

University of Gdańsk

Faculty of Chemistry

MSc Magdalena Anna Bojko

*Searching for peptides interacting with the PD-1
and PD-L1 immune checkpoint proteins for cancer
immunotherapies*

Doctoral Thesis

*Poszukiwanie peptydów oddziałujących z białkami immunologicznych
punktów kontrolnych PD-1 i PD-L1 wykorzystywanych w terapiach
nowotworowych*

Doctoral dissertation conducted at the Department of Biomedical
Chemistry

under the supervision of

prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło

co-supervisor: dr Marta Spodzieja

Gdańsk 2023

Streszczenie

Nowotwory to grupa chorób, z którymi ludzkość boryka się od początku istnienia. Liczba zachorowań na raka rośnie każdego roku i szacuje się, że do 2050 roku może osiągnąć około 60 milionów nowych przypadków. Zmusza to rządy państw i naukowców do pracy nad nowymi terapiami przeciwnowotworowymi oraz programami profilaktyki i leczenia. Obecnie istnieje wiele różnych podejść do leczenia raka. Często terapia przeciwnowotworowa łączy więcej niż jeden rodzaj leczenia, jednak jej efekty nie zawsze są zadowalające. W ostatnich dwóch dekadach wiele uwagi poświęcono immunoonkologii, a zwłaszcza hamowaniu punktów kontrolnych układu immunologicznego. Za prace nad tym zagadnieniem, w 2018 roku dwóch naukowców, Thasuku Honjo i James P. Allison, otrzymało Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Punkty kontrolne układu odpornościowego są odpowiedzialne za modulację odpowiedzi immunologicznej, poprzez regulację aktywności limfocytów T. Jednym z najlepiej poznanych i najlepiej scharakteryzowanych punktów kontrolnych hamujących odpowiedź układu odpornościowego jest białko PD-1, tworzące kompleks ze swoim ligandem, białkiem PD-L1. Zablokowanie wiązania się tych molekuł może mieć wiele potencjalnych zastosowań klinicznych, a związki hamujące tworzenie kompleksu PD-1/PD-L1 mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów i chorób zakaźnych.

Obecnie istnieje wiele podejść mających na celu blokowanie tworzenia kompleksów przez białka należące do punktów kontrolnych układu immunologicznego, co daje pacjentom nadzieje i nowe możliwości powrotu do zdrowia. Jednak zatwierdzone przez FDA terapie przeciwnowotworowe w większości oparte są na przeciwciałach monoklonalnych, które przyczyniają się do wystąpienia wielu skutków ubocznych i nie zawsze są skuteczne. Ponadto koszt rocznego leczenia jednego pacjenta złożony z jednego przeciwciała blokującego kompleks PD-1/PD-L1 może sięgać nawet ponad 100 000 USD. Terapia skojarzeniowa, przy użyciu co najmniej dwóch przeciwciał monoklonalnych, przynosząca lepsze efekty, jest jeszcze droższa a przez to mniej dostępna dla pacjentów onkologicznych. Wszystko to sprawia, że konieczne jest poszukiwanie nowych, lepszych i bardziej przystępnych cenowo terapii blokujących wiązanie się białka PD-1 z PD-L1. W swoich badaniach skupiłam się na poszukiwaniu

peptydowych inhibitorów tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1, zdolnych do przywracania funkcji układu odpornościowego. Do zaprojektowania peptydów, wykorzystałam strukturę krystaliczną kompleksu PD-1/PD-L1 oraz informacje uzyskane z analizy MM/GBSA.

W pierwszym etapie moich badań otrzymałam trzynaście peptydów liniowych oraz cyklicznych z mostkami disulfidowymi, wywodzących się ze struktury białka PD-1. Wykorzystując technikę SPR określiłam ich powinowactwo do białka PD-L1. Wiązanie do białka zaobserwowałam dla peptydów **(10)** i **(7)**, ale sześć innych związków również oddziaływało z celem molekularnym. Wszystkie peptydy, które wiązały się do białka PD-L1 poddałam dalszej analizie. Zbadałam ich stabilność w pożywce RPMI 1640 (z 10% FBS), używanej w hodowli komórkowej oraz ich wpływ na żywotność trzech linii komórkowych, wykorzystywanych w dalszych doświadczeniach. Dla większości badanych związków, zaobserwowałam zmniejszenie się ich stężenia po dodaniu do pożywki oraz po 24 godzinach inkubacji. Nie zaobserwowałam jednak dodatkowych sygnałów na chromatogramach uzyskanych podczas analizy z wykorzystaniem HPLC, co może wskazywać, że nie były one przedmiotem degradacji, natomiast mogły oddziaływać ze składnikami pożywki. Następnie sprawdziłam wpływ peptydów na żywotność komórek. Test ten wykonałam dla trzech linii komórkowych - CHO-K1, Jurkat E6.1 i TCS Ctrl (zmodyfikowane BW5417). Na komórki Jurkat E6.1 negatywny wpływ miały jedynie najwyższe stężenia niektórych z peptydów (150 μ M). Linie CHO-K1 i TCS Ctrl okazały się bardziej wrażliwe na działanie związków. Badane peptydy wykazały efekt cytotoksyczny w szerszym spektrum niż w przypadku linii komórkowej Jurkat E6.1. Sprawdziłam również, czy otrzymane przez mnie związki konkurują z białkiem PD-1 o wiązanie się z PD-L1 obecnym na powierzchni komórek oraz określiłam czy posiadają zdolności do hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 w teście komórkowym polegającym na przywróceniu ekspresji lucyferazy poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NFAT. Wyniki moich badań pokazują, że peptydy **(7)** i **(10)** w pewnym stopniu hamują tworzenie się kompleksu białko-białko. Ponadto peptyd **(7)** konkuruje z PD-1 o wiązanie się z PD-L1.

Drugie podejście do blokowania kompleksu PD-1/PD-L1 polegało na zaprojektowaniu peptydów, wywodzących się ze struktury białka PD-L1. Otrzymałam siedemnaście peptydów, które były liniowe lub posiadały mostek disulfidowy. Peptydy pochodzące z białka PD-L1 testowałam w podobny sposób jak peptydy pochodzące z białka PD-1.

Zbadałam ich zdolność do konkurencji z białkiem PD-L1 o wiązanie się z PD-1 znajdującym się na powierzchni komórki oraz ich właściwości hamujące względem kompleksu PD-1/PD-L1 poprzez pomiar ekspresji eGFP wyindukowanego za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. W teście kompetycyjnym peptydy **(L1)** i **(L11)** zakłócają wiązanie się PD-L1 do PD-1 w sposób zależny od stężenia, ponadto **(L11)** jako jedyny stymulował ekspresję eGFP poprzez hamowanie tworzenia się kompleksu PD-1/PD-L1 w sposób zależny od stężenia. Peptyd **(L11)** jest również jednym ze związków najsilniej wiążących się do białka PD-L1.

Na podstawie wyników otrzymanych dla peptydów wywodzących się z białka PD-1, wybrałam peptyd **(10)** jako cząsteczkę wiodącą do zaprojektowania jego analogów. Zaprojektowałam sześć związków, jednak tylko cztery z nich zostały poddane dalszej analizie, ze względu na problemy powstałe podczas syntezy. Do wszystkich analogów peptydu **(10)** wprowadziłam zmiany w pętli, aby ustabilizować ich strukturę i przez to poprawić ich powinowactwo do PD-L1. Wprowadzone modyfikacje nie zwiększyły siły wiązania się z białkiem PD-L1, w porównaniu do peptydu **(10)**, jednak wpłynęły na ich stabilność i wiązanie się ze składnikami pożywki. Związki te miały również dużo mniej negatywny wpływ na komórki, wykorzystywane w testach. W funkcjonalnym teście komórkowym, przeprowadzonym w celu zbadania właściwości kompetycyjnych analogów peptydu **(10)**, zaobserwowałam, że zmiany wprowadzone w sekwencji **A3** prowadzą do wypierania białka PD-1 z kompleksu z PD-L1 w sposób zależny od dawki. W teście stymulacji opartym na systemie ekspresji genu reporterowego (NF- κ B::eGFP) analogi **A3**, **A4** i **A5** podobnie jak peptyd **(10)** przywracają ekspresję eGFP tylko w najwyższym zastosowanym stężeniu.

Rynek peptydów terapeutycznych rośnie z roku na rok i szacuje się, że do 2026 roku osiągnie wartość 50,60 mld USD. W badaniach klinicznych nad rozwojem terapii immunookologicznych coraz częściej można spotkać terapie wykorzystujące w swoim podejściu peptydy i peptydomimetyki. Otrzymane w tej pracy cząsteczki, po dalszych modyfikacjach struktury w celu zwiększenia ich aktywności również będą mogły znaleźć zastosowanie jako terapeutyki w immunoonkologii.