



prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz
Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Chemii
Katedra Chemii Fizycznej, Pracownia Bioanalizy
ul. Ciołkowskiego 1K,
15-245 Białystok

Białystok, dn. 24.03.2023r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. inż. Ewy Kobylskiej
pt. Badania właściwości fizyko-chemicznych, struktury oraz aktywności biologicznej
metabolitów nowych analogów insuliny
wykonanej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej
realizowanej w ramach programu „Doktorat Wdrożeniowy”
pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Michała Chudego

Analogi insuliny są jednym z najszerzej stosowanych leków na świecie, w związku z masowym występowaniem cukrzycy pierwszego i drugiego rodzaju. W Polsce zapotrzebowanie na ten lek jest pokrywane importem. Dlatego wysiłki podjęte przez Sieć Badawczą Łukasiewicz-Instytut Chemii Przemysłowej im. Ignacego Mościckiego zmierzające do opracowania i wdrożenia technologii nowych analogów insuliny są niezwykle trafne. Oceniana praca doktorska mieści się tym nurcie, stanowiąc ważny fragment badań przedklinicznych dwóch długodziałających analogów insuliny: AKR i SK3R. Dlatego wybór tematu doktoratu wdrożeniowego uważam za niezwykle trafny.

Praca została wykonana pod promotorstwem profesora Michała Chudego, który jest uznanym badaczem posiadającym imponujący dorobek w zakresie biomedycznym m.in. cytostatyczności, różnorodnych badań komórek rakowych, biomedycznych zastosowań nowych materiałów.

Recenzowana dysertacja została zawarta na 218 stronach maszynopisu, w tym na 15 tablicach, ilustrowana 155 rysunkami. Przegląd literaturowy obejmuje 121 pozycji i koncentruje się

na cukrzycy, insulinie, jej analogach i metabolitach a także potencjalnych związkach stosowania analogów insuliny z procesami nowotworzenia. Struktura dysertacji odbiega od klasycznej struktury dysertacji doktorskich; każdy z 13 rozdziałów badań stanowi odrębną całość, z własną częścią eksperymentalną, wynikami i dyskusją wyników. Wnioski stanowią odrębny rozdział.

Eksperymentalna część dysertacji rozpoczyna się opisem badań biotransformacji analogów insuliny AKR i SK3R w osoczu krwi. Badania te rozszerzono o biodegradację glarginy – insuliny analogami której są AKR i SK3R wytworzone metodami biotechnologicznymi. Badania te prowadzono w osoczu króliczym a potem ludzkim a postęp biotransformacji w czasie śledzono techniką MALDI TOF/TOF. Wykazano pełny zanik substratów AKR, SK3R oraz glarginy oraz tworzenie produktu biotransformacji desB32ArgdesB31LysAKR oraz desB32ArgdesB31Lysglargina a także desB32ArgSK3R. Wykazano także, że insulina ludzka nie ulega biotransformacji w warunkach eksperymentu.

Kluczowym problemem w prowadzeniu dalszych badań okazała się dostępność wzorców desB32ArgAKR, desB32ArgdesB31LysAKR, desB32ArgSK3R oraz desB32Argglargina, desB32ArgdesB31Lysglargina. Dlatego podjęto skuteczne badania w kierunku opracowania technologii ich otrzymywania i oczyszczania, łącznie z metodami kontroli analitycznej. Substraty AKR, SK3R oraz glarginę poddawano trawieniu enzymem karboksypeptydazą B w warunkach zoptymalizowanych dla każdego z pożądaných produktów. Otrzymane metabolity były rozdzielane i oczyszczane metodą preparatywnej chromatografii a kontrola analityczna wszystkich operacji była dokonywana za pomocą HPLC z detekcją spektrofotometryczną. Technologie otrzymywania desB32ArgAKR, desB32ArgdesB31LysAKR oraz desB32ArgSK3R wdrożono w celu wytwarzania tych wzorców na potrzeby własne Instytutu natomiast technologię wytwarzania wzorców desB32Argglargina oraz desB32ArgdesB31Lysglargina skomercjalizowano a certyfikowane wzorce są sprzedawane.

Analogi insuliny AKR i SK3R oraz ich metabolity były poddane badaniom stabilności termicznej. Badania wykonano w 0,01 M roztworze HCl, w którym przechowywane są wzorce. Dla porównania, do badań tych włączono insulinę ludzką. W celu przeprowadzenia tych badań opracowano ich metodykę. Nie znaleziono istotnych różnic w stabilności termicznej desB32ArgAKR, desB32ArgdesB31LysAKR, desB32ArgSK3R, AKR, SK3R oraz insuliny ludzkiej. Opracowana metoda badania stabilności termicznej insulin i ich metabolitów będzie mogła znaleźć zastosowanie do badania stabilności formułacji farmaceutycznych insulin.

Ważnym narzędziem stosowanym przez Doktorantkę do identyfikacji analogów insuliny i ich metabolitów jest sporządzanie ich map peptydowych. Stosując proteazę PV8, dokonuje się podziału badanego analogu insuliny lub jego metabolitu na 4 fragmenty w miejscu występowania kwasu glutaminowego. Jako wzorzec Doktorantka stosowała insulinę ludzką. Identyfikacja otrzymanych fragmentów była dokonywana techniką HPLC-UV-Vis, która była techniką drugiego wyboru ze względu na ograniczony dostęp do techniki LC-MS, na tym etapie badań. Jednak technika HPLC UV-Vis, stosowana bez wzorców oczekiwanych fragmentów jest tylko narzędziem półilościowym, wymagającym znacznej wprawy badacza dla dokonania identyfikacji otrzymanych fragmentów. Oczekiwałabym rozszerzonej dyskusji tego fragmentu badań.

Homogeniczność i polidispersyjność otrzymanych roztworów wzorców Doktorantka badała techniką dynamicznego rozpraszania światła, szeroko stosowaną do badań substancji wielkocząsteczkowych pod kątem potencjalnej agregacji i rozkładu wielkości cząstek. Wyniki takich badań stanowią ważną charakterystykę otrzymanych wzorców. Badania były wykonane w 0,01 roztworze HCl, stosowanym do przechowania wytworzonych wzorców. Otrzymane wzorce charakteryzuje niski współczynnik polidispersyjności, w kilku przypadkach lepszy od współczynnika insuliny ludzkiej i znacznie lepszy od współczynników metabolitów glarginy. Moim zdaniem, wyniki przedstawione na Rys. 53 mogły by być przedstawione bardziej komunikatywnie.

Ważną charakterystyką białek jest wyznaczenie punktu izoelektrycznego. Badania takie wykonała Doktorantka w odniesieniu do analogów insuliny AKR i SK3R oraz ich metabolitów. Dla celów porównawczych do programu badań wprowadzono insulinę ludzką. Badania zostały wykonane techniką kapilarnego ogniskowania. Wartości punktu izoelektrycznego analogów insuliny i ich metabolitów okazały się wyższe od wartości dla insuliny ludzkiej, co zdaniem Doktorantki, jest zgodne z oczekiwaniami na podstawie obliczeń dokonanych na podstawie struktury I-rzędowej tych związków. Identycznie wyjaśnia Doktorantka zmiany punktu izoelektrycznego metabolitów w odniesieniu do wartości analogów insuliny. Wdrożenie metody pomiaru punktu izoelektrycznego wzbogaciło ofertę komercyjną Ł-IChP.

Badania spektroskopowe wykonane technikami spektrofotometrycznymi i spektrofluorymetrycznymi posłużyły Doktorantce do oceny ekspozycji tyrozyny w analogach insuliny SKR i SK3R, ich metabolitów a także glarginy i w jej metabolitach w porównaniu do insuliny ludzkiej. W badaniach tych uznano wpływ hydrofobowej fenyloalaniny jako nieistotny, całość efektów związanych z pierścieniem aromatycznym przypisując tyrozynie. Widma UV-Vis oraz ich pierwsze i drugie pochodne wykonane w zakresie 200-350 nm charakteryzuje bardzo zbliżony

przebieg dla wszystkich badanych 9 związków, z czego Doktorantka wyciąga wniosek, że w analogach insuliny ani w ich metabolitach nie dochodzi do ekspozycji fragmentów tyrozynowych na zewnątrz ich molekuł ani ich denaturacji w roztworach wzorców. Również widma fluorescencji wszystkich badanych związków wykazują bardzo zbliżony przebieg z maksimum występującym dla czystej tyrozyny. Poza rozważaniami dotyczącymi konformacji pochodnych insuliny i ich metabolitów, wykonane badania spektroskopowe stanowią ich podstawową charakterystykę oraz okazały się pomocne podczas wytwarzania wzorców metabolitów do kontroli międzyoperacyjnej.

Badania właściwości biologicznych badanych analogów insuliny i ich metabolitów obejmowały badania powinowactwa tych związków do receptora insulinowego, badania aktywacji szlaków metabolicznych przez te związki, badania przez nie proliferacji komórek, badania ich mutagenności oraz poboru glukozy indukowanego przez te związki. W celu badania powinowactwa badanych analogów insuliny i ich metabolitów do receptora insulinowego opracowano nową metodę takich badań opartą na technice przepływowej wersji powierzchniowego rezonansu plazmonów. Oddziaływanie badany związek – receptor insulinowy zbadano immobilizując receptor insulinowy na powierzchni chipa i wprowadzając roztwór badanego związku w przepływającym strumieniu popychanym fazą ruchomą. Immobilizacja receptora insulinowego na powierzchni chipa jest dokonywana *in situ* z wykorzystaniem protokołu NHS/EDC. Zastosowany chip zawiera powierzchnię metaliczną (Au?), która jest pokryta karboksymetylodekstranem, którego grupy karboksylowane zostają aktywowane. Wprowadzony następnie roztwór receptora insulinowego zostaje kowalencyjnie zimmobilizowany na powierzchni chipa, tworząc biosensor reagujący na wprowadzany badany związek zmianą kąta rezonansowego. Pomiar realizowany w warunkach przepływowych pokazuje zmiany kąta rezonansowego w czasie, ilustrujące wiązanie badanego związku do receptora insulinowego, następnie osiąganie stanu równowagi i w końcu dysocjację wytworzonego kompleksu, kiedy przepływająca próbka już nie zawiera badanego związku tylko bufor popychający próbkę. Otrzymany sensogram pozwala obliczyć dane kinetyczne za pomocą specjalistycznego oprogramowania. Badaniami objęto oddziaływania dwóch izoform receptora insulinowego oraz receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu z analogami insuliny AKR i SK3R i ich metabolitami oraz z insuliny ludzką oraz glarginą i jej metabolitami. Doktorantka zebrała obszerny materiał eksperymentalny, którego uzyskanie było możliwe dzięki zaletom opracowanej metody pomiaru. Wyznaczone stałe dysocjacji tworzą obraz siły oddziaływania badanych analogów insuliny i ich metabolitów oraz insuliny ludzkiej z izoformami receptora insulinowego oraz z receptorem insulinopodobnego czynnika wzrostu. Wyraźnie widać silniejsze wiązanie badanych

związków w pierwszym niż drugim miejscem wiązania. Insulina ludzka, SK3R oraz metabolit desB32ArgdesB31LysAKR są najsilniej związane do izoformy B receptora insulinowego podczas gdy nieomal wszystkie badane metabolity są najsilniej związane do receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu. Moim zdaniem to ostatnie spostrzeżenie zasługuje na poszerzoną dyskusję.

Badania aktywacji fosforylacji receptora insulinowego i receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu a także innych szlaków metabolicznych przez badane analogi insuliny i ich metabolity zostały przeprowadzone przez Doktorantkę na komórkach HepG2. Dla celów porównawczych badaniami objęto glarginę i insulinę ludzką. Badania przeprowadzono stosując półilościowy test enzymatyczny łączący cechy testu ELISA i analizy metodą Western Blot. Badania wykazały, że analogi insuliny AKR, SK3R oraz ich metabolity wykazują bardzo podobne profile działania biologicznego na komórkach HepG2 jak ludzka insulina. Wdrożenie trudnego technicznie testu enzymatycznego pozwoliło na jego włączenie do oferty badań komercyjnych IChP.

Ważnym elementem badań przedklinicznych był wpływ analogów insuliny na żywotność prawidłowych hepatocytów szczurzych linii komórkowej Clone 9 oraz zmienionych nowotworowo hepatocytów ludzkich linii HepG2. Badania wykonano z zastosowaniem spektrofotometrycznego testu MTT, w którym barwnik (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy) ulega redukcji do nierozpuszczalnego fioletowego formazanu, następującej pod wpływem dehydrogenazy bursztynianowej, co jest pośrednio skorelowane z liczbą żywych i aktywnych metabolicznie komórek. Wyniki badań analogów insuliny i ich metabolitów odniesiono do wyników dla insuliny ludzkiej. Ani w przypadku komórek linii Clone 9 ani komórek linii HepG2 nie stwierdzono statystycznie różnych wyników, niż w przypadku insuliny ludzkiej, co świadczy o braku działania cytostatycznego i wzmożonej proliferacji komórek. Wdrożone metody wzbogaciły potencjał badań własnych w tym zakresie oraz poszerzyły ofertę badań komercyjnych IChP.

Kolejnym istotnym elementem badań przedklinicznych wykonanych przez Doktorantkę było badanie mutagenności analogów insuliny, ich metabolitów a także, w celu porównawczym, glarginy i jej metabolitów oraz insuliny ludzkiej. Badania wykonano in vitro z zastosowaniem testu Ames'a, stosowanego w warunkach ograniczonego dostępu do badanych substancji. Badaniom poddano dwa szczepy bakterii zawierające mutacje uniemożliwiające syntezę histydyny przez te bakterie a o mutagenności badanych substancji świadczy przywrócenie zdolności syntezy histydyny. Żaden z badanych analogów insulin ani ich metabolitów nie przekroczył potencjału mutagennego (dwukrotna wartość kontroli negatywnej plus odchylenie standardowe), co

świadczy o braku mutagenności badanych substancji. Wdrożona metoda badania mutagenności poszerza ofertę badań komercyjnych IChP.

Ostatnią serię badań właściwości biologicznych badanych analogów insuliny i ich metabolitów stanowiły badania poboru glukozy przez komórki adipocytów indukowanej przez analogi insuliny i ich metabolity. Badania były wykonane w warunkach *in vitro* na komórkach linii 3T3 L1 MBX, poddane konwersji do adipocytów. Ze względów pomiarowych zamiast glukozy w badaniach zastosowano jej analog - 2-deoksyglukozę, która transportowana do wnętrza adipocytów jest metabolizowana do produktu, którego stężenie można oznaczyć w enzymatycznej reakcji, co odzwierciedla pobór glukozy przez adipocyty. Otrzymane wyniki wskazują, że analog insuliny AKR i jego metabolity wykazują podobny pobór glukozy jak insulina ludzka, podczas gdy analog insuliny SK3R oraz glargina oraz ich metabolity charakteryzuje niższy pobór glukozy do adipocytów. Wdrożona metoda badania poboru insuliny do adipocytów indukowana przez analogi insuliny poszerza ofertę badań komercyjnych IChP.

Recenzowana Dysertacja stanowi ważny fragment badań przedklinicznych, które wymagały dokonania szeregu wdrożeń. Kluczowym z nich było opracowanie i wdrożenie technologii otrzymywania i oczyszczania metabolitów analogów insuliny AKR i SK3R a także glarginy. Otrzymane wzorce metabolitów stanowiły podstawę do przeprowadzenia niezbędnych badań biologicznych i fizykochemicznych. Technologia ta została skomercjalizowana a niektóre wzorce znalazły nabywców. W zakresie badań biologicznych analogów insuliny AKR i SK3R i ich metabolitów wdrożone zostały metody badania aktywacji szlaków metabolicznych przez te związki, badania przez nie proliferacji komórek, badania ich mutagenności oraz poboru glukozy indukowanego przez te związki a także badania powinowactwa tych związków do receptora insulinowego. Ta ostatnia metoda stanowi doskonałe wykorzystanie potencjału przepływowej techniki SPR. Wszystkie wdrożone metody poszerzyły ofertę badań komercyjnych. Podobnie skutecznie wdrożone zostały metody badań fizykochemicznych takich jak metoda badań homogeniczności i polidispersyjności czy metoda badań punktu izoelektrycznego, które także wzbogaciły ofertę IChP kierowaną do odbiorców komercyjnych. Z pewnością oceniana dysertacja spełniła wymagania doktoratu wdrożeniowego.

Oprócz oczywistego dorobku wdrożeniowego, Doktorantka legitymuje się dorobkiem naukowym w postaci 3 publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz 2 rozdziałów w monografiach.

Z obowiązku recenzentki zwrócę uwagę na kilka mało istotnych niedociągnięć redakcyjnych:

1. Rys 63 nie zawiera istotnego elementu jakim jest metal (Au) na powierzchni pryzmatu, bez którego nie zaobserwujemy efektu SPR
2. Tablica 14. Zawiera błąd w opisie kolumn (dwie maja ten sam opis)
3. Doktorantka powszechnie stosuje „ug” zamiast „µg”.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu kompleksowych badań przedklinicznych, potwierdzając wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia zaawansowanych badań wdrożeniowych przez Doktorantkę. Podjęta tematyka jest niezwykle aktualna i ma bardzo duży potencjał aplikacyjny. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa mgr. inż. Ewy Kobyłskiej pt. „Badania właściwości fizykochemicznych, struktury oraz aktywności biologicznej metabolitów nowych analogów insuliny” spełnia wszystkie wymagania odpowiednich przepisów prawnych i zwyczajowych stawianych pracom doktorskim i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr. inż. Ewy Kobyłskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gorodkiewicz