



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

Zakład Farmakologii

Pracownia Farmakologii Biochemicznej

dr hab. Agata Faron-Górecka

Kraków 8.12.2021r

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Dziedzic

„Charakterystyka molekularnego mechanizmu działania

innowacyjnych związków małocząsteczkowych w immunoterapii nowotworów”

przygotowanej pod opieką naukową promotora prof. dr hab. Jolanty Jury

oraz promotora pomocniczego dr Pauliny Węgrzyn

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w ramach programu Ministerstwa Edukacji i Nauki „Doktorat wdrożeniowy” oraz projektu „Rozwój innowacyjnej immunoterapii nowotworów litych celującej w immunosupresyjne mikrośrodowisko guza” dofinansowanego przez Fundusz Unii Europejskiej – Program Operacyjny Inteligentny Rozwój nr POIR.01.01.01-00-0987/16-00. Ponieważ jest to „Doktorat wdrożeniowy”, którego głównym zadaniem jest nawiązanie współpracy między przemysłem a uczelnią, niniejsza rozprawa została wykonana we współpracy z firmą Ryvu Therapeutics. Opracowane przez firmę i zsyntetyzowane związki, będące potencjalnymi lekami w immunoterapii nowotworów, stanowią istotną podstawę do badań nad terapią skoncentrowaną na immunosupresji wywołanej adenozyną. Założeniem projektu było stworzenie podwójnego antagonisty receptorów A_{2A} i A_{2B} o unikalnym profilu działania, który będzie skuteczny przy wysokich stężeniach adenozyiny. Doktorantka w rozprawie doktorskiej skupia się na charakterystyce jednego spośród 400 opracowanych przez firmę związków, SEL330-639, który, jak to określa Doktorantka, we wstępnej charakterystyce wykazywał najlepszą aktywność i był najbardziej aktywnym związkiem.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań wskazują, że związek SEL330-639 jest antagonistą receptorów adenozynowych A_{2A} i A_{2B} , hamującym produkcję cAMP oraz blokującym przepływ kaskady sygnałowej wywołanej działaniem agonisty. Związek ten znosi immunosupresyjny efekt adenozyiny i przywraca funkcje efektorowe limfocytom T i komórkom dendrytycznym. Pomimo, że związek ten nie działa w monoterapii w mysim modelu raka jelita grubego, to terapia skojarzona tego



związku z przeciwciałem blokującym CTLA-4, skutkuje większą przeżywalnością zwierząt w tym modelu.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Dziedzic została zredagowana w języku polskim, na 179 stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o typowy układ. Po spisie treści, ułatwiającym poruszanie się po obszernej pracy, znajduje się sześciostronicowy wykaz skrótów. Następnie zostało umieszczone streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozdział 4. Wstęp, składający się z czterech podrozdziałów, wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z adenozyną, która jest głównym celem działania badanego związku. W podrozdziale 1. została przedstawiona jej budowa, drogi syntezy, metabolizm i transport oraz najważniejszy aspekt roli adenozyiny w kontekście wyżej wymienionego Projektu, mianowicie jej rola w *mikrośrodkowisku guza*. Czytając ten podrozdział czuje się jednak pewien niedosyt informacji na ten temat. Doktorantka do tego kluczowego w swojej pracy zagadnienia podeszła w sposób zbyt skrótowy, przez co osoby niezaangażowane bezpośrednio w tę tematykę, mogą odczuwać pewien dyskomfort podczas lektury. Kolejny podrozdział skupia się na receptorach adenozyinowych, ich klasyfikacji, budowie oraz aktywacji. Ta część jest bardzo szczegółowo i wyczerpująco opisana. Następnie doktorantka przeprowadza czytelnika przez typy receptorów adenozyinowych, opisując szczegółowo profil ich ekspresji w ludzkich tkankach oraz ich regulację, aby przejść do części: *Rola adenozyiny w organizmie człowieka*. Doktorantka opisała szczegółowo udział adenozyiny w układach: krwionośnym, nerwowym, moczowym, kostnym i oddechowym. Podrozdział ten jest bardzo interesujący dla czytelnika, ze względu na opisaną szeroką rolę adenozyiny w różnych jednostkach chorobowych. Ponadto sekcja ta została uzupełniona o najnowsze doniesienia związane z badaniami przedklinicznymi podań agonisty receptora A_{2A} w niwelowaniu negatywnych skutków terapii tlenem u chorych ze śródmiąższowym zapaleniem płuc towarzyszącemu COVID-19. Świadczy to m.in. o zaangażowaniu Doktorantki w poszerzaniu tematyki związanej z badaniami nad rolą ligandów receptorów adenozyinowych. Kolejnym podrozdziałem wstępu jest *Rola adenozyiny w układzie immunologicznym*, w którym została przedstawiona szczegółowo regulacja odpowiedzi immunologicznej przez adenozyinę, aby ostatecznie dojść do najważniejszego podrozdziału w kontekście niniejszej rozprawy *Immunosupresja wywołana przez adenozyinę w kontekście nowotworu*. Ostatni podrozdział wstępu skupia się na antagonistach i agonistach receptorów adenozyinowych typu A₂. Doktorantka szczegółowo opisuje zastosowanie antagonistów receptorów A₂ w leczeniu nowotworów. Przedstawia charakterystykę nowych związków, będących obecnie na etapie badań



klinicznych. Niemniej, po zakończeniu tego rozdziału brakuje mi krótkiego podsumowania, w którym Doktorantka na podstawie przytoczonych informacji, wskazałaby, dlaczego do dalszych badań wybrała takie a nie inne związki referencyjne. Na stronie 54 znajduje się opisany Cel Pracy, scharakteryzowany jako *wykonanie pełnej charakterystyki antagonisty receptorów adenozynowych A_{2A} i A_{2B}* . Doktorantka określiła ponadto pięć celów pośrednich:

- Opracowanie modeli badawczych służących do oceny aktywności związków chemicznych w komórkach układu odpornościowego;
- Określenie poziomu i regulacji receptorów A_{2A} i A_{2B} na powierzchni badanych komórek
- Zbadanie aktywności antagonistów w modelach funkcjonalnych na poziomie tkanek
- Zweryfikowanie zasadności antagonizowania receptora A_{2B} i tworzenia podwójnych antagonistów receptorów adenozynowych
- Badania translacyjne związku umożliwiające inicjację badań klinicznych.

Następnie na 24 stronach znajduje się Rozdział Materiały i metody, w którym Doktorantka opisuje zastosowane w rozprawie doktorskiej techniki m.in. izolacje komórek, różnicowanie komórek CD14+ do komórek dendrytycznych, analizę wiązania radioligandów, wiązanie fluorescencyjnie znakowanego agonisty do ludzkich komórek PBMC, pomiar wewnętrznego poziomu cAMP, pomiar fosforylacji czynnika transkrypcyjnego CREB, czy ekspresję genów. Wszystkie zastosowane metody są różnorodne i nowoczesne. Znakomicie odpowiadają najwyższym standardom prowadzenia badań nad nowymi potencjalnymi celami terapeutycznymi. Niemniej w opisie metod jest kilka drobnych błędów, ale zaliczają się one raczej do błędów edytorskich niż merytorycznych, dlatego zostaną wymienione poniżej.

W dalszej części rozprawy na 33 stronach zostały opisane Wyniki eksperymentów. Mgr Katarzyna Dziedzic porównuje związek SEL330-639 do czterech innych antagonistów receptorów adenozynowych zaprojektowanych przez inne firmy farmaceutyczne, będących w fazie badań klinicznych. O ile we wstępie są opisane trzy z nich, o tyle "tajemniczy" związek Example 7 pojawia się dopiero w sekcji wyniki. Rezultaty badań Doktorantka przedstawiła na 19 rycinach oraz w 7 tabelach. Całość jest opisana w sposób przejrzysty z elementami wstępnej dyskusji. Ta właściwa stanowi 8. rozdział i składa się z 20 stron. Doktorantka prowadzi ją w sposób wywarzony, tłumacząc trudności w uzyskaniu wyników, potencjalny wpływ innych czynników na otrzymane wyniki, czy też problemy metodyczne. Po omówieniu wyników znajduje się rozdział Wnioski końcowe, które Doktorantka zawarła w 11 punktach. Wynika z nich, że postawione przez Doktorantkę cele pośrednie zostały

osiągnięte. Przedostatni rozdział rozprawy stanowią Dane uzupełniające, składające się z 7 rycin. Pracę doktorską wieńczy Bibliografia, składająca się 277 pozycji literaturowych.

Uwagi krytyczne

W streszczeniu Doktorantka zaznacza, że aby ocenić aktywność 400 nowo powstałych związków, opracowano kaskadę testów przesiewowych, w celu wyłonienia najlepiej działającego związku. Również jednym z celów pośrednich niniejszej rozprawy było opracowanie modeli badawczych, służących do oceny aktywności związków chemicznych. Czy Doktorantka może przedstawić, które dokładnie modele badawcze zostały przez Nią opracowane?

Szkoda, że nie zostały dołączone do doktoratu informacje wskazujące, które eksperymenty zostały wykonane przez Doktorantkę. Zwłaszcza w kontekście opublikowania części wyników rozprawy doktorskiej w wieloautorskiej publikacji: Release of adenosine-induced immunosuppression: Comprehensive characterization of dual A2A/A2B receptor antagonist. Dziedzic K, Węgrzyn P, Gałęzowski M, Bońkowska M, Grycuk K, Satała G, Wiatrowska K, Wiklik K, Brzózka K, Nowak M. *Int Immunopharmacol.* 2021; 96:107645. Ponadto Doktorantka w dyskusji omawia przeprowadzony eksperyment *in vivo* dla związku SEL330-1046, dla którego zostały przedstawione wyniki icAMP w niniejszej rozprawie i odnosi się do pozycji literaturowej nr 202. Gałęzowski M, Dziedzic K, Węgrzyn P, Gołas A, Bońkowska M, Grycuk K, Ogórek M, Bobowska A, Szeremeta-Spisak J, Nowogródzki M, Satała G, Łozińska -Raj I, i wsp., In vivo and in vitro characterization of RVU330 best-in-class dual A2A/A2B adenosine receptor antagonist, *Cancer Res.* 80 (2020) 5555 LP-55555. Czy Doktorantka może przedstawić, które eksperymenty w ramach powyższego doniesienia zostały wykonane przez Nią samodzielnie i stanowią część rozprawy doktorskiej?

Podrozdział 6.8. PCR w czasie rzeczywistym. Doktorantka opisuje, że wyniki zostały opracowane w oparciu o gen referencyjny 18sRNA. Zazwyczaj używa się kilka genów referencyjnych. Dlaczego Doktorantka zdecydowała się na wybór tego genu i czy to podejście jest optymalne?

Podrozdziały 6.2.2. oraz 6.2.3 Izolacja mysich splenocytów została wykonana na samicach myszy szczepu BALBc, natomiast izolacja szczurzych splenocytów została wykonana na samcach szczepu Wistar. W takim przypadku mamy nie tylko do czynienia z wpływem różnic gatunku, ale również płci na wynik eksperymentu. Istnieją doniesienia literaturowe świadczące o wpływie płci na układ immunologiczny. Jak w kontekście tych opracowań Doktorantka interpretuje znaczenie uzyskanych wyników?



Podrozdział 6.18.1. Anestezja i pobranie materiału. Dlaczego do badań wybrano aż pięć różnych metod pobierania krwi do badań. Użycie surowicy do badań zniwelowałoby potencjalne problemy związane z wpływem antykoagulantów na wyniki eksperymentu. Czy Doktorantka rozważała użycie do badań surowicy? Ponadto, do powyższych badań użyto samic myszy BALBc oraz samców szczepu Wistar. Jakie było zamierzenie Doktorantki, aby wprowadzić do badań zmienną gatunkową oraz płci?

Podrozdział 7.1. Jak Doktorantka wytłumaczy brak ekspresji ADORA2B w linii komórkowej PC-12, podczas gdy przy użyciu techniki Western Blot wykazała w tej linii komórkowej prążek odpowiadający receptorowi A_{2B}?

Rozdział 7.2. Jak został wykonany eksperyment kinetyki wiązania/dysocjacji w celu wyznaczenia czasu oddziaływania z receptorem?

Rozdział 7.14. Opis wyników tego eksperymentu jest niejasny. Doktorantka zaznacza, że nie była możliwa analiza subpopulacji izolowanych z PBMC z powodu małej objętości krwi. Wobec tego do badań użyto pulę pierwotnych mysich lub szczurzych splenocytów. Jednak ze względu na brak opracowanych metod, nie wykonano aktywacji szczurzych limfocytów. Ponadto w tym eksperymencie nie wykonano badań ze związkiem SEL330-639, użyto natomiast do analizy jego bliską pochodną, SEL330-1046. Czy Doktorantka może bardziej szczegółowo omówić tę część eksperymentu i powody, dla których zdecydowała się użyć inny związek? Nie znalazłam w rozprawie struktury chemicznej związku SEL330-1046. Czy Doktorantka może wykazać, że wykorzystany do badań związek SEL330-1046 działa w taki sam sposób w innych testach jak badany związek SEL 330-639?

Rozdział 8. Dyskusja. Wydaje się, że najważniejszy wynik mający potencjalne przełożenie translacyjne, został wykonany przy użyciu związku SEL330-1046. Natomiast nie ma takiego wyniku w sekcji Wyniki, a autorka rozprawy odnosi się do zacytowanej pozycji literaturowej 202; Gałęzowski i wsp., 2020.

Doktorantka odnosi się kilka razy do danych nieumieszczonych w rozprawie doktorskiej, niemniej istotnych w dyskusji. Ich prezentacja bardzo ułatwiłaby ocenę trafności interpretacji prezentowanych wyników.

Dyskutując wyniki eksperymentów *in vivo*, doktorantka wskazuje, że podanie związku SEL330-639 w dawce 5 mg/kg w połączeniu z anti-CTLA-4, skutkuje najwyższą przeżywalnością myszy z rakiem jelita grubego. Jak można wytłumaczyć fakt, że wyższe dawki badanego związku SEL330-639 w połączeniu z taką samą ilością anti-CTLA-4 mają taki sam wpływ na przeżywalność osobników jak po podaniu tylko anti-CTLA-4? Ponadto podanie związku SEL330-639 w trzech różnych stężeniach nie skutkowało poprawą przeżywalności myszy z rakiem jelita grubego.



W podrozdziale 4.4.4. napisano, że badania *in vivo* dowodzą, że antagoniści receptorów A_2 wykazują skuteczność w podaniu monoterapeutycznym, a zastosowanie ich w kombinacji m.in. z inhibitorami punktów kontrolnych, takich jak przeciwciało anty-CTLA4, powoduje zwiększenie efektu działania

obydwu komponentów z osobna. Jaki mechanizm działania stoi więc za obserwowanymi efektami badań *in vivo*?

Poprawność redakcyjna rozprawy

Pełniąc funkcję recenzenta jestem zobligowana do wskazania kilku uwag natury redaktorskiej.

Doktorantka często używa skrótu agonista A_{2A} mając na myśli agonista receptora A_{2A} . Powinno się użyć w takim przypadku skrótu $A_{2A}R$;

W podrozdziale 4.4. Antagoniści i agoniści receptorów adenozynowych w sposób niefortunny umieszczono akapit o allosterycznych modulatorach, który może sugerować, że są to agoniści lub antagoniści (str. 45);

Ryciny oraz tabele często są w miejscach nieadekwatnych do ich zawartości, np. Podrozdział 4.4. (str. 46) rycina 8, przedstawiająca schemat immunosupresji wywołanej adenozyzną, mylnie została przedstawiona w podrozdziale 4.4.1. Umieszczenie jej w podrozdziale 4.3.3. ułatwiłoby czytelnikowi lekturę.

Podrozdział 4.4.3. (str. 49) Tabela 1. Tuż pod nią rozpoczyna się opis tabeli 2, która znajduje się na stronie 51. Taki sposób umieszczenia rycin czy tabel sprawia, że czytelnik ma trudności w odnalezieniu się w tekście;

Podrozdział 6.1.1. (str.55) Hodowla linii komórkowych; O ile Doktorantka wprowadziła krótki opis linii komórkowych: PC12 oraz HEK293 A2B, to nie ma żadnej informacji na temat linii komórkowej KHYG-1. Dopiero w rozdziale Wyniki dowiadujemy się, w jakim celu została wykorzystana do badań ta linia komórkowa.

Podrozdział 6.1.2. (str.55) Hodowla ludzkich komórek CD4+, CD8+ - nie ma informacji z jakiego materiału zostały wyizolowane ludzkie limfocyty T typu CD4+ oraz komórki CD8+.

Rycina 27. przedstawia krzywe przeżywalności myszy w trakcie eksperymentów *in vivo*. Na rycinie związek SEL330-639 został opisany jako SLV-20356. Nie zostało to opisane w tekście rozprawy doktorskiej.



Ocena końcowa

Wymienione powyżej zastrzeżenia nie wpływają w żaden sposób na pozytywny odbiór przeprowadzonych eksperymentów i sposobu ich opisu w recenzowanej rozprawie doktorskiej. Zdając sobie sprawę ze wszystkich napotkanych problemów natury pozyskania materiału do badań oraz optymalizacji niektórych metod badawczych, tym bardziej doceniam fakt, że udało się Doktorantce uzyskać interesujący zestaw danych, będących podstawą do dalszych badań związku SEL330-639 w terapii nowotworów. Ponadto, rozprawa doktorska spełnia kryteria Doktoratu Wdrożeniowego, co stanowi dodatkową wartość recenzowanej pracy.

Stwierdzam zatem, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr Katarzyny Dziejic** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **mgr Katarzyny Dziejic** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Pracowni Farmakologii Biochemicznej
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk w Krakowie
Agata Faron-Górecka
dr hab. Agata Faron-Górecka