

## Streszczenie

Immunoterapia, innowacyjne podejście w leczeniu nowotworów, ma na celu przywrócenie zdolności układu odpornościowego do rozpoznawania i eliminowania komórek nowotworowych. W ostatnich latach terapia wymierzona w immunologiczne punkty kontrolne osiągnęła spektakularne efekty. Wśród poznanych immunologicznych punktów kontrolnych, interakcja pomiędzy białkiem PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1, Receptor Programowanej Śmierci 1) występującym na powierzchni komórek immunologicznych, a jego ligandem, PD-L1, prezentowanym na powierzchni komórek nowotworowych, jest przyczyną rozwoju procesu nowotworzenia. Obecnie przeciwciała monoklonalne, są jedynymi przedstawicielami inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 wykorzystywanymi w terapiach przeciwnowotworowych. Pomimo ogromnego potencjału jaki niesie ich zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych, wymienia się również negatywne aspekty stosowania przeciwciał monoklonalnych, takie jak niepożądane skutki uboczne i wysokie koszty terapii. Podkreśla się zatem potrzebę opracowania nowych klas inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1.

W ostatnich latach obserwujemy rosnące zainteresowanie rozwojem inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego PD-1/PD-L1, jednak w większości opublikowanych prac naukowych opisujących nowe inhibitory, nie zweryfikowano ich aktywności biologicznej w warunkach *in vitro*. Badania opisane w niniejszej rozprawie miały na celu przeprowadzenie pierwszej charakterystyki bioaktywności wybranych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1, należących do klas związków małocząsteczkowych i peptydów makrocyklicznych. Ponadto, w doświadczeniach wykorzystano modele komórkowe ukierunkowane na blokadę zarówno ludzkiego jak i mysiego białka PD-L1.

W pierwszej części przedstawionej rozprawy badano aktywność inhibitorów PD-L1 z wykorzystaniem kilku metod *in vitro*: testu blokady punktu kontrolnego układu odpornościowego PD-1/PD-L1, kolorymetrycznego testu cytotoxyczności oraz nowo opracowanego modelu odwzorowującego interakcję nowotwór-układ immunologiczny, w którym komórki nowotworowe były hodowane wraz z komórkami jednojądrzastymi krwi obwodowej (PBMCs) wyizolowanymi od dawców krwi. Stworzony model jest pierwszą platformą umożliwiającą monitorowanie poziomu markerów aktywacji na powierzchni limfocytów T oraz uwalniania cytokin związanych z aktywacją układu immunologicznego. W opracowanym modelu, komórki nowotworowe dzięki prezentacji na swojej powierzchni TCRAktywatora pełnią rolę komórek prezentujących antygen i wykazują ekspresję ludzkiego białka PD-L1 (*hPD-L1*), a także cząsteczki TCRAktywatora kontaktują się z pierwotnymi komórkami odpornościowymi w obecności inhibitorów PD-1/PD-L1.

Z wykorzystaniem wymienionych modeli zweryfikowano bioaktywność makrocyklicznych peptydów opatentowanych przez firmę Bristol-Myers Squibb: Peptydu-101, oraz Peptydu-AC65. Badaniom poddano również małocząsteczkowe inhibitory białka PD-L1 oparte o rdzeń bifenyloy lub terfenyloy opracowane w naszym Zespole. Ponadto, zatwierdzone do

wykorzystania w terapiach przeciwnowotworowych przeciwciała monoklonalne anty-PD-1 i anty-PD-L1 zostały wykorzystane jako pozytywne kontrole w eksperymentach. Co więcej, ich zastosowanie doprowadziło do nieoczekiwanych wniosków dotyczących ich selektywności gatunkowej.

Charakterystyka bioaktywności serii bifenylowych i terfenylowych małowymiarowych inhibitorów PD-L1, opisanych szczegółowo w rozprawie, doprowadziła do identyfikacji wpływu wprowadzonych modyfikacji chemicznych i nowych podstawników na aktywność i cytotoksyczność związków. Wyniki te mogą stanowić cenne wskazówki do dalszych analiz struktura-aktywność wykonywanych w ramach ciągłego procesu rozwoju kolejnych potencjalnych związków o działaniu przeciwnowotworowym. Ponadto, dla Peptydu-AC65, wyniki dotyczące jego aktywności w warunkach *in vitro* wskazały na porównywalny do skierowanych przeciwko białku PD-L1 przeciwciał terapeutycznych potencjał do przywracania aktywności układu immunologicznego przeciwko komórkom nowotworowym.

W ostatnich latach do badania aktywności wybranych inhibitorów PD-1/PD-L1 w warunkach *in vivo*, wykorzystano kilka modeli mysich, wśród których modele syngeniczne, opierające się na mysich celach molekularnych w obecności mysiego układu immunologicznego, wiodą prym. W dotychczas przeprowadzonych badaniach nad nowymi inhibitorami, nie ukazano jednak bezpośrednio ich wiązania do mysiego białka PD-L1 (*mPD-L1*), które uzasadniałoby wykorzystanie modeli syngenicznych do badań *in vivo*.

Kolejnym z celów przedstawionej pracy było opracowanie testu *in vitro*, który pozwoliłby na weryfikację potencjału wiązania projektowanych inhibitorów do ludzkiego oraz mysiego białka PD-L1. Stworzony model oparty na ko-hodowli komórek czerniaka mysiego linii B16-F10 prezentujących *mPD-L1* oraz TCRAktywator wraz z komórkami Jurkat T ekspresjonującymi *hPD-1* posłużył do charakterystyki kilku przedstawicieli różnych klas inhibitorów PD-1/PD-L1. Wyniki wskazały, że ani badane peptydy makrocycliczne, ani małowymiarowe inhibitory PD-L1 nie zapewniają funkcjonalnej blokady immunologicznego punktu kontrolnego *hPD-1/mPD-L1* w stężeniach aktywnych wobec interakcji *hPD-1/hPD-L1* w warunkach *in vitro*. Co ciekawe, zatwierdzone klinicznie przeciwciała anty-PD-L1 atezolizumab i avelumab, ale nie durvalumab, wykazywały w modelu potencjał do hamowania oddziaływania *hPD-1/mPD-L1*.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły na stworzenie pierwszej charakterystyki *in vitro* inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 należących do klas związków małowymiarowych i peptydów makrocyclicznych, a także opisano nowe aspekty funkcjonowania znanych przeciwciał monoklonalnych. Co więcej, zaproponowano nowy model oparty na ko-hodowli komórek nowotworowych i PBMCs służący do monitorowania efektów immunostymulacyjnych, występujących po dodaniu inhibitorów PD-1/PD-L1 do układu. Ponadto, opracowano pierwszy test *in vitro* do weryfikacji potencjału inhibitorów do blokowania nie tylko punktu kontrolnego *hPD-1/hPD-L1*, ale także *hPD-1/mPD-L1*. W badaniach udowodniono, że takie podejście powinno być brane pod uwagę zawsze przy wyborze modelu *in vivo* do dalszych badań nad inhibitorami oddziaływania PD-1/PD-L1.