



Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Michał Mikitiuk

Opracowanie multispecyficznych, fuzyjnych białek indukujących ukierunkowaną, lizosomalną degradację receptorów hamujących aktywność układu immunologicznego

Development of multispecific fusion proteins inducing
targeted lysosomal degradation of receptors inhibiting
the activity of immune system

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie biotechnologia

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Bielawski
Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej

GDAŃSK 2024

Pragnę wyrazić najszczerze podziękowania dla wszystkich osób, które umożliwiły realizację niniejszego projektu oraz udzieliły mi wszelkiego wsparcia. W szczególności podziękowania kieruję do:

Dr. Tomasza Sitara

Za dostrzeżenie we mnie potencjału na wczesnym etapie mojej kariery i danie mi sposobności na wykazanie się, czemu zawdzięczam cały mój dalszy rozwój zawodowo-naukowy, w tym realizację niniejszego doktoratu

Prof. Krzysztofa P. Bielawskiego

Za podjęcie się opieki nad projektem oraz wszelką pomoc, w szczególności w kwestiach formalno-administracyjnych

Prof. Tadeusza A. Holaka

Za nieocenioną pomoc w pisaniu mojej pierwszej publikacji

Dr. Przemysława Bielskiego i Jana Barczyńskiego

Za wspólne pokonywanie trudności i wyzwań w pracy badawczej

Dr hab. Andrei D. Lipińskiej

Za umożliwienie przeprowadzenia eksperymentów z wykorzystaniem cytometru przepływowego oraz wsparcie merytoryczne

Weroniki oraz moich rodziców: Ewy i Grzegorza

Za niezłomną wiarę we mnie oraz wszelkie wsparcie emocjonalne

Rozprawa doktorska została przygotowana w Recepton Sp. z o.o. pod opieką dr. Tomasza Sitara, w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy, współfinansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr projektu DWD/4/54/2020).

1. SPIS TREŚCI

1. Spis treści.....	4
2. Streszczenie	6
3. Abstract	7
4. Wykaz skrótów	8
5. Wstęp.....	11
5.1. Nowotwory	11
5.1.1. Mechanizm nowotworzenia	12
5.1.2. Modele powstawania guza.....	14
5.1.3. Przerzutowanie.....	15
5.2. Odpowiedź immunologiczna w nowotworach	18
5.2.1. Odpowiedź immunologiczna w metastazie	20
5.2.2. Białka szoku termicznego	21
5.3. Immunoterapia nowotworów	21
5.3.1. Zasada działania blokady punktu kontrolnego	23
5.3.2. Immunoterapia komórkowa	25
5.3.3. Oporność na immunoterapię i terapię kombinowane	27
5.3.4. Wpływ klonalnej ekspansji limfocytów T w krwi obwodowej na odpowiedź na terapię.....	31
5.3.5. Rola rozpuszczalnych form PD-L1 w oporności na immunoterapię	32
5.4. System insulinopodobnego czynnika wzrostu.....	33
5.5. Technologie ukierunkowanej degradacji białek	34
5.5.1. Technologia ukierunkowanej degradacji proteasomalnej (PROTAC).....	35
5.5.2. Technologia ukierunkowanej degradacji lizosomalnej (LYTAC).....	37
5.5.3. Technologia ukierunkowanej degradacji fagocytarnej (AUTAC, ATTEC)	44
6. Cel pracy	46
7. Materiały i metody.....	47
7.1. Materiały.....	47
7.1.1. Odczynniki i materiały zużywalne	47
7.1.2. Aparatura	56
7.2. Metody	58
7.2.1. Modelowanie molekularne polipeptydów bazujących na IGF2, niewykazujących powinowactwa do IGFIR 58	
7.2.2. Projektowanie konstruktów genetycznych.....	58
7.2.3. Hodowla bakteryjna i przygotowanie komórek kompetentnych.....	64
7.2.4. Transformacja	65
7.2.5. Oczyszczanie DNA plazmidowego	65
7.2.6. Trawienie enzymami restrykcyjnymi	65
7.2.7. Elektroforeza w żelu agarozowym	66
7.2.8. Oczyszczanie fragmentów DNA z żelu agarozowego i po reakcjach enzymatycznych.....	66
7.2.9. Ligacja.....	66

7.2.10.	PCR.....	67
7.2.11.	Hodowla ssaczych komórek zawieszonych (CHO, HEK29).....	68
7.2.12.	Transfekcja komórek ssaczych i rozwój stabilnych linii komórkowych	69
7.2.13.	Przygotowanie banków komórkowych	70
7.2.14.	Produkcja białek ze stabilnych linii komórkowych.....	71
7.2.15.	Produkcja przejściowa.....	71
7.2.16.	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE.....	72
7.2.17.	Western blot.....	73
7.2.18.	Określanie stężenia produktu w hodowli komórkowej z wykorzystaniem ultra wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej.....	74
7.2.19.	Analityczna chromatografia wykluczania.....	75
7.2.20.	Oczyszczanie białek.....	75
7.2.21.	ELISA.....	76
7.2.22.	Hodowla nowotworowych komórek adherentnych	77
7.2.23.	Test blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1.....	77
7.2.24.	Analiza stopnia internalizacji z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.....	78
7.2.25.	Wizualizacja internalizacji z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej.....	79
7.2.26.	Test cytotoksyczności	79
7.2.27.	Test cytotoksyczności w ko-kulturze komórek nowotworowych z komórkami jednojądrzastymi krwi obwodowej.....	79
8.	Wyniki.....	80
8.1.	Produkcja i oczyszczanie cząsteczek referencyjnych	80
8.2.	Przeciwciało C5 wiąże PD-L1, jednocześnie nie blokując interakcji PD-1/PD-L1.....	86
8.3.	Wymodelowane peptydy wiążą IGF2R-D11, jednocześnie nie wykazując powinowactwa do IGF1R.....	89
8.4.	Projektowanie, produkcja i oczyszczanie cząsteczek LYTAC.....	91
8.5.	Otrzymane cząsteczki LYTAC wiążą wybrane cele molekularne i tworzą trójąsteczkowy kompleks	97
8.5.1.	Potwierdzenie wiązania celów molekularnych metodą ELISA.....	97
8.5.2.	Potwierdzenie tworzenia kompleksu z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania.....	98
8.6.	Otrzymane cząsteczki LYTAC indukują internalizację znakowanego fluorescencyjnie rozpuszczalnego, zewnątrzkomórkowego celu molekularnego w zależności od czasu	106
8.7.	Otrzymane cząsteczki LYTAC indukują internalizację transmembranowego celu molekularnego w zależności od stężenia	110
8.8.	Otrzymane cząsteczki LYTAC wykazują zwiększony poziom lizy komórek nowotworowych w obecności komórek jednojądrzastych krwi obwodowej.....	114
8.9.	Otrzymana cząsteczka C5M1A sama w sobie nie wykazuje cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych	119
9.	Dyskusja.....	122
10.	Wnioski.....	128
11.	Piśmiennictwo	129
12.	Spis rycin.....	141
13.	Spis tabel.....	144

2. STRESZCZENIE

Mimo istotnych postępów w nauce na przestrzeni ostatnich lat nowotwory wciąż są w czołówce przyczyn śmierci w krajach rozwiniętych. Dynamiczny rozwój immunoterapii daje nadzieję wielu chorym, którzy przy klasycznie stosowanej chemioterapii mieliby znacząco niższe szanse na przeżycie. Immunoterapia nie jest jednak lekarstwem ostatecznym – część pacjentów nie odpowiada na leczenie. Przyczyna tego stanu rzeczy nadal nie została w pełni opisana. W grę wchodzi bowiem szereg zmiennych na poziomie indywidualnym. Stąd, jednym z podejść do problemu jest poszukiwanie cząsteczek aktywnych o nowych mechanizmach działania. Przykładem takich cząsteczek są opracowane w ramach niniejszej pracy Lysosome Targeting Chimeras (LYTAC). Cząsteczki te wykazują powinowactwo do wybranego celu molekularnego przeznaczonego do degradacji oraz jednocześnie receptora indukującego degradację lizosomalną, w tym przypadku IGF2R (CI-M6PR). W toku prac wykazano, że cząsteczki te zdolne są do skutecznej internalizacji celu molekularnego (w tym przypadku punktu kontrolnego układu odpornościowego – PD-L1) zarówno w formie rozpuszczalnej, jak i transbłonowej. Internalizacja zależna jest od czasu i zaaplikowanego stężenia. Istotnym wyróżnikiem opracowanych cząsteczek jest możliwość produkcji bezpośrednio z komórek, bez konieczności stosowania jakichkolwiek modyfikacji chemicznych oraz wykazany brak powinowactwa do receptora IGF1R. Cząsteczki tego typu powinny indukować analogiczną odpowiedź na poziomie komórkowym, co zastosowanie blokady punktu kontrolnego. Właściwość ta została wstępnie wykazana *in vitro* w teście cytotoksyczności z jednojądrzastymi komórkami krwi obwodowej. Opracowane cząsteczki LYTAC indukowały znacząco wyższy poziom lizy komórek nowotworowych w porównaniu z dopuszczonymi do użycia u ludzi przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi na ten sam cel molekularny. Technologie ukierunkowanej degradacji dają więc nadzieję na wprowadzenie w przyszłości terapii opartych na nowych mechanizmach, zarówno przeciwnowotworowych, jak również celujących w choroby, na które odnalezienie inhibitora klasycznymi metodami racjonalnego projektowania leków (takich jak np. choroba Alzheimera) jest niemożliwe.

3. ABSTRACT

Despite significant advancements in oncology in recent years, cancer is still among the top death causes in highly developed countries. Development of immunotherapy gives hope to many suffering from cancer, who would have significantly lower survival chances when treated with chemotherapy. Unfortunately, not all patients respond equally to immunotherapy. The reason behind this is still not well understood, as individual differences between cancers of the same type can be significant. One of the approaches to overcome this problem is to create molecules with innovative mechanisms of action. An example of such molecules is Lysosome Targeting Chimeras (LYTAC) developed within the scope of the present dissertation. LYTACs are bispecific compounds that exhibit affinity for a selected molecular target (intended for degradation) and - at the same time - a receptor which induces lysosomal trafficking. Herein, IGF2R (CI-M6PR) has been selected as the lysosome-targeting receptor. In the course of the work, it was shown that the developed molecules are capable of inducing internalization of a selected immune checkpoint (PD-L1) in both soluble and transmembrane forms. The intensity of internalization depends on time and applied LYTAC concentration. A significant distinguishing feature of the molecules developed within this work is that they are completely genetically encoded (there is no need for chemical modifications) and they do not exhibit affinity for IGF1R. In principle, these molecules should induce a response analogous to the immune checkpoint blockade achieved with monoclonal antibodies. Engineered LYTACs induced significantly higher levels of tumor cell lysis in comparison with monoclonal antibodies approved for human use that are directed at the same molecular target. Targeted degradation technologies offer hope for the introduction of future therapies based on new mechanisms, targeting not only cancers but also other diseases for which finding an inhibitor using classical methods of rational drug design (such as Alzheimer's disease) is impossible.

4. WYKAZ SKRÓTÓW

- APC** – Komórka prezentująca antygen (ang. *Antigen Presenting Cell*)
- APS** – Nadsiarczan amonu (ang. *Ammonium Persulfate*)
- ASGPR** – Receptor asialoglikoproteinowy (ang. *asialoglycoprotein receptor*)
- ATCC** – American Type Culture Collection
- ATTEC** – Związek kierujący do autofagosomu (ang. *Autophagosome Tethering Compound*)
- AUTAC** – Chimera kierująca do autofagii (ang. *Autophagy-Targeting Chimera*)
- B2M** – β 2-mikroglobulina
- BCA** – Kwas bicinechinowy (ang. *Bicinchoninic Acid*)
- BSA** – Surowicza albumina wołowa (ang. *Bovine Serum Albumin*)
- CAR-T** – Limfocyt T z chimerycznym receptorem antygenowym (ang. *Chimeric Antigen Receptor T-cell*)
- CAR-NK** – Komórka NK z chimerycznym receptorem antygenowym (ang. *Chimeric Antigen Receptor Natural Killer*)
- CDS** – System danych chromatograficznych (ang. *Chromatographic Data System*)
- CHO** – komórki jajnika chomika chińskiego (ang. *Chinese Hamster Ovary*)
- CSC** – Komórka nowotworowa podobna do komórki macierzystej (ang. *Cancer Stem-like Cell*)
- DMSO** – Dimetylosulfotlenek
- DNA** – Kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *Deoxyribonucleic Acid*)
- EC₅₀** – Połowa maksymalnego stężenia efektywnego
- EDTA** – Kwas wersenowy (ang. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- EMA** – Europejska Agencja Leków (ang. *European Medicines Agency*)
- EMT** – Przejście epithelialno-mezenchymalne (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*)
- EPC** – Komórki progenitorowe śródbłonna (ang. *Endothelial Progenitor Cells*)
- ESCRT** – Sortujący kompleks endosomalny niezbędny do transportu (ang. *endosomal sorting complex required for transport*)
- Fab** – Fragment wiążący antygen (ang. *Fragment antigen binding*)
- Fc** – Fragment krystalizujący (ang. *Fragment crystallizable*)
- FDA** – Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)
- FN-II** – Fibronektyna o układzie typu II (ang. *fibronectin type II fold*)
- GalNAc** – N-acetylogalaktozamina
- HC** – Łańcuch ciężki (ang. *Heavy Chain*)
- HDI** – Wskaźnik rozwoju ludzkiego (ang. *Human Development Index*)
- HEK** – komórki nerki płodu ludzkiego (ang. *Human Embryo Kidney*)
- HLA** – Ludzki antygen leukocytarny (ang. *Human Leukocyte Antigen*)
- HRP** – Peroksydaza chrzanowa (ang. *Horseradish Peroxidase*)
- HyT** – Oznaczanie hydrofobowe (ang. *Hydrophobic Tagging*)
- IC₅₀** – Połowa maksymalnego stężenia inhibującego
- IDO** – 2,3-dioksygenaza indolaminy (ang. *Indoleamine 2,3-dioxygenase*)

IFN- γ – Interferon gamma

IGF1R – Receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*)

IGF2 – Insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (ang. *Insulin-like Growth Factor 2*)

IGF2R – Receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 2 (ang. *Insulin-like Growth Factor 2 Receptor*)

IL-2 – Interleukina 2

IMAC – Chromatografia powinowactwa z immobilizowanym metalem (ang. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*)

JAK – Kinazy janusowe (ang. *Janus kinases*)

KIH – Knob Into Hole

LAMP – Białko błonowe związane z lizosomami (ang. *Lysosomal-Associated Membrane Protein*)

LB – Bulion lizogenny (ang. *Lysogeny Broth*)

LC – Łańcuch lekki (ang. *Light Chain*)

LYTAC – Chimera kierująca do lizosomu (ang. *Lysosome Targeting Chimera*)

MFI – Średnia intensywność fluorescencji (ang. *Mean Fluorescence Intensity*)

MHC – Główny kompleks zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex*)

MTT – Bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenyltetrazoliowy

N/D – nie dotyczy

n/s – nieistotne (ang. *non significant*; również jako "ns")

NF- κ B – Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK – Natural Killer

NOS – Syntaza tlenu azotu (ang. *Nitric Oxide Synthase*)

OD₆₀₀ – Absorbancja przy długości fali 600 nm

ORR – Obiektywny wskaźnik odpowiedzi (ang. *Objective Response Rate*)

PBMC – Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS – Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. *Phosphate Buffered Saline*)

PBST – Sól fizjologiczna buforowana fosforanami z dodatkiem Tween 20 (ang. *Phosphate Buffered Saline Tween*)

PCR – Łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

PD-1 – Receptor programowanej śmierci 1 (ang. *Programmed cell death protein 1*)

PD-L1 – Ligand 1 receptora programowanej śmierci 1 (ang. *Programmed death-ligand 1*)

PE – Fikoerytryna (ang. *Phycoerythrin*)

PEI – Polietylenoimina (ang. *Polyethylenimine*)

PES – Polieterosulon (ang. *Polyethersulfone*)

PROTAC – Chimera kierująca do proteolizy (ang. *Proteolysis Targeting Chimera*)

PVDF – Fluorek poliwinylidenu (ang. *Polyvinylidene Fluoride*)

pz – pary zasad

RCF – Względna siła odśrodkowa (ang. *Relative Centrifugal Force*)

RNA – Kwas rybonukleinowy (ang. *Ribonucleic Acid*)

RPM – Obroty na minutę (ang. *Revolutions Per Minute*)

RT – Temperatura pokojowa (ang. *Room Temperature*)

scFv – jednołańcuchowy fragment zmienny (ang. *single chain variable fragment*)
SD – Odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)
SDS – Laurylosiarczan sodu (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate*)
SEC – Chromatografia wykluczania (ang. *Size Exclusion Chromatography*)
shRNA – krótkie RNA w formie szpilki do włosów (ang. *short hairpin RNA*)
STAT – Przetwornik sygnału i aktywator białek transkrypcyjnych (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*)
TAA – Antygeny związane z guzem (ang. *Tumor Associated Antigens*)
TAE – Bufor TRIS-Kwas octowy-EDTA
TAM – Makrofagi związane z guzem (ang. *Tumor-Associated Macrophages*)
TCR – Receptor limfocytów T (ang. *T-Cell Receptor*)
TE – Bufor TRIS-EDTA
TEMED – N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
T_h – Limfocyty T pomocnicze (CD4⁺) (ang. *Helper T-cells*)
TIL – Limfocyty infiltrujące guza (ang. *Tumor Infiltrating Lymphocytes*)
TMB – 3,3',5,5'-Tetrametylobenzydina
TMB – Obciążenie guza mutacjami (ang. *Tumor Mutational Burden*)
TME – Mikrośrodowisko guza (ang. *Tumor Microenvironment*)
T_{reg} – Limfocyty T regulatorowe
TRIS – 2-Amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diol
U – jednostka (ang. *unit*)
UPLC – Ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *Ultra (High) Performance Liquid Chromatography*)
v/v – objętość na objętość (ang. *volume per volume*)
VEGF – Czynn timerostu śródbłnki naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*)
w/v – waga na objętość (ang. *weight per volume*)

5. WSTĘP

5.1. NOWOTWORY

Nowotwory są jedną z głównych przyczyn przedwczesnych zgonów w XXI wieku. Dane z 2019 roku pokazują, że w grupie wiekowej 30 – 70 ponad 75% zgonów powodowane jest przez choroby niezakaźne. Wśród tej grupy 40% stanowią choroby sercowo-naczyniowe, a 30% – nowotwory, co daje niespełna 5 milionów przedwczesnych zgonów tylko z powodu nowotworów (Bray i in., 2021). Bray i współpracownicy wskazują na wysoką korelację stopnia rozwoju ekonomicznego kraju (ang. *Human Development Index*, HDI) z liczbą przedwczesnych zgonów na choroby nowotworowe – w krajach bardzo wysoko rozwiniętych jest to wiodąca przyczyna śmierci, podczas gdy w krajach średnio i wysoko rozwiniętych, zajmuje ona drugie miejsce, po schorzeniach układu krążenia. Autorzy argumentują, że jeśli trend się utrzyma, to pod koniec XXI wieku nowotwory zajmą czołową pozycję w statystykach śmiertelności na całym świecie, co w połączeniu z prognozowanym przyrostem populacji, stanie się dodatkowym, znaczącym obciążeniem dla globalnej służby zdrowia (Bray i in., 2021). W kolejnej analizie Bray i współpracownicy, analizują dane z 2022 roku, które mówią o 20 milionach nowych przypadków oraz 9,7 miliona śmierci z powodu nowotworów. Jednocześnie prognozują, że 20% populacji w ciągu życia zachoruje na raka, z czego ok. 11% mężczyzn i 8,3% kobiet umrze z tego powodu (Bray i in., 2024).

Analiza danych z roku 2020 dotyczących poszczególnych nowotworów wykonana przez Ferlaya i współpracowników wskazuje na największą istotność epidemiologiczną takich nowotworów jak rak piersi u kobiet, rak płuc i prostaty, podczas gdy największą śmiertelnością cechowały się nowotwory płuc, wątroby i żołądka (Ferlay i in., 2021).

Siegel i współpracownicy prognozowali, że w roku 2023 w Stanach Zjednoczonych (a więc kraju o wysokim HDI) za 48% wszystkich nowotworów u mężczyzn odpowiadać będą nowotwory płuc, jelita grubego i prostaty, gdzie 29% wszystkich diagnoz stanowić będzie rak prostaty. U kobiet za najwięcej przypadków będą odpowiadać nowotwory piersi, płuc i jelita grubego – 52% łącznie, z czego 31% wszystkich diagnoz stanowić będzie rak piersi. W przypadku śmiertelności statystyki wyglądają podobnie, jednak w tym przypadku najwyższą śmiertelnością odznaczać się będzie rak płuc, z czego 81% przypadków będzie bezpośrednio związane z używaniem tytoniu (Siegel i in., 2023).

Pewną dozą optymizmu wyróżnia się analiza wykonana przez Santucci i współpracowników, według której, na przestrzeni ostatnich trzech dekad (1990 – 2016) śmiertelność na skutek nowotworów spadła (z wyjątkiem raka trzustki i raka płuc u kobiet).

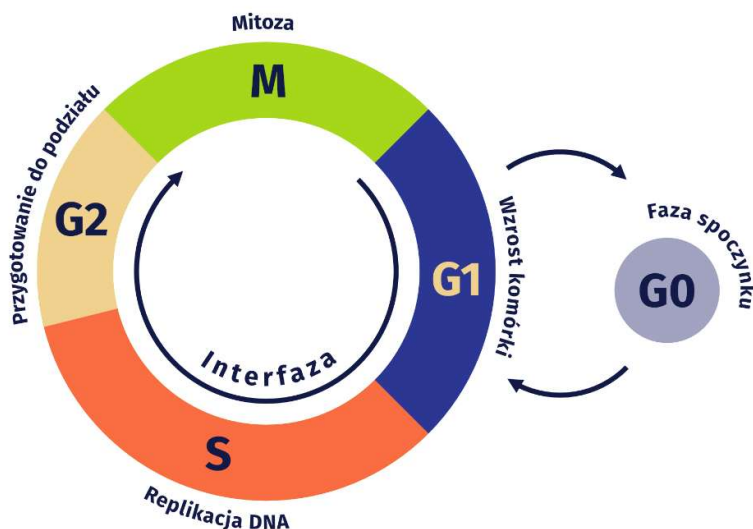
Jako przyczynę tego stanu rzeczy autorzy wskazują na rozwój zarówno profilaktyki (ograniczenie ekspozycji na czynniki ryzyka), diagnostyki, jak i metod leczenia (Santucci i in., 2020).

W nadchodzących latach globalna służba zdrowia niewątpliwie będzie mierzyła się z nowymi wyzwaniami związanymi z chorobami nowotworowymi, na co wpływ będzie miał między innymi prognozowany przyrost populacji. Aby utrzymać spadkowy trend śmiertelności, popularyzowanie profilaktyki, ale również rozwój metod diagnostycznych i nowoczesnych terapii, opartych na innowacyjnych mechanizmach działania, wydaje się być pożądane i uzasadnione ekonomicznie. Znaczna część dostępnych analiz odwołuje się do krajów wysoko i bardzo wysoko rozwiniętych (czego jedną z przyczyn może być lepsza dostępność danych). Opracowywanie innowacyjnych terapii, potencjalnie także skutkujące ich szerszą dostępnością, pozwalałoby na zapewnienie doskonalszej opieki zdrowotnej również dla populacji w krajach mniej rozwiniętych.

5.1.1. Mechanizm nowotworzenia

Mechanizm powstawania nowotworów jest zagadnieniem niezwykle złożonym. U podstaw przyczyn dla których komórki somatyczne w fazie G0 zaczynają dzielić się w sposób niekontrolowany leżą mutacje, które z definicji są spontaniczne, a więc również zróżnicowane wśród populacji. Na przestrzeni lat poszukiwano czynnika łączącego wszystkie choroby nowotworowe jako uniwersalnego mechanizmu, powodującego chorobę i warunkującego jej późniejszą progresję. Jako kandydatów na takie mechanizmy wskazywano zmiany genetyczne – mutacje onkogenów i genów supresorowych nowotworów, powstawanie nowotworowych komórek macierzystych, stres metaboliczny, stres retikulum endoplazmatycznego, uszkodzenia powstałe na skutek działania związków o charakterze utleniającym, ubikwitynację, infekcje, stany zapalne, niedobory odporności oraz szereg modyfikacji o podłożu epigenetycznym. Heng i współpracownicy wskazują jednak na fakt, że pojedynczy mechanizm nigdy nie będzie odpowiadał za nowotworzenie jako całość i należy patrzeć na szerszą perspektywę tego zagadnienia. Liczba zmiennych, czasami nawet w obrębie jednego guza jest znacząca, nie wspominając o różnicach między pacjentami. Autorzy postulują, że na proces powstawania nowotworu należy patrzeć przede wszystkim jak na proces ewolucyjny, który jest wypadkową wszystkich poszczególnych mechanizmów molekularnych. W tej sytuacji skupianie się na jakimkolwiek pojedynczym mechanizmie nie znajdowałoby uzasadnienia, biorąc pod uwagę, że znaczenie jakiegokolwiek pojedynczego mechanizmu molekularnego jest niskie wśród populacji pacjentów (Heng i in., 2010). W tym kontekście szczególnie istotny wydaje się kierunek medycyny spersonalizowanej. Jako pierwszy krok wymagane byłyby skuteczne procedury i algorytmy diagnostyczne, w drugim

natomiast – skuteczne terapie, współdziałające ze sobą, zdolne do niwelowania mechanizmów nowotworzenia istotnych w indywidualnych przypadkach.



Rycina 1 Schemat cyklu komórkowego (opracowanie własne)

Jako główną przyczynę powstawania guzów wskazuje się również szlaki metaboliczne związane z cyklem komórkowym i apoptozą. Na fundamentalnym poziomie, genezy zaburzenia cyklu komórkowego poszukuje się w braku sygnału hamującego podział komórki bądź w uniewrażliwieniu komórek na taki sygnał. Jedną z kluczowych ról w hamowaniu podziałów komórkowych odgrywa białko p53, które pośrednio uniemożliwia przejście z fazy G1 do fazy S. Białko to pełni ono rolę czynnika transkrypcyjnego, który pozwala na produkcję białek takich jak p21-WAF1, inaktywującego kinazy zależne od cyklin, które z kolei odpowiadają za fosforylację białek takich jak RB. Białko RB formie ufosforylowanej bezpośrednio umożliwia tranzycję z fazy G1 do fazy S (Rycina 1). Innymi białkami zależnymi od p53 są receptor Fas, pełniący rolę w apoptozie, jak również białka odpowiedzialne za naprawę DNA, a więc również czynników powiązanych z procesem nowotworzenia (Kontomanolis i in., 2021). Zestawienie najistotniejszych białek będących supresorami nowotworów przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1 Zestawienie najważniejszych białek będących supresorami nowotworów; na podstawie (Kontomanolis i in., 2021)

Gen	Kodowane białko
p53	Fosfoproteina o masie 53 kDa, czynnik transkrypcyjny, indukuje białko p21 (supresor kinaz zależnych od cyklin)

Gen	Kodowane białko
Rb (retinoblastoma)	Fosfoproteina o masie 105 kDa, w formie nieufosforylowanej inaktywuje czynnik transkrypcyjny E2-F1
Wt (Wilm's tumor)	Białko o masie 35 kDa, zawiera cztery motywy palca cynkowego, czynnik transkrypcyjny
BRCA1 (Breast cancer gene 1)	Białko o masie 220 kDa, czynnik transkrypcyjny, kostymulator białka p53
BRCA2 (Breast cancer gene 2)	Białko o masie 109 kDa, odpowiedzialne za naprawę DNA
APC (adenomatosis-polypsis colon genes)	Białko o masie 300 kDa, zatrzymuje tworzenie kompleksu β -katenin z czynnikiem transkrypcyjnym Tcf-4, a w konsekwencji jego indukję do c-myc
DCC (deleted in colon cancer gene)	Transmembranowe białko o masie 190 kDa
NF-1 (neurofibromatosis gene)	Białko o masie 250 kDa, homolog białka aktywującego GTPazę

Innym mechanizmem koniecznym dla prawidłowego funkcjonowania organizmu jest aktywność telomeraz. Telomery są sekwencjami DNA, składającymi się z powtórzeń 5-6 nukleotydów (o sekwencji TTAGGG u kręgowców), obecnymi na końcach chromosomów. Ich zadaniem jest ochrona właściwych sekwencji kodujących przed degradacją podczas podziału komórki. Przy każdym podziale telomery są skracane o 50 - 100 par zasad, przez co pełnią one swoją rolę ochronną jedynie przez określoną liczbę cykli podziału. Kiedy nastąpi całkowita utrata telomerów, w komórce zaczynają pojawiać się zaburzenia kariotypu, które ostatecznie powinny prowadzić do apoptozy. Możliwe jest jednak wydłużanie telomerów. Enzymami odpowiedzialnymi za ten proces są telomerazy. Zaburzenie działania lub ekspresji telomeraz może nieść za sobą poważne konsekwencje, ich nadekspresja jest bowiem obserwowana w nowotworach - przyczynia się do zdolności komórek nowotworowych do nielimitowanych podziałów. Co więcej, poprzez nadekspresję odwrotnej transkryptazytelomerazy z powodzeniem unieśmiertniono wiele rodzajów pierwotnych linii komórkowych, co wyraźnie wskazuje na kluczową rolę tego mechanizmu w nowotworzeniu (Artandi & DePinho, 2010), (Kontomanolis i in., 2021).

5.1.2. Modele powstawania guza

Guzy odznaczają się zmiennością. Co oczywiste, ten sam rodzaj nowotworu może diametralnie różnić się pośród pacjentów, natomiast poważniejszym problemem jest zmienność w obrębie pojedynczego guza. Niejednorodność komórek wynikać może z niestabilności genetycznej, modyfikacji w zakresie ekspresji genów, zmian w stanie

komórkowym i czynników środowiskowych. Zmienność ta jest jednym z głównych czynników promujących progresję raka i powodujących brak odpowiedzi na stosowane terapie (Fanelli i in., 2020).

Klasycznie ukonstytuowane zostały dwa modele rozwoju guza: model ewolucji klonalnej oraz model nowotworowych komórek macierzystych (ang. *cancer stem-like cell*, CSC). Pierwszy z nich zakłada, że z czasem następuje selekcja klonalna komórek wykazujących większy potencjał do podziału ze względu na mutacje lub modyfikacje epigenetyczne. Tłumaczy ona też zjawisko nabierania oporności na terapie – komórki podatne zostają zabite, podczas gdy odporne odbudowują populację (Greaves & Maley, 2012). Drugi z kolei zakłada obecność małej populacji komórek o zdolności samoodnawiania, z których następnie powstają bardziej zróżnicowane komórki, stanowiące większą część guza. Przemawiają za tym dane eksperymentalne – po wyizolowaniu komórek nowotworowych i ich dalszej hodowli *in vitro* lub zaszczepieniu w modelach zwierzęcych jedynie 0,01% do 1% komórek wykazywało zdolności tworzenia kolonii i dalszego wzrostu (Reya i in., 2001).

Żaden z zaproponowanych modeli nie był w stanie całkowicie wytłumaczyć obserwowanej zmienności w obrębie pojedynczych guzów. Obserwacje te zaowocowały w ostatnich latach powstaniem hybrydowego modelu plastyczności komórkowej. Postuluje on zdolność komórek wyspecjalizowanych do zmiany fenotypu na CSC i na odwrót. W szczególności odróżnicowywanie komórek (powrót do fenotypu CSC) jest wskazywane jako przyczyna nabywania zdolności do przerzutowania i nabywania oporności na leki, np. chemioterapię (w niektórych przypadkach IC_{50} zwiększa się nawet 10-krotnie) (Gupta i in., 2019).

5.1.3. Przerzutowanie

Znaczącym czynnikiem wpływającym na śmiertelność chorób nowotworowych jest przerzutowanie. Pacjenci z przerzutami mają znacząco gorsze 5-letnie wskaźniki przeżycia niż pacjenci z rakiem miejscowym (Castaneda i in., 2022). Pierwotnym modelem przerzutowania jest model progresji liniowej, zakładający stopniową ewolucję nowotworu poprzez nagromadzenie kolejnych mutacji i rozpoczęcie metastazy dopiero, kiedy guz jest już znacząco rozwinięty (Fearon & Vogelstein, 1990). Z czasem jednak zaczęły pojawiać się badania ustanawiające model progresji równoległej, który zakłada możliwość tworzenia przerzutów już na wczesnym etapie rozwoju choroby (Klein, 2009). Ma to znaczące konsekwencje dla diagnostyki – charakteryzacji nowotworu dokonuje się najczęściej na podstawie biopsji guza pierwotnego. W przypadku modelu progresji równoległej komórki przerzutowane mogą mieć istotnie odmienny profil molekularny od guza pierwotnego, a co za tym idzie – mogą nie odpowiadać na dobraną terapię. Ponadto, przerzuty mogą mieć

swoje źródło we wcześniejszych przerzutach, a nie tylko w guzie pierwotnym (Borriello i in., 2021), co może dodatkowo wpływać na zmienność choroby w obrębie indywidualnego pacjenta, a w konsekwencji dalece komplikować proces leczenia.

Jednym z najistotniejszych zjawisk koniecznym do powstania przerzutów jest angiogeneza w obrębie guza pierwotnego. Może ona mieć miejsce nawet w przypadku guza umiejscowionego lokalnie, który jest obecny w organizmie już od dłuższego czasu, nie dając innych objawów (Folkman & Kalluri, 2004). Kluczowym elementem koniecznym do rozpoczęcia angiogenezy jest ekspresja przez komórki nowotworowe czynników wzrostu, takich jak czynniki wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), co mogłoby świadczyć o tym, że białka tej klasy będą dobrymi celami molekularnymi w innowacyjnych terapiach, mających na celu powstrzymanie przerzutowania. Rzeczywiście, pewne terapie oparte o ten mechanizm i monoklonalne przeciwciała skierowane na VEGF zostały dopuszczone do użycia u ludzi (Hurwitz i in., 2004). W szerszym spektrum nowotworów ich skuteczność jest jednak ograniczona, głównie ze względu na oporność (zarówno naturalną, jak i nabytą). Mechanizmy oporności obejmują w tym przypadku wykorzystanie alternatywnych czynników wzrostu do promocji angiogenezy, wykorzystanie zdrowych naczyń krwionośnych obecnych w otaczających tkankach, mimikra naczyniowa, aktywność komórek zrębowych biorących udział w aktywacji makrofagów związanych z nowotworem (ang. *tumor-associated macrophages*, TAM), śródbłonkowych komórek progenitorowych (ang. *endothelial progenitor cells*, EPC) oraz proangiogennych komórek mieloidalnych (Lugano i in., 2020). W ostatecznym rozrachunku terapie tego typu zwiększają przeżywalność tylko w wybranych nowotworach (nerki, wątroby, jelita grubego), podczas gdy w innych (trzustki, prostaty, piersi, czerniak) nie odnotowano statystycznie istotnego wzrostu przeżywalności (Kuczynski i in., 2019). Taki stan rzeczy wskazuje na wysoce złożoną naturę chorób nowotworowych, które mogą się różnić między sobą diametralnie.

Kolejnym krokiem w przerzutowaniu jest inwazja do krwiobiegu. Nowopowstałe w procesie angiogenezy naczynia krwionośne mogą być nieprawidłowo rozwinięte, mocno rozgałęzione i wysoce przepuszczalne, co ułatwia wynaczynianie komórek nowotworu. Wyróżnić można dwie formy inwazji: pojedynczych komórek (mezenchymalnych lub emeboidalnych) lub grup komórek (Wu i in., 2021). Charakteryzują się one innymi mechanizmami molekularnymi, co dodatkowo utrudnia potencjalne celowanie terapiami w to zjawisko.

Dla migracji pojedynczych komórek mezenchymalnych kluczowym zjawiskiem jest przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT).

Komórki nabłonka nabierają cech komórek macierzystych, w tym zdolności do migracji i inwazji, podczas gdy oddziaływania międzykomórkowe wyraźnie słabną (Lamouille i in., 2014). Jednocześnie komórki stają się bardziej odporne na warunki panujące w krwiobiegu, w szczególności na wynikające z przepływu cieczy siły ścinające. W rzeczywistości stan E-M można sklasyfikować spektrum – komórki biorące udział w metastazie wykazują jednocześnie ekspresję markerów zarówno epitelialnych, jak i mezenchymalnych. Ma to znaczenie przy tworzeniu kolejnych guzów, po ekstrakwazacji (proces, w którym komórki rakowe opuszczają naczynia krwionośne lub limfatyczne i przechodzą do otaczających tkanek) w miejscu docelowym – wtedy ponownie bardziej korzystny jest fenotyp epitelialny (Kröger i in., 2019).

W przypadku fizycznie ograniczającej macierzy pozakomórkowej z wąskimi przestrzeniami (np. przy konieczności przebycia granic pomiędzy kilkoma rodzajami tkanek przed dostaniem się do krwiobiegu lub węzła chłonnego) komórki nowotworowe mogą dynamicznie przechodzić również w formę emeboidalną, która jest lepiej przystosowana do tego typu warunków (Holle i in., 2019).

W końcu możliwe jest również rozsiewanie całych grup komórek. Bronsert i współpracownicy wysuwają hipotezę, że w rzeczywistości ta forma inwazji jest obecna w przytłaczającej większości przypadków (Bronsert i in., 2014). Charakteryzuje się ona utrzymaniem adhezji międzykomórkowej i ekspresją markerów charakterystycznych dla komórek epitelialnych (Mizukoshi i in., 2020). Krążące grupy komórek nowotworowych wykazują większą skłonność do tworzenia przerzutów niż inwazja w postaci pojedynczych komórek, a co za tym idzie – są związane z gorszymi prognozami przeżywalności (Aceto i in., 2014).

Ostatecznym etapem tworzenia przerzutu jest wynacznienie do miejsca docelowego. Jak każdy z indywidualnych kroków przerzutowania, wynacznianie jest skomplikowanym, wieloetapowym procesem. Ogółem wyróżnić można dwa mechanizmy, zależne od tego, czy wynaczyniana jest pojedyncza komórka, czy ich grupa (Cheng & Cheng, 2021). W przypadku pojedynczej komórki proces ten przybiera formę diapedezy, w której przeciska się ona przez połączenie śródbłonkowe. Proces ten przebiega w sposób analogiczny do wynaczyniania leukocytów, jednak w ich przypadku ciągłość nabłonka naczyń krwionośnych jest naruszona jedynie tymczasowo, podczas gdy w przypadku komórek nowotworowych nabłonek zostaje trwale uszkodzony (Strell & Entschladen, 2008). Drugim mechanizmem jest angiopeloza, w której dochodzi do aktywnego przemodelowania nabłonka naczyniowego, aby utworzyć kieszeń wokół grupy komórek, a następnie wypchnięcia ich poza naczynia krwionośne. Jest to również możliwe dla pojedynczej komórki, jednak w tej formie wynaczyniania niezwykle

istotna jest zdolność do zachowania formy grupy komórek bez dysocjacji, co przekłada się na zachowanie fenotypu klastra. Komórki wynaczyniane w ten sposób wykazują znacząco zwiększoną proliferację, a w konsekwencji - zdolność do tworzenia guzów w odległych miejscach (Allen i in., 2019).

Kiedy dojdzie już do wynaczynienia, znacząca część komórek pozostaje w formie uśpionej lub tworzy mikrometastazy (4-16 komórek). Do utworzenia odległych guzów dochodzi stosunkowo rzadko, Luzzi i współpracownicy opisują następujące rezultaty uzyskane w badaniach na modelach mysich: 80% ze wszystkich wstrzykniętych komórek nowotworowych przetrwało i wynaczyło się; z tej grupy jedynie 2,5% utworzyło mikrometastazy, z których jedynie 1% utworzył guzy, podczas gdy większość mikrometastaz uległa zanikowi (Luzzi i in., 1998). Niemniej, mogą one pozostawać w formie uśpionej, ze względu na brak stymulacji czynnikami wzrostu tudzież działanie układu immunologicznego, a w sprzyjających warunkach powrócić do formy aktywnej. Proces ten wymaga nałożenia kilku czynników, takich jak somatyczne aberracje i interakcja komórek uśpionych z mikrośrodowiskiem w miejscu metastazy. Dodatkowo wpływ może mieć również podatność genetyczna pacjenta (Wikman i in., 2008).

5.2. ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA W NOWOTWORACH

Prawidłowo funkcjonujący układ odpornościowy ma zdolność do neutralizacji powstających komórek nowotworowych. W wyniku mutacji w komórkach nowotworowych powstają neoantygeny, które odróżniają je od zdrowych komórek gospodarza, umożliwiając prezentację w kontekście głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC). Zasada odpowiedzi jest więc analogiczna do odpowiedzi na jakikolwiek patogen. Istotną różnicą przy nowotworach jest fakt, że jednocześnie są to komórki gospodarza. W zależności od obciążenia mutacjami (ang. *tumor mutational burden*, TMB) mogą one nie wykazywać bardzo silnej immunogenności (TMB jest wskazywane jako jeden z prognostyków odpowiedzi na immunoterapię inhibitorami punktu kontrolnego (Sha i in., 2020)).

Głównymi komórkami specyficznymi dla odpowiedzi na nowotwory są limfocyty T infiltrujące guz (ang. *tumor infiltrating lymphocytes*, TILs), których cechą charakterystyczną jest obecność markera CD3 na ich powierzchni. Wśród nich wyróżnić można dwie subpopulacje: CD8⁺ i CD4⁺, odpowiednio limfocyty T cytotoksyczne i pomocnicze (Th). Pierwsze rozpoznają antygen prezentowany w kontekście MHC klasy I i warunkują apoptozę. Drugie natomiast rozpoznają antygen prezentowany w kontekście MHC klasy II i odpowiadają za produkcję czynników stymulujących limfocyty - przede wszystkim

interleukiny 2 (IL-2), ale także interleukiny 3, 4, 5, 10, interferonu gamma, czynnika martwicy guza alfa i beta oraz czynnika stymulującego kolonie granulocytów i makrofagów. Aktywowane Th wykazują zdolność do autoregulacji, tj. intensywnej proliferacji pod wpływem oddziaływania IL-2 z odpowiednim receptorem na ich powierzchni (Loose & Van De Wiele, 2009).

Innymi istotnym elementem odpowiedzi na nowotwór są również komórki NK. W przeciwieństwie do limfocytów T CD^{8+} i CD^{4+} wchodzą one w skład odpowiedzi nieswoistej. Nie wymagają obecności cząsteczek MHC na powierzchni komórki do jej neutralizacji, a więc są w stanie poradzić sobie z celami, które dla cytotoksycznych limfocytów T byłyby niewidoczne (Cózar i in., 2021). Podobnie jak Th, NK posiadają receptory IL-2, w związku z czym odpowiadają na stymulację tą interleukiną, zwiększając swój potencjał cytotoksyczny (Caligiuri i in., 1990).

Niestety, nowotwory w miarę rozwoju nabywają zdolności immunosupresyjnych, co prowadzi do osłabienia odpowiedzi, a z czasem do niemal całkowitej utraty zdolności do zatrzymania wzrostu guzów. Jednym z mechanizmów ucieczki spod kontroli układu immunologicznego jest ekspresja na powierzchni guza ligandów hamujących aktywność limfocytów, takich jak PD-L1, PD-L2 (wiążące do PD-1), CD80 czy CD86 (wiążące do CTLA-4). Wymienione powyżej są w chwili pisania tekstu najistotniejszymi ścieżkami sygnałnymi w immunoterapii z punktu widzenia klinicznego, co zostało opisane bardziej szczegółowo później w tekście.

Inne mechanizmy wykorzystywane przez nowotwory do ucieczki spod kontroli układu immunologicznego to produkcja immunosupresyjnych cząsteczek, obejmujących enzymy rozkładające tryptofan i argininę (odpowiednio 2,3-dioksygenaza indolaminy (IDO) oraz arginaza i syntaza tlenku azotu (NOS)) (Munn & Mellor, 2016), (Chang i in., 2001), (Zhang i in., 2011), co w konsekwencji prowadzi do anergii limfocytów (Mellor i in., 2003). Kolejną metodą supresji odpowiedzi jest pośrednia modyfikacja metabolizmu i aktywności komórek dendrytycznych za pośrednictwem akumulacji lipidów (Herber i in., 2010). Istotny jest też wpływ generowanych przez guz mleczanów. Są one produkowane na drodze glikolizy i późniejszej fermentacji beztlenowej. Jest to główna droga pozyskiwania energii przez komórki nowotworowe (co zostało opisane przez Warburga już w latach dwudziestych XX wieku i nosi nazwę efektu Warburga; w 1931 roku za to odkrycie została przyznana nagroda Nobla), w związku z czym, stężenia mleczanów w mikrośrodowisku guza znacząco przewyższają stężenia obserwowane w tkankach, gdzie główną formą pozyskiwania energii jest cykl kwasu cytrynowego i fosforylacja oksydacyjna. Wpływ podwyższonego stężenia mleczanów obejmuje obniżenie pH, co samo w sobie prowadzi do immunosupresji (Choi i in.,

2013), ale również zjawiska takie jak zablokowanie możliwości różnicowania monocytów do komórek dendrytycznych, zablokowanie uwalniania cytokin z komórek dendrytycznych i cytotoksycznych limfocytów T, utrudnianie migracji monocytów i ograniczanie funkcji cytotoksycznych limfocytów T (Villalba i in., 2013).

Nowotwory w celu ograniczenia oddziaływań z układem odpornościowym przystosowują się także poprzez obniżenie ekspresji antygenów związanych z nowotorem (ang. *tumor associated antigens*, TAA) i ligandów stymulujących aktywność limfocytów, brak cząsteczek adhezyjnych, obecność ligandu Fas i transformującego czynnika wzrostu beta na powierzchni komórki, a także obniżenie ilości MHC klasy I i zaburzenie ekspresji innych białek koniecznych do przeprocesowania i prezentacji antygeny (Villalba i in., 2013).

5.2.1. Odpowiedź immunologiczna w metastazie

Jak opisano w rozdziale 5.1.3, wiodącą przyczyną śmierci u pacjentów z rakiem jest przerzutowanie. Guz tworzy specyficzne, immunosupresyjne środowisko, jednak komórki będące przyczyną przerzutów również unikają neutralizacji, mimo opuszczenia mikrośrodowiska nowotworu (ang. *tumor microenvironment*, TME). Środowisko guza najczęściej charakteryzuje hipoksja i ograniczony dostęp do składników odżywczych. Ograniczenia te nie wpływają na komórki migrujące. Nie bez znaczenia jest (również opisywane wcześniej) EMT. Wszystkie te czynniki sugerują, że komórki migrujące posiadają inny system unikania odpowiedzi immunologicznej niż te, które tworzą guz pierwotny (Schaller & Agudo, 2020).

Zmiany wywołane przez guz pierwotny mogą oddziaływać na funkcjonowanie układu immunologicznego w obrębie całego organizmu, co ułatwia komórkom migrującym przeżycie. Wydzielanie czynników wzrostu, cytokin, chemokin czy egzosomów (dyskutowane szerzej później w tekście) może ograniczać między innymi formowanie granulocytów, monocytów i komórek dendrytycznych (Meyer i in., 2018). IL-6 i VEGF wydzielane przez komórki guza wpływają na różnicowanie komórek dendrytycznych, obserwowane jest też upośledzenie ich funkcji, a co za tym idzie – obniżenie aktywności limfocytów T oraz różnicowanie limfocytów CD4⁺ w limfocyty T regulatorowe (Treg), których zadaniem jest tłumienie odpowiedzi immunologicznej (Schaller & Agudo, 2020).

Na poziomie indywidualnym komórki inicjujące przerzuty muszą przetrwać (poza czynnikami mechanicznymi, takimi jak siły ścinające wynikające z przepływu krwi przez naczynia krwionośne) neutralizację przez limfocyty T cytotoksyczne. Jednym ze sposobów na indukcję ich wyczerpania jest ekspresja PD-L1 lub innych inhibitorów punktu kontrolnego. Analogicznie do komórek guza pierwotnego, mechanizmem ucieczki spod kontroli układu immunologicznego jest obniżenie ekspresji MHC klasy I, choć w tej kwestii obserwuje się

dużą różnorodność zarówno pomiędzy komórkami powodującymi przerzuty (poza obniżeniem ekspresji pojawiają się też nowe fenotypy MHC), jak i między guzem pierwotnym a komórkami metastatycznymi (Garrido & Aptsiauri, 2019). Rolę w metastazie i unikaniu odpowiedzi (w szczególności warunkowanej przez komórki NK) spełnia także remodelowanie cytoszkieletu (Fife i in., 2014), (Al Absi i in., 2018).

5.2.2. Białka szoku termicznego

Rolę w odpowiedzi immunologicznej na nowotwór odgrywają też białka szoku termicznego (ang. *heat shock protein*, HSP). HSP są wysoce zakonserwowanymi białkami opiekuńczymi, produkowanymi najczęściej pod wpływem bodźca stresowego, spełniającymi szereg funkcji. Między innymi zapobiegają one niespecyficznemu agregowaniu się białek w komórkach poprzez utrzymywanie ich natywnej konformacji energetycznej, a zaburzenie tej funkcji jest wskazywane jako przyczyna powstawania niektórych nowotworów (Das i in., 2019). Część z nich odgrywa bezpośrednią rolę w zjawiskach koniecznych do rozwoju guza, takich jak stymulacja proliferacji komórek i inwazja do naczyń krwionośnych, a co za tym idzie – również w metastazie (Calderwood i in., 2006). Przykładowo HSP27 odgrywa rolę w indukcji przejścia epitelialno-mezenchymalnego, macierzystości (ang. *stemness*) i oporności na radioterapię (Chen i in., 2018). Oznaczanie poziomów HSP i przeciwciał anti-HSP mogą więc być stosowane jako biomarkery w określonych rodzajach nowotworów, mówiące o stopniu zaawansowania choroby i jej agresywności (Das i in., 2019). HSP są ściśle regulowanymi białkami wewnątrzkomórkowymi, stąd ich obecność poza komórką jest immunogenna, ma bowiem miejsce tylko w przypadku obumierania komórek na drodze nekrozy (w przeciwieństwie do śmierci apoptotycznej). W tym kontekście odgrywają rolę w stymulacji makrofagów i komórek dendrytycznych poprzez szlak NF- κ B (Basu i in., 2000).

Zasadniczą zdolnością HSP jest wiązanie białek. Biorą więc one udział w procesach kluczowych dla swoistej odpowiedzi immunologicznej, takich jak transfer antygeny oraz jego prezentacja w kontekście MHC klasy I, ale również klasy II na komórkach dendrytycznych, dzięki indukcji endocytozy kompleksu HSP-peptyd przez oddziaływanie z receptorem CD91 (Binder, 2019). Wysoka immunogenność kompleksów HSP-białko sprawia, że są one jednym z badanych podejść dla potencjalnych szczepionek przeciwnowotworowych (Kelly i in., 2018).

5.3. IMMUNOTERAPIA NOWOTWORÓW

Immunoterapia jest metodą walki z nowotworami, bazującą na przywróceniu naturalnych zdolności oraz stymulacji ludzkiego układu odpornościowego do zwalczania komórek nowotworowych. W literaturze opisany został szeroki wachlarz strategii: terapia oparta na inhibitorach punktu kontrolnego, cząsteczki bispecyficzne (bazujące zarówno na celowaniu

jednocześnie w dwa punkty kontrolne, ale także o innych mechanizmach, np. fizycznego parowania limfocytów cytotoksycznych do komórek posiadających wybrany antygen), immunoterapia komórkowa (CAR-T, CAR-NK), szczepionki nowotworowe oraz wykorzystanie wirusów onkolitycznych (Mitra i in., 2024).

Już pod koniec XIX wieku podejmowano pierwsze próby wykorzystanie układu immunologicznego do zwalczania nowotworów. Historycznie za ojca immunoterapii uważa się Williama B. Coleya, który zaobserwował redukcję guzów po podaniu pacjentom koktajlu bakteryjnego (McCarthy, 2006), choć ogromne znaczenie miało też odkrycie przez Paula Ehrlicha fundamentów immunologii (Titford, 2010). Niemniej, dopiero opisanie w latach 90. XX wieku punktów kontrolnego układu odpornościowego zapoczątkowało współczesną erę immunoterapii. Za prace nad białkami PD-1 oraz CTLA-4 nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny otrzymali w 2018 roku odpowiednio Tasuku Honjo oraz James Allison.

Właściwie działający układ immunologiczny utrzymywany jest w stanie równowagi, aby móc skutecznie zwalczać patogeny, ale jednocześnie, aby zbyt silna i długotrwała odpowiedź nie wywoływała skutków niepożądanych. Z tej perspektywy inhibitory punktu kontrolnego są białkami koniecznymi do zachowania homeostazy i utrzymania prawidłowego funkcjonowania organizmu (Andersen, 2018).

Prawidłowo funkcjonujący układ odpornościowy wykazuje zdolność neutralizacji komórek nowotworowych (Adam i in., 2003), jednak mechanizmy odpowiadające za te funkcje mogą przestać działać właściwie. Jednocześnie spadać może również wydajność mechanizmów naprawy DNA, co sprzyja dalszemu powstawaniu mutacji (Lengauer i in., 1998). W konsekwencji prowadzi to do nagromadzenia zmutowanych komórek, pozytywną selekcję komórek o zwiększonej ekspresji inhibitorów punktu kontrolnego, zwiększonej obecności rozpuszczalnych i egzosomalnych inhibitorów punktu kontrolnego (takich jak PD-L1) we krwi i przestrzeni międzykomórkowej, i w końcu wytworzenia się specyficznego mikrośrodowiska nowotworu w obrębie zmienionej chorobowo tkanki, często mającego właściwości silnie immunosupresyjne (Greaves & Maley, 2012). Wszystkie te czynniki składają się na zdolność nowotworu do unikania odpowiedzi immunologicznej (ang. *immune evasion*). Jednocześnie zwrócić uwagę należy również na to, że w niektórych przypadkach komórka nowotworowa może wykazywać relatywnie niskie obciążenie mutacjami (gdyż mutacja z definicji jest zjawiskiem przypadkowym), w wyniku czego może nie produkować antygenów, dzięki którym układ odpornościowy byłby zdolny do rozróżnienia jej od zdrowych komórek organizmu (Sha i in., 2020). Mutacjom mogą ulegać również białka zaangażowane w obróbkę i prezentację antygenów, co będzie miało analogiczny skutek (Schrörs i in., 2017). Jest to kolejny

czynnik, który potencjalnie może wpływać na niską intensywność odpowiedzi immunologicznej.

5.3.1. Zasada działania blokady punktu kontrolnego

W momencie pisania niniejszej pracy, podejściem dopuszczonym do wykorzystania u ludzi o największym znaczeniu jest immunoterapia oparta na blokadzie punktu kontrolnego z wykorzystaniem przeciwciał. Podstawową zasadą działania, na której opierają się dopuszczone do stosowania u ludzi przeciwciała będące inhibitorami punktu kontrolnego, jest odblokowanie zdolności komórek układu odpornościowego (głównie limfocytów T) do zwalczania komórek nowotworowych. Hipotetycznie pożądane byłyby także cząsteczki będące agonistami receptorów stymulujących odpowiedź immunologiczną, jednak w tym momencie cząsteczki te są dopiero na różnych stadiach badań przedklinicznych i klinicznych. Przegląd cząsteczek zaakceptowanych do użycia u ludzi przedstawiony jest w Tabeli 2.

Tabela 2 Przegląd inhibitorów punktu kontrolnego dopuszczonych do użycia u ludzi, opracowane na podstawie (Dutta i in., 2023), (Hargadon i in., 2018) oraz (Markham & Duggan, 2018)

Cząsteczka	Nazwa komercyjna	Cel molekularny	Wskazania
Ipilimumab	Yervoy	CTLA-4	Nieoperacyjny lub przerzutowy czerniak, leczenie uzupełniające czerniaka skóry
Nivolumab	Opdivo	PD-1	Nieoperacyjny lub przerzutowy czerniak, przerzutowy niedrobnokomórkowy rak płuca, rak nerki, rak urotelialny, chłoniak Hodgkina, rak wątrobowokomórkowy, rak płaskonabłonkowy głowy i szyi, rak jelita grubego
Pembrolizumab	Keytruda	PD-1	Czerniak przerzutowy, chłoniak nieziarniczy, rak płaskonabłonkowy głowy i szyi, rak urotelialny, rak jelita grubego; leczenie guzów litych cechujących się wysoką niestabilnością mikrosateliterną lub niedoborem mechanizmu naprawy błędnie sparowanych zasad, zaawansowany lub przerzutowy gruczolakorak żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego wykazujący ekspresję PD-L1 (określaną na podstawie dopuszczonego przez FDA testu)

Cząsteczka	Nazwa komercyjna	Cel molekularny	Wskazania
Cemiplimab	Libtayo	PD-1	Przerzutowy rak płaskonabłonkowy skóry lub miejscowo zaawansowany rak płaskonabłonkowy skóry, które nie kwalifikują się do leczenia operacyjnego lub radioterapii
Atezolizumab	Tecentriq	PD-L1	Przerzutowy rak urotelialny, rak urotelialny pęcherza moczowego, niedrobnokomórkowy rak płuca, rak nerki, rak piersi,
Avelumab	Bavencio	PD-L1	Rak neuroendokrynnny skóry, miejscowo zaawansowany lub przerzutowy rak urotelialny
Durvalumab	Imfinzi	PD-L1	Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi, miejscowo zaawansowany lub przerzutowy rak urotelialny, niedrobnokomórkowy rak płuca
Ipilimumab + Nivolumab	Yervoy + Opdivo	CTLA-4 + PD-1	Nieoperacyjny lub przerzutowy czerniak, rak nerki, rak płaskonabłonkowy głowy i szyi, niedrobnokomórkowy rak płuca

W szczególności interesujące podejście zostało zastosowane przy Pembrolizumabie, który jako pierwszy lek przeciwnowotworowy uzyskał pozwolenie na użycie w określonych wskazaniach na podstawie analizy biomarkerów (obecność lub brak obecności PD-L1), bez klasycznego podejścia opartego na diagnozach histopatologicznych (Prasad i in., 2018). Jest to znaczący krok w kierunku wdrożenia medycyny spersonalizowanej w leczeniu nowotworów, która wskazywana jest (obok terapii kombinowanych) jako kluczowy element w dalszym rozwoju immunoterapii (Kraehenbuehl i in., 2022).

Przywrócenie limfocytom T zdolności do oddziaływań cytotoksycznych wobec komórek nowotworowych opiera się na zablokowaniu możliwości oddziaływania wybranych ligandów obecnych na komórkach nowotworowych (np. PD-L1, PD-L2) z receptorami hamującymi intensywność odpowiedzi immunologicznej obecnych na limfocytach (np. PD-1). Brak takiego oddziaływania powinien być równoznaczny z brakiem przekazywania do limfocytów T sygnału hamującego, w wyniku czego powinny one zachować (lub odzyskać, zależnie od stopnia wyczerpania) właściwości cytotoksyczne i zapobiegać ich wyczerpaniu. Analizując zasadę działania dopuszczonych do tej pory do użycia preparatów, można wyciągnąć wniosek, że warunkiem koniecznym do przywrócenia prawidłowej funkcji limfocytów jest zniesienie efektu inhibicji, a dodatkowa stymulacja ma znaczenie drugorzędne i potencjalnie może zostać wykorzystana w przyszłości jako uzupełnienie zniesienia blokady.

Jednakże, mimo obiecującej zasady działania, tylko część z pacjentów reaguje pozytywnie na immunoterapię, nawet w przypadku obecności wybranego celu molekularnego na komórkach nowotworu. W roku 2018 aż 43,63% pacjentów onkologicznych w Stanach Zjednoczonych kwalifikowało się do leczenia opartego na blokadzie punktu kontrolnego. Jednocześnie przewidywano, że tylko 12,46% z ogółu pacjentów onkologicznych zareaguje pozytywnie na terapię (Haslam & Prasad, 2019). W praktyce bowiem stymulacja i hamowanie odpowiedzi immunologicznej to zagadnienie dalece bardziej złożone, na które wpływa szereg czynników indywidualnych, takich jak mikrośrodowisko nowotworu, obciążenie guza mutacjami i związane z tym występowanie neoantygenów, zmiany metaboliczne w obrębie komórek patologicznych czy profil klonalnych populacji limfocytów T w krwi obwodowej (dyskutowane szerzej w rozdziale 5.3.4) (Wu i in., 2020), (Mitra i in., 2024).

Ponadto, w części przypadków pozytywnej reakcji na immunoterapię, czas przeżycia zwiększa się znacząco względem klasycznych metod terapii nowotworów, takich jak chemioterapia i radioterapia, jednak w ujęciu bezwzględny nadal nie są to wyniki spektakularne. Przykładowo, dla Ipilimumabu (przeciwciało anty-CTLA-4), w III fazie badań klinicznych odsetek przeżywalności chorych na czerniaka po 2 latach wzrósł z 13,7% do 23,5%, liczone w odniesieniu do grupy kontrolnej, której podawana była szczepionka gp100. Mediana przeżywalności wzrosła natomiast z 6,4 do 10,1 miesięcy (Hodi i in., 2010). Do zbliżonych wniosków dochodzą Zhao i współpracownicy w swojej metaanalizie, w której przeanalizowane zostały rezultaty monoterapii celującej w ścieżkę sygnałną PD-1/PD-L1 na różnych etapach badań klinicznych obejmujących u ponad 28 000 pacjentów (pod uwagę brane były wyłącznie przeciwciała zaakceptowane do użycia u ludzi, wymienione w Tabeli 2). Uśredniony obiektywny wskaźnik odpowiedzi (ORR, ang. *Objective Response Rate*) wyniósł 20,21%, jednak znacząco różnił się w zależności od typu nowotworu i statusu ekspresji PD-L1. W przypadku nowotworów PD-L1 pozytywnych autorzy wskazują na poprawę odpowiedzi względem terapii konwencjonalnej, jednak, co ciekawe, również 10,34% pacjentów z nowotworami PD-L1 negatywnymi wykazywało odpowiedź na terapię (poziom porównywalny z terapią konwencjonalną) (Zhao i in., 2020). Może to sugerować, że interesującym obiektem badań byłby wpływ ogólnoustrojowy tego typu terapii, bez względu na status PD-L1 na powierzchni guza.

5.3.2. Immunoterapia komórkowa

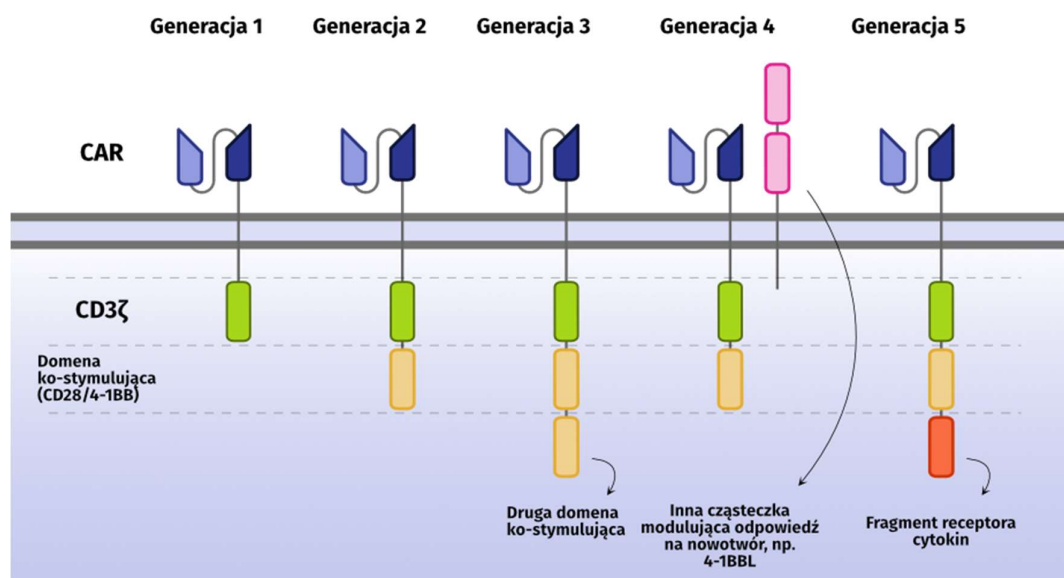
Immunoterapia komórkowa oparta jest o technologię chimerycznych receptorów skierowanych na wybrany antygen (ang. *chimeric antigen receptor*, CAR). Komórki pobrane od pacjenta są transfekowane DNA kodującym taki receptor, który z kolei warunkuje rozpoznawanie wybranego nowotworu i przyłączanie do niego zmodyfikowanych komórek

o potencjale cytotoksycznym. Co istotne, takie wiązanie jest niezależne od obecności MHC klasy I na komórkach. Najczęściej wykorzystywane są limfocyty T CD8⁺ (CAR-T), lecz w ostatnich latach obserwuje się także wykorzystanie komórek NK (CAR-NK) oraz wstępne prace postulujące analogiczne wykorzystanie makrofagów (CAR-Macrophage) (Pan i in., 2022). CAR-T zostały dopuszczone do użycia u ludzi w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego, gdzie odnotowują znaczące sukcesy (chimeryczny receptor w tych komórkach rozpoznaje antygen CD19). Ich skuteczność w neutralizacji guzów litych pozostawia jednak wiele do życzenia (Bourbon i in., 2021). Jednocześnie CAR-T prezentują stosunkowo wysokie ryzyko wystąpienia efektów toksycznych i innych, poważnych skutków ubocznych (Schmidts i in., 2021).

Na CAR składają się cztery elementy: domena wiążąca antygen, region zawiasowy (ang. *hinge*), region transmembranowy i endodomena. Domena wiążąca antygen warunkuje specyficzność komórki. Kluczowym parametrem jest jej powinowactwo do celu molekularnego – musi być na tyle wysokie, żeby efektywnie parować komórki, a jednocześnie na tyle niskie, żeby nie indukować śmierci limfocytu w wyniku nadmiernej aktywacji, która będzie prowadziła do efektów toksycznych. Pośrednio region zawiasowy również odgrywa rolę w wiązaniu – warunkuje on bowiem dystans na jaki domena wiążąca antygen będzie oddalona od błony komórkowej, co w połączeniu z możliwością regulacji stopnia elastyczności tego regionu będzie decydowało o zawadzie sterycznej, a więc umożliwiało (lub uniemożliwiało) różne geometrie wiązania antygeny. Region transmembranowy spełnia głównie funkcję zakotwiczenia receptora w błonie komórkowej, stąd poświęca się mu najmniej uwagi, choć pojawiają się też wyniki sugerujące, że może on wpływać na funkcjonalność CAR-T. Ostatnim elementem jest domena wewnątrzkomórkowa. Większość z nich bazuje na tyrozynowych motywach aktywujących opierających się o wewnątrzkomórkowe łańcuchy naturalnie występujące w TCR, CD3ζ (Sterner & Sterner, 2021).

Wyróżnić można 5 generacji komórek CAR-T. Generacja pierwsza opiera się o wyżej opisany, podstawowy schemat konstrukcji chimerycznego receptora. W drugiej generacji do łańcucha CD3ζ dodana została domena ko-stymulująca pochodząca z CD28 lub 4-1BB. Trzecia generacja zawiera dwie domeny ko-stymulujące, bazujące na białkach takich jak CD28, 4-1BB, OX40, CD27 czy ICOS. Do tej pory wszystkie terapie zatwierdzone do użycia u ludzi oparte są o model drugiej generacji, trzecia bowiem nie wykazuje względem niej przewagi znaczącej klinicznie. Czwarta i piąta generacja mają na celu dalszą poprawę skuteczności i obniżenie działań niepożądanych. W czwartej generacji wykorzystywane są komórki posiadające konstrukty warunkujące produkcję cytokin takich jak interleukina 12, 15

i 18 oraz innych cząsteczek, jak ko-stymulujące ligandy (4-1BBL, CD40L) czy receptory chemokin. Piąta generacja charakteryzuje się obecnością fragmentu receptora cytokin w endodomeń, jak np. łańcuch β receptora IL-2, który warunkuje sygnalizowanie przez JAK-STAT3/5. Dzięki temu CAR-T piątej generacji mają umożliwiać kompletną aktywację i proliferację limfocytów T, poprzez aktywację wszystkich trzech niezbędnych do tego celu ścieżek sygnałnych (Lutskovich i in., 2024) (Tomasik i in., 2022) (Yeku & Brentjens, 2016). Schematyczne przedstawienie receptorów, na których zostały oparte kolejne generacje komórek CAR-T zostało zobrazowane na Rycinie 2.



Rycina 2 Schematyczne przedstawienie kolejnych generacji CAR-T. Opracowane na podstawie (Lutskovich i in., 2024) i (Yeku & Brentjens, 2016).

Jednym z minusów tej technologii jest możliwość wyczerpania modyfikowanych limfocytów i ich przejście w stan wyczerpany pod wpływem oddziaływania z mikrośrodowiskiem guza, co jest szerzej dyskutowane w punkcie 5.3.4.

5.3.3. Oporność na immunoterapię i terapie kombinowane

Część z pacjentów od początku terapii nie wykazuje odpowiedzi na immunoterapię. Zjawisko to określane jest mianem oporności pierwotnej. Nowotwory drugiej grupy pacjentów są rozpoznawane przez układ odpornościowy, jednak adaptują się do odpowiedzi, co może objawiać się zarówno jako oporność pierwotna jak i nabyta. Inni mimo początkowej pozytywnej odpowiedzi, z czasem doświadczają nawrotu choroby (mimo ciągłego podawania leków). Zjawisko to określane jest mianem oporności nabytej i jest istotnym problemem w leczeniu (Sharma i in., 2017). Przegląd mechanizmów odpowiadających zarówno za oporność pierwotną, jak i nabytą został przedstawiony w Tabeli 3.

Tabela 3 Mechanizmy odpowiadające za pierwotną i nabytą oporność na immunoterapię; na podstawie (Sharma i in., 2017)

Klasyfikacja	Mechanizm	Przykłady
Wewnątrzkomórkowe	Brak/niedostępność neoantygenów	Niskie obciążenie mutacjami Nakładanie się białek na powierzchni komórki
	Utrata zdolności prezentacji antygenów	Utrata zdolności produkcji białek takich jak MHC klasy I, transporterów związanych z przetwarzaniem antygenów, beta 2 mikroglobuliny
	Niewrażliwość na limfocyty T	Mutacje w szlakach sygnałnych związanych z interferonem gamma
Zewnątrzkomórkowe	Brak limfocytów T	Brak limfocytów T z TCR warunkującym rozpoznawanie neoantygenów lub ich niedostateczna proliferacja
	Obecność ligandów warunkujących inhibicję odpowiedzi	PD-L1, CTLA-4, VISTA, LAG-3, TIM-3
	Obecność komórek immunosupresyjnych	Limfocyty T regulatorowe, makrofagi związane z nowotworem

Jedną z metod ucieczki nowotworu spod kontroli układu odpornościowego jest zaburzenie prezentacji antygenów w kontekście MHC klasy I. Zaretsky i współpracownicy wiążą mutację, wskutek której beta 2 mikroglobulina (ang. *β 2-microglobulin*, B2M) zostaje skrócona, z utratą ekspresji MHC, jednak analiza obejmuje tylko jednego pacjenta (Zaretsky i in., 2016). Przeciwnie, Middha i współpracownicy wskazują na brak korelacji skrócenia lub całkowitej utraty B2M ze statusem ekspresji MHC, choć jednocześnie wskazują też, że większość pacjentów wykazujących utratę B2M odnosi korzyści kliniczne z terapii inhibitorami punktu kontrolnego (Middha i in., 2019). W regulacji ekspresji molekuł MHC bierze także udział szereg czynników transkrypcyjnych takich jak NLRC5 czy IRF-1 (Meissner i in., 2010) (Hobart i in., 1997), przez co status MHC na powierzchni komórki może być podatny na zmiany epigenetyczne. Utrata HLA jest istotnym powodem, dla którego immunoterapia oparta wyłącznie o mechanizmy rozpoznające komórki guza na podstawie obecności tych cząsteczek na dłuższą metę będzie niewystarczająca (Schrörs i in., 2017).

Jednakże, nawet w przypadku, kiedy komórki nowotworowe posiadają pełny zestaw białek niezbędnych do obróbki i prezentacji antygenów, konieczna jest także obecność neoantygenów, które umożliwią limfocytom T rozpoznanie zmienionych nowotworowo komórek. Zestawienia dostępnych danych wskazują na silną korelację wysokiego obciążenia TMB z pozytywną odpowiedzią na terapię anti-PD-1 (Yarchoan i in., 2017). Jednocześnie sami

autorzy wskazują na słabą stronę analizy – zsekwencjonowane próbki prawdopodobnie nie były tymi samymi, których odpowiedź na terapię oceniono. Pojawiają się pojedyncze badania, w których stopień obciążenia TMB w obrębie tkanki nie jest powiązany z odpowiedzią na terapię (Paz-Ares i in., 2019), co wydaje się być naturalne, biorąc pod uwagę stopień skomplikowania zjawiska. Większość publikacji wskazuje jednak na istotne znaczenie tego markera jako prognostyka (Snyder i in., 2014) (Le i in., 2017) (Samstein i in., 2019). Ważny jest tutaj przede wszystkim kontekst aplikowanego leczenia, bowiem w przypadku terapii innych niż immunoterapia wysokie obciążenie TMB nie wiązało się z lepszą prognozą, a w części przypadków wręcz przeciwnie – szanse przeżycia pacjenta spadały, choć nawet w przypadku immunoterapii było to zależne od rodzaju nowotworu (Valero i in., 2021). W świetle dostępnych wyników pojawiają się prace skupiające się na poprawie ekspresji neoantygenów w obrębie nowotworu, najczęściej poprzez celowanie w mechanizmy naprawcze na poziomie mRNA (Ishizuka i in., 2019) (Supek i in., 2021 i przytoczone tam odniesienia).

Innym powodem oporności na immunoterapię może być utrata zdolności sygnalizacji poprzez szlaki indukowane interferonem gamma (IFN- γ) (Gao i in., 2016). IFN- γ to jedna z kluczowych cytokin w aktywacji komórek układu odpornościowego. Wiążąc się do receptora, uruchomiona zostaje kaskada sygnalizacji – aktywacja kinaz JAK1 i JAK2, a w rezultacie fosforylacja, dimeryzacja i aktywacja czynnika transkrypcyjnego STAT1 (Greenlund i in., 1995). STAT1 odpowiada bezpośrednio za regulację ekspresji genów zależnych od IFN- γ (Darnell i in., 1994), tak więc cały proces aktywacji jest ściśle powiązany i zależny od białek ścieżki sygnałnej JAK/STAT, a jej zaburzenia mogą bezpośrednio prowadzić do rozwoju chorób, w tym nowotworów (Hu i in., 2021). Co więcej, komórki nowotworowe również mogą posiadać receptory IFN- γ , a indukowana nimi sygnalizacja prowadzi do apoptozy (Detjen i in., 2001). Związek ten pełni więc wieloczynnikową rolę w odpowiedzi na nowotwór, stąd utrata zdolności sygnalizacji przez szlaki związane z IFN- γ może mieć znaczący udział w mechanizmie oporności na immunoterapię.

Jako jedno z rozwiązań problemu nabytej oporności wskazywane są terapie kombinowane, oddziałujące na więcej niż jeden mechanizm nowotworzenia. Przykładem takiej terapii jest dopuszczona do użycia u ludzi terapia wykorzystująca Ipilimumab i Nivolumab (Tabela 2). Terapie kombinowane mogą wykazywać istotne korzyści kliniczne dla pacjentów, jednak równocześnie rośnie ryzyko niepożądanych efektów ubocznych związanych z odpowiedzią immunologiczną (Park i in., 2020) (Ma i in., 2021) (Pradeep i in., 2022). Ponadto, nie wszystkie kombinacje dają istotną klinicznie korzyść, a ze względu na wykorzystanie dwóch cząsteczek, rośnie stopień skomplikowania badań klinicznych, należałoby bowiem potwierdzić korzyści zarówno wobec klasycznej chemioterapii (jeśli jest

to standard opieki w wybranym wskazaniu), jak i wobec użycia pojedynczego inhibitora punktu kontrolnego (Puri & Shafique, 2020). Przy połączeniu więcej niż jednej cząsteczki liczba możliwych terapii zaczyna rosnąć bardzo szybko i niemożliwe będzie kliniczne przetestowanie wszystkich z nich. Wskazuje się więc na konieczność indywidualizacji terapii kombinowanych, opartej na analizie markerów. Pozwoliłoby to na określenie mechanizmu immunosupresji i racjonalnym dobraniu indywidualnych komponentów terapii (Zamarin & Postow, 2015) (Rotte i in., 2018).

Innym mechanizmem, który jest proponowany w terapiach kombinowanych, jest połączenie inhibitorów punktu kontrolnego ze związkami celującymi w receptory stymulujące odpowiedź immunologiczną, takie jak 4-1BB (Vinay & Kwon, 2012), ICOS (Solinas i in., 2020), GITR (Knee i in., 2016) i OX40 (Aspeslagh i in., 2016), z których część jest na różnych etapach badań klinicznych, jednak żaden z nich nie został jeszcze zatwierdzony do użycia u ludzi. Obecnie zatwierdzone cząsteczki znoszą inhibicję, co może sugerować, że ten mechanizm jest warunkiem koniecznym dla zachowania aktywności układu odpornościowego, a sygnały ko-stymulujące mogą okazać się skutecznym dodatkiem.

Klasyczna chemioterapia z reguły podawana jest w dawkach niższych niż maksymalna tolerowana, co nadal umożliwia organizmowi odpowiedź immunologiczną (Wumkes i in., 2013). Cytotoksyczny efekt klasycznej chemioterapii może okazać się korzystny z punktu widzenia terapii kombinowanych. Śmierć komórek nowotworowych wiąże się bowiem z uwalnianiem immunogennych białek, które stymulować będą dalszą odpowiedź. Równolegle chemioterapia może oddziaływać stymulująco na inne komórki układu odpornościowego (Galluzzi i in., 2020). Stąd, kombinacja chemioterapii z immunoterapią może być z powodzeniem stosowana, jak pokazuje przykładowe badanie kliniczne z wykorzystaniem kombinacji Ipilimumabu i chemioterapii w niedrobnokomórkowym raku płuca (Lynch i in., 2012). Należy jednak pamiętać, że chemioterapia może dawać także efekty immunosupresyjne, na przykład poprzez zmniejszenie populacji limfocytów (Verma i in., 2016). Dlatego każda kombinacja musi zostać oceniona indywidualnie pod względem potencjalnych korzyści klinicznych.

Często do terapii kombinowanych wykorzystywane są środki już wcześniej dopuszczone do użycia w formie monoterapii. Dzięki temu nie muszą one przechodzić od nowa całej ścieżki rozwoju i zatwierdzenia do użycia, przez co pochłaniają dalece mniej zasobów niż opracowanie cząsteczek innowacyjnych (Ashburn & Thor, 2004). Niemniej, w przypadku leków biologicznych cena terapii nadal dalece przewyższa koszt leków małowartościowych, co w negatywny sposób przekłada się na aspekty ekonomiczne (Criss i in., 2019) (Courtney i in., 2021).

5.3.4. Wpływ klonalnej ekspansji limfocytów T w krwi obwodowej na odpowiedź na terapię

Interesującym kierunkiem badań w kontekście skuteczności blokady punktu kontrolnego jest analiza klonalnych populacji limfocytów T w obrębie tkanki zmienionej nowotworowo, przylegającej zdrowej tkanki i krwi obwodowej. Wu i współpracownicy poprzez sekwencjonowanie mRNA i TCR z pojedynczych komórek wskazują na silną korelację obecności klonalnych populacji efektorowych limfocytów T w obrębie zarówno guza, jak i zdrowej tkanki przylegającej z pozytywną odpowiedzią pacjenta na terapię anty-PD-L1. Jednocześnie w takich przypadkach klonalne populacje efektorowych limfocytów T obecne są również we krwi obwodowej. Sugeruje to możliwość ciągłego napływu świeżych limfocytów do guza. Potencjalnie na tej podstawie pojawia się możliwość relatywnie łatwej identyfikacji pacjentów, którzy będą pozytywnie odpowiadać na terapię (Wu i in., 2020).

Analogiczne wyniki raportuje Kidman i współpracownicy. Choć badania zostały wykonane na modelach mysich, autorzy argumentują, że pozwoliło to na uniknięcie przypadkowej zmienności (wynikającej z elementów osobniczych, takich jak zmienność genetyczna, czynniki środowiskowe czy indywidualne obciążenie guza mutacjami) i dzięki temu analizę wyłącznie pod kątem naturalnie występującej zmienności receptorów limfocytów T. Jednocześnie możliwe było też pobieranie próbek guza w czasie i analiza zmiany populacji komórek w odpowiedzi na immunoterapię (co w przypadku pacjentów klinicznych nie jest osiągalne). Ponadto, autorzy wskazują na obniżoną zmienność TCR w obrębie mysich guzów odpowiadających na terapię, co najprawdopodobniej jest efektem klonalnej ekspansji wybranych limfocytów. Jednocześnie ekspansja klonalna wśród guzów odpowiadających na terapię następuje wcześniej w czasie niż w przypadku guzów opornych (Kidman i in., 2024). Zakładając hipotetycznie, że stwarzałoby to podwaliny dla nowego rodzaju terapii kombinowanej (blokada punktu kontrolnego + immunoterapia komórkowa w formie namnożonych limfocytów T gospodarza lub modyfikowanych, np. CAR-T), nadal olbrzymią rolę odgrywałaby skuteczna diagnostyka i wczesne rozpoznanie choroby, biorąc pod uwagę, że w guzach odpowiadających na terapię ekspansja klonalna następowała wcześniej w czasie.

Hipoteza stawiana przez Wu i współpracowników jest spójna z pracami postulującymi, że raz wyczerpany limfocyt pozostaje w tym fenotypie na stałe. Związane jest to głównie z aktywnością czynnika transkrypcyjnego TOX oraz późniejszą blokadą epigenetyczną fenotypu wyczerpanego (Khan i in., 2019) (Scott i in., 2019). Przywrócenie fenotypu aktywnego po osiągnięciu pewnego stopnia wyczerpania jest niemożliwe. W myśl tej teorii, do prawidłowego działania blokady punktu kontrolnego konieczny jest ciągły napływ świeżych, niewyczerpanych limfocytów z krwi obwodowej do tkanki nowotworowej, na które

inhibitory będą działać jeszcze przed interakcją z komórkami nowotworowymi, tym samym uniemożliwiając wiązanie do immunosupresyjnych ligandów i późniejsze konsekwencje w postaci wyczerpania komórki. Stąd, warunkiem koniecznym do efektywnej terapii byłoby występowanie we krwi obwodowej pacjenta klonalnych populacji limfocytów T, rozpoznających neoantygeny nowotworowe. Brak takich populacji może być powodem, dla którego jedynie część pacjentów reaguje pozytywnie na immunoterapię w formie blokady punktu kontrolnego. Jednocześnie same czynniki transkrypcyjne warunkujące wyczerpanie limfocytów mogą być interesującym celem molekularnym w immunoterapii, jak zostało pokazane między innymi przez Seo i współpracowników z wykorzystaniem modeli mysich. Zademonstrowali oni polepszenie właściwości przeciwnowotworowych komórek CAR-T dzięki wyciszeniu czynników TOX i TOX2 z użyciem shRNA (Seo i in., 2019).

5.3.5. Rola rozpuszczalnych form PD-L1 w oporności na immunoterapię

W krwiobiegu wyróżnić można kilka rodzajów rozpuszczalnego PD-L1:

- Odcinane z powierzchni komórki (monomeryczne),
- Wydzielane (monomeryczne i dimeryczne),
- Egzosomalne (struktury o średnicy 30 – 100 μm),
- Mikropęcherzykowe (struktury o średnicy 100 – 1000 μm).

Są one istotne z punktu widzenia terapii anti-PD-1/PD-L1 ze względu na ich zdolność do oddziaływania zarówno z receptorem PD-1 (a więc inhibicji aktywności limfocytów T), jak i z przeciwciałami skierowanymi na PD-L1. Najistotniejszą formą z punktu widzenia klinicznego wydaje się być forma egzosomalna, ze względu na fakt, że egzosomy mogą posiadać na swojej powierzchni nie tylko wiele kopii samego PD-L1, ale również inne, potencjalnie immunosupresyjne białka, w szczególności kompleks MHC powiązany z antygenem (Daassi i in., 2020). Faktycznie, wysokie stężenia egzosomalnego PD-L1 u pacjentów skorelowane są ze słabą odpowiedzią na terapię i gorszymi prognozami, co potencjalnie może zostać wykorzystane jako biomarker do prognozy odpowiedzi na wybrane terapie (Chen i in., 2018).

Egzosomy mają także zdolność fuzji z komórkami, dzięki czemu mogą przenosić wszelkiego rodzaju cząsteczki do innych komórek, w tym materiał genetyczny (zarówno DNA, jak i mRNA), przez co nabywają one zdolności do ekspresji PD-L1. Powstawanie egzosomów jest naturalnym procesem, który ma miejsce zarówno w komórkach zdrowych, jak i zmienionych nowotworowo. Jedną z proponowanych form wspomagania terapii anti-PD-1/PD-L1 jest celowanie w białka biorące udział w tworzeniu egzosomów (RAB27A, ESCRT, fosfodiesterazę sfingomielinową 3). Tego typu podejście zostało przetestowane w modelach mysich, dając obiecujące rezultaty (Poggio i in., 2019).

Wykorzystanie egzosomalnego i rozpuszczalnego PD-L1 jako celów molekularnych w terapii, mimo dobrze rokujących wstępnych badań, wymaga dalszej eksploracji i pełniejszego zrozumienia jego oddziaływania na organizm jako całość. W dostępnych analizach często różne formy rozpuszczalnego PD-L1 nie są rozróżniane, a większość eksperymentów nad formami odcinanymi i wydzielanymi ogranicza się do badań *in vitro* lub z wykorzystaniem konstruktu chimerycznego PD-L1-Fc, który, mimo że formuje dimer, może zachowywać się inaczej niż występująca naturalnie wydzielana forma dimeryczna (Daassi i in., 2020) (Yin i in., 2021).

5.4. SYSTEM INSULINOPODOBNEGO CZYNNIKA WZROSTU

System insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. *Insulin-like Growth Factor*, IGF) jest wysoce zakonserwowanym szlakiem sygnałowym zaangażowanym w szereg procesów, od wzrostu, rozwoju i kontroli metabolizmu, przez działanie układu immunologicznego do procesów komórkowych, takich jak proliferacja, migracja i różnicowanie. W skład systemu wchodzi insulina, insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF1), insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (IGF2), receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*, IGF1R), receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 2 (ang. *Insulin-like Growth Factor 2 Receptor*, IGF2R; również *Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor*, CI-M6PR), receptor insuliny (ang. *Insulin Receptor*, IR), hybrydowy receptor IR/IGF1R oraz 6 białek wiążących insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins*, IGFBP) i ich proteazy (Denley i in., 2005) (Annunziata i in., 2011).

Z punktu widzenia realizowanego projektu najistotniejszymi komponentami systemu jest IGF2R oraz pośrednio IGF2. IGF2R, zwany również CI-M6PR, jest białkiem transbłonowym o masie ok. 300 kDa. Posiada 15 domen zewnątrzkomórkowych, które nie wykazują podobieństw do pozostałych receptorów systemu IGF, a ponadto również region transmembranowy i krótki ogon cytoplazmatyczny (Morgan i in., 1987). Na powierzchni komórki najczęściej występuje jako dimer. Wiąże on szereg ligandów: enzymy lizosomalne (kwaśne hydrolazy), transformujący czynnik wzrostu- β , granzym B, plazminogeny, glikozylowany czynnik hamujący białaczkę (ang. *leukemia inhibitory factor*, LIF) oraz retinoidy (Ghosh i in., 2003 i przytoczone tam odniesienia). Występuje głównie w formie wewnątrzkomórkowej (ok. 90%), która odpowiada za transfer enzymów znakowanych resztami mannozo-6-fosforanów (ang. *mannose-6-phosphate*, M6P) z sieci trans-Golgiego do lizosomów (Rohrer & Kornfeld, 2001). Pozostała populacja receptora na powierzchni komórki, mimo że występuje w mniejszości, także odgrywa istotną rolę. Endodomena IGF2R nie wykazuje aktywności kinazy, w związku z czym nie jest w stanie przekazywać do komórki

żadnego sygnału (Brown i in., 2009). Powinowactwo do IGF2 sprawia jednak, że może on być internalizowany i degradowany w lizosomach, tym samym receptor spełnia rolę regulacji poziomu wolnego czynnika wzrostu (Scott & Firth, 2004 i przytoczone tam odniesienia). Zaburzenie poziomu ekspresji IGF2R (a więc podwyższonego IGF2) jest bowiem powiązane z licznymi patologiami, w tym z rozwojem nowotworów (Ludwig i in., 1996) (Toretsky & Helman, 1996) (Foulstone i in., 2005). Jednocześnie sam receptor nie jest kierowany do lizosomu dzięki obecnym w endodomeńce sygnałom sortującym, a co za tym idzie – nie podlega degradacji i jest kierowany z powrotem na powierzchnię komórki (Ghosh i in., 2003).

Dla wiązania IGF2/IGF2R kluczowa jest domena 11, która sama jest zdolna nie tylko do wiązania IGF2 (Schmidt i in., 1995), ale również do wywoływania efektu internalizacji (Grimme i in., 2000). W tworzeniu kompleksu udział biorą także domeny 6, 8 oraz motyw FN-II (ang. *fibronectin type II fold*) obecny w domenie 13 (Wang i in., 2020). Wang i współpracownicy proponują również mechanizm uwalniania związków przyłączonych do IGF2 (zarówno zwierających glikany M6P, jak i IGF2) pod wpływem pH <6 w endosomie, co również pośrednio potwierdzają wyniki raportowane przez Bochel i współpracowników (Bochel i in., 2020).

Z punktu widzenia projektowania potencjalnie terapeutycznej cząsteczki kierującej wybrany cel molekularny do degradacji lizosomalnej, modelowanej na bazie IGF2, krytyczny jest brak aktywności krzyżowej, tzn. cząsteczka musi wiązać IGF2R, aby warunkować ukierunkowaną degradację, ale nie może jednocześnie wiązać IGF1R, gdyż ten spełnia funkcje typowo anaboliczne – nadaktywność tego receptora jest obserwowana w nowotworach (Foulstone i in., 2005), stąd u pacjentów onkologicznych pożądane było by uniknięcie jego dalszej stymulacji.

5.5. TECHNOLOGIE UKIERUNKOWANEJ DEGRADACJI BIAŁEK

Technologie ukierunkowanej degradacji białek to nowo kształtujący się kierunek, proponowany jako rozwiązanie pewnych inherentnych problemów, które cechują klasyczne podejścia do racjonalnego opracowywania leków. Technologie degradacji posiadają bowiem kilka istotnych przewag: przede wszystkim są zdolne do oddziaływania na cele molekularne dla których opracowanie małowcząsteczkowego inhibitora byłoby bardzo trudne. Przykładem z obszaru immunoterapii jest ścieżka sygnałowa PD-1/PD-L1. Interfejs wiązania między tymi dwoma białkami jest relatywnie płaski i hydrofobowy, co już na poziomie modelowania molekularnego będzie przysparzało trudności (Zak i in., 2015) (Zarganes-Tzitzikas i in., 2016). Mimo to, ze względu na olbrzymie znaczenie kliniczne tej ścieżki, trwa intensywny rozwój potencjalnych inhibitorów małowcząsteczkowych, jednak jak na razie żaden z kandydatów nie

przeszedł pomyślnie III fazy badań klinicznych (Li & Tian, 2019) (Wu i in., 2021) (Hao i in., 2023).

Inna sytuacja ma miejsce w przypadku dwóch innych białek budzących zainteresowanie w obszarze immunoterapii: B7-H3 i B7-H4. Wiadomo, że są one inhibitorami odpowiedzi immunologicznej (Suh i in., 2003) (Sica i in., 2003), jednak do tej pory nie zidentyfikowano partnerów dla ich wiązania, a co za tym idzie – nie jest znane centrum aktywne, więc proces poszukiwania inhibitorów jest znacząco utrudniony. W przypadku zastosowania wobec nich degradacji, wystarczy cząsteczka wiążąca specyficznie dany cel, niezależnie od epitopu.

Kolejną zaletą technologii degradacji jest fakt, że część białek patogennych nie posiada żadnego istotnego biologicznie centrum aktywnego, które odpowiadałoby za funkcje białka i które można by zablokować. Problem ten jest szczególnie obserwowany w amyloidozach, takich jak np. choroby neurodegeneracyjne, gdzie kluczową rolę w patogenezie odgrywa sama akumulacja białek (Chiti & Dobson, 2006) (Serrano-Pozo i in., 2011). Białka te mogą być idealnymi celami dla ukierunkowanej degradacji.

Wśród celów, dla których znalezienie inhibitora metodami konwencjonalnymi jest ogromnym wyzwaniem wyróżnić można też inne klasy związków: małe GTPazy, fosfatazy, czynniki transkrypcyjne (w tym białko p53, szerzej opisywane w akapicie 5.1.1) oraz cele związane z epigenetyką (Xie i in., 2023). Repertuar potencjalnych celów wydaje się więc uzasadniać badania nad nowymi technologiami, takimi jak ukierunkowana degradacja.

Ostatecznie, odpowiednio zaprojektowane cząsteczki kierujące do degradacji mogłyby wykazywać korzystną stechiometrię względem inhibitorów czy przeciwciał monoklonalnych (Ding i in., 2020). Jedna cząsteczka czynnika degradującego mogłaby odpowiadać za degradację więcej niż jednej cząsteczki celu molekularnego (zakładając, że sama nie ulega degradacji), co mogłoby przełożyć się na korzystniejsze parametry farmakokinetyczne, niższe dawkowanie, a więc także potencjalne zmniejszenie skutków ubocznych i niższe koszty terapii.

5.5.1. Technologia ukierunkowanej degradacji proteasomalnej (PROTAC)

Technologie ukierunkowanej, specyficznej degradacji białek zostały zapoczątkowane poprzez prace nad systemem PROTAC (ang. Proteasome Targeting Chimera), który wykorzystuje system proteasom-ubikwityna. W 2001 roku Sakamoto i współpracownicy opublikowali wyniki demonstrujące słuszność koncepcji i działanie mechanizmu selektywnej ubikwitynacji wybranego celu molekularnego (Sakamoto i in., 2001). Zasada działania systemu opiera się na połączeniu za pomocą cząsteczki bispecyficznej celu molekularnego i ligazy z grupy E3, która będzie warunkować ubikwitynację celu molekularnego. Oznaczony w ten sposób cel molekularny jest kierowany do degradacji w proteasomie, w którym obok

kompleksów 26S i 30S kluczową rolę odgrywa kompleks 20S (Ciechanover, 1994) (Sahu i in., 2021). Szacuje się, że w ludzkim organizmie występuje ponad 600 ligaz E3 (Zheng & Shabek, 2017), z czego w cząsteczkach PROTAC wykorzystywane jest około 10, m.in. METAP-2 (methionyl aminopeptidase 2) (Sakamoto i in., 2001), MDM2 (mouse double minute 2 homolog) (Vicente & Salvador, 2022), CRBN (cereblon) (Winter i in., 2015), VHL (Von Hippel Lindau) (Cubillos-Rojas i in., 2023) i cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) (Itoh i in., 2010) (Naito i in., 2019).

Cząsteczki PROTAC, których fragmenty warunkujące powinowactwo do ligazy E3 oparte są na peptydach, nazywane są obecnie bioPROTAC i obejmują one w większości początkowe odkrycia w tej dziedzinie (Békés i in., 2022). Obecnie większość badań skupiona jest na PROTAC opartych całkowicie o małe cząsteczki, gdyż produkcja koniugatów peptyd-mała cząsteczka przysparzałaby problemów w skali przemysłowej.

Z punktu widzenia mechanizmu degradacji podobną koncepcją jest hydrofobowe oznaczanie celów molekularnych (HyT, ang. *hydrophobic tagging*). HyT różni się od PROTAC tym, że nie warunkuje powinowactwa do ligazy E3, a degradacja celu molekularnego odbywa się poprzez oznaczenie go cząsteczką zawierającą fragment silnie hydrofobowy, co następnie prowadzi do przyłączania cząsteczek HSP, a w konsekwencji – degradację proteasomalną (Neklesa i in., 2011) (Long i in., 2012).

Jedną ze znaczących wad cząsteczek PROTAC jest możliwość działania wyłącznie wewnątrzkomórkowego. Jedno z rozwiązań, umożliwiających degradację celów transmembranowych zaproponowali Cotton i współpracownicy. Cząsteczka jest bispecyficznym, asymetrycznym przeciwciałem, które warunkuje powinowactwo do wybranego, transbłonowego celu molekularnego oraz do transbłonowej ligazy E3 RNF43, co skutkuje degradacją wybranego celu molekularnego (Cotton i in., 2021). Analogiczna technologia została opracowana przez Marei i współpracowników, wykorzystując ligazę ZNRF3 (Marei i in., 2022). Jednocześnie autorzy wskazali na możliwość optymalizacji intensywności degradacji poprzez odpowiednie zaprojektowanie cząsteczki pod względem walentności zarówno wobec celu molekularnego, jak i ligazy, ale również pod względem przestrzennej odległości między obydwoma wiązanymi cząsteczkami.

Innym podejściem wykorzystującym przeciwciała i degradację poprzez system proteasom-ubikwityna jest technologia TrimAway, choć w tym przypadku potencjalne cele ograniczają się ponownie do wewnątrzkomórkowych (Clift i in., 2017). Bazuje ona na wykorzystaniu receptora TRIM21, rozpoznającego fragment Fc przeciwciała skierowanego na wybrany cel molekularny. Autorzy wskazują na znaczącą szybkość zachodzącej degradacji (czas półtrwania 10-20 minut). Znaczącą wadą tej technologii w kontekście klinicznym

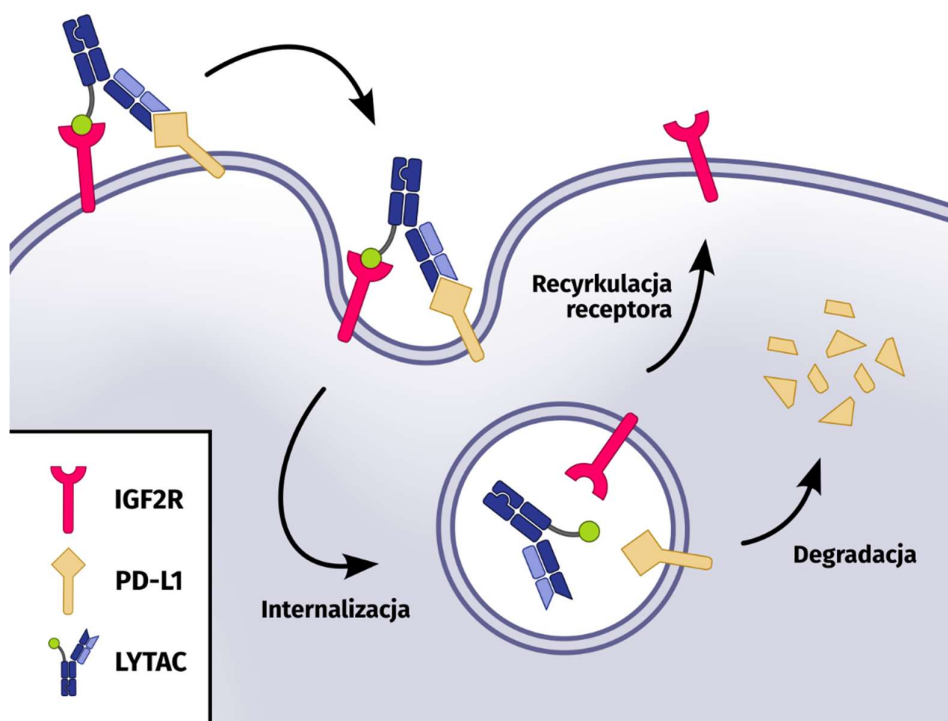
wyduje się być konieczność wewnątrzkomórkowego dostarczenia przeciwciała, co autorzy osiągają poprzez mikroiniekcję lub elektroporację (Clift i in., 2018).

Niestety, małocząsteczkowe PROTAC wykazują szereg wad, wśród których wyróżnić można relatywnie dużą masę (>800 Da), niską rozpuszczalność i przepuszczalność przez błony komórkowe, małą biodostępność przy podaniu doustnym oraz problemy z penetracją bariery krew-mózg. Biorąc pod uwagę mnogość ligaz E3, istotnym ograniczeniem jest też występowanie ligazy, do której powinowactwo wykazuje PROTAC w komórkach, w których degradacja ma zostać zaindukowana (Ding i in., 2020).

PROTAC jest jedyną klasą cząsteczek kierujących do degradacji, która w momencie pisania pracy weszła w fazę badań klinicznych. W 2020 roku z pozytywnym rezultatem zakończyła się I faza badań związków rozwijanych przez Arvinas: ARV-110 i ARV-471, determinując ich bezpieczeństwo w rosnących dawkach. Jeszcze w tym samym roku rozpoczęto II fazę badań klinicznych ARV-110 (Petrylak i in., 2020) (Békés i in., 2022 i przytoczone tam odniesienia).

5.5.2. Technologia ukierunkowanej degradacji lizosomalnej (LYTAC)

Cząsteczki LYTAC zostały opisane po raz pierwszy w 2020 roku przez zespół Bertozzi. Zsyntetyzowane przez nich cząsteczki opierały się na koniugacie przeciwciała skierowanego na wybrany cel molekularny z glikopeptydem zawierającym reszty M6P, warunkujące wiązanie do IGF2R (Banik i in., 2020). Autorzy wykazali, że cząsteczki te zdolne są do indukcji degradacji celów rozpuszczalnych i transbłonowych w liniach komórkowych pochodzących z szerokiego przekroju tkanek, a także potwierdzili, że kluczową do tego procesu cząsteczką jest IGF2R. Był to przełom w technologiach ukierunkowanej degradacji, ponieważ po raz pierwszy zademonstrowana została możliwość degradacji celów innych niż wewnątrzkomórkowe. Otworzyło to drogę do szybkiego rozwoju i kolejnych iteracji tego typu technologii. Schematycznie przedstawienie działania cząsteczek LYTAC przedstawiono na Rycinie 3.



Rycina 3 Schematyczne przedstawienie zasady działania cząsteczek LYTAC skierowanych na PD-L1 (opracowanie własne)

Kolejna opublikowana praca obejmowała wykorzystanie receptora ASGPR (ang. *asialoglycoprotein receptor*), którego występowanie jest charakterystyczne dla hepatocytów, co umożliwia degradację wyłącznie w obrębie wyselekcjonowanych komórek (Ahn i in., 2021). Autorzy zademonstrowali, że fragment cząsteczki warunkujący powinowactwo do celu molekularnego może być krótkim fragmentem peptydowym, jednak część warunkująca wiązanie ASGPR nadal pozostawała w formie N-acetylogalaktozaminy (GalNAc), a więc potencjalna synteza takiej cząsteczki w skali przemysłowej pozostaje problematyczna. Związek wykorzystujący ten sam mechanizm została równocześnie zaproponowana przez Zhou i współpracowników (Zhou i in., 2021) oraz Caianiello i współpracowników, jednak drugi zespół zaprezentował związek całkowicie małowcząsteczkowy (Caianiello i in., 2021), co z jednej strony ułatwia potencjalnie późniejszą syntezę wielkoskalową, jednak stwarza większe wyzwanie na etapie wczesnego rozwoju, bowiem każdorazowo musi zostać od nowa zaprojektowany fragment wiążący cel molekularny.

Jako jeden z czynników limitujących w wykorzystaniu LYTAC wskazywane jest tempo degradacji. Jest ono limitowane przez szybkość powrotu IGF2R na powierzchnię komórki po indukcji internalizacji, ale również – w przypadku cząsteczek posiadających reszty M6P – kompetycja z naturalnie występującymi związkami zawierającymi te reszty (Banik i in., 2020). Wyniki te są spójne z opublikowaną później przez tą samą grupę analizą wskazującą, że

inhibicja naturalnej biosyntezy glikanów M6P obniża poziom IGF2R zajmowanego przez występujące endogennie białka zawierające te struktury, co z kolei zwiększa dostępność receptora dla cząsteczek LYTAC i w rezultacie zwiększa intensywność degradacji (Ahn i in., 2023). Niezbadaną kwestią pozostaje czy analogiczna sytuacja ma miejsce w przypadku wykorzystania LYTAC opartym o IGF2 lub jego analogi, tj. jak wpływa naturalnie występujący IGF2 na intensywność degradacji oraz czy wykorzystanie IGF2R w procesie ukierunkowanej degradacji nie zaburza naturalnego metabolizmu IGF2 do poziomu, w którym byłoby to powodem niepożądanych skutków ubocznych. Jednocześnie Ahn i współpracownicy wskazują na inne szlaki metaboliczne, których regulacja ma wpływ na intensywność degradacji za pośrednictwem IGF2R. Są one związane z recyrkulacją LYTAC z endosomu na powierzchnię komórki oraz dojrzewaniem lizosomów. Autorzy wskazują też, że skuteczna internalizacja celów rozpuszczalnych nie zawsze jest skorelowana z internalizacją celów transmembranowych i na odwrót, co sugeruje, że w obu przypadkach mamy do czynienia z działaniem różnych mechanizmów (Ahn i in., 2023).

Jednym z potencjalnych rozwiązań ograniczeń wynikających z zaangażowania jakiegokolwiek receptora jest zastosowanie LYTAC niezależnych od obecności receptorów. Konstrukty te wykorzystują przeciwciała skierowane na wybrany cel molekularny, które jednocześnie zawierają także motyw występujący naturalnie w IGF2R, który warunkuje jego internalizację (Zhang i in., 2021) (Yu i in., 2023). Takie rozwiązanie pozwala całkowicie uniezależnić internalizację od występowania jakichkolwiek receptorów na powierzchni komórki, choć większość przytoczonych w tym rozdziale badań wskazuje na powszechność występowania IGF2R w szerokim przekroju tkanek, stąd w zastosowaniach aplikacyjnych nie powinno to stanowić problemu. Ponadto, innowacją zaprezentowaną przez Zhanga i współpracowników jest wykorzystanie przeciwciał jednodomenowych (występujących naturalnie u wielbłądowatych, ang. *nanobody*) jako elementu warunkującego powinowactwo do celu molekularnego, co pozwala na obniżenie całkowitej masy kompleksu w porównaniu do zastosowania pełnoformatowych przeciwciał, jednocześnie nie wykorzystując aptamerów (co zostało opisane szerzej dalej w rozdziale). Ewentualne problemy wynikające z niższego powinowactwa do celu zostały rozwiązane poprzez zastosowanie cząsteczki zdolnej do wiązania kowalencyjnego (Zhang i in., 2021), co później zostało również potwierdzone wynikami opublikowanymi przez Li i współpracowników (choć w tym przypadku zastosowane zostały właśnie aptamery) – LYTAC ze zdolnością wiązania kowalencyjnego wykazuje istotnie wyższy poziom degradacji celu molekularnego niż cząsteczka, która takiej zdolności nie posiada (Li i in., 2023).

Przy projektowaniu cząsteczek warunkujących ukierunkowaną degradację lizosomalną wykorzystywane są również inne receptory kierujące do lizosomu. Przykładem takiego receptora jest integryna $\alpha_v\beta_3$. Poza standardowym panelem eksperymentów potwierdzających skuteczną internalizację celów zewnątrzkomórkowych i transbłonowych Zheng i współpracownicy raportują także wyniki z badań *in vivo* w mysim modelu guza indukowanym poprzez wszczepianie komórek B16F10 (czerniak). Podawanie myszom zaprojektowanego związku BMS-L1-RGD w znaczący sposób obniżało wzrost guza względem kontroli. Co więcej, zaprojektowane związki są konstruktami całkowicie małowcząsteczkowymi. Po raz kolejny wskazywana jest również istotność geometrii wiązania celu i receptora, ponieważ wraz ze zmianą długości linkera wiążącego domeny warunkujące wiązanie obu białek zmieniała się także intensywność degradacji (Zheng i in., 2022).

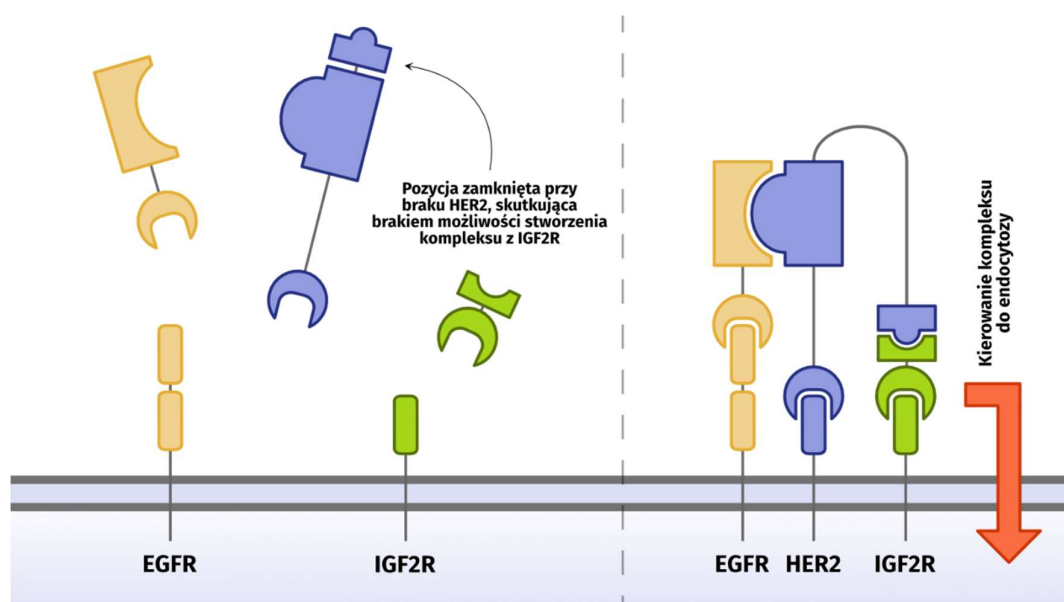
Kolejnym przykładem receptora kierującego do lizosomu są receptory cytokin, takie jak CXCR7. W tym przypadku wykorzystywane są cząsteczki całkowicie białkowe, o architekturze asymetrycznej (analogicznej do prezentowanego w niniejszej pracy konstruktu C5M1A – Rycina 8). Pance i współpracownicy wskazują na przewagi tego formatu: brak problemów z parowaniem łańcuchów lekkich, które może występować w przeciwciałach bispecyficznych typu KIH oraz monowalentność względem każdego z celów – przeciwciała biwalentne mogą bowiem wiązać dwa cele molekularne, jednocześnie nie wiążąc receptora kierującego do lizosomu, co wpływa na intensywność zachodzącej degradacji. Autorzy wyciągają jeszcze jeden wniosek kluczowy przy dalszym rozwoju tego typu technologii – cząsteczki oparte o różne przeciwciała o niemal identycznym powinowactwie do celu molekularnego wykazują inną intensywność degradacji, co sugeruje, że istotną rolę odgrywa miejsce wiązania – im bliżej błony komórkowej, tym skuteczniejsza degradacja (Pance i in., 2023).

Innym białkiem warunkującym internalizację jest receptor transferyny. W przeciwieństwie do przytoczonego powyżej przykładu, cząsteczki prezentowane przez Zhanga i współpracowników wykazują wyższą intensywność degradacji w formacie biwalentnym wobec receptora transferyny, co najprawdopodobniej spowodowane jest faktem, że receptor ten inicjuje endocytozę jako dimer. Interesującym rozwiązaniem jest też zastosowanie fragmentu, który będzie trawiony katepsynami we wczesnym endosomie, co pozwoli na rozdzielenie kompleksu przed skierowaniem go do lizosomu, jednocześnie umożliwiając receptorowi transferyny powrót na powierzchnię komórki (Zhang i in., 2023).

Następna ścieżka pozwalająca na ukierunkowaną degradację to wykorzystująca receptor LRP-1. Loppinet i współpracownicy zaprojektowali małą cząsteczkę angażującą ten receptor do internalizacji wybranych celów molekularnych. Poważną wadą tego podejścia jest jednak

konieczność nie tylko obecności LRP-1 na powierzchni komórki, ale również innych białek koniecznych do inicjacji endocytozy tą ścieżką: TG2 i α 2M (Loppinet i in., 2023).

Ambitnym projektem, który poszerza pole ukierunkowanej degradacji, jest zaprojektowanie syntetycznych cząsteczek EndoTags, które do internalizacji wykorzystują receptory IGF2R, ASGPR, receptor transferyny oraz Sortilin. Autorzy po raz pierwszy demonstrują zastosowania receptora Sortilin, który zlokalizowany jest głównie w mózgu i układzie nerwowym, co stwarza podstawy pod technologię indukującą degradację wyłącznie w wybranych tkankach. Wskazują także na różne mechanizmy indukcji endocytozy. W przypadku IGF2R są to zmiany konformacyjne receptora; dla ASGPR – oligomeryzacja, podczas gdy dwa pozostałe są w sposób ciągły recyrkulowane pomiędzy powierzchnią komórki i jej wnętrzem. Przy racjonalnym projektowaniu syntetycznych cząsteczek celujących w wybrany receptor należy więc mieć na uwadze jego mechanizm indukcji endocytozy, aby być w stanie skutecznie go zainicjować. Dla zoptymalizowania intensywności degradacji każdorazowo konieczna jest też optymalizacja linkerów łączących domeny warunkujące powinowactwo do obu celów. Prawdopodobnie jednak największą innowacją raportowaną przez autorów jest technologia warunkowej indukcji degradacji. Zakłada ona degradację celu molekularnego jedynie w obecności innego, wybranego markera, np. białka występującego tylko na komórkach nowotworowych. Zasadę działania zespół zademonstrował na przykładzie degradacji EGFR tylko w obecności receptora HER2 (schematycznie przedstawione na Rycinie 4) (Huang i in., 2023).



Rycina 4 Schematyczne przedstawienie zasady działania warunkowej degradacji w obecności HER2 z wykorzystaniem EndoTags, na podstawie (Huang i in., 2023)

Wspomniana wyżej technologia degradacji zależnej od rodzaju tkanki jest również kierunkiem wzbudzającym zainteresowanie. Szczególnie istotny zdaje się być mózg i układ nerwowy, ze względu na patogenezę chorób neurodegeneracyjnych. Znanym problemem w farmakoterapii jest także niezdolność cząsteczek do penetracji bariery krew-mózg. Howell i współpracownicy raportują zaprojektowanie cząsteczki opartej na Angiopep-2, wykorzystującej m.in. receptor LRP1, która zdolna jest nie tylko do inicjalizacji endocytozy i degradacji lizosomalnej, ale również transcytozy w modelu komórkowym bariery krew-mózg, co potencjalnie mogłoby zostać wykorzystane jako mechanizm dostarczania cząsteczek terapeutycznych (Howell i in., 2024).

Inną koncepcją indukcji degradacji jest wykorzystanie receptorów oczyszczających (ang. *scavenger receptors*). Cząsteczki angażujące te receptory składają się z koniugatu przeciwciała z dendrytycznym DNA, a więc konstrukcji niezbyt dogodnej do produkcji przemysłowej. Niemniej, badania Zhu i współpracowników potwierdzają skuteczność takiego podejścia, a także dostarczają jednych z nadal nielicznych danych preklinicznych z wykorzystania ukierunkowanej degradacji celów transbłonowych, w tym przypadku nukleoliny występującej na komórkach nowotworu płuc. W mysim modelu tej choroby zastosowanie ukierunkowanej degradacji wykazywało zmniejszenie objętości guzów o 76% względem kontroli nietraktowanej i o 30% względem zastosowania oligonukleotydu AS1411, wiążącego ten sam receptor (Zhu i in., 2023).

Bazując na wszystkich opisanych do tej pory wynikach, można przypuszczać, że istnieje możliwość aplikacji technologii LYTAC także do innych receptorów kierujących do lizosomu. Potencjalnie takim receptorem może być również LIMP2 (Coutinho i in., 2012).

Wśród opisanych receptorów największe zainteresowanie wydaje się nadal wzbudzać IGF2R. Jego powszechne występowanie połączone z możliwością rekrutacji poprzez cząsteczki całkowicie białkowe stanowi wygodny model dla projektowania nowych cząsteczek LYTAC. Cząsteczki tego typu, oparte na natywnym IGF2 zostały opisane przez Zhanga i współpracowników (Zhang i in., 2023). Interesującą innowacją zaproponowaną przez autorów jest zastosowanie fuzji IGF2 z domeną Z, która służy za uniwersalny adaptor, zdolny do wiązania przeciwciał, warunkujących specyficzność. Przy projektowaniu tego typu modułowych konstruktów istotną kwestią, która może okazać się problematyczna, jest ich ocena i akceptacja przez agencje regulatorowe, (jeżeli docelowo miałyby być stosowane jako terapie). Wyniki uzyskane w ramach niniejszego projektu (Mikitiuk i in., 2023) odpowiadają na potrzebę uzyskania cząsteczki rekrutującej IGF2R, jednocześnie niewykazującej powinowactwa do IGF1R. Potwierdzeniem istotności tego typu prac są późniejsze publikacje prezentujące analogiczne rozwiązania (Tian i in., 2024) (Pan i in., 2024).

Innym projektem wykorzystującym cząsteczki bazujące na IGF2, jak również ich zmutowane wersje, jest praca Yang i współpracowników, jednak nie określają oni powinowactwa mutantów do IGF1R, a jedynie raportują zwiększone powinowactwo wobec IGF2R, co przekłada się na większą intensywność degradacji (Yang i in., 2024). Innym interesującym aspektem pracy jest wykazanie, że LYTAC produkowane bezpośrednio w kokulturze przez komórki HEK293T są zdolne do indukcji degradacji celu obecnego w medium przez komórki K562. Autorzy postulują potencjalne zastosowanie takiego rozwiązania w komórkach terapeutycznych, takich jak np. CAR-T. IGF2R był również jednym z receptorów wykorzystanych jako kierujący do lizosomu w cząsteczkach EndoTags, jednak podobnie jak w pracy przytoczonej wcześniej, ich powinowactwo do IGF1R nie zostało określone (Huang i in., 2023). W końcu koncepcja celowania w IGF2R poprzez reszty M6P również jest dalej eksplorowana. Daurat i współpracownicy pokazują zdolność zaprojektowanych przez zespół cząsteczek kierujących VEGF do degradacji do wydajniejszego hamowania angiogenezy niż samo przeciwciało anti-VEGF w modelach embrionów kurczaka i danio pręgowanego (Daurat i in., 2024).

Trendem w projektowaniu cząsteczek LYTAC jest także wykorzystanie aptamerów. Opisane zostały cząsteczki wykorzystujące do degradacji zarówno ścieżkę IGF2R (Miao i in., 2021) (Hamada i in., 2023) celujące odpowiednio w receptory Met i HER2, jak również ścieżkę ASGPR (Wu i in., 2023). Wskazuje się na konieczność optymalizacji linkera wiążącego obie domeny aptameru, zarówno ze względu na jego późniejszą stabilność, jak i wpływ na zdolność degradacji celu molekularnego (Miao i in., 2021). Kolejnym krokiem w rozwoju tego typu cząsteczek są cząsteczki chimeryczne, złożone z IGF2 i aptamerów, które umożliwiają degradację dwóch celów molekularnych jednocześnie (Tian i in., 2024), wykazując działanie analogicznie do zastosowania bispecyficznych przeciwciał skierowanych na dwa cele molekularne, jednak dodatkowo z indukcją degradacji. Możliwe jest również przytoczone już wcześniej kowalencyjne wiązanie aptamerów do celu molekularnego, co pozytywnie wpływa na intensywność degradacji (Li i in., 2023).

Aptamery stwarzają możliwość szybkiej selekcji cząsteczek wykazujących powinowactwo do pożądanego celu molekularnego bazując na dostępnych bibliotekach (Shangguan i in., 2006), jak również relatywnie łatwej produkcji, szczególnie ze względu na uzyskiwanie powtarzalnego produktu z każdej szarży. Główną wadą, która stanowi poważną przeszkodę w komercjalizacji cząsteczek opartych o aptamery jest ich silnie niekorzystny profil farmakokinetyczny, związany między innymi z obecnością nukleaz w osoczu (Brody & Gold, 2000) (Zhu & Chen, 2018).

5.5.3. Technologia ukierunkowanej degradacji fagocytarnej (AUTAC, ATTEC)

Innymi podejściami do ukierunkowanej degradacji są technologie wykorzystujące autofagię. Wśród nich wyróżnić można cząsteczki AUTAC (ang. *autophagy-targeting chimera*) oraz ATTEC (ang. *autophagosome-tethering compound*).

5.5.3.1. AUTAC

Cząsteczki AUTAC działają na zasadzie kierowania wybranego celu molekularnego do degradacji w autofagosomie. Wyróżnikiem tego typu cząsteczek na tle innych technologii ukierunkowanej degradacji może być fakt, że poprzez mechanizm autofagii komórki są w stanie rozkładać cele o wielkości znacznie przekraczającej pojedyncze białka, takie jak agregaty białkowe czy całe organelle, np. uszkodzone mitochondria (Komatsu & Ichimura, 2010).

AUTAC opisane przez Takahashiego i współpracowników wykazują pewną analogię do technologii PROTAC, ponieważ także wykorzystują mechanizm ubikwitynacji, jednak w tym przypadku jest to poliubikwitynacja K63, która w odróżnieniu od K48 warunkuje degradację poprzez selektywną autofagię. Są to cząsteczki monospecyficzne, wykazujące powinowactwo do celu molekularnego, jednocześnie naznaczając go strukturą na bazie S-guanylation (modyfikacja potranslacyjna, obejmująca dodawanie reszt cyklicznych guanozyno-3',5'-monofosforanów (Sawa i in., 2007)), która determinuje dalszą ubikwitynację i degradację autofagosomalną (Takahashi i in., 2019). Do tej pory opisane zostały także cząsteczki AUTAC celujące przede wszystkim w uszkodzone mitochondria, wykorzystując w tym celu reszty biguanidu, jako warunkujące lokalizację w mitochondriach oraz jak opisane powyżej, S-guanylation (Vatté i in., 2024). Autorzy stwierdzają, że zsyntetyzowane przez nich cząsteczki wykazują znaczące właściwości hamujące proliferację komórek nowotworowych *in vitro*, w szczególności wskazując na znacząco niższe EC₅₀ niż w przypadku metforminy.

5.5.3.2. ATTEC

Cząsteczki ATTEC, podobnie jak AUTAC, warunkują degradację poprzez mechanizm autofagii, jednak celem jego rekrutacji wykorzystują powinowactwo do białka LC3, charakterystycznego dla autofagosomów. Koncepcja ATTEC została opisana po raz pierwszy przez zespół Lu i współpracowników, którzy wykazali skuteczność technologii w degradacji zmutowanego białka HTT, którego akumulacja stanowi przyczynę nieuleczalnej płasawicy Huntingtona, zarówno *in vitro*, jak i w badaniach na zwierzęcych modelach tej choroby (Li i in., 2019) (Li i in., 2020). Kolejno zespół pokazał też zdolność technologii do celowania w

struktury niebiałkowe – w tym przypadku adiposomy (Fu & Lu, 2021), a następnie w całe orgenella – mitochondria (Tan i in., 2023).

Na tej samej zasadzie działa także cząsteczka opracowana przez Pei i współpracowników, degradująca selektywnie białko BRD4. Wykazała ona znaczącą zdolność do hamowania proliferacji w szerokim panelu komórek nowotworowych. Cząsteczka została nazwana przez autorów jako AUTAC, jednak w myśl prezentowanego tu podziału bazującego na mechanizmie działania klasyfikuje się ona jako ATTEC (Pei i in., 2021).

Analogicznie jak w cząsteczkach LYTAC, także w przypadku ATTEC pojawiły się badania wykorzystujące aptamery jako elementy warunkujące powinowactwo do celu molekularnego (Liao i in., 2024). Zalety i wady tego podejścia zostały szerzej opisane we wcześniejszym akapicie 5.5.2.

6. CEL PRACY

Celami pracy było:

1. Wyprodukowanie referencyjnych cząsteczek: C5, M1 – M5, IGF2, IGF2R (domena 11) oraz IGF1R poprzez wyprowadzenie stabilnej, ssaczej linii komórkowej bądź produkcji przejściowej.
2. Zaprojektowanie konstruktów bispecyficznych, chimerycznych cząsteczek LYTAC, indukujących ukierunkowaną degradację lizosomalną transmembranowego i rozpuszczalnego ligandu programowanej śmierci 1, PD-L1 (ang. *Programmed Death-Ligand 1*).
3. Wyprowadzenie co najmniej jednej, stabilnej linii komórkowej produkującej zaprojektowaną cząsteczkę LYTAC.
4. Określenie zdolności wiązania odpowiednich celów komórkowych przez wyprodukowane cząsteczki LYTAC *in vitro*.
5. Zbadanie zdolności wyprodukowanych cząsteczek LYTAC do indukcji internalizacji/degradacji celu molekularnego w środowisku komórkowym; analiza zależności internalizacji/degradacji od czasu i od stężenia stosowanej cząsteczki.
6. Określenie wpływu cząsteczki na zdolność jednojądrzastych komórek krwi obwodowej do lizy komórek nowotworowych *in vitro*; porównanie z komercyjnie dostępnymi przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi na ten sam cel molekularny.

7. MATERIAŁY I METODY

7.1. MATERIAŁY

7.1.1. Odczynniki i materiały zużywalne

7.1.1.1. Hodowle bakteryjne

Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach bakteryjnych zostały wymienione w Tabeli 4.

Tabela 4 Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach bakteryjnych

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Komórki kompetentne DH5 α	Thermo Fisher Scientific	EC0112
Podłoże LB	BTL	P-0279
Ampicylina	Cayman Chemical Company	14417
Kanamycyna	Carl Roth	T832.2
Agar bakteriologiczny	BTL	S-0001

7.1.1.2. Oczyszczanie, trawienie, ligacja i analiza DNA

Krytyczne odczynniki wykorzystywane przy oczyszczaniu, trawieniu i analizie DNA zostały wymienione w Tabeli 5.

Tabela 5 Odczynniki wykorzystywane przy oczyszczaniu, trawieniu i analizie DNA

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Zestaw do oczyszczania DNA (miniprep)	EURx	E3500
Zestaw do oczyszczania DNA (midiprep)	Thermo Fisher	K2100-04
Zestaw do oczyszczania DNA (maxiprep)	Thermo Fisher	K2100-07
Zestaw do oczyszczania DNA z żelu agarozowego	EURx	E3540
Zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych	EURx	E3520
Ligaza faga T4	New England Biolabs	M0202
Bufor do ligazy T4	New England Biolabs	30202A
BamHI-HF	New England Biolabs	R3136

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
XhoI	New England Biolabs	R0146
KpnI-HF	New England Biolabs	R3142
HindIII-HF	New England Biolabs	R3104
Sall	New England Biolabs	R0138
NheI-HF	New England Biolabs	R3131
BglII	New England Biolabs	R0144
NruI-HF	New England Biolabs	R3192
MluI-HF	New England Biolabs	R3198
Bufor do trawienia rCutSmart	New England Biolabs	B6004S
2-propanol	Chempur	117515002
Agaroza	Thermo Scientific	R0492
Barwnik do DNA	Nippon Genetics Europe	MG 04
TRIS	Alfa Aesar	31801
Kwas octowy	VWR	20104.334
EDTA	Alfa Aesar	A10713

7.1.1.3. PCR

Odczynniki wykorzystywane przy reakcji PCR zostały wymienione w Tabeli 6. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 7.

Tabela 6 Odczynniki wykorzystywane przy reakcji PCR

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Polimeraza Phusion	New England Biolabs	M0530
Bufor 5x Phusion HF	New England Biolabs	B0518SVIAL
DMSO	New England Biolabs	B0515AVIAL
dNTP Mix	New England Biolabs	N0447
Startery	Genomed / Sigma Aldrich	N/D

Tabela 7 Materiały zużywalne wykorzystywane przy reakcji PCR

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Probówki mikrowirówkowe 0,2 mL	LABSOLUTE	7696502

7.1.1.4. Hodowle komórek zawiesinowych

Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach komórek zawiesinowych (zarówno CHO, jak i HEK) zostały wymienione w Tabeli 8. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 9.

Tabela 8 Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach komórek zawiesinowych

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
BalanCD CHO Growth A	Fujifilm Irvine Scientific	94120
BalanCD HEK	Fujifilm Irvine Scientific	94137
L-glutamina	Carl Roth	HN08.3
G418 Disulfate	TOKU-E	G021-100ML
Higromycyna B	PAN Biotech	P06-08100
D-Glukoza	VWR	0188
OptiMEM	gibco	31985070
Polietylenoimina	Polysciences	23966
DMSO	Sigma Aldrich	2650
NaOH	STANLAB	011-002-00-6

Tabela 9 Materiały zużywalne wykorzystywane przy hodowlach komórek zawiesinowych

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Kolby Elrenmeyera 125 mL	Nalgene	TMO4115-0125
Kolby Elrenmeyera 250 mL	Corning	CLS431144
Kolby Elrenmeyera 500 mL	Corning	CLS431255
Kolby Elrenmeyera 1 L	Corning	CLS431147
Kolby Elrenmeyera 2 L	Corning	CLS431145
Płytki 96-dołkowe nietraktowane	Greiner Bio-One	655161
Płytki 24-dołkowe nietraktowane	VWR	734-2779
Płytki 6-dołkowe nietraktowane	NEST	703001
Mini bioreaktor	Corning	431720
Zestaw do filtracji próżniowej 500 mL	Nalgene	566-0020
Zestaw do filtracji próżniowej 1 L	Nalgene	567-0020
Szkiełka do automatycznego licznika komórek	NanoEnTek	EVS-050

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Kuwety do elektroporacji	BTX	45-0126
Krioprobówki	VWR	10018-754

7.1.1.5. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE i Western blot

Odczynniki wykorzystywane przy elektroforezie w żelu poliakrylamidowym oraz Western blot zostały wymienione w Tabeli 10. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 11.

Tabela 10 Odczynniki wykorzystywane przy elektroforezie w żelu poliakrylamidowym oraz Western blot

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Akrylamid (Acryl/BIS™ 19:1)	VWR	0496
TRIS	Fisher Bioreagents	BP152-1
SDS	VWR	0227
Błękit bromofenolowy	VWR	0449
Gliceryna	Chempur	114433204
TEMED	VWR	0761
APS	VWR	M133
2-merkaptotetanol	VWR	0482
Glicyna	Sigma Aldrich	33226
Metanol	Chempur	116219904
Przeciwciała anty-ludzkie IgG skoniugowane z HRP	abcam	ab7499
Przeciwciała anty-ludzkie IgG, biotynylowane	Thermo Fisher	31789
Przeciwciała anty-HisTag biotynylowane	Southern Biotech	4603-08
Przeciwciała anty-ludzkie PD-L1	Thermo Fisher	14-5983-82
Przeciwciała anty-mysie IgG skoniugowane z HRP	Thermo Fisher	31430
Koniugat streptawidyna-HRP	Pierce	21124
BSA	Fisher Bioreagents	BP9702
Mleko w proszku	PanReac AppliChem	A0830
NaCl	VWR	27810.295
KCl	VWR	0395
Na ₂ HPO ₄	Chempur	117992300

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
KH ₂ PO ₄	VWR	26925.295
TWEEN 20	VWR	M147

Tabela 11 Materiały zużywalne wykorzystywane przy elektroforezie w żelu poliakrylamidowym oraz Western blot

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Membrana PVDF	Cytiva	10600023
Bibuły do Western blot	Cytiva	10426880

7.1.1.6. Chromatografia analityczna

Odczynniki wykorzystywane przy chromatografii analitycznej zostały wymienione w Tabeli 12. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 13.

Tabela 12 Odczynniki wykorzystywane przy chromatografii analitycznej

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Kwas octowy	VWR	20104.334
Chlorek potasu	VWR	26925
Chlorek sodu	VWR	26925
Na ₂ HPO ₄	VWR	TS44814
NaH ₂ PO ₄	VWR	470302-664
Octan sodu	VWR	0602
TRIS	Alfa Aesar	31801
TRIS-HCl	VWR	0234
Standard wielkości białek	Sigma Aldrich	69385

Tabela 13 Materiały zużywalne wykorzystywane przy chromatografii analitycznej

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Kolumna, białko A	Tosoh	0023483
Kolumna SEC	Waters	186005226
Fiolki do autosamplera	Polygen	11 09 2275
Zakrętki do fiolek do autosamplera	Chrom4	C39RE-09B
Strzykawki 3 mL	Henke Sass Wolf	8300005762
Filtry strzykawkowe 0,22 µm	VWR	514-0073

7.1.1.7. Chromatografia preparatywna

Odczynniki wykorzystywane przy chromatografii preparatywnej zostały wymienione w Tabeli 14. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 15.

Tabela 14 Odczynniki wykorzystywane przy chromatografii preparatywnej

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Złoże z białkiem A (MabSelect Sure)	Cytiva	17543804
Złoże z niklem (Ni Sepharose excel)	Cytiva	17371202
Kwas octowy	Carl Roth	T179
Imidazol	Aldrich Chemistry	I202
Na ₂ HPO ₄	VWR	TS44814
NaH ₂ PO ₄	VWR	470302-664
Chlorek sodu	VWR	26925
Wodorotlenek sodu	VWR	28244.295
TRIS	Alfa Aesar	31801
TRIS-HCl	VWR	0234

Tabela 15 Materiały zużywalne wykorzystywane przy chromatografii preparatywnej

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Kolumna SEC (HiLoad 26/600 Superdex 200 pg)	Cytiva	28-9893-36
Kolumna ze złożem z niklem (HisTrap HP), 1 mL	Cytiva	17524701
Kolumna szklana	YMC	10/200MOV
Sterylizujące filtry kapsułowe 200 cm ²	mdi	DKS55101AARX301

7.1.1.8. ELISA

Odczynniki wykorzystywane przy testach ELISA zostały wymienione w Tabeli 16. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 17.

Tabela 16 Odczynniki wykorzystywane przy testach ELISA

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
TMB	Sigma Aldrich	T0440
BSA	Fisher Bioreagents	BP9702
H ₂ SO ₄	POCH	575000115

Tabela 17 Materiały zużywalne wykorzystywane przy testach ELISA

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Płytki 96-dołkowe	Thermo Fisher	439454
Rezerwuary na odczynniki do pipet wielokanałowych	BIOLOGIX	25-1025
Folia do płytek	greiner bio-one	676001

7.1.1.9. Hodowla ludzkich, nowotworowych komórek adherentnych

Odczynniki wykorzystywane przy hodowli ludzkich, nowotworowych komórek adherentnych zostały wymienione w Tabeli 18. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 19.

Tabela 18 Odczynniki wykorzystywane przy hodowli ludzkich, nowotworowych komórek adherentnych

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Eagle's Minimum Essential Medium	PAN Biotech	P04-08056
DMEM:F12	PAN Biotech	P04-41250
RPMI-1640	PAN Biotech	P04-18047
FBS	PAN Biotech	P30-19375
Rekombinowana insulina ludzka	Sigma	I9278
Trypsyna-EDTA 0,25%	Thermo Fisher	25200-072
DPBS	PAN Biotech	P04-361000

Tabela 19 Materiały zużywalne wykorzystywane przy hodowli ludzkich, nowotworowych komórek adherentnych

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Płytki 6-dołkowe traktowane	Corning	3516
Płytki 6-dołkowe traktowane	NEST	703001
Płytki 24-dołkowe traktowane	NEST	702001
Płytki 96-dołkowe traktowane	NEST	701001
Kolby 12,5 cm ² traktowane	VWR	734-2309
Kolby 75 cm ² traktowane	VWR	734-2313

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Zestaw do filtracji próżniowej 1 L	Nalgene	567-0020
Szkiełka do automatycznego licznika komórek	NanoEnTek	EVS-050
Krioprobówki	VWR	10018-754

7.1.1.10. Test blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1

Odczynniki wykorzystywane przy teście blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1 zostały wymienione w Tabeli 20. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 21.

Tabela 20 Odczynniki wykorzystywane przy teście blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Test blokady ścieżki PD-1/PD-L1	Promega	J1250
Odczynnik do wywoływania luminescencji Bio-Glo™	Promega	G7940

Tabela 21 Materiały zużywalne wykorzystywane przy teście blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Płytki 96-dołkowe białe	Thermo Fisher	136101
Rezerwuary na odczynniki do pipet wielokanałowych	BIOLOGIX	25-1025

7.1.1.11. Cytometria przepływowa

Odczynniki wykorzystywane w cytometrii przepływowej zostały wymienione w Tabeli 22. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 23.

Tabela 22 Odczynniki wykorzystywane w cytometrii przepływowej

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Przeciwciało anty-ludzkie PD-L1	Thermo Fisher	14-5983-82
Przeciwciało anty-mysie IgG, wyznakowane PE	BD Biosciences	550589
BSA	Fisher Bioreagents	BP9702
NaCl	VWR	27810.295
KCl	VWR	0395

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Na ₂ HPO ₄	Chempur	117992300
KH ₂ PO ₄	VWR	26925.295
Etanol 96%	STANLAB	603-002-00-5

Tabela 23 Materiały zużywalne wykorzystywane w cytometrii przepływowej

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Probówki do cytometru przepływowego	Corning	352008
Płytki 96-dołkowe, stożkowodenne	Thermo Fisher Scientific	277143
Rezerwuary na odczynniki do pipet wielokanałowych	BIOLOGIX	25-1025

7.1.1.12. Mikroskopia fluorescencyjna

Materiały zużywalne wykorzystywane w mikroskopii fluorescencyjnej zostały wymienione w Tabeli 24.

Tabela 24 Materiały zużywalne wykorzystywane w mikroskopii fluorescencyjnej

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Płytki do hodowli adherentnych do obserwacji mikroskopowych	greiner bio-one	543078

7.1.1.13. Testy cytotoksyczności

Odczynniki wykorzystywane w testach cytotoksyczności zostały wymienione w Tabeli 25. Materiały zużywalne zostały wymienione w Tabeli 26.

Tabela 25 Odczynniki wykorzystywane w testach cytotoksyczności

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Medium z gradientem gęstości	Cytiva	17144002
DPBS	PAN Biotech	P04-361000
FBS	PAN Biotech	P30-19375
DMSO	Sigma Aldrich	2650
RPMI-1640	ATCC	30-2001
MTT	PanReac AppliChem	A2231
SDS	VWR	0227

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
HCl	Chempur	115752837

Tabela 26 Materiały zużywalne wykorzystywane w testach cytotoksyczności

Materiał	Producent	Numer katalogowy
Płytki 96-dołkowe traktowane	NEST	701001
Rezerwuary na odczynniki do pipet wielokanałowych	BIOLOGIX	25-1025

7.1.2. Aparatura

Lista aparatury wykorzystanej do wykonania badań została przedstawiona w Tabeli 27.

Tabela 27 Lista aparatury wykorzystanej przy realizacji projektu

Aparatura	Model	Producent
Inkubator CO ₂ z wytrząsaniem	New Brunswick S41i	Eppendorf
Inkubator CO ₂	CellXpert C170	Eppendorf
Inkubator CO ₂	INCO108med	Memmert
Inkubator z wytrząsaniem	AI 70 Minitron	Infors
Wirówka	MPW-352R	MPW
Wirówka	5415 R	Eppendorf
Wirówka preparatywna	J2 - 21M	Beckman
Chromatograf wysokociśnieniowy	Vanquish UHPLC system + CDS Chromeleon 7.2	Thermo Fisher Scientific
Chromatograf preparacyjny	AKTA Pure 25	GE Healthcare
Czytnik mikropłytek	Spark	Tecan
Komora laminarna	BIO130 A2	Alpina
Zestaw jednokanałowych pipet automatycznych (0,1 – 2,5 µL; 2 – 20 µL; 20 – 200 µL; 100 – 1000 µL; 0,5 – 5 mL)	Research plus	Eppendorf
Pipeta 12-kanałowa 30 – 300 µL	Research plus	Eppendorf
Pipeta 12-kanałowa 10 – 100 µL	Research plus	Eppendorf

Aparatura	Model	Producent
Pipeta 8-kanałowa 30 - 300 µL	Research plus	Eppendorf
Pipeta 8-kanałowa 10 - 100 µL	Research plus	Eppendorf
Pipeta 8-kanałowa 0,5 - 10 µL	Research plus	Eppendorf
Automatyczny licznik komórek	EVE	NanoEnTek
Mikroskop	VisiScope IT415 PH + kamera VisiCam 5.0 plus	VWR
Mikroskop konfokalny	SP8X	Leica
Cytometr przepływowy	FACScalibur	BD Biosciences
System wizualizacji membran i żeli	ChemiDoc	BIO-RAD
Transiluminator	Fast Gene Blue/White LED Tab	Nippon Genetics
System do elektroforezy w żelu agarozowym	Mini Gel II	VWR
System do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BIO-RAD
Zasilacz do elektroforezy	PowerPro 3AMP	Cleaver Scientific
System do transferu Western blot	Trans-Blot Turbo	BIO-RAD
Zamrażarka niskotemperaturowa	U445 2.5	Telstar
Elektroporator	GenePulser xCell	BIO-RAD
Termocykler	System CFX 96 Touch C1000 Touch Thermal Cycler	BIO-RAD
Spektrometr UV-VIS	UV-1600PC	VWR
pH-metr	FiveEasy Plus FP20	Mettler Toledo
Konduktometr	SevenCompact S231	Mettler Toledo
Waga laboratoryjna	PS 4500.3Y.M	RADWAG
Waga analityczna	AS 60/220.X2	RADWAG
System do demineralizacji wody	HLP 5UV	Hydrolab
Autoklaw	Vapour Line 135 EU	VWR
Dewar	BSS-750	VWR

Aparatura	Model	Producent
Wyrząsarka	3500 Advanced Orbital Shaker	VWR
Wyrząsarka	Rocker 2D Basic	VWR
Mieszadło magnetyczne	MR HEI-TEC	Heidolph
Worteks	REAX TOP	VWR
Pompa próżniowa	Rocker 400	Rocker

7.2. METODY

7.2.1. Modelowanie molekularne polipeptydów bazujących na IGF2, niewykazujących powinowactwa do IGF1R

Modelowanie molekularne polipeptydów bazujących na IGF2, wiążących IGF2R, jednocześnie niewykazujących powinowactwa do IGF1R zostało wykonane w zespole Poszukiwania Leków Recepton.

Eksperymentalna struktura ludzkiego IGF2 (6UM2.pdb) została wykorzystana jako matryca, w szczególności odcinki Glu6 – Ser29 i Gly41-Pro63. 12-aminokwasowa przerwa pomiędzy Ser29 i Gly41 została wypełniona krótkimi linkerami (2-3 aminokwasy) wykorzystując Rosetta Suite (Leaver-Fay i in., 2011). W pierwszym kroku eksperymentalna matryca została poddana protokołowi rozluźnienia (Nivón i in., 2013) z optymalizacją wiązań wodorowych i grup amidowych w łańcuchach bocznych. Rotamery z wejściowej struktury zostały wykorzystane w procesie pakowania, a dodatkowo przeprowadzono próbkowanie rotamerów chi1 i chi2. Koordynaty szkieletu stanowiły podstawę początkowych koordynatów szablonu. Maksymalna liczba cykli minimalizacji została ustawiona na 200. Wynikiem była pojedyncza struktura. Bazując na strukturze rozluźnionej, zostały wykonane dwa cykle protokołu remodelującego (Huang i in., 2011), uwzględniając odpowiednio linkery o długości 2 i 3. Wynikiem było 500 struktur dla każdego z cykli. Po przeprowadzeniu strukturalnej oceny najlepszych wyników (według punktacji Rosetta), wybrano 5 modeli do oceny eksperymentalnej. Kolejnym modelom nadano nazwy M1, M2, M3, M4 oraz M5.

7.2.2. Projektowanie konstruktów genetycznych

Wszystkie konstrukty wyprodukowanych białek zostały zaprojektowane lub skonstruowane opisanymi w niniejszym dziale technikami biologii molekularnej na bazie elementów genetycznych biblioteki Recepton z zamiarem ekspresji w komórkach ssaczych (CHO K1 lub HEK293).

Elementy genetyczne wchodzące w skład przykładowych konstruktów zaprezentowane są w Tabelach 28 - 32. Kolejność domen w zaprojektowanych cząsteczkach LYTAC przedstawiona jest na Rycinach 5 - 7. Wybrane formaty cząsteczek bispecyficznych zostały przedstawione na Rycinie 8.

Prezentowane sekwencje polipeptydów M1, M2, M3, M4 i M5 oraz ich pochodne objęte są **zgłoszeniem patentowym PL445164**, będącym rezultatem prac nad niniejszym projektem.

Tabela 28 Przykładowa sekwencja nukleotydowa biała znakowanego fragmentem IgG1 Fc, w tym przypadku kontrolnego peptydu M1-IgG1Fc

Element genetyczny	Sekwencja nukleotydowa
Miejsce rozpoznania KpnI	GGTACC
Sekwencja Kozak	ACCGCCACC
Sekwencja sygnałna BSA (UniProt ID: P02769 1-18)	ATGAAGTGGGTGACCTTCATCTCCCTGCTGTTTCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC
Sekwencja białka docelowego, np. polipeptydu M1	GAGACCTGTGCGGCGGCGAGCTGGTGGACACCCTGCAGTTCTGTTGCGGCGACAGGGGCTTCTACAACGACGACGGCATCGTGGAGGAGTGCTGCTTCAGGTCCTGCGACCTGGCCCTGCTGGAGACCTACTGCGCCACCCCC
Miejsce rozpoznania NheI	GCTAGC
HisTag (6 x His)	CACCACCACCACCACCAC
Miejsce rozpoznania Sall	GTCGAC
Miejsce rozpoznania czynnika Xa (IEGR)	ATCGAGGGCAGG
IgG1 Fc (UniProt ID: PODOX5 219 - 449)	CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCAGGTTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTCTGTA CAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
STOP	TGA

Miejsce rozpoznania HindIII	AAGCTT
--------------------------------	--------

Tabela 29 Sekwencja nukleotydowa konstruktów łańcucha lekkiego przeciwciała C5

Element genetyczny	Sekwencja nukleotydowa
Miejsce rozpoznania BamHI	GGATTC
Sekwencja Kozak	ACCGCCACC
Sekwencja sygnałna BSA (UniProt ID: P02769 1-18)	ATGAAGTGGGTGACCTTCATCTCCCTGCTGTTTCTGTTCTCCAGCGCCTACT CC
C5 LC	GTGCTGACACAGTCTCCCGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCTA CCCTGTCCTGCAAGGCTTCTGAGGACATCGGCACATGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGACAGGCTCCCGGCTGCTGATCTACGATGCTTCTTCCAGA GCCACAGGCATCCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTCA CCCTGACCATCTCCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGTCA GCAGTACGGCTCCCTGCCCTTGGACCTTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATC AAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGAGC AGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCTGTGCTGCTGTAACAACCTTCTACCC TCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAAC TCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGT CCTCCACACTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGC CTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAAC CGGGGCGAGTGC
STOP	TGA
Miejsce rozpoznania XhoI	CTCGAG

Tabela 30 Sekwencja nukleotydowa konstruktów łańcucha ciężkiego przeciwciała C5 z mutacją Knob-Into-Hole

Element genetyczny	Sekwencja nukleotydowa
Miejsce rozpoznania KpnI	GGTACC
Sekwencja Kozak	ACCGCCACC
Sekwencja sygnałna BSA (UniProt ID: P02769 1-18)	ATGAAGTGGGTGACCTTCATCTCCCTGCTGTTTCTGTTCTCCAGCGCCTACTC C

C5 IgG4 HC KIH2	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGCTCTCT GAGACTGTCTTGTGCCGCTCTGGCTTCACCTTCAGCCGGTACTGGATGTCCT GGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTTCGCCCTGATCTCCCGC GACGGCTCTGAGACATATTACGTGGACTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTC TCGGGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGAGAAGGCGGATGGTTCGGCGAGCTG GCCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTTAGTTCTGCTAGCAC CAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCG GAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCTGAGCCTGTGACC GTGTCTTGGAACCTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGT GCTGCAATCCAGCGGCTGTACTCTCTGTCTCCGTCTGTGACCGTGCCTTCTA GCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACACC TCCATGTCCACCATGTCTCTGCTCCAGAGTTTCTCGGCGGACCCCTCCGTGTTTC TGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTG ACCTGCGTGCGTGGTGGATGTGTCCCAAGAGGACCCCGAGGTGCAGTTAATTG GTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAAC AGTTCAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAT TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCCTAG CTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGTGAACCCAGG TTTACACCCTGCCTCCAAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTGGTTAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATTGCCGTGGAATGGGAGTC TAATGGCCAGCCAGAGAACAATAAGACCACACCTCCTGTGCTGGACTCCG ACGGCAGCTTCTTCTGTATTCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAA GAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTA CAGGAGAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGCAAG
STOP	TGA
Miejsce rozpoznania HindIII	AAGCTT

Tabela 31 Sekwencja nukleotydowa konstruktu peptydu M1, połączonego z fragmentem IgG4 Fc, zawierającym mutację Knob-Into-Hole, przeznaczonego do koekspresji jako asymetryczna cząsteczka LYTAC C5M1A.

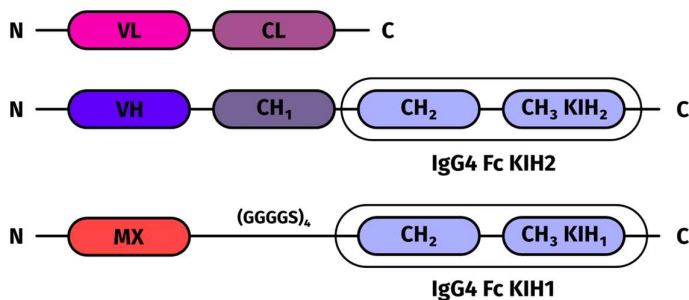
Element genetyczny	Sekwencja nukleotydowa
Miejsce rozpoznania KpnI	GGTACC
Sekwencja Kozak	ACCGCCACC
Sekwencja sygnałna BSA (UniProt ID: P02769 1-18)	ATGAAGTGGGTGACCTTCATCTCCCTGCTGTTTCTGTTCTCCAGCGCCTACTC C
M1	GAGACACTGTGTGGCGGAGAGCTGGTGGATACCCTGCAGTTCGTGTGTGGCGA CCGGGGCTTCTACAACGATGACGGCATCGTGGAAGAGTGTGCTTCCGGTCTT GTGATCTGGCCCTGCTGGAAACCTACTGCGCTACACCTGCTAGC
Linker (GGGS) ₄	GGCGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGCGGATCTGGTGGCGGAGGTAGTGGCGGCGG TGGCTCT
Miejsce rozpoznania Sall	GTCGAC

IgG4 Fc KIH1	AAGAGAGTGGAACTCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGA GTTTCTCGGCGGACCCTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCC TGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTTGCCAA GAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACAGAGTGGTGT CTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCCTGCCTCCATGCCAAGAGG AAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCT TCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAA GACCACACCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCCCGCC TGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCT GGGCAAG
STOP	TGA
Miejsce rozpoznania HindIII	AAGCTT

Tabela 32 Sekwencja nukleotydowa bispecyficznej cząsteczki LYTAC C5M1B.

Element genetyczny	Sekwencja nukleotydowa
Miejsce rozpoznania KpnI	GGTACC
Sekwencja Kozak	ACCGCCACC
Sekwencja sygnałna BSA (UniProt ID: P02769 1-18)	ATGAAGTGGGTGACCTTCATCTCCCTGCTGTTTCTGTTCTCCAGCGCCTACT CC
C5 HC _v	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCC TGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGGTACTGGATGAG CTGGGTGAGGCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCCTGATCAGC AGGGACGGCAGCGAGACCTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCA TCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG GGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGGGCGGCTGGTTCCGGC GAGCTGGCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAACGTGAGC
Linker (GGGS) ₄	GGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCG GCGGCTCC
C5 LC _v	ATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGAGAGGG CCACCCTGAGCTGCAAGGCCAGCGAGGACATCGGCACCTGGCTGGCCTGGTA CCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGGCTGCTGATCTACGACGCCAGCAGC AGGGCCACCGGCATCCCCGACAGGTTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACT TCACCCTGACCATCAGCAGGCTGGAGCCCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTG CCAGCAGTACGGCAGCCTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAG ATCAAGAGGGGCGGCGGCGGC
2x His Tag	GCAGCACACCACCACCATCACCATGCAGCACACCACCACCATCACCAT
Miejsce rozpoznania NheI	GCTAGC

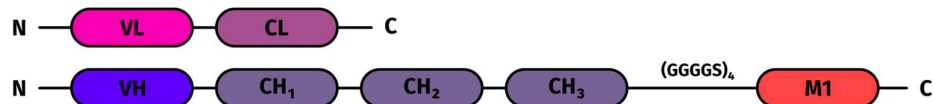
Linker (GGGGS) ₄	GGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCC
Miejsce rozpoznania Sall	GTCGAC
M1	GAGACCCTGTGCGGCGGCGAGCTGGTGGACACCCTGCAGTTCGTGTGCGGCG ACAGGGGCTTCTACAACGACGACGGCATCGTGGAGGAGTGCTGCTTCAGGTC CTGCGACCTGGCCCTGCTGGAGACCTACTGCGCCACCCCC
STOP	TAG
Miejsce rozpoznania HindIII	AAGCTT



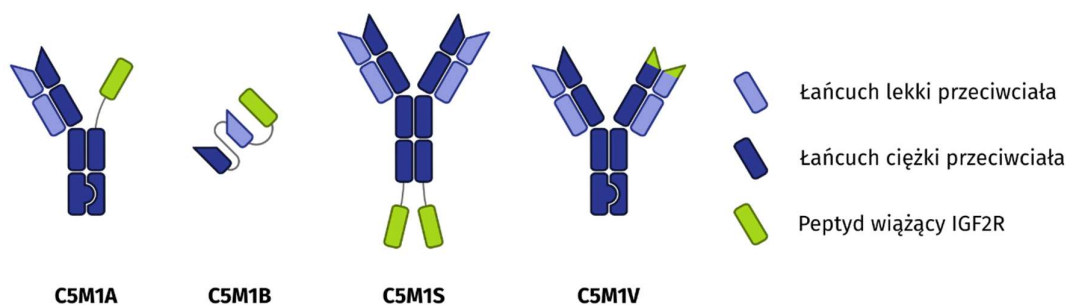
Rycina 5 Układ domen w kompletnym konstrukcie asymetrycznych cząsteczek LYTAC C5MXA, opartych na kolejnych peptydach M1 – M5 (opracowanie własne).



Rycina 6 Układ domen w konstrukcie cząsteczki LYTAC C5M1B (opracowanie własne).



Rycina 7 Układ domen w kompletnym konstrukcie symetrycznej cząsteczki LYTAC C5M1S (opracowanie własne).



Rycina 8 Przegląd formatów zaprojektowanych cząsteczek bispecyficznych LYTAC (opracowanie własne).

W przypadku sekwencji sygnałnej BSA każdorazowo w pozycji +4 stosowana jest adenina, zamiast będącej standardowym elementem sekwencji Kozak guaniny.

Zaprojektowane konstrukty molekularne zostały zsyntezowane zewnątrz, przez firmę Eurofins Genomics oraz dostarczone w dostępnych komercyjnie wektorach do klonowania udostępnianych przez dostawcę: pEX-A128 lub pEX-A258, warunkujących oporność na ampicylinę. Otrzymane liofilizaty plazmidów zostały zawieszone w buforze Tris-EDTA (TE), w objętości koniecznej do uzyskania stężenia 100 ng/ μ L, a następnie wykorzystane do transformacji komórek kompetentnych.

7.2.3. Hodowla bakteryjna i przygotowanie komórek kompetentnych

Komórki *E. coli* DH5 α były hodowane w 1x LB, suplementowanym ampicyliną (100 μ g/mL) lub kanamycyną (50 μ g/mL), zależnie od oporności warunkowanej przez zastosowany plazmid (lub bez dodatku antybiotyków w przypadku komórek nietransformowanych). Jeśli nie zaznaczono inaczej hodowla była prowadzona przez noc, w 37°C, przy wytrząsaniu 180 RPM w inkubatorze Infors AI 70 Minitron.

Z hodowli nocnej komórek DH5 α zainokulowana została świeża hodowla o docelowej objętości 120 mL w rozcieńczeniu 1:100 (v/v). W momencie osiągnięcia OD₆₀₀ w przedziale 0,8 – 1,0 komórki zostały odwirowane przy 4000 RCF przez 10 minut, w 4°C. Nadsącz usunięto. Osad został zawieszony w 10 mL zimnego, 100 mM chlorku magnezu. Następnie komórki zostały ponownie odwirowane. Powtórzono płukanie chlorkiem magnezu oraz wirowanie. Komórki zawieszono w 10 mL zimnego, 100 mM chlorku wapnia, a następnie inkubowano na lodzie przez 10 minut. Komórki zostały zwirowane przy 4000 RCF przez 10 minut, w 4°C. Nadsącz usunięto, a osad zawieszono w 4 mL zimnego roztworu 100 mM chlorku wapnia z 20% zawartością glicerolu. Uzyskaną zawiesinę rozporcjowano do mikroprobówek wirówkowych po 50 μ L i zamrożono w -80°C.

7.2.4. Transformacja

Przygotowane wcześniej komórki kompetentne DH5 α zostały transformowane z użyciem 100 – 200 ng otrzymanego DNA plazmidowego. Transformacja została wykonana według protokołu szoku termicznego, przedstawionego poniżej (Tabela 33).

Tabela 33 Warunki transformacji komórek kompetentnych

Warunki	Czas
Lód	30 minut
42°C	45 sekund
Lód	2 minuty
0,5 mL LB bez antybiotyków, 37°C	30 – 60 minut
LB z antybiotykiem odpowiednim dla zastosowanego plazmidu; 37°C; 5 - 10 mL z wytrząsaniem 180 RPM dla hodowli zawiesinowych lub szalka Petriego dla hodowli na podłożu stałym	Hodowla przez noc - minimum 18 godzin

7.2.5. Oczyszczanie DNA plazmidowego

DNA plazmidowy z przeznaczeniem do zastosowania w dalszym klonowaniu został oczyszczony z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu do oczyszczania DNA plazmidowego, według instrukcji producenta (EURx).

Analogicznie, w przypadku oczyszczania DNA plazmidowego w większej skali, przeznaczonego do elektroporacji komórek ssaczych lub ekspresji przejściowej w komórkach ssaczych na późniejszych etapach prac, DNA został oczyszczony z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu do oczyszczania DNA plazmidowego, pozwalającego na uzyskanie czystości preparatu koniecznej do wymienionych powyżej zastosowań. Oczyszczanie przeprowadzono według instrukcji producenta (ThermoFisher Scientific).

7.2.6. Trawienie enzymami restrykcyjnymi

Rutynowe trawienie enzymami restrykcyjnymi było prowadzone według zaleceń producenta enzymów (New England Biolabs). Warunki przykładowej reakcji trawienia zostały przedstawione poniżej (Tabela 34).

Tabela 34 Warunki przykładowej reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi

Warunek	Wartość
KpnI-HF	0,5 μ L
HindIII-HF	0,5 μ L

DNA plazmidowe	15 μ L
Bufor CutSmart 10x	2 μ L
Woda	2 μ L
Temperatura inkubacji	37°C
Czas trawienia	≥ 60 minut

W przypadku rutynowego trawienia restrykcyjnego stosowano 5-10 U/ μ g DNA.

Linearyzacja DNA plazmidowego do celów elektroporacji komórek ssaczych była prowadzona przy stężeniu 0,5 – 1 U/ μ g DNA przez noc (minimum 18 godzin). Całkowita objętość reakcji została ustalona tak, aby objętość stosowanych enzymów stanowiła maksymalnie 10% całkowitej objętości reakcji, celem uniknięcia niespecyficznej aktywności enzymów. Objętość buforu do trawienia została odpowiednio dostosowana, aby uzyskać końcowe stężenie buforu 1x.

Po upływie wyznaczonego czasu, reakcja trawienia była zatrzymywana z wykorzystaniem barwnika obciążającego do elektroforezy w żelu agarozowym (końcowe stężenie barwnika w próbce wynosiło 1x) lub w przypadku linearyzacji, z wykorzystaniem izopropanolu.

7.2.7. Elektroforeza w żelu agarozowym

Elektroforeza w żelu agarozowym (żel 6 cm, 1% agarozy) prowadzona była z wykorzystaniem buforu TAE przy napięciu 100 V przez 45 minut. Następnie żel był barwiony przez 15-25 minut oraz wizualizowany w świetle niebieskim.

W przypadku fragmentów DNA w zakresie 100 – 300 pz stosowano alternatywnie żel 6 cm, 2% agarozy; rozdział prowadzono przy napięciu 70 V przez 70 minut.

7.2.8. Oczyszczanie fragmentów DNA z żelu agarozowego i po reakcjach enzymatycznych

Oczyszczanie fragmentów DNA wyciętych z żelu agarozowego oraz po reakcjach enzymatycznych (trawienie restrykcyjne) odbywało się z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów przeznaczonych do tego typu zastosowań; oczyszczanie prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta (EURx).

7.2.9. Ligacja

Konstrukty genetyczne wycięte z dostarczonych plazmidów do klonowania lub przygotowane poprzez ligację elementów pozyskanych z biblioteki elementów genetycznych Recepton zostały wklonowane do plazmidów do ekspresji: pcDNA3.1(+) (ThermoFisher Scientific), pREC3G (Recepton) lub pREC3H (Recepton).

Ligację prowadzono z wykorzystaniem rekombinowanej ligazy faga T4 (New England Biolabs), w warunkach kontrolowanej temperatury. Stosunek molowy insertu do wektora wynosił minimum 5:1, optymalnie 10:1. Stosowano 25–100 ng wektora.

W przypadku ligacji dwóch insertów do późniejszej amplifikacji stosunek molowy wynosił 1:1. Przykładowe warunki ligacji przedstawiono poniżej (Tabela 35).

Tabela 35 Przykładowe warunki ligacji insertu do wektora

Element	Wartość
Insert	45 µL
Wektor	2 µL
Ligaza	1 µL
Bufor	5,5 µL
Woda	1,5 µL
Temperatura	21°C
Czas	1-2 h

Po zakończonej ligacji całość mieszaniny ligacyjnej była użyta do transformacji komórek kompetentnych i wysiewana na szalki Petriego według protokołu opisanego w punkcie 7.2.4.

W przypadku ligacji dwóch elementów do późniejszej amplifikacji, otrzymana mieszanina wykorzystywana była bezpośrednio jako matryca do reakcji PCR.

7.2.10. PCR

W przypadku konieczności namnożenia fragmentu insertu z biblioteki elementów genetycznych Recepton (np. fragmenty IgG4 Fc KIH, wykorzystane w konstrukcie C5M1A) wykonywana była reakcja PCR. Startery syntetyzowane były zewnętrznie (Genomed lub SigmaAldrich). Przykładowy skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil reakcji został opisany poniżej (odpowiednio Tabele 36 i 37). Produkty analizowane były na żelu agarozowym, a następnie oczyszczane według protokołów opisanych powyżej (odpowiednio punkty 7.2.7 i 7.2.8).

W wybranych przypadkach technika PCR stosowana była również do wydłużania konstruktów oraz potwierdzenia obecności insertu po ligacji.

Tabela 36 Przykładowy skład mieszaniny do reakcji PCR

Składnik	Objętość [µL]
Polimeraza (Phusion NEB)	0,2
Bufor do reakcji (5x)	4

Mieszanina dNTPs (10 mM każdego)	1
Starter Forward (roztwór 5 μ M)	2
Starter Reverse (roztwór 5 μ M)	2
Matryca (1 ng/ μ L)	1
Woda	9,8

Tabela 37 Przykładowy profil temperaturowy reakcji PCR

Temperatura [°C]	Czas [s]	
98	180	
98	20	x35
56	30	
72	15	
72	300	
10	∞	

7.2.11. Hodowla ssaczych komórek zawiesinowych (CHO, HEK29)

7.2.11.1. CHO

Hodowle zawiesinowych komórek CHO rozpoczynano od rozmrożenia banków komórkowych. Banki wyjęte z ciekłego azotu były inkubowane w 37°C i okresowo mieszane, aż do momentu całkowitego rozmrożenia banku. Następnie, były one aseptycznie transferowane do docelowego, wcześniej przygotowanego i nagrzanego do 37°C medium hodowlanego. Rutynowo na bank składało się 10 mln komórek, a objętość hodowli bezpośrednio po rozmrożeniu wynosiła 30 mL.

Komórki pasażowane były w logarytmicznej fazie wzrostu, w przypadku opisywanej linii jako wartość maksymalna zostało przyjęte 3,5 mln komórek/mL. Gęstość inokulacji przy pasażu mieściła się w zakresie 0,15 – 0,6 mln komórek/mL. Czas generacji komórek wynosił ok. 20 godzin.

Hodowle prowadzone były w jednorazowych, presterylizowanych kolbach Erlenmeyera (Thermo Fisher Scientific, Corning) oraz, na wczesnych etapach rozwoju linii komórkowych, w 50 mL mini bioreaktorach (Corning). Objętość robocza wynosiła maksymalnie połowę objętości nominalnej kolby; dla mini bioreaktora objętość robocza wynosiła 10% objętości nominalnej.

Temperatura hodowli wynosiła 37°C, z 8% zawartością CO₂ w atmosferze. Komórki inkubowane były w inkubatorze New Brunswick S41i (Eppendorf) z wbudowaną platformą do wytrząsania o orbicie 25 mm przy 140 RPM (kolby) lub INCO108med (Mettler) z niezależną

platformą do wytrząsania Advanced 3500 Orbital Shaker (VWR) o orbicie 15 mm przy 140 RPM (kolby) lub 210 RPM (mini bioreaktory).

Zastosowane medium to BalanCD CHO Growth A suplementowane roztworem 200 mM L-glutaminy do końcowego stężenia 8 mM. W przypadku hodowli z selekcją, dodawane były stosowne antybiotyki – G418 (genetycyna) w końcowym stężeniu 50 – 600 µg/mL lub Higromycyna B w stężeniu 25 – 300 µg/mL.

W przypadku klonowania z pojedynczej komórki medium było suplementowane wcześniej przygotowanym medium kondycjonowanym (50% objętości całego medium) oraz preparatem InstiGRO CHO (Advanced Instruments), według instrukcji producenta.

7.2.11.2. HEK293

Hodowle zawiesinowe komórek HEK293F, jak i HEK293S (GnTI^{-/-}) prowadzono analogicznie do hodowli zawiesinowych linii komórkowych CHO. Temperatura hodowli wynosiła 37°C, z 8% zawartością CO₂ w atmosferze. Komórki inkubowane były w inkubatorze New Brunswick S41i (Eppendorf) z wbudowaną platformą do wytrząsania o orbicie 25 mm przy 140 RPM. Komórki hodowane były w kolbach Erlenmeyera, przy maksymalnej objętości roboczej wynoszącej połowę objętości nominalnej. Wykorzystywane medium to BalanCD HEK (Fujifilm Irvine Scientific), suplementowane roztworem 200 mM L-glutaminy do końcowego stężenia 4 mM. Przy pasażu komórki przesadzane były przy gęstości w zakresie 0,15 – 0,6 mln komórek/mL, hodowla prowadzona była przez 2 – 4 dni, tak aby całkowite stężenie komórek w hodowli nie przekraczało 3 mln komórek/mL.

7.2.12. Transfekcja komórek ssaczy i rozwój stabilnych linii komórkowych

Komórki CHO były transfekowane metodą elektroporacji. Komórki po rozmrożeniu pasażowano minimum jeden raz przed przeprowadzeniem transfekcji.

W celu rozwoju stabilnej linii komórkowej do transfekcji wykorzystywano liniowy DNA, który linearyzowany był według protokołu opisanego w punkcie 7.2.6

Parametry transfekcji podano w Tabeli 38.

Tabela 38 Parametry elektroporacji komórek CHO K1

Parametr	Wartość
Napięcie [V]	300
Czas pulsu [ms]	18
Ilość pulsów	1
Przerwa między pulsami	N/D

Szerokość kuwety [mm]	4
Ilość komórek [mln]	1
Objętość elektroporacji [μ L]	400
Stężenie komórek [mln kom./mL]	2,5
Ilość DNA [μ g]	5 - 25
Medium do elektroporacji	OptiMEM (gibco)
Objętość po elektroporacji [mL]	3,4

Bezpośrednio po elektroporacji komórki inkubowane były na nietraktowanej 6-dołkowej płytce. W ciągu 24 godzin od elektroporacji do hodowli dodawane było medium suplementowane stosownym do zastosowanego plazmidu antybiotykiem. Następnie, stężenie antybiotyku zwiększane było dnia 3 oraz 5. Dnia 5 hodowle przenoszone były do mini bioreaktorów. Dalsze zwiększanie stężenia antybiotyków realizowane było indywidualnie, zależnie od kondycji hodowli. Stężenie antybiotyków w hodowlach podnoszone było do momentu, w którym równoległa hodowla kontrolna (elektroporowana bez dodatku DNA) osiągnęła żywotność <10%.

W przypadku niskiej żywotności elektroporowanej hodowli (<60%), stosowane było wirowanie komórek i wymiana medium na świeże, szczególnie na etapie bezpośrednio po transfekcji.

Po zakończeniu selekcji hodowla analizowana była pod kątem produktywności z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej lub metody Western blot.

7.2.13. Przygotowanie banków komórkowych

Banki linii komórkowych CHO K1 przygotowywane były w standardowym medium hodowlanym (BalanCD CHO Growth A, 8 mM L-glutaminy, stosowny antybiotyk w stężeniu 50 – 100 μ g/mL) z dodatkiem 5% DMSO.

Objętość banku wynosiła 1 mL, przy 10 mln komórek.

Objętość hodowli konieczna do przygotowania określonej ilości banków wirowana była przy 200 RCF przez 5 minut. Następnie usuwano nadsącz, zawieszano osad komórkowy w zimnym medium do bankowania i porcjowano do krioprobówek. Krioprobówki inkubowano w Mr. Frosty™ (Thermo Fisher Scientific) przez 30 minut w 4°C, następnie w -80°C przez minimum 7 godzin (najczęściej przez noc), po czym przenoszono je do przechowywania w fazie gazowej ciekłego azotu.

Przy przygotowywaniu banków linii komórkowych HEK postępowano analogicznie.

7.2.14. Produkcja białek ze stabilnych linii komórkowych

Produkcja białek ze stabilnych linii komórkowych odbywała się poprzez rozmrożenie banku komórkowego oraz ekspansję inokulum, prowadzone według ogólnych zasad dotyczących hodowli komórek CHO, opisanych w punkcie 7.2.11.1.

Hodowla produkcyjna prowadzona była również z zachowaniem większości zasad opisanych w wyżej wymienionym akapicie. Różnice polegały na długości hodowli: 7 – 10 dni, w zależności od stanu indywidualnej hodowli oraz organizacji pracy i dostępności miejsca w inkubatorze. Żywotność komórek oraz stężenie glukozy w hodowli było mierzone dnia 5 hodowli. Zależnie od wyniku pomiaru stężenia, glukoza uzupełniana była do poziomu 3 g/L poprzez dodanie 20% (w/v) sterylnego roztworu glukozy. W przypadku znaczącego obniżenia żywotności komórek zaplanowano wcześniejszy zbiór komórek, jednak w trakcie realizacji projektu nie wystąpiła taka konieczność.

Ostatniego dnia hodowli ponownie mierzono jej parametry (liczba komórek, żywotność komórek, stężenie glukozy), następnie całą objętość wirowano przy średnio ok. 7750 RCF. Ostatnim krokiem odzysku pierwotnego była filtracja przez sterylizujący filtr kapsułowy z hydrofilową membraną PES lub PVDF o porach nie większych niż 0,22 μm , a następnie tak uzyskany filtrat oczyszczano dalej z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa lub mrożono w -80°C do późniejszego oczyszczenia.

7.2.15. Produkcja przejściowa

Komórki HEK293F oraz HEK293S wykorzystywane były do przejściowej produkcji białek.

W pierwszym kroku, z hodowli bakteryjnej oczyszczano DNA, wykorzystując komercyjnie dostępny zestaw do oczyszczania DNA plazmidowego, który zapewniał końcową czystość preparatu umożliwiającą jego zastosowanie w hodowlach komórkowych.

Komórki Freestyle293F hodowano w odpowiedniej objętości, tak aby ich stężenie w dniu transfekcji nie przekroczyło $3 \cdot 10^6$ komórek/mL. Komórki pasażowano do 90% końcowej, zakładanej objętości hodowli przy gęstości 10^6 komórek/mL. Pozostałe 10% medium pozostawiano w RT. Adaptacja komórek do świeżego medium trwała minimum 3 godziny. W pozostawionych 10% medium zawieszano DNA i odczynnik do transfekcji (PEI 25K linear, Polysciences) w stosunku 1 μg DNA do 1 miliona komórek oraz 30 μL odczynnika o stężeniu 1 mg/mL na 10 mL hodowli. Tak przygotowane medium pozostawiano na 30 minut w celu uformowania kompleksów DNA-PEI. Po zakończeniu inkubacji mieszaninę medium-DNA-PEI przenoszono do hodowli, tym samym otrzymując 100% zakładanej objętości. Hodowla prowadzona była według standardowego protokołu opisanego w punkcie 7.2.11.2 przez 5-9 dni, monitorując żywotność komórek. W dniu zbioru wykonywano odzysk pierwotny,

analogicznie do procedury odzysku przy produkcji ze stabilnej linii komórkowej, opisanego w punkcie 7.2.14.

7.2.16. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE

Elektroforezę w żeli poliakrylamidowym SDS-PAGE prowadzono w systemie TRIS-glicyna – skład 10x stężonego buforu do elektroforezy przedstawiono w Tabeli 39. Do przeprowadzenia rozdziału stosowano bufor rozcieńczony w stosunku 1:9 (bufor : woda dejonizowana, v/v).

Tabela 39 Składniki buforu do elektroforezy SDS-PAGE w systemie TRIS-glicyna

Składnik buforu	Ilość
TRIS	30,29 g
Glicyna	144 g
SDS	10 g
Woda dejonizowana	Do końcowej objętości 1000 mL

Do przeprowadzenia rozdziału wykorzystywano rozdzielające żele 10% lub 12% z 5% żelem zagęszczającym. Składniki żeli zostały przedstawione w Tabelach 40 oraz 41.

Tabela 40 Składniki poliakrylamidowych żeli rozdzielających przeznaczonych do elektroforezy SDS-PAGE

Składnik żelu rozdzielającego	Objętość – żel 10% [mL]	Objętość – żel 12% [mL]
Woda dejonizowana	2,400	2,150
Acrylamide/N,N'-methylene-bis-acrylamide mix	1,250	1,500
Tris (1,5 M; pH 8,8; SDS-0,39% w/v)	1,300	1,300
APS 10%	0,050	0,050
TEMED	0,004	0,004

Tabela 41 Składniki poliakrylamidowych żeli zagęszczających przeznaczonych do elektroforezy SDS-PAGE

Składnik żelu zagęszczającego	Objętość – żel 5% [mL]
Woda dejonizowana	1,470
Acrylamide/N,N'-methylene-bis-acrylamide mix	0,250
Tris (1,0 M; pH 6,8; SDS-0,39% w/v)	0,260

APS 10%	0,020
TEMED	0,002

Próbki białek przygotowywane były poprzez zmieszanie z buforem do próbek (250 mM TRIS, 40% glicerol (v/v), 8% SDS (w/v), 0,1% błękit bromofenolowy (w/v); w przypadku warunków redukujących dodatkowo 5% 2-merkaptoetanolu (v/v)) w stosunku 4:1 (v/v), a następnie inkubację w temperaturze 95°C przez 5 minut.

W przypadku rozdziału lizatów komórkowych z zamiarem późniejszej wizualizacji z wykorzystaniem metody Western blot, pomijano etap inkubacji w 95°C (bazując na wynikach Tsuji, 2020) i każdorazowo stosowano nieredukujący bufor do próbek.

Rozdział prowadzono przy napięciu 130 V do momentu przejścia próbek przez żel zagęszczający, po czym zwiększano napięcie do 180 V. Po zakończonym rozdziale żel inkubowany był przez 15 – 30 minut w barwniku (FastGene Q-Stain), a następnie odbarwiany wodą dejonizowaną (1 – 24 h).

7.2.17. Western blot

Procedura Western blot rozpoczynała się od elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE, opisaney w punkcie 7.2.16, z pominięciem kroku barwienia żelu.

W przypadku analizy całkowitych lizatów komórkowych, komórki wirowano przy 3000 RCF, zawieszano w buforze do lizy i inkubowano na lodzie przez 30 minut. Otrzymany lizat wirowano przy 23000 RCF. Następnie oznaczano stężenie białka w supernatancie z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu BCA (Thermo Fisher Scientific). Objętości nakładanych próbek normalizowano pod względem masy nakładanego białka.

Membranę PVDF aktywowano poprzez inkubację w metanolu (15 s), wodzie dejonizowanej (5 min) i 1x stężonym buforze do transferu (5 min; skład 10x stężonego buforu do transferu przedstawiony jest w Tabeli 42; skład 1x stężonego buforu do transferu przedstawiony jest w Tabeli 43).

Tabela 42 Skład 10x stężonego buforu do transferu Western blot

Składnik	Ilość
TRIS	30,29 g
Glicyna	144 g
Woda dejonizowana	Do 1000 mL

Tabela 43 Skład 1x stężonego buforu do transferu Western blot

Składnik	Objętość [mL]
Bufor do transferu 10x stężony	100
Metanol	200
Woda dejonizowana	700

Białka po rozdziale były transferowane na aktywowaną membranę przy 25 V; 2,5 A przez 30 minut. Po transferze membrana była blokowana w 5% roztworze mleka w PBS (1 h), następnie w przeciwciałach pierwszorzędowych (minimum 1 h, najczęściej przez noc; w przypadku PD-L1: mysie anty-ludzkie PD-L1, nr kat. 14-5983-82, Thermo Fisher Scientific, 1:500). Po trzykrotnym płukaniu PBST, membrana inkubowana była w przeciwciałach drugorzędowych (w przypadku I-rzędowych przeciwciał mysich: kozie anty-mysie IgG, skoniugowane z HRP, nr kat. 31430, Thermo Fisher Scientific, 1:10000) . Po czterokrotnym płukaniu PBST i jednokrotnym płukaniu wodą dejonizowaną, na membranę dodawany był odczynnik do wizualizacji, według zaleceń producenta. Membrana wizualizowana była kolorymetrycznie (Novex™ HRP Chromogenic Substrate (TMB), Thermo Fisher Scientific) lub – w przypadku detekcji chemiluminescencyjnej (SuperSignal™ West Atto Ultimate Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific) – z wykorzystaniem ChemiDoc (BIO-RAD).

7.2.18. Określanie stężenia produktu w hodowli komórkowej z wykorzystaniem ultra wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej

Stężenie produktów zawierających fragment Fc było określane z wykorzystaniem ultra wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (UPLC), stosując kolumnę ze złożem opłaszczonym białkiem A (Tosoh), umożliwiającym analizę na próbkach niewymagających wcześniejszego oczyszczania.

Próbka hodowli była wirowana przy 200 RCF przez 5 minut, a uzyskany po wirowaniu nadsącz był filtrowany przez filtr strzykawkowy o hydrofilowej membranie (PES lub PVDF) i porach nie większych niż 0,22 µm. Minimum 1,2 mL filtratu przenoszone było do szklanej fiolki.

Na zrównoważoną kolumnę (bufor równoważący: 20 mM NaHPO₄ + 150 mM NaCl pH 7,0) nastrzykiwane było 10 x 0,1 mL próbki. Nastrzyk wykonywany był przez autosampler. Po nastrzyku kolumna była ponownie płukana buforem równoważącym, po czym białka eluowano 100 mM kwasem octowym pH 3,0.

Stężenie białka określone było poprzez porównanie powierzchni pików analizowanej próbki do krzywej kalibracyjnej. Krzywa kalibracyjna przygotowana była przez nastrzykiwanie 1 mL roztworu białka o znanym stężeniu.

7.2.19. Analityczna chromatografia wykluczania

Analityczna chromatografia wykluczania (SEC) wykorzystywana była do określania wielkości białek, czystości preparatu oraz obecności oddziaływania pomiędzy białkami (zdolności do tworzenia kompleksów).

Kolumna (ACQUITY UPLC Protein BEH SEC, Waters) była równoważona buforem 100 mM NaHPO₄ pH 6,8 z przepływem 0,3 mL/min. Na kolumnę nastrzykiwany był wcześniej przefiltrowany (membrana PES/PVDF, 0,22 µm) lub zwirowany (16000 RCF, 10 min) preparat białka, o całkowitej zawartości analizowanego białka ok. 10 µg.

Analiza odbywała się przy przepływie 3 mL/min.

Masa molekularna została określona poprzez porównanie czasu retencji analizowanej próbki z czasem retencji pików wzorca (Protein Standard Mix, Sigma Aldrich).

7.2.20. Oczyszczanie białek

7.2.20.1. Chromatografia powinowactwa – Białko A

Chromatografia powinowactwa wykorzystująca białko A używana była jako pierwszy krok oczyszczania konstruktów zawierających fragment Fc (przeciwciał lub białek chimericznych).

Kolumna upakowana złożem (MabSelectSure, Cytiva) została przygotowana poprzez zrównoważenie buforem ekwilibracyjnym (4 objętości kolumny; bufor 20 mM NaHPO₄ + 150 mM NaCl, pH 7,0). Następnie, preparat białka uzyskany w trakcie odzysku pierwotnego (opisanego w punkcie 7.2.14) ładowany był na kolumnę z 4-minutowym czasem kontaktu. Kolejno, kolumna była płukana 3 objętościami kolumny buforu równoważącego i 4 objętościami kolumny 40 mM roztworu octanu sodu pH 5,0. Białka związane do złoża były eluowane 40 mM roztworem octanu sodu pH 3,3. Uzyskany eluat był niezwłocznie neutralizowany, poprzez doprowadzenie pH do zakresu 6,8 – 7,0 z użyciem 1 M roztworu TRIS, pH 8,0.

W przypadku stosowania oczyszczonego białka w testach komórkowych bez dalszych kroków oczyszczania, preparat poddawany był wymianie buforu na PBS z wykorzystaniem koncentratorów (minimum 3 objętości pierwotnego preparatu), filtrowany filtrem sterylizującym, aseptycznie porcjowany i przechowywany w -80°C.

7.2.20.2. Chromatografia powinowactwa – IMAC

Chromatografia powinowactwa ze złożem zawierającym nikiel stosowana była jako pierwszy krok oczyszczania białek zawierających HisTag (6 x histydyna). Kolumna upakowana Ni Sepharose Excel (Cytiva) została zrównoważona 4 objętościami kolumny buforu równoważącego (20 mM NaHPO₄ + 250 mM NaCl; pH 7,4). Próbkki były ładowane na kolumnę z 4-minutowym czasem kontaktu. Następnie, kolumna była płukana 3 objętościami kolumny buforu równoważącego. Białka związane do złoża były eluowane buforem elucyjnym (20 mM NaHPO₄ + 250 mM NaCl + 300 mM imidazol, pH 7,0).

7.2.20.3. Preparatywna chromatografia wykluczania

Preparatywna chromatografia wykluczania (SEC) stosowana była jako drugi krok oczyszczania, do eliminacji agregatów, zanieczyszczeń pozostałych po chromatografii powinowactwa oraz ewentualnych frakcji zawierających produkty degradacji. Wykorzystywano kolumnę Superdex 200 pg 26 x 600 (Cytiva). Kolumna była równoważona PBS. Próbkki przed nałożeniem na kolumnę były doprowadzane do pH 7,4. Rozdział był prowadzony nieprzerwanie, przy przepływie 1 mL/min.

We wszystkich krokach oczyszczania wykorzystywany był chromatograf preparatywny AKTA Pure 25 (GE Healthcare).

7.2.21. ELISA

Test ELISA został wykorzystany do określenia siły wiązania ligandów i przeciwciał do receptorów i/lub celów molekularnych. Płytki zostały opłaskzczone 50 µL roztworu białka w żądanym stężeniu i inkubowane przez noc w 4°C. Następnego dnia płytki były równoważone w RT przez minimum 1 godzinę, wypłukane (4 x 300 µL PBST) i zablokowane 1% roztworem BSA (1 h, RT, bez wytrząsania).

Testowane ligandy i/lub przeciwciała zostały rozcieńczone do żądanych stężeń w PBS, a następnie 50 µL przygotowanych roztworów zostało dodane do wybranych studzienek, po uprzednim usunięciu roztworu blokującego. Płytkę inkubowano 1 h w RT z wytrząsaniem. Następnie płytki wypłukano (4 x 300 µL PBST), dodano po 50 µL przygotowanego roztwór przeciwciał pierwszorzędowych (zależne od testowanych związków) i inkubowano 1 h w RT bez wytrząsania. Krok płukania i inkubacji powtórzono z przeciwciałami drugorzędowymi lub koniugatem streptawidyna-HRP.

Wszystkie dołki wypłukano 6 x 300 µL PBST. Do wywołania reakcji użyto 100 µL/dołek wcześniej ogrzanego do temperatury pokojowej TMB. Po 6 minutach reakcja została zatrzymana poprzez dodanie 100 µL/dołek 0,2 M H₂SO₄.

Absorbancja odczytywana była przy 450 nm i 655 nm (dla odjęcia tła), przy użyciu czytnika mikropłytek Tecan Spark. Dane analizowane były z wykorzystaniem GraphPad Prism (wersja 9.5.1).

7.2.22. Hodowla nowotworowych komórek adherentnych

W trakcie trwania projektu wykorzystywano trzy ludzkie, nowotworowe linie komórkowe: BT-20 (ATCC HTB-19), RL95-2 (ATCC CRL-1671) oraz Panc 10.05 (ATCC CRL-2574), odpowiadające kolejno nowotworom piersi, endometrium macicy oraz trzustki. Wszystkie z nich hodowane były w standardowych, jednorazowych, traktowanych kolbach o wielkości hodowli w zakresie 12,5 cm² – 75 cm² lub na płytkach 6-dołkowych. Media stosowane dla każdej z linii przedstawiono w Tabeli 44. Hodowle prowadzone były każdorazowo w 37°C z 5% zawartością CO₂ w atmosferze.

Tabela 44 Wykaz mediów hodowlanych wraz z suplementami stosowanych przy hodowli adherentnych, ludzkich komórek nowotworowych

BT-20	RL95-2	Panc 10.05
Eagle's Minimum Essential Medium	DMEM:F12	RPMI-1640
FBS 10%	FBS 10%	FBS 15%
-	0,005 mg/mL rekombinowanej, ludzkiej insuliny	10 U/mL rekombinowanej, ludzkiej insuliny

Bezpośrednio po rozmrożeniu usuwano z roztworu DMSO. Cała objętość banku komórkowego (1 mL) dodawana była do 9 mL kompletnego, wcześniej przygotowanego medium hodowlanego. Po delikatnym wymieszaniu, zawiesina była wirowana przy 125 RCF przez 5 minut. Nadsącz usuwano, a pozostały osad zawieszano w kompletnym, wcześniej nagrzanym do 37°C medium i przenoszono do docelowego naczynia hodowlanego. Medium we wszystkich hodowlach wymieniane było co 2-3 dni. Przy osiągnięciu konfluencji na poziomie maksymalnie 90% komórki były pasażowane w stosunku od 1:2 do 1:5.

7.2.23. Test blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1

Do oceny blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1 wykorzystany został komercyjnie dostępny test (Promega). Procedura została wykonana według protokołu producenta.

PD-L1 + aAPC/CHO-K1 zostały rozmrożone (analogicznie do procedury opisanej w punkcie 7.2.11.1), zmieszane z 14,5 mL wcześniej przygotowanego i ogrzanego do 37°C medium (Ham's F-12 + 10% FBS), a następnie zainokulowane do białej, płaskodennej, białej, 96-

dołkowej płytki przy gęstości $4 \cdot 10^5$ komórek/dołek i objętości 100 μL /dołek. Do zewnętrznych dołków płytki zostało dodane wyłącznie medium. Płytki zostały przykryte i inkubowane przez noc w 37°C przy 5% CO_2 .

Następnego dnia medium zostało usunięte z płytki. Do dołków dodano seryjnie rozcieńczone w buforze testowym (RPMI1640 + 1% FBS) przeciwciała (40 μL /dołek). Następnie, komórki efektorowe (PD-1 Jurkat) zostały zawieszone w buforze testowym w stężeniu $1,25 \cdot 10^6$ komórek/mL i dodane na płytkę (40 μL /dołek). Komórki były inkubowane jako ko-kultura przez 6 godzin w 37°C , przy 5% CO_2 .

Przed wywołaniem reakcji płytka została wyjęta z inkubatora i równoważona w RT przez 5 minut. Do wszystkich dołków testowych, po uprzednim przygotowaniu według protokołu producenta, zostało dodane 80 μL /dołek odczynnika Bio-Glo™ (Promega). Płytkę z odczynnikiem była inkubowana w temp. pok. przez 15 minut.

Luminescencja została przeanalizowana na czytniku mikropłytek Tecan Spark. Dane analizowany były z wykorzystaniem GraphPad Prism (wersja 9.5.1).

7.2.24. Analiza stopnia internalizacji z wykorzystaniem cytometrii przepływowej

Komórki Panc 10.05 były hodowane w 6-dołkowej płytce, przy gęstości inokulacji $0,6 \cdot 10^6$ komórek/dołek. Po 24 h medium zostało wymienione, dodano badane związki zawieszone w PBS w stężeniach w zakresie 10 nM – 500 nM.

Po 22 godzinach inkubacji komórki zostały strypsynizowane, $0,4 \cdot 10^6$ komórek ze wszystkich prób eksperymentalnych zostało przeniesione do mikroprobówek wirówkowych. Komórki były wirowane przy 1300 RCF przez 3 minuty, a następnie inkubowane w zimnym 0,5% roztworze BSA w PBS, zawierającym mysie przeciwciało anty-ludzkie PD-L1 (1:50, Thermo Fisher Scientific, nr kat. 14-5983-82). Po 60 minutowej inkubacji na lodzie, komórki zostały dwukrotnie wypłukane 0,5% roztworem BSA w PBS i kolejno inkubowane przez 60 minut na lodzie, w ciemności, w 0,5% roztworze BSA w PBS zawierającym II-rzędowe przeciwciała znakowane Alexa Fluor 488 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, nr kat. A11001) lub fikoerytryną (1:350, BD Biosciences, nr kat. 550589). Następnie, komórki zostały poddane dwukrotnemu płukaniu i zawieszone w zimnym 0,5% roztworem BSA w PBS. Analizie poddano 10 000 komórek z każdej próbki. Dla kontroli tła pomijano etap inkubacji z przeciwciałami I-rzędowymi. Do analizy wykorzystano cytometr BD FACSCalibur; do analizy wyników wykorzystano oprogramowanie Cell Quest Pro (wersja 5.2.1).

7.2.25. Wizualizacja internalizacji z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej

Komórki RL95-2 zostały przepasażowane do 10-dołkowych płytek ze szklanym dnem w ilości pozwalającej na osiągnięcie 50% konfluencji w dniu obserwacji. Po 24 godzinach medium w komórkach zostało wymienione na medium zawierające testowane cząsteczki LYTAC lub cząsteczki kontrolne, zawieszone w PBS, w końcowym stężeniu 100 nM. Jednocześnie do każdego dołka zostało dodane 100 nM rozpuszczalnego, chimerycznego białka PD-L1, znakowanego mCherry (stosunek molowy 1:1 z cząsteczkami eksperymentalnymi i kontrolnymi).

Próbki były poddane obserwacji przez 22 godziny z wykorzystaniem konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (Leica SP8X z komorą inkubacyjną do analizy żywych komórek), wykorzystując obiektyw immersyjny o 63x powiększeniu. Długość fali wzbudzenia została ustawiona na 585 nm; długość fali emisji została ustawiona w zakresie 602 nm – 651 nm. Do analizy wyników zostało użyte oprogramowanie Leica Application Suite X (wersja 3.0.2).

7.2.26. Test cytotoksyczności

Dzień przed eksperymentem, ludzkie komórki nowotworowe zostały posadzone do płytki 96-dołkowej ($3 \cdot 10^4$ komórek/dołek) w odpowiednim dla każdej z linii medium. W dniu eksperymentu rozcieńczenia testowanych związków w PBS zostały przygotowane i dodane do komórek nowotworowych. Komórki inkubowano przez 120 godzin w 37°C, przy 5% CO₂. Po zakończonej inkubacji, do każdego z dołków dodano 20 µL roztworu MTT o stężeniu 5 mg/mL. Po 2-godzinnej inkubacji do dołków dodano po 100 µL rozpuszczalnika MTT (10% SDS, 0,01 N HCl). Płytki pozostawiono w inkubatorze na noc. Kolejnego dnia odczytywano absorbancję przy 570 nm oraz 690 nm (odejmowanie tła) z użyciem czytnika mikropłytek Tecan Spark. Żywotność podawana jest jako wynik procentowy względem nietraktowanej kontroli. Dane analizowane były z wykorzystaniem GraphPad Prism (wersja 9.5.1).

7.2.27. Test cytotoksyczności w ko-kulturze komórek nowotworowych z komórkami jednojądrzastymi krwi obwodowej

Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) zostały wyizolowane poprzez wirowanie w gradiencie (Ficoll Paque Plus, Cytiva) próbek ludzkiej krwi pobranych od osób zdrowych. Próbkę krwi zostały dostarczone przez Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku. Po izolacji komórki zostały zamrożone w ciekłym azocie w mieszaninie 90% FBS + 10% DMSO.

Dzień przed planowanym eksperymentem ludzkie komórki nowotworowe zostały przesiane na płytkę 96-dołkową przy stężeniu $3 \cdot 10^4$ komórek/dołek, w kompletnym medium hodowlanym odpowiadającym danej linii (wyszczególnionym w punkcie 7.2.22). Jednocześnie komórki PBMC zostały rozmrożone i przeniesione do wcześniej nagrzanego do 37°C medium (RPMI1640 + 10% FBS) i pozostawione na noc w inkubatorze. Kolejnego dnia do komórek nowotworowych dodawane były PBMC w stosunku 1:10 (odpowiednio) oraz testowane związki w żądanych stężeniach. Tak przygotowane płytki były inkubowane przez 120 godzin w 37°C przy 5% CO₂ w atmosferze. Po zakończeniu inkubacji 20 µL roztworu MTT o stężeniu 5 mg/mL zostało dodane do każdej studzienki i pozostawione do inkubacji na 2 godziny. Po zakończeniu inkubacji do wszystkich studzienek dodawano 100 µL rozpuszczalnika MTT (10% SDS, 0,01 N HCl). Płytki pozostawiano w inkubatorze (37°C, 5% CO₂) na noc. Kolejnego dnia odczytywano absorbancję przy 570 nm, z odcięciem tła przy 690 nm, z wykorzystaniem czytnika mikropłytek Tecan Spark. Procent lizy komórek był obliczany jako stosunek sygnału w próbkach z dodatkiem testowanych związków (komórki nowotworowe + PBMC + testowane związki) do kontroli (komórki nowotworowe + PBMC). Zahamowanie wzrostu było obliczane jako stosunek sygnału w próbkach z dodatkiem testowanych związków (komórki nowotworowe + PBMC +/- testowane związki) do kontroli (komórki nowotworowe). Analiza danych została wykonana z użyciem GraphPad Prism (wersja 9.5.1).

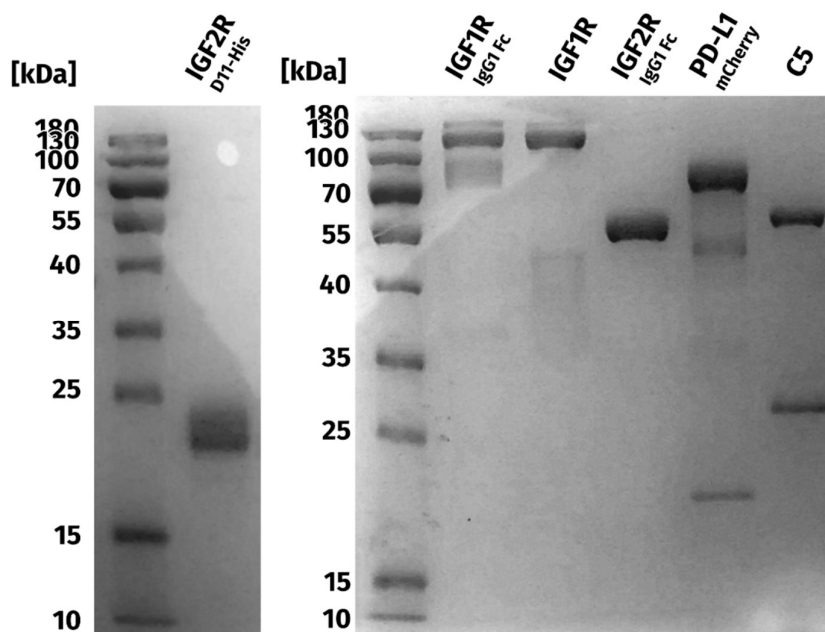
8. WYNIKI

8.1. PRODUKCJA I OCZYSZCZANIE CZĄSTECZEK

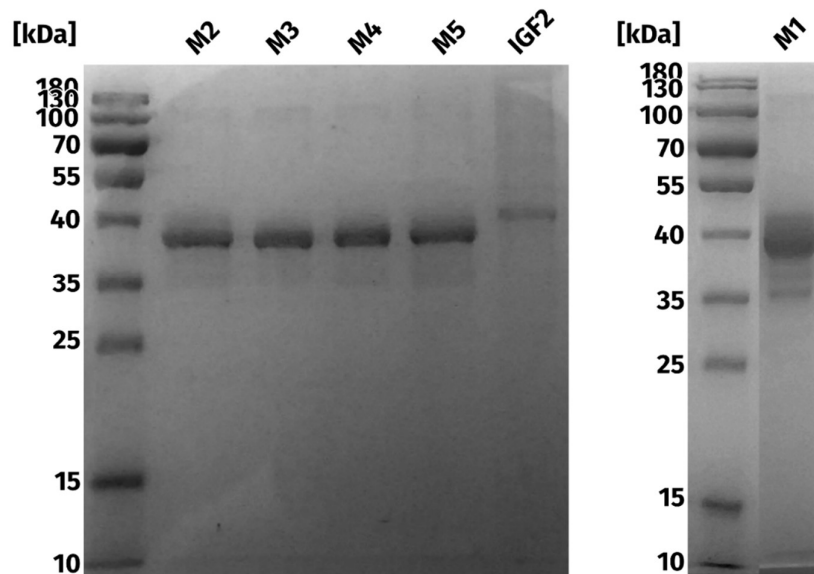
REFERENCYJNYCH

Pierwszym krokiem w realizacji projektu było wyprodukowanie cząsteczek referencyjnych, pozwalających na przeprowadzenie eksperymentów oceniających siłę wiązania, tworzenie kompleksów, internalizację (zarówno celów rozpuszczalnych, jak i transmembranowych) oraz cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych.

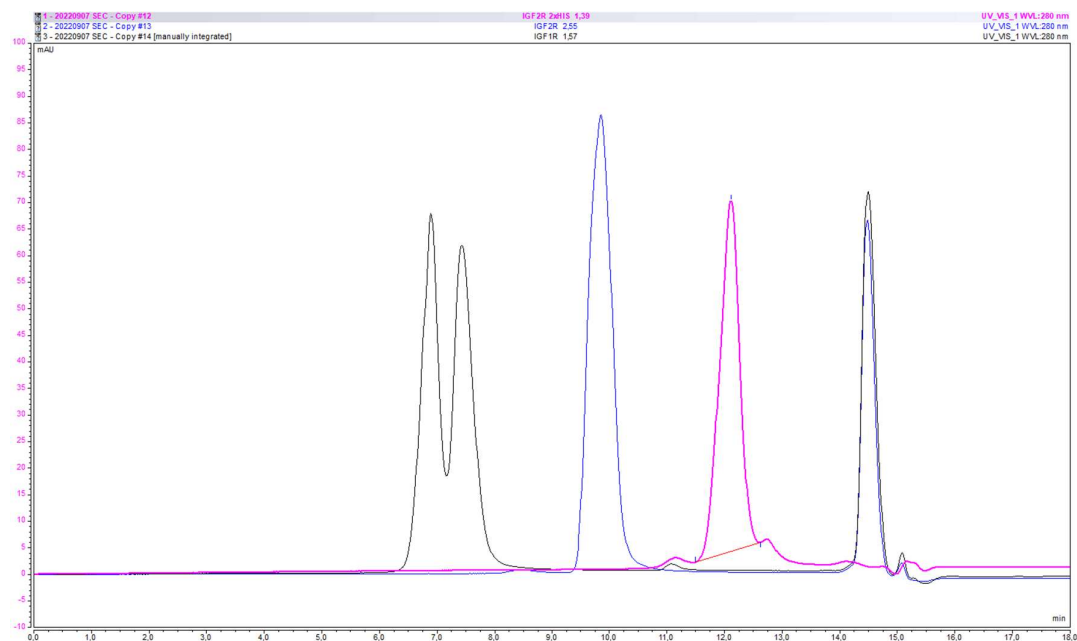
Wyprodukowane cząsteczki obejmowały białka takie jak IGF2, IGF1R, domena 11 IGF2R, PD-L1, referencyjne przeciwciało C5 oraz szereg wymodelowanych wcześniej peptydów warunkujących wiązanie do IGF2R, jednocześnie niewykazujących powinowactwa do IGF1R. Analiza preparatów otrzymanych białek z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE przedstawiona jest na Rycinach 9 i 10 (w obu przypadkach warunki redukujące). Kolejno, analiza wszystkich preparatów z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania została przedstawiona na Rycinach 11 - 18.



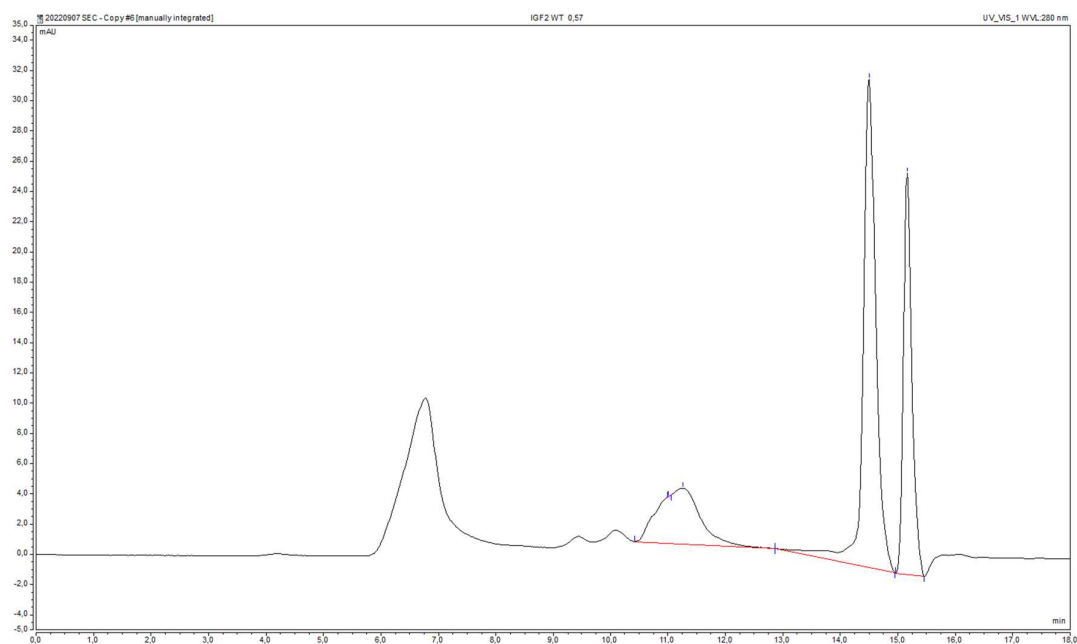
Rycina 9 Analiza wyprodukowanych białek referencyjnych z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE



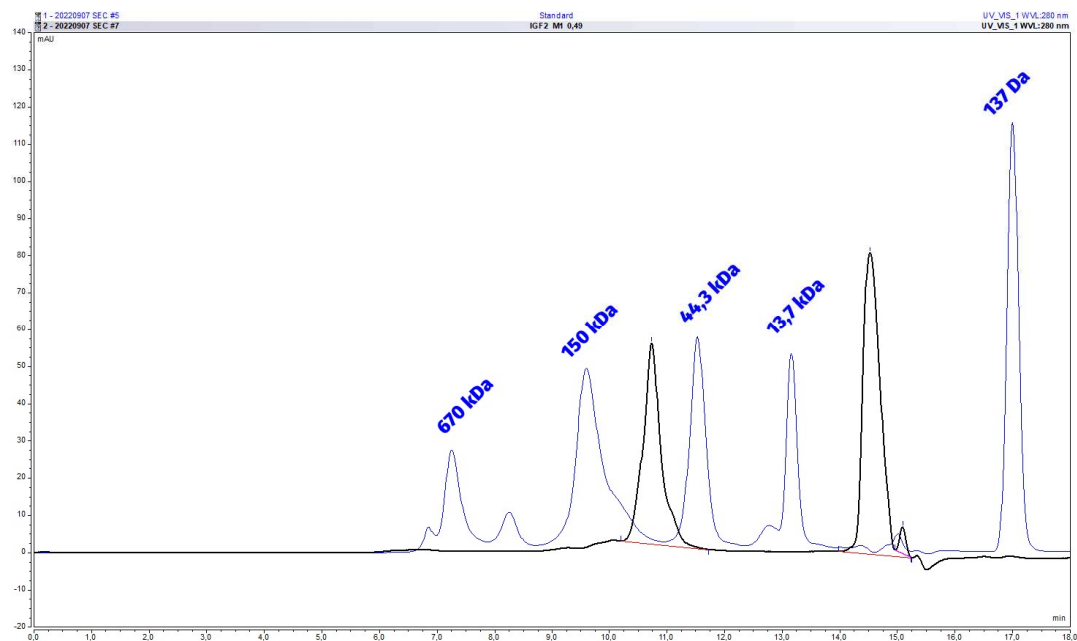
Rycina 10 Analiza wyprodukowanych peptydów wiążących IGF2R oraz dzikiego białka IGF2 z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE. Wszystkie analizowane konstrukty są chimeryczne, zawierają fragment IgG1 Fc.



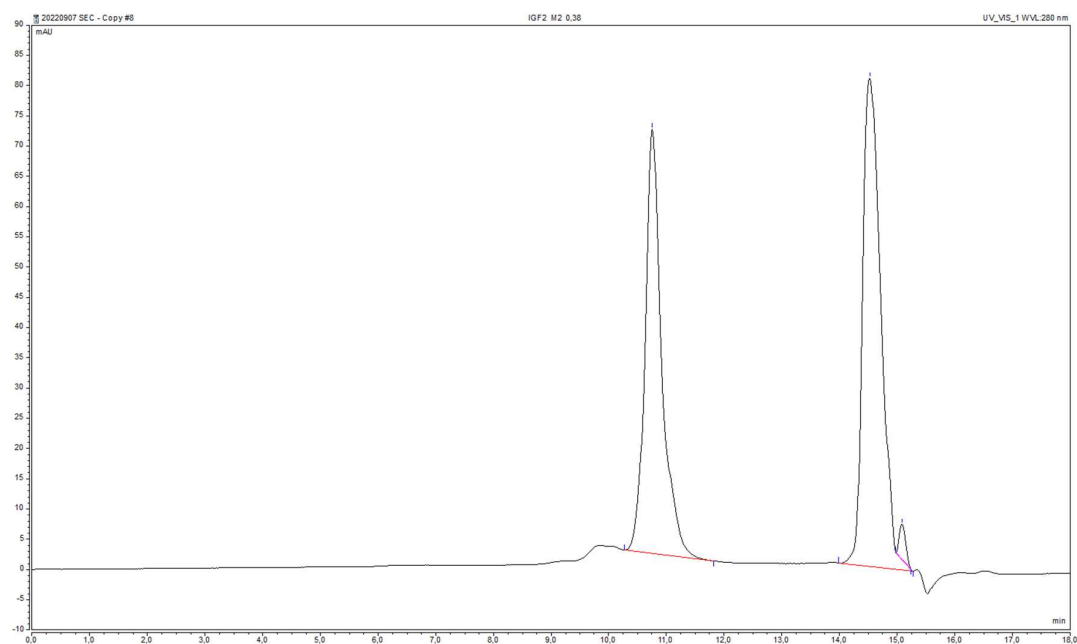
Rycina 11 Analiza IGF1R-IgG1 Fc, IGF2R-His oraz IGF2R-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania



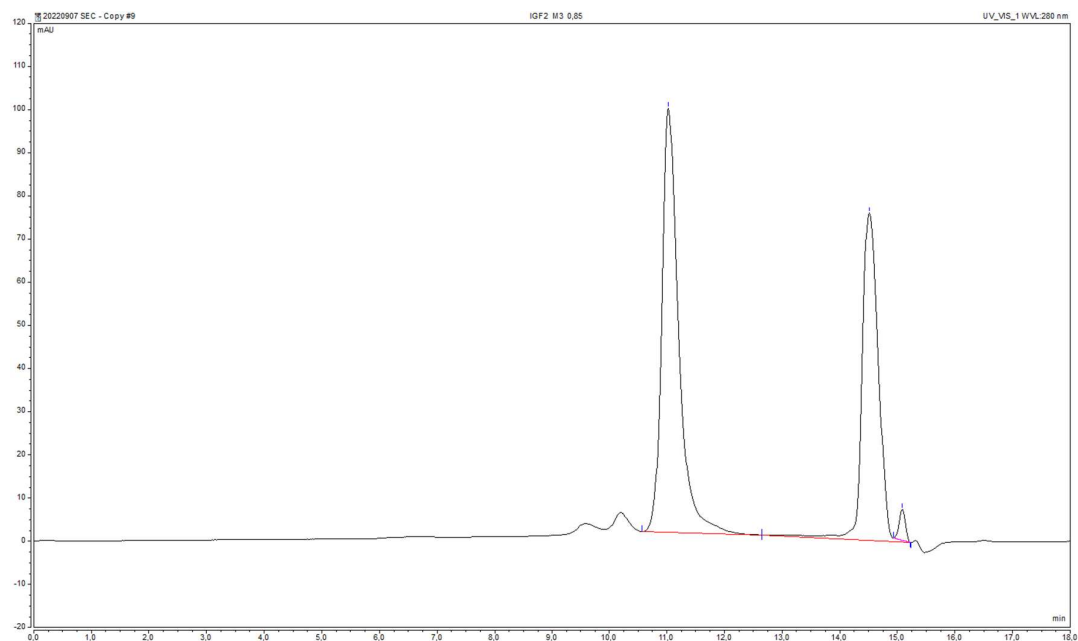
Rycina 12 Analiza IGF2-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania



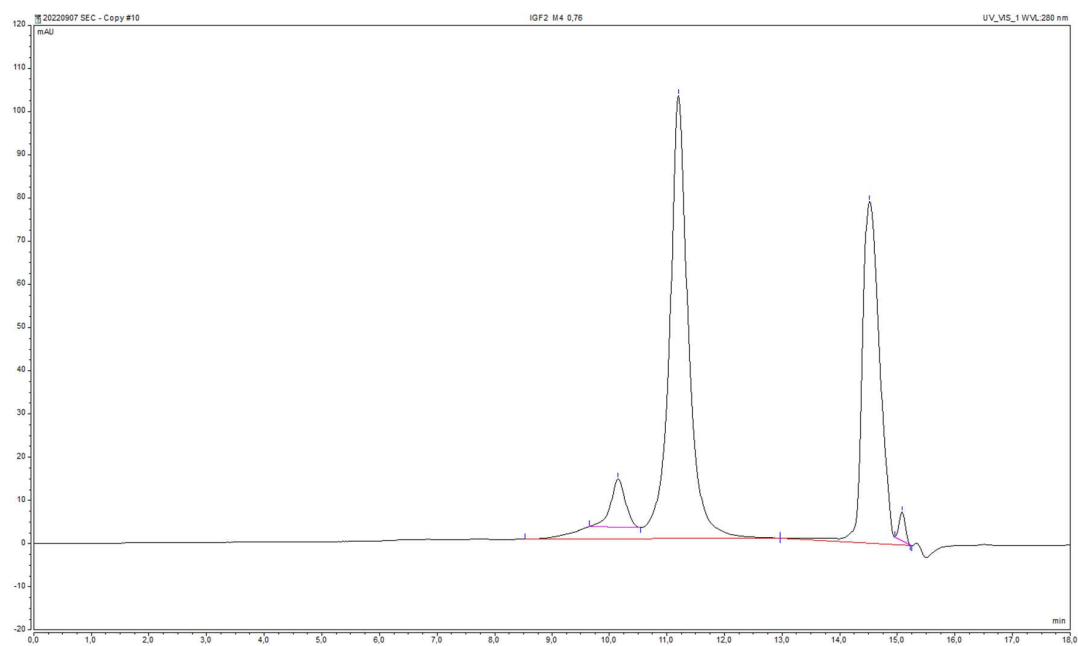
Rycina 13 Analiza peptydu M1-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania z nałożonym standardem wielkości



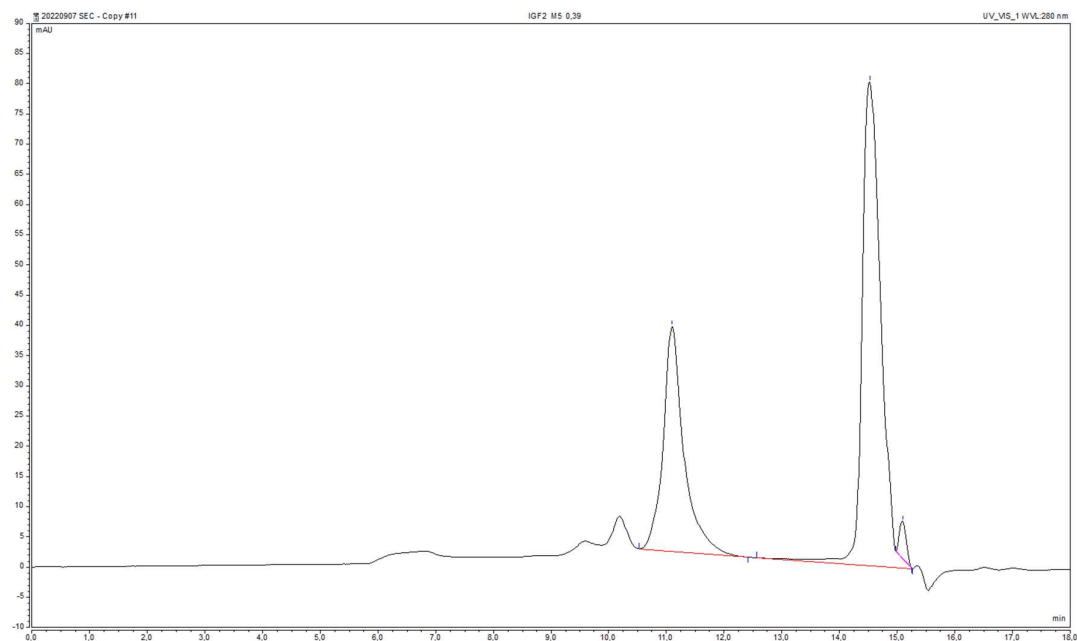
Rycina 14 Analiza peptydu M2-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania



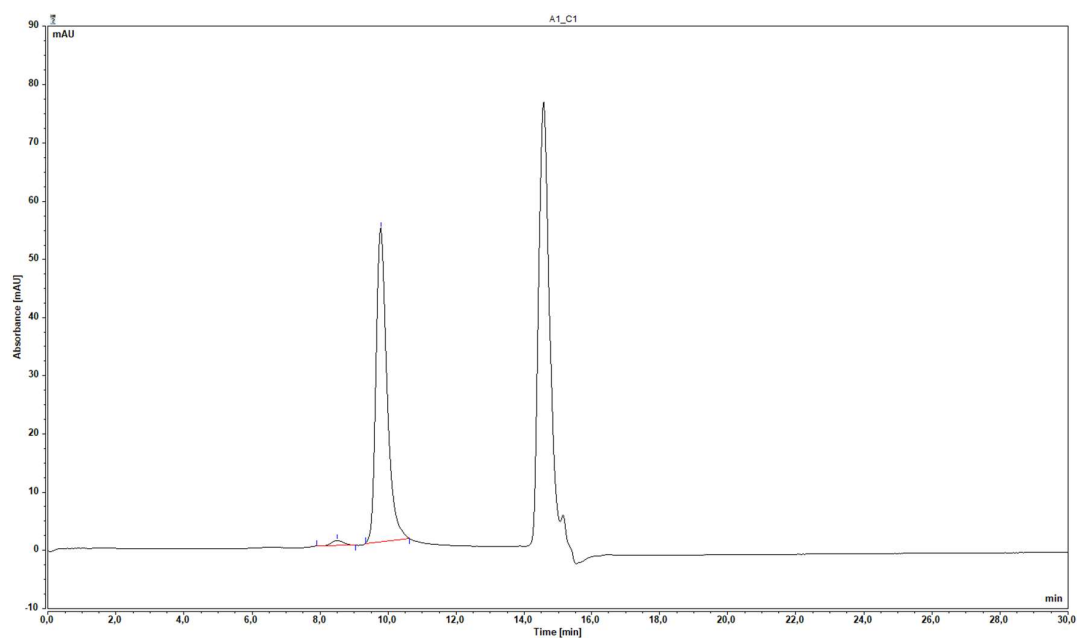
Rycina 15 Analiza peptydu M3-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania



Rycina 16 Analiza peptydu M4-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania



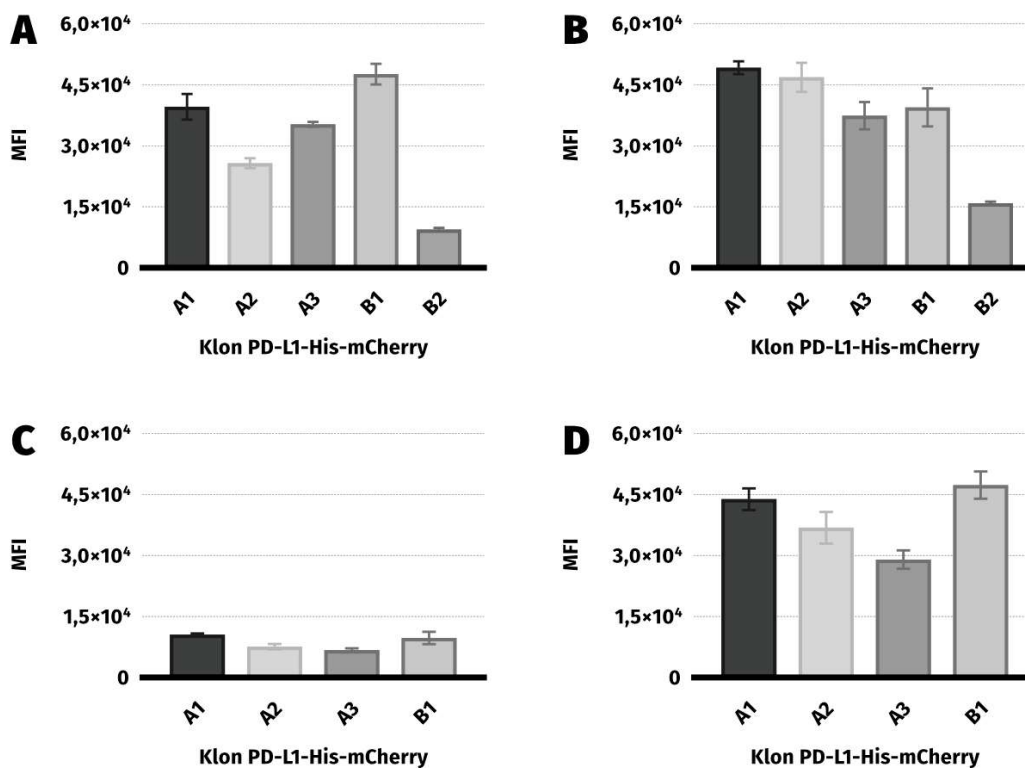
Rycina 17 Analiza peptydu M5-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania



Rycina 18 Analiza przeciwciała C5 z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania

Przeprowadzone analizy pozwoliły na określenie wielkości białek, jak również czystości preparatów białkowych. Czystość oraz homogenność wszystkich uzyskanych preparatów uznano za odpowiednie do przeprowadzenia dalszych eksperymentów z wykorzystaniem tych białek.

Białko PD-L1-His-mCherry, ze względu na konstrukcję chimeryczną, zawierającą białko fluorescencyjne dało możliwość selekcji produkcyjnej monoklonalnej linii komórkowej na podstawie analizy fluorescencji medium. Wyniki pomiarów wstępnych oraz końcowych zostały przedstawione na Rycinie 19. Po analizie wstępnej odrzucony został klon B2. Kolejna seria eksperymentów wskazała klon B1 jako najwydajniejszego producenta.



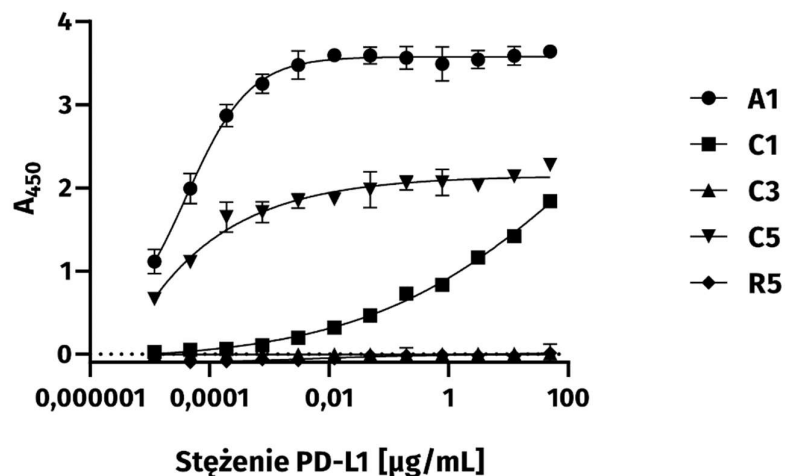
Rycina 19 Określanie produktywności monoklonalnych linii produkcyjnych PD-L1-His-mCherry z wykorzystaniem analizy fluorescencji. **A** – wstępna analiza hodowli 3-dniowych; **B** – wstępna analiza hodowli 7-dniowych; **C** – finalna analiza hodowli 5-dniowych; **D** – finalna analiza hodowli 8-dniowych

8.2. PRZECIWCIAŁO C5 WIĄŻE PD-L1, JEDNOCZEŚNIE NIE

BLOKUJĄC INTERAKCJE PD-1/PD-L1

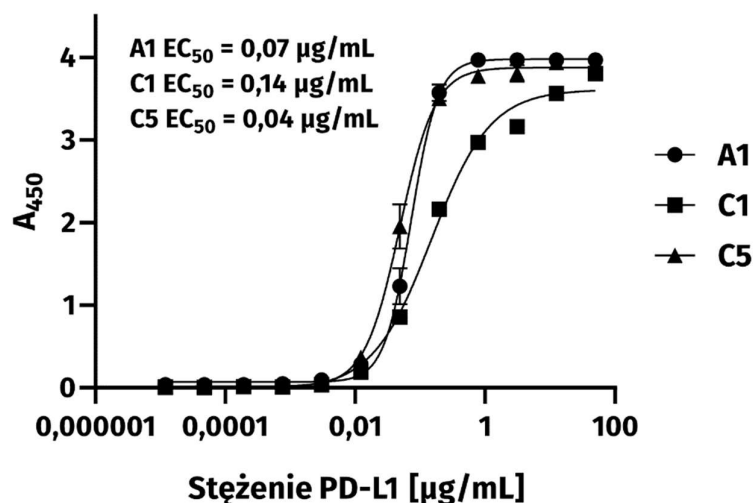
Do konstrukcji bispecyficznych cząsteczek LYTAC niezbędne są dwa składniki: domena warunkująca powinowactwo do wybranego celu molekularnego oraz domena warunkująca powinowactwo do receptora indukującego internalizację i degradację lizosomalną, w tym przypadku IGF2R (CI-M6PR).

Z biblioteki Recepton wybrano cztery przeciwciała mające wiązać specyficznie PD-L1 i poddano je wstępnej ocenie, celem ustalenia cząsteczki, której elementy zostaną wykorzystane do konstrukcji docelowych cząsteczek LYTAC. Wyniki wstępnej oceny testem ELISA przedstawiono na Rycinie 20.



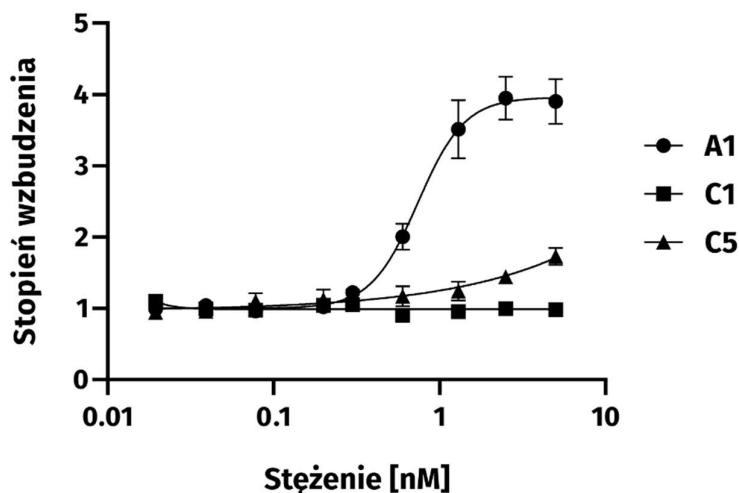
Rycina 20 Wstępny screening siły oddziaływania przeciwciała referencyjnego (A1) oraz przeciwciał z biblioteki Recepton z celem molekularnym – PD-L1

Na podstawie uzyskanych wyników, ze wstępnie wybranych czterech przeciwciał, ze względu na znikome oddziaływanie odrzucono cząsteczki C3 i R5, a dalszemu testowi poddano pozostałe dwa: C1 oraz C5. Zoptymalizowano stężenia testowanych przeciwciał. W kolejnym teście ustalone zostały wartości EC_{50} względem przeciwciała referencyjnego oznaczonego A1 (Durvalumab – komercyjnie dopuszczone do stosowania przeciwciało anty-PD-L1, nazwa handlowa Imfinzi). Wyniki, wraz z oznaczonymi wartościami EC_{50} przedstawiono na Rycinie 21.



Rycina 21 Określenie EC_{50} dla przeciwciał C1, C5 oraz referencyjnego przeciwciała A1 w teście ELISA

Następnie, określono zdolność testowanych przeciwciał do blokowania oddziaływania PD-1/PD-L1 w środowisku komórkowym, z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego testu blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1 (Promega). Wyniki testu zostały przedstawione na Rycinie 22.



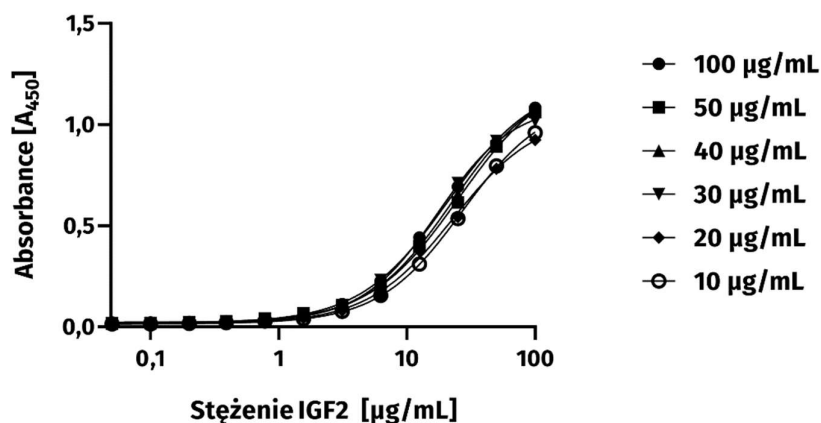
Rycina 22 Określenie zdolności przeciwciał C1, C5 oraz referencyjnego przeciwciała A1 do blokowania oddziaływania PD-1/PD-L1 w środowisku komórkowym

Przeciwciała C1 oraz C5 nie wykazują zdolności do blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1 w środowisku komórkowym lub wykazują tę zdolność w stopniu znikomym. Biorąc pod uwagę wyniki z powyżej opisanych eksperymentów, do konstrukcji docelowej cząsteczki

LYTAC wybrano przeciwciało **C5**, ze względu na najniższe spośród testowanych przeciwciał EC_{50} (również niższe niż wartość dla przeciwciała referencyjnego) oraz potwierdzoną znikomą zdolność do blokowania oddziaływania PD-1/PD-L1, co pozwala jednoznacznie określić, że obserwowane rezultaty cytotoksyczności (podrozdział 8.8) nie wynikają z blokady punktu kontrolnego, a z usunięcia go z powierzchni komórki.

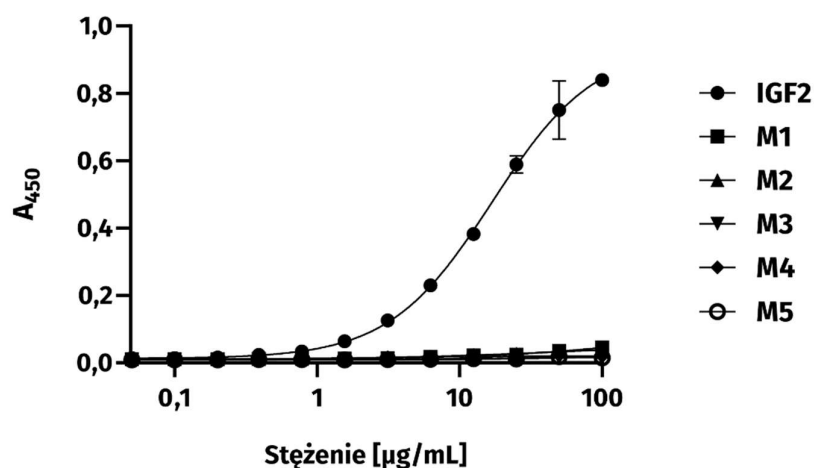
8.3. WYMODELOWANE PEPTYDY WIĄŻĄ IGF2R-D11, JEDNOCZEŚNIE NIE WYKAZUJĄC POWINOWACTWA DO IGF1R

Podobnie jak w przypadku przeciwciał, zoptymalizowano również wymodelowane przez Recepton peptydy bazujące na IGF2, warunkujące powinowactwo do receptora kierującego do lizosomu. Wyniki wstępnego screeningu stężeń IGF2/IGF1R w teście ELISA przedstawione są na Rycinie 23.



Rycina 23 Wstępny screening zakresu stężeń dla oddziaływania IGF2/IGF1R w teście ELISA

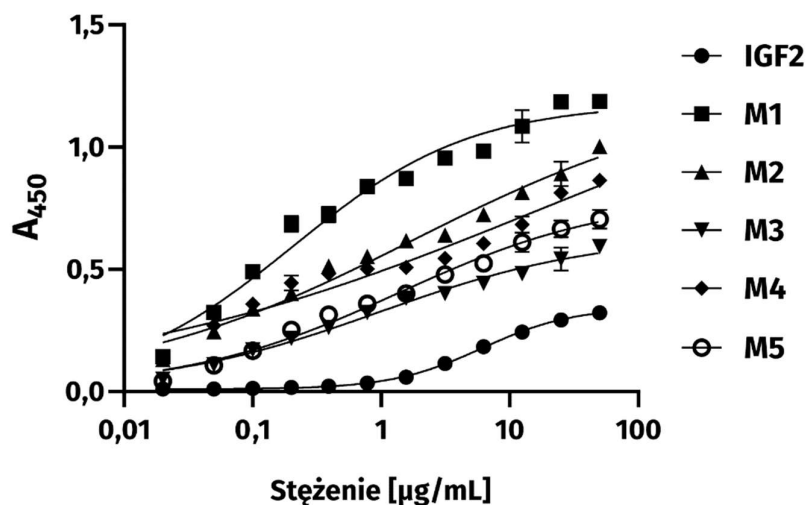
Bazując na uzyskanych wynikach, przeprowadzono docelowy test wiązania wszystkich uzyskanych peptydów oraz białka referencyjnego (IGF2), którego wyniki przedstawiono na Rycinie 24.



Rycina 24 Test wiązania peptydów M1 - M5 oraz referencyjnego białka IGF2 do IGF1R

Żaden z wymodelowanych peptydów nie wykazywał powinowactwa do IGF1R lub wykazywał powinowactwo na znikomym poziomie, co przy potencjalnym docelowym zastosowaniu w terapii nowotworów, pozwoli na ograniczenie potencjalnych skutków ubocznych, wynikających z nadmiernego wzbudzenia IGF1R.

Kolejno, wszystkie otrzymane peptydy przebadano pod kątem siły wiązania do domeny 11 IGF2R. Domenę 11 wykorzystano jako substytut kompletnego receptora, na podstawie wyników raportowanych przez Grimme i współpracowników (Grimme i in., 2000). Wyniki testu ELISA przedstawiono na Rycinie 25.



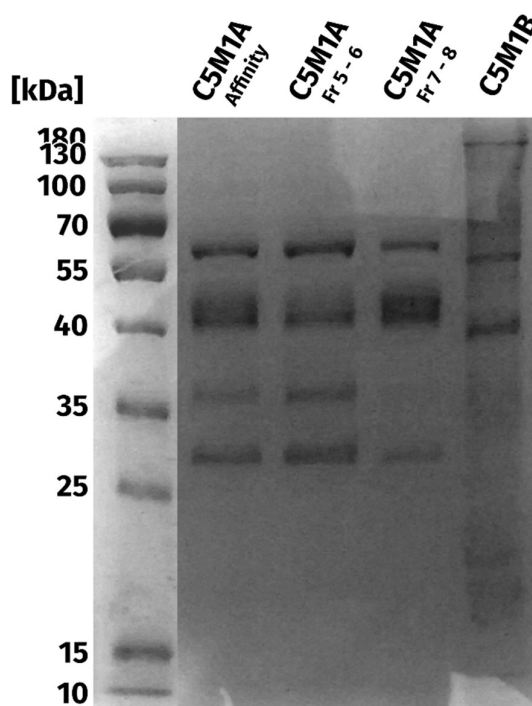
Rycina 25 Test wiązania peptydów M1 - M5 oraz referencyjnego białka IGF2 do domeny 11 IGF2R

Bazując na uzyskanych wynikach, do konstrukcji docelowych cząsteczek LYTAC wybrano peptyd **M1**, ze względu na najwyższe powinowactwo do domeny 11 IGF2R. Wszystkie testowane peptydy, wykazywały wyższe powinowactwo do domeny 11 IGF2R niż natywny IGF2.

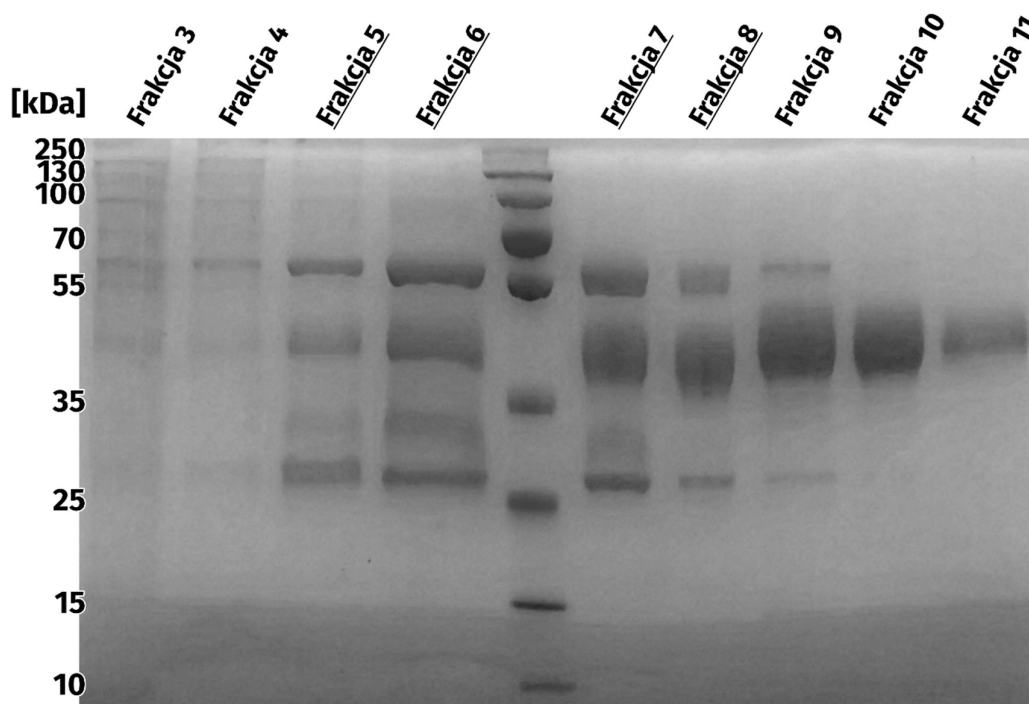
8.4. PROJEKTOWANIE, PRODUKCJA I OCZYSZCZANIE

CZĄSTECZEK LYTAC

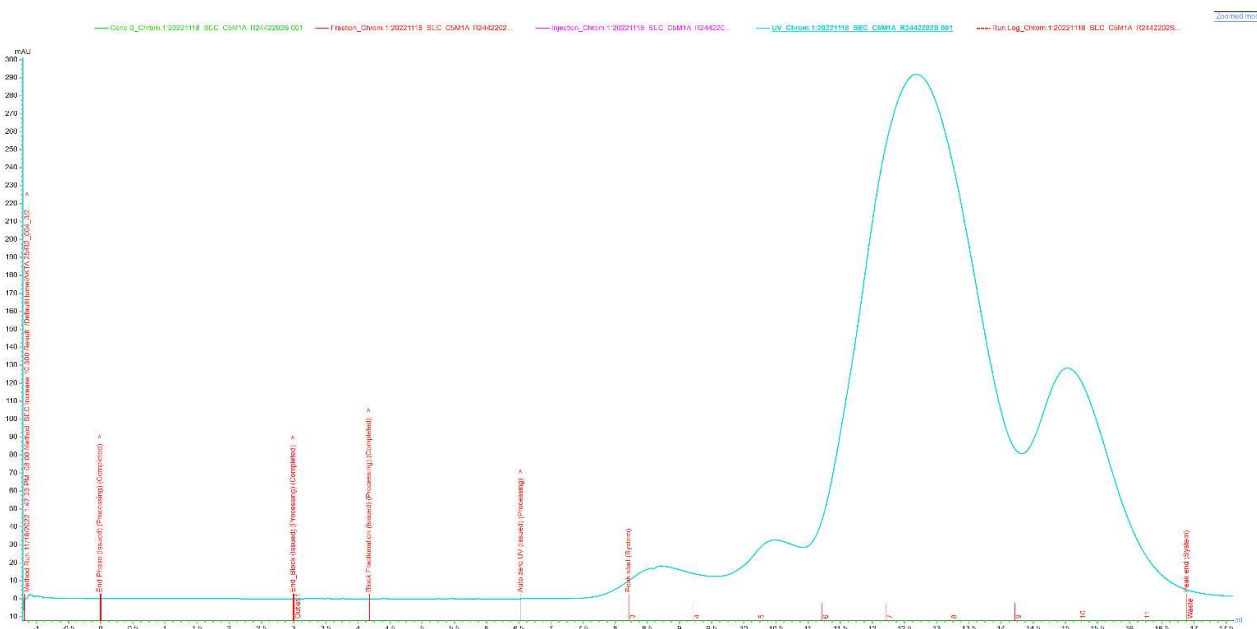
Po uzyskaniu danych dotyczących siły wiązania poszczególnych peptydów i przeciwciał przystąpiono do produkcji cząsteczek bispecyficznych. Wybrane formaty obejmowały asymetryczne przeciwciało w formacie IgG4, z mutacją knob-into-hole (KIH) w rejonie Fc (oznaczone jako C5MXA, gdzie X odpowiada oznaczeniu zastosowanego peptydu) oraz scFv połączone z peptydem M1 poprzez elastyczny linker (oznaczone jako C5M1B). Analiza preparatów wyprodukowanych białek C5M1A oraz C5M1B (w tym z różnych etapów oczyszczania) z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE pokazana jest na Rycinach 26 oraz 27. Chromatogram uzyskany w drugim etapie oczyszczania C5M1A (na preparatywnej chromatografii wykluczania) przedstawiony jest na Rycinie 28.



Rycina 26 Analiza wyprodukowanych cząsteczek LYTAC z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE; warunki redukujące



Rycina 27 Analiza frakcji białka C5M1A po oczyszczeniu na preparatywnej chromatografii wykluczania; warunki redukujące.

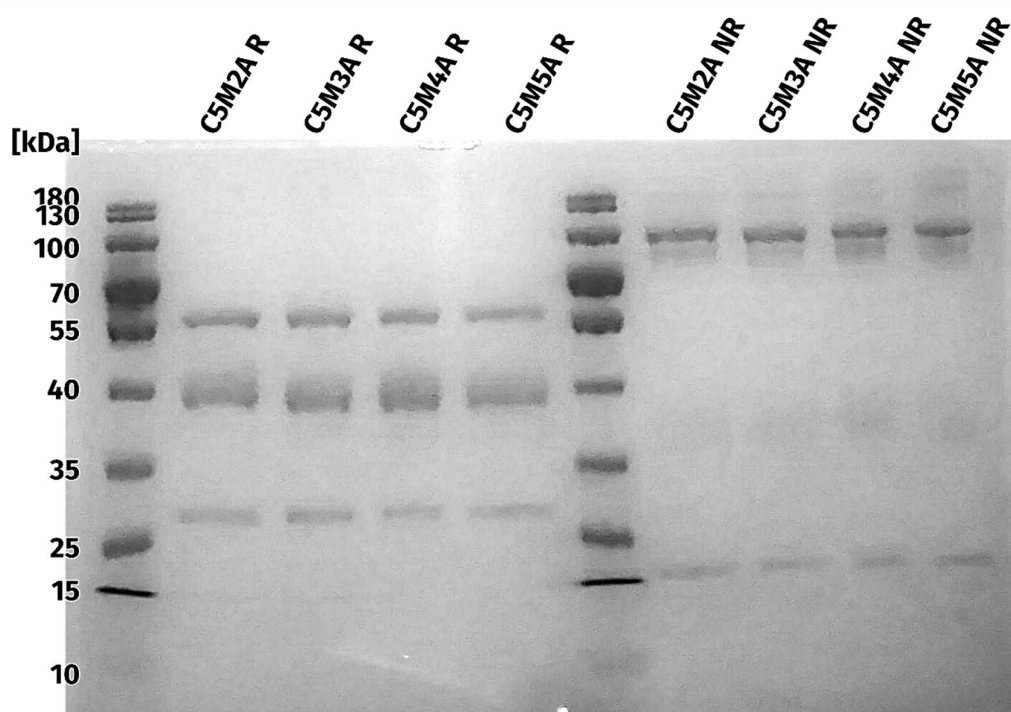


Rycina 28 Drugi etap oczyszczania C5M1A na preparatywnej chromatografii wykluczania; błękitna linia - UV

Białko C5M1A zostało przebadane zarówno jako preparat uzyskany po oczyszczeniu jednostopniowym (chromatografia powinowactwa), jak i preparat po oczyszczeniu dwustopniowym (chromatografia powinowactwa + chromatografia wykluczania). Wzór

prążków na żelu wskazuje na to, że prawidłowe łańcuchy zawierają frakcje 7 i 8. Dla potwierdzenia tej hipotezy z frakcji podkreślonych (Rycina 27) zostały utworzone preparaty C5M1A Fr 5-6 i C5M1A Fr 7-8.

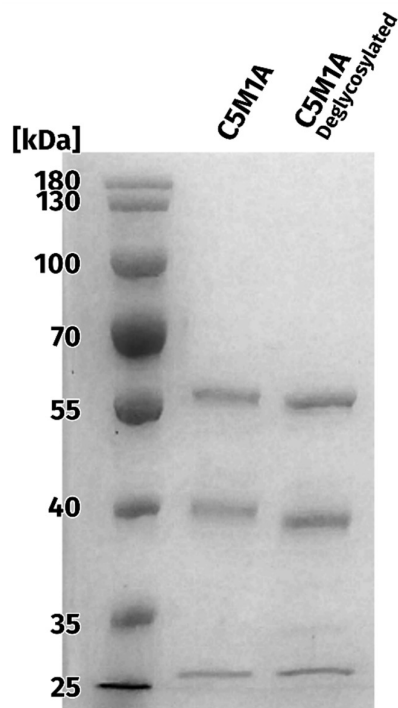
Wyprodukowano również cząsteczki w formacie asymetrycznym, analogiczne do C5M1A, z wykorzystaniem pozostałych peptydów (M2 – M5). Wyniki analizy preparatów tych białek przedstawione są na Rycinie 29.



Rycina 29 Analiza wyprodukowanych wariantów asymetrycznych cząsteczek LYTAC z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE; R – warunki redukujące, NR – warunki nieredukujące

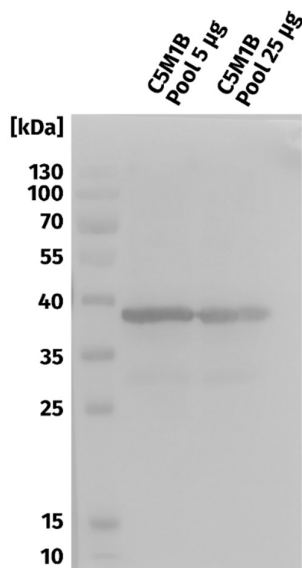
Przedstawione białka otrzymane zostały w ekspresji przejściowej (w przeciwieństwie do C5M1A i C5M1B, które uzyskane zostały ze stabilnych linii komórkowych) oraz zostały oczyszczone jednoetapowo. Zaobserwować można brak dodatkowego prążka, który obecny jest w preparacie C5M1A, o wielkości ok. 37 kDa.

Kolejnym wariantem białka C5M1A który został wyprodukowany jest wersja wysokomannozowa, otrzymywana w ekspresji przejściowej w systemie HEK293S GnTI^{-/-}. Kolejno, białko to zostało traktowane Endoglikozydazą H, celem usunięcia mannoz i pozostawienia końcowego produktu z minimalną glikozylacją. Analizę obu preparatów (wysokomannozowy przed i po trawieniu) przedstawiono na Rycinie 30.

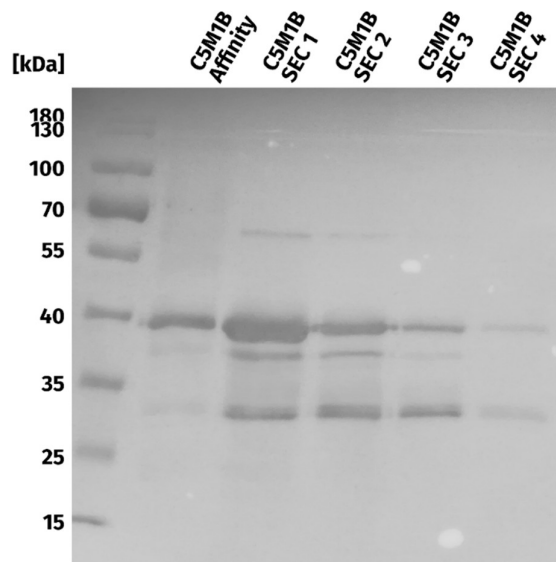


Rycina 30 Analiza białka C5M1A wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym HEK293S GnTI^{-/-} oraz traktowanego Endoglikozydazą H

Białko C5M1B, ze względu na swój format, prezentuje niską stabilność w trakcie przechowywania. Na Rycinie 31 przedstawiono analizę Western blot supernatantów uzyskanych z dwóch poliklonalnych, stabilnych linii komórkowych, produkujących C5M1B. Analiza nie wskazuje na degradację ani agregację białka, w obu przypadkach widoczny jest jeden, zwarty prążek. Podobnie wygląda analiza Western blot (Rycina 32) preparatu otrzymanego po jednostopniowym oczyszczaniu (chromatografia powinowactwa), jednak zauważyć można pierwsze oznaki degradacji, które znacząco postępują w trakcie drugiego kroku oczyszczania (chromatografia wykluczania).

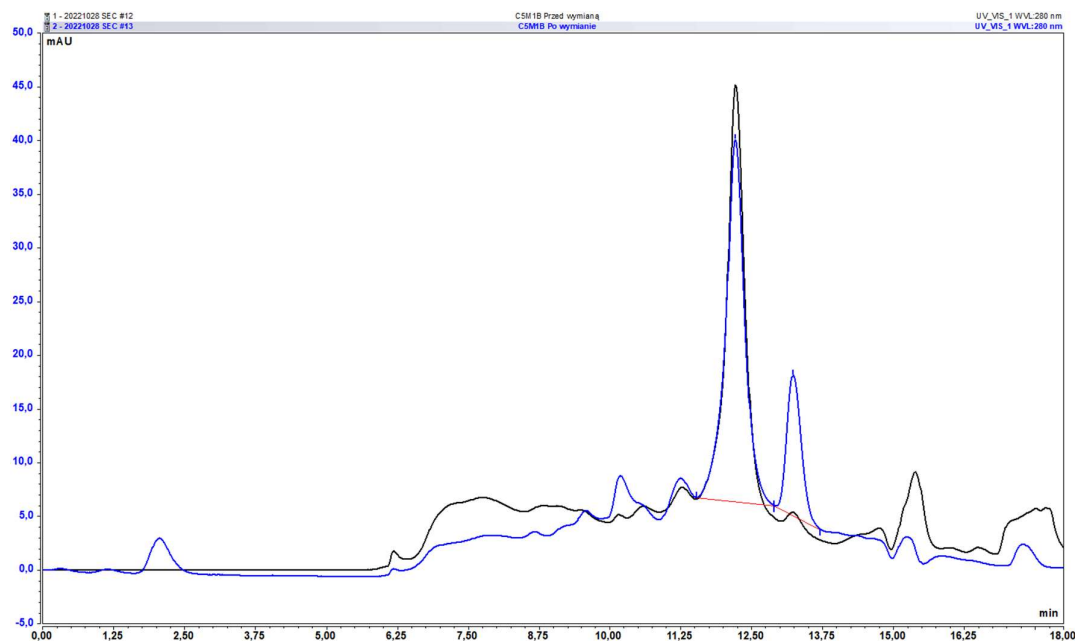


Rycina 31 Ocena produktywności poliklonalnych, stabilnych linii komórkowych produkujących białko C5M1B z wykorzystaniem metody Western blot

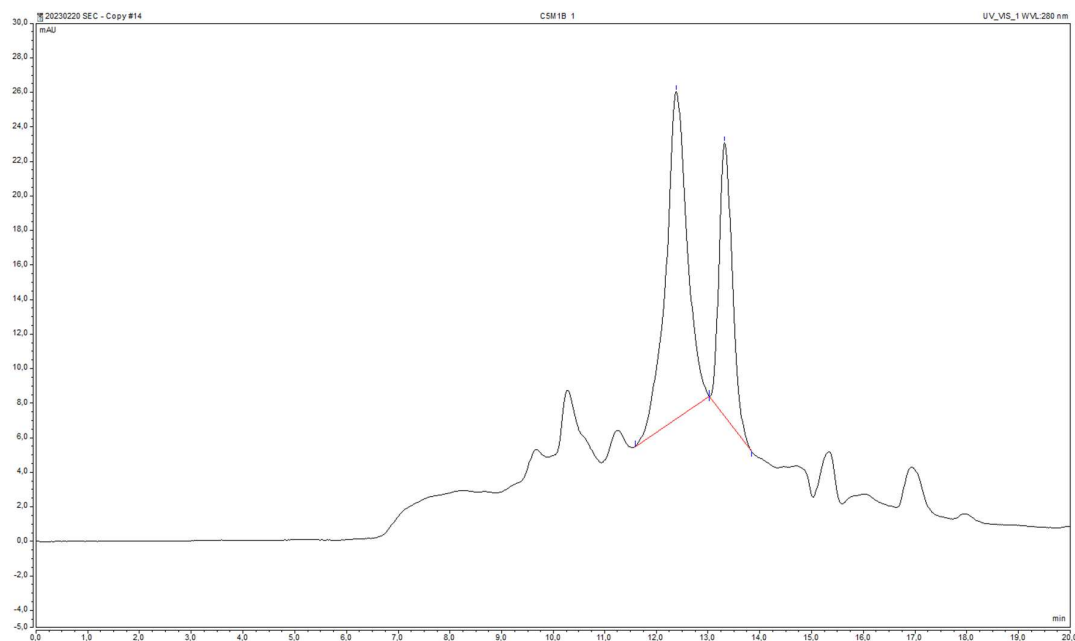


Rycina 32 Analiza białka C5M1B na kolejnych etapach oczyszczania z wykorzystaniem metody Western blot

Analizy preapratu C5M1B po pierwszym etapie oczyszczania przeprowadzono również z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania (Rycina 33). W przypadku wymianu buforu na PBS z użyciem koncentratorów, również widoczna jest znacząca degradacja białka.



Rycina 33 Analiza cząsteczki C5M1B bezpośrednio po oczyszczaniu na chromatografii powinowactwa (czarna linia) oraz po wymianie buforu elucyjnego na PBS z wykorzystaniem koncentratorów (niebieska linia)



Rycina 34 Analiza cząsteczki C5M1B po przechowywaniu w PBS

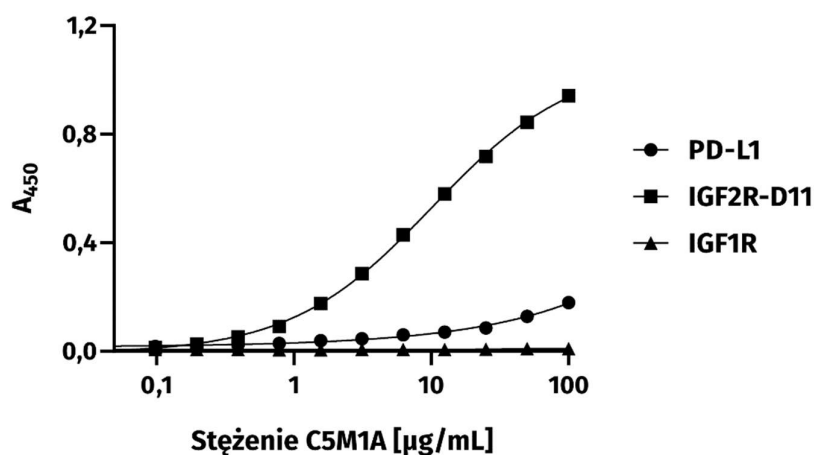
Przeprowadzone analizy wskazują na postępowanie degradacji wraz z czasem przechowywania (Rycina 34, widoczne także na wcześniejszej analizie SDS-PAGE - Rycina 26), nawet w temperaturze -70°C . Linia bazowa analizy na analitycznej chromatografii wykluczania wskazuje również na obecność niezidentyfikowanych zanieczyszczeń.

8.5. OTRZYMANE CZĄSTECZKI LYTAC WIĄŻĄ WYBRANE CELE

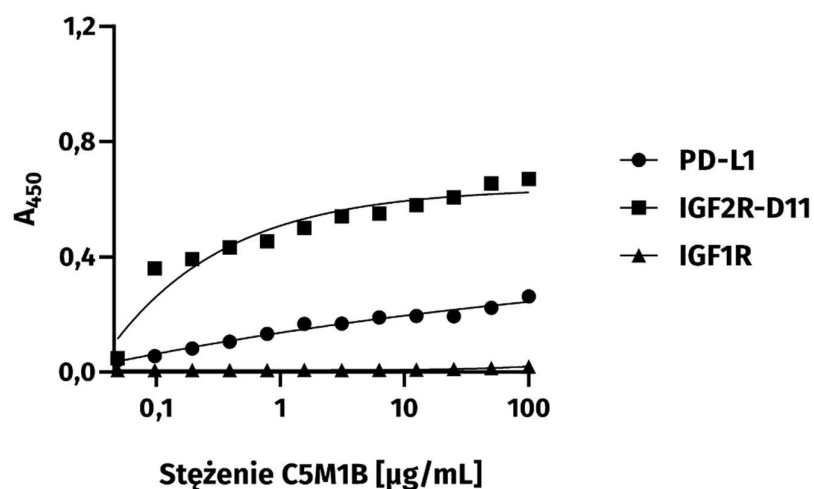
MOLEKULARNE I TWORZĄ TRÓJCZĄSTECZKOWY KOMPLEKS

8.5.1. Potwierdzenie wiązania celów molekularnych metodą ELISA

Wyniki testu wiązania bispecyficznych cząsteczek LYTAC do swoich celów molekularnych zostały przedstawione na Rycinach 35 i 36.



Rycina 35 Wyniki testu wiązania cząsteczki C5M1A do wybranych celów molekularnych metodą ELISA



Rycina 36 Wyniki testu wiązania cząsteczki C5M1B do wybranych celów molekularnych metodą ELISA

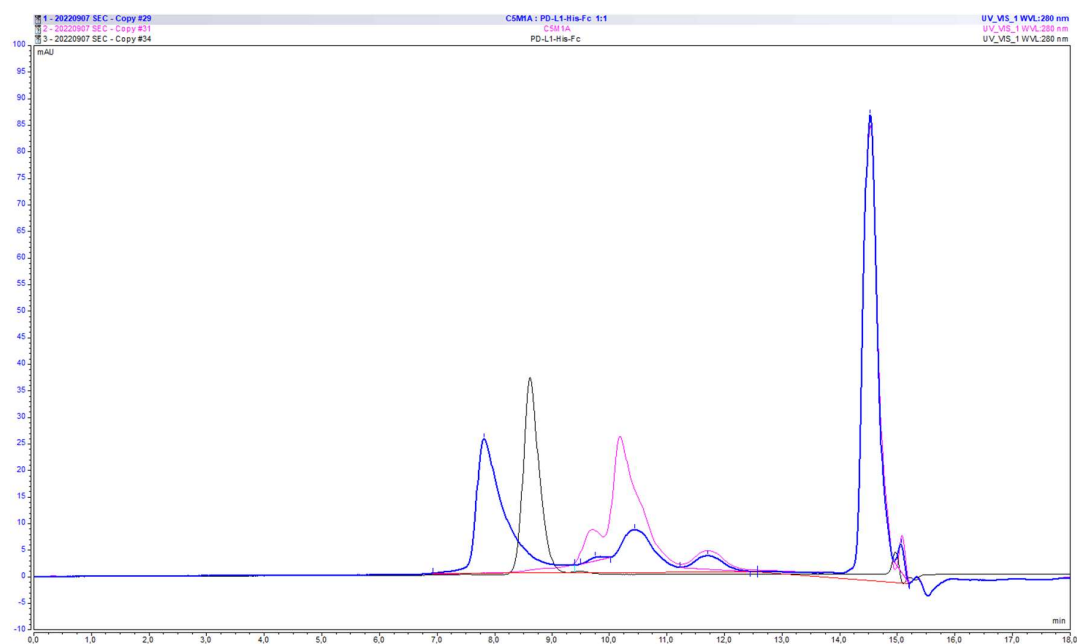
Zgodnie z oczekiwaniami obie cząsteczki wykazują wiązanie do PD-L1 oraz domeny 11 IGF2R, jednocześnie nie wykazując powinowactwa do IGF1R. C5M1B wykazuje niższe

powinowactwo do domeny 11 IGF2R niż C5M1A, jednocześnie przejawiając nieznacznie lepsze właściwości wiązania PD-L1.

8.5.2. Potwierdzenie tworzenia kompleksu z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania

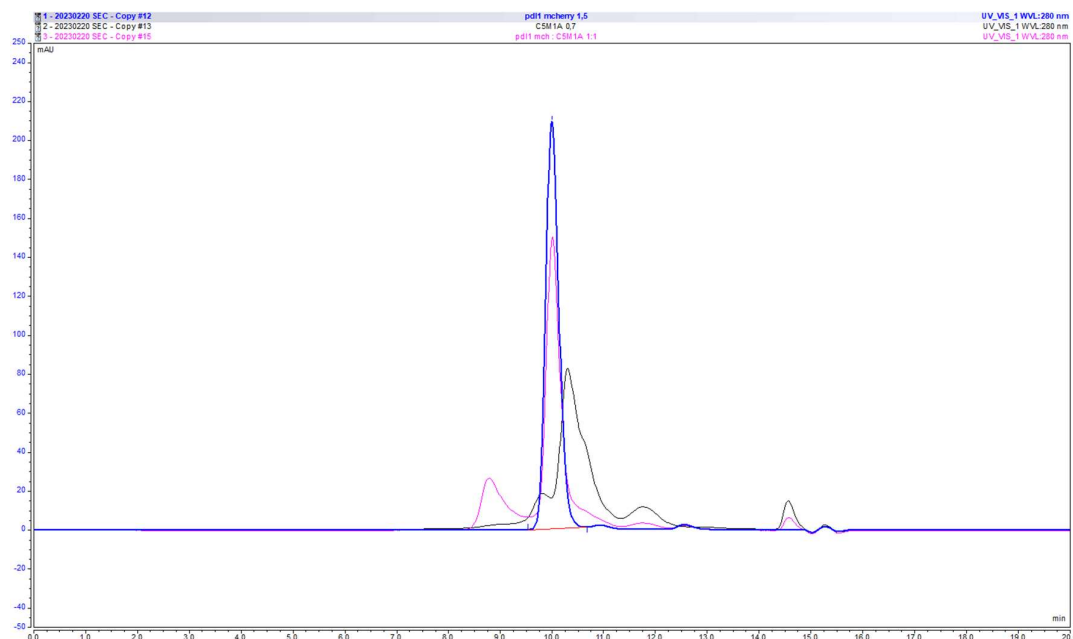
Wstępne badanie zdolności do tworzenia kompleksu z użyciem analitycznej chromatografii wykluczania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem cząsteczki C5M1A oraz chimerycznego konstruktu PD-L1-His-Fc. Wyniki zostały przedstawione na Rycinie 37. Widoczne przesunięcie pików z kompleksem względem pików od pojedynczych cząsteczek wskazuje na prawidłowe tworzenie kompleksu.

8.5.2.1. Wiązanie C5M1A-PD-L1



Rycina 37 Wyniki wstępnej oceny zdolności tworzenia kompleksu z użyciem cząsteczek C5M1A i PD-L1-His-Fc.

Kolejno, analogiczny test został przeprowadzony z wykorzystaniem cząsteczki PD-L1-mCherry, którą zastosowano później w teście internalizacji z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Wyniki testu widoczne są na Rycinie 38. Ponownie, przesunięcie wskazuje na prawidłowe utworzenie kompleksu, jednak w mieszaninie widoczne są znaczące pozostałości jednej z frakcji.

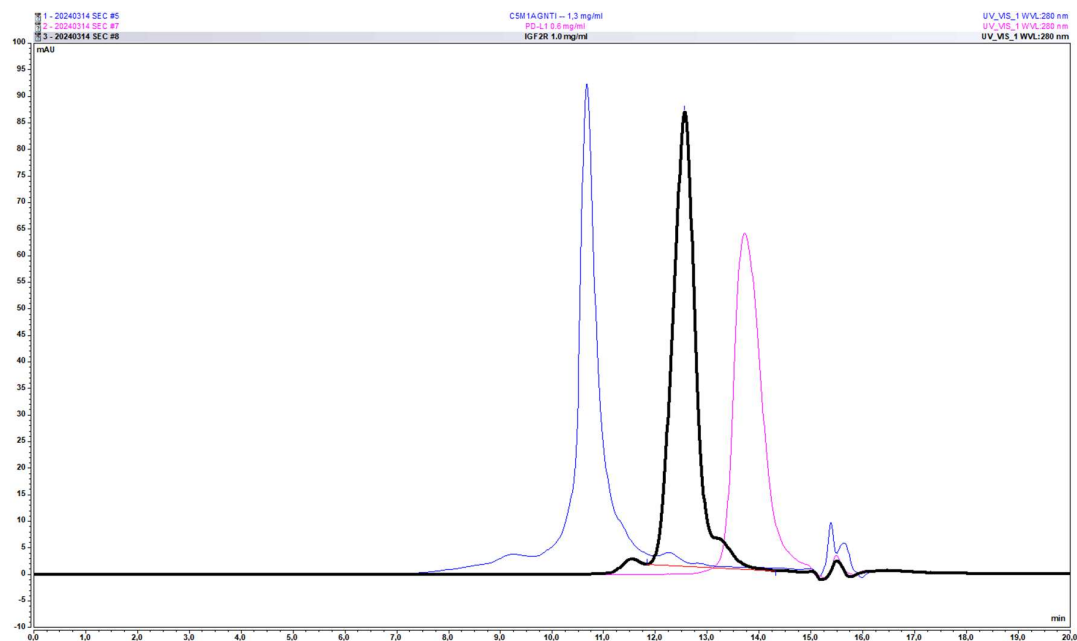


Rycina 38 Wyniki wstępnej oceny zdolności tworzenia kompleksu z użyciem cząsteczek C5M1A i PD-L1-His-Fc.

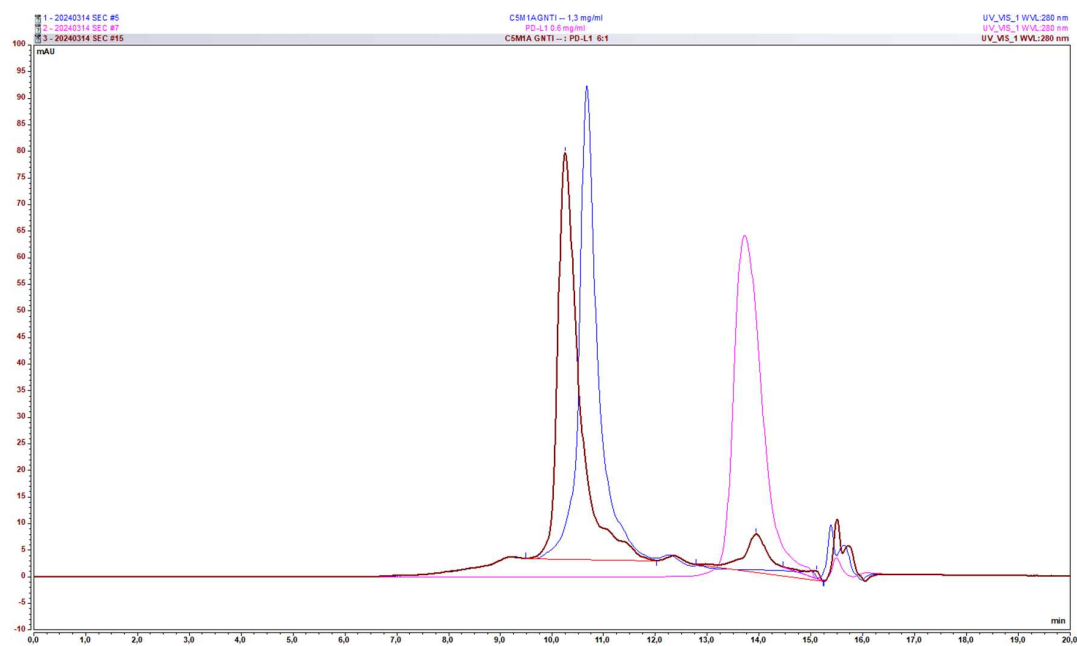
8.5.2.2. Wiązanie C5M1A GnTI^{-/-}-PD-L1-IGF2R-D11

Kolejnym przeprowadzonym testem było określenie zdolności deglikozylowanej cząsteczki C5M1A do tworzenia potrójnego kompleksu w roztworze, aby określić potencjał do późniejszej krystalizacji i określenia struktury krystalicznej. W tym celu wykorzystano wersje cząsteczek z minimalną glikozylacją lub jej całkowitym brakiem: C5M1A zostało wyprodukowane w HEK293S GnTI^{-/-}, a następnie trawione Endoglikozydazą H. PD-L1 zostało wyprodukowane w *E. coli*.

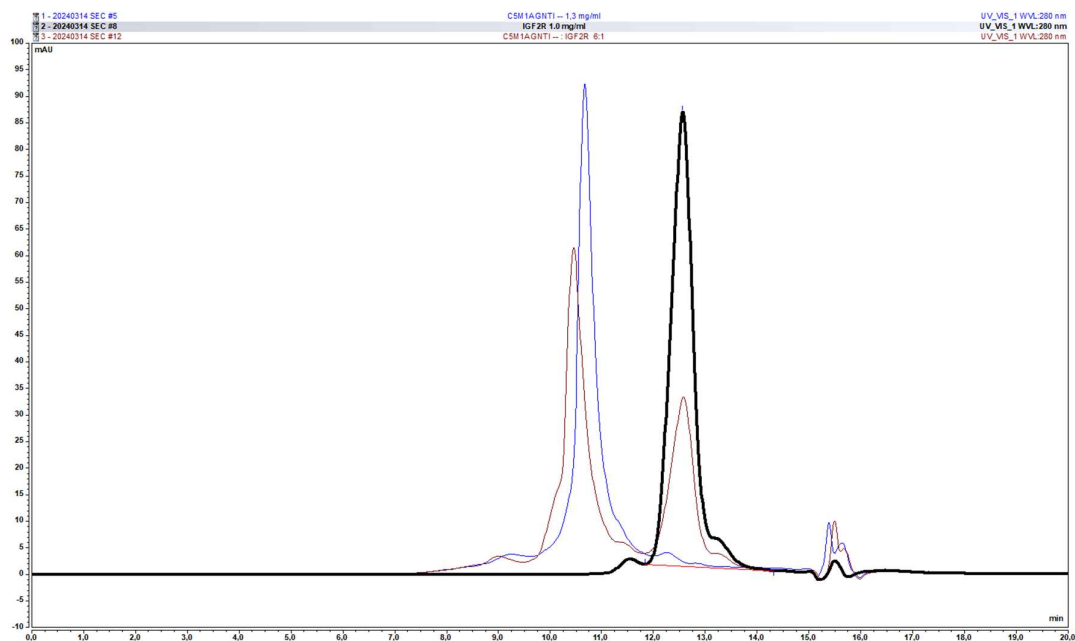
Wyniki chromatografii wykluczania dla poszczególnych preparatów zostały zobrazowane na Rycinie 39. Dla C5M1A GnTI^{-/-} zaobserwować można pojedynczy, zwarty pik, w przeciwieństwie do preparatu otrzymanego ze stabilnej linii komórkowej. Wyniki uzyskane dla analiz kompleksów C5M1A GnTI^{-/-}/PD-L1 oraz C5M1A GnTI^{-/-}/IGF2R-D11-His są przedstawione kolejno na Rycinach 40 i 41. Wynik analizy potrójnego kompleksu oraz nałożenie wyników wszystkich analiz przedstawione jest kolejno na Rycinach 42 i 43. C5M1A GnTI^{-/-} tworzy potrójny kompleks z obydwojoma swoimi celami molekularnymi.



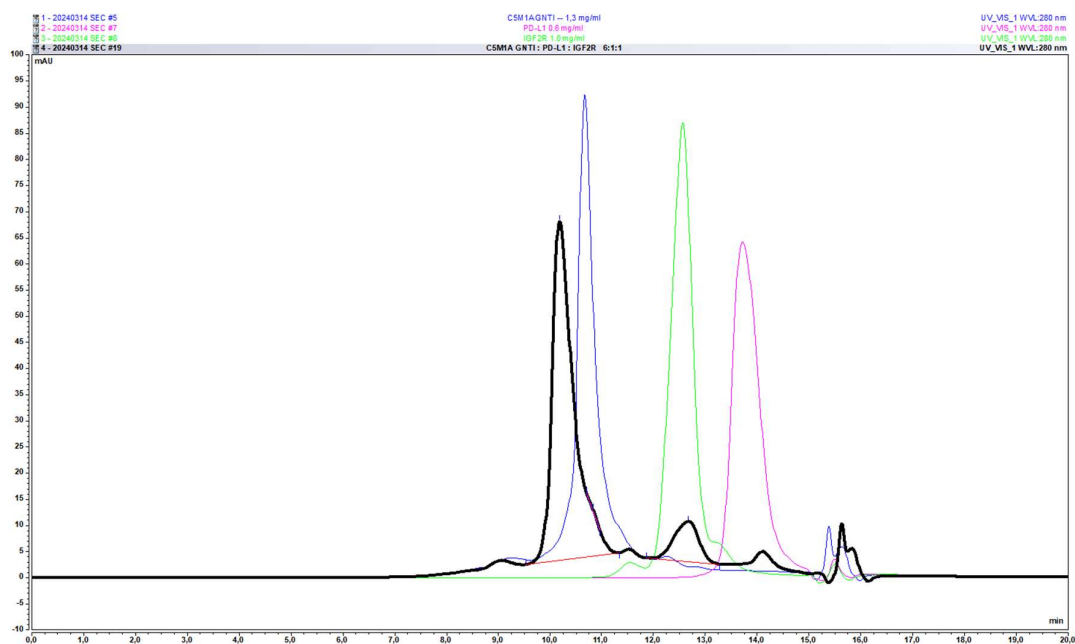
Rycina 39 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI^{-/-}, PD-L1 oraz IGF2R D11-His z wykorzystaniem chromatografii wykluczania



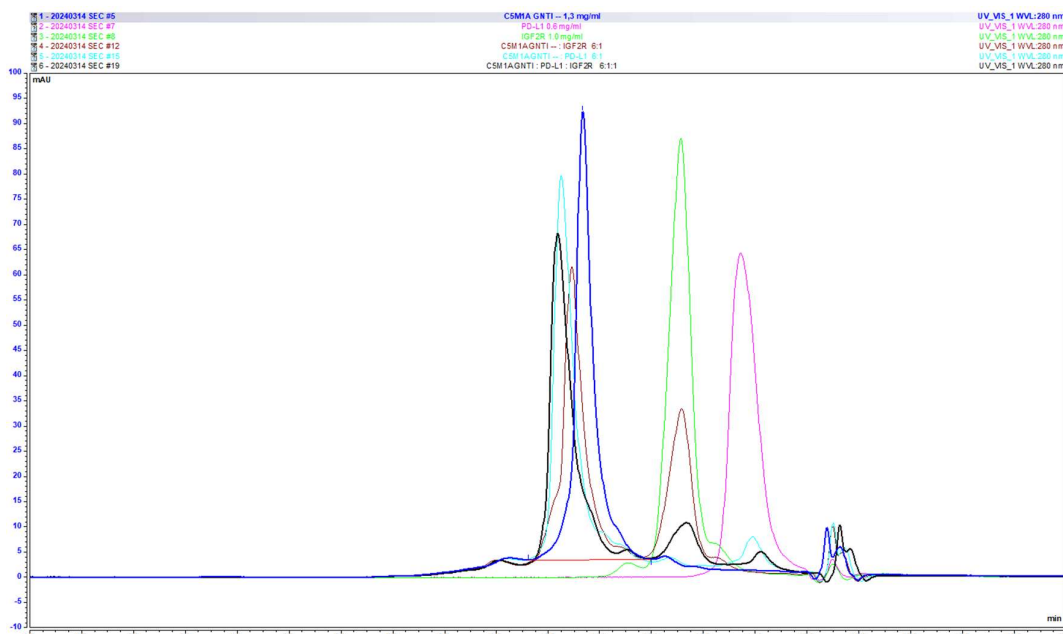
Rycina 40 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI^{-/-}, PD-L1 oraz mieszaniny obu preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania



Rycina 41 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI-/-, IGF2R-D11-His oraz mieszaniny obu preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania



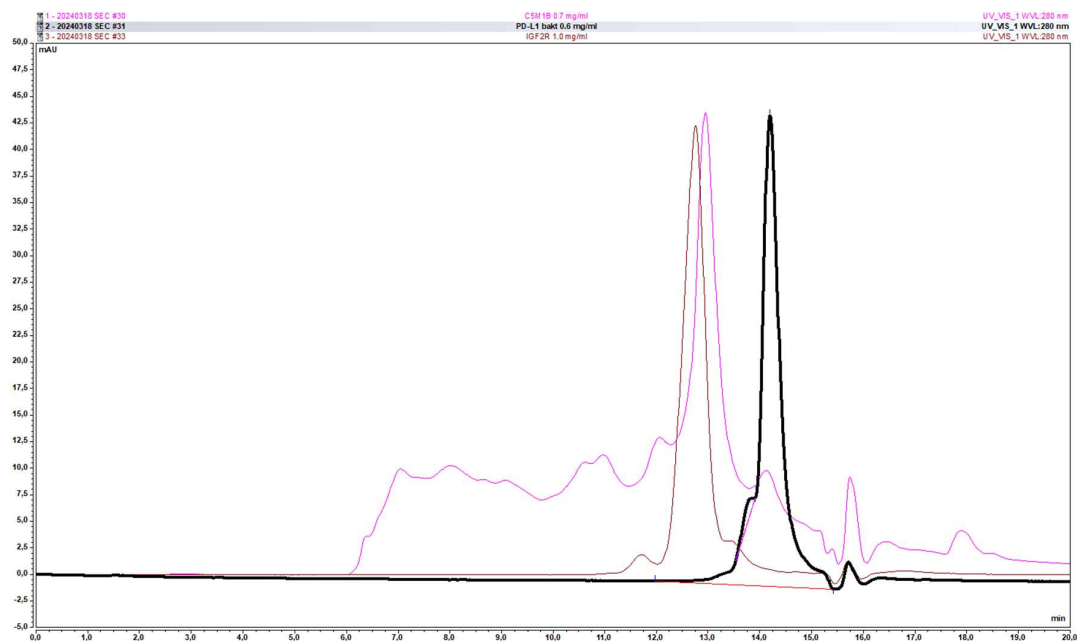
Rycina 42 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI-/-, PD-L1, IGF2R-D11-His oraz mieszaniny wszystkich preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania



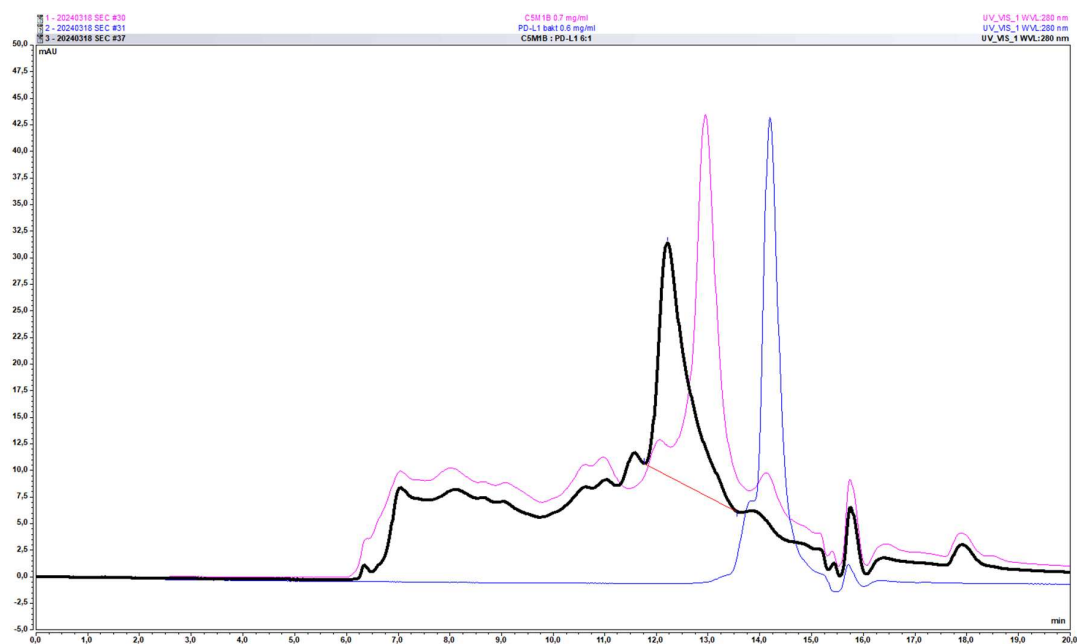
Rycina 43 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI-/-, PD-L1, IGF2R-D11-His oraz wszystkich kombinacji mieszanin ich preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania

8.5.2.3. Wiązanie C5M1B-PD-L1-IGF2R-D11

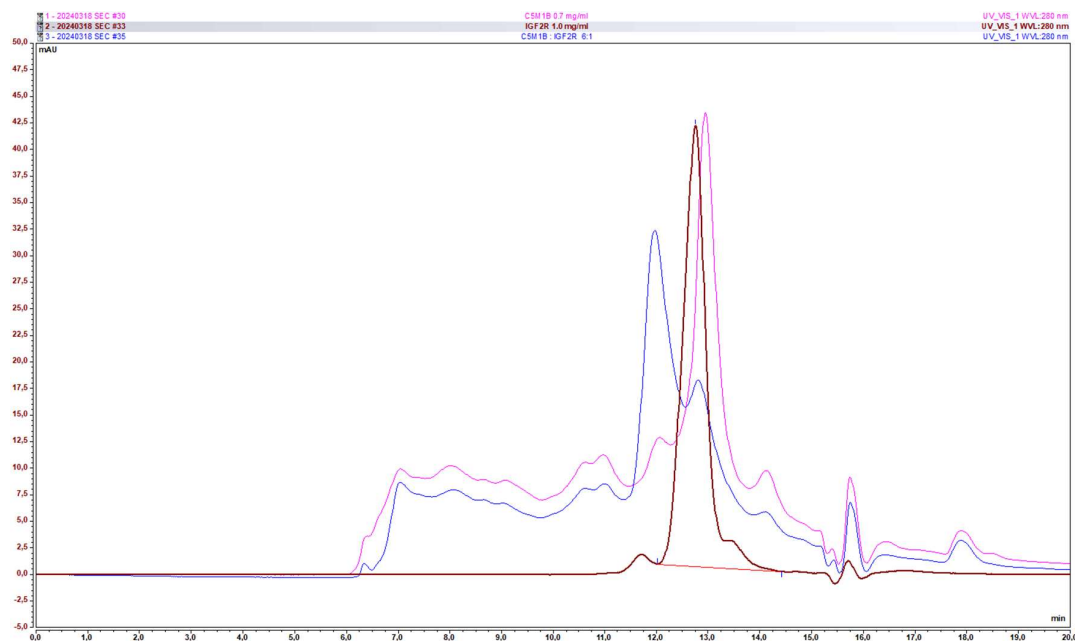
Analogiczny pakiet analiz został wykonany dla cząsteczki C5M1B. Mając na uwadze wcześniej pozyskane dane dotyczące niskiej stabilności cząsteczki, wyprodukowana została świeża partia, a następnie wszystkie analizy wykonane zostały w możliwie jak najkrótszym czasie od oczyszczenia. Wyniki przedstawione są na Rycinach: 44 (pojedyncze cząsteczki), 45 (C5M1B + PD-L1), 46 (C5M1B + IGF2R-D11-His), 47 (kompleks potrójny), 48 (nałożenie wyników wszystkich analiz). Ponadto, dla końcowego preparatu zawierającego potrójny kompleks (oczyszczonego z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii wykluczania) wykonano także analizę SDS-PAGE, której wyniki przedstawiono na Rycinie 49. C5M1B wiąże oba swoje cele molekularne, tworząc potrójny kompleks.



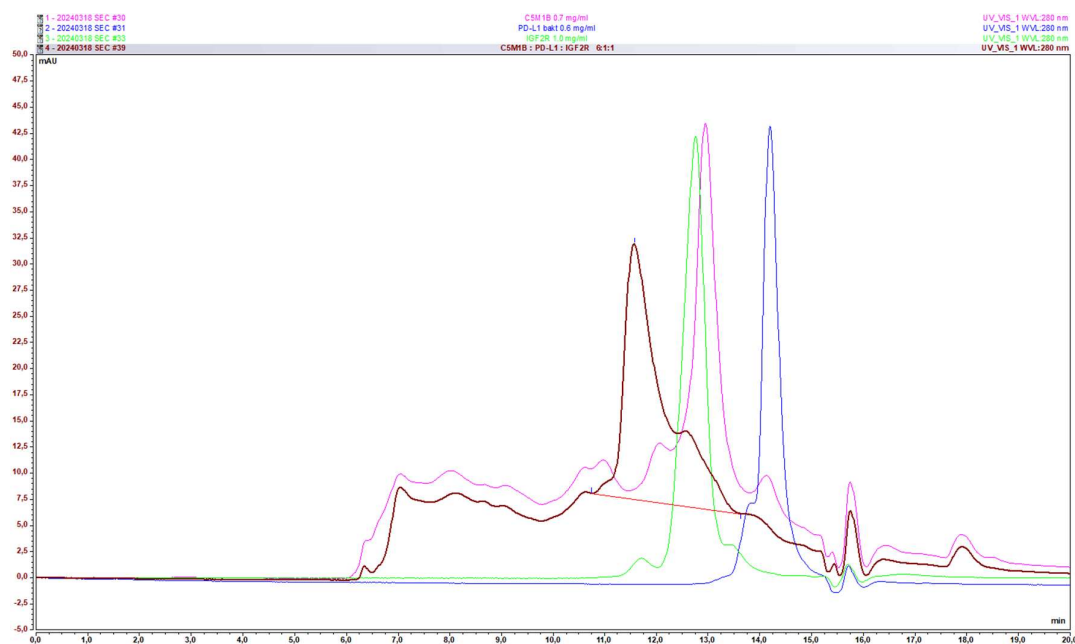
Rycina 44 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1, IGF2R-D11-His z wykorzystaniem chromatografii wykluczania



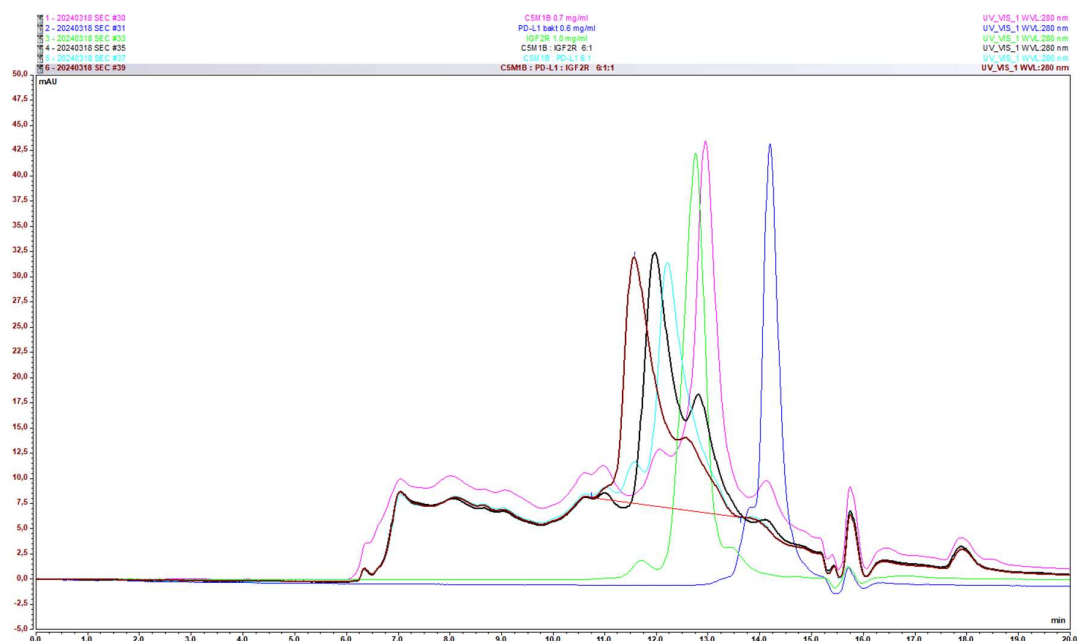
Rycina 45 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1 oraz mieszaniny obu preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania



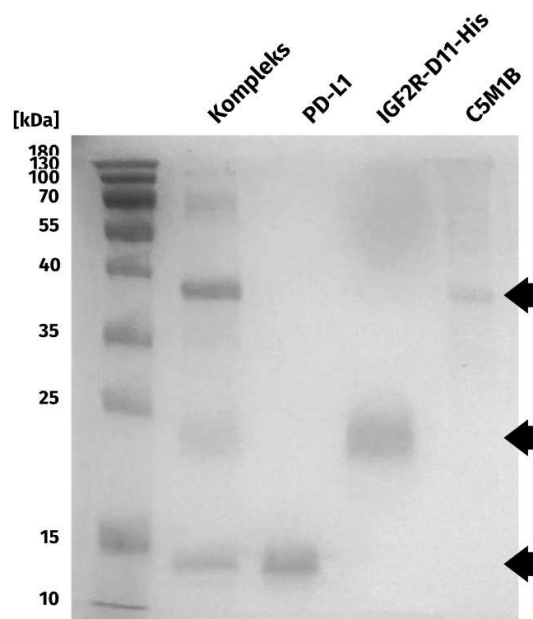
Rycina 46 Analiza cząsteczek C5M1B, IGF2R-D11-His oraz mieszaniny obu preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania



Rycina 47 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1, IGF2R-D11-His oraz mieszaniny wszystkich preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania



Rycina 48 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1, IGF2R-D11-His oraz wszystkich kombinacji mieszanin ich preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania

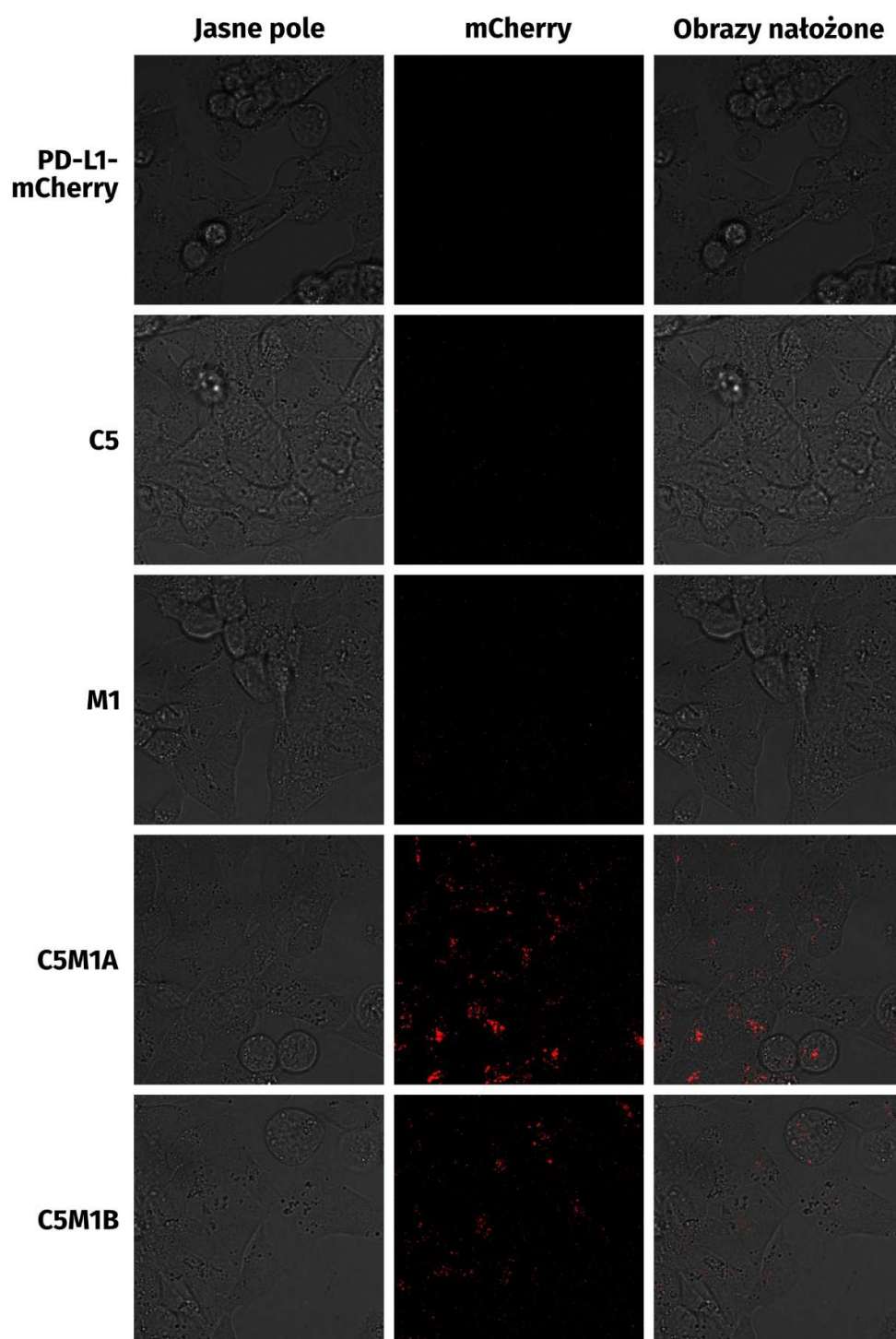


Rycina 49 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1, IGF2R-D11-His oraz mieszaniny wszystkich preparatów z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (warunki redukujące)

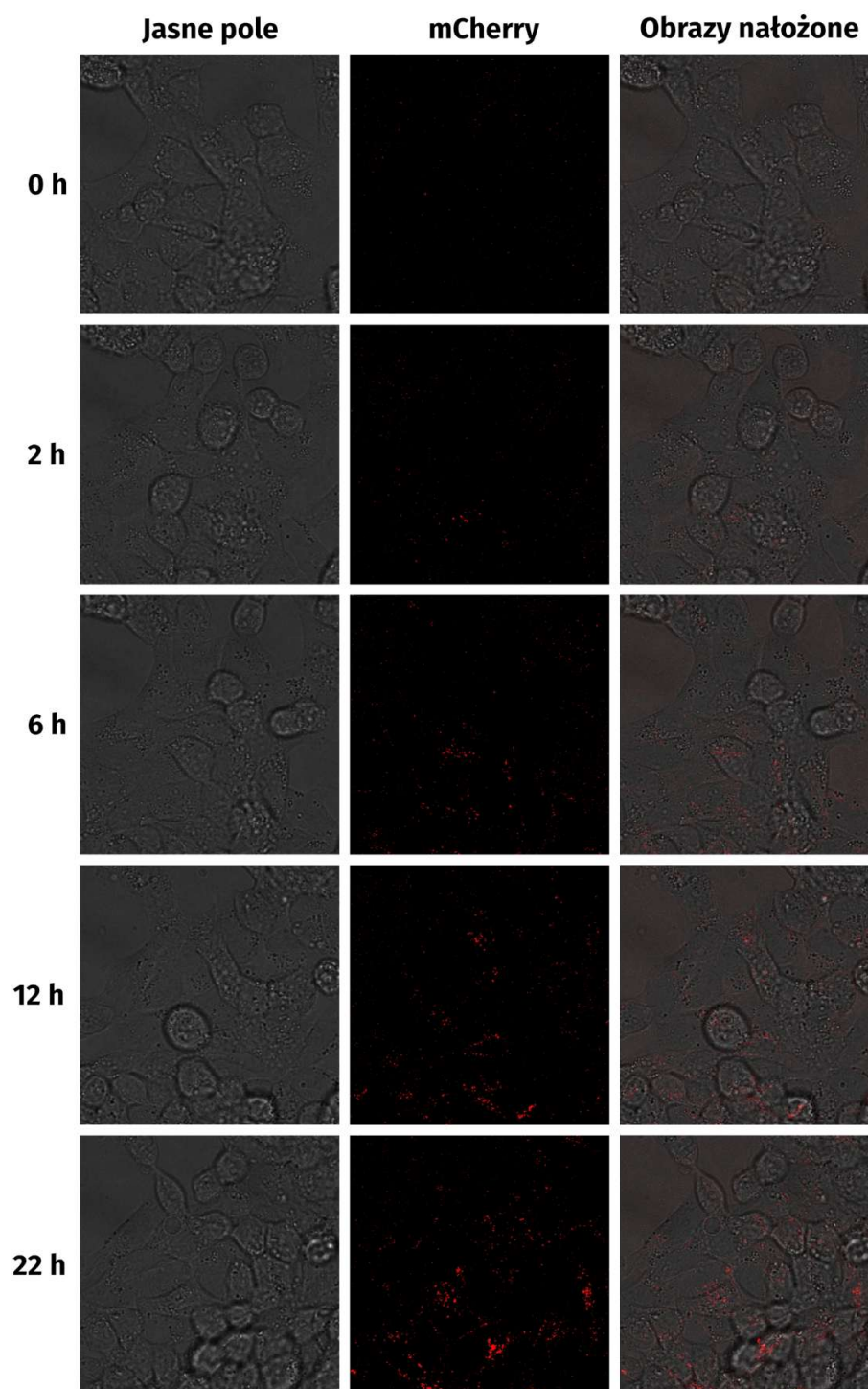
8.6. OTRZYMANE CZĄSTECZKI LYTAC INDUKUJĄ INTERNALIZACJĘ ZNAKOWANEGO FLUORESCENCYJNIE ROZPUSZCZALNEGO, ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO CELU MOLEKULARNEGO W ZALEŻNOŚCI OD CZASU

Do zobrazowania akumulacji wyznakowanego, rozpuszczalnego celu molekularnego (chimerycznego PD-L1-mCherry) w komórkach pod wpływem otrzymanych cząsteczek LYTAC, wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną. Otrzymane wyniki dla związków eksperymentalnych oraz kontroli potwierdzają zdolność wyprodukowanych białek do indukcji internalizacji zewnątrzkomórkowego, rozpuszczalnego celu molekularnego (Rycina 50). Wyniki wskazują na brak spontanicznego wchłaniania PD-L1-mCherry, jak również brak zdolności internalizacji pod wpływem tylko przeciwciała C5 czy peptydu M1 wyznakowanego ludzkim fragmentem Fc IgG1. Jednocześnie C5M1A wykazuje wyższy stopień indukcji internalizacji, niż C5M1B, co potwierdzają wyniki 22-godzinnej obserwacji. C5M1A wykazuje znaczący poziom internalizacji już po 6 godzinach inkubacji (Rycina 51), podczas gdy C5M1B wykazuje pierwsze oznaki indukcji internalizacji celu molekularnego dopiero po 12 godzinach (Rycina 52).

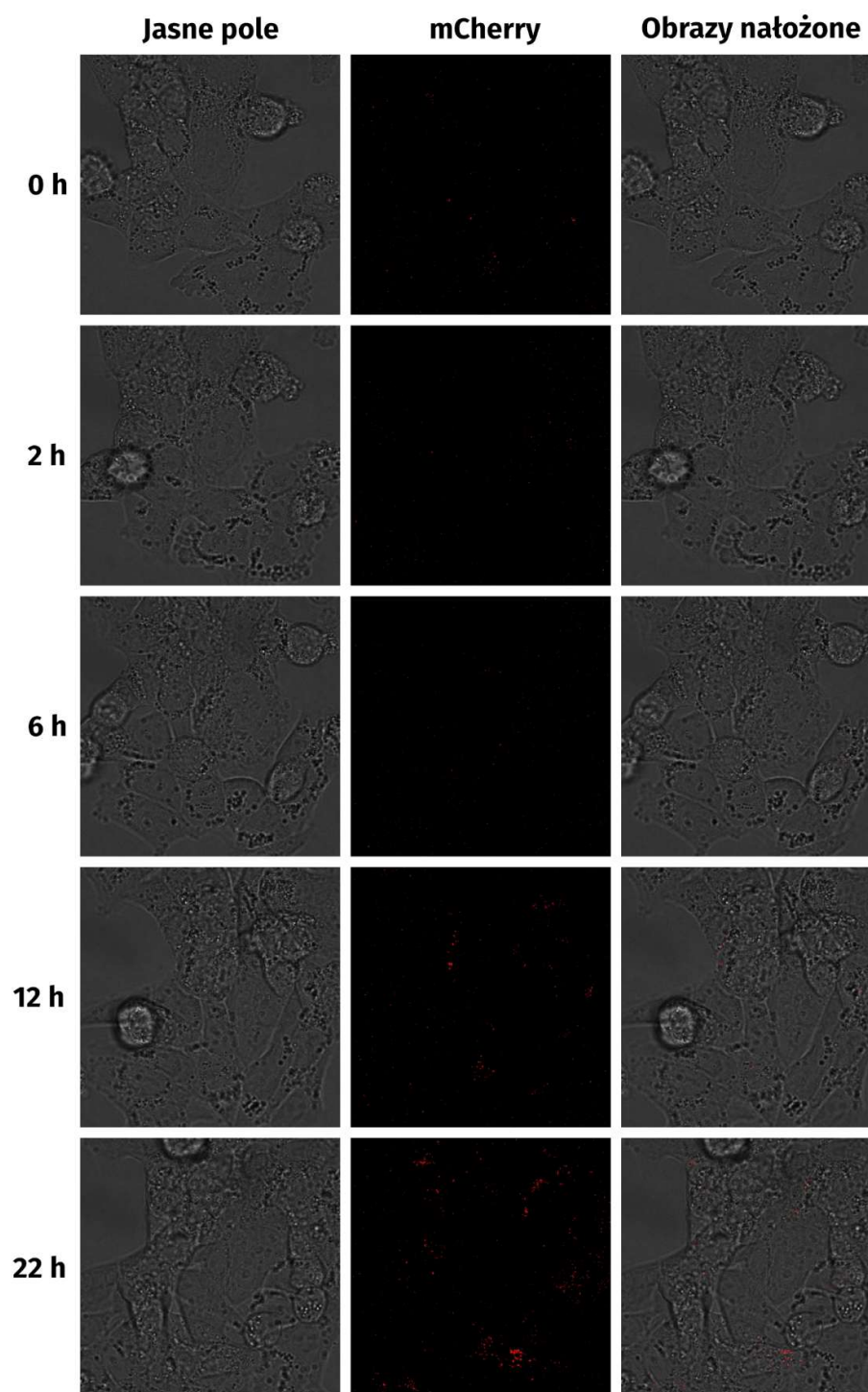
Jednocześnie, wyniki przeprowadzonych obserwacji w sposób jednoznaczny ukazują zależność intensywności internalizacji celu molekularnego od czasu ekspozycji na LYTAC.



Rycina 50 Mikroskopowy obraz internalizacji rozpuszczalnego PD-L1-mCherry po 22 h inkubacji pod wpływem badanych związków



Rycina 51 Zależność internalizacji rozpuszczalnego PD-L1-mCherry pod wpływem **C5M1A** w czasie



Rycina 52 Zależność internalizacji rozpuszczalnego PD-L1-mCherry pod wpływem **C5M1B** w czasie

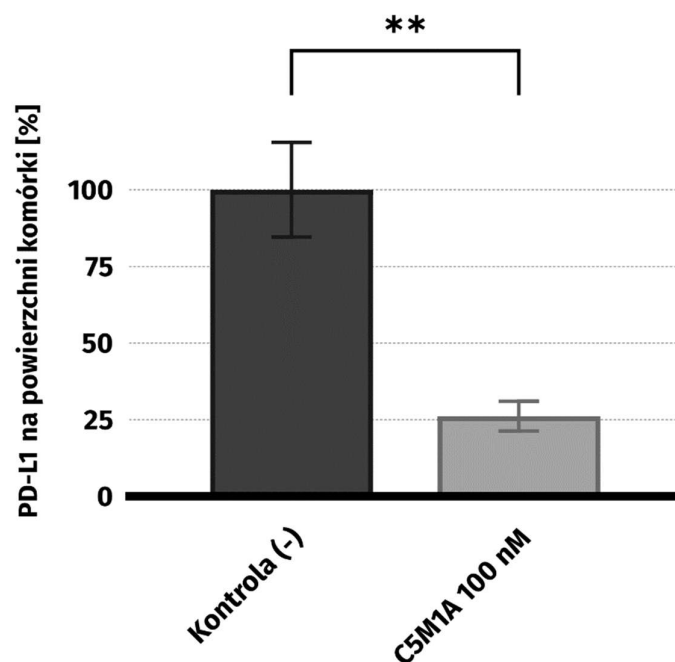
8.7. OTRZYMANE CZĄSTECZKI LYTAC INDUKUJĄ INTERNALIZACJĘ TRANSMEMBRANOWEGO CELU MOLEKULARNEGO W ZALEŻNOŚCI OD STĘŻENIA

Na wszystkich rycinach wynik przedstawiony jest jako procent nietraktowanej kontroli, gdzie kontrola ujemna została przyjęta jako 100%. Dane na wszystkich wykresach reprezentują średnią z 3 niezależnych powtórzeń jako średnia $\pm$ SD, po odcięciu tła (niespecyficzny sygnał z przeciwciał drugorzędowych). Nieparowany test t Studenta został wykorzystany do porównania średnich każdej grupy z kontrolą nietraktowaną. Wartości $p \leq 0,05$ zostały uznane za istotne statystycznie. Wartości p przypisane poszczególnym oznaczeniom zostały wyszczególnione w Tabeli 45.

Tabela 45 Znaczenie symboli określających poziom istotności statystycznej

Symbol	Wartość p
n/s	$> 0,05$
*	$\leq 0,05$
**	$\leq 0,01$
***	$\leq 0,001$
****	$\leq 0,0001$

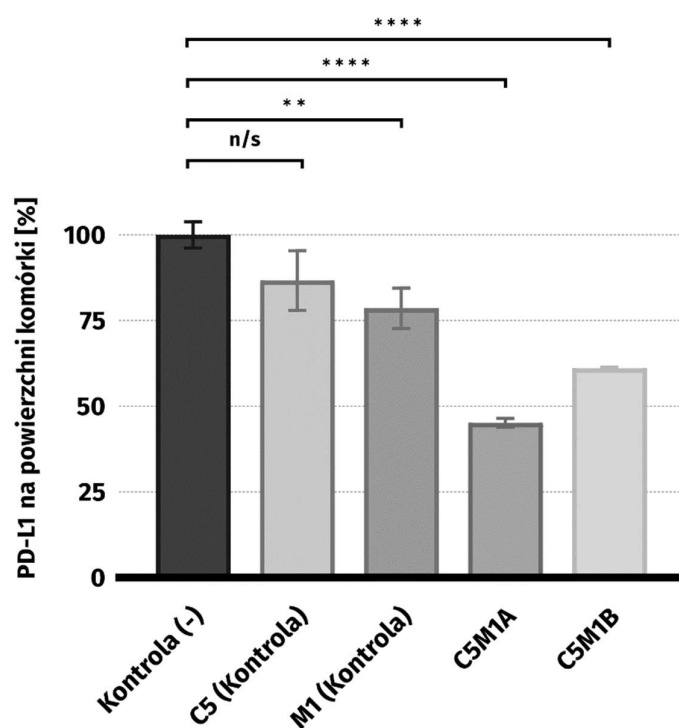
Wstępny test internalizacji przeprowadzony został na linii komórkowej nowotworu endometrium macicy RL95-2. Uzyskany rezultat wskazywał na około 75% poziom internalizacji (Rycina 53).



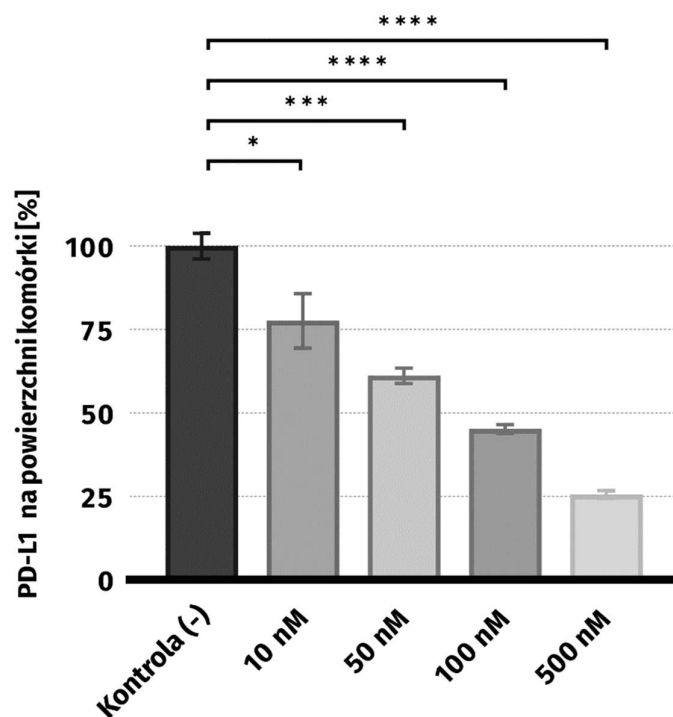
Rycina 53 Oznaczanie PD-L1 na powierzchni komórek przy użyciu cytometrii przepływowej. Komórki **RL95-2** traktowane były **C5M1A** w stężeniu 100 nM przez 22 h.

Ze względu na niską bezwzględną ilość PD-L1 na powierzchni komórek RL95-2, celem zwiększenia czułości testu kolejne eksperymenty przeprowadzane były na linii komórkowej Panc 10.05 (gruczolakorak trzustki). Wyniki wstępnego eksperymentu na linii Panc 10.05 zostały przedstawione na Rycinie 54. Otrzymany wynik wskazuje na skuteczność w internalizacji transmembranowego PD-L1, zarówno z wykorzystaniem C5M1A, jak i C5M1B, jednak zaobserwować można trend analogiczny do tego obserwowanego przy internalizacji cząsteczek rozpuszczalnych – C5M1A warunkuje silniejszą internalizację niż C5M1B. Pewien stopień internalizacji zaobserwować można także przy zastosowaniu chimerycznego konstruktu M1-IgG1 Fc, jednak nie na tyle istotny, co w przypadku cząsteczek eksperymentalnych.

Następnie przetestowano zależność intensywności internalizacji od stężenia stosowanego związku. Otrzymany rezultat (Rycina 55) wskazuje na bezpośrednią zależność intensywności internalizacji od stężenia zastosowanego związku eksperymentalnego, w tym przypadku C5M1A.

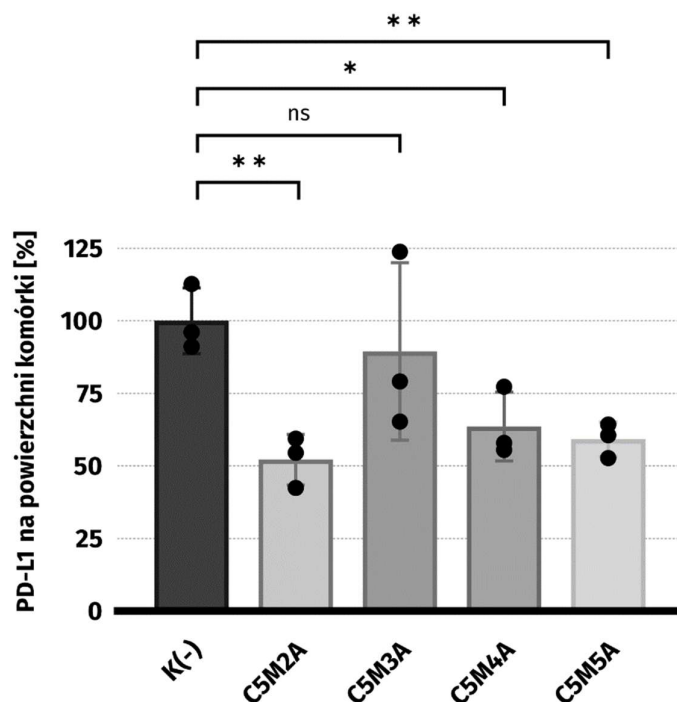


Rycina 54 Oznaczanie PD-L1 na powierzchni komórek przy użyciu cytometrii przepływowej. Komórki Panc 10.05 traktowane były wskazanymi związkami w stężeniu 100 nM przez 22 h.



Rycina 55 Określenie wpływu stężenia **C5M1A** na poziom PD-L1 na powierzchni komórek Panc 10.05 z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (inkubacja 22 h).

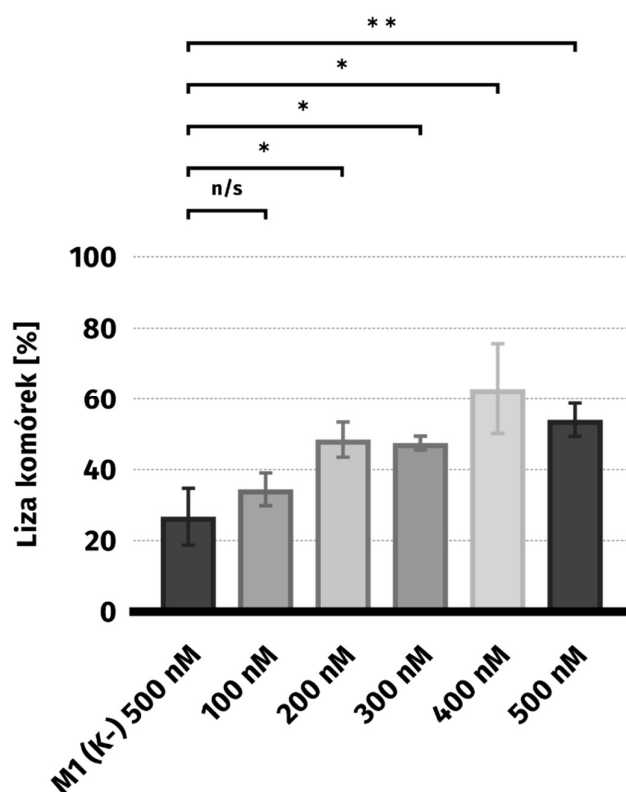
Po uzyskaniu kolejnych cząsteczek asymetrycznych opartych na peptydach M2 – M5 ponownie wykonana została analiza internalizacji PD-L1, celem stwierdzenia czy powinowactwo do IGF2R (akapit 8.3, Rycina 25) wpływa na intensywność internalizacji. Wyniki zaprezentowano na Rycinie 56.



Rycina 56 Porównanie internalizacji indukowanej przez asymetryczne cząsteczki LYTAC oparte na peptydach M2 - M5

8.8. OTRZYMANE CZĄSTECZKI LYTAC WYKAZUJĄ ZWIĘKSZONY POZIOM LIZY KOMÓREK NOWOTWOROWYCH W OBECNOŚCI KOMÓREK JEDNOJĄDRZASTYCH KRWI OBWODOWEJ

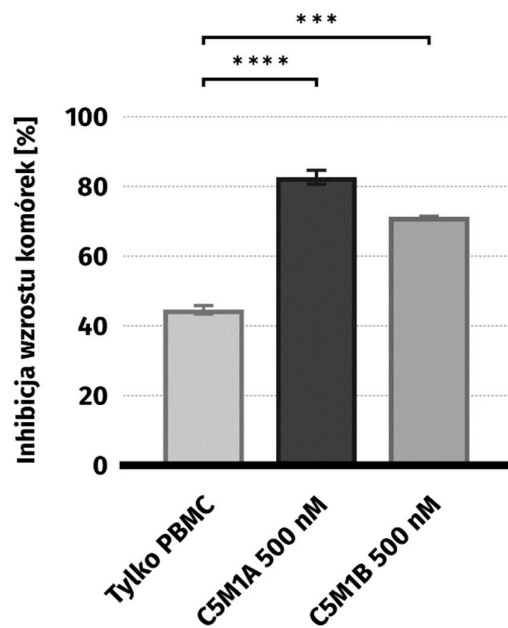
Kolejnym krokiem w projekcie, po potwierdzeniu zdolności internalizacji celów zarówno rozpuszczalnych, jak i transbłonowych, było zbadanie wpływu internalizacji na zdolność jednojądrzastych komórek krwi obwodowej do lizy komórek nowotworowych. Wyniki wstępnego screeningu stężeń C5M1A w teście PBMC z komórkami od pojedynczego dawcy widoczny jest na Rycinie 57.



Rycina 57 Wstępny screening wpływu stężenia **C5M1A** na lizę komórek nowotworowych **RL95-2** w teście PBMC

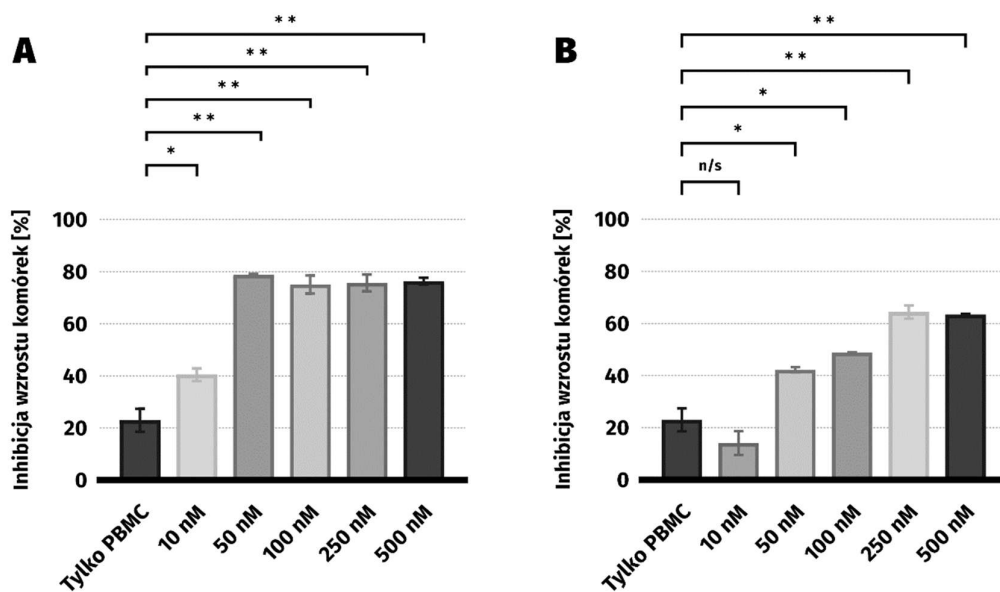
Wstępny wynik sugeruje, że intensywność lizy komórek nowotworowych jest zależna od stężenia. Zestawiając uzyskany wynik z wynikiem uzyskanym w cytometrii przepływowej (zależność intensywności internalizacji od stężenia), jak również z wynikiem testu blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1 (brak zdolności blokady przez przeciwciało C5), można wnioskować, że zwiększony poziom lizy komórek nowotworowych jest bezpośrednim wynikiem internalizacji PD-L1.

Ze względu na dostępność materiału, w kolejnych eksperymentach próbki o różnych stężeniach testowane były na komórkach od różnych dawców, co może mieć przełożenie na otrzymywane wyniki. Wyniki z kolejnej próby, z wykorzystaniem linii komórkowej BT20 (rak piersi) widoczne są na Rycinie 58.

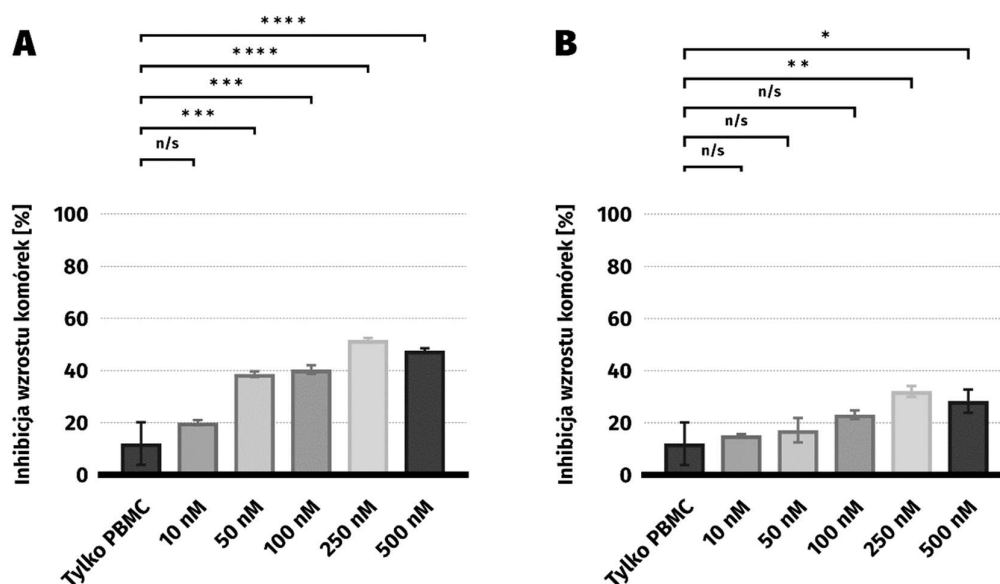


Rycina 58 Wpływ cząsteczek LYTAC na liżę komórek nowotworowych BT20 w teście PBMC

Aby uzyskać szerszy obraz skuteczności cząsteczek LYTAC przeprowadzono kolejne eksperymenty przy różnych stężeniach związków, na różnych liniach komórkowych. Wyniki dla linii RL95-2 przedstawione są na Rycinie 59, natomiast dla Panc 10.05 – na Rycinie 60.



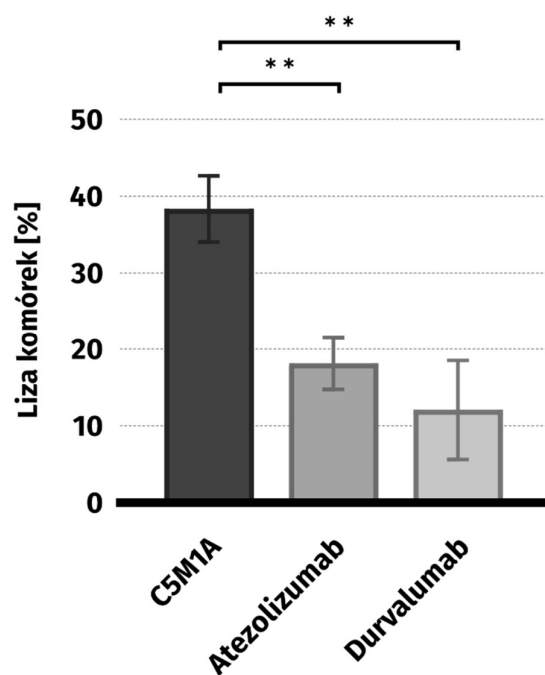
Rycina 59 Wpływ cząsteczek LYTAC na liżę komórek nowotworowych **RL95-2** w teście PBMC. **A:** C5M1A **B:** C5M1B



Rycina 60 Wpływ cząsteczek LYTAC na lizę komórek nowotworowych **Panc 10.05** w teście PBMC. **A:** C5M1A **B:** C5M1B

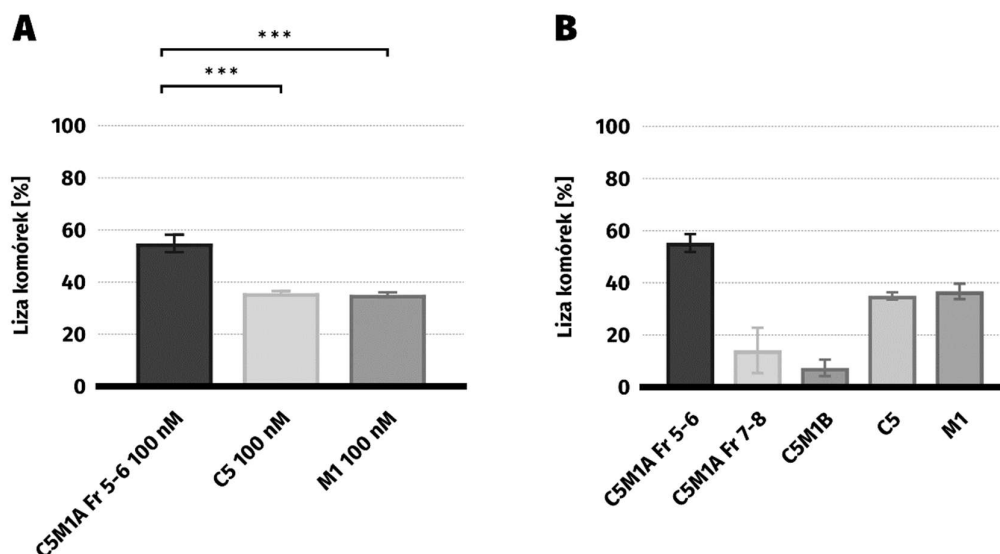
Ponownie C5M1A każdorazowo przewyższa rezultatem C5M1B. Zaobserwować można także wyższą skuteczność lizy (w przypadku obu związków) na linii RL95-2 niż Panc 10.05.

Aby zbadać potencjał cytotoksyczny C5M1A w odniesieniu do komercyjnie dopuszczonych do użycia przeciwciał skierowanych na ten sam cel molekularny, przeprowadzony został kolejny eksperyment. Wykorzystane przeciwciała to durvalumab w formie IgG4 (nazwa handlowa Imfinzi, wykorzystywany przy wcześniejszych testach jako przeciwciało referencyjne) oraz atezolizumab w formie IgG1 (nazwa handlowa Tecentriq). Wynik został zobrazowany na Rycinie 61. PBMC pod wpływem traktowania C5M1A generują istotnie wyższą lizę komórek w porównaniu do traktowania którymkolwiek z wymienionych wcześniej przeciwciał monoklonalnych.



Rycina 61 Porównanie wpływu C5M1A do Atezolizumabu i Durvalumabu w teście PBMC na indukcję lizy komórek nowotworowych RL95-2

Wcześniej opisane wyniki wygenerowane zostały z wykorzystaniem C5M1A oczyszczanego jednostopniowo (chromatografia powinowactwa). Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w elektroforezie SDS-PAGE (dodatkowy prążek) oraz chromatografii wykluczania (asymetryczny kształt piku) można przypuszczać, że część białka podlega degradacji, przez co może nie być funkcjonalna. Aby potwierdzić tę hipotezę, preparat białka C5M1A oczyszczono dalej z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii wykluczania, w wyniku czego uzyskano dwie frakcje. Następnie, obie z frakcji poddano testowi cytotoksyczności z wykorzystaniem komórek PBMC. Wyniki zostały zobrazowane na Rycinie 62.



Rycina 62 Porównanie wpływu różnych frakcji C5M1A w teście PBMC na lizę komórek nowotworowych **RL95-2**. **A**: porównanie frakcji 5-6 do kontroli; **B**: porównanie frakcji 5-6 i 6-7 do C5M1B oraz kontroli.

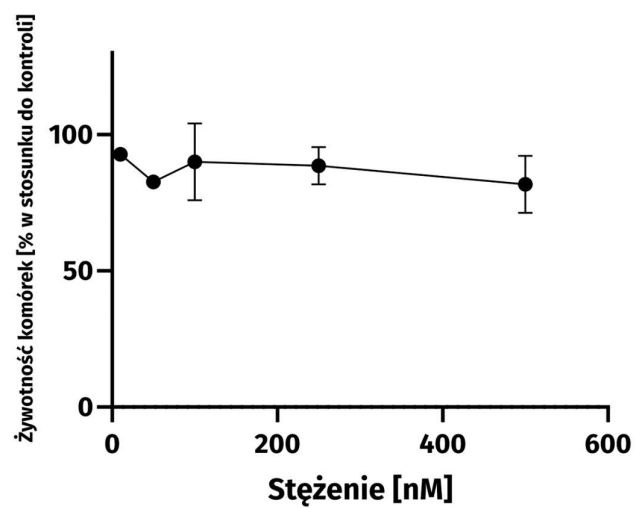
Frakcja C5M1A 5-6 wykazuje aktywność zbliżoną do aktywności białka oczyszczonego jednostopniowo, podczas gdy frakcja 7-8 wykazuje znikomą aktywność.

8.9. OTRZYMANA CZĄSTECZKA C5M1A SAMA W SOBIE NIE

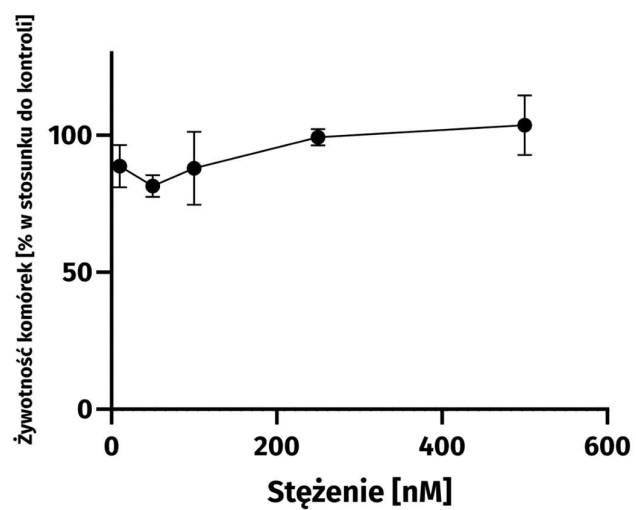
WYKAZUJE CYTOTOKSYCZNOŚCI WOBEC KOMÓREK

NOWOTWOROWYCH

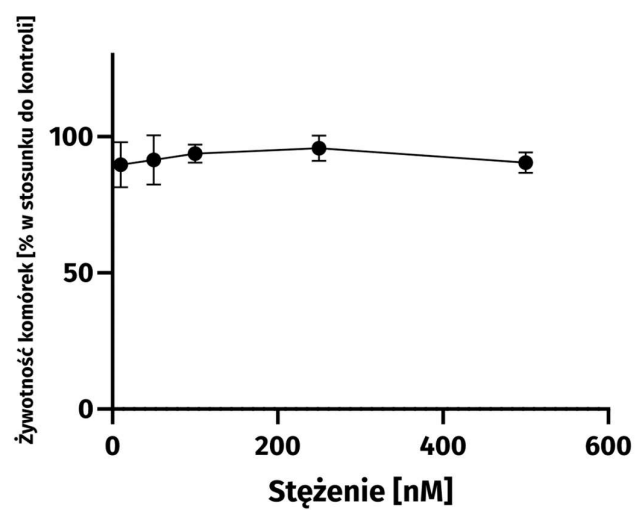
Cytotoksyczność związku C5M1A została oznaczona w rosnących stężeniach na czterech ludzkich, nowotworowych liniach komórkowych: BT20 (Rycina 63), Panc 10.05 (Rycina 64), PANC-1 (Rycina 65) i RL95-2 (Rycina 66). Sam związek nie wykazuje istotnej cytotoksyczności wobec wyżej wymienionych linii w całym zakresie testowanych stężeń.



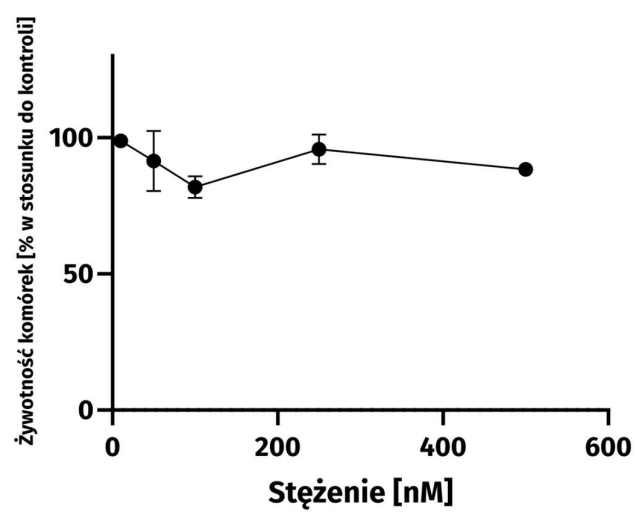
Rycina 63 Ocena cytotoksyczności związku C5M1A na linii komórkowej BT20



Rycina 64 Ocena cytotoksyczności związku C5M1A na linii komórkowej Panc 10.05



Rycina 65 Ocena cytotoksyczności związku C5M1A na linii komórkowej PANC-1



Rycina 66 Ocena cytotoksyczności związku C5M1A na linii komórkowej RL95-2

9. DYSKUSJA

Realizowany projekt opracowania nowatorskich cząsteczek indukujących ukierunkowaną degradację lizosomalną został zakończony sukcesem. Zaproponowane zostały bispecyficzne cząsteczki, wykorzystujące do degradacji ścieżkę IGF2R (CI-M6PR), jednocześnie wiążące i skutecznie indukujące internalizację celu molekularnego, jakim jest istotny z klinicznego punktu widzenia punkt kontrolny układu odpornościowego – PD-L1. W przeciwieństwie do innych opublikowanych do tej pory wyników potwierdzono, że wyprodukowane w ramach realizacji tej rozprawy cząsteczki LYTAC (oparte na wymodelowanych peptydach bazujących na IGF2) nie wykazują zdolności wiązania IGF1R. Biorąc pod uwagę docelowe zastosowania kliniczne, jest to niezwykle pożądana właściwość ze względu na rolę odgrywaną przez nadmierną stymulację IGF1R w nowotworzeniu (Sell i in., 1994) (Foulstone i in., 2005) (Guevara-Aguirre i in., 2011).

W toku prac wykazano zdolność wiązania indywidualnych komponentów cząsteczek do wybranych celów, a kolejno także kompletnych konstruktów bispecyficznych, celem walidacji projektu na wczesnym etapie rozwoju. Jednocześnie przeciwciało C5 poddano testowi zdolności do blokady sygnalizacji poprzez ścieżkę PD-1/PD-L1 w środowisku komórkowym, który dał wynik negatywny. Pozwoliło to na określenie, że obserwowane później efekty cytotoksyczne w teście PBMC są rezultatem degradacji PD-L1, a nie blokady interakcji. Co więcej, w porównaniu skuteczności opracowanej cząsteczki C5M1A do atezolizumabu i durwalumabu (przeciwciał działających właśnie na zasadzie blokady oddziaływania), LYTAC indukuje minimum o połowę większą liczę komórek nowotworowych. Jednocześnie cząsteczka sama w sobie nie daje efektów cytotoksycznych na szerokim panelu linii komórkowych, co jest wynikiem spodziewanym w przypadku preparatów biologicznych, których toksyczność najczęściej związana jest z reakcją układu odpornościowego (Scherer i in., 2010), co jest indywidualne dla każdego pacjenta i będzie możliwe do oceny dopiero na etapie klinicznym.

Obie opracowane cząsteczki – C5M1A i C5M1B – wykazują zdolność internalizacji rozpuszczalnego oraz transbłonowego celu molekularnego, co zostało potwierdzone odpowiednio z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej i cytometrii przepływowej. W świetle opublikowanych do tej pory danych o podobnych cząsteczkach (szeroko omówionych w rozdziale 5.5.2) był to wynik spodziewany. Podobnie, wynikiem spodziewanym była zależność internalizacji od stężenia i czasu inkubacji. Cząsteczki wykazywały zdolność indukcji internalizacji we wszystkich przetestowanych liniach komórkowych, co również spójne jest z danymi dostępnymi w literaturze i dodatkowo

potwierdza szerokie występowanie IGF2R w organizmie. Między poszczególnymi liniami dało się jednak zaobserwować różnice w intensywności degradacji. Wynikać one mogą z naturalnie występujących różnic w liczbie cząsteczek PD-L1 na powierzchni komórki. Przy zakładanej stechiometrii 1:1 i zastosowaniu stałego stężenia LYTAC w przypadku wszystkich linii powinna zostać zdegradowana taka sama liczba ligandów (przy założeniu, że każda z nich posiada zbliżony poziom IGF2R i żadne z białek biorące udział w jego recyrkulacji nie jest zmutowane), jednak w przypadku komórek wykazujących naturalnie wyższą produkcję celu molekularnego będzie to mniejszy udział procentowy.

Z punktu widzenia aplikacyjnego i wykonalności produkcji interesującym pozostaje fakt, że cząsteczki asymetryczne uzyskane ze stabilnej linii komórkowej (C5M1A) wykazują obecność czterech prążków w SDS-PAGE, podczas gdy analogiczne białka uzyskane z produkcji przejściowej (C5M2A – C5M5A) wykazują jedynie trzy prążki w warunkach redukujących (a więc spodziewana liczba podjednostek). Tworzy to konieczność bardziej rozległego oczyszczania preparatu z linii stabilnej w warunkach laboratoryjnych. Rozważając możliwości oczyszczania w warunkach wielkoskalowej produkcji farmaceutycznej należałoby dokonać dalszej charakterystyki niepożądanego produktu celem ustalenia, czy w przypadku zastosowania chromatografii jonowymiennej byłaby możliwość wydajnego usunięcia tej frakcji z końcowego preparatu. Chromatografia jonowymienna jest bowiem rutynowo stosowana w procesach oczyszczania przeciwciał monoklonalnych, a więc nie powinno generować to nadmiarowego kroku. Biorąc pod uwagę, że tylko część frakcji wykazuje pożądaną właściwość, prowadzi to do obniżenia ilości uzyskiwanej aktywnej frakcji z jednej szarży, co przełoży się na wydajność produkcji i cenę produktu. Otwartym pytaniem pozostaje przyczyna takiego stanu rzeczy. Komórki wykorzystywane w generacji stabilnej linii (CHO) są standardowo wykorzystywane w produkcji znaczącej większości preparatów biofarmaceutycznych w skali globalnej (Tihanyi & Nyitray, 2020). Potencjalnie mogłoby się okazać, że jest to przypadłość jedynie wygenerowanej poliklonalnej linii komórkowej i po selekcji linii monoklonalnej problem zniknie, bowiem istnieje możliwość, że niepożądaną frakcję produkuje tylko wybrana pula komórek; ewentualnie należałoby powtórzyć transfekcję i selekcję oraz ocenić, czy problem jest odtwarzalny.

Kwestia, która również pozostaje otwarta to indukowanie degradacji. Udowodniono ponad wszelką wątpliwość, że na skutek działania opracowanych związków indukowana jest internalizacja celu molekularnego. Z punktu widzenia mechanizmu immunoterapii jest to rzecz najistotniejsza, ponieważ powinna wystarczyć do uzyskania pożądanego efektu fizjologicznego, co wstępnie potwierdza wynik uzyskany w teście z komórkami PBMC.

Niemniej jednak, dla kompletnego opisu technologii w dalszych pracach wartym sprawdzenia byłoby czy cel molekularny jest faktycznie degradowany.

Aspektem, który wymaga dalszych badań pozostaje także los kompleksu i celu molekularnego wewnątrz komórki. Cała dostępna literatura (szeroko omówiona w rozdziale 5.5.2) wskazuje jednoznacznie, że białka takie jak reporterowe mCherry akumulowane są w lizosomach (mCherry charakteryzuje się bowiem opornością na degradację w lizosomie, ponadto w kwaśnym pH nie traci zdolności emisji fluorescencji), co determinowane jest przez barwienie struktur kwaśnych innym fluoroforem niż wykorzystywany przez białko reporterowe i obserwację pod mikroskopem fluorescencyjnym. Niemniej jednak, bardziej precyzyjną metodą wizualizacji kolokalizacji byłoby specyficzne barwienie markerów lizosomów, takich jak np. LAMP-1 i LAMP-2 (ang. *Lysosomal-Associated Membrane Protein*) (Barral i in., 2022). Inną metodą określenia mechanizmu degradacji jest traktowanie komórek związkami indukującymi degradację w obecności inhibitorów degradacji lizosomalnej (bafilomycyna A, chlorek amonu, pepstatyna A), proteasomalnej (MG123) i autofagosomalnej (3-metyloadenina) (Wang i in., 2022) (Ji i in., 2022) (Wu i in., 2023) oraz późniejsze oznaczanie poziomów celu molekularnego w porównaniu do kontroli.

Opracowane w ramach projektu konstrukty pozwalają na szybkie uzyskanie cząsteczek degradujących wybrany cel molekularny pod warunkiem znajomości sekwencji przeciwciała wiążącego ten cel. Opublikowane do tej pory wyniki pokazują wstępnie, że istnieje pewne pole do optymalizacji intensywności indukowanej degradacji poprzez manipulowanie miejscem wiązania. W przypadku białek transmembranowych - im bliższe błony komórkowej, tym większa intensywność degradacji (Pance i in., 2023). Jak pokazały uzyskane wyniki również powinowactwo do receptora kierującego do lizosomu odgrywa rolę w intensywności indukowanej degradacji. Do sprawdzenia pozostaje kwestia w jaki sposób powinowactwo do celu molekularnego wpłynie na ten sam parametr.

Innym elementem, na który zwraca się uwagę przy projektowaniu cząsteczki jest połączenie domen warunkujących powinowactwo do receptora i celu molekularnego. Wskazuje się na konieczność optymalnej geometrii wiązania, stąd łącznik nie może być ani zbyt długi, ani zbyt krótki, musi wykazywać optymalną elastyczność (Miao i in., 2021) (Pance i in., 2023). Jednocześnie racjonalnie zaprojektowana cząsteczka musi uwzględniać mechanizm internalizacji wykorzystywany przez wybrany receptor (Huang i in., 2023).

Niemniej jednak więcej światła na kwestie związane z intensywnością degradacji będą mogły rzucić jedynie wyniki uzyskane w badaniach preklinicznych i klinicznych. Można spekulować, że w części przypadków niepożądana będzie możliwie najwyższa intensywność degradacji, a jedynie optymalna, która niezbędna będzie do osiągnięcia zakładanego efektu,

szczególnie przy celowaniu w białka występujące ogólnoustrojowo. Z drugiej strony, zmienną którą można łatwo manipulować na późnych etapach rozwoju cząsteczki jest podawana pacjentowi dawka preparatu, co jednak sugerowałoby pożądaną jak najintensywniejszą degradację przypadającą na jedną cząsteczkę. Umożliwiłoby to bowiem podawanie mniejszych ilości produktu, a co za tym idzie - obniżenie ceny dla odbiorcy końcowego (która w przypadku biofarmaceutyków i tak jest znacząca) oraz potencjalnie łagodniejsze działania niepożądane związane z układem odpornościowym.

Opracowany konstrukt warunkując wiązanie do IGF2R może być wykorzystany jako podstawa do podejścia platformowego przy projektowaniu kolejnych cząsteczek. Przeciwciało asymetryczne, monowalentne wobec każdego z celów (C5M1A) każdorazowo wykazywało wyższą skuteczność internalizacji (a także lizy komórek nowotworowych w teście z wykorzystaniem PBMC) niż chimeryczny konstrukt oparty o analogiczny scFv połączony z peptydem bazującym na IGF2 (C5M1B). Niewiele podobnych danych jest dostępnych jak do tej pory w literaturze, jednak te które się ukazały, potwierdzają wyższość przeciwciała w formie asymetrycznym monowalentnym, również nad konstruktami symetrycznymi, biwalentnymi wobec każdego z celów (Pance i in., 2023). Chociaż w tym przypadku również możliwe jest dalsze zoptymalizowanie cząsteczki – fuzja domeny warunkującej powinowactwo do receptora kierującego do lizosomu w innym miejscu niż na C-końcu łańcucha ciężkiego umożliwiłaby inną geometrię wiązania, co potencjalnie mogłoby dawać diametralnie różne efekty. W rezultacie, przy planowaniu każdej kolejnej cząsteczki, ramię warunkujące powinowactwo do IGF2R może być wykorzystywane tak jak jest, bez konieczności jakichkolwiek dalszych modyfikacji, choć na podstawie uzyskanych danych można się pokusić o dalsze modelowanie i optymalizację, celem uzyskania cząsteczki, która będzie silniej wiązała receptor.

Jak zostało zaznaczone we wstępie, największym zainteresowaniem przy pracach nad technologią LYTAC zdaje się cieszyć ścieżka IGF2R. Wiązanie do tegoż receptora przy jednoczesnym braku wiązania do IGF1R to osiągnięcie rozwiązujące jeden z problemów. W dalszych pracach konieczne będzie także dogłębne przyjrzenie się wpływowi na całkowity metabolizm IGF2. Jak zostało określone, czynnikiem limitującym tempo degradacji jest recyrkulacja receptora na powierzchnię komórki (Banik i in., 2020). Świadczy to o tym, że cała dostępna populacja receptora jest zaangażowana w ukierunkowaną degradację. W tym samym czasie problematyczna może się okazać kwestia naturalnej funkcji receptora – regulacji poziomu wolnego IGF2. IGF2 jest bowiem zdolny do wiązania i stymulacji IGF1R. Mimo, że powinowactwo to jest dalece niższe niż w przypadku IGF1, nadal może to powodować opisany już wcześniej problem nadmiernej stymulacji tego receptora.

Podwyższone stężenia wolnego IGF2 są bowiem powiązane ze wzrostem nowotworów (Toretzky & Helman, 1996) (Hassan & Howell, 2000). Hipotetycznie stwarza to sytuację, w której bardziej pożądane byłyby cząsteczki kierujące do degradacji niezależnie od obecności receptorów, jednak tak jak wcześniej, do jednoznacznego wyznaczenia takiego trendu prawdopodobnie konieczne będą wyniki z badań przedklinicznych i klinicznych.

Celem uzyskania jak najbardziej korzystnego profilu farmakokinetycznego, należałoby także określić jakie są dalsze losy cząsteczek LYTAC, po dostarczeniu celu molekularnego do lizosomu. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że cały kompleks jest kierowany do degradacji, co odpowiadałoby za stechiometrię 1:1 – na jedną podaną cząsteczkę przypadałaby jedna zdegradowana cząsteczka celu molekularnego. Celem poprawy tego stanu rzeczy, do konstrukcji kolejnych cząsteczek można by wykorzystać przeciwciała zależne od pH, aby analogicznie do IGF2R, oddysocjowywały od swojego celu w niskim pH (Klaus & Deshmukh, 2021). Do eksperymentalnego określenia pozostaje, czy zastosowanie takiego zabiegu pozwoli na recyrkulację LYTAC na zewnątrz komórki, choć w przypadku przeciwciał zjawisko takie może zachodzić poprzez receptory FcRn (Vincent & Zurini, 2012).

Przy projektowaniu potencjalnych terapii należy mieć także na uwadze, czy wybrany cel molekularny występuje w formie transbłonowej, rozpuszczalnej, czy – jak w przypadku chociażby PD-L1 – w obu. Zaprojektowane w ramach niniejszego projektu cząsteczki LYTAC umożliwiają internalizację obu rodzajów celów, jednak pojawiają się dane wskazujące, że intensywność internalizacji celów rozpuszczalnych nie jest powiązana z poziomami degradacji celów transbłonowych, a co za tym idzie – najprawdopodobniej za oba procesy odpowiedzialne są inne białka regulatorowe (Ahn i in., 2023). Przy jednoznacznym określeniu jakie to białka, można by wykorzystać je jako markery, przewidujące skuteczność degradacji celów molekularnych.

Podsumowując, opracowane związki LYTAC umożliwiają skuteczną internalizację rozpuszczalnego i transbłonowego PD-L1, a także dają możliwość łatwego rozszerzenia technologii na inne cele molekularne. Wykorzystywany do kierowania do lizosomu receptor IGF2R występuje w szerokim panelu tkanek, co zapewnia uniwersalność mechanizmu. Jednocześnie opracowane związki nie wykazują powinowactwa do IGF1R, co jest istotnym wyróżnikiem wśród innych opisanych w literaturze molekuł. Przeprowadzone badania miały na celu weryfikację koncepcji, co zostało w pełni osiągnięte. Technologia LYTAC nadal jest rzeczą stosunkowo nową i wymaga dalszych badań przed wdrożeniem. Na obecnym etapie w szczególności istotne wydają się być badania przedkliniczne, celem określenia toksyczności, skuteczności i wpływu ogólnoustrojowego w modelach *in vivo*. Pomyślne wyniki otworzyłyby drogę do badań klinicznych z udziałem ludzi, a kolejno – przy odrobinie

szczęścia – komercjalizację i w rezultacie pomoc pacjentom z ciężkimi chorobami, co jest głównym zamysłem od samego początku realizowania projektu.

10. WNIOSKI

1. Wyprodukowane cząsteczki LYTAC są zdolne do indukowania ukierunkowanej internalizacji wybranego celu molekularnego.
2. Intensywność indukowanej internalizacji zależy od czasu inkubacji.
3. Intensywność indukowanej internalizacji zależy od stężenia cząsteczki LYTAC w roztworze.
4. Chimeryczne, asymetryczne przeciwciało w formie IgG4-KIH (C5M1A) wykazuje wyższą zdolność indukcji internalizacji niż mniejszy, chimeryczny konstrukt scFv-M1 (C5M1B).
5. W teście cytotoksyczności z PBMC cząsteczka asymetryczna C5M1A indukuje znacząco wyższą liczbę komórek nowotworowych niż dopuszczone do stosowania u ludzi przeciwciała monoklonalne, skierowane na ten sam cel molekularny.
6. Wyniki wstępnych badań sugerują zależność intensywności internalizacji od powinowactwa danej cząsteczki do receptora IGF2.
7. Dla pełniejszego opisu technologii w dalszych pracach wartym sprawdzenia byłoby czy cel molekularny poza internalizacją ulega również degradacji.
8. Przeprowadzone badania dają silne podstawy do dalszego rozwoju technologii ukierunkowanej degradacji, co w przyszłości może skutkować opracowaniem nowatorskich terapii wykorzystujących ten mechanizm, m.in. na choroby nowotworowe.

11. PIŚMIENICTWO

- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B. W., Kapur, R., Stott, S. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D. T., Lin, C. P., Toner, M., Haber, D. A., & Maheswaran, S. (2014). Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell*, 158(5), 1110–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>
- Adam, J. K., Odhav, B., & Bhoola, K. D. (2003). Immune responses in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 99(1), 113–132. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00056-1)
- Ahn, G., Banik, S. M., Miller, C. L., Riley, N. M., Cochran, J. R., & Bertozzi, C. R. (2021). LYTAGs that engage the asialoglycoprotein receptor for targeted protein degradation. *Nature Chemical Biology*, 17(9), 937–946. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00770-1>
- Ahn, G., Riley, N. M., Kamber, R. A., Wisnovsky, S., Moncayo Von Hase, S., Bassik, M. C., Banik, S. M., & Bertozzi, C. R. (2023). Elucidating the cellular determinants of targeted membrane protein degradation by lysosome-targeting chimeras. *Science*, 382(6668), eadf6249. <https://doi.org/10.1126/science.adf6249>
- Al Absi, A., Wurzer, H., Guerin, C., Hoffmann, C., Moreau, F., Mao, X., Brown-Clay, J., Petrolli, R., Casellas, C. P., Dieterle, M., Thiery, J.-P., Chouaib, S., Berchem, G., Janji, B., & Thomas, C. (2018). Actin Cytoskeleton Remodeling Drives Breast Cancer Cell Escape from Natural Killer-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Research*, 78(19), 5631–5643. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0441>
- Allen, T. A., Asad, D., Amu, E., Hensley, M. T., Cores, J., Vandergriff, A., Tang, J., Dinh, P.-U., Shen, D., Qiao, L., Su, T., Hu, S., Liang, H., Shive, H., Harrell, E., Campbell, C., Peng, X., Yoder, J. A., & Cheng, K. (2019). Circulating tumor cells exit circulation while maintaining multicellularity, augmenting metastatic potential. *Journal of Cell Science*, 132(17), jcs231563. <https://doi.org/10.1242/jcs.231563>
- Andersen, M. H. (2018). The Balance Players of the Adaptive Immune System. *Cancer Research*, 78(6), 1379–1382. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3607>
- Annunziata, M., Granata, R., & Ghigo, E. (2011). The IGF system. *Acta Diabetologica*, 48(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00592-010-0227-z>
- Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9–18. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp268>
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8), 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>
- Aspeshlagh, S., Postel-Vinay, S., Rusakiewicz, S., Soria, J.-C., Zitvogel, L., & Marabelle, A. (2016). Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *European Journal of Cancer*, 52, 50–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.08.021>
- Banik, S. M., Pedram, K., Wisnovsky, S., Ahn, G., Riley, N. M., & Bertozzi, C. R. (2020). Lysosome-targeting chimeras for degradation of extracellular proteins. *Nature*, 584(7820), 291–297. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2545-9>
- Barral, D. C., Staiano, L., Guimas Almeida, C., Cutler, D. F., Eden, E. R., Futter, C. E., Galione, A., Marques, A. R. A., Medina, D. L., Napolitano, G., Settembre, C., Vieira, O. V., Aerts, J. M. F. G., Atakpa-Adaji, P., Bruno, G., Capuozzo, A., De Leonibus, E., Di Malta, C., Escrevente, C., ... Seabra, M. C. (2022). Current methods to analyze lysosome morphology, positioning, motility and function. *Traffic*, 23(5), 238–269. <https://doi.org/10.1111/tra.12839>
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., & Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *International Immunology*, 12(11), 1539–1546. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.11.1539>
- Békés, M., Langley, D. R., & Crews, C. M. (2022). PROTAC targeted protein degraders: The past is prologue. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(3), 181–200. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>
- Binder, R. J. (2019). Immunosurveillance of cancer and the heat shock protein-CD91 pathway. *Cellular Immunology*, 343, 103814. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.05.007>
- Bochel, A. J., Williams, C., McCoy, A. J., Hoppe, H.-J., Winter, A. J., Nicholls, R. D., Harlos, K., Jones, E. Y., Berger, I., Hassan, A. B., & Crump, M. P. (2020). Structure of the Human Cation-Independent Mannose 6-Phosphate/IGF2 Receptor Domains 7–11 Uncovers the Mannose 6-Phosphate Binding Site of Domain 9. *Structure*, 28(12), 1300–1312.e5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.08.002>
- Borriello, L., Condeelis, J., Entenberg, D., & Oktay, M. H. (2021). Breast Cancer Cell Re-Dissemination from Lung Metastases—A Mechanism for Enhancing Metastatic Burden. *Journal of Clinical Medicine*, 10(11), 2340.

<https://doi.org/10.3390/jcm10112340>

- Bourbon, E., Ghesquière, H., & Bachy, E. (2021). CAR-T cells, from principle to clinical applications. *Bulletin Du Cancer*, 108(10), S4–S17. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2021.02.017>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., & Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029–3030. <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>
- Brody, E. N., & Gold, L. (2000). Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(1), 5–13. [https://doi.org/10.1016/s1389-0352\(99\)00004-5](https://doi.org/10.1016/s1389-0352(99)00004-5)
- Bronsart, P., Enderle-Ammour, K., Bader, M., Timme, S., Kuehs, M., Csanadi, A., Kayser, G., Kohler, I., Bausch, D., Hoepfner, J., Hopt, U., Keck, T., Stickeler, E., Passlick, B., Schilling, O., Reiss, C., Vashist, Y., Brabletz, T., Berger, J., ... Wellner, U. (2014). Cancer cell invasion and EMT marker expression: A three-dimensional study of the human cancer-host interface: 3D cancer-host interface. *The Journal of Pathology*, 234(3), 410–422. <https://doi.org/10.1002/path.4416>
- Brown, J., Jones, E. Y., & Forbes, B. E. (2009). Keeping IGF-II under control: Lessons from the IGF-II-IGF2R crystal structure. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(12), 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.07.003>
- Caianiello, D. F., Zhang, M., Ray, J. D., Howell, R. A., Swartzel, J. C., Branham, E. M. J., Chirkin, E., Sabbasani, V. R., Gong, A. Z., McDonald, D. M., Muthusamy, V., & Spiegel, D. A. (2021). Bifunctional small molecules that mediate the degradation of extracellular proteins. *Nature Chemical Biology*, 17(9), 947–953. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00851-1>
- Calderwood, S. K., Khaleque, M. A., Sawyer, D. B., & Ciocca, D. R. (2006). Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(3), 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.006>
- Caligiuri, M. A., Zmuidzinas, A., Manley, T. J., Levine, H., Smith, K. A., & Ritz, J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(5), 1509–1526. <https://doi.org/10.1084/jem.171.5.1509>
- Castaneda, M., Den Hollander, P., Kuburich, N. A., Rosen, J. M., & Mani, S. A. (2022). Mechanisms of cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 87, 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.10.006>
- Chang, C.-I., Liao, J. C., & Kuo, L. (2001). Macrophage Arginase Promotes Tumor Cell Growth and Suppresses Nitric Oxide-mediated Tumor Cytotoxicity. *Cancer Research*, 61, 1100–1106.
- Chen, G., Huang, A. C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., Xia, H., Man, Q., Zhong, W., Antelo, L. F., Wu, B., Xiong, X., Liu, X., Guan, L., Li, T., ... Guo, W. (2018). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 560(7718), 382–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>
- Chen, W., Ren, X., Wu, J., Gao, X., Cen, X., Wang, S., Sheng, S., Chen, Q., Tang, Y., Liang, X., & Tang, Y. (2018). HSP 27 associates with epithelial-mesenchymal transition, stemness and radioresistance of salivary adenoid cystic carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(4), 2283–2298. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13510>
- Cheng, X., & Cheng, K. (2021). Visualizing cancer extravasation: From mechanistic studies to drug development. *Cancer and Metastasis Reviews*, 40(1), 71–88. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09942-2>
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 333–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
- Choi, S. Y. C., Collins, C. C., Gout, P. W., & Wang, Y. (2013). Cancer-generated lactic acid: A regulatory, immunosuppressive metabolite? *The Journal of Pathology*, 230(4), 350–355. <https://doi.org/10.1002/path.4218>
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79(1), 13–21. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90396-4)
- Clift, D., McEwan, W. A., Labzin, L. I., Konieczny, V., Mogessie, B., James, L. C., & Schuh, M. (2017). A Method for the Acute and Rapid Degradation of Endogenous Proteins. *Cell*, 171(7), 1692–1706.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.033>
- Clift, D., So, C., McEwan, W. A., James, L. C., & Schuh, M. (2018). Acute and rapid degradation of endogenous proteins by Trim-Away. *Nature Protocols*, 13(10), 2149–2175. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0028-3>
- Cotton, A. D., Nguyen, D. P., Gramespacher, J. A., Seiple, I. B., & Wells, J. A. (2021). Development of Antibody-Based PROTACs for the Degradation of the Cell-Surface Immune Checkpoint Protein PD-L1. *Journal of the American Chemical Society*, 143(2), 593–598. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c10008>

- Courtney, P. T., Yip, A. T., Cherry, D. R., Salans, M. A., Kumar, A., & Murphy, J. D. (2021). Cost-effectiveness of Nivolumab-Ipilimumab Combination Therapy for the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Network Open*, 4(5), e218787. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.8787>
- Coutinho, M. F., Prata, M. J., & Alves, S. (2012). A shortcut to the lysosome: The mannose-6-phosphate-independent pathway. *Molecular Genetics and Metabolism*, 107(3), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.07.012>
- Cózar, B., Greppi, M., Carpentier, S., Narni-Mancinelli, E., Chiossone, L., & Vivier, E. (2021). Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells. *Cancer Discovery*, 11(1), 34–44. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0655>
- Criss, S. D., Mooradian, M. J., Watson, T. R., Gainor, J. F., Reynolds, K. L., & Kong, C. Y. (2019). Cost-effectiveness of Atezolizumab Combination Therapy for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer in the United States. *JAMA Network Open*, 2(9), e1911952. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.11952>
- Cubillos-Rojas, M., Loren, G., Hakim, Y. Z., Verdaguer, X., Riera, A., & Nebreda, A. R. (2023). Synthesis and Biological Activity of a VHL-Based PROTAC Specific for p38 α . *Cancers*, 15(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cancers15030611>
- Daassi, D., Mahoney, K. M., & Freeman, G. J. (2020). The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. *Nature Reviews Immunology*, 20(4), 209–215. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0264-y>
- Darnell, J. E., Kerr, L. M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science*, 264(5164), 1415–1421. <https://doi.org/10.1126/science.8197455>
- Das, J. K., Xiong, X., Ren, X., Yang, J.-M., & Song, J. (2019). Heat Shock Proteins in Cancer Immunotherapy. *Journal of Oncology*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/3267207>
- Daurat, M., Gauthier, C., El Cheikh, K., Ali, L. M. A., Morère, E., Bettache, N., Gary-Bobo, M., Morère, A., Garcia, M., Maynadier, M., & Basile, I. (2024). Engineered therapeutic antibodies with mannose 6-phosphate analogues as a tool to degrade extracellular proteins. *Frontiers in Immunology*, 15, 1273280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1273280>
- Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C., & Forbes, B. E. (2005). Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(4–5), 421–439. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.04.004>
- Detjen, K. M., Farwig, K., Welzel, M., Wiedenmann, B., & Rosewicz, S. (2001). Interferon γ inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis. *Gut*, 49(2), 251–262. <https://doi.org/10.1136/gut.49.2.251>
- Ding, Y., Fei, Y., & Lu, B. (2020). Emerging New Concepts of Degradation Technologies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(7), 464–474. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.04.005>
- Dutta, S., Ganguly, A., Chatterjee, K., Spada, S., & Mukherjee, S. (2023). Targets of Immune Escape Mechanisms in Cancer: Basis for Development and Evolution of Cancer Immune Checkpoint Inhibitors. *Biology*, 12(2), 218. <https://doi.org/10.3390/biology12020218>
- Fanelli, G. N., Naccarato, A. G., & Scatena, C. (2020). Recent Advances in Cancer Plasticity: Cellular Mechanisms, Surveillance Strategies, and Therapeutic Optimization. *Frontiers in Oncology*, 10, 569. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00569>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fife, C. M., McCarroll, J. A., & Kavallaris, M. (2014). Movers and shakers: Cell cytoskeleton in cancer metastasis. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), 5507–5523. <https://doi.org/10.1111/bph.12704>
- Folkman, J., & Kalluri, R. (2004). Cancer without disease. *Nature*, 427(6977), 787–787. <https://doi.org/10.1038/427787a>
- Foulstone, E., Prince, S., Zaccheo, O., Burns, J., Harper, J., Jacobs, C., Church, D., & Hassan, A. (2005). Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *The Journal of Pathology*, 205(2), 145–153. <https://doi.org/10.1002/path.1712>
- Fu, Y., & Lu, B. (2021). Targeting lipid droplets for autophagic degradation by ATTEC. *Autophagy*, 17(12), 4486–4488. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1967616>
- Galluzzi, L., Humeau, J., Buqué, A., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2020). Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(12), 725–741.

- <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0413-z>
- Gao, J., Shi, L. Z., Zhao, H., Chen, J., Xiong, L., He, Q., Chen, T., Roszik, J., Bernatchez, C., Woodman, S. E., Chen, P.-L., Hwu, P., Allison, J. P., Futreal, A., Wargo, J. A., & Sharma, P. (2016). Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell*, 167(2), 397-404.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.069>
- Garrido, F., & Aptsiauri, N. (2019). Cancer immune escape: MHC expression in primary tumours versus metastases. *Immunology*, 158(4), 255-266. <https://doi.org/10.1111/imm.13114>
- Ghosh, P., Dahms, N. M., & Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: New twists in the tale. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(3), 202-213. <https://doi.org/10.1038/nrm1050>
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
- Greenlund, A. C., Morales, M. O., Viviano, B. L., Yan, H., Krolewski, J., & Schreiber, R. D. (1995). Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: An ordered reversible affinity-driven process. *Immunity*, 2(6), 677-687. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90012-8](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90012-8)
- Grimme, S., Hönig, S., Von Figura, K., & Schmidt, B. (2000). Endocytosis of Insulin-like Growth Factor II by a Mini-receptor Based on Repeat 11 of the Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33697-33703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003789200>
- Guevara-Aguirre, J., Balasubramanian, P., Guevara-Aguirre, M., Wei, M., Madia, F., Cheng, C.-W., Hwang, D., Martin-Montalvo, A., Saavedra, J., Ingles, S., De Cabo, R., Cohen, P., & Longo, V. D. (2011). Growth Hormone Receptor Deficiency Is Associated with a Major Reduction in Pro-Aging Signaling, Cancer, and Diabetes in Humans. *Science Translational Medicine*, 3(70). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001845>
- Gupta, P. B., Pastushenko, I., Skibinski, A., Blanpain, C., & Kuperwasser, C. (2019). Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell*, 24(1), 65-78. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.011>
- Hamada, K., Hashimoto, T., Iwashita, R., Yamada, Y., Kikkawa, Y., & Nomizu, M. (2023). Development of a bispecific DNA-aptamer-based lysosome-targeting chimera for HER2 protein degradation. *Cell Reports Physical Science*, 4(3), 101296. <https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2023.101296>
- Hao, X., Chen, Z., Li, H., Wei, M., Zuo, Z., & Su, Q. (2023). Small-Molecule Drugs in Immunotherapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 23(13), 1341-1359. <https://doi.org/10.2174/1389557522666220930154527>
- Hargadon, K. M., Johnson, C. E., & Williams, C. J. (2018). Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *International Immunopharmacology*, 62, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.001>
- Haslam, A., & Prasad, V. (2019). Estimation of the Percentage of US Patients With Cancer Who Are Eligible for and Respond to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Drugs. *JAMA Network Open*, 2(5), e192535. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.2535>
- Hassan, A. B., & Howell, J. A. (2000). Insulin-like growth factor II supply modifies growth of intestinal adenoma in Apc(Min/+) mice. *Cancer Research*, 60(4), 1070-1076.
- Heng, H. H. Q., Stevens, J. B., Bremer, S. W., Ye, K. J., Liu, G., & Ye, C. J. (2010). The evolutionary mechanism of cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(6), 1072-1084. <https://doi.org/10.1002/jcb.22497>
- Herber, D. L., Cao, W., Nefedova, Y., Novitskiy, S. V., Nagaraj, S., Tyurin, V. A., Corzo, A., Cho, H.-I., Celis, E., Lennox, B., Knight, S. C., Padhya, T., McCaffrey, T. V., McCaffrey, J. C., Antonia, S., Fishman, M., Ferris, R. L., Kagan, V. E., & Gabrilovich, D. I. (2010). Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nature Medicine*, 16(8), 880-886. <https://doi.org/10.1038/nm.2172>
- Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J., & Halloran, P. F. (1997). IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo. *The Journal of Immunology*, 158(9), 4260-4269. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.158.9.4260>
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., Van Den Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., ... Urba, W. J. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(8), 711-723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- Holle, A. W., Govindan Kutty Devi, N., Clar, K., Fan, A., Saif, T., Kemkemer, R., & Spatz, J. P. (2019). Cancer Cells Invade Confined Microchannels via a Self-Directed Mesenchymal-to-Amoeboid Transition. *Nano Letters*, 19(4), 2280-2290. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b04720>
- Howell, R. A., Wang, S., Khambete, M., McDonald, D. M., & Spiegel, D. A. (2024). Bifunctional Molecules That Induce

- Both Targeted Degradation and Transcytosis of Extracellular Proteins in Brain Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 146(24), 16404–16411. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c13320>
- Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: From bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 402. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>
- Huang, B., Abedi, M., Ahn, G., Coventry, B., Sappington, I., Wang, R., Schlichthaerle, T., Zhang, J. Z., Wang, Y., Goresnik, I., Chiu, C. W., Chazin-Gray, A., Chan, S., Gerben, S., Murray, A., Wang, S., O'Neill, J., Yeh, R., Misquith, A., ... Baker, D. (2023). *Designed Endocytosis-Triggering Proteins mediate Targeted Degradation*. <https://doi.org/10.1101/2023.08.19.553321>
- Huang, P.-S., Ban, Y.-E. A., Richter, F., Andre, I., Vernon, R., Schief, W. R., & Baker, D. (2011). RosettaRemodel: A Generalized Framework for Flexible Backbone Protein Design. *PLoS ONE*, 6(8), e24109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024109>
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., & Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(23), 2335–2342. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691>
- Ishizuka, J. J., Manguso, R. T., Cheruiyot, C. K., Bi, K., Panda, A., Iracheta-Vellve, A., Miller, B. C., Du, P. P., Yates, K. B., Dubrot, J., Buchumenski, I., Comstock, D. E., Brown, F. D., Ayer, A., Kohnle, I. C., Pope, H. W., Zimmer, M. D., Sen, D. R., Lane-Reticker, S. K., ... Haining, W. N. (2019). Loss of ADAR1 in tumours overcomes resistance to immune checkpoint blockade. *Nature*, 565(7737), 43–48. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0768-9>
- Itoh, Y., Ishikawa, M., Naito, M., & Hashimoto, Y. (2010). Protein Knockdown Using Methyl Bestatin-Ligand Hybrid Molecules: Design and Synthesis of Inducers of Ubiquitination-Mediated Degradation of Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 132(16), 5820–5826. <https://doi.org/10.1021/ja100691p>
- Ji, C. H., Kim, H. Y., Lee, M. J., Heo, A. J., Park, D. Y., Lim, S., Shin, S., Ganipiseti, S., Yang, W. S., Jung, C. A., Kim, K. Y., Jeong, E. H., Park, S. H., Bin Kim, S., Lee, S. J., Na, J. E., Kang, J. I., Chi, H. M., Kim, H. T., ... Kwon, Y. T. (2022). The AUTOTAC chemical biology platform for targeted protein degradation via the autophagy-lysosome system. *Nature Communications*, 13(1), 904. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28520-4>
- Kelly, M., McNeel, D., Fisch, P., & Malkovsky, M. (2018). Immunological considerations underlying heat shock protein-mediated cancer vaccine strategies. *Immunology Letters*, 193, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.11.001>
- Khan, O., Giles, J. R., McDonald, S., Manne, S., Ngiew, S. F., Patel, K. P., Werner, M. T., Huang, A. C., Alexander, K. A., Wu, J. E., Attanasio, J., Yan, P., George, S. M., Bengsch, B., Staup, R. P., Donahue, G., Xu, W., Amaravadi, R. K., Xu, X., ... Wherry, E. J. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature*, 571(7764), 211–218. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1325-x>
- Kidman, J., Zemek, R. M., Sidhom, J.-W., Correa, D., Principe, N., Sheikh, F., Fear, V. S., Forbes, C. A., Chopra, A., Boon, L., Zaitouny, A., De Jong, E., Holt, R. A., Jones, M., Millward, M. J., Lassmann, T., Forrest, A. R. R., Nowak, A. K., Watson, M., ... Chee, J. (2024). Immune checkpoint therapy responders display early clonal expansion of tumor infiltrating lymphocytes. *Oncot Immunology*, 13(1), 2345859. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2024.2345859>
- Klaus, T., & Deshmukh, S. (2021). pH-responsive antibodies for therapeutic applications. *Journal of Biomedical Science*, 28(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00709-7>
- Klein, C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 302–312. <https://doi.org/10.1038/nrc2627>
- Knee, D. A., Hewes, B., & Brogdon, J. L. (2016). Rationale for anti-GITR cancer immunotherapy. *European Journal of Cancer*, 67, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.06.028>
- Komatsu, M., & Ichimura, Y. (2010). MBSJ MCC Young Scientist Award 2009 REVIEW: Selective autophagy regulates various cellular functions. *Genes to Cells*, 15(9), 923–933. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01433.x>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Kalagasidou, S., Pagkalos, A., Alatzidou, D., Kantari, P., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2021). Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, 26(5), 1723–1734.
- Kraehenbuehl, L., Weng, C.-H., Eghbali, S., Wolchok, J. D., & Merghoub, T. (2022). Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(1), 37–50. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00552-7>
- Kröger, C., Afeyan, A., Mraz, J., Eaton, E. N., Reinhardt, F., Khodor, Y. L., Thiru, P., Bieri, B., Ye, X., Burge, C. B., & Weinberg, R. A. (2019). Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(15), 7353–7362.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1812876116>
- Kuczynski, E. A., Vermeulen, P. B., Pezzella, F., Kerbel, R. S., & Reynolds, A. R. (2019). Vessel co-option in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(8), 469–493. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0181-9>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Luber, B. S., Wong, F., Azad, N. S., Rucki, A. A., Laheru, D., Donehower, R., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., ... Diaz, L. A. (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*, 357(6349), 409–413. <https://doi.org/10.1126/science.aan6733>
- Leaver-Fay, A., Tyka, M., Lewis, S. M., Lange, O. F., Thompson, J., Jacak, R., Kaufman, K. W., Renfrew, P. D., Smith, C. A., Sheffler, W., Davis, I. W., Cooper, S., Treuille, A., Mandell, D. J., Richter, F., Ban, Y.-E. A., Fleishman, S. J., Corn, J. E., Kim, D. E., ... Bradley, P. (2011). Rosetta3. *W Methods in Enzymology* (T. 487, s. 545–574). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381270-4.00019-6>
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>
- Li, K., & Tian, H. (2019). Development of small-molecule immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1 as a new therapeutic strategy for tumour immunotherapy. *Journal of Drug Targeting*, 27(3), 244–256. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1440400>
- Li, Y., Li, X., Yu, L., Huang, X., Wang, X., Han, D., Yang, Y., & Liu, Z. (2023). Covalent LYTAC Enabled by DNA Aptamers for Immune Checkpoint Degradation Therapy. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c03899>
- Li, Z., Wang, C., Wang, Z., Zhu, C., Li, J., Sha, T., Ma, L., Gao, C., Yang, Y., Sun, Y., Wang, J., Sun, X., Lu, C., Difiglia, M., Mei, Y., Ding, C., Luo, S., Dang, Y., Ding, Y., ... Lu, B. (2019). Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds. *Nature*, 575(7781), 203–209. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1722-1>
- Li, Z., Zhu, C., Ding, Y., Fei, Y., & Lu, B. (2020). ATTEC: A potential new approach to target proteinopathies. *Autophagy*, 16(1), 185–187. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1688556>
- Liao, X., Qin, G., Liu, Z., Ren, J., & Qu, X. (2024). Bioorthogonal Aptamer-ATTEC Conjugates for Degradation of Alpha-Synuclein via Autophagy-Lysosomal Pathway. *Small*, 20(8), 2306760. <https://doi.org/10.1002/sml.202306760>
- Long, M. J. C., Gollapalli, D. R., & Hedstrom, L. (2012). Inhibitor Mediated Protein Degradation. *Chemistry & Biology*, 19(5), 629–637. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.04.008>
- Loose, D., & Van De Wiele, C. (2009). The Immune System and Cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 24(3), 369–376. <https://doi.org/10.1089/cbr.2008.0593>
- Loppinet, E., Besser, H. A., Lee, C., Zhang, W., Cui, B., & Khosla, C. (2023). Targeted Lysosomal Degradation of Secreted and Cell Surface Proteins through the LRP-1 Pathway. *Journal of the American Chemical Society*, 145(34), 18705–18710. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c05109>
- Ludwig, T., Eggenschwiler, J., Fisher, P., D'Ercole, A. J., Davenport, M. L., & Efstratiadis, A. (1996). Mouse Mutants Lacking the Type 2 IGF Receptor (IGF2R) Are Rescued from Perinatal Lethality in Igf2 and Igf1r Null Backgrounds. *Developmental Biology*, 177(2), 517–535. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0182>
- Lugano, R., Ramachandran, M., & Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: Causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(9), 1745–1770. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>
- Lutskovich, D., Meleshko, A., & Katsin, M. (2024). State of the art and perspectives of CAR-T cell therapy for neuroblastoma. *Cytotherapy*, S1465324924007187. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.05.011>
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., & Groom, A. C. (1998). Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. *The American Journal of Pathology*, 153(3), 865–873. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65628-3)
- Lynch, T. J., Bondarenko, I., Luft, A., Serwatowski, P., Barlesi, F., Chacko, R., Sebastian, M., Neal, J., Lu, H., Cuillerot, J.-M., & Reck, M. (2012). Ipilimumab in Combination With Paclitaxel and Carboplatin As First-Line Treatment in Stage IIIB/IV Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From a Randomized, Double-Blind, Multicenter Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(17), 2046–2054. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.4032>
- Ma, X., Zhang, Y., Wang, S., Wei, H., & Yu, J. (2021). Immune checkpoint inhibitor (ICI) combination therapy compared to monotherapy in advanced solid cancer: A systematic review. *Journal of Cancer*, 12(5), 1318–1333. <https://doi.org/10.7150/jca.49174>

- Marei, H., Tsai, W.-T. K., Kee, Y.-S., Ruiz, K., He, J., Cox, C., Sun, T., Penikalapati, S., Dwivedi, P., Choi, M., Kan, D., Saenz-Lopez, P., Dorigi, K., Zhang, P., Kschonsak, Y. T., Kljavin, N., Amin, D., Kim, I., Mancini, A. G., ... de Sousa e Melo, F. (2022). Antibody targeting of E3 ubiquitin ligases for receptor degradation. *Nature*, 610(7930), 182–189. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05235-6>
- Markham, A., & Duggan, S. (2018). Cemiplimab: First Global Approval. *Drugs*, 78(17), 1841–1846. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1012-5>
- McCarthy, E. F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa Orthopaedic Journal*, 26, 154–158.
- Meissner, T. B., Li, A., Biswas, A., Lee, K.-H., Liu, Y.-J., Bayir, E., Iliopoulos, D., Van Den Elsen, P. J., & Kobayashi, K. S. (2010). NLR family member NLR5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13794–13799. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008684107>
- Mellor, A. L., Munn, D., Chandler, P., Keskin, D., Johnson, T., Marshall, B., Jhaver, K., & Baban, B. (2003). Tryptophan Catabolism and T Cell Responses. W G. Allegri, C. V. L. Costa, E. Ragazzi, H. Steinhart, & L. Varesio (Red.), *Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism* (T. 527, s. 27–35). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0_3
- Meyer, M. A., Baer, J. M., Knolhoff, B. L., Nywening, T. M., Panni, R. Z., Su, X., Weilbaecher, K. N., Hawkins, W. G., Ma, C., Fields, R. C., Linehan, D. C., Challen, G. A., Faccio, R., Aft, R. L., & DeNardo, D. G. (2018). Breast and pancreatic cancer interrupt IRF8-dependent dendritic cell development to overcome immune surveillance. *Nature Communications*, 9(1), 1250. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03600-6>
- Miao, Y., Gao, Q., Mao, M., Zhang, C., Yang, L., Yang, Y., & Han, D. (2021). Bispecific Aptamer Chimeras Enable Targeted Protein Degradation on Cell Membranes. *Angewandte Chemie*, 133(20), 11367–11371. <https://doi.org/10.1002/ange.202102170>
- Middha, S., Yaeger, R., Shia, J., Stadler, Z. K., King, S., Guercio, S., Paroder, V., Bates, D. D. B., Rana, S., Diaz, L. A., Saltz, L., Segal, N., Ladanyi, M., Zehir, A., & Hechtman, J. F. (2019). Majority of B2M⁻ Mutant and -Deficient Colorectal Carcinomas Achieve Clinical Benefit From Immune Checkpoint Inhibitor Therapy and Are Microsatellite Instability-High. *JCO Precision Oncology*, 3, 1–14. <https://doi.org/10.1200/PO.18.00321>
- Mikitiuk, M., Barczyński, J., Bielski, P., Arciniega, M., Tyrcha, U., Hec, A., Lipińska, A. D., Rychłowski, M., Holak, T. A., & Sitar, T. (2023). IGF2 Peptide-Based LYTACs for Targeted Degradation of Extracellular and Transmembrane Proteins. *Molecules*, 28(22), 7519. <https://doi.org/10.3390/molecules28227519>
- Mitra, A., Kumar, A., Amdare, N. P., & Pathak, R. (2024). Current Landscape of Cancer Immunotherapy: Harnessing the Immune Arsenal to Overcome Immune Evasion. *Biology*, 13(5), 307. <https://doi.org/10.3390/biology13050307>
- Mizukoshi, K., Okazawa, Y., Haeno, H., Koyama, Y., Sulidan, K., Komiyama, H., Saeki, H., Ohtsuji, N., Ito, Y., Kojima, Y., Goto, M., Habu, S., Hino, O., Sakamoto, K., & Orimo, A. (2020). Metastatic seeding of human colon cancer cell clusters expressing the hybrid epithelial/mesenchymal state. *International Journal of Cancer*, 146(9), 2547–2562. <https://doi.org/10.1002/ijc.32672>
- Morgan, D. O., Edman, J. C., Standring, D. N., Fried, V. A., Smith, M. C., Roth, R. A., & Rutter, W. J. (1987). Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature*, 329(6137), 301–307. <https://doi.org/10.1038/329301a0>
- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2016). IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends in Immunology*, 37(3), 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.002>
- Naito, M., Ohoka, N., & Shibata, N. (2019). SNIPERs—Hijacking IAP activity to induce protein degradation. *Drug Discovery Today: Technologies*, 31, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.12.002>
- Neklesa, T. K., Tae, H. S., Schneekloth, A. R., Stulberg, M. J., Corson, T. W., Sundberg, T. B., Raina, K., Holley, S. A., & Crews, C. M. (2011). Small-molecule hydrophobic tagging-induced degradation of HaloTag fusion proteins. *Nature Chemical Biology*, 7(8), 538–543. <https://doi.org/10.1038/nchembio.597>
- Nivón, L. G., Moretti, R., & Baker, D. (2013). A Pareto-Optimal Refinement Method for Protein Design Scaffolds. *PLoS ONE*, 8(4), e59004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059004>
- Pan, K., Farrukh, H., Chittepu, V. C. S. R., Xu, H., Pan, C., & Zhu, Z. (2022). CAR race to cancer immunotherapy: From CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02327-z>
- Pan, Y., Xiang, Q., Deng, K., Anwar, M., Wang, L., Wang, Y., Liang, Q., Shen, L., Yang, J., & Shen, W. (2024). An Engineered IGF2 Mutant for Lysosomal Targeting Chimeras Development and Membrane Proteins Degradation. <https://doi.org/10.1101/2024.02.20.581320>
- Pance, K., Gramespacher, J. A., Byrnes, J. R., Salangsang, F., Serrano, J.-A. C., Cotton, A. D., Steri, V., & Wells, J. A. (2023). Modular cytokine receptor-targeting chimeras for targeted degradation of cell surface and extracellular

- proteins. *Nature Biotechnology*, 41(2), 273–281. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01456-2>
- Park, R., Lopes, L., Cristancho, C. R., Riano, I. M., & Saeed, A. (2020). Treatment-Related Adverse Events of Combination Immune Checkpoint Inhibitors: Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*, 10, 258. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00258>
- Paz-Ares, L., Langer, C. J., Novello, S., Halmos, B., Cheng, Y., Gadgeel, S. M., Hui, R., Sugawara, S., Borghaei, H., Cristescu, R., Aurora-Garg, D., Albright, A., Loboda, A., Kobie, J., Lunceford, J., Ayers, M., Lubiniecki, G. M., Pietanza, M. C., Piperdi, B., & Garassino, M. C. (2019). Pembrolizumab (pembro) plus platinum-based chemotherapy (chemo) for metastatic NSCLC: Tissue TMB (tTMB) and outcomes in KEYNOTE-021, 189, and 407. *Annals of Oncology*, 30, v917–v918. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz394.078>
- Pei, J., Pan, X., Wang, A., Shuai, W., Bu, F., Tang, P., Zhang, S., Zhang, Y., Wang, G., & Ouyang, L. (2021). Developing potent LC3-targeting AUTAC tools for protein degradation with selective autophagy. *Chemical Communications*, 57(97), 13194–13197. <https://doi.org/10.1039/D1CC04661F>
- Petrylak, D. P., Gao, X., Vogelzang, N. J., Garfield, M. H., Taylor, I., Dougan Moore, M., Peck, R. A., & Burris, H. A. (2020). First-in-human phase I study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader in patients (pts) with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) following enzalutamide (ENZ) and/or abiraterone (ABI). *Journal of Clinical Oncology*, 38(15_suppl), 3500–3500. https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.3500
- Poggio, M., Hu, T., Pai, C.-C., Chu, B., Belair, C. D., Chang, A., Montabana, E., Lang, U. E., Fu, Q., Fong, L., & Blleloch, R. (2019). Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell*, 177(2), 414–427.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.016>
- Pradeep, J., Win, T. T., Aye, S. N., & Sreeramareddy, C. T. (2022). Efficacy and Safety of Immune Checkpoint Inhibitors for Advanced Malignant Melanoma: A Meta-Analysis on Monotherapy Vs Combination Therapy. *Journal of Cancer*, 13(10), 3091–3102. <https://doi.org/10.7150/jca.72210>
- Prasad, V., Kaestner, V., & Mailankody, S. (2018). Cancer Drugs Approved Based on Biomarkers and Not Tumor Type—FDA Approval of Pembrolizumab for Mismatch Repair-Deficient Solid Cancers. *JAMA Oncology*, 4(2), 157. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4182>
- Puri, S., & Shafique, M. (2020). Combination checkpoint inhibitors for treatment of non-small-cell lung cancer: An update on dual anti-CTLA-4 and anti-PD-1/PD-L1 therapies. *Drugs in Context*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.7573/dic.2019-9-2>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Rohrer, J., & Kornfeld, R. (2001). Lysosomal Hydrolase Mannose 6-Phosphate Uncovering Enzyme Resides in the trans -Golgi Network. *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), 1623–1631. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.6.1623>
- Rotte, A., Jin, J. Y., & Lemaire, V. (2018). Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. *Annals of Oncology*, 29(1), 71–83. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx686>
- Sahu, I., Mali, S. M., Sulkshane, P., Xu, C., Rozenberg, A., Morag, R., Sahoo, M. P., Singh, S. K., Ding, Z., Wang, Y., Day, S., Cong, Y., Kleinfeld, O., Brik, A., & Glickman, M. H. (2021). The 20S as a stand-alone proteasome in cells can degrade the ubiquitin tag. *Nature Communications*, 12(1), 6173. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26427-0>
- Sakamoto, K. M., Kim, K. B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C. M., & Deshaies, R. J. (2001). Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8554–8559. <https://doi.org/10.1073/pnas.141230798>
- Samstein, R. M., Lee, C.-H., Shoushtari, A. N., Hellmann, M. D., Shen, R., Janjigian, Y. Y., Barron, D. A., Zehir, A., Jordan, E. J., Omuro, A., Kaley, T. J., Kendall, S. M., Motzer, R. J., Hakimi, A. A., Voss, M. H., Russo, P., Rosenberg, J., Iyer, G., Bochner, B. H., ... Morris, L. G. T. (2019). Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nature Genetics*, 51(2), 202–206. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0312-8>
- Santucci, C., Carioli, G., Bertuccio, P., Malvezzi, M., Pastorino, U., Boffetta, P., Negri, E., Bosetti, C., & La Vecchia, C. (2020). Progress in cancer mortality, incidence, and survival: A global overview. *European Journal of Cancer Prevention*, 29(5), 367–381. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000594>
- Sawa, T., Zaki, M. H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., & Akaike, T. (2007). Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nature Chemical Biology*, 3(11), 727–735. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.33>
- Schaller, J., & Agudo, J. (2020). Metastatic Colonization: Escaping Immune Surveillance. *Cancers*, 12(11), 3385. <https://doi.org/10.3390/cancers12113385>

- Scherer, K., Spoerl, D., & Bircher, A. J. (2010). Adverse drug reactions to biologics. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 8(6), 411–426. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2010.07339.x>
- Schmidt, B., Kiecke-Siensen, C., Waheed, A., Bräulke, T., & Von Figura, K. (1995). Localization of the Insulin-like Growth Factor II Binding Site to Amino Acids 1508–1566 in Repeat 11 of the Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270(25), 14975–14982. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.14975>
- Schmidts, A., Wehrli, M., & Maus, M. V. (2021). Toward Better Understanding and Management of CAR-T Cell-Associated Toxicity. *Annual Review of Medicine*, 72(1), 365–382. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-061119-015600>
- Schrörs, B., Lübcke, S., Lennerz, V., Fatho, M., Bicker, A., Wölfel, C., Derigs, P., Hankeln, T., Schadendorf, D., Paschen, A., & Wölfel, T. (2017). HLA class I loss in metachronous metastases prevents continuous T cell recognition of mutated neoantigens in a human melanoma model. *Oncotarget*, 8(17), 28312–28327. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16048>
- Scott, A. C., Dünder, F., Zumbo, P., Chandran, S. S., Klebanoff, C. A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S., Zamarin, D., Walther, T., Snyder, A., Femia, M. R., Comen, E. A., Wen, H. Y., Hellmann, M. D., Anandasabapathy, N., Liu, Y., ... Schietinger, A. (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature*, 571(7764), 270–274. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1324-y>
- Scott, C. D., & Firth, S. M. (2004). The Role of the M6P/IGF-II Receptor in Cancer: Tumor Suppression or Garbage Disposal? *Hormone and Metabolic Research*, 36(5), 261–271. <https://doi.org/10.1055/s-2004-814477>
- Sell, C., Dumenil, G., Deveaud, C., Miura, M., Coppola, D., Deangelis, T., Rubin, R., Efstratiadis, A., & Baserga, R. (1994). Effect of a Null Mutation of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor Gene on Growth and Transformation of Mouse Embryo Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 14(6), 3604–3612. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.6.3604-3612.1994>
- Seo, H., Chen, J., González-Avalos, E., Samaniego-Castruita, D., Das, A., Wang, Y. H., López-Moyado, I. F., Georges, R. O., Zhang, W., Onodera, A., Wu, C.-J., Lu, L.-F., Hogan, P. G., Bhandardia, A., & Rao, A. (2019). TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺ T cell exhaustion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(25), 12410–12415. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905675116>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006189–a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Sha, D., Jin, Z., Budczies, J., Kluck, K., Stenzinger, A., & Sinicrope, F. A. (2020). Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker in Solid Tumors. *Cancer Discovery*, 10(12), 1808–1825. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0522>
- Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z., Cao, Z. C., Chen, H. W., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C. J., & Tan, W. (2006). Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 11838–11843. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602615103>
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(4), 707–723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>
- Sica, G. L., Choi, I.-H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S.-D., Tamura, H., Chapoval, A. I., Flies, D. B., Bajorath, J., & Chen, L. (2003). B7-H4, a Molecule of the B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity. *Immunity*, 18(6), 849–861. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00152-3)
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J. M., Desrichard, A., Walsh, L. A., Postow, M. A., Wong, P., Ho, T. S., Hollmann, T. J., Bruggeman, C., Kannan, K., Li, Y., Elipenahli, C., Liu, C., Harbison, C. T., Wang, L., Ribas, A., ... Chan, T. A. (2014). Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 371(23), 2189–2199. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406498>
- Solinas, C., Gu-Trantien, C., & Willard-Gallo, K. (2020). The rationale behind targeting the ICOS-ICOS ligand costimulatory pathway in cancer immunotherapy. *ESMO Open*, 5(1), e000544. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000544>
- Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: Current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal*, 11(4), 69. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- Strell, C., & Entschladen, F. (2008). Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Communication and Signaling*, 6(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-6-10>
- Suh, W.-K., Gajewska, B. U., Okada, H., Gronski, M. A., Bertram, E. M., Dawicki, W., Duncan, G. S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., Wakeham, A., Itie, A., Chung, S., Da Costa, J., Arya, S., Horan, T., Campbell, P., Gaida, K., Ohashi,

- P. S., ... Mak, T. W. (2003). The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nature Immunology*, 4(9), 899–906. <https://doi.org/10.1038/ni967>
- Supek, F., Lehner, B., & Lindeboom, R. G. H. (2021). To NMD or Not To NMD: Nonsense-Mediated mRNA Decay in Cancer and Other Genetic Diseases. *Trends in Genetics*, 37(7), 657–668. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.11.002>
- Takahashi, D., Moriyama, J., Nakamura, T., Miki, E., Takahashi, E., Sato, A., Akaike, T., Itto-Nakama, K., & Arimoto, H. (2019). AUTACs: Cargo-Specific Degradors Using Selective Autophagy. *Molecular Cell*, 76(5), 797–810.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.009>
- Tan, S., Wang, D., Fu, Y., Zheng, H., Liu, Y., & Lu, B. (2023). Targeted clearance of mitochondria by an autophagy-tethering compound (ATTEC) and its potential therapeutic effects. *Science Bulletin*, 68(23), 3013–3026. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2023.10.021>
- Tian, Y., Miao, Y., Guo, P., Wang, J., & Han, D. (2024). Insulin-like Growth Factor 2-Tagged Aptamer Chimeras (ITACs) Modular Assembly for Targeted and Efficient Degradation of Two Membrane Proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 63(5), e202316089. <https://doi.org/10.1002/anie.202316089>
- Tihanyi, B., & Nyitray, L. (2020). Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies*, 38, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>
- Titford, M. (2010). Paul Ehrlich: Histological Staining, Immunology, Chemotherapy. *Laboratory Medicine*, 41(8), 497–498. <https://doi.org/10.1309/LMHJS86N5ICBIBWM>
- Tomasik, J., Jasiński, M., & Basak, G. W. (2022). Next generations of CAR-T cells—New therapeutic opportunities in hematology? *Frontiers in Immunology*, 13, 1034707. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1034707>
- Toretsky, J. A., & Helman, L. J. (1996). Involvement of IGF-II in human cancer. *Journal of Endocrinology*, 149(3), 367–372. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1490367>
- Valero, C., Lee, M., Hoen, D., Wang, J., Nadeem, Z., Patel, N., Postow, M. A., Shoushtari, A. N., Plitas, G., Balachandran, V. P., Smith, J. J., Crago, A. M., Long Roche, K. C., Kelly, D. W., Samstein, R. M., Rana, S., Ganly, I., Wong, R. J., Hakimi, A. A., ... Morris, L. G. T. (2021). The association between tumor mutational burden and prognosis is dependent on treatment context. *Nature Genetics*, 53(1), 11–15. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00752-4>
- Vatté, J., Bourdeau, V., Ferbeyre, G., & Schmitzer, A. (2024). Gaining Insight into Mitochondrial Targeting: AUTAC-Biquanide as an Anticancer Agent. <https://doi.org/10.20944/preprints202407.1193.v1>
- Verma, R., Foster, R. E., Horgan, K., Mounsey, K., Nixon, H., Smalle, N., Hughes, T. A., & Carter, C. Rd. (2016). Lymphocyte depletion and repopulation after chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Research*, 18(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0669-x>
- Vicente, A. T. S., & Salvador, J. A. R. (2022). MDM2-Based Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs): An Innovative Drug Strategy for Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms231911068>
- Villalba, M., Rathore, M. G., Lopez-Royuela, N., Krzywinska, E., Garaude, J., & Allende-Vega, N. (2013). From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(1), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.024>
- Vinay, D. S., & Kwon, B. S. (2012). Immunotherapy of Cancer with 4-1BB. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(5), 1062–1070. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0677>
- Vincent, K. J., & Zurini, M. (2012). Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates. *Biotechnology Journal*, 7(12), 1444–1450. <https://doi.org/10.1002/biot.201200250>
- Wang, R., Qi, X., Schmiede, P., Coutavas, E., & Li, X. (2020). Marked structural rearrangement of mannose 6-phosphate/IGF2 receptor at different pH environments. *Science Advances*, 6(7), eaaz1466. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1466>
- Wang, T., Cai, S., Cheng, Y., Zhang, W., Wang, M., Sun, H., Guo, B., Li, Z., Xiao, Y., & Jiang, S. (2022). Discovery of Small-Molecule Inhibitors of the PD-1/PD-L1 Axis That Promote PD-L1 Internalization and Degradation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(5), 3879–3893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01682>
- Wikman, H., Vessella, R., & Pantel, K. (2008). Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS*, 116(7–8), 754–770. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.01033.x>
- Wu, J., Jiang, J., Chen, B., Wang, K., Tang, Y., & Liang, X. (2021). Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Translational Oncology*, 14(1), 100899. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100899>
- Wu, Q., Jiang, L., Li, S., He, Q., Yang, B., & Cao, J. (2021). Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1

- signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0366-x>
- Wu, T. D., Madireddi, S., De Almeida, P. E., Banchereau, R., Chen, Y.-J. J., Chitre, A. S., Chiang, E. Y., Iftikhar, H., O’Gorman, W. E., Au-Yeung, A., Takahashi, C., Goldstein, L. D., Poon, C., Keerthivasan, S., De Almeida Nagata, D. E., Du, X., Lee, H.-M., Banta, K. L., Mariathasan, S., ... Grogan, J. L. (2020). Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature*, 579(7798), 274–278. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2056-8>
- Wu, Y., Lin, B., Lu, Y., Li, L., Deng, K., Zhang, S., Zhang, H., Yang, C., & Zhu, Z. (2023). Aptamer-LYTACs for Targeted Degradation of Extracellular and Membrane Proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 62(15), e202218106. <https://doi.org/10.1002/anie.202218106>
- Wumkes, M. L., Van Der Velden, A. M. T., Los, M., Leys, M. B. L., Beeker, A., Nijziel, M. R., Van Der Velden, A. W. G., Westerman, M., Meerveld-Eggink, A., Rimmelzwaan, G. F., Rijkers, G. T., & Biesma, D. H. (2013). Serum antibody response to influenza virus vaccination during chemotherapy treatment in adult patients with solid tumours. *Vaccine*, 31(52), 6177–6184. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.053>
- Xie, X., Yu, T., Li, X., Zhang, N., Foster, L. J., Peng, C., Huang, W., & He, G. (2023). Recent advances in targeting the “undruggable” proteins: From drug discovery to clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 335. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01589-z>
- Yang, J. L., Yamada-Hunter, S. A., Labanieh, L., Sotillo, E., Cheah, J. S., Roberts, D. S., Mackall, C. L., Bertozzi, C. R., & Ting, A. Y. (2024). Directed evolution of genetically encoded LYTCs for cell-mediated delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(13), e2320053121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2320053121>
- Yarchoan, M., Hopkins, A., & Jaffee, E. M. (2017). Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *New England Journal of Medicine*, 377(25), 2500–2501. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1713444>
- Yeku, O. O., & Brentjens, R. J. (2016). Armored CAR T-cells: Utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochemical Society Transactions*, 44(2), 412–418. <https://doi.org/10.1042/BST20150291>
- Yin, Z., Yu, M., Ma, T., Zhang, C., Huang, S., Karimzadeh, M. R., Momtazi-Borojeni, A. A., & Chen, S. (2021). Mechanisms underlying low-clinical responses to PD-1/PD-L1 blocking antibodies in immunotherapy of cancer: A key role of exosomal PD-L1. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 9(1), e001698. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001698>
- Yu, J., Li, H., Tong, F., Yun, C., Xue, L., Xu, J., Jiang, X., & Cai, X. (2023). Harnessing the Lysosomal Sorting Signals of the Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor for Targeted Degradation of Membrane Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 145(34), 19107–19119. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c07687>
- Zak, K. M., Kitel, R., Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2015). Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure*, 23(12), 2341–2348. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.010>
- Zamarin, D., & Postow, M. A. (2015). Immune checkpoint modulation: Rational design of combination strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, 150, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.003>
- Zaretsky, J. M., Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Torrejon, D. Y., Abril-Rodriguez, G., Sandoval, S., Barthly, L., Saco, J., Homet Moreno, B., Mezzadra, R., Chmielowski, B., Ruchalski, K., Shintaku, I. P., Sanchez, P. J., Puig-Saus, C., Cherry, G., ... Ribas, A. (2016). Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 375(9), 819–829. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1604958>
- Zarganes-Tzitzikas, T., Konstantinidou, M., Gao, Y., Krzemien, D., Zak, K., Dubin, G., Holak, T. A., & Dömling, A. (2016). Inhibitors of programmed cell death 1 (PD-1): A patent review (2010–2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(9), 973–977. <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1206527>
- Zhang, B., Brahma, R. K., Zhu, L., Feng, J., Hu, S., Qian, L., Du, S., Yao, S. Q., & Ge, J. (2023). Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2)-Fused Lysosomal Targeting Chimeras for Degradation of Extracellular and Membrane Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 145(44), 24272–24283. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c08886>
- Zhang, D., Jhoely Duque-Jimenez, Garyk Bixi, Facchinetti, F., Rhee, K., Feng, W. W., Jänne, P. A., & Zhou, X. (2023). Transferrin Receptor Targeting Chimeras (TransTACs) for Membrane Protein Degradation. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.08.10.552782>
- Zhang, H., Han, Y., Yang, Y., Lin, F., Li, K., Kong, L., Liu, H., Dang, Y., Lin, J., & Chen, P. R. (2021). Covalently Engineered Nanobody Chimeras for Targeted Membrane Protein Degradation. *Journal of the American Chemical Society*, 143(40), 16377–16382. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c08521>
- Zhang, W., He, X.-J., Ma, Y.-Y., Wang, H.-J., Xia, Y.-J., Zhao, Z.-S., Ye, Z.-Y., & Tao, H.-Q. (2011). Inducible nitric oxide synthase expression correlates with angiogenesis, lymphangiogenesis, and poor prognosis in gastric cancer patients. *Human Pathology*, 42(9), 1275–1282. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.09.020>

- Zhao, B., Zhao, H., & Zhao, J. (2020). Efficacy of PD-1/PD-L1 blockade monotherapy in clinical trials. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 12, 175883592093761. <https://doi.org/10.1177/1758835920937612>
- Zheng, J., He, W., Li, J. C., Feng, X., Li, Y., Cheng, B., Zhou, Y., Li, M., Liu, K., Shao, X., Zhang, J., Li, H., Chen, L., & Fang, L. (2022). Bifunctional Compounds as Molecular Degraders for Integrin-Facilitated Targeted Protein Degradation. *Journal of the American Chemical Society*, 144(48), 21831–21836. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c08367>
- Zheng, N., & Shabek, N. (2017). Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 129–157. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014922>
- Zhou, Y., Teng, P., Montgomery, N. T., Li, X., & Tang, W. (2021). Development of Triantennary N-Acetylgalactosamine Conjugates as Degraders for Extracellular Proteins. *ACS Central Science*, 7(3), 499–506. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00146>
- Zhu, C., Wang, W., Wang, Y., Zhang, Y., & Li, J. (2023). Dendronized DNA Chimeras Harness Scavenger Receptors To Degrade Cell Membrane Proteins. *Angewandte Chemie*, 62(13), e202300694. <https://doi.org/10.1002/anie.202300694>
- Zhu, G., & Chen, X. (2018). Aptamer-based targeted therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 134, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.005>

12. SPIS RYCIN

Rycina 1 Schemat cyklu komórkowego (opracowanie własne).....	13
Rycina 2 Schematyczne przedstawienie kolejnych generacji CAR-T. Opracowane na podstawie (Lutskovich i in., 2024) i (Yeku & Brentjens, 2016).	27
Rycina 3 Schematyczne przedstawienie zasady działania cząsteczek LYTAC skierowanych na PD-L1 (opracowanie własne).....	38
Rycina 4 Schematyczne przedstawienie zasady działania warunkowej degradacji w obecności HER2 z wykorzystaniem EndoTags, na podstawie (Huang i in., 2023).....	41
Rycina 5 Układ domen w kompletnym konstrukcie asymetrycznych cząsteczek LYTAC C5MXA, opartych na kolejnych peptydach M1 – M5 (opracowanie własne).	63
Rycina 6 Układ domen w konstrukcie cząsteczki LYTAC C5M1B (opracowanie własne).	63
Rycina 7 Układ domen w kompletnym konstrukcie symetrycznej cząsteczki LYTAC C5M1S (opracowanie własne).	63
Rycina 8 Przegląd formatów zaprojektowanych cząsteczek bispecyficznych LYTAC (opracowanie własne).	64
Rycina 9 Analiza wyprodukowanych białek referencyjnych z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE.....	81
Rycina 10 Analiza wyprodukowanych peptydów wiążących IGF2R oraz dzikiego białka IGF2 z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE. Wszystkie analizowane konstrukty są chimeryczne, zawierają fragment IgG1 Fc.	81
Rycina 11 Analiza IGF1R-IgG1 Fc, IGF2R-His oraz IGF2R-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania.....	82
Rycina 12 Analiza IGF2-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania.....	82
Rycina 13 Analiza peptydu M1-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania z nałożonym standardem wielkości	83
Rycina 14 Analiza peptydu M2-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania	83
Rycina 15 Analiza peptydu M3-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania	84
Rycina 16 Analiza peptydu M4-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania	84
Rycina 17 Analiza peptydu M5-IgG1 Fc z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania.....	85
Rycina 18 Analiza przeciwciała C5 z wykorzystaniem analitycznej chromatografii wykluczania	85
Rycina 19 Określanie produktywności monoklonalnych linii produkcyjnych PD-L1-His-mCherry z wykorzystaniem analizy fluorescencji. A – wstępna analiza hodowli 3-dniowych; B – wstępna analiza hodowli 7-dniowych; C – finalna analiza hodowli 5-dniowych; D – finalna analiza hodowli 8-dniowych.....	86
Rycina 20 Wstępny screening siły oddziaływania przeciwciała referencyjnego (A1) oraz przeciwciał z biblioteki Receptor z celem molekularnym – PD-L1	87
Rycina 21 Określenie EC50 dla przeciwciał C1, C5 oraz referencyjnego przeciwciała A1 w teście ELISA	88

Rycina 22 Określenie zdolności przeciwciał C1, C5 oraz referencyjnego przeciwciała A1 do blokowania oddziaływania PD-1/PD-L1 w środowisku komórkowym.....	88
Rycina 23 Wstępny screening zakresu stężeń dla oddziaływania IGF2/IGF1R w teście ELISA.....	89
Rycina 24 Test wiązania peptydów M1 - M5 oraz referencyjnego białka IGF2 do IGF1R	90
Rycina 25 Test wiązania peptydów M1 - M5 oraz referencyjnego białka IGF2 do domeny 11 IGF2R.....	90
Rycina 26 Analiza wyprodukowanych cząsteczek LYTAC z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE; warunki redukujące.....	91
Rycina 27 Analiza frakcji białka C5M1A po oczyszczaniu na preparatywnej chromatografii wykluczania; warunki redukujące.....	92
Rycina 28 Drugi etap oczyszczania C5M1A na preparatywnej chromatografii wykluczania; błękitna linia - UV	92
Rycina 29 Analiza wyprodukowanych wariantów asymetrycznych cząsteczek LYTAC z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE; R – warunki redukujące, NR – warunki nieredukujące ...	93
Rycina 30 Analiza białka C5M1A wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym HEK293S GnTI ^{-/-} oraz traktowanego Endoglikozydazą H	94
Rycina 31 Ocena produktywności poliklonalnych, stabilnych linii komórkowych produkujących białko C5M1B z wykorzystaniem metody Western blot.....	95
Rycina 32 Analiza białka C5M1B na kolejnych etapach oczyszczania z wykorzystaniem metody Western blot.....	95
Rycina 33 Analiza cząsteczki C5M1B bezpośrednio po oczyszczaniu na chromatografii powinowactwa (czarna linia) oraz po wymianie buforu elucyjnego na PBS z wykorzystaniem koncentratorów (niebieska linia).....	96
Rycina 34 Analiza cząsteczki C5M1B po przechowywaniu w PBS	96
Rycina 35 Wyniki testu wiązania cząsteczki C5M1A do wybranych celów molekularnych metodą ELISA	97
Rycina 36 Wyniki testu wiązania cząsteczki C5M1B do wybranych celów molekularnych metodą ELISA	97
Rycina 37 Wyniki wstępnej oceny zdolności tworzenia kompleksu z użyciem cząsteczek C5M1A i PD-L1-His-Fc...98	
Rycina 38 Wyniki wstępnej oceny zdolności tworzenia kompleksu z użyciem cząsteczek C5M1A i PD-L1-His-Fc...99	
Rycina 39 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI ^{-/-} , PD-L1 oraz IGF2R D11-His z wykorzystaniem chromatografii wykluczania.....	100
Rycina 40 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI ^{-/-} , PD-L1 oraz mieszaniny obu preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania	100
Rycina 41 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI ^{-/-} , IGF2R-D11-His oraz mieszaniny obu preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania	101
Rycina 42 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI ^{-/-} , PD-L1, IGF2R-D11-His oraz mieszaniny wszystkich preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania.....	101
Rycina 43 Analiza cząsteczek C5M1A GnTI ^{-/-} , PD-L1, IGF2R-D11-His oraz wszystkich kombinacji mieszanin ich preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania.....	102
Rycina 44 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1, IGF2R-D11-His z wykorzystaniem chromatografii wykluczania.....	103

Rycina 45 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1 oraz mieszaniny obu preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania.....	103
Rycina 46 Analiza cząsteczek C5M1B, IGF2R-D11-His oraz mieszaniny obu preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania	104
Rycina 47 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1, IGF2R-D11-His oraz mieszaniny wszystkich preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania.....	104
Rycina 48 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1, IGF2R-D11-His oraz wszystkich kombinacji mieszanin ich preparatów z wykorzystaniem chromatografii wykluczania.....	105
Rycina 49 Analiza cząsteczek C5M1B, PD-L1, IGF2R-D11-His oraz mieszaniny wszystkich preparatów z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (warunki redukujące).....	105
Rycina 50 Mikroskopowy obraz internalizacji rozpuszczalnego PD-L1-mCherry po 22 h inkubacji pod wpływem badanych związków.....	107
Rycina 51 Zależność internalizacji rozpuszczalnego PD-L1-mCherry pod wpływem C5M1A w czasie.....	108
Rycina 52 Zależność internalizacji rozpuszczalnego PD-L1-mCherry pod wpływem C5M1B w czasie	109
Rycina 53 Oznaczanie PD-L1 na powierzchni komórek przy użyciu cytometrii przepływowej. Komórki RL95-2 traktowane były C5M1A w stężeniu 100 nM przez 22 h.....	111
Rycina 54 Oznaczanie PD-L1 na powierzchni komórek przy użyciu cytometrii przepływowej. Komórki Panc 10.05 traktowane były wskazanymi związkami w stężeniu 100 nM przez 22 h.....	112
Rycina 55 Określenie wpływu stężenia C5M1A na poziom PD-L1 na powierzchni komórek Panc 10.05 z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (inkubacja 22 h).	113
Rycina 56 Porównanie internalizacji indukowanej przez asymetryczne cząsteczki LYTAC oparte na peptydach M2 - M5	114
Rycina 57 Wstępny screening wpływu stężenia C5M1A na lizę komórek nowotworowych RL95-2 w teście PBMC. 115	
Rycina 58 Wpływ cząsteczek LYTAC na lizę komórek nowotworowych BT20 w teście PBMC.....	116
Rycina 59 Wpływ cząsteczek LYTAC na lizę komórek nowotworowych RL95-2 w teście PBMC. A: C5M1A B: C5M1B	116
Rycina 60 Wpływ cząsteczek LYTAC na lizę komórek nowotworowych Panc 10.05 w teście PBMC. A: C5M1A B: C5M1B.....	117
Rycina 61 Porównanie wpływu C5M1A do Atezolizumabu i Durvalumabu w teście PBMC na indukcję lizy komórek nowotworowych RL95-2	118
Rycina 62 Porównanie wpływu różnych frakcji C5M1A w teście PBMC na lizę komórek nowotworowych RL95-2. A: porównanie frakcji 5-6 do kontroli; B: porównanie frakcji 5-6 i 6-7 do C5M1B oraz kontroli	119
Rycina 63 Ocena cytotoksyczności związku C5M1A na linii komórkowej BT20.....	120
Rycina 64 Ocena cytotoksyczności związku C5M1A na linii komórkowej Panc 10.05	120
Rycina 65 Ocena cytotoksyczności związku C5M1A na linii komórkowej PANC-1.....	121
Rycina 66 Ocena cytotoksyczności związku C5M1A na linii komórkowej RL95-2.....	121

13. SPIS TABEL

Tabela 1 Zestawienie najważniejszych białek będących supresorami nowotworów; na podstawie (Kontomanolis i in., 2021)	13
Tabela 2 Przegląd inhibitorów punktu kontrolnego dopuszczonych do użycia u ludzi, opracowane na podstawie (Dutta i in., 2023), (Hargadon i in., 2018) oraz (Markham & Duggan, 2018)	23
Tabela 3 Mechanizmy odpowiadające za pierwotną i nabytą oporność na immunoterapię; na podstawie (Sharma i in., 2017)	28
Tabela 4 Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach bakteryjnych	47
Tabela 5 Odczynniki wykorzystywane przy oczyszczaniu, trawieniu i analizie DNA	47
Tabela 6 Odczynniki wykorzystywane przy reakcji PCR	48
Tabela 7 Materiały zużywalne wykorzystywane przy reakcji PCR	48
Tabela 8 Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach komórek zawieszinowych	49
Tabela 9 Materiały zużywalne wykorzystywane przy hodowlach komórek zawieszinowych	49
Tabela 10 Odczynniki wykorzystywane przy elektroforezie w żelu poliakrylamidowym oraz Western blot	50
Tabela 11 Materiały zużywalne wykorzystywane przy elektroforezie w żelu poliakrylamidowym oraz Western blot	51
Tabela 12 Odczynniki wykorzystywane przy chromatografii analitycznej	51
Tabela 13 Materiały zużywalne wykorzystywane przy chromatografii analitycznej	51
Tabela 14 Odczynniki wykorzystywane przy chromatografii preparatywnej	52
Tabela 15 Materiały zużywalne wykorzystywane przy chromatografii preparatywnej	52
Tabela 16 Odczynniki wykorzystywane przy testach ELISA	52
Tabela 17 Materiały zużywalne wykorzystywane przy testach ELISA	53
Tabela 18 Odczynniki wykorzystywane przy hodowli ludzkich, nowotworowych komórek adherentnych	53
Tabela 19 Materiały zużywalne wykorzystywane przy hodowli ludzkich, nowotworowych komórek adherentnych	53
Tabela 20 Odczynniki wykorzystywane przy teście blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1	54
Tabela 21 Materiały zużywalne wykorzystywane przy teście blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1	54
Tabela 22 Odczynniki wykorzystywane w cytometrii przepływowej	54
Tabela 23 Materiały zużywalne wykorzystywane w cytometrii przepływowej	55
Tabela 24 Materiały zużywalne wykorzystywane w mikroskopii fluorescencyjnej	55
Tabela 25 Odczynniki wykorzystywane w testach cytotoksyczności	55
Tabela 26 Materiały zużywalne wykorzystywane w testach cytotoksyczności	56
Tabela 27 Lista aparatury wykorzystanej przy realizacji projektu	56

Tabela 28 Przykładowa sekwencja nukleotydowa biała znakowanego fragmentem IgG1 Fc, w tym przypadku kontrolnego peptydu M1-IgG1Fc.....	59
Tabela 29 Sekwencja nukleotydowa konstruktu łańcucha lekkiego przeciwciała C5.....	60
Tabela 30 Sekwencja nukleotydowa konstrukt łańcucha ciężkiego przeciwciała C5 z mutacją Knob-Into-Hole...	60
Tabela 31 Sekwencja nukleotydowa konstrukt peptydu M1, połączonego z fragmentem IgG4 Fc, zawierającym mutację Knob-Into-Hole, przeznaczonego do koekspresji jako asymetryczna cząsteczka LYTAC C5M1A.....	61
Tabela 32 Sekwencja nukleotydowa bispecyficznej cząsteczki LYTAC C5M1B.....	62
Tabela 33 Warunki transformacji komórek kompetentnych.....	65
Tabela 34 Warunki przykładowej reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi.....	65
Tabela 35 Przykładowe warunki ligacji insertu do wektora	67
Tabela 36 Przykładowy skład mieszaniny do reakcji PCR.....	67
Tabela 37 Przykładowy profil temperaturowy reakcji PCR.....	68
Tabela 38 Parametry elektroporacji komórek CHO K1.....	69
Tabela 39 Składniki buforu do elektroforezy SDS-PAGE w systemie TRIS-glicyna	72
Tabela 40 Składniki poliakrylamidowych żeli rozdzielających przeznaczonych do elektroforezy SDS-PAGE	72
Tabela 41 Składniki poliakrylamidowych żeli zagęszczających przeznaczonych do elektroforezy SDS-PAGE.....	72
Tabela 42 Skład 10x stężonego buforu do transferu Western blot.....	73
Tabela 43 Skład 1x stężonego buforu do transferu Western blot.....	74
Tabela 44 Wykaz mediów hodowlanych wraz z suplementami stosowanych przy hodowli adherentnych, ludzkich komórek nowotworowych	77
Tabela 45 Znaczenie symboli określających poziom istotności statystycznej.....	110