



KRAKÓW, 9.12. 2020

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
KIEROWNIK ZAKŁADU IMMUNOLOGII

PROF. DR HAB. JOANNA CICHY

Ocena pracy doktorskiej mgr Mateusza Adama Krzyścika

pt. „Wysoce cytotoksyczne koniugaty oparte o ludzki czynnik fibroblastów 2”

Skuteczna i wszechstronna terapia nowotworów takich jak guzy łagodne, pozostaje jednym z najważniejszych problemów współczesnej medycyny. Strategie terapeutyczne z użyciem cytotoksyków skierowanych na komórki nowotworowe stanowią jeden z obiecujących i szeroko badanych sposobów hamowania rozrostu, a docelowo eradykacji nowotworów. Chociaż w tych pracach dominują terapie oparte na przeciwciałach monoklonalnych jako cząsteczkach sterujących tkankową lokalizacją związków toksycznych, to nie można pominąć również innych metod kierowania cytotoksyków do komórek nowotworowych. W ten ważny nurt badań wpisują się prace zespołu prof. dr hab. Jacka Otlewskiego, promotora niniejszej rozprawy, które dotyczą zastosowania ligandów dla receptorów czynnika wzrostu fibroblastów 1 (FGFR1) jako „koni trojańskich” tj. cząsteczek kierujących substancje toksyczne do komórek nowotworowych. Zaletą proponowanego podejścia jest wysoki poziom ekspresji receptora FGFR1 opisywany w wielu typach nowotworów i szybka internalizacja FGFR1 po związaniu ligandu, którą można wykorzystać do wniesienia cytotoksyku sprzężonego z ligandem do wnętrza komórki nowotworowej. Taką strategię zastosował również doktorant, który jako obiekt badań wybrał koniugaty ludzkiego czynnika wzrostu fibroblastów 2 (FGF2), jednego z ligandów FGFR1.

Praca została wykonana w Zakładzie Inżynierii Białka, na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Rozprawa ma formę spójnego tematycznie zestawu trzech publikacji eksperymentalnych (ACS Omega, oraz dwukrotnie Molecular Pharmaceutics), oraz krótkiego ogólnego wprowadzenia poprzedzającego wszystkie publikacje, i szczegółowego omówienia najważniejszych wyników przed każdą z zamieszczonych publikacji w języku polskim. Dodatkowo praca zawiera streszczenie w języku polskim i j. angielskim oraz krótkie podsumowanie wyników badań, bibliografię, a także spis publikacji, zgłoszeń patentowych

oraz doniesień konferencyjnych doktoranta. We wszystkich pracach doktorant jest pierwszym autorem i ocenia swój wkład odpowiednio, w pierwszej publikacji na 50% (pierwszy z dziewięciu autorów) oraz w dwóch pozostałych publikacjach na 75% (w obu przypadkach pierwszy autor wśród trzech autorów). Efektem badań doktoranta dyskutowanych w przedstawionej mi do oceny rozprawie są również dwa zgłoszenia patentowe (1 polskie i 1 międzynarodowe). W dorobku doktoranta znajduje się łącznie osiem publikacji (włączając w to trzy publikacje przedstawione do oceny w ramach rozprawy doktorskiej). W pozostałych publikacjach, autor nie pełni roli wiodącego autora.

Uwagi szczegółowe:

Rozdział „**Wprowadzenie**” stanowi zwięzły i przejrzysty opis zalet i wad chemioterapii, z przekonującym uzasadnieniem konieczności terapii celowanej w celu zmniejszenia cytotoksycznego wpływu chemioterapeutyków na komórki zdrowe. W tej części doktorant również opisał ogólną budowę stosowanych/konstruowanych w celach terapeutycznych koniugatów cząsteczkowych, które zawierają trzy zmienne elementy: (i) białko naprowadzające na cel (najczęściej przeciwciała swoiście rozpoznające antygeny powierzchniowe obecne głównie na komórkach nowotworowych); (ii) związek aktywny, o silnym działaniu toksycznym (np. inhibitory polimeryzacji mikrotubul, czy blokery polimeraz RNA); (iii) łącznik sprzęgający ze sobą dwa powyższe elementy i uwalniający substancję cytotoksyczną w środowisku nowotworów (np. wewnątrz komórek nowotworowych w wyniku hydrolizy lizosomalnej łączników, po internalizacji koniugatów).

We „wprowadzeniu” doktorant zamieścił również opis rodziny ligandów FGFR1, do których należy FGF2, i krótko nawiązał do wcześniejszych prób zespołu polegających na wykorzystaniu pary FGF-FGFR do wprowadzania cząsteczek cytotoksycznych do komórek nowotworowych. W ostatniej części tego rozdziału autor uzasadnia wybór FGF2 do konstrukcji nowych koniugatów. Nieco odmiennie cechy biochemiczne i funkcjonalne tego czynnika, w stosunku do wcześniej wszechstronnie badanego przez zespół FGF1, pozwalały mieć nadzieje na opracowanie bardziej skutecznych konstruktów białkowych. Do tych porządnym cech FGF2 w stosunku do FGF1 należą większa stabilność chemiczna oraz termiczna, jak również większa specyficzność względem rodziny receptorów FGF, co pozwala na bardziej selektywny dobór komórkowych obiektów terapii.

Cel pracy.

Głównym celem badań była konstrukcja i charakterystyka biofizyczna, biochemiczna i funkcjonalna kilku różnych koniugatów białko-lek na bazie cząsteczki naprowadzającej FGF2. Cel pracy został zrealizowany ponieważ z powodzeniem udało się opracować kilka funkcjonalnych konstruktów białkowych, relatywnie wybiórczych względem komórek z nadekspresją FGFR1.

Wyniki i dyskusja.

W trzech publikacjach opisano kilka różnych monomerycznych lub dimerycznych koniugatów FGF2 zawierających jako cytostatyk odpowiednio; monomylo aurostatynę E (MMAE)—inhibitor polimeryzacji mikrotubul (publikacja I), PEGyłowane pochodne hydrofilowej aurostatyny Y, inhibitora polimeryzacji mikrotubul (publikacja II), i jednocześnie dwa związki cytotoksyczne różniące się mechanizmem działania- MMAE, i amanitynę alfa- inhibitor polimerazy II i III RNA (publikacja III). Opracowanie tych konstruktów białkowych wymagało wyprodukowania różnych mutein FGF2, które umożliwiły dołączenie w żądanych pozycjach odpowiednich łączników, jak również bardzo dobrej orientacji w chemii i biologii peptydów w celu zaprojektowania odpowiednich linkerów.

Konstrukcja wszystkich przedstawionych do oceny publikacji jest podobna i składa się z kilku elementów; (i) charakterystyki biofizycznej/biochemicznej nowoutworzonych konstruktów białkowych FGF2 pod kątem między innymi zachowania cech wiązania się do FGFR1 i/lub analizy zdolności komórki do aktywacji szlaków sygnałowych zależnych od FGFR1 po związaniu konstruktów, (ii) potwierdzenia spodziewanej internalizacji koniugatów i lokalizacji komórkowej w endosomach a następnie w lizosomach, koniecznej do zwolnienia aktywnego leku, i (iii) analizy efektu cytotoksycznego konstruktów FGF2 przy użyciu komórek różniących się poziomem ekspresji FGFR1, w tym komórek z nadekspresją tego receptora jako modelu komórek nowotworowych poddanych celowanej terapii.

Opracowanie różnych konstruktów na bazie FGF2 w trzech kolejnych pracach, doktorant uzasadnił chęcią udoskonalenia przynajmniej dwóch istotnych cech koniugatów mogących mieć znaczenie dla farmakokinetyki działania tych leków; (i) wydłużeniem czasu usuwania koniugatów z krwiobiegu przez filtrację kłębuszkową w nerkach poprzez zwiększenie promienia hydrodynamicznego koniugatu do rozmiaru odpowiadającego białkom globularnym o masie cząsteczkowej ~ 60 kDa, jak również (ii) uzyskaniem lepszej swoistości i efektywności cytostatyków względem komórek nowotworowych. W tym kontekście najbardziej efektywne okazały się koniugaty dimerów FGF2 zawierające dwie różne substancje cytotoksyczne, i wymagany promień hydrodynamiczny.

Wnioski końcowe

W mojej opinii niewątpliwą zaletą rozprawy jest bardzo dobry, oparty na nowoczesnych metodach warsztat badawczy, obejmujący takie metody biofizyczne i biochemiczne jak spektrometria mas, metody fluorometryczne do badań stanu natywnego białkowych konstruktów, mikroskalarna różnicowa fluorymetria skaningowa, interferometria biowarstwowa, mikroskopia konfokalna czy cytometria przepływowa. Czytając rozprawę odniosłam wrażenie, że inżynieria białek jest powołaniem doktoranta i że z dużą łatwością

konceptyjną i warsztatową tworzy on konstrukty białkowe. Inżynieria białek potrafi być żmudnym i często frustrującym procesem, ale w sposobie prezentacji rozprawy dominuje u czytającego wyczuwalne poczucie satysfakcji autora-inżyniera cząsteczek z udanego opracowania nowych koniugatów białkowych o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

Za główne zagadnienie wymagające pogłębionej dyskusji uważam brak prezentacji wyników testów *in vivo* badających skuteczność, swoistość i immunogenność nowoutworzonych koniugatów FGF2. Zasadniczo polemizowałabym z doktorantem co do spodziewanego braku immunogenności takich konstruktyw. W swojej rozprawie, doktorant kilkakrotnie używa argumentu, że w odróżnieniu od koniugatów stworzonych na bazie przeciwciał, pochodne FGF2 będą raczej mało jeśli w ogóle immunogenne, ponieważ FGF2 jest naturalnie występującym czynnikiem wzrostu. Niestety w wyniku modyfikacji koniecznych do sprzęgnięcia FGF2 z cytostatykami, jest duże prawdopodobieństwo że FGF2 straci tą zaletę cząsteczki natywnej i będzie prowokował odpowiedź immunologiczną. Między innymi to zagadnienie pomogą rozstrzygnąć testy *in vivo*.

Takie testy pozwoliłyby również na bardziej jednoznaczną ocenę skuteczności koniugatów FGF2 w stosunku do komórek nowotworowych i potencjalnych efektów ubocznych względem komórek zdrowych. Jest to tym bardziej istotne, że w przedstawionych w rozprawie wynikach testów *in vitro*, zasadniczo żaden z zastosowanych koniugatów FGF2 nie wykazał 100% efektu toksycznego względem komórek ekspresjonujących FGFR1. Z reguły około 20% komórek z nadekspresją FGFR1 przeżywało w obecności maksymalnych stężeń koniugatów FGF2 użytych w testach cytotoxyczości (z wyjątkiem komórek U2OS-R1 taktowanych dimerycznym konstruktywem FGF2). W układzie *in vivo*, ten brak całkowitego zahamowania wzrostu komórek nowotworowych może doprowadzić do wyselekcjonowania klonów komórek nowotworowych np. pozbawionych powierzchniowej ekspresji receptora FGFR1 w wyniku tzw. edycji (zanikania cech, które są przedmiotem ataku). Edycja jest między innymi jedną z przyczyn niepowodzeń niektórych strategii stosowanych w immunoterapii nowotworów.

Proponuję aby doktorant odniósł się do tych zagadnień i przedstawił swoje przemyślenia na ten temat podczas publicznej obrony. Chciałam również zachęcić doktoranta do dyskusji na temat rzeczywistych poziomów ekspresji FGFR1 na komórkach zdrowych i nowotworowych, w kontekście badania cytotoxyczości konstruktywów FGF2 w oparciu o transgeniczne komórki z nadekspresją FGFR1, takie jak U2OS-R1. Podczas tej dyskusji byłabym również ciekawa zdania doktoranta na temat tego w jaki sposób prawdopodobna dostępność innych czynników wzrostu z rodziny FGF w otoczeniu nowotworów może wpłynąć na skuteczność proponowanej terapii. Nie było też dla mnie jednoznaczne w trakcie lektury rozprawy, na ile uzyskane przez doktoranta koniugaty wykazywały niepożądaną tendencję do agregacji. Dla przykładu, w publikacji I dotyczącej koniugatu FGF2 z 3 cząsteczkami MMAE doktorant nie

wskazywał na poważne problemy z agregacją jednego z takich konstruktów, podczas gdy w pracy II odnoszącej się do cząsteczek FGF2 sprzęgniętych z trzema cząsteczkami MMAE, wymienia agregację takich koniugatów jako przeszkodę w osiągnięciu bardziej cytotoksycznych konstruktów „obładowanych” MMAE.

Powyższe uwagi i sugestie nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy, którą cechuje naukowa dojrzałość, logiczny plan doświadczeń i imponujący warsztat inżynierii cząsteczek. Wykonanie testów *in vivo*, na które gorąco namawiam doktoranta, będzie na pewno czasochłonne i wymagające eksperymentalnie, ale zaprezentowane badania w mojej opinii bardzo zyskają na znaczeniu jeśli skuteczność koniugatów potwierdzą testy *in vivo*. Niniejsza dysertacja stanowi dobry punkt wyjścia do dalszych badań w tym zakresie.

Przedstawiona do oceny dysertacja spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana Mateusza Krzyścika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. Joanna Cichy

