



Kraków, 22 grudnia 2021 roku

Prof. dr hab. Katarzyna Starowicz-Bubak
Zakład Neurochemii
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Michalik pt.:
**„Rozwój metod badawczych opartych o białka rekombinowane do charakterystyki potencjalnych
leków w immunoterapii nowotworów”**
**przygotowanej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz w firmie Ryvu Therapeutics
napisanej pod kierunkiem dr hab. Anny Wiśniewskiej-Becker, prof. UJ
oraz dr. Stefana Chmielewskiego.**

Rozprawa doktorska mgr Kingi Michalik dotyczy optymalizacji oraz wykorzystania adekwatnych metod eksperymentalnych do identyfikacji modulatorów celów białkowych w wybranych szlakach immunologicznych z potencjalnym zastosowaniem w immunoterapii nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem roli białka STING (ang. Stimulator Of Interferone Genes), RIG-I (ang. Retinoic Acid-Inducible Gene I) oraz HPK1 (ang. Hematopoietic Protein Kinase 1).

Immunoterapia nowotworów to trend, który odgrywa coraz istotniejszą rolę we współczesnej onkologii. Wprowadzenie do szerokiego użytku przeciwciał monoklonalnych i inhibitorów kinaz tyrozynowych stanowiło ostatni wielki przełom w leczeniu nowotworów. Na początku XXI wieku badacze powrócili do koncepcji przywrócenia właściwego działania mechanizmu układu odpornościowego pacjenta w walce z chorobą nowotworową. Ten trop okazał się strzałem w dziesiątkę. Leczenie wielu nowotworów w najbliższych latach może zdominować immunoterapia aktywizująca układ immunologiczny chorego. Obecnie trwają zaawansowane badania kliniczne nad zastosowaniem różnych cząsteczek immunokompetentnych w wielu typach nowotworów. Immunoterapia nowotworów – obok chirurgii, radioterapii, chemioterapii oraz terapii ukierunkowanych molekularnie – została uznana za podstawową (i bardzo perspektywiczną) metodę leczenia nowotworów złośliwych. Odkrycie cząsteczek immunokompetentnych, które potrafią hamować interakcje komórki nowotworowej z komórkami prezentującymi antygen czy komórkami efektorowymi, stanowi źródło wielkiego postępu w onkologii i onkohematologii. Wiedza badaczy i naukowców na temat immunoterapii nowotworów dynamicznie się poszerza. Pojawiają się nowe

koncepcje, a na świecie prowadzi się obecnie setki badań klinicznych oceniających skuteczność i bezpieczeństwo nowych cząsteczek w leczeniu raka.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest stosunkowo obszerna – podstawowy tekst liczy 314 stron, który poprzedzony jest wykazem skrótów, streszczeniem w języku polskim i angielskim. Spis wykorzystanych źródeł zawarty jest na 33 stronach. W tekście zamieszczono znaczną liczbę, bo aż 120 rysunków, które nadają większą przejrzystość prowadzonym rozważaniom oraz 54 tabele zawierających niezbędne zestawienia, klasyfikacje a dane obliczeniowe uzupełnione są 17 równaniami.

Praca napisana jest poprawnym i zrozumiałym językiem. Podkreślam to jako cechę pozytywną, ze względu na często spotykaną w tego typu opracowaniach styl posługiwania się żargonem naukowym i laboratoryjnym. W nielicznych miejscach można spotkać zapożyczenia i kalki językowe z angielskiego (np. target zamiast cel), jednak są to określenia powszechnie stosowane w tematyce zagadnienia naukowego poruszanego przez doktorantkę i nie budzą one istotnych kontrowersji.

Od strony formalnej praca nie wzbudza zastrzeżeń. Rysunki są wykonane niezmiernie starannie i właściwie opisane, a powoływanie się na źródła jest prawidłowe. Układ rozprawy jest logiczny i przejrzysty.

Promotorem ocenianej pracy doktorskiej jest dr hab. Anna Wiśniewska-Becker, prof. UJ. Dysponuje ona doświadczeniem i znaczącym dorobkiem naukowym w zakresie tematyki ocenianej rozprawy doktorskiej, doktorantce zapewniona została bardzo dobra opieka w ramach wykonywanej pracy. Funkcję promotora pomocniczego pełni dr Stefan Chmielewski, Kierownik Działu Badań nad Immunoonkologią Translacyjną w Ryvu Therapeutics.

OCENA KOMPETENCJI DOKTORANTKI NA PODSTAWIE LITERATURY PRZEDMIOTU WYKORZYSTANEJ W ROZPRAWIE

Stan wiedzy Autorki rozprawy z zakresu wybranej problematyki badawczej oceniam na podstawie zakresu i sposobu zrelacjonowania piśmiennictwa dotyczącego obszaru podjętych badań. Uważam, że ważne jest, aby każdy autor pracy naukowej potrafił krytycznie wyznaczyć granicę wiedzy i obszaru wymagającego poznania, aby dzięki temu umożliwić ocenę własnego wkładu w rozwój nauki. Wykaz literatury podanej na końcu opracowania jest obszerny – jak już wskazywałam wcześniej w recenzji - zawiera 369 publikacji. Autorka podaje znaczną część współczesnych publikacji mających istotną wartość dla prowadzonych rozważań, a gdy podaje publikacje starsze to raczej w kontekście rysu historycznego, prac klasycznych, wybitnych pozycji, mieszczących się w centrum problematyki objętej zakresem rozprawy doktorskiej. Taki dobór literatury pozwolił Autorce uzyskać szeroką i ciekawą perspektywę, w ten sposób buduje solidny fundament, na którym opiera się zasadnicza część pracy, nawet dla osoby nie będącej ekspertem w onkologii. Odnosi się więc wrażenie, że dobór źródeł jest kompletny, a także w znacznym stopniu nieprzypadkowy. Część literaturowa pracy doktorskiej nie pozostawia

niedosytu. Choć część wprowadzająca nie ma waloru oryginalności, jest niewątpliwie użyteczna, a nawet niezbędna z punktu widzenia całości opracowania.

OCENA PRACY

Celem przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej był proces optymalizacji oraz wykorzystania adekwatnych metod eksperymentalnych do identyfikacji modulatorów celów białkowych w wybranych szlakach immunologicznych z potencjalnym zastosowaniem w immunoterapii nowotworów. Wybrane przez Doktorantkę cele molekularne to białka STING, RIG-I oraz HPK1. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że badania wykonywane przez Doktorantkę były prowadzone w ramach I edycji programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Doktorat wdrożeniowy”. Tym samym należy podkreślić walory praktyczne pracy, w ramach której Doktorantka opracowała możliwe do wdrożenia w praktyce firmy unikalne narzędzia badawcze do osiągnięcia celów praktycznych o potencjalne wdrożeniowym w zakresie poszukiwania nowych leków w immunoterapii.

W ramach ogólnego celu pracy Doktorantka wyróżniła trzy szczegółowe cele badawcze (opisane w rozprawie na stronach 46-48) dla każdego z badanych celów terapeutycznych.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania wpisują się w koncepcję najnowocześniejszych strategii badań immunoterapeutyków. Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne m.in. w związku ze stałym wydłużaniem się długości życia i nierozłącznie z tym związanymi prognozami zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce (i na świecie). Działalność badawcza Doktorantki w tym zakresie jest innowacyjnym i twórczym wkładem do nowoczesnego systemu wskazania skutecznej immunoterapii. Warto zaznaczyć w tym miejscu, że zaledwie 3 lata po docenieniu przez Komitet Noblowski prac prof. Jamesa P. Allisona z USA oraz Tasuku Honjo z Japonii (za ich wkład w rozwój immunoterapii nowotworów), dyskutujemy wyniki dotyczące opracowania adekwatnych metod biochemicznych i biofizycznych pozwalających na identyfikację i charakterystykę małowcząsteczkowych związków mogących modulować aktywność wybranych białek zaangażowanych w procesy immunologiczne i aktywować układ immunologiczny do walki z nowotworem.

Założone badania obejmowały prace eksperymentalne z udziałem białek rekombinowanych na wczesnym etapie rozwoju nowych leków, w szczególności optymalizację wybranych metod biofizycznych oraz biochemicznych oraz dostosowanie ich do testów wysokoprzepustowych dla znalezienia nowej materii chemicznej, a także w celu głębszej charakterystyki wybranych związków dla lepszej predykcji działania związków w modelach komórkowych oraz zwierzęcych.

Nie będę streszczać przeprowadzonych badań, sam ich zakres oraz ilość poddanych badaniu celów jest niezmiernie szeroki i obejmuje pełen wachlarz metod oraz charakterystykę zjawisk biofizycznych i biochemicznych wykorzystanych w badaniach w ramach rozprawy. Metody te obejmowały badanie przesunięcia termicznego białek, wykorzystanie zjawiska polaryzacji fluorescencji, termoforezę w mikroskali, plazmonowy rezonans powierzchniowy, enzymatyczną

charakterystykę kinaz i ATPaz, liczne modele opisujące aktywność związków w testach biochemicznych czy wysokoprzepustowe testy przesiewowe.

Dla wszystkich przeprowadzonych badań: 1) badaniach nad białkiem STING, 2) pracach nad kinazą HPK1 oraz 3) badaniach nad białkiem RIG-I Doktorantka rzetelnie przedstawiła wyniki podsumowując kolejno osiągnięte cele (np. przejrzyste przedstawione w Tabeli 15). W oparciu o uzyskane wyniki kolejno typuje kandydata do badań przedklinicznych (dla białka STING); dokonuje charakterystyki inhibitorów kinazy HPK1 oraz negatywnie weryfikuje wstępną hipotezę dotyczącą aktywacji RIG-I w układzie komórkowym poprzez zahamowanie aktywności ATPazowej tego białka, potwierdzając tym samym wdrożeniowy charakter rozprawy.

OCENA WARTOŚCI NAUKOWEJ ROZPRAWY

Rozprawa doktorska powinna prezentować ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a przedmiot rozprawy doktorskiej powinien stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej (za *Artykuł 187.1, punkty 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*). Dodatkowo biorąc pod uwagę charakter programu MNiSW „Doktorat wdrożeniowy”, który nie zakłada stawiania klasycznych hipotez badawczych sprawdzanych w badaniach podstawowych, ale odpowiednie opracowywanie nowych i wykorzystanie istniejących narzędzi badawczych do osiągnięcia celów praktycznych, (tu: wskazania nowych leków w immunoterapii) z przekonaniem stwierdzam, że powyższe wymogi spełnia zarówno recenzowana praca, jak i kandydatka na doktora. Rozprawa ma charakter pracy metodologicznej ukierunkowanej na optymalizację metod biochemicznych i biofizycznych pozwalających na identyfikację oraz charakterystykę nowych związków chemicznych będących aktywatorami odpowiedzi immunologicznej z potencjalnym zastosowaniem w immunoterapii nowotworów. Celem zwiększenia szansy wyłonienia kandydata do badań klinicznych o największym potencjale terapeutycznym oraz możliwości komercjalizacji, Doktorantka prowadziła badania dla trzech celów białkowych zaangażowanych w procesy immuno-onkologiczne: STING, HPK1 oraz RIG-I. Zaproponowane podejście pozwoliło na zwiększenie szansy osiągnięcia sukcesu ze względu na różnice w ekspresji białek w różnych podtypach układu odpornościowego oraz w typach nowotworów związanych z konkretnym badanym białkiem; pozwoliło również na wybór najbardziej obiecującej ścieżki terapeutycznej. Wiarygodność swoich badań Doktorantka potwierdziła szeregiem testów istotności statystycznych. Ponadto, wykraczając poza zakres niniejszej rozprawy, Doktorantka umiejętnie odniosła wyniki badań własnych do wyników uzyskanych z modeli komórkowych przeprowadzonych w grupie dr Jolanty Mazurek, Macieja Kujawy i dra Stefana Chmielewskiego. Powyższe udowadnia wysoką wartość predykcyjną otrzymanych wyników. Cenną umiejętnością Doktorantki jest związane formułowanie myśli oraz jasne formułowanie wniosków i prezentowanie wyników prowadzonych badań. Na podstawie wyników obszernych badań Doktorantka sformułowała wnioski podsumowujące, które odzwierciedlają najistotniejsze elementy pracy.

OCENA KOŃCOWA I KONKLUZJA

Podsumowując, należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Doktorantki, która wyśmienicie opanowała wymagający warsztat badawczy. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska magister Kingi Michalik przygotowana jest znakomicie, wyniki przedstawione są klarownie, z olbrzymią dbałością o ikonografię. Zastosowana metodyka jest nowoczesna i nie budzi zastrzeżeń oraz świadczy o ogromnej pracowitości i doskonałym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki.

Opiniując pozytywnie recenzowaną pracę doktorską pt. „Rozwój metod badawczych opartych o białka rekombinowane do charakterystyki potencjalnych leków w immunoterapii nowotworów” stwierdzam, iż spełnia ona warunki określone w artykułe 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). oraz wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne UJ o dopuszczenie Pani mgr Kingi Michalik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uważam, również, że praca doktorska kwalifikuje się do wyróżnienia.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Krzysztof Gersonik-Pluta', is centered on the page.