UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Zakład Syntezy i Technologii Środków Leczniczych
15-089 Białystok , ul. Kilińskiego 1
Tel. (85) 748-57-41, FAX (85) 879-57-18
kbiel@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Krzysztof Bielawski **Białystok 28.06.2021**

Ocena pracy doktorskiej mgr Piotra Kamila Rózgi pt. "Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego o właściwościach proapoptotycznych i antyangiogennych, do celowanej terapii przeciwnowotworowej"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy niezwykle ważnego społecznego zagadnienia – poszukiwań nowych chemioterapeutyków na potrzeby onkologii. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia liczba nowo stwierdzonych przypadków chorób nowotworowych w 2020 roku wyniosła aż 19 milionów a przewidywana liczba nowych przypadków wzrośnie do 22 milionów w ciągu następnych dziesięciu lat. W ostatnich latach pomimo wdrożenia zakrojonych na szeroką skalę badań przesiewowych w poszukiwaniu nowych leków oraz wprowadzenia nowych procedur terapeutycznych, śmiertelność z powodu nowotworów nie uległa zdecydowanej poprawie. Ograniczenia w chemioterapii nowotworów wynikają głównie z faktu, iż stosowane leki obarczone są silnym działaniem niepożądanym, a wiele rodzajów nowotworów wykazuje nabytą lub wrodzoną oporność na podawane leki. W związku z tym konieczne jest poszukiwanie nowych, mniej toksycznych leków oraz bardziej skutecznych terapii. W miarę wzrostu wiedzy na temat molekularnego mechanizmu procesów nowotworowych oraz biologii nowotworów, pojawiają się nowe możliwości i strategie terapeutyczne. Obecnie prowadzone prace skupiają się na badaniu związków działających na bezpośrednie otoczenie komórki nowotworowej, naczynia krwionośne oraz przekazywanie sygnałów do i wewnątrz komórki nowotworowej. Wiele uwagi poświęca się również lekom wpływającym na cykl komórki nowotworowej, jej proliferację i indukcję apoptozy.

Poznanie procesów związanych z genezą i rozwojem komórek nowotworowych zaowocowało wprowadzeniem terapii celowanej. Nową metodą w leczeniu skojarzonym jest tworzenie koniugatów „biopolimer-lek", w którym lek związany jest w sposób kowalencyjny z nośnikiem. Liczne korzyści płynące ze stosowania w terapii tego typu połączeń w stosunku do wolnych leków obejmują między innymi: mniejszą toksyczność wprowadzanych leków, pasywne wprowadzanie leku do guza przez zwiększenie przepuszczalności i retencji, zwiększenie rozpuszczalności leku w płynach ustrojowych, możliwość ominięcia mechanizmów oporności komórek nowotworowych na leki oraz możliwość wywołania działania immunostymulującego. Podstawową zmianą, jaka zaszła na polu farmakoterapii nowotworów jest przejście z ogólnie rozumianej cytotoksyczności do ściśle ukierunkowanej aktywności przeciwnowotworowej. Główną przyczyną tych zmian jest coraz większa wiedza na temat biologii nowotworów, precyzyjna identyfikacji celu działania leku oraz opracowanie racjonalnych metod ich projektowania z wykorzystaniem osiągnieć bioinformatyki. Do leków nowej generacji, stosowanych w tzw. terapii celowanej, o bardzo selektywnym działaniu, jednak nie pozbawionych całkowicie działań niepożądanych należą między innymi przeciwciała monoklonalne oraz inhibitory kinazy tyrozynowej. Imatynib (Gleevec), prekursor leków z grupy inhibitorów kinazy tyrozynowej, pomimo niewielkiego wpływu na szpik kostny czy wątrobę jest lekiem stosunkowo bezpiecznym. Bez wątpienia związek ten, jego analogi a także inne przeciwciała monoklonalne stanowią przełom we współczesnej onkologii.

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej nowe rekombinowane białka fuzyjne VCTR4.0 zawiera fragment białka TRAIL. Ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę (TRAIL) jest białkiem błonowym typu II należącym do rodziny TNF. Cząsteczka ligandu ma postać monomeru bądź też trimeru cechującego się dużo większą aktywnością biologiczną. TRAIL ma zdolność wywoływania zaprogramowanej śmierci w komórkach nowotworowych nie będąc jednocześnie toksycznym w stosunku do prawidłowych komórek organizmu. Fizjologiczną funkcją TRAIL jest nadzór immunologiczny i udział w odporności przeciwnowotworowej. Liczne badania wykazały jednak, że około 40%-50% nowotworów charakteryzują się opornością na działanie tego białka. Wrażliwość komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną TRAIL wynika z różnic w dystrybucji błonowych receptorów śmierci TRAIL-R1 i TRAIL-R2, do których przyłącza się ligand, jak również obecności wewnątrzkomórkowych białek pro- i antyapoptotycznych. TRAIL nie wykazuje specyficzności gatunkowej i jest aktywny zarówno w stosunku do zwierzęcych, jak i ludzkich komórek linii nowotworowych. Dokładne poznanie i zrozumienie mechanizmów braku wrażliwości komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną TRAIL pomogłoby w opracowaniu strategii

przełamywania TRAIL-oporności. W ciągu ostatnich lat badania *in vitro* i *in vivo* oraz testy kliniczne dowiodły znaczącej roli molekuły TRAIL w terapii przeciwnowotworowej. TRAIL w postaci rekombinowanego ligandu (rhsTRAIL) lub przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko receptorom śmierci TRAIL-R1 i TRAIL-R2 znajduje się obecnie w I i II fazie badań klinicznych w monoterapii, jak i terapii skojarzonej z cytostatykami lub promieniowaniem gamma.

Badania angiogenezy na poziomie molekularnym wykazały, że wzrost nowotworów zależy od tworzenia własnej sieci naczyń krwionośnych, więc efektywne zahamowanie powstawania tej sieci, uszkodzenie lub całkowite jej zniszczenie powinny skutecznie hamować wzrost nowotworów. Głównym czynnikiem proangiogennym jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF, stymulujący podziały komórkowe, migrację i proliferację komórek śródbłonka. Reguluje on zarówno fizjologiczną, jak i patologiczną angiogenezę. Bierze udział w mobilizacji komórek macierzystych śródbłonka naczyń ze szpiku kostnego, co ma bardzo istotne znaczenie, gdyż stanowią one około 15% komórek nowo powstałych naczyń krwionośnych w obszarze nowotworu. Zahamowanie aktywności VEGF, a co za tym idzie supresję angiogenezy, budzi nadzieję na poprawę wyników leczenia chorób nowotworowych. Z sekwencji liganda VEGF Doktorant wybrał 7-aminokwasowy fragment, który według naukowych doniesień ma zdolność do łączenia się z receptorami białka, blokując jego aktywność. Peptyd ten jest połączony z N-końcem liganda TRAIL w otrzymanym białku fuzyjnym VCTR4.0.

Istotna rola VEGF w pobudzaniu procesu angiogenezy sprawiła, że czynnik ten stał się głównym celem terapii antyangiogennej. Terapia antyangiogenna budzi obecnie szerokie zainteresowanie, a wciąż prowadzone badania właściwości leków antyangiogennych dostarczają cennych informacji na temat sposobu inhibicji tego procesu. Obecnie w badaniach klinicznych wykorzystuje się wiele leków hamujących proces angiogenezy na rożnych jego etapach. Należą do nich m.in. antagoniści czynników angiogennych, receptory cytokin proangiogennych, naturalne inhibitory angiogenezy, inhibitory metaloproteinaz czy inhibitory integryn. Ważną grupę leków o działaniu hamującym unaczynienie guzów stanowią także te skierowane na receptory VEGF. Aktualnie dopuszczonych przez FDA do obrotu jest ok. 7 leków, wśród nich sunitinib i sorafenib. Możemy, więc stwierdzić, że wybór tematu pracy doktorskiej jest ważny społecznie, interesujący naukowo, o dużych walorach praktycznych. Układ przedstawionej do recenzji pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, z podziałem na rozdziały: wstęp, cel badań, materiały i metody, wyniki, dyskusję i piśmiennictwo. Przed spisem treści znajdziemy wykaz stosowanych skrótów, abstrakt w języku polskim i języku

angielskim. Rozprawa doktorska mgr Piotra Kamila Rózgi jest obszerna, liczy 142 stron tekstu, w których zawartych jest 50 rycin i 20 tabel. Tabele i ryciny umieszczono w tekście, co znacznie ułatwia korzystanie z nich w trakcie czytania. Doktorant posługuje się precyzyjnym, zwięzłym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Zwraca uwagę wielka staranność graficzna i edytorska pracy. Piśmiennictwo jest imponujące, liczy aż 422 pozycje i jest właściwie dobrane i cytowane.

We wstępie pracy Doktorant przedstawia informacje szeroko naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W rozdziałach tych Autor omawia zagadnienia dotyczące leczenia nowotworów ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania w tym obszarze białka TRAIL oraz molekularnych mechanizmów apoptozy. We wstępie Autor pracy doktorskiej scharakteryzował również proces angiogenezy ze szczególnym uwzględnieniem czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGF pod kątem wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej. Autor szczegółowo omawia także czynniki białkowe uwikłane w regulacje złożonego procesu angiogenezy w komórkach nowotworowych. Materiał zawarty w tej części pracy jest oparty na dogłębnej analizie prac badawczych z ostatnich lat i stanowi zdaniem Recenzenta wyczerpujące wprowadzenie do części doświadczalnej. Podsumowując, rozdział ten świadczy o doskonałej znajomości aktualnego piśmiennictwa, dużej wiedzy i bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta do podjętych badań.

Celem pracy doktorskiej mgr Piotra Kamila Rózgi było zaprojektowanie, otrzymanie oraz analiza właściwości biologicznych nowego białka fuzyjnego VCTR4.0, którego działanie łączy w sobie aktywność cytotoksyczną oraz antyangiogenną. Nowo zaprojektowana cząsteczka VCTR4.0 posiada wyjątkową selektywnością białka TRAIL wobec komórek nowotworowych, będąc jednocześnie nośnikiem peptydów blokujących receptory VEGF odpowiedzialne za proces angiogenezy. W ramach założonego celu Doktorant podzielił badania na trzy etapy: zaprojektowanie sekwencji aminokwasowej białka fuzyjnego VCTR4.0 spełniającej żądane funkcje w oparciu o znaną budowę chemiczną liganda TRAIL oraz VEGF, syntezę białka, zaś w końcowej części pracy podjął się zadania oceny wpływu otrzymanego białka fuzyjnego na indukcję procesu apoptozy oraz efektu antyangiogennego w odniesieniu do wybranych komórek nowotworowych.

Rozdział „Materiały i Metody" został opracowany szczegółowo, lecz zarazem przejrzyście. Bardzo istotne dla czytelnika pracy jest pełne i klarowne przedstawienie metod. Rozdział „Wyniki i Dyskusja" zawierający wiele rycin i tabel stanowi obszerną i najciekawszą cześć pracy. Ryciny, tabele i wykresy są czytelne i przejrzyste. Znaczną część tego rozdziału stanowi krytyczne i wszechstronne omówienie wyników własnych badań. Rozdział jest

napisany bardzo kompetentnie, zawiera wszystkie informacje potrzebne do wyciągnięcia końcowych wniosków z badań. Wyniki przedstawiono w sposób uporządkowany, zgodny z układem przedstawionym w rozdziale poświęconym metodyce badań, co ułatwia ich ocenę.

Ligand TRAIL stał się w nowo zaprojektowanym białku fuzyjnym VCTR4.0 nośnikiem dla fragmentu peptydu o potencjale antyangiogennym. Modyfikacja białka TRAIL przez dodanie do niego peptydów efektorowych zapewnia także poprawę parametrów farmakokinetycznych przyczyniając się do zwiększenia efektywności białka w warunkach *in vivo*. Przewaga opracowanej przez Doktoranta cząsteczki VCTR4.0 nad przeciwciałami oraz koniugatami przeciwciał z substancjami cytotoksycznymi polega na posiadaniu przez nią pierwotnej aktywności przeciwnowotworowej. Powszechnie stosowane przeciwciała są nośnikami biernymi. Ich funkcją jest jedynie dostarczenie cytostatyków w odpowiednie miejsce lub blokowanie przyłączania się ligandów do receptorów poprzez interakcję z nimi, co skutkuje hamowaniem silnej proliferacji i rozrostu guzów. Dodatkową wadą przeciwciał jest także ich wielkość. Ze względu na duży rozmiar cząsteczki, penetracja poszczególnych komórek guza jest utrudniona. W pierwszej części pracy Doktorant korzystając z dostępnych baz danych określił niezbędne sekwencje aminokwasowe białek VEGF oraz TRAIL, które należy włączyć do białka fuzyjnego. Z sekwencji liganda VEGF wybrał 7-aminokwasowy fragment, który według uprzednich badań ma zdolność do łączenia się z receptorami białka. W zaprojektowanym białku fuzyjnym ligand TRAIL został zmodyfikowany poprzez przyłączenie do jego N-końca powtórzonej sekwencji peptydu pochodzącego z liganda VEGF i mogącego się przyłączać do odpowiednich receptorów charakterystycznych dla tego liganda blokując ich efekt biologiczny. Peptydy oddzielone są od białka TRAIL za pomocą linkerów, które potencjalnie zwiększają jego elastyczność i mobilność na powierzchni błony komórkowej, przez co wzrasta prawdopodobieństwo jego połączenia się z receptorem. Do produkcji białka VCTR4.0 Doktorant wybrał bakteryjny system ekspresyjny *E. coli* przy pomocy algorytmu dostarczonego przez firmę GENEART AG. Po wielu wstępnych próbach najwyższą ekspresję uzyskał w szczepie *E.coli* BL21 (DE3)-RIL. Doktorant wykonał szereg fermentacji w małej skali w celu zoptymalizowania czasu ekspresji oraz warunków hodowlanych. Przy pomocy metody Western blot z wykorzystaniem przeciwciał anty-TRAIL potwierdził ekspresję białka zawierającego ligand TRAIL. Uzyskał wystarczającą ilość białka do przeprowadzenia procesu oczyszczania z użyciem chromatografii jonowymiennej. Otrzymane białko fuzyjne VCTR4.0 posiada widma CD charakterystyczne dla białek o przewadze struktur typu β-harmonijki, co jest typowe dla białek z rodziny TNF. Ponadto posługując się metodą sączenia na sicie molekularnym Doktorant wykazał, iż opracowany preparat białka fuzyjnego zawiera molekuły

o masie homotrimeru – aktywnej formy białka. W przedstawionej pracy określił parametry kinetyczne oddziaływania białka fuzyjnego VCTR4.0 z ludzkimi receptorami TRAIL-R1 i TRAIL-R2, VEGFR-2 oraz mysim TRAIL-R metodą plazmonowego rezonansu powierzchniowego. Uzyskane wyniki sugerują, iż modyfikacja liganda TRAIL w białku fuzyjnym VCTR4.0, nie zmienia jego właściwości wiązania do wybranych receptorów śmierci. Doktorant określił cytotoksyczność nowego białka fuzyjnego VCTR4.0 testem MTT wobec 18 linii komórek nowotworowych i 2 linii komórek prawidłowych w porównaniu do białka TRAIL i paklitakselu. VCTR4.0 wykazał znacznie wyższą cytotoksyczność w porównaniu z ligandem TRAIL i paklitakselem w badanych liniach nowotworowych. Dla 16 pośród 18 linii nowotworowych wartości IC_{50} dla białka VCTR4.0 wynosiła poniżej 1 nM. W liniach komórek prawidłowych: w komórkach śródbłonka i fibroblastach płuc otrzymane białko fuzyjne podobnie jak TRAIL nie wywoływały procesu apoptozy. Ponadto Doktorant wykazał, że inkubacja z surowicą nie ma żadnego wpływu na aktywność cytotoksyczną białka VCTR4.0, co może świadczyć o niewystępowaniu czynników neutralizujących we krwi. Doktorant udowodnił, iż białko VCTR4.0 ma *in vitro* zdolność do omijania oporności na ligand TRAIL indukując w ten sposób szlak apoptozy. Dodatkowo jego bezpośrednia aktywność antyangiogenna została potwierdzona w teście sferoidalnym HUVEC oraz z wykorzystaniem fragmentów aorty. Silne działanie przeciwnowotworowe nowej cząsteczki fuzyjnej zostało również potwierdzone na modelu heteroprzeszczepu lekoopornego ludzkiego mięsaka macicy MES-SA/Dx5. Podobny efekt obserwowano w przypadku ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego Colo205, ludzkiego raka trzustki MIA PaCa-2 czy modelu ludzkiego raka wątroby HepG2. Nowo stworzone białko fuzyjne VCTR4.0 o podwójnym działaniu zarówno silnie cytotoksycznym, jak i hamującym proces angiogenezy, wykazywało dużo silniejsze i skuteczniejsze działanie niż rozpuszczalny TRAIL. Doktorant zrealizował swoje zamierzenia gdyż przyłączenie peptydu efektorowego do liganda pozwoliło przezwyciężyć problemy z selektywnym dostarczeniem go w miejsca, gdzie jego działanie jest pożądane, a także, poprzez zwiększenie masy białka, polepszono jego parametry farmakokinetyczne. Otrzymane wyniki skłaniają do dalszych poszerzonych badań nad mechanizmem działania przeciwnowotworowego białka fuzyjnego VCTR4.0.

W rozdziale „Dyskusja" Doktorant przeprowadziła szczegółową analizę uzyskanych wyników. Czytelnik może odczuwać jednak pewien niedosyt związany z brakiem konfrontacji badań własnych z osiągnięciami innych zespołów badawczych. Należałoby bardziej wyeksponować oryginalny wkład Doktoranta w rozwój i zestawienie metod badawczych w

zakresie aktywności przeciwnowotworowej białka fuzyjnego VCTR4.0. Podsumowanie kończące pracę ma charakter głównych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań.

Zdaniem Recenzenta należy kontynuować badania białka fuzyjnego VCTR4.0 na kolejnych modelach doświadczalnych, gdyż terapia antyangiogenna napotyka na swej drodze wiele trudności. Wiążą się one przede wszystkim z tym, że wyniki badań przedklinicznych prowadzonych na myszach nie odzwierciedlają wyników uzyskanych w badaniach klinicznych. Przyczyn tego zjawiska może być kilka. Jedną z nich jest na przykład większa podatność mysich naczyń krwionośnych w guzie pochodzenia ludzkiego na terapię antyangiogenną niż ludzkich naczyń krwionośnych. Wśród licznych ograniczeń ważnym elementem jest to, że naczynia u zwierząt eksperymentalnych są młode, zaś ich wzrost uzależniony jest od jednego głównego czynnika proangiogennego, jakim jest VEGF. Rozbieżności w wynikach mogą być również spowodowane różnicami w budowie pomiędzy nowotworami ludzkimi a nowotworami doświadczalnymi. Tkanki zmienione nowotworowo przeszczepiane zwierzętom zbudowane są z jednakowych komórek i charakteryzują się szybkim wzrostem. Ludzkie nowotwory z kolei rosną wolniej i składają się z komórek niejednorodnych pod względem genetycznym, które mogą wytwarzać rożne czynniki proangiogenne. Genom komórki nowotworowej cechuje się niestabilnością i podlega licznym mutacjom, które w efekcie prowadzą do zaburzenia ekspresji genów. W związku z tym hamowanie aktywności wyłącznie VEGF może okazać się niewystarczające dla zahamowania rozwoju nowotworu. Ekspresja czynników angiogennych może zatem ulegać zmianie w miarę rozwoju guza. Dostępne dane wskazują, że w początkowych stadiach kancerogenezy mogą być produkowane nieliczne czynniki angiogenne, natomiast w zaawansowanym stadium choroby produkowanych jest wiele czynników. Strategia terapeutyczna polegająca na zahamowaniu tylko jednego z czynników angiogennych zazwyczaj jest nieskuteczna z uwagi na fakt, iż jest to kompensowane nadekspresją innych, podobnie działających substancji, co w konsekwencji może prowadzić do wytworzenia oporności na dany czynnik angiogenny.

Praca doktorska mgr Piotra Kamila Rózgi rodzi kilka pytań. Najważniejsze z nich to:

1. Czy zdaniem autora pracy doktorskiej na podstawie przeprowadzonych badań możemy już wstępnie określić jaki rodzaj nowotworów mógłby być głównym celem terapeutycznym białka VCTR4.0?
2. Zgodnie z przedstawioną hipotezą w dyskusji pracy istotne dla aktywności biologicznej białka VCTR4.0 jest odcięcie 7-aminokwasowego fragmentu liganda VEGF po dotarciu do

komórek nowotworowych. Jaka rolę w tym procesie odgrywa sekwencja aminokwasowa łączników i czym się kierowano przy ich wyborze?

Należy także nadmienić, że mgr Piotr Kamil Rózga jest współautorem 4 znaczących prac naukowych o wysokich współczynnikach oddziaływania IF oraz 20 komunikatów zjazdowych. Wysoki, jak na doktoranta jest także Index Hirscha, który wynosi 3. Podjęte przez Doktoranta badania mają istotne znaczenie aplikacyjne, co potwierdza ochrona białka VCTR4.0 patentem międzynarodowym o numerze PCT/EP2012/050145.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Piotra Kamila Rózgi pt. „Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego o właściwościach proapoptotycznych i antyangiogennych, do celowanej terapii przeciwnowotworowej" cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktoranta. Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam za niezwykle interesującą oraz nowatorską. Stanowi ona samodzielny dorobek naukowy, w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi poprawkami z 2014r. (Dz.U. Poz. 1852). Ze względu na te walory, pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Piotra Kamila Rózgi do wyróżnienia.

Z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Piotra Kamila Rózgi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Syntezy i Technologii
Środków Leczniczych
prof. dr hab. Krzysztof Bielawski