



Uniwersytet  
Gdański



WYDZIAŁ CHEMII  
UNIwersytet GDAŃSKI

*Prof. dr hab. Krzysztof Rolka*  
KIEROWNIK KATEDRY BIOCHEMII MOLEKULARNEJ

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk  
tel. +48-58-5235088  
e-mail: krzysztof.rolka@ug.edu.pl

Gdańsk, 11 sierpnia 2023

**Ocena pracy doktorskiej mgr Katarzyny Sylwii Masłowskiej  
p.t. „Synteza i badania radioznakowanych peptydomimetycznych inhibitorów  
kompleksu VEGF/NRP-1 do diagnostyki patologicznej angiogenezy”**

Angiogeneza to proces tworzenia się naczyń włosowatych, zachodzi zarówno w okresie embrionalnym jak i pozapłodowym (okresowa odbudowa naczyń krwionośnych lub regeneracja uszkodzonych tkanek). Proces ten może mieć też charakter patologiczny. Takim jest neoangiogeneza, czyli tworzenie naczyń włosowatych w guzie nowotworowym, odgrywa zasadniczą rolę w jego rozwoju, a także tworzenie przerzutów. Stanowi więc przełomowy etap w rozwoju nowotworu. W proces angiogenezy zaangażowane są czynniki wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFs), które uruchamiają szlak sygnałowy tworząc trójskładnikowe kompleksy z receptorami czynnika wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych (RVEGFs) oraz koreceptorami neuropilinowymi (NRPs). Nadekspresja w komórkach nowotworu izoformy VEGF-A<sub>165</sub> (tworzącej kompleks z receptorem VEGFR-2 i koreceptorem NRP-1) stymuluje neoangiogenezę, a w konsekwencji warunkuje jego rozwój. Związki chemiczne hamujące tworzenie tego trójskładnikowego kompleksu, działają antyangiogenne, mają więc duży potencjał aplikacyjny jako leki przeciwnowotworowe. W nurt tej problematyki wypisują się zadania badawcze realizowane przez mgr Katarzynę Masłowską. Temat rozprawy bez

wątpienia leży w głównym nurcie współczesnej chemii biomedycznej, o czym przekonują liczne prace opublikowane w bardzo dobrych czasopismach z listy JCR, nawiązujące do przedstawionej powyżej problematyki.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska to 260 stron tekstu. Zasadnicze rozdziały pracy to: *Cele pracy* (2 strony), *Część teoretyczna* (32 strony), *Część doświadczalna* (62 strony), w tym podsumowanie wyników (6 stron) i wnioski (2 strony), kopie 3 prac współautorstwa Kandydatki i zgłoszenia patentowego, *Bibliografia* (301 pozycji) Rozprawę uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Recenzowana rozprawa ma formę pośrednią pomiędzy monografią naukową, a zbiorem opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Przyjęty przez Kandydatkę sposób redakcji rozprawy pozwala na jednoznaczną ocenę najważniejszych, wymaganych prawem, aspektów opracowania.

Celem badań prowadzonych przez Kandydatkę w ramach rozprawy doktorskiej była chemiczna synteza znaczonych radionuklidami związków hamujących oddziaływanie pomiędzy VEGF-A<sub>165</sub> i NRP-1 oraz ocena ich potencjału aplikacyjnego w jako radiofarmaceutyków (diagnostycznych i/albo terapeutycznych). Realizując zadania badawcze Doktorantka otrzymała serię kilkunastu koniugatów zawierających zarówno radionuklidy ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ ,  $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}$  lub  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ ), jak też trwałe izotopy tych pierwiastków, które następnie poddała badaniom fizykochemicznym (ocena lipofilowości oraz trwałości w układach stosowanych w diagnostyce i terapii radionuklidami), a także ich powinowactwa do NRP-1 w kontekście hamowania tworzenia kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1. Cel rozprawy (opracowanie radiofarmaceutyku) oceniam jako ambitny, a wybrane podejście stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Praca realizowana była w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Opiekę naukową nad Doktorantką sprawowały Panie dr hab. Ewa Gniazdowska, prof. IChT. (Promotorka) i prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik (Wydział Chemii UW, IMDiK PAN) – Kopromotorka. Pomoc merytoryczna ze strony znakomitych Specjalistek a także ich doświadczenie w realizacji zadań problematyki rozprawy bez wątpienia ułatwiło Doktorantce rozpoczęcie badań. Bardzo pozytywnie oceniam też zaplecze badawcze jednostek, w których realizowana była rozprawa.

W *Części teoretycznej* (chyba lepiej rozdział ten określić jako *Przegląd literaturowy*) Doktorantka wyróżniała trzy podrozdziały. W pierwszym charakteryzuje komponenty odpowiedzialnych za angiogenezę trójskładnikowych kompleksów VEGF/VEGFR/NRP. Omawia zarówno ich struktury pierwszorzędowe, najważniejsze elementy struktury przestrzennej kompleksów, jak też ich szlaki sygnalizacyjne. Kolejny podrozdział to zwięzła

charakterystyka związków hamujących tworzenie kompleksu VEGF-A<sub>165</sub> /NRP-1. W ostatnim zaś prezentuje najważniejsze aspekty medycyny nuklearnej, w tym techniki diagnostyczne i radioterapii, rodzaje promieniowania i sposoby ich emitowania, charakterystykę radionuklidów w kontekście ich stosowania w praktyce medycznej oraz radiofarmaceutyki (przykłady, budowa, etapy opracowania nowych leków). Lektura tego rozdziału dowodzi, że Autorka potrafi redagować tekst naukowy. Strona językowa tej części rozprawy nie budzi zastrzeżeń. Korekta pracy jest dokładna. Przegląd literaturowy ma charakter syntetyczny, niemniej przekonywająco uzasadnia celowość podjętych badań. Kandydatka przedstawia tu aktualny stan wiedzy, referując wyniki najnowszych prac, problematyki rozprawy. Bardzo wysoko oceniam też poziom merytoryczny obszernego (46 stron, 301 odnośników literaturowych) artykułu przeglądowego (Cancers, 13, 1072 (2021)), którego Doktorantka jest autorem korespondencyjnym. Dyskutowane w nim zagadnienia nawiązują bezpośrednio do problematyki rozprawy, a ich zakres znacznie szerszy niż oczekiwania stawiane przeglądowi literaturowym rozpraw doktorskich. Redakcja pracy jest na wysokim poziomie. Z obowiązku recenzenta wymienię kilka uwag do tego rozdziału. W polskojęzycznym tekście rozprawy wszystkie rysunki są w wersji angielskiej. Nie utrudnia to lektury pracy (także dzięki szczegółowym podpisom pod rysunkami), niemniej lepiej, aby język rozprawy był jednolity. W kilku miejscach np. str. 25 „*VEGF-A zawiera osiem eksonów*”; str. 29 „*strukturę krystaliczną eksonów 7 i 8 mysiego liganda VEGF-A164*”, Doktorantka używa pojęcia „akson” w stosunku do segmentów łańcucha polipeptydowego, a przecież odnosi się ono do kodujących fragmentów kwasu nukleinowego. Za niefortunne uważam tautologiczne określenie „*związki naturalne występujące w naturze*” (str. 34). Moją wątpliwość wzbudza sformułowanie „*receptory neuropilinowe są eksprymowane*” (str. 46). Nazwa „glikol polietylenowy” (str. 48) to niepoprawna nazwa poli(tlenku etylenu). Zamiast „*wysoka elastyczność*” (str. 50) poprawniej byłoby napisać np. duża swoboda konformacyjna.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym Część doświadczalna, znajduje się opis eksperymentów prowadzonych przez Kandydatkę. Włączone są to także, chociaż moim zdaniem powinny być wydzielane, niezbyt obszerne podrozdziały zatytułowane *Podsumowanie uzyskanych wyników* oraz *Wnioski*. Przedmiotem badań były trzy peptydy: A7R (Ala-Thr-Trp-Leu-ProArg), jego analog retroinwerso (<sup>p</sup>R7A), K4R (tetrapeptyd Lys-Dab-Pro-Arg, w którym do grupy ε-aminowej N-końcowej reszty Lys przyłączona była wiązaniem izopeptydowym L-homoarginina). Dwa kolejne związki to peptydomimetyk oznaczony jako KA\*AR (w sekwencji Lys-Ala-Ala-Arg wiązanie peptydowe między resztami alanin zastąpiono ugrupowaniem (-CH<sub>2</sub>-NH-) oraz drobnocząsteczkowy antagonist receptoru neuropiliny-1 o symbolu EG01377 (w tekście, także zgłoszeniu patentowym Doktorantka nie podała nie

polskiej nazwy tego związku). Związki te zostały wcześniej opisane w literaturze jako inhibitory tworzenia kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1. Przy czym dwa z nich K4R i KA\*AR zaprojektowane zostały przez zespół badawczy kierowany przez prof. dr hab. Aleksandrę Misicką-Kęsik. Wyżej wymienione związki zostały wyznakowane radionuklidami (<sup>68</sup>Ga]Ga, [<sup>44</sup>Sc]Sc lub [<sup>177</sup>Lu]Lu, jak też trwałymi izotopami tych pierwiastków. Te kompleksowane były przez kowalencyjne przyłączone do peptydów chelator DOTA (kwas 1,4,7,10-tetraazacyklodekano-1,4,7,10-tetraoctowy). Miejscem łączenia DOTA były grupy aminowe potencjalnych inhibitorów kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1, a łącznikiem (z wyjątkiem jednego koniugatu EG01377) pomiędzy cząsteczkami obu komponentów był kwas 6-aminoheksanowy (Ahx) lub L-lizyna. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów Doktorantka otrzymała serię kilkudziesięciu potencjalnych inhibitorów kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1 znaczonej promieniotwórczymi lub trwałymi izotopami galu, lutenu i skandu. Nie mam zastrzeżeń do doboru metod eksperymentalnych (wybór grup ochronnych, metod sprzęgania oraz analiz), jak też opisu prowadzonych eksperymentów. W wypadku wyników już opublikowanych, Doktorantka odwołuje się do dołączonych do rozprawy teksów tych prac, w których czytelnik znajdzie opisy bardziej szczegółowe. Peptydy syntetyzowane były manualnie z zastosowaniem klasycznej metody na nośniku stałym. Zarówno łączniki, jak i DOTA przyłączane były do peptydylożywicy. Syntezy pochodnych EG01377 Kandydatka prowadziła w roztworze. Zamieszczone w rozprawie wyniki analiz TLC, HPLC i MS przekonują o poprawności struktur otrzymanych związków. Pojedyncze piki na chromatogramach HPLC wskazują na jednorodność produktów, niemniej w niektórych wypadkach np. rys. 25 stężenie analizowanego związku jest zbyt duże i taką analizę należałoby powtórzyć. Chromatogramy HPLC radiokoniugatów (detekcja gamma) wskazują na jednorodność produktów. W wypadku odpowiednich koniugatów z trwałymi izotopami, na chromatogramach (detekcja UV) dla każdego z badanych związków znajduje się po kilka pików i adnotacja, że analizowano mieszaninę reakcyjną. Dla niektórych związków (np. Lys(DOTA-Sc)-A7R, rys. 54) sygnał pochodzący od właściwego produktu w znacznej części podrywa się z dominującym. W takim wypadku jego wydzielenie nie będzie zadaniem łatwym. W tym kontekście uważam za celowe zestawienie chromatogramów koniugatów z radioligandami uzyskanych przy detekcji gamma i UV. Jest to szczególnie istotne z uwagi na warunki wprowadzania jonów badanych pierwiastków do koniugatów. W temperaturze 95 °C trwałość peptydów jest ograniczona. Problem odporności syntetyzowanych związków na warunkach zbliżonych do tych, w jakich podaje się farmaceutyki został zreferowany w kolejnym podrozdziale. Doktorantka przeprowadziła analizę trwałości radiokoniugatów w buforze o pH 7,4, roztworach cysteiny, histydyny oraz surowicy ludzkiej. Badane związki były trwałe w trzech pierwszych

roztworach. Niestety, w surowicy ludzkiej wszystkie radiokoniugaty peptydowe ulegały szybkiej proteolizie, co znacznie ogranicza ich potencjał aplikacyjny w praktyce medycznej. Znacznie bardziej obiecujące okazały się wyniki dla koniugatów bazujących na niepeptydowym związku EG01377, które w opisanych wyżej warunkach eksperymentalnych, w tym i surowicy ludzkiej praktycznie nie ulegały rozpadowi. Ważną weryfikacją hipotezy badawczej była ocena zdolności badanych koniugatów (analogi zawierające trwałe izotopy) do hamowania tworzenia kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1. Badania, w których brała udział także Doktorantka, zostały przeprowadzone w Zakładzie Neuropeptydów Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN przez dr Patrycję Redkiewicz. Wyznaczona metodą ELISA wartość IC<sub>50</sub> (4,99 ± 0,17 μM) potwierdziła doniesienia literaturowe o wysokiej aktywności związku EG01377. Oba badane koniugaty (Sc-DOTA-EG i Sc-DOTA-Ahx-EG) tego inhibitora charakteryzowały się wysoką aktywnością, przy czym koniugat, w którym chelator połączony był bezpośrednio z grupą aminową inhibitora zachował aktywność macierzystego związku. Równie wysokie powinowactwo do NRP-1 wykazał peptyd K4R, jednak aktywność odpowiedniego koniugatu w kompleksie z jodem skandu była kilkukrotnie niższa. Zbliżone wartości IC<sub>50</sub> uzyskano dla koniugatów A7R. W tym wypadku decydujący wpływ na aktywność miało powinowactwo wolnego peptydu (IC<sub>50</sub> = 17,47 ± 1,49 μM), a nie jego modyfikacje. Dwa pozostałe związki (<sup>125</sup>I-R7A i KA\*AR) były w warunkach eksperymentu praktycznie nieaktywne.

W podrozdziale zatytułowanym *Podsumowanie otrzymanych wyników* Kandydatka w sposób syntetyczny dyskutuje uzyskane wyniki, odsyłając czytelnika do dołączonych tekstów prac oryginalnych, gdzie te zagadnienia omawiane są bardziej szczegółowo. Wysoko oceniam wartość merytoryczną badań wykonanych przez Doktorantkę. Co prawda wrażliwość otrzymanych radiokoniugatów peptydowych na działanie enzymów praktycznie uniemożliwia dalsze prace nad ich wykorzystaniem jako radiofarmaceutyki, niemniej prezentowane wyniki wskazują, że ich modyfikacje (wprowadzenie łącznika, chelatora i radionuklidu) skutkuje otrzymaniem związków zachowujących powinowactwo do receptora NRP-1. Badania te (wyniki opublikowane w dwóch pracach w czasopismach z listy JCR) wnoszą istotny wkład w badanie tej grupy związków, a koniugaty peptydowe otrzymane przez Kandydatkę stanowią interesujące struktury wyjściowe w projektowaniu kolejnych generacji potencjalnych radiofarmaceutyków. Ograniczona trwałość peptydów w układach biologicznych to największe organicznie w ich wykorzystaniu w praktyce medycznej. W dyskusji wyników Doktorantka zaproponowała kilka potencjalnych modyfikacji peptydów mających zwiększyć ich trwałość. Nie ma wśród nich tworzenia układów cyklicznych, a te moim zdaniem mają największy potencjał. Wyniki uzyskane dla radiokoniugatów EG01377 w pełni rekompensują nieco

rozczarowujące wyniki uzyskane dla związków o charakterze peptydowym. Związki te okazały się trwałe także w surowicy ludzkiej, zachowując wysokie powinowactwo do receptora neuropilinowego. Zostały objęte ochroną patentową i są przedmiotem pogłębionych badań pod kątem ich wykorzystania w medycynie nuklearnej. Wysoko oceniam stronę redakcyjną tego rozdziału. Jego lektura przekonuje, że Kandydatka potrafi wykazać samodzielnie prowadzić badania naukowe, analizować uzyskane wyniki i prezentować je w formie opracowania o charakterze naukowym. Moja uwaga o charakterze redakcyjnym to niepotrzebne, moim zdaniem, powtarzanie opisów tych samych procedur syntetycznych dla otrzymania różnych związków. Lepiej byłoby przedstawić te eksperymenty w sposób zbiorczy. Doktorantka podejmuje próbę wyjaśnienia uzyskanych wyników. Takie podejście oceniam bardzo pozytywnie, aczkolwiek niektóre z hipotez, z uwagi na brak dowodów eksperymentalnych, uważam za nieco spekulacyjne. Mam natomiast zastrzeżenia do fragmentu, w którym Kandydatka proponuje metodę identyfikacji miejsc proteolizy radiokoniugatu [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-Ahx-A7R (str. 109). Chemiczna synteza wszystkich potencjalnych produktów proteolizy (fragmentów peptydu), uwzględniając obecne metody analityczne, jest niecelowa. Zdecydowanie najlepszą (praktycznie jedyną dzisiaj stosowaną) metodą analizy sekwencyjnej peptydów jest spektrometria mas (MS, LC-MS).

Uważam, że mgr Katarzyna Masłowska przedłożyła interesującą i oryginalną w treści rozprawę doktorską. Wysoko oceniam poziom merytoryczny badań wykonanych przez Doktorantkę. Po lekturze dysertacji stwierdzam, że Kandydatka jest bardzo wykształconą chemiką, zarówno od strony teoretycznej jak też praktycznej, tym samym przygotowana jest do prowadzenia badań naukowych. Temat podjęty przez Doktorantkę jest atrakcyjny z punktu widzenia badań podstawowych, a także aplikacyjnych, o czym świadczy między innymi fakt opublikowania części wyników rozprawy w czasopismach z list JCR (dwie prace oryginalne i jedna przeglądowa) oraz objęcia najciekawszych ochroną patentową. Reasumując, recenzowana rozprawa doktorska: prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne, wykazuje umiejętność Kandydatki samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Tym samym spełnia wymagania ustawowe (art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. 2018, poz. 1668) oraz zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie o dopuszczenie mgr Katarzyny Sylwii Masłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

