



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej
kierownik: prof. dr hab. Andrzej Gamian

Prof. dr hab. Andrzej Gamian
ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław
tel. (071)7841370, 7840084, fax: 7840085
e-mail: andrzej.gamian@umed.wroc.pl; <http://www.am.wroc.pl>

Wrocław, 13.01.2016r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Serwotki-Suszczak pt. „Koniugaty białek wiążących integralną $\alpha_v\beta_3$ i HER2 do wykorzystania w terapiach nowotworowych” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Otlewskiego

Praca dotyczy badań nad chemioterapeutykami przeciwnowotworowymi, zastosowania inżynierii białek do otrzymania nowych cytostatyków. Badania nad przygotowaniem koniugatów o zwiększonej specyficzności wobec komórek nowotworowych do terapii celowanej mają na celu polepszenie skuteczności leczenia i obniżenie skutków ubocznych. Do badań wybrano dwa białka o właściwościach podobnych do przeciwciał, o niskiej masie cząsteczkowej, diaffibody anty-HER2 oraz scFv anty-integryna $\alpha_v\beta_3$, związane z lekiem MMAE, syntetycznym cytostatykiem, pochodną naturalnego peptydu. Podjęty problem jest umiejscowiony w jednym z najważniejszych nurtów nauki światowej, ukierunkowanej na tkankę nowotworową terapii celowanej. W tym też celu wciąż poszukuje się wysoce specyficznych markerów nowotworowych. Są to istotne zagadnienia biologii eksperymentalnej i medycyny mające na celu ograniczenie zgonów wywołanych przez choroby nowotworowe. Praca ma szerokie znaczenie biologiczne, a wyniki mogą znaleźć wykorzystanie praktyczne w opracowywaniu nowych leków. Podjęty w tej pracy problem jest kontynuacją programu realizowanego w Zakładzie Inżynierii Białka na Wydziale Biotechnologicznym Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, jest podzielona na rozdziały, na początku umieszczono wykaz skrótów, wstęp, następnie cel pracy, część metodyczną, wyniki i dyskusję z podsumowaniem, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa, rycin, tabel i dorobku naukowego. Praca zawiera 138 stron maszynopisu wraz z 53 rysunkami i 8

tabelami, cytowanymi 272 pozycjami piśmiennictwa głównie (72%) z ostatniej dekady. We wstępie do rozprawy autorka umiejętnie wprowadza w tematykę, bez zbędnej rozbudowy, kompilacji, uzasadnia logicznie temat i cel badań, wprowadza do tematyki nowotworów, ich epidemiologii i od razu przechodzi do omówienia terapii celowanej przy pomocy związków niskocząsteczkowych, przeciwciał monoklonalnych i ich koniugatów z cytostatykami. Przybliża kwestie samego cytostatyku w koniugacie, rodzajów łączników i sposobów koniugacji, by poddać krytyce przeciwciała monoklonalne w tych zastosowaniach i przejść do omawiania alternatywnych do przeciwciał białek, jak affibody i różne fragmenty przeciwciał. Osobny rozdział poświęcono markerom nowotworowym, jako celom terapeutycznym dla koniugatów z lekiem, ale też jako cząsteczkom o znaczeniu predykcyjnym do oceny ryzyka zachorowania, diagnostyki rokowniczej i monitorowania postępu leczenia, dalej do omówienia receptora naskórkowego czynnika wzrostu HER2 i integryny $\alpha_v\beta_3$, użytych w pracy. Taka konstrukcja wstępu pozwoliła autorce na konkretne ujęcie w jednym zdaniu celu badań, zaprojektowania i otrzymania dwóch koniugatów białka z lekiem.

W części metodycznej opisano modele i procedury postępowania z komórkami, cytometrię przepływową, mikroskopię fluorescencyjną, powierzchniowy rezonans plazmonowy, immunobloting, wprowadzoną technikę oznaczania żywotności komórek przez pomiar ich impedancji. Dalej autorka opisuje ekspresję i oczyszczanie białka diaffibody anti-HER2, przygotowanie koniugatów najpierw z 5-jodoamidofluoresceiną, potem z lekiem monometyloaurystatyną, oddziaływania z ligandem, termostabilność, cytotoksyczność. Takie samo postępowanie zastosowano w przypadku konstruktu anti-integrynowego. Do oceny wyników użyto analizy statystycznej. Zestaw metod jest szeroki, dobrze opisanych, co ważne, każdą procedurę poprzedza zdanie wstępne o metodzie i celowości jej użycia, przez co rozdział jak też cała praca, jest ciekawym, logicznym, jednolitym wywodem.

Autorka otrzymała dwa koniugaty, diaffibody anti-HER2 i scFv anti-integryna $\alpha_v\beta_3$, każdy z nich związany z lekiem MMAE, bądź ze znacznikiem fluorescencyjnym. Wszystkie produkty okazały się aktywne, wiążąc się do receptorów. Autorka wykazała wysoką cytotoksyczność koniugatu anti-HER2-MMAE, obniżającego żywotność komórek HER2 pozytywnych do 10%. Wyznaczony współczynnik IC_{50} wynosił 1-10 nM w zależności od linii komórkowej. Drugi koniugat anti-integrynowy był mniej cytotoksyczny, obniżał żywotność do 20% komórek zawierających integrynę $\alpha_v\beta_3$, przy stosunkowo wysokim stężeniu IC_{50} wynoszącym 115 nM. Wyniki mają wartość podstawową i praktyczną w zakresie nowych dróg konstrukcji koniugatów, cytostatyków z nośnikami docelowymi, ale także dostarczają nowych

produktów do chemioterapii. Są to gotowe związki do dalszych badań na zwierzętach i w testach klinicznych. Mniejsza aktywność koniugatu anty-integrynowego może wynikać z większej powszechności integryn w tkankach. Interesującą i cenną informacją jest wykazanie obecności, chociaż w mniejszej ilości, receptora HER2 na komórkach T-47D ludzkiego raka śródprzewodowego sutka. Ważne jest także porównanie metody MTT i techniki pomiaru impedancji do określania wzrostu komórek. Interesującymi danymi referencyjnymi okazały się wyniki z użyciem linii U-87 MG techniką pomiaru impedancji (ACEAxCELLigence) i w metodzie MTT, gdy okazało się, że technika pomiaru oporności elektrycznej nie nadawała się do tej linii komórkowej, co ma znaczenie dla szerszego zastosowania tej metody. Innym wkładem jest opracowanie buforu na bazie PBS z dodatkiem glicerolu, sacharozy i reduktanta TCEP dla polepszenia rozpuszczalności produktu w *E. coli*. Pytanie tutaj miałbym do doktorantki o warunki użycia tego odczynnika, gdyż nie mogłem ich znaleźć w pracy, a należy się spodziewać jego szerszego zastosowania.

Dyskusja jest bardzo dobrze przeprowadzona, doświadczenia są omówione pod względem trudności technicznych, co dostarcza wiele cennych informacji. Autorka umiejętnie podsumowuje uzyskane wyniki, w odniesieniu do piśmiennictwa. Tutaj należy podkreślić, że autorka jako pierwsza otrzymała białko diafibody z podwojenia białka afibody krótkim łącznikiem z kwasu glutaminowego i z miejscem koniugacji cytostatyku w postaci trzech reszt cysteiny, co razem pozwala na przekroczenie granicy klirensu nerkowego.

Odnosnie uwag krytycznych dotyczą one strony redakcyjnej i to zaledwie kilku punktów. Pozycje piśmiennictwa 101, 103, 106, są podane bez rocznika. PBS to roztwór soli fizjologicznej jako pierwszej funkcji tego roztworu, jej zbuforowany roztwór, raczej niż bufor PBS, co zapisano w wersji angielskiej, a w tekście używa się jako bufor PBS. Odnosnie mediów, istnieje przyjęty termin pożywka. Na str 41 i dalej w tekście używane określenia poliklonalne przeciwciała anty-mysie skoniugowane jest niewystarczającym opisem, należy podawać swoistość tych przeciwciał. Można zastąpić ON str. 49 przez PN i RT na str. 54 przez TP. Co do Western blottingu wydaje się, że lepsze byłoby określenie Western blotting lub immunoblotting, tak jak lektynoblotting, czy afibodyblotting, jako grupa podobnych metod. Na str. 41 wzorce masy cząsteczkowej zamiast wzorce masy, na str. 106 fenylo-Sepharose. Podsumowując, należy podkreślić że nie mam uwag krytycznych do pracy o dużej wartości, dobrze zaplanowanej i wykonanej. Wyniki przedstawiają cenne dane, które stanowią podstawę do dalszych badań. Praca jest oryginalnym wkładem w zakresie nauki podstawowej o potencjalnym znaczeniu praktycznym na polu biomedycznym, przyczynia się do istotnego

poszerzenia wiedzy o konstrukcji docelowych cytostatyków. Autorka wykazała się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Anny Serwotki-Suszczak spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnioskuje do Rady Wydziału Biotechnologicznego Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Anny Serwotki-Suszczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pozwalam sobie również złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej oraz napisanie całej rozprawy.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII LEKARSKIEJ
kierownik
Andrzej Gamian
Prof. dr hab. Andrzej Gamian