

Łódź, dn. 18.03.2024 r.

Dr hab. inż. Aneta Białkowska, prof. uczelni
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul. Stefanowskiego 2/22, 90-537 Łódź
aneta.bialkowska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz pt. „Projektowanie, synteza i aktywność biologiczna inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 bazujących na minibiałkach”, wykonanej w Katedrze Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Łukasza Berlickiego

Podstawa formalna

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej z dnia 17 stycznia 2024 roku.

Podstawą prawną wykonania recenzji jest ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Wybór i znaczenie tematu

Podjęta w pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz problematyka badawcza dotycząca projektowania, syntezy i aktywności biologicznej inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 bazujących na minibiałkach jest niezwykle ciekawa i otwiera nowe możliwości terapeutyczne, m.in. w leczeniu nowotworów. Szczególną rolę odgrywa tutaj blokowanie punktów kontrolnych układu immunologicznego, takich jak PD-1/PD-L1. Jak do tej pory najbardziej znaczącą rolę w tym kierunku przypisuje się inhibitorom opartym na przeciwciałach. Na świecie, jak dotąd zatwierdzono łącznie 11 przeciwciał blokujących oddziaływanie PD-1/PD-L1, spośród których 7 zostało zatwierdzonych przez Agencję Żywności i Leków (FDA). Niestety nie jest to rozwiązanie doskonałe, ze względu na potencjalną immunogenność i słabą zdolność przenikania do guzów litych. Dlatego też poszukuje się innych związków, które charakteryzowałyby się niższą toksycznością, lepszą biodostępnością oraz lepszym dostępem do wybranych rodzajów nowotworów. W tym kontekście za rokującą strategię leczniczą uważa się stosowanie do inhibicji oddziaływania PD-1/PD-L1 peptydów oraz związków małowcząsteczkowych. W obrębie tych grup duże nadzieje wiąże się z minibiałkami, które łącząc cechy peptydów i białek mogą efektywnie blokować oddziaływanie białko-białko. Są to najczęściej cząsteczki nie przekraczające masy 10 kDa o ściśle zdefiniowanej strukturze trzeciorzędowej, które można modyfikować w celu poprawy

aktywności biologicznej. Ich stosowanie w skutecznym hamowaniu interakcji PD-1/PD-L1 wymaga jednak kontynuacji badań, które mogą doprowadzić do opracowania innowacyjnych terapii, konkurencyjnych dla immunoterapii przeciwnowotworowej.

W związku z przedstawionymi faktami uważam, że dokonany przez Doktorantkę wybór tematu badawczego jest bardzo trafny i wnoszący wiele elementów nowości, szczególnie ze względu na mało dotychczas poznany w literaturze temat obiekt badań, jakimi są minibiałka. Jest to grupa związków o potencjalnym zastosowaniu medycznym, zwłaszcza w przypadku trudnych celów terapeutycznych, takich jak interakcje białko-białko. W pełni uzasadniona jest zatem realizacja celów postawionych przez Panią mgr inż. Agnieszkę Ciesiołkiewicz w recenzowanej pracy. Już na tym etapie analizy rozprawy doktorskiej należy podkreślić i docenić zakres realizowanych prac związany z dwojakim podejściem do projektowania nowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Pierwsze opierało się na wykorzystaniu stabilnych konformacyjnie minibiałek jako rusztowań do projektowania związków inhibitorowych, a drugie na projektowaniu *de novo* rusztowań wzbogaconych o β -aminokwasy.

Ocena pracy pod względem wymagań formalnych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz ma klasyczną dla tego rodzaju dokumentów strukturę i liczy 190 stron. Składa się z pięciu głównych rozdziałów (wstęp, cel pracy, wyniki i dyskusja, podsumowanie i część eksperymentalna), wzbogaconych streszczeniem w języku polskim i angielskim. Na końcu rozprawy dołączone są, w formie tabel, charakterystyki peptydów. Istotnym elementem pracy jest bibliografia, zawierająca 143 pozycje literaturowe, ponumerowane zgodnie z cytacjami w tekście, umieszczone na 11 stronach tekstu. W pracy znajdują się ponadto 72 rysunki i 27 tabel. W mojej opinii, znacznym ułatwieniem dla czytelnika, byłoby zamieszczenie przez Doktorantkę na końcu pracy spisu rysunków i tabel.

W rozdziale wyniki i dyskusja Doktorantka opisuje kolejne badania, których wyniki rekapitułuje w podrozdziałach zatytułowanych wnioskami. W opinii recenzenta nie są to jednak wnioski, a raczej podsumowania. W dodatku znaczna ich część to obserwacje, a nie wnioski, gdyż generują pytania „dlaczego?” i pozostawiają je bez odpowiedzi. W sumie te rozdziały nie zostały prawidłowo nazwane, z pewnością wskazują na duże umiejętności Doktorantki w obszarze analizy, natomiast umiejętności syntezy i formułowania wniosków należy udoskonalić. Dobrą praktyką jest zamieszczanie w pracy doktorskiej odrębnego rozdziału - dyskusja wyników. W niniejszej pracy tego zabrakło. Myślę, że wartościowa byłaby interpretacja wyników badań Doktorantki i ich konfrontacja z wynikami innych autorów literatury światowej z danego zakresu badawczego. Zdaję sobie jednak sprawę, że nie jest to łatwe, zwłaszcza w przypadku innowacyjnych badań.

Ponadto uważam, że zabrakło w pracy informacji na temat dorobku naukowego Autorki niniejszej dysertacji. Taka wiedza pozwoliłaby dokonać bardziej całościowej oceny dojrzałości naukowej Doktorantki.

Od strony edytorskiej praca jest dobrze przygotowana. Pojawiają się co prawda niefortunne sformułowania i błędy literowe, ale one nie zakłócają odbioru pracy i nie wpływają na wartość naukową rozprawy.

Stwierdzam, że praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim.

Ocena pracy pod względem wymagań merytorycznych

W streszczeniu rozprawy Pani mgr inż. Agnieszka Ciesiołkiewicz przedstawiła obecnie stosowane strategie dotyczące blokowania punktów kontrolnych układu immunologicznego, takich jak PD-1/PD-L1. Zabrakło mi jednak w tej części skróconego opisu najważniejszych informacji o przeprowadzonych doświadczeniach i uzyskanych wynikach.

Kolejny rozdział zatytułowany „Wstęp” liczy 36 stron i zaczyna się wyjaśnieniem roli oddziaływania białko-białko w procesach biologicznych. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka skupia się na omówieniu interakcji PD-1/PD-L1, zwłaszcza w kontekście mechanizmu inicjacji i rozwoju odpowiedzi immunologicznej przeciw nowotworom, a także analizuje strukturę kompleksu obu białek. Duży fragment wstępu Autorka pracy poświęca opisowi różnych inhibitorów wspomnianego oddziaływania, ze szczególnym uwzględnieniem przeciwciał monoklonalnych, peptydów oraz związków małowcząsteczkowych. Ostatni fragment to obszerny opis charakterystycznych cech strukturalnych minibiałek i sposobów stabilizacji ich konformacji.

Nie ma wątpliwości, że do przygotowania części teoretycznej pracy Doktorantka wykorzystwała bogatą literaturę źródłową. Opracowanie to, napisane poprawnym językiem, ujmuje przedmiotową problematykę badawczą i potwierdza dobre przygotowanie do podjętego zadania. Z obowiązku recenzenta odnotowuje pojedyncze błędne sformułowania, takie jak np. „receptor jest ekspresjonowany”, czy „rekrutacja fosfataz”.

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawiła cel pracy, który uważam za interesujący, innowacyjny i praktyczny. W mojej opinii jego realizacja może przyczynić się do dalszego rozwoju dziedziny projektowania i otrzymywania wysoce aktywnych leków opartych na minibiałkach. Pewien niedosyt budzi, moim zdaniem, brak sformułowanych w oparciu o literaturę hipotez badawczych, które byłyby dobrym wstępem do wyników badań własnych i pozwoliłyby Doktorantce na wykazanie w tym obszarze Jej dojrzałości naukowej, a czytelnikowi umożliwiłyby uzyskanie pełnego obrazu szeroko zakrojonych badań.

Rezultaty przeprowadzonych badań i dyskusja wyników zostały wnikliwie omówione w kolejnym, liczącym 94 strony rozdziale zatytułowanym „Wyniki i dyskusja”. Należy podkreślić, że prace badawcze zostały zaplanowane bardzo konsekwentnie i logicznie. Realizację swoich badań Doktorantka rozpoczęła od analizy oddziaływania PD-L1 z wysokoaktywnym, makrocyclicznym peptydowym inhibitorem pAC65 i stanowiło to istotny punkt wyjścia do efektywnego projektowania nowych minibiałkowych inhibitorów. W tym celu Doktorantka przeprowadziła 4-etapową syntezę pochodnej tryptofanu w oparciu o zmodyfikowaną procedurę opracowaną przez firmę Bristol-Myers Squibb (MS). Dalsze badania z tym rodzajem inhibitora, opisane przez Doktorantkę w pracy, zostały przeprowadzone przez członków zespołu prof. Tadeusza Holaka z Zespołu Chemii Bioorganicznej i Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dotyczyły one aktywności biologicznej peptydu pAC65, a także analizy strukturalnej interakcji pomiędzy pAC65 i PD-L1. Jak podaje Autorka uzyskane, poza macierzystą jednostką, wyniki zostały wykorzystane na kolejnych etapach pracy do projektowania nowych inhibitorów docelowego oddziaływania. Za takie Pani Ciesiołkiewicz uznała inhibitory bazujące na strukturze minibiałek. Pierwszym z nich była wilina. Ten wybór jest w pełni uzasadniony, ponieważ ta cząsteczka cechuje się optymalną do syntezy długością sekwencji aminokwasowej, szybkim procesem związania oraz wysoką stabilnością konformacyjną. Doktorantka na podstawie analizy

wymodelowanego kompleksu wilina/PD-L1 wskazała potencjalne miejsca i rodzaje mutacji, a następnie z zastosowaniem protokołu FastDesign oprogramowania Rosetta wytypowała sześć mutantów o najlepszej ocenie. W kolejnym kroku dokonała analizy strukturalnej zsyntetyzowanych minibiałek za pomocą dichroizmu kołowego (CD), skupiając się głównie na identyfikacji obecności struktur drugorzędowych, określeniu stabilności termicznej oraz wyznaczeniu temperatury rozfałdowywania zaprojektowanych inhibitorów. Aby ocenić korelację struktura-funkcja docelowych minibiałek w oddziaływaniu z PD-L1 Autorka oznaczyła aktywność biologiczną peptydów, wykorzystując do tego celu dwie metody: interferometrię biowarstwową (BLI) oraz homogenną czasowo-rozdzielczą fluorescencję (HTRF). Dopelnienie tych badań stanowiły testy blokowania immunologicznego punktu kontrolnego oparte na komórkach (ICB), które wykonane zostały w Zespole Chemii Bioorganicznej i Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Niestety wyniki uzyskane na tym etapie nie były zadowalające i doprowadziły Doktorantkę do wniosku, że wprowadzone mutacje w obrębie 6 z 35 reszt aminokwasowych oryginalnego rusztowania prowadzą do obniżenia stabilności konformacyjnej minibiałek. Nie należy jednak traktować tych wyników jako mało istotnych dla założonego celu, a wręcz przeciwnie, pozwoliły one Autorce postawić cenną hipotezę dotyczącą istnienia więcej niż jednego miejsca wiązania w obrębie PD-L1. Za w pełni uzasadnione należy zatem uznać zmianę rusztowań do projektowania inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Jako pierwsze zostało wybrane minibiałko, które w swojej strukturze posiada charakterystyczną domenę „engrailed”. Po optymalizacji jego struktury Doktorantka zaproponowała miejsca i typu mutacji, a do dalszych badań wskazała cztery sekwencje o najlepszej ocenie. Na podstawie oceny stabilności konformacyjnej i aktywności biologicznej peptydów (natywnego oraz zinyńierowanych), wykonanej w taki sam sposób, jak dla wiliny, Autorka wytypowała dwa inhibitory, oznaczone symbolami E1 i E4. Różnica strukturalna w obrębie tych dwóch peptydów dotyczyła pozycji 23, dla której w przypadku rusztowania E1 występował tryptofan, a E4 histydyna. Ostatecznie, w oparciu o analizę możliwości oddziaływania obu reszt w modelu kompleksów inhibitor/PD-L1 za bardziej efektywny potencjalny inhibitor został uznany peptyd E1. W celu zwiększenia jego aktywności hamującej zaprojektowano wprowadzenie pojedynczych mutacji na powierzchni przeznaczanej do oddziaływania z PD-L1 i oceniono efektywność tej substytucji w oparciu o parametry strukturalne i aktywność biologiczną. Warto podkreślić, że Doktorantka dokonując analizy każdej pozycji przeznaczanej do mutacji opierała się na obserwacji oddziaływań w znanych i opublikowanych kompleksach PD-L1 z naturalnymi partnerami wiązania PD-1, czyli przeciwciałami, takimi jak atezolizumabem, avelumabem i durvalumabem oraz inhibitorami makrocyclicznymi – BMS-57, BMS-71 i pAC65. Za najlepszego kandydata do roli inhibitora badanego oddziaływania Doktorantka uznała peptyd oznaczony symbolem E5. Wykazuje on wartość K_D równą $14,3 \mu\text{M}$, a ilość niezdisocjowanego kompleksu z HTRF wynosi $39,8\%$, co potwierdza jego powinowactwo do celu molekularnego oraz aktywność hamującą, wyższą niż w przypadku peptydu E1. W celu ulepszenia właściwości badanych inhibitorów, a zwłaszcza ich rozpuszczalności, Doktorantka zaproponowała kolejne etapy optymalizacji sekwencji aminokwasowych uzyskanych wcześniej zinyńierowanych minibiałek. Ta praca zaowocowała otrzymaniem minibiałkowych inhibitorów, których aktywność biologiczna była porównywalna do wartości IC_{50} jedyne go dotąd opublikowanego minibiałkowego inhibitora oddziaływania PD-1/PD-L1 – MOPD-1. Struktura trzeciorzędowa tego związku stabilizowana jest głównie przez 3 wiązania disiarczkowe, natomiast w przypadku zinyńierowanych peptydów zaprojektowanych przez Panią Ciesiołkiewicz stabilizacja cząsteczki zachodzi wyłącznie przez hydrofobowy rdzeń. Jak opisuje Autorka

pracy, nie zostały dotychczas opublikowane tego rodzaju inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1. Za właściwe uważam wytypowanie do kolejnej rundy optymalizacji peptydu E32, ponieważ, jak wykazała Autorka, charakteryzował się on brakiem precypitacji podczas pomiarów temperaturowych CD, sigmoidalnym kształtem krzywej denaturacji, wysokim powinowactwem do PD-L1 oraz zdolnością do reaktywacji modelowych komórek limfoidalnych linii Jurkat. Niestety dalsze mutacje w tej cząsteczce nie przyniosły zadowalających rezultatów. To sprawiło, że Doktorantka rozpoczęła badania nad projektowaniem minibiałek zawierających α i β -aminokwasy *de novo*. Warto podkreślić, że tego rodzaju manipulacje w cząsteczkach docelowych peptydów zostały już opisane i wskazują na zwiększenia stabilności i aktywności biologicznej inżynierowanych peptydów. Uważam zatem za w pełni zasadne rozpoczęcie tego rodzaju badań przez Doktorantkę, tym bardziej, że dotychczas nie zostały one opisane w kontekście inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Niestety na tym etapie prac nie udało się zbadać aktywności biologicznej minibiałek zawierających α i β -aminokwasy. Jak sugeruje Autorka, konieczne jest potwierdzenie struktury modelowej z eksperymentalną, a badania są w toku.

Podsumowując tę część pracy stwierdzam, że zakres wykonanych badań był ambitny i ciekawy naukowo. Wyniki badań Doktorantki są cenne i stanowią ważne uzupełnienie zgromadzonej dotychczas wiedzy na temat rodzaju inhibitorów i wpływu ich budowy na oddziaływania PD-1/PD-L1. Mimo, że nie w pełni udało się zrealizować założone cele, to uzyskane wyniki z pewnością posłużą do dalszych badań nad projektowaniem minibiałek wykorzystywanych w blokowaniu interakcji białko-białko.

Po części „Wyniki i dyskusja” Doktorantka, przytaczając i interpretując konkretne badania, dokonała podsumowania uzyskanych wyników.

Rozdział 5 pracy pt. „Część eksperymentalna” zawiera szczegółowe informacje na temat wykorzystanych w pracy metod badawczych i analitycznych. Metody są wiarygodne i nowoczesne. W opinii recenzenta nie budzą zastrzeżeń. Można byłoby jedynie zastanawiać się, czy rozdział ten został właściwie nazwany w niniejszej rozprawie doktorskiej. W opinii recenzenta bardziej pasowałaby tutaj nazwa „Materiały i metody”.

Rozprawa jest podstawą do dyskusji naukowej, a pytania przedstawione poniżej wynikają z czystej ciekawości recenzenta:

1. Czy w wyniku krystalizacji opisanej w p. 5.7. otrzymano odpowiedniej jakości kryształy do badań dyfrakcji rentgenowskiej? Jeśli tak, to w jakich warunkach je uzyskano?
2. Czy istnieją obecnie inhibitory białek - peptydy z modyfikowanymi resztami aminokwasowymi, które przeszły badania kliniczne lub są na zaawansowanym ich etapie?
3. Czy planowane są badania na zwierzętach obiecującego peptydu cyklicznego pAC65?
4. Jakie są dalsze plany badawcze? Jak Pani zdaniem można poprawić rozpuszczalność peptydów z modyfikowanymi resztami, tak aby możliwe były do wykonania testy BLI/HTRF/na komórkach.

Podsumowując, uważam, że mgr inż. Agnieszka Ciesiołkiewicz podjęła bardzo ciekawy temat, wykazując się jednocześnie odpowiednim warsztatem badawczym oraz znajomością tematu. Swoją rolę jako recenzenta nie postrzegam wyłącznie w kontekście wskazania ewentualnych nieprawidłowości i dokonania całościowej oceny rozprawy jedynie przez pryzmat popełnionych błędów. W mojej ocenie, zadaniem recenzenta powinno być przede wszystkim wskazanie tych aspektów, których dopracowanie mogłoby wspomóc dalszy rozwój naukowy Doktorantki. Wszelkie uwagi, komentarze wskazane przeze mnie w recenzji nie stanowią w swej istocie zarzutów o poważnym charakterze merytorycznym, a mają przede wszystkim zachęcić do dyskusji i dalszej wymiany spostrzeżeń.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz pt. „Projektowanie, synteza i aktywność biologiczna inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 bazujących na minibiałkach” spełnia warunki określone w **art. 187 ust. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce** (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.), jest bowiem wartościowym dorobkiem naukowym, wnosi do nauki elementy poznawcze i ma znaczenie dla praktyki. W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ameta Białkowska

