie przeprowadza szczegółową analizę ich własności chemicznych i biologicznych. W szczególności Autor zaproponował modyfikacje strukturalne cząsteczki aprepitantu umożliwiające ich wyznakowanie radionuklidami ^{68}Ga i ^{177}Lu , zbadał lipofilność otrzymanych kompleksów oraz ich trwałość w surowicy ludzkiej. Dla struktur konjugatów wykazujących wystarczającą trwałość przeprowadzono badania modelowania molekularnego wobec struktury

obliczeniowej ludzkiego receptora NK-1. W badaniach kompetencyjnych in vitro oceniono wiązalność tych kompleksów do receptora w homogenatach mózgu szczurzego wobec w aprepitantu.

Kolejna publikacja rozszerza zakres przeprowadzonych badań otrzymanych kompleksów jako wektorów rozpoznających komórki nowotworowe glejaka wielopostaciowego, w badaniach komórkowych i w badaniach in silico.

Czwarta z kolei publikacja, z Doktorantem jako pierwszym autorem, stanowi podsumowanie wyników badań in vitro radiokonjugatów aprepitantu z Lu-177.

Wymienione powyżej prace ukazały się w renomowanych czasopismach o wysokim IF (od 4,412 do 6,321). Wymienionym publikacjom towarzyszy monografia w recenzowanym wydawnictwie INCT Annual Report, w której Autor przedstawia wyniki swoich prac związanych z modyfikacją antagonisty NK1, cząsteczki SPANTIDE I (5-11). Dodatkowo, załączono również oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie poszczególnych publikacji.

Niezależnie od wymienionych wyżej publikacji, ważnym elementem dorobku naukowego Doktoranta, potwierdzającym charakter aplikacyjny prowadzonych badań, jest Patent Nr 238401 na wynalazek pt. Zmodyfikowana cząsteczka substancji leczniczej, sposób jej wytwarzania, diagnostyczny lub terapeutyczny radiofarmaceutyk receptorowy oparty na tej cząsteczce, oraz jego zastosowanie. (autorzy P. Halik, E. Gniazdowska, P. Koźmiński)

Za najważniejsze osiągnięcie Doktoranta uważam bardzo krytyczne i niestandardowe podejście do danych dostępnych w literaturze przedmiotu a następnie metodyczne, krok po kroku, przeprowadzenie procesu dowodowego dla sformułowanej hipotezy badawczej. Wykorzystanie aprepitantu, w którym substancja czynna [5-([(2R,3S)-2-((R)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]ethoxy)-3-(4-fluorophenyl)morpholino]methyl)-1H-1,2,4-triazol-3(2H)-one] to wybiórczy antagonistą o dużym powinowactwie do ludzkich receptorów neurokininowych 1 (NK1) powinno ułatwić dalszą drogę badań rozwojowych, ponieważ jest to lek dopuszczony do stosowania ze wskazaniem do zapobiegania nudnościom i wymiotom związanym z chemioterapią przeciwnowotworową. Doktorant konsekwentnie dokonał modyfikacji wybranej cząsteczki w celu wyznakowania jej wybranymi radionuklidami i potwierdził słuszność zaproponowanego podejścia metodami analitycznymi jak również metodą modelowania in silico.

Stwierdzam, że rozwiązanie postawionego zadania zostało przeprowadzone prawidłowo, a przyjęte założenia i metody nie budzą większych zastrzeżeń. Pracę mgr farm Pawła Krzysztofa Halika oceniam wysoko, jednakże, z obowiązku recenzenta, muszę wskazać na pewne niedociągnięcia w przygotowaniu dysertacji. Dlatego prosiłabym, aby Doktorant zechciał się ustosunkować do niżej wymienionych uwag o charakterze dyskusyjnym w trakcie publicznej obrony:

1. W celu pracy Autor odnosząc się do możliwości zahamowania rozrostu zmiany nowotworowej proponuje zastosowanie wysoce **cytotoksycznych** radiofarmaceutyków receptorowych. Tymczasem w publikacjach stanowiących rdzeń rozprawy zagadnieniu cytotoksyczności poświęcono stosunkowo niewiele miejsca. Czy i jak została potwierdzona cytotoksyczność zaprojektowanych kompleksów z radionuklidami?
2. Odrębnego wyjaśnienia wymagałoby zagadnienie trwałości (stabilności) otrzymanych prekursorów i ich kompleksów z wybranymi radionuklidami. W publikacjach wyniki badań trwałości przedstawione są jakościowo i ilościowo z podaniem warunków i czasu badania. Jednak w tekście opisującym te wyniki Doktorant posługuje się bardzo subiektywnymi ocenami, np. „nieakceptowalna stabilność” (str. 45), „pełna stabilność”. Jakie kryteria ilościowe przyjął Autor do oceny wyników badań trwałości? Czym uzasadnia ten wybór?
3. W analizie literatury zabrakło odniesień do znanych już i będących w fazie badań klinicznych radiofarmaceutyków opartych na peptydowych i nie-peptydowych antagonistach innych receptorów błonowych.

Inne drobne nieścisłości:

Autor bardzo często stosuje w tekście nawiasy okrągłe jako znak interpunkcyjny, chociaż nie zawsze zgodnie z zasadami ich stosowania. Jak podaje Słownik Języka Polskiego PWN, za pomocą nawiasu możemy wskazywać, które partie tekstu w stosunku do tekstu głównego mają charakter poboczny, drugoplanowy bądź uzupełniający. Do tego samego celu można też użyć innych znaków interpunkcyjnych. Natomiast w tekście Doktorant wykorzystuje nawiasy okrągłe do powtórzenia innymi słowami tej samej informacji, np. omawiając możliwość blokowania wychwyty radiofarmaceutyku przez podanie odpowiednich substancji pisze „W tym przypadku substancja kompetencyjna (współzawodnicząca, bloker) dla radiofarmaceutyku ...” – określenia podane w nawiasie to synonimy a nie rozszerzenie definicji, szczególnie, że wyżej w tekście już omówiono, na czym polega blokowanie. Podobne wrażenie nadmiernego

i niekoniecznie właściwego stosowania można odnieść w przypadku wtrętów łacińskojęzycznych typu; *de facto*, *a priori* itp.

Autor z pewną nonszalancją podchodzi do słowa pisanego w przedstawieniu stanu obecnego jeśli chodzi o charakterystykę radiofarmaceutyków. Stosowane słownictwo jest nieprecyzyjne i niezgodne z obowiązującymi definicjami np. „Ilość otrzymanej dawki promieniowania” na str. 30 – wtedy gdy prawdopodobnie chodzi o dawkę pochłoniętą. Podobnie, na str. 36, definiuje aktywność molową jako „ilość radioaktywności na jednostkę liczby moli substancji”.

W tekście pojawia się określenie ksenobiotyk – użycie tego określenia w stosunku do radiofarmaceutyków jest nieuzasadnione, chociażby z tego powodu, że masa podawanych w radiofarmaceutykach substancji chemicznych jest bardzo mała w porównaniu do klasycznych produktów leczniczych, podawane są raz lub maksymalnie kilka razy w czasie życia pacjenta. Określenie to pojawia się tylko w pewnej części tekstu, co może wskazywać na raczej przejściowe zauroczenie Autora nowym pojęciem.

Na pewien brak staranności w przygotowywaniu tekstu, być może przy bezpośrednim tłumaczeniu wybranych fragmentów tekstów obcojęzycznych, wskazują pojawiające się lapsusy językowe takie jak np. na str. 33: „Izotopy powinny ulegać w maksymalnym stopniu rozpadom promieniotwórczym ..” „w tym przypadku izotopy powinny ulegać rozpadom promieniotwórczym..” – to chyba badacz powinien dobierać izotopy promieniotwórcze o odpowiedniej charakterystyce fizycznej, od izotopów trudno wymagać takiej decyzyjności.

3. Ocena końcowa rozprawy doktorskiej

Pracę doktorską mgr farm. Pawła Krzysztofa Halika pt. „Otrzymywanie celowanych radiofarmaceutyków bazujących na antagonistach receptora NK-1 do diagnostyki i terapii patologii onkologicznych” oceniam wysoko. Przedstawiona rozprawa doktorska dotyczy ważnego obszaru badawczego, związanego z projektowaniem potencjalnych radiofarmaceutyków. Biorąc pod uwagę szeroki zakres przeprowadzonych prac oraz sposób ich realizacji, co do którego nie wnoszę istotnych uwag krytycznych, należy stwierdzić, że Autor wykazał się doskonałym opanowaniem warsztatu badawczego, w szczególności w projektowaniu i prowadzeniu badań fizyko-chemicznych i biologicznych. Pozwoliło to doktorantowi w sposób prawidłowy zrealizować zaplanowane w pracy zadania, uzyskać wartościowe wyniki i na ich podstawie sformułować właściwe wnioski oraz zrealizować założony cel pracy. Przedstawiona do recenzji dysertacja spełnia wszystkie wymagania stawiane przez ustawodawcę pracom doktorskim. Pewne drobne manakmenty, budzące moje

zastrzeżenia, nie wpływają na ogólną ocenę pracy, na wyciągnięte wnioski i nie umniejszają znaczenia przedstawionych wyników. Uważam, że Doktorant jest w pełni dojrzałym kandydatem do organizowania i prowadzenia badań naukowych, spełnia tym samym kryteria stawiane pracownikom naukowym ubiegającym się o stopień naukowy doktora.

Podsumowując, oceniam przedstawioną rozprawę doktorską jako bardzo dobrą, spełniającą wszystkie wymagania ustawy dotyczące rozpraw doktorskich i wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr farm. Pawła Krzysztofa Halika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Renata Mikołajczak

Świerk-Otwock: 18.08.2022

**Rada Naukowa
Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16
03-195 Warszawa**

Szanowni Państwo!

Niniejszym przekazuję recenzję rozprawy doktorskiej Pana mgr farm. Pawła Krzysztofa Halika pt. „Otrzymywanie celowanych radiofarmaceutyków bazujących na antagonistach receptora NK-1 do diagnostyki i terapii patologii onkologicznych”, której promotorem jest Pani dr hab. Ewa Gniazdowska z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej i ko-promotrem jest Pani prof. dr hab. n. farm. Grażyna Nowicka z Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Zapoznałam się z pracą z zainteresowaniem i oceniam jej poziom jako wyróżniający. Zwracam się więc do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej o wyróżnienie rozprawy.

Praca prezentuje wysoki poziom, biorąc pod uwagę trudność rozwiązywanego problemu jakim jest projektowanie nowych radiofarmaceutyków. Doktorant wykazał bardzo krytyczne i nowatorskie podejście do danych dostępnych w literaturze przedmiotu a następnie metodyczne, krok po kroku, przeprowadził proces dowodowy dla sformułowanej hipotezy badawczej. Wykorzystanie aprepitantu, w którym substancja czynna to wybiórczy antagonistą o dużym powinowactwie do ludzkich receptorów neurokininowych 1 (NK1) stanowi ważny krok na drodze dalszych badań nakierowanych na rozwój nowoczesnych zastosowań radiofarmaceutyków.

Z wyrazami szacunku



prof. dr hab. inż. Renata Mikołajczak