

Warszawa, 10.01.2019 r.

Prof. dr hab. Dorota Maciejewska
Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1, 02 097 Warszawa

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Barbary Janoty

Opracowanie i przygotowanie radiofarmaceutyku HYNIC–Eksendyna–4, agonisty receptora GLP–1. Badania chemiczne i biologiczne.

Tematyka pracy doktorskiej mgr Barbary Janoty dotyczy ważnego problemu terapeutycznego czyli diagnozowania w narządach zmian spowodowanych przez nowotwory neuroendokrynne, zwłaszcza przez insulinoma (zlokalizowanego w trzustce) oraz przez raka rdzeniastego tarczycy (zgodnie z nazwą występującego w tarczycy). Nowotwory te nie zawsze są złośliwe, ale głównym sposobem ich leczenia jest chirurgiczne usunięcie części lub całości odpowiedniego narządu. Chociaż dzięki istnieniu markerów biochemicznych świadczących o występowaniu tych nowotworów, ich diagnoza jest możliwa, informacja o dokładnej lokalizacji zmian przed interwencją chirurgiczną jest kluczowa dla optymalizacji terapii. Radiofarmaceutyki stosowane w technikach SPECT i PET wiążące się z określonymi makromolekułami pozwalają obrazować narządy i są odpowiedzią nauk chemicznych na aktualne problemy nauk medycznych.

Doktorantka ma doświadczenie w prowadzeniu badań nad radiofarmaceutykami i jest współtwórcą patentu dotyczącego formulacji znakowanych technetem–99m analogów somatostatyny (B. Górka, R. Mikołajczak, A. Markiewicz, P.354567, 2002). Przedstawione w dysertacji badania można uważać jako nowe osiągnięcie, w którym wykorzystano rozwiązania opracowane we wcześniejszych projektach naukowych. Cel molekularny zaplanowanego radiofarmaceutyku, receptor glukagonopodobnego peptydu typu 1 (GLP-1R), został zdefiniowany wcześniej, a prace nad rozwiązaniem problemów rozpoznania molekularnego były prowadzone w kilku ośrodkach naukowych. Niemniej całościowe opracowanie farmaceutycznej postaci preparatu, umożliwiające stosowanie go w praktyce klinicznej, jest osiągnięciem oryginalnym Doktorantki.

Zasadnicza treść rozprawy doktorskiej mgr Barbary Janoty zawarta jest na 163 stronach. Ostatnie 49 stron to załączniki, które są instrukcjami przygotowania radiofarmaceutyków, tabelami z wynikami, spisami tabel i rysunków oraz piśmiennictwem.

Zarówno tytuł pracy jak i jej treść sugerują wdrożeniowy charakter doktoratu. Używam tego terminu, ponieważ głównym celem pracy jest „opracowanie formułacji farmaceutycznej ... przeznaczonej do znakowania technetem-99m”. Stąd w rozprawie większy nacisk położono na wartości parametrów, które muszą być zachowane, aby preparat mógł być stosowany w praktyce klinicznej niż na wyjaśnienie zależności eksperyment-wynik lub pełną analizę wszystkich czynników wpływających na optymalizowane parametry. Uważam, że Doktorantka powinna silniej zaakcentować nowatorstwo rozwiązań (a nie tylko podkreślać kontynuowanie badań). Mgr Barbara Janota zdecydowała się na układ pracy, w którym najpierw omawia wszystkie materiały, techniki analityczne, parametry pomiarów ograniczając komentarze dotyczące doboru parametrów. Jest to oczywiście akceptowalne, ale czasami komplikuje śledzenie toku dyskusji i wymaga wielokrotnego powracania do opisu eksperymentów. Również podawanie ilości substancji w μg i mg , a nie μmol ach, mmol ach utrudnia szybką ocenę wydajności omawianych procesów chemicznych.

W treści dysertacji zauważyłam szereg nieścisłości lub niezręcznych sformułowań, których poprawa wpłynęłaby korzystnie na całość pracy. A oto niektóre przykłady z Rozdziału 1 zatytułowanego „Część literaturowa”:

- na stronie 7 podano „... na peptydzie HYNIC-Eksendyna-4, który jest naturalnym ligandem ...”, a to już jest związek zmodyfikowany, a nie naturalny,

- na stronie 31 podano „Efektywne znakowanie ... osiągnięto w wyniku metody polegającej na zastosowaniu układu dwóch koligandów...”. Synteza była dwuetapowa, natomiast kompleks końcowy zawierał jeden dodatkowy ligand kwas etylenodiamino- N,N' -diocowy (EDDA). (Nie wiadomo, czy w tej informacji uwzględniono kwas 6-hydrazynopirydyno-3-karboksylowy?),

- na stronie 49 nieprawidłowo podano różnice sekwencji eksendyny-4 i eksendyny-3 oraz jest błąd w sekwencji ekstendyny-4 (porównanie ze wzorem na str 81). Za niepotrzebne uważam powtarzanie wzorów polipeptydów,

- niektóre odnośniki nie odpowiadają treści (np. 163),

- uważam, że Rys. 11 na str 39 przedstawiający receptor metabotropowy można było pominąć, ponieważ w dalszej części jest przedstawiony receptor GLC-1R, który jest takim receptorem,

- Sekcja 1.7 „Receptory somastatynowe i ich rola w obrazowaniu nowotworów endokrynych” zawiera opis prac badawczych, w których uczestniczyła Doktorantka, ale niebędących tematem dysertacji. Może są przedstawione zbyt szczegółowo? Stanowią część życiorysu naukowego Doktorantki i trudno jest ocenić jak zostaną wykorzystane w dalszej części pracy (dane są podane informacyjnie),

- na początku Sekcji 1.8 na str 45 zawarto tekst o inkretynach bezpośrednio skopiowany z Wikipedii (10 linijek),

- Rys. 15 przedstawia schemat receptora GLP-1R szczura, a przecież jest wiedza o budowie ludzkiego receptora i taki schemat powinien być zamieszczony. Są dostępne różne struktury w bazie RCSB PDB Protein Data Bank,

- Rys. 16 na str 48 nie jest informacyjny – właściwsze byłoby pokazanie struktury przestrzennej peptydu. Sekwencja aminokwasów nie daje wyobrażenia o funkcji peptydu,

- Tabela 5 str 52 – pierwsza kolumna - niejasne co oznaczają cyfry,

- w Sekcjach 1.9 i 1.10 dobrze byłoby podać opis przebiegu internalizacji i eksternalizacji GLP-1R z uwzględnieniem czasu trwania procesów i przemieszczania się ligandów. Również powinien zostać podany molekularny model wiązania się eksendyny-4 z receptorem (przegląd D. Donnelly. *British J. Pharmacol.*, 2012, 167, 27-41; S. N. Roed *et. Mol. & Cell. Endocrin.* 2014, 382, 938-949).

W dalszych częściach pracy są również informacje, które wymagają uściślenia lub poprawy, np. niezręczne sformułowanie – „azotowałam”. Również używanie kilku rodzajów skrótów na tą samą substancję stwarza problemy przy śledzeniu dyskusji wyników. Inne przykłady:

- nie poinformowano skąd wzięto wzorzec z utlenioną metioniną,

- numeracja serii jest nieprzejrzysta,

- Sekcja 4.9.4 - nie jest jasne, dla którego preparatu określano toksyczność ostrą.

Rozdział 4 jest kluczową częścią dysertacji i zawiera wyniki i ich dyskusję. Doktorantka wspomina, że prace nad znakowanymi ^{99m}Tc analogami eksendyny wykonywała w ramach grantu N402 445039 (2010-2013). Nie mówi jednak czy włączyła te badania do pracy doktorskiej? A może rozwiązywała problemy, które zdefiniowała podczas realizacji grantu?

W Sekcji 4.1 „Peptydy” Doktorantka omawia widma mas zastosowanych peptydów. Ponieważ są to odczynniki handlowe nie uważam za zasadne umieszczanie tych danych w dysertacji. Ich struktura powinna być zdefiniowana przez producenta. Uzasadnienie wyboru odpowiednich ligandów jest ważne, ale ich struktura jest analogiczna do wcześniej

stosowanych związków. Podobna uwaga – powtarzalność – dotyczy również innych sekcji tej pracy. Doktorantka zbyt rzadko mówi o nowych rozwiązaniach przez nią opracowanych.

W Sekcji 4.2.1 Doktorantka proponuje wzory kompleksów ^{99m}Tc z tricyną i EDDA. Różnią się one od doniesień literaturowych (pozycja 56. Shuang Liu et.al. *Bioconjugate Chem* 1996, 7, 63-71). Niejasno brzmi zdanie „W pracach tych dowiedziono, iż poszczególne kompleksy koniugatu HYNIC-peptyd z technetem- 99m tworzą się w obecności jednej cząsteczki tricyny oraz dwóch cząsteczek EDDA jako koligandów.” Czy oznacza to zdefiniowanie ilości cząsteczek ligandów w strukturze kompleksów? Propozycja Doktorantki różni się od propozycji innych autorów.

Śledzenie doboru ilości tricyny, EDDA i SnCl_2 utrudnia podanie w Tabelach 7-13 skrótów ^{99m}Tc -HYNIC-Exn i ^{99m}Tc -HYNIC-Exn(Nle), ponieważ są to właściwie kompleksy z różnymi ligandami i powinno to być określone np. ^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-Exn. Czy dobierając temperaturę i pH Doktorantka rozważyła trwałość peptydów w zaproponowanych warunkach? Może jednak temperatura 80 °C byłaby satysfakcjonująca? Tym bardziej, że we wstępie podaje zakres temperatury 80 – 100°C jako wadę bezpośredniego kompleksowania z EDDA. Brakuje komentarza do wartości pH i temperatury dla preparatu znakowanego ^{68}Ga (podano jedynie niesatysfakcjonujące wyniki dla temperatury pokojowej, a następnie zaproponowano temperaturę 100 °C). Niejasny jest powód rozdzielenia Sekcji 4.2.1 i 4.2.3 – znakowanie ^{99m}Tc oraz 4.2.2 i 4.2.5 – znakowanie ^{68}Ga .

Ciekawym rozszerzeniem pracy byłoby przeanalizowanie możliwych zmian struktury peptydowych ligandów podczas opracowywania formulacji, ponieważ parametry stosowane w produkcji radiofarmaceutyków (100° C, niskie i wysokie pH) są ekstremalne.

W podsekcji 4.2.4 Doktorantka umieściła dane dotyczące znakowania ^{111}In informując, że oparła się na „powszechnie opisanych w literaturze” danych. Niestety zacytowany odnośnik [179] zawiera badania dotyczące znakowania ^{125}I . Brakuje też informacji czy radiofarmaceutyk otrzymany przez Doktorantkę ma parametry zgodne z danymi literaturowymi i czy wykonano dla niego analogiczną formulację jak dla preparatów znakowanych ^{68}Ga lub ^{99m}Tc (np. liofilizację).

Podsekcja 4.2.6 dotyczy otrzymania liofilizatów ^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-Exn. I tutaj nie przedyskutowano kluczowej informacji o zastosowaniu etanolu jako rozpuszczalnika w celu poprawienia czystości radiochemicznej. Niepełna jest informacja o zestawie liofilizowanym ^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-Exn(Nle). Mogę się tylko domyślać, że parametry przygotowania zestawów są identyczne jak zestawu poprzedniego, ale nie wiadomo czy jest to zestaw jedno- czy dwufiolkowy. Również niepełna jest informacja o zestawie znakowanym ^{68}Ga .

Kolejne Sekcje opisują badania jakości opracowanych produktów jako potencjalnych radiofarmaceutyków. Opracowane są zgodnie z wymaganiami Farmakopei Polskiej i Europejskiej. Doktorantka udowadnia poprawność wszystkich wymaganych parametrów. Ostatnim problemem, który rozwiązała Doktorantka był spowodowany utlenianiem peptydu, w którym bierze udział L-metionina będąca częścią eksendyny-4. Spośród stosowanych powszechnie substancji optymalnym dodatkiem okazała się L-metionina.

Doktorantka przytacza wyniki innych badaczy i nadal nie definiuje elementów nowości w stosunku do już opracowanych preparatów.

Sekcja związana z omawianiem internalizacji/eksternalizacji omawiana jest bardzo skrótowo, chociaż może być to zjawisko kluczowe dla oznaczeń diagnostycznych. Zawiera odniesienia do innych preparatów niż te będące przedmiotem Doktoratu.

Końcowe Sekcje dysertacji dokumentują biodystrybucję otrzymanych preparatów. Doktorantka podaje gdzie wykonywała badania, natomiast nie charakteryzuje aparatury i techniki. Nie uwzględnia również tego aspektu w dyskusji wyników. Uważam, że skoro nadrzędnym celem było otrzymanie preparatu znakowanego ^{99m}Tc , to dyskusja wyników biodystrybucji jest prowadzona w sposób niewłaściwie ukierunkowany. Dyskusja powinna koncentrować się na parametrach tego właśnie preparatu i podkreślać jego zalety w porównaniu z pozostałymi dwoma radiofarmaceutykami. Ponieważ deklarowanym celem jest detekcja zmian związanych z insulinoma (trzustka) i rakiem rdzeniastym tarczycy również w dyskusji biodystrybucji już na wczesnym etapie właściwe byłoby zwrócenie uwagi na wiązanie się preparatów z receptorami GLP-1R w trzustce i tarczycy. Niemniej Doktorantka wykazała swoiste gromadzenie się badanych preparatów w organach zawierających receptory GLP-R1, określiła drogę wydalania i wskazała główne zagrożenia dla organizmów diagnozowanych. Porównała wyniki dla różnych preparatów, różnych formułacji i różnych peptydów, chociaż nie wszystkie badania były wykonane dla wszystkich preparatów. Niektóre są podane dla zestawu dwufiolkowego, inne dla jednofiolkowego. Trudno zorientować się dla jakiego preparatu określono toksyczność ostrą. Wynika to z niestarannego podawania skrótów. Uważam, że toksyczność ostra powinna być zbadana dla zoptymalizowanego preparatu, który jest finalnym osiągnięciem Doktorantki.

Zakończenie dyskusji wyników, w którym omawiane są związki stosowane w terapii nowotworów nie do końca odpowiada celowi pracy. Chyba, że stanowi propozycje kierunku dalszych badań.

Praca kończy bardzo ważna Sekcja 4.10 dokumentująca skuteczność diagnostyczną ^{99m}Tc -HYNIC-Ex(II) w diagnozowaniu insulinoma i raka rdzeniastego tarczycy u ludzi zwłaszcza wtedy, gdy inne preparaty nie dawały odpowiedzi zgodnych z prognozami.

Wnioski są sformułowane szerzej niż temat pracy. Również do prac „dotyczących przedmiotu pracy” dołączono publikacje, które w moim odczuciu dotyczą nie tylko dysertacji, ale dokumentują cały dorobek naukowy Doktorantki.

Podsumowując swoją ocenę, chciałabym podkreślić znaczenie praktyczne przedstawionego osiągnięcia naukowego. Wiele dysertacji doktorskich koncentruje się na szczegółowych badaniach podstawowych, odsuwając opracowanie konkretnych procedur medycznych, terapeutycznych, czy farmakologicznych metod analitycznych na dalszy etap prac już nieobjętych doktoratem. W zaprezentowanej pracy przedstawiono pełną procedurę produkcji radiofarmaceutyku w warunkach szpitalnych i wykazano jego przydatność w warunkach klinicznych.

Sądzę, że przedstawione w recenzji niedociągnięcia opisu badań wynikają z chęci Doktorantki przedstawienia całości pracy badawczej realizowanej w ciągu wielu lat.

Wnioski końcowe

Ze względu na kompleksowe opracowanie formułacji radiofarmaceutyku i wykazanie jego skuteczności we wstępnych próbach u chorych z insulinoma i rakiem rdzeniastym tarczycy uważam, że przedstawiona dysertacja jest opracowaniem oryginalnym i spełnia wymagania Art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej wnioski o dopuszczenie Pani mgr Barbary Janoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

