



# Politechnika Wroclawska

Wroclaw, 15.09.2023

Prof. Łukasz Berlicki  
Katedra Chemii Bioorganicznej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wroclaw  
lukasz.berlicki@pwr.edu.pl

## **Recenzja pracy doktorskiej mgr Magdaleny Żarnik, pt.: "Design, synthesis, and activity evaluation of small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 interaction"**

Pani mgr Magdalena Żarnik zrealizowała pracę doktorską pod opieką prof. Tadeusza Holaka w Zespole Biologii Chemicznej i Projektowania Leków na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Celem doktoratu Pani mgr Magdaleny Żarnik było opracowanie nowych małowcząsteczkowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 bazujących na szkielecie bifenylowym, które potencjalnie mogłyby znaleźć zastosowanie w immunoterapii nowotworów.

Poszukiwanie nowych immunomodulatorów oddziałujących z punktami kontrolnymi układu immunologicznego takimi, jak oddziaływanie PD-1/PD-L1 jest kluczowe dla rozwoju nowoczesnych metod terapii nowotworów. Dotychczas w immunoterapii nowotworów stosowane są przeciwciała, które pomimo wielu sukcesów terapeutycznych, wykazują szereg wad. Z tego powodu tematyka doktoratu mgr Magdaleny Żarnik jest niezwykle ważna i wpisuje się w najnowsze trendy poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej. Warto także zaznaczyć, że podjęty temat badawczy jest trudny. Opracowanie nowych ligandów białka PD-L1 jest nietrywialne ze względu na konstrukcję powierzchni celu molekularnego.

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Żarnik jest napisana w języku angielskim i liczy 190 stron. Praca pod względem językowym jest poprawna i napisana jest w układzie

klasycznym składającym się z wstępu (34 strony), wyników (50 stron), podsumowania (4 strony), materiałów i metod (81 stron) oraz spisu literatury. W pracy nie wydzielono rozdziału dotyczącego celu, jednakże pierwsze trzy strony sekcji Wyniki definiują go w wystarczający sposób. W ogólności praca pod względem edytorskim przygotowana jest bardzo dobrze – otrzymujemy szereg kolorowych dobrze przemyślanych rysunków obrazujących struktury trójwymiarowe białek i ich kompleksów oraz dobrze opisanych schematów przeprowadzonych syntez. Zastrzeżenia budzi niewystarczająca dbałość o jednostki opisujące aktywność biologiczną: w Tabelach 1 i 14 nie ma ich wcale, w Tabeli 11 używane są uM zamiast  $\mu\text{M}$ , natomiast w Tabeli 9 błędnie wskazano, że durvalumab wykazuje  $\text{EC}_{50} = 0.25 \mu\text{M}$  zamiast 0.25 nM. Znaczącym błędem edytorskim jest także brak słowa ‘Symmetric’ w tytule rozdziału 2.7, co powoduje, że jest on niezrozumiały.

We wstępie Pani mgr Magdalena Żarnik krótko opisuje rolę białek PD-1 i PD-L1 w kontroli układu immunologicznego oraz ich użycie jako celów molekularnych w immunoterapii nowotworów. Główna część wstępu jest poświęcona na przegląd znanych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Przedstawiona analiza struktur znanych inhibitorów i ich korelacja z aktywnością biologiczną jest kluczowa dla zaproponowania nowych inhibitorów otrzymanych w ramach dyskutowanej rozprawy. W celu pracy zaprezentowanym na pierwszych stronach sekcji Wyniki wskazano szereg struktur bazowych, które będą eksplorowane w ramach poszukiwania nowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Warto podkreślić, że duża liczba struktur zaproponowana w celu pracy definiuje znaczący zakres prac eksperymentalnych.

Głównym zadaniem Doktorantki była synteza znaczącej liczby rozbudowanych związków organicznych zawierających motyw bifenylowy. Przedstawione w części Wyniki syntezy są w większości przypadków nietrywialne i wieloetapowe. Należy jednoznacznie podkreślić duży wysiłek Doktorantki, który zakończył się otrzymaniem z sukcesem wielu ciekawych związków. Niewątpliwie Pani mgr Magdalena Żarnik jest bardzo dobrym i skutecznym syntetykiem. Co więcej, większość otrzymanych związków wykazywała znaczącą aktywność inhibitorową względem wybranego celu molekularnego. Oceny aktywności biologicznej były przeprowadzone bardzo rzetelnie a dla wszystkich obiecujących związków wykonano pomiary co najmniej dwoma niezależnymi metodami. Największą liczbę pochodnych otrzymano w grupie związków 3. Przeprowadzono efektywną optymalizację struktury cząsteczki, która doprowadziła do związków hamujących oddziaływanie PD-1/PD-L1 w zakresie nanomolarnym. Testy komórkowe potwierdziły aktywność wybranych

analogów, a najefektywniejszy związek wykazywał  $EC_{50} = 0.51 \mu\text{M}$ . Niestety opracowane związki wykazywały także cytotoksyczność w zakresie mikromolarnym.

Grupy związków 2, 4 i 5 były mniej liczne, jednakże ich struktury bardziej rozbudowane, co przekładało się na skomplikowaną i wieloetapową syntezę. W tej grupie pochodnych warto wspomnieć o analogach związku ARB272542, które wykazywały aktywność w testach komórkowych w zakresie nanomolarnym, jednakże nie przewyższały aktywności biologicznej związku wyjściowego.

W grupie związków 7 otrzymano i przetestowano 14 analogów. Aż pięć związków wykazywało  $IC_{50}$  poniżej 1 nM w teście HTRF, co jest bardzo dobrym wynikiem. Najaktywniejszy związek w testach komórkowych charakteryzował się  $EC_{50} = 54 \text{ nM}$  oraz cytotoksycznością na poziomie  $1.2 \mu\text{M}$ .

Rozdział Materiały i Metody bardzo dobrze dokumentuje ogromny wysiłek Doktorantki w zakresie syntezy opisanych związków. Protokoły syntetyczne, opisy widm NMR i MS oraz chromatogramów są na poziomie szczegółowości wymaganym w publikacjach naukowych. Opisy analiz potwierdzają struktury związków i ich czystość.

W czasie obrony bardzo proszę Doktorantkę o przedyskutowanie następujących kwestii:

1. Jakie cechy opracowanych związków mogą powodować ich cytotoksyczność? Czy możliwe jest zaproponowanie analogów o niższej toksyczności?
2. Która grupa związków jest najbardziej obiecująca i czy możliwa jest jej dalsza optymalizacja?
3. Jakie znaczenie dla aktywności inhibitorowej ma sztywność struktury liganda? Czy można optymalizować aktywność zmieniając sztywność potencjalnego inhibitora?

Podsumowując, chciałbym podkreślić ogromny nakład pracy eksperymentalnej Pani Magdaleny Żarnik w zakresie syntezy organicznej. Otrzymanie z sukcesem tak dużej liczby pochodnych nie tylko dowodzi jej pracowitości ale także szerokiej wiedzy w zakresie chemii organicznej oraz doskonałej znajomości technik laboratoryjnych. Zsyntezowanie zaplanowanych pochodnych pozwoliło na skuteczną optymalizację ich aktywności biologicznej. W tym zakresie Doktorantka także osiągnęła znaczące sukcesy opracowując związki o bardzo wysokiej aktywności inhibitorowej względem trudnego celu molekularnego jakim jest białko PD-L1.

Na podstawie przedstawionej analizy rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Żarnik, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że spełnia ona ustawowe (Ustawa Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018r.) i zwyczajowe wymagania stawiane pracownikom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki

Chemiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Żarnik do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Dodatkowo, ze względu na bardzo szeroki zakres prac eksperymentalnych i ponadprzeciętne wyniki opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej, wnoszę o wyróżnienie pracy.

*Julia Baran.*