

Recenzja osiągnięcia naukowego

pt: **Projektowanie, synteza i charakterystyka koniugatów znakowanych Ga-68 oraz Tc-99m do diagnostyki choroby Alzheimera, stopy cukrzycowej i reumatoidalnego zapalenia stawów metodą PET I SPECT**

oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego

dra Przemysława Andrzeja Koźmińskiego w związku z postępowaniem habilitacyjnym prowadzonym przez Radę Naukową Instytutu Chemii I Techniki Jądrowej w Warszawie.

Podstawą przedłożenia niniejszej opinii jest uchwała Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie z dnia 10 października br. powołująca mnie na recenzenta dorobku habilitacyjnego Pana dra Przemysława Koźmińskiego.

Pan dr Przemysław Koźmiński ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w roku 2004 broniąc pracę magisterską napisaną pod kierunkiem prof. dra hab. Marka Trojanowicza dotyczącą zateżania śladowych ilości analitów w bezprzewodowej analizie przepływowo-wstrzykowej. Następnie kontynuował edukację na studiach doktoranckich i w roku 2012 uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na podstawie rozprawy doktorskiej związanej z syntezą i badaniami właściwości fizykochemicznych koniugatów kompleksów technetu-99m z wybranym peptydem. Promotorem tej rozprawy był prof. dr hab. Jerzy Ostyk-Narbutt. W Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej Pan Koźmiński jest zatrudniony od roku 2007 początkowo na stanowisku chemika a obecnie adiunkta. Przez półtora roku (luty 2005 - wrzesień 2006) był związany z Uniwersytetem w Coimbrze, w Portugalii gdzie uczestniczył w realizacji projektu naukowego Novel Technology for Controlling Wine Production and Quality „NovTech”, HPRN-CT-2002-00186). Pan dr Koźmiński w trakcie swojej dotychczasowej działalności naukowej uzyskał łącznie ponad 20 różnego rodzaju nagród indywidualnych oraz zespołowych – stypendia, granty wyjazdowe, nagrody IAEA, nagrody



konferencyjne czy Dyrektora IChTJ co świadczy o jego aktywności naukowej. Zainteresowania naukowe Habilitanta skupiają się wokół syntezy i charakterystyki biologicznie czynnych układów w kontekście diagnostyki i terapii różnego rodzaju schorzeń.

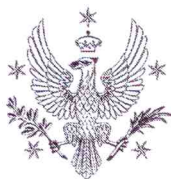
Ocena osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę wniosku składa się z cyklu 9 publikacji o łącznym IF równym 32,292, z których to 8 jest pracami oryginalnymi a 1 pracą przeglądową. We wszystkich pracach Pan dr Koźmiński jest autorem korespondencyjnym, z czego w 7 także pierwszym autorem. Załączone oświadczenia współautorów wskazują, że jego wkład w powstanie wszystkich prac był znaczący. Dotyczył on sformułowania koncepcji oraz celu badań, przeprowadzenia i interpretacji części chemicznej uzyskanych wyników, przygotowania manuskryptów i odpowiedzi na recenzje.

Prace stanowiące opiniowany cykl skupiają się na 4 głównych obszarach badawczych związanych z wydzielaniem Tc-99m oraz wykorzystaniem radioizotopów Ga-68 oraz Tc-99m. Podejście zaprezentowane przez Habilitanta jest kompleksowe i obejmuje oczyszczanie radionuklidu Tc-99m od molibdenu [H9] a także syntezę, charakterystykę fizykochemiczną oraz badania biologiczne koniugatów zawierających Ga-68 i Tc-99m [H1-H8]. Koniugaty te analizowano w kontekście ich wykorzystania podczas badania zmian neurodegeneracyjnych [H1-H3], diagnostyki zespołu stopy cukrzycowej [H4-H6] oraz reumatoidalnego zapalenia stawów [H7, H8].

Podjęty przez dra Koźmińskiego temat bardzo dobrze wpisuje się we współczesne, światowe trendy badań z zakresu wykorzystania radioizotopów w diagnostyce medycznej.

Jednym z obszarów badawczych obecnie intensywnie eksplorowanych jest alternatywne do reaktorowego pozyskiwanie Mo-99. Izotop ten jest izotopem macierzystym w generatorach Mo-99/Tc-99m. Obecnie otrzymuje się go głównie poprzez separację z napromieniowanych tarcz uranowych wzbogaconych w U-235. Problem polega jednak na tym, że proces ten jest realizowany głównie w reaktorach badawczych, których wiek jest już znaczący a przez to w całym procesie produkcyjnym muszą być uwzględniane długie przerwy konserwacyjne. Innym aspektem jest zagadnienie nieprolifracji materiałów rozszczepialnych. Mając na uwadze powyższe poszukuje się nowych metod pozyskiwania Mo-99. Izotop ten może być otrzymywany na drodze reakcji fotojądrowej $^{100}\text{Mo}(\gamma, n)^{99}\text{Mo}$ prowadzonej w akceleratorach. Otrzymywany Mo-99 ulega rozpadowi do pożądanego Tc-99m. Z punktu widzenia ekonomiki



procesu, ważne jest efektywne rozdzielenie technetu od molibdenu oraz po pewnym czasie powtórne napromieniowanie i otrzymania nowej porcji Mo-99.

Zaprezentowane w pracy [H9] wyniki badań omawiają półautomatyczny zestaw do oczyszczania technetu-99m od molibdenu. Co ważne, zestaw skonfigurowano tak, że otrzymany preparat zawiera jony TcO_4^- w roztworze soli fizjologicznej. Zastosowanie 3 kolumn z różnymi złożami (AnaLig®Tc-02, DOWEX-50 WX2 i tlenek glinu Al_2O_3) umożliwiło efektywną i szybką separację rozważanych izotopów pierwiastków. Dodatkowe badania chromatograficzne wykazały przydatność pozyskiwanego Tc-99m do syntezy wybranego radiofarmaceutyku – Tc-DTPA przy zadowalającej wydajności znakowania.

Pozostałe prace [H1-H8] skupiają się na zastosowaniu Ga-68 i/lub Tc-99m podczas syntezy koniugatów umożliwiających diagnostykę postępu niezmiernie ważnych chorób cywilizacyjnych – choroby neurodegeneracyjnej, zmian związanych z postępującą cukrzycą czy reumatoidalnego zapalenia stawów. Pan dr Koźmiński wykorzystał popularne radioizotopy, których dostępność na rynku możliwa jest dzięki istnieniu generatorów Mo-99/Tc-99m czy też Ge-68/Ga-68. Technet jest pierwiastkiem leżącym w bloku d układu okresowego. Może on występować na wielu stopniach utlenienia, na których to może być skompleksowany odpowiednimi związkami organicznymi. Samo zagadnienie wydaje się być proste jednak niewłaściwe warunki redukcji Tc(VII) prowadzą do otrzymania niepożądanego TcO_2 lub rozkładu aktywnie czynnej molekuly przyłączonej do radioizotopu. Zastosowanie dużych molekuł organicznych w tym kontekście stanowiło wyzwanie preparatywne a otrzymane wyniki wskazują na bardzo dobre opanowanie przez dra Koźmińskiego technik syntezy skompleksowanych form technetu na pośrednich stopniach utlenienia i ich stabilizacji w płynach ustrojowych. Zagadnienie poruszane w cyklu publikacji wpisuje się w najważniejsze trendy badań radioizotopowych służących tworzeniu preparatów umożliwiających jak najwcześniejszego określenie zmian chorobowych w organizmie. Choroby cywilizacyjne w sposób istotny skracają życie i odpowiadają za znaczący odsetek przedwczesnych zgonów, dlatego też eksplorowany przez Habilitanta obszar badawczy jest niezmiernie ważny.

Prace [H1-H3] dotyczą poszukiwania radiofarmaceutyków dedykowanych diagnostyce choroby Alzheimera. Otrzymanie trwałego preparatu, który pokonywałby efektywnie barierę krew-mózg stanowi wyzwanie. Badania dra Koźmińskiego skupiły się na syntezie koniugatów zawierających pochodne takryny. Związek ten, jako inhibitor acetylocholiestrazy, hamuje aktywność tego istotnego enzymu odpowiedzialnego za rozkład acetylocholinyl. Zaburzenie w gospodarce tego ostatniego związku jest związane z postępującymi zmianami



neurodegeneracyjnymi. W ramach prac Habilitant skupił się na syntezie i charakterystyce fizykochemicznej nowych analogów takryny znakowanych Tc-99m. W pracy [H1] do pochodnej takryny przyłączono ester imidobursztynianowy kwasu izocyjanomasłowego, w którym grupa izonitrylowa pełniła rolę ligandu monodentnego obok tetradentnego ligandu tris(2-merkaptoetylo)aminy. Badania wykazały, że otrzymane radiokoniugaty wykazują się wysoką stabilnością w surowicy ludzkiej czy wobec nadmiaru aminokwasów np. cysteiny lub histydyny. Badania *in vivo* wykazały wychwyty zsyntezowanego znacznika w mózgu. Warto tutaj podkreślić, że opisane wyniki badań są bardzo szerokie od wnikliwej analizy fizykochemicznej otrzymanych koniugatów, przez modelowanie molekularne umożliwiające określenie kluczowych oddziaływań, po badania biologiczne.

Kolejna publikacja [H2] dotyczyła również syntezy związku na bazie pochodnych takryny, jednak poprzez wyznakowanie Tc-99m z użyciem chelatora Hynic. W tym przypadku otrzymane układy wykazywały się inną niż poprzednie lipofilowością. Także w przypadku tego układu badania fizykochemiczne wykazały wysoką stabilność wobec obecnych aminokwasów (cysteiny i histydyny) oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym czy ludzkiej surowicy.

W pracach [H2, H3] pochodne takryny były wyznakowane galem-68 z użyciem DOTA-NHS. W przypadku otrzymanych koniugatów otrzymano stabilne układy charakteryzowane porównywalnymi wartościami logD do tej opisanej dla koniugatu z Tc-99m.

W pracy [H3] do znakowania użyto także innych chelatorów takich NODAGA-NHS. Otrzymane radiobio-koniugaty charakteryzowały się obiecującymi wartościami parametru logD. W toku dalszych pracy wybrano $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-Bn-NH}(\text{CH}_2)_9\text{Tac}$ i $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-THP-NH}(\text{CH}_2)_9\text{Tac}$ wykazując, że oba znaczniki są skutecznymi inhibitorami cholinoestraz. Analiza właściwości otrzymanych radiokoniugatów wykazała, że $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-Hynic-NH}(\text{CH}_2)_9\text{Tac}$ charakteryzuje się podobnym wychwytem w mózgu do komercyjnie dostępnego preparatu znakowanego Tc-99m. Dodatkowo, prace dra Koźmińskiego wykazały, że badane radiokoniugaty charakteryzują się wychwytem także w płucach [H3], co potencjalnie może służyć do oceny stanu płuc pacjenta cierpiącego na chorobę Alzheimera.

Kolejny obszar badawczy eksplorowany przez dra Koźmińskiego dotyczył związków służących do oceny zespołu stopy cukrzycowej [H4-H6]. Otrzymane przez dra Koźmińskiego układy zawierały, oprócz wspomnianych radioizotopów, antybiotyki – cyprofloksacyną (CIP) [H4] i cefepim (CFM) [H5, H6]. Dużym wyzwaniem była tutaj synteza radiokoniugatów zawierających aktywne formy antybiotyków. Zsyntezowane układy zawierały radionuklidy technet-99m ($[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-CIP}$) lub



gal-68 ($[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}^{\text{TA}}\text{-CIP}$). Tak jak w powyżej omawianych pracach, ich właściwości fizykochemiczne zostały także opisane, uzupełnione w tym przypadku o badania wobec wybranych szczepów bakterii. Wobec wysokiej aktywności biologicznej CIP preparat $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-CIP}$ okazał się niecałkowicie stabilny w surowicy, jednak na tyle trwały, że możliwe było wykonanie obrazowania SPECT. Badania dra Koźmińskiego wykazały, że jest on wychwytywany przez wątrobę, śledzionę, nerki i płuca, a w przypadku osób z zespołem stopy cukrzycowej także w zainfekowanej części stopy. Związek $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}^{\text{TA}}\text{-CIP}$ wykazał się bardziej trwały od poprzedniego. Charakteryzował się jednak niższym parametrem lipofilowości, co skutkowało inną siłą wiązania z komórkami bakteryjnymi.

Drugim antybiotykiem użytym jako wektor był cefepim. Związek ten należy do antybiotyków β -laktamowych o szerokim spektrum działania wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W celu określenia struktury badanego związku (Tc-DTPA-CFM) dr Koźmiński zsyntezował radiokoniugat z zastosowaniem chelatora DTPA. Otrzymany związek okazał się być silnie hydrofilowy, stabilny w obecności cysteiny i histydyny oraz w surowicy ludzkiej. Jednocześnie okazał się on aktywny wobec analizowanego szczepu bakterii, co wskazuje na zachowanie trwałości antybiotyku wchodzącego w skład koniugatu. Syntezy radiokoniugatu zawierającego CFM powtórzono wykorzystując Ga-68 otrzymując $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-Glu-CFM}$. Warto nadmienić, że badania te są jednymi z pierwszych dla tej klasy układów.

Na uwagę zasługuje fakt, że dr Koźmiński krytycznie podchodzi do doniesień literaturowych dotyczących np. struktur związków będących bardzo podobnymi do analizowanych. Świadczy to o jego dojrzałości naukowej i szerokiej wiedzy w analizowanym obszarze.

Radioizotop Tc-99m został wykorzystany przez dra Koźmińskiego także do syntezy i charakterystyki preparatu służącego do diagnostyki reumatoidalnego zapalenia stawów zawierającego lek metotreksat (MTX). Cieszy się on dużą popularnością i jest powszechnie stosowany w medycynie - od wielu lat w leczeniu nowotworów czy zaburzeń autoimmunologicznych. Otrzymane wyniki oraz krytyczna dyskusja doniesień literaturowych związanych z syntezą radiopreparatów zawierających Tc-99m zostały zawarte w publikacjach [H7] oraz [H8]. W przeglądowym artykule [H7] omówiony został ogólny mechanizm działania MTX oraz jego zastosowanie immunosupresyjne, przeciwnowotworowe, w leczeniu reumatoidalnych zmian zapalnych czy neurodegeneracyjnych. Warto nadmienić, że praca ta z 2020 roku była już cytowana 125 razy (wg bazy WoSci). Z metodologicznego punktu widzenia cenna jest publikacja [H8] w której dr Koźmiński szczegółowo omawia opis parametrów fizyko-chemicznych, kontrolę jakości otrzymywanych różnych preparatów



zawierających Tc-99m z wykorzystaniem standardowej techniki TLC oraz problemy z niejednoznacznymi wynikami teŝe.

Mając na uwadze analizę wyników opisanych w cyklu 9 publikacji stanowiących przedłoŝone do oceny osiągnięcie naukowe uważam, że do najważniejszych osiągnięć dra Koźmińskiego zalicza się:

- otrzymanie i charakterystyka radiokoniugatów:
 - a) mogących przekraczać barierę krew-mózg oraz umożliwiających ocenę stanu płuc
 - b) służących do oceny zmian chorobowych – tzw. stopy cukrzycowej
 - c) zawierających antybiotyki przy zachowaniu jego aktywności
- omówienie i wskazanie głównych problemów mogących się pojawiać na etapie projektowania i charakterystyki fizykochemicznej nowych radiokoniugatów,
- opracowanie efektywnej metody separacji Tc-99m od molibdenu.

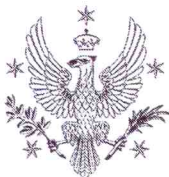
Ocena pozostałego dorobku naukowego

Pan dr Koźmiński jest aktywny naukowo. Sumaryczny IF wszystkich jego prac jest równy 98,501, liczba cytowań 361 (bez autocytowań) a jego indeks Hirscha wynosi 11 (wg bazy WoSci na dzień 27.12.2023). Po uzyskaniu stopnia doktora opublikował jako współautor 12 prac związanych głównie z wykorzystaniem radioizotopów ^{177}Lu , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{223}Ra . Współpracuje z naukowcami z różnych ośrodków w kraju (WUM, UJ, UW, UML, IBB PAN, SGGW). Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych uzyskane wyniki zaprezentował w postaci 4 wystąpień ustnych, 4 plakatów na konferencjach naukowych oraz będąc współautorem 21 innych wystąpień także podczas konferencji naukowych. Dr Koźmiński miał także kilka wystąpień podczas seminariów prowadzonych na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Recenzuje on artykuły naukowe w rozpoznawalnych czasopismach naukowych o zasięgu światowym. Uczestniczył on w kilku stażach, pobytach, kursach naukowych, których celem było podnoszenie kompetencji naukowych w zakresie chemii jądrowej.

Na uwagę zasługuje fakt, że Pan dr Koźmiński jest współautorem 8 patentów, co świadczy o wysokiej wartości aplikacyjnej badań prowadzonych przez niego i współpracowników.

Ocena dorobku organizacyjnego i dydaktycznego

Analiza dokumentów załączonych do wniosku habilitacyjnego Pana dra Koźmińskiego wskazuje, że jest on także aktywny w poszukiwaniu zewnętrznych źródeł finansowania.



Po otrzymaniu stopnia doktora uczestniczył w 4 projektach naukowych (1- IAEA, 3- NCN) w roli wykonawcy oraz w 3 w roli kierownika (1- IAEA, 1- MEiN, 1- NCN). Jest on członkiem Polskiego Towarzystwa Nukleonowego oraz European Nuclear Society.

Działalność dydaktyczna Habilitanta jest także widoczna. Był on kierownikiem 8 prac magisterskich z zakresu chemii jądrowej. Od roku 2013 prowadzi ćwiczenia laboratoryjne dla studentów Wydziału Fizyki Politechniki Warszawskiej. Przez kilka lat prowadził także ćwiczenia dla studentów Uniwersytetu Warszawskiego oraz Wojskowej Akademii Technicznej oraz wykład monograficzny zatytułowany „Radiochemia i chemia radiofarmaceutyczna w medycynie”.

Podsumowanie i Wnioski

Po zapoznaniu się z materiałami związanymi z przewodem habilitacyjnym dra Przemysława Andrzeja Koźmińskiego uważam, że przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe zatytułowane „Projektowanie, synteza i charakterystyka koniugatów znakowanych Ga-68 oraz Tc-99m do diagnostyki choroby Alzheimera, stopy cukrzycowej i reumatoidalnego zapalenia stawów metodą PET I SPECT” na które składa się cykl 9 artykułów naukowych stanowi ważny wkład w rozwój chemii radiofarmaceutyków oraz ogólniej w rozwój dziedziny nauk chemicznych. Powyższe osiągnięcie naukowe spełnia wymagania określone w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych (Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 roku). Ponadto uważam, że pozostały dorobek naukowy, dydaktyczny i organizacyjny świadczą o dobrym przygotowaniu Pana dra Koźmińskiego do samodzielnej pracy naukowej.

Mając na uwadze powyższe przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie wniosek o dopuszczenie dra Przemysława Andrzeja Koźmińskiego do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Marek Chętkowski