

Dr hab. Katarzyna Piwocka
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Warszawa, 09.05.2022

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katsiaryny Marhelavy zatytułowanej
" Evaluation of the anticancer efficacy of a chimeric antigen
receptor targeting PD-L1 molecule"

Rozprawa doktorska pani mgr Katsiaryny Marhelavy przedstawia wyniki badań przeprowadzonych przez doktorantkę w Zakładzie Immunologii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem dr hab. n. med. Radosława Zagożdżona (promotor) oraz dr Małgorzaty Bajer (co-promotor).

Badania podjęte przez doktorantkę wpisują się w zakres prac prowadzonych w zespole dr Zagożdżona, dotyczących zagadnień związanych z badaniami nad zastosowaniem nowoczesnych terapii komórkowych i immunoterapii w leczeniu nowotworów. Badania realizowane przez doktorantkę były finansowane w ramach grantu OPUS Narodowego Centrum Nauki „The Evaluation of the anticancer efficacy of a new chimeric antigen receptor targeting PD-L1 molecule” No 2016/23/B/NZ6/02535.

Ostatnie lata to okres bardzo intensywnego rozwoju terapii przeciwnowotworowych opartych o genetyczną inżynierię komórek układu odpornościowego oraz immunoterapie tak, aby odblokować i uruchomić układ odpornościowy przeciw komórkom nowotworowym. W tym niezwykle obiecujące są terapie oparte o modyfikacje genetyczne limfocytów T tak, aby produkowały chimeryczne receptory antygenowe (CAR) oraz terapie uderzające w punkty kontroli układu odpornościowego. Część z tych badań zakończyła się sukcesem, wdrożeniem do badań klinicznych i w końcu zaaprobowaniem przez FDA oraz Unię Europejską schematów terapeutycznych konkretnych immunoterapii ukierunkowanych. To też jeden z bardziej obiecujących kierunków w obecnie rozwijanych kierunkach nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych. O ile terapie CAR-T są skuteczne w przypadku nowotworów krwi, o tyle ich zastosowanie w guzach litych stanowi problem. Związane jest to z bardzo złożoną strukturą samego guza oraz immunosupresyjnym mikrośrodowiskiem guza, stanowiącym barierę dla limfocytów CAR-T. Stąd konieczność intensywnych badań, które pozwolą na obejście tych przeszkód, tworzenie bardziej funkcjonalnych komórek CAR-T i nowych schematów immunoterapii, w tym terapii łączonych, i w tym obszarze porusza się doktorantka. To ważne i aktualne zagadnienia.

Założenia i Cel zostały przedstawione jasno. Doktorantka postawiła sobie za cel opracowanie i optymalizację nowej generacji komórek PD-L1-CAR-T stworzonych w macierzystym laboratorium oraz przeprowadzić serie eksperymentów in vitro weryfikujących ich działanie i eliminację komórek linii nowotworowych raka sutka z różnym poziomem PD-L1, a także zbadać ich efekt na komórki prawidłowe nienowotworowe. O ile cele szczegółowe nie budzą wątpliwości, za pewne nadużycie uważam postawienie hipotezy i stwierdzenie (występujące także w Streszczeniu), że zastosowane nowotworowe linie komórkowe zostały wykorzystane jako modele guzów litych i pozwolą na weryfikację hipotezy i ocenę wpływu na zmniejszenie masy guza. Biorąc pod uwagę znaczenie mikrośrodowiska guza, udział różnych typów komórek, w tym komórek układu odpornościowego infiltrujących guz (np. makrofagi), immunosupresję, warunki hypoksyjne, niedobory czynników wzrostowych itd. wpływające na ograniczenie skuteczności terapii komórkowych i immunoterapii, zastosowanie adherentnych linii komórkowych raczej nie pozwoli na ocenę potencjału terapeutycznego na komórki rosnące w guzach litych. Być może część założeń dotyczy grantu a część rozprawy doktorskiej, jednak nie jest to jasne. Prosiłabym doktorantkę o komentarz.

Jak już wspomniałam, tematykę podjętych badań uważam za bardzo aktualną, nowatorską i mającą dużą wartość zarówno z punktu widzenia nauk podstawowych, jak i badań o charakterze translacyjnym, mogącym przyczynić się do wprowadzenia nowoczesnych strategii terapeutycznych do badań klinicznych. Aby zrealizować założone Cele doktorantka wykorzystwała liczne metody *in vitro* z zakresu biologii molekularnej i biologii komórkowej, oraz modelowe linie komórkowe raka piersi (na podkreślenie zasługują dobrze zaplanowane i wyprowadzone samodzielne modele komórek kontrolnych – pozbawione oraz z nadekspresją PD-L1), pozwalające na realizację postawionych celów. W trakcie realizacji uzyskano cenne wyniki. Doktorantce udało się zweryfikować nową strategię modyfikacji limfocytów T konstruktami kodującymi PD-L1-CAR oraz wykazać ich zdolność do eliminacji komórek nowotworowych. Ciekawe i nowatorskie są wyniki pokazujące zdolność wygenerowanych limfocytów PD-L1-CAR-T do indukcji PD-L1 na komórkach otaczających. Jednocześnie istotna, i ważna, że została podkreślona, jest obserwacja wskazująca na dodatkowe możliwe efekty cytotoksyczne w kierunku komórek nie zmienionych nowotworowo, komórek zawierających PD-L1 na powierzchni. To cenna obserwacja o znaczeniu dla potencjalnego zastosowania tej terapii.

Szczegółowe uwagi i komentarze

Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. **Wstęp** napisany jest bardzo dobrze i zawiera dobrze dobrane informacje wystarczające do wprowadzenia czytelnika w tematykę realizowanych badań. Na podkreślenie zasługuje staranna szata graficzna oraz klarowne i dobrze zrobione ryciny.

Doktorantka przedstawiła ogólny rys stosowanych terapii przeciwnowotworowych, rozwój terapii komórkowych, kolejne generacje i rodzaje konstruktów CAR i rozwój technologii tworzenia komórek CAR-T. Z drugiej strony opisała mechanizmy wykorzystywane przez komórki nowotworowe, aby „wyłączyć” układ odpornościowy i strategie terapeutyczne mające na celu ich zahamowanie. Za bardzo ciekawe uważam z jednej strony rys historyczny i opis kolejnych etapów rozwoju, a z drugiej strony przedstawienie obecnego stanu zaawansowania klinicznego zastosowania tych bardzo perspektywicznych terapii. Osobny podrozdział poświęcony jest ograniczeniom w stosowaniu CAR-T w guzach litych oraz znaczeniu immunosupresyjnego mikrośrodowiska w hamowaniu efektywności tej terapii. Doktorantka zwróciła uwagę na znaczenie wydzielania immunosupresyjnych cytokin, unaczynienie, hypoksję, pH, samą strukturę guza oraz infiltrowanie guza i obecność i immunosupresyjnych komórek układu odpornościowego, w tym regulatorowych komórek T (Treg) oraz mieloidalnych komórek supresorowych MDSCs. Ta część ma duże znaczenie w kontekście tematyki pracy i badań prowadzonych przez doktorantkę. W końcu dużo uwagi poświęcono immunologicznym punktom kontroli i mechanizmowi PD-1/PD-L, podając występowanie i znaczenie tych receptorów w różnych typach komórek prawidłowych oraz ich funkcje w komórkach nowotworowych. W końcu przedstawiono strategię oparte o hamowanie oddziaływań PD-1–PD-L1 oraz ideę zastosowania kombinacji CAR-T z hamowaniem punktu kontroli PD-1–PD-L1, zastosowaną w rozprawie. Tak napisany Wstęp bardzo dobrze wprowadza w badania przedstawione w Rozprawie.

Metodyka. Praca jest zaawansowana technicznie, co znalazło odzwierciedlenie w szerokim spektrum stosowanych metod. Bogata metodyka zawiera opis szeregu stosowanych metod z zakresu inżynierii, klonowania, metod biologii molekularnej i komórkowej. W większości przedstawiona jest w pracy dość dokładnie.

Niestety dla części z nich nie przedstawiono danych niezbędnych dla odtworzenia metod, co mogłoby być przydatne chociażby dla kolejnych osób kontynuujących te badania. Przykładowo, dla stosowanych przeciwciał podano tylko nazwę producenta, bez numeru katalogowego oraz stosowanego klonu. Ponieważ ilości użytego przeciwciała podawano w µl, nie mając informacji na temat konkretnego produktu (i jego stężenia), nie da się tego protokołu odtworzyć. Podając ilości inhibitorów sekrecji w µl, bez podania końcowego stężenia ani numeru katalogowego, ten protokół test także nie do odtworzenia. Dla pożywki DMEM podano producenta, ale bez numeru katalogowego nie wiadomo więc który typ pożywki DMEM stosowano. Brak tych danych jest ze szkodą dla potencjalnych przyszłych czytelników rozprawy.

W opisie dotyczącym opisu modyfikowania komórek T doktorantka pisze, że zastosowano świeże lub rozmrożone PBMC. To dość istotna różnica. Prosiłabym o informacje, czy świeże vs wcześniej zamrożone komórki były stosowane zamiennie, czy do konkretnych typów eksperymentów, czy oceniano ich żywotność w całej puli oraz czy porównano żywotność i zdolność do aktywacji poszczególnych populacji.

Nie znalazłam informacji, czy i jak określano czystość izolowanej populacji komórek T.

Dla badań cytometrycznych, zwłaszcza dotyczących produkcji cytokin, który wymaga bardziej zaawansowanej metodologii cytometrycznej, zabrakło pokazania tzw. strategii bramkowania i barwień dla jednego eksperymentu przykładowego.

Nie do końca jasne są dla mnie przeprowadzone analizy ilościowe i statystyczne. Dlaczego na wykresach ilościowych zawierających wartości średnie wraz z odchyleniami SD i w niektórych przypadkach także istotnością statystyczną (p value), do analizy brano jeden reprezentatywny eksperyment? (w dużej większości to jeden z dwu przeprowadzonych eksperymentów, określając go jako reprezentatywny). Dlaczego nie analizowano ilościowo i statystycznie wszystkich danych i wszystkich doświadczeń wraz z powtórzeniami? W przypadku dwu różniących się eksperymentów, który uznawano za reprezentatywny? Proszę o komentarz i ustosunkowanie się do tej uwagi.

Uzyskane **Wyniki** przedstawiono w sposób czytelny, z dbałością o odpowiednie przedstawienie graficzne. Przeprowadzone eksperymenty są dobrze przemyślane i starannie zrealizowane. Zastosowano odpowiedni dobór linii komórkowych oraz odpowiednio zaprojektowane i stworzone przez doktorantkę linie kontrolne, pozwalające na weryfikację uzyskanych wyników. Zestaw stosowanych modeli komórkowych pozwala na wyciągnięcie wniosków.

Doktorantka po kolei opisała stworzone modelowe linie komórkowe, wprowadzanie konstruktów PD-L1-CAR do komórek T, działanie CAR-T i ocenę poziomu PD-L1, zbadała efekt działania CAR-T na komórki nowotworowe z wysokim lub niskim poziomem PD-L1 zbadała proces auto-wzmocnienia efektu działania PD-L1-CAR, poziom ekspresji PD-L1 oraz produkcję cytokin i w końcu określiła efekty cytotoksyczne na komórki oraz komórki niestransformowane. W ogólnej ocenie uzyskane wyniki są wartościowe i cenne, przyczyniają się do rozwoju tej dziedziny, produkcji nowych konstruktów CAR i wprowadzania nowych typów komórek CAR-T celujących w punkty kontrolne.

Moja zasadnicza uwaga dotycząca części wykresów słupkowych przedstawiających ilościową analizę wyników (średnia $\pm$ SD) została już częściowo opisana powyżej, przy okazji komentarzy do rozdziału Metody. Dlaczego na wykresach ilościowych nie przedstawiono średnich wartości z odchyleniami z wszystkich danych, tylko wybraną ich część i wartości średnie wraz z odchyleniami jednego wybranego/ reprezentatywnego eksperymentu (uwagi te dotyczą dużej części wykresów ilościowych, przykładowo: Rycina 34 –eksperyment wykonano 2x, każdy w trzech powtórzeniach; Na wykresie ilościowym przedstawiono dane z jednego eksperymentu; Rycina 32 – eksperyment powtórzono 3x, na wykresie ilościowym przedstawiono wyniki z jednego eksperymentu, itd). Jak już pisałam, w przypadku dwóch różniących się eksperymentów, który był reprezentatywny?

Dane przedstawione na Rycinach 25/26/27 odnoszą się do modyfikacji komórek T konstruktem PD-L1-CAR-T i pokazują cytometryczne dane i poziom PD-L1-CAR-T. Jak przedstawiała się przeżywalność komórek T po transdukcji lentiwirusem i czy przedstawione dane cytometryczne odnoszą się do populacji komórek żywych? Oraz, czy określano rozkład populacji w obrębie komórek T (CD4, CD8, komórki efektorowe, etc) w tych doświadczeniach.

Nie do końca jest dla mnie jasne, jakie dane pokazują eksperymenty przedstawione w Rozdziale 4.4.1 dotyczącym degranulacji i produkcji cytokin. Jak wyglądało barwienie cytometryczne i bramkowanie? Na jakiej podstawie ustawiano granice produkcji cytokin, czy bramkowano komórki żywe (na podstawie dodatkowego barwienia) czy wszystkie, i w końcu czy rozdzielano populacje na CD4⁺ i CD8⁺, gdyż produkcja części badanych cytokin znacznie się różni pomiędzy tymi populacjami?

Bardzo ciekawe są wyniki dotyczące auto-wzmocnienia efektów PD-L1-CAR-T i indukcji ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych (Rozdział 4.5). Wyraźny efekt powoduje kombinacja IFN γ z TNF α , natomiast stosowane osobno dają bardzo słabe efekty (IFN γ) lub w zasadzie ich brak (TNF α). Jak doktorantka tłumaczy taki addytywny mechanizm? Podobne silne efekty obserwowano po zastosowaniu supernatantu (Rycina 40). Badania zawartości wydzielanych białek w supernatancie wykazały wzmożoną produkcję wielu różnych cytokin, włączając w to TNF i IFN γ (Rycina 41). Na jakiej jednak podstawie stwierdzono, że to właśnie cytokiny prozapalne w szczególności TNF α i IFN γ są odpowiedzialne za obserwowane efekty?

Za ważną uważam też obserwację, że populacja PD-L1-CAR-T ekspresyjna PD-L1+ może być aktywnie usuwana przez PDL-1-CAR-T, co może prowadzić do selekcji frakcji PD-L1-CAR-T nie mającej ekspresji PDL-1.

Na koniec drobna, ale istotna merytorycznie uwaga: W opisie pod Tabelą 1 (str. 24) podano błędnie CD137 przy OX 40 (zamiast CD134), a z kolei przy 4-1BB podano CD134 zamiast CD137.

Dyskusja jest spójna, rzetelna i odnosi się w wyważony sposób i z wymaganą ostrożnością do uzyskanych wyników. Prawidłowo i w ciekawy sposób osadza uzyskane wyniki w najnowszych danych oraz dyskutuje ich potencjał oraz ograniczenia.

Bardzo ciekawa jest część Dyskusji poświęcona efektom na komórki z niskim poziomem PD-L1 oraz zaproponowanie zjawiska „kondycjonowania” efektów cytotoksycznych.

Jak już wspominałam, nie do końca przekonuje mnie interpretacja wyników odnosząca się do potencjalnej skuteczności w guzach litych. W mojej opinii za wcześnie na takie stwierdzenie, gdyż badania doktorantki nie zawierały żadnego układu doświadczalnego pozwalającego na ocenę elementów wpływających na ograniczenia skuteczności terapii CAR-T (układy 3D, sferoidy, hypoksja, ko-kultury z makrofagami itd).

Za wartościową uważam także część, w której doktorantka opisuje wyniki dotyczące auto-wzmocnienia efektów mogących powodować eliminację nie tylko komórek nowotworowych, ale też różnych typów immunosupresyjnych komórek mikrośrodowiska. Czy jednak nie może to też powodować niekorzystnego efektu usuwania komórek stromalnych, których eliminacja może powodować powstawanie przerzutów jak jest to np. przy chemioterapii w nowotworach piersi. Co warto podkreślić, doktorantka zwraca uwagę także na potencjalne niekorzystne efekty tego zjawiska, związane z obecnością PD-L1 na komórkach różnych narządów, mogące skutkować cytotoksycznością badanych PD-L1-CAR-T. Ta część zawiera odniesienie do konkretnych przykładów, w których zaobserwowano uszkodzenia narządów oraz cytotoksyczność, skutkujące zamknięciem badania klinicznego. Zgadzam się z doktorantką, że uzyskane wyniki sugerują konieczność dalszego zweryfikowania kwestii cytotoksyczności w kierunku komórek somatycznych i organów charakteryzujących się ekspresją PD-L1. To ważne zagadnienie i bardzo dobrze, że zostało podniesione, a ta część Dyskusji świadczy o dojrzałości i świadomości naukowej i medycznej doktorantki.

Pracę kończy Podsumowanie wyników oraz prawidłowo sformułowane Wnioski.

Po zapoznaniu się z rozprawą, chciałabym przedyskutować następujące zagadnienia:

1. Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowana strategia może mieć uboczne efekty cytotoksyczne skierowane na komórki somatyczne z ekspresją PD-L1 a tym samym atakować i niszczyć istotne organy. Zagadnienie to było poruszone w Dyskusji. Czy doktorantka może proponować lub pospekulować nad inną modyfikacją zastosowanego konstruktu lub inną strategią, która byłaby bezpieczna dla komórek prawidłowych? Czy rozważano lub próbowano podobną podwójną strategię,

ale połączenie CAR z innym receptorem/ligandem blokującym odpowiedź immunologiczną, biorąc pod uwagę dość szeroką obecność PD-L1 na komórkach somatycznych narządów ?

2. Czy weryfikowano mechanizm auto-wzmocnienia efektu komórek PD-L1-CAR-T w ko-hodowlach w obecności komórek jeszcze innego typu, np. stromalnych, epithelialnych, itd.

3. Nie do końca zgadzam się ze stwierdzeniem z Dyskusji, iż uzyskane wyniki wskazują, że zaproponowana strategia może być skuteczna w guzach litych nowotworów piersi, gdyż doktorantka nie dotknęła w swoich badaniach mechanizmów powodujących ograniczenia w efektywności tej terapii w guzach litych – takich jak struktura guza, hypoksja, immunosupresyjne mikrorodowisko, obecność komórek Treg, obecność makrofagów etc. Prosiłabym o komentarz i ew. przedstawienie eksperymentu/ów, który pozwoliłby na takie stwierdzenie.

Wniosek końcowy

Przedstawione powyżej uwagi i komentarze nie wpływają na końcową pozytywną ocenę niniejszej rozprawy. Rozprawa pani mgr Katsiaryny Marhelavy jest pracą nowatorską i wartościową, a także stanowiącą istotny krok naprzód w badaniach nad terapiami komórkowymi i immunoterapią. W pracy postawiono istotny cel, który udało się doktorantce zrealizować, a uzyskane wyniki z pewnością staną się podstawą dalszych prac ze względu na ich wartość naukową i potencjalne znaczenie translacyjne.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)” i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie mgr Katsiaryny Marhelavy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Katarzyna Piwocka