



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirszfelda
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 fax: (+48-71) 337 21 71
<http://www.iitd.pan.wroc.pl>

Wrocław, 4.01.2016 r.

Ocena

**rozprawy doktorskiej mgr Anny Marii Serwotki-Suszczak
z Zakładu Inżynierii Białka Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
pt. „Koniugaty białek wiążących integrynę $\alpha_v\beta_3$ i HER2 do wykorzystania
w terapiach przeciwnowotworowych”**

Jednym z najczęściej stosowanych rodzajów leczenia nowotworów jest chemioterapia. Leczenie to uszkadza zarówno komórki zdrowe jak i komórki nowotworowe, co skutkuje wystąpieniem szeregu działań niepożądanych. Ostatnio dużo uwagi poświęca się badaniom mającym na celu polepszenie skuteczności chemioterapii i zmniejszenie związanych z nią działań niepożądanych. Dużym postępem w tej dziedzinie było zastosowanie różnego typu nośników leków. Zadaniem nośników jest dostarczenie leków o dużym stężeniu do komórek nowotworowych przy jednoczesnym zmniejszeniu toksyczności ogólnoustrojowej. Prowadzone są liczne badania mające na celu otrzymanie nośnika, który charakteryzowałby się wysoką selektywnością z jednocześnie niską immunogennością. Warunkiem powodzenia leczenia ukierunkowanego molekularnie jest zdefiniowanie właściwego „celu molekularnego”, dobranie odpowiedniego leku aktywnego wobec określonego „celu” oraz wyselekcjonowanie grupy chorych, która odnosi korzyści z leczenia.

Wprowadzenie do terapii leków ukierunkowanych na cele molekularne przyczyniło się do poprawy wyników leczenia wielu schorzeń. Niezwykle obiecujące wydaje się użycie jako nośników przeciwciał monoklonalnych połączonych z silnymi cytostatykami w postaci tzw. ADC (koniugaty przeciwciało-lek; antibody-drug conjugate).

Celem pracy doktorskiej było zaprojektowanie dwóch koniugatów, w których przeciwciała zastąpione zostały białkami o podobnych właściwościach, różniące się jednak rozmiarem i stopniem skomplikowania struktury, ich charakterystyka i ocena potencjału cytotoksycznego.

1. Koniugat białka diaffibody (utworzonego przez fuzję dwóch białek affibody wiążących receptor HER2) połączonego z cytostatykiem monometyloaurystatyną E za pomocą łącznika walinowo-cytrulinowego. Duplikacji białka affibody dokonano, aby zwiększyć masę białka w celu wyeliminowania trudności związanych z możliwym szybkim klirensenem nerkowym.
2. Koniugat białka scFv wiążącego integrynę $\alpha_v\beta_3$ połączonego z cytostatykiem monometyloaurystatyną E za pomocą łącznika walinowo-cytrulinowego.

Zabieg wykorzystania białek o takich cechach miał na celu ograniczenie wad ADC wynikających z obecności przeciwciał, zmniejszenie kosztów i ułatwienie produkcji.

Receptor HER2 występuje na powierzchni zdrowych komórek, ale w przypadku niektórych nowotworów, w tym w 25–30% raków piersi, dochodzi do jego nadekspresji. Cecha ta wiąże się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby i gorszym rokowaniem.

Integryny odgrywają dużą rolę w progresji nowotworu, promując wzrost guza pierwotnego. Ich udział w wewnątrzkomórkowym mechanizmie transdukcji sygnału ma wpływ na zdolność migracji komórek nowotworowych przez ścianę naczyń i umożliwia powstawanie narządowo-specyficznych przerzutów. Stymulują również proces angiogenezy.

Obserwowane w wielu nowotworach złośliwych zaburzenia ekspresji integryn związane są z gorszym przebiegiem choroby, szybszym powstawaniem przerzutów i złym rokowaniem. Wstępne doniesienia wskazują na skuteczność inhibitorów integryn w terapii nowotworów i mogą one posłużyć jako ich markery oraz pozwalają też ocenić ryzyko nawrotu choroby i powstawania przerzutów.

Temat pracy doktorskiej jest niezmiernie aktualny o dużych implikacjach klinicznych. We Wstępie Doktorantka opisuje zasady stosowania terapii celowanych w schorzeniach nowotworowych, w tym związków niskocząsteczkowych oraz przeciwciał monoklonalnych. Dodatkowo omawia koniugaty przeciwciał monoklonalnych z cytostatykami oraz ich zastosowanie kliniczne. W tym rozdziale szeroko omawia mechanizmy działania tych koniugatów i sposoby koniugacji leków do przeciwciał, w tym przy pomocy łączników pH-labilnych, łączników wrażliwych na redukcję, łączników hydrolizowanych enzymatycznie oraz problemy związane z ich produkcją i wywoływaniem działaniami niepożądanymi. Kolejno bardzo dokładnie omawia białka alternatywne do przeciwciał, w tym szczególnie dokładnie te, które zostały wykorzystane w pracy doktorskiej – affibody i scFv. Opisuje białka affibody zaprojektowane na podstawie sekwencji

stabilnej domeny A białka A pochodzącego z bakterii *Staphylococcus aureus* oraz białka scFv zawierające tę część przeciwciała, która odpowiada za rozpoznanie i wiązanie antygeny. Kolejny rozdział poświęcony jest markerom nowotworowym i ich zastosowaniu klinicznemu. Następnie Doktorantka omawia dokładnie markery nowotworowe wykorzystane w rozprawie doktorskiej: receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2).

Całość Wstępu napisana jest rzeczowo i przejrzysto. Wstęp stanowi bardzo dobre, w pełni wyczerpujące wprowadzenie do badań własnych Doktorantki. Jako model do badania zaprojektowano dwa koniugaty cytostatyków z białkami analogicznymi do przeciwciał o potencjalnym zastosowaniu w terapiach przeciwnowotworowych.

Doktorantka zaprojektowała dwa koniugaty białek – diaffibody anti-HER2 oraz scFv anti-integryna $\alpha_v\beta_3$ – z lekiem monometyloaurystatyną E (MMAE – monometyloaurystatyna E), bardzo silnym syntetycznym cytostatykiem, będącym pochodną peptydów występujących naturalnie w ślimaku morskim *Dolabella auricularia*, hamującym podziały komórek poprzez blokowanie polimeryzacji tubuliny.

Dokonano wyboru odpowiednich modeli komórkowych charakteryzujących się nadprodukcją HER2 oraz integryny $\alpha_v\beta_3$ oraz modeli kontrolnych pozbawionych tych receptorów. Doboru linii komórkowych dokonano poprzez analizę literatury, a następnie potwierdzono z użyciem metod fluorescencyjnych, mikroskopii oraz cytometrii przepływowej, a także z użyciem techniki Western Blotting.

W ramach pracy zaprojektowano oraz uzyskano i oczyszczono białka, diaffibody anti-HER2 oraz scFv anti-integryna $\alpha_v\beta_3$, oraz wykonano ich charakterystykę biofizyczną mającą na celu głównie zbadanie ich oddziaływania z ligandami. W kolejnym etapie białka poddano koniugacji z cytostatykiem monometyloaurystatyną E, a następnie wykonano charakterystykę biofizyczną otrzymanych koniugatów.

Kolejno przygotowane koniugaty analizowano pod kątem ich potencjału przeciwnowotworowego. Wykonano analizę ich wpływu na żywotność komórek nowotworowych charakteryzujących się nadprodukcją liganda względem komórek kontrolnych. W przypadku koniugatu diaffibody anti-HER2-MMAE wykazano stosunkowo wysoką cytotoksyczność, powodującą spadek żywotności komórek HER2-pozytywnych nawet do 10% oraz wyznaczono współczynnik IC_{50} w zakresie 1-10 nM w zależności od linii komórkowej. Słabsze wyniki uzyskano dla koniugatu scFv anti-integryna $\alpha_v\beta_3$ -MMAE, wywołującego spadek żywotności komórek zawierających integrynę $\alpha_v\beta_3$ maksymalnie do 20%, jednak przy zastosowaniu stosunkowo wysokich stężeń. Współczynnik IC_{50} wyznaczony dla tego koniugatu wyniósł 115 nM.

Otrzymane w ramach pracy koniugaty wykazały potencjał do zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych.

Metody badawcze są adekwatne do zaplanowanych badań. Wszystkie metody badawcze zostały opisane bardzo szczegółowo. Zwraca uwagę nowoczesna metodologia. Cały rozdział obrazuje ogrom pracy, który Doktorantka musiała włożyć podczas wykonywania badań oraz wskazuje na bardzo wysoki poziom warsztatu badawczego, w którym praca ta została wykonana. Wyniki pracy zostały opracowane starannie i jasno przedstawione w postaci tabelarycznej i na rycinach.

W Dyskusji Autorka wykazała, że jest świetnie obeznana z piśmiennictwem, które jest aktualne i starannie dobrane oraz że potrafi interpretować własne wyniki w świetle innych doniesień. Dyskusja jest obszerna i wyczerpująca. Drobne uwagi zaznaczyłam w tekście Rozprawy. Całość Rozprawy kończy podsumowanie, w którym Autorka stwierdza, że uzyskane koniugaty cytostatyków z białkami oddziałującymi z markerami nowotworowymi charakteryzują się wysoką cytotoksycznością. Do oceny możliwości zastosowania ich w terapiach przeciwnowotworowych niezbędna byłaby dalsza analiza ich skuteczności i specyficzności z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, a następnie w badaniach klinicznych.

Reasumując uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Marii Serwotki-Suszczak ma charakter poznawczy i duże implikacje kliniczne. Zakres wykonanych badań przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Praca posiada prawidłowy układ i strukturę podziału treści. Uzyskane wyniki mają oryginalny charakter i stanowią podstawę do dalszych badań. Autorka wykazała szeroką wiedzę teoretyczną oraz opanowanie nowoczesnych, skomplikowanych technik laboratoryjnych. Ze względu na bardzo wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań, niezwykle staranną redakcją pracy mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego wysoce pozytywną recenzję pracy z wnioskiem o dopuszczenie mgr Anny Marii Serwotki-Suszczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie tej rozprawy.

prof. dr hab. Irena Frydecka
specj. chorób wewnętrznych
i hematologii
51-602 Wrocław, ul. Kochanowskiego 3
tel. 661317832 8621490 980114523