



Dr hab. Katarzyna Piwocka, *Profesor Instytutu Nenckiego*
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Warszawa, 15.12.2023

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agaty Mikołajczyk
"Rozwój innowacyjnego inhibitora drobnocząsteczkowego celującego zarówno w komórki nowotworowe, jak i mikrośrodowisko nowotworowe"

Przedstawiona do oceny rozprawa pani mgr Agaty Mikołajczyk wykonana została w Dziale Badań Przedklinicznych Celon Pharma S.A., w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy realizowanego w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem prof. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek (promotor) oraz dr Delfiny Popiel (promotor pomocniczy).

Badania podjęte przez doktorantkę wpisują się w niezwykle ważny obszar nauk biologiczno-medycznych związany z zastosowaniem nowoczesnych niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz onkogennych oraz mikrośrodowiskiem guza jako celem terapeutycznym. Mikrośrodowisko guza odgrywa istotną rolę w powstawaniu i progresji nowotworów i jest przyczyną oporności na terapię. Stąd poznanie procesów zachodzących w mikrośrodowisku guza oraz projektowanie i wdrażanie nowoczesnych terapii celujących w komórki mikrośrodowiska naciekające guz jest intensywnie rozwijającym się kierunkiem prac nad efektywnymi i skutecznymi terapiami przeciwnowotworowymi. Doktorantka skupiła się na nowotworach, których rozwój związany jest z aktywnością onkogennych kinaz tyrozynowych z [REDACTED]. Aktywacja i funkcje tych kinaz w nowotworach różnych typów mają szerokie konsekwencje dla homeostazy komórek, transformacji nowotworowej oraz aktywacji pronowotworowych i prożyciowych cech komórek. Ponadto, w ostatnim czasie wykazano znaczenie kinaz z [REDACTED] także w makrofagach naciekających guz. Makrofagi istotnie wpływają na rozwój nowotworu, a makrofagi związane z nowotworem, które wykazują właściwości przeciwzapalne i cytoprotekcyjne wspierają wzrost nowotworu, angiogenezę, przerzutowanie a także immunosupresję. W związku z powyższym, kinazy te są celami terapeutycznymi o bardzo wysokim potencjale klinicznym, ze względu na znaczenie dla samego nowotworu jak i komórek mikrośrodowiska. Stąd wybór obszaru badań uważam za bardzo ważny i cenny, a także zgodny z aktualnymi potrzebami i kierunkiem rozwoju procesu powstawania skutecznego nowoczesnego leku przeciwnowotworowego.

Pani Agata Mikołajczyk postawiła za Cel swojej pracy selekcję i przeprowadzenie badań przedklinicznych innowacyjnych cząsteczek - inhibitorów kinaz onkogennych z [REDACTED] (ulegających ekspresji w różnych nowotworach i komórkach mikrośrodowiska guza) oraz [REDACTED] (ulegającej ekspresji w progenitorowych komórkach krwiotwórczych i ulegających mutacji w około 30% przypadków AML) oraz wybór cząsteczek wiodących, a następnie ocenę ich skuteczności na hamowanie wzrostu guza w mysim modelu xenograft czerniaka i ostrej białaczki szpikowej. Finalnie, doktorantka wytypowała związek główny do dalszych badań i zbadała jego wpływ na mikrośrodowisko guza i naciekające komórki układu odpornościowego w syngenicznym modelu

mysim. Badania te bazują na bogatych wynikach wcześniejszych prac przeprowadzonych wcześniej w laboratoriach Celon Pharma (biblioteka 438 drobnocząsteczkowych związków chemicznych, pochodnych aminopirydyn oraz pirolipirydyn, opracowana na podstawie dostępnych publicznie danych obejmujących znane inhibitory kinaz z [REDACTED]). Co istotne, do badań wybrano związki o potencjale patentowalności, co pozwoliło na złożenie zgłoszenia patentowego. Cel badań doktorantka zrealizowała, a uzyskane dane i obiecująca charakterystyka działania związku głównego przedstawiają dużą wartość naukową i aplikacyjną, otwierając drzwi do dalszych już zaawansowanych badań przedklinicznych i klinicznych.

We Wstępie doktorantka zawarła dobrze dobrane i wyselekcjonowane informacje potrzebne do wprowadzenia czytelnika w tematykę realizowanych badań, przedstawiając jednocześnie aktualny stan prac i wdrażania nowoczesnych związków celujących w te kinazy. Za bardzo ciekawy uważam podrozdział poświęcony związkom znajdującym się obecnie na etapie badań klinicznych oraz niedawno dopuszczonych przez FDA do leczenia. Ostatni rozdział Wstępu to przedstawienie podstawowych etapów procesu rozwoju leków, co jest istotne ze względu na obszar badawczy oraz zaplanowane etapy realizacji prac doktorantki. Ze Wstępu wynika jednoznacznie realna potrzeba medyczna opracowania skutecznych inhibitorów, znaczenie i potencjał realizowanych przez doktorantkę badań oraz to, że znajdują się one w głównym nurcie prac nad nowymi lekami. Byłby on ciekawszy, gdyby został wzbogacony rycinami i schematami, jednak ich brak nie wpływa na wysoką wartość merytoryczną tego rozdziału.

W pracy zastosowano szeroki wachlarz metod, dobrze opisanych w rozdziale Materiały i Metody, w większości w sposób pozwalający na replikowanie badań. Bogata metodyka to na pewno wartościowa część rozprawy.

W tym rozdziale niedosyt pozostawia brak dokładnego opisu tworzenia sferoidów, czasu powstawania, ich oceny itd. Na jakiej podstawie oceniano, że rosnące komórki stworzyły sferoidy, które są strukturami o określonych cechach. Przy opisie metodyki badań cytometrycznych, przedstawiając strategię bramkowania należało pokazać negatywne barwienia, na podstawie których ustawiano granice populacji negatywna-pozytywna. Bez tego ciężko ocenić np. zasadność bramki komórek dendrytycznych (CD11c vs MHCII) czy bramki CD11b vs F4/80 (Rycina 5). Nie pokazano też kontroli FMO (Fluorescence minus one) przy weryfikacji panelu cytometrycznego. Nie do końca rozumiem też pokazaną strategię bramkowania przy ocenie eferocytozy, gdzie różne typy komórek były znakowane fluorescencyjnie w celu ich rozróżnienia, a dodatkowo wyznakowywano wczesną i późną apoptozę. Na rycinie 4 brakuje przykładu pełnego schematu eksperymentu ze wszystkimi znacznikami/fluorochromami. Przedstawiona strategia bramkowania prowadzi do żywych makrofagów, natomiast nie jest jasne, z jakiej konkretnej bramki pochodzą histogramy przedstawione na Rycinie 4. Nie ma też wyraźnie zaprezentowanej strategii prowadzącej do oceny odsetka np. fagocytyzujących makrofagów, fagocytyzujących komórek dendrytycznych i w ich obrębie apoptozy i nekrozy, na podstawie których sporządzono wykresy (ryciny 24, 25).

Uzyskane Wyniki przedstawiono w znaczącej większości w sposób klarowny, przeprowadzając czytelnika przez cały proces charakterystyki związków, kolejne rundy selekcji i doboru substancji aktywnych (HIT) i trzech wiodących (LEAD) i potem ocenę ich właściwości biologicznych i potencjału antynowotworowego. W niektórych przypadkach opis wyników jest jednak mało dokładny i powierzchowny, lub autorka po metodycznym opisie eksperymentu od razu przesyła czytelnika do

ryciny, co czasem utrudnia analizę i ocenę wyników. Natomiast dokładniejsze opisy wyników zostały umieszczone w Dyskusji, razem z ich interpretacją.

W podrozdziale dotyczącym wpływu na sferoidy (4.2.1.5) brakuje wyników opisujących tworzenie i powstawanie sferoidów, które są strukturami 3D o określonych cechach. Doktorantka opisuje traktowanie związkami przez 7 dni, ale jak rozumiem, najpierw struktura sferoidu musiała powstać, jeżeli oceniano wpływ związków na komórki rosnące w sferoidach. Pierwsze traktowanie następowało już po 24h od wysiania komórek, co niepokoi w kontekście tempa powstawania sferoidów. Dobrze też byłoby, gdyby autorka zechciała przedstawić na przykład dokumentację zdjęciową sferoidów w czasie. Proszę o wyjaśnienie, jak i w jakim czasie powstawały sferoidy, jak je charakteryzowano oraz oceniano.

Jak wspomniałam w komentarzach do metod, nie do końca przekonywująco przedstawiona jest analiza cytometryczna i bramkowanie poszczególnych populacji komórek naciekających guz płuca. Także analiza tych wyników jest dość powierzchowna i raczej ogranicza się do informacji jakiego markera/populacji ubyło a jakiego przybyło. Ten fragment pracy pozostawia pewien niedosyt, zwłaszcza w przypadku oceny limfocytów T. Rozszerzone immunofenotypowanie pozwalające na ocenę funkcjonalności/aktywacji/stanu komórek dałoby znacznie więcej informacji o efektach badanych związków na mikrośrodowisko i komórki naciekające.

Nie wszystkie wyniki mają analizę statystyczną (na przykład brak jej w przypadku badania wpływu związków na wzrost guzów).

W Dyskusji autorka w mojej ocenie poświęca zbyt dużo miejsca na powtarzanie informacji o przeprowadzonych eksperymentach, przeprowadzając czytelnika jeszcze raz przez wszystkie opisy wyników. Tych opisów brakowało właśnie w rozdziale Wyniki. Dyskusja byłaby spójniejsza, gdyby zawierała te fragmenty, gdzie doktorantka w ciekawy sposób dyskutuje i odnosi się do rezultatów i ich znaczenia, w kontekście innych badań. Niezależnie od powyższej uwagi, dyskusja jest interesująca, rzetelna, i bez nadinterpretacji.

Prosiłabym o komentarz do wyników, do których autorka się nie odniosła, a mianowicie jak interpretuje i jakie może być biologiczne znaczenie wyników pokazujących zmiany w populacjach limfocytów (w tym znacząco niższy odsetek komórek CD45+ oraz limfocytów T CD4+ przy podwyższonym poziomie CD8+) po zastosowaniu badanego związku. Jaki może być związek tych wyników z zastosowanym modelem badawczym, którego ograniczenia opisuje.

Wartościowa jest część dotycząca ograniczeń zastosowanych metod, autorka porusza w niej bardzo istotne kwestie, wykazując się wysoką świadomością tych ograniczeń i proponując inne rozwiązania. To świadczy o dużej dojrzałości naukowej.

Pracę kończą prawidłowo sformułowane Wnioski, bez nadinterpretacji i oceny na wyrost.

Wniosek końcowy

Przedstawione powyżej uwagi i komentarze nie wpływają na końcową pozytywną ocenę niniejszej rozprawy, a stanowić powinny przyczynek do dyskusji. Rozprawa pani mgr Agaty Mikołajczyk jest pracą wartościową, stanowiącą istotny krok naprzód w badaniach nad nowymi lekami. Autorce udało się w pełni zrealizować założone cele oraz przeprowadzić cały proces selekcji i identyfikacji związku o dużym potencjale, biodostępności i efektywności. Uzyskane wyniki są wysokiej jakości, a o ich potencjale aplikacyjnym świadczą zgłoszenia patentowe oraz wybór i charakterystyka związku głównego do dalszych zaawansowanych badań przedklinicznych.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny 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)* i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Agaty Mikołajczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Katarzyna Piwocka