Elektronicznie podpisany przez:

Beata Teresa Pająk

Data:
2024-3-21 11:24:3

# Recenzja rozprawy doktorskiej

**Imię i nazwisko kandydata: mgr inż. Radosław Borowski**

**Tytuł rozprawy doktorskiejPerspektywy zastosowania w terapii przeciwnowotworowej immunotoksyn ukierunkowanych na komórki nowotworowe z ekspresją receptora IL-13Rα2**

**Promotor: dr hab. n. med. inż. Beata Pająk, prof. WIHE**

**Recenzent: dr hab. n. med. Janusz Kocik, Prof. CMKP I NCBJ**

## 1 Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań:

Celem przedstawionej mi do recenzji pracy była analiza porównawcza skuteczności cytotoksycznej dwóch immunotoksyn skierowanych przeciwko IL-13Rα2 w modelu *in vitro* glejaka wielopostaciowego (GBM). Ponadto, intencją autora była ocena potencjału immunotoksyn w terapii przerzutów raka sutka, prostaty, płuc i czerniaka skóry do mózgu, oraz pierwotnego raka sutka i raka prostaty.
Analiz dokonano poprzez zastosowanie standardowego panelu testów biochemicznych i molekularnych, pozwalających ocenić wpływ badanych immunotoksyn na żywotność, proliferację, zdolność do syntezy białek i tworzenia kolonii komórek nowotworowych różnych rodzajów nowotworów.
Immunotoksyny opartą o marker nowotworowy IL-13Rα2 są szeroko badane, w tym głównie fuzja IL-13 ze zmodyfikowaną egzotoksyną A *Pseudomonas aeruginosa* PE38QQR i w badaniach laboratoryjnych udowodniono wysoką skuteczność IL-13-PE38QQR wobec guzów litych. Również immunotoksyna IL-13-DT390 została przebadana w badaniach klinicznych faz 1 – 3, z udziałem zwierząt i pacjentów. Immunotoksyna IL-13-PE38QQR, weszła do obrotu pod nazwą handlową Cintredekin Besudotox® i została przebadana w badaniach klinicznych 1 i 2 fazy u chorych z pierwotnymi nowotworami mózgu, gdzie nie zarejestrowano ogólnoustrojowej cytotoksyczności. Przeprowadzono też badania fazy 3, gdzie IL-13-PE38QQR była porównywana z zarejestrowaną terapią GLIADEL, wkładkami do loży po resekcji guza uwalniającymi cytostatyk, bez spodziewanej korzyści dla pacjentów.
Należy stwierdzić, że aktywność cytotoksyczna immunotoksyn analizowanych w niniejszej pracy wobec guzów mózgu jak i ich tolerancja, zarówno w układzie przedklininicznym jaki i w badaniach z udziałem pacjentów jest dość dobrze poznane, także w zakresie innych podejściu ukierunkowujących, takich jak np. CAR-T co dokumentuje m.in. minireview pracowników FDA – Knudson K et al. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878365
Recenzowane badania w tym zakresie nie mają charakteru w pełni oryginalnego.
O oryginalności pracy niniejszej pracy stanowi więc głównie analiza porównawcza skuteczności tych immunotoksyn, sprowadzona do porównania ich cytotoksyczności. Uzasadnieniem do podjęcia badań, prezentowanym przy omawianiu hipotezy badawczej, jest konieczność precyzyjnego wskazania najlepszego kandydata na lek, ze względu na [koszt badań z udziałem ludzi i następową] wysoką cenę terapii.
Zaproponowana hipoteza badawcza zakłada także, iż celowane immunotoksyny ukierunkowane na receptor IL-13Ra2 będą wykazywały wysoką cytotoksyczność względem komórek glejaka, istotnie wyższą niż obecnie wykorzystywany temozolomid, czego jednak nie potwierdzono wprost i nie odniesiono się w obrębie recenzowanej pracy.

Założono także, iż przeprowadzone badania pozwolą na identyfikację wariantu immunotoksyny o wyższym potencjale cytotoksycznym co zostało właściwie tu właściwie zobrazowane.
Zaproponowana hipoteza badawcza zakłada, iż immunotoksyny ukierunkowane na receptor IL-13Rα2 mogą być nowym kierunkiem rozwoju terapii przerzutów do mózgu. W tym zakresie praca jest częściowo oryginalna. Prace o podobnym założeniu, częściowo przy użyciu różnych od zastosowanej w niniejszej technologii zostały przeprowadzone w próbach hamowania mi.n. przerzutów raka jelita grubego, czerniaka, pierwotnego raka nadnerczy, piersi oraz pierwotnego raka wątroby.
Nowością uzyskaną dzięki recenzowanej pracy jest ocena aktywności badanych immunotoksyn przeciw przerzutom do mózgu nowotworów sutka, prostaty, płuc i czerniaka, skóry oraz przeciw pierwotnym nowotworom prostaty i sutka. Prac o takim charakterze recenzent nie napotkał w bazie publikacji naukowych Pubmed i bazie badań klinicznych clinicaltrials.gov.

b. Wartość naukowa rozdziałów:

Wstęp w sposób informatywny przedstawia problem epidemiologiczny i kliniczny guzów mózgu, ograniczenia aktualnych terapii – lokalnych, skojarzonych i systemowych (farmakologicznych), w tym trudności z pokonaniem bariery krew-mózg. Przegląd odpowiada aktualnemu standardowi postępowania klinicznego. W przypadku próby streszczenia obecnych standardów leczenia przerzutowego raka piersi doktorant pomija fakt, że podstawowym narzędziem w postępowaniu przeciw przerzutom do mózgu pozostają metastazektomia i radioterapia, w tym coraz częściej stosowana radioterapia stereotaktyczna. Natomiast omawiane przezeń linie postępowania farmakologicznego są aktywne głównie aktywne wobec przerzutów wisceralnych. Ich omówienie jest jednak uzasadnione ze względu na uwzględnienie w prowadzonych przez doktoranta pracach także pierwotnego raka piersi. Omawiając zagadnienie przerzutów do mózgu raka prostaty doktorant zapomina wspomnieć, że problem ten dotyczy jedynie 1-6% pacjentów. Opisana terapia hormonalna i cytostatyczna nie wpływa na przerzuty do mózgu i nie jest to dotknięte w omówieniu. Ponadto widząc znikome uzasadnienie do zastosowania immunotoksyn w tym wskazaniu należy poddać w wątpliwość sens badań stosowanych w tym kierunku, ze względu na znikomą wartość rynkową w tym szczegółowym wskazaniu. Poza błędnym podaniem nazwy cytostatyku – dakarbazyny – doktorant wykazał się znajomością aktualnego standardu postępowania farmakologicznego w przerzutowym czerniaku i raku płuca, w tym głównie terapii celowanej.
Wskazując cele terapii celowanej w sekcji temu poświęconej doktorant niewłaściwie stwierdza, że wyzwaniem jest tu znalezienie biomarkera a nie celu (ang. *target*) terapii, aczkolwiek taki błąd można uznać za semantyczny gdyż w wielu przypadkach obecny standard rozwoju tych terapii polega na określeniu biomarkerów odpowiedzi na leczenie, które mogą być ale nie muszą być celem tej terapii. Wybrane leki celowane zestawione w tabeli 1 są przykładowe, jednakże, ze względu na mechanizm działania immunotoksyn, wiążących receptory powierzchniowe, byłoby lepiej omówić głównie leki wiążące się z domenami błonowymi. Jednocześnie stwierdzenie, że molekularna terapia celowana posiada ograniczenia wynikające z konieczności obecności markera molekularnego na powierzchni komórki nowotworowe jest o tyle mylące, że duża część małych cząsteczek działa wewnątrzcytoplazmatycznie, wpływając na elementy szlaku metabolicznego, najczęściej na kinazy.
Omawiając immunotoksyny doktorant zapomina wspomnieć o Fam-trastuzumab deruxtecan-nxki (Enhertu) czy Sacituzumab govitecan (Trodelvy), wprowadzone świeżo do praktyki w leczeniu przerzutowego raka piersi, w tym szczególnie przerzutów do mózgu. Jako immunokonjugaty z cytostatykami w leczeniu jednego z nowotworów w obrębie zainteresowań doktoranta najbardziej nadają się do porównań ze związkami przezeń badanymi.

Bakteryjne egzotoksyny są szeroko i standardowo omówione pod względem budowy i mechanizmów przekształceń aktywizujących, ułatwiających produkcję oraz wpływu cytotoksycznego. Także budowa, funkcja oraz stany sprzyjające nadekspresji receptora IL-13Rα2 są przedstawione szczegółowo, choć może niekoniecznie w zakresie jedynie potrzebnym na cele dysertacji.
Szczegółowe pokazanie budującej się wiedzy odnośnie zastosowania immunotoksyn IL-13 w terapii nowotworów podbudowuje znacząco uzasadnienie do weryfikacji znaczenia rodzaju toksyny bakteryjnej dla efektów immunotoksyn przeciwko Il-13Rα2.
Jednocześnie zapowiedź modyfikacji genetycznej immunotoksyny, tak aby zwiększyć aby zmniejszyć niespecyficzne oddziaływanie receptorem Il-13Rα1 nie jest opatrzona wystarczającym omówieniem w uzasadnieniu do badań. Doktorant wprawdzie wspomina, że jest to receptor, który jest powszechnie obecny w organizmie a jego aktywacja może wiązać się z indukcją odpowiedzi immunologicznej, nie prowadzi jednak szerszych rozważań o mechanizmach niepożądanej toksyczności wobec tkanek zdrowych i potencjalnej utracie aktywności w wyniku immunogenności własnej.
Informacje kliniczne o asocjacji nadekspresji receptora z gorszym rokowaniem pacjenta z glejakiem IV stopnia czy rakiem prostaty lub piersi; informacje histopatologiczne w typie mezenchymalnym glejaka o gorszym przebiegu klinicznym; z informacjami na poziomie patofizjologii o relacji nadekspresji ze zwiększoną inwazyjnością a nie proliferacją komórek a także o interakcjach z innymi szlakami metabolicznymi prowadzą czytelnika wielowątkowo w kierunku zrozumienia potencjalnej korzyści z blokowania tego szlaku metabolicznego w zapobieganiu przerzutom nowotworu. Jednakże inne podane informacje wskazują na niepewności w jednokierunkowej interpretacji dostępnych wyników badań.
**W tym kontekście na podkreślenie zasługuje rzetelność badacza w dyskusji tych niepewności.**
Wskazanie na fakt, że liczba dostępnych danych dotycząca analiz obecności receptora Il-13Rα2 w przerzutach do mózgu jest ograniczona i zapowiedź w niniejszej dysertacji badań odpowiadających na potrzebę weryfikacji dotychczasowych badań w zakresie obecności tego markera molekularnego w przerzutach różnych nowotworów do mózgu i możliwości zastosowania ukierunkowanych na niego immunotoksyn w ich terapii w pełni uzasadniają szczegółowość wstępu **i czynią go wartościową merytorycznie częścią.**

Wartość naukową założonych badań należy ocenić bardzo wysoko. Wpisują się one w nurt rozwoju celowanych terapii przeciwnowotworowych, wybierając szczegółowy obszar dotąd nie eksplorowany i wart eksploracji z praktycznego punktu widzenia onkologa klinicznego. Metodyka przeprowadzonych działań biotechnologicznych i badań z zakresu biologii molekularnych stanowi wysoki standard odniesienia (*state-of-the-art*).

## 2 Wartość merytoryczna rozprawy

Wartość merytoryczną wstępu oceniono i ocenę przedstawiono wyżej. W podsumowaniu należy wskazać, że zaznacza się umiejętność doktoranta w zakresie zbierania i prezentacji danych uzasadniających podejmowanie badania i wskazujących na ich nowatorstwo.
Cel pracy jest sformułowany czytelnie i odpowiada zakresowi następowo wykonanych badań.
Zadania badawcze adekwatnie sprzyjają osiągnięciu założonego celu
Na szczególne uznanie zasługuje przeprowadzona z sukcesem produkcja immunotoksyn

ich

oczyszczanie z dobrą wydajnością

**świadczą o rzetelnej pracy biotechnologicznej i znajomości jej zasad z umiejętnością własnego ich modyfikowania.**
Dobór metod do oceny cytotoksyczności tychże immunotoksyn, w tym dobór linii komórkowych, ich hodowle, dobór metod immunocytochemicznych oceniających ekspresję badanego receptora, badania żywotności testem MTS, proliferacji z w wykorzystaniem BrdU, pomiar natężenia syntezy białka z SRB, ocena zdolności tworzenia kolonii w teście klonogennym i ocena apoptozy pozwala na sprawdzenie oddziaływania cytotoksycznego pod wieloma kątami i właściwe porównanie aktywności badanych immunotoksyn. **Świadczy to o dużej pieczołowitości doktoranta, tym razem jako biologa molekularnego, w podejściu do wykonania wyznaczonych zadań badawczych i osiągnięcia celu pracy.**
Metoda statystyczna została dobrana prawidłowo.
W komentarzu do prezentacji wyników należy wskazać, że w pierwszej części doktorant bardzo przyjaźnie dla czytelnika przedstawia kolejne kroki w analizach.

Następnie doktorant przedstawia obserwowaną immunohistochemicznie ekspresję receptora Il-13Rα2 w poszczególnych liniach komórkowych a w kolejności – wpływ porównawczy obu immunotoksyn, w zależności od tejże ekspresji. Koncentracja receptora Il-13Rα2 na powierzchni została przejrzyście przedstawiona porównawczo między liniami komórkowymi w tab. 5, natomiast wpływ immunotoksyn na żywotność na ryc. 21-27. Wartości stężenia hamującego dla 50% komórek po 72h ($IC_{50}$ 72h) doktorant prezentuje dla wybranych linii o wysokiej i umiarkowanej ekspresji receptora w tab. 6.
Tu należy zaznaczyć dużą złożoność i wielowątkowość otrzymanych danych. Do porównania są ekspresja receptora dla poszczególnych linii, zależność cytotoksyczności obu immunotoksyn od tejże ekspresji i różnica w tejże cytotoksyczności między związkami badanymi. Aczkolwiek czytając opis wyników czytelnik uzyskuje informację, że relacje te są praktycznie jednokierunkowe i zgodne z oczekiwaniami, pozostaje jednak wrażenie, że autor nie do końca czytelnie umiał zaprezentować wyniki. Wczytując się głębiej widzimy, że korelacja ekspresja receptora/żywotność nie jest liniowa, biorąc pod uwagę pełen zestaw linii komórkowych. Jest tu widoczny brak jednej tabeli lub wykresu porównujących wszystkie te zmienne, szczególnie w ujęciu statystycznym siły korelacji ekspresja receptora/żywotność, z poziomami ufności do zaobserwowanych różnic.
Podobnie jest z kolejnymi partiami wyników omawiającymi wpływ immunotoksyn na klonogenność, proliferację, syntezę białka, apoptozę, gdzie wyniki zebrane są na ryc. 30-32 i 34. Dla apoptozy są one przedstawione jedynie informacyjnie, dla linii o najwyższej ekspresji receptora. Odnosi się wrażenie, że zjawiska inne od wpływu immunotoksyn na żywotność komórek nowotworowych były obserwowane niepotrzebnie.
Na uznanie zasługuje natomiast przeprowadzenie testu kompetycji (błędnie nazwanego testem kompetencji na str.105)

badaniu swoistości efektu cytotoksycznego, zeprezentowany na ryc. 28.
Świadczy on o niższej aktywności immunotoksyn w momencie wcześniejszego zablokowania receptora przez swoisty ligand. Niestety błąd w legendzie wykresu (ryc. 28 B) zmniejsza satysfakcję z obserwacji tak doniosłego zjawiska.
Nie do końca czytelna prezentacja danych jest rekompensowana przez esencjonalne podsumowanie wyników. Znaczące jest i konieczne do podkreślenia, że doktorant zadbał o badanie porównawcze wpływu immunotoksyn na komórki prawidłowe. Sens wykorzystania

innych technik niż jedynie test żywotności MTS jest uwidoczniony w obserwacji,

wystarczająco czytelnie uwypuklone w sekcji im poświęconej aczkolwiek są czytelnie omówione w dyskusji.

W dyskusji doktorant nadrabia niedostatki prezentacji wyników odnosząc się do relacji ekspresji receptora do skuteczności immunotoksyn w poszczególnych liniach komórkowych. Słusznie wnioskuje o celowości wprowadzenia badania ekspresji Il-13Rα2 na powierzchni komórek nowotworów, przyszłych celów terapii jako biomarkera predykcyjnego jej skuteczności. Wniosek ten można zaakceptować jako słuszny, z poprawką na historię innych terapii celowanych takich jak przeciwciała monoklonalne przeciw EGFR (cetuximab, panitumumab) czy przeciwciała przeciw PDL-1 takie jak nivolumab, gdzie ekspresja receptora powierzchniowego nie jest biomarkerem predykcyjnym. W dyskusji autor pochyla się nad zagadnieniem toksyczności immunotoksyn, zwracając uwagę m.in. na predylekcję do gonad i za tym, możliwości bezpłodności. Niestety poza badaniem wpływu doktorant nie wykonał żadnych badań ukierunkowanych na bezpieczeństwo terapii, choćby wpływu na mikroglej mózgu. Doktorant prezentuje niespójne wyniki innych autorów odnośnie relacji ekspresji receptora do zdolności do tworzenia przerzutów i zasiedlenia (proliferacji w miejscu przerzutowania). Wysoka ekspresja ma sprzyjać zmniejszeniu inwazyjności i zwiększeniu zdolności do proliferacji. Jednocześnie jednak podaje fakt wysokiej ekspresji Il-13Rα2 w trójnegatywnym raku piersi (TNBC). Wydaje się, że te nieścisłości wymagają lepszego omówienia.

Doktorant w interesujący sposób spekuluje nt. różnic w toksyczności badanych immunotoksyn, poszukując przyczyny m.in. w zdolności wiązania receptora, konformacji białka i losów wewnątrzcytoplazmatycznych części katalitycznej egzotoksyny konkludując, ze wyjaśnienie różnic wymaga m.in. badań strukturalnych.

Wreszcie autor kreśli perspektywiczne zastosowania immunotoksyn przeciw Il-13Rα2 jako elementu leczenia skojarzonego, jako komponenty ograniczającej przerzutowanie nowotworu. Jako takie, przy założeniu niskiej toksyczności, immunotoksyny mogłoby zająć pozycję konkurencyjną wobec aktualnie stosowanych terapii uzupełniających leczenie zasadnicze, zapobiegających ujawnieniu się przerzutowej choroby nowotworowej.

Z niewielkimi zastrzeżeniami uwypuklonymi wcześniej widzę dużą wartość merytoryczną dyskusji własnych wyników, przeprowadzonej przez doktoranta.

3 **Poprawność redakcyjna rozprawy**

Manuskrypt zachowuje czytelny, typowy układ pracy doktorskiej. Rozdziały są skonstruowane w sposób zrównoważony, wynikowy względem siebie wzajemnie. Poza nielicznymi niepotrzebnie przekazanymi informacjami, treść odnosi się bezpośrednio do zamiaru, realizacji, wyników i dyskusji ich znaczenia. Praca zawiera liczne błędy literowe i słownikowe oraz pomyłkę w opisie tabeli, wspomniane wcześniej. Nie umniejsza to wartości pracy jednak musi być uwzględnione przy poprawkach przy edycji pracy. Recenzent oferuje przekazanie własnych uwag w tym zakresie poza recenzją.

4 **Uwagi krytyczne**

W abstrakcie, omawiając wyniki badań, użyto sformułowań podkreślających wysoki potencjał przeciwnowotworowy i skuteczność w eliminacji przerzutów do mózgu, których to stwierdzeń

te wyniki nie usprawiedliwiają. Stwierdzenia te mają charakter nieuprawnienie optymistyczny. Zamierzeniem pracy była analiza porównawcza skuteczności cytotoksycznej dwóch immunotoksyn, co zresztą zostało pierwszorzędnie dokonane. Niemniej wnioski umieszczone w abstrakcie, który jest najczęściej czytaną częścią publikacji prac, muszą być lepiej wyważone, wskazując bardziej na potencjalną niż potwierdzoną rolę badanej terapii na podstawie osiągniętych wyników.

Model linii komórkowych, mimo, że są one m.in. pozyskane z przerzutów do mózgu, w żadnym stopniu nie daje gwarancji aktywności w stosunku do faktycznych przerzutów, oddzielonych od krwioobiegu barierą krew-mózg i mających liczne wpływy podtrzymujące ze strony swojego mikrośrodowiska (ang. *TME*). Pokładanie wiary w dostarczanie bezpośrednie do mózgu na wzór struktur nasyconych lekiem (Gliadel), może okazać się płonne, gdyż dotychczasowe doświadczenia nie przynoszą dowodów na wyższą aktywność immunotoksyn od karmustyny. Niska skuteczność tego podejścia leży m.in. u podstaw niewprowadzania tej techniki do praktyki codziennej.

Hipoteza badawcza jest sformułowana zbyt szeroko. Zawarto w niej zamiar porównania z terapią standardową cytotoksyczną (temozolomide), jednak nie przeprowadzono bezpośrednich badań porównawczych ani nie dyskutowano dostępnych retrospektywnie porównań stężeń $IC_{50}$ temozolomide względem odpowiednich linii komórkowych.

Zbyt mało uwagi poświęcono wpływowi toksycznemu wobec komórek zdrowych. Linia prawidłowych fibroblastów, która spośród dostępnych prawidłowych linii komórkowych charakteryzuje się relatywnie wysokim stężeniem receptora IL-13Rα2 wykazywała umiarkowaną wrażliwość na badane związki i zachowała zdolność do proliferacji. Immunogenność immunotoksyn jest często podnoszonym ograniczeniem. Uprawnione wnioski odnośnie stosowalności terapii powinny opierać się na badaniu cytotoksyczności względem komórek nowotworowych i wszystkich aspektów tolerancji przez poszczególne układy narządowe, w tym na wpływie na komórki mieloidalne i nefrocyty i hepatocyty. Badanie ekspresji Il-13Rα2 w komórkach *TME* jest kluczowe. Duża część badań powinna skupiać się na wykluczeniu kross-reaktywności z pokrewnymi receptorami, jak Il-13Rα1 i Il4R.

5 Ocena końcowa

W ocenie końcowej pragnę jeszcze raz podkreślić, że mimo powyższych uwag krytycznych, wynikających ze zbytniej wnikliwości recenzenta, mającego głównie nastawienie wynikające z pracy klinicznej w farmakoterapii onkologicznej uważam, że praca ma charakter absolutnie nowatorski i stanowi istotny wkład dający podstawy do uczynienia immunotoksyn przeciw Il-13Rα2 jako ważnego kierunku wdrożenia terapii onkologicznej. Na podstawie przeprowadzonych prac można uznać, że proponowany ligand receptorowy, a także cała immunotoksyna może stanowić platformę teranostyczną jako łącznik dla izotopów lub innych nietoksycznych związków czynnych w diagnostyce i terapii celowanej, skojarzonej z wpływem promieniowania. Daje to asumpt do nadziei na jeszcze bardziej toksyczne względem nowotworu a jednocześnie wybiórcze terapie przyszłości. Praca, jako stosunkowo bliska zastosowaniu w faktycznej praktyce klinicznej, zasługuje na szczególne wyróżnienie.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr. inż. Radosława Borowskiego** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2022 poz. 574 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie **mgr. inż. Radosława Borowskiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie wniosku
Jak w sekcji 5

10.01.2024

data sporządzenia recenzji

podpis recenzenta