

Dr hab. Piotr Garnuszek  
Ośrodek Radioizotopów POLATOM  
Narodowe Centrum Badań Jądrowych  
Ul. Andrzeja Sołtana 7  
05-400 Otwock  
[piotr.garnuszek@polatom.pl](mailto:piotr.garnuszek@polatom.pl)

Warszawa, dn. 25.09.2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**Pana mgr Rafała Walczaka**

**pt.: „Radionuklidy skandu dla radiofarmaceutyków teranostycznych”**

**Promotor: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz**

**Promotor pomocniczy: dr hab. Marek Pruszyński**

Rozprawa doktorska powstała dzięki możliwości współpracy Doktoranta z krajowymi i zagranicznymi jednostkami posiadającymi cyklotrony i kadrę niezbędną do ich obsługi. Główną część badań Doktorant przeprowadził w ramach wspólnego grantu IChTJ ze Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów UW. Współpracował również z Instytutem Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN i centrum cyklotronowym ARRONAX we Francji, gdzie badane były reakcje cyklotronowego otrzymywania  $^{47}\text{Sc}$ :  $^{48}\text{Ca}(p,2n)^{47}\text{Sc}$  i  $^{48}\text{Ca}(p,d)^{47}\text{Ca} \rightarrow ^{47}\text{Sc}$ . Korzystał z aparatury i doświadczenia specjalistycznych zespołów w zakresie technik fizyko-chemicznych: ICP-MS (Laboratorium Jądrowych Techniki Analitycznych IChTJ), MALDI-TOF (Pracownia Peptydów UW).

Przedstawiona do oceny rozprawa napisana jest w sposób klasyczny i składa się z przeglądu literaturowego (107 pozycji), części eksperymentalnej, dyskusji wyników, podsumowania i wniosków. Praca liczy 120 stron i zawiera 36 rysunków oraz 28 tabel z wynikami badań, które umożliwiają śledzenie i analizę treści dysertacji. Przedstawiony na stronie 111 rozprawy dorobek naukowy Doktoranta stanowią 4 publikacje w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, praca w recenzji oraz zgłoszenie patentowe nr P.415874 wynalazku, który został nagrodzony złotym medalem na XI Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Wynalazków IWIS 2017. W dwóch publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem. Dorobek Doktoranta znacząco przewyższa ustawowe wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora i świadczy o jego naukowej dojrzałości. Opublikowane i zgłoszone prace dotyczą zagadnień związanych z otrzymywaniem i zastosowaniem radionuklidów skandu do celów medycznych. Świadczy to o dużym doświadczeniu i znajomości zagadnień, które były przedmiotem badań Doktoranta w zaprezentowanej rozprawie.

## Zakres merytoryczny pracy

Celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej było opracowanie wydajnej metody produkcji radionuklidów skandu ( $^{43}\text{Sc}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  i  $^{47}\text{Sc}$ ) oraz metody wytwarzania radiofarmaceutyków opartych na radionuklidach skandu. Ten cel nadrzędny Doktorant postanowił osiągnąć poprzez realizację kilku celów szczegółowych: (a) opracowanie wydajnych metod produkcji radionuklidów  $^{43}\text{Sc}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  i  $^{47}\text{Sc}$  na tarczach  $\text{CaCO}_3$  i  $\text{TiO}_2$ , (b) określenie optymalnych warunków wydzielania radionuklidów skandu z tarczy wraz z odzyskiem materiału tarczowego, (c) znalezienie liganda trwale kompleksującego radionuklidy skandu w niskich temperaturach, (d) określenie wpływu zanieczyszczeń metalicznych na wydajność procesu kompleksowania, (e) syntezę nowych radiobiokoniugatów wykorzystując przeciwciało monoklonalne trastuzumab oraz nanociało 2Rs15d, (f) określenie właściwości nowo zsyntezowanych radiobiokoniugatów.

W części literaturowej (23 strony), Doktorant przedstawił ogólny zarys medycyny nuklearnej, stosowane radiofarmaceutyki, metody diagnostyczne SPECT, PET i CT, metody terapeutyczne z zastosowaniem radionuklidów. Co prawda w tym rozdziale Doktorant skupia się jedynie na metodzie brachyterapii i celowanej terapii radionuklidowej, pomijając dużo bardziej masową i standardową terapię jodem-131, terapię paliatywną ( $^{89}\text{SrCl}_2$ ,  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ , Xofigo  $^{223}\text{RaCl}_2$ ), czy radiosynowektomię (koloidalny  $^{90}\text{Y-cytrynian}$ ). W następnych rozdziałach Doktorant naświetlił nowoczesne trendy w medycynie, polegające na zindywidualizowanym podejściu do pacjenta i zastosowaniu w schematach diagnostyczno-terapeutycznych leków teranostycznych. W kolejnych rozdziałach przedstawił charakterystykę skandu i jego związków oraz potencjalnie użyteczne radioizotopy skandu ( $^{43}\text{Sc}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ) i omówił metody ich otrzymywania. Na podkreślenie zasługuje fakt krytycznej analizy możliwości wytwarzania poszczególnych izotopów skandu z uwzględnieniem zarówno mocy i typu obecnie dostępnych na świecie cyklotronów jak i materiałów tarczowych, w tym stopnia ich wzbogacenia w pożądane radionuklidy macierzyste. Część literaturową kończy rozdział poświęcony opublikowanym wynikiem otrzymywania różnorodnych związków z radionuklidami skandu i ich pierwszego zastosowania u pacjentów, m.in.  $^{44}\text{Sc-DOTATOC}$  czy  $^{44}\text{Sc-PSMA-617}$ .

Radionuklidy skandu bez wątpienia stanowią perspektywiczne narzędzia medycyny nuklearnej, w tym przede wszystkim w aspekcie diagnostycznym PET ( $^{43/44}\text{Sc}$ -znakowane peptydy, przeciwciała i ich fragmenty) jak i w walce z nowotworami o charakterze rozsiałym (związki znakowane  $^{47}\text{Sc}$ ). Mogą być użyte jako pary teranostyczne, co dzięki takiej samej chemii radionuklidu diagnostycznego ( $^{43/44}\text{Sc}$ ) i terapeutycznego ( $^{47}\text{Sc}$ ), a co za tym idzie takiej samej farmakokinetyce w organizmie żywym, w sposób dalece perspektywiczny stwarza możliwość zindywidualizowanej terapii pacjentów nowotworowych. Dłuższe okresy półtrwania diagnostycznych radionuklidów  $^{43}\text{Sc}$  i  $^{44}\text{Sc}$  w porównaniu do popularnego

radionuklidu  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 68$  min) sprawiają, że można te izotopy zastosować do znakowania przeciwciał i ich struktur pochodnych, o dłuższym okresie biologicznego półtrwania.

Wymaga podkreślenia, że podjęta przez Doktoranta tematyka wydajnego otrzymywania radionuklidów skandu i radiofarmaceutyków opartych na tych radionuklidach jest z praktycznego punktu widzenia aktualna i bardzo ważna.

### **Ocena metodologiczna dysertacji**

Doktorant zaproponował nową metodę otrzymywania radionuklidu  $^{47}\text{Sc}$  w reakcji  $^{48}\text{Ca}(p, 2n)^{47}\text{Sc}$  z zastosowaniem średnio energetycznego cyklotronu 30 MeV. Wraz ze współpracownikami określił optymalną energię przyspieszanych protonów na 24->17 MeV. Używając tarczy naturalnego wapnia z zawartością izotopu  $^{48}\text{Ca}$  na poziomie 0,187% otrzymuje się również izotopy  $^{48}\text{Sc}$  (14,7% w EOB) i  $^{46}\text{Sc}$  (0,25%).

Bardzo pozytywnym aspektem prac doświadczalnych i krytycznej analizy uzyskanych rezultatów jest rzetelne podsumowanie możliwości otrzymywania radionuklidów skandu, ze wskazaniem ograniczeń zarówno technicznych (w niektórych przypadkach konieczność zastosowania wysokoenergetycznych cyklotronów), jak i ekonomicznych (wysokie koszty materiału tarczowego). Przetestowane metody wydzielenia radionuklidów skandu ze wskazaniem tych najbardziej efektywnych (mikrofiltracja) oraz doprowadzenie radionuklidów skandu do postaci prekursorów radionuklidowych użytecznych do znakowania związków biologicznie czynnych (zastosowanie kolumny DOWEX 50WX4 do wymiany eluentu) stanowią podwaliny do opracowania zautomatyzowanych metod otrzymywania radionuklidów skandu o statusie prekursorów radiofarmaceutycznych.

Doktorant przeprowadził szacunek kosztów otrzymywania poszczególnych radionuklidów skandu w zależności od wzbogacenia tarczy i zastosowanej metody napromieniania. To bardzo istotny aspekt, ukierunkowujący badaczy na potencjalnie najbardziej ekonomiczną metodę pozyskania radionuklidów skandu. Przeprowadził izolację radioaktywnych nuklidów skandu z zastosowaniem opublikowanych metod. Stwierdził, że metoda filtracyjna jest najbardziej efektywna. Metodą mikrofiltracji uzyskał również wysoki odzysk materiału tarczowego  $\text{CaCO}_3$  (91%), a w przypadku tarczy  $\text{TiO}_2$  najlepsze efekty uzyskał z zastosowaniem żywicy DGA (94-98%).

### **Uwagi krytyczne**

W trakcie lektury dysertacji nasuwa się szereg pytań i wątpliwości, z których najistotniejsze pozwolę sobie wypunktować poniżej. W opinii recenzującego w pracy brakuje pogłębionej analizy poruszanych problemów naukowych i praktycznych otrzymywania i stosowania radionuklidów skandu. Poniżej przykłady.

1) Rozdziały 7.8 i 8.7. Otrzymywanie kompleksów  $^{46}\text{Sc}$  z ligandami bifunkcyjnymi (BFC): DOTA, DTPA, EGTA, THP, HBED i Lumi-4.

To bez wątpienia najstabsza część pracy doktorskiej mgr Rafała Walczaka. Zdaniem recenzującego podejście Doktoranta do problemu kompleksowania jonów skandu z ligandami bifunkcyjnymi jest niepoprawne metodycznie i naukowo, a uzyskane przez Doktoranta wyniki przedstawione w tej części mogą w dodatku wprowadzić czytelnika w błąd. Doktorant twierdzi, że „Wszystkie roztwory ligandów zostały doprowadzone do pH 4,5 buforem octanowym, co stanowi optymalne środowisko do badań znakowania biokoniugatów radionuklidami skandu.” Nie przeprowadził badań nad tworzeniem kompleksów w szerszym zakresie pH. W cytowanym przez Doktoranta artykule *S. Huclier-Markai et al. Optimization of reaction conditions for the radiolabeling of DOTA and DOTA-peptide with  $^{44\text{m}/44}\text{Sc}$  and experimental evidence of the feasibility of an in vivo PET generator. Nucl Med Biol 41 (2014) e36–e43*, autorzy prezentują wyniki szczegółowych badań nad znakowaniem tylko jednego z BFC – DOTA. Na podstawie wyników systematycznych badań w zakresie pH od 2 do 6, w zakresie temperaturowym od 25°C do 90°C, stosunku M: L od 1:10 do 1:1000 i w różnych czasach reakcji, doszli do wniosku, że najwyższą wydajność znakowania  $^{44\text{m}/44}\text{Sc}$  peptydu DOTATATE (>98%) uzyskuje się przy stosunku M:L 1:500, prowadząc reakcję w buforze octanowym o pH = 4, w temperaturze 90°C przez 20 min. W innym artykule opublikowanym przez *M. Połosak, et al. Stability of  $^{47}\text{Sc}$ -complexes with acyclic polyamino-polycarboxylate ligands. J Radioanal Nucl Chem (2013) 295:1867–1872*, autorzy badali reakcje kompleksowania i stabilność kompleksów  $^{47}\text{Sc}$  z acyklicznymi ligandami bifunkcyjnymi: DTPA, HBED, BAPTA, EGTA, TTTHA i deferoksaminą. Przeprowadzone badania wykazały, że w środowisku o pH = 6.0, ponad 96% jonów  $^{46}\text{Sc}$  było kompleksowane przez badane ligandy (oprócz HBDE) już przy stosunku molowym M:L = 1:1. Badania stabilności wykazały, że w temperaturze pokojowej Sc tworzy z kwasem etyleno glikoilo-bis(2-aminoetyloetero)-N,N,N',N'-czterooctowym (EGTA) bardzo silne i stabilne kompleksy i zgodnie z wnioskiem autorów ten BFC może z powodzeniem być stosowany do otrzymywania znakowanych preparatów w oparciu o białka i przeciwciała. Doktorant nie odniósł się do tych wyników. Przeprowadził badania kompleksowania tylko w środowisku o pH 4.5, co doprowadziło do oczywistej obserwacji wydajnego kompleksowania jonów skandu tylko w przypadku DOTA i DTPA. Rozdział ten nie wnosi zatem żadnego nowego aspektu do chemii koordynacyjnej skandu.

2. Doktorant nie przeprowadził oceny i dyskusji na temat istotności poszczególnych parametrów jakościowych otrzymywanych radionuklidowych prekursorów skandu do radioznakowania cząsteczek biologicznie czynnych w celu otrzymania teranostycznych radiofarmaceutyków. Nie jest zatem pomocny do opracowania standardów jakościowych dla poszczególnych izotopów skandu.

*Inne aspekty budzące wątpliwości:*

- str. 7 – „Z przeprowadzonych badań wynika, że związki oparte na radionuklidach skandu przyłączonych do trastuzumabu lub nanociała 2R<sub>s</sub>15d spełniają wymagania stawiane radiofarmaceutynom.” Niestety nie zauważyłem w pracy rzetelnej dyskusji na temat parametrów jakościowych uzyskanych preparatów, więc wysnuty wniosek uważam za zbyt wczesny. Radiofarmaceutyki to produkty lecznicze, które muszą spełniać szereg wymagań jakościowych, określonych w prawie farmaceutycznym. Na dzień dzisiejszy nie zostały jeszcze opracowane normy jakościowe dla radionuklidów skandu o statusie prekursorów radiofarmaceutycznych, co wynika głównie z trudności otrzymania pożądanego radionuklidu skandu o wysokiej czystości radionuklidowej.

- Tabela 17 – po zastosowaniu kolejnego etapu oczyszczania materiału po mikrofiltracji zawartość Zn i Cu wzrasta po oczyszczaniu/wymianie eluentu na żywicy Dowex 50WX4? Proszę wyjaśnić.

#### **Konkluzja końcowa**

Mimo wymienionych uwag krytycznych i dostrzeżonych uchybień metodologicznych, pozytywne aspekty pracy przewyższają wady dysertacji, a w związku z tym wydaję ogólną pozytywną ocenę rozprawy. Doktorant uzyskał szereg wartościowych wyników i posiadał wiedzę teoretyczną i praktyczną z zakresu cyklotronowego otrzymywania radionuklidów skandu, chromatograficznych metod ich wydzielenia i oczyszczania, fizyko-chemii i badań in vitro nad związkami skandu oraz zdobył umiejętność zarówno samodzielnego prowadzenia pracy naukowej jak i w zespołach badawczych. Stwierdzam zatem, że spełnione zostały wszelkie wymagania stawiane tego typu opracowaniom i stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie o przyjęcie rozprawy doktorskiej pt.: „**Radionuklidy skandu dla radiofarmaceutyków teranostycznych**” i dopuszczenie mgr Rafała Walczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Piotr Garnuszek