



UNIwersYTET GDAŃSKI



Prof. dr hab. Krzysztof Liberek
Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
ul. Abrahama 58; 80-307 Gdańsk
tel. +48 58 523 6346
E-mail: liberek@biotech.ug.edu.pl

Gdańsk, 20.09.2016

Opinia o rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Borek pt. "Selekcja, optymalizacja i charakterystyka fragmentów przeciwciał scFv oraz scFv-Fc anti-FGFR2 oraz ich koniugacja z cytostatykami".

Terapie celowane, z uwagi na ich stosunkowo wysoką skuteczność oraz ograniczoną toksyczności w stosunku do zdrowych tkanek, są pożądanym, coraz powszechniejszym sposobem postępowania w leczeniu nowotworów. Ich wprowadzanie i stosowanie wymaga opracowywania nowych leków specyficznie nakierowanych na różne rodzaje nowotworów. Najczęstszym sposobem nakierowywania leku na komórki nowotworowe jest użycie przeciwciał wykazujących specyficzną wobec charakterystycznego dla danego rodzaju komórek nowotworowych antygenu. W swojej rozprawie doktorskiej mgr Borek przedstawia cykl doświadczeń, które mają na celu wytworzenie fragmentów przeciwciał specyficznych wobec zewnątrzkomórkowej domeny receptora 2 czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR2) oraz skoniugowanie tych przeciwciał z cytostatykiem, co potencjalnie może prowadzić do powstania leku nakierowanego na nowotwory charakteryzujące się podwyższoną ekspresją FGFR2. Badanie przeprowadzone przez mgr Borek mają więc nie tylko znaczenie poznawcze ale posiadają również wartość aplikacyjną.

Układ przedstawionej pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Praca opatrzona jest *Wstępem*, w drugiej części którego autorka przedstawia przegląd informacji na temat budowy oraz mechanizmu działania stosowanych wspólnie oraz opracowywanych leków stosowanych w celowanych terapiach przeciwnowotworowych. Ta część jest dobrze napisana oraz interesująca, niezbędna do zrozumienia zastosowanego w pracy podejścia eksperymentalnego. W pierwszej części wstępu doktorantka przedstawiła natomiast użytą w

części eksperymentalnej pracy technikę *phage display*. Uważam, że ta część *Wstępu* jest zbędna. Technika *phage display* było tylko użytym narzędziem eksperymentalnym i została wystarczająco opisana w rozdziale *Wyniki*.

W rozdziałach *Materiały* oraz *Metody* Doktorantka rzeczowo i precyzyjnie opisuje stosowane materiały oraz procedury i techniki eksperymentalne.

W rozdziale *Wyniki* Doktorantka przedstawia kolejne kroki eksperymentalne składające się na zastosowane podejście badawcze mające na celu otrzymanie fragmentów przeciwciał skoniugowanych z cytostatykiem. Pierwszy etap to klonowanie oraz oczyszczenie zewnątrzkomórkowej domeny receptora FGFR2, która służyła jako antygen w kolejnych eksperymentach. Następnie przy użyciu techniki *phage display* Doktorantka wyselekcjonowała z biblioteki Tomlinson jednołańcuchowe fragmenty zmienne przeciwciał (scFv) o wysokim powinowactwie do FGFR2. Doktorantka podjęła również próbę zwiększenia tego powinowactwa poprzez zastosowanie drugiej rundy selekcji budując bibliotekę w oparciu o wyizolowany w pierwszej rundzie selekcji klon scFv-F7. Następnie, w celu zwiększenia powinowactwa wyselekcjonowanego klonu, przeprowadzono go do formatu biwalentnego poprzez dodanie regionu stałego przeciwciała (Fc) (pierwszy konstrukt) oraz wygenerowanie tzw. cząsteczki *diabody* (drugi konstrukt). Po pomiarach, przy użyciu techniki SPR, stałych oddziaływania pomiędzy przeciwciałami a FGFR2 do dalszych badań wybrano dwa konstrukty: jeden monowalentny scFv-F7, drugi biwalentny scFv-F7-Fc. Uzyskane w ten sposób fragmenty przeciwciał były na następnych etapach koniugowane z cytostatykiem. Jako cytostatyk wybrano monoetyloaurystynę E, związek będący inhibitorem polimeryzacji tubuliny. Skuteczność działania wolnej monoetyloaurystyny E oraz otrzymanych koniugatów Doktorantka zbadała używając czterech linii komórkowych. Trzy z tych linii: Snu-16 (ludzki rak żołądka), NCI-H716 (ludzki gruczolakorak jelita grubego) oraz U2OSR2 (ludzki kostnomięsak stabilnie transfekowany DNA kodującym receptor FGFR2) wykazywały, co potwierdzono techniką Western blot, nadprodukcję FGFR2. Czwarta linia U2OS (ludzki kostnomięsak) w której nie zachodziła ekspresja FGFR2 stanowiła kontrolę negatywną. Doktorantka pokazała, że wszystkie te linie komórkowe były wrażliwe na samą monoetyloaurystynę E. Co zaskakujące IC₅₀ dla linii U2OS by siedem razy wyższe niż dla wywodzącej się z niej linii U2OSR2 (U2OS stabilnie transfekowane FGFR2). Skąd może pochodzić tak duża różnica? To w opinii recenzenta trochę utrudnia późniejszą analizę działania badanych w pracy koniugatów. Należy również zauważyć, że w *Dyskusji* w tabeli 17, strona 105, w czasie porównywania wszystkich IC₅₀ błędnie przypisano linii U2OS wartość

0.99 jako IC50 dla monoetyloaurystyny E. Jak pokazują wyniki zawarte na rysunku 29 prawidłowa wartość to 4.93. Zwieńczeniem pracy Doktorantki jest porównanie wrażliwości analizowanych linii komórkowych na otrzymane w pracy dwa koniugaty: scFv-F7-monoetyloaurystyna E oraz scFv-F7-Fc-monoetyloaurystyna E. Linie komórkowe ekspresyjnie FGFR2 okazały się wrażliwe na badane koniugaty, natomiast linia kontrolna nie. IC50 dla scFv-F7-monoetyloaurystyna E dla wszystkich analizowanych linii był kilku a nawet kilkunastokrotnie wyższy niż dla scFv-F7-Fc-monoetyloaurystyna E. Jak w *Dyskusji* zauważa Doktorantka wynika to z większego powinowactwa do receptora biwalentnego przeciwciała oraz związania do tego przeciwciała dwóch cząsteczek monoetyloaurystyny E. Według recenzenta w ramach dyskusji wyników należałoby również przedyskutować fakt, że IC50 dla wolnej monoetyloaurystyny E jest niższe niż dla uzyskanych koniugatów. Zdaję sobie sprawę, że tych dwóch wartości nie można porównywać wprost z uwagi na inny mechanizm dostarczania cytostatyku do komórek oraz konieczność hydrolizy wiązania pomiędzy cytostatykiem i przeciwciałem w komórce, ale można było te różnice przedyskutować. Może gdyby np. krócej inkubować komórki z koniugatami i monoetyloaurystyna E efekt byłby odwrotny. Czas inkubacji komórek z monoetyloaurystyna E oraz koniugatami był długi i wynosił 72 godziny. Czy Doktorantka próbowała analizować krótsze czasy inkubacji komórek z badanymi substancjami? Należy zauważyć, że wyraźny efekt internalizacji przeciwciał do komórek był widoczny po 15 minutowej inkubacji. Może gdyby stosować krótsze czasu inkubacji efektywniej niż wolna monoetyloaurystyna E działałyby koniugaty. Odpowiedź na to pytanie wydaje się interesująca z punktu widzenia skuteczności działania koniugatów jako potencjalnych leków.

Podsumowując, mgr Aleksandra Borek otrzymała koniugaty fragmentów przeciwciał o wysokim powinowactwie do FGFR2 z monoetyloaurystyna E. Uzyskane koniugaty w stężeniach nanomolarnych powodowały śmierć komórek nadprodukujących FGFR2, natomiast w tych stężeniach nie były toksyczne dla komórek w których nie ma ekspresji FGFR2. Tak więc, doktorantka w czasie realizacji projektu doktorskiego uzyskała koniugaty, które potencjalnie mogą być lekiem w celowanej terapii nowotworów nadprodukujących FGFR2. Czy w związku z tym planowane są dalsze badania uzyskanych koniugatów na zwierzętach?

Należy zauważyć, że realizacja projektu doktorskiego wymagała mrówczej pracy. Doktorantka uzyskała koniugaty w wyniku wieloetapowego procesu eksperymentalnego w którym każdy poprzedni etap determinował następny. Każdy z etapów pracy wymagał szeregu optymalizacji co zostało zdobione i opisane w rozprawie doktorskiej. Taki sposób

postępowania generował dużą liczbę dodatkowych eksperymentów. Wyniki uzyskane przez mgr Borek w ramach realizacji projektu doktorskiego uważam za bardzo wartościowe.

Sama praca doktorska została napisana w jasny i precyzyjny sposób. Nie mam również żadnych zastrzeżeń do graficznego przedstawienia wyników na rycinach. Pewien niedosyt pozostawia tylko rozdział *Dyskusja*. W opinii recenzenta zbyt dużo w nim powtórzeń informacji zawartych w rozdziale *Wyniki*. Natomiast bardziej obszerna mogłaby być rzeczywista dyskusja wyników.

Reasumując pracę doktorską mgr Aleksandry Borek oceniam bardzo wysoko. Nie mam żadnych wątpliwości, że przedstawiona do oceny praca w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w artykule 13 „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003. Uzyskane wyniki badań naukowych w pełni uzasadniają nadanie Pani mgr Borek stopnia naukowego doktora w dyscyplinie biotechnologia. W związku z tym zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Borek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

