



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Prof. dr hab. inż. Barbara Jachimska,

Kraków 17.02.2023

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Drozdowskiej
pt. „Synteza i analiza aktywności biologicznej zmodyfikowanych dendrymerów
poliamidoaminowych generacji trzeciej podstawionych wybranymi związkami z grupy
ksantonów, jako potencjalnych czynników w terapii przeciwnowotworowej i
przeciwnicieniowej”

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Joanny Drozdowskiej powstała na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza pod kierunkiem prof. dr. hab. Wojciecha Rode oraz dr. hab. Łukasza Urama.

Badania realizowane w ramach doktoratu dotyczyły ustalenia potencjału przeciwnowotworowego oraz przeciwnicieniowego związków z grupy ksantonów, syntezy szeregu koniugatów dendrymeru poli(amidoaminowego) PAMAM trzeciej generacji z wybranymi związkami z grupy ksantonów oraz ich charakterystykę fizykochemiczną oraz biologiczną. W zamierzeniu, opracowana metodologia powinna być użyteczna w optymalizowaniu systemów dostarczania leku opartych o strukturze dendrymeru oraz weryfikacji tych układów *in vitro* wobec komórek nowotworowych oraz *in vivo* wobec nicienia.

Nanotechnologia farmaceutyczna zajmuje się rozwojem nanometrycznych systemów dostarczania leków poprzez zastosowanie nanośników (DDS). Obecnie przy projektowaniu nanonośników leków brane są pod uwagę: zdefiniowanie konkretnego celu terapeutycznego dla danej jednostki chorobowej, wybór leku efektywnego w jej terapii oraz optymalizacja transportu leku do zmienionej chorobowo tkanki. Multifunkcjonalne systemy nanonośników mogą być szczególnie użyteczne w chorobach wymagających politerapii, ponieważ zapewniają wydłużony czas przebywania leku w organizmie, korzystnie wpływają na

34



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

biodystrybucję leku i umożliwiają kontrolowane uwalnianie substancji leczniczej w ściśle określonej tkance, tym samym eliminują niepożądane działania *off target*. Dendrymery stanowią syntetyczne makrocząsteczki o interesujących właściwościach, takich jak hiperrozgałęziona struktura, kulisty kształt, dobrze zdefiniowane rozmiary i ciężar cząsteczkowy, określona liczba grup funkcyjnych i względnie niepolarne przestrzenie wewnętrzne. Dendrymery ze względu na specyficzną budowę umożliwiają transport substancji aktywnej, zarówno poprzez wiązanie jej z grupami powierzchniowymi, jak i w wolnych przestrzeniach we wnętrzu struktury cząsteczki. Dendrymery wzbudzają coraz większe zainteresowanie ze względu na ich potencjalne zastosowanie w terapiach onkologicznych, neurodegeneracyjnych, jako niewirusowe transportery małego interferującego RNA (siRNA ang. small interfering RNA) oraz łatwość przejścia kompleksów dendrymerowych przez barierę krew—mózg (BBB). W tym kontekście recenzowana praca dobrze wpisuje się w kierunki rozwoju nanosystemów dedykowanych do aplikacji biomedycznych.

Podstawą rozprawy są cztery spójne tematycznie prace opublikowane w latach 2019-2022 w czasopismach z listy JCR, o sumarycznym wskaźniku cytowań (impact factor) 20,403 (MEiN 480 punktów). Powyższe publikacje należą do kwartyła Q1 oraz Q2 w zakresie farmakologii i farmacji, biochemii i biologii molekularnej, chemii. Publikacja, które ukazała się European Journal of Pharmacology w 2019 roku posiada już 19 cytowań (wg Bazy WOS). Do cyklu autorka dołączyła streszczenie w języku polskim i angielskim, oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie poszczególnych publikacji, a także informacje o osiągnięciach naukowych doktorantki. W trzech pozycjach stanowiących podstawę dysertacji autorka jest zarówno pierwszym autorem jak i autorem korespondencyjnym. Na podstawie oświadczeń współautorów udział doktorantki w powstaniu poszczególnych publikacji to odpowiednio: P1 -50%, P2-14%, P3-60%, P4-60%. Jak wynika z załączonych oświadczeń współautorów publikacji, a także na podstawie przedłożonego oświadczenia autorki dotyczącego wkładu własnego, Jej udział w trzech pracach był dominujący i polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, wykonywaniu prac eksperymentalnych oraz opracowaniu wyników doświadczalnych i ich interpretacji. Promotorzy pracy uczestniczyli w opracowaniu koncepcji pracy, interpretacji wybranych wyników oraz redagowaniu manuskryptów. Wkład pozostałych współautorów publikacji P1-P4 to wybór metodologii syntezy dendrymerów, pomiary NMR, wykonaniu eksperymentów dotyczących hodowli nicieni oraz udział w

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351

34



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

opracowaniu otrzymanych wyników i ich interpretacji. Publikacja P2 powstała przy współpracy z zespołem prof. Bruno Botty z Uniwersytetu La Sapienza w Rzymie. Na podstawie powyższych informacji można jednoznacznie stwierdzić, iż przedłożona praca doktorska spełnia wszystkie wymogi ustawowe i zwyczajowe przyjęte przez krajowe instytucje akademickie dla tej formy rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska ma charakter eksperymentalny, dwie pierwsze prace z cyklu dotyczą wyboru oraz weryfikacji związków z grupy ksantonów w terapii przeciwnowotworowej oraz przeciwnicieniowej. Dwie kolejne to badania zastosowania układów opartych na strukturze cząsteczki dendrymeru jako nośnika dla wybranych związków z grupy ksantonów.

Pierwsza publikacja z serii dotyczy cząsteczki α -mangostyny. Dużą aktywność w układach biologicznych przypisuje się obecności w strukturze cząsteczki dwóch grup izoprenylowych. Efektywność przeciwnowotworową prowadzono na komórkach glejaka wielopostaciowego IV stopnia złośliwości (U-118MG) oraz komórkach raka płaskonabłonkowego (SCC-15). Jako odniesienie dla komórek nowotworowych zastosowano komórki prawidłowych fibroblastów skórnych (BJ). Wielopłaszczyznowo zweryfikowano potencjał α -mangostyny poprzez określenie poziomu cytotoksyczności (testy NR oraz XTT), proliferacji komórek, kondycji mitochondriów, indukcji procesu apoptozy (poprzez weryfikacje aktywności enzymatycznej kaspazy 3 i 7), zdolności komórek do adhezji i migracji. Wszystkie testy prowadzono w trzech niezależnych próbach z trzema powtórzeniami. Najlepszy efekt obserwowano wobec komórek SCC-15 ($IC_{50} = 6,43 \mu M$). Ponadto skontrolowano działanie przeciwnicieniowe α -mangostyny wobec *Caenorhabditis elegans* (CeTs) ($LC_{50} = 3,8 \mu M$)

Druga publikacja zrealizowana z grupą prof. Bruno Botty dotyczy szeroko pojętych badań nad poszukiwaniem nowych substancji biologicznie aktywnych, z myślą o uzyskaniu nowych kandydatów na leki. Poszukiwania prowadzono korzystając z zasobów biblioteki związków naturalnego pochodzenia. Pule związków poddano badaniom przesiewowym *in silico* stosując dokowanie molekularne FRED. Selekcję związków oparto na wyborze celu molekularnego polegającego na identyfikacji nowych inhibitorów reakcji katalizowanej przez syntazę tymidylanową nicieni pasożytniczych (TS). Tylko sześć najbardziej obiecujących struktur przetestowano *in vitro* na trzech liniach komórkowych. Aktywność związków

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351

34



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

testowano wobec czterech preparatów enzymatycznych, pochodzących od dwóch gatunków ssaków (ludzki (hTS) oraz mysz (mTS)) i dwóm gatunków nicieni (*T. spiralis* (TsTS) oraz *C. elegans* (CeTs)). Na tym etapie największy potencjał wykazał alwaksanton jako stosunkowo silny inhibitor TS powodujący ograniczenie wzrostu populacji *C. elegans* o sile nicieniobójczej podobnej do mebendazolu oraz α -mangostyny. Do dalszych badań wybrano dwa związki, czyli alwaksanton oraz rhediaksanton B. Zastosowano metodologię badań biologicznych opracowaną w publikacji Pl. Oba związki wykazały działanie antyproliferacyjne wobec zastosowanych linii komórkowych, przy czym działanie rhediaksantonu B okazało się skuteczniejsze przy niższym stężeniu w porównaniu do alwaksantonu. Identyczne korelacje obserwowano pod względem adhezji komórek. Ponadto oba związki ksantonów indukowały zwiększone działanie kaspaz 3 i 7, zwłaszcza dla komórek nowotworowych.

Następne publikacje poświęcono tworzeniu koniugatów dendrymerowych z dwoma wyselekcjonowanymi związkami ksantonów. Jako bazę wybrano dendrymery poli(amidoaminowe) PAMAM trzeciej generacji, które charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością, wysoką biogodnością oraz niską immunogennością. Strukturę nanonośnika sfunkcjonalizowano poprzez przyłączenie 5 ($G3^{2B12gh5M}$) lub 17 ($G3^{2B10gh17M}$) cząsteczek α -mangostyny do powierzchniowych grup aminowych dendrymeru poprzez wiązanie amidowe. W celu zminimalizowania cytotoksyczności nośnika przyłączono do grup aminowych dodatkowo dwanaście lub dziesięć cząsteczek D-glukoheptono-1,4-laktonu (gh). Każdy układ zawierał dwie cząsteczki biotyny (B) pełniące rolę liganda naprowadzającego ukierunkowanego na receptory obecne w komórkach nowotworowych. Do kontroli poprawności funkcjonalizacji zastosowano spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Wykonano widma jednowymiarowe (1H , ^{13}C) oraz dwuwymiarowe (COSY, HSQC, HMBC). Do charakterystyki fizykochemicznej wybrano dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz elektroforetyczne rozpraszanie światła (ELS). Aktywność biologiczną otrzymanych dendrypleksów badano *in vitro* na komórkach glejaka (U-118 MG), komórek raka płaskonabłonkowego SCC-15 i porównano z komórkami prawidłowych fibroblastów (BJ). Do badań *in vivo* zastosowano *C. elegans*. Po funkcjonalizacji nośnik dendrymerowy $G3^{2B12gh}$ nie wykazał cytotoksyczności w stosunku do badanych linii komórkowych oraz nicienia *C. elegans*. Natomiast przyłączenie do struktury α -mangostyny

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351

34
34



znacznie zwiększyło działanie cytotoksyczne leku, odpowiednio 4 i 25-krotnie w przypadku koniugatu $G3^{2B12gh5M}$ oraz $G3^{2B10gh17M}$. Ponadto obserwowano silniejsze hamowanie żywotności komórek oraz duży wpływ na inne parametry metaboliczne układu (prolifracje, adhezje, poziom ATP i aktywność kaspaz 3 i 7) zwłaszcza w przypadku zastosowania $G3^{2B10gh17M}$ niż $G3^{2B12gh5M}$. Przyłączenie α -magnostyny do dendrymeru indukuje zwiększoną toksyczność także w stosunku do *C. elegans*. Generalnie badania potwierdziły efektywniejsze działanie leku wobec komórek nowotworowym jak i nicienia.

W ostatniej pracy testowano wpływ rodzaju wiązania kowalencyjnego na aktywność biologiczną nośnika dendrymerowego zawierającego w strukturze cząsteczki α -magnostyny lub vadimezanu. W przypadku α -magnostyny zsyntezowano dodatkowy koniugat stosując wiązaniem estrowe ($G3^{gh2B5M}$). Dla cząsteczki vadimezanu zastosowano amidowe ($G3^{2B12gh5V}$) lub estrowe ($G3^{gh4B5V}$) wiązanie, aby przyłączyć lek do struktury nośnika. Przeanalizowano wpływ rodzaju wiązania na aktywność biologiczną leków. Analizowano wpływ wielkości koniugatu oraz wartości potencjału zeta na odpowiedź biologiczną układu. Cytotoksyczność α -mangostyny okazała się silniejsza niż vadimezanu. Nośnik dendrymerowy zwielokrotnił kilkukrotnie działanie leków w stosunku do wolnego związku. Zastosowanie wiązania amidowego było nieco bardziej skuteczniejsze, zwłaszcza w przypadku komórek linii SCC-15. Na podstawie otrzymanych profili toksyczności badanych koniugatów *in vitro* i *in vivo* zaobserwowano istotny wpływ wartości potencjału zeta, wielkości nanocząsteczek jak sposobu przyłączenia cząsteczki leku (poprzez wiązanie amidowe lub estrowe) na ich aktywność w układach biologicznych.

Generalnie koncepcja pracy jest bardzo ciekawa i dobrze przemyślana. Autorka w pierwszym etapie prac wyselekcjonowała potencjalne związki do terapii przeciwnowotworowej i przeciwnicieniowej. Aby proces selekcji związków był efektywniejszy zastosowano podejście teoretyczne stosując dokowanie molekularne. Wzrost mocy obliczeniowej komputerów oraz udoskonalenie technik informatycznych sprawiły, że wykorzystuje się te narzędzia do wspomaganego komputerowo projektowania leków, ale również do preselekcji nowych kandydatów na leki. Zastosowanie systemów kontrolowanego dostarczania substancji aktywnych, spowodowało że wielu badaczy koncentruje się na rozwoju nanonośników opartych na syntetycznych polimerach. Ogromny postęp w tej dziedzinie dokonał się zwłaszcza dzięki opracowaniu metod syntezy nowych materiałów o



kontrolowalnych/dedykowanych właściwościach fizykochemicznych takich jak dendrymery. Wraz z wykorzystaniem platform nanocząsteczkowych jako systemów dostarczania leków nieodzowna staje się wiedza o ich zachowaniu w układach biologicznych. Efektywne zastosowanie leków w terapiach przeciwnowotworowych wynika po części z ich niskiej rozpuszczalności, a tym samym słabej biodystrybucji. W takim przypadku wzrost efektywności leku można uzyskać poprzez zastosowanie odpowiednio dobranego nośnika. Autorka wykazała, iż biotynylowane dendrymery PAMAM G3.0 po odpowiedniej funkcjonalizacji zwiększają kilkukrotnie aktywność leku w układach docelowych, w tym przypadku zwłaszcza α -magnostyny.

Opracowana przez doktorantkę metodologia badawcza ma dużą wartość poznawczą oraz aplikacyjną. Jednakże chciałabym, aby autorka ustosunkowała się do kilku aspektów, które moim zdaniem mają istotny wpływ na omawiane zagadnienie oraz kierunek dalszych badań:

- Należy podkreślić, że rozwój metodologii giętkiego dokowania zapoczątkował nowe podejście do projektowania leków tzw. „structure based drug design”. W kontekście przeprowadzonych badań ciekawe byłoby skorelowanie wartości energii swobodnej wiązania receptor-ligand z danymi eksperymentalnymi, a także oszacowanie wartości względnego powinowactwa do receptora TS dla jednego z najbardziej obiecujących ksantonów.
- W pracy P3 oraz P4 przedstawiono wielkość koniugatów dendrymerowych otrzymanych z zastosowaniem metody DLS. Analizę przedstawiono „by volume” oraz „by number”. Najbardziej miarodajne wyniki otrzymuje się stosując analizę „by intensity”. Dla nanoukładów, które charakteryzują się polidispersyjnością sprawdza się analiza „by volume”. W takim przypadku należałoby przedstawić wartości PDI oraz rozkłady wielkości w formie graficznej.
- W tabelach 1 P3 oraz P4, zastawiono wartości średnicy hydrodynamicznej dla badanych układów. Wartości otrzymane w tych pomiarach dla koniugatów $G3^{2B12gh}$ oraz $G3^{gh}$ mieszczą się w dolnej granicy pomiarowej dla metody DLS. W literaturze przedmiotu jest sporo danych dotyczących wielkości dendrymeru PAMAM G3.0. Wartość promienia hydrodynamicznego na podstawie metody SAXS oscyluje w granicach 1,6 nm, zależnie od warunków środowiskowych (typu rozpuszczalnika, siły jonowej, pH roztworu).



- Na rysunku 3 i 4 (P3) oraz tabeli 1 (P3, P4) zestawiono wyniki potencjału zeta badanych koniugatów w wodzie (pH=7.0) oraz buforze octanowym (pH=5.0). Analizując powyższe wyniki należy uwzględnić nie tylko zmianę pH rozpuszczalnika, ale również siłę jonową roztworu. W opisie metodologii brak informacji jaką wartość funkcji Ka zastosowano przy przeliczeniu wartości ruchliwości elektroforetycznej na potencjał zeta.
- Należałoby zinterpretować obserwowaną znikomą zmianę potencjału zeta dla koniugatów zawierających 5 lub 17 (tabela 1 P3) cząsteczek α -magnostyny. Jeżeli weźmiemy pod uwagę ilość grup wyjściowych (32 grupy powierzchniowe) sfunkcjonalizowanych w obu przypadkach to różnica jest kilkakrotna. Należałoby też porównać wartości potencjału zeta dla cząsteczki PAMAM G3.0 przed funkcjonalizacją, kiedy wszystkie grupy aminowe pierwszo i trzeciorzędowe są dostępne.
- Zaskakujący jest brak agregacji koniugatów $G3^{2B10gh17M}$ w wodzie pH =7,0, pomimo że charakteryzują się potencjałem zeta o wartości 22,7mV (rys.3 P3). Jednocześnie obserwuje się agregacje tego układu w pH 5.0 w buforze octanowym, pomimo że potencjał zeta w tym przypadku jest wyższy i wynosi 39,5mV. Aby monitorować wpływ potencjału zeta koniugatów na ich stabilność, proponuje określić ten parametr w szerszym zakresie pH. To pozwoli na zweryfikowanie wpływu przeciwjonów, a dodatkowo określenie położenia punktu izoelektrycznego dla badanego układu w zależności od zastosowanego rodzaju rozpuszczalnika.
- W przeprowadzonych badaniach brak próby kontrolnej dla samego leku (P3). Autorka w opracowaniu przyjmuje wartość IC_{50} otrzymaną z wcześniejszych badań. Sugerowałabym stosowanie próby kontrolnej dla każdej serii pomiarowej.
- Autorka podjęła się próby określenia wpływu wielkości oraz ładunku cząsteczki nośnika na efektywność badanych układów pod względem biologicznym. W pracy P4 mamy następujące podsumowanie:

"The results clearly show that conjugates containing amide bonds, partially-blocked amino groups on the surface, larger particle diameters and higher zeta potentials could be a more effective tool for therapy for cancer and nematode infections."

Jak się ma powyższe stwierdzenie do danych literaturowych, które wskazują, iż zbyt duża wielkość nośnika stanowi barierę przy przejściu przez błonę komórkową (optymalna



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

wielkość nośnika to 200 nm), ponadto dodatnio naładowane cząsteczki cechują się gorszą internalizacją do komórek.

W przedstawionych do oceny publikacjach są nieliczne pomyłki edytorskie.

- Na rysunku 5 (P2) brak oznaczenia, którą formę cząsteczki rhediaksantonu przedstawiono.
- W publikacji P3 oraz P4 autorka stosuje określenie „dynamic diameter”. Wielkość cząsteczki w pomiarach DLS określa się jako „hydrodynamic diameter”.

Dorobek mgr inż. Joanny Drozdowskiej obejmuje osiem publikacji. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym: *Pharmaceutics*, *Cancers*, *International Journal of Molecular Sciences*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *Molecules*, *European Journal of Pharmacology*. W trzech publikacjach doktorantka jest zarówno głównym autorem jak i korespondencyjnym.

Uczestniczyła w 7 konferencjach, na których zaprezentowała 3 referaty ustne i 4 postery. Odbyła miesięczny staż naukowy w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Za swoją działalność naukową otrzymała kilka razy stypendium dla najlepszych doktorantów. Brał udział w działalności koła naukowego studentów biotechnologii INSERT. Biorąc pod uwagę etap kariery naukowej dorobek Autorki oceniam na bardzo dobry.

Podsumowując, przedłożona do recenzji praca doktorska przedstawia istotną wartość pod względem poznawczym i aplikacyjnym, a tym samym posiada elementy nowości w zakresie dyscypliny inżynierii chemicznej. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Drozdowskiej pt. „Synteza i analiza aktywności biologicznej zmodyfikowanych dendrymerów poliamidoaminowych generacji trzeciej podstawionych wybranymi związkami z grupy ksantonów, jako potencjalnych czynników w terapii przeciwnowotworowej i przeciwnicieniowej” spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” oraz & 5 ust. 1 „Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków prowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora” (Dz. U. z 2018 r. poz. 261) oraz na podstawie art. 179. I Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę



Institut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

— Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669). Wobec powyższego
wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Rzeszowskiej o
przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Joanny Drozdowskiej do dalszych etapów
przewodu doktorskiego.

Barbara Jachimska

prof. dr hab. inż. Barbara Jachimska

BJ