



Narodowy Instytut Onkologii

**im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Gliwicach**

AUTOREFERAT

dr n. med. Joanna Jazowiecka-Rakus

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej

Nowotworów

im. Profesora Mieczysława Chorażego

GLIWICE, 2022

1. Imię i nazwisko.

Joanna Jazowiecka- Rakus

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.Stopień naukowy doktora

Doktor nauk medycznych w dziedzinie biologia medyczna

Data nadania stopnia: 21 marca 2007

Stopień nadała: Rada Naukowa Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Tytuł rozprawy doktorskiej: Wazostatyna w terapii czerniaka B16(F10) u myszy

Promotor: Prof. dr hab. Stanisław Szala

Recenzenci: Prof. dr hab. Jakub Gołąb (Zakład Immunologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny)
Prof. dr hab. Janusz Siedlecki (Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej, NIO-PIB w Warszawie.)

Tytuł zawodowy magistra

Magister biologii

Specjalność: Biotechnologia roślin i mikroorganizmów

Data uzyskania tytułu: 30 października 2001 r.

Miejsce uzyskania tytułu: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Tytuł pracy magisterskiej: Charakterystyka kosmetyków i środków stosowanych do ich konserwowania

Promotor: Prof. dr hab. Joanna Radziejewska-Lebrecht

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- | | |
|------------------------------|--|
| 01.01.2020-obecnie | <u>Adiunkt naukowo-badawczy</u> , Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy Oddział w Gliwicach. |
| 01.11.2012-30.06.2015 | <u>Staż podoktorski</u> , Pracownia Immunologii-Wakcynologii, Zakład Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet w Liège, Liège, Belgia. |
| 01.06.2007-31.12.2019 | <u>Adiunkt naukowo-badawczy</u> , Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, O/Gliwice. |
| 01.10.2002-31.05.2007 | <u>Asystent naukowo-badawczy</u> , Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, O/Gliwice. |
| 17.01.2002-30.09.2002 | <u>Biolog</u> , Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, O/Gliwice. |

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.Tytuł osiągnięcia naukowego

Zmodyfikowany wirus myksomatozy oraz mezenchymalne komórki macierzyste w doświadczalnej terapii przeciwnowotworowej

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Autorstwa korespondencyjne oznaczono gwiazdką (*). W publikacji z roku 2022 podano IF z roku 2021.

1. Hadryś, A., Sochanik, A., McFadden, G., & **Jazowiecka-Rakus, J.***. (2020). Mesenchymal stem cells as carriers for systemic delivery of oncolytic viruses. *European Journal of Pharmacology*, 874, 172991. doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172991; (IF₂₀₂₀: 4,432; MNiSW₂₀₂₁: 100).
2. **Jazowiecka-Rakus, J.***, Sochanik, A., Rusin, A., Hadryś, A., Fidyk, W., Villa, N., Rahman, M. M., Chmielik, E., Franco, L. S., & McFadden, G. (2020). Myxoma Virus-Loaded Mesenchymal Stem Cells in Experimental Oncolytic Therapy of Murine Pulmonary Melanoma. *Molecular Therapy Oncolytics*, 18, 335–350. doi.org/10.1016/j.omto.2020.07.003; (IF₂₀₂₀: 7,2; MNiSW₂₀₂₁: 100).
3. **Jazowiecka-Rakus, J.***, Hadrys, A., Rahman, M. M., McFadden, G., Fidyk, W., Chmielik, E., Pazdzior, M., Grajek, M., Kozik, V., & Sochanik, A. (2021). Myxoma Virus Expressing LIGHT (TNFSF14) Pre-Loaded into Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Is Effective Treatment for Murine Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers*, 13(6), 1394.; doi.org/10.3390/cancers14082022. (IF₂₀₂₁: 6,575; MNiSW₂₀₂₁: 140).
4. **Jazowiecka-Rakus, J.***, Sochanik, A., Hadryś, A., Fidyk, W., Chmielik, E., Rahman, M. M., & McFadden, G. (2022). Combination of LIGHT (TNFSF14)-Armed Myxoma Virus Pre-Loaded into ADSCs and Gemcitabine in the Treatment of Experimental Orthotopic Murine Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers*, 14(8), 2022. doi.org/10.3390/cancers14082022; (IF₂₀₂₁: 6,575; MNiSW₂₀₂₁: 140)

Summary IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 24,782

Suma punktów MNiSW (2021 r.): 480

4.1 Zwięzłe omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego

WSTĘP

Nowotwory złośliwe są ciągle rosnącym zagrożeniem cywilizacyjnym i to zarówno pod względem medycznym jak i społeczno-ekonomicznym, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Pośród nich szczególne miejsce zajmują nowotwory odporne w leczeniu, zwykle z niepomyślnym rokowaniem pomimo pewnych postępów współczesnej radio- i chemioterapii, terapii celowanych i hormonalnych, a nawet immunoterapii. Bezspornie do takich „trudnych” nowotworów zaliczają się: czerniak złośliwy, gruczolakorak trzustki i glejak wielopostaciowy. Do przyczyn niepowodzeń w ich leczeniu, należą wysoki stopień złośliwości, skłonność do rozsiewu lub wznowy. W próbach terapii tych nowotworów ponownie zainteresowanie budzi wirusoterapia onkolityczna, ściślej mówiąc zastosowanie zmodyfikowanych genetycznie wirusów onkolitycznych (ang. *oncolytic viruses*, OV) jako czynnika terapeutycznego. Początki ich wykorzystywania sięgają końca XIX wieku ale dopiero rozwój nowych narzędzi biologii molekularnej pod koniec ubiegłego stulecia spowodował odrodzenie zainteresowania tymi wirusami. OV to szczególna kategoria wirusów wykazujących tropizm do komórek nowotworowych, w których wirusy te namnażając się doprowadzają do ich zniszczenia, a jednocześnie nie naruszają funkcjonowania komórek prawidłowych. Zakażone komórki nowotworowe obumierają a uwolnione cząstki wirusa zakażają następne komórki. Działanie OV prowadzi do rozpadu struktury guza (tzw. onkolizy), a dodatkowo może pobudzić zarówno wrodzoną, jak i nabytą odpowiedź immunologiczną [Yoon i wsp., 2022].

Mechanizmy onkolizy powodowanej przez OV nie są do końca poznane i mogą różnić się znacznie w zależności od rodzaju wirusa, docelowych komórek nowotworowych, a także mechanizmów oddziaływania z mikrośrodowiskiem nowotworu oraz układem odpornościowym gospodarza. Po zainfekowaniu przez OV komórki nowotworowe zwykle giną w wyniku pobudzenia szlaków śmierci komórkowej i/lub utraty integralności spowodowanej uszkodzeniami wywołanymi przez wirusy. Naturalnie występujące wirusy o działaniu onkolitycznym są współcześnie modyfikowane genetycznie poprzez usuwanie pewnych genów lub wprowadzanie do takich konstruktów odpowiednio dobranych transgenów w celu dalszego zwiększenia tropizmu do komórek nowotworowych i/lub pobudzenia różnych mechanizmów odpowiedzi przeciwnowotworowej. Współczesne konstrukty genetyczne są zatem projektowane aby aktywować i wzmacniać szlaki apoptozy, autofagii lub piroptozy, jak również nasilać efekty immunogennej śmierci komórkowej

[Mardi i wsp., 2022]. Ta ostatnia skutkuje uwolnieniem antygenów nowotworowych, cząsteczek DAMP (ang. *danger/damage-associated molecular patterns*; wzorce molekularne związane z uszkodzeniami) oraz PAMP (ang. *pathogen-associated molecular patterns*; wzorce molekularne związane z patogenami) jak i zwiększoną ekspresją cytokin prozapalnych, których zadaniem jest przyciągnięcie i aktywowanie komórek związanych zarówno z wrodzoną, jak i nabytą odpowiedzią układu odpornościowego. Indukcja immunogennej śmierci komórkowej za pośrednictwem OV odgrywa kluczową rolę w przekształcaniu guzów o niskiej immunogenności (tzw. guzów „zimnych”) w guzy ze zwiększonym napływem limfocytów T (tzw. guzy „gorące”) [Rahman i McFadden, 2021]. *Modus operandi* OV umożliwia więc wykorzystanie ich nie tylko jako czynników wywołujących destrukcję utkania nowotworowego lecz również jako narzędzi do aktywacji układu odpornościowego. Postęp w „immunoterapii onkolitycznej” jest więc zbieżny z ogólnym rozwojem immunoterapii nowotworów. Immunoterapia onkolityczna ma jednak przewagę nad innymi rodzajami immunoterapii; np. przeciwciała nie wnikają do guzów litych w przeciwieństwie do wirusów. Zaletą wirusoterapii onkolitycznej jest możliwość kojarzenia jej np. z inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych, terapiami opartymi na komórkach T, czy też celowaną chemioterapią lub konformalną radioterapią.

Wirusy onkolityczne zawierające DNA cechuje wysoka stabilność genomu i większe możliwości insercji transgenów, bez zmniejszenia zdolności wirusa do infekcji i replikacji [Harrington i wsp., 2019]. Z kolei wirusy RNA mogą być bardziej immunogenne [Rahman i McFadden, 2021] i mają mniejsze genomy [Cattaneo i wsp., 2008] co może ograniczać rozmiar wprowadzanych transgenów.

Użycie wybranego wirusa onkolitycznego jest więc uwarunkowane biologią i kontekstem zastosowania. Do testowanych onkolitycznych wirusów RNA należą m. in. wirus odry (MV), wirus choroby Newcastle (NDV) czy wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV). Z kolei do onkolitycznych wirusów zawierających DNA należą adenowirusy, wirus opryszczki zwykłej (HSV), parwovirusy oraz pokswirusy, takie jak wirus krowianki (VACV) i wirus myksomatozy (myxoma virus, MYXV). Właśnie konstrukty na bazie MYXV były przeze mnie wykorzystane w pracach tworzących cykl habilitacyjny.

Do chwili obecnej zatwierdzono użycie kliniczne zaledwie kilku konstruktów onkolitycznych (m. in. pikornawirus o nazwie Rigvir ® w leczeniu czerniaka [Alberts i wsp., 2018], adenowirus H101 w leczeniu raka głowy i szyi [Wei i wsp., 2018] czy zmodyfikowany wirus HSV-1 o nazwie DELYTACT w leczeniu nowotworów mózgu [Sugawara i wsp., 2021]). Szczególne jednak znaczenie, ze względu na uczyniony przełom w leczeniu

nieresekcyjnego czerniaka, posiada zmodyfikowany wirus opryszczki pospolitej (HSV-1) o nazwie Talimogene Laherparepvec (T-VEC) [Raman i wsp., 2019].

Wspomniany wcześniej wirus myksomatozy (MYXV) występuje naturalnie wśród populacji dzikich królików obu Ameryk, u których jest niepatogenny w odróżnieniu od populacji królika europejskiego, gdzie wywołuje chorobę myksomatozę. Dla ludzi i innych kręgowców (np. myszy) jest niepatogenny. Wirus ten wydajnie infekuje i niszczy różne typy ludzkich oraz mysich komórek nowotworowych. Jego wybiórczość działania sprawia, że jest atrakcyjnym obiektem badań nad terapiami wielu nowotworów, w tym raka jajnika, białaczki szpikowej, szpiczaka mnogiego oraz czerniaka, raka trzustki i glejaka [Stanford i McFadden, 2007; Chan i wsp., 2013]. Konstrukty MYXV, które wykorzystano do opisanych doświadczeń opracowane zostały w laboratorium amerykańskiego biochemika i wirusologa prof. Granta McFaddena (Arizona State University, Tempe, AZ, USA), z którym współpracuję od ponad pięciu lat.

W genomie MYXV jest ponad 20 genów kodujących białka pozwalające wirusowi hamować mechanizmy odpowiedzi immunologicznej gospodarza, co ułatwia replikację oraz transmisję wirusa. Są to białka immunoregulatorowe, takie jak: wirokiny (np. M-T1; Serp-1; Myxoma Growth Factor), wioreceptory (np. M-T2; M-T7) czy inne białka regulatorowe np. M-T4; M-T5; M11L czy Serp-2 [Stanford i wsp., 2007]. Wybiórcza replikacja MYXV w komórkach nowotworowych zachodzi z powodu mutacji w genach kodujących interferon typu I (IFN I), czynnik martwicy nowotworów (TNF) [Bartee i McFadden, 2009] czy też dzięki konstytutywnej aktywacji niektórych szlaków sygnałowych (np. PI3K/AKT) [Stanford i McFadden, 2007]. Podatność na zakażenie wirusem związana jest z zaburzeniem aktywacji endogennej fosforylowanej kinazy Akt, co z kolei wpływa na tworzenie kompleksu pomiędzy Akt a wirusowym białkiem M-T5 z domeną zawierającą wielokrotne powtórzenia ankiryny [Wang i wsp., 2006; Krześlak, 2010].

Dla poprawy wyników leczenia nowotworów o ograniczonej dostępności anatomicznej i/lub wysokim potencjale przerzutowania skuteczna może być terapia oparta o możliwie niezawodny sposób dostarczania terapeutycznego do ogniska nowotworowego. Hipotetycznie najbardziej skuteczną drogą podania wirusów onkolitycznych wydaje się być iniekcja ogólnoustrojowa (do krwiobiegu). Wirusy dostarczane drogą dożylną są jednak rozpoznawane przez mechanizmy obronne gospodarza zanim zdążą zniszczyć komórki nowotworowe. Ogranicza to oczywiście wydajność docierania cząstek wirusa onkolitycznego do ogniska nowotworowego, a tym samym wydajność zakażenia komórek docelowych i zainicjowanie onkolizy. Nasuwającym się rozwiązaniem jest strategia „konja trojańskiego”, w

rozważanym kontekście zapewniająca steryczną osłonę wirusa podczas tranzytu w układzie krwionośnym do ogniska nowotworowego. Rozwiązanie to ma zaletę w postaci potencjalnie zwiększonej skuteczności terapii, jako że pozwala na zastosowanie jednego typu wirusa onkolitycznego zamiast dwu różnych, co jest czasem postulowane w związku z nabywaniem odporności na pierwotnie podany wirus.

Do osłony konstruktów wirusa onkolitycznego wykorzystałam multipotencjalne mezenchymalne komórki zrębu zwane potocznie mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSC, ang. *mesenchymal stem cells*). Są to komórki izolowane m.in. ze szpiku kostnego (BM-MSC, ang. *bone marrow-derived stem/stromal cells*) lub tkanki tłuszczowej (ADSC, ang. *adipose tissue-derived stem/stromal cells*) spełniające pewne minimalne kryteria Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej (ISCT): zdolność przylegania do podłoża hodowlanego oraz różnicowania do osteoblastów (komórek kościotwórczych), chondroblastów (komórek chrząstkotwórczych) i adipocytów (komórek tłuszczowych) oraz obecność markerów powierzchniowych (CD73, CD90, CD105) lub ich brak (CD34, CD45, CD-14 lub CD11b, CD19, CD79 α , HLA-DR), co umożliwia identyfikację MSC w trakcie hodowli [Dominici i wsp., 2006]. Ogólnoustrojowe podawanie komórek MSC zakażonych *ex vivo* wirusami jest w niewielkim stopniu inwazyjne; skuteczność dostarczania wirusów onkolitycznych tą drogą do zmian nowotworowych została dowiedziona [Yoon i wsp., 2022]. MSC cechuje niski poziom cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC) klasy I oraz brak ekspresji MHC klasy II. Niska immunogenność, nawet allogenicznych MSC pozwala im unikać rozpoznania przez układ odpornościowy [Chulpanova i wsp., 2018]. Tropizm MSC do miejsc zapalnych może dodatkowo ułatwiać skuteczniejsze przenoszenie wirusów onkolitycznych do ognisk nowotworowych. Łatwiejsza dostępność jak i wyższa wydajność izolacji ADSC w porównaniu z BM-MSC może stwarzać pewne korzyści aplikacyjne tych pierwszych przy określonych strategiach terapii [Strioga i wsp., 2012].

Wspólnym mianownikiem prac wchodzących w skład przedstawionej rozprawy habilitacyjnej jest ocena wykonalności oraz praktyczne zastosowanie **zapropionowanej przeze mnie po raz pierwszy** doświadczalnej terapii przeciwnowotworowej. Jest ona oparta na zastosowaniu modularnego układu terapeutycznego zawierającego ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) zainfekowane *ex vivo* różnymi konstruktami wirusa myksomatozy mającymi działanie onkolityczne i immunomodulacyjne. Takie układy wykorzystałam do prób ogólnoustrojowej terapii doświadczalnej dwóch nowotworów o wysokiej śmiertelności: czerniaka złośliwego oraz gruczolaka trzustki.

Pierwsza publikacja wchodząca w skład osiągnięcia naukowego jest przeglądem literaturowym wykorzystania MSC jako nośnika różnych wirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej. Przeglądu dokonałam w celu adaptacji tego nośnika do własnych celów badawczych (praca nr 1). Pozostałe trzy publikacje opisują wyniki prac doświadczalnych na myszach, z wykorzystaniem modelu przeszczepialnego czerniaka płuca (praca nr 2) oraz modelu ortotopowego gruczolaka trzustki (prace nr 3 i 4).

Praca nr 1. *Hadryś A., Sochanik, A., McFadden, G., & Jazowiecka-Rakus, J. (2020). Mesenchymal stem cells as carriers for systemic delivery of oncolytic viruses. European Journal of Pharmacology, 874, 172991.*

Publikacja jest krytycznym przeglądem piśmiennictwa dotyczącego systemowego zastosowania w leczeniu nowotworów mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) jako nośnika różnych wirusów onkolitycznych (OV). Celem dokonania przeglądu było opracowanie własnego układu terapeutycznego opartego o konstrukty wirusa myksomatozy oraz MSC i przystosowanie go do systemowej terapii onkolitycznej czerniaka złośliwego, gruczolaka trzustki jak i glejaka wielopostaciowego.

W pracy porównałam zalety i wady zastosowania MSC w terapiach przeciwnowotworowych oraz rozważyłam różne rozwiązania zwiększające tropizm tych komórek do docelowych ognisk nowotworowych. Przeanalizowałam przykłady zastosowań MSC jako nośnika różnych wirusów onkolitycznych, zapewniającego ochronę przed zbyt wczesną ich eliminacją z organizmu biorcy; proces ten zachodzi bowiem nawet po dotarciu wirusa do rozpoznanego ogniska nowotworowego. Dobranie odpowiedniego nośnika ochronnego i warunków tworzenia układu terapeutycznego z wirusem onkolitycznym jest szczególnie istotne przy tworzeniu strategii leczenia tych nowotworów, które stanowią największe wyzwanie z powodów bądź to anatomicznych bądź dużej skłonności do przerzutowania. W przeglądzie przedstawiłam dowody uzasadniające użycie nośnika ochronnego w terapii ogólnoustrojowej z udziałem OV. Jakkolwiek użycie zarówno BM-MSC jak i ADSC wzbudza pewne kontrowersje związane z transformacją komórek i promocją angiogenezy, to MSC zainfekowane wirusami onkolitycznymi nie wywierają już takich niebezpiecznych efektów pronowotworowych [Hadryś i wsp., 2020]. W publikacji omówiłam także mechanizmy kierunkowej migracji MSC do ognisk nowotworowych; jest ono wywołane uruchomieniem szeregu kaskad sygnałowych i wykazuje analogie z tropizmem MSC do miejsc objętych stanem zapalnym [Dvorak, 1986]. Postulowane korzyści z ogólnoustrojowego podawania OV za pomocą nośnika komórkowego wynikają m.in. z

niewielkiego stopnia inwazyjności takiej procedury. Należy jednak pamiętać, że iniekcja dożylna może prowadzić do retencji nośnika z wirusem w płucach ze względu na barierę (ang. "pulmonary first-pass effect") jaką tworzy system kapilar płucnych [Ferrini i wsp., 2021]. Czasem stanowi to pewną przeszkodę np. dla terapii ogólnoustrojowej guzów obwodowych [Fischer i wsp., 2009]. Jednak w przypadku celowania w ogniska nowotworowe zlokalizowane w płucach [Jazowiecka-Rakus i wsp., 2020] akumulacja nośnika z wirusem ma charakter korzystny.

W omawianej pracy przeglądowej rozważyłam również trafność dalszego ulepszania terapii onkolitycznej trudnych nowotworów. Dotychczasowa jej skuteczność nie jest bowiem optymalna; tylko pewien odsetek pacjentów wykazuje, przynajmniej w wariancie terapii pojedynczej (monoterapii), całkowitą regresję guza (ang. "elite responders") [Bell i McFadden, 2014].

Podsumowując, powyższy przegląd literaturowy pozwolił mi w następnym kroku dopracować koncepcję układów terapeutycznych opartych na komórkach MSC jako nośniku badanych konstruktów genetycznych wirusa myksomatozy. Układy takie wykorzystałam w moich dalszych badaniach nad terapią onkolityczną czerniaka i raka trzustki.

Praca nr 2. Jazowiecka-Rakus, J., Sochanik, A., Rusin, A., Hadryś, A., Fidyk, W., Villa, N., Rahman, M. M., Chmielik, E., Franco, L. S., & McFadden, G. (2020). Myxoma Virus-Loaded Mesenchymal Stem Cells in Experimental Oncolytic Therapy of Murine Pulmonary Melanoma. *Molecular Therapy Oncolytics*, 18, 335–350.

Jest to praca eksperymentalna dotycząca terapii onkolitycznej ognisk czerniaka płuca wywołanych doświadczalnie u myszy C57BL6. Zastosowałam układ terapeutyczny składający się z MSC przenoszących konstrukt wirusa myksomatozy z wklonowanym transgenem zawierającym sekwencje kodujące IL-15. Celem tej pracy było wykazanie skuteczności proponowanej terapii i możliwości wykorzystania jej w przyszłych skojarzonych strategiach leczenia czerniaka.

Czerniak jest jednym z najbardziej złośliwych nowotworów. O ile nowatorskie (np. immunoterapia) a nawet konwencjonalne terapie mogą być częściowo skuteczne to przerzuty do płuc i mózgu są powszechną przyczyną niepomyślnego rokowania. Wprowadzenie do praktyki klinicznej w 2015 zmodyfikowanego genetycznie herpeswirusa o nazwie Talimogene laherparepvec (T-VEC, Imlygic™) uczyniło duży przełom w leczeniu tego nowotworu [Andtbacka i wsp., 2015]. Optymizm z korzyści klinicznych tego konstruktu

onkolitycznego jest studzony jego skutecznością, która ogranicza się do przypadków bezpośredniego podania do zmian nowotworowych lub do okolicznych węzłów chłonnych. Formulacja T-VEC nadająca się do podania systemowego nie jest, jak dotąd, dostępna. Sytuacja ta nadaje sens próbom poprawy skuteczności terapii z zastosowaniem OV podanych drogą ogólnoustrojową.

W badaniach opisanych w Pracy nr 2 posłużyłam się wspomnianą już strategią konia trojańskiego; w roli nośnika konstruktów wirusa MYXV wykorzystałam komórki MSC pochodzące z ludzkiego szpiku kostnego (BM-MS). Potwierdziłam ich fenotyp oraz zdolność do różnicowania, zgodnie z kryteriami ISCT. W ramach współpracy z prof. Grantem McFaddenem w badaniach wykorzystałam konstrukty genetyczne MYXV tzw. reporterowe czyli kodujące białko zielonej lub czerwonej fluorescencji (vMyx-EGFP oraz vMyx-EGFP/tdTr) lub kodujące lucyferazę (vMyx-Fluc/tdTr); do terapii wykorzystałam zaś konstrukt kodujący mysia IL-15 wraz z podjednostką α receptora IL-15 (vMyx-IL15R α -tdTr). Transgen ten został wklonowany w celu zwiększenia aktywacji komórek NK jak i nasilenia infiltracji limfocytów T CD8+ [Tosic i wsp., 2014].

Wykazałam, że konstrukty MYXV infekują i niszczą *in vitro* komórki mysich oraz ludzkich linii czerniaka, natomiast zainfekowanie komórek MSC nie wpływa znacząco na ich przeżywalność. Dowiodłam dalej, że komórki MSC zakażone *ex vivo* wirusem są w stanie przekazać go w hodowli, w tzw. kokulturze, komórkom linii zarówno mysiego jak i ludzkiego czerniaka. Wykonałam badania z zastosowaniem cytarabiny (arabinozyd cytozyny), która jest inhibitorem replikacji wirusowego DNA i ekspresji późnych genów wirusowych. Wykazałam, że komórki czerniaka są infekowane przez wirusy potomne uwolnione z zainfekowanych wcześniej MSC. Wzmocniło to założoną tezę o rzeczywistej przydatności komórek MSC jako nośnika konstruktów MYXV do badań *in vivo* w terapii mysiego czerniaka płuca. Wykazałam dalej, że powstawanie i rozwój doświadczalnych ognisk nowotworowych czerniaka B16-F10 w płucach myszy C57BL6 może być skutecznie zahamowane jeżeli wstrzyknięte dożylnie komórki nowotworowe zostały uprzednio zakażone *ex vivo* konstruktem wirusa MYXV. Dalsze badania *in vivo* (oparte o detekcję bioluminescencji za pomocą systemu IVIS) pokazały, że po dożylnym podaniu układu terapeutycznego (tj. komórek MSC zakażonych konstruktem onkolitycznym) wirus jest wykrywany w płucach i utrzymuje się tam dłużej w porównaniu z podaniem konstruktu nieosłoniętego. Efekt ten bezpośrednio potwierdził słuszność zastosowania nośnika komórkowego dla konstruktów MYXV w próbach niszczenia ognisk czerniaka zlokalizowanych w płucach. Zastosowana terapia pokazała jasno, że

zmniejszenie liczby ognisk nowotworowych koreluje z wydłużeniem czasu przeżycia zwierząt i jest zależne od ilości dawek układu terapeutycznego; statystyczna istotność różnic w przeżyciu wymaga co najmniej trzech rund terapii onkolitycznej. Podwyższona ekspresja genów kodujących cytokiny prozapalne, jak też markerów limfocytów T (CD4 i CD8) potwierdza postulowaną aktywację przeciwnowotworowej odpowiedzi odpornościowej.

Podsumowując, w Pracy nr 2 wykazałam na modelu przeszczepialnego czerniaka płuca u myszy skuteczność niszczenia oraz pobudzenie przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej przez proponowany nowatorski układ terapeutyczny. Zwiększona ekspresja PD-1 i jego liganda, PD-L1 sugeruje możliwość skojarzenia tej terapii onkolitycznej z inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych, a więc realną możliwość synergii terapeutycznej. W przypadku czerniaka byłoby to szczególnie pożądane z powodu częstych nawrotów tego wysoce złośliwego nowotworu. Planowane przeze mnie udoskonalenie doświadczalnej terapii czerniaka złośliwego obejmuje także skojarzenie z nowymi celowanymi chemioterapeutykami. Co ciekawe, efekt „pierwszego przejścia” w płucach i gromadzenie się tam badanego przeze mnie układu terapeutycznego sugeruje możliwość zastosowania podobnych strategii, także skojarzonych, w przypadku terapii innych jeszcze nowotworów np. pierwotnego raka płuca czy przerzutów kostniakomięsaka do płuca.

Praca nr 3. Jazowiecka-Rakus, J., Hadrys, A., Rahman, M. M., McFadden, G., Fidyk, W., Chmielik, E., Pazdzior, M., Grajek, M., Kozik, V., & Sochanik, A. (2021). *Myxoma Virus Expressing LIGHT (TNFSF14) Pre-Loaded into Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Is Effective Treatment for Murine Pancreatic Adenocarcinoma*. *Cancers*, 13(6), 1394.

Celem kolejnej pracy w przedstawianym cyklu była ocena skuteczności działania układu terapeutycznego opartego o ADSC zainfekowane *ex vivo* wirusem myksomatozy kodującym białko immunomodulacyjne LIGHT. Układ był dostarczany drogą dootrzewnową do wywołanych doświadczalnie ortotopowych ognisk gruczolakoraka trzustki u myszy C57BL6.

Rak trzustki jest jednym z najgorzej rokujących nowotworów. Wynika to z biologii samego nowotworu, późnego rozpoznania choroby, na ogół w zaawansowanym nieoperacyjnym stadium oraz braku skutecznych metod leczenia choroby rozsianej. Rozsiany rak trzustki jest chorobą nieuleczalną, z czasem przeżycia nieprzekraczającym 6 miesięcy, a celem postępowania jest wyłącznie uzyskanie efektu paliatywnego [Zhang i wsp., 2022]. W przypadku najczęściej występującego gruczolakoraka przewodowego (PDAC, ang. *pancreatic ductal adenocarcinoma*) współczynniki zachorowalności są praktycznie równe

współczynnikom umieralności (ok. 95% śmiertelność w ciągu roku od wykrycia). Standardy leczenia oprócz radykalnej resekcji obejmują podawanie chemioterapii (gemcytabina z paklitakselem, cisplatyna, fluorouracyl, kapecytabina, czy schematy złożone np. FOLFIRINOX) i/lub napromienianie. Agresywna chemioterapia jest jednak mało skuteczna; skutkuje wtórną lekoopornością i tylko nieznacznie poprawia statystyki przeżycia. Zdecydowana poprawa leczenia tego nowotworu wymaga nowatorskich podejść. Wspólnym motywem zwiększenia efektywności różnych nowych terapii tego nowotworu może okazać się rozrzedzenie charakterystycznego dlań gęstego podścieliska (tzw. desmoplazji), które sprzyja rozrostowi komórek gruczolakoraka trzustki a jednocześnie jest barierą dla penetracji guza przez różne czynniki terapeutyczne [Sarantis i wsp., 2020].

W moich badaniach w roli nośnika konstruktu wirusowego użyłam mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z ludzkiej tkanki tłuszczowej (ADSC). Metoda ich izolacji okazała się bardziej wydajna w porównaniu z komórkami macierzystymi pochodzącymi ze szpiku kostnego (BM-MSC). Umożliwiło mi to później zaprojektowanie bardziej złożonych doświadczeń terapeutycznych. Do badań *in vitro* użyłam mysiej linii gruczolakoraka trzustki (Pan02) oraz dwóch linii ludzkich (Panc-1 oraz AsPC-1). W pracy wykorzystałam, w ramach współpracy z prof. Grantem McFaddenem, trzy różne konstrukty wirusowe: terapeutyczny z mysim transgenem Light (vMyx-LIGHT) oraz dwa reporterowe (vMyx-EGFP i vMyx-EGFP/tdTr). LIGHT jest indukowalnym wydzielniczym białkiem z nadrodziny TNF, znanym też jako TNFSF14 (ang. *tumor necrosis factor superfamily member 14*). Gen Light został wprowadzony do wirusa MYXV w celu zwiększenia napływu limfocytów T do guza, a tym samym nasilenia odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko nowotworowi [Maker, 2015]. W pracy oszacowałam permissywność (tzn. podatność na infekcję i produktywną replikację wirusa) komórek ADSC oraz trzech linii komórkowych raka trzustki dla badanych konstruktów wirusowych. Odkryłam znaczące różnice pomiędzy badanymi liniami w kontekście poziomu infekcji i replikacji wirusa MYXV. Konstrukty wirusa wydajnie infekują mysią linię Pan02 i wywołują wyraźny efekt cytotoksyczny. W przypadku linii ludzkiego raka trzustki (AsPC-1 oraz Panc-1) zaobserwowałam z kolei mniejszą podatność na infekcję wirusem MYXV; linie te można uznać za pół- lub niepermissywne. Tym niemniej, pomimo różniącego się poziomu infekcji i replikacji terapeutycznego konstruktu vMyx-LIGHT w badanych liniach komórkowych raka trzustki, zakażenie nieodmiennie wywoływało znaczące zmniejszenie żywotności hodowli. Natomiast, stopień żywotności komórek ADSC po zakażeniu konstruktem wirusowym pozostawał wysoki (ok. 90% po 24 godzinach). Istnienie tego „okienka” terapeutycznego w

przypadku komórek ADSC można traktować jako dowód ich przydatności w roli nośnika badanych przeze mnie konstruktów wirusowych w zastosowaniach *in vivo*. Potwierdziłam zdolność vMyx-LIGHT do zapobiegania rozwojowi gruczolaka trzustki u myszy w ślad za ortotopową implantacją komórek nowotworowych Pan02 jeśli jednocześnie z komórkami Pan02 został dostarczony konstrukt wirusowy. Makroskopowa ocena trzustek izolowanych po zakończeniu doświadczeń nie wykazała obecności ognisk nowotworowych. W badaniach *in vivo* zbadalam dystrybucję i utrzymywanie się wirusa w trzustce po dootrzewnowym podaniu komórek ADSC wcześniej zakażonych *ex vivo* konstruktem vMyx-LIGHT. Badania oparte były na detekcji bioluminescencji za pomocą systemu IVIS. Wykazałam, że nieosłonięty konstrukt MYXV był stosunkowo szybko usuwany z organizmu po podaniu dootrzewnowym w porównaniu z konstruktem osłoniętym przez ADSC. Sugeruje to wczesną odpowiedź przeciwwirusową, która ogranicza replikację i rozprzestrzenianie się wirusa.

W dalszej kolejności zbadalam skuteczność niszczenia ortotopowych ognisk PDAC wywołanych u myszy doświadczalnie za pomocą metod chirurgicznych. Po pięciokrotnym dootrzewnowym podaniu układu terapeutycznego ADSC+vMyx-LIGHT odnotowałam zmniejszenie masy guzów i zwiększenie napływu limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ do trzustki. Przeżycie myszy poddanych terapii uległo znamiennej wydłużeniu.

Podsumowując, w pracy tej pokazałam przydatność układu terapeutycznego ADSC+vMyx-LIGHT w niszczeniu doświadczalnych ognisk raka trzustki u myszy. Działanie konstruktów oprócz efektu *stricte* onkolitycznego wywołało wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko nowotworowi i wydłużenie przeżywalności leczonych myszy. Dalszej poprawy skuteczności badanej strategii terapeutycznej upatrywałam w terapii skojarzonej; badanie takie zostało podjęte w kolejnej pracy z cyklu.

Praca nr 4. Jazowiecka-Rakus, J., Sochanik, A., Hadryś, A., Fidyk, W., Chmielik, E., Rahman, M. M., & McFadden, G. (2022). *Combination of LIGHT (TNFSF14)-Armed Myxoma Virus Pre-Loaded into ADSCs and Gemcitabine in the Treatment of Experimental Orthotopic Murine Pancreatic Adenocarcinoma*. *Cancers*, 14(8), 2022.

Celem kolejnej pracy było zwiększenie skuteczności badanej terapii onkolitycznej gruczolaka trzustki u myszy C57BL/6 poprzez skojarzenie jej z chemoterapią. Oprócz immunogennego konstruktów wirusa myksomatozy dostarczanego za pomocą ADSC zastosowana w niej została gemcytabina.

W celu zwiększenia skuteczności terapii mysiego raka trzustki posłużyłam się wspomnianym wcześniej układem terapeutycznym ADSC + vMyx-LIGHT, tutaj w kombinacji z chemoterapeutyką gemcytabiną (GEM). Jest to standardowy lek (tzw. złoty standard) w terapii raka trzustki, zapewniający niewielkie korzyści w zakresie czasu przeżycia w porównaniu z najlepszym leczeniem objawowym. Z tego powodu stale prowadzone są badania oceniające korzyści z terapii skojarzonej z GEM. Stosując panel ludzkich i mysich linii komórkowych raka trzustki wykazałam ekspresję terapeutycznego białka LIGHT po zakażeniu badanym konstruktom. Zbadałam żywotność zainfekowanych komórek i porównałam ilość komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych w badanych hodowlach. Odnotowałam znacząco podwyższony stopień nekrozy w hodowlach komórek Pan02 oraz AsPC-1, podczas gdy komórki Panc-1 po infekcji wirusem MYXV ulegały apoptozie. Następnie potwierdziłam, że cztery badane linie komórkowe (ADSC, Pan02, AsPC-1 i Panc-1) są wrażliwe na GEM. Po ekspozycji hodowli na konstrukt vMyx-LIGHT a następnie na GEM odnotowałam synergiczny efekt cytotoksyczny. W tym przypadku żywotność komórek badanych linii spadła po trzech dobach do poziomu ok. 15%. W dalszej kolejności zbadałam *in vivo* efekt terapeutyczny układu ADSC+vMyx-LIGHT w kombinacji z GEM używając immunokompetentnych myszy C57BL6 z wywołanymi doświadczalnie ogniskami PDAC w trzustce. Zwiększony odsetek limfocytów T (CD8+) w trzustce odnotowałam zarówno przy zastosowaniu wirusa osłoniętego jak i nieosłoniętego, zaś najniższą wartość CD8+ zaobserwowałam w grupie myszy leczonych samym chemioterapeutyką (GEM), jak również - ku pewnemu zaskoczeniu - w grupie myszy leczonych kombinacją ADSC-vMyx-LIGHT + GEM. Brak zmian w odsetku limfocytów T CD4+ pomocniczych, a także jedynie niewielkie zmiany we współczynniku CD4+/CD8+ i jego malejący trend odnotowany u myszy traktowanych GEM rodzą przypuszczenie, że pobudzona odpowiedź immunologiczna była skutkiem działania jedynie wirusa onkolitycznego. Można przypuścić że wynika to z mielosupresyjnego działania GEM oraz/lub desmoplazji. Podobnego efektu nie zaobserwowano bowiem w badaniach nad skutecznością terapeutyczną wirusa MYXV w kombinacji z GEM, ale z wykorzystaniem modelu mysiego raka trzustki rozsianego w przestrzeni otrzewnowej (nieortotopowego) [Wennier i wsp., 2012]. Zbadałam za pomocą RT-qPCR ekspresję wybranych genów związanych z odpowiedzią odpornościową. „Wyłączenie” ekspresji cytokiny TGF- β , związanej z jedną spośród dwunastu najważniejszych kaskad sygnałowych odpowiedzialnych za wzrost guzów PDAC może być zdarzeniem krytycznym w zatrzymaniu progresji PDAC. Ponieważ stosowanie GEM zwiększa w konsekwencji syntezę chemokin CCL i CXCL oraz cząsteczek sygnałowych związanych z

TGF- β [Principe i wsp., 2020] toteż zaobserwowany przeze mnie wzrost poziomu TGF- β oraz niższa skuteczność terapii ADSC-vMyx-LIGHT skojarzonej z GEM wydaje się to potwierdzać. Inną cytokiną odgrywającą ważną rolę w PDAC jest IL-10 [Padoan i wsp., 2019]. Wyniki RT-qPCR wykazały podwyższony poziom ekspresji IL-10. Ponieważ własności immunostymulujące IL-10 umożliwiają ekspansję komórek CD8⁺ rezydujących w guzie, otrzymany wynik wskazuje, że IL-10 jest rzeczywiście zaangażowana w dojrzewanie i różnicowanie limfocytów T w ogniskach raka trzustki u myszy poddanych omawianej terapii. Uzyskane przeze mnie dane RT-qPCR dotyczące ekspresji markerów charakterystycznych dla naciekających efektorowych komórek T jasno pokazują aktywację przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Ponieważ takiej odpowiedzi przeciwdziała zaobserwowany przeze mnie wzrost ekspresji PD-1 i jego liganda PD-L1 to dodanie inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych do proponowanej terapii onkolitycznej PDAC może przynieść dalszą poprawę skuteczności leczenia. W pracy tej potwierdziłam również podwyższoną ekspresję genów Light i HVEM (ang. *herpesvirus entry mediator*). HVEM obok receptora limfotoksyny- β (LT β R) jest jednym z receptorów, który po związaniu z białkiem LIGHT może zwiększać aktywność limfocytów T [Šedý i Ramezani-Rad, 2019]. Brak korzyści terapeutycznej z dodania gemcytabiny zaobserwowany przeze mnie w leczeniu skojarzonym stoi w sprzeczności z synergią wykazaną w hodowli komórek PDAC *in vitro*. Jak wspomniano może to, w warunkach *in vivo*, wynikać z obecności desmoplazji w guzie trzustki lub mielotoksyczności powodowanej przez GEM (co niekorzystnie wpływa na efekt immunologiczny terapii onkolitycznej), lub z obu tych powodów. Gemcytabina może znacząco hamować naciek limfocytów CD8⁺, co obserwuje się zarówno w alloprzeszczepach guzów u myszy, jak i w tkankach ludzkiego raka trzustki [Glorieux i wsp., 2022].

Podsumowując, w Pracy nr 4 potwierdziłam skuteczność dootrzewnego dostarczania ADSC zainfekowanych *ex vivo* konstruktem vMyx-LIGHT do ognisk PDAC, co przyniosło w efekcie znaczącą odpowiedź odpornościową skierowaną przeciwko nowotworowi i zwiększenie napływu limfocytów T do ognisk nowotworowych w trzustce myszy. Terapia skojarzona z udziałem GEM ujawniła jednak osłabienie nabytej odpowiedzi immunologicznej w porównaniu z terapią pojedynczą i nie przyniosła korzyści w przeżyciu myszy leczonych. Zasadne wydaje się zatem ukierunkowanie dalszych prób doświadczalnej terapii raka trzustki w stronę skojarzenia osłoniętego sterycznie konstruktu onkolitycznego (ADSC+vMyx-LIGHT) z ablacją farmakologiczną TGF- β oraz zastosowaniem inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych oraz radioterapii. Niebagatelne znaczenie będą

miały też próby farmakologicznego zmniejszenia desmoplazji. Propozycje te są przedmiotem kolejnego wniosku grantowego będącego w trakcie oceny.

Podsumowanie

W badaniach przedstawionych w cyklu prac doświadczalnych, wykazałam, że:

1. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) pozyskane z ludzkiego szpiku kostnego (BM-MSC) lub tkanki tłuszczowej (ADSC), o prawidłowym fenotypie oraz zdolności różnicowania, nadają się do roli nośnika terapeutycznych konstruktów onkolitycznego wirusa myksomatozy (MYXV). MSC są permissive wobec wirusa jednak zachowują wystarczająco długą żywotność po zakażeniu (tzw. „okienko terapeutyczne”) umożliwiając tym samym ich wykorzystanie w próbach terapii tzw. trudnych nowotworów.
2. Konstrukty onkolityczne „uzbrojone” w geny terapeutyczne (vMyx-IL15R α -tdTr oraz vMyx-LIGHT-Fluc/tdTr) replikują produktywnie w komórkach badanych mysich linii nowotworowych i znacząco zmniejszają ich żywotność *in vitro*.
3. Terapia doświadczalnego czerniaka płuca u myszy z zastosowaniem konstruktu vMyx-IL15R α -tdTr dostarczanego ogólnoustrojowo za pomocą BM-MSC znacząco zmniejsza ilość ognisk nowotworowych, pobudza odpowiedź immunologiczną gospodarza i przedłuża znamienne przeżycie leczonych zwierząt.
4. Terapia doświadczalnego ortotopowego mysiego raka trzustki z zastosowaniem konstruktu vMyx-LIGHT-Fluc/tdTr dostarczanego dootrzewnowo przez ADSC hamuje rozwój nowotworu, pobudza odpowiedź przeciwnowotworową i zwiększa przeżywalność myszy. Skojarzenie takiej terapii z GEM osłabia nabytą odpowiedź immunologiczną i nie przynosi korzyści w zakresie przeżywalności leczonych myszy. Ponieważ w badaniach *in vitro* stwierdzono zwiększoną cytotoksyczność kombinacji konstruktu MYXV i GEM to obserwowany *in vivo* odwrotny efekt może być skutkiem mielosupresyjnego działania chemioterapeutyku lub desmoplazji w guzach trzustki. Dalsze badania i poprawa skuteczności terapii skojarzonej (uzyskanie efektu synergii) powinny uwzględnić zapobieżenie tym zjawiskom.
5. Układy terapeutyczne na bazie MSC i konstruktów wirusa MYXV oraz strategie skojarzone stwarzają nadzieję na opracowanie skutecznej systemowej terapii czerniaka złośliwego i raka trzustki.
6. Ze względu na modularność terapii na bazie badanych układów (MSC izolowane z różnych źródeł, konstrukty wirusa myksomatozy z różnymi transgenami

terapeutycznymi), skojarzonej np. z nowymi chemioterapeutykami podobny wniosek może odnosić się również do innych, nieuwjętych w niniejszym cyklu badań. W doświadczalnej terapii glejaka wielopostaciowego u myszy wykorzystuję ADSC przenoszące unikatowy konstrukt wirusa MYXV skierowany przeciwko macierzystym komórkom glejaka (BTIC, ang. *brain tumor initiating cells*), w połączeniu z nanoformulacją nowatorskiego chemioterapeutyku, zdolną do przenikania fizjologicznej bariery krew-mózg.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W latach 2011-2012 odbyłam roczny staż podoktorski jako wolontariusz w Laboratorium Biologii Rozwoju i Nowotworów kierowanym przez prof. Agnes Noel (GIGA-Cancer Center, Uniwersytet w Liège, Belgia). Moja praca dotyczyła badania roli metaloproteinazy MT4-MMP i receptora czynnika wzrostu EGFR w przerzutach ludzkiego potrójnie ujemnego raka piersi. Staż ten (równoczesowy z urlopem wychowawczym) pozwolił mi nabyć nowe doświadczenia w stosowaniu różnych technik biologii molekularnej oraz umożliwił aplikowanie na stanowisko typu post-doc w kolejnym zagranicznym laboratorium.

W latach 2012-2015 podjęłam pracę jako post-doc w laboratorium prof. Alaina Vanderplasschena na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Liège w ramach projektu pt. Cyprinid herpesvirus 3 encodes two homologues of the TNF receptor superfamily: study of their roles in the biology of the infection *in vitro* and *in vivo*. W Projekcie tym, finansowanym przez FNRS (Fonds National Belge de la Recherche Scientifique; grant 7091641) prowadziłam badania dotyczące interakcji pomiędzy rybem herpeswirusem (cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3) i jego gospodarzem tj. karpem (*Cyprinus carpio* L.). W ramach realizowanego projektu badałam białka wirusowe, które pośredniczą w ucieczce wirusa spod nadzoru immunologicznego (w tym głównie ORF4 i ORF12). Owocem stażu i współpracy z prof. Vanderplasschenem były cztery publikacje, których jestem współautorką (Załącznik 5 pkt II.4 Prace po uzyskaniu stopnia doktora, nr 4-7).

W 2015 roku nawiązałam współpracę z prof. Grantem McFaddenem, światowym autorytetem w dziedzinie badań nad onkolitycznym wirusem myksomatozy i współpracę tą kontynuuję do dziś. W 2017 odbyłam miesięczny staż w laboratorium prof. Granta McFaddena w Centrum Immunoterapii, Szczepionek i Wiroterapii usytuowanym w Instytucie

Biodesign przy Uniwersytecie Stanowym w Tempe, Arizona, USA. W ramach tego stażu wykonałam badania dotyczące określenia czy w transferze wirusa myksomatozy z mezenchymalnych komórek macierzystych do komórek nowotworowych biorą udział wirusy rodzicielskie czy też wirusy potomne. Jak dotąd we współpracy z prof. Grantem McFaddenem ukazały się cztery publikacje, których jestem głównym i korespondencyjnym autorem (Załącznik 5 pkt.I.2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, 1-4).

W 2019 odbyłam 10-dniowy staż w Instytucie Badań nad Rakiem w Londynie (Institute of Cancer Research), gdzie w Zespole Przedklinicznego Obrazowania Molekularnego kierowanym przez prof. Gabrielę Kramer-Marek doskonaliłam swoje umiejętności w przeprowadzaniu na myszach zabiegów chirurgicznych i mikrochirurgicznych; mogą one okazać się przydatne w moich badaniach nad doświadczalną terapią m.in. glejaka.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Osiągnięcia dydaktyczne

W trakcie studiów magisterskich na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŚ ukończyłam kurs pedagogiczny, dzięki któremu uzyskałam kwalifikacje do nauczania biologii. W trakcie pracy w Narodowym Instytucie Onkologii w Gliwicach (NIO) sprawowałam opiekę nad studentami w ramach wolontariatów, praktyk i staży studenckich takich jak praktyki z technik biologii molekularnej (2003-2010); praktyki w ramach programu BIOSART (2018 i 2019) oraz praktyki w ramach programu CheS – Chemik na Staż (2019).

Byłam opiekunem 5 prac magisterskich (w tym kierowałam wykonaniem 2 prac magisterskich realizowanych we współpracy z Politechniką Śląską w Gliwicach) oraz 2 prac inżynierskich. Obecnie jestem promotorem pomocniczym dwóch doktorantek realizujących w NIO swoje projekty: w ramach Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach (mgr inż. Agata Hadryś, promotor: dr hab. Violetta Kozik, prof. UŚ) jak również Szkoły Doktorskiej przy Politechnice Śląskiej w Gliwicach (mgr inż. Kinga Pogoda-Mieszczak, promotor dr hab. Magdalena Skonieczna, prof. Politechniki Śląskiej). Dodatkowo pełniłam rolę tzw. tutora w przewodzie doktorskim mgr inż. Agaty Hadryś.

Osiągnięcia organizacyjne

Połączenie wiedzy wirusologicznej oraz doświadczenia zdobytego podczas stażu w Belgii z zainteresowaniami przeciwnowotworową terapią onkologiczną zaowocowało utworzeniem przeze mnie od podstaw laboratorium wirusowego w Centrum Badań

Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów w obecnym Narodowym Instytucie Onkologii w Gliwicach oraz podjęciem tam nowego tematu badawczego jakim jest zastosowanie wirusów onkolitycznych w terapii nowotworów. Przy współudziale dr Aleksandra Sochanika uruchomiliśmy Pracownię Wirusoterapii Onkolitycznej i Nanooskładników Leków co pozwala prowadzić badania doświadczalne nad zastosowaniem wirusa myksomatozy w terapii przeciwnowotworowej oraz prace nad terapiami skojarzonymi na modelach zwierzęcych. Rozpoczęcie i prowadzenie tych badań umożliwiają mi granty badawcze, przyznane w ramach konkursu CRP/POL16-02_EC (Międzynarodowego Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii; ICGB) oraz konkursu Harmonia 8 Narodowego Centrum Nauki (UMO-2016/22/M/NZ6/00418).

Jestem członkiem Stowarzyszenia na Rzecz Wspierania Badań nad Rakiem działającego od ponad 20 lat przy Narodowym Instytucie Onkologii w Gliwicach oraz członkiem Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych.

Osiągnięcia popularyzujące naukę

Równolegle z prowadzeniem badań w Narodowym Centrum Onkologii w Gliwicach nad użyciem wirusów onkolitycznych w terapii, staram się popularyzować wiedzę dotyczącą takich wirusów poprzez wygłaszanie wykładów i seminariów w miejscu zatrudnienia jak i w placówkach naukowych, z którymi współpracuję (Centrum Immunoterapii, Szczepionek i Wirusoterapii przy Instytucie Biodesign na Uniwersytecie Stanowym Arizony w Tempe oraz Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie).

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Przed ukończeniem studiów magisterskich odbyłam 5-miesięczny staż w ramach Programu Wspólnotowego Sokrates/Erasmus w Laboratorium Kontroli Jakości i Higieny Żywności (Wydział Nauki i Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Atenach, Grecja). Moja praca polegała na wykonywaniu analiz mikrobiologicznych produktów dostarczanych z lokalnych zakładów przetwórstwa mięsnego oraz dotyczyła weryfikacji punktów krytycznych systemu zarządzania bezpieczeństwem żywności. Po ukończeniu studiów magisterskich na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach podjęłam w styczniu 2002 zatrudnienie w ówczesnym Centrum Onkologii-Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach. Jako biolog a później asystent naukowo-badawczy w Zakładzie Biologii Molekularnej kierowanym przez prof. Stanisława Szalę prowadziłam badania z

wykorzystaniem różnych modeli mysich nowotworów. Jeden z wątków mojej samodzielnej pracy badawczej dotyczył możliwości wykorzystania bakterii onkolitycznych, w tym genetycznie modyfikowanej bakterii *Salmonella typhimurium*, w terapii przeciwnowotworowej (Załącznik 5 pkt II.4. Prace przed uzyskaniem stopnia doktora, nr 14-15).

Dalsza moja praca dotyczyła klonowania genu wazostatyny i jej wykorzystania w terapii genowej mysiego czerniaka B16-F10. Następnie opracowałam metodę otrzymywania białka rekombinowanego wazostatyny w systemie bakteryjnym. Wykazałam, że zarówno antyangiogenna terapia genowa z użyciem genu wazostatyny i skojarzona z antyangiogenną chemioterapią, jak również terapia z użyciem białka fuzyjnego MBP/wazostatyna mogą być skutecznymi strategiami w leczeniu nowotworów. W roku 2007 uzyskałam stopień doktora nauk medycznych za pracę pt. „Wazostatyna w terapii czerniaka B16(F10) u myszy”. Uzyskane w doktoracie wyniki opisałam w dwóch publikacjach (Załącznik 5 pkt II.4. Prace przed uzyskaniem stopnia doktora, nr 10-11).

W latach 2003-2005 w ramach współpracy pomiędzy Zakładem Biologii Molekularnej a Zakładem Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej kierowanym przez prof. dr hab. Barbarę Jarząb brałam udział, razem z dr Aleksandrem Sochanikiem i dr Magdaleną Olbryt, w pracach laboratoryjnych prowadzących do zainaugurowania w ówczesnym Instytucie Onkologii w Gliwicach działalności pierwszego w kraju Laboratorium Mikromacierzy DNA wykorzystującego mikromacierze oligonukleotydowe Affymetrix (Załącznik 5 pkt II.4. Prace przed uzyskaniem stopnia doktora, nr 12).

W latach 2008-2009 uczestniczyłam, również z ramienia Zakładu Biologii Molekularnej i w ramach współpracy z prof. Jerzym Hołowieckim z Kliniki Transplantacji Szpiku i Onkohematologii w czynnościach związanych z preparatyką szpiku kostnego pobieranego operacyjnie z talerza biodrowego pacjentów z nowotworami hematologicznymi oraz w badaniach dotyczących wpływu stężenia DMSO w mieszaninie krioprezerwacyjnej na żywotność zamrożonego szpiku przechowywanego w Banku Komórek Krwiotwórczych.

W trakcie mojej aktywności zawodowej uczestniczyłam w 13 projektach badawczych. Byłam kierownikiem zadania w grantie zamawianym finansowanym przez MNiI oraz kierownikiem projektu zagranicznego otrzymanego w ramach konkursu CRP/POL16-02_EC finansowanego przez Międzynarodowe Centrum Inżynierii Genetycznej i Biotechnologii (ICGEB). W pozostałych grantach krajowych finansowanych przez KBN, MNiSW i NCN oraz w dwóch projektach zagranicznych (w tym jako post-doc w projekcie finansowanym przez FNRS, Belgia) byłam wykonawcą. Obecnie jestem kierownikiem projektu badawczego

finansowanego w ramach konkursu Harmonia 8 przez NCN dotyczącego nowych terapii czerniaka, raka trzustki i glejaka (Załącznik 5 pkt II.9. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych).

W połowie br. złożyłam wniosek grantowy do NCN (OPUS 23) pt. „Kombinowana strategia leczenia doświadczalnego raka trzustki w oparciu o onkolityczny wirus myksomatozy, chemioterapię, inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych i radioterapię” dotyczący dalszych badań nad skojarzoną terapią doświadczalnego raka trzustki u myszy.

Posiadam niezbędne uprawnienia do pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi. Podczas mojego stażu podoktorskiego w Belgii uzyskałam Certyfikat FELASA (Kategoria C). Ponadto w 2015 uzyskałam Certyfikat PolLASA. Z kolei w 2022 odbyłam specjalistyczną praktykę w Centrum Szkolenia Chirurgicznego René Remie w Almere (Holandia), gdzie pozyskałam niezbędne doświadczenie w zakresie mikrochirurgii naczyniowej małych zwierząt laboratoryjnych. Obejmuje ono m. in. dotętnicze podawanie leków poprzez zakładanie cewnika w obrębie tętnicy szyjnej oraz przewodu żółciowego w dwunastnicy u myszy. Nabyte umiejętności zostaną wykorzystane w terapii doświadczalnej glejaka a także raka trzustki na ortotopowych modelach mysich, przy użyciu konstruktów wirusa myksomatozy i mezenchymalnych komórek macierzystych.

W latach 2020-2021 byłam ekspertem w zespole badawczo-projektowym PBL przy Centrum Nowoczesnego Kształcenia Politechniki Śląskiej w Gliwicach Projekt POWR-03.05.00-00- Z098/17-00 pt. „Antynowotworowa terapia fotodynamiczna (PDT) w hamowaniu rozwoju macierzystych komórek nowotworowych i ograniczająca infekcje wirusowe u osób otyłych”.

Kierowane przeze mnie projekty badawcze w połączeniu z doświadczeniem i współpracą zawodową zdobytymi podczas staży zagranicznych pozwoliły mi na wyodrębnienie własnej tematyki badawczej i utworzenie niewielkiego zespołu w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów; w skład tego zespołu wchodzi obecnie dwoje doktorów i dwie doktorantki oraz studenci Politechniki Śląskiej i Uniwersytetu Śląskiego. Prowadzone w ramach zespołu badania dotyczą opracowania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu tzw. „trudnych” nowotworów. Zespół, którego pracę nadzoruję umożliwia realizację kolejnych prac magisterskich oraz doktorskich.

Szereg prowadzonych przeze mnie badań było, jest, lub ich realizacja nastąpi we współpracy z badaczami w innych ośrodkach naukowych: Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie (badania nad możliwością skojarzonej terapii onkolitycznej czerniaka z

wykorzystaniem modelu danio pręgowanego (ang. *zebrafish*); Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach (badania nad wykorzystaniem w terapii nowotworowej pochodnych fenotiazyn); Politechnice Śląskiej w Gliwicach (badania nad wykorzystaniem do celów terapii skojarzonej hydrożeli przenoszących nowe chemioterapeutyki); Uniwersytecie w Liège (Belgia) oraz Uniwersytecie Stanowym Arizony w Tempe, AZ (USA). Współpraca z naukowcami z powyższych ośrodków jest udokumentowana wspólnymi publikacjami albo jest w trakcie realizacji.

Jestem także autorem 4 recenzji manuskryptów dla czasopism naukowych *Molecular Therapy* oraz *Molecular Therapy Oncolytics*.

Wyróżnienia i nagrody

2021: II nagroda w konkursie za najlepszą prezentację plakatową, jako współautor pracy pt. *Myxoma Virus Expressing LIGHT (TNFSF14) Pre-loaded into adipose-derived mesenchymal stem cells is effective treatment for murine pancreatic adenocarcinoma*. The 6th Warsaw Conference on Perspectives of Molecular Oncology, Warsaw, Poland, 15-16.09.2021.

2020: I miejsce w kategorii „Nowe Strategie Terapeutyczne”, jako współautor pracy pt. *Przydatność mezenchymalnych komórek macierzystych jako nośnika wirusa myksomatozy w onkolitycznej wirusoterapii mysiego nowotworu trzustki*. VII Śląskie Spotkania Naukowe, Gliwice, 29-30.05.2020.

2009: III Nagroda Stowarzyszenia na Rzecz Wspierania Badań nad Rakiem za prezentację plakatową, jako współautor pracy pt. *A combination of endoglin-based DNA vaccine and interleukin-12 gene enhances antiangiogenic and antitumor effects*. XIIIth Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland, 20-21.11.2009.

Podsumowanie moich danych naukowych

	Publikacje przed doktoratem	Publikacje po doktoracie	SUMA
Liczba publikacji	6	13	19
Liczba cytowań	Scopus: 70 Web of Science: 66	Scopus: 265 Web of Science: 246	Scopus: 335 Web of Science: 312
Liczba cytowań bez autocytowań	Scopus: 67 Web of Science: 62	Scopus: 212 Web of Science: 196	Scopus: 279 Web of Science: 258
Impact factor (IF)	5,844	69,155	74,999
Punkty MEiN	68	955	1023

INDEKS HIRSCHA na dzień 16.09.2022

Scopus: 10 (bez autocytowań: 9)

Web of Science: 10 (bez autocytowań: 9)

.....
(podpis wnioskodawcy)

LITERATURA

1. Alberts P, Tilgase A, Rasa A, Bandere K, Venskus D. The advent of oncolytic virotherapy in oncology: The Rigvir® story. *Eur J Pharmacol.* 2018; 837, 117–126.
2. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(25):2780-2788.
3. Barte E, McFadden G. Human cancer cells have specifically lost the ability to induce the synergistic state caused by tumor necrosis factor plus interferon-beta. *Cytokine.* 2009;47(3):199-205.
4. Bell J, McFadden G. Viruses for tumor therapy. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):260-265.
5. Cattaneo R, Miest T, Shashkova EV, Barry MA. Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(7):529-540.
6. Chan WM, Rahman MM, McFadden G. Oncolytic myxoma virus: the path to clinic. *Vaccine.* 2013;31(39):4252-4258.
7. Chulpanova DS, Kitaeva KV, Tazetdinova LG, James V, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Application of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Agent Delivery in Anti-tumor Treatment. *Front Pharmacol.* 2018;9:259.
8. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
9. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986;315(26):1650-1659.
10. Ferrini E, Stellari FF, Franceschi V, et al. Persistency of Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Lungs. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:709225.
11. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev.* 2009;18(5):683-692.
12. Glorieux C, Xia X, You X, et al. Cisplatin and gemcitabine exert opposite effects on immunotherapy with PD-1 antibody in K-ras-driven cancer. *J Adv Res.* 2022;40:109-124.
13. Hadryś A, Sochanik A, McFadden G, Jazowiecka-Rakus J. Mesenchymal stem cells as carriers for systemic delivery of oncolytic viruses. *Eur J Pharmacol.* 2020;874:172991. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172991. Epub 2020 Feb 7.
14. Harrington K, Freeman DJ, Kelly B, Harper J, Soria JC. Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2019, 18, 689–706.
15. Krześlak A. Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów. *Postepy Hig Med Dosw.* 2010;64:490-503.
16. Jazowiecka-Rakus J, Sochanik A, Rusin A, et al. Myxoma Virus-Loaded Mesenchymal Stem Cells in Experimental Oncolytic Therapy of Murine Pulmonary Melanoma. *Mol Ther Oncolytics.* 2020;18:335-350.
17. Maker AV. Precise identification of immunotherapeutic targets for solid malignancies using clues within the tumor microenvironment-Evidence to turn on the LIGHT. *Oncoimmunology.* 2015;5(1):e1069937.
18. Mardi A, Shirokova AV, Mohammed RN, et al. Biological causes of immunogenic cancer cell death (ICD) and anti-tumor therapy; Combination of Oncolytic virus-based immunotherapy and CAR T-cell therapy for ICD induction. *Cancer Cell Int.* 2022;22(1):168.

19. Padoan A, Plebani M, Basso D. Inflammation and Pancreatic Cancer: Focus on Metabolism, Cytokines, and Immunity. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):676.
20. Principe DR, Narbutis M, Kumar S, Park A, Viswakarma N, Dorman MJ, Kamath SD, Grippo PJ, Fishel ML, Hwang RF, Thummuri D, Underwood PW, Munshi HG, Trevino JG, & Rana A. Long-Term Gemcitabine Treatment Reshapes the Pancreatic Tumor Microenvironment and Sensitizes Murine Carcinoma to Combination Immunotherapy. *Cancer Res.* 2020, 80, 3101–3115.
21. Rahman MM, McFadden G. Oncolytic Viruses: Newest Frontier for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2021;13(21):5452.
22. Raman SS, Hecht JR, Chan E. Talimogene laherparepvec: Review of its mechanism of action and clinical efficacy and safety. *Immunotherapy* 2019, 11, 705–723.
23. Sarantis P, Koustas E, Papadimitropoulou A, Papavassiliou AG, Karamouzis MV. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World J Gastrointest Oncol.* 2020;12(2):173-181.
24. Šedý JR, Ramezani-Rad P. HVEM network signaling in cancer. *Adv. Cancer Res.* 2019, 142, 145–186.
25. Stanford MM, McFadden G. Myxoma virus and oncolytic virotherapy: a new biologic weapon in the war against cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7(9):1415-1425.
26. Stanford MM, Werden SJ, McFadden G. Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet Res.* 2007;38(2):299-318.
27. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2012;21(14):2724-2752.
28. Sugawara K, Iwai M, Ito H, Tanaka M, Seto Y, Todo T. Oncolytic herpes virus G47Δ works synergistically with CTLA-4 inhibition via dynamic intratumoral immune modulation. *Mol Ther Oncolytics* 2021, 22, 129–142.
29. Tosić V, Thomas DL, Kranz DM, et al. Myxoma virus expressing a fusion protein of interleukin-15 (IL15) and IL15 receptor alpha has enhanced antitumor activity. *PLoS One.* 2014;9(10):e109801.
30. Wang G, Barrett JW, Stanford M, Werden SJ, Johnston JB, Gao X, Sun M, Cheng JQ, McFadden G. Infection of human cancer cells with myxoma virus requires Akt activation via interaction with a viral ankyrin-repeat host range factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(12):4640-5.
31. Wei D, Xu J, Liu XY, Chen ZN, Bian H. Fighting Cancer with Viruses: Oncolytic Virus Therapy in China. *Hum Gene Ther.* 2018, 29, 151–159.
32. Wennier SJ, Liu J, Li S, Rahman MM, Mona M, McFadden G. Myxoma virus sensitizes cancer cells to gemcitabine and is an effective oncolytic virotherapeutic in models of disseminated pancreatic cancer. *Mol Ther.* 2012 Apr;20(4):759-68.
33. Yoon AR, Rivera-Cruz C, Gimble JM, Yun CO, Figueiredo ML. Immunotherapy by mesenchymal stromal cell delivery of oncolytic viruses for treating metastatic tumors. *Mol Ther Oncolytics.* 2022;25:78-97.
34. Zhang W, Ji L, Zhong X, et al. Two Novel Nomograms Predicting the Risk and Prognosis of Pancreatic Cancer Patients With Lung Metastases: A Population-Based Study. *Front Public Health.* 2022;10:884349.