

UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Zakład Biochemii Farmaceutycznej



Bartłomiej Żerek

*Opracowanie nowego rekombinowanego białka fuzyjnego
TRAIL – IFN γ do celowanej terapii przeciwnowotworowej*

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Promotor pracy: prof. dr hab. Elżbieta Pękała

Kraków 2021

Streszczenie

TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), występujący w piśmiennictwie również jako Apo-2 ligand, od czasów jego odkrycia w połowie lat dziewięćdziesiątych do dnia dzisiejszego, stanowi istotny obiekt zainteresowań grup badawczych wyspecjalizowanych w pracach nad nowymi terapiami przeciwnowotworowymi. Zainteresowanie tą cząsteczką wynika z faktu, iż prawie od samego początku jest ona identyfikowana jako molekula zdolna do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych przy jednoczesnym zachowaniu bezpieczeństwa wobec komórek zdrowych. Tym samym odkrycie TRAIL zainicjowało eksplorację koncepcji wykorzystania apoptozy zależnej od receptorów śmierci (ang. Death Receptors) w terapii celowanej. W oparciu o powyższą ideę powstały i zostały przetestowane w ramach badań przedklinicznych oraz klinicznych dziesiątki kandydatów na leki w postaci rekombinowanych ligandów, agonistycznych przeciwciał monoklonalnych oraz białek fuzyjnych. Do tej pory jednak nikomu nie udało się zarejestrować leku do terapii jakiegokolwiek typu nowotworu. Przyczyn braku wystarczającej efektywności i przewagi nad aktualnymi standardami w testowanych wskazaniach upatrywać można na kilku przynajmniej płaszczyznach. Pierwszą zaobserwowaną jest oporność niektórych typów komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną TRAIL. Ta z kolei może wynikać

z obniżonego poziomu ekspresji DR4/5, mutacji lub wad strukturalnych DR4/5, wiązania TRAIL przez receptory wabiki DcR1/2, aktywności białek zakłócających kaskadę sygnałową (np. cFLIP, IAPs, Bcl-2, Bcl-XL, Akt, MAPK, NF- κ B, IL-8), czy braku ekspresji kaspaz. Ponadto powodów niedostatecznej skuteczności testowanych cząsteczek naukowcy doszukują się także w trudności w zoptymalizowaniu schematu dawkowania, niewystarczającej stabilności kandydatów na leki oraz braku wystarczająco informatywnego zestawu biomarkerów. Do rozwoju, po prostych modyfikacjach ligandów poprawiających parametry PK, specyficzność oraz stabilność cząsteczek, trafiają dziś przeciwciała monoklonalne, biokoniugaty, cząsteczki oparte o domeny scFv, Fab oraz białka fuzyjne. Dodatkowo testowana jest skuteczność kombinacji agonistów DR4/5 ze znanymi lekami (cytostatykami, inhibitorami kinaz, peptydami proapoptocycznymi).

Obecnie szeroko eksplorowana jest koncepcja „wzbogacania” analogów TRAIL o domeny wykazujące dodatkowy, inny niż apoptoza, mechanizm działania. Jednym z proponowanych rozwiązań jest otrzymanie rekombinowanych fuzji Apo2L/TRAIL z domenami ludzkich interferonów. Wartością dodaną takich struktur w założeniu są: stymulacja komórek układu

immunologicznego do walki z nowotworem, celowane dostarczenie interferonu, wydłużenie $t_{1/2}$ rekombinowanego TRAIL oraz – co najbardziej istotne – uwrażliwienie komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną przez TRAIL wynikające z indukcji przez IFN genów kodujących białka odpowiedzialne za pozytywną regulację szlaku apoptozy.

Zaproponowana, częściowo przetestowana i opisana w niniejszej pracy rekombinowana fuzja TRAIL-IFN w większości wykorzystanych modeli badawczych (aktywność cytotoksyczna in vitro, badanie mechanizmów śmierci komórkowej, analiza cyklu komórkowego, badanie morfologii komórek, efektywność przeciwnowotworowa in vivo) wykazuje istotną przewagę nad rekombinowanym wariantem ludzkiego TRAIL. Z punktu widzenia prób opracowania kandydata na lek wyzwania na przyszłość stanowią: stabilność samej cząsteczki oraz jej formuacja, a także dobór optymalnej dawki terapeutycznej, tak aby obydwie komponenty rekombinowanego białka zachowały pożądaną profil aktywności i bezpieczeństwa.

Słowa kluczowe: apoptoza, mechanizmy śmierci komórkowej, TRAIL, interferon, rekombinowane białka fuzyjne, czynniki immunostymulujące, terapia przeciwnowotworowa, rozwój leków oryginalnych