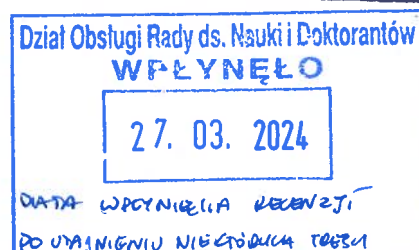
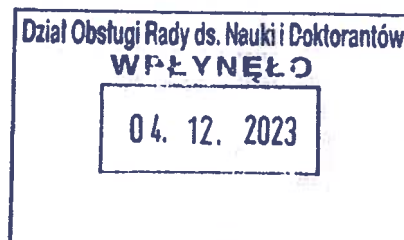




Warszawa, 4.12.2023

Prof. dr hab. Przemysław Juszczynski
Z-ca Dyrektora ds. Nauki
Kierownik Zakładu Hematologii Eksperymentalnej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Ul. Indiry Gandhi 14
Warszawa 02-776



OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Mikołajczyk

„Rozwój innowacyjnego inhibitora drobnocząsteczkowego celującego zarówno w komórki nowotworowe jak i mikrośrodowisko nowotworowe ”

Praca została wykonana w ramach programu Ministerstwa Edukacji i Nauki „Doktorat Wdrożeniowy”.

Jedną z typowych cech definiujących komórki nowotworowe jest ich zdolność do dynamicznego kształtowania/hamowania odpowiedzi immunologicznej (Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.) Zdobycze nauk podstawowych wyjaśniające zasady i mechanizmy interakcji między komórkami nowotworowymi a jego mikrośrodowiskiem i układem immunologicznym stały się podstawą opracowywania skutecznych form terapii dostępnych dziś w leczeniu tej grupy chorób. Z tego względu, immuno-onkologia stanowi niezwykle dynamicznie rozwijającą się i obiecującą dziedzinę nauk medycznych. Badania ostatnich lat dowodzą, że wiele celów molekularnych uznawanych wcześniej tylko za kluczowe dla proliferacji komórek



nowotworowych, wpływa także na ich kontakty z mikrośrodowiskiem, lub wręcz jest obecnych i aktywnych w komórkach mikrośrodowiska. Ich hamowanie może mieć zatem pleiotropowy efekt – będzie jednocześnie indukować apoptozę komórek nowotworowych, jak i modulować skład i funkcję mikrośrodowiska. W ten właśnie nurt poszukiwania leków działających zarówno na komórki nowotworowe, jak i na mikrośrodowisko, wpisuje się przedstawiona mi do oceny praca.

Autorka, we współpracy z firmą Celon Pharma, podjęła się zadania rozwinięcia i scharakteryzowania potencjalnych inhibitorów kinaz [REDACTED]

[REDACTED] Ekspresję mRNA [REDACTED] obserwowano w wielu tkankach i nowotworach, a także w komórkach układu odpornościowego (zarówno odporności wrodzonej jak i swoistej). Receptorowe kinazy [REDACTED] są ważnymi regulatorami procesów proliferacji i przeżywalności komórek, a ponadto regulują kluczowe mechanizmy działania układu odpornościowego, w tym odbywające się w mikrośrodowisku guza. Zaprojektowanie i charakteryzacja inhibitorów tej grupy kinaz jest zatem celem bardzo racjonalnym i innowacyjnym.

Głównym celem pracy było wyselekcjonowanie i badania przedkliniczne innowacyjnych cząsteczek hamujących kinazy [REDACTED]

Szczegółowe cele pracy autorka przedstawia w następujący sposób:

1. Badania przesiewowe potencjalnych inhibitorów [REDACTED] w teście kinazowym in vitro, analizę związków pod kątem korzystnych parametrów fizyko-chemicznych i ADMET oraz określenie wstępnej selektywności cząsteczek.
2. Identyfikacja związków wiodących poprzez analizę wyników ADMET, badanie farmakokinetyki oraz zdolności do hamowania proliferacji komórek nowotworowych z ekspresją [REDACTED] in vitro.
3. Zbadanie wpływu związków wiodących pod kątem ich zdolności do hamowania wzrostu nowotworów w modelu mysim.
4. Szczegółowa charakterystyka właściwości farmakokinetycznych związku głównego oraz określenie jego biodostępności
5. Zbadanie wpływu związku głównego na mikrośrodowisko guza w syngenicznym modelu mysim.

Rozprawa przedstawiona mi do oceny posiada konstrukcję typową dla rozpraw doktorskich i obejmuje wstęp, przedstawienie celów i zakresu pracy, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Rozprawę uzupełniają streszczenie w języku polskim i angielskim, spis użytych skrótów i rycin, kopie stosownych zgód komisji bioetycznych oraz 236 dobrze dobranych pozycji piśmiennictwa.

We wstępie pracy, zgodnie z jej tytułem, szczególną uwagę Autorka poświęca molekularnym mechanizmom działania kinaz [REDAKTOWANE], ich strukturze, funkcjom w komórkach nowotworowych i mikrośrodowisku oraz strategiom rozwoju małych cząstek. Ta część pracy wskazuje na bardzo głęboką wiedzę autorki, choć Doktorantka dokonała tu kilku nadmiernych i ciężkich do zaakceptowania uproszczeń, na przykład w twierdzeniu, że identyfikacja celu molekularnego odbywa się poprzez analizę piśmiennictwa. Ponadto dość powierzchownie Autorka pertraktowała przegląd związków firm konkurencyjnych.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka w sposób wyjątkowo szczegółowy – wręcz pedantyczny - przedstawia metodykę wykonanych doświadczeń. Ten fakt zasługuje na szczególne podkreślenie i uznanie. Metodyka jest nowoczesna i bardzo adekwatna do przedstawionych celów pracy, a zakres planowanych doświadczeń odpowiada złotemu standardowi tego etapu badań w przemyśle.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia uzyskane wyniki i dokumentuje je w formie 26 rycin i 15 tabel. Wyniki prezentowane są w sposób w większości przejrzysty i zrozumiały, choć czasem brakuje niektórych danych surowych. Eksperymenty uwzględniają w większości stosowne kontrole, a wnioskowanie i interpretacja na podstawie uzyskanych wyników są rzetelne.

Do tej części pracy mam następujące uwagi i pytania:

1. Losowy dobór linii komórkowych i wykonanych z ich użyciem eksperymentów

W pracy z modelami komórkowymi autorka wykorzystała 10 linii [REDAKTOWANE] (czerniak), [REDAKTOWANE] (AML), [REDAKTOWANE] (rak płuca), [REDAKTOWANE] (rak płuca). Największym chyba zarzutem, jaki mam pod adresem Doktorantki jest brak spójnego zestawu eksperymentów dla każdej linii. Po pierwsze, Autorka nie oceniła celów molekularnych dla rozwijanych inhibitorów w tych liniach, odwołując się jedynie do literatury. Ocena ekspresji kinaz [REDAKTOWANE] w tych liniach zestawionych obok siebie ułatwiłaby być może zrozumienie dużego rozrzutu w toksyczności związków (IC50 od wartości ~5 nM do kilkuset nM). Po drugie, Autorka ocenia stopień zahamowania kinazy AKT w linii [REDAKTOWANE], ale nie wyznaczyła toksyczności związku w tej linii



– czytelnik pracy nie jest w stanie ocenić zależności między zablokowaniem celu molekularnego i zahamowaniem przekaźnictwa sygnału w szlaku zależnym od kinazy a toksycnością.

2. Z jakiego powodu do obliczenia IC50 dla zahamowania AKT w jednej linii (), dla zakresu 6 stężeń Autorka wykorzystała platformę HCS do badań wysokoprzepustowych? O ile nie jest to błąd i istotny zarzut, wydaje mi się że metoda dobrana została na wyrost. Bardzo brakuje surowych danych – ocena była prowadzona immunofluorescencyjnie, warto było zaprezentować obrazy z tych analiz, a nie tylko wyznaczoną krzywą dawka-odpowiedź.

3. W Pierwszym eksperymencie z linią Ba/F3 brakuje bardzo istotnej wg mnie kontroli – należałoby ocenić aktywność inhibitorów w stosunku do linii Ba/F3 hodowanej w obecności IL3, a nie tylko linii Ba/F3 z nadekspresją . Taki prosty eksperyment pozwoliłby oszacować wstępnie, czy toksycność związku rzeczywiście zależy od wyłączenia podstawowego celu molekularnego, czy może też od wyłączenia innych kinaz („off-targets”).

4. W pracy nie przedstawiono informacji o badaniach nad innymi, poza pożądanymi, kinazami hamowanymi przez związki. Takie eksperymenty przywołuje Autorka w dyskusji, wspominając o KINOMEScan DiscoverX. Jeśli planuje się badania toksykologiczne, a tym bardziej kliniczne, scharakteryzowanie swoistości/wybiórczości związku wydaje się sprawą konieczną do wykonania.

5. Czy autorka oceniła zdolności fagocytarne kom. dendrytycznych i makrofagów tylko względem komórek apoptotycznych/nekrotycznych, czy może dokonywała też oceny spontanicznej fagocytozy np. znakowanych kulek lateksowych? Makrofagi stanowią istotną linię obrony w układzie odporności nieswoistej, sprzęgając ją z odpornością adaptacyjną. Zaburzenia funkcji fagocytarnej makrofagów może powodować niedobory odporności i powikłania infekcyjne, zwłaszcza grzybicze (np. aspergilozy), u chorych szczególnie i tak podatnych na tego rodzaju komplikacje.

6. Czy obserwowany wpływ na fagocytozę, jest zdaniem Autorki, zjawiskiem korzystnym czy nie? Autorka jedynie odnosi się do roli eferocytozy w indukcji polaryzacji makrofagów związanych z nowotworem do profilu M2-podobnego, ale pomija fakt, że fagocytoza komórek nowotworowych jest kluczowym elementem dla indukcji swoistych limfocytów T CD8+ - komórki dendrytyczne i krzyżowa prezentacja antygeny są niezbędne dla

uzbrojenia limfocytów cytotoksycznych. Zatem zahamowanie tego zjawiska może mieć *de facto* niekorzystny wpływ, zwłaszcza w nowotworach immunologicznie „gorących”. Jaki eksperyment zaproponowałaby Autorka, by to zbadać?

7. Autorka twierdzi, że wpływ związku głównego na mikrośrodowisko może być istotny z farmakodynamicznego i klinicznego punktu widzenia. Twierdzenie to autorka opiera na zmianie odsetka obecnych w mikrośrodowisku komórek T CD8+, NK i zmniejszeniu ekspresji PD-1 na kom. T CD8+. Mam dwie zasadnicze wątpliwości do przedstawionych wyników:

- a. Zmieniają się jedynie odsetki komórek w mikrośrodowisku, ale nie ich całkowita liczba. Jeśli weźmiemy pod uwagę fakt, że masa guza pozostaje niezmienną (brak wpływu na kinetykę wzrostu guzów i marginalny, choć istotny wpływ na śmierć komórkową), a całkowita liczba komórek CD45+ spada (choć bez istotności statystycznej), to obserwowany efekt jest raczej wynikiem „wzbogacenia populacji leukocytów opornych na apoptozę indukowaną leczeniem, a nie „aktywnej” rekrutacji limfocytów w obręb masy nowotworu, która mogłaby wynikać ze zmiany charakteru mikrośrodowiska. Jak wykluczyć taki mechanizm – czy Doktorantka może zaproponować eksperyment lub ich serię?
- b. U zwierząt otrzymujących ██████████ spada odsetek żywych leukocytów w nacieku. Jakie komórki giną?

9. W sekcji dotyczącej stabilności metabolicznej przedstawiono wyłącznie wyniki – brak wskazówek jak je interpretować. Niewprawionemu czytelnikowi trudno ocenić jakie wartości definiują stabilne i niestabilne związki.

10. O ile rozumiem zespołowy charakter pracy w tego rodzaju przedsięwzięciu, trudno w niektórych opisach zorientować się, co było rzeczywistym wkładem doktorantki, a co jest wynikiem pracy zespołu. Razi też fakt nieprezentowania danych, na które powołuje się doktorantka w wynikach.

10. Na Rycinie 6 jest błąd w opisie bramki z limfocytami CD4/CD8 (drugi rząd, druga bramka od prawej)

11. Autorka nie uniknęła kilku błędów edytorskich („literówek”) i niezręcznych sformułowań.



INSTYTUT HEMATOLOGII I TRANSFUZJOLOGII

02-776 Warszawa, ul. Indrzej Gandhi 14 • Centrala: tel. 22 34-06-100, sekretariat: tel. 22 34-06-176, fax 22 34-06-178 • www.ihl.waw.pl

Rozprawę kończy dyskusja, w której Autorka konfrontuje swoje wyniki z danymi innych autorów i firm konkurencyjnych. Za dużą wartość uważam krytyczne odniesienie się do własnych wyników w sekcji dotyczącej ograniczeń przeprowadzonych badań i zastosowanej metodyki.

Pomimo sformułowanych powyżej uwag, które powinny stanowić przyczynek do dyskusji z Doktorantką w trakcie obrony, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi ciekawe, oryginalne i szerokie opracowanie naukowe i niesie bardzo dużą wartość poznawczą, a przede wszystkim wdrożeniową i spełnia ustawowe wymogi stawiane tego rodzaju opracowaniom.

Z pełnym przekonaniem pragnę przeto przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosku o dopuszczenie mgr Agaty Mikołajczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem
Przemysław Juszczyński
Podpisano przez:
Przemysław
Juszczyński
Date / Data:
2023-12-04 20:54
Przemysław Juszczyński