



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Gdańsk, 17 marzec 2021 r.

*prof. hab. dr inż. Agata Kot-Wasik  
Katedra Chemii Analitycznej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Gdańska*

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr Anny Kilanowskiej**

**pt.: „Zastosowanie technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas w badaniu metabolizmu in vitro oligonukleotydów antysensownych pierwszej i drugiej generacji”**

wykonanej w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem promotora pani dr hab. Sylwii Studzińskiej, prof. UMK

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska obejmuje wszechstronnie przeprowadzone badania metabolizmu różnych generacji ASO w układach in vitro. Do realizacji zadania niezbędnym stało się opracowanie metod analitycznych pozwalających na analizę wybranych oligonukleotydów trzech różnych generacji o takiej samej sekwencji, lecz różniących się modyfikacją chemiczną.

Pierwszą kwestią, na jaką chciałam odpowiedzieć sobie po zapoznaniu się z rozprawą doktorską to kwestia wyboru analitów: oligonukleotydy. Oligonukleotydy to krótkie fragmenty kwasów nukleinowych, które z kolei są odpowiedzialne za dziedziczenie cech od naszych przodków. Oligonukleotydy antysensowne różnią się od tych obecnych w organizmie człowieka – mają inną budowę. Kilka z nich jest stosowanych w terapii różnego rodzaju chorób. Większość jest jednak w fazie badań klinicznych w testowaniu możliwości ich wykorzystania w leczeniu nowotworów. Struktura oligonukleotydów antysensownych jest zmodyfikowana, aby po przyjęciu takiego leku przez człowieka nie uległ on natychmiastowemu rozkładowi, a miał możliwość dotrzeć do miejsca działania w naszym organizmie. Ze względu na ich wykorzystanie w medycynie niezbędne jest więc poznanie ich losu w organizmie. A to będzie możliwe dzięki przeprowadzeniu badań ich przemian pod wpływem działania enzymów. Umożliwi to określenie jakie metabolity będą powstawać w organizmie w zależności od modyfikacji strukturalnych oligonukleotydów. Badania pozwolą także na oszacowanie czy produkty metabolizmu będą wykazywały aktywność biologiczną, czy będą szkodliwe dla

organizmu, w jakim stopniu i kiedy zostaną z organizmu wydalone. Wybór analitów wzbudził moje uznanie i duże zainteresowanie naukowe.

Drugą kwestią, na którą zwróciłam uwagę to: analityka oligonukleotydów. Nie jest to łatwa grupa analitów do rozdzielania. Układ chromatograficzny musi zapewnić i dużą selektywność i czułość w analizie najbardziej polarnych nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów, których nie można rozdzielić przy użyciu RP HPLC. Pod względem analitycznym cel postawiony został wysoko, a moja ciekawość w sposobie jego osiągnięcia wzrosła jeszcze bardziej.

Trzecia kwestia to warsztat aparaturowy. Połączenie selektywnej ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej z czułą detekcją MS (w różnych trybach pracy spektrometru mas) jest po prostu kompromisem pomiędzy obiema technikami. Optymalizacja warunków rozdzielania, jonizacji ESI i detekcji analitów z grupy oligonukleotydów wymagała wykonania wielu przemyślanych, obszernych, kompleksowych badań. Warsztat analityczny nie tylko nie budzi jakichkolwiek zastrzeżeń, ale wręcz przeciwnie, podziw i uznanie.

Z formalnego punktu widzenia oceniana rozprawa obejmuje 144 strony maszynopisu podzielonych na szereg rozdziałów, wśród których można wymienić części typowe dla tego typu dzieł, czyli: wykaz skrótów i oznaczeń (2 strony), wprowadzenie (obejmuje 3 strony), cele i założenia pracy (2 strony), omówienie problemu badawczego (czyli metod chromatograficznych, badań metabolizmu, zastosowań dendrymerycznych faz stacjonarnych – 22 strony), bibliografia (6 stron, 81 pozycji literaturowych, z czego ok. 75% to prace starannie dobrane opublikowane w ostatnim pięcioleciu), po czym po zamieszczonych publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej ulokowano podsumowanie i wnioski (2 strony), streszczenie w języku polskim i angielskim, dorobek naukowy Autorki pracy doktorskiej wraz z oświadczeniami współautorów.

Efektom prac jest aż sześć publikacji naukowych. Stanowią one zwartą całość przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej. Tak obszerna badania nie są opisane wcześniej w literaturze. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich sześciu pracach wchodzących w skład rozprawy, a oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości co do wiodącej roli pani mgr Anny Kilanowskiej. Dodam tutaj, iż tematyka badawcza jest według mojej opinii w pełni aktualna.

Tekst został napisany jasnym i poprawnym językiem. Autorka rozprawy doktorskiej znacząco utrudniła recenzentowi zadanie doszukania się niejasności i uchybień dbając o poprawność także pod kątem gramatycznym i interpunkcyjnym.

Opisy problemu badawczego, jak i sposobu jego realizacji oraz uzyskane wyniki są zaprezentowane kompleksowo i poruszają wszystkie ważne aspekty, co świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i dobrej znajomości tematu.

Analizując przedstawiony do recenzji materiał pod kątem merytorycznym, chciałabym podkreślić, iż w rozprawie doktorskiej przedstawiono opracowane metody kompleksowej analizy ASO różnych generacji zarówno w próbkach osocza, jak i w próbkach po inkubacji enzymatycznej. Rosnące zainteresowanie badaczy potencjalnymi terapeutykami, jakimi są

oligonukleotydy antysensowne, sprawia, że wymagana jest ich czuła analiza na różnych etapach badań. Takie czułe metody opracowano i przedstawiono. Doboru parametrów metod chromatograficznych rozdzielania mieszanin ASO dokonano poprzez selekcję rodzaju faz stacjonarnych i składu faz ruchomych dla różnych trybów chromatografii cieczowej: IPC, HILIC i IEC. Opisano mechanizm retencji ASO w trzech badanych trybach LC. Wykorzystano po raz pierwszy ciecze jonowe jako modyfikatory fazy ruchomej w IPC. W trybie HILIC wykazano możliwość zastosowania faz stacjonarnych o małej średnicy ziarna wypełnienia. Za pomocą dwubiegowego wypełnienia kolumny chromatograficznej rozdzielono mieszaniny oligonukleotydów różnych generacji. W trybie IPC pokazano możliwość zastosowania zsytegowanych w katedrze Chemii Środowiska i Bioanalizy dendrymerycznych faz stacjonarnych. Do detekcji oligonukleotydów stosowano spektrometrię mas. Opracowane metody analityczne zastosowano do badania metabolizmu *in vitro* oligonukleotydów różniących się długością sekwencji i modyfikacją chemiczną. Jestem przekonana, że opracowane przez panią mgr Annę Kilanowską metody mogą być wykorzystane w rutynowych analizach oligonukleotydów, w badaniach ścieżek transformacji, w badaniach przedklinicznych i klinicznych.

Z uwagi na fakt, iż wyniki prowadzonych badań zostały szczegółowo opisane w publikacjach naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach (*Critical Review in Analytical Chemistry* (IF=4.568), *RSC Advances* (IF=3,119), *Talanta* (IF=5,339), *Journal of Chromatography A* (IF=4,049), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (IF=3.637)) – a wiadomym jest fakt, iż opublikowanie wiązało się z oceną dwóch, a w niektórych przypadkach i trzech recenzentów – czuję się zwolniona z recenzowania tych publikacji. Przedstawię w tym miejscu najważniejsze osiągnięcia Doktorantki zaprezentowane w publikacjach:

1. „*Analysis of Antisense Oligonucleotides and Their Metabolites with the Use of Ion Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*”; Anna Kaczmarkiewicz, Łukasz Nuckowski, Sylwia Studzińska, Bogusław Buszewski – praca przeglądowa *Critical Review in Anal. Chem.*, 49, 256-270 (2019).

W w/w pracy przeglądowej przedstawiono aktualnie zatwierdzone leki oligonukleotydowe (OGN) i podsumowano ich rodzaje modyfikacji, mechanizmy działania oraz zastosowanie do analizy chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami par jonowych. Szczególną uwagę zwrócono na dobór faz stacjonarnych do rozdzielania OGN oraz wpływ różnych składów faz ruchomych na retencję i intensywność sygnału w spektrometrii mas (MS). Ponadto opisano zastosowanie chromatografii cieczowej opartej na oddziaływaniach par jonowych sprzężonej z MS do rozdzielania i oznaczania metabolitów ASO. Podkreślę, że uwzględniono rodzaj matrycy, czas analizy, granice oznaczalności i wykrywalności, a także precyzję, dokładność i liniowość opracowanych metod.

2. „*In vivo and in vitro studies of antisense oligonucleotides – a review*”; Anna Kilanowska i Sylwia Studzińska, *RSC Advances*, 10, 34501-34516 (2020)

W tej pracy podsumowano wybrane mechanizmy antysensownego działania leków, a także dotychczas zatwierdzone przez Agencję ds. Żywności i Leków oraz Europejską Agencję Leków leki. Ponadto krótko podsumowano metody bioanalityczne stosowane w badaniach farmakokinetyki i metabolizmu ASO. Szczególną uwagę zwraca się na podstawowe właściwości farmakokinetyczne różnych klas chemicznych antysensownych oligonukleotydów. Ponadto szeroko opisano szlaki metaboliczne tych związków *in vivo* i *in vitro*, z naciskiem na różne modele zwierzęce, jak również modele *in vitro*.

3. „*Analylis of the first and second generation of antisense oligonucleotides in serum samples with the use of ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*”; Anna Kaczmarkiewicz, Łukasz Nuckowski, Sylwia Studzińska, *Talanta*, 196, 54-63 (2019)

Celem badań było zbadanie wpływu sześciu różnych odczynników do parowania jonów w trybie chromatografii par jonowych na retencję i jonizację siedmiu antysensownych oligonukleotydów, które mają tę samą sekwencję, ale różne typy modyfikacji i długości. Ponadto badania retencji i selektywności przeprowadzono z wykorzystaniem czterech różnych faz stacjonarnych, w tym grup oktadecylowych, oktylowych i pentafluorofenyłowych oraz ligandów z wbudowanymi grupami polarnymi. Wyniki badań wykazały, że głównymi czynnikami wpływającymi na retencję badanych związków są hydrofobowość amin oraz rozgałęzienie łańcuchów. Największą retencję uzyskano dla heksyloaminy, a najmniejszą dla propyloaminy. Kolumny oktadecylowe i pentafluorofenyłowe charakteryzowały się najlepszą selektywnością i tę pierwszą wybrano do dalszych badań. Ponadto zoptymalizowano parametry pracy tandemowej spektrometrii mas i oceniono czułość oznaczania oligonukleotydów metodą spektrometrii mas. Największą czułość uzyskano dla 5 mM N, N-dimetylobutyloaminy w połączeniu z 1,1,1,3,3,3-heksafluoroizopropanolem i metanolem. Opracowaną metodę z powodzeniem zastosowano do oznaczania i rozdzielania mieszaniny siedmiu różnych oligonukleotydów w surowicy.

4. „*Analysis of antisense oligonucleotides with the use of ionic liquids as mobile phase modifiers*”; Anna Kaczmarkiewicz, Judyta Zielak, Łukasz Nuckowski, Sylwia Studzińska, *RSC Advances*, 9, 39100-39110 (2019)

Głównym celem było zbadanie wpływu kilku cieczy jonowych na retencję i rozdzielanie oligonukleotydów fosforotionianowych. Wykorzystano trzy różne fazy stacjonarne (oktadecyl, oktadecyl z wbudowanymi grupami polarnymi i pentafluorofenyl) oraz cieczy jonowe. Wyniki uzyskane podczas tych badań wykazały, że wzrost stężenia cieczy jonowych powoduje wzrost retencji oligonukleotydów. Taki efekt obserwowano niezależnie od zastosowanej fazy

stacjonarnej. Ponadto wydłużenie łańcucha alkilowego w strukturze cieczy jonowych spowodowało wzrost antysensownych czynników retencji oligonukleotydów. Opracowano metodę rozdzielania oligonukleotydów. Najlepszą selektywność uzyskano dla stacjonarnej fazy oktadecylowej. Dodam, iż zastosowanie cieczy jonowych jako dodatków do fazy ruchomej w analizie oligonukleotydów miało miejsce po raz pierwszy.

5. „*Application of hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the retention and sensitivity studies of antisense oligonucleotides*”; Anna Kilanowska, Bogusław Buszewski, Sylwia Studzińska, *J. Chromatogr. A.*, 1622, 461100 (2020)

Celem badań było zastosowanie chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych jako alternatywnego podejścia chromatograficznego do badań antysensownych oligonukleotydów. Zbadano wpływ kilku faz ruchomych, różniących się rodzajem soli, ich stężeniem i wartością pH na retencję i rozdzielanie antysensownych oligonukleotydów. Zastosowano również cztery różne fazy stacjonarne, w tym krzemionkę niemodyfikowaną, krzemionkę modyfikowaną grupami sulfobetainowymi, grupy polihydroksy i aminopropylowe. Tak szeroki zakres badanych warunków był przydatny w lepszym zrozumieniu mechanizmu retencji badanych związków. Wyniki uzyskane podczas tych badań wskazały, że większą retencję, większą symetrię pików, a także skuteczniejsze rozdzielanie mieszaniny wybranych oligonukleotydów uzyskano dla obojnaczej fazy stacjonarnej. Ponadto przeprowadzono optymalizację parametrów pracy tandemowej spektrometrii mas z wykorzystaniem *Central Composite Design*. Przetestowano różne fazy ruchome, aby wybrać tę, która zapewnia największą intensywność pików antysensownych oligonukleotydów w trybie MRM, a tym samym największą możliwą czułość. Chromatografię cieczową oddziaływań hydrofilowych porównano z chromatografią par jonowych, powszechnie stosowaną w analizie oligonukleotydów. Uzyskane wyniki dowiodły, że chromatografia par jonowych zapewniła lepsze wyniki pod względem wydajności rozdzielania i powierzchni pików w monitorowaniu reakcji wielokrotnych w badanych warunkach. Jednak wyniki te nie wykluczają zastosowania chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych jako alternatywnego podejścia chromatograficznego do analizy oligonukleotydów, zwłaszcza, gdy wymagana jest faza ruchoma bez odczynników par jonowych.

6. „*Studying in vitro metabolism of the first and second generation of antisense oligonucleotides with the use of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry*”; Anna Kilanowska, Łukasz Nuckowski, Sylwia Studzińska, *Anal. Bioanal. Chem.*, 412, 7453-7467 (2020)

Celem badań była analiza i identyfikacja produktów metabolizmu antysensownych oligonukleotydów po inkubacji z mikrosomami ludzkiej wątroby pod kątem czterech różnych modyfikacji oligonukleotydów. W tym celu opracowano metody rozdzielania i detekcji oparte na zastosowaniu chromatografii cieczowej sprzężonej z kwadropolową spektrometrią mas i z analizatorem czasem przelotu. W pierwszej

kolejności dokonano optymalizacji parametrów spektrometru mas, aby wyselekcjonować te, które zapewniają najwyższą możliwą czułość analizy oligonukleotydów. Ten etap przeprowadzono dla dwóch trybów chromatograficznych - chromatografii par jonowych i chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych - ze względu na ich powszechne zastosowanie w analizie oligonukleotydów. Na podstawie wyników czułości wybrano chromatografię par jonowych połączoną ze spektrometrią mas do rozdzielania modelowych mieszanin oligonukleotydów. Następnie opracowaną metodę zastosowano w badaniu metabolizmu oligonukleotydów *in vitro*. Najpierw przeprowadzono szeroką optymalizację parametrów inkubacji, w tym stężenia składników buforu reakcyjnego. Uzyskane wyniki wskazały, że zarówno 3'-egzonukleazy, jak i 5'-egzonukleazy przyczyniły się do biotransformacji oligonukleotydów. Ponadto można stwierdzić, że liczba metabolitów zależy od modyfikacji oligonukleotydów, a co za tym idzie, ich odporności na atak enzymatyczny.

Z nieukrywaniem zainteresowaniem zapoznałam się treścią wyżej omówionych publikacji, po lekturze której nasunęły się mi następujące pytania:

1. Połączenie chromatografii cieczowej i spektrometrii mas to kompromis pomiędzy rozdzielaniem (chromatograficznym) i czułością (w detektorze). Proszę o przedstawienie zalet stosowania HFIP w porównaniu do innych dodatków do fazy ruchomej.
2. Wykazano możliwość stosowania cieczy jonowych jako dodatków do fazy ruchomej w analizie oligonukleotydów. W roli detektora użyto spektrofotometr absorpcyjny. Czy próbowała Pani zastosować detekcję MS? Jeśli tak, to jakie były efekty? Jeśli nie, to dlaczego?
3. Podczas identyfikacji związku zawsze można popełnić błąd uzyskując wynik fałszywie dodatni lub fałszywie negatywny. Jak Pani, podczas identyfikacji metabolitów oligonukleotydów antysensownych, weryfikowała wyniki celem eliminacji tych podstawowych trudności?

Liczę na dyskusję w w/w zakresie podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Podsumowując uważam, iż badania będące przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kilanowskiej istotnie przyczyniają się do rozwoju nowych metod analitycznych pozwalających na kompleksową analizę oligonukleotydów antysensownych pierwszej i drugiej generacji z użyciem technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas w badaniu metabolizmu oligonukleotydów. Co więcej, aplikacja opracowanych metod ma ogromne znaczenie poznawcze. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż rozprawa doktorska autorstwa mgr Anny Kilanowskiej zatytułowana „Zastosowanie technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas w badaniu metabolizmu *in vitro* oligonukleotydów antysensownych pierwszej i drugiej generacji” wykonana w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu pod



kierunkiem promotora pani dr hab. Sylwii Studzińskiej, prof. UMK w mojej ocenie spełnia aktualne wymagania merytoryczne i formalne Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym, w związku z czym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Wydziału Chemii UMK w Toruniu o dopuszczenie mgr Anny Kilanowskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie chciałabym podkreślić, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Anny Kilanowskiej wpisuje się we współczesny nurt badań istotnych i wzbudzających zainteresowanie wśród naukowców. Biorąc pod uwagę złożoność rozwiązywanego zagadnienia, obszerny zakres pracy przekraczający zwyczajowo przyjęty, dużą wnikliwość i rzetelność Doktorantki w prowadzeniu pracy naukowej popartą aktywnością i efektywnością naukową (6 publikacji w tym 4 o charakterze oryginalnym i 2 prace przeglądowe) i bogatym dorobkiem naukowym (w sumie 13 publikacji naukowych, jedna monografia, 3 publikacje spoza listy JCR, uczestnictwo w konferencjach naukowych z prezentacją komunikatów i posterów), pozwalam sobie na postawienie wniosku o wyróżnieniu rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kilanowskiej. Wyróżnieniu w mojej opinii podlegają badania retencji oligonukleotydów antysensownych w trybie IP RP HPLC oraz HILIC z zastosowaniem UHPLC, badania wpływu różnych modyfikacji oligonukleotydów na ich oddziaływanie z fazą stacjonarną, zastosowanie UHPLC-ESI-MS/MS i UHPLC-ESI-Q-TOF-MS w analizie oligonukleotydów antysensownych oraz badania ich metabolizmu. Zaproponowane rozwiązania problemów chromatograficznych związanych z analityką oligonukleotydów antysensownych opisane zostały w literaturze po raz pierwszy, a zaprezentowane metodyki badawcze mogą być wykorzystywane podczas rutynowych oznaczeń oligonukleotydów.

*Prof. dr hab. inż. Agata Kot-Wasik*



Wpłynęło dnia 22.03.2022  
dr Katarzyna Białowicz  
Podpis Białowicz