

Grzegorz Dubin

ul. Gronostajowa 7a, 30-387 Kraków

(+48) 664-143-130
grzegorz.dubin@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Mikitiuka pt. Opracowanie mulitspecyficznych, fuzyjnych białek indukujących ukierunkowaną, lizosomalną degradację receptorów hamujących aktywność układu immunologicznego.

Rozprawa doktorska została przygotowana w firmie Recepton Sp. z o.o. pod opieką dra Tomasza Sitara w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy. Promotorem w przewodzie doktorskim jest prof. dr hab. Krzysztof Bielawski z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUM.

Pomimo znacznego postępu medycyny nowotwory pozostają znaczącą przyczyną przedwczesnej śmierci w krajach rozwiniętych. W ostatnim dziesięcioleciu immunoterapie zmieniają potencjał przeciwnowotworowy medycyny, jednak z uwagi na osobniczy charakter odpowiedzi poszukuje się wciąż nowych związków aktywnych. W niniejszej rozprawie autor proponuje takie podejście, obejmujące Lysosome Targeting Chimeras (LYTAC). Częsteczki te wiążą cel molekularny z receptorem ukierunkowanych do przedziału komórkowego przeprowadzającego degradację, co skutkuje degradacją celu molekularnego. Przykładem tego typu podejścia są np. prace opisywane w artykule „Transferrin receptor targeting chimeras for membrane protein degradation” (Nature, 2025, 638:787-795). Autor pracy doktorskiej proponuje podejście w którym cel molekularny (PD-L1) jest wiązany do receptora IGF2R przy pomocy białkowych cząsteczek hybrydowych posiadających domeny zapewniające powinowactwo do celu molekularnego i receptora. W rozprawie opisano tworzenie rekombinowanych białek hybrydowych oraz ich zdolność do indukcji internalizacji celu molekularnego. Opracowane cząsteczki wykazują efekt podobny jak blokery punktu kontrolnego PD-1/PD-L1, jednak działając przez inny mechanizm funkcjonalny mają szansę obejścia oporności/braku odpowiedzi na blokery PD-1/PD-L1 stosowane obecnie klinicznie.

Rozprawa posiada klasyczny układ. We wstępie autor prezentuje stan wiedzy przedstawiając ważniejsze z punktu widzenia pracy aspekty procesu nowotworzenia, immunoterapii, oraz oporności na immunoterapie. Następnie autor charakteryzuje system insulinopodobnego czynnika wzrostu i technologie ukierunkowanej degradacji białek. Informacja jest wystarczająca w kontekście dalszego opisu wyników i dyskusji.

Z ważniejszych wyników zawartych w części eksperymentalnej, autor rozpoczyna od opisu produkcji białek referencyjnych niezbędnych do realizacji dalszych prac. Następnie charakteryzuje wiązanie wymodelowanych peptydów do receptora docelowego, nie podejmuje jednak szerszych prób optymalizacji wiązania. Z jednej strony jest dla mnie zaskakujące, iż peptydy wymodelowane w tak prosty sposób w ogóle wykazują jakiekolwiek wiązanie. Z drugiej strony dostępnych jest szereg metod pozwalających na prostą optymalizację wiązania peptydów (lub selekcji de novo peptydów wiążących o wysokim powinowactwie). Autor nie podaje stałych dysocjacji wybranych przez siebie peptydów, zakładam jednak, iż istnieje tu duże pole do optymalizacji, a więc do zwiększenia aktywności (a więc docelowo do zmniejszenia dawek). Szkoda, że metody takie nie zostały wykorzystane szczególnie, iż autor wykazuje iż biwalentne przeciwciała działają efektywniej niż fuzje z peptydem – istnieje duże prawdopodobieństwo, iż jest to związane z powinowactwem. W kolejnej części autor uzyskuje wybrane cząsteczki LYTAC w systemach rekombinowanych i pokazuje, że wiążą one wybrane cele molekularne i receptory. Uzyskane cząsteczki LYTAC indukują internalizację rozpuszczalnego celu molekularnego w eksperymentach z wykorzystaniem linii komórkowej. Pomocna byłaby tutaj próba ilościowej charakterystyki danych z mikroskopii konfokalnej. W dalszej kolejności praca dyskutuje wyniki wskazujące na internalizację transbłonowego celu molekularnego. Kulminacją pracy jest wykazanie, iż cząsteczki LYTAC, same nie będąc cytotoksyczne, wykazują zwiększony poziom lizy komórek nowotworowych w obecności PBMC.

Podsumowując część badawczą – autor realizuje stawiany sobie cel, a więc opracowanie cząsteczek LYTAC degradujących PD-L1 przez wiązanie z receptorem IGF2R. Jest to wynik ciekawy i wartościowy jeśli chodzi o próby opracowania nowych metod terapii. Praca jest jednak zrealizowana na poziomie minimalnym, co stanowczo pomniejsza wagę prezentowanych wyników, a niezrealizowany potencjał pozostawia wrażenie niedosytu. Od strony biochemicznej brakuje systematycznej optymalizacji kandydatów na LYTAC by uzyskać pewność, iż cząsteczki które testujemy w dalszych badaniach to maksimum tego co da się osiągnąć stosowanymi metodami. Od strony komórkowej – tutaj braki są jeszcze większe gdyż możliwości są praktycznie nieograniczone. Wykazanie, że cel molekularny jest rzeczywiście degradowany (przeciwciała dla PD-L1 są powszechnie dostępne i wystarczyłby Western Blot), analiza szerszego panelu linii komórkowych, analiza komórek pierwotnych, śledzenie losów LYTAC w komórce, analiza linii z wyłączoną ekspresją receptora – można by wymieniać jeszcze długo. Realizacja choć części z tych badań pozwoliłaby na ugruntowanie ciekawych wniosków płynących z tej rozprawy. W końcu, nieocenione byłyby badania nawet w prostym modelu zwierzęcym. Nic z tego nie znalazło się jednak w pracy.

Części „Dyskusja” i „Materiały i Metody” mają formę charakterystyczną dla prac doktorskich, a zawarte w nich informacje są wystarczające.

Podsumowując całokształt rozprawy doktorskiej, za mocne strony, uważam:

- ciekawa i „na czasie” tematyka badawcza,
- wykazanie iż hybrydowe białka posiadające zdolność jednoczesnego wiązania PD-L1 i IGF2R mają zdolność indukcji degradacji PD-L1 zwiększając tym samym potencjał komórek PBMC do zabijania komórek nowotworowych

Do słabych stron zaliczam:

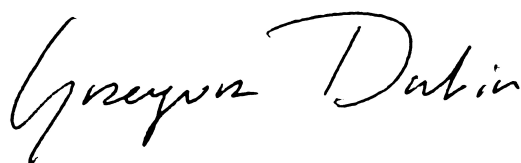
- główną słabą stroną pracy jest ograniczone podejście eksperymentalne. Autor proponuje bardzo ciekawą tematykę i wykazuje skuteczność przyjętego podejścia, niemniej zakres eksperymentalny przyjęty w większości elementów pracy jest zakresem minimum, ledwo wystarczającym by wykazać występowanie spodziewanych efektów. Tym samym całości przedstawionych badań brakuje siły przekonywania charakterystycznej dla opracowań osiągających realny wpływ na rozwój nauki. Szkoda. Gdyż w podejmowanej tematyce drzemie znacznie większy potencjał.
- opracowanie redakcyjne części wyniki odpowiada bardziej periodycznym raportom w grupie badawczej niż rozprawie doktorskiej. Ikografika jest na słabym poziomie redakcyjnym, opisy są nieczytelne, ryciny wyglądają jak dane robocze, a nie ryciny o jakości publikacyjnej. Wiele aspektów opisu jest potraktowanych bardzo pobieżnie lub wspomnianych jedynie zdawkowo. W większości przypadków można się domyślić właściwej interpretacji, nie jest to jednak sposób przedstawiania danych odpowiedni dla wagi opracowania. Wiele danych eksperymentalnych wygląda jak dane z eksperymentów pilotażowych bez dbałości o optymalizację i uzyskanie w dalszym etapie danych w czytelniejszy sposób obrazujących wnioski.

W związku z poruszaną tematyką oraz wymienionymi w recenzji słabszymi stronami rozprawy podczas obrony proszę o odniesienie się do następujących zagadnień:

- (1) wskazanie 3 eksperymentów które mogłyby uatrakcyjnić prezentowane wyniki na tyle by mogły mieć one szansę na publikację w renomowanym czasopiśmie naukowym, takim jak np. Nature Communications czy PNAS (proszę założyć brak ograniczeń w dostępnych zasobach)
- (2) Proszę przedyskutować obniżenie powierzchniowej ekspresji lub traffickingu IGF2R jako mechanizmu uodpornia się na opracowane związki.

(3) W ostatnim zdaniu wstępu do rozdziału 5.5 autor sugeruje, że niższe dawkowanie może przełożyć się na niższe koszty terapii. W przypadku leków generycznych jest to zapewne stwierdzenie prawdziwe. Mówimy tutaj jednak o odkrywaniu leków nowych w chorobach w których nie istnieją dobre alternatywy, a więc koszt terapii w okresie ochrony interesów twórcy jest wysoki. Proszę o analizę wpływu kosztu substancji czynnej na koszt leku w przypadku nowych leków przeciwnowotworowych w okresie obowiązywania ochrony własności intelektualnej. Czy w takim przypadku koszt substancji czynnej rzeczywiście znacząco wpływający na koszt terapii?

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Michała Mikitiuka, pomimo wymienionych w recenzji słabszych stron, spełnia warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Według mojej oceny wyniki przedstawione w rozprawie uzasadniają nadanie kandydatowi stopnia naukowego doktora. Dlatego **wnoszę o dopuszczenie Pana mgr inż. Michała Mikitiuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



prof. dr hab. Grzegorz Dubin
Kierownik Grupy Badawczej
Krystalografii Białek MCB UJ