

Recenzja pracy doktorskiej mgr Magdaleny Żarnik zatytułowanej
Design, synthesis, and activity evaluation of small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1
interaction

której promotorem jest Profesor Tadeusz Holak

Ucieczka komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego stanowi jeden z najważniejszych mechanizmów umożliwiających rozwój i progresję nowotworów. Jednym z tzw. punktów kontroli odpowiedzi immunologicznej, wykorzystywanym przez komórki nowotworowe, są białka programowanej śmierci PD-1 na limfocytach T. Ich interakcja ze znajdującą się na powierzchni komórek nowotworowych glikoproteiną PDL-1, hamuje aktywność limfocytów T, co w konsekwencji blokuje odpowiedź układu odpornościowego. Szlak oparty na PD-1/PDL-1 jest zatem ważnym celem dla ukierunkowanej molekularnie immunoterapii, jednak stosowanie w praktyce klinicznej blokady tych protein za pomocą specyficznych przeciwciał ma pewne ograniczenia. Trudność w przewidzeniu odpowiedzi pacjenta i możliwość wystąpienia oporności na terapię oraz jej wysokie koszty, to jedne z istotniejszych czynników stymulujących poszukiwania nowych sposobów ingerencji w oddziaływanie białek PD-1 i PDL-1.

W ten nurt tematyczny wpisują się badania zrealizowane przez Panią mgr Magdalenę Żarnik w Zespole Chemii Bioorganicznej i Medycznej Zakładu Chemii Organicznej WCh UJ pod kierownictwem profesora Tadeusza Holaka. W szczególności obejmują one projektowanie i syntezę małowcząsteczkowych inhibitorów punktu kontroli immunologicznej PD-1/PD-L1 o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. Jest to obiecujący kierunek badań mający szereg potencjalnych korzyści począwszy od lepszej dostępności doustnej i penetracji guza przez lek małowcząsteczkowy, po mniej spodziewanych działań niepożądanych ze strony układu odpornościowego.

Formalna charakterystyka pracy

Licząca 190 stron rozprawa doktorska została opracowana w języku angielskim i ma formę klasyczną. W literaturowym wprowadzeniu poruszone są zagadnienia: immunoterapii, struktury i funkcji białek PD1 i PDL1, mechanizmu immunosupresji wywoływanej przez komórki nowotworowe, strategii przywracania odpowiedzi przeciwnowotworowej poprzez blokadę PD-1/PD-L1 za pomocą przeciwciał monoklonalnych, inhibitorów peptydowych i peptydomimetycznych oraz niepeptydowych. Co oczywiste, najwięcej miejsca poświęcono ostatniej grupie związków, tj. omówieniu znanych z literatury małowcząsteczkowych ligandów blokujących interakcję PD-1/PD-L1.

Cześć poświęcona badaniom własnym to omówienie eksperymentów przeprowadzonych w celu otrzymania i określenia aktywności nowych antagonistów PD-1/PD-L1. Sumarycznie mgr Magdalena Żarnik zsyntezowała ponad 80 związków, w większości pochodnych bifenyli, dla których wyznaczona została różnymi metodami aktywność blokowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1. W tej grupie Doktorantka wyszczególniła dziesięć serii, przy czym pod względem struktury można otrzymane pochodne klasyfikować jako związki o krótkich i długich cząsteczkach.

Opis otwiera przedstawienie procesu syntezy czterech pochodnych 2*H*-benzo[*b*][1,4]oksazyn-3(4*H*)-onu, z których trzy (**2.4–2.6**) są pośrednimi substratami końcowego kwasu **2.7** [(2*S*,4*R*)-1-(3-bromo-4-((3-(4-(2-morfolino-2-oksoetylo)-3-okso-3,4-dihydro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oksazyno-7-yl)benzylo)oksy)benzylo)-4-hydroksypirrolidyno-2-karboksylowego]. Opis syntezy opatrzony jest obszernymi komentarzami dotyczącymi szczegółów mechanizmów reakcji Suzukiego i aminowania redukcyjnego.

Otrzymane na tym etapie pochodne charakteryzowały się niskim potencjałem blokowania interakcji PD-1/PD-L1, stąd w celu identyfikacji fragmentów i wprowadzenia modyfikacji strukturalnych, korzystnych dla wiązania z PD-L1, włączono metody przesiewowe *in silico* z użyciem dimerycznej struktury białka PD-L1. Na tej podstawie wybrano 7 prostych bifenyliowych związków (**3.1–3.7**); dwie pochodne: 2-bromo-1,1'-bifenyli (**3.1**) i 2-fluoro-1,1'-bifenyli (**3.7**), wykazywały znaczącą zdolność do inicjowania dysocjacji kompleksu PD-1/PD-L1.

W toku dalszych badań Doktorantka otrzymała 45 pochodnych opartych na rdzeniu bifenyliowym (**3.8–3.37** oraz **3.44–3.58**), wprowadzając podstawniki do struktur ogólnych **II.I**, **II.II** i **II.III**.

Kolejno dążąc do wydłużenia struktury zsyntezowana została pochodna 2,3-dihydro-1*H*-indenu (**4.13**), 4 analogi znanego inhibitora PD-1/PD-L1 ARB 272572 (**5.5–5.8**), 8 pochodnych 3,4-dihydro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oksazyny (**6.13–6.20**), a w końcowym etapie 16 związków nazwanych w pracy doktorskiej jako pseudo C₂-symetryczne inhibitory PD-1/PD-L1 (**7.5**, **7.12**, **7.25–7.38**).

Struktury wszystkich zsyntezowanych przez Doktorantkę związków zostały potwierdzone przy użyciu technik spektroskopowych, tj.: ¹H NMR, ¹³C NMR, LCMS, HRMS, a szczegółowe dane przedstawiono w końcowym rozdziale Materials and Methods.

W pracy doktorskiej oprócz omówienia badań prowadzących do otrzymywania nowych związków, przedstawiono także wnioski z badań przeprowadzonych w celu identyfikacji podstaw molekularnych oddziaływania inhibitorów z białkiem PD-L1. W oparciu o symulacje dokowania antagonisty **3.17** z dostępną w bazie PDB strukturą krystaliczną PD-L1 oraz na podstawie otrzymanego w macierzystym Zespole kryształu dimeru PD-L1 współwykryształizowanego ze związkiem **3.54** wyznaczone zostały punkty interakcji kotwiczących wymienione cząsteczki w miejscu wiążącym dimerycznej struktury PD-L1.

W eksperymentach *in silico* wykorzystano program AutoDock Vina, natomiast do analizy kryształu PD-L1/3.54 użyto wizualizera BIOVIA Discovery Studio i systemu grafiki molekularnej PyMOL.

Do empirycznej oceny aktywności związków pod względem zdolności blokowania interakcji PD-1/PD-L1 stosowane były trzy rodzaje testów *in vitro*. W tym celu wykorzystywano techniki wysokorozdzielczej spektroskopii NMR (a konkretnie test dysocjacji kompleksu PD-1/PD-L1 indukowany słabym ligandem tzw. weak-AIDA NMR) oraz spektroskopii fluorescencyjnej z rozdzielczością czasową (HTRF Homogenous Time Resolved Fluorescence). Stosując testy HTRF wyznaczano procent niezdisocjowanego kompleksu PD-1/PD-L1 w obecności różnego stężenia badanego związku (najczęściej 5 nM ale także 0.5 i 50 nM oraz 0,5 i 50 μ M) albo określano powinowactwo badanych związków do białka PD-L1 jako stałą inhibicji IC_{50} . Trzeci komercyjnie dostępny bioluminescencyjny test blokady punktu kontrolnego PD-1/PD-L1 (skrótowo nazwany w pracy testem ICB) oparty na wykorzystaniu modyfikowanych linii komórkowych, umożliwiał wyznaczenie wartości EC_{50} . Dodatkowo dla wybranych związków scharakteryzowane zostało także działanie cytotoksyczne. Metodyka tych badań została przybliżona w Materials and Methods.

Podsumowując aktywność zsyntezowanych przez Doktorantkę związków, w grupie krótkich inhibitorów białka PD-1/PD-L1 najlepsze wyniki wyznaczono dla cząsteczki **3.17** będącej pochodną ugrupowania 2-bromo-1,1'-bifenylu. Związek charakteryzował się wartością stałej $IC_{50} = 15,0$ nM i $EC_{50} = 6,6$ μ M oraz brakiem cytotoksyczności w zakresie do 100 μ M. Podobną wartość IC_{50} otrzymano dla związku **3.13**, jednak jego cytotoksyczne działanie ujawniało się już w stężeniu powyżej 10 μ M. Aktywność w zakresie $IC_{50} < 100$ nM posiadało ponadto 6 pochodnych (**3.22**, **3.28**, **3.45**, **3.50–3.52**), a do $IC_{50} < 500$ nM jeszcze 5 związków (**3.15**, **3.16**, **3.20**, **3.29**, **3.54**).

Natomiast w grupie związków o wydłużonej strukturze najwyższe aktywności wykazywały pseudo C_2 -symetryczne pochodne 2-fluoro-2'-metylo-1,1'-bifenylu oraz 2,2'-dimetylo-1,1'-bifenylu. Osiem z otrzymanych pochodnych (**7.29**, **7.31–7.37**) charakteryzowało IC_{50} w zakresie do 15 nM, a dziewięć spośród otrzymanych związków (**5.6–5.8**, **7.31–7.36**), dla których obok wyznaczenia procentu niezdisocjowanej formy kompleksu PD-1/PD-L1 wykonano test ICB, wykazywało EC_{50} w zakresie do 500 nM.

Uwagi i pytania

1. Największą trudność w analizowaniu pracy doktorskiej sprawia niejednolity sposób testowania i prezentowania wyników aktywności biologicznej otrzymywanych związków.
2. Metody oparte na technikach NMR dają tylko jakościowy pogląd na zdolność blokowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 i na początkowych etapach są stosowane jako wstępne badanie, a później jako test weryfikujący wynik otrzymany dla 5 nM stężenia związku **3.46** wskazujący na obecność 46% formy niezdisocjowanej kompleksu. Ten wynik w zasadzie nic nie wnosi, a poza tym czym kierowano się wybierając akurat ten związek?

3. W tabeli 8 dla części związków badanych metodami HTRF podane są tylko wartości % formy niezdysojowanej PD-1/PD-L1, a dla wybranych pochodnych tylko IC₅₀. Trudno na podstawie tak niejednorodnych wyników dyskutować zależności struktura-aktywność, szczególnie gdy % niezdysojowanego kompleksu jest wyznaczony z niską dokładnością, jak np. dla **3.47** (54.7% ± 40.6).
4. W tabeli 10, prezentowane są wyniki wskazujące na praktycznie całkowity rozpad kompleksu PD-1/PD-L1 otrzymane w uproszczonej metodzie HTRF dla 5 nM stężenia związków (i dodatkowo 0.5 nM dla **5.8**), które pod względem ilościowym są niemiernodajne. Dla tak aktywnych związków i aby umożliwić ich bezpośrednie porównania z wzorcem (**1.59 - ARB272572**) powinno się wyznaczyć wartości IC₅₀.
5. Nie do końca jasny jest wybór grupy związków do dodatkowego testowania metodą ICB z przedstawionych w tabelach 5 i 6. Dlaczego nie przebadano najaktywniejszych – **3.22**, **3.28** i **3.29**, które miały niższe wartości IC₅₀ niż wytypowane do przetestowania: **3.14–3.16** i **3.20**?
6. Podobnie, dlaczego spośród pochodnych w tabeli 8 do testów ICB wybrano związek **3.48** (79%) a nie **3.45** albo **3.51**, których IC₅₀ = 70 i 78 nM?
7. Dlaczego do krystalizacji z dimerem PD-L1 wybrano **3.54** o IC₅₀ = 142 nM?
8. W opisie metodyki badań z wykorzystaniem HTRF (rozdz. 4.5, str. 178) brakuje opisu eksperymentów uproszczonych, w szczególności nie podano liczby powtórzeń technicznych dla testowanego stężenia oraz powtórzeń eksperymentów, także dla oznaczeń IC₅₀.
9. Szkoda, że w przypadku dwóch największych grup bliskich strukturalnie związków – **3.44–3.58** oraz **7.5**, **7.12** i **7.25–7.38** (odpowiednio 15 i 16 pochodnych, czyli ponad połowa związków końcowych) dane strukturalne i aktywności zostały zestawione w osobnych tabelach (odpowiednio 7 i 8 oraz 12 i 13), co znacząco utrudnia śledzenie zależności struktura-aktywność.
10. Mam wątpliwość dotyczącą poprawności zdania na str. 24: "The hPD-1 hot spots are mostly hydrophobic and consist of Asn66, Tyr68, Gly124, Ile126, Leu128, Ile134, and Glu136 located in the anterior leaflet of hPD-1." Już z wymienionych aminokwasów rysuje się przewaga tych polarnych/hydrofilowych nad niepolarnymi/hydrofobowymi (4:3). Również liczba opisanych wcześniej silnych oddziaływań wymienionych aminokwasów (wiązania wodorowe i mostki solne) w kompleksie hPD-1/PD-L1, jak i zdecydowana mniejszość aminokwasów hydrofobowych po stronie hPD-L1 na Rysunku 9 (tylko dwa: M115 i A121) w porównaniu z ośmioma hydrofilowymi (kwasowe: D26, E58 i D122, zasadowe: R113, K124 i R125 oraz hydrofilowe: Y56 i Y123) sugerują przewagę interakcji elektrostatycznych.

Drobne pomyłki:

- W całym tekście symbol związku ARB 272572 został błędnie przyjęty jako ARB 272542;
- Biorąc pod uwagę związki przyporządkowane do serii **II.II** (tabela 6, str. 60), wzór ogólny podany na Figurze 29 (str. 46) i w tabeli 6 jest błędny, bo nie uwzględnia podstawienia w skrajnym pierścieniu bifenylu.

- Na str. 70 wśród „compounds **3.46–3.50, 3.54, 3.57** presenting the best results in HTRF tests” nie wymieniono **3.52** i zapewne omyłkowo zamiast niego jest **3.57** (który jest również w podpisie Rysunku 42 ale nie ma dla niego pokazanego wykresu, a jest dla **3.52**).
- Mam wrażenie, że opis procesu krystalizacji przedstawiony w rozdziale Materials and Methods jest niekompletny, albo tytuł rozdziału 4.9: *Crystallization and the Crystal Structure Determination* jest nieadekwatny.
- Nie ma odpowiedniego akapitu w Materials and Methods dotyczącego opisu eksperymentów in silico.
- Na str. 72 tab. 9 – Durvalumab – wartość EC₅₀ powinna być w nM.
- Na str. 97 tab. 14 – brak jednostek przy wartościach IC₅₀ i EC₅₀.
- Drobne niedociągnięcia edycyjne i językowe naniósłem bezpośrednio w udostępnionej elektronicznej wersji rozprawy.

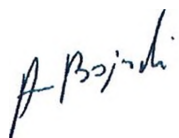
Ocena rozprawy

Na wstępie pragnę zaznaczyć, że wymienione komentarze i uwagi nie umniejszają osiągnięć Doktorantki, a stanowią głównie tematy do dyskusji na etapie obrony rozprawy doktorskiej.

Ogólnie, praca doktorska została umiejętnie zaprojektowana i opracowana. Część literaturowa stanowi znakomite wprowadzenie do badań własnych, w przeważającej części prezentując bogato ilustrowany przegląd małowcząsteczkowych inhibitorów szlaku PD-1/PD-L1 z kilkudziesięcioma odniesieniami do najnowszej literatury naukowej i patentowej. Badania własne Doktorantki to projektowanie i synteza 59 związków końcowych, z których wiele wymagało kilkietapowych syntez, oraz ponad dwudziestu rdzeni bifenylowych i związków pośrednich, dla których także wyznaczono aktywność in vitro. Wszystkie syntezy zostały przedstawione na schematach oraz szczegółowo opisane, a związki końcowe i produkty pośrednie scharakteryzowane spektroskopowo i zestawione w części eksperymentalnej. Doktorantka wykazała się doskonałą znajomością chemii organicznej, biegłością w planowaniu ścieżek syntezy zaprojektowanych związków i prowadzeniem wielu różnorodnych reakcji chemicznych, procesów oczyszczania i analizy spektralnej produktów. Przy projektowaniu kolejnych grup związków Doktorantka opierała się zarówno na inhibitorach znanych z literatury, na analizie in silico oddziaływań rdzeni bifenylowych i związku **3.17** z dimerem PD-L1 oraz struktury krystalicznej kompleksu z **3.54**, jak i wynikach dla poprzednich generacji własnych inhibitorów. Dobrym podsumowaniem wyników przedstawionych w rozprawie jest Rysunek 55, na którym porównano aktywność otrzymanych pochodnych z najaktywniejszymi związkami rozwijanymi przez inne grupy badawcze, także w firmach farmaceutycznych.

Warto podkreślić, że część wyników prezentowanych w rozprawie (rozdział 2.2) została opublikowana w najlepszym czasopiśmie z dziedziny chemii leków *Journal of Medicinal Chemistry*, a Doktorantka jest pierwszym autorem tej pracy. Jest ona również kierownikiem realizowanego projektu Preludium20, którego tematyka jest zbieżna z przedstawioną w niniejszej pracy doktorskiej.

Reasumując, nie mam żadnych wątpliwości, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Żarnik zatytułowana „Design, synthesis, and activity evaluation of small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 interaction”, spełnia wszystkie kryteria stawiane kandydatom w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn.zm.) i z pełnym przekonaniem przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Żarnik do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Andrzej Bojarski