UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Zakład Biotechnologii
15-089 Białystok, ul. Kilińskiego 1
Tel. (85) 748-57-01, FAX (85) 879-57-18

aniabiel@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bielawska **Białystok, 03. 07. 2021**

Ocena pracy doktorskiej mgr Bartłomieja Żerka pt. "Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego TRAIL – IFNγ do celowanej terapii przeciwnowotworowej"

Nowotwory są bardzo trudnym celem terapeutycznym, co wiąże się z różnorodnością rasową i osobniczą człowieka, heterogennością guzów, zarówno nowotworów pierwotnych jak i zmian przerzutowych, z warunkami środowiskowymi, które mogą wpływać na rozwój i postęp choroby nowotworowej. Według najnowszych doniesień tylko 20-75% chorych na nowotwory odpowiada na standardowe leczenie. W przypadku niektórych nowotworów, np. czerniaka ten odsetek jest jeszcze niższy i zamyka się w przedziale od 4-12%. Jednocześnie, np. w USA, ponad 100 000 chorych umiera z powodu reakcji niepożądanych (toksyczności) związanych z terapią. W związku z tym istotnie wzrasta zapotrzebowanie na bardziej efektywne i bezpieczne leki przeciwnowotworowe. Jedną ze strategii staje się zatem rozwój medycyny spersonalizowanej, która zyskuje coraz większe znaczenie w onkologii. Na bazie wiedzy z zakresu genomiki, biologii molekularnej, biotechnologii, toksykologii oraz immunologii coraz prostsze staje się optymalizowanie i indywidualizowanie terapii ogólnoustrojowej stosowanej u chorych na nowotwory. Wiele nowych obiecujących leków i testów

genomicznych pozwalających na optymalizację leczenia znajduje się ciągle jeszcze na etapie badań klinicznych. Rezultaty obserwowane w ramach wczesnych badań klinicznych (I i II fazy) napawają ogromnym optymizmem i stanowią zapowiedź dalszego, oczekiwanego postępu w personalizowanej onkologii.

Gwałtowny rozwój terapii celowanej w onkologii związany jest z oczekiwaniem większej skuteczności leczenia, wysokim kosztem wprowadzania leków na rynek, odkryciami nowych biomarkerów, czy szybkim rozwojem technologii genomicznych. Badania genomu człowieka pomogły zidentyfikować szereg molekularnych markerów predyspozycji do zachorowania, rozwinąć szereg badań przesiewowych oraz prognostycznych, jak również ułatwiły przewidywanie i monitorowanie reakcji na leki. Wprowadzanie terapii celowanej na rynek ochrony zdrowia spotyka się jednak ze starciem różnych interesów dużych firm farmaceutycznych. Niektóre, takie jak Roche (Basel, Szwajcaria), ostatnio Amgen (Thousand Oaks, USA) czy Genzyme (Boston, USA) inwestując w terapię celowaną przyjęły, że strategia ta jest przyszłością medycyny. Z kolei inne firmy farmaceutyczne uważają jednak, że ograniczanie liczby chorych leczonych dopuszczonym już do obrotu specyfikiem, znacznie obniży ich dochody. Obecne procedury rejestracyjne i refundacyjne wymagają, gdzie jest to możliwe, przedstawienia wyników badań uwzględniających rolę biomarkerów jako czynników predykcyjnych przy wyborze docelowej grupy chorych, którzy najkorzystniej odpowiadają na dane leczenie. Przykładem może być sytuacja, w której EMEA odmówiła dopuszczenia do obrotu w Europie przeciwciała monoklonalnego stosowanego w leczeniu raka jelita grubego (panitumumab). Producent natychmiast przedstawił wyniki badań z uwzględnieniem biomarkera i uzyskał warunkowe dopuszczenie do obrotu w monoterapii u chorych, którzy nie odpowiedzieli na standardową chemioterapię, a zmiany przerzutowe wykazywały ekspresję EGER oraz dziki gen *K-RAS*.

W świetle przytoczonych faktów wybór tematu pracy doktorskiej mgr Bartłomieja Żerka pt. "Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego TRAIL – IFNγ do celowanej terapii przeciwnowotworowej" jest istotny, aktualny i interesujący, o dużych walorach praktycznych. Układ przedstawionej do recenzji pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, z podziałem na rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i literaturę. Rozprawa doktorska mgr Bartłomieja Żerka liczy 133 strony tekstu, w których zawartych jest 66 rysunków i 30 tabel. Tabele i rysunki umieszczono w tekście, co znacznie ułatwia korzystanie z nich w czasie czytania. Doktorant posługuje się precyzyjnym, zwięzłym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Zwraca uwagę wielka staranność graficzna i edytorska pracy. Piśmiennictwo liczy 258 pozycji i jest właściwie dobrane i cytowane.

We wstępie pracy Doktorant perfekcyjnie przedstawia informacje szeroko naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W rozdziałach tych Autor omawia zagadnienia dotyczące struktury interferonu IFN-α, IFN-γ i odziaływanie z receptorem, odpowiedź interferonową w nowotworach, skuteczność kliniczną interferonów. Druga część wstępu dotyczy ligandu TRAIL. Autor scharakteryzował strukturę, funkcje, mechanizmy działania, oporności i trudności aplikacyjne związane z ligandem TRAIL. Doktorant posługuje się precyzyjnym, zwięzłym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Wstęp pracy doktorskiej jest doskonałym wprowadzeniem czytelnika do dalszej części dysertacji.

Celem pracy doktorskiej mgr Bartłomieja Żerka pt. "Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego TRAIL – IFNγ do celowanej terapii przeciwnowotworowej" było opracowanie aktywnej muteiny w formie białka fuzyjnego opartej na cząsteczce z grupy interferonów oraz na zoptymalizowanej sekwencji liganda TRAIL. Założono, że nowo zaprojektowana muteina

scINFTR3.0 powinna oddziaływać z więcej niż jednym celem molekularnym i wykazywać mechanizm angażujący więcej, niż jeden szlak sygnałowy. Postawiony cel badawczy jest niezwykle ambitny i interesujący. Wielu autorów potwierdziło synergizm lub komplementarność działania liganda TRAIL oraz cząsteczek z grupy interferonów. Dysertacja obejmuje projektowanie rekombinowanych wariantów białka fuzyjnego TRAIL–IFNγ, produkcję tego białka, analizę jego właściwości fizykochemicznych, badanie interakcji uzyskanego białka fuzyjnego z celami molekularnymi oraz szeroko zakrojone badania aktywności biologicznej *in vitro* i *in vivo*. Badania biotechnologiczne, fizykochemiczne, biologiczne i farmakologiczne budzą ogromny podziw Recenzentki. Są one doskonale zaplanowane, przemyślane, wykonane i precyzyjnie opisane w recenzowanej dysertacji, co potwierdza, iż Doktorant pracował w zespole badawczym kierowanym przez wybitnego naukowca - Profesor Elżbietę Pękalę.

Najważniejszym celem przy konstruowaniu scINFTR3.0 było wyposażenie liganda śmierci w dodatkowy, niezależny od apoptozy mechanizm, który miał uwrażliwiać komórki nowotworowe na TRAIL, a także powinien stymulować lokalne komórki układu immunologicznego gospodarza do silnej odpowiedzi immunologicznej i dodatkowej produkcji ligandów rodziny TNF. Celem dysertacji było też obniżenie dolegliwości związanych z toksycznością ogólnoustrojową i efektami ubocznymi stosowania interferonu. Ponadto, zwiększenie masy cząsteczkowej poprzez połączenie dwóch molekuł, miało poprawić właściwości farmakokinetyczne uzyskanego białka fuzyjnego.

Autor zaprojektował oraz opracował metodę produkcji białka fuzyjnego scINFTR3.0, którego czystość oszacowano na ponad 90%. Masę cząsteczki w warunkach denaturujących oraz natywnych Doktorant wyznaczył techniką sączenia molekularnego, którą następnie potwierdził na spektrometrze mas. Posługując się techniką SPR i urządzeniem Biacore3000 Autor sprawdził

funkcjonalność domeny TRAIL poprzez testy oddziaływania z receptorami DR4 oraz DR5.

Bardzo bogatą częścią dysertacji, obfitującą w liczne eksperymenty są rozdziały poświęcone badaniom na liniach komórkowych. Na podstawie uzyskanych wyników badań opisanych w rozprawie doktorskiej bez cienia wątpliwości można stwierdzić, że wzbogacenie TRAIL o dodatkowy mechanizm działania podniosło jego aktywność antyproliferacyjną i skutkowało poprawą potencjału cytotoksycznego *in vitro*. Badania cytotoksyczności Doktorant przeprowadził aż na 28 liniach komórkowych. Dotyczy to także linii komórkowych opornych na TRAIL. Należy podkreślić fakt, że scINFTR3.0 nie wykazuje znaczącego efektu cytotoksycznego wobec badanych komórek prawidłowych gruczołu sutkowego MCF-10A czy żyły pępowinowej HUV-EC-C. Badania biologiczne *in vitro* są imponujące, obfitują w mnóstwo metod i co za tym idzie wyników. Autor określił różnice aktywności pomiędzy cząsteczką TRAIL oraz scINFTR3.0. W przypadku linii wrażliwych na TRAIL zaobserwowano synergizm działania, natomiast wobec linii niewrażliwych na TRAIL, zaobserwowano przełamanie oporności, nawet w przypadku linii wykazujących niski poziom ekspresji receptorów DR4 i DR5.

W przypadku leków białkowych problemem jest ich oddziaływanie na układ immunologiczny. Zarówno w przypadku TRAIL, jak i scINFTR3.0 okazało się, że składniki osocza pozostają niemalże bez wpływu dla cytotoksycznej aktywności tych białek (testy na liniach wrażliwych na TRAIL – NCI-H460, HCT116), co pozwoliło zakwalifikować je do podania dożylnego. W kolejnym etapie badań Autor badał wpływ uzyskanej muteiny scINFTR3.0 na proces apoptozy: wpływ białka fuzyjnego na błonę komórkową oraz błonę mitochondrialną, przebieg cyklu komórkowego, wzrost poziomu aktywnych kaspaz oraz ich produktów. Badania cytometryczne jednoznacznie potwierdziły przewagę białka scINFTR3.0 nad TRAIL. Przeprowadzone badania na liniach komórkowych potwierdziły słuszność zastosowania rozwiązania łączącego

ligand Apo2 i IFN-γ w jedną cząsteczkę. Wyniki testów cytotoksyczności oraz markerów procesu apoptozy były niezwykle satysfakcjonujące, co zachęciło Doktoranta do podjęcia badań *in vivo*.

Badania *in vivo*, mgr Bartłomiej Żerek przeprowadził na samicach mysich szczepu Crl:SHO-*Prkdc*^{scid}*Hr*^{hr} o obniżonej odporności, gdzie Autor wykazał niedostateczną aktywność przeciwnowotworową uzyskanego białka scINFTR3.0. Jednocześnie Autor rozprawy doktorskiej zwraca uwagę na istotny fakt, że zarówno TRAIL jak i IFN-γ wykorzystane w zaprojektowanej cząsteczce są sekwencjami ludzkimi, różniącymi się od mysich, co może wpływać na uzyskane wyniki. Dużym problemem okazała się ograniczona rozpuszczalność uzyskanej muteiny scINFTR3.0 w roztworach wodnych uniemożliwiająca zastosowanie wyższych dawek preparatu oraz wyznaczenie dawki MTD. Autor zbadał również aktywność przeciwnowotworową białka fuzyjnego scINFTR3.0 w mysim modelu wątroby PLC/PRF/5, w mysim modelu raka okrężnicy oraz w mysim modelu raka nerki. W każdym z tych eksperymentów obserwowano zmniejszenie objętości guza, ale niestety nie doszło do całkowitego wyleczenia. Reasumując, eksperymenty zawarte w rozprawie doktorskiej są bardzo dobrze zaplanowane, prowadzone w oparciu o głęboką wiedzę, intuicję i zdolności organizacyjne Doktoranta mgr Bartłomieja Żerka i Jego Promotor Prof. Elżbietę Pękalę.

Z wielką przyjemnością recenzentka zapoznała się z rozdziałem "Dyskusja", w którym Doktorant przeprowadził szczegółową analizę uzyskanych wyników oraz dokonał konfrontacji badań własnych z osiągnięciami innych zespołów badawczych. Praca doktorska mgr Bartłomieja Żerka zdaniem recenzentki ma charakter nowatorski i wnosi istotny wkład w farmakoterapię chorób nowotworowych.

Praca doktorska mgr Bartłomieja Żerka rodzi pytanie: Czy Doktorant widzi potrzebę dalszej modyfikacji rekombinowanego białka fuzyjnego TRAIL – IFNγ w celu poprawy jego właściwości terapeutycznych? Autor przeprowadził

badania na bardzo szerokim zbiorze linii nowotworowych *in vitro*, jak *in vivo*, wobec czego pragnę zapytać, jaka grupa nowotworów może być celem molekularnym uzyskanego białka fuzyjnego?

Można uznać, że choć podjęte przez Doktoranta badania mają charakter podstawowy to mogą mieć one konsekwencje aplikacyjne, czego dowodem są dwa zgłoszenia patentowe – patent polski i patent międzynarodowy. Połączenie tych dwóch cech stanowi o poważnym ciężarze gatunkowym wyników przedstawionych w pracy. Widać ogrom pracy eksperymentalnej, wielu przemyśleń i dyskusji naukowych na najwyższym, światowym poziomie. Należy również podkreślić dorobek naukowy mgr Bartłomieja Żerka, jest On jest autorem, lub współautorem 6 znaczących prac naukowych o wysokich współczynnikach oddziaływania IF, wynoszącym łącznie 12,734, 370 punktów MNiSW.

Z obowiązku recenzenta chcę zwrócić uwagę na drobne błędy edytorskie, np. str 106, str.103 zamiast „kwas dwucynochinonowy" powinno być kwas biscynochinonowy, na str.106 na rysunku 63 niepodpisana jest oś Y i błędnie podpisane są krzywe, cytogramy na rysunkach 45-51, 53, 54, 56-59 są zbyt małe, a przez to są nieczytelne. Oczywiście, są to drobne uchybienia, absolutnie nie wpływające na wartość merytoryczną pracy.

Reasumując przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Bartłomieja Żerka pt. "Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego TRAIL – IFNγ 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, jest na najwyższym światowym poziomie i 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 Bartłomieja Żerka do wyróżnienia.

KIEROWNIK
Zakład Biotechnologii
prof. dr hab. Anna Bielawska