



Politechnika Łódzka

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

Łódź, dn. 03.03.2024 r.

Dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach, prof. uczelni
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul Stefanowskiego 2/22
90-537 Łódź

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz**

**„Projektowanie, synteza i aktywność biologiczna inhibitorów
oddziaływania PD-1/PD-L1 bazujących na minibiałkach”**

wykonanej w Katedrze Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej
pod kierunkiem prof. dr hab. Łukasza Berlickiego i zrealizowanej w dziedzinie nauk ścisłych
i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny
Naukowej Nauki Chemiczne dr hab. inż. Roberta Góry, prof. uczelni (283/RDND10/2023).

Zasadność podjętej tematyki

Sukces immunoterapii ukierunkowanej na zablokowanie immunologicznych punktów kontroli zrewolucjonizował leczenie chorób nowotworowych. Najpopularniejszymi inhibitorami w tym podejściu są przeciwciała monoklonalne (mAb), przy czym kluczową rolę odgrywają przeciwciała skierowane na receptor programowanej śmierci 1 (PD-1) i jego ligand (PD-L1). Zatwierdzone przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) mAb stosuje się do skutecznego leczenia wielu nowotworów złośliwych, w tym między innymi raka płaskonabłonkowego skóry, czerniaka, niedrobnokomórkowego raka płuc, raka nabłonka dróg moczowych czy klasycznego chłoniaka Hodgkina. Co więcej, trwają badania mające na celu sprawdzenie możliwości stosowania inhibitorów punktów kontrolnych, samodzielnie lub w połączeniu z innymi lekami, w leczeniu innych typów nowotworów. Chociaż podejście oparte o zastosowanie mAb ma ogromny potencjał terapeutyczny, jednakże ma również poważne wady i może wywoływać zdarzenia niepożądane o podłożu immunologicznym. Poza tym, leczenie to przyniosło skuteczne, trwałe i długotrwałe odpowiedzi tylko u części pacjentów. Zatem istnieje duże zapotrzebowanie na alternatywne terapie blokujące punkty kontrolne układu immunologicznego nieoparte na przeciwciałach.

W tym kontekście postawiony w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz cel badań w postaci opracowania inhibitorów oddziaływania PD-

1/PD-L1 bazujących na minibiałkach wpisuje się doskonale w aktualny nurt poszukiwań strategii polegających na aktywacji układu odpornościowego do atakowania komórek nowotworowych. Tak więc cel badań i zasadność prowadzonych badań nie budzą jakichkolwiek zastrzeżeń. Praca została wykonana w Katedrze Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Łukasza Berlickiego, który z sukcesem prowadzi badania związane z projektowaniem, syntezą i analizą aktywności inhibitorów oddziaływania białko-białko.

Charakterystyka rozprawy i uwagi

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz liczy 190 stron tekstu wzbogaconych o 72 rysunki i 27 tabel wydrukowanych w formacie książkowym. Dysertacja została przygotowana w sposób klasyczny dla doktorskich prac eksperymentalnych. Zawiera polskie i angielskie streszczenie, wykaz skrótów oraz sześć podstawowych rozdziałów obejmujących wstęp teoretyczny (36 stron), cel pracy (2 strony), wyniki i dyskusję (94 strony), podsumowanie (4 strony), część eksperymentalną (13 stron) oraz bibliografię. Wykaz cytowanej literatury zawiera 143 pozycje, przy czym w większości to piśmiennictwo opublikowane po roku 2010.

W części literaturowej omówione zostały zasadnicze zagadnienia związane z rolą oddziaływań białko-białko, blokowaniem punktów kontrolnych układu immunologicznego ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań PD-1/PD-L1 oraz charakterystyką minibiałek. Warto tutaj zauważyć, iż ostatni podrozdział zawiera w przeważającej części materiał ujęty w postaci artykułu „Miniproteins in medicinal chemistry” opublikowanego w roku 2022 w czasopiśmie *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, w którym Pani mgr Ciesiołkiewicz jest pierwszym autorem. Co istotne, Autorka dysertacji przybliżyła także strukturę znanych trójhelisowych minibiałek, które wykorzystwała do zaprojektowania inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Umieszczone w tej części pracy rysunki zdecydowanie ułatwiają lekturę tekstu, a zaprezentowane treści są bardzo dobrym wprowadzeniem do kolejnych rozdziałów pracy.

W podrozdziale „Cel pracy” Pani mgr Agnieszka Ciesiołkiewicz przedstawia powody podjętej tematyki oraz założenia osiągnięcia postawionego celu poprzez wykorzystanie dwóch wariantów projektowania minibiałkowych inhibitorów, a mianowicie wykorzystania znanych struktur (wiliny i domeny „engrailed”) oraz projektowania *de novo* minibiałek zawierających β -aminokwasy. Konformacje wszystkich zaprojektowanych minibiałkowych inhibitorów miały być stabilizowane obecnością hydrofobowego rdzenia. Etapem wstępnym do osiągnięcia założonych celów była synteza i analiza biologiczna oraz strukturalna makrocyclicznego peptydowego inhibitora oddziaływań PD-1/PD-L1 o nazwie pAC65 wymienionego w patencie Bristol Myers Squibb w 2016 r.

Pierwszym etapem pracy opisanym w podrozdziale „Wyniki i dyskusja” była właśnie synteza 15-aminokwasowego pAC65 zawierającego 7 reszt niekanonicznych. Co istotne, ze względu na brak komercyjnej dostępności, pochodna tryptofanu (TrpNAc) musiała również zostać zsyntetyzowana przez Doktorantkę. Już na tym etapie pracy, mimo wykorzystania opublikowanego wcześniej protokołu, Pani mgr Ciesiołkiewicz musiała rozwiązać wiele

problemów metodycznych. Również proces oczyszczania TrpNAc wymagał optymalizacji, podobnie jak synteza docelowego peptydu pAC65. Ostatecznie udało się otrzymać wystarczającą ilość peptydu niezbędną do otrzymania wysokiej jakości kryształów pAC65 w kompleksie z PD-L1, co umożliwiło rozwiązanie struktury przy rozdzielczości 1,1 Å. Badania krystalograficzne zostały przeprowadzone w zespole profesora Tadeusza Holaka z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, podobnie jak ocena aktywności biologicznej peptydu pAC65. W tym celu przeprowadzono testy blokady immunologicznego punktu kontrolnego na bazie komórek oraz zweryfikowano powinowactwo pAC65 do PD-L1 przy użyciu dostępnego handlowo testu z wykorzystaniem homogennej czasowo rozdzielczej fluorescencji HTRF. W oparciu o dane uzyskane z testów biologicznych wykazano, że pAC65 jest najsilniejszym opublikowanym dotychczas inhibitorem interakcji PD-1/PD-L1 nieopartym na przeciwciałach, którego wartość EC_{50} jest porównywalna z mAb zatwierdzonymi przez FDA. Co więcej, otrzymane dane strukturalne zostały wykorzystane przez Doktorantkę w dalszych etapach pracy doktorskiej. W tym miejscu należy również zauważyć, że wyniki tych prac zostały zawarte w artykule „Structural and biological characterization of pAC65, a macrocyclic peptide that blocks PD-L1 with equivalent potency to the FDA-approved antibodies” opublikowanym w 2023 r w znakomitym czasopiśmie *Molecular Cancer*, gdzie Pani mgr Ciesiołkiewicz jest jedną ze współautorów.

Dwa kolejne podrozdziały to opis projektowania, analizy strukturalnej i aktywności biologicznej minibiątkowych rusztowań i inhibitorów. Autorka dysertacji wykorzystowała oprogramowanie RosettaDock umożliwiające wprowadzanie losowych zmian strukturalnych do modelowania molekularnego kompleksów minibiątko/PD-L1. W opisie części eksperymentalnej dokowania *in silico* brakuje mi jednak szczegółowych parametrów zastosowanych protokołów. Na podstawie danych otrzymanych podczas modelowania, potwierdzonych licznymi rysunkami przedstawiającymi wizualizację struktur oraz tabel zawierających zaplanowane sekwencje aminokwasowe, zsyntetyzowane zostały minibiątka, które analizowano strukturalnie z wykorzystaniem widm dichroizmu kołowego CD. Na etapie syntezy również zabrakło mi informacji czy Pani mgr Ciesiołkiewicz napotkała trudności na tym etapie i jaka wydajność towarzyszyła poszczególnym syntezom. O trudnościach syntetycznych Doktorantka wspomina jedynie podczas opisu minibiątek zawierających β -aminokwasy. Prosiłabym wobec tego o komentarz tej kwestii podczas publicznej obrony. Kolejne analizy obejmują wykonanie krzywych denaturacji termicznej w celu dostarczenia informacji o stabilności konformacyjnej minibiątek oraz testy aktywności biologicznej w postaci interferometrii biowarstwowej BLI oraz HTRF. Dzięki zastosowaniu takiej metodologii możliwe było określenie stałej dysocjacji K_D wiązania inhibitora z PD-L1 oraz stopnia dysocjacji kompleksu. W pracy zamieszczone zostały odpowiednie widma CD, krzywe denaturacji termicznej oraz tabele zawierające wyniki aktywności biologicznej.

Na podstawie lektury można wnioskować o ogromnej ilości pracy włożonej w żmudną optymalizację otrzymanych potencjalnych inhibitorów ze względu na napotykaną trudności związane głównie z brakiem obecności pożądanego konformacji, niedostateczną stabilnością bądź rozpuszczalnością. W pierwszym etapie Doktorantka przebadła sześć potencjalnych inhibitorów bazujących na strukturze wiliny (V1-V6) oraz oryginalne minibiątko V1. Otrzymane minibiątka charakteryzowały się stosunkowo wysokim powinowactwem do PD-

L1. Ponieważ wprowadzone mutacje miały negatywny wpływ na stabilność konformacyjną bądź obserwowano brak korelacji między wartościami K_D a aktywnością inhibitorową, w kolejnym etapie zaprojektowano minibiałkowe inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1 na bazie struktury domeny „engrailed”. Tutaj Autorka dysertacji poprzedziła projektowanie inhibitorów optymalizacją samego rusztowania, co doprowadziło do otrzymania jego skróconej wersji E0. Początkowo zaprojektowano cztery inhibitory (E1-E4), spośród których, na podstawie najkorzystniejszych parametrów stabilności i rozpuszczalności, wytypowano związek E1, dla którego określono wartość IC_{50} na poziomie 3,9 μM . Kolejne rundy optymalizacyjne polegały na potencjalnym zwiększeniu aktywności inhibitorowej (E5-E14) oraz dodatkowo stabilizacji struktury konformacyjnej (E15-E19), co doprowadziło do otrzymania inhibitora charakteryzującego się wartością IC_{50} równą 3,1 μM . Jednakże dwa minibiałka o najkorzystniejszych właściwościach i aktywności hamującej (E5 i E15) wykazywały ograniczoną rozpuszczalność w medium przeznaczonym do hodowli komórkowych. W związku z tym Pani mgr Ciesiołkiewicz podjęła kolejne rundy optymalizacji mające na celu poprawę rozpuszczalności w środowisku wodnym, które doprowadziły do otrzymania kolejnych grup potencjalnych inhibitorów (E20-E23 i E24-E30) oraz E31-E33. Efektem tych prac było wytypowanie związków E24 i E32, które zostały poddane badaniom z wykorzystaniem komórek oraz testu blokowania immunologicznego punktu kontrolnego oraz wyznaczenia wartości EC_{50} na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Na tym etapie okazało się, że kluczowe dla aktywności syntetyzowanych peptydów w warunkach hodowli komórkowych jest pH środowiska. Obniżenie pH medium hodowlanego z wartości 7,4 do 6,9 skutkowało wysoką aktywnością hamującą interakcji PD-1/PD-L1 dla obydwu testowanych peptydów na poziomie mikromolarnym. Tę obserwację uważam za szczególnie znaczącą w kontekście potencjalnego zastosowania minibiałek w terapiach przeciwnowotworowych. E32 został również wytypowany do kolejnej rundy optymalizacji, w wyniku której zaprojektowano minibiałka E34-E36, spośród których peptyd E36 wykazywał najkorzystniejsze cechy.

Jako drugi główny cel Pani mgr Ciesiołkiewicz wskazała zaprojektowanie *de novo* inhibitorów interakcji PD-1/PD-L1 na bazie minibiałek zawierających β -aminokwasy. W tym celu do struktury minibiałek wprowadzono cykliczny β -aminokwas oparty na strukturze cyklopentanu (*trans*-ACPC). Podejście to okazało się jednak wysoce wymagające i nie sprostало pokładanym oczekiwaniom. Pierwsze zaprojektowane rusztowania (K1-K7) zawierały trzy reszty β -aminokwasów. Niestety niska rozpuszczalność najbardziej obiecującego pod względem cech strukturalnych minibiałka K7 okazała się ograniczeniem dla kolejnych analiz. K7 stał się jednak punktem wyjścia do kolejnych optymalizacji wprowadzających do rusztowań reszty polarne (K8-K12) oraz zwiększających stopień upakowania hydrofobowego rdzenia (K13-K15), a także do syntezy właściwych inhibitorów oddziaływać PD-1/PD-L1 (P1-P10). Ze względu na bardzo ograniczoną rozpuszczalność i brak możliwości analiz aktywności biologicznej potencjalnych inhibitorów Autorka dysertacji podjęła próby zaprojektowania i analizy strukturalnej minibiałek zawierających dwie reszty β -aminokwasów (O1-O5). Optymalizacja rusztowania O4 doprowadziła do otrzymania kolejnej serii O6-O12, która jednak również nie spełniła oczekiwań pod względem stabilizacji struktury. Ostatecznie peptyd O5 został poddany analizom strukturalnym, które na etapie pisania rozprawy nie zostały jeszcze uzyskane. W związku z

tym proszę o komentarz czy dostępne są już wyniki tych analiz i ewentualnie jakie wnioski można z nich wyciągnąć.

W kolejnym podrozdziale znajdujemy zwięzłe podsumowanie otrzymanych wyników, a w kolejnym „Część eksperymentalna” opis procedur poszczególnych eksperymentów. Opisy te są jednak często dość ogólnikowe. W kontekście podrozdziału „Podsumowanie” prosiłabym o jasne wskazanie przez Autorkę dysertacji podczas publicznej obrony pięciu najistotniejszych wg Niej wniosków wynikających w przeprowadzonej analizy typu struktura-aktywność.

Należy podkreślić, że umiejętne zaplanowanie badań i konsekwentne ich realizowanie poprzez kolejne rundy optymalizacyjne dostarczyły szeregu oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Na uwagę zasługuje nie tylko osiągnięcie ostatecznego celu, czyli otrzymania minibiółkowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 wykazujących mikromolarną aktywność hamującą, ale również ilość zaprojektowanych, zsyntetyzowanych i przeanalizowanych peptydów. Jak wskazuje w podsumowaniu Doktorantka, w ramach przedstawionej dysertacji otrzymano 42 potencjalne inhibitory zawierające α - oraz 37 zawierających α - i β -aminokwasy. Świadczy to o determinacji i ogromnym nakładzie pracy Pani mgr Ciesiołkiewicz. Szkoda, że wyniki te nie ukazały się jeszcze w postaci artykułu naukowego.

Pod względem edytorskim Doktorantce nie udało się ustrzec błędów, które jednak nie wpływają zasadniczo na pozytywny odbiór całej pracy. Przykładowo

- w niektórych akapitach brak jest odnośników literaturowych do prezentowanych treści (np. w podrozdziale 1.3). Mankament ten powtarza się również w kolejnych rozdziałach.
- rysunek 1: czy powinien być odnośnik 28 czy 23
- skróty myślowe, np. „receptorów regulujących limfocyty T” zamiast regulujących aktywność limfocytów T lub „Zwiększenie aktywności hamującej biologii interleukiny-2” (powinno też być IL-2 lub interleukiny 2)
- gen kodujący PD-1, *pdcd1*, (błędnie zastosowana nomenklatura ludzkiego genu - powinno być *PDCD1*)
- fosfatazy hydrolizują reszty fosforanowe? (str. 13)
- usterki językowe, np. receptor ekspresjonowany zamiast ekspresjonowany; Peptydu (zamiast Peptydy) oczyszczane
- str 35: Odnośnik 80 (Liu J et al., Front Pharmacol. 2021;12:731798) - powinno być Liu et al. J Immunother Cancer. 2019;7(1):270.

Podsumowując, nakreślone na początku cele pracy, które stanowią złożone problemy badawcze zostały zrealizowane w sposób skrupulatny i przemyślany. Nie oznacza to jednak, że tematyka badawcza została w tym obszarze wyczerpana. Wręcz przeciwnie - otwiera nowe pola do dyskusji, a otrzymane wyniki stanowią punkt wyjścia do dalszych badań. Dlatego prosiłabym Doktorantkę o kilka zdań na temat możliwości podjęcia kolejnych kroków badawczych w oparciu o uzyskane dotychczas wyniki.

Podsumowanie

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz zatytułowana „Projektowanie, synteza i aktywność biologiczna inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 bazujących na minibiałkach” stanowi merytorycznie wartościowy i nowatorski wkład do światowej wiedzy na temat chemii peptydów i możliwości wykorzystania minibiałek do hamowania oddziaływań białko-białko. Rozprawa obejmuje bogaty materiał, który wymagał przeprowadzenia szeroko zakrojonych badań. Stwierdzam więc z całym przekonaniem, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszelkie warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Ciesiołkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Adyta Gembalska - Darmoch