

Warszawa, 23.07.2015

Prof. dr hab. Jan Pachecka
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt. "Wpływ struktury jednołańcuchowego prekursora insuliny na proces wytwarzania rekombinowanej insuliny ludzkiej" wykonanej przez mgr Renatę Pawlak-Morka pod kierunkiem dr hab. Wojciecha Miłtyka.

Problematyka badawcza pracy ma aspekty poznawcze i aplikacyjne w zakresie charakterystyki przebiegu i mechanizmów procesów biosyntezy substancji białkowych na drodze rekombinacji genetycznej jak również określenia wpływu sekwencji aminokwasowej jednołańcuchowego prekursora insuliny na właściwości chemiczne i biologiczne tego hormonu stosowanego w terapii.

Przedmiotem badań przedstawionych w recenzowanej pracy jest rekombinowana insulina ludzka wytwarzana przez genetycznie zmodyfikowany szczep *E. coli* zawierający plazmid z fragmentem DNA kodującym jednołańcuchowy prekursor insuliny ludzkiej. Wprowadzony do komórek bakterii DNA zawiera również zmodyfikowany fragment genu ludzkiej dysmutazy ponadtlenkowej odpowiedzialny za wydajność procesu biosyntezy oraz odtwarzanie konformacji rekombinowanej insuliny ludzkiej. Istotną rolę w otrzymywaniu aktywnej konformacji rekombinowanej insuliny ludzkiej odgrywa prawidłowe rozpuszczanie ciał inkluzyjnych, a następnie odtworzenie natywnej struktury przestrzennej hormonu.

Badania wchodzące w zakres recenzowanej rozprawy uważam za ważne z uwagi na konieczność dostarczania do leczenia preparatów insuliny zapewniających skuteczną i bezpieczną terapię cukrzycy typu 1 i 2.

Będzie to możliwe pod warunkiem, że otrzymana metodą biotechnologiczną insulina ludzka będzie posiadała konformację natywnej cząsteczki hormonu

determinującą rozpoznanie biologiczne i związanie ze specyficznym receptorem. Związanie insuliny ludzkiej z receptorem insuliny w organizmie pacjenta wywołuje odpowiednią sekwencję efektów biologicznych i jest pozbawione niekorzystnych działań ubocznych.

Wiodącym celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było dokonanie oceny wpływu struktury prekursora insuliny na przebieg procesu biosyntezy oraz jakoć wytwarzanego hormonu. Badania obejmowały cztery prawidłowo sformułowane zadania badawcze. Po pierwsze, potwierdzenie struktury jednołańcuchowego prekursora insuliny ludzkiej, po drugie, określenie mechanizmu reakcji deamidynacji asparaginy do kwasu asparaginowego zachodzącej w procesie wytwarzania insuliny, po trzecie, ocenę wpływu struktury prekursora na przebieg procesu renaturacji białka liderowego oraz proces konwersji enzymatycznej hormonu, po czwarte, określenia wpływu sekwencji aminokwasowej prekursora na odtwarzanie natywnej konformacji oraz aktywność biologiczną rekombinowanej insuliny ludzkiej.

Uważam, że zaplanowane i przeprowadzone w recenzowanej pracy badania są wynikiem logicznej i dojrzałej koncepcji rozwiązania problemu naukowego.

Metody badawcze zastosowane w toku realizacji programu badań pozwoliły na uzyskanie zamierzonego celu badań.

Do oceny czystości materiału na etapie foldingu i konwersji enzymatycznej białka stosowano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Ustalenie sekwencji aminokwasowej wykonano metodą Edmana.

Proces deamidynacji badano przy użyciu spektrometrii mas.

Badania struktury drugorzędowej rekombinowanej insuliny ludzkiej prowadzono metodą spektroskopii dichroizmu kołowego oraz metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera.

Uważam, że Autorka rozprawy uzyskała zamierzony cel badań.

W przeprowadzonych badaniach, po pierwsze, potwierdziła obecność kwasu asparaginowego w pozycji 26 fragmentu polipeptydu zawierającą zmodyfikowaną sekwencję dysmutazy ponadtlenkowej. Po drugie, potwierdziła, że deamidynacja asparaginy do kwasu asparaginowego zachodzi stopniowo na etapie rozpuszczania ciał inkluzyjnych oraz na etapie prowadzenia foldingu.

Po trzecie, potwierdziła, że zidentyfikowana struktura prekursora insuliny zapewnia powtarzalny, prawidłowy przebieg procesu foldingu oraz konwersji enzymatycznej białka.

Po czwarte, wykazała pełną zgodność struktury II rządowej insuliny produkcji Bioton S.A. z substancją referencyjną produkowaną przez firmę E. Lilly.

Po piąte, stwierdziła, że stopień powinowactwa insuliny produkowanej przez Bioton S.A. do receptorów oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 jest identyczny jak substancji referencyjnej

Maszynopis recenzowanej rozprawy ma układ typowy dla prac doktorskich. W części teoretycznej zatytułowanej „Wstęp” Autorka podaje niezbędne informacje dotyczące insuliny, z uwzględnieniem metod jej wytwarzania w ujęciu historycznym. Zwraca szczególną uwagę na rekombinowaną insulinę ludzką i jej wytwarzanie metodami biotechnologicznymi oraz na znaczenie prekursora w procesie odtwarzania struktury przestrzennej hormonu i rolę struktury przestrzennej w zjawisku insulinooporności.

Informacje podane w tej części pracy świadczą, że Autorka zapoznała się z bogatym piśmiennictwem w tym zakresie i dokonała prawidłowej selekcji publikacji. Wykaz piśmiennictwa obejmuje 91 pozycji, przede wszystkim anglojęzycznych (niestety, nie każda pozycja piśmiennictwa zawiera rok opublikowania). W wykazie piśmiennictwa nie podano prac własnych.

Cel pracy został sformułowany prawidłowo, a jego realizacja została w znacznym stopniu oparta na porównaniu preparatów insuliny wytwarzanych metodami biotechnologicznymi przez firmę Bioton S.A. oraz firmę E. Lilly.

Rozdział zatytułowany „Materiały i Metody” zawiera wykaz materiałów stosowanych w badaniach, wykaz stosowanej aparatury laboratoryjnej oraz wystarczająco dokładny opis stosowanych metod badawczych. Tą część pracy kończy omówienie schematu prowadzonych badań podzielonych na etapy I-IV.

Następna, najbardziej obszerna część pracy, zatytułowana „Wyniki” zawiera rezultaty badań, które zostały przedstawione w formie 43 rycin oraz 7 tabel.

Przedstawiono sekwencje 116 aminokwasowego prekursora rekombinowanej insuliny ludzkiej, zapewniającą powtarzalny, prawidłowy przebieg procesu foldingu oraz konwersji enzymatycznej białka. Do badania parametrów biologicznych stosowano pomiar wiązania insuliny do receptorów metodą radioizotopową (RIA), pozwalającą na określenie powinowactwa insulina-

receptor insuliny oraz insulina-ludzki receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu-1. Analiza uzyskanych wyników wskazuje, że powinowactwo do specyficznego receptora rekombinowanej insuliny ludzkiej wytworzonej przez Bioton S.A. oraz insuliny referencyjnej jest na porównywalnym poziomie. Podobne wyniki uzyskano w badaniach wiązania insuliny do ludzkiego receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu-1.

Bardzo dobrze jest napisana następną część pracy zatytułowana „Dyskusja”. Na podstawie danych literaturowych, obowiązujących zasad badania leków biologicznych oraz wyników badań własnych Autorka przedstawiła w sposób systematyczny główne problemy realizowanych badań. Ważnym zagadnieniem było zidentyfikowanie etapu procesu wytwarzania insuliny, w którym zachodzi przemiana asparaginy do kwasu asparaginowego i podjęcie próby wyjaśnienia tego zjawiska. Autorka wykazała, że deamidacja asparaginy w pozycji 26 prekursora rozpoczyna się podczas rozpuszczania ciał inkluzyjnych i przebiega w trakcie prowadzenia procesu foldingu. Przedstawiony mechanizm wyjaśnia, że asparagina w pozycji 26 ulega preferencyjnej deamidacji ze względu na obecność glicyny w pozycji 27 łańcucha polipeptydowego.

Ocena czystości prekursora insuliny rekombinowanej na etapie foldingu i konwersji enzymatycznej wykazała, że czystość obu badanych preparatów jest zgodna z przyjętymi normami. Zidentyfikowana struktura prekursora insuliny zapewnia prawidłowy, powtarzalny przebieg foldingu i enzymatycznej konwersji białka.

Badania wpływu sekwencji aminokwasowej na właściwości fizykochemiczne i biologiczne insuliny rekombinowanej prowadzono zgodnie z wytyczną ICH Q5E rekomendowaną przez Europejską Agencję Leków (EMA).

Strukturę II rzędową i III rzędową insuliny ludzkiej porównano z farmakopealnym standardem wzorcowym Insulin Human CRS i wykazano występowanie identycznych struktur przestrzennych w rekombinowanej insuliny ludzkiej wytworzonej w Bioton S.A. i referencyjnym wzorcu farmakopealnym. Dalsze badania z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni (FTIR) wykazały pełną zgodność udziału α -helisy i β -harmonijki w strukturze II rzędowej insuliny Bioton S.A. i insuliny referencyjnej.

Najważniejszym parametrem jakości otrzymanego preparatu insuliny rekombinowanej jest określenie i porównanie powinowactwa do receptora insuliny ludzkiej oraz do ludzkiego receptora insulinopodobnego czynnika

wzrostu -1, zgodnie z metodami rekomendowanymi przez Europejską Agencję Leków zawartymi w wytycznych z roku 2005 i 2012. Jako produkt referencyjny stosowano preparat Huminsulin Normal/Huminsulin R wytwarzany przez firmę E. Lilly. Analiza uzyskanych wyników wskazuje, że porównywane preparaty wykazują identyczny stopień powinowactwa do obu typów badanych receptorów.

W części zatytułowanej „Wnioski” Autorka przedstawia 6 dobrze sformułowanych wniosków adekwatnych do uzyskanych wyników.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana praca doktorska wnosi nowe informacje do problematyki otrzymywania rekombinowanej insuliny ludzkiej zgodnie z technologią stosowaną w firmie Bioton S.A. oraz do charakterystyki otrzymywanych preparatów na poziomie właściwości fizykochemicznych i biologicznych w odniesieniu do preparatów insuliny ludzkiej produkowanej przez firmę E. Lilly.

Formułowanie i umiejętność rozwiązywania problemów świadczą, że Autorka rozprawy opanowała sztukę prowadzenia badań naukowych w zakresie biotechnologii farmaceutycznej.

Stwierdzam, że recenzowana praca spełnia ustawowe warunki stawiane pracom na stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Renaty Pawlak-Morka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

