

Jan Walewski, prof. dr hab. n. med.

Warszawa, 22.05.2017 r.

Specjalista w dziedzinie onkologii klinicznej,
hematologii, transplantologii klinicznej,
chorób wewnętrznych,
Kierownik Kliniki Nowotworów Układu Chłonnego,
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marka Gryzika pt.:

Wpływ toksyny bakteryjnej listeriolizyny O oraz jej mieszanin z przeciwciałem anti-CD20 na ludzkie limfocyty oraz limfocytarne linie komórkowe

Autor rozprawy sformułował tezę, że toksyna bakteryjna listeriolizyna O (LLO) oraz jej mieszaniny z przeciwciałem anti-CD20 rytuksymabem (RTX) mogą wpłynąć na żywotność ludzkich limfocytów oraz limfocytarnych linii komórkowych. Dla potwierdzenia tezy, autor określił cel pracy, którym było sprawdzenie, czy w modelach doświadczalnych *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo*, łączne zastosowanie LLO i RTX zwiększy efekt cytotoksyczny przeciwciała na komórki docelowe. Autor określił także następujące trzy cele szczegółowe:

- a) ocenę wpływu oryginalnego przeciwciała (RTX), przeciwciała zmodyfikowanego przez dołączenie łącznika zawierającego grupę nitrylotrójocową (RTX_{-NTA}), preparatu LLO oraz ich mieszanin na komórki ustalonych linii ludzkich limfocytów B (Raji) i T (Jurkat), Efekt cytotoksyczny był oceniany z zastosowaniem cytometrii przepływowej w opraciu o wychwyty jodku propidyny,
- b) ocenę wpływu tych czynników białkowych na komórki linii limfocytarnych wprowadzone do jamy otrzewnej myszy z niedoborem odporności szczepu NSG (dysfunkcja receptora HLA-DR, brak aktywnego układu dopełniacza, defekt w układzie cytokin),
- c) ocenę LLO i RTX na limfocyty B i T w pełnej krwi obwodowej zdrowych dawców i chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (PBL).

Tak sformułowane cele badawcze autor wywodzi z przesłanek dotyczących aktualnego standardu leczenia chorych na PBL, którym jest immunochemioterapia obejmująca

stosowanie rytuksymabu, fludarabiny i cyklofosfamidu (FCR) oraz hipotezy dotyczącej możliwości zwiększenia aktywności przeciwciała przez sprzężenie z toksyną bakteryjną.

Rytuksymab, pierwsze terapeutyczne przeciwciało monoklonalne wdrożone do praktyki hemato-onkologicznej przed 20 laty, zwiększa skuteczność leczenia wszystkich nowotworów wywodzących się z limfocytów B, jednak ten wzrost skuteczności jest relatywnie najmniejszy w odniesieniu do PBL z powodu, jak się przypuszcza, mniejszej ekspresji CD20 oraz złożonych zaburzeń układu odpornościowego występujących w tej chorobie. W ostatnich latach pojawiły się nowe możliwości leczenia chorych na PBL – zwłaszcza postaci opornych na leczenie standardowe, związane z opracowaniem i wdrożeniem inhibitorów kinazy Brutona oraz kinazy fosfatydyloinozytolowej 3, ale nie zmniejszają one roli przeciwciał anti-CD20, ponieważ inhibitory szlaków sygnałowych nie dorównują przeciwciałom w szybkości i głębokości uzyskiwanej remisji choroby. Przeciwnie, kierunek badań nad udoskonaleniem przeciwciał jest bogato reprezentowany w badaniach przedklinicznych i klinicznych, a także jest odzwierciedlony w niedawnych rejestracjach nowych przeciwciał anti-CD20 do stosowania w PBL. Należą do nich przeciwciała o swoistości wobec innego niż w przypadku rytuksymabu epitopu CD20: ofatumumab, który w większym stopniu niż rytuksymab angażuje cytotoksyczność układu dopełniacza oraz obinutuzumab, który dzięki zmodyfikowanej grupie cukrowej w większym stopniu angażuje cytotoksyczność zależną od komórek za pośrednictwem receptora Fc. Konjugaty przeciwciał i toksyn, czy przeciwciał i radionuklidów (ADC – *antibody drug conjugates*), stanowią model cząsteczki terapeutycznej bardzo atrakcyjny teoretycznie, jednak jego weryfikacja eksperymentalna, a zwłaszcza kliniczna nie przyniosła dotychczas tak spektakularnych sukcesów na większą skalę, jakie nastąpiły w przypadku przeciwciał niezwiązanych. Jednym z nielicznych przykładów sukcesu konjugatu (pomijając radionuklidy) jest brentuksymab vedotin, przeciwciało anti-CD30 sprzężone z monometyloaurystatyną E (toksyna mikrotubuli), które po połączeniu z komórką CD30 dodatnią (np. Hodgkina lub chłoniaka z obwodowych komórek T) ulega internalizacji, a toksyna uwalniana wewnątrz komórki powoduje jej eliminację. Jednak w przypadku chłoniaków z limfocytów B, taki model leku nie może być rozważany, ponieważ cząsteczka CD20 nie ulega internalizacji.

Biorąc pod uwagę wskazany powyżej kontekst kliniczny, projekt badawczy przyjęty przez autora rozprawy, należy ocenić jako interesujący, ponieważ uwzględnia on znane ograniczenia i zakłada wykorzystanie białka bakteryjnego, którego punktem uchwytu są składniki lipidowe błony komórkowej, w której agregaty toksyny tworzą pory, a jednym z mechanizmów działania rytuksymabu jest tworzenie tratw lipidowych w błonie komórek

docelowych. Istnieją zatem przesłanki teoretyczne współdziałania cząsteczki RTX i LLO w zakresie toksyczności wobec limfocytów CD20 dodatnich. Ponadto, charakterystyka fizykochemiczna cząsteczki LLO pozwala przewidywać jej małą toksyczność w przypadku zastosowania dożylnego.

Przesłanki teoretyczne i kliniczne projektu badawczego i jego uzasadnienie zostały przez autora opisane we wstępie w sposób przejrzysty i zgodny z aktualną wiedzą. W odniesieniu do danych klinicznych, autor pomija całkowicie postępy dotyczące ingerencji w patologiczne szlaki sygnałowe komórek PBL, w szczególności z zastosowaniem inhibitorów kinaz oraz inhibitorów apoptozy. Jest to zrozumiałe ze względu na zakres tematyczny jego pracy, ale ogranicza kontekst badawczy przedsięwzięcia ukierunkowanego na opracowanie nowej metody terapeutycznej.

Do realizacji pierwszego celu szczegółowego, autor opracował metodę izolacji i oczyszczania toksyny LLO przy pomocy chromatografii powinowactwa, modyfikację przeciwciała oryginalnego przez dołączenie linkera z grupą nitrylotrójoctową (NTA), która umożliwiałaby powstanie połączenia między zmodyfikowanym przeciwciałem, a toksyną zmodyfikowaną przez przyłączenie cząsteczek histydyny, a także opracował metodę oczyszczania uzyskanego przeciwciała przy pomocy sączenia molekularnego i chromatografii HPLC. Wiązanie chelatowe RTX_{NTA-Ni-6His}-LLO wytworzone przez autora, stabilne w warunkach fizjologicznego pH, miało posłużyć do transportu toksyny do miejsca działania, jakim byłaby błona komórki CD20 dodatniej. Autor oceniał cytotoxycznosc różnych dawek przeciwciała w obecności osocza od zdrowych dawców.

W drugiej części doświadczeń, autor wprowadzał komórki docelowe do jamy otrzewnej myszy szczepu NSG, następnie dodawał badane preparaty białkowe, a po 2 godzinach odzyskiwał komórki z jamy otrzewnej i poddawał je ocenie cytometrycznej. Badania te wykazały większą toksycznosc mieszaniny LLO-RTX wobec komórek linii B niż tych preparatów stosowanych oddzielnie oraz brak cytotoxycznosci wobec komórek linii T. Nie obserwowano systemowej toksycznosci badanych czynników w ocenie zachowania ani w badaniu patomorfologicznym.

W części badań z wykorzystaniem pełnej krwi obwodowej zdrowych dawców i chorych na PBL wykonywano ocenę cytometryczną limfocytów poddanych działaniu RTX lub LLO z zastosowaniem nietoksycznej dawki LLO. W przypadku zdrowych limfocytów B obserwowano znaczą depopulację pod wpływem RTX bez dodatkowego efektu LLO, natomiast w przypadku limfocytów chorych, efekty były indywidualnie zróżnicowane.

Autor prezentuje wyniki systematycznie i w sposób przejrzysty bez wyraźnego shierarchizowania pod względem ciągłości wyводу. Część z tych wyników, dotycząca opracowania optymalnych warunków doświadczenia i kalibracji metod mogłaby być przeniesiona do części, która mogłaby stanowić suplement. Generalnie, wyniki można podzielić na dotyczące właściwości postulowanego kompleksu immunotoksyny oraz dotyczące efektów biologicznych.

Autor wykazał, że modyfikacja RTX nie powoduje jego degradacji ani utraty zdolności wiązania przeciwciała ze swoistym antygenem CD20 oraz, że modyfikacje RTX mają zdolność znakowania komórek docelowych. Jednak nie udało się wykazać obecności kompleksu RTX_{-NTA-Ni-6His}-LLO metodami elektroforezy ani określić wydajności reakcji kompleksowania. Obecność kompleksu wykazano jedynie w ocenie cytometrycznej po inkubacji komórek docelowych z zastosowaniem białka _{6His}-GFP, RTX_{-NTA} w obecności jonów niklu. Z tego względu, w dalszych badaniach autor analizował efekty mieszaniny RTX_{-NTA}, _{6His}-LLO i Ni⁺².

W ramach oceny efektów biologicznych, autor wykazał, że stopień eliminacji limfocytów B jest zależny od zawartości surowicy w mieszaninie inkubacyjnej, co wiąże się z obecnością dopełniacza oraz, że jest wysoce zróżnicowany w zależności od dawcy osocza. Ponadto, autor wykazał, że podanie RTX i RTX_{-NTA} wraz z jonami niklu nasila cytotoksyczności wobec komórek linii B, ale nie linii T. Podobny efekt obserwowano w doświadczeniach z wykorzystaniem krwi obwodowej chorych. Ponadto, autor wykazał, że w przeciwieństwie do limfocytów zdrowych dawców, których depopulacja pod wpływem RTX sięgała 80%, w przypadku chorych na PBL była ona bardzo zróżnicowana i zależna od dawki. Autor sugeruje, że analogiczny test przeżywalności komórek krwi obwodowej mógłby być rozważany do oceny podatności limfocytów białaczkowych na RTX w przypadku konkretnych chorych oraz do testowania nowych przeciwciał.

Wnioski autor formułuje w sposób ostrożny, zgodnie z ograniczeniami w uzyskanych wynikach takimi, jak pośredni charakter charakterystyki immunotoksyny, zmienność wyników uzyskanych z wykorzystaniem limfocytów chorych i niewielka liczebność próby. Zasadniczym wnioskiem jest wykazanie, że w warunkach *in vitro* łączne podanie rytuksymabu i toksyny LLO w niskich dawkach zwiększa cytotoksyczność wobec limfocytów B ale oszczędza limfocyty T, natomiast efekty w warunkach *in vivo* autor ocenia jako wskazujące na możliwość zwiększenia wybiórczości działania toksyny LLO na komórki docelowe i pozytywną interakcję z przeciwciałem terapeutycznym.

Autor wskazuje także w podsumowaniu na elementy nowości w jego pracy, do których należy wybór i zastosowanie doświadczalne toksyny LLO, wykazanie efektów jonów niklu nasilających wybiórczą cytotoksyczność przeciwciał, oryginalność modelu badań *in vivo* z wykorzystaniem jamy otrzewnej myszy NSG jako ograniczonej przestrzeni inkubacyjnej umożliwiającej kalibrację efektu dopełniacza, wykazanie integralności cząsteczki rytuksymabu po jego modyfikacji w kierunku kompleksowania z toksyną oraz opracowanie protokołu analizy podatności limfocytów B z pełnej krwi obwodowej na działanie przeciwciała, możliwego do zastosowania w warunkach klinicznych jako testu predykcyjnego.

Rozprawa jest skonstruowana w sposób typowy, obejmuje wstęp odpowiednio określający przesłanki podjętego projektu, precyzyjne sformułowanie celów, opis materiałów i metod, wyczerpujący opis uzyskanych wyników z dobrej jakości ilustracją wykresami, tabelami i rysunkami oraz podsumowaniem każdej części wykonanych doświadczeń, dyskusję odnoszącą się do wyników badań o pokrewnej tematyce i interpretację – niekiedy hipotetyczną, wyników własnych oraz wnioski. Ponadto, rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz użytych skrótów, spis tabel i rycin, 177 pozycji piśmiennictwa, załączniki (zezwoleń na doświadczenia na zwierzętach i uchwała komisji etycznej, informację o komercyjnym substracie kompleksu) oraz informację o publikacjach i działalności naukowej autora.

W podsumowaniu recenzji, rozprawę mgr Marka Gryzika oceniam bardzo wysoko. Zawiera ona zgodne z zasadami sztuki przedstawienie oryginalnego pomysłu badawczego z perspektywą praktycznego zastosowania, oryginalne rozwiązanie i realizację założonych celów, prawidłową i przejrzystą prezentację wyników, wykazuje wiedzę teoretyczną doktoranta i potwierdza jego umiejętność prowadzenia pracy naukowej.

W mojej ocenie, rozprawa spełnia warunki określone w ustawie o stopniach i tytule naukowym etc. i uzasadnia dopuszczenie mgr Marka Gryzika do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto uważam, że praca zasługuje na wyróżnienie, ze względu na ambitny i oryginalny projekt oraz jego potencjalny wymiar praktyczny.

Recenzent



Prof. dr hab. n. med. Jan Walewski