



Warszawa, 09.03.2015r.

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Toporkiewicz
**„Liposomowy nośnik leku genetycznego
przeznaczony do celowanej terapii nowotworów krwi”**

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Moniki Toporkiewicz dotyczy kręgu zagadnień wzbudzających wielkie zainteresowanie. Jest nim poszukiwanie nowych, skuteczniejszych leków przeciwnowotworowych - a w tym przypadku, bardziej konkretnie, leków przeciwbiałaczkowych.

Poszukiwania nowych leków są prowadzone w różnych kierunkach. Obecnie jednym z bardziej obiecujących jest konstruowanie tak zwanych „inteligentnych form leków”, złożonych nanostruktur których zadaniem jest selektywne dostarczanie substancji czynnej do miejsc jej działania. Ten kierunek jest szczególnie obiecujący między innymi dlatego, że umożliwić może terapeutyczną ingerencję w materiał genetyczny, czyli „terapię genową”. Przy konstruowaniu tego rodzaju leków wykorzystana być musi wiedza z wielu różnych, odległych bardzo od siebie dziedzin nauki, od biofizyki przez inżynierię chemiczną do biologii molekularnej i medycyny klinicznej - jest to więc zadanie intelektualnie bardzo wymagające. Rozprawa doktorska Pani Moniki Toporkiewicz dowodzi - moim zdaniem - że doktorantka tym szczególnym wymaganiom podołała. Nie oznacza to, że rozprawa pozbawiona jest wad i niedostatków - ale zaznaczam od razu, że nie mają one zasadniczego znaczenia dla oceny jej wartości merytorycznej.

Rozprawa doktorska Pani Moniki Toporkiewicz liczy 122 strony maszynopisu i ma „klasyczną” konstrukcję. W liczącym 31 stron wstępie autorka omawia, kolejno: podstawowe wiadomości dotyczące białeczek i ich podłoża cyto-genetycznego - ze szczególnym uwzględnieniem przewlekłej białaczki limfocytarnej i roli antyapoptotycznego białka Bcl-2 w tym schorzeniu; koncepcję terapii genowej i podstawowe kierunki poszukiwań metod terapeutycznego transferu materiału genetycznego do komórek, oraz zastosowanie wirusowych i niewirusowych nośników kwasów nukleinowych. Poszczególne zagadnienia omawiane są kompetentnie, w oparciu o obszerną i prawidłowo cytowaną literaturę naukową - chociaż wiele poruszonych we wstępie tematów nie ma związku z tematyką pracy.

W dalszym ciągu Wstępu, na stronach od 21 do 25 przedstawione jest zagadnienie antysensowych oligonukleotydów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych; w tej kategorii bliżej omówiony jest Oblimersen, przedstawiony jako fosfotiolowany oligodeoksynukleozyd zawierający 18 zasad, skierowany przeciwko genowi białka Bcl-2. Oblimersen kilka lat temu był przedmiotem badań klinicznych jako potencjalna terapia przewlekłej białaczki limfatycznej. Zakończeniem wstępu jest podrozdział 5. zatytułowany *„Naturalne bariery limitujące efektywne dostarczenie leku genetycznego do komórek docelowych”*, który - moim zdaniem - zasługuje na szczególnie wysoką ocenę, gdyż w jasny i uporządkowany, wręcz plastyczny sposób przedstawia trudności, jakie na drodze do „miejsca docelowego” w komórce napotyka „lek genetyczny”, taki jak na przykład antysensowy oligonukleotyd. W tym podrozdziale zamieszczona jest rycina 6., będąca ilustracją omawianego zagadnienia. Z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać można, że jest to autorskie dzieło doktorantki - jest to bowiem jedyna rycina we wstępie, która nie jest opatrzona odnośnikiem do źródła literaturowego. Schemat zamieszczony na tej rycinie jest bardzo pomocny w wyobrażeniu sobie trudności, jakie na swojej drodze pokonywać musi każdy terapeutyczny materiał genetyczny, zanim dotrze do miejsca docelowego - do jądra komórkowego albo do cytoplazmy. Z drugiej strony, podpis pod tym schematem jest - moim zdaniem - mylący, bo pokazane są na nim etapy i bariery, które musi pokonać nie *„niewirusowy nośnik leków genetycznych”*, lecz lek genetyczny taki jak antysens, który na pierwszych etapach umieszczony jest w nośniku, lecz w następnych jest już z niego uwolniony. Nie mam wątpliwości, że autorka o tym doskonale wie, bo przecież na str. 42 napisała: *„Uważa się, że główną drogą wnikania liposomów i lipopleksów do wnętrza komórki docelowej jest endocytoza... , natomiast proces fuzji błon pozwala na uwolnienie lipopleksów lub samego materiału genetycznego z endosomu.”*

Drugą częścią rozprawy jest rozdział „Cel pracy”. Autorka definiuje cel swoich badań jako *„stworzenie liposomowego nośnika antysensowych oligonukleotydów anty-BCL2 przeznaczonego do celowanej terapii nowotworów krwi pochodzenia B-komórkowego”*, precyzując dalej, że nośnik taki powinien między innymi *„... chronić zamknięty w nim kwas nukleinowy przed białkami surowicy i osocza...”*, *„wykazywać niską nieswoistą aktywność cytotoksyczną i hemolityczną”*, oraz dobrze by było, aby dodatkowo *„...charakteryzował się [on] zwiększoną toksycznością względem komórek docelowych”*. Widać tu pewien kłopot ze zdefiniowaniem faktycznego celu pracy, bo czytelnik nabiera wątpliwości, czy celem tym jest opracowanie nośnika dla różnych leków genetycznych, na przykład dla różnych antysensowych oligonukleotydów, czy też chodzi o opracowanie konkretnej formy leku w oparciu o znaną substancję czynną o znanym działaniu przeciwbiałaczkowym? Zresztą ten kłopot zaznacza się już w tytule pracy, bo przecież to nie nośnik leku genetycznego będzie przeznaczony do terapii nowotworów krwi, lecz forma leku złożona z substancji czynnej leku umieszczonej w tym nośniku, na przykład w liposomie.

Kolejne niezgrabności pojawiają się już na następnej stronie, na której autorka precyzuje cele cząstkowe, jakie miała osiągnąć w realizacji celu pracy. Aby uniknąć nieporozumień podkreślam od razu, że kiedy czytelnik głębiej się w te cele cząstkowe „wgrzyzie”, to okazuje się, że są one dobrze zaprojektowane, stanowią logiczny ciąg zadań prowadzących do założonego celu - a więc merytorycznie nie budzą wątpliwości. Tylko że nie jest w tej sekwencji celów cząstkowych jasno określone, co było punktem wyjścia dla prac Pani doktorantki. Jeśli (pkt 1 na str 47) pierwszym celem cząstkowym było *udoskonalenie parametrów liposomowego nośnika asODN*, to skąd wzięto nośnik wyjściowy który był przez nią udoskonalany? Dalej (pkt 3) mowa jest o *optymalizacji procesu przyłączania przeciwciał anti-CD20 do powierzchni liposomów tL-D* i czytelnik zgadywać musi, czy te liposomy tL-D są tożsame z udoskonalonym nośnikiem asODN. Jeszcze dalej mowa jest o ukierunkowanym przeciwciałami liposomowym nośniku iL-D zawierającym asODN anty-BCL2 - tylko skąd się wziął ten antysens anty-BCL2? W sumie: czytelnikowi sporo czasu i intelektualnego wysiłku zabiera zrozumienie, że - mówiąc w skrócie - w pracy chodziło o opracowanie i przetestowanie na modelach in vitro i in vivo liposomowej postaci antysensu o sekwencji zasad tożsamej z sekwencją zasad w Oblimersenie. A to, że opracowana w tym celu konstrukcja liposomów może stać się platformą do tworzenia postaci różnych leków genetycznych skierowanych przeciwko komórkom wyposażonym w różne powierzchniowe epitopy, staje się wiadome dopiero po przeczytaniu dyskusji. Jak już jednak zaznaczyłem, te różne niezgrabności nie mają zasadniczego znaczenia, bo ciąg badań obejmujący optymalizację konstrukcji liposomów, ich charakterystykę, ocenę toksykologiczną, oraz ocenę cytotoksyczności in vitro i in vivo na modelu ksenograftu ludzkich komórek chłoniaka Burkitta do myszy bezgranicznych został prawidłowo zaprojektowany.

Trzecią częścią rozprawy jest rozdział zatytułowany „Materiał i metody”, liczący 15 stron. Jego zawartość wywiera na czytelniku duże wrażenie - gdyż w realizacji omówionego powyżej bardzo ambitnego planu badań autorka posłużyła się znaczną liczbą różnorodnych metod, między innymi: otrzymywała liposomy i wykorzystwała kilka metod biofizycznych do oceny ich właściwości; przyłączała do nich przeciwciała; zamykała w nich fluorescencyjne barwniki kalceinę której wyciek monitorowała spektrofлуorymetrycznie i DiD który lokalizowała przyżyciowo w myszach przy pomocy urządzenia Xtreme dla ustalenia biodystrybucji liposomów podanych dożylnie; zamykała w liposomach oligonukleozydy; izolowała białe krwinki z krwi ludzkiej przy pomocy wirowania w gradiencie fikolu; prowadziła hodowle linii komórkowych in vitro i badała przeżywalność komórek testem MTT i indukcję apoptozy wykrywając fosfatydyloserynę metodą cytometrii przepływowowej z użyciem aneksyny po ekspozycji na liposomy i immunoliposomy bez antysensu i z antysensem; oraz - ostatnie, ale nie najmniej ważne - wykonywała doświadczenia na myszach bezgranicznych z hodowanymi podskórnymi guzami chłoniaka ludzkiego. Wyniki pomiarów były analizowane statystycznie testami nieparametrycznymi. Wykorzystanie w pracy nad doktoratem tak dużego wachlarza różnorodnych metod, od biofizycznych poprzez hodowle komórkowe, aż do eksperymentów na zwierzętach zasługuje na pochwałę. To właśnie między innymi ze względu na tę różnorodność użytych metod już na początku niniejszej oceny zaznaczyłem, że

doktorantka podolała - moim zdaniem - szczególnym wymaganiom, przed jakimi staje badacz chcący opracować nową metodę terapii genowej.

Kolejną częścią rozprawy jest liczący 27 stron rozdział „Wyniki”. Autorka prezentuje w nim w zwartej i uporządkowanej formie rezultaty poszczególnych etapów swoich prac. Ale zanim czytelnik do tego dotrze, to na pierwszej stronie tego rozdziału (str. 63 rozprawy) spotyka go niespodzianka - dowiaduje się mianowicie, że *„punktem wyjścia do konstrukcji immunoliposomów tL-D był preparat liposomów CCL, którego skład objęty jest zastrzeżeniem patentowym.”* I jest tu zacytowane międzynarodowe zgłoszenie patentowe - którego autorka rozprawy nie jest współautorem. Dopiero w tym miejscu staje się jasne, co było punktem wyjścia i celem pracy. Chodziło przecież o przetworzenie opracowanego uprzednio w jej miejscu pracy kationowego liposomalnego nośnika dla leków genetycznych (patrz tytuł zgłoszenia patentowego), zwanego - jak twierdzi autorka - liposomami CLL w immunoliposomy nakierowane na komórki posiadające na swojej powierzchni epitopy CD20, a więc mogące dostarczać lek genetyczny do limfocytów przewlekłej białaczki limfatycznej które są komórkami CD20+.

Wyniki przedstawione przez autorkę - których jest bardzo dużo i nie będę ich wszystkich omawiał - potwierdziły słusność drogi, którą obrała. Okazało się między innymi, że immunoliposomy skierowane przeciwko epitopom CD20 i zawierające antysensowy oligonukleotyd anty-BCL2 zachowują się tak, jak powinny - między innymi są stabilne podczas przechowywania, nie ulegają dezintegracji pod wpływem białek osocza krwi i są wyraźnie silniej toksyczne wobec hodowli komórek CD20+ niż wobec hodowli komórek CD20- (patrz ryc. 18). W szczególności dotyczy to linii komórek ludzkiego chłoniaka Burkita znanej pod nazwą Raji, w której Pani doktorantka metodą Western Blot wykrywała immunoaktywność białka Bcl-2 i stwierdzała jej obniżenie w wyniku inkubacji z immunoliposomami zawierającymi antysens anty-Bcl2 (ryc. 24). Podobny wynik uzyskała eksponując na immunoprzeciwciała z antysensem limfocyty pobrane od pacjenta z przewlekłą białaczką limfocytarną (ryc. 27). Ukoronowaniem przedklinicznych eksperymentów z immunoliposomami zawierającymi antysens anty-Bcl2 były eksperymenty na myszach bezgranicznych, w większości również zakończone pozytywnymi wynikami. Jednak nie została w tych eksperymentach potwierdzona addytywność cytotoksycznego efektu immunoliposomów z antysensem anty-Bcl-2 i konwencjonalnego niskocząsteczkowego cytostatyku mitoksantronu, zaobserwowana uprzednio na hodowlach komórkowych. Może było tak dlatego, że mitoksantron działa głównie na komórki proliferujące? Może warto by użyć cytostatyku indukującego apoptozę również w limfocytach w spoczynku, kladrybiny albo fludarabiny?

Ostatnim rozdziałem rozprawy jest licząca 12 stron Dyskusja, która jest - moim zdaniem - najlepiej napisaną częścią rozprawy, być może dlatego, że pisząc poprzednie rozdziały Pani doktorantka nabyła już sporego doświadczenia w pisaniu. Dyskusja zawiera wiele jasno wyrażonych myśli; wiele z nich - moim zdaniem - powinno być zamieszczone w rozdziałach

Wstęp oraz Cel pracy. Na przykład już na pierwszej stronie Dyskusji czytamy, że *„Oblimersen pomimo zastosowania zastąpienia wiązania fosfodiesterowego wiązaniem fosforosiarkowym, bardzo szybko ulega degradacji...”*. Dlaczego ta informacja nie została zamieszczona we Wstępie? Przecież zawarte tam (na str. 23) stwierdzenie, że *„... Oblimersen jest fosforotiolowanym antysensowym oligodeoksynukleotydem...”* nie wyjaśnia, na czym polegała i czemu służyła rzekoma fosforotiolacja tej antysensowej sekwencji skierowanej przeciwko genowi kodującemu białko Bcl-2. Dopiero po przeczytaniu tej uwagi zawartej na początku Dyskusji staje się jasne, że kiedy w rozdziale Materiał i metody (na str. 48) przeczytałem *„... niemodyfikowane chemicznie oligonukleotydy, [w tym] antysensowy oligonukleotyd przeciw genowi BCL2 według sekwencji Oblimersenu sodowego...”*, to był to skrót myślowy. Aby być w tym miejscu dobrze zrozumianym, powinno się użyć sformułowania „oligonukleotydy zbudowane ze zmodyfikowanych chemicznie (fosforotiolowanych) zasad”. Proszę bowiem zauważyć, że z pojęciem „oligonukleotydy zmodyfikowane chemicznie” czytelnikowi „nie siedzącemu po uszy” w zagadnieniach terapii genetycznych skojarzy się „normalny” oligonukleotyd, najpierw zsyntetyzowany a potem chemicznie zmodyfikowany. I dalej, dopiero na samym końcu Dyskusji, na str. 101, znajdujemy myśl, że *„Jednym z głównych celów zastosowania nośnika dla leku genetycznego jest konieczność zapewnienia ochrony przeciwdziałającej degradacji leku przez egzogenne nukleazy.”* Dlaczego autorka nie powiedziała tego w rozdziale Cel pracy?

W przeciwieństwie do Wstępu i Celu pracy, Dyskusja prawie nie zawiera skrótów myślowych ani niedomówień - zawiera natomiast wiele bardzo trafnych uwag, bez wątpienia świadczących o wysokim stopniu intelektualnej kontroli doktorantki nad poruszonymi tematami. Chociaż wypomnieć można, że na str. 94 znajdujemy znowu nie do końca poprawną myśl, że *„celem projektu było opracowanie liposomowego, ukierunkowanego nośnika leków genetycznych, skutecznego w terapii nowotworów krwi...”*. Ale pozostałe myśli zawarte w Dyskusji zasługują już tylko na pochwały, między innymi dlatego, że wyjaśniają wątpliwości, jakie zrodziły się podczas czytania Wstępu. Oto przykład: na str. 102 Pani doktorantka napisała, że *„... zastosowanie przeciwciała terapeutycznego ukierunkowującego nośnik ma na celu jedynie selektywne rozpoznanie komórki docelowej, a nie wywoływanie efekty terapeutycznego.”* To stwierdzenie potwierdza słuszność moich wątpliwości co do trafności tytułu i kilku sformułowań w rozdziale Cel pracy.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani Moniki Toporkiewicz oceniam bardzo pozytywnie. Moja krytyka ograniczyła się do wad konstrukcyjnych tego dzieła, które - szczerze mówiąc - nie ułatwiły mi jego oceny. W rozprawie są zawarte wszystkie niezbędne informacje, ale niektóre - i to te kluczowe dla zrozumienia istoty opracowanego przez autorkę rozwiązania - zostały dość skrętnie ukryte w rozdziałach Wyniki i Dyskusja. Autorka - moim zdaniem - ani we wstępie, ani w celu pracy nie wyróżniła w wystarczającym stopniu Oblimersenu i nie podkreśliła, że to właśnie antysens o takiej jak Oblimersen sekwencji, lecz zbudowany z niemodyfikowanych nukleotydów, został przez nią wybrany do sprawdzenia trafności koncepcji kierowanego dostarczania leku genetycznego do komórek CD20+. Tytuł rozprawy i

omówienie celu pracy odnoszą się do liposomowego nośnika leku genetycznego, który jako taki, czyli bez leku genetycznego w środku, nie zadziała - co autorka wie, lecz wiedzę tę ujawniła czytelnikowi dopiero pod koniec dyskusji. Jednak - jak już zaznaczyłem na początku recenzji - te moje, być może nieco kąśliwe, uwagi mają w istocie drugorzędne znaczenie. Życzę Pani doktorance, jej Promotorowi i całemu zespołowi, aby opracowane przez nich rozwiązanie stało się tą wymarzoną „magiczną kulą” przeciwko białaczkom i innym nowotworom złośliwym i otworzyło nowy rozdział genowej terapii chorób nowotworowych. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora i wnoszę o dopuszczenie Pani Moniki Toporkiewicz do dalszych etapów postępowania. Wnioskuje także o wyróżnienie rozprawy.

Stawek Grieb