

Prof. dr hab. inż. Maciej Bagiński

Katedra Technologii Leków i Biochemii

Wydział Chemiczny

Politechnika Gdańska

Ul. Narutowicza 11/12

80-233 Gdańsk, Polska

Tel.: (58) 347 15 96

e-mail: chemmbag@pg.edu.pl



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

Gdańsk 24.01.2025

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr. inż. Michała Mikitiuka

Tytuł:

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

Przedstawiona do recenzji praca stanowi przedstawienie i omówienie wyników badań prowadzonych przez mgr. inż. Michała Mikitiuka na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. Rozprawa doktorska została przygotowana w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy. Promotorem pracy jest Prof. dr hab. Krzysztof Bielawski, a opiekunem ze strony firmy Reception Sp. z o.o. (z Gdańska) dr Tomasz Sitara. Praca jest przedstawiona w formie klasycznej rozprawy doktorskiej liczącej sobie w sumie 145 stron. Praca została przedstawiona Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego celem nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

Omawiając tematykę pracy należy podkreślić, że jest ona bardzo ciekawa i bardzo nowatorska. Poszukiwanie bowiem leków biologicznych o działaniu przeciwnowotworowym wykorzystujących immunoterapię jest nadal pionierskie i w sumie nie wyszło znacząco poza zakres badań klinicznych. Ze względu też na koszty takich preparatów jest to wciąż raczej ograniczona terapia. Jednym z celów w immunoterapii przeciwnowotworowej jest przywrócenie limfocytom T zdolności do oddziaływania cytotoksycznego wobec komórek nowotworowych. Przywrócenie to polega na zablokowaniu możliwości oddziaływania wybranych ligandów białkowych (np. PD-L1) obecnych na powierzchni komórek nowotworowych z receptorami hamującymi intensywność odpowiedzi immunologicznej obecnych na limfocytach. Blokada tych ligandów może być realizowana na wiele sposobów, ale jednym z nich jest ich selektywna degradacja. Degradacja taka może być przeprowadzona poprzez internalizację tych ligandów do wnętrza komórki do lizosomów, gdzie następnie ulegną lizie. Jest to naturalna droga transportu dużego cargo do wnętrza komórki. Jedną z technik takiej internalizacji jest technika LYTAC (Lysosome Targeting Chimera), wykorzystująca naturalne receptory np. takie jak IGF2R, które transportują różne cargo do wnętrza komórki w celu jego trawienia. Doktorant prowadził swoje badania właśnie w oparciu o ten mechanizm.

Celem nadrzędnym pracy było otrzymanie ligandów białkowych (białka fuzyjne), które rozpoznawałyby selektywnie jednocześnie receptor IGF2R odpowiedzialny za internalizację, jak też ligand PD-L1 przeznaczony do degradacji, a odpowiedzialny za hamowanie odpowiedzi immunologicznej w stosunku do komórek nowotworowych. Do celu

nadrzędnego prowadziło szereg celów pośrednich wymienionych na str. 46 w rozdziale „Cel pracy”. Zarówno cele pośrednie jak i cel nadrzędny został osiągnięty. Otrzymano kilka białek fuzyjnych, z których zwłaszcza jedno, C5M1A, wykazuje bardzo interesujące właściwości terapeutyczne potwierdzone *in vitro*. Jest to znacząca nowość naukowa, która stała się przedmiotem zgłoszenia patentowego i po szerszym przebadaniu przedklinicznym i dalszej optymalizacji, o czym mowa jest obszernie w dyskusji wyników, może mieć zastosowanie chemoterapeutyczne – docelowo stać się lekiem. Zatem pod względem naukowym bardzo wysoko oceniam pracę doktorską pana Mikitiuka.

Co do układu pracy to jest to klasyczny układ zawierający streszczenie, wstęp, cel pracy, metody, wyniki, dyskusję, wnioski i spis literatury (ponad 210 pozycji). Zwłaszcza wstęp jest bardzo dobrze przygotowany i zawiera nie za długi, ale bardzo profesjonalny opis odpowiedzi immunologicznej w nowotworach, immunoterapii nowotworów i technologii ukierunkowanej degradacji białek w tym LYTAC. Wstęp oprócz omówienia tematyki przedstawia również motywację do podjęcia badań. Ponad to warto zauważyć, że opis stanu wiedzy przedstawiony we wstępie opiera się wielokrotnie na najnowszych artykułach naukowych pochodzących z ostatnich 3 lat. Rozdziały opisujące metody i wyniki są generalnie poprawnie przedstawione – pewne uwagi przedstawiam poniżej. Omówienie wyników jest dość obszerne, a ostatni rozdział przedstawia konkluzje, które rzeczywiście pokazują znaczące osiągnięcia. Doktorant przedstawia też perspektywę dalszej pracy nad otrzymanymi konstruktami białkowymi.

Bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską i otrzymane wyniki, ale z obowiązku recenzenta muszę przedstawić pewne uwagi krytyczne czy też postawić pytania, na które nie znalazłem satysfakcjonującej odpowiedzi w pracy.

Uwagi ogólne:

1. Na str. 11 Doktorant przedstawia „CEL PRACY”, ale podaje tylko cele pośrednie, niejako zadania do celu nadrzędnego, a nie definiuje samego celu nadrzędnego.
2. Na str. 58 Doktorant opisuje w metodach modelowanie molekularne polipeptydów bazujących na strukturze IGF2 (6UM2). Informacja tam zawarta nie jest jednak wyczerpująca. Nie ma np. informacji jak w tym modelowaniu uwzględniono wymóg selektywności w stosunku do IGF2, a nie IGF1 co było m.in. celem pracy. Tym bardziej jest to ważne, iż struktury zawierające IGF1 istnieją w pdb (np. 7YRR). Struktura 6UM2, jaką zajmował się Doktorant jest dość nietypowa, gdyż odległość pomiędzy Ser29 i Gly41 (brakujący fragment) wynosi mniej niż 4 Å, a więc całe modelowanie tej przerwy za pomocą wstawionych reszt aminokwasowych jest bardzo istotnym elementem budowy peptydu. Wzmianka jest o programie Rosetta, ale np. takie techniki jak dynamika molekularna prawdopodobnie byłyby bardziej przydatne.
3. Na str. 63 przedstawiony jest schemat domen w projektowanym konstrukcie białkowym, który zawiera różne peptydy M1-M5. W sumie w pracy nie podano jak kierowano się wyborem sekwencji tych peptydów i co było racjonalną przesłanką ich zaprojektowania w takiej sekwencji.
4. Na str. 77 Doktorant podał, iż w pracy wykorzystano trzy ludzkie, nowotworowe linie komórkowe (piersi, macicy, trzustki). W sumie nie podano dlaczego akurat te modele komórkowe były przedmiotem badań i dlaczego tylko trzy modele wzięto pod uwagę.
5. Na str. 90 rys. 25 i na str. 91 podano, że wszystkie testowane peptydy M1-M5 wykazywały wyższe powinowactwo do domeny 11 IGF2R niż natywny IGF2. Czy można to jakoś wyjaśnić? Zazwyczaj trudno jest zaprojektować taki peptyd, który byłby lepszy niż naturalny substrat. Czy wyszło tak przypadkiem, czy stosowano może jakąś „technologię” na etapie projektowania aby taki efekt osiągnąć?

6. Na str. 94 Doktorant wspomina o problemie niestabilności otrzymanego białka fuzyjnego pod drugim oczyszczaniem i do tego problemu później też nawiązuje dalej w omówieniu wyników i dyskusji. Jest to spory problem jeżeli wziąć pod uwagę, zastosowanie takiego preparatu w praktyce klinicznej. Czy mogę prosić o jakiś komentarz, jak z tym można sobie poradzić?

Uwagi szczegółowe i edytorskie:

1. Definicja terminu IC_{50} nie jest poprawna – nie jest to połowa maksymalnego stężenia inhibującego, a jest to stężenie powodujące 50% inhibicję danego procesu.
2. Na str. 11 we wstępie Doktorant podaje dużo wartościowych literaturowych statystycznych danych o nowotworach, ale nie podaje jakich krajów czy kontynentów, czy całego świata to dotyczy.
3. Poczynając od str. 82, praktycznie wszystkie rysunki zawierające wyniki z analiz chromatograficznych nie zawierają opisu pików. U góry każdego rysunku są jakieś mikroskopijne maszynowe opisy ale są one zupełnie nieczytelne. W związku z tym w legendzie albo na rysunku powinien ten opis być dorobiony.
4. Na str. 107 i następnych mikroskopowe obrazy (rys. 50-52) są praktycznie nieczytelne. Można jedynie wierzyć, że zawierają to co przedstawia opis.
5. Na końcu pracy nie ma podanego spisu osiągnięć Doktoranta w postaci publikacji, doniesień konferencyjnych itp.

Podsumowanie:

Pomimo moich pewnych uwag krytyczno-dyskusyjnych przedstawionych powyżej uważam, że tematyka pracy doktorskiej jest wysoce ciekawa i osiągnięcie Doktoranta jest bardzo znaczące. Wkład jego badań w rozwój nowych chemoterapeutyków biologicznych o działaniu przeciwnowotworowym jest znaczący, a praca zawiera duży ładunek nowości naukowej. Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Biotechnologia UG o dopuszczenie Pana **Mgr. inż. Michała Mikitiuka** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie:

Jednocześnie zapoznając się z warunkami nadawania wyróżnień pracom doktorskim w ramach Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej pana Mikitiuka. Przedstawione osiągnięcie jest bowiem unikatowe na skalę światową. Otrzymanie nowego obiecującego konstrukt białkowego, który może po optymalizacji zostać lekiem przeciwnowotworowym działającym w oparciu o odblokowanie reakcji immunologicznej jest dość rzadkie. Przedstawiona tematyka i obszar terapii przeciwnowotworowych opartych o układ immunologiczny są wciąż nowatorskie i nie ma jeszcze skutecznych rozwiązań w szerszej praktyce klinicznej. Otrzymany przez Doktoranta (działającego na uczelni i w firmie) produkt, który przewyższa parametrami (przynajmniej *in vitro*), jak wykazano w pracy, produkty działające w oparciu o ten sam mechanizm, ale będące już w III fazie klinicznej, jest dużym sukcesem. Ponad to, jak wynika z opisu, zostało dokonane zgłoszenie patentowe, a zatem wpisuje się to w regulamin przyznawania wyróżnień. Warto, też dodać, że dyskusja wyników zawiera też elementy ekonomii produktu, co w przypadku leków biologicznych jest wysoce zasadne. Bez bowiem obniżania kosztów tego typu terapie nie mogą być szerzej stosowane.

