

Prof. dr hab. Jacek Jemielity  
Laboratorium Chemii Bioorganicznej  
Centrum Nowych Technologii  
Uniwersytet Warszawski  
e-mail: [j.jemielity@cent.uw.edu.pl](mailto:j.jemielity@cent.uw.edu.pl)  
tel. 22 5543774

Warszawa 8.04.2021

#### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Kilanowskiej**

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

Oligonukleotydy, czyli krótkie syntetyczne fragmenty kwasów nukleinowych, mają olbrzymi potencjał jako czynniki terapeutyczne, ze względu na zdolność do selektywnego wyciszania ekspresji poszczególnych genów. Jednym z rodzajów tego typu narzędzi terapeutycznych są antysensowne oligonukleotydy (ASO) zaproponowane przez Paula Zamecnika w latach 70-tych ubiegłego stulecia, których działanie polega na tworzeniu heterodupleksów z mRNA, które zawierają sekwencję komplementarną do ASO, co prowadzi do zahamowania ekspresji danego genu. Dzieje się tak poprzez degradację mRNA w wyniku aktywacji RNAzy H lub blokowanie rybosomów. Obydwa mechanizmy skutkują zahamowaniem biosyntezy danego białka. Technologia ta w swojej historii przechodziła pewne zakręty od olbrzymiej euforii związanej z ich potencjałem, po rozczarowanie wynikające z braku spektakularnych zastosowań, aby w ostatnim dziesięcioleciu ponownie wrócić do łask. Obok olbrzymiego potencjału jaki mają ASO jako terapeutyki, posiadają one też istotne wady ograniczające ten potencjał; należą do nich m. in. naturalna podatność na degradację, brak zdolności do penetracji błon biologicznych, niespecyficzne wiązanie się do białek obecnych w osoczu. Z tego powodu przez ostatnie dziesięciolecie rozwijane są kolejne generacje ASO, w których zastosowano różnorodne rodzaje modyfikacji chemicznych poprawiających właściwości biologiczne. Z drugiej strony badanie efektu tych modyfikacji, stężenia w układach biologicznych, metabolizmu modyfikowanych oligonukleotydów, oceny ich czystości i stabilności wymaga odpowiednich metod analitycznych. I tego

właśnie dotyczy rozprawa przygotowana przez Panią magister Annę Kilanowską wykonaną pod kierunkiem dr hab. Sylwi Studzińskiej, prof. UMK w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pani mgr Anny Kilanowskiej została przygotowana w formie cyklu 6 publikacji opatrzonych 32 stronicowym komentarzem. Na zbiór prac, składa się dwie prace przeglądowe (*Critical Reviews in Analytical Chemistry* IF = 4.568; oraz *RSC Advance*, IF = 3.119) oraz 4 oryginalne prace eksperymentalne (*Analytical and Bioanalytical Chemistry*, IF = 3.637; *RSC Advances*, IF = 3.119; *Talanta*, IF = 5.339; *Journal of Chromatography A*, IF = 4.049). We wszystkich sześciu pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto mgr Anna Kilanowska jest współautorem siedmiu kolejnych prac, które nie zostały włączone do doktoratu. Nie ma więc wątpliwości, zwłaszcza biorąc pod uwagę etap kariery, że jest to bogaty dorobek naukowy.

Celem rozprawy było badanie metabolizmu różnych generacji oligonukleotydów antysensownych w układach *in vitro*. Drogą do realizacji tego celu było opracowanie efektywnych metod rozdzielania modyfikowanych oligonukleotydów. W tym celu zastosowano różne fazy stacjonarne oraz ruchome. Zbadano również wpływ fazy ruchomej na czułość oznaczania ASO metodą spektrometrii mas. W kolejnym etapie warunki te wykorzystano do oznaczania oligonukleotydów w próbkach biologicznych, oznaczania stabilności ASO w układach *in vitro* oraz badania ich metabolizmu.

Autorski komentarz do cyklu prac będących przedmiotem recenzowanej pracy jest krótki, co w pewnym sensie jest to spowodowane tym, że przegląd literatury został przedstawiony w dwóch pracach przeglądowych wchodzących w skład cyklu. Komentarz rozpoczyna się od krótkiego przedstawienia głównych technik chromatograficznych stosowanych w analizie oligonukleotydów. Autorka najwięcej uwagi poświęca chromatografii jonowymiennej (IEC), chromatografii par jonowych (IPR), oraz chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych (HILIC) przedstawiając ich zalety, ograniczenia w kontekście rozdziału oligonukleotydów, czułości ich oznaczania oraz kompatybilności ze spektrometrią mas. Pewne aspekty tego zagadnienia są znacznie szerzej omówione w pierwszej pracy przeglądowej wchodzącej w skład cyklu. Poświęcona jest ona chromatografii par jonowych sprzężonej ze spektrometrią mas do badania oligonukleotydów i ich metabolitów. Druga z kolei praca przeglądowa (*RSC Advances*) poświęcona jest badaniom *in vitro* i *in vivo* nad oligonukleotydami antysensownymi. Pewnych aspektów związanych z różnymi generacjami ASO, ich strukturą i właściwościami oraz mechanizmami działania oligonukleotydów w komentarzu do cyklu mi zabrakło. Zagadnienia te zostały potraktowane bardzo ogólnikowo i wydaje mi się, że rozwinięcie tej tematyki we wstępie lepiej uzasadniałoby ogrom pracy włożony w optymalizację metod oczyszczania, rozdziału i detekcji oligonukleotydów i ich metabolitów.

Badania własne przedstawione w komentarzu zostały podzielone na trzy części: a) opracowanie metod chromatograficznych do analizy ASO, b) badanie metabolizmu ASO w układzie *in vitro*, c)

zastosowanie dendrymerycznych faz stacjonarnych w analizie ASO. Jeśli chodzi o optymalizację metod chromatograficznych badano następujące czynniki: skład fazy ruchomej na rozdział chromatograficzny oraz czułość oznaczania przy użyciu MS, skład fazy stacjonarnej na rozdział oraz opracowanie metod chromatograficznych do rozdzielenia mieszanin ASO. Generalnym celem, który przyświecał tej części badań było opracowanie metod chromatograficznych do analizy ASO, które są efektywniejsze niż metody dotychczas stosowane.

Pierwszy etap polegał na badaniu wpływu różnego składu fazy ruchomej w IPC oraz HILIC na retencję i rozdział mieszaniny ASO. W tym celu stosowano różnego rodzaju aminy w mieszaninie z 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanolem (HFIP), sole organiczne lub imidazolowe ciecze jonowe.

Jeśli chodzi o fazę stacjonarną to testowano kolumny charakteryzujące się zmniejszoną średnicą ziaren (<2 um) i właściwościami hydrofobowymi oraz polarnymi w trybie HILIC oraz IPC wykorzystując komercyjne kolumny wypełnione niemodyfikowanym żel krzemionkowym oraz takie zawierające zawierające grupy zwiększające w różnym stopniu hydrofobowość. W rozdziale 2.2.3 Doktorantka krótko podsumowuje, które z zastosowanych układów eksperymentalnych pozwalają na skuteczny rozdział mieszaniny oligonukleotydów różnych generacji. Najważniejsza konkluzja z tego etapu badań jest taka, że najlepszą selektywność uzyskano w trybie IPC. W trakcie dalszych badań wykazano, również że ten układ eksperymentalny jest korzystny z punktu widzenia czułości oznaczania ASO metodą spektrometrii mas. Skrupulatne i pracochłonne badania przeprowadzone przez Doktorantkę doprowadziły do konkluzji, że najlepsze warunki analizy mieszaniny oligonukleotydów pod kątem selektywności rozdzielenia i czułości oznaczenia daje metoda IPC, oktadecylowe lub pentafluorenylowe wypełnienie kolumny oraz faza ruchoma składająca się z mieszaniny N,N-dimetylobutyloaminy, HFIP oraz metanolu. Jeśli chodzi o moje uwagi do tej części to przyznaje, że zabrakło mi głębszego uzasadnienia, do tych pracochłonnych badań polegających na rozdzieleniu ASO różnych generacji, zawierających różne modyfikacje. O ile badania oligonukleotydów różnej długości wydaje się dość oczywiste w kontekście metabolizmu ASO, to rozdział oligonukleotydów różnych generacji już taki oczywisty nie jest. Prosiłbym Doktorantkę aby odniosła się do tego problemu podczas publicznej obrony, wyjaśniając, czy istnieje rzeczywista potrzeba analizy tego typu mieszanin? Zabrakło mi również odniesienia w jakim stopniu osiągnięto cel ogólny, czyli czy udało się poprawić rozdział i czułość oznaczania oligonukleotydów w stosunku do obecnie stosowanych metod znanych z literatury.

Kolejnym etapem pracy było wykorzystanie zoptymalizowanych metod do badania metabolitów wybranych ASO. W tych badaniach wykorzystano jako model *in vitro* mikrosomy pozyskane z wątroby ludzkiej. Przed przystąpieniem do analizy metabolizmu oligonukleotydów, układ zoptymalizowano pod kątem czasu inkubacji oraz składu buforu reakcyjnego. W Tabeli 1 przedstawiono jakie produkty udało się wykryć w mieszaninie reakcyjnej dla 5 oligonukleotydów, jednego niemodyfikowanego oraz czterech modyfikowanych. Wprowadź skróty zamieszczone w tabeli

nie zostały wyjaśnione w tekście, ale zakładam, że 3'N-1 oznacza metabolit skrócony o jeden nukleotydy na 3' końcu, a z kolei 5'N-3 metabolit skrócony od strony 5' o trzy kolejne nukleotydy. Zgodnie z oczekiwaniami najwięcej metabolitów wykryto dla niemodyfikowanego oligonukleotydu, niewiele mniej dla analogu tiofosforanowego, najbardziej stabilny w badanym układzie okazał się MOE20, dla którego udało się wykryć tylko jeden metabolit (3'N-1). Zabrakło również komentarza dotyczącego stereochemii wiązań tiofosfodiesterowych w badanym oligonukleotyddzie tiofosforanowym. Ta część pracy wydawała mi się bardzo interesująca, jednak rodziła też kolejne pytania. Przykładowo, czy rozpatrywane były inne rodzaje metabolitów jak tylko wynikające ze skracania łańcucha oligonukleotydowego? Czy poszukiwano produktów utleniania zasad nukleinowych, czego można by spodziewać się w obecności cytochromu P450? Czy rozważano wykorzystanie do tych badań również lizatu komórkowego z komórek docelowych, takich w których ASO miałyby funkcjonować jako terapeutyki?

Ostatnia część rozprawy opisuje nieopublikowane dotychczas wyniki badań nad zastosowaniem dendrymerycznych faz stacjonarnych w analizie oligonukleotydów metodą chromatografii jonowymiennej. Jest to ciekawa koncepcja, udało się Doktorantce uzyskać dobrą separację jednak ze względu na stosowaną fazę ruchomą typową dla chromatografii jonowymiennej, czułość detekcji w spektrometrze mas była niska, zatem jej użyteczność jest ograniczona jedynie do zastosowań w których czułość metody nie jest istotna.

Podsumowując Doktorantka podczas realizacji projektu doktorskiego uzyskała bardzo bogaty materiał doświadczalny. Dotyczy on bardzo istotnego zagadnienia jakim jest opracowanie metod analitycznych związanych z rozwijaniem nowatorskich metod terapeutycznych. Sam autorski komentarz do cyklu prac jest dość oszczędny i budzi niekiedy wątpliwości co do jasności przekazu i jego kompletności. Jednak nie ma wątpliwości, że rozprawa wnosi istotny wkład w metodykę separacji i oznaczania oligonukleotydów anysensownych i ich metabolitów. Dorobek Kandydatki uważam za bardzo istotny. Sześć prac pierwszoautorskich opublikowanych w uznanych przez środowisko naukowe czasopismach uważam za dowód dojrzałości i samodzielności naukowej Kandydatki.

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa Doktorska spełnia wszelkie warunki określone w stosownej Ustawie i wnioskuję do do Rady Dyscypliny na Wydziale Chemii UMK o dopuszczenie mgr Anny Kilanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

