

Warszawa, 16.04.2023 r.

dr hab. Małgorzata Kęsik-Brodacka, prof. NIL
Zastępca Dyrektora ds. Naukowych
Narodowy Instytut Leków
m.kesik@nil.gov.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Kobylskiej

pt. „**Badanie właściwości fizyko-chemicznych, struktury oraz aktywności biologicznej
metabolitów nowych analogów insuliny**”

wykonanej pod kierunkiem

Promotora prof. dr hab. inż. Michała Chudego

Opiekuna naukowego dr Anety Łukomskiej

Rozprawę zrealizowano na wydziale Chemii Politechniki Warszawskiej oraz w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego.

Podstawa opracowania recenzji

Podstawą formalną opracowania recenzji jest Uchwała nr 285/28/2023 Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej z dnia 24.01.2023 r.

Wprowadzenie - aktualność tematu, cele

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Ewy Kobylskiej powstała w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy” w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze,

w dyscyplinie nauki chemiczne. Praca dotyczy istotnych problemów związanych z bezpieczeństwem stosowania rekombinowanych leków biologicznych podawanych w terapii cukrzycy. Ze względu m.in. na masowość występowania, dramatyczny wzrost liczby zachorowań obserwowany w ostatnich dekadach oraz liczbę powikłań występującą u chorych, cukrzyca stanowi niewątpliwie jedno z największych wyzwań terapeutycznych naszych czasów. Implikuje to potrzebę prowadzenia badań nad nowymi lekami do terapii tego schorzenia. W ramach takich badań w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków (obecnie Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Chemii Przemysłowej im. prof. Ignacego Mościckiego) powstały oryginalne, długodziałające analogi insuliny AKR i SK3R. Cząsteczki insuliny ludzkiej wytworzone zostały z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej i zmodyfikowane, tak aby po podaniu symulowały dostarczanie naturalnie produkowanej w organizmie insuliny bazowej i zapewniały długotrwałe działanie. W związku z tym, że analogi insuliny są w nieco inny sposób metabolizowane niż insulina ludzka, istotne jest pogłębienie wiedzy dotyczącej właściwości biologicznych powstających w organizmie pochodnych analogów. Potrzeba badań wynika w szczególności z ich potencjalnego wpływu na procesy związane z wywołaniem i rozwojem raka. Badania takie są szczególnie ważne biorąc pod uwagę, że opracowane, innowacyjne analogi charakteryzują się podobieństwem strukturalnym do glarginy - zarejestrowanej cząsteczki insuliny długodziałającej, dla której pojawiły się podejrzenia o potencjalne właściwości mutagenne. Dlatego też, przed rozpoczęciem szeroko zakrojonych badań przedklinicznych, istotne jest przeanalizowanie produktów biotransformacji AKR i SK3R, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnej mutagenności opracowanych cząsteczek oraz ich metabolitów.

W tym kontekście, niezwykle trafne jest podjęcie przez Doktorantkę tematu, którego celem było *zbadanie tożsamości podstawowych produktów biotransformacji innowacyjnych długodziałających analogów insuliny, wytworzenie wzorców tych pochodnych oraz charakterystyka ich aktywności biologicznej.*

Opis rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska liczy 218 stron, w tym 15 tabel oraz 115 rysunków. Struktura pracy jest typowa dla rozpraw naukowych i obejmuje następujące części: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel i zakres pracy, badania własne, wnioski, bibliografię, spis tabel, spis rysunków. Spis bibliografii obejmuje 121 publikacji naukowych,

źródeł internetowych oraz dokumentów różnych organizacji międzynarodowych. Źródła literatury z ostatnich 5 lat stanowią 22% wszystkich pozycji. Odwołania do przedstawionych w bibliografii pozycji literaturowych mają uzasadnienie wynikające z treści rozprawy i są prawidłowo dobrane. Sposób oznaczenia cytowań źródeł literatury jest zgodny ze stylistyką stosowaną w literaturze naukowej przedmiotu.

Rozprawa charakteryzuje się poprawną strukturą i staranną polszczyzną. Na uwagę zasługuje przejrzystość z jaką zaprezentowane są poszczególne, skomplikowane zagadnienia.

W rozdziale „Streszczenie” i „Abstrakt” Doktorantka zaprezentowała w zwięzły sposób przesłanki podjęcia tematu badawczego oraz główne zadania badawcze i rezultaty uzyskane w ramach doktoratu.

Rozdział „Wstęp” podzielony jest na 5 podrozdziałów zawierających analizę stanu wiedzy w temacie rozprawy. W pierwszym podrozdziale zebrane zostały najważniejsze informacje dotyczące choroby jaką jest cukrzyca. W drugim podrozdziale opisana została insulina ludzka, jej budowa, synteza, działanie biologiczne, oddziaływanie z receptorem oraz jej metabolizm. W kolejnym podrozdziale poruszona została tematyka analogów insuliny ludzkiej i ich metabolitów. Opisane zostały tu szybko działające i długo działające analogi, które są dostępne komercyjnie. W tym podrozdziale znalazły się również dane dotyczące innowacyjnych długo działających analogów insuliny ludzkiej AKR i SK3R, które opracowano w Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. prof. Ignacego Mościckiego (Ł- IChP). W następnym podrozdziale omówiono problematykę potencjalnego wpływu insuliny na proces rozwoju nowotworów. W ostatnim podrozdziale Doktorantka podsumowała część literaturową. Informacje zawarte w rozdziale „Wstęp” zostały poparte danymi literaturowymi i stanowią bardzo dobre wprowadzenie w podjętą przez Doktorantkę tematykę badawczą.

W rozdziale „Cel i zakres pracy” przedstawiono główny cel badań zaplanowanych do realizacji w ramach doktoratu. Autorka jako cel pracy przyjmuje *określenie tożsamości podstawowych produktów biotransformacji innowacyjnych długo działających analogów insuliny, wytworzenie wzorców tych pochodnych oraz charakterystykę ich aktywności biologicznej.*

Doktorantka do osiągnięcia celu głównego zaplanowała realizację celów szczegółowych obejmujących:

- zbadanie ścieżek biotransformacji innowacyjnych analogów insuliny: AKR i SK3R,
- opracowanie technologii wytwarzania wzorców metabolitów AKR i SK3R,
- opracowanie zestawu procedur analitycznych do weryfikacji jakości wytworzonych wzorców metabolitów (tożsamość, czystość, zawartość, zachowanie natywnej struktury białka) do wdrożenia w rutynowej kontroli jakości,
- opracowanie metod weryfikacji właściwości biologicznych metabolitów (oddziaływanie z receptorem, aktywacja szlaków sygnałowych w komórce, pobór glukozy),
- opracowanie metod weryfikacji działania niepożądanego metabolitów (wpływ na proliferację komórek prawidłowych i nowotworowych, mutagenność).

W tym rozdziale postawione zostały również hipotezy badawcze, które były weryfikowane w trakcie prowadzonych prac.

Cel przyjęty w pracy ma charakter ściśle użyteczny i jest zgodny z ogólnym celem doktoratu wdrożeniowego, w ramach którego według zamierzeń Ustawodawcy powstać mają rozwiązania, pozwalające uzyskać danej firmie trwałą przewagę konkurencyjną.

Część doświadczalna pracy zaprezentowana została w rozdziale „Badania własne”. Obejmuje ona opis przeprowadzonych doświadczeń oraz wyniki, które znalazły zastosowanie praktyczne skutkujące poszerzeniem technik stosowanych w Ł- IChP. Pragnę zaznaczyć, że układ wszystkich doświadczeń jest starannie przemyślany i zaplanowany w logiczny sposób. Doktorantka właściwie dobrała metody badawcze. Każdy z 13 podrozdziałów stanowi odrębną logiczną całość, z własną częścią metodyczną, eksperymentalną, wynikami oraz krótką dyskusją wyników. Poszczególne podrozdziały grupują się w 3 główne zadania badawcze. Pierwsze zadanie obejmowało opracowanie metodyki badania biotransformacji oraz identyfikacji powstających metabolitów insuliny AKR i SK3R oraz glarginy w osoczu krwi. W dalszych etapach prac niezbędne było zastosowanie wzorców metabolitów. Badania prowadzone na potrzeby realizacji tego zadania doprowadziły do opracowania pięciu i skomercjalizowania dwóch technologii wytwarzania metabolitów glarginy. W ostatnim etapie prac Doktorantka przeprowadziła szeroko zakrojone badania właściwości biologicznych uzyskanych metabolitów. W ramach tych badań zmierzono powinowactwo wytworzonych metabolitów do receptora insulinowego oraz prześledzono, jakie szlaki enzymatyczne są w wyniku tego oddziaływania aktywowane. Zwrócono szczególną uwagę na aktywację szlaków prowadzących w kierunku proliferacji komórek. Badano również stopień

realizacji funkcji metabolicznych, określany poziomem poboru w odpowiedzi na obecność poszczególnych substancji w medium hodowlanym komórek. Przeprowadzono testy mutagenności i wpływu na proliferację komórek. Badania te były prowadzone w celu weryfikacji bezpieczeństwa stosowania analogów AKR i SK3R.

Rozdział „Wnioski” obejmuje całościowe podsumowanie wyników uzyskanych w ramach przeprowadzonych badań. W tym rozdziale zebrano również informacje o wszystkich metodach wykorzystanych w badaniach oraz opracowanych technologiach, które poszerzyły ofertę Instytutu. Konkluzją doktoratu jest potwierdzenie zasadności kontynuacji badań nad innowacyjnymi długodziałającymi analogami insuliny opracowanymi w Ł-IChP w zakresie niezbędnym do rejestracji tych preparatów jako leków w terapii cukrzycy.

Najważniejsze osiągnięcia rozprawy

Za najważniejsze osiągnięcie ujęte w rozprawie uważam:

1. Wdrożenie technologii wytwarzania metabolitów analogów insuliny AKR, SK3R i glarginy.
2. Opracowanie i wdrożenie w Ł-IChP nowych technologii wytwarzania metabolitów analogów insuliny: desB32Arg AKR (metabolitu insuliny AKR, powstającego po odcięciu argininy z C-końca łańcucha β), desB32Arg desB31Lys AKR (metabolitu insuliny AKR, powstającego po odcięciu argininy i lizyny z C-końca łańcucha β), desB31Arg SK3R (metabolitu insuliny SK3R, powstającego po odcięciu argininy z C-końca łańcucha β), desB32Arg glarginy (metabolitu glarginy, powstającego po odcięciu argininy z C-końca łańcucha β), desB32Arg desB31Arg glarginy (metabolitu glarginy, powstającego po odcięciu dwóch arginin z C-końca łańcucha β).
Na uwagę zasługuje, iż technologie wytwarzania: desB32Arg glarginy i desB32Arg desB31Arg glarginy zostały skomercjalizowane i są obecnie sprzedawane.
3. Opracowanie lub zoptymalizowanie i wdrożenie w Ł-IChP nowych metod analitycznych, które mogą być wykorzystane w celach komercyjnych. Są to metody badania: biotransformacji białek terapeutycznych w osoczu króliczym i osoczu ludzkim, metoda badania szlaków metabolicznych indukowanych fosforylacją receptora insulinowego *in vitro*, poboru glukozy *in vitro* oraz metoda badania mutagenności z użyciem zminiaturyzowanego testu AMES *in vitro*.

Ponadto, oprócz dorobku wdrożeniowego, Doktorantka zgromadziła dorobek naukowy obejmujący współautorstwo 3 publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz współautorstwo 2 rozdziałów w monografiach.

Uwagi redakcyjne

W trakcie czytania zauważyłam drobne niedociągnięcia:

1. Na rys. 46 znajduje się nieprawidłowe określenie próbki ślepej (rozpuszczalnika prób) jako „placebo”.
2. W bibliografii nie podano numerów stron dla poszczególnych pozycji literaturowych. Podanie takich danych ułatwiłoby odszukanie publikacji.

Wymienione niedociągnięcia nie wnoszą nic do merytorycznej oceny pracy.

Ocena merytoryczna

Wysoko oceniam tematykę rozprawy wybraną przez Doktorantkę. Jest ona bardzo ważna i aktualna oraz ma istotne znaczenia praktyczne i komercyjne. Cel rozprawy doktorskiej został jasno sformułowany i wyjaśniony. Cele szczegółowe zostały podporządkowane realizacji celu głównego.

Po przeprowadzeniu analizy treści rozprawy stwierdzam, że postawiony przez Doktorantkę cel główny pracy został osiągnięty.

Wyniki zadań realizowanych przez Doktorantkę stanowią cenny dorobek mający duże znaczenie praktyczne i komercyjne. Do realizacji głównego celu pracy Doktorantka opracowała autorskie technologie wytwarzania i oczyszczania białek- metabolitów analogów insuliny. Zastosowano je jako wzorce do badań fizykochemicznych i biologicznych. Do tej pory nie pojawiały się w literaturze żadne dane w tym temacie, choć problematyka badania produktów biotransformacji glarginy przyciąga od kilku lat uwagę naukowców. Technologie te stanowią nowość i opracowanie ich jest odpowiedzią na realne zapotrzebowanie rynkowe. Na uwagę zasługuje fakt, że wzorce wytworzone zgodnie z dwoma opracowanymi przez Doktorantkę technologiami już są sprzedawane.

Wyniki prac przeprowadzonych przez Doktorantkę wnoszą istotne elementy o znaczeniu zarówno naukowym, jak i praktycznym. Umożliwiły zbadanie metabolitów innowacyjnych analogów insuliny ludzkiej AKR i SK3R oraz uzupełnienie brakujących elementów w dokumentacji badań przedklinicznych.

Wnioski końcowe

Na podstawie przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej, mając na względzie przedstawione wcześniej uwagi i spostrzeżenia stwierdzam, że rozprawa pt. „Badanie właściwości fizyko-chemicznych, struktury oraz aktywności biologicznej metabolitów nowych analogów insuliny” Pani mgr inż. Ewy Kobyłskiej spełnia w całości, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.), warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, w dyscyplinie nauki chemiczne. Dowodzi także Jej umiejętności samodzielnego planowania i prowadzenia badań. Dogłębne i szczegółowe zbadanie problemu potencjalnych właściwości mutagennych innowacyjnych długodziałających analogów insuliny ludzkiej wskazują na szeroką wiedzę teoretyczną i praktyczną Pani mgr inż. Ewy Kobyłskiej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Wobec powyższych faktów wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne o dopuszczenie Pani mgr inż. Ewy Kobyłskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Małgorzata Kęsik-Brodacka

