

Prof. dr hab. Wojciech Kamysz  
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 18.04.2023 r.

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Poszukiwanie peptydów oddziałujących z białkami immunologicznymi punktów kontrolnych PD-1 i PD-L1 wykorzystywanych w terapiach nowotworowych”,  
wykonanej przez mgr Magdalenę Annę Bojko.

Nowotwory stanowią poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny, zarówno pod względem diagnozy jak i ich leczenia. Nowotwory są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie – w roku 2020 spowodowały ich ok. 10 mln. Obecnie stosowane terapie przeciwnowotworowe okazują się w wielu przypadkach nieskuteczne dlatego tak istotne jest poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych. Jedną z koncepcji, która jest stosowana w leczeniu chorób nowotworowych jest wykorzystanie leków wpływających na białka związane z punktami kontrolnymi odpowiedzi immunologicznej. Układ immunologiczny jest w stanie rozpoznać komórki nowotworowe dzięki limfocytom T poprzez antygeny obecne na ich powierzchni. W efekcie dochodzi do wyeliminowania komórek nowotworowych przez układ odpornościowy. Niemniej jednak może dojść do sytuacji, w której w wyniku długiej ekspozycji na antygen dojdzie do zwiększenia ekspresji receptorów limfocytów T hamujących odpowiedź układu immunologicznego. Receptory te oddziałując z ligandami na powierzchni komórek nowotworowych hamują odpowiedź układu odpornościowego co prowadzi do namnażania się komórek nowotworowych i postępu choroby. Obecnie są dostępne na rynku leki będące przeciwciałami monoklonalnymi stosowanymi w celu przywrócenia pierwotnej funkcji układu odpornościowego. Przykładami takich leków są atezolizumab, awelumab, durwalumab, ipilimumab, niwolumab oraz pembrolizumab. Niestety stosowanie leków z tej grupy niesie ze sobą stosunkowo wysokie ryzyko występowania skutków ubocznych spowodowanych nadmierną aktywnością układu immunologicznego m.in. perforacja przewodu pokarmowego, endokrynopatie, ciężkie reakcje skórne, zapalenia wątroby, nerek i płuc, gorączka, nudności, osłabienie, uczucie zmęczenia, bóle głowy, stawów i wiele innych. Niewątpliwie ta grupa leków

zasługuje na szczególne zainteresowanie i dalszy rozwój. Doktorantka w swojej pracy podjęła próbę otrzymania peptydów, które mogłyby, podobnie jak wspomniane przeciwciała, przywracać pierwotną funkcję układu odpornościowego poprzez wiązanie się z białkiem PD-1 oraz PD-L1.

Praca doktorska mgr Magdaleny Bojko składa się ze 177 stron, w tym streszczenia w języku polskim oraz angielskim, spisu treści, spisu skrótów, 76 rysunków oraz 21 tabel. Praca została podzielona na wprowadzenie, część teoretyczną, opis celu pracy, wyniki, dyskusję, wnioski, część opisującą materiały i metody, oraz bibliografię składającą się z 275 pozycji oraz podsumowanie dorobku naukowego. Dysertacja jest przygotowana w języku angielskim a jej układ jest typowy dla tego typu prac.

W części teoretycznej w sposób obszerny i szczegółowy ujęty został problem terapii nowotworów ze szczególnym uwzględnieniem immunoterapii. Przedstawiony obecny stan wiedzy dotyczy bezpośrednio tematu pracy, mianowicie hamowaniu punktów kontrolnych układu immunologicznego jako celu terapii przeciwnowotworowej. Uwagę skupiono na opisie dotyczącym białek PD-1 oraz PD-L1. Podkreślono istotę problemu i tym samym uzasadniono prowadzenie dalszych badań nad otrzymaniem odpowiednich inhibitorów uniemożliwiających tworzenie kompleksu PD-1/PD-L1 w celu przywrócenia funkcjonowania układu immunologicznego (jego aktywacji w danym miejscu), co miałyby w dalszej kolejności doprowadzić do zwalczania komórek nowotworu. Praca wzbogacona jest licznymi rysunkami pozwalającymi na lepsze zrozumienie omawianych zagadnień. Rozprawa opiera się na hipotezie, że odpowiednie peptydy są w stanie hamować powstawanie wspomnianego kompleksu. Przeprowadzone badania można podzielić na następujące etapy:

- 1) Zaprojektowanie i synteza peptydów na podstawie sekwencji aminokwasowej białek PD-1 oraz PD-L1;
- 2) Badania stabilności peptydów w pożywce RPMI-1640;
- 3) Badania wpływu peptydów na żywotność komórek wybranych linii komórkowych;
- 4) Badanie oddziaływania peptydów z PD-1 i PD-L1 przy użyciu techniki powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR);



- 5) Test kompetycyjny wiązania się wybranych peptydów do PD-1 i PD-L1 wytwarzanych przez odpowiednie komórki w obecności glikozylowanego PD-L1-Fc lub glikozylowanego PD-1-Fc;
- 6) Badania konformacji wybranego peptydu – PD-1(122-138)<sup>C123-S137C</sup>;
- 7) Zaprojektowanie i synteza serii nowych analogów najlepiej ocenionego związku z pierwszej grupy peptydów otrzymanych na bazie PD-1 oraz wykonanie analogicznych badań oceniających jego wpływ na tworzenie się kompleksu PD-1/PD-L1.

Badania zostały szczegółowo zaplanowane i dobrze przemyślane. Dobre narzędzia badawcze w pełni pozwoliły na gruntowne zbadanie postawionych hipotez. Ponadto na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka dokonała porównania kilku układów linii komórkowych do badania zmian ekspresji genu białka wzmocnionej zielonej fluorescencji (eGFP) w odpowiedzi na obecność kompleksu PD-1/PD-L1 w celu oceny wpływu zaprojektowanych peptydów na tworzenie się tego kompleksu. Pozwoliło to na opracowanie optymalnych warunków danego eksperymentu. Takie podejście jest jednym z przejawów dbałości o jak najwyższą jakość wyników a także świadczy o dojrzałości badawczej Doktorantki.

Warto podkreślić, że praca znalazła wsparcie finansowe w grantach dla młodych badaczy oraz Naukowej Fundacji Polfarmy. Część wyników została opublikowana w artykule – Bojko M, Węgrzyn K, Sikorska E, Kocikowski M, Parys M, Battin C, Steinberger P, Kogut MM, Winnicki M, Sieradzan AK, Spodzieja M, Rodziewicz-Motowidło S. Design, synthesis and biological evaluation of PD-1 derived peptides as inhibitors of PD-1/PD-L1 complex formation for cancer therapy. *Bioorg Chem.* 2022 Nov;128:106047.

Trud włożony w realizację badań zaowocował otrzymaniem związków o pożądanych właściwościach a ich dogłębna charakterystyka pozwoliły na wyciągnięcie istotnych wniosków. Za najbardziej doniosłe osiągnięcia niniejszej rozprawy uważam:

- Otrzymanie peptydów (analogi PD-1), które oddziaływały z PD-L1 hamując tym samym powstawanie kompleksu z PD-1, a także otrzymanie takich peptydów, które uniemożliwiały tworzenie się tego kompleksu w wyniku ich oddziaływania z PD-1 (analogi PD-L1).



- Zbadanie wpływu obecności D-aminokwasów na wiązanie się z PD-L1 i inhibicję kompetycyjną.

W nawiązaniu do poruszanej w rozprawie tematyki, prosiłbym Doktorantkę o udzielenie odpowiedzi na następujące pytania:

- Na stronie 139 opisana jest synteza biotynylowanych peptydów. Ilość biotyny jak i czynnika sprzęgającego – TBTU, były przeliczane w odniesieniu do stopnia osadzenia żywicy. Zgodnie z mechanizmem reakcji i typowym protokołem dla sprzęgania z użyciem TBTU stosunek ilości użytego czynnika sprzęgającego i związku zawierającego grupę karboksylową powinien być 1:1. Z czego wynika użycie 2,36 eq. TBTU i 2,5 eq. biotyny (stosunek 2,36:2,5)?
- Przed oczyszczaniem peptydy zawierające reszty cysteiny poddawane były redukcji za pomocą DTT a następnie ponownie utleniane w celu otrzymania związku z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem disulfidowym. Czy brano pod uwagę zastosowanie 1,2-etanoditiolu (EDT) jako składnika mieszaniny do odszczepiania peptydu od nośnika?
- Z czego wynika wybór długości fali 223 nm i 254 nm? Dlaczego nie skorzystano z długości fali przypadającej na maksimum absorpcji dla układów aromatycznych Trp i Tyr ok. 280 nm, a zamiast tego zdecydowano się na 254 nm?
- Do syntezy zastosowano automatyczny mikrofalowy syntezaor peptydów. Jakie temperatury i czas sprzęgania zastosowano do poszczególnych reszt aminokwasowych?
- W wynikach dla badań stabilności obserwujemy zanikanie sygnału pochodzącego od peptydów. Nie stwierdzono też pojawiania się nowych sygnałów od produktów degradacji. Czy możliwe jest nakładanie się sygnałów produktów degradacji z sygnałami pochodzącymi od związków obecnych w mieszaninie wyjściowej? Jak jeszcze można przeprowadzić badanie stabilności? Czy warto byłoby uwzględnić spektrometrię mas?
- Jakie potencjalne korzyści niesie ze sobą wykorzystanie peptydów w terapii? Jakie aspekty przemawiają za stosowaniem peptydów zamiast przeciwciał?

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa Pani mgr Magdaleny Bojko pt. „Poszukiwanie peptydów oddziałujących z białkami immunologicznych punktów kontrolnych PD-1 i PD-L1 wykorzystywanych w terapiach nowotworowych”, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Anny Bojko do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

**KIEROWNIK**  
Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej

  
*prof. dr hab. Wojciech Kamysz*