

Warszawa 14.09.2022

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń,
Członek koresp. Polskiej Akademii Nauk
Dyrektor Instytutu
Kierownik Pracowni Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy
pt. „Rozwój innowacyjnych agonistów GPR40 jako potencjalnych leków
w terapii cukrzycy typu 2”

Receptor sprzężony z białkami (GPR) 40 jest receptorem wolnych kwasów tłuszczowych, ulegającym ekspresji głównie w komórkach beta trzustki, aktywowanym przez średnio- i długołańcuchowe kwasy tłuszczowe i regulującym wydzielanie insuliny, poprzez zwiększenie stężenia wolnego wapnia w cytozolu komórki. Aktywacja GPR40 w komórkach beta trzustki może poprawić kontrolę glikemii w cukrzycy typu 2, poprzez zwiększenie stymulowanego glukozą wydzielania insuliny, dlatego receptor ten jest dobrze znanym i obiecującym celem terapeutycznym w cukrzycy. Kwasy tłuszczowe są bardzo aktywnymi związkami sygnałowymi, stąd główny cel recenzowanej rozprawy doktorskiej, tj. wyselekcjonowanie i ocena efektywności małowcząsteczkowego agonisty receptora GPR40, o strukturze opartej o naturalne kwasy tłuszczowe, jako potencjalnego leku w terapii cukrzycy typu 2, wydaje się być trafny i bardzo interesujący.

Praca doktorska mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy zrealizowana została w laboratoriach Celon Pharma S.A, w ramach programu - Doktorat Wdrożeniowy, realizowanego w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Rozprawa ma nietypowy układ i składa się z maszynopisu i dołączonych do niego trzech publikacji, stanowiących cykl oryginalnych prac będących podstawą dysertacji. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej drugim. Maszynopis, który zawiera omówienie wspomnianych powyżej publikacji, ma 47 stron. Całość jest podzielona na następujące rozdziały: 1) Wykaz

skrótów (3 strony), 2 i 3) Streszczenia w języku polskim i angielskim (po 1 stronie), 4) Wstęp (12 stron), 5) Cel projektu (0,5 strony), 6) Materiały i metody badawcze (1,5 strony), 7) Wyniki (11 stron), 8) Podsumowanie (3 strony), 9) Wnioski (1 strona), 10) Bibliografia (7 stron). Następnie do rozprawy dołączone się trzy publikacje (M. Mach, K. Bazydło-Guzenda et al: Discovery and Development of CPL207280 as New GPR40/FFA1 Agonist. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021; 226: 113810; (2) K. Bazydło-Guzenda et al: CPL207280 – a novel GPR40/FFA1 specific agonist shows a favorable safety profile and exerts anti-diabetic effects in type 2 diabetic animals. *Molecular Pharmacology*. 2021; 100(4):335-347; Bazydło-Guzenda K et al: Evaluation of the hepatotoxicity of the novel GPR40 (FFAR1) agonist CPL207280 in the rat and monkey. *PLOS ONE*. 2021; 16(9): e0257477) oraz odpowiednie oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie tych prac.

Rozprawa została przygotowana dość starannie pod względem edycyjnym. Nie uniknięto jednak kilku niedociągnięć. Zestawienie skrótów jest zaskakujące, trudno zrozumieć cel wprowadzenia skrótów takich jak 3D (trójwymiarowy) czy AE (adverse events). Skrót WT jest w odmienny sposób rozwinięty w rozdziałach: ‘Wykaz skrótów’ i ‘Wyniki’, gdzie szczep szczurów typu dzikiego (WT) nazwano ‘szczurami typu prawidłowego’ – co jest błędne. Poza tym, skróty nie są konsekwentnie wprowadzane w tekście rozprawy. Standardem jest, że za pierwszym razem w tekście podajemy najpierw całą nazwę, np. danego białka oraz jego nazwę skrótową, która jest następnie konsekwentnie używana w dysertacji. W maszynopisie Doktoranta wprowadza co chwila nazwę angielską opisywanego zaburzenia czy procesu np. cyt.: ‘...odkrycie nowego leku (ang. drug discovery) i jego dalszy rozwój (ang. drug development)...’, - taki zabieg edycyjny nie wnosi do tekstu nic nowego i jest zupełnie zbędny. W dysertacji nie udało się także uniknąć używania określeń tzw. slangu laboratoryjnego, jak ‘całkowite kwasy żółciowe’, ‘zgłoszenie leku do dopuszczenia do obrotu’ czy ‘zwierzęce modele cukrzycowe’. Również nazywanie komórek INS-1E ‘komórkami szczurzego nowotworu’ jest niepoprawne, mimo, że ta linia komórek beta trzustki została wyprowadzona z linii nowotworowej.

W rozdziale ‘Wstęp’ Doktorantka przedstawiła szczegółowe informacje dotyczące etiologii i patologii rozwoju cukrzycy typu 2 oraz aktualnie stosowane leki i terapie łączone. Pewien niedosyt zostawia lakoniczny opis mechanizmu insulino-zależnego wychwyty glukozy - brak wzmianki o transporterach glukozy oraz podkreślenia faktu, że tylko nieliczne tkanki wychwytyują glukozę w sposób zależny od insuliny. W kolejnych rozdziałach ‘Wstępu’ przedstawiona została pełna charakterystyka receptorów GPR w tym GPR40, którego dotyczy

tematyka pracy doktorskiej oraz wszystkie pozytywne i negatywne efekty stosowania agonisty tego receptora – TAK-875. W rozdziale tym pojawiła się zaskakująca informacja, że cyt.: ‘GPR40, GPR41 i GPR43 są u ludzi zlokalizowane na chromosomie 19q13.12 (21).’ – rozumiem, że Doktorantka miała na myśli nie receptory, a geny je kodujące, ale - skoro już zostało to wspomniane – bardzo proszę, by w czasie obrony Doktorantka przedstawiła informację, w jakich komórkach zlokalizowane są receptory GPR40, GPR41 i GPR43, jakie są ich naturalne ligandy oraz w czym różnią się te receptory pod względem pełnionej funkcji. Ważną częścią rozdziału ‘Wstęp’ jest szczegółowy opis procesu rozwoju leku, na przykładzie cząsteczki CPL207280, który zawiera wszystkie niezbędne informacje wprowadzające czytelnika w tematykę badań zaprezentowaną w dalszej części dysertacji. Rozdział ‘Wstęp’ jest napisany klarownym językiem, a zrozumienie zamieszczonych w nim informacji ułatwiają dwie ryciny. Jedynym zaskoczeniem jest ostatni paragraf, który mówi, że badany w ramach pracy doktorskiej związek przeszedł już pomyślnie I fazę badań klinicznych i aktualnie przygotowywany jest do fazy II. Ta informacja nie powinna być umieszczona w rozdziale ‘Wstęp’, ponieważ niespodziewanie zdradza czytelnikowi jak kończy się cała ekscytująca faza badań przedklinicznych, która jest tematem doktoratu.

Rozdział ‘Cel projektu’ w sposób zwięzły przedstawia cel realizowanych badań, którym było wyselekcjonowanie z biblioteki związków zaprojektowanych w Celon Pharma S.A, małowcząsteczkowego agonisty receptora GPR40 oraz przetestowanie jego efektywności i bezpieczeństwa, jako potencjalnego leku w terapii cukrzycy typu 2. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na pełną realizację założonego celu.

Modelem doświadczalnym w zaprezentowanych badaniach *in vitro* były komórki CHO oraz unieśmiertelnione linie komórek beta trzustki MIN6 oraz INS-1E. Badania *in vivo* przeprowadzono z wykorzystaniem różnych zwierzęcych modeli cukrzycy (szczury Zucker Diabetic Fatty (ZDF), szczury Goto Kakizaki (GK), myszy db/db) oraz zwierząt kontrolnych (szczury szczepu Wistar i myszy B6, odpowiednio). Badania toksykologiczne przeprowadzono także na małpach – makakach jawajskich. Rozdział ‘Materiały i metody’ jest napisany bardzo lakonicznie, brak jest jakichkolwiek szczegółów dotyczących zastosowanej w dysertacji metodyki, w każdym z podrozdziałów Doktorantka odsyła czytelnika do opublikowanych prac. Pewien niepokój wzbudza fakt, że – jak podano w rozdziale ‘Materiały i metody’ – wszystkie eksperymenty *in vivo* oraz część eksperymentów *in vitro* były zlecone podwykonawcom, firmom zewnętrznym. Brak jest informacji, które eksperymenty robiła Doktorantka i jaki jest

Jej rzeczywisty udział w otrzymaniu wyników, będących podstawą przedstawionej do oceny dysertacji. Bardzo proszę o wyjaśnienie tej kwestii podczas obrony pracy doktorskiej.

Jak wspomniano, wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań zostały opublikowane w cyklu trzech prac oryginalnych. Pierwsza publikacja, w której doktorantka ma 10% udziału, ma 7 rycin oraz 3 tabele prezentujące rezultaty. W drugiej publikacji (50% udziału Doktorantki) wyniki przedstawiono na 10 rycinach i w 3 tabelach. W publikacji nr 3 (55% udział Doktorantki), wyniki zaprezentowano na 10 rycinach i w 5 tabelach. Publikacja ta zawiera także rycinę podsumowującą badania hepatotoksyczności dwóch agonistów receptora GPR40: wcześniej opisanego TAK-875 oraz badanego przez Doktorantkę związku CPL207280. Dodatkowo, rozprawa zawiera dwie ryciny oraz dwie tabele z danymi niepublikowanymi. Rozdział 'Wyniki' napisany jest w sposób, który w dużej mierze przypomina Dyskusję, gdzie doktorantka opisuje uzyskane wyniki (odnosząc się do figur i tabel w ww. publikacjach) oraz konfrontuje je z danymi literaturowych. Do najciekawszych rezultatów otrzymanych przez Doktorantkę z pewnością należy wykazanie, że: (1) drobnocząsteczkowy związek CPL207280 selektywnie aktywuje receptor GPR40 i stymuluje wydzielanie insuliny zarówno w warunkach fizjologicznych jak i we wczesnych etapach rozwoju cukrzycy typu 2; (2) związek CPL207280 posiada właściwości fizyko-chemiczne oraz parametry farmakokinetyczne, które zapewniają balans pomiędzy aktywnością związku a bezpieczeństwem toksykologicznym, zarówno w testach *in vitro* jak i *in vivo*. Na podkreślenie zasługuje fakt, że na podstawie przeprowadzonych badań, związek CPL207280 został zaproponowany jako skuteczny i bezpieczny kandydat do badań klinicznych we wskazaniu – cukrzyca typu 2. Rozdział 'Wyniki' napisany jest klarownym językiem i przedstawia interesujące, nowatorskie dane.

Otrzymane przez doktorantkę oryginalne wyniki eksperymentalne zostały krótko omówione w odniesieniu do dostępnego stanu wiedzy w rozdziale 'Podsumowanie'. Doktorantka krytycznie odniosła się do uzyskanych rezultatów wykazując tym samym, że z łatwością porusza się w trudnych zagadnieniach związanych z odkryciem i rozwojem nowego leku. Z obowiązku recenzenta nie mogę nie zauważyć, że rozdział ten, podobnie jak rozdział 'Wyniki', zawiera liczne błędy gramatyczne i interpunkcyjne, nie wpływa to jednak na moją wysoką ocenę merytoryczną przedstawionej pracy. W spisie cytowanych publikacji znalazło się 60 pozycji, których większość została opublikowana w ostatnich latach.

Niezależnie od wysokiej oceny dysertacji, mam kilka uwag i pytań, które nasunęły mi się po jej wnikliwym przestudiowaniu. Proszę o ustosunkowanie się do nich w czasie obrony:

1. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że związek CPL207280 poprawia glikemię i zwiększa wydzielanie insuliny w szczurów ZDF i ZDSD, natomiast takiego efektu nie stwierdzono u szczurów Goto Kakizaki. Czym różniły się zastosowane w pracy zwierzęce modele cukrzycy? Jakie jest podłoże genetyczne prowadzące do rozwoju cukrzycy u tych zwierząt i na ile jest ono zbliżone do cukrzycy typu 2 u ludzi? Dlaczego w badaniach nie zastosowano modelu cukrzycy wywołanego dietą wzbogaconą w tłuszcze i węglowodany?
2. Proszę wyjaśnić, jaka jest zasada projektowania badań przedklinicznych nowych leków, z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Jakie modele zwierzęce, poza gryzoniami, są najczęściej stosowane. Jaka jest przewaga wykorzystywania psów w porównaniu z małpami (jeśli jest). Czy, w opinii Doktorantki, najnowsze technologie pozwalające na tworzenie organoidów ludzkich tkanek, mają szansę na zastosowanie w procesie testowania nowych leków? Jeśli tak, jakie technologie są najbardziej obiecujące? Czy mogą one pozwolić na wyeliminowanie badań prowadzonych na zwierzętach?
3. Badany związek CPL207280 jest inspirowany naturalnymi kwasami tłuszczowymi – czy możliwe jest, by mógł on działać na komórki aktywując inne szlaki sygnałowe niż szlak receptora GPR40? Jakie są znane mechanizmy (poza aktywacją receptorów GPR), poprzez które kwasy tłuszczowe pełnią funkcje sygnałowe w komórkach? Czy cząsteczka CPL207280 przenika przez błony komórkowe lub się w nie wbudowuje? W jaki sposób jest metabolizowana?
4. W swoich badaniach Doktorantka potwierdziła toksyczny efekt TAK-875 na wątrobę. Jednocześnie, w pracy opublikowanej w roku 2020, Ookawara *et al.* wykazali, że inny agonista GPR40, związek SCO-267, w sposób korzystny wpływa na funkcjonowanie wątroby w mysim modelu niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Czym różnią się między sobą te dwa związki i jak można wyjaśnić ich przeciwstawne efekty obserwowane w wątrobie? Czy związek SCO-267 aktywuje GPR40 w sposób podobny do aktywacji przez CPL207280? Czy możliwe jest, że związek CPL207280 jest nie tylko nietoksyczny dla wątroby (co pokazały wyniki w obecnej pracy), ale – w określonych warunkach – może poprawiać funkcję tego narządu? Jeśli tak, jaki jest potencjalny mechanizm?

Wniosek końcowy

Pracę doktorską mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy pt. „Rozwój innowacyjnych agonistów GPR40 jako potencjalnych leków w terapii cukrzycy typu 2” oceniam bardzo pozytywnie. Rozprawa zawiera wyniki oryginalnych badań i stanowi istotny wkład w odkrycie i rozwój nowego obiecującego leku w terapii cukrzycy typu 2. Wyniki badań stanowiące podstawę dysertacji zostały opublikowane w trzech pracach oryginalnych, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Katarzyny Bazydło-Guzendy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy prowadzonych badań, ich nowatorski charakter oraz fakt, że na ich podstawie związek CPL207280 został dopuszczony do etapu badań klinicznych, wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy odpowiednią nagrodą.

Agnieszka Dobużyńska