



WARSZAWSKI  
UNIwersYTET  
MEDYCZNY

KATEDRA TECHNOLOGII LEKÓW I BIOTECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

Warszawa, 20.03.2024

## Recenzja rozprawy doktorskiej

**mgr Aleksandry Hec**

**o tytule**

***Synthesis of small molecule inhibitors of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint interaction***

**wykonanej pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Pałasz jako promotor oraz  
dr Tomasza Sitara jako promotora pomocniczego.**

Prace badawcze opisane w dysertacji zostały zrealizowane w ramach Programu „Doktorat Wdrożeniowy” Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, jako efekt współpracy badawczo-wdrożeniowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego z firmą Recepton.

*Niniejsza 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.*

Zwalczanie nowotworów jest bardzo trudnym zagadnieniem, stąd poszukiwanie nowych leków o zastosowaniu w onkologii wymaga multidyscyplinarnego podejścia i opracowywania nowych technologii alternatywnych wobec klasycznych podejść. Obecnie, tradycyjne metody leczenia nowotworów, polegające na stosowaniu mniej lub bardziej selektywnych, cytotoksycznych związków małowcząsteczkowych, są stopniowo uzupełniane przez schematy nowocześniejsze,

powodujące mniejszą ilość skutków ubocznych, dające lepszą odpowiedź u pacjentów lub wręcz dające szansę na całkowitą remisję nowotworu bez nawrotów choroby w okresie pięcioletnim. Duże sukcesy na tym polu ma immuno-onkologia (immunoterapia nowotworów), polegająca na wzmocnieniu układu odpornościowego organizmu chorego do walki z chorobą, a więc na pobudzaniu jego naturalnej odpowiedzi na obecność tkanki nowotworowej. W tym podejściu klinicznym stosuje się przeciwciała monoklonalne, ich koniugaty z silnymi cytotoksynami, rzadziej związki małowcząsteczkowe.

Oddziaływanie receptora programowanej śmierci komórkowej (PD-1) z jego ligandem (PD-L1) jest jednym ze szlaków biochemicznych wykorzystywanych w immuno-onkologii. Wytworzenie funkcjonalnego kompleksu tych dwóch białek hamuje odpowiedź immunologiczną organizmu poprzez zmniejszenie proliferacji limfocytów T, uwalnianie cytokin oraz cytotoksyczność, co powoduje ich zamieranie. Wprowadzenie do terapii przeciwciał monoklonalnych (z ang. 'monoclonal antibodies', mAbs) hamujących łączenie się PD-1 z PD-L1 było jednym z przełomowych odkryć immuno-onkologii. Jedną z atrakcyjnych ścieżek odkrywania nowych leków przeciwnowotworowych działających na ten szlak, jest otrzymywanie związków drobnocząsteczkowych rozbijających połączenie PD-1/PD-L1. Sugeruje się, iż ta strategia mogła by mogły by być pozbawiona niektórych wad cechujących mAbs (np. konieczność podawania dożylnego, wysokie koszty wytwarzania, brak zdolności penetracji ośrodkowego układu nerwowego). Wspomniany kierunek poszukiwań jest jednak dużym wyzwaniem dla chemii medycznej, ponieważ kompleks PD-1/PD-L1 jest trudnym celem molekularnym. Należy on do grupy oddziaływań białko-białko (z ang. 'protein-protein interactions', PPIs), które w odróżnieniu od bardziej typowych celów molekularnych (typu enzym lub receptor) nie posiadają dobrze wykształconego miejsca aktywnego bądź kieszeni wiążącej, charakteryzują się dużą powierzchnią styku o dynamicznej strukturze i w której występują nieliczne, rozproszone, płytkie kieszenie wiążące o charakterze hydrofobowym. Stąd uważam, że temat badawczy który podjęła mgr Aleksandra Hec w swojej dysertacji - poszukiwanie nowych, małowcząsteczkowych modulatorów oddziaływania PD-1/PD-L1 - jest niezwykle ambitny.

Praca doktorska mgr Aleksandry Hec ma układ klasyczny. Wyodrębnione są w niej: wstęp teoretyczny, opis badań własnych z podaniem ich rezultatów, wnioski oraz część eksperymentalną. Struktura dysertacji jest przejrzysta, wyróżniamy w niej ponadto listę osiągnięć badawczo-wdrożeniowych Autorki, streszczenie, podsumowanie, wykaz skrótów oraz spis literatury.

We wstępie teoretycznym swojej pracy doktorskiej Autorka omówiła immunoterapię jako

obiecującą metodę w terapii nowotworów. Opisała szczegółowo rolę szlaku PD1/PD-L1 w procesie nowotworzenia oraz scharakteryzowała białka które w nim uczestniczą. Szczególną uwagę poświęciła strukturze kompleksu PD1/PD-L1 oraz sposobowi, w jaki dochodzi do połączenia tych dwóch białek. Wskazała, które rejony powierzchni ich styku można wykorzystać w projektowaniu inhibitorów. W dalszej kolejności Dyplomantka opisała rolę związków małocząsteczkowych jako alternatywnych wobec przeciwciał monoklonalnych stosowanych w celowaniu PD1/PD-L1. Obszerny fragment wstępu, ważny z punktu widzenia przeprowadzonych badań własnych, dotyczy znanych peptydów, peptydomimetyków i związków małocząsteczkowych które jako mechanizm uchwytu wykorzystują szlak PD-1/PD-L1. Autorka wyodrębniła podgrupę ligandów o strukturze wydłużonej (z ang. „elongated inhibitors”), badania nad którymi stanowią ważną część Jej dysertacji. Podsumowując ten fragment pracy, bardzo dobrze wprowadza on czytelnika w podejmowaną tematykę badawczą. Autorka omówiła obecny stan wiedzy na temat inhibitorów PD1/PD-L1, szeregując je od najbardziej złożonych strukturalnie do tych o najprostszej budowie chemicznej. Zamieszczone ryciny są czytelne, a szczególnie przypadł mi do gustu sposób prezentacji struktur związków aktywnych na obrazkach nr. 18 i 19. Wyróżniam również to, że tak szczegółowe rozeznanie stanu wiedzy na temat inhibitorów PD-1/PD-L1 wymagało od Autorki dysertacji wykonania analizy literatury patentowej. Wstęp opiera się na przeglądzie piśmiennictwa, zawierającego pozycje opublikowane prawie w całości po roku 2010.

W dalszym rozdziale dysertacji zamieszczone są wyniki badań eksperymentalnych nad poszukiwaniem nowych, małocząsteczkowych inhibitorów interakcji PD-1/PD-L1. Autorka pracy, na drodze wieloetapowej syntezy otrzymała znaczną ilość nowych związków, które zaszeregowała do IX różnych grup, w sposób logiczny, uwzględniający ich strukturę chemiczną. W syntezie użyła szerokiego repertuaru reakcji chemicznych, m.in. redukcyjne aminowanie, utlenienie, redukcja, halogenowanie, amidowanie, czy reakcja Suzuki-Miyaura. Są to metody standardowo stosowane w otrzymywaniu cząsteczek potencjalnych leków,<sup>1</sup> a synteza jest zaprojektowana prawidłowo –

<sup>1</sup> Pomimo iż inhibitory PPI będące tematem dysertacji nierzadko nie spełniają tzw. ‘reguł lekopodobieństwa’, warto w tym miejscu przytoczyć interpretację ‘lekopodobieństwa’ w kontekście struktury związków i ich syntezy chemicznej, wg. prof. C. Nicolau (Nicolau, K. C., Angew. Chem. Int. Ed., 53, 2014, 9128–9140): *“Analiza kilku baz danych sugeruje, że typowy związek lekopodobny ma masę molową rzędu 350–550, log P w granicach 3.5–5.5 i całkowitą powierzchnię polarną 60–90 Å². Posiada 0–2 centr stereogenicznych, 30–50 % jej węgli ma konfigurację sp³, zawiera wiązanie biarylowe łączące skondensowany układ heterocykliczny oraz inny pierścień (przynajmniej jeden z pierścieni jest benzenowy). Taka cząsteczka zawiera “grupę solubilizującą” taką jak morfolina czy piperazyna, dołączoną przez linker do pierścienia aryłowego, lub grupy amidowej. Taka “typowa cząsteczka” została otrzymana na drodze syntezy czterodo sześćoetapowej, wykorzystującej wytworzenie wiązania amidowego, zniesienie grupy zabezpieczającej (najprawdopodobniej Boc), oraz reakcję sprzęgania krzyżowego katalizowaną palladem (najczęściej reakcję Suzuki).”*

jest logiczna, oszczędna, a poszczególne przekształcenia są ułożone w odpowiednich sekwencjach. Co najbardziej istotne dla projektu w którym Dyplomantka uczestniczyła, ta synteza doprowadziła do pożądanego celu – uzyskania odpowiedniej ilości inhibitorów PD-1/PD-L1 do analizy SAR i badań rozszerzonych. Otrzymane pochodne były charakteryzowane za pomocą co najmniej jednej z metod: spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) oraz spektrometrii mas.

Dla każdej grupy pochodnych, po omówieniu syntezy inhibitorów, Autorka dysertacji zamieściła i skomentowała wyniki oznaczeń *in vitro* efektywności ligandów z użyciem metod opartych o pomiary aktywacji limfocytów T (NFAT, z ang. ‘nuclear factor of activated T cells’) i/lub o pomiary fluorescencji czasowo rozdzielczej (HTRF, z ang. ‘Homogenous Time Resolved Fluorescence’). Dla niektórych związków została również podana efektywność blokowania kompleksu PD-1/PD-L1. Co ważne, omówienie wyników uzyskanych dla poszczególnych grup ligandów jest zakończone propozycjami dalszych, racjonalnych modyfikacji strukturalnych.

Praca obfituje w wyniki badań *in vitro*. Autorka dysertacji otrzymała inhibitory o zróżnicowanych aktywnościach, co dało podstawy do analizy zależności struktura-aktywność. Oczywiście, z punktu widzenia ewentualnych wdrożeń, najbardziej interesujące są ligandy powodujące znaczny efekt w testach biofizycznych. W tym kontekście, najsilniej działający związek z grupy ligandów  $\text{C}_2$ -niesymetrycznych,<sup>2</sup> o symbolu **5.2.11\_17a**, charakteryzował się wysokim powinowactwem do celu molekularnego oraz wykazał aktywność w testach komórkowych ( $\text{EC}_{50}$  równe 21.8 nM). Z tego względu związek poddano dalszym, bardziej szczegółowym badaniom. Oddziaływanie pochodnej **5.2.11\_17a** z białkiem PD-L1 oraz jej zdolność do rozbijania kompleksu PD-1/PD-L1 zostało potwierdzone za pomocą eksperymentu magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR): 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC i 1D w-AIDA (z ang. ‘weak-Antagonist Induced Dissociation Assay’). W pracy została również zamieszczona struktura krystalograficzna, która dowodzi że **5.2.11\_17** powoduje dimeryzację PD-L1. Jest to bardzo cenna informacja, tym bardziej że pozwoliła ona zrationalizować silne oddziaływanie ligandu z białkiem i może stanowić podstawę do projektowania kolejnych, bardziej aktywnych ligandów. Innym związkiem o bardzo korzystnym profilu oddziaływania na kompleks PD-1/PD-L1, była  $\text{C}_2$ -symetryczna pochodna 1,1'-bifenylu **9.15**. Została ona poddana badaniu *in vivo* na myszach z guzami wywołanym implantacją komórek nowotworowych linii MC38-hPD-L1. Zaobserwowano statystycznie istotnie mniejszą objętość guza u myszy którym podawano związek **9.15** doustnie, w

---

<sup>2</sup> Przytaczana tu klasyfikacja jest zaczerpnięta z klasyfikacji literaturowej, zwyczajowej, stosowanej przez Autorkę dysertacji.



pojedynczej dawce 200 mg/kg masy ciała, przez okres 21 dni, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. W konkluzji, autorka stwierdza iż związek **9.15** jest aktywny, ale wymaga wykonania dodatkowych badań *in vivo*, w tym zmiany podania z doustnego na dootrzewnowe.

Przechodząc do oceny dysertacji, pod względem formalnym, ma ona układ klasyczny. Jest napisana językiem angielskim, bardzo dobrym, jednak są w niej pewne błędy, np.: Str. 17: "This pocket consists of the side chains of LTyr56, LGlu58, LArg113, LMet115, and LTyr123. It can accommodate and react with a 6-membered aromatic ring." - (interact ?); Str. 20: "The next modification step was to try to close the peptides."; "(...) closed peptide (...)" - (cyclize, cyclized?); Str. 37: „cellural”, „dimeryzation” - (cellular, dimerization?); Str 67: " The HCl salt should be more soluble, making the compound more bioavailable as a potent drug." - (potential?); Strona 50: „Not so bad result (...)” - (choć szczere, w kontekście pracy naukowej to sformułowanie nie jest dostatecznie precyzyjne).

Mgr Aleksandra Hec dobrze zadbała również o poprawność w raportowanych danych, jednak pewne kwestie wymagają wyjaśnienia, np.: Str. 24: „IC<sub>50</sub>= 0.08 pM (Feng *et al.*, 2017a, Feng *et al.*, 2017b, Feng *et al.*, 2017c)” – jest to bardzo wysoka aktywność, liczona w fM, ze względów językowych recenzentowi nie udało się zweryfikować tej danej; zdarza się że nad strzałkami brakuje wzorów/symboli niektórych substratów, np. Str. 66, schemat 15, przejścia 4.1 do 5.1.2, 5.1.2 do 9.4 i 9,12 do 9.13; na niektórych schematach wzór chlorku mesylu jest nieprawidłowy; w przepisach eksperymentalnych nie zawsze są podawane wydajności w (%) oraz objętości używanych roztworów w (mL); w tabelach, dla niektórych wartości dotyczących aktywności *in vitro* (EC<sub>50</sub>) nie podano ilości wykonanych powtórzeń ani odchyień od średniej/odchyień standardowych; przy oznaczeniach HTRF podano wartości jako ułamki setne, odchylenia standardowe są natomiast podane w innych rzędach wartości (pełne liczby, w % ?); na Str. 65: „The O-methoxy non-symmetrically substituted 1,1'-biphenyl derivative (...)” - (co oznacza symbol “O”? atom tlenu?).

Analizując aspekty merytoryczne dysertacji, jej wartość oceniam ogólnie wysoko, szczególnie że opisane badania dotyczą bardzo trudnej klasy celów molekularnych (PPI), a ich wyniki będą użyteczne w projektowaniu nowych inhibitorów PD-1/PD-L1. Jednak, w mojej ocenie, pewne zagadnienia wymagają komentarza: Mam wątpliwości co do oznaczania grup funkcyjnych R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, ... R<sub>n</sub>. Dyplomantka nazywa je grupami protekcyjnymi („protecting groups”, Fig. 31), jednak użyta forma adnotacji nie jest standardowa, ponieważ nie udziela odpowiedzi na pytanie jaka grupa funkcyjna ma być blokowana; W tekście opisującym syntezę (Schemat 5, Str.

48) znajduje się wzmianka o selektywnej redukcji grupy estrowej w obecności karboksamidowej, za pomocą glinowodoru litu. Z drugiej strony wspomniany jest borowodorek sodu. Najprawdopodobniej chodziło o borowodorek litu (*nota bene*, czasem borowodorek sodu jest skuteczny w redukcji grupy estrowej); Ta sama strona: sformułowanie, że „It is interesting that its HCl salt form 4.12 did not improve the inhibitor activity score.”, wymaga wyjaśnienia. Wydaje się, że otrzymanie identycznego (w granicach błędu) wyniku dla wolnej zasady i dla jej soli jest spodziewane, ponieważ w oznaczeniach posługujemy się buforami. Z kolei, kilka rozdziałów dalej (str. 55), Dyplomantka stwierdza, że związek 5.2.11\_17a, będący chlorowodorkiem związku 5.2.11\_17, powoduje obecność tylko 16% niezdisocjowanego kompleksu w oznaczeniu HTRF, co w Jej mniemaniu świadczy o zwiększonej rozpuszczalności. Być może jest to prawda, jednak różnice aktywności związków wynikające z różnej rozpuszczalności, nie powinny być traktowane jako wiarygodne w analizie SAR. Dalej, „podobny efekt obserwuje dla związku 5.1.13\_2 i jego soli 5.1.13\_2a”, podczas gdy dla tego drugiego oznaczenie HTRF nie było wykonywane; Analizując fragment pracy zawierający opis aktywności *in vivo* nasuwa się pytanie, dlaczego pominięto badania ADME i farmakokinetyki, przed podaniem związku 9.15 zwierzętom. W moim odczuciu powoduje to, iż trudno interpretować wyniki eksperymentu *in vivo*, ponieważ nie wiadomo, czy obserwowany efekt dość wysokiej dawki związku nie jest rezultatem jego nieoptymalnego profilu ADME i w takim razie zamieszczone wyniki mają charakter badań bardzo wstępnych. Pojawia się też pytanie, dlaczego nie postanowiono przebadać pochodnej 5.2.11\_17a? Zastanawia również, dlaczego nie przeprowadzono badań *in vitro* cytotoksyczności związków wobec komórek nowotworowych i prawidłowych? Prawdziwe jest stwierdzenie iż eksperyment *in vivo* daje szerszy obraz aktywności i ma większe znaczenie przy podejmowaniu decyzji dotyczących projektu. Jednak, cytotoksyczność na poziomie komórkowym nie zawsze koreluje z siłą oddziaływania na cel molekularny, a więc ta pierwsza jest lepszym kryterium selekcji cząsteczek do badań *in vivo*.

Lektura dysertacji jest bardzo interesująca, ponieważ stanowi opis szerszego projektu typu *drug-discovery*. W tym kontekście warto zapytać o dalsze kroki. Czy otrzymane związki mają już pożądany profil, czy też wymagają dalszej optymalizacji? Na przykład, związek o symbolu 5.2.11\_17a wykazał silne działanie *in vitro*, jego wiązanie potwierdzono za pomocą NMR i krystalografii, jednak nie przeprowadzono dla niego badań *in vivo*. Czy Autorka uważa że związek ten warto dalej optymalizować, np. w oparciu o dane krystalograficzne (jakie modyfikacje zaproponowała by?).

Wymienione wyżej uwagi nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Hec. Przede wszystkim, uwagi te w małym stopniu dotyczą zadań badawczych które Dyplomantka wykonywała osobiście (Autorka definiuje je jako: „synteza, optymalizacja oraz analiza otrzymanych związków chemicznych pod względem właściwości inhibujących ścieżkę PD-1/PD-L1”). Dalej, badania zawarte w dysertacji odnoszą się do PPIs, które rzadko są celowane ze względu na wysoki stopień trudności otrzymania związków o pożądanym profilu aktywności i ADME/PK. Wyniki zostały opublikowane w artykule naukowym, dalsze publikacje są w recenzji/w przygotowaniu. Ze wszystkich tych względów uważam, że przedłożona dysertacja spełnia wymogi ustawowe i przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie pani mgr Aleksandry Hec do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

  
(dr hab. n. farm. Maciej Dawidowski)

717 pr2