



Warszawa 04.12.2017

Prof. dr hab. Janusz Siedlecki
Zakład Onkologii Molekularnej
i Translacyjnej
Centrum Onkologii-Instytut,
ul. Wawelska 15B, 02-034 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

„Opracowanie i badanie aktywności biologicznej drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz z rodziny receptorowych czynników wzrostu fibroblastów (FGFR) jako innowacyjnych leków przeciwnowotworowych. Badanie mechanizmów oporności na inhibitory kinaz FGFR w oparciu o opracowane modele komórkowe.”

Autor: mgr Paulina Stańczak

Proces powstawania leku jest zmuśny i skomplikowany. Od wybrania celu molekularnego aż do zaliczenia czynnika terapeutycznego do panelu dostępnych środków leczniczych zwykle upływa wiele lat. W tym czasie prowadzone są zarówno badania podstawowe pozwalające na poznanie mechanizmów działania wybranego czynnika chemicznego, badania farmakokinetyczne, które pozwalają na poznanie reakcji modelowego organizmu na stosowany czynnik chemiczny oraz ustalenie dawki toksycznej i terapeutycznej podawanego środka terapeutycznego. Następnym etapem są badania kliniczne, które w kolejnych fazach pozwalają poznać reakcje ludzkiego organizmu na badany związek i większość z podstawowych objawów ubocznych. Większość, bo ponad 95% testowanych związków kończy swoją karierę najpóźniej na tym etapie. Jedynie niewielki procent badanych związków zostaje dopuszczony do badania klinicznego na dużej grupie pacjentów i gdy ten egzamin wypadnie pozytywnie specjalny urząd powtórnie ocenia przebieg całego procesu i w przypadku, gdy spełnione są wszystkie obowiązujące kryteria dopuszczenia leku do stosowania u ludzi wpisuje badany związek na listę stosowanych leków. Przedstawiona mi do recenzji praca dotyczy najwcześniejszego etapu badań nad lekiem związanego z charakterystyką

MARIA SKŁODOWSKA-CURIE MEMORIAL CANCER CENTER AND INSTITUTE OF ONCOLOGY
15B WAWELSKA STREET, 02-034 WARSAW, POLAND

Reception Phone: +48 22 546 20 00 Directorate Phone: +48 22 570 93 22 E-mail: dyrektor@coi.pl TIN: 5250008057
Reception Fax: +48 22 546 33 00 Directorate Fax: +48 22 570 94 72 Url: www.coi.pl REGON: 000288366

Mailing address: 5 W.K. Roentgena street, 02-781 Warsaw, Poland

zdolności do hamowania transmisji sygnału przez ścieżkę metaboliczną związaną z receptorem dla czynnika wzrostu fibroblastów.

Rozprawa doktorska, włącznie ze spisem literatury liczy 110 stron. Ma układ typowy dla rozpraw na stopień doktora. Składa się ze Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wprowadzenia, Celu pracy, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji i Wniosków. Całość pracy poprzedzona jest spisem stosowanych skrótów. Wykaz piśmiennictwa liczy 182 pozycje. Na podkreślenie zasługuje bardzo staranne graficzne opracowanie tekstu i bardzo mała liczba błędów literowych.

We wstępie autorka opisuje rodzinę receptorów FGFR. Rodzina ta składa się z czterech receptorów wiążących aż 22 różne ligandy. Ścieżki sygnalizacyjne regulowane przez te receptory odgrywają istotną rolę w szeregu ważnych procesach biologicznych takich jak proliferacja, różnicowanie czy apoptoza. W komórkach nowotworowych, ale również w komórkach mikrośrodowiska, często obserwuje się zarówno niekontrolowaną aktywację receptora FGFR będącą skutkiem amplifikacji genu lub mutacji aktywujących, jak i wiele aberracji prowadzących do powstawania białek fuzyjnych, alternatywnych form transkrypcyjnych receptora czy zmiany w ekspresji ligandów dla receptorów. Najczęściej uszkodzeniom ulegają FGFR1 i FGFR3, odpowiednio w 50% i 26%. Rzadziej obserwuje się zmiany w FGFR2 i FGFR 4, odpowiednio 19% i 7%. Doktorantka podkreśla, że pomimo iż zmiany w genach FGFR obserwuje się jedynie w 7% wszystkich przypadków nowotworów, to poszukiwanie specyficznych inhibitorów dla tych receptorów jest uzasadnione.

Cel pracy wypunktowany jest precyzyjnie. Głównym celem jest opracowanie i zbadanie przeciwnowotworowego działania nowych, drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz FGFR oraz zbadanie mechanizmów oporności na te inhibitory w oparciu o opracowane modele komórkowe. Autorce chodziło o wytypowanie selektywnych inhibitorów i sprawdzenie, czy i w jakim stopniu

hamują one inne szlaki regulowane przez różne kinazy i zbadanie mechanizmów oporności ujawniających się w czasie stosowania inhibitorów.

W pracy wykorzystano komercyjnie dostępne ludzkie linie komórek nowotworowych o ściśle zdefiniowanych zmianach w poziomie ekspresji różnych członków rodziny FGFR, i tak linię raka płuca H1581 cechował wzrost poziomu ekspresji FGFR1 związany z amplifikacją tego genu, a linie raka żołądka SNU16 i raka endometrium AN3CA wysoki poziom ekspresji FGFR2 związany z odpowiednio amplifikacją i mutacją aktywującą tego genu. Linia raka nerki MM-UC14 posiadała konstytutywną aktywność FGFR3. Linię raka pęcherza cechowała translokacja FGFR3 z TACC3. Pozostałe wykorzystane linie cechowały się mutacjami w innych kinazach. Doktorantka wyprowadziła też z linii raka żołądka SNU16 trzy linie odporne na drobnocząsteczkowe kontrolne inhibitory FGFR. Uzyskała także transfekowaną plazmidem zawierającym konstrukt TEL-FGFR1 limfoidalną linię myszą Ba/F3. Wszystkie wykorzystywane linie hodowano w odpowiednich warunkach temperatury, wilgotności i stężenia CO₂. Metodyka prac opisana jest w sposób wystarczający i pozwala na odtworzenie zastosowanej metody. W pracy wykorzystano dostępne komercyjnie drobnocząsteczkowe inhibitory FGFR oraz nowe inhibitory zsyntetyzowane przez Dział Chemii Medycznej firmy Celon Pharma. Aktywność badanych związków wobec całego panelu kinaz oceniano stosując test ADP-Glo Kinase Assay firmy Promega a oznaczenia ich selektywności wykonano w firmie DiscoverX metodą KINOMEscanTM.

Badania farmakokinetyczne nowych związków prowadzono na myszach Balb/c. Związek podawano doustnie, a następnie oceniano jego stężenie w osoczu. Badania wykonano w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu a oznaczenie stężenia związku w surowicy wykonano w firmie Blirt. Aktywność przeciwnowotworową oceniano na myszach SCID, którym podskórnie wszczepiono komórki linii H1581. Objętość guza mierzono w trakcie terapii. Zebrane dane poddano analizie statystycznej.

Na podstawie analizy biblioteki Celon Pharma zsyntetyzowano panel inhibitorów FGFR. Wykorzystując program komputerowy dokujący strukturę inhibitora w znanej strukturze FGFR wybrano 29 związków, które poddano dalszym analizom w celu ustalenia nie tylko ich aktywności hamującej względem aktywności kinazującej FGFR1, 2 i 3, ale także innych kinaz. Spośród badanych inhibitorów 28% wykazywało IC_{50} poniżej 1 nM dla kinazy FGFR2, a wartości IC_{50} mniejsze niż 10 nM dla kinaz FGFR1, 2 i 3 odpowiednio dla 59%, 76% i 21% inhibitorów. Oznaczone wartości były podobne do tych uzyskanych dla inhibitora referencyjnego jakim był AZD 4547. Selektywność badanych inhibitorów była podobna, a dla niektórych związków nawet wyższa, niż ta jaką miał inhibitor referencyjny. Dodatkowo 24 związki, których IC_{50} było poniżej 40nM dla FGFR2 były przetestowane pod kątem hamowania aktywności fosforylującej na ustalonym w Celon Pharma panelu kinaz. Wyniki potwierdzały wysoką selektywność badanych inhibitorów w stosunku do rodziny FGFR w tym szczególnie wobec FGFR2.

W kolejnym etapie aktywność nowych inhibitorów doktorantka badała na liniach komórkowych zależnych i niezależnych od szlaku FGFR. W tym celu w pierwszym rzędzie wykorzystwała mysią linię Ba/F3 stransformowaną konstruktem zawierającym gen fuzyjny TEL/FGFR1. Dla wszystkich badanych związków uzyskano wartości IC_{50} w zakresie od 0,203 do 4,256 μ M, w tym dla 57% związków IC_{50} nie przekroczyło 1 μ M. Ten wynik potwierdzał wysoką wrażliwość otrzymanej linii komórkowej na działanie inhibitorów FGFR.

Do dalszych badań wybrano 21 związków. Analiza żywotności komórek przeprowadzona na linii potrójnie ujemnego raka piersi z charakterystyczną amplifikacją genu FGFR wykazała małą wrażliwość nawet na referencyjny inhibitor. W tych warunkach do dalszych badań wybrano jedynie 7 spośród 21 związków wykazujących najniższe IC_{50} . W kolejnym etapie efekt hamujący badano z wykorzystaniem linii raka płuca H1581 (linia z mutacją aktywującą FGFR1). IC_{50} poniżej 1 μ M wykazało 33% badanych związków, podobny procent inhibitorów miał IC_{50} w zakresie między 1 a 2 μ M a IC_{50} powyżej 2 μ M pozostała jedna trzecia inhibitorów. Pięćdziesięcioprocentowe

zahamowanie wzrostu dla inhibitora referencyjnego obserwowano przy stężeniu 1,5 μM . Podobna analiza przeprowadzona dla wszystkich 21 związków na liniach zależnych od FGFR2 wykazała, że aż 50% związków hamuje wzrost tych linii w stężeniu poniżej 1 μM i na liniach zależnych od FGFR3 ponad 50-cio procentowe hamowanie wzrostu obserwowano w zakresie stężeń badanych inhibitorów od 0,3 do 4,2 μM . Doktorantka zaobserwowała też, że wzrost komórek SNU16 był niezależny od stężenia w zakresie od 0,156 aż do 6 μM . Selektowność inhibitorów potwierdzono wykorzystując linie uzależnione od innych szlaków sygnalizacyjnych. Wszystkie badane inhibitory wykazywały IC_{50} dla innych kinaz znacząco wyższe niż te dla inhibicji rodziny FGFR. Bazując na posiadanych danych doktorantka wybrała 6 związków wykazujących niskie wartości IC_{50} , czyli największe zdolności do hamowania fosforylacji przez poszczególnych członków rodziny FGFR.

Te sześć związków poddano badaniom na zwierzętach. We współpracy z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN wybrane inhibitory podawano doustnie myszom w ustalonych dawkach, a następnie oznaczano poziom związku w surowicy wyizolowanej z krwi pobranej od tych zwierząt w określonych przedziałach czasowych. Wszystkie badane inhibitory osiągały maksymalne stężenie po godzinie od podania. Stężenie inhibitora spadało w czasie i było znacząco niższe po 6 godzinach. Ten eksperyment pozwolił autorce na dalszą selekcję inhibitorów. Do dalszej charakterystyki autorka wybrała trzy związki, które osiągały najlepsze parametry farmakokinetyczne. Kolejną selekcję doktorantka przeprowadziła wykorzystując model ksenograftów. Myszom SCID wstrzyknięto podskórną linię raka żołądka SNU16 aby następnie zbadać wpływ podawania inhibitorów na wielkość guza. Najsilniejszy inhibitor (CPL-8) wybrano do dalszych badań. Porównano w nich zarówno poziom fosforylacji białek za pośrednictwem szlaku regulowanego przez rodzinę receptorów FGFR po dodaniu inhibitora referencyjnego i CPL-8 oraz selektowność inhibitora w stosunku do panelu 100 kinaz. Doktorantka wykazała, że oba inhibitory cechuje podobny profil aktywności i selektowności. Te dane sugerują, że oba inhibitory, badany i referencyjny, wiążą się w podobnych miejscach domeny kinazującej FGFR. W badaniach

na zwierzętach podawanie inhibitora referencyjnego i CPL-8 wywierało podobny skutek. Oba inhibitory, w podawanych dawkach, wykazywały też brak istotnego działania toksycznego.

Badanie mechanizmu oporności doktorantka wykonała na linii SNU-16 z wyindukowaną opornością na referencyjne inhibitory aktywności kinazującej FGFR. Autorka wykazała brak aktywności i ekspresji receptora FGFR. Mimo to obserwowała fosforylację kinaz, które w warunkach braku oporności były fosforylowane przez aktywność kinazującą FGFR. Te dane jednoznacznie wskazywały, że odporne komórki uruchomiły alternatywny szlak sygnalizacyjny. Dodatkowo autorka, z użyciem komercyjnego testu immunologicznego który umożliwiał detekcję 28 kinaz i 11 białek, elementów różnych szlaków sygnalizacyjnych, wykazała różnice w poziomie fosforylacji pomiędzy oporną i wyjściową linią komórkową. Poza zmianami w aktywności białek doktorantka obserwowała również zmiany w morfologii linii odpornej w stosunku do linii wyjściowej. Zmiany te były charakterystyczne dla przejścia (tranzycji) epitelialno-mezenchymalnego. Komórki linii odpornej wykazywały zwiększoną ekspresję białek charakterystycznych dla fenotypu mezenchymalnego i spadek ekspresji białek charakterystycznych dla fenotypu epitelialnego.

Aby zbadać, czy możliwe jest przełamanie oporności na inhibitory FGFR linia oporna inkubowana była z panelem niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz. Doktorantka wykazała, że spośród kilku inhibitorów, które hamowały proces fosforylacji przez alternatywne kinazy najlepsze parametry farmakokinetyczne wykazywał mubrutinib. Autorka obserwowała przy niskich wartościach IC_{50} hamowanie fosforylacji kinazy ERK. Jednak nie zaobserwowała odwrócenia fenotypu.

Dyskusja poprowadzona na 13 stronach maszynopisu ma bardzo wnikliwy charakter. Otrzymane wyniki porównano z danymi literaturowymi. Wykazano dużą zgodność we właściwościach inhibitora CPL-8 z inhibitorem referencyjnym. Podkreślono także, że CPL-8 wykazuje większą specyficzność w stosunku do rodziny kinaz FGFR, w tym szczególnie do FGFR2

niż do większości innych kinaz sygnalizacyjnych Doktorantka podkreśla, że pojawienie się oporności wtórnej jest wynikiem przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Moim zdaniem nie ma w tej pracy wystarczających dowodów na postawienie tak kategorycznej tezy. Sugerowałbym raczej stwierdzenie, że mechanizm oporności wtórnej jest związany z ujawnieniem się w linii SNU16R cech mezenchymalnych związanych z długotrwałą hodowlą linii SNU16 w warunkach obecności wzrastającego stężenia inhibitora CPL-8. Trochę brak mi też informacji o oporności pierwotnej, ale to jest jedyne moje zastrzeżenie do tego doktoratu.

Całość pracy kończy się czterema wnioskami, z których tak naprawdę istotny jest wniosek pierwszy. Trzy pozostałe są jedynie jego rozwinięciem.

Podsumowując, uważam, że mgr Paulina Stańczak osiągnęła stawiane sobie cele. Wykonała ogromną liczbę eksperymentów aby wykazać, że opracowany inhibitor może być przydatny w leczeniu nowotworów, w których uszkodzeniu uległ szlak związany z receptorem z rodziny fibroblastycznych kinaz tyrozynowych. Trzeba jednak pamiętać, że wykonana przez Panią Stańczak praca jest jedynie wstępem do badań, które muszą teraz być wykonane aby wybrany inhibitor trafił jako lek celowany do panelu środków wykorzystywanych w terapii człowieka. Jednak wyniki tych wstępnych badań stwarzają realne nadzieje, że w przyszłości CPL-8 będzie mógł spełnić pokładane w nim nadzieje. Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie autorki pracy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

p.o. KIEROWNIKA
Zakładu Onkologii
Molekularnej i Translacyjnej
Prof. dr hab. n. med. Janusz A. Siedlecki