WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bartłomieja Żerka

p.t. „Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego TRAIL-IFNγ do celowanej terapii przeciwnowotworowej",

wykonanej w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej

Wydziału Farmaceutycznego

Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum

Promotor: Prof. dr hab. Elżbieta Pękala

Celem badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej mgr Bartłomieja Żerka było opracowanie cząsteczki terapeutycznej opartej na technologii białka fuzyjnego, przeznaczonej do celowanej terapii przeciwnowotworowej. Terapia celowana, oparta na profilu molekularnym nowotworu daje niewątpliwie większą szansę na wyleczenie od tradycyjnej chemioterapii. Bywa również skuteczna nawet w przypadku nowotworów metastatycznych. Tak dobrany lek jest mniej toksyczny i obciążający organizm, zmniejszone jest ryzyko powikłań. Tematyka badań podjęta przez Doktoranta jest więc niezwykle aktualna.

Zaaprobowane współcześnie do stosowania w leczeniu nowotworów terapie celowane wykorzystują inhibitory transdukcji sygnału, modulatory ekspresji genów, inhibitory angiogenezy, immunokoniugaty, immunoterapie, czy induktory apoptozy. Zaprojektowana i otrzymana przez Doktoranta cząsteczka wpisuje się w ostatnie z wymienionych mechanizmów działania.

Rozwój nowego produktu leczniczego rozpoczyna się od wyboru przez badacza potencjalnego celu molekularnego, oraz określenia struktury wiodącej. Zasada ta sprawdza się zarówno w poszukiwaniu leków syntetycznych jak i biotechnologicznych. W przypadku terapii celowanej nowotworów celem molekularnym może być np. specyficzne białko obecne w komórkach nowotworowych, ale nie w normalnych komórkach, lub występujące w większej ilości w komórkach nowotworowych. Po zidentyfikowaniu potencjalnego celu, następnym krokiem jest opracowanie terapii, która wpływa na cel w sposób, który zakłóca jego zdolność do

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl

promowania wzrostu lub przeżycia komórek nowotworowych. Większość leków stosowanych w terapiach celowanych nowotworów to albo związki niskocząsteczkowe, opracowywane dla celów zlokalizowanych wewnątrz komórki, albo związki białkowe, cząsteczki o dużej masie, np. przeciwciała monoklonalne do celów znajdujących się na zewnątrz komórek lub na powierzchni komórki (np. przeciwciała monoklonalne czy koniugaty przeciwciało-lek). Zaprojektowana przez Doktoranta cząsteczka – aktywna muteina w formie białka fuzyjnego, oparta na sekwencji liganda TRAIL należy do tej drugiej grupy. TRAIL (Apo-2 ligand) jest molekułą zdolną do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych przy zachowaniu bezpieczeństwa wobec komórek normalnych, z czego z resztą wynikała koncepcja wykorzystania apoptozy zależnej od „receptorów śmierci" (powierzchniowych receptorów DR4 i DR5 należącymi do receptorów TNF, których wspólną cechą jest transdukcja sygnału powodującego uruchomienie kaskady kaspaz i apoptozę) w celowanej terapii nowotworów. Niestety żaden z wielu kandydatów na leki, mających działać w oparciu o ten mechanizm nie wykazał wystarczającej efektywności dla wprowadzenia do lecznictwa, być może ze względu na oporność niektórych typów komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną TRAIL.

W efekcie tych niepowodzeń pojawiła się koncepcja, w którą wpisana jest również recenzowana praca doktorska, polegająca na uzbrojeniu liganda śmierci (TRAIL) w dodatkowy, niezależny od apoptozy mechanizm działania. Takim rozwiązaniem jest na przykład otrzymywanie rekombinowanych fuzji z domenami ludzkich interferonów. W założeniu taka fuzja powinna skutkować stymulacją układu immunologicznego oraz uwrażliwieniem komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną przez TRAIL, wynikającą z indukcji przez interferon genów kodujących białka odpowiedzialne za regulację szlaku apoptozy. Uzasadniając celowość wyboru tematu pracy doktorskiej Autor powołuje się na liczne publikacje, których autorzy podkreślają synergizm lub komplementarność działania liganda TRAIL oraz cząsteczek z grupy interferonów.

Reasumując, tematyka podjęta przez Doktoranta jest niezwykle aktualna i dotyczy opracowania aktywnej muteiny w formie białka fuzyjnego, opartej na cząsteczce z grupy interferonów oraz na zoptymalizowanej sekwencji liganda TRAIL, która powinna oddziaływać z więcej niż jednym celem molekularnym i wykazywać więcej niż jeden szlak sygnałowy, o założonym przeznaczeniu do celowanej terapii przeciwnowotworowej.

Recenzowana dysertacja ma postać 133 stronicowej rozprawy w języku polskim o klasycznym układzie, zawierającej streszczenie w języku polskim i angielskim, część teoretyczną

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl

(wstęp), cel pracy, opis stosowanej metodyki (materiały i metody), wyniki, dyskusję wyników oraz podsumowanie. Praca zaopatrzona jest w 30 tabel i 66 ryciny.

Uzasadnieniem zainteresowania Doktoranta wybraną tematyką badawczą jest obszerny, liczący 30 stron wstęp teoretyczny do rozprawy. Autor poświęca w nim dużo uwagi interferonom, w tym ich zastosowaniom w klinice, kodującym ich genom, strukturze interferonów α i dimerom IFN-α, interferonom γ, indukcji odpowiedzi interferonowej, w tym odpowiedzi interferonowej w nowotworach, wreszcie ich skuteczności klinicznej. Ta część wstępu daje czytelne uzasadnienie wykorzystania IFN-γ w konstrukcji zaprojektowanego białka fuzyjnego. Osobny podrozdział Doktorant poświęca ligandowi TRAIL, w tym jego strukturze, funkcjom, mechanizmowi indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych, programom badawczym dotyczącym skuteczności antagonistów DR4 i DR5 ze znanymi lekami, białkom fuzyjnym – kandydatom na nowe leki, a także mechanizmom oporności niektórych komórek nowotworowych na działanie liganda TRAIL. W mojej ocenie dostarczone w tym podrozdziale dane literaturowe dobrze uzasadniają potrzebę zaprojektowanej fuzji liganda TRAIL np. z domenami ludzkich interferonów

Zaprezentowany w dysertacji przegląd piśmiennictwa jest bardzo szeroki; obejmuje 258 pozycji. Stanowi on czytelną podstawę dla postawionej przez doktoranta hipotezy badawczej, dotyczącej potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej zaprojektowanego białka fuzyjnego TRAIL-TNF-γ.

Zaprojektowane przez Doktoranta badania własne były również bardzo szerokie i obejmowały następujące etapy (1) projektowanie rekombinowanych wariantów białka fuzyjnego TRAIL-IFN, (2) otrzymanie zaprojektowanego białka fuzyjnego, (3) analizę własności fizykochemicznych otrzymanych produktów, (4) testy interakcji z celami molekularnymi, (5) badanie aktywności biologicznej białka TRAIL-INF *in vitro* oraz (6) badanie aktywności *in vivo*. Opis eksperymentów pozwala sądzić, że Doktorant wykonywał te wszystkie badania osobiście, bądź czynnie uczestniczył w ich wykonywaniu, co budzi podziw dla jego wszechstronnej wiedzy i umiejętności.

Ze względu na konieczność skrótowego podsumowania przeprowadzonych przez Doktoranta badań, których sama metodyka opisana jest na 23 stronach pracy, po krótkim opisie prowadzonych badań przejdę bezpośrednio do podsumowania i oceny osiągniętych wyników i wyciągniętych przez Autora pracy wniosków.

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl

Doktorant deklaruje, że punktem wyjścia do projektowania potencjalnego nowego produktu leczniczego był potencjalny lek przeciwnowotworowy Dulanermin, którego rozwój wstrzymano na etapie drugiej fazy badań klinicznych.

Zaprojektowane przez Doktoranta białko fuzyjne o akronimie scINFTR3.0 składało się z łańcucha pochodzącego z cząsteczki TRAIL oraz domeny interferonowej połączonej z jego N-końcem. Połączeniem była dodatkowa sekwencja składająca się z pięciu elementów umożliwiających aktywację w odpowiednim środowisku a także poprawiających stabilność i rozpuszczalność, a także umożliwiająca dodatkową modyfikację powierzchniową w procesie biokoniugacji.

Otrzymanie zaprojektowanego białka fuzyjnego obejmowało etapy polegające na pozyskaniu genów kodujących składowe białka, klonowaniu molekularnym oraz transformacji komórek bakteryjnych w systemie pET. Ekspresja białek była prowadzona w wybranych 5 szczepach *E. coli.* Procedura produkcji i oczyszczania białka została zoptymalizowana w relatywnie wysokiej skali dla otrzymania 1g produktu. Ilość ta umożliwiła przeprowadzenie bardzo szerokich badań własności fizykochemicznych produktu a także testów aktywności biologicznej, w tym testy interakcji z celami molekularnymi, badania aktywności *in vitro* i *in vivo*.

Badania własności fizykochemicznych, niezwykle istotnych dla aktywności białka fuzyjnego, obejmowały m. innymi oznaczenia czystości (metodą elektroforezy SDS-PAGE), potwierdzenie tożsamości (techniką Western Blot), weryfikację masy i homogenności trimeru (techniką chromatografii żelowej SEC-HPLC) oraz monomeru (technika LC/MS) a także weryfikację struktury drugorzędowej (metodą dichroizmu kołowego). Interakcje z celami molekularnymi badane były technikami plazmowego rezonansu powierzchniowego (SPR) oraz interferometrią. Badania aktywności produktu *in vitro* polegały na testach efektu toksycznego wobec wybranych linii komórek nowotworowych, w tym z uwzględnieniem wpływu osocza na aktywność cytotoksyczną (test MTT), badaniu wpływu białka na integralność błon komórkowych i analizie morfologicznych zmian w komórkach nowotworowych, analizie cyklu komórkowego oraz na innych szczegółowych analizach aktywności biologicznej, np. aktywności kaspazy 3, zmiany potencjału mitochondrialnego, wykrywaniu ciętej formy białka Bid czy cięcia PARP. Ostatnim etapem pracy było badanie aktywności biologicznej wybranego wariantu białka TRAIL-IFN *in vivo* w mysich ksenoprzeszczepach ludzkich guzów nerki, wątroby i okrężnicy, oraz badania wpływu na komórki układu immunologicznego. Podsumowując bardzo szeroki zakres badań jaki obejmuje rozprawa, Doktorant przeprowadził badania składające się na zasadnicze etapy rozwoju nowego

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl

produktu leczniczego - od etapu projektu innowacyjnej cząsteczki do zaawansowanych badań przedklinicznych.

Podsumowując rezultaty prowadzonych badań Doktorant stwierdza, że otrzymane białko fuzyjne scINFTR3.0 ma niestety niewielkie szanse na przejście kolejnych etapów rozwoju leku pomimo, że wzbogacenie TRAIL o dodatkowy mechanizm działania podniosło jego aktywność antyproliferacyjną i wzmocniło aktywność cytotoksyczną, nawet w liniach komórkowych opornych na TRAIL, nie wykazywało również wzrostu efektu cytotoksycznego w komórkach prawidłowych. Białko scINFTR3.0 w badaniach nad mechanizmami śmierci komórkowej, prowadzonych z zastosowaniem markerów apoptozy również wykazywało przewagę nad TRAIL. Znaczące ograniczenia pojawiły się natomiast w eksperymentach *in vivo*. Wiązały się z ograniczoną rozpuszczalnością produktu oraz z niedostateczną aktywnością przeciwnowotworową w mysich modelach nowotworów ludzkich. Dyskusyjne jest jednak, na ile model ten w pełni odpowiada nowotworom ludzkim. Problematyczne również jest bezpieczeństwo stosowania potencjalnego leku, związane głównie z jego dawką. W przypadku otrzymanego białka fuzyjnego trudne byłoby uzyskanie dawki równocześnie bezpiecznej i efektywnej, dla której domena interferonu będzie jeszcze bezpieczna a domena TRAIL już aktywna.

Wskazując w dyskusji niewątpliwe zalety ale również poważne ograniczenia związane z potencjalnym stosowaniem w klinice testowanej innowacyjnej molekuły Doktorant proponuje możliwe modyfikacje struktury otrzymanego białka fuzyjnego mające na celu usunięcie „wad" cząsteczki. Stawia pod rozwagę również sensowność przeprowadzenia rozszerzonych testów stabilności cząsteczki z uwzględnieniem warunków które mogą podwyższyć jej rozpuszczalność czy testów oddziaływania cząsteczki z celem molekularnym w bardziej złożonych warunkach. Należy stwierdzić, że dyskusja wyników przeprowadzonych eksperymentów jest bardzo szeroka i udowadnia wszechstronną wiedzę Doktoranta w zakresie prowadzonych badań. Praca jest w mojej opinii bardzo wartościowa i trudno wskazać jej słabe strony.

Jedyna uwaga krytyczna, jaka mogę przedstawić dotyczy spraw po części formalnych: Doktorant ma tendencję do bardzo szerokiej analizy prowadzonych działań i dyskusji ich wyników. Jest to bardzo cenne w rozdziale *Dyskusja* czy w podsumowaniach efektów prowadzonych badań. Ta tendencja natomiast znacząco utrudnia czytelnikowi zapoznanie się z wynikami eksperymentów. W mojej ocenie szeroka dyskusja wyników z odnoszeniem się np. do efektów badań poprzednich czy do danych literaturowych nie powinna jednak pojawiać się w rozdziale *Wyniki*. Jest to jednak uwaga natury głównie formalnej.

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl

Podsumowując pragnę stwierdzić, że mgr Bartłomiej Żerek przedłożył bardzo wartościową pracę, wnoszącą poważny wkład do wiedzy na temat projektowania, metod otrzymywania, badania aktywności i wybranych parametrów farmakokinetycznych białek fuzyjnych oddziałujących z więcej niż jednym celem molekularnym i wykazujących więcej niż jeden szlak sygnałowy, przeznaczonych do terapii celowanej nowotworów.

Doktorant wykazał się umiejętnością tworzenia hipotezy badawczej, projektowania i przeprowadzenia bardzo złożonych eksperymentów z zakresu zarówno szeroko rozumianej inżynierii genetycznej jak i badania własności i aktywności biologicznej białek fuzyjnych, w tym wpływających na aktywność związków białkowych własności fizykochemicznych, badania ich wiązania z celem molekularnym oraz aktywności biologicznej *in vitro* i *in vivo*. Wykazał również wysokie kompetencje w zakresie analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków.

W mojej ocenie recenzowana rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie pana mgr Bartłomieja Żerka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom recenzowanej pracy, oryginalność stosowanych metod badawczych, szczególne walory poznawcze i aplikacyjne oraz fakt, że wyniki badań są przedmiotem wynalazku zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana magistra Bartłomieja Żerka.

Warszawa 18 czerwca 2021

Prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl