



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

KATEDRA TECHNOLOGII LEKÓW I BIOTECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

Warszawa, 24.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Magdaleny Żarnik

o tytule

Design, synthesis, and activity evaluation of small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 interaction

wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, w Zespole Chemii Bioorganicznej i Medycznej, pod kierunkiem prof. Tadeusza Holaka

Recenzja została opracowana na zlecenie Uniwersytetu Jagiellońskiego, w oparciu o Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.), zawierającą wymagania stawianych rozprawom doktorskim.

Poszukiwanie nowych leków przeciwnowotworowych to zagadnienie bardzo złożone, wymagające użycia technologii wypracowanych przez badaczy reprezentujących różne dziedziny nauki. Tradycyjne podejścia terapeutyczne do leczenia nowotworów, polegające na stosowaniu cytotoksycznych związków małowcząsteczkowych są stopniowo uzupełniane, a nawet zastępowane przez schematy nowocześniejsze, powodujące mniejszą ilość skutków ubocznych i często dające lepszą odpowiedź u pacjentów lub wręcz zapewniające całkowitą remisję nowotworu bez nawrotów

choroby w okresie pięcioletnim. Duże sukcesy na tym polu ma strategia stosunkowo niedawno wprowadzona, polegająca na wzmocnieniu immunologicznych mechanizmów efektorowych, a więc opierająca się na pobudzeniu układu odpornościowego do walki z chorobą, wpływaniu na jego naturalną odpowiedź na nowotwór. Strategia ta jest określana ogólnie jako 'immunoterapia nowotworów'.

Jednym ze szlaków wykorzystywanych w immunoterapii nowotworów jest oddziaływanie receptora programowanej śmierci komórkowej (PD-1) z jego ligandem (PD-L1). Wiązanie tych dwóch białek tłumi odpowiedź immunologiczną organizmu poprzez hamowanie proliferacji limfocytów T, uwalnianie cytokin oraz cytotoxyczność, które powodują apoptozę tych komórek odpornościowych. W wielu komórkach nowotworowych, PD-L1 ulega nadekspresji i występuje na ich powierzchni, w efekcie, organizm nie jest w stanie wytworzyć na nie odpowiedzi immunologicznej. Wprowadzenie do skutecznej terapii przeciwciał monoklonalnych (mAb) celujących w oddziaływanie PD-1/PD-L1 stało się dowodem na to, że osiągnięta w ten sposób modulacja odpowiedzi immunologicznej może przywrócić funkcję specyficznych limfocytów T i normalizować odpowiedzi przeciwnowotworowe. Wyniki badań klinicznych uzyskanych z użyciem mAb pociągnęły za sobą intensywne poszukiwania innych skutecznych terapii wykorzystujących ten szlak. Jednym z trendów jest poszukiwanie nowych związków małowcząsteczkowych rozbijających kompleks PD-1/PD-L1, ponieważ te mogły by być pozbawione wad cechujących terapie związane z użyciem mAbs (np. konieczność podania dożylnego, wysoka cena wytwarzania, brak zdolności przenikania bariery krew-mózg). Warto przy tym zauważyć, że nie jest to prosty kierunek, lecz stanowi duże wyzwanie dla chemii medycznej. Oddziaływanie PD-1/PD-L1 jest bowiem typowym celem molekularnym z klasy oddziaływań białko-białko (z ang. 'protein-protein interactions', PPIs), które charakteryzują się dużą powierzchnią styku, w której występują nieliczne, płytkie kieszenie wiążące o naturze hydrofobowej.

Tą trudną tematykę podjęła mgr Magdalena Żarnik w swojej dysertacji, która dotyczy projektowania, syntezy organicznej oraz oceny aktywności biochemicznej małowcząsteczkowych inhibitorów punktu kontroli immunologicznej PD-1/PD-L1. We wstępie pracy Dyplomantka omawia zagadnienia związane z pojęciem punktu kontroli immunologicznej PD-1/PD-L1, wraz z opisem kaskady reakcji biochemicznych zachodzących po wytworzeniu funkcjonalnego połączenia tych białek. Omawia również strukturę kompleksu PD-1/PD-L1, szczególną uwagę poświęcając miejscu styku (z ang. 'interface'), tego PPI – zasadnie, ponieważ ma to być miejsce wiązania otrzymywanych przez Nią inhibitorów. W dalszej części, mgr Magdalena Żarnik przedstawia aktualny stan wiedzy na temat związków celujących w PD-1/PD-L1. Omawia znane

przeciwciała monoklonalne, jak również peptydy liniowe i makrocykliczne, peptydomimetyki, oraz 'klasyczne', 'małocząsteczkowe' modulatory tego PPI. Jest to przegląd bardzo interesujący. Co ważne – intencjonalnie, bądź nie – Autorka niemalże idealnie uszeregowała wspomniane związki w sposób dążący do uproszczenia struktury. Widać to np. w szeregu peptydy – peptydomimetyki różnych klas – małe cząsteczki. Podsumowując tą część pracy - doskonale wprowadza ona czytelnika w podejmowaną tematykę badawczą, i przedstawia informacje ważne dla projektowania inhibitorów. Wstęp opiera się na przeglądzie piśmiennictwa, które liczy ponad 100 pozycji, opublikowanych prawie w całości po roku 2000.

W dalszych częściach dysertacji Doktorantka zamieszcza wyniki własne badań nad poszukiwaniem nowych małocząsteczkowych inhibitorów interakcji PD-1/PD-L1. W mojej ocenie, użyty warsztat badawczy jest bardzo bogaty. Z pracy wynika jasno, że najbardziej pracochłonnym zadaniem było otrzymanie olbrzymiej liczby związków finalnych (59) należących do różnych grup chemicznych (2*H*-benzo[*b*][1,4]oksazyn-3(4*H*)-ony, 2-bromo-1,1'-bifenyle, 1,1':2',1"-terfenyle, 2-fluoro-1,1'-bifenyle, 2-chloro-1,1'-bifenyle oraz 2-jodo-1,1'-bifenyle, jak również 2,3-dihydro-1*H*-indeny, 2,2'-dimetylo-1,1'-bifenyle, 2-fluoro-2'-metylo-1,1'-bifenyle i 3,4-dihydro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oksazyny). W tym celu Dyplomantka posłużyła się szerokim wachlarzem przekształceń chemicznych (np. redukcyjne aminowanie, chlorowanie, amidowanie, alkilowanie), z których niektóre uchodzą za dosyć skomplikowane operacyjnie (np. reakcje Suzuki-Miyaury, Mitsunobu, Wittiga, Buchwalda-Hartwiga, wymagające warunków beztlenowych). Ścieżki syntezy zostały opisane prawidłowo, przejrzysto. Doktorantka charakteryzowała otrzymane pochodne za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, widma ¹H, ¹³C) oraz spektrometrii mas. Izomery *E*- i *Z*-3-dihydro-1*H*-indenu różnicowała za pomocą widm dwuwymiarowych, w oparciu o jądrowy efekt Overhausera. Wiązalność ligandów z PD-L1 oraz/lub efektywność inhibowania przez nie kompleksu PD-1/PD-L1, były wyznaczane za pomocą pomiarów fluorescencji czasowo rozdzielczej (HTRF, z ang. 'Homogenous Time Resolved Fluorescence'). Oddziaływania niektórych ligandów z białkiem były również badane za pomocą NMR: 2D ¹H-¹⁵N HSQC i 1D w-AIDA (z ang. 'weak-Antagonist Induced Dissociation Assay'). Było to zasadne, ponieważ w odróżnieniu od HTRF metoda ta nie jest czuła na fluorescencję analitów, a więc wykluczyła, że wiązalność ligandów z PD-L1 jest artefaktem. Cząsteczki, które najsilniej inhibowały kompleks PD-1/PD-L1, badano w kierunku ich zdolności do aktywacji limfocytów T w komórkowym teście blokady punktu kontroli immunologicznej oraz określano ich cytotoksyczność. Wszystkie użyte metody zostały udokumentowane bardzo precyzyjnie w części eksperymentalnej pracy.

Dysertacja obfituje w wyniki badań oraz zawiera szczegółową ich analizę. Doktorantka uzyskała inhibitory o zróżnicowanych aktywnościach, które umożliwiły przeprowadzenie analizy zależności struktura aktywność (SAR). Najaktywniejszymi inhibitorami PD-1/PD-L1 okazały się pochodne 2-bromo-1,1'-bifenylu (związek **3.17**: $IC_{50HTRF} = 15 \text{ nM}$) oraz pseudo C_2 -symetryczne pochodne 2-fluoro-2'-metylo-1,1'-bifenylu oraz 2,2'-dimetylo-1,1'-bifenylu (związki **7.29**, **7.31-7.37**: $IC_{50HTRF} = 0.05 - 13.6 \text{ nM}$). Co ważne, wiele z silnych inhibitorów wykazało również zdolność do aktywacji limfocytów T w testach komórkowych, przy czym pochodna **3.17** cechowała się marginalną cytotoksycznością ($>100 \mu\text{M}$). Niższa aktywność *in vitro* pozostałych pochodnych została przedyskutowana zarówno w kontekście innych, bardziej aktywnych związków uzyskanych przez Autorkę dysertacji, ale również została odniesiona do podobnych strukturalnie wzorców literaturowych.

Podsumowując aspekty merytoryczne dysertacji, jej wartość oceniam bardzo wysoko. Opisane badania dotyczą bardzo trudnej klasy celów molekularnych (PPI), a ich wyniki będą użyteczne w projektowaniu nowych inhibitorów PD-1/PD-L1. Pod względem formalnym, dysertacja ma układ klasyczny. Jest napisana starannie, poza przypadkami nielicznych błędów, jest również nienaganna pod względem językowym.

Zagadnienia wymagające dodatkowego komentarza Doktorantki nie są liczne i zostały wypunktowane poniżej:


- 1) Jak wspomniałem, praca jest napisana starannie i nie dopatrzyłem się w niej wielu istotnych uchybień formalnych. Jednak, są one obecne, np.: str. 58 – “Following the demonstration of *in vitro* activity of the 2-bromo-1,1'-biphenyl fragment” – sformułowanie *in vitro* jest tu zbyt ogólne, ponieważ odnosi się tu tylko do oznaczeń aktywności inhibujących kompleks PD-1/PD-L1, bez uwzględnienia testów komórkowych; str. 54 i inne – Autorka dysertacji często używa sformułowania „PD-1/PD-L antagonists” – sformułowanie „antagonist” bywa używane w tej klasie celów terapeutycznych co w mojej opinii nie jest uzasadnione, częściej odnosi się do aktywności wewnętrznej ligandów (np. receptorów związanych z białkiem G, gdzie określenie to ma bardziej ważące znaczenie); rysunek 46, str. 77 przedstawia widma NOESY w których sygnały korelacyjne są słabo widoczne; tabela 1, str. 45 i tabela 14 str. 97 – brak jest określenia jednostek/rzędu wielkości. Oczywiście, lektura pracy dostarcza odpowiednich informacji, jednak w kontekście poprawności formalnej i łatwości analizy danych, taka informacja powinna być zamieszczona; rysunek 38, str. 64 – zwyczajowo, wyjaśnia się na rysunkach wszystkie

podstawniki dla których podaje się kody (np. -R, -X) , tutaj – nie podano co oznacza „-X” . Oczywiście, informacje te znajdują się w części eksperymentalnej dysertacji, jednak dla łatwości analizy wyników powinny być również zamieszczone w tej konkretnie rycinie; str. 95 zawiera błąd językowy – “The interaction of obtained compounds with PD-L1 protein was preliminarily tested due to ^1H NMR.” – bardziej odpowiednie było by sformułowanie “by ^1H NMR”; str. 98 zawiera błąd językowy – “inhibitors show similar activity to the previously known small molecular references of PD-L1 inhibitors” – lepsze było by sformułowanie “reference PD-L1 inhibitors”; str. 89 – podpis rysunku 53 jest nieprawidłowo otoczony tekstem; rysunek 35, str. 57 – rycina obrazująca zmiany widm 2D HSQC mogła by być nieco większych rozmiarów lub rozdzielczości, aby zmiany te były bardziej widoczne.

- 2) Czytając pracę, czasem trudno wnioskować jakiego typu podejście do projektowania związków aktywnych zostało użyte, np. w przypadku pochodnej **2.7** zupełnie brak jest w moim odczuciu wystarczającego wyjaśnienia.
- 3) Rozdział “2.2.1. Identification of the Short Fragments That Bind to PD-L1”, str. 54 – wyniki dokowania fragmentów bifenylowych są tylko marginalnie wspomniane i zapisane w postaci liczbowej wygenerowanej przez użyty program. Na tym etapie było by warto pokazać struktury kompleksów białko-fragment. Oczywiście, były by one przybliżone, ale w moim odczuciu obrazowe. Ma to znaczenie, ponieważ fragment bifenyłowy jest obecny w wielu ligandach PD-L1, nie tylko tych opisanych w dysertacji.
- 4) Doktorantka nie zamieszcza wielu rycin obrazujących oddziaływania otrzymanych ligandów z PD-L1. Oczywiście, dane z dokowania nie zawsze są precyzyjne, jednak zawsze stanowią oparcie dla dyskusji. Dane zamieszczone dla związku **3.17** oraz dane z eksperymentu krystalograficznego stanowią w mojej ocenie dobry przykład na to jak takie informacje mogą wzbogacić dyskusję SAR. Dodatkowo, w mojej opinii warto pokazać jak poszczególne reszty ligandów z poszczególnych grup chemicznych wiążą się z kieszeniami na styku PD-1/PD-L1.
- 5) Str. 59 – Porównując aktywności związków Autorka pisze, że wyraźna jest korelacja między rozpuszczalnością a aktywnością w teście HTRF. Jako przykład podaje aktywność wyjściowych aldehydów, która jest 3000x niższa niż oznaczona dla związku końcowego **3.17**. Nie do końca zgodzę się z taką interpretacją wyników. Oczywiście, dla związków słabo rozpuszczalnych często obserwuje się zaniżoną aktywność *in vitro*, która wynika z tego, że w nie osiąga się zamierzonych, najwyższych stężeń próbki. Jednak, w tym

konkretnym wypadku, reszta kwasu piperkolinowego, podnosi rozpuszczalność, ale również wytwarza istotne, polarne kontakty z resztą asparaginy oraz tyrozyny białka, co zresztą jest pokazane na rysunku 37, str. 63.

Powyższe uwagi nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę walorów merytorycznych i formalnych rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Żarnik. Przede wszystkim, badania zawarte w dysertacji odnoszą się do PPIs, które rzadko są celowane ze względu na wysoki stopień trudności. W pracy wykorzystane zostały aktualne narzędzia badawcze. Doktorantka jest współautorką 4 prac oryginalnych, w tym 3 związanych bezpośrednio z tematyką dysertacji. Dodatkowo, bardzo pozytywnie jawi się sylwetka mgr Magdaleny Żarnik jako osoby pozyskującej i współrealizującej Granty badawcze. Ze wszystkich tych względów uważam, że przedłożona dysertacja spełnia wymogi ustawowe i przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie pani mgr Magdaleny Żarnik do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.


(dr hab. Maciej Dawidowski)