



Dr hab. Marcin Czerwiński

Wrocław, 30.08.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Borek

"Selekcja, optymalizacja i charakterystyka fragmentów przeciwciała scFv i scFv-Fc anty-FGFR2 oraz ich koniugatów z cytostatykami"

Receptor 2 czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR2), należący do rodziny receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych, odgrywa istotną rolę w procesach życiowych komórki. Po związaniu liganda, FGFR2 aktywuje szlaki sygnałowe regulujące kluczowe procesy życiowe, takie jak różnicowanie, podziały komórkowe i migrację. Zmiany w regulacji aktywności tego białka mogą powodować zaburzenia rozwoju, a także procesy nowotworowe. Z drugiej strony, terapeutyczne przeciwciała monoklonalne oraz ich koniugaty z cytostatykami stanowią najszybciej rosnącą grupę leków we współczesnej medycynie. Poszukiwanie nowych przeciwciał monoklonalnych swoistych wobec FGFR2 oraz konstruowanie koniugatów takich przeciwciał z cytostatykami stanowi w związku z tym bardzo ciekawy projekt badawczy. Co prawda otrzymano już takie przeciwciała, i są one w różnych fazach badań klinicznych, ale zawsze istnieje możliwość otrzymania nowego przeciwciała o wysokiej swoistości. Dlatego zadanie, którego podjęła się Doktorantka, uważam za ważne i ciekawe.

Oceniana praca ma układ przyjęty dla tego typu opracowań. We Wstępie Doktorantka, wykazując się bardzo dobrą znajomością tematu, omówiła metody otrzymywania rekombinowanych fragmentów przeciwciał ze szczególnym uwzględnieniem przeciwciał terapeutycznych oraz ich koniugatów. Autorka przedstawiła metody selekcji fagowej oraz metody otrzymywania rekombinowanych przeciwciał za pomocą randomizacji regionów hiperzmiennych. Duża część tego rozdziału poświęcona jest koniugatom fragmentów przeciwciał z cytostatykami.

W drugiej części Wstępu Autorka omówiła budowę i funkcję receptora 2 czynnika wzrostu fibroblastów, i temat ten potraktowała dość powierzchownie. Brakuje schematu budowy białka (które Autorka opisuje), niewiele też dowiadujemy się na temat roli FGFR2 w nowotworach, przy czym Doktorantka używa niefortunnych sformułowań jak „nieprawidłowa

ekspresja receptorów FGFR”. Uważam, że w rozdziale tym powinno znaleźć się bardziej szczegółowe omówienie mutacji związanych z FGFR2 wraz z przedstawieniem ich fizjologicznego znaczenia, tak jak np. w publikacji Hugsten i Więdłocha, *Mol. Cancer Res.* 2010, 8: 1439. Na zakończenie rozdziału Autorka opisuje stosowane dotychczas strategie terapeutyczne w nowotworach ze zmienioną ekspresją FGFR2 (tytuł tego rozdziału jest też niezbyt szczęśliwy: „Obecnie stosowane strategie terapeutyczne wobec FGFR2”).

Celem pracy było, jak pisze Autorka, opracowanie (chyba: otrzymanie?) fragmentów przeciwciał specyficznych (raczej: swoistych) wobec zewnątrzkomórkowej domeny receptora FGFR2 oraz zaprojektowanie koniugatów przeciwciała z cytostatykiem o zastosowaniu przeciwnowotworowym wobec różnych typów nowotworów charakteryzujących się nadprodukcją FGFR2, ich charakterystyka (nowotworów czy koniugatów?) oraz ocena ich potencjału cytotoksycznego.

W rozdziale Materiały i Metody przedstawiono metody, jakimi posługiwała się Autorka. Były to: nadprodukcja białka FGFR2 w komórkach CHO-S z użyciem wektora pLev, oczyszczanie i biotynylacja tego białka, a także selekcja fragmentów scFv z gotowych bibliotek Tomlinson I oraz J, charakterystyka tych fragmentów za pomocą testu ELISA i SPR, randomizacja regionów hiperzmiennych, otrzymywanie fragmentów scFv7 w wersji dimerycznej i w połączeniu z fragmentem Fc. Autorka opisała również metody hodowli komórek nowotworowych używanych w badaniach oraz testy cytotoksyczności stosowane do ewaluacji wybranych koniugatów.

W rozdziale Wyniki opisano realizację poszczególnych zadań badawczych. Autorka opisuje otrzymanie rekombinowanych białek FGFR2 i Fc oraz ich analizę za pomocą spektrometrii mas. Przygotowanie plazmidu ekspresyjnego oraz jego mapa powinny raczej znaleźć się w Metodach lub Załączniku. Następnie Doktorantka opisuje selekcję biblioteki scFv oraz analizę pozytywnych klonów za pomocą testów ELISA i SPR. O ile testy SPT zostały pokazane, to wyniki testów ELISA zostały zaprezentowane w postaci słupków (po jednym dla każdego klonu). Uważam, że Autorka powinna pokazać raczej wykresy absorbancji w funkcji stężenia scFv (przynajmniej dla wybranych klonów).

Autorka wybrała pięć najlepiej reagujących fragmentów scFv, oczyściła je i scharakteryzowała, wykazując, że najwyższe powinowactwo wobec FGFR2 ma fragment F7 ($K_D=37$ nM). Posłużył on Doktorantce do stworzenia biblioteki drugiej generacji metodą randomizacji regionów hiperzmiennych łańcucha ciężkiego i lekkiego, z której Autorka wyselekcjonowała kilka klonów, w tym klon scFvF7-H10 o $K_D=56$ nM. Wielkość ta jest jednak wyższa niż K_D wyjściowego fragmentu scFv, tak więc nie można powiedzieć, że ten cykl

eksperymentów zakończył się sukcesem. Dlaczego tak się stało? Będę wdzięczny za przedyskutowanie tej kwestii.

Autorka następnie otrzymała fragment scFvF7 w formie dwuwartościowym (jako diabody) i w postaci białka fuzyjnego z fragmentem Fc, oraz otrzymała koniugaty tych cząsteczek z monometyloarystatyną E. Aktywność przeciwnowotworowa tych preparatów została sprawdzona za pomocą testów cytotoksyczności z użyciem trzech linii komórkowych: U2OSR2 (komórki kostniakomięsaka stabilnie transfekowane plazmidem kodujących, receptor FGFR2), Snu-16 (komórki raka żołądka) i NCI-H716 (komórki raka jelita grubego). Komórki tych linii produkowały FGFR2, a wybrano je, ponieważ mogą w przyszłości posłużyć do stworzenia modeli ksenoprzeszczepu raka żołądka oraz raka jelita grubego. Do badania wrażliwości komórek na koniugaty scFvF7 z monometyloaurystatyną wykorzystano test Alamar Blue; Autorka wykazała, że cytotoksyczność badanych związków była wyższa wobec komórek FGFR2-dodatnich, niż w wobec komórek nie produkujących tego białka. Doktorantka wykazała, że najbardziej wrażliwe na koniugaty są komórki linii Snu-16: obniżenie żywotności do 10% jest powodowane przez scFv-Fc-MMAE w stężeniu 9 nM, podczas gdy dla komórek linii NCI-H716 wielkość ta wynosi 90 nM. Jest to interesujące, ponieważ Autorka wykazuje, że poziom FGF2 w komórkach tej linii jest taki sam. Jaka może być przyczyna tego zjawiska?

Dyskusja liczy 10 stron i zawiera liczne podrozdziały takie jak „Modele komórkowe” czy „Analiza preparatów mikroskopowych barwionych fragmentem przeciwciała scFvF7-Fc”, które moim zdaniem nie powinny się znaleźć w tej części pracy doktorskiej. Stosunkowo niewiele uwagi poświęca Autorka omówieniu mechanizmów działania cytotoksycznych koniugatów; brakuje mi jednoznacznych wniosków na temat cytotoksyczności otrzymanych związków. Autorka nie pisze też o planach na przyszłość; jak rozumiem, otrzymane koniugaty będą testowane metodami *in vivo* (proszę Autorkę o naświetlenie tej sprawy).

Na końcu pracy jest jeszcze Podsumowanie, w którym Autorka opisuje otrzymane wyniki, oraz Streszczenie, które w zasadzie niewiele różni się od Podsumowania. Uważam, że zamiast Podsumowania Doktorantka powinna w kilku punktach podać najważniejsze osiągnięcia swojej pracy. Będę wdzięczny Autorce za przedstawienie takich punktów.

Pod względem edytorskim praca nie jest przygotowana najlepiej. Brak nadtytułów utrudnia czytanie pracy. Praca została jednostronnie wydrukowana (dlaczego?) na bardzo grubym papierze, nie dostałem też wersji elektronicznej. Ilustracje nie są zbyt czytelne, co jest prawdopodobnie związane z bezpośrednim wklejaniem plików jpg do programu Word. Znalezione przez mnie błędy literowe i językowe zostały przekazane Autorce.

Podsumowanie

Pomimo opisanych drobnych niedociągnięć, pracę doktorską Dr Aleksandry Borek oceniam bardzo wysoko. Autorka wykazała się dużą wiedzą i znajomością wielu technik laboratoryjnych, a przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i składam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Borek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.