

*Alvarez
Hern*



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w
Poznaniu

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Adres: ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań
mkaraz@ump.edu.pl

tel. (61) 641-83-65

Poznań 2022-08-31

RECENZJA

pracy doktorskiej wykonanej przez mgr Katarzynę Bazydło-Guzendę
pt: „Rozwój innowacyjnych agonistów GPR40 jako potencjalnych leków w terapii
cukrzycy typu 2”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek oraz dr. Jerzego Pieczykolana w laboratoriach Celon Pharma S.A., dotycząca rozwoju nowego agonisty GPR40, który mógłby być wykorzystany do leczenia cukrzycy typu 2, doskonale wpisuje się w nowoczesny nurt badań przedklinicznych mających na celu zaprojektowanie i opracowanie bezpiecznych i skutecznych leków przy wykorzystaniu szeregu nowoczesnych technik analitycznych, linii komórkowych i modeli zwierzęcych.

Rozprawa doktorska liczy 47 numerowanych stron i zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, teoretyczne wprowadzenie do badanej tematyki, jasno sprecyzowany cel projektu, opis materiałów i metod zastosowanych do jego realizacji, wyniki wraz z komentarzem, podsumowanie i wnioski, a także artykuły będące integralną częścią rozprawy. Wyniki przeprowadzonych przez mgr Bazydło-Guzendę badań udokumentowano w trzech spójnych tematycznie publikacjach oryginalnych, opublikowanych w 2021 r. w międzynarodowych czasopismach (European Journal of Medicinal Chemistry, Molecular Pharmacology i PLOS ONE), posiadających wysokie współczynniki oddziaływania *Impact Factor* 3,240 – 6,514. Elementem łączącym wszystkie publikacje jest związek CPL207280, nowy agonista GPR40 o potencjalnym działaniu przeciwcukrzycowym, dla którego przeprowadzono badania efektywności i

bezpieczeństwa zarówno w testach *in vitro* jak i *in vivo*. Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktorantki oraz współautorów opublikowanych manuskryptów. Wynika z nich, że udział p. mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy w przygotowaniu tych prac był znaczący (10–55%) i obejmował aktywne uczestnictwo w części przeprowadzonych eksperymentów, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptów. Doktorantka jest osobą o znaczącym doświadczeniu naukowym, co na pewno pomogło Jej w planowaniu i realizacji szeregu zadań badawczych. Z przesłanych mi informacji wynika, że p. Katarzyna Bazydło-Guzenda może poszczycić się stosunkowo wysokim dorobkiem naukowym (całkowity IF = 22,891), jest również współautorką patentu i dwóch grantów NCBiR, oraz brała udział w licznych konferencjach naukowych.

W rozdziale pierwszym rozprawy, będącym teoretycznym wprowadzeniem w podjętą tematykę badań, Doktorantka przedstawiła zagadnienia dotyczące etiologii i patologii cukrzycy, oraz omówiła mechanizmy działania leków przeciwcukrzycowych. Opisała rolę receptora 1 dla wolnych kwasów tłuszczowych (FFAR1/GPR40) w regulacji poziomu glukozy w organizmie i przedstawiła historię rozwoju pierwszego drobnocząsteczkowego agonisty GPR40 (TAK875), powołując się na szczegóły przeprowadzonych z jego udziałem badań. Doktorantka trafnie wykorzystwała przedstawione powyżej zagadnienia teoretyczne do podkreślenia zasadności podjęcia przeprowadzonych w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej badań nad opracowaną w laboratoriach Celon Pharma S.A. cząsteczką CPL207280. Rozdział ten zawiera również omówienie procesu rozwoju leku drobnocząsteczkowego na przykładzie wspomnianego związku wraz z opisem badań, które powinny być przeprowadzone w poszczególnych etapach tego procesu z uwzględnieniem badań przesiewowych, analizy fizykochemicznej, technologii postaci leku czy badań efektywności i bezpieczeństwa w warunkach *in vivo*.

Wybór tematu pracy i cele badawcze zostały jasno sprecyzowane w rozdziale drugim. Doktorantka postawiła sobie ambitne zadanie przeprowadzenia szeregu badań obejmujących wyselekcjonowanie efektywnego, małowcząsteczkowego agonisty receptora GPR40, który mógłby być wykorzystany do dalszego rozwoju jako innowacyjny lek stosowany w leczeniu chorych z cukrzycą typu 2. Jak wspomniano w rozdziale 3 dotyczącym metodyki badań, część prac została zlecona firmom zewnętrznym, co przy tak złożonym projekcie jest w pełni zrozumiałe. Jednak, jak wynika z oświadczenia Autorki, synteza analizowanych związków, większość badań *in vitro* przy użyciu linii komórkowych oraz analiza i interpretacja wyników, zostały wykonane w laboratoriach Celon Pharma S.A. przy znaczącym udziale Doktorantki. Tak szeroki zakres badań

świadczy o dobrej znajomości różnych technik analitycznych i umiejętności ich wykorzystania do założonych celów badawczych.

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawiła nieopublikowane wyniki dotyczące testów przesiewowych potencjalnych agonistów GPR40, obejmujących 200 związków chemicznych zsyntetyzowanych na potrzeby badań. Testy te obejmowały określenie stopnia aktywacji receptora GPR40 przez badane związki, a po wyselekcjonowaniu 13 związków o największej aktywności, przeprowadzono dla nich test wydzielania insuliny w hodowli mysich komórek insulinomy oraz badania stabilności metabolicznej z użyciem szczurzych i ludzkich mikrosomów wątrobowych. Wyznaczone dla badanych związków parametry kinetyczne, $T_{1/2}$ i Cl_{int} porównano do wartości otrzymanych dla związków referencyjnych, TAK875 oraz AMG837. O ile związek referencyjny TAK875 został wcześniej zdefiniowany jako fasiglifam, agonista GPR40, który został wycofany z badań klinicznych z powodu hepatotoksyczności, o tyle AMG837 nie został opisany w tekście rozprawy i nie wyjaśniono, dlaczego jest związkiem referencyjnym. Z kolei w opisie Tabeli 1, Autorka podaje, że stabilność metaboliczną badanych związków oceniano, porównując je do dwóch standardów o niskiej i wysokiej stabilności metabolicznej, którymi były odpowiednio werapamil i donepezil oraz stosując klasyfikację dostępną na stronach firmy Cyprotex. Jednak w tekście pracy brakuje wyjaśnienia, które kryteria ostatecznie przyjęto i czy wartości graniczne podane w Tabeli 1 odnoszą się do wspomnianych standardów. Ponadto, porównując w tekście wartości klirensu wewnętrznego, należałoby podać też jednostkę, w której te wartości wyznaczono.

Pierwsza praca ujęta w rozprawie doktorskiej to publikacja przedstawiająca wyniki badań, na podstawie których dokonano wyboru związku CPL207280 spośród grupy 4 najbardziej obiecujących cząsteczek wyselekcjonowanych we wcześniejszych testach *in vitro*. Badania te obejmowały określenie parametrów farmakokinetycznych: biodostępności, stężenia maksymalnego w osoczu, T_{max} oraz biologicznego okresu półtrwania po podaniu doustnym analizowanych związków szczurom typu dzikiego (WT), a także badania oceniające zdolność stymulacji insuliny w teście obciążenia glukozą. Tutaj muszę wspomnieć o tym, że przy opisie testu obciążenia glukozą stosowane są trzy różne skróty: TTG (str. 32), GTT (np. str. 33) lub IPGTT (w publikacji 1), co może być mylące, jeżeli dotyczy tego samego badania. Jeżeli jednak testy te były prowadzone w odmiennych warunkach, należałoby to wyjaśnić w tekście. W załączonej Tabeli 2 przedstawiono podsumowanie najważniejszych parametrów związku CPL207280 i wyników, na podstawie których wyselekcjonowano ten związek do dalszych badań efektywności oraz bezpieczeństwa. Szkoda, że nie omówiono wyników z Tabeli 2 szerzej w tekście, gdyż nie

do końca wiadomo, czego te parametry dotyczą. Na przykład wyjaśnienia wymagałby parametr CHLogD7.4 – czym różni się od parametru cLogD7.4? Dodatkowo określenie parametrów klirensu wewnętrznego i okresu półtrwania jako „Cl_{int} (człowiek)” i „T_{1/2} (człowiek)” i zestawienie ich obok parametrów farmakokinetycznych uzyskanych w badaniach *in vivo* na szczurach może wprowadzać w błąd i sugerować kliniczny aspekt badań, choć uzyskano te parametry w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich mikrosomów. Natomiast oceniając samą publikację 1, jestem pod dużym wrażeniem i gratuluję tak dobrze przygotowanego opracowania. Cały opis procesu selekcji związku CPL207280 od samej koncepcji, przez optymalizację syntezy, aż do badań na zwierzętach, został rzetelnie opisany i skomentowany, a do realizacji części badawczej wykorzystano wiele nowoczesnych i różnorodnych technik analitycznych.

Kolejna publikacja dotyczy analizy efektywności związku CPL207280 i prezentuje wyniki badań *in vitro* i *in vivo*. W przeprowadzonych testach z użyciem komórek ludzkich z nadekspresją receptora GPR40, potwierdzono mechanizm działania badanej cząsteczki obejmujący zależną od poziomu glukozy stymulację wydzielania insuliny za pośrednictwem receptora GPR40. Natomiast, w badaniach z wykorzystaniem mysich i szczurzych komórek insulinoma wykazano, że CPL207280 charakteryzuje się silniejszym działaniem i niższą toksycznością w porównaniu do referencyjnego związku TAK875. Dodatkowo zbadano wpływ nowej cząsteczki na funkcje innych receptorów, enzymów, kanałów jonowych i transporterów w celu oceny potencjalnych niespecyficznych interakcji z białkami. Aktywność związku potwierdzono również w modelach zwierząt zdrowych i z cukrzycą, a co ważne nie obserwowano hipoglikemii nawet po podaniu wysokich dawek. Dodatkowo wyznaczono parametry farmakokinetyczne u szczurów po podaniu doustnym i dożylnym związku. Zauważyłam pewną nieścisłość dotyczącą wartości biologicznego okresu półtrwania. W tabeli 3 publikacji 2 podana jest wartość T_{1/2}=0.49 h, natomiast w tekście tej publikacji (str. 339) jest to wartość 1.4 h. Proszę o wyjaśnienie, z czego wynika ta różnica.

Podsumowując zaprezentowane w publikacji 2 wyniki badań, zgadzam się z opinią Autorki rozprawy, że CPL207280 wykazuje się wysoką efektywnością i niską toksycznością zarówno w badaniach na liniach komórkowych, jak i w modelach zwierzęcych, i jest dobrym kandydatem na nowy lek o potencjalnym zastosowaniu w cukrzycy typu 2.

Ostatnia publikacja objęta rozprawą doktorską dotyczy badań nad bezpieczeństwem stosowania nowego związku. W tym celu przeprowadzono testy *in vitro* oceniające jego wpływ na funkcję hepatocytów, ludzkich komórek raka wątroby oraz hepatosferoidów. Przeanalizowano również profil metaboliczny cząsteczki z

wykorzystaniem mikrosomów i hepatocytów zwierzęcych. W badaniach *in vivo*, nie wykazano hepatotoksyczności po podaniu jednorazowym i wielokrotnym CPL207280 szczurom i małpom. Na podstawie zależności zmian stężeń związków CPL207280 oraz TAK875 w czasie u tych zwierząt, zarówno po podaniu jednorazowym jak i wielokrotnym stwierdzono, że oba związki wykazują odmienną farmakokinetykę, co było widoczne zwłaszcza w odniesieniu do biologicznego okresu półtrwania i biodostępności. Nie udało mi się znaleźć w publikacji informacji na temat programu wykorzystanego do wyznaczenia parametrów farmakokinetycznych u zwierząt. W dwóch poprzednich publikacjach, przy opisie badań farmakokinetycznych podano, że C_{max} i t_{max} odczytywano na podstawie rzeczywistych wartości stężeń, natomiast brak było informacji, na temat sposobu wyznaczania $T_{1/2}$. W publikacji trzeciej pojawiły się dodatkowe parametry, takie jak k_{el} , $T_{1/2ka}$, V_d i AUC. W jaki sposób je wyznaczono? Czy na podstawie uzyskanych profili zmian stężenia CPL207280 w czasie u zwierząt można określić dopasowanie do konkretnego modelu farmakokinetycznego?

W przedstawionej do oceny rozprawie zamieszczono podsumowanie przeprowadzonych badań oraz wnioski, które wskazują na wysoką aktywność związku CPL207280 w regulacji poziomu glukozy u zwierząt reprezentujących różne modele i fenotypy cukrzycy oraz brak oznak toksyczności. W podsumowaniu zawarta jest również informacja, że badany związek jest obecnie poddawany badaniom klinicznym 2 fazy, co wskazuje na to, że inspirowana naturalnymi kwasami tłuszczowymi cząsteczka jest dalej rozwijana jako atrakcyjny kandydat na lek, dedykowany do leczenia cukrzycy typu 2.

Do rozprawy dołączono również bibliografię, obejmującą 74 pozycje, głównie w postaci publikacji zagranicznych z kilku ostatnich lat i źródeł internetowych, które zostały dobrze dobrane i w sposób wyczerpujący wyjaśniają podstawy teoretyczne podjętych badań. Praca napisana jest poprawnie pod względem stylistycznym i gramatycznym. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i zostały trafnie dobrane do rodzaju zadań badawczych i wyznaczonego celu. Liczne tabele i ryciny obrazujące wyniki badań przedstawione w publikacjach są niezwykle pomocne przy interpretacji prezentowanych parametrów. W mojej ocenie wszystkie wyniki zostały poprawnie zinterpretowane i skomentowane w odniesieniu do danych literaturowych.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do recenzji rozprawą, nasunęły mi się dodatkowe drobne uwagi w odniesieniu do wykazu stosowanych skrótów:

- Dla FPG użyto potocznego sformułowania „glukoza na czczo”. Wg mnie, powinno być „stężenie/poziom glukozy w osoczu na czczo”.

- Podobnie, dla „TBA – całkowite kwasy żółciowe”, lepiej użyć sformułowania „stężenie całkowite kwasów żółciowych”
- EPAC - Exchange protein directly activated by camp / białko wymienne aktywowane przez camp – powinno być „Białko wymienne aktywowane przez cAMP”.

Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, która jest ambitna i nowatorska, a zawarte w niej dane i sposób analizy świadczą o dużej wiedzy i umiejętnościach Doktorantki, nie tylko w zakresie planowania eksperymentów, prowadzenia badań z wykorzystaniem różnorodnych metod analitycznych, linii komórkowych i modeli zwierzęcych, ale także analizy uzyskanych wyników.

Podsumowując, recenzowana praca jest oryginalna i dostarcza wielu wartościowych danych dotyczących właściwości fizykochemicznych, efektywności i bezpieczeństwa stosowania cząsteczki CPL207280. Stanowi ona twórczy wkład Doktorantki w proces rozwoju nowego agonisty GPR40 o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu cukrzycy typu 2. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, proponuję wyróżnić przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską ze względu na wysoki aplikacyjny charakter przeprowadzonych badań. O ich wartości świadczy również fakt, że zostały opublikowane w specjalistycznych czasopismach z bazy JCR o sumarycznym współczynniku oddziaływania $IF= 14,19$ i punktacji $MEiN = 380$.

dr hab. n. farm.
M. Karasiewicz-Lada
M. Karasiewicz-Lada