



Politechnika Wroclawska

---

Nauki ścisłe i przyrodnicze  
Nauki Chemiczne

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

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

**mgr inż. Agnieszka Ciesiołkiewicz**

Promotor: prof. dr hab. inż. Łukasz Berlicki

Słowa kluczowe: peptydy,  $\beta$ -aminokwasy, inhibitory oddziaływania białko-białko,  
projektowanie leków, immunoterapie przeciwnowotworowe

**Wrocław 2023**



**Pragnę serdecznie podziękować:**

**prof. dr hab. inż. Łukaszowi Berlickiemu**, mojemu promotorowi, za umożliwienie mi realizacji badań w ramach dwóch ekscytujących projektów, za poświęcony mi czas, cenne wskazówki oraz pomoc w przygotowywaniu niniejszej pracy.

**Juanowi Lizandra Perez** oraz **Monice Szefczyk** za wsparcie i przyjaźń w każdym dniu fascynującej przygody jaką były ostatnie cztery lata.

**Kolegom i Koleżankom z Katedry Chemii Bioorganicznej**, Violi Markovic, Saurabhowi Loharchowi, Natalii Miodowskiej, Pawłowi Noceniowi, Annie Szczepańskiej, Mateuszowi Garbiczowi oraz Marcie Grabarek, za wspianą, pełną wsparcia i wyrozumiałości atmosferę, gotowość do pomocy oraz liczne dyskusje i uwagi. Dzięki Wam praca naukowa stała się nie tylko produktywna, ale także satysfakcjonująca.

**Kolegom i Koleżankom ze Szkoły Doktorskiej Politechniki Wrocławskiej**, w szczególności: Kindze Halickiej-Stępień, Rafałowi Lendzie, Marcinowi Sojce i Ewelinie Waglewskiej oraz Honoracie Poturaj. Wasza przyjaźń i zrozumienie były dla mnie ogromnym źródłem siły i motywacji podczas realizacji tej rozprawy.

**Radzie Doktorantów Politechniki Wrocławskiej** za nieocenioną możliwość realizacji fascynujących projektów oraz zadań, jakie mi powierzono. Wasze ciągle zaangażowanie na rzecz dobra doktorantów zasługuje na ogromną wdzięczność.

**Moim przyjaciółom**, Marii Makowskiej, Natalii Gawronkiewicz, Radosławowi Rajczakowskiemu oraz Gosi Lewińskiej za nieocenione wsparcie, otuchę, przyjaźń i niesamowitą wyrozumiałość.

**Moim najbliższymi**, Henryce, Krystynie, Joannie i Ireneuszowi Ciesiołkiewicz oraz Dominikowi Didule za bezwarunkową miłość, wsparcie i wyrozumiałość. Bez Was ta praca nigdy by nie powstała.





## SPIS TREŚCI

Streszczenie .....	1
Abstract.....	3
Wykaz stosowanych skrótów .....	5
1. Wstęp.....	7
1.1. Oddziaływanie białko-białko .....	7
1.2. Punkty kontroli odpowiedzi immunologicznej .....	8
1.3. Oddziaływanie PD-1/PD-L1 .....	10
1.3.1. Przeciwnowotworowa odpowiedź immunologiczna .....	10
1.3.2. Charakterystyka receptora PD-1 .....	13
1.3.3. Charakterystyka ligandów PD-1 – PD-L1 i PD-L2.....	13
1.3.4. Struktura kompleksu PD-1/PD-L1 .....	14
1.4. Inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1 .....	18
1.4.1. Przeciwciała .....	18
1.4.2. Związki małowcząsteczkowe.....	26
1.4.3. Peptydy.....	31
1.5. Minibiałka .....	37
1.5.1. Minibiałka stabilizowane przez mostki disiarczkowe.....	38
1.5.2. Minibiałka stabilizowane przez obecność jonu metalu.....	42
1.5.3. Minibiałka stabilizowane przez hydrofobowy rdzeń .....	43
2. Cel pracy .....	51
3. Wyniki i dyskusja.....	53
3.1. pAC65 – makrocycliczny peptydowy inhibitor oddziaływania PD-1/PD-L1 .....	53
3.1.1. Synteza .....	53

3.1.2.	Aktywność biologiczna .....	59
3.1.3.	Struktura krystaliczna.....	60
3.2.	Inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1 bazujące na znanych rusztowaniach minibiałkowych.....	63
3.2.1.	Inhibitory bazujący na strukturze minibiałka wiliny .....	63
3.2.2.	Inhibitory bazujące na strukturze domeny „ <i>engrailed</i> ” .....	73
3.3.	Minibiałka zawierające $\alpha$ - i $\beta$ -aminokwasy zaprojektowane <i>de novo</i> . .....	127
3.3.1.	Rusztowania zawierające trzy reszty $\beta$ -aminokwasowe.....	128
3.3.2.	Inhibitory na bazie rusztowań zawierających trzy reszty $\beta$ -aminokwasowe.....	139
3.3.3.	Rusztowania zawierające dwie reszty $\beta$ -aminokwasowe .....	147
4.	Podsumowanie.....	163
5.	Część eksperymentalna .....	167
5.1.	Odczynniki .....	167
5.2.	Wspomagane komputerowo metody projektowania .....	167
5.2.1.	Protokół FastDesign oprogramowania Rosetta .....	167
5.2.2.	Docking RosettaDock.....	168
5.3.	Synteza kwasu (S)-2-(((9H-fluoren-9-ylo)metoksy)karbonylo)amino)-3-(1-(2-( <i>tert</i> -butoksy)-2-oksoetylo)-1H-indol-3-ylo)propanowego.....	168
5.4.	Synteza peptydów.....	170
5.4.1.	Synteza przy użyciu automatycznego syntezyzatora .....	170
5.4.2.	Odcinanie peptydów z żywicy.....	171
5.4.3.	Cyklizacja.....	171

5.4.4.	Oczyszczanie peptydów .....	171
5.4.5.	Identyfikacja produktu .....	172
5.5.	Dichroizm kołowy (CD).....	172
5.5.1.	Pomiar widm CD w stałej temperaturze 25°C .....	172
5.5.2.	Pomiary temperaturowe CD .....	172
5.6.	Pomiary NMR .....	173
5.7.	Krystalizacja.....	173
5.8.	Interferometria biowarstwowa (BLI) .....	174
5.9.	Homogenna czasowo rozdzielcza fluorescencja (HTRF) .....	174
5.10.	Test blokowania immunologicznego punktu kontrolnego oparty na komórkach.....	175
5.11.	Charakterystyka otrzymanych peptydów .....	177
6.	Bibliografia .....	180



## STRESZCZENIE

Rozwijająca się wiedza na temat roli interakcji białko-białko w organizmach otwiera nowe możliwości terapeutyczne. Jednym z obszarów, który stał się przedmiotem zainteresowania, jest blokowanie punktów kontrolnych układu immunologicznego, takich jak PD-1/PD-L1. Wykorzystywanie tych punktów kontrolnych jest powszechną strategią, która pozwala komórkom nowotworowym na uniknięcie wykrycia i proliferację w ludzkich organizmach. Ta strategia polega na tłumieniu aktywacji limfocytów T, co prowadzi do negatywnej regulacji reakcji układu immunologicznego. Toteż blokowanie oddziaływania PD-1/PD-L1 stanowi obiecujące podejście w leczeniu nowotworów. Niemniej jednak, nie jest to zadaniem trywialnym, głównie z powodu dużych, płaskich i hydrofobowych powierzchni interakcji między tymi białkami, które nie posiadają znaczących wgłębień ułatwiających projektowanie inhibitorów. Jak dotąd, FDA zatwierdziła siedem inhibitorów interakcji PD-1/PD-L1 opartych na przeciwciałach. Niestety, terapie oparte na przeciwciałach mają swoje ograniczenia, takie jak potencjalna immunogenność i słaba zdolność przenikania do guzów litych. W związku z tym prowadzone są badania nad innymi grupami potencjalnych inhibitorów. Wśród nich można wyróżnić związki małowcząsteczkowe oraz peptydy, które w porównaniu do przeciwciał mogą cechować się niższą toksycznością, lepszą biodostępnością oraz skuteczniejszym przenikaniem do guzów litych. Niestety, związki małowcząsteczkowe, pomimo ich ogromnej różnorodności i znacznych możliwości modyfikacji, mają pewne ograniczenia związane z rozmiarem, co oznacza, że są one zbyt małe, aby skutecznie blokować rozległe powierzchnie interakcji białko-białko. Złoty środek wydają się stanowić leki oparte na peptydach, które dzięki swoim rozmiarom są w stanie efektywnie hamować interakcje między białkami, jednocześnie zachowując zalety charakterystyczne dla mniejszych cząsteczek.

Szczególnie obiecujące w blokowaniu oddziaływań białko-białko wydają się minibiałka, które łączą cechy peptydów i białek. Są to cząsteczki o stabilnej

strukturze trzeciorzędowej i masie do 10 kDa. Ich mały rozmiar umożliwia produkcję za pomocą syntezy chemicznej, co ułatwia wprowadzenie niekanonicznych reszt aminokwasowych i zwiększa zakres możliwości ich potencjalnych funkcji. Z drugiej strony odpowiednio długa sekwencja aminokwasowa pozwala na wprowadzenie modyfikacji, które poprawiają ich aktywność, nie zmieniając znacząco struktury trzeciorzędowej. Minibiałka są obiecujące z punktu widzenia zastosowań medycznych, szczególnie w przypadku trudnych celów terapeutycznych, takich jak blokowanie interakcji białko-białko. Celem niniejszej rozprawy był opracowanie inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 opartych na minibiałkach.

## **ABSTRACT**

The evolving knowledge about the role of protein-protein interactions in organisms has opened new therapeutic possibilities. One of the areas that has attracted attention is the blockade of immune system checkpoint proteins, such as PD-1/PD-L1. Utilizing these checkpoint proteins is a common strategy that allows cancer cells to evade detection and proliferate within the human body. This strategy involves suppressing the activation of T lymphocytes, leading to negative regulation of the immune system response. Therefore, blocking the PD-1/PD-L1 interaction holds promise in cancer treatment. Nevertheless, it is not a trivial task, mainly due to the large, flat, and hydrophobic interaction surfaces between these proteins, which lack significant clefts that would facilitate inhibitor design. So far, the FDA has approved seven PD-1/PD-L1 interaction inhibitors based on antibodies. Unfortunately, antibody-based therapies have limitations, such as potential immunogenicity and poor penetration into solid tumors. Hence, research is ongoing into other groups of potential inhibitors. Among them, small molecules and peptides stand out, which, in comparison to antibodies, may offer lower toxicity, better bioavailability, and more effective penetration into solid tumors. However, low-molecular-weight compounds, despite their significant diversity and modifiability, have certain size-related limitations, meaning they are too small to effectively block extensive protein-protein interaction surfaces. Peptide-based drugs seem to strike a balance, as their size allows them to efficiently inhibit protein interactions while retaining the advantages typical of smaller molecules.

Particularly promising in blocking protein-protein interactions are miniproteins, which combine the characteristics of peptides and proteins. These molecules have stable tertiary structures and a mass of up to 10 kDa. Their small size allows for production through chemical synthesis, facilitating the introduction of noncanonical amino acid residues and expanding their potential functional range. On the other hand, a sufficiently long amino acid sequence enables modifications that enhance their activity without significantly altering the tertiary structure. Miniproteins hold promise for medical applications, especially for

challenging therapeutic targets, such as blocking protein-protein interactions. The aim of this thesis was to develop inhibitors of the PD-1/PD-L1 interaction based on miniproteins.



## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACN	acetonitryl
APC	komórka prezentująca antygen (ang. <i>antigen-presenting cell</i> )
APP	ptasi polipeptyd trzustkowy (ang. <i>avian pancreatic polypeptide</i> )
BLI	interferometria biowarstwowej (ang. <i>biolayer interferometry</i> )
BMS	Bristol-Myers Squibb
Boc	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylową
CD	dichroizm kołowy (ang. <i>circular dichroism</i> )
CDR	rejon determinujący dopasowanie (ang. <i>complementarity determining region</i> )
CRMP	minibiałko stabilizowane przez mostki disiarczkowe (ang. <i>cysteine-rich miniprotein</i> )
CSB	motyw $\beta$ -kartki stabilizowanej cysteiną (ang. <i>cysteine-stabilized <math>\beta</math>-sheet motif</i> )
CTLA-4	antygen 4 związany z limfocytami T (ang. <i>cytotoxic T cell antigen 4</i> )
DCM	dichlorometan
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropylkarbodiimid
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DSF	skaningowa fluorymetria różnicowa (ang. <i>differential scanning fluorimetry</i> )
EC <sub>50</sub>	połowa maksymalnego stężenia efektorowego (ang. <i>half maximal effective concentration</i> )
EDT	etano-1,2-ditiol
FDA	Agencja Żywności i Leków (ang. <i>U.S. Food and Drug Administration</i> )
Fmoc	grupa fluorenylometoksykarbonylowa
Fmoc-OSu	węglan 9-fluorenylometylo-sukcynimidylu
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HTRF	homogenna czasowo rozdzielcza fluorescencja (ang. <i>homogeneous time resolved fluorescence</i> )

IC<sub>50</sub> połowa maksymalnego stężenia hamującego (ang. *half maximal inhibitory concentration*)

ICB test blokowania immunologicznego punktu kontrolnego oparty na komórkach (ang. *cell-based immune checkpoint blockade assay*)

irAEs działanie niepożądane o charakterze immunologicznym (ang. *immune-related adverse events*)

ITIM immunoreceptorowy motyw hamujący oparty o tyrozynę (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)

ITSM motyw przełączający oparty o tyrozynę (ang. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*)

K<sub>D</sub> stała dysocjacji

MHC główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*)

MS spektrometria masowa (ang. *mass spectrometry*)

NMR spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*)

PD-1 receptor programowanej śmierci 1 (ang. *programmed death receptor 1*)

PDB baza danych struktur białkowych (ang. *protein data bank*)

PD-L1 ligand receptora programowanej śmierci 1 (ang. *programmed death-ligand 1*)

PPI oddziaływanie białko-białko (ang. *protein-protein interaction*)

RBD domena wiążąca receptor (ang. *receptor binding domain*)

TCR receptor limfocytów T (ang. *T cell receptor*)

TFA kwas trifluoroctowy

TIS triizopropylosilan

TLC chromatografia cienkowarstwowa (ang. *thin layer chromatography*)

T<sub>m</sub> temperatura rozfałdowywania (ang. *melting temperature*)

trans-ACPC kwas (1*S*,2*S*)-trans-aminocyklopentanokarboksylowy

# 1. WSTĘP

## 1.1. Oddziaływanie białko-białko

Oddziaływania białko-białko (ang. *protein-protein interactions*, PPIs) odgrywają kluczową rolę w licznych procesach biologicznych takich jak transdukcja sygnału, szlaki metaboliczne, komunikacja pomiędzy komórkami oraz odpowiedź immunologiczna. W związku z szerokim wachlarzem funkcji pełnionych przez złożoną sieć oddziaływań białko-białko, PPIs charakteryzują się dużą różnorodnością. Można wyróżnić wśród nich kompleksy homooligomeryczne, w których interakcja zachodzi między identycznymi białkami oraz kompleksy heterooligomeryczne, pomiędzy różnymi białkami. Mogą one być specyficzne i dotyczyć wyłącznie jednego partnera wiązania lub mniej specyficzne i polegać na wiązaniu różnych białek. Dodatkowo, wyróżnia się zarówno interakcje przejściowe jak i stałe.<sup>1,2</sup>

Interakcje białko-białko były przez długi czas uznawane za „*undruggable*” co oznacza, że projektowanie skierowanych przeciwko nim leków było uznawane za bardzo trudne lub niemożliwe.<sup>3</sup> Wynikało to z charakterystyki powierzchni oddziaływania białek, które są zwykle duże, osiągają zazwyczaj 1500–3000 Å<sup>2</sup> oraz płaskie, bez znaczących wgłębień i kieszeni. Dodatkowo oddziaływania bazują głównie na efekcie hydrofobowym, chociaż wykazano również obecność wiązań wodorowych, oddziaływań elektrostatycznych, a czasem również wiązań kowalencyjnych.<sup>4</sup> Te cechy znacznie utrudniają projektowanie modulatorów PPIs.

Odkrycie tzw. "*hot-spots*", czyli kluczowych reszt aminokwasowych wpływających na interakcje między białkami, otworzyło nowe możliwości w zakresie projektowania leków, które oddziałują poprzez hamowanie lub stymulację tych interakcji. W związku z istotną rolą PPIs w funkcjonowaniu komórek, prowadzone badania pozwalają na odkrywanie nowych mechanizmów prowadzących do wystąpienia stanów chorobowych. To z kolei umożliwia bardziej efektywne projektowanie leków, które w przewidywalny sposób modyfikują PPIs.<sup>5,6</sup>

Najczęściej stosowaną strategią w modyfikowaniu działania interakcji białko-białko jest ich inhibicja. Warto jednak zaznaczyć, że istnieją również przykłady związków stabilizujących te interakcje,<sup>7,8</sup> jak również agonistów, które je aktywują.<sup>9</sup>

Wśród inhibitorów interakcji między białkami można wyróżnić, na przykład, inhibitory interakcji p53/MDM2<sup>10,11</sup> oraz Bcl-2/BH3,<sup>12</sup> które mają na celu przywrócenie prawidłowego poziomu apoptozy w komórkach nowotworowych. Ponadto, obszerną grupę stanowią inhibitory punktów kontrolnych w odpowiedzi immunologicznej, które znajdują zastosowanie w immunoterapii przeciwnowotworowej.<sup>6,13</sup>

Warto również zaznaczyć, że istnieją również inhibitory interakcji między białkami obecnymi w komórkach gospodarza i wirusach.<sup>14</sup> Przykładem są inhibitory interakcji między białkiem kolca (ang. *spike protein*) SARS-CoV-2 a ludzkim receptorem ACE2,<sup>15</sup> a także inhibitory interakcji między białkami wirusowymi, takie jak gp41/gp120.<sup>16</sup> Blokowanie tych interakcji uniemożliwia wirusowi wejście do wnętrza komórek gospodarza, co z kolei pozwala uniknąć zainfekowania komórek.

## **1.2. Punkty kontroli odpowiedzi immunologicznej**

Punkty kontroli odpowiedzi immunologicznej (ang. *immune checkpoints*) to białka, które pełnią funkcję regulacyjną układu immunologicznego. Odgrywają one kluczową rolę w utrzymaniu równowagi między hamowaniem a aktywacją odpowiedzi immunologicznej. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu punktów kontroli odpowiedzi immunologicznej mogą prowadzić do nadmiernej aktywacji układu odpornościowego, co skutkuje atakowaniem własnych, zdrowych komórek organizmu. Taka sytuacja jest charakterystyczna dla chorób autoimmunologicznych, takich jak stwardnienie rozsiane czy toczeń.<sup>17</sup>

Komórki nowotworowe mogą wykorzystywać mechanizmy punktów kontroli odpowiedzi immunologicznej, aby uniknąć ataku ze strony układu odpornościowego, co pozwala im przetrwać i się namnażać. Inhibicja interakcji między białkami, które stanowią punkty kontroli odpowiedzi immunologicznej,

jest obiecującym podejściem w immunoterapii przeciwnowotworowej. Intensywnie prowadzone w ostatnich latach badania nad punktami kontrolnymi odpowiedzi immunologicznej wykazały ogromny potencjał tej strategii jako skutecznej formy terapii przeciwnowotworowej.<sup>17</sup>

Najbardziej zbadanymi do tej pory celami molekularnymi w immunoterapii przeciwnowotworowej są CTLA-4 (ang. *cytotoxic T cell antigen 4*) oraz PD-1 (ang. *programmed death receptor 1*) i jego ligand PD-L1 (ang. *programmed death-ligand 1*). Odkrywczy tych białek, Tasuku Honjo i James P. Allison, zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny w 2018 roku.<sup>18</sup>

Antygen 4 związany z limfocytami T (ang. *cytotoxic T cell antigen 4*, CTLA-4) jest receptorem obecnym na powierzchni limfocytów T. Funkcja CTLA-4 polega na hamowaniu aktywacji limfocytów T, co ma na celu zapobieżenie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej. Mechanizm działania CTLA-4 polega na konkurencji z innym receptorem kostymulującym, CD28, o wiązanie z jego ligandami (rodzina białek B7) obecnymi na komórkach prezentujących antygen. Białka z rodziny B7 są także obecne na powierzchni komórek nowotworowych i poprzez oddziaływanie z CTLA-4 hamują aktywność odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworowi. W związku z tym blokowanie interakcji między CTLA-4 a jego ligandami stanowi skuteczną strategię w reaktywacji układu odpornościowego przeciwko nowotworowi.<sup>19,20</sup>

Pierwszym inhibitorem CTLA-4 zatwierdzonym przez FDA w 2011 roku był ipilimumab, ludzkie przeciwciało monoklonalne, które znalazło zastosowanie w leczeniu zaawansowanego czerniaka. Wprowadzenie ipilimumabu na rynek stanowiło przełom w immunoterapii przeciwnowotworowej opartej na przeciwciałach.<sup>21</sup> W 2022 roku FDA zatwierdziła drugi inhibitor CTLA-4, którym jest tremelimumab. Tremelimumab to ludzkie przeciwciało monoklonalne, stosowane w kombinacji z durvalumabem, ludzkim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko PD-L1, do leczenia raka wątrobowokomórkowego.<sup>22</sup>

### 1.3. Oddziaływanie PD-1/PD-L1

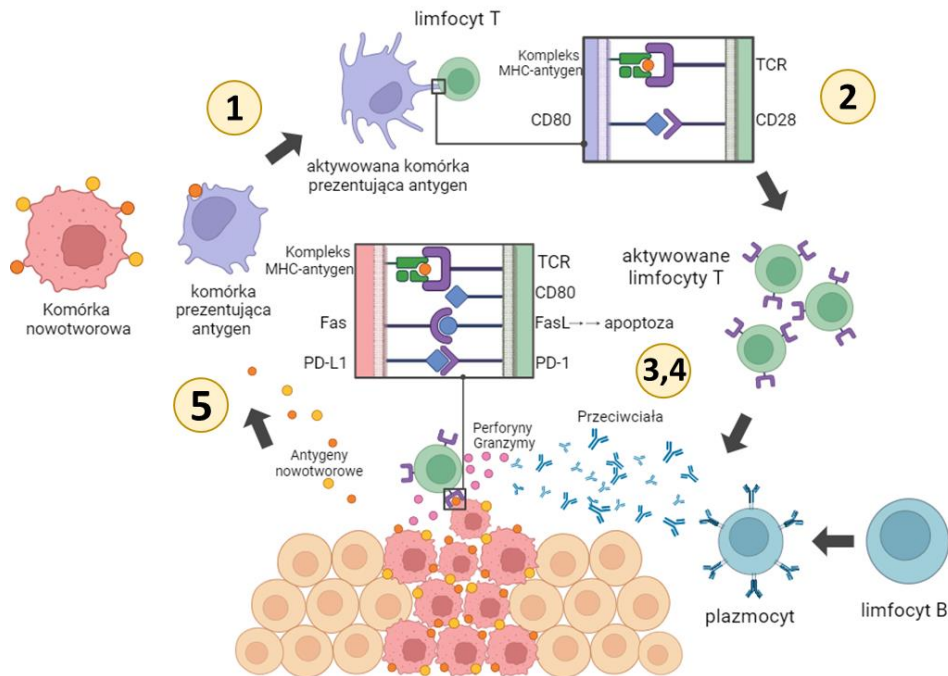
Receptor programowanej śmierci 1 (PD-1) jest kluczowym białkiem w regulacji układu immunologicznego. PD-1 występuje na powierzchni różnych komórek immunologicznych i pomaga w kontrolowaniu ich aktywności. Jego rola polega na hamowaniu aktywności limfocytów T, gdy są aktywowane, aby zapobiec nadmiernym reakcjom immunologicznym. PD-1 oddziałuje z ligandami PD-L1 i PD-L2, które mogą występować na komórkach nowotworowych i komórkach prezentujących antygeny, co prowadzi do wyciszenia odpowiedzi immunologicznej.

Warto również zaznaczyć, że nieprawidłowości w ekspresji PD-1 lub jego ligandów mogą prowadzić do zaburzeń immunologicznych, takich jak autoimmunizacja lub ucieczka komórek nowotworowych przed kontrolą układu odpornościowego. Dlatego zrozumienie mechanizmów działania PD-1 jest istotne dla rozwoju skuteczniejszych terapii i leczenia chorób związanych z układem immunologicznym.

#### 1.3.1. Przeciwnowotworowa odpowiedź immunologiczna

Wiązanie PD-1 do jego ligandów, PD-L1 i PD-L2, prowadzi do aktywacji apoptozy limfocytów T, a tym samym do obniżenia aktywności układu odpornościowego. Na efekt ten składa się szereg zdarzeń (**Rysunek 1**).<sup>23</sup> Na początku, komórki prezentujące antygen (ang. *antigen-presenting cells*, APCs) rozpoznają obce antygeny np. takie, które występują na powierzchni komórek nowotworowych. Następnie APCs przetwarzają antygeny i prezentują je, w połączeniu z głównym układem zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) na swojej powierzchni (proces 1, **Rysunek 1**). Później, Limfocyty T są aktywowane na skutek rozpoznania kompleksu antygen-MHC przez receptory limfocytów T (ang. *T cell receptors*, TCRs). Ta interakcja nadaje specyficzności odpowiedzi immunologicznej, zapewniając, że tylko komórki posiadające specyficzny antygen będą eliminowane oraz stanowi pierwszy z dwóch sygnałów skutkujących aktywowaniem limfocytów T.

Drugi sygnał polega na wiązaniu się ligandów B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86) na powierzchni APC do ich receptora, CD28, na powierzchni limfocyta T. To dwuetapowe rozpoznanie aktywuje limfocyty T prowadząc do ich różnicowania w efektorowe limfocyty T skierowane przeciwko komórkom nowotworowym (proces 2, **Rysunek 1**). Efektorowe limfocyty T niszczą komórki nowotworowe poprzez indukowanie szlaków apoptozy lub uwalnianie perforyn i granzymów powodujących powstawanie porów. Oprócz bezpośredniego ukierunkowania na komórki nowotworowe, efektorowe limfocyty T mogą też pośrednio indukować ich eliminację poprzez aktywację innych elementów układu immunologicznego np. limfocytów B (proces 3, **Rysunek 1**). Gdy limfocyty T zostają aktywowane rozpoczynają one ekspresję PD-1, co stanowi element mechanizmu regulacyjnego odpowiedzi odpornościowej i pozwala na utrzymanie homeostazy immunologicznej. W normalnych warunkach PD-L1 występuje na powierzchni komórek układu odpornościowego takich jak komórki dendrytyczne i w kontrolowany sposób oddziałuje z PD-1 indukując apoptozę limfocytów T. PD-L1 ulega nadekspresji w niektórych komórkach nowotworowych co prowadzi do nadmiernego i niekontrolowanego obniżenia aktywności odpowiedzi odpornościowej (proces 4, **Rysunek 1**). Oddziaływanie PD-1/PD-L1 prowadzi do aktywowania wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych w limfocytach T. Dochodzi do wiązania fosfataz tyrozynowych SHP-1 i SHP-2 przez cytoplazmatyczną część PD-L1, fosfatazy defosforylują specyficzne cząsteczki sygnałowe, takie jak kinazy, prowadząc do apoptozy limfocytów T (proces 5, **Rysunek 1**).<sup>23</sup>



**Rysunek 1.** Schemat mechanizmu inicjacji i rozwoju odpowiedzi immunologicznej przeciw nowotworom.<sup>28</sup> Ilustracja została sporządzona przy użyciu BioRender.com.

Nieprawidłowości w ekspresji białka PD-1 lub jego ligandu PD-L1 prowadzą do wystąpienia patologicznych stanów w organizmie. Wzmożona ekspresja białka PD-1 obserwowana jest u pacjentów cierpiących na stwardnienie rozsiane, co przyczynia się do destrukcyjnej autoimmunizacji. W odwrotnym przypadku, obniżenie aktywności odpowiedzi odpornościowej jest zaobserwowane w przypadku pacjentów z nowotworami. Ligand PD-1 oraz PD-L1 ulegają nadmiernej ekspresji na powierzchni niektórych typów komórek nowotworowych, a ich interakcja z białkiem PD-1 umożliwia nowotworom uniknięcie ataku ze strony układu odpornościowego poprzez hamowanie aktywności limfocytów T.<sup>23</sup>



### 1.3.2. Charakterystyka receptora PD-1

Receptor programowanej śmierci 1 (ang. *programmed death receptor 1*, PD-1 lub CD279) jest białkiem transmembranowym, które składa się z 288 reszt aminokwasowych. Należy on do grupy receptorów regulujących limfocyty T i jest częścią rodziny CD28/B7/CTLA4.<sup>24</sup> Gen kodujący PD-1, *pdccl1*, znajduje się na ludzkim chromosomie 2 w *locus* 2q37.3 i składa się z 5 eksonów.<sup>25</sup> Receptor PD-1 jest ekspresjonowany na powierzchni limfocytów T, limfocytów B, komórek dendrytycznych, monocytów oraz komórek NK.<sup>26</sup>

Strukturalnie PD-1 jest białkiem transmembranowym typu I i składa się z IgV-podobnej domeny zewnątrzkomórkowej na końcu aminowym, regionu transmembranowego oraz ogona cytoplazmatycznego na końcu karboksylowym. W obrębie domeny cytoplazmatycznej wyróżnia się dwa fragmenty krytyczne dla funkcjonowania receptora: immunoreceptorowy motyw hamujący oparty o tyrozyne (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM) oraz immunoreceptorowy motyw przełączający oparty o tyrozyne (ang. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*, ITSM). Fosforylacja reszt tyrozyny w obrębie ITSM prowadzi do rekrutacji fosfataz, które katalizują hydrolizę grup fosforanowych na cząsteczkach sygnałowych szlaku TCR/CD28, co skutkuje wyciszeniem sygnału aktywacyjnego.<sup>27,28</sup> Dzięki tym mechanizmom, PD-1 pełni funkcję hamującą w odpowiedzi immunologicznej.

Receptor PD-1 oddziałuje ze swoimi ligandami PD-L1 i PD-L2, które ulegają ekspresji na powierzchni komórek nowotworowych i komórek prezentujących antygen. Oba ligandy przyłączają się do zewnątrzkomórkowej domeny IgV-podobnej PD-1, co inicjuje szlaki sygnałowe prowadzące do hamowania proliferacji limfocytów T oraz produkcji cytokin.<sup>23</sup>

### 1.3.3. Charakterystyka ligandów PD-1 – PD-L1 i PD-L2

Ligandy PD-1, PD-L1 (ang. *programmed death-ligand 1*, CD274, B7-H1) i PD-L2 (ang. *programmed death-ligand 2*, CD273, B7-DC), są kodowane przez geny zlokalizowane na prążku p24 ludzkiego chromosomu 9. PD-L1 składa się z 290 reszt aminokwasowych, podczas gdy PD-L2 ma 273 reszty aminokwasowe.

Ich sekwencje wykazują 37% homologii.<sup>29</sup> PD-L1 ulega ekspresji w znacznie szerszym zakresie niż PD-L2, co nadaje mu kluczową rolę w ucieczce komórek nowotworowych przed działaniem układu immunologicznego.<sup>24</sup> Ekspresja PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych może być dodatnio regulowana przez interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) wytwarzany przez limfocyty T.<sup>22</sup> PD-L1 ulega nadekspresji w wielu rodzajach nowotworów, jak niedrobnokomórkowy rak płuca,<sup>30</sup> chłoniak<sup>31</sup> oraz czerniak.<sup>32</sup>

Podobnie jak PD-1, oba ligandy PD-L1 i PD-L2 są białkami transmembranowymi typu I, które składają się z krótkiej domeny cytoplazmatycznej, hydrofobowej domeny transbłonowej oraz fragmentu zewnątrzkomórkowego. Fragment zewnątrzkomórkowy zawiera dwie Ig-podobne domeny: IgV-podobną i Ig stałą, przy czym IgV-podobna domena odpowiada za oddziaływanie z receptorem PD-1.<sup>29</sup>

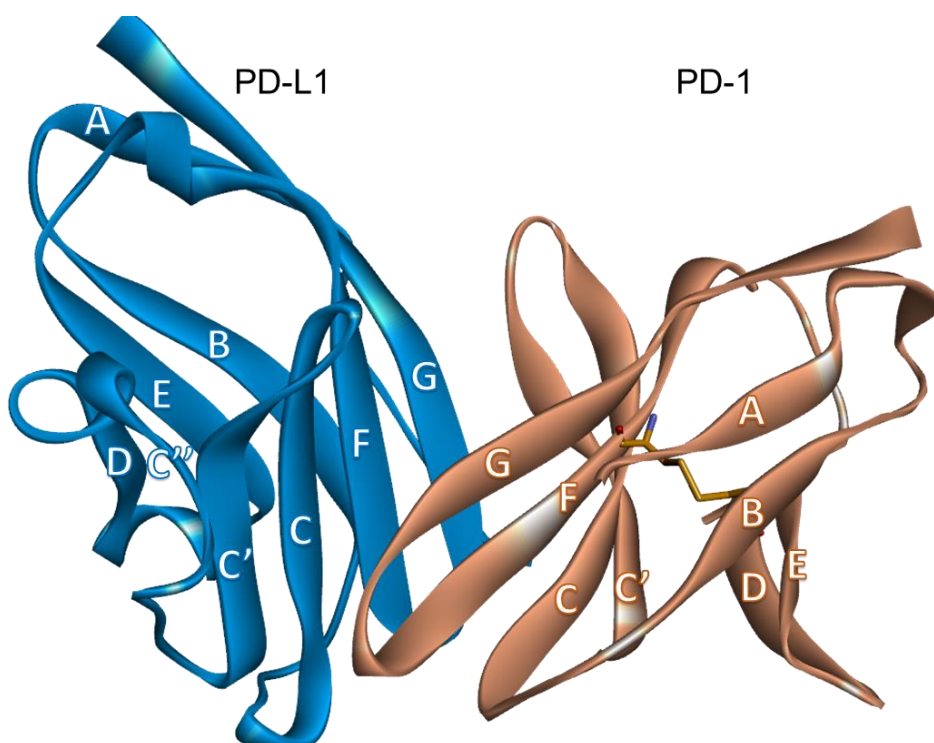
#### **1.3.4. Struktura kompleksu PD-1/PD-L1**

Początek badań strukturalnych nad punktem kontrolnym układu immunologicznego PD-1/PD-L1 stanowi struktura krystaliczna mysiego PD-1.<sup>33</sup> Najważniejsze wnioski dotyczyły stabilności PD-1 na poziomie molekularnym w roztworze i na powierzchni komórek. Zaobserwowano znaczące różnice w regionie wiążącym w porównaniu z pokrewnymi członkami rodziny, takimi jak CTLA-4. Podobnie jak CTLA-4, PD-1 zbudowane jest z kilku  $\beta$ -katek. Nici  $\beta$  połączone są ze sobą pętlami przypominającymi rejony determinujące dopasowanie (ang. *complementarity determining regions*, CDRs) CDR1 i CDR3.<sup>33</sup>

Następnie otrzymana została struktura krystaliczna kompleksu mysiego PD-1 z ludzkim PD-L1 oraz wolnego ludzkiego PD-L1.<sup>34</sup> Struktury te umożliwiły scharakteryzowanie powierzchni oddziaływania obu białek, które są zdominowane przez oddziaływania hydrofobowe. Zidentyfikowano również istotne zagłębienie na powierzchni PD-1, które jest wypełnione przez resztę <sub>PD-L1</sub>Tyr123. Ponadto, analiza strukturalna pozwoliła zidentyfikować kluczowe reszty polarne, które odgrywają istotną rolę w interakcji między PD-1 a PD-L1.

W obrębie PD-1 są to Lys78, Ile126 i Glu136, natomiast w przypadku PD-L1 kluczową rolę odgrywają Asp61, Arg113 oraz Arg125.<sup>34</sup>

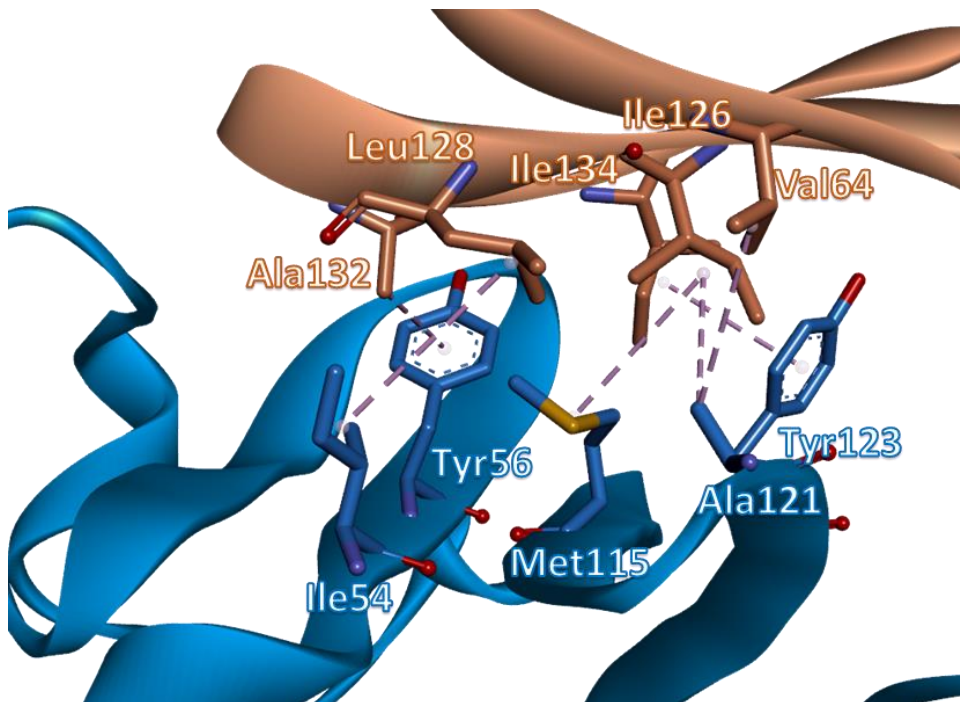
Przełomem w rozwoju inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 było opublikowanie w roku 2015 struktury krystalicznej ludzkiego kompleksu PD-1/PD-L1.<sup>35</sup> Opublikowanie tej struktury doprowadziło do znacznego rozwoju inhibitorów opartych nie tylko na przeciwciałach, ale także na peptydach i związkach małowcząsteczkowych.<sup>36</sup>



**Rysunek 2.** Struktura kompleksu PD-1/PD-L1 (PDB ID: 4ZQK<sup>35</sup>) z zaznaczonymi nazwami nici  $\beta$ .

Wykazano, że PD-1 i PD-L1 oddziałują ze sobą poprzez zewnątrzkomórkowe domeny IgV-podobne. Domeny te tworzą dwuwarstwową strukturę tzw. „kanapki” składającą się z 9 nici  $\beta$  (ABCC'C''DEFG) połączonych pętlami (**Rysunek 2**). Warstwa zewnętrzna domeny, GFCC', odpowiada za oddziaływanie z partnerem wiązania. Dodatkowo, scharakteryzowane zostały również

oddziaływania pomiędzy  $\beta$ -kartką GFCC' PD-L1, a pętlami CC', C'C'' oraz FG PD-1. Powierzchnia oddziaływania obu białek wynosi 1970 Å<sup>2</sup> i jest bogata w oddziaływania hydrofobowe oraz polarne.<sup>35</sup>



**Rysunek 3.** Struktura kompleksu PD-1/PD-L1 (PDB ID: 4ZQK<sup>35</sup>) z zaznaczonymi kluczowymi resztami tworzącymi hydrofobowy rdzeń powierzchni oddziaływania obu białek. PD-1 zostało oznaczone kolorem pomarańczowym, natomiast PD-L1 kolorem niebieskim.

Rdzeń oddziaływania jest kształtowany przez interakcje hydrofobowe (**Rysunek 3**), w których uczestniczy pięć reszt na powierzchni PD-1 (Val64, Ile126, Leu128, Ala132, Ile134), jak również pięć reszt w obrębie PD-L1 (Ile54, Tyr56, Met115, Ala121, Tyr123). Hydrofobowy rdzeń oddziaływania jest otoczony przez reszty polarne, które przyczyniają się do stabilizacji poprzez tworzenie wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych.<sup>35</sup> Badania oparte na wirtualnej mutagenezie, wykorzystujące skanowanie alaninowe, pozwoliły na zidentyfikowanie sześciu kluczowych miejsc na powierzchni PD-L1, które odgrywają istotną rolę w oddziaływaniu. Wśród tych kluczowych miejsc wyróżniono: Tyr56, Gln66, Met115, Asp122, Tyr123 oraz Arg125.<sup>37</sup>

Oddziaływanie między natywnymi białkami PD-1 i PD-L1 charakteryzuje się wysoką wartością  $K_D$  równą  $8,2 \mu\text{M}$ .<sup>38</sup> To stosunkowo słabe powinowactwo skłoniło badaczy do przeprowadzenia badań nad zoptymalizowanym wariantem PD-1. W wyniku tych badań udało się uzyskać wariant o niezwykle wysokim powinowactwie do PD-L1, którego wartość  $K_D$  wynosi  $110 \text{ pM}$ . Analiza struktury krystalicznej zoptymalizowanego wariantu PD-1 w kompleksie z PD-L1 wskazała na wpływ wprowadzonych mutacji na interakcje między nimi. Zoptymalizowany wariant PD-1 umożliwia bardziej rozbudowane oddziaływania między polarnymi resztami aminokwasowymi, co podkreśla znaczenie reszt takich jak Arg113, Asp122, Lys124 i Arg125 na powierzchni PD-L1.<sup>27,39</sup>

## 1.4. Inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1

Dotychczas opracowane inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1 zostały sklasyfikowane w trzech głównych grupach: przeciwciała monoklonalne, peptydy oraz związki małowcząsteczkowe. W kontekście immunoterapii przeciwnowotworowej wszystkie grupy są przedmiotem intensywnych badań. Warto zaznaczyć, że jedynie leki oparte na przeciwciałach monoklonalnych zostały zatwierdzone przez Agencję Żywności i Leków (FDA).

Wśród inhibitorów PD-1/PD-L1, związki małowcząsteczkowe oraz peptydy wykazują istotne zalety w porównaniu z przeciwciałami monoklonalnymi. Niższa masa cząsteczkowa tych substancji może przynieść korzyści w zakresie biodostępności, penetracji guzów, oraz zmniejszenia ryzyka działań niepożądanych. Niemniej jednak, aby osiągnąć etap, w którym zostaną opracowane i zatwierdzone leki oparte na związkach małowcząsteczkowych i peptydach, konieczne jest kontynuowanie badań pozwalających na otrzymanie związków o skuteczności porównywalnej do przeciwciał.

W obecnej fazie rozwoju terapii PD-1/PD-L1, przeciwciała monoklonalne pozostają jedyną dostępną opcją, co podkreśla potrzebę ciągłego inwestowania w badania i rozwijanie innowacyjnych strategii leczniczych, które mogą przekształcić przyszłość immunoterapii przeciwnowotworowej.

### 1.4.1. Przeciwciała

Na świecie, jak dotąd zatwierdzono łącznie 11 przeciwciał blokujących oddziaływanie PD-1/PD-L1, spośród których 7 zostało zatwierdzonych przez FDA (**Tabela 1**). Pierwszym z tych przeciwciał był pembrolizumab, który uzyskał akceptację w 2014 roku jako lek przeznaczony do leczenia zaawansowanej postaci czerniaka.<sup>40</sup> Następnie, również w 2014 roku, zatwierdzono nivolumab do leczenia różnych nowotworów, w tym czerniaka i niedrobnokomórkowego raka płuca.<sup>41</sup> Badania kliniczne nad nivolumabem i pembrolizumabem jako pierwsze dostarczyły dowodów na skuteczność hamowania interakcji PD-1/PD-L1 w immunoterapii przeciwnowotworowej, potwierdzając wydłużone pozytywne odpowiedzi immunologiczne u pacjentów cierpiących na czerniaka.

Sukces tych dwóch leków zaowocował zwiększeniem intensywności badań nad inhibitorami PD-1/PD-L1 w dziedzinie immunoterapii przeciwnowotworowej przez firmy farmaceutyczne. W kolejnych latach wprowadzono na rynek kolejne inhibitory ukierunkowane na PD-1 oraz PD-L1.

Poza pembrolizumabem i nivolumabem, na rynku znajduje się jeszcze 6 inhibitorów skierowanych przeciwko PD-1, które uzyskały zatwierdzenie do leczenia różnych typów nowotworów. W 2018 roku, FDA zatwierdziła cemiplimab do stosowania w leczeniu raka kolczystokomórkowego, niedrobnokomórkowego raka płuca oraz raka podstawnokomórkowego.<sup>42</sup> W roku 2019, toripalimab zdobył akceptację na skalę globalną jako lek do leczenia nieoperacyjnego lub przerzutowego czerniaka.<sup>43</sup> Następnie, tislelizumab, w tym samym roku, otrzymał zatwierdzenie od Chińskiej Narodowej Administracji Produktów Medycznych w terapii nawracającego lub opornego na klasyczne leczenie chłoniaka Hodgkina.<sup>44</sup> Camrelizumab, skierowany przeciwko tym samym typom nowotworów co tislelizumab, został globalnie dopuszczony do użytku w 2019 roku.<sup>45</sup> Sintilimab został dopuszczony w Chinach do leczenia klasycznego chłoniaka Hodgkina w roku 2019.<sup>46</sup>

Warto zaznaczyć, że toripalimab, tislelizumab, camrelizumab i sintilimab, choć zostały dopuszczone do użytku przez inne instytucje, nie zdobyły dotychczas akceptacji od FDA. Natomiast, ostatnie przeciwciało skierowane przeciwko PD-1, dostarlimab, zostało zatwierdzone przez FDA w 2021 roku i znajduje zastosowanie w terapii raka endometrium z niedoborem naprawy niedopasowania i guzów litych dMMR.<sup>47</sup>

**Tabela 1.** Zaakceptowane przeciwciała blokujące oddziaływanie PD-1/PD-L1.

Lp.	Nazwa	Rok zatwierdzenia	Cel molekularny
1	Pembrolizumab	2014 (FDA)	PD-1
2	Nivolumab	2014 (FDA)	PD-1
3	Atezolizumab	2016 (FDA)	PD-L1
4	Avelumab	2017 (FDA)	PD-L1
5	Durvalumab	2017 (FDA)	PD-L1
6	Cemiplimab	2018 (FDA)	PD-1
7	Toripalimab	2019	PD-1
8	Tislelizumab	2019	PD-1
9	Camrelizumab	2019	PD-1
10	Sintilimab	2019	PD-1
11	Dostarlimab	2021 (FDA)	PD-1

Wśród inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 opartych na przeciwciałach, skierowanych przeciwko PD-L1, można wyróżnić trzy leki zatwierdzone przez FDA: atezolizumab, avelumab i durvalumab. Atezolizumab uzyskał akceptację w 2016 roku i jest stosowany w leczeniu zaawansowanego raka pęcherza moczowego oraz niedrobnokomórkowego raka płuca.<sup>48,49</sup> Następnie, w 2017 roku, FDA zatwierdziła avelumab do terapii przerzutowego raka z komórek Merkla.<sup>50</sup> Również w 2017 roku został zaakceptowany durvalumab, który znajduje zastosowanie w leczeniu zaawansowanego raka pęcherza.<sup>51</sup>

Opublikowane struktury krystaliczne kompleksów przeciwciał monoklonalnych z celem molekularnym pozwalają na szczegółowe zrozumienie mechanizmu blokowania oddziaływania PD-1/PD-L1. Ta wiedza jest niezwykle istotna przy identyfikacji kluczowych reszt aminokwasowych, które mogą stanowić cel projektowania małowcząsteczkowych i peptydowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Do tej pory opublikowano kilka struktur kompleksów

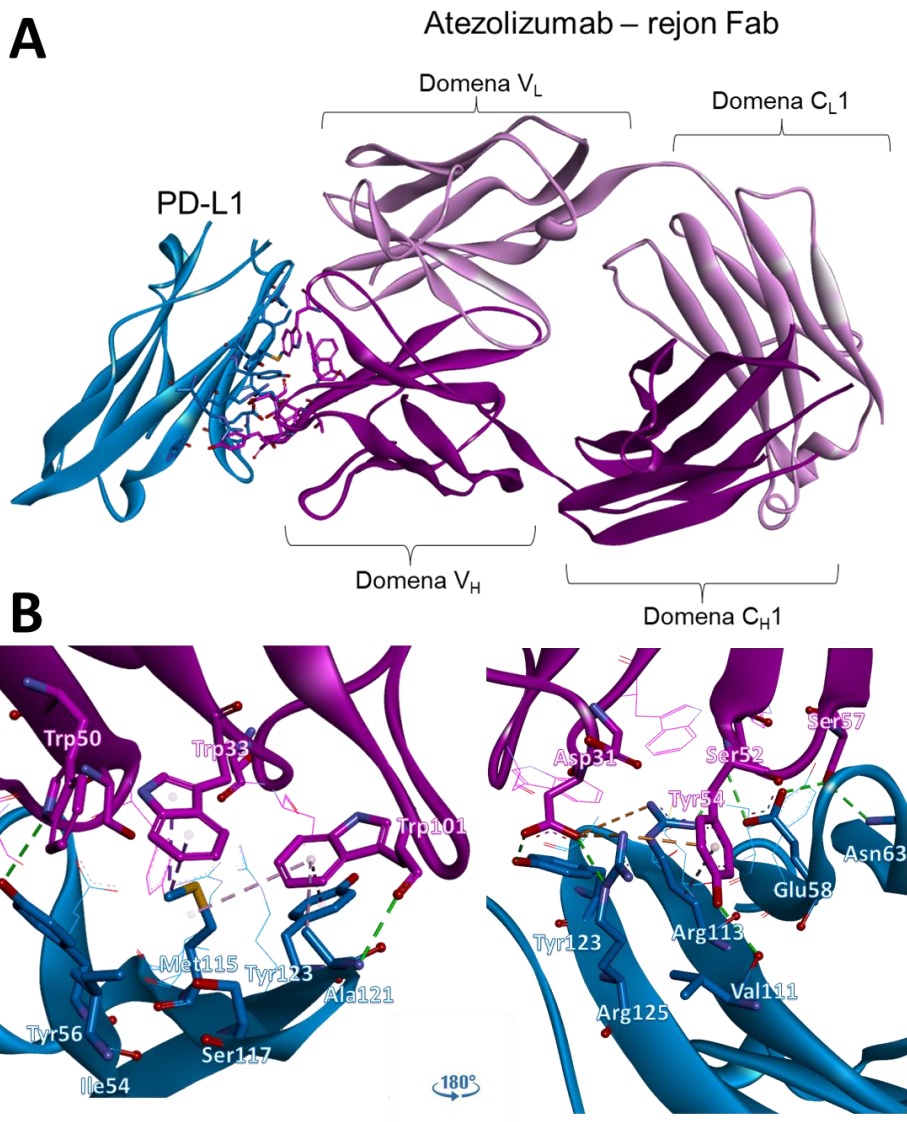


PD-1 z jego inhibitorami, takimi jak pembrolizumab,<sup>52-54</sup> nivolumab,<sup>53</sup> cemiplimab,<sup>55</sup> toripalimab,<sup>56</sup> tislelizumab,<sup>57</sup> camrelizumab<sup>58</sup> oraz dostarlimab.<sup>59</sup> Również dostępne są struktury krystaliczne PD-L1 w kompleksie z przeciwciałami oddziałującymi z tym celem molekularnym.

Ze względu na cel niniejszej pracy, którym było zaprojektowanie inhibitorów oddziałujących z PD-L1, w tym rozdziale szczegółowo omówiono wyłącznie przeciwciała skierowane przeciwko ligandowi PD-1.

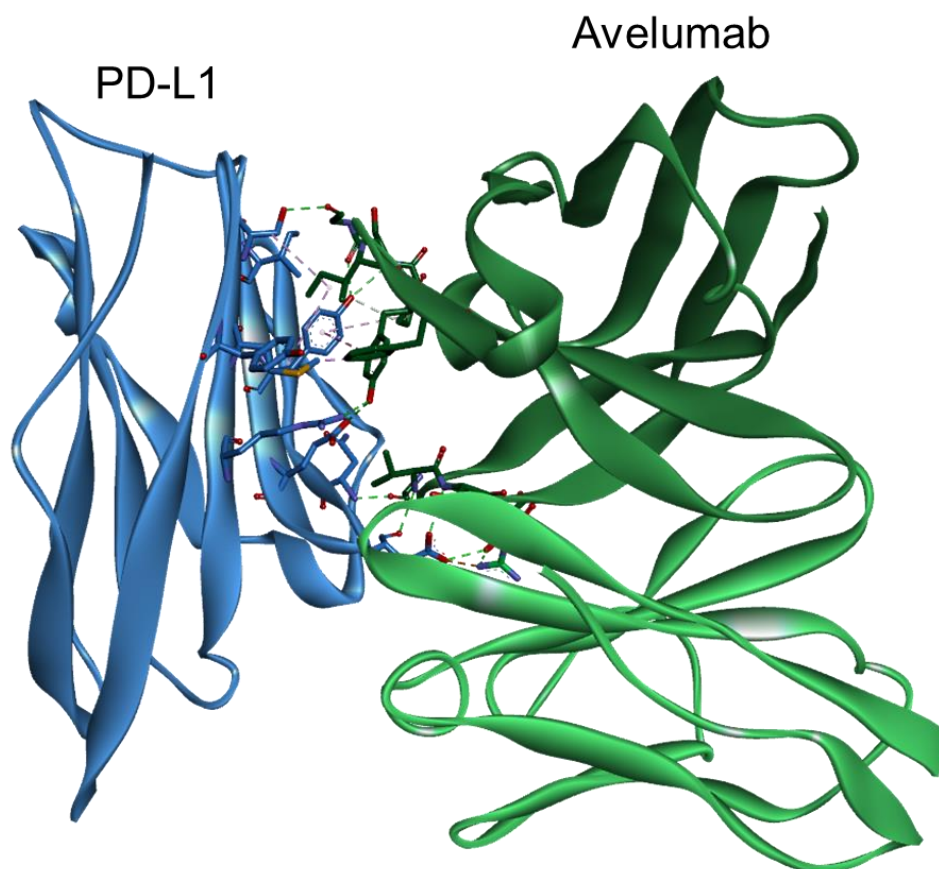
Wszystkie trzy przeciwciała skierowane przeciwko PD-L1, które zostały zatwierdzone przez FDA, wykazują bardzo wysokie powinowactwo do swojego celu molekularnego. Wartości stałych dysocjacji ( $K_D$ ) wynoszą odpowiednio: 400 pM dla atezolizumabu,<sup>60</sup> 42,1 pM dla avelumabu<sup>61</sup> oraz 667 pM dla durvalumabu.<sup>62</sup> Wszystkie te przeciwciała wiążą się z obszarem  $\beta$ -kartki GFCC' oraz pętlą CC' na powierzchni PD-L1. Warto zaznaczyć, że struktury kompleksów tych przeciwciał z PD-L1 różnią się przede wszystkim umiejscowieniem łańcuchów ciężkich ( $V_H$ ) i lekkich ( $V_L$ ) przeciwciał na powierzchni PD-L1.

Opublikowane zostały dwie struktury krystaliczne kompleksu PD-L1 z atezolizumabem.<sup>63,64</sup> Analiza tych struktur wykazała, że przeciwciało monoklonalne oddziałuje z  $\beta$ -kartką GFCC' receptora poprzez swoją domenę zmienną łańcucha ciężkiego przeciwciała (domena  $V_H$ ). To oddziaływanie obejmuje szereg interakcji, takich jak oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania van der Waalsa, wiązania wodorowe oraz mostki solne (**Rysunek 4**). Na powierzchni, którą PD-L1 oddziałuje z inhibitorem, można wyróżnić dwie główne części: hydrofobową, zbudowaną z reszt takich jak Ile54, Tyr56, Asn63, Met115, Ser117, Ala121, Tyr123, oraz część polarną, która zawiera reszty Glu58, Arg113, i Arg125. Oddziaływanie z częścią hydrofobową jest głównie stabilizowane przez trzy reszty tryptofanu na powierzchni inhibitora: Trp33, Trp50 i Trp101. Natomiast polarne oddziaływania są zapewnione dzięki resztom: Asp31, Ser52, Tyr54 oraz Ser57. Dodatkowo, zaobserwowano interakcje między atezolizumabem a pętlami BC, CC', C'C'', oraz FG PD-L1.<sup>63</sup>



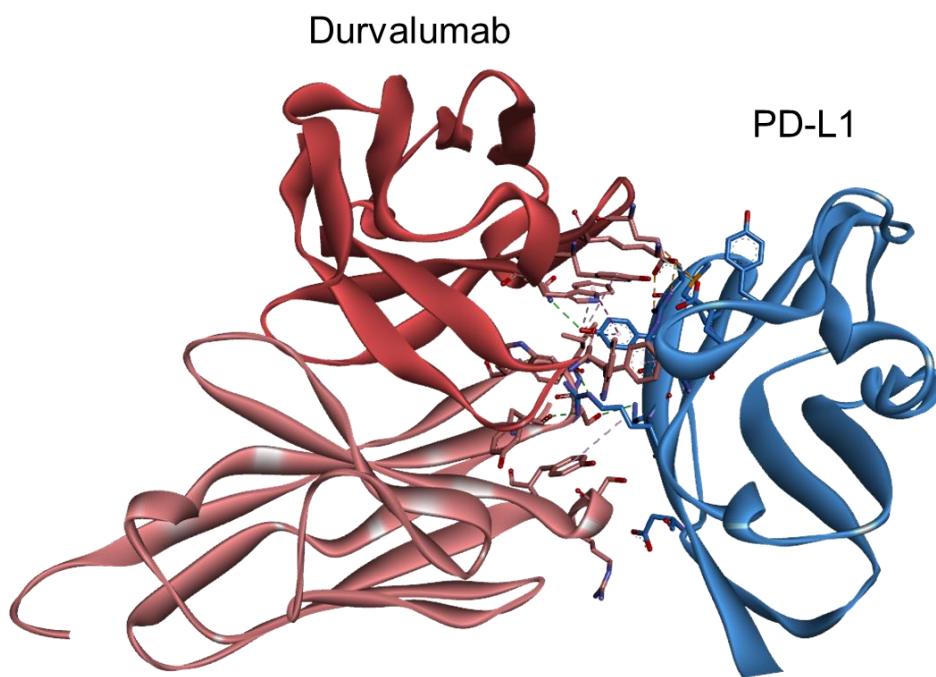
**Rysunek 4.** (A) Struktura kompleksu PD-L1 z atezolizumabem (PDB ID: 5XXY<sup>63</sup>). Na rysunku zaznaczone zostały fragmenty rejonu Fab przeciwciała: domeny łańcucha ciężkiego — domena zmienna  $V_H$  i domena stała  $C_H1$  oraz domeny łańcucha lekkiego – domena zmienna  $V_L$  i domena stała  $C_L$ . (B) Struktura powierzchni oddziaływania PD-L1/atezolizumab z zaznaczonymi kluczowymi resztami aminokwasowymi na powierzchni PD-L1 (kolor niebieski) i atezolizumabu (kolor fioletowy).

Struktura krystaliczna kompleksu avelumabu z PD-L1<sup>61</sup> pokazuje, że to przeciwciało łączy się z receptorem zarówno poprzez łańcuch ciężki (V<sub>H</sub>), jak i łańcuch lekki (V<sub>L</sub>). Niemniej jednak łańcuch V<sub>H</sub> pełni dominującą rolę w oddziaływaniu (**Rysunek 5**). Podobnie jak w przypadku atezolizumabu, reszty aminokwasowe na powierzchni avelumabu tworzą hydrofobową powierzchnię, która umożliwia oddziaływanie z hydrofobowym fragmentem PD-L1 składającym się z reszt: Ile54, Tyr56, Asn63, Met115 i Tyr123, oraz z fragmentem polarnym PD-L1 zawierającym reszty: Glu58, Asp61, Asn63, Arg113.<sup>61</sup>



**Rysunek 5.** Struktura kompleksu PD-L1 z avelumabem (PDB ID: 5GRJ<sup>61</sup>). PD-L1 zostało zaznaczone kolorem niebieskim, natomiast avelumab: kolorem ciemnozielonym – domena V<sub>H</sub>, kolorem jasnozielonym – domena V<sub>L</sub>.

Ostatnie z przeciwciał skierowanych przeciwko PD-L1, które uzyskały akceptację FDA, durvalumab, oddziałuje z celem poprzez oba łańcuchy ciężki ( $V_H$ ) i lekki ( $V_L$ ) (**Rysunek 6**).<sup>62,63</sup> Warto zaznaczyć, w tej interakcji uczestniczą głównie nici A, G i F PD-L1. Podobnie jak w przypadku dwóch wcześniejszych inhibitorów, powierzchnie oddziaływania PD-L1 z inhibitorem można podzielić na fragment głównie hydrofobowy, w skład którego wchodzi Tyr56, Met115, Ala121, Tyr123, oraz fragment polarny, który zawiera Asp26, Glu58, Arg113, Tyr123, Lys124, Arg125.<sup>62,63</sup>



**Rysunek 6.** Struktura kompleksu PD-L1 z durvalumabem (PDB ID: 5XJ4<sup>62</sup>). PD-L1 zostało zaznaczone kolorem niebieskim, natomiast durvalumab: kolorem brunatnym – domena  $V_H$ , kolorem jasnobieżowym – domena  $V_L$ .

Należy zwrócić uwagę, że w każdym z tych przypadków powierzchnia oddziaływania inhibitora z PD-L1 jest zbliżona pod względem wielkości do powierzchni, którą PD-L1 oddziałuje z jego naturalnym partnerem wiążącym PD-1. Obecność wielu reszt aminokwasowych uczestniczących w tym oddziaływaniu sprawia, że projektowanie małowcząsteczkowych lub peptydowych inhibitorów jest znacznie utrudnione. Niemniej jednak istnieją pewne reszty aminokwasowe, które biorą udział w oddziaływaniu we wszystkich trzech przypadkach. To sugeruje, że są one kluczowe dla hamowania interakcji między PD-1 a PD-L1, co może ułatwić projektowanie leków skierowanych przeciwko PD-L1.

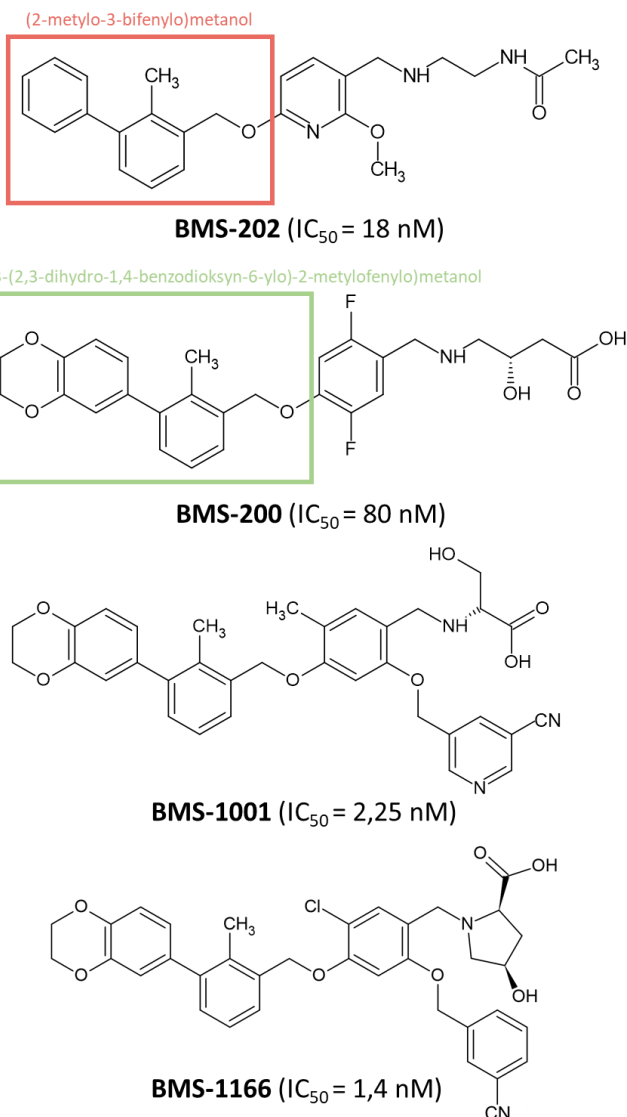
Analiza powierzchni oddziaływania monoklonalnych przeciwciał z PD-L1 wykazała, że reszty na powierzchni PD-L1, takie jak: Tyr56, Glu58, Arg113, Met115, Ala121 i Tyr123, są zaangażowane we wszystkich trzech przypadkach. Co więcej, część z tych reszt została wcześniej zidentyfikowana jako kluczowe dla oddziaływania z PD-1.<sup>37</sup>

Immunoterapie oparte na przeciwciałach monoklonalnych niestety wykazują wiele wad i ograniczeń. Wśród tych ograniczeń wymienić można wysoką immunogenność, ograniczoną zdolność penetracji tkanek nowotworowych oraz toksyczność. Terapie przeciwnowotworowe bazujące na przeciwciałach monoklonalnych, działające na punkty kontrolne układu immunologicznego PD-1/PD-L1, są również obciążone skutkami ubocznymi, takimi jak specyficzne dla narządu stany zapalne, na przykład zapalenie płuc, oraz działaniami niepożądanymi o charakterze immunologicznym (ang. *immune-related adverse events*, irAEs).<sup>65</sup> Ponadto, efektywność terapii opartych na przeciwciałach jest stosunkowo niska i wynosi średnio od 20% do 40% w przypadku guzów litych.<sup>23</sup>

Przewycięzenie wad leków opartych na przeciwciałach jest możliwe poprzez wykorzystanie innych grup związków biologicznie aktywnych takich jak związki małowcząsteczkowe oraz peptydy. Związki te charakteryzują się szeregiem zalet, w mogą się charakteryzować wyższą biodostępnością po podaniu doustnym, co ułatwia ich podawanie pacjentom.

### 1.4.2. Związki małowzrasteczkowe

Dotychczas opublikowanych zostało kilka grup małowzrasteczkowych związkw, makrocyklicznych peptydów oraz peptydomimetykw, które sà zaprojektowane w celu blokowania interakcji PD-1/PD-L1.



**Rysunek 7.** Struktury małowzrasteczkowych inhibitorów PD-1/PD-L1 opatentowanych przez firmę BMS wraz z wartościami  $IC_{50}$  uzyskanymi z wykorzystaniem metody HTRF.<sup>66,67</sup>

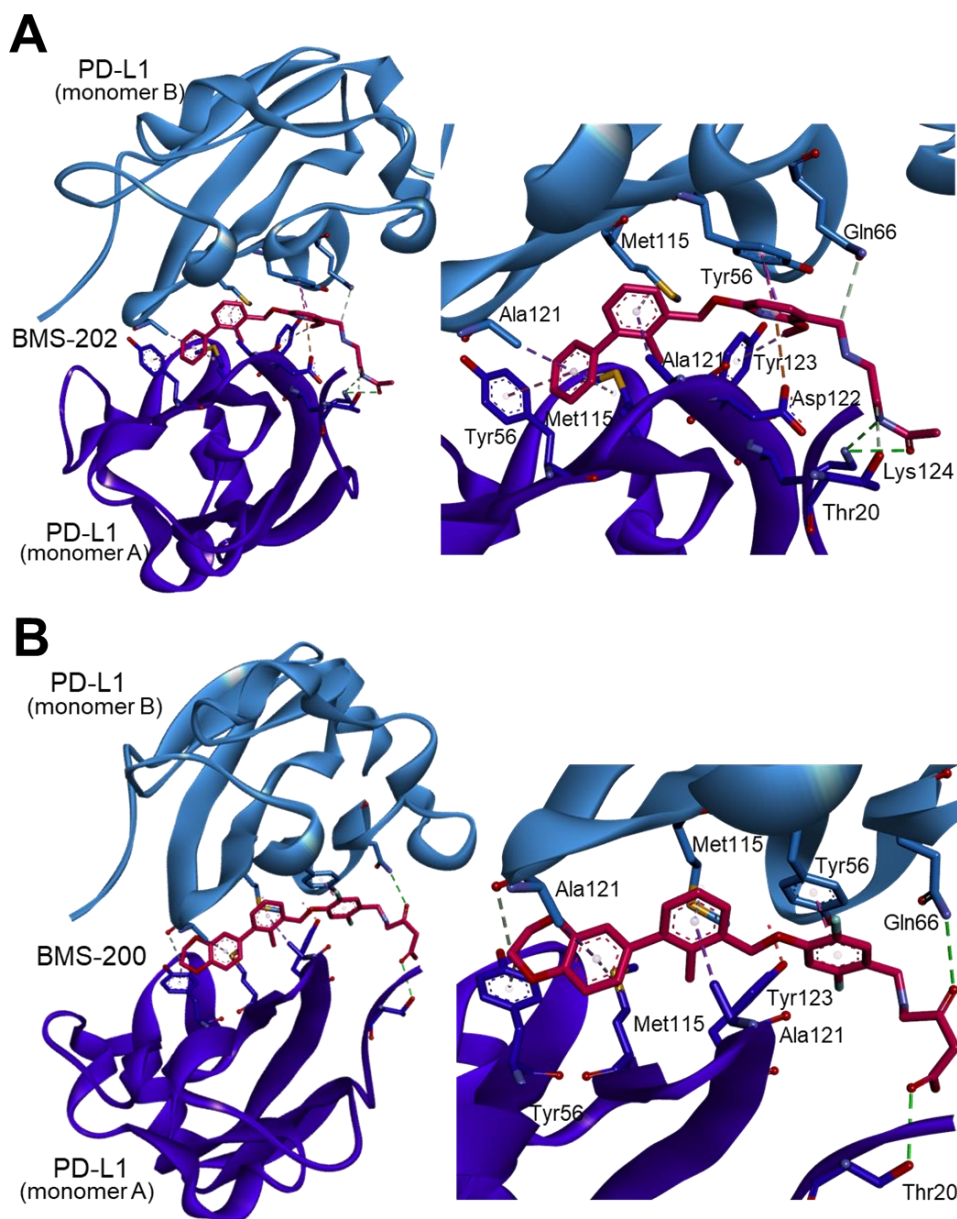
Małocząsteczkowe inhibitory punktów kontroli układu immunologicznego, oddziałujące z PD-1/PD-L1, mogą pełnić rolę uzupełnienia lub wzmocnienia terapii opartych na przeciwciałach monoklonalnych, a nawet stanowić samodzielne metody lecznicze.

Pierwsze całkowicie niepeptydowe związki małocząsteczkowe o aktywności hamującej względem kompleksu PD-1/PD-L1 zostały opatentowane przez firmę Bristol-Myers Squibb (BMS). Wśród nich można wyróżnić związki bazujące na szkielecie (2-metylo-3-bifenylo)metanolu (np. BMS-202) oraz 3-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxyn-6-ylo)-2-metylofenylo)metanolu (np. BMS-200) (**Rysunek 7**).<sup>68,69</sup>

Spośród opublikowanych związków, te o najlepszych właściwościach wykazują wartości IC<sub>50</sub> na poziomie nanomolarnym, otrzymane z testów opartych na homogennej czasowo-rozdzielczej fluorescencji (ang. *homogeneous time resolved fluorescence*, HTRF). Mechanizm działania tych inhibitorów został zbadany, wykazując, że łączą się one bezpośrednio z PD-L1, prowadząc do tworzenia dimerycznego kompleksu dwóch cząsteczek PD-L1 (monomeru A i B) w roztworze, co z kolei uniemożliwia wiązanie się z PD-1.<sup>66,67</sup>

Struktura krystaliczna kompleksu, składającego się z dimeru PD-L1 (monomeru A i B) oraz inhibitora BMS-202<sup>66</sup> (**Rysunek 8**), pokazała mechanizm wiązania związków opartych na szkielecie (2-metylo-3-bifenylo)metanolu. Inhibitor wiąże się w obszarze hydrofobowej powierzchni PD-L1 oddziałującej z PD-1. Jeden pierścień fenylowy w bifenylowym fragmencie tworzy interakcję typu  $\pi$ - $\pi$  o konfiguracji w kształcie litery "T" z pierścieniem aromatycznym reszty <sub>A</sub>Tyr56. Ponadto, ten pierścień tworzy oddziaływanie typu  $\pi$ -alkil z <sub>A</sub>Met115 oraz <sub>B</sub>Ala121. Drugi pierścień tworzy interakcje typu  $\pi$ -alkil z <sub>A</sub>Ala121 oraz <sub>B</sub>Met115, a jego grupa metylowa wchodzi w dodatkowe oddziaływania z hydrofobową kieszenią wiążącą, złożoną z <sub>A</sub>Met115, <sub>A</sub>Ala121 oraz <sub>A</sub>Tyr123. Fragment metoksypirydynowy oddziałuje poprzez interakcje typu  $\pi$ - $\pi$  z <sub>B</sub>Tyr56, a jego grupa metylowa tworzy również oddziaływanie typu  $\pi$ -alkil z <sub>B</sub>Tyr123. Ten pierścień angażuje się także w oddziaływania typu  $\pi$ -anion z <sub>A</sub>Asp122.

Ponadto, końcowy fragment *N*-(2-aminoetylo)octanamidu zapewnia interakcje poprzez oddziaływania elektrostatyczne z  $^A$ Thr20 i  $^A$ Lys124.<sup>66</sup>



**Rysunek 8.** Struktura kompleksu dimeru PD-L1 z inhibitorem (A) BMS-202 (PDB ID: 5J89<sup>66</sup>) oraz (B) BMS-200 (PDB ID: 5N2F<sup>67</sup>). Monomery A i B PD-L1 zostały zaznaczone na rysunku odpowiednio ciemnoniebieskim i jasnoniebieskim kolorem, natomiast inhibitor został oznaczony kolorem różowym. Dodatkowo, na rysunkach wyróżnione zostały te konkretne reszty, które oddziałują z inhibitorem.



Następnie, badania z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR) i krytalografii rentgenowskiej pokazały, że obie grupy związków oddziałują z PD-L1 w różny sposób, lecz w większości przypadków korzystają z tych samych reszt na hydrofobowej powierzchni białka. BMS-200, opierający się na strukturze (3-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxyn-6-ylo)-2-metylofenylo)metanolu, tworzy hydrofobowy tunel na powierzchni obu cząsteczek PD-L1 w miejscu, gdzie normalnie zachodzi wiązanie z PD-1 (**Rysunek 8**).<sup>67</sup> Z drugiej strony, BMS-202 oddziałuje z hydrofobową kieszenią bez wywoływania znaczących zmian konformacyjnych na powierzchni białka. Grupa 2,3-dihydro-1,4-benzodioxynylowa inhibitora BMS-200 powoduje zmiany konformacyjne w obrębie <sub>A</sub>Tyr56, które przyczyniają się do powstawania hydrofobowego tunelu na powierzchni białka. Jeden pierścień tej grupy oddziałuje z <sub>A</sub>Tyr56 poprzez interakcje typu  $\pi$ -alkil oraz z <sub>B</sub>Ala121 poprzez wiązanie wodorowe. Drugi pierścień odpowiada za oddziaływanie typu  $\pi$ - $\sigma$  z <sub>B</sub>Ala121 oraz typu  $\pi$ -alkil z <sub>A</sub>Met115. Pierścień metylofenylowy zapewnia oddziaływanie typu  $\pi$ -alkil z <sub>A</sub>Met115 i <sub>B</sub>Met115 oraz  $\pi$ - $\sigma$  z <sub>A</sub>Ala121. Dodatkowa interakcje z <sub>A</sub>Tyr123 zapewnia sztywne ułożenia inhibitora w tunelu. Pierścień 2,5-difluorofenylowy zapewnia oddziaływanie typu  $\pi$ - $\pi$  z <sub>B</sub>Tyr56. Końcowy fragment kwasu (S)-4-amino-3-hydroksymasłowego tworzy oddziaływanie wodorowe z <sub>A</sub>Thr20 i <sub>B</sub>Gln66.<sup>67</sup>

Kolejne badania wykazały, że dwa spośród opatentowanych przez BMS związków, BMS-1001 oraz BMS-1166 (**Rysunek 7**), nie tylko, wiążą się do izolowanego PD-L1 blokując jego oddziaływanie z PD-1, lecz także charakteryzują się niską cytotoksycznością i wykazują aktywność *in vitro*. Zarówno BMS-1001, jak i BMS-1166, wykazują aktywność hamującą względem PD-L1 na powierzchni komórek Jurkat oraz wolnego PD-L1, a ich działanie prowadzi do reaktywacji modelowych komórek limfoidalnych linii Jurkat.<sup>70</sup>

Sposób oddziaływania inhibitorów opartych na rusztowaniu bifenyłowym z PD-L1 wskazuje na istotne reszty zaangażowane w blokowanie interakcji PD-1/PD-L1 za pomocą związków małowcząsteczkowych. Do tych reszt zalicza się

m.in. Tyr56, Gln66, Met115, Ala123 oraz Tyr123.<sup>71</sup> Inhibitory bazujące na rusztowaniu bifenylowym stanowią przekonujący dowód na to, że istnieje możliwość osiągnięcia skutecznych terapii skierowanych przeciwko PD-1/PD-L1, opartych na związkach małowcząsteczkowych. Struktury opublikowane przez BMS stanowiły punkt wyjścia do licznych badań nad kolejnymi grupami małowcząsteczkowych inhibitorów opartych na strukturach inhibitorów BMS. Niemniej jednak, żaden z tych inhibitorów nie został dotychczas poddany badaniom klinicznym.<sup>36,72</sup>

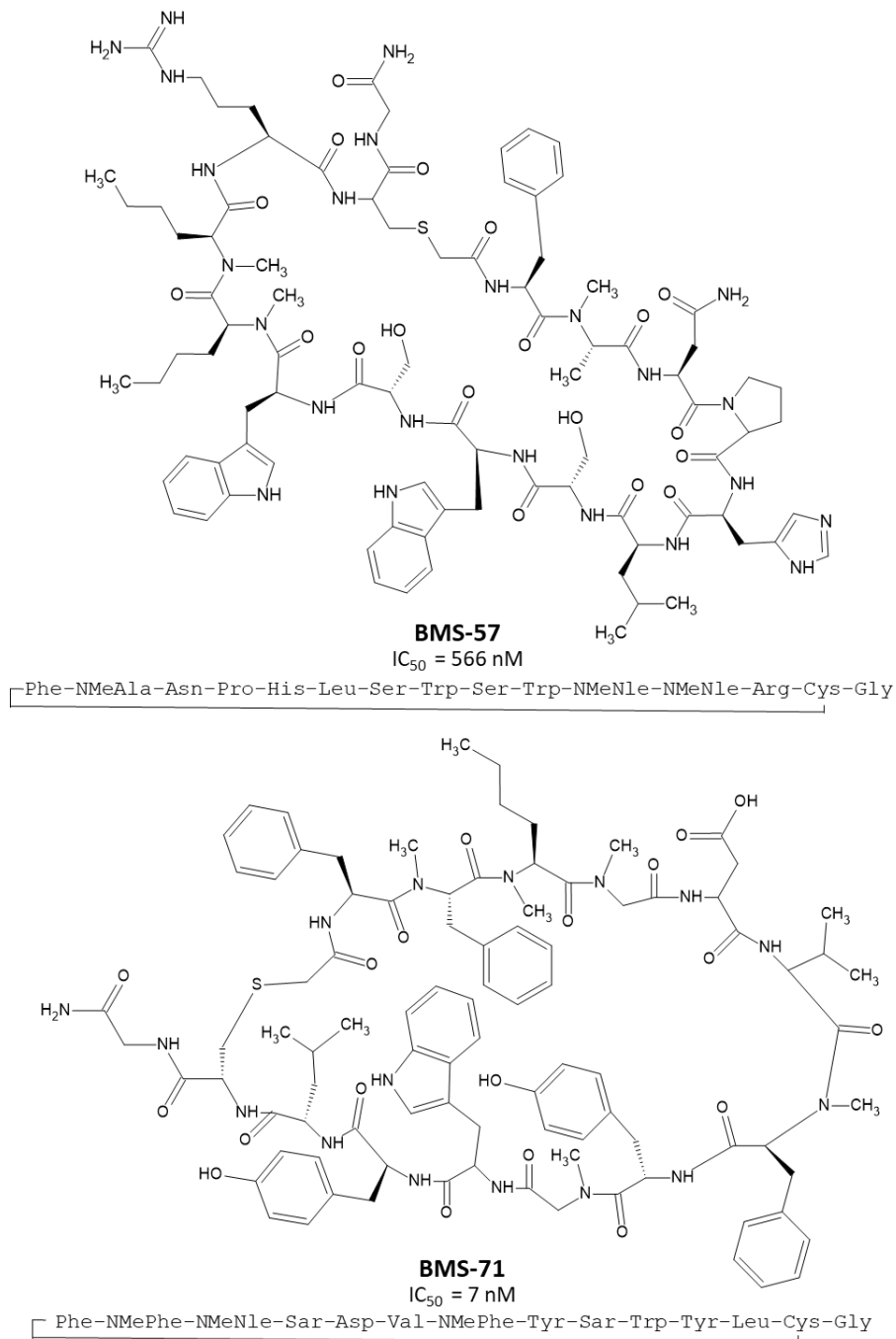
Obecnie jedynym małowcząsteczkowym związkiem, który przechodzi badania kliniczne w celu hamowania interakcji PD-1/PD-L1, jest CA-170. Choć CA-170 początkowo został wprowadzony jako inhibitor skierowany zarówno przeciwko PD-L1, jak i VISTA, to analizy wykorzystujące techniki NMR oraz HTRF wykazały, że między tym inhibitorem a PD-L1 nie zachodzi bezpośrednie wiązanie.<sup>73</sup> Obecnie CA-170 znajduje się w II fazie badań klinicznych.<sup>74</sup>

### 1.4.3. Peptydy

Grupa inhibitorów peptydowych, skierowanych przeciwko PD-1/PD-L1, wykazuje istotną przewagę w zestawieniu zarówno z przeciwciałami, jak i związkami małowcząsteczkowymi. Podobnie jak w przypadku związków małowcząsteczkowych, peptydy charakteryzują się znacznie mniejszymi rozmiarami w porównaniu z przeciwciałami. Dzięki temu mogą penetrować komórki nowotworowe, w tym komórki guzów litych. Dzięki większym, niż związki małowcząsteczkowe, rozmiarom, mogą one skuteczniej blokować rozległe i płaskie powierzchnie oddziaływania między białkami, co może prowadzić do zwiększonej specyficzności oraz skuteczności działania. Co więcej, peptydowe inhibitory mogą cechować się niższą toksycznością oraz mniejszym ryzykiem wystąpienia oddziaływań niespecyficznych czy interakcji między lekami. Warto jednak zauważyć, że peptydowe leki nie są pozbawione wad. Jedną z głównych wad jest ich ograniczona stabilność po podaniu doustnym oraz w osoczu, co wynika między innymi z niskiej odporności na działanie enzymów proteolitycznych.<sup>75</sup> W celu zwiększenia stabilności peptydowych leków stosuje się dwie główne strategie, które obejmują cyklizację peptydów oraz wprowadzanie niekanonicznych reszt aminokwasowych.<sup>76</sup>

Pierwszy opatentowany inhibitor PD-1/PD-L1 o charakterze peptydowym, AUNP-12, jest rozgałęzionym peptydem składającym się z 29 reszt aminokwasowych.<sup>77</sup> Inhibitor ten jest prekursorem dla CA-170 i, podobnie jak ten małowcząsteczkowy inhibitor, nie wykazuje bezpośredniego wiązania z PD-L1. Wyniki uzyskane dla obu inhibitorów sugerują, że zarówno CA-170, jak i AUNP-12, oddziałują raczej na szlak sygnałowy PD-1/PD-L1 niż bezpośrednio na te białka.<sup>73</sup>

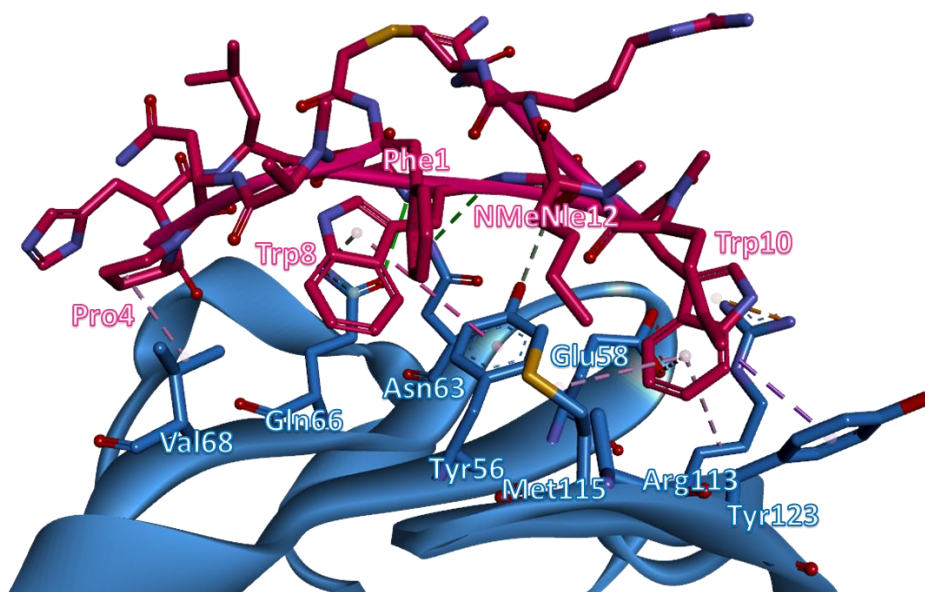
W latach 2014<sup>77</sup> i 2018,<sup>78</sup> firma BMS opatentowała grupę inhibitorów PD-1/PD-L1 o charakterze makrocyklicznym. Kolejne badania pozwoliły na poznanie mechanizmów wiązania trzech z opublikowanych inhibitorów: BMS-57, BMS-71 (**Rysunek 9**) oraz BMS-99 które złożone są odpowiednio z 15, 14 i 13 reszt aminokwasowych.<sup>79</sup>



**Rysunek 9.** Wzory strukturalne, sekwencje oraz wartości IC<sub>50</sub> otrzymane z HTRF<sup>77</sup> dla BMS-57 i BMS-71. NMe przed trójliterowymi skrótami aminokwasów oznacza *N*-metylowaną pochodną danego aminokwasu, Nle oznacza norleucynę, Sar — sarkozynę.

Badania z wykorzystaniem NMR oraz skaningowej fluorymetrii różnicowej (ang. *differential scanning fluorimetry*, DSF) wykazały, że BMS-57 oraz BMS-71 wiążą się wyłącznie do PD-L1. Badania dotyczące reaktywacji modelowych komórek limfoidalnych linii Jurkat potwierdziły, że wszystkie wspomniane inhibitory prowadziły do przywrócenia aktywności promotora reagującego na TCR. Otrzymane wartości  $EC_{50}$  wynosiły odpowiednio: 566 nM dla BMS-57, 293 nM dla BMS-71 i 6,30  $\mu$ M dla BMS-99. Dla dwóch najlepszych peptydów otrzymane zostały struktury krystaliczne w kompleksie z PD-L1. Struktury wskazują, że peptydy wiążą się w obszarze przeznaczonym do oddziaływania z PD-1, jednak mechanizm wiązania różni się od tego obserwowanego w przypadku PD-1. Powierzchnię wiążącą dla obu inhibitorów, oddziałujących z celem molekularnym, można podzielić na dwie główne części. Pierwsza z nich to część składająca się głównie z oddziaływań hydrofobowych, podczas gdy druga jest zdominowana przez oddziaływania polarne. W przeciwieństwie do inhibitorów małowcząsteczkowych, wiązanie ligandów nie indukuje zmian konformacyjnych ani dimeryzacji PD-L1.<sup>79</sup>

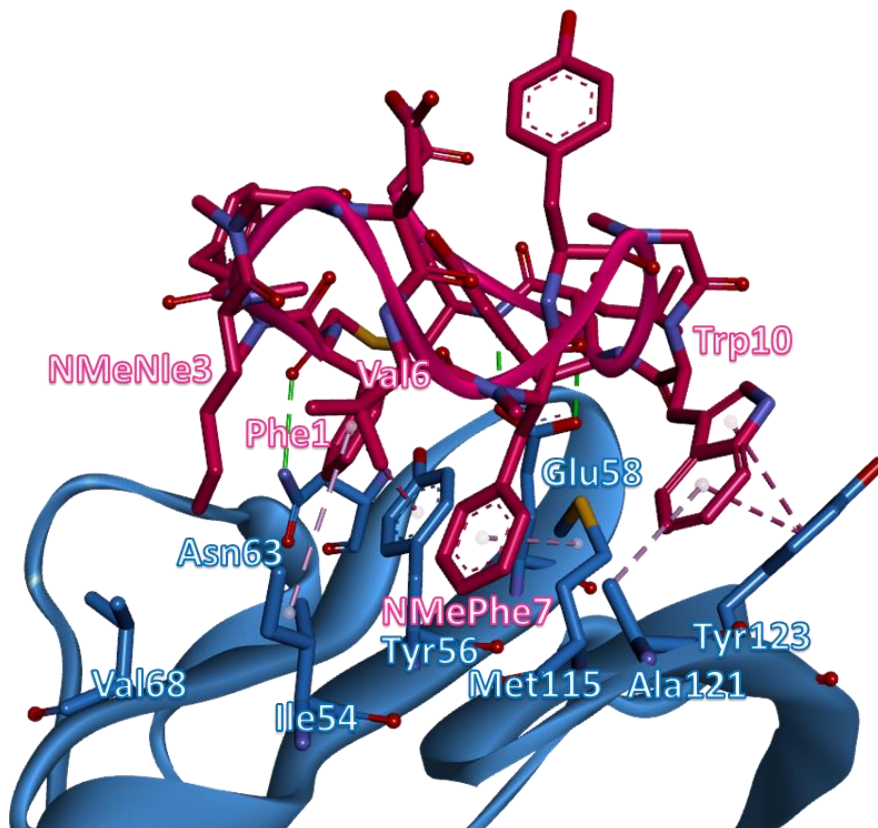
Hydrofobowa powierzchnia BMS-57 składa się z reszt Phe1, Trp8, Trp10, NMeNle11, NMeNle12 oraz położonego dalej Pro4. Dwie hydrofobowe kieszenie na powierzchni PD-L1 wypełnione są przez duże, aromatyczne reszty tryptofanu. W pierwszej, reszta <sup>57</sup>Trp10 tworzy interakcję typu  $\pi$ - $\pi$  w konfiguracji w kształcie litery "T" z resztami <sub>PD-L1</sub>Tyr56 oraz <sub>PD-L1</sub>Tyr123, typu  $\pi$ -anion z <sub>PD-L1</sub>Glu58,  $\pi$ -kation i  $\pi$ -alkil z <sub>PD-L1</sub>Arg113 oraz  $\pi$ -alkil z <sub>PD-L1</sub>Met115. W drugiej kieszeni, <sup>57</sup>Trp8 tworzy interakcje typu  $\pi$ - $\pi$  z <sub>PD-L1</sub>Tyr56 oraz wiązanie wodorowe donor- $\pi$  z <sub>PD-L1</sub>Gln66. Reszty <sup>57</sup>NMeNle11 i <sup>57</sup>NMeNle12 oddziałują z <sub>PD-L1</sub>Met115 otaczając ją z obu stron. <sup>57</sup>NMeNle12 oddziałuje również z <sub>PD-L1</sub>Ala121, podczas gdy <sup>57</sup>NMeNle11 tworzy interakcje  $\pi$ - $\sigma$  z Tyr123. Położona dalej reszta <sup>57</sup>Pro4 tworzy oddziaływanie z <sub>PD-L1</sub>Val68. Część zdominowana przez oddziaływania polarne bazuje głównie na wiązaniach wodorowych pomiędzy <sub>PD-L1</sub>Gln66, a amidem łańcucha peptydowego <sup>57</sup>Trp8 oraz <sub>PD-L1</sub>Asn63, a karbonyłem <sup>57</sup>Trp8 łańcucha (**Rysunek 10**).<sup>79</sup>



**Rysunek 10.** Struktura kompleksu PD-L1 z BMS-57 (PDB ID: 5O4Y<sup>79</sup>).

Powierzchnie umożliwiające oddziaływania hydrofobowe wykazują znaczące podobieństwo w obu strukturach, z wyjątkiem konfiguracji łańcucha bocznego  ${}_{PD-L1}Met115$ . W kompleksie PD-L1/BMS-71 łańcuch boczny  ${}_{PD-L1}Met115$  przyjmuje zgiętą postać, co tworzy przestrzeń dla łańcucha bocznego  ${}_{71}NMePhe7$ . Hydrofobowa powierzchnia BMS-71 składa się z  ${}_{71}Phe1$ ,  ${}_{71}NMePhe7$ ,  ${}_{71}Trp10$ ,  ${}_{71}NMeNle3$  oraz  ${}_{71}Val6$  (**Rysunek 11**). Reszta  ${}_{71}Phe1$  stabilizuje oddziaływanie z celem molekularnym w obrębie jednej z hydrofobowych kieszeni na jego powierzchni poprzez interakcje typu  $\pi$ - $\pi$  z  ${}_{PD-L1}Tyr56$ . Dodatkowe hydrofobowe oddziaływania, stabilizujące wiązanie z tą kieszenią zachodzą pomiędzy  ${}_{71}NMeNle3$  i  ${}_{PD-L1}Val68$ ,  ${}_{71}Val6$  i  ${}_{PD-L1}Ile54$ ,  ${}_{71}NMePhe7$  i  ${}_{PD-L1}Met115$ . Druga hydrofobowa kieszeń podobnie do BMS-57, wypełniona jest resztą  ${}_{71}Trp10$ , która tworzy interakcje typu  $\pi$ - $\pi$  z  ${}_{PD-L1}Tyr123$ ,  $\pi$ -alkil z  ${}_{PD-L1a}Ala121$  oraz  ${}_{PD-L1}Met115$ .<sup>79</sup>

Niewielki obszar wiążący BMS-71, w którym dominują interakcje polarne bazuje na wiązaniach wodorowych pomiędzy  ${}_{PD-L1}Glu58$ , a amidami łańcucha polipeptydowego  ${}_{71}Leu12$  i  ${}_{71}Cys13$  oraz  ${}_{PD-L1}Asn63$ , a karbonyłem łańcucha peptydowego  ${}_{71}Cys13$ .<sup>79</sup>



**Rysunek 11.** Struktura kompleksu PD-L1 z BMS-71 (PDB ID: 5O45<sup>79</sup>).

Warto zauważyć, że reszty: Tyr56, Met115, Ala121 oraz Tyr123 na powierzchni PD-L1 biorą udział w oddziaływaniu w przypadku BMS-57, BMS-71, wszystkich trzech przeciwciał, PD-1 oraz zoptymalizowanego wariantu PD-1.

Następnie, kolejna grupa peptydowych inhibitorów została opracowana z wykorzystaniem techniki prezentacji fagowej.<sup>80</sup> Najlepszy kandydat, CLP002, składający się z 12 reszt aminokwasowych, charakteryzuje się wartością  $K_D$  względem PD-L1 wynoszącą 366 nM. Dodatkowo, badania nad nim wykazały wysoką specyficzność, zdolność do penetracji guzów oraz zdolność do hamowania wzrostu guzów w organizmie modelowym – myszy z nowotworem CT26.<sup>80</sup>

Dotychczas został opublikowany tylko jeden obiecujący inhibitor oddziaływania PD-1/PD-L1 oparty na strukturze minibiłka.<sup>81</sup> Ten inhibitor został

opracowany z wykorzystaniem wcześniej otrzymanego stabilnego rusztowania minibiałkowego i podejścia opartego na naśladowaniu powierzchni PD-1, która oddziałuje z PD-L1. Warto zaznaczyć, że peptyd, którego powierzchnia oddziaływania z celem molekularnym była zgodna z powierzchnią natywnego PD-1, nie wykazywał aktywności biologicznej. Dopiero po wykorzystaniu struktury PD-1 o zwiększonym powinowactwie,<sup>27,39</sup> uzyskano obiecujący inhibitor o nazwie MOPD-1. Trzeciorzędową strukturę tego peptydu, o długości 47 aminokwasów, stabilizuje występowanie mostków disiarczkowych, co pozwoliło wprowadzić mutacje na powierzchni minibiałka, które miały na celu zwiększenie jego zdolności do oddziaływania z PD-L1, bez znacznego destabilizowania jego struktury. MOPD-1 charakteryzuje się silnym powinowactwem do PD-L1, wykazując wartość  $K_D$  wynoszącą 0,3  $\mu\text{M}$ , oraz zdolnością do hamowania oddziaływania PD-1/PD-L1 zarówno w testach opartych na białkach, jak i w badaniach komórkowych. Należy podkreślić, że MOPD-1 jest stabilny w surowicy oraz wykazuje zdolność do hamowania wzrostu guza w organizmach myszy modelowych z zaawansowanym nowotworem CT26.<sup>81</sup>



## 1.5. Minibiałka

Minibiałka stanowią obiecującą grupę cząsteczek, które łączą w sobie zalety peptydów i białek. Minibiałka można zdefiniować poprzez występowanie dwóch cech jakimi są stabilna struktura trzeciorzędowa i masa do 10 kDa. Ich stosunkowo niewielki rozmiar pozwala na otrzymywanie ich przy użyciu syntezy chemicznej, co umożliwia łatwe wprowadzenie niekanonicznych reszt aminokwasowych oraz zwiększenie zakresu ich potencjalnych funkcji. Jednocześnie, długość sekwencji wynosząca kilkadziesiąt reszt aminokwasowych pozwala na wprowadzenie mutacji, które nadadzą pożądaną aktywność, nie prowadząc do znaczących zmian w obrębie struktury trzeciorzędowej. To połączenie cech czyni minibiałka bardzo obiecującą grupą związków o potencjalnym zastosowaniu medycznym, zwłaszcza w przypadku trudnych celów terapeutycznych, takich jak interakcje białko-białko.<sup>82</sup>

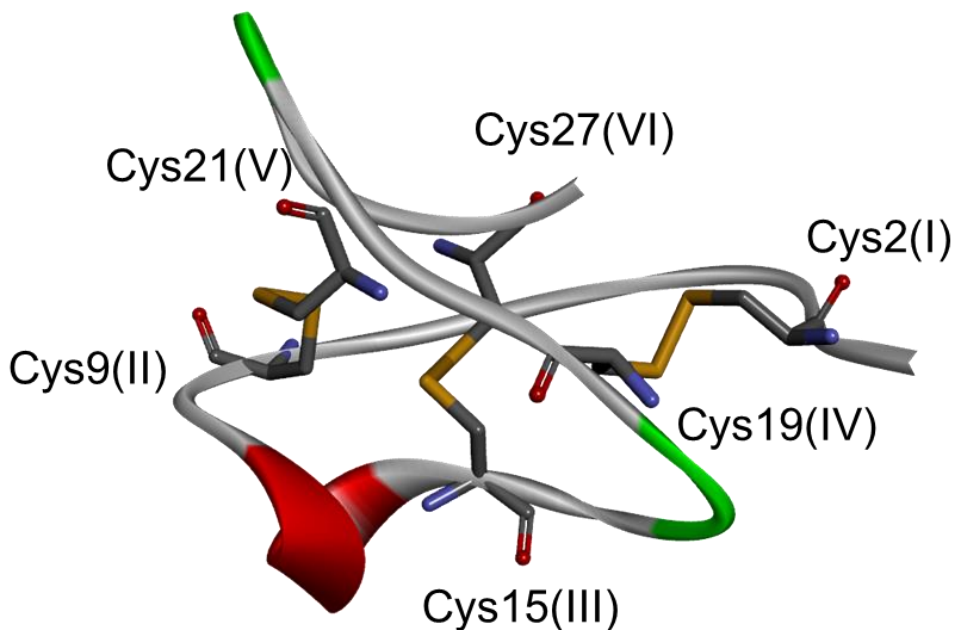
Minibiałka można podzielić na trzy grupy w zależności od sposobu, w jaki stabilizowana jest ich struktura trzeciorzędowa: przez mostki disiarczkowe, poprzez kompleksowanie jonu metalu oraz za pomocą hydrofobowego rdzenia. Niektóre z nich wykazują aktywność i zostały już wykorzystane jako leki w medycynie tradycyjnej, podczas gdy inne stanowią idealne rusztowania do wprowadzenia dowolnej aktywności. Choć dostępność rusztowań o pożądanej wielkości, kształcie i stabilności może stanowić pewne wyzwanie, to najnowsze osiągnięcia w projektowaniu minibiałek za pomocą narzędzi komputerowych pozwalają na tworzenie rusztowań o niemal dowolnej geometrii.<sup>82</sup>

### 1.5.1. Minibiałka stabilizowane przez mostki disiarczkowe

Najliczniejszą grupą naturalnie występujących minibiałek są minibiałka stabilizowane przez mostki disiarczkowe (ang. *cysteine-rich miniproteins*, CRMPs).<sup>83</sup> Dzięki stabilizacji za pomocą wiązań kowalencyjnych, CRMPs charakteryzują się wysoką stabilnością konformacyjną oraz efektywnym zwijaniem. Ich korzystne cechy sprawiają, że występują one we wszystkich żywych organizmach, pełniąc różnorodne funkcje biologiczne.<sup>84</sup>

Grupa CRMPs cechuje się obecnością różnorodnych motywów strukturalnych o unikalnych właściwościach. Jednym z najczęściej spotykanych motywów zawierających mostki disiarczkowe jest tzw. węzeł cysteinowy (ang. *cysteine knot*), składający się z trzech mostków disiarczkowych. Ponadto, w obrębie członków rodziny CRMPs charakterystyczne jest występowanie motywu  $\beta$ -kartki stabilizowanej cysteiną (ang. *cysteine-stabilized  $\beta$ -sheet motif*, CSB).<sup>85</sup>

Struktura węzła cysteinowego zawiera 6 reszt cysteiny, które tworzą trzy mostki disiarczkowe wewnątrz struktury. Motyw ten opiera się zazwyczaj na wiązaniach kowalencyjnych między pierwszą a czwartą cysteiną w sekwencji, drugą i piątą, oraz trzecią i szóstą. Wiązanie pomiędzy trzecią i szóstą resztą cysteiny przechodzi przez pętlę utworzoną przez pozostałe dwa mostki disiarczkowe, tworząc tym samym węzeł, od którego pochodzi nazwa. Zwykle motyw węzła cysteinowego składa się z około 30 reszt aminokwasowych (**Rysunek 12**).<sup>86</sup> Warto zauważyć, że tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy drugą i piątą resztą cysteiny w sekwencji, oraz trzecią i szóstą, jest wysoce konserwatywne i występuje w większości minibiałek rodziny CRMPs.<sup>87</sup> Dzięki tym dwóm mostkom disiarczkowym formowany może być motyw  $\beta$ -kartki stabilizowany cysteiną (CSB), który składa się z dwóch nici  $\beta$ .<sup>88,89</sup>



**Rysunek 12.** Motyw węzła cysteinowego na przykładzie struktury EETI-II (PDB ID: 2IT7<sup>90</sup>).

Ze względu na dużą liczbę oraz różnorodność opisanych dotychczas CRMPs, można w ich obrębie wyróżnić mniejsze podrodziny, takie jak knotyny (ang. *knottins*) oraz cyklotydy (ang. *cyclotides*).

Członkowie podrodziny knotyn posiadają strukturę węzła cysteinowego, zazwyczaj składają się z około 30 reszt aminokwasowych, a szkielet ich łańcucha polipeptydowego ma charakter liniowy. Najbardziej znanym i dobrze zbadanym członkiem tej rodziny jest Inhibitor Trypsyny II, minibiałko pochodzące z rośliny *Ecballium elaterium*. Warto jednak zauważyć, że minibiałka z tej podrodziny występują we wszystkich żywych organizmach.<sup>91</sup>

Druga duża podrodzina CRPMs to cyklotydy, które występują wyłącznie w roślinach, a ich charakterystyczną cechą jest cykliczna struktura szkieletu łańcucha polipeptydowego typu głowa do ogona (ang. *head-to-tail*).<sup>92,93</sup> Cyklotydy stanowią bardzo liczną grupę, a przez ostatnie 30 lat opisano i sklasyfikowano ponad 600 członków tej podrodziny w bazie danych dotyczącej cyklotydydów — CyBase.<sup>94,95</sup> Najbardziej przebadanym minibiałkiem pochodzącym z tej rodziny

jest Kalata B1. Kalata B1 wykazuje aktywność w swojej natywnej formie oraz, względu na swoją wysoką stabilność konformacyjną i korzystne właściwości, znalazła zastosowanie jako rusztowanie do projektowania związków o działaniu terapeutycznym.<sup>96</sup>

Kalata B1 została po raz zidentyfikowana w latach 70. ubiegłego wieku. Jej odkrycie było następstwem badań nad ekstraktem z rośliny *Oldenlandia affinis* DC, który zawiera to minibiałko i był wykorzystywany do przyspieszania akcji porodowej w Afryce.<sup>97</sup> To odkrycie znacząco przyczyniło się do zintensyfikowania badań nad biologicznie aktywnymi związkami peptydowymi występującymi w roślinach. Dalsze badania nad aktywnością Kalaty B1 wykazały, że to minibiałko wykazuje właściwości antyproliferacyjne względem aktywowanych limfocytów ludzkich, co sugeruje jego potencjał jako leku immunosupresyjnego.<sup>98,99</sup> W wyniku tych badań stworzono mutantą Kalaty B1 o nazwie T20K, który posiada pojedynczą mutację polegającą na zamianie reszty treoniny w pozycji 20 na resztę lizyny. Ta zmiana doprowadziła do zwiększenia aktywności hamującej biologię interleukiny-2 w limfocytach T.<sup>99</sup> Obecnie, T20K jest przedmiotem badań klinicznych prowadzonych przez firmę Cyxone jako potencjalny lek na stwardnienie rozsiane. Stanowi to dowód na wiele korzystnych właściwości cyklotydów jako potencjalnych leków.<sup>100</sup>

Wśród naturalnie występujących CRPMs o natywnej aktywności biologicznej warto również zwrócić uwagę na minibiałka obecne w jadach różnych organizmów, takich jak węże i pająki, które są wykorzystywane w niewielkich dawkach w medycynie tradycyjnej.<sup>101</sup> Jednym z obiecujących przykładów członków tej grupy, charakteryzujących się efektywnym działaniem terapeutycznym, jest KCP-400 (RgAI4). KCP-400 został stworzony na bazie  $\alpha$ -konotoksyny pochodzącej ze ślimaka morskiego *Conus regius* i jest bardzo obiecującym związkiem o działaniu przeciwbólowym. Badania nad pochodnymi KCP-400 są prowadzone przez firmę Kineta Inc., a jednym z nich jest KCP506, który obecnie przechodzi badania kliniczne.<sup>102,103</sup>

Ze względu na swoje korzystne cechy, CRPMs wykorzystywane są również jako rusztowania do wprowadzania całkiem nowej aktywności, która nie występuje natywnie.

Jedną z strategii modyfikowania minibiałek w celu wprowadzenia nowej aktywności polega na włączeniu epitopu o określonej aktywności do już istniejącego rusztowania minibiałkowego, które odznacza się wysoką stabilnością i biodostępnością. To podejście jest nazywane przeszczepem molekularnym (ang. *molecular grafting*).<sup>104</sup>

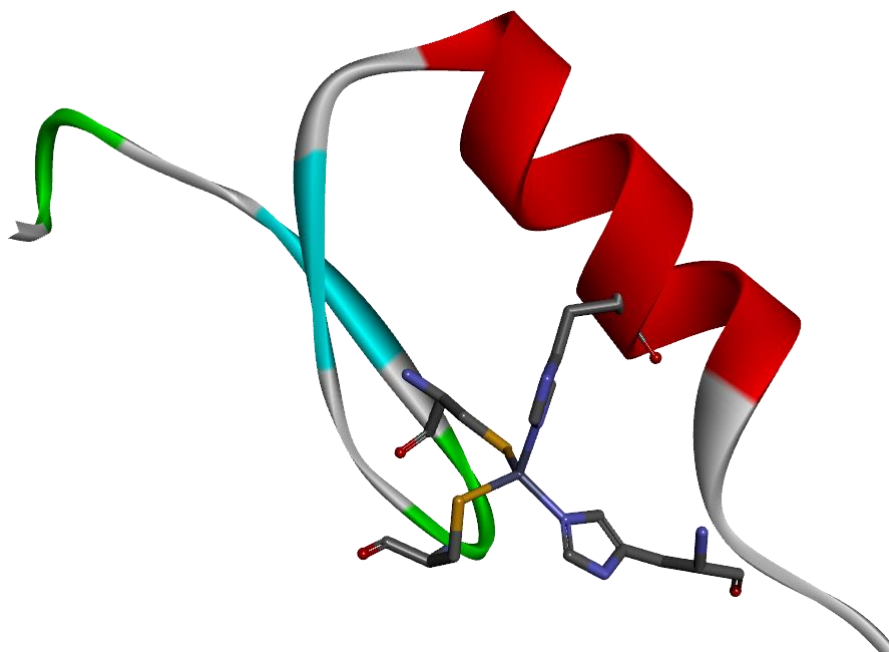
Minibiałka z licznymi resztami cysteiny są doskonałymi kandydatami na rusztowania do przeszczepu molekularnego, ponieważ możliwa jest modyfikacja pojedynczej pętli bez istotnego wpływu na całą strukturę.<sup>104,105</sup> Obiecującym przykładem tego podejścia jest MOG3, związek o aktywności immunomodulatorowej, który został zaprojektowany na bazie rusztowania Kalaty B1 oraz fragmentu epitopu z glikoproteiny oligodendrocytów mielinowych (ang. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG). MOG został uznany za obiecujący związek w leczeniu stwardnienia rozsianego, ale ze względu na niską stabilność konformacyjną i biodostępność nie mógł być dalej rozważany jako lek. Jednak te wady udało się przewyciężyć poprzez zastosowanie przeszczepu molekularnego. MOG3, uzyskany w ten sposób, wykazuje wysoką stabilność i aktywność *in vivo*.<sup>106</sup>

Drugie podejście, pozwalające na wprowadzenie aktywności biologicznej do nieaktywnego rusztowania minibiałkowego polega na wprowadzeniu aktywności poprzez projektowanie *de novo*. Podejście to może bazować na dwóch strategiach: ukierunkowanej ewolucji lub projektowanie w oparciu o metody komputerowe. Pierwsze z podejść wykazuje pewne ograniczenia takie jak: możliwość modyfikacji wyłącznie fragmentu struktury oraz trudności w ekspresji minibiałek zawierających mostki cysteinowe.<sup>82</sup> Projektowanie w oparciu o metody komputerowe pozwoliło na uzyskanie stabilizowanego przez mostki disiarczkowe, inhibitora oddziaływania PD-1/PD-L1 — MOPD-1, który został opisany w podrozdziale 1.4.3.

### 1.5.2. Minibiałka stabilizowane przez obecność jonu metalu

Trzeciorzędowa struktura minibiałek może być stabilizowana przez jon metalu, który poprzez wiązanie koordynacyjne wiąże się z resztami aminokwasowymi we wnętrzu rdzenia.

Jednym z powszechnych motywów minibiałkowych stabilizowanych przez obecność jonu metalu jest palec cynkowy, który zawiera motyw  $\beta\beta\alpha$ , składający się z helisy i dwóch nici  $\beta$  (**Rysunek 13**). Charakterystyczną cechą jest obecność jonu cynku, który tworzy wiązania koordynacyjne z dwiema resztami histydyny i dwiema resztami cysteiny, stabilizując globularną strukturę minibiałka.<sup>107</sup> Dzięki swojej wysokiej stabilności motyw palca cynkowego pełni różnorodne funkcje w organizmach żywych.<sup>108</sup>

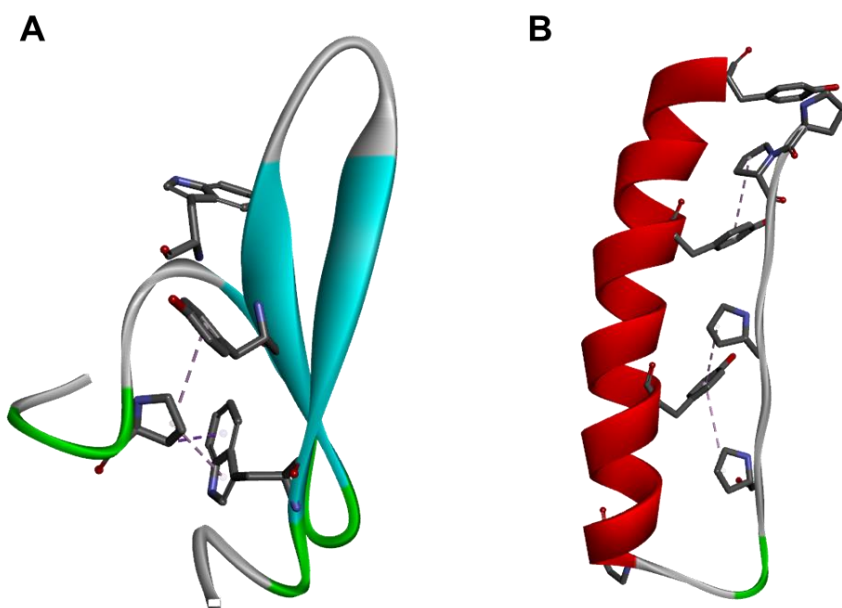


**Rysunek 13.** Struktura minibiałka posiadającego motyw palca cynkowego (PDB ID: 3IUF<sup>109</sup>) z zaznaczonym jonem cynku oraz resztami cysteiny i histydyny tworzącymi wiązanie koordynacyjne.

### 1.5.3. Minibiałka stabilizowane przez hydrofobowy rdzeń

Trzecią grupą są minibiałka stabilizowane przez hydrofobowy rdzeń, czyli takie których struktura trzeciorzędowa jest stabilizowana bez udziału dodatkowych wiązań kowalencyjnych oraz jonów metali.

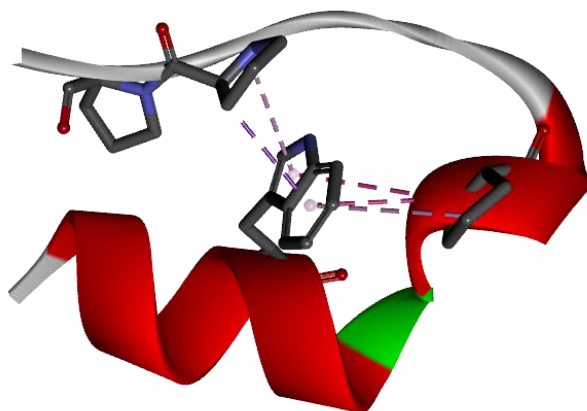
Jedną z powszechnie występujących w naturze domen charakterystycznych dla minibiałek stabilizowanych przez hydrofobowy rdzeń jest domena WW.<sup>110</sup> Nazwa domeny WW pochodzi o dwóch konserwatywnych reszt tryptofanu, które występują w obrębie pierwszej i trzeciej nici struktury podwójnej ‘spinki do włosów’ lub trzech antyrównoległych nici  $\beta$ .<sup>111</sup> Przykładem minibiałka posiadającego domenę WW jest prototyp WW (**Rysunek 14**).<sup>112</sup> Stabilizacja struktury trzeciorzędowej prototypu WW odbywa się poprzez występowanie kluczowych reszt Trp8 oraz Pro33 odpowiednio na końcach: aminowym i karboksylowym. Ponadto, w obrębie rdzenia występują oddziaływania hydrofobowe pomiędzy resztą Trp8, a Tyr20, co dodatkowo stabilizuje minibiałko.<sup>112</sup>



**Rysunek 14.** Struktury minibiałek: (A) domena WW (PDB ID: 1E0M<sup>112</sup>) oraz (B) PP $\alpha$  (PDB ID: 6GWX<sup>113</sup>).

Przykładem minibiłkowego motywu tworzącego hydrofobowy rdzeń jest motyw  $PP\alpha$  składający się z poliproliny typu II (PPII), pętli oraz  $\alpha$ -helisy, który po raz pierwszy został zidentyfikowany w obrębie ptasiego polipeptydu trzustkowego (ang. *avian pancreatic polypeptide*, APP).<sup>114</sup> Hydrofobowy rdzeń w obrębie tego motywu tworzony jest przez oddziaływania typu  $\pi$ -alkil pomiędzy resztami proliny z PPII oraz resztami aromatycznymi budującymi  $\alpha$ -helisę (**Rysunek 14**).<sup>114</sup>

Motyw klatki tryptofanowej to najmniejsze dotychczas opisane minibiłko stabilizowane przez hydrofobowy rdzeń. Minibiłko to składa się z 20 reszt aminokwasowych, a jego struktura trzeciorzędowa stabilizowana jest przez hydrofobowe interakcje pomiędzy resztą Trp6 znajdującą się w obrębie  $\alpha$ -helisy, a resztami Pro z PPII (**Rysunek 15**).<sup>115</sup>



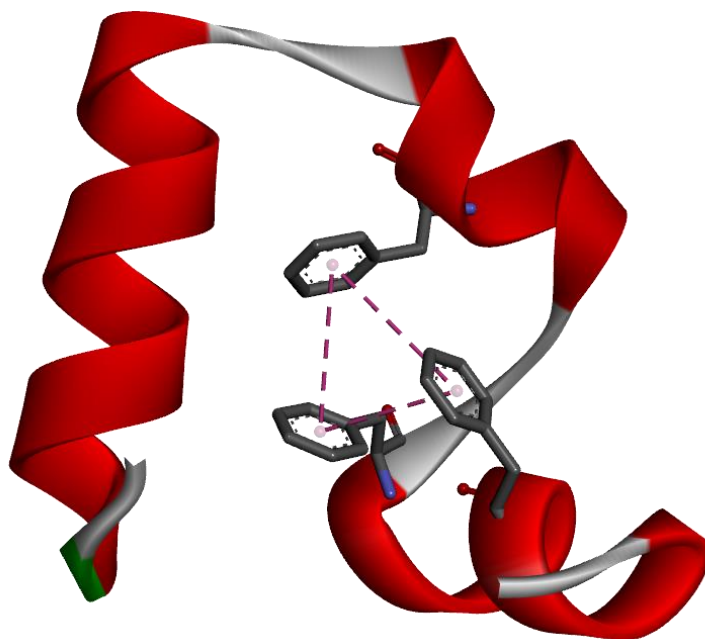
**Rysunek 15.** Struktura minibiłka stabilizowanego przez motyw klatki tryptofanowej (PDB ID: 2JOF<sup>115</sup>).

Do występujących w naturze motywów minibiłkowych motywów należy zaliczyć również motyw  $\alpha\alpha\alpha$ , składający się z trzech  $\alpha$ -helis. Przykładami minibiłek zawierających ten motyw są minibiłko wilina oraz domena „*engrailed*”.<sup>116–118</sup>

Minibiłko wilina składa się z 35 reszt aminokwasowych, a jej struktura trzeciorzędowa i proces zwijania determinowane są przez obecność hydrofobowego rdzenia (**Rysunek 16**).<sup>116</sup> Hydrofobowy rdzeń wiliny



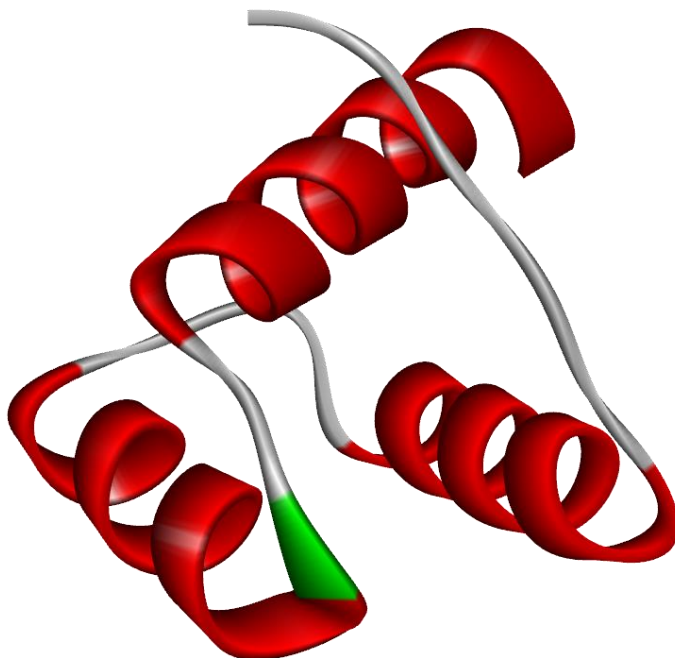
stabilizowany jest przez obecność trzech kluczowych reszt fenyloalaniny Phe6, Phe10 i Phe17. Dzięki takiej strukturze, minibiałko to charakteryzują się wysoką stabilnością termiczną scharakteryzowaną przez wartość  $T_m$  wynoszącą 70°C oraz szybkim procesem zwijania.<sup>117</sup>



**Rysunek 16.** Struktura minibiałka wily (PDB ID: 1WY3<sup>117</sup>) zawierającego motyw  $\alpha\alpha\alpha$ .

Domena „*engrailed*” zawiera motyw składający się z trzech  $\alpha$ -helis oraz krótki fragment nici na końcu aminowym (**Rysunek 17**). Taki motyw strukturalny jest charakterystyczny dla homeodomen, których funkcją jest wiązanie eukariotycznego DNA. Struktury homeodomen były intensywnie badane ze względu na ich prostotę, obejmującą stosunkowo krótką sekwencję (około 60 reszt aminokwasowych) i stabilizację poprzez hydrofobowy rdzeń. Dlatego stanowiły one doskonały model do badań nad procesem zwijania białek. Rdzeń hydrofobowy domeny „*engrailed*” stabilizowany jest poprzez oddziaływania niepolarne pomiędzy resztami aromatycznymi, ale cała struktura

stabilizowana jest przez szereg dodatkowych oddziaływań w tym również poprzez mostki solne tworzone pomiędzy różnoimiennymi grupami bocznymi reszt znajdujących się w obrębie pierwszej i drugiej  $\alpha$ -helisy. Stosunkowo długa sekwencja domeny „*engrailed*” sprawia, że istnieje możliwość wprowadzenia mutacji nadających aktywność bez znacznych zmian w procesie zwijania, a tym samym strukturze trzeciorzędowej minibiałka.<sup>118</sup>



**Rysunek 17.** Struktura minibiałka domeny "*engrailed*" (PDB ID: 1ENH<sup>118</sup>).

Minibiałka stabilizowane przez hydrofobowy rdzeń stanowią bardzo obiecujących kandydatów na rusztowania do projektowania związków o aktywności biologicznej. Dzięki stosunkowo niedługiej sekwencji wynoszącej nie więcej niż kilkadziesiąt reszt aminokwasowych oraz stabilizacji bez udziału wiązań kowalencyjnych czy jonu metalu, są one dostępne do syntezy, również metodami chemicznymi. Dodatkowo ich otrzymywanie nie wymaga dodatkowych etapów potrzebnych do osiągnięcia prawidłowego procesu zwijania. Stosunkowo długa, w porównaniu do większości peptydów, sekwencja pozwala na wprowadzenie większej ilości mutacji, co z kolei umożliwia projektowanie

efektywnych terapeutyków dla trudnych celów molekularnych takich jak na przykład oddziaływania białko-białko.

Podobnie jak CRPMs, minibiałka stabilizowane przez hydrofobowy rdzeń stanowią idealnych kandydatów na rusztowania do zastosowania strategii przeszczepu molekularnego (ang. *molecular grafting*) epitopu o specyficznej aktywności.<sup>119,120</sup>

Dowodem skuteczności tego podejścia jest minibiałko o nazwie cewka C34 (ang. *C34 coil*), które wykazuje aktywność przeciwwirusową polegającą na blokowaniu wejście wirusa HIV-1 do komórek gospodarza.<sup>119</sup> Strategia projektowania tego minibiałka polegała na włączeniu fragmentu epitopu wiążącego z peptydu C HIV-1 na powierzchni rusztowania zamka leucynowego GCN4. Wolny fragment peptydu C HIV-1 charakteryzował się niską stabilnością konformacyjną oraz wysoką wrażliwością na cięcie proteolityczne. Po włączeniu fragmentu w stabilnie rusztowanie białkowe uzyskano inhibitor wykazujący zdolność do hamowania wejścia wirusa do komórek oraz korzystniejsze właściwości farmakokinetyczne takie jak wysoka stabilność konformacyjna i zwiększona odporność na cięcie proteolityczne.<sup>119,121</sup>

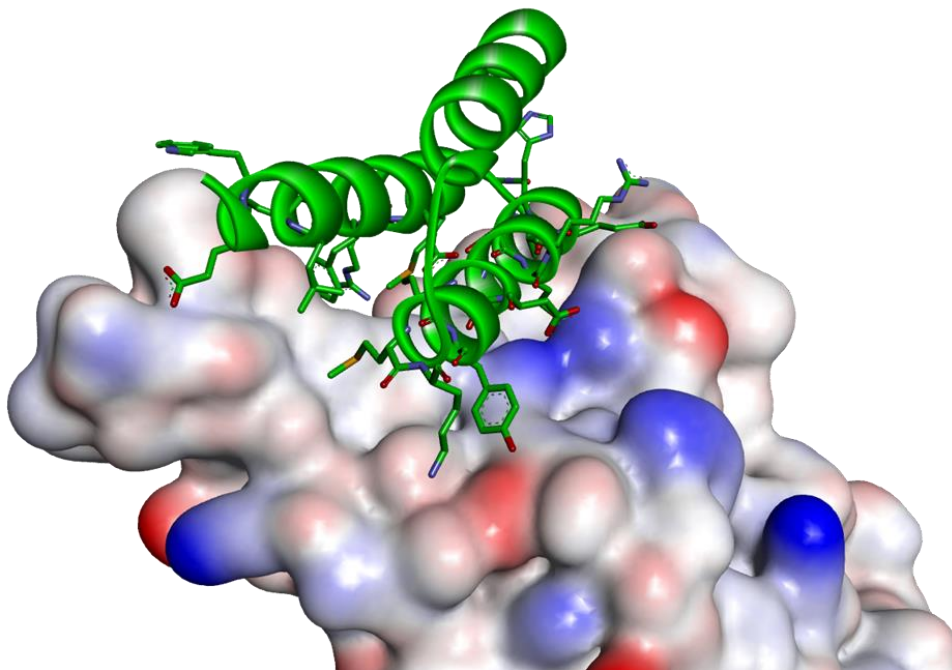
Podejście *de novo* również znalazło zastosowanie w projektowaniu potencjalnych leków na bazie minibiałek stabilizowanych przez rdzeń hydrofobowy.

Strategia oparta o ukierunkowaną ewolucję doprowadziła do opracowania Ecallantide (DX-88), zatwierdzonego przez FDA w 2009 roku leku przeznaczonego leczenia ostrych ataków dziedzicznego obrzęku naczynioruchowego.<sup>122</sup> Ecallantide jest inhibitorem kalikreiny osoczowej, który został zidentyfikowany poprzez technikę reprezentacji fagowej wykorzystującej biblioteki DNA kodujące różnorodne minibiałka bazujące na domenie Kunitz ludzkiego inhibitora krzepnięcia związanego z lipoproteinami. Dzięki wykorzystaniu jako rusztowania domeny, która naturalnie występuje w ludzkim organizmie, udało się uzyskać skuteczny lek, który jest bezpieczny po podaniu dożylnym i podskórnym.<sup>123</sup>

Druga strategia oparta o podejście do projektowania *de novo*, projektowanie komputerowe, również jest szeroko wykorzystywana w projektowaniu minibiałkowych terapeutyków stabilizowanych przez hydrofobowy rdzeń. Podejście to pozwala na wprowadzenie modyfikacji w obrębie całego minibiałka, a nie, jak w przypadku ukierunkowanej ewolucji, wyłącznie w obrębie jego fragmentu. Jednakże, projektowanie z wykorzystaniem tej metody może być bardziej czasochłonne oraz bardziej kosztowne.<sup>124,125</sup>

Jednym z dostępnych pakietów oprogramowania wspierających komputerowe projektowanie minibiałek jest Rosetta.<sup>126,127</sup> Platforma ta umożliwia projektowanie minibiałek na bazie wybranej struktury startowej oraz pozwala na wykonanie próbkowanie różnych wariantów sekwencji pod kątem uzyskania powinowactwa do partnera wiązania, co ma zastosowanie na przykład przy projektowaniu inhibitorów.

Przykładem skutecznego wykorzystania oprogramowania Rosetta do projektowania minibiałkowych inhibitorów oddziaływania białko-białko są inhibitory oddziaływania domeny RBD (ang. *receptor binding domain*) białka S SARS-CoV-2 oraz ludzkiego receptora ACE2 o potencjalnym zastosowaniu w leczenia COVID-19. Przy projektowaniu tych inhibitorów zastosowano dwa podejścia. Pierwsze z nich polegało na wykorzystaniu strategii przeszczepu molekularnego, a więc włączeniu  $\alpha$ -helisy z ACE2, która odpowiadającej za powinowactwo do RBD w zaprojektowane *de novo* rusztowanie minibiałkowe stabilizowane przez hydrofobowy rdzeń. Drugie podejście, polegało na projektowaniu inhibitorów *de novo* i miało na celu uzyskanie nowego modelu wiązania. Najlepsze inhibitory, LCB1 (**Rysunek 18**) i LCB3, który zostały uzyskane dzięki drugiemu podejściu, charakteryzowały się wartościami  $IC_{50}$  rzędu pikomolarnego, które wynosiło odpowiednio 23,54 pM i 48,1 pM dla LCB1 i LCB3.<sup>120</sup>



**Rysunek 18.** Struktura kompleksu LCB1/RBD białka S SARS-CoV-2 (PDB ID: 7JZU<sup>120</sup>). LCB1 zostało zaznaczone kolorem zielonym, zaś domena RBD białka S została przedstawiona poprzez reprezentacje powierzchni z zaznaczonymi kolorem niebieskim ładunkiem o charakterze dodatnim oraz kolorem czerwonym ładunkiem o charakterze ujemnym.

Oprogramowanie Rosetta zostało wykorzystane również do projektowania agonistów PD-1, którzy mogą znaleźć zastosowanie jako leki w leczeniu chorób autoimmunologicznych oraz stanów zapalnych. Zaprojektowane w ten sposób minibiałko, PD-MP1, wykazuje powinowactwo rzędu nanomolarnego zarówno wobec ludzkiego jak i mysiego PD-1, a dodatkowe badania wykazały, że obecność trimery PD-MP1 skutkuje hamowanie aktywacji mysich limfocytów T.<sup>9</sup>

Projektowanie *de novo* może być dodatkowo wsparte przez manualny wybór modyfikacji i wprowadzenie reszt niekanonicznych aminokwasów. Efektywnym przykładem tego podejścia są minibiałka miniCD4s, które są inhibitorami białka gp120, dzięki czemu blokują wejście wirusa HIV-1 do ludzkich komórek. Inhibitory te zostały zaprojektowane na bazie minibiałkowego rusztowania, toksyny, która występuje w jadzie gatunku skorpiona *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (ang. *scyllatoxin*). Kluczowe okazały się modyfikacja reszty

fenyloalaniny, która wypełniała wnękę na powierzchni gp120, jednak były za małe, aby wypełnić ją całkowicie. W celu zwiększenia aktywności hamującej wprowadzono w tej pozycji różne pochodne fenyloalaniny. Wprowadzenie podstawienia cykloheksylometyloaminy na fenyloalaninie doprowadziło do zwiększenia zdolności hamującej, co mogło być osiągnięte wyłącznie przez zastosowanie w tej pozycji nienaturalnej pochodnej aminokwasowej.<sup>125,128</sup>

Dzięki swoim korzystnym cechom minibiłka są szeroko wykorzystywane w projektowaniu związków o aktywności biologicznej, w tym potencjalnych leków. Opisane w tym podrozdziale przykłady pokazują olbrzymi potencjał tej grupy związków, które dzięki swoim cechom i rozwijającej się wiedzy dotyczącej procesu zwijania białek oraz metod ich projektowania stanowią istotną grupę potencjalnych leków, celujących w dotychczas bardzo trudne cele terapeutyczne.

## 2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było opracowanie inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 opartych na minibiałkach. Inhibitory te mają potencjalne zastosowanie w immunoterapii przeciwnowotworowej, innowacyjnej metodzie leczenia nowotworów, wykorzystującej naturalny układ odpornościowy organizmu do zwalczania komórek nowotworowych. Jednym z podejść w immunoterapii jest blokowanie oddziaływania punktów kontrolnych układu immunologicznego, takich jak PD-1/PD-L1. Interakcja między tymi dwoma białkami prowadzi do tłumienia aktywności układu odpornościowego, co umożliwia komórkom nowotworowym unikanie ataku ze strony systemu immunologicznego. Terapie opierające się na inhibitorach oddziaływania PD-1/PD-L1 stanowią obiecującą strategię w leczeniu nowotworów.

W prezentowanej pracy głównym celem jest opracowanie nowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 przy zastosowaniu dwóch różnych podejść projektowania. Pierwsze podejście opiera się na wykorzystaniu stabilnych konformacyjnie minibiałek jako rusztowań do projektowania związków hamujących interakcję między PD-1, a PD-L1. Drugie podejście zakłada projektowanie *de novo* rusztowań, które będą charakteryzować się wysoką stabilnością i zawierać  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokwasy. Dodatkowo, wprowadzone mutacje zwiększą powinowactwo tych rusztowań względem PD-L1 w miejscu oddziaływania z PD-1. W obu podejściach kluczową rolę w stabilizacji związków odgrywa hydrofobowy rdzeń, który powstaje w wyniku oddziaływań struktur drugorzędowych i tworzenia trzeciorzędowej struktury minibiałka.

Przed przystąpieniem do syntezy nowych minibiałek, etapem wstępnym była synteza i badania peptydowego inhibitora oddziaływania PD-1/PD-L1 opracowanego przez firmę Bristol-Myers Squibb. Ten inhibitor charakteryzował się aktywnością rzędu nanomolarnego. Uzyskana struktura krystaliczna inhibitora z celem molekularnym pozwoliła na dogłębne poznanie charakterystyki jego oddziaływania, co stanowiło istotny punkt wyjścia do efektywnego projektowania nowych minibiałkowych inhibitorów.

Ponadto, projektowanie, synteza oraz analiza strukturalna zsyntetyzowanych minibiałek stanowi istotny aspekt pracy. Te badania mają na celu głębsze zrozumienie procesu fałdowania białek oraz kontroli stabilności ich konformacji. Ostatecznie, te wnioski i osiągnięcia mogą przyczynić się do dalszego rozwoju dziedziny projektowania i otrzymywania wysoce aktywnych leków opartych na minibiałkach.



### 3. WYNIKI I Dyskusja

#### 3.1. pAC65 – makrocykliczny peptydowy inhibitor oddziaływania PD-1/PD-L1

W celu zidentyfikowania najważniejszych reszt aminokwasowych warunkujących oddziaływanie pomiędzy białkami PD-1 i PD-L1 zsyntetyzowano i przeanalizowano oddziaływanie PD-L1 z wysokoaktywnym, makrocyklicznym peptydowym inhibitorem, **pAC65**, pochodzącym z patentu firmy BMS.<sup>78</sup>

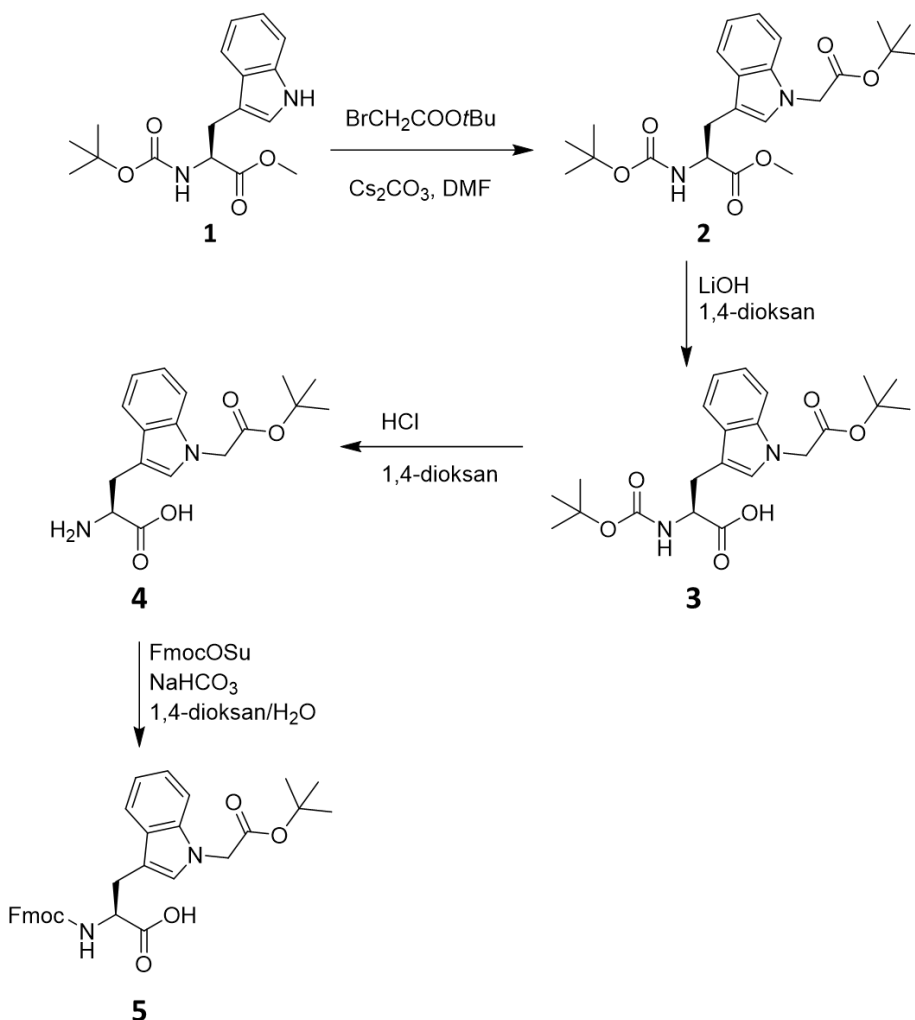
##### 3.1.1. Synteza

Sekwencja **pAC65** zawiera 15 reszt aminokwasowych z czego 7 jest resztami aminokwasów niekanonicznych. Dodatkowo, na końcu aminowym liniowego peptydu (przed cyklizacją) znajdował się kwas chlorooctowy. Większość pochodnych aminokwasowych wykorzystanych do syntezy miało pochodzenie komercyjne. Wyjątek stanowiła pochodna tryptofanu, kwas (*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)metoksy)karbonyloamino)-3-(1-(2-(*tert*-butoksy)-2-oksoetylo)-1*H*-indol-3-yl)propanowy, oznaczony jako **TrpNAc**, który nie był dostępny handlowo. W związku z tym konieczna była jego synteza.

Synteza pochodnej tryptofanu składała się z czterech etapów (**Rysunek 19**). Trzy etapy były przeprowadzone zgodnie z protokołem opublikowanym w patencie firmy BMS<sup>78</sup>, do którego wprowadzono niewielkie modyfikacje. Czwarty etap, polegający na przyłączeniu grupy fluorenylometoksykarbonylowej (Fmoc), został przeprowadzony zgodnie z procedurą wykorzystującą węglan 9-fluorenylometylo-sukcynimidylu (Fmoc-OSu). Związkiem wyjściowym była, dostępna komercyjnie, modyfikowana pochodna tryptofanu — Boc-Trp-OMe (**1**).

Pierwszy etap miał na celu przyłączenie grupy *tert*-butylooctanowej do atomu azotu pierścienia indolowego w warunkach zasadowych, reakcja zachodziła z wydajnością 60%. Produkt pierwszego etapu (**2**) oczyszczono z użyciem chromatografii Flash na kolumnie wypełnionej żelami krzemionkowymi stosując układ eluentów składający się z heksanu i octanu etylu. Substrat był odzyskany podczas oczyszczania i przereagowywany ponownie. W kolejnym etapie

przeprowadzona została hydroliza estru metylowego w celu otrzymania wolnej grupy karboksylowej. Reakcja hydrolizy charakteryzowała się niską wydajnością i prowadzona zgodnie z protokołem przez 1 godzinę wykazywała wydajność na poziomie 10%. Reakcje stopniowo wydłużano, aż do 12 godzin, przy których udało się otrzymać wydajność na poziomie 37%, a dalsze wydłużanie czasu reakcji prowadziło do powstawania produktów ubocznych. Produkt drugiego etapu (3) oczyszczano w ten sam sposób jak produkt pierwszego etapu.



**Rysunek 19.** Schemat syntezy modyfikowanego tryptofanu.

Trzeci etap polegał na odblokowaniu w środowisku kwaśnym grupy  $\alpha$ -aminowej zabezpieczonej kwasolabilną grupą *tert*-butoksykarbonylową (Boc). Ze względu na fakt, że przyłączona w pierwszym etapie grupa *tert*-butylooctowa posiada również kwasolabilną grupę *tert*-butylową, reakcja ta wymagała łagodnych warunków. Zbyt długi czas reakcji (powyżej 60 minut), zbyt wysoka temperatura mieszaniny reakcyjnej lub łaźni wodnej w trakcie odparowywania za pomocą wyparki, powodowały powstawanie produktu ubocznego –  $\epsilon$ -*N*-karboksymetylotryptofanu. Z uwagi na obecność kwasu oraz niską stabilność związku **4**, produktu po trzecim etapie nie oczyszczano, tylko od razu przeprowadzano reakcję blokowania grupy  $\alpha$ -aminowej zasadolabilną grupą Fmoc. Ze względu na umiarkowaną wydajność reakcji (60%) i obecne produkty uboczne, oczyszczanie nie było trywialne. Dla pierwszych porcji związku prowadzono oczyszczanie z użyciem HPLC na kolumnie C18 z wykorzystaniem układu eluentów składającego się z wody i acetonitrylu (ACN). Oczyszczanie z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) wykazuje wiele zalet takich jak pełna automatyzacja procesu oraz bardzo wysoka rozdzielczość, niestety rozmiar dostępnej kolumny oraz detektor UV-VIS powodowały ograniczenia co do ilości związku, którą można jednorazowo nastrzyknąć na kolumnę. Ze względu na stosunkowo dużą ilość TrpNAc potrzebną do syntez, oczyszczenie całości otrzymanego produktu z użyciem HPLC nie było możliwe. W związku z tym, przeprowadzono liczne próby oczyszczania produktów etapu **4** na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym w układzie faz normalnych z użyciem układów: heksan i octan etylu, dichlorometan i metanol, chloroform i metanol, heksan wraz z octanem etylu i metanolem oraz heksan wraz z dichlorometanem i metanolem. Pomimo wielu prób optymalizacji gradientu i testowania różnych wielkości kolumn, nie udało się uzyskać metody, która pozwalałaby na efektywne oczyszczenie produktu w krótkim czasie, a więc bez zużycia dużej ilości rozpuszczalników. Wobec powyższego oczyszczanie przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii Flash na kolumnie C18 w układzie eluentów składającym się z wody i acetonitrylu. Ze względu na cenę kolumny taki wybór

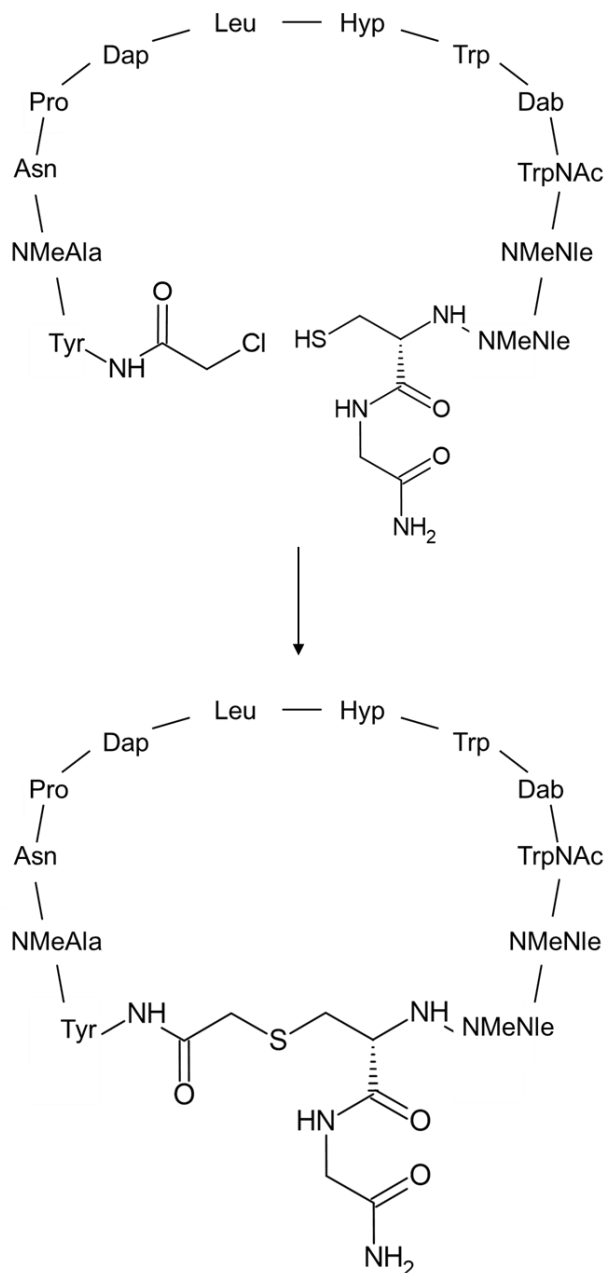
wiązał się z większymi kosztami, jednak ostatecznie stanowił najbardziej efektywną metodę oczyszczania produktu. W ten sposób otrzymano docelową pochodną tryptofanu z odpowiednio zablokowanymi grupami funkcyjnymi w ilościach gramowych, które umożliwiły wykorzystanie jej do syntezy peptydu zgodnie ze strategią chemii Fmoc.

Otrzymana pochodna tryptofanu oraz pozostałe pochodne aminokwasowe dostępne komercyjnie zostały następnie wykorzystane do syntezy peptydu. W związku z występowaniem w sekwencji reszt posiadających metylowaną grupę  $\alpha$ -aminową (*N*-metylowanych) oraz wrażliwej na utlenianie reszty cysteiny konieczne było zastosowanie niestandardowych metod sprzęgania podczas syntezy peptydu. Obecność grupy *N*-metylowej wprowadza zawadę przestrzenną trakcie reakcji sprzęgania, stąd istotne jest zastosowanie metod pozwalających na zwiększenie wydajności przyłączania kolejnej reszty aminokwasowej do grupy aminowej. W tym celu kolejny aminokwas był sprzęgany podwójnie 2 x 15 minut w temperaturze 75°C, a czas drugiego sprzęgania był wydłużony o dodatkowych 6 godzin w temperaturze pokojowej. W przypadku reszt cysteiny zastosowano łagodniejsze warunki sprzęgania i reakcje prowadzono w 50°C przez 10 minut. Dla pozostałych aminokwasów użyto standardowych metod sprzęgania.

Po przeprowadzeniu syntezy, peptyd został odcięty z żywicy, a kwasolabilne grupy protekcyjne poddane procesowi deprotekcji. Z uwagi na obecność reszty cysteiny, podatnej na utlenianie, konieczne stało się zastosowanie odpowiedniej mieszaniny skomponowanej z kwasu trifluorooctowego (TFA), tioanizolu, anizolu oraz etano-1,2-ditiolu (EDT). Kwas trifluorooctowy zapewnił odpowiednie środowisko kwasowe dla przeprowadzenia reakcji. Natomiast tioanizol oraz anizol pełniły funkcję tzw. „scavengers”, reagując z reaktywnymi produktami deprotekcji, co nie tylko skutecznie je usunęło, ale także zapobiegło ewentualnym reakcjom ubocznym. Wprowadzenie etano-1,2-ditiolu miało na celu przeciwdziałanie procesowi utleniania cysteiny. Niestety, proces deprotekcji peptydu prowadził do niepożądanego utleniania cysteiny w znaczącej ilości otrzymanego produktu. W celu poprawy efektywności tego etapu, podjęto szereg prób modyfikacji składu mieszaniny ściągającej. Obejmowały one zwiększenie

ilości EDT w stosunku do pozostałych składników, zastąpienie EDT ditiotreitolem, dodatek fenolu do mieszanki oraz zamianę EDT na fenol. Pomimo podjętych prób, nie zaobserwowano istotnej poprawy wydajności procesu w żadnym z badanych warunków. Aby przeciwdziałać utlenianiu cysteiny i poprawić efektywność procesu deprotekcji, podjęto dalsze kroki. Przeprowadzono próbę przeprowadzenia procesu w kontrolowanej atmosferze argonu, wykluczając dostęp tlenu. Dodatkowo, testowano różne czasy trwania reakcji dla każdego z warunków, tj. 30 minut, 60 minut, 90 minut, 120 minut oraz 180 minut. Niestety, żaden z przedstawionych warunków nie przyniósł istotnego zwiększenia wydajności procesu deprotekcji, z uniknięciem utlenienia cysteiny. Jednak otrzymane ilości pozwoliły na przeprowadzenie dalszych badań.

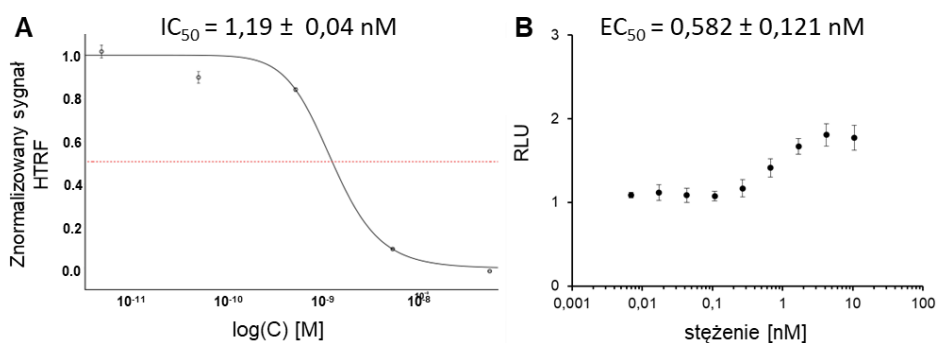
Następnym kluczowym krokiem była niezwłoczna cyklizacja peptydu po jego odcięciu od żywicy, wytrąceniu i odwirowaniu. Podejście to, zakładające natychmiastowe przeprowadzenie tych procesów kolejno po sobie, wynikało głównie z wrażliwości grupy tiolowej cysteiny na utlenianie. Proces cyklizacji prowadzono w środowisku zasadowym. Przed rozpuszczeniem osadu peptydu w buforze zasadowym, konieczne było skuteczne usunięcie nadmiaru kwasu trifluorooctowego z próbki. W tym celu osad peptydu osuszano strumieniem argonu. Cyklizacja opierała się na reakcji substytucji nukleofilowej między kwasem chlorooctowym na końcu aminowym a grupą tiolową cysteiny przy końcu karboksylowym peptydu. W wyniku tej reakcji powstawał łącznik, umożliwiający zamknięcie makrocyklu peptydowego (**Rysunek 20**). Po zakończeniu procesu cyklizacji, otrzymaną mieszaninę poddano liofilizacji, a następnie dokonano oczyszczenia przy użyciu HPLC.



**Rysunek 20.** Schemat reakcji cyklizacji peptydu **pAC65**. Procedura cyklizacji polega na reakcji substytucji nukleofilowej pomiędzy kwasem chlorooctowym na końcu aminowym, a grupą tiolową reszty cysteiny przy końcu karboksylowym. Znajdująca się na końcu karboksylowym reszta glicyny, pozostaje po cyklizacji poza strukturą makrocykliczną. Skrót „NMe” oznacza *N*-metylowaną pochodną danego aminokwasu, Dap — kwas diaminopimielinowy, Hyp — hydroksyprolina, Dab — kwas 2,4-diaminomasłowy, Nle — norleucyna, TrpNAc — pochodną tryptofanu.

### 3.1.2. Aktywność biologiczna\*

Aktywność biologiczna peptydu **pAC65** została przebadana dwoma metodami: z wykorzystaniem homogennej czasowo rozdzielczej fluorescencji (ang. *homogeneous time resolved fluorescence*, HTRF) oraz poprzez test blokowania immunologicznego oparty na komórkach (ang. *cell-based Immune Checkpoint Blockade assay*, ICB). Za pomocą tych metod zostały określone parametry charakteryzujące aktywność otrzymanego peptydu: wartość połowy maksymalnego stężenia hamującego oddziaływanie PD-1/PD-L1 ( $IC_{50}$ ) oraz wartość połowy maksymalnego stężenia efektorowego ( $EC_{50}$ ) dla reaktywacji efektorowych limfocytów T zablokowanych przez PD-L1 (Rysunek 21).



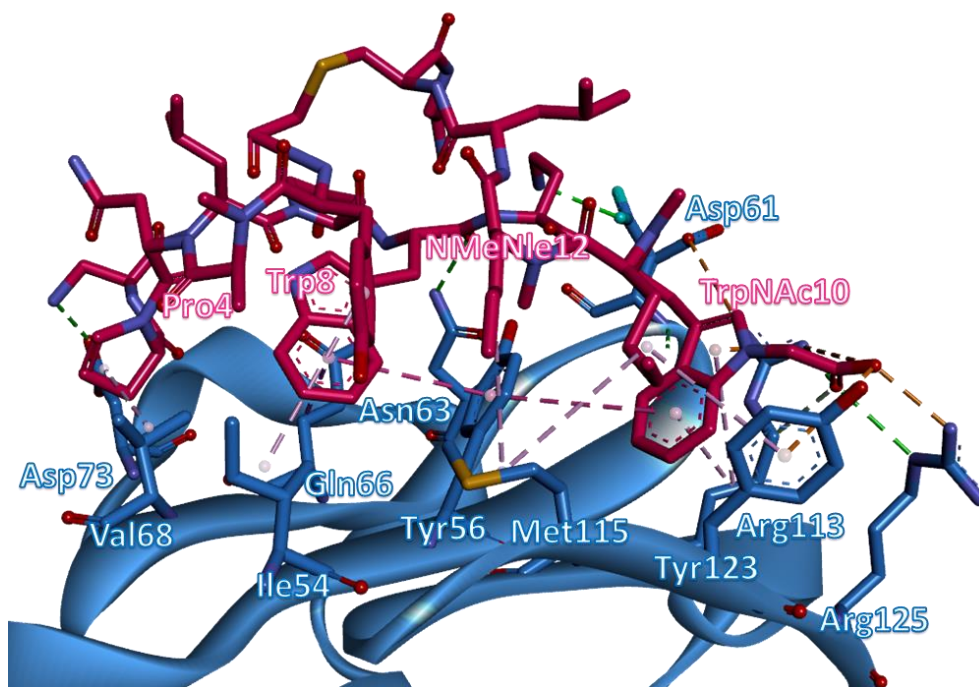
**Rysunek 21.** (A) Wyniki HTRF oraz (B) wyniki testu blokowania immunologicznego opartego na komórkach dla **pAC65**.

Otrzymana w ICB wartość  $EC_{50}$  jest zbliżona do wyników uzyskanych dla zatwierdzonych przez FDA przeciwciał przetestowanych w tej samej procedurze (atezolizumab – 0,14 nM, durvalumab – 0,23 nM, nivolumab – 1,27 nM).<sup>129</sup> Te wyniki jednoznacznie dowodzą, że **pAC65** stanowi najsilniejszy opublikowany dotychczas inhibitor PD-1/PD-L1, który nie opiera się na strukturze przeciwciała.<sup>36</sup>

\* Badania zostały zrealizowane przez członków zespołu prof. Tadeusza Holaka z Zespołu Chemii Bioorganicznej i Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

### 3.1.3. Struktura krystaliczna<sup>†</sup>

W kontekście znaczącej aktywności inhibitora **pAC65**, kolejnym krokiem było uzyskanie jego struktury krystalicznej. Proces krystalizacji został przeprowadzony przy wykorzystaniu metody siedzącej kropli. Kryształy, charakteryzujące się odpowiednią jakością dyfrakcyjną, uzyskano z roztworu PD-L1 z **pAC65**, w stosunku molowym 1:1, w temperaturze pokojowej, z roztworu o pH 6.5, zawierającego 1,4 M trihydratu octanu sodu oraz 0,1 M kakodylanu sodu. Dane dotyczące dyfrakcji promieni rentgenowskich zostały gromadzone na linii wiązki PXIII-X06DA w Swiss Light Source w Instytucie Paula Scherrera w Villigen Szwajcarii. Otrzymane kryształy umożliwiły rozwiązanie struktury z rozdzielczością 1,1 Å. (**Rysunek 22**).



**Rysunek 22.** Struktura krystaliczna kompleksu **pAC65/**PD-L1.

<sup>†</sup> Badania zostały zrealizowane przez członków zespołu prof. Tadeusza Holaka z Zespołu Chemii Bioorganicznej i Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.



Interakcja pomiędzy **pAC65**, a PD-L1 zachodzi na powierzchni  $\beta$ -karkki GFCC' PD-L1, która oddziałuje z natywnym PD-1. Wygięty kształt peptydu zapewnia szeroką powierzchnię ściśle oddziałującą z białkiem, która jest bogata w oddziaływania hydrofobowe i polarne. Podobnie do innych opublikowanych inhibitorów makrocyclicznych, powierzchnie oddziaływania możemy podzielić na centralną część zdominowaną przez oddziaływania hydrofobowe oraz otaczającą ją część, gdzie występują dodatkowe interakcje pomiędzy polarnymi resztami.<sup>79</sup>

W centralnej, hydrofobowej części znajdują się reszty <sup>65</sup>Pro4, <sup>65</sup>Trp8, <sup>65</sup>TrpNac10, <sup>65</sup>NMeNle11, <sup>65</sup>NMeNle12. Dwie hydrofobowe kieszenie na powierzchni PD-L1 są wypełnione przez <sup>65</sup>Trp8 oraz <sup>65</sup>TrpNac10. Położenie pierścieni indolowych tych aminokwasów jest zgodne z ich położeniem w kompleksie BMS-57/PD-L1, z tą różnicą, że obecność dodatkowej grupy karboksylowej w <sup>65</sup>TrpNac pozwala na szereg dodatkowych oddziaływań polarnych z <sup>PD-L1</sup>Arg113 i <sup>PD-L1</sup>Arg125. Warto zauważyć, że oddziaływania z tymi resztami zostały już wcześniej uznane za kluczowe na podstawie analizy wariantu PD-1 o zwiększonym powinowactwie do PD-L1.<sup>27,39</sup> Reszta <sup>65</sup>TrpNac zapewnia szereg oddziaływań hydrofobowych z resztami: <sup>PD-L1</sup>Tyr56, <sup>PD-L1</sup>Met115 oraz <sup>PD-L1</sup>Tyr123, które budują jedną z hydrofobowych kieszeni. Dodatkowo, oddziaływania w obrębie tej kieszeni stabilizowane są przez hydrofobowe interakcje pomiędzy <sup>65</sup>NMeNle11 i <sup>65</sup>NMeNle12, a <sup>PD-L1</sup>Met115 i <sup>PD-L1</sup>Tyr123. Oddziaływanie z drugą kieszenią, składającą się z reszt: <sup>PD-L1</sup>Ile54, <sup>PD-L1</sup>Tyr56, <sup>PD-L1</sup>Gln66 oraz <sup>PD-L1</sup>Val68, stabilizowane jest przez oddziaływania hydrofobowe pomiędzy <sup>65</sup>Trp8 a <sup>PD-L1</sup>Tyr56 i <sup>PD-L1</sup>Gln66, <sup>65</sup>Pro4 a <sup>PD-L1</sup>Val68 oraz <sup>65</sup>Tyr2 a <sup>PD-L1</sup>Ile54. W obrębie polarnego fragmentu powierzchni wiążącej występują: wiązanie wodorowe pomiędzy <sup>65</sup>Dap5 i <sup>PD-L1</sup>Asp73 oraz <sup>65</sup>Dab9 i <sup>PD-L1</sup>Asp61 oraz <sup>PD-L1</sup>Asn63.

Ze względu na bardzo wysoką aktywność **pAC65**, wyniki te zostały wykorzystane na kolejnych etapach pracy do projektowania nowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1.

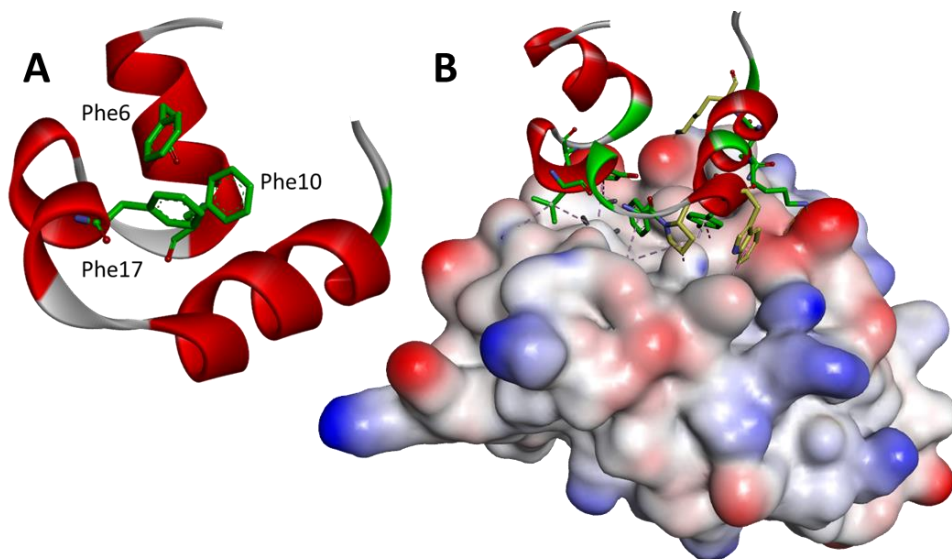


## 3.2. Inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1 bazujące na znanych rusztowaniach minibiłkowych

### 3.2.1. Inhibitory bazujący na strukturze minibiłka wiliny

#### 3.2.1.1. Projektowanie

Pierwsza grupa inhibitorów została zaprojektowana na podstawie struktury znanego minibiłka — wiliny (PDB ID: 1WY3<sup>117</sup>). Minibiłko to cechuje się optymalną długością sekwencji (35 reszt aminokwasowych) do syntezy przy użyciu automatycznego syntezyatora mikrofalowego, szybkim procesem zwijania oraz wysoką stabilnością konformacyjną, która jest osiągnana dzięki obecności hydrofobowego rdzenia, który tworzy trzeciorzędową strukturę białka.<sup>117</sup>



**Rysunek 23.** (A) Struktura krystaliczna minibiłka wiliny (PDB ID: 1WY3<sup>117</sup>). Reszty fenyloalaniny, które są kluczowe dla stabilizacji trzeciorzędowej struktury zaznaczono kolorem zielonym. (B) Model kompleksu V1/PD-L1. Kolorem zielonym zostały zaznaczone reszty aminokwasowe inhibitora przeznaczone do oddziaływania z PD-L1, kolorem żółty reszty znajdujące się w oryginalnej sekwencji rusztowania i oddziałujące z powierzchnią celu molekularnego.

Inhibitory zostały zaprojektowane z założeniem ich wiązania do PD-L1 w miejscu oddziaływania z PD-1. We wszystkich inhibitorach zachowane zostały trzy, kluczowe dla stabilizacji hydrofobowego rdzenia, konserwatywne reszty fenyloalaniny (Phe6, Phe10, Phe17).<sup>117</sup> W celu zbudowania modelu kompleksu

inhibitor/PD-L1 wykorzystano protokół Docking oprogramowania RosettaDock (**Rysunek 23**).

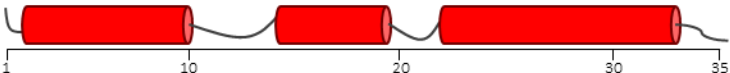
Przed wprowadzeniem mutacji zidentyfikowano trzy reszty aminokwasowe w obrębie rusztowania o wysokim potencjale oddziaływania z molekularnym celem: Pro21, Trp23 oraz Lys32, które zostały zachowane w sekwencji podczas kolejnych etapów projektowania (**Rysunek 23-24**). Reszta  ${}_{1WY3}$ Pro21 została zachowana ze względu na możliwość tworzenia hydrofobowych oddziaływań z resztami  ${}_{PD-L1}$ Ala121 oraz  ${}_{PD-L1}$ Met115 oraz z uwagi na jej występowanie w obrębie tej pętli, gdzie prolina umożliwia jej poprawne formowanie. Znajdująca się obok  ${}_{1WY3}$ Pro21 reszta  ${}_{1WY3}$ Trp23 może tworzyć oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$  z  ${}_{PD-L1}$ Tyr123. Jednocześnie obie te reszty wypełniają hydrofobową kieszeń na powierzchni PD-L1, która w podobny sposób jest wypełniona pierścieniem indolowym w kompleksach makrocyklicznych peptydów BMS-57, BMS-71 oraz **pAC65**. Ostatnia z reszt, występująca w natywnym minibiałku wilinie, która może zapewniać powinowactwo do PD-L1,  ${}_{1WY3}$ Lys32, oddziałuje w obrębie polarnej części powierzchni oddziaływania, gdzie podobnie do **pAC65** może tworzyć oddziaływanie na zasadzie mostka solnego z  ${}_{PD-L1}$ Asp73 (**Rysunek 24**).

Następnie, przeanalizowano strukturę modelową kompleksu wilina/PD-L1 i wybrano reszty aminokwasowe na powierzchni rusztowania przeznaczone do mutacji oraz rodzaje reszt, na które mogłyby zostać zamienione (**Rysunek 24**). Reszta  ${}_{1WY3}$ Met12 w modelu znajduje się w obrębie hydrofobowej powierzchni oddziaływania PD-L1, dlatego zdecydowano się zamienić ją na jeden z niepolarnych aminokwasów takich jak tyrozyna, leucyna, fenyloalanina, prolina lub tryptofan, które umożliwiają tworzenie oddziaływań hydrofobowych z  ${}_{PD-L1}$ Ile54 oraz  ${}_{PD-L1}$ Val68. W pozycji 16 wprowadzona została reszta leucyny, która rozszerza hydrofobową powierzchnie oddziaływania o interakcje z  ${}_{PD-L1}$ Ala52 oraz może oddziaływać z  ${}_{PD-L1}$ Ile54. Dalej, zdecydowano się dokonać mutacji w przypadku aminokwasu  ${}_{1WY3}$ Leu20, który znajduje się w centralnym obszarze hydrofobowego fragmentu oddziaływania. Wybrano ten aminokwas do modyfikacji, ponieważ jego niewielki rozmiar nie pozwala na wypełnienie pustej przestrzeni między powierzchnią wiążącą inhibitora a celem molekularnym.

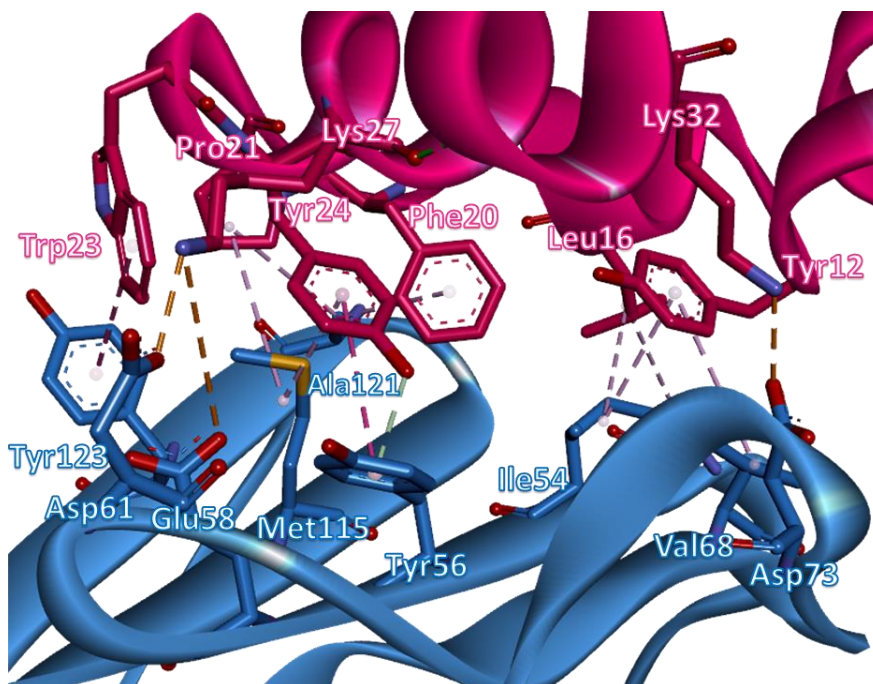
W związku z tym, w tej pozycji rozważono możliwość wprowadzenia większych aromatycznych aminokwasów, takich jak tryptofan, fenyloalanina lub tyrozyna. Tego rodzaju substytucje mogą pozwolić na wypełnienie przestrzeni pomiędzy białkiem a inhibitorem, co tworzy możliwość zachodzenia interakcji hydrofobowych z  $_{PD-L1}Ala121$ . Zlokalizowana w obrębie drugiej hydrofobowej kieszeni PD-L1 reszta  $_{1WY3}Nle24$ , podobnie jak  $_{1WY3}Leu20$ , jest zbyt mała, by w pełni wypełnić hydrofobową wnękę. W związku z tym w tej pozycji również rozważano wszystkie trzy aminokwasy aromatyczne: tryptofan, tyrozinę i fenyloalaninę. Reszta  $_{1WY3}His27$  znajduje się w obrębie polarnego fragmentu powierzchni wiążącej PD-L1. Jej zamiana na aminokwasy o dodatnim ładunku, takie jak lizyna lub arginina, mogła przyczynić się do stabilizacji oddziaływań z celem molekularnym poprzez tworzenie mostków solnych z  $_{PD-L1}Glu58$  oraz  $_{PD-L1}Asp61$ . Wydaje się to obiecujące, ponieważ polarne oddziaływanie z  $_{PD-L1}Glu58$  obserwowane są w przypadku wszystkich trzech przeciwciał oraz BMS-57 i BMS-71. Z kolei oddziaływanie tego typu z  $_{PD-L1}Asp61$  zostało zaobserwowane w kompleksie z avelumabem, durvalumabem i **pAC65**. Dodatkowo, konieczne było dokonanie substytucji reszty  $_{1WY3}Glu31$  na aminokwas, który mógłby zapewnić interakcje w tym obszarze. W tym kontekście zastosowano dwie różne strategie. Pierwsza polegała na wprowadzeniu krótkiej reszty polarnej, takiej jak asparagina, co umożliwiło oddziaływanie z ujemnie naładowaną  $_{PD-L1}Asp61$ . Druga strategia miała na celu wprowadzenie niewielkiej reszty niepolarnej, jak izoleucyna, leucyna lub walina, w celu rozszerzenia hydrofobowej powierzchni oddziaływań z celem molekularnym (**Rysunek 24**).

Na bazie powyższej analizy wybrano miejsca i rodzaje mutacji. Następnie, najkorzystniejsze kombinacje sekwencji zostały wybrane z zastosowaniem protokołu FastDesign oprogramowania Rosetta. Sześć sekwencji, o najlepszej ocenie (ang. *score*) otrzymanych w ten sposób, zostało wybranych do dalszych etapów badań (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Sekwencje zaprojektowanych inhibitorów **V1–V6** oraz ich porównanie z oryginalną sekwencją williny (**V0**). Pogrubioną, czerwoną czcionką zostały zaznaczone zmodyfikowane reszty przeznaczone do oddziaływania z PD-L1, kolorem zielonym zostały wyróżnione mutacje wspólne dla wszystkich inhibitorów

Peptyd	Sekwencja						
							
<b>V0</b>	LSDED	FKAVF	GMTRS	AFANL	PLWBQ	QHLKK	EKGLF
<b>V1</b>	LSDED	FKAVF	<b>GY</b> TRS	<b>L</b> FAN <b>F</b>	PLW <b>Y</b> Q	Q <b>K</b> LKK	<b>N</b> KGLF
<b>V2</b>	LSDED	FKAVF	<b>GL</b> TRS	<b>L</b> FAN <b>F</b>	PLW <b>Y</b> Q	Q <b>K</b> LKK	<b>L</b> KGLF
<b>V3</b>	LSDED	FKAVF	<b>GY</b> TRS	<b>L</b> FAN <b>F</b>	PLW <b>W</b> Q	Q <b>R</b> LKK	<b>L</b> KGLF
<b>V4</b>	LSDED	FKAVF	<b>GY</b> TRS	<b>L</b> FAN <b>F</b>	PLW <b>Y</b> Q	Q <b>KE</b> KK	<b>L</b> KGLF
<b>V5</b>	LSDED	FKAVF	<b>GF</b> TRS	<b>L</b> FAN <b>F</b>	PLW <b>Y</b> Q	Q <b>K</b> LKK	<b>L</b> KGLF
<b>V6</b>	LSDED	FKAVF	<b>GY</b> TRS	<b>L</b> FAN <b>F</b>	PLW <b>Y</b> Q	Q <b>K</b> LKK	<b>L</b> KGLF

B = Norleucyna



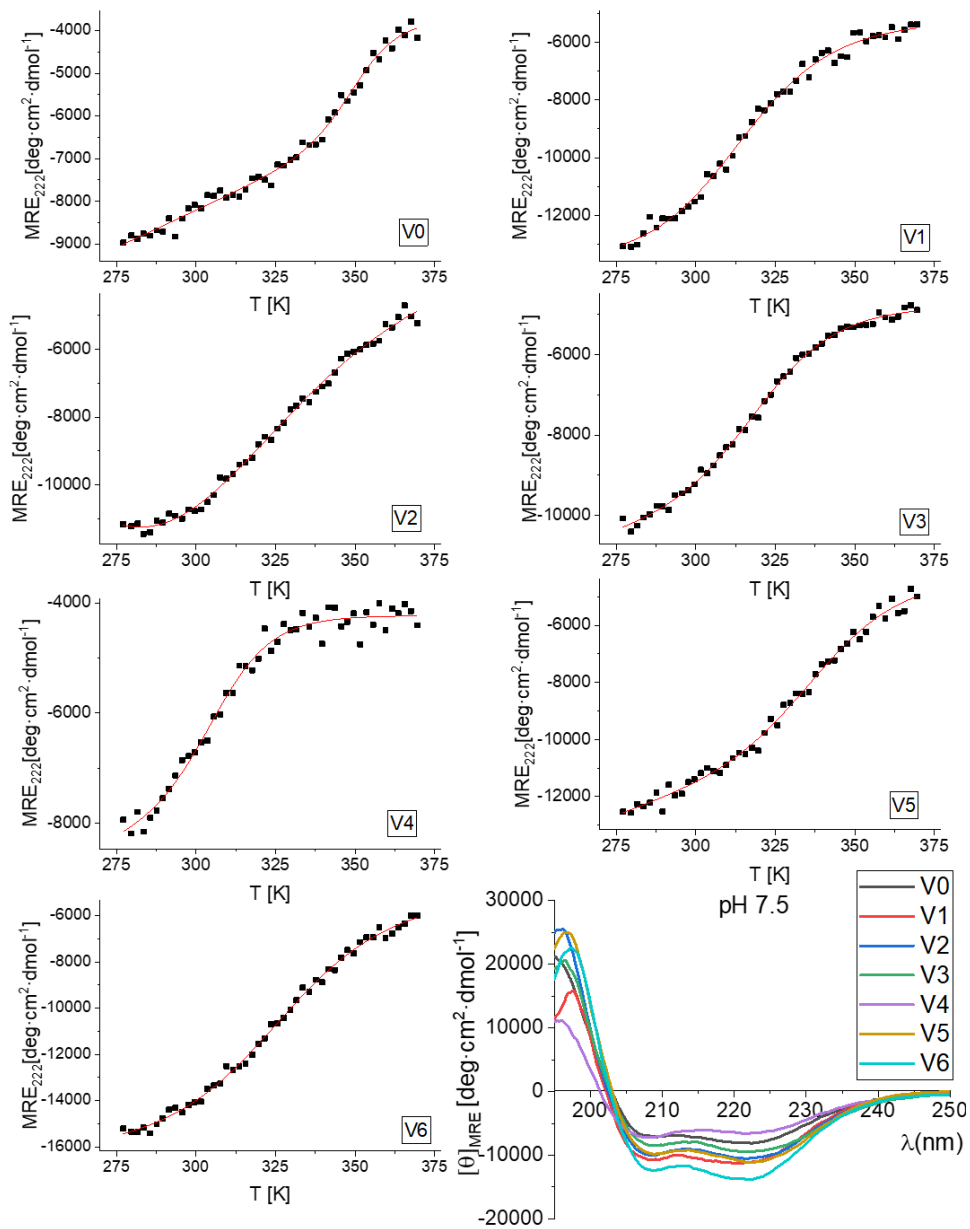
**Rysunek 24.** Wymodelowana struktura kompleksu **V1/CD276** z zaznaczonymi resztami biorącymi udział w oddziaływaniu. Minibiątko **V1** zostało oznaczone kolorem różowym, natomiast CD276 – kolorem niebieskim.

### 3.2.1.2. Analiza strukturalna

Analiza strukturalna zsyntetyzowanych minibiałek została przeprowadzona z wykorzystaniem dichroizmu kołowego (ang. *circular dichroism*, CD). W ramach tej analizy przeprowadzono dwa rodzaje badań. Pierwszy z nich polegał na pomiarze widma CD w stałej temperaturze 25°C, w zakresie długości fal od 195 nm do 250 nm, w celu identyfikacji obecności struktur drugorzędowych. Drugi rodzaj analizy to pomiar krzywej denaturacji przy stałej długości fali 222 nm i zmiennej temperaturze od 4°C do 96°C, w celu określenia stabilności termicznej oraz wyznaczenia temperatury rozfałdowywania (ang. *melting temperature*,  $T_m$ ). Wszystkie pomiary zostały przeprowadzone w buforze fosforanowym o stężeniu 50 mM i pH 7.5.

Widma CD (**Rysunek 25**) wykazują, że we wszystkich przypadkach obserwuje się dwa minima przy długościach fal 208 nm i 222 nm, co jest charakterystyczne dla obecności  $\alpha$ -helis, a więc zgodne z początkowymi założeniami. Ponadto, znaczące podobieństwo widm uzyskanych dla oryginalnej sekwencji (**V0**) oraz inhibitorów (**V1–V6**) sugeruje brak istotnych zmian konformacyjnych w strukturze minibiałek po wprowadzeniu mutacji.

Krzywe denaturacji termicznej (**Rysunek 25**) wykazują spadek stabilności termicznej po wprowadzeniu mutacji. Temperatura rozfałdowywania uzyskana dla rusztowania (**V0**) wynosząca 75°C jest wyższa niż wartości uzyskane dla inhibitorów. Dla inhibitorów **V1–V4** uzyskano wartości  $T_m$  poniżej 50°C, co wskazuje na niską stabilność termiczną.



Peptyd	V0	V1	V2	V3	V4	V5	V6
$T_m$ [°C]	$78,8 \pm 1,4$	$43,3 \pm 5,9$	$36,9 \pm 13,6$	$49,8 \pm 2,7$	$34,8 \pm 5,5$	$69,5 \pm 2,7$	$69,5 \pm 2,7$

**Rysunek 25.** Widma CD, krzywe denaturacji termicznej oraz wyznaczone temperatury rozfałdowywania ( $T_m$ ) dla **V0–V6**. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE).



### 3.2.1.3. Aktywność biologiczna

Badania aktywności biologicznej peptydów były przeprowadzane za pomocą dwóch różnych metod. Pierwsza z nich, opierająca się na interferometrii biowarstwowej (ang. *biolayer interferometry*, BLI), miała na celu analizę kinetyki oddziaływania z celem molekularnym — PD-L1, a tym samym określenie stałej dysocjacji ( $K_D$ ) wiązania inhibitora z PD-L1. Druga metoda, oparta na homogennej czasowo-rozdzielczej fluorescencji (ang. *homogeneous time-resolved fluorescence*, HTRF), służyła do oceny aktywności hamującej oddziaływanie PD-1/PD-L1

Otrzymane wyniki z testów BLI potwierdzają powinowactwo do celu molekularnego dla wszystkich zsyntetyzowanych inhibitorów (**Tabela 3**, **Rysunek 26**). Wynik uzyskany dla rusztowania bez wprowadzonych mutacji (**V0**) również sugeruje oddziaływanie z PD-L1.

Podobnie, wszystkie wyniki uzyskane w pomiarach z wykorzystaniem HTRF wskazują na zdolność minibiłek do hamowania interakcji PD-1/PD-L1, jednak wyniki z obu testów nie są ze sobą skorelowane (**Tabela 3**, **Rysunek 26**). Najlepszy inhibitor (o najniższej ilości niezdisocjowanego kompleksu przy stężeniu inhibitora wynoszącym 50  $\mu$ M, **V4**) wykazuje prawie najniższe powinowactwo do celu w testach BLI. Podobnie przedstawiają się wyniki dla kandydata o najlepszym wyniku uzyskanym w testach BLI (**V1**).

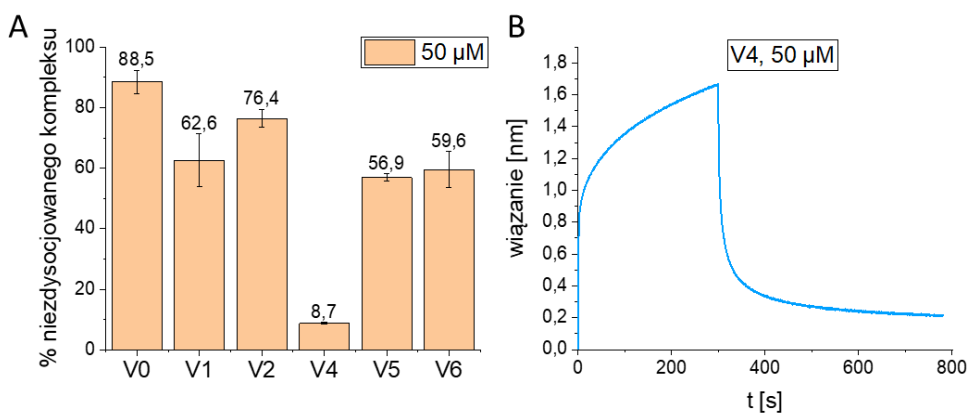
W przypadku inhibitorów **V1–V4** zaobserwowano brak korelacji między powinowactwem do PD-L1, a aktywnością hamującą. Wartości temperatury topnienia tych czterech minibiłek wynoszące poniżej 50°C oraz kształt krzywych denaturacji sugerują możliwość częściowego rozfałdowania podczas przeprowadzania eksperymentów, które prowadzono w temperaturze 30°C (BLI) oraz w temperaturze pokojowej (HTRF).

Dodatkowo, warto zauważyć, że niewielkie zmiany w sekwencji, takie jak różnica między **V1**, a **V6**, która polega na obecności reszty asparaginy lub leucyny w pozycji 31, powodują znaczące różnice w powinowactwie (**V1** ma powinowactwo 170 razy większe niż **V6**), co nie jest jednoznaczne z modelem. Te obserwacje sugerują dwie możliwości. Pierwsza z nich to potencjalne

nieprawidłowości w skonstruowanym modelu. Druga możliwość to znaczący spadek stabilności konformacyjnej i zmiany w obrębie struktury trzeciorzędowej inhibitorów w temperaturze, w której był prowadzony eksperyment.

**Tabela 3.** Wartości stałej dysocjacji ( $K_D$ ) otrzymane z wykorzystaniem BLI oraz ilość niezdysojowanego kompleksu zmierzone testami HTRF dla minibiałek **V0–V6** przy stężeniu  $50 \mu\text{M}$ . Pomiary HTRF dla **V3** nie zostały przeprowadzone ze względu na niską rozpuszczalność w buforze przeznaczonym do pomiarów.

Peptyd	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	ilość niezdysojowanego kompleksu [%] [i] = $50 \mu\text{M}$
<b>V0</b>	$6,0 \pm 0,3$	$88,5 \pm 3,8$
<b>V1</b>	$0,041 \pm 0,003$	$62,6 \pm 8,8$
<b>V2</b>	$0,14 \pm 0,01$	$76,4 \pm 3,0$
<b>V3</b>	$23,3 \pm 1,3$	N/A
<b>V4</b>	$13,0 \pm 0,6$	$8,7 \pm 0,3$
<b>V5</b>	$6,7 \pm 0,5$	$56,9 \pm 1,2$
<b>V6</b>	$7,1 \pm 0,5$	$59,6 \pm 5,9$



**Rysunek 26.** (A) Wyniki BLI (B) i HTRF dla inhibitorów **V1–V6** oraz rusztowania **V0**.

Oryginalne minibiałko (**V0**) wykazuje stosunkowo wysokie powinowactwo do PD-L1, co potwierdza wartości  $K_D$  wynosząca  $6 \mu\text{M}$ . Jednocześnie obserwuje się niską aktywność hamującą oddziaływanie kompleksu PD-1/PD-L1, co jest scharakteryzowane przez wartość niezdysojowanego kompleksu wynoszącą 89%

przy stężeniu inhibitora równym 50  $\mu\text{M}$ . Wyniki uzyskane w pomiarach CD wskazują, że białko to cechuje się wysoką wartością  $T_m$ , a więc rozbieżności te nie są spowodowane niską stabilnością konformacyjną w temperaturze, w której przeprowadzane są eksperymenty. Przyczyną stosunkowo wysokiego powinowactwa do PD-L1, pomimo niskiej aktywności hamującej oddziaływanie kompleksu PD-1/PD-L1, może być wiązanie minibiałka z PD-L1 nie tylko w regionie zakładanym podczas projektowania, ale także w innych miejscach lub nawet w obrębie kilku różnych fragmentów.

W przeciwieństwie do inhibitorów **V1–V4**, peptydy **V5** i **V6** cechują się wyższymi wartościami  $T_m$ , wynoszącymi odpowiednio 70°C i 58°C, co sugeruje brak rozfałdowania peptydów w czasie eksperymentów. Dodatkowo, otrzymane wartości  $K_D$  (6,7  $\mu\text{M}$  dla **V5** i 7,1  $\mu\text{M}$  dla **V6**) oraz ilości niezdisocjowanego kompleksu (57% i 60%) są zbliżone do siebie, co jest zgodne z oczekiwaniami, biorąc pod uwagę podobieństwo ich sekwencji. Sekwencje tych inhibitorów różnią się tylko jedną resztą w pozycji 12, gdzie **V5** zawiera resztę fenyloalaniny, a **V6** resztę tyrozyny.

Warto zauważyć, że inhibitory **V5** i **V6** wykazują powinowactwo do PD-L1 na bardzo podobnym poziomie jak **V0**, dla którego  $K_D$  wynosi 6  $\mu\text{M}$ . Jednak różnią się one od rusztowania aktywnością hamującą, która jest wyższa o 30% na korzyść inhibitorów. Wartości te potwierdzają wcześniej wysunięty wniosek dotyczący możliwości wiązania **V0** do PD-L1 w kilku różnych miejscach. Wprowadzenie mutacji, występujących w inhibitorach, powoduje najprawdopodobniej zwiększenie powinowactwa minibiałek do fragmentu PD-L1 oddziałującego z PD-1 i zmniejszenie powinowactwa do pozostałych miejsc. W związku z tym otrzymane wartości  $K_D$  dla wszystkich trzech minibiałek są niemal takie same, ale aktywność hamująca jest większa w przypadku inhibitorów.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że wprowadzone mutacje mogą zwiększać zdolność hamowania oddziaływania PD-1/PD-L1. Jednakże wprowadzenie mutacji może prowadzić do obniżenia stabilności konformacyjnej minibiałek. Konieczność wprowadzenia mutacji w obrębie 6 z 35 reszt aminokwasowych oryginalnego rusztowania miała istotny

wpływ na stabilność konformacyjną otrzymanych inhibitorów, co było trudne do przewidzenia, ponieważ nie wynikało to jednoznacznie z modelu strukturalnego. Ponadto, warto zauważyć, że nawet niewielkie różnice w sekwencji, jak w przypadku peptydów **V1** i **V6**, które miały odpowiednio wartości  $T_m$  wynoszące 45°C i 58°C, powodowały różnice w stabilności konformacyjnej. Przyczyną tej destabilizacji mogła być krótka sekwencja rusztowania, która nie pozwalała na wprowadzenie większej liczby mutacji bez znaczących zmian konformacyjnych. Te obserwacje, w połączeniu z wnioskiem dotyczącym możliwości istnienia więcej niż jednego miejsca wiązania w obrębie PD-L1, skłoniły nas do zmiany rusztowania.

### 3.2.2. Inhibitory bazujące na strukturze domeny „engrailed”

Jako nowe rusztowanie do projektowania inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 wybrano, podobne do wiliny i dobrze zbadane minibiałko, które również składa się z trzech helis, jednak jest dłuższe i zawiera 54 reszty aminokwasowe, a mianowicie domenę "engrailed" (ENH, PDB ID: 1ENH<sup>118</sup>).

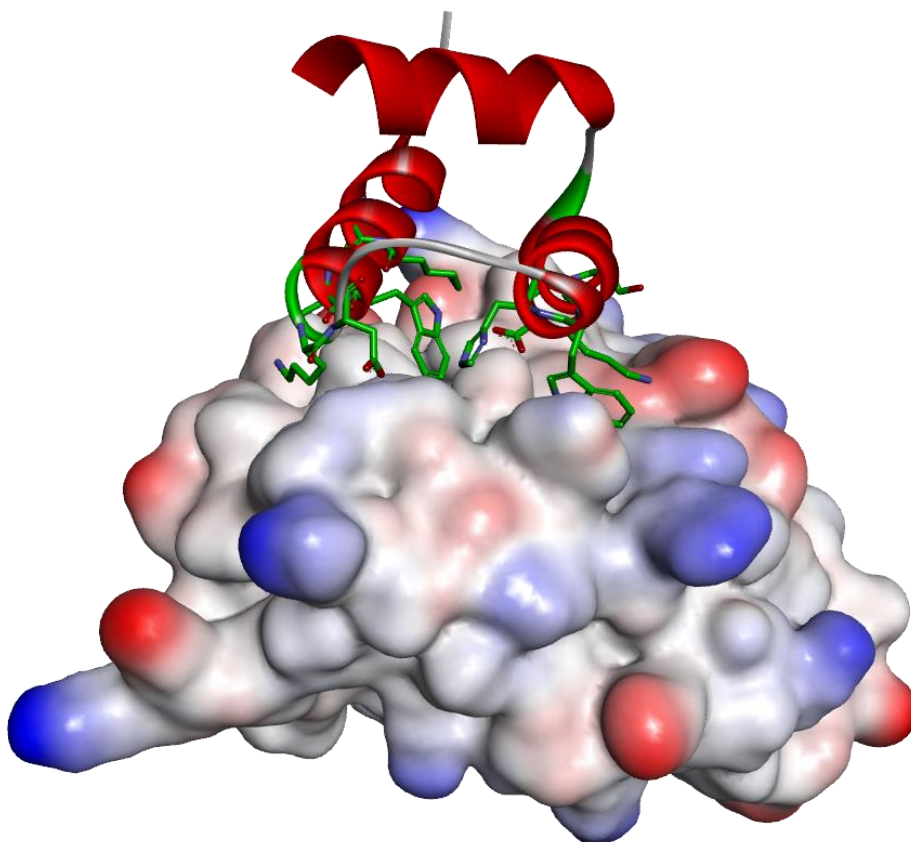
#### 3.2.2.1. Pierwsza grupa inhibitorów

##### 3.2.2.1.1. Projektowanie

Procedura projektowania inhibitorów opartych na strukturze domeny "engrailed" była podobna do wcześniejszej. Jednak poprzedzona została dodatkowym etapem optymalizacji struktury samego rusztowania. Oryginalna sekwencja minibiałka **ENH**, która składa się z 54 reszt aminokwasowych, została skrócona o 8 reszt aminokwasowych: 4 reszty z końca karboksylowego oraz 4 reszty z końca aminowego. Reszty te zostały wybrane, ponieważ ze struktury wynika, że nie biorą one udziału w tworzeniu hydrofobowego rdzenia. Skrócenie sekwencji miało na celu ułatwienie syntezy peptydów.

Ponieważ po skróceniu sekwencji zachowana została stabilność konformacyjna minibiałka, w kolejnym kroku jako rusztowanie wykorzystano **ENH** o skróconej sekwencji, które nazwano **E0**. Inhibitory, podobnie jak w przypadku poprzedniej grupy, zostały zaprojektowane z założeniem ich wiązania do PD-L1 w miejscu oddziaływania z PD-1. Wybór ułożenia inhibitora względem celu molekularnego oraz zbudowanie modelu, na którym oparto dalsze etapy projektowania, zostały przeprowadzone przy użyciu protokołu Docking oprogramowania RosettaDock. Do oddziaływania z celem została wybrana powierzchnia inhibitora skonstruowana z dwóch antyrównoległe ułożonych  $\alpha$ -helis (**Rysunek 27**).

Projektowanie powierzchni przeznaczonej do oddziaływania z PD-L1 opierało się na skonstruowaniu dwóch fragmentów: hydrofobowego oraz polarnego, podobnie jak ma to miejsce w przypadku makrocyklicznych inhibitorów BMS-57, BMS-71<sup>79</sup> oraz **pAC65**.

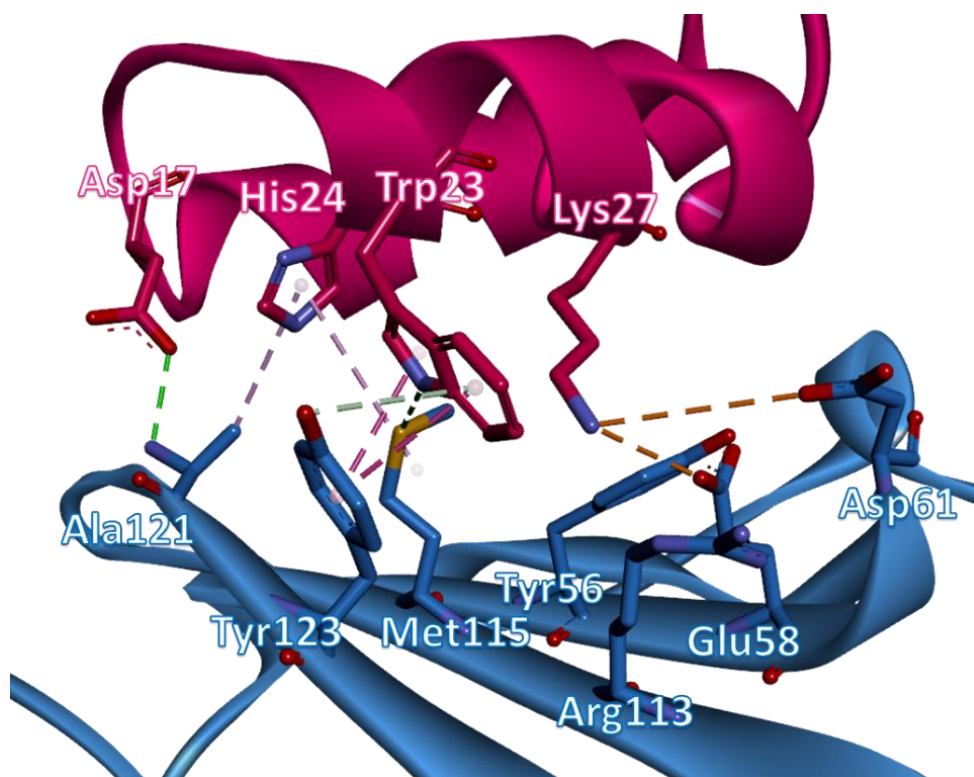


**Rysunek 27.** Model kompleksu E1/PD-L1. Kolorem zielonym zostały zaznaczone reszty aminokwasowe inhibitora przeznaczone do oddziaływania z celem molekularnym PD-L1.

W celu zaprojektowania inhibitorów wybrano pozycje przeznaczone do mutacji na powierzchni minibiłka E0 (**Rysunek 27**). Jako fragment hydrofobowy wybrano reszty aminokwasowe znajdujące się w strukturze modelowej kompleksu w okolicach hydrofobowych kieszeni PD-L1, a mianowicie:  $E_0$ Arg12,  $E_0$ Glu13,  $E_0$ Asn17,  $E_0$ Arg23,  $E_0$ Arg24 oraz  $E_0$ Glu31. Natomiast oddziaływania polarne miały zapewnić reszty w pozycjach:  $E_0$ Ala8,  $E_0$ Arg9 i  $E_0$ Gln27.

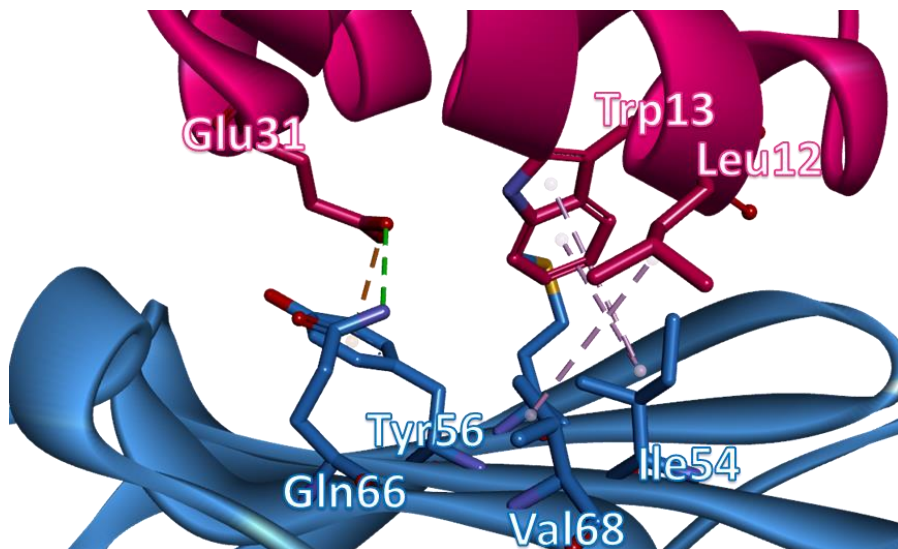
Pierwsza hydrofobowa kieszeń PD-L1 zbudowana jest z reszt Tyr56, Arg113, Met115, Ala121 i Tyr123 (**Rysunek 28**). W przypadku inhibitorów makrocyklicznych ta była kieszeń wypełniana przez resztę tryptofanu lub, w przypadku pAC65, przez resztę modyfikowanego tryptofanu, a także przez jedną lub dwie dodatkowe hydrofobowe reszty. W związku z tym w pozycji

$E_0$ Arg23 zdecydowano się wprowadzić resztę tryptofanu, która może tworzyć interakcje typu  $\pi$ - $\pi$  z  $PD-L1$ Tyr123 oraz wiązanie wodorowe z  $PD-L1$ Met115. W pozycji  $E_0$ Arg24 rozważano zamianę na jedną z aromatycznych reszt, takich jak reszta fenyloalaniny, histydyny lub tryptofanu. Dodatkowo, w tej samej kieszeni, na pozycji  $E_0$ Gln27, zaproponowano wprowadzenie dłuższej, dodatnio naładowanej reszty, na przykład argininy lub lizyny. Reszty te mogą zapewniać zarówno hydrofobowe oddziaływania z niepolarną kieszenią, jak i mostki solne z resztami znajdującymi się w obrębie fragmentu polarnego, takimi jak  $PD-L1$ Glu58 i  $PD-L1$ Asp61. Na drugim końcu kieszeni, w pozycji  $E_0$ Asn17, rozważano reszty posiadające negatywny ładunek, takie jak kwas glutaminowy lub asparaginowy. Takie reszty mogą tworzyć wiązania wodorowe z amidem łańcucha polipeptydowego  $PD-L1$ Ala121, a także potencjalnie poprawić rozpuszczalność inhibitora (**Rysunek 28**).



**Rysunek 28.** Wymodelowana struktura kompleksu **E1/PD-L1** z zaznaczonymi resztami biorącymi udział w oddziaływaniu w obrębie pierwszej hydrofobowej kieszeni PD-L1. PD-L1 oznaczone zostało kolorem niebieskim, natomiast inhibitor — różowym.

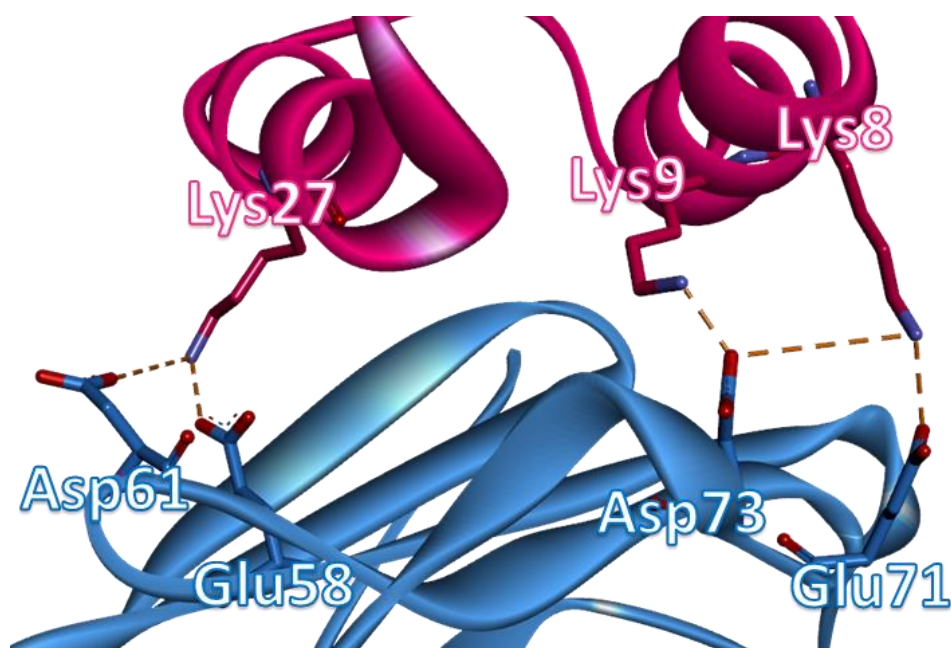
Druga, hydrofobowa kieszeń PD-L1, składająca się z reszt Ile54, Tyr56, Gln66, Val68 i Met115, jest wypełniona w strukturze modelowej kompleksu przez reszty  $E_0$ Arg12,  $E_0$ Glu13, i  $E_0$ Glu31 (**Rysunek 29**). Reszta  $E_0$ Glu13 znajduje się w centralnej części wgłębienia, dlatego w tej pozycji wprowadzono resztę tryptofanu, która dzięki swoim rozmiarom oraz właściwościom hydrofobowym stanowi idealnego kandydata do wypełnienia hydrofobowej kieszeni, analogicznie jak ma to miejsce w przypadku inhibitorów makrocyklicznych BMS-57 i pAC65. Wprowadzenie reszty tryptofanu w tej pozycji umożliwia powstanie oddziaływań typu  $\pi$ -alkil z  $_{PD-L1}$ Ile54 oraz  $\pi$ - $\pi$  z  $_{PD-L1}$ Tyr56. W pozycji 12 rusztowania rozważano wprowadzenie reszty niepolarniej, takiej jak walina, leucyna, izoleucyna lub fenyloalanina, które mogą zapewnić interakcje hydrofobowe z  $_{PD-L1}$ Ile54 oraz  $_{PD-L1}$ Val68. Część tej hydrofobowej kieszeni znajduje się na granicy z polarnym fragmentem, dlatego w pozycji 31 rozważono dwie możliwości: zamianę reszty kwasu glutaminowego na alaninę, aby umożliwić oddziaływania hydrofobowe z wnęką, takie jak oddziaływania  $\pi$ -alkil z resztą  $_{PD-L1}$ Tyr56, oraz pozostawienie w tej pozycji kwasu glutaminowego, który zapewnia wiązanie wodorowe z  $_{PD-L1}$ Gln66 oraz interakcje typu  $\pi$ -anion z  $_{PD-L1}$ Tyr56 (**Rysunek 29**).



**Rysunek 29.** Wymodelowana struktura kompleksu E1/PD-L1 z zaznaczonymi resztami biorącymi udział w oddziaływaniu w obrębie drugiej hydrofobowej kieszeni PD-L1. PD-L1 oznaczone zostało kolorem niebieskim, natomiast inhibitor — różowym.



W obszarze polarnego fragmentu powierzchni oddziaływania, który otacza część hydrofobową, zaplanowano interakcje poprzez substytucję aminokwasów  $E_0Ala8$ ,  $E_0Arg9$  oraz  $E_0Gln27$  (**Rysunek 30**). Ze względu na obecność w tym regionie na powierzchni PD-L1 reszt kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego, które posiadają ładunki ujemne, rozważono substytucje na aminokwasy o ładunkach dodatnich, takie jak lizyna i arginina, co pozwoli na tworzenie oddziaływań na zasadzie mostków solnych.



**Rysunek 30.** Wymodelowana struktura kompleksu E1/PD-L1 z zaznaczonymi resztami biorącymi udział w oddziaływaniu w obrębie obszaru polarnego. PD-L1 oznaczone zostało kolorem niebieskim, natomiast inhibitor — różowym.

Dodatkowo, do modyfikacji wybrano resztę  $E_0Glu16$ , która znajduje się w okolicach pierwszej kieszeni. Została ona zamieniona na resztę lizyny, która dzięki swojemu długiemu, nierozgałęzionemu łańcuchowi może zapewniać dodatkowe oddziaływania hydrofobowe z  $PD-L1Ala52$ ,  $PD-L1Ile54$  i  $PD-L1Ser117$ , oraz wiązanie wodorowe z grupą karbonylową łańcucha polipeptydowego  $PD-L1Ala52$ .

Na podstawie powyższej analizy dokonano selekcji lokalizacji i typów mutacji. Następnie, używając oprogramowania protokołu FastDesign oprogramowania, wybrano najbardziej optymalne warianty sekwencji. Spośród tych wariantów wybrano cztery sekwencje o najlepszej ocenie (ang. *score*) do kolejnych etapów badań. (Tabela 4).

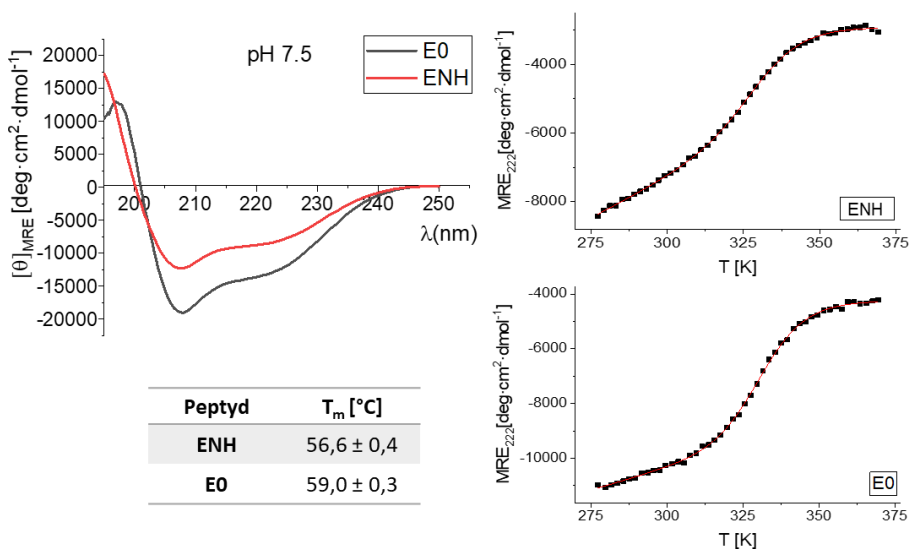
**Tabela 4.** Sekwencje zaprojektowanych miniałek **E0–E4** oraz ich porównanie z oryginalną sekwencją minibiałka **1ENH**. Pogrubioną, czerwoną czcionką zostały zaznaczone zmodyfikowane reszty przeznaczone do oddziaływania z PD-L1, kolorem zielonym zostały wyróżnione mutacje wspólne dla wszystkich inhibitorów.

Peptyd	Sekwencja											
	1	10	20	30	40	46						
<b>1ENH</b>	RPRT	AFSSE	QLARL	KREFN	ENRYL	TERRR	QQLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	RAKI
<b>E0</b>		AFSSE	QLARL	KREFN	ENRYL	TERRR	QQLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	
<b>E1</b>		AFSSE	QL <b>KL</b>	<b>KL</b> FN	<b>D</b> RYL	TE <b>W</b> R	<b>Q</b> LSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	
<b>E2</b>		AFSSE	QL <b>KL</b>	<b>KL</b> FN	<b>D</b> RYL	TE <b>W</b> R	<b>Q</b> LSS	<b>A</b> LGLN	EAQIK	IWFQN	K	
<b>E3</b>		AFSSE	QL <b>RL</b>	<b>KI</b> FN	<b>E</b> RYL	TE <b>W</b> R	<b>Q</b> LSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	
<b>E4</b>		AFSSE	QL <b>KL</b>	<b>KI</b> FN	<b>D</b> RYL	TE <b>H</b> R	<b>Q</b> LSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	

### 3.2.2.1.2. Analiza strukturalna

Widma dichroizmu kołowego uzyskane dla minibiałka ENH o pełnej długości (ENH) oraz jego wersji skróconej (E0) wykazują obecność minimów przy długościach fal 208 nm oraz 222 nm, co jest charakterystyczne dla występowania  $\alpha$ -helis (Rysunek 31). Widmo CD dla E0 wykazuje większą intensywność eliptyczności molowej, co wskazuje na większą zawartość helikalnych struktur drugorzędowych w tym minibiałku. Oznacza to, że fragmenty sekwencji usunięte z ENH nie przyjmowały struktury  $\alpha$ -helikalnej.

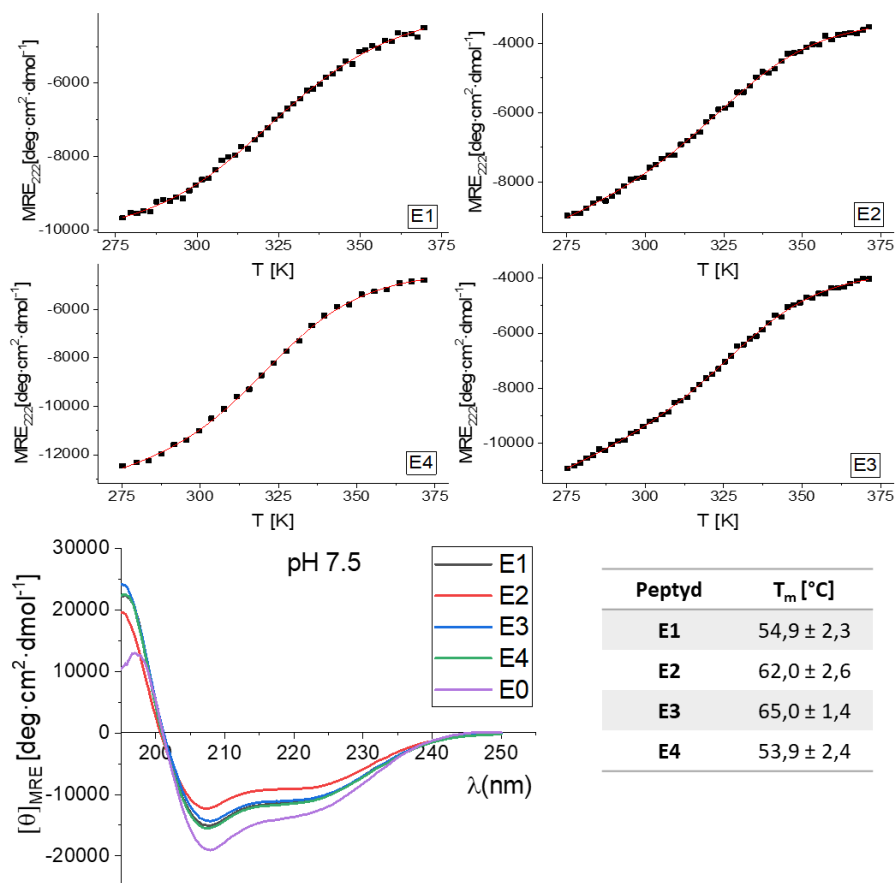
Krzywe denaturacji termicznej wskazują na zbliżone wartości temperatury rozkładowania ( $T_m$ ) obu minibiałek wynoszące 56,6°C dla ENH i 59,0°C dla E0 (Rysunek 31). Wyniki te sugerują, że nie zachodziły znaczące zmiany konformacyjne w strukturze minibiałka po skróceniu jego sekwencji. Dlatego też, inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1 zostały opracowane na bazie minibiałka ENH o skróconej sekwencji.



**Rysunek 31.** Widma CD, krzywe denaturacji termicznej oraz wyznaczone temperatury rozkładowania ( $T_m$ ) dla minibiałka ENH oraz wersji skróconej E0. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE).

Wyniki otrzymane dla inhibitorów nie wskazują na istotne zmiany w konformacji (**Rysunek 32**). Obecność minimów przy długościach fal 208 nm i 222 nm wskazuje, że struktury tych peptydów zawierają elementy  $\alpha$ -helikalne, co jest zgodne z założeniami. Krzywe denaturacji termicznej dla inhibitorów pokazują, że proces rozfałdowywania minibiałek zaczyna się przy niższych temperaturach w porównaniu do oryginalnego (**ENH**) oraz skróconego (**E0**) minibiałka. Niemniej jednak, temperatury rozfałdowywania, w zakresie 53–65°C, określone dla inhibitorów potwierdzają wysoką stabilność konformacyjną tych peptydów.

Podczas pomiarów temperaturowych dichroizmu kołowego zaobserwowano wytrącanie peptydów **E2** i **E3**, które obserwowano po wyjęciu kuwety pomiarowej z aparatu po zakończeniu pomiaru. To zjawisko może sugerować tendencję tych peptydów do agregacji w wyższych temperaturach lub do wytrącania się podczas obniżania temperatury kuwety po zakończonym pomiarze, co z kolei może wynikać z niepełnego lub nieprawidłowego procesu renaturacji minibiałka. Wytrącania nie zaobserwowano w przypadku peptydów **E0**, **E1** i **E4**.



**Rysunek 32.** Widma CD, krzywe denaturacji termicznej oraz wyznaczone temperatury rozkładowywania ( $T_m$ ) dla inhibitorów **E1–E4**. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE).

### 3.2.2.1.3. Aktywność biologiczna

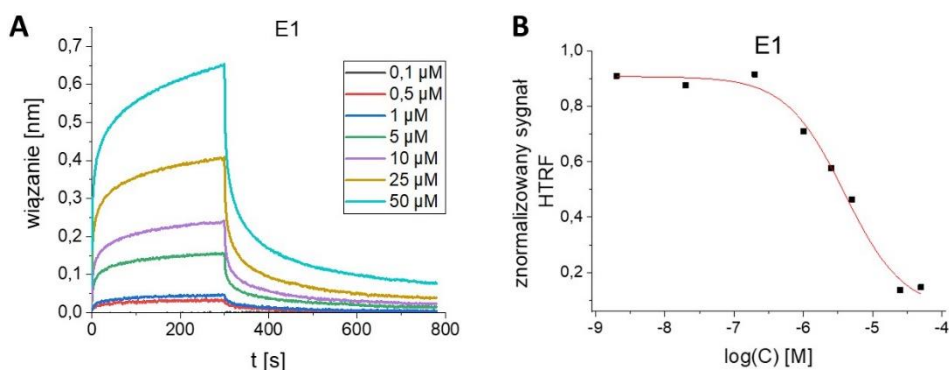
Dla otrzymanych peptydów przeprowadzono analizę kinetyki oddziaływania z PD-L1 z wykorzystaniem BLI w celu wyznaczenia stałych dysocjacji ( $K_D$ ). Wszystkie cztery zsyntetyzowane inhibitory wykazywały interakcje z celem molekularnym, charakteryzowane wartościami  $K_D$  w zakresie od 11  $\mu\text{M}$  do 27  $\mu\text{M}$ . Natomiast, w przypadku minibiałka **E0**, nie zaobserwowano żadnego wiązania (**Tabela 5, Rysunek 33**).

W celu potwierdzenia aktywności hamującej otrzymanych minibiałek wykorzystano metodę opartą na HTRF. Otrzymane wartości ilości niezdysoncowanego kompleksu wynoszące od 55% do 77% dla stężenia inhibitorów wynoszącego 5  $\mu\text{M}$  potwierdziły zdolność badanych inhibitorów do hamowania oddziaływania PD-1/PD-L1 (**Tabela 5, Rysunek 33**).

Otrzymane wyniki wskazują na wysoką skuteczność wprowadzonych do nieaktywnego rusztowania mutacji.

**Tabela 5.** Wartości stałej dysocjacji ( $K_D$ ) otrzymane z wykorzystaniem BLI oraz ilości niezdysoncowanego kompleksu i wartości połowy maksymalnego stężenia hamującego ( $IC_{50}$ ) zmierzone testami HTRF dla minibiałek **E0–E4**. Wartości  $K_D$  zostały uzyskane z pomiarów przy stężeniach: 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ . Pomiary HTRF dla **E0** nie zostały przeprowadzone ze względu na brak aktywności w testach BLI. Pomiary mające na celu otrzymanie wartości  $IC_{50}$  przeprowadzono wyłącznie dla peptydu **E1** przy stężeniach: 0,02, 0,02, 0,2, 1, 2,5, 5, 25, 50  $\mu\text{M}$ , dla pozostałych wartości  $IC_{50}$  nie zostały zmierzone

Peptyd	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	ilość niezdysoncowanego	
		kompleksu [%]	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
		[i] = 5 $\mu\text{M}$	
<b>E0</b>	brak aktywności	-	-
<b>E1</b>	26,8 $\pm$ 0,3	55,8 $\pm$ 6,2	3,9 $\pm$ 1,0
<b>E2</b>	11,0 $\pm$ 0,1	77,5 $\pm$ 4,6	-
<b>E3</b>	24,1 $\pm$ 0,2	64,7 $\pm$ 5,7	-
<b>E4</b>	17,7 $\pm$ 0,2	63,0 $\pm$ 5,1	-



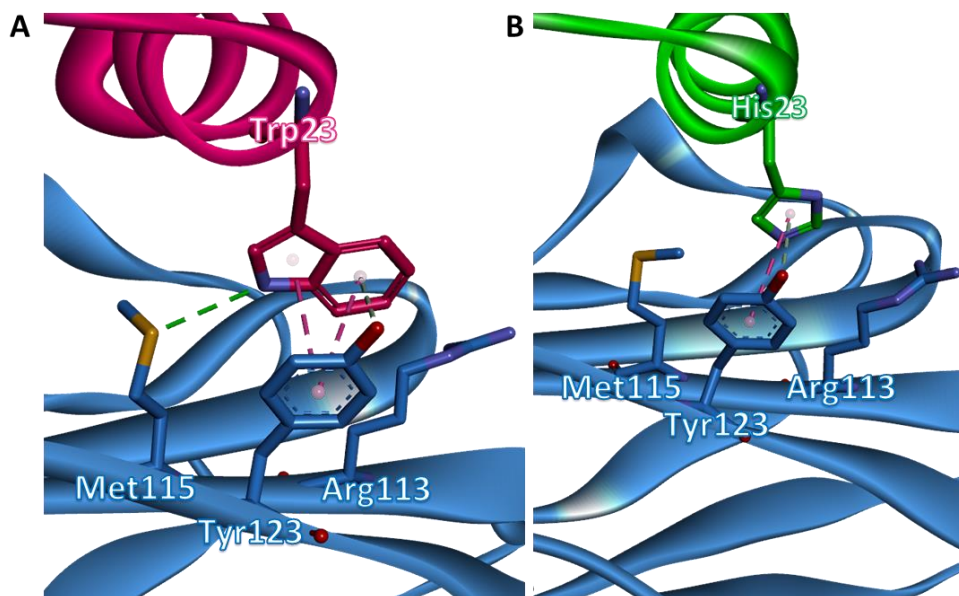
**Rysunek 33. (A) Wyniki BLI (B) i HTRF dla E1.**

Najwyższe powinowactwo do celu molekularnego wykazywał inhibitor **E2**, którego wartość  $K_D$  wynosi 11  $\mu\text{M}$ . Niemniej jednak, jego aktywność hamująca oddziaływanie kompleksu PD-1/PD-L1 jest najniższa, a ilość niezdisocjowanego kompleksu wynosi 77%. Podobnie, peptyd **E1**, który wykazuje najwyższą aktywność hamującą (z ilością niezdisocjowanego kompleksu wynoszącą 56%), ma najwyższą wartość  $K_D$  wynoszącą 27  $\mu\text{M}$ . Wartości te są jednak bardzo zbliżone, co sugeruje, że wszystkie inhibitory w tej grupie wykazują aktywność na podobnym poziomie.

Kolejnym krokiem było zoptymalizowanie sekwencji najlepszego z otrzymanych inhibitorów w celu zwiększenia jego aktywności. Wybór tego konkretnego inhibitora został podyktowany głównie kryteriami stabilności i rozpuszczalności ze względu na podobną aktywność wszystkich peptydów. W związku z tym peptydy **E2** i **E3** zostały odrzucone z powodu ich tendencji do agregacji podczas pomiarów temperaturowego CD. Pozostałe dwa inhibitory, **E1** i **E4**, różnią się od siebie tylko jednym aminokwasem w pozycji 23 (**Tabela 4**).

Minibiałko **E1** w tej pozycji zawiera resztę tryptofanu, podczas gdy **E4** ma mniejszą resztę aromatyczną – histydynę. Te reszty mają za zadanie zapewnić oddziaływanie w obrębie pierwszej hydrofobowej kieszeni na powierzchni PD-L1, która w przypadku inhibitorów makrocyclicznych jest wypełniona resztą tryptofanu. Dodatkowo, przeprowadzono analizę możliwości oddziaływania obu tych reszt aminokwasowych w modelu kompleksów inhibitor/PD-L1 (**Rysunek**

34). Analiza ta wykazała, że prawdopodobnie tryptofan w pozycji 23 jest bardziej korzystny dla hamowania oddziaływania PD-1/PD-L1. Dlatego przeprowadzono pomiar wartości  $IC_{50}$  dla peptydu **E1** przy użyciu metody HTRF przy następujących stężeniach inhibitora: 0,02, 0,02, 0,2, 1, 2,5, 5, 25, 50  $\mu\text{M}$ . Otrzymana wartość  $IC_{50}$  wynosiła 3,9  $\mu\text{M}$ , co potwierdziło, że peptyd ten jest idealnym kandydatem do dalszych optymalizacji.



**Rysunek 34.** Wymodelowana struktura kompleksów (A) **E1**/PD-L1 i (B) **E4**/PD-L1 z zaznaczoną resztą w pozycji 23 inhibitora z jej potencjalnymi oddziaływaniami na powierzchni celu molekularnego. PD-L1 oznaczone zostało kolorem niebieskim, natomiast **E1** — różowym, a **E4** — zielonym.

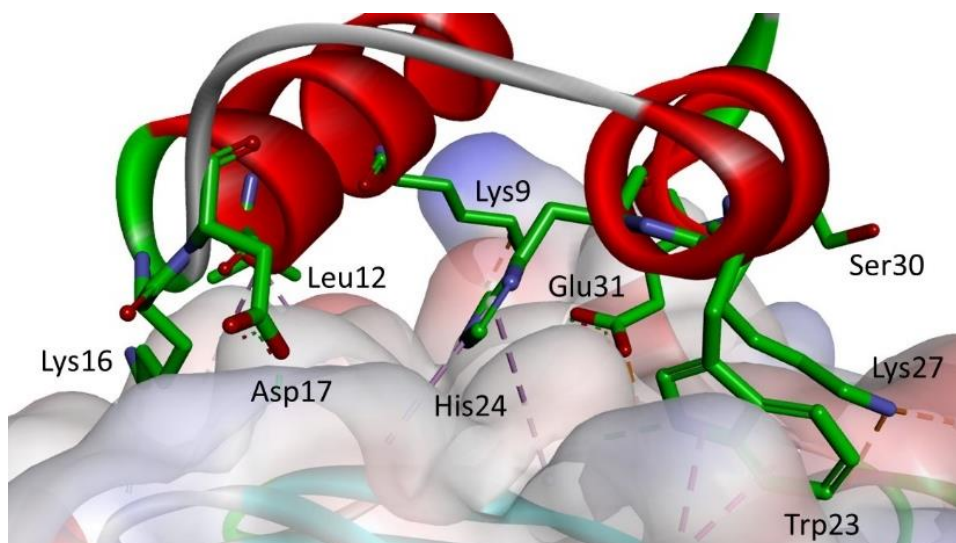


### 3.2.2.2. Optymalizacja w celu zwiększenia aktywności hamującej

#### 3.2.2.2.1. Projektowanie

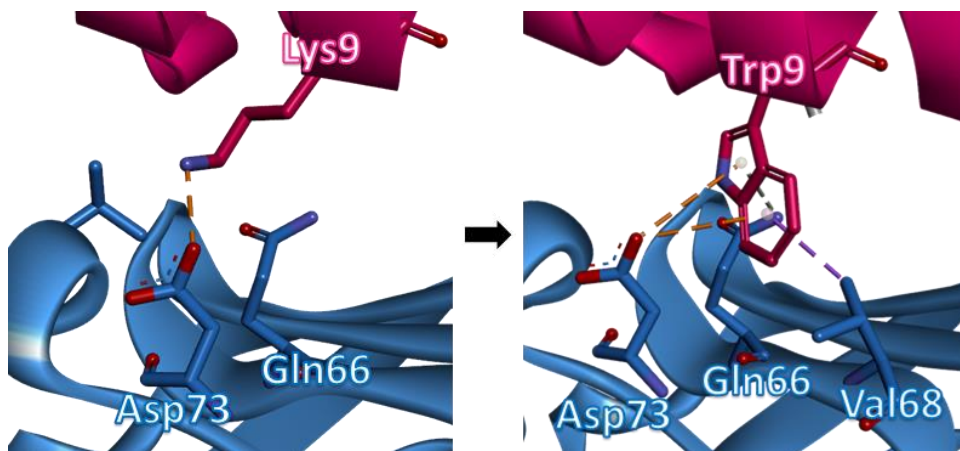
Optymalizacja w celu zwiększenia aktywności hamującej polegała na projektowaniu nowych sekwencji opartych na strukturze **E1** poprzez wprowadzenie pojedynczych mutacji na powierzchni przeznaczony do oddziaływania z PD-L1 oraz analizie wpływu tej substytucji na aktywność i parametry strukturalne.

W pierwszym kroku jako potencjalne miejsca mutacji w obrębie **E1** wybrano Lys9, Leu12, Lys16, Asp17, Trp23, His24, Lys27, Ser30 i Glu31 (**Rysunek 35**). Następnie przeprowadzono analizę każdej pozycji, która była połączona z analizą oddziaływań obserwowanych w opublikowanych kompleksach PD-L1 z naturalnym partnerem wiązania PD-1,<sup>35</sup> przeciwciałami takimi jak atezolizumabem,<sup>63</sup> avelumabem<sup>61</sup> i durvalumabem<sup>62</sup> oraz inhibitorami makrocyclicznymi jak BMS-57, BMS-71<sup>79</sup> i pAC65.



**Rysunek 35.** Wymodelowana struktura kompleksu **E1/PD-L1**. Kolorem zielonym zaznaczono reszty inhibitora wybrane do dalszych modyfikacji w celu zwiększenia aktywności.

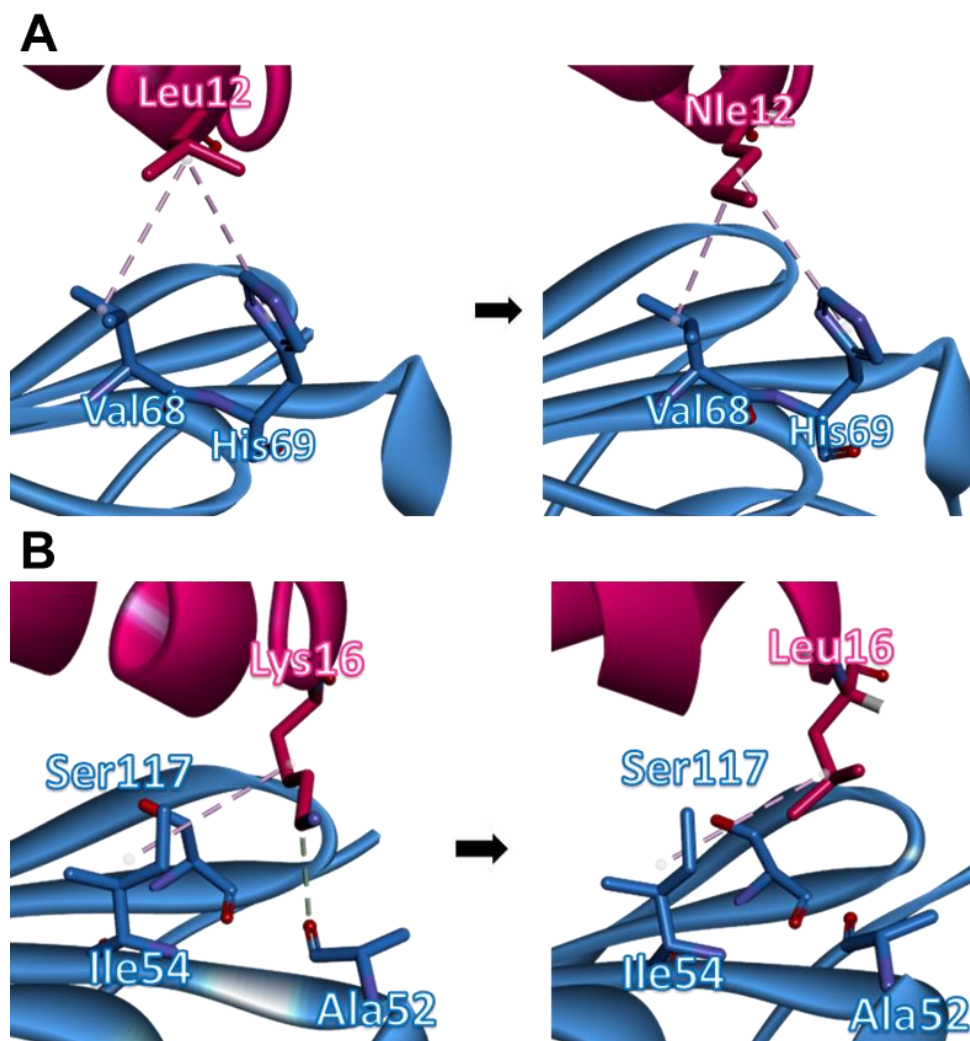
Pierwsza wybrana reszta do substytucji, Lys9, tworzy w modelu strukturalnym interakcje typu mostka solnego z  $_{PD-L1}Asp73$  (**Rysunek 36**). Oddziaływanie z tą resztą występuje jedynie w przypadku kompleksów PD-L1 z avelumabem, BMS-57 oraz pAC65. Nie jest obecne w kompleksie z naturalnym partnerem wiązania, jednakże może wzmacniać oddziaływanie z inhibitorem. W każdym z tych trzech przypadków  $_{PD-L1}Asp73$  tworzy wiązania wodorowe z odpowiednio avelumabSer31,  $_{57}His5$  lub  $_{65}Dap5$ . Jednak ze względu na obecność w tym miejscu niewielkiego wgłębienia i duże możliwości oddziaływań, zdecydowano się wprowadzić w tej pozycji resztę tryptofanu. Wprowadzenie reszty tryptofanu umożliwia szereg oddziaływań takich jak oddziaływania typu  $\pi$ -anion z  $_{PD-L1}Asp73$ ,  $\pi$ - $\sigma$  z  $_{PD-L1}Val68$  oraz wiązanie wodorowe z  $_{PD-L1}Gln66$ .



**Rysunek 36.** Proponowana mutacja w obrębie reszty 9 inhibitora. PD-L1 zostało oznaczone kolorem niebieskim, natomiast inhibitor — różowym.

Następna wybrana do substytucji reszta, Leu12, zlokalizowana jest w drugiej, hydrofobowej kieszeni, co umożliwia jej tworzenie oddziaływań hydrofobowych z  $_{PD-L1}Val68$  oraz  $_{PD-L1}His69$  (**Rysunek 37**). Oddziaływania z tymi resztami nie występują w przypadku PD-1 oraz przeciwciał, natomiast są obecne w przypadku inhibitorów makrocyklicznych. W przypadku BMS-56 oraz pAC65,  $_{PD-L1}Val68$  tworzy oddziaływania hydrofobowe z resztą proliny inhibitora. Ten rodzaj substytucji został odrzucony podczas projektowania ze względu na charakter reszty proliny, która promuje powstawanie pętli, a Leu12 znajduje się w obrębie

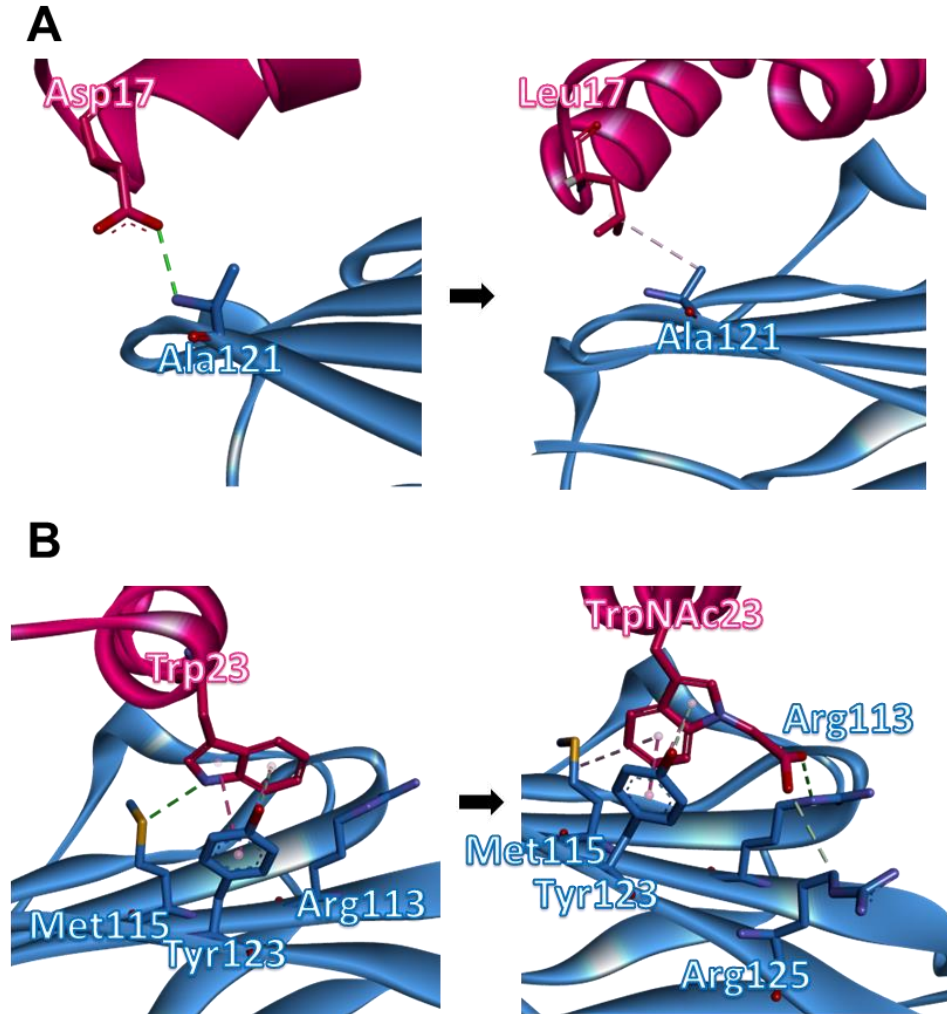
helisy. W przypadku BMS-71 interakcje z  $_{PD-L1}Val68$  tworzy reszta norleucyny. Norleucyna wydaje się być korzystna również w przypadku inhibitorów na bazie ENH, ze względu na jej hydrofobowość oraz długość, która pozwala na wypełnienie objętości pomiędzy inhibitorem, a PD-L1 (**Rysunek 37**).



**Rysunek 37.** Proponowana mutacja w obrębie reszty 12 (**A**) i 16 (**B**) inhibitora. PD-L1 zostało oznaczone kolorem niebieskim, natomiast inhibitor — różowym.

Reszta Lys16 może tworzyć wiązanie wodorowe z grupą aminową  $_{PD-L1}Ala52$  oraz oddziaływanie hydrofobowe z  $_{PD-L1}Ala52$ ,  $_{PD-L1}Ile54$  i  $_{PD-L1}Ser117$  (**Rysunek 37**). Reszta  $_{PD-L1}Ala52$  nie jest zaangażowana w oddziaływanie w żadnym z analizowanych kompleksów z PD-L1. Oddziaływanie z  $_{PD-L1}Ser117$

występuje jedynie w przypadku kompleksu z PD-1 i avelumabem. W kompleksie z PD-1 oddziaływanie jest zapewnione przez resztę leucyny, dlatego też wybrano tę resztę do mutacji w pozycji 16 inhibitora.



**Rysunek 38.** Proponowana mutacja w obrębie reszty 17 (A) i 23 (B) inhibitora. PD-L1 zostało oznaczone kolorem niebieskim, natomiast inhibitor — różowym

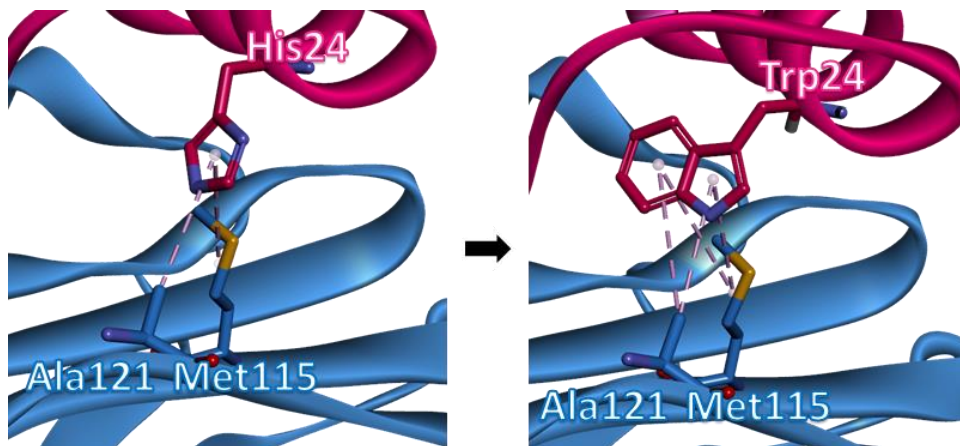
Kolejna reszta, Asp17, zgodnie z modelem strukturalnym może tworzyć wiązania wodorowe z amidem łańcucha polipeptydowego  $_{PD-L1}Ala121$  (Rysunek 38). Hydrofobowe oddziaływania z tą resztą występują w przypadku wszystkich kompleksów z PD-L1, z wyjątkiem pAC65. Dodatkowo reszta ta znajduje się w obrębie pierwszej hydrofobowej kieszeni, dlatego zdecydowane

się na zamianę reszty Asp17 na resztę leucyny. Taka substytucja może umożliwić hydrofobowe oddziaływania z  $_{PD-L1}Ala121$ , na wzór tych, które występuje w przypadku pozostałych inhibitorów i PD-1.

Następnie, reszta Trp23, która znajduje się w obrębie pierwszej hydrofobowej kieszeni, tworząc w jej obrębie liczne hydrofobowe oddziaływania, została zamieniona na resztą modyfikowanego tryptofanu, która występuje w tym miejscu w kompleksie **pAC65/PD-L1**. Obecność dodatkowej grupy karboksylowej w TrpNAc pozwala na tworzenie dodatkowych oddziaływań polarnych z  $_{PD-L1}Arg113$  i  $_{PD-L1}Arg125$  (**Rysunek 38**).

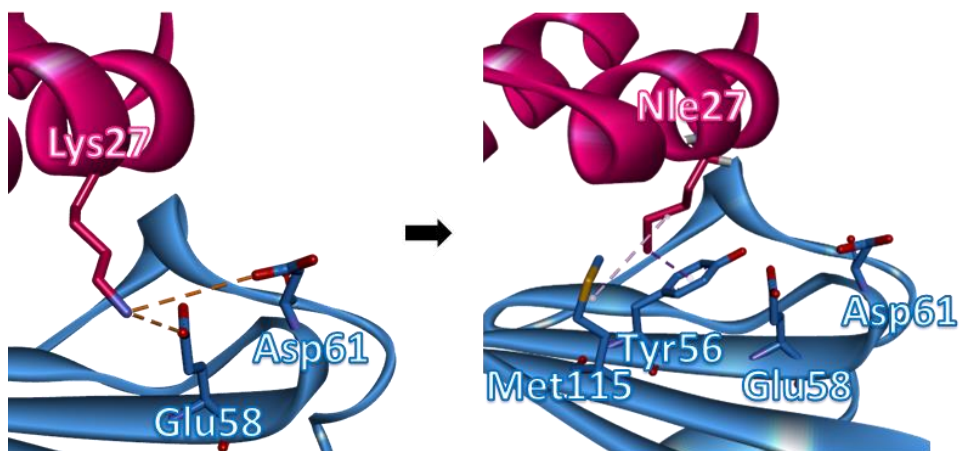
Kolejną resztą, His24, również wypełnia pierwszą hydrofobową kieszeń, oddziałując z  $_{PD-L1}Met115$  oraz  $_{PD-L1}Ala121$ . Resztę tą zamieniono na większą, niepolarną resztę tryptofanu, co umożliwi wypełnienie hydrofobowej wnęki w większym stopniu (**Rysunek 39**).

Następnie, zaproponowano zamianę Lys27, która tworzyła w obszarze oddziaływań polarnych mostki solne z  $_{PD-L1}Glu58$  i  $_{PD-L1}Asp61$  na resztę norleucyny (**Rysunek 40**). Długa i niepolarna reszta miała za zadanie wypełnić pustą powierzchnię pomiędzy inhibitorem, a celem molekularnym w okolicach  $_{PD-L1}Tyr56$  i  $_{PD-L1}Met115$ .



**Rysunek 39.** Proponowana mutacja w obrębie reszty 24 inhibitora. PD-L1 zostało oznaczone kolorem niebieskim, natomiast inhibitor — różowym



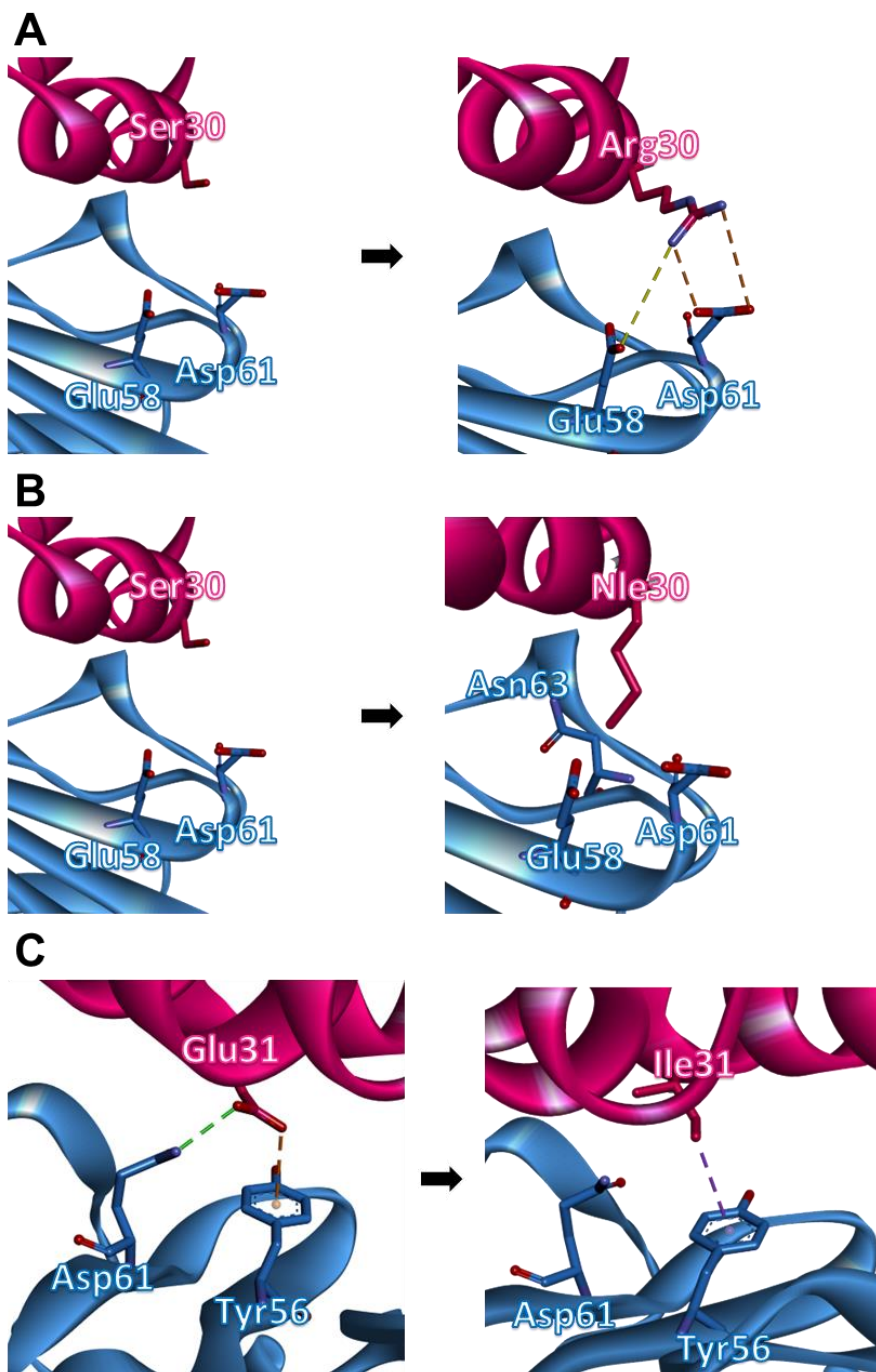


**Rysunek 40.** Proponowana mutacja w obrębie reszty 27 inhibitora. PD-L1 zostało oznaczone kolorem niebieskim, natomiast inhibitor — różowym

Reszta Ser30 nie wykazywała w modelu żadnych oddziaływań z powierzchnią celu molekularnego i znajdowała się w okolicy polarnego fragmentu PD-L1 zawierającego  $_{PD-L1}Glu58$  oraz  $_{PD-L1}Asp61$  (**Rysunek 41**). Ze względu na charakter tego obszaru oraz fakt, że  $_{PD-L1}Glu58$  tworzy oddziaływania polarne w przypadku kompleksów PD-L1 ze wszystkimi przeciwciałami oraz BMS-57 i BMS-71, a  $_{PD-L1}Asp61$  w przypadku avelumabu i pAC65, wprowadzono w tej pozycji resztę argininy zapewniająca oddziaływania polarne z tymi resztami.

Drugą propozycją mutacji Ser30 była zamiana tej reszty na norleucynę (**Rysunek 41**). Wprowadzenie długiej niepolarniej reszty miało na celu zapewnienie dodatkowej powierzchni oddziaływań hydrofobowych.

Ostatnia mutacja została wprowadzona w obrębie reszty Glu31 (**Rysunek 41**). Reszta ta tworzyła wiązanie wodorowe z  $_{PD-L1}Asp61$  oraz oddziaływanie typu  $\pi$ -anion z  $_{PD-L1}Tyr56$ . Ponieważ  $_{PD-L1}Tyr56$  znajduje się w obrębie hydrofobowej powierzchni oddziaływania PD-L1, a oddziaływania hydrofobowe z tą resztą występują w prawie wszystkich analizowanych kompleksach, zdecydowano się zastąpić Glu31 niepolarną resztą izoleucyny.



**Rysunek 41.** Proponowane mutacje w obrębie reszty 30 (A i B) oraz 31 (C) inhibitora. PD-L1 zostało oznaczone kolorem niebieskim, natomiast inhibitor — różowym.

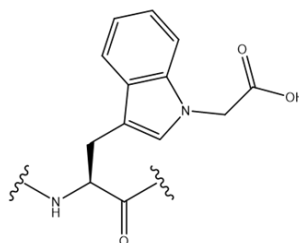
W ten sposób zaprojektowano 10 sekwencji (**E5–E14**), które zostały następnie zsyntetyzowane i przebadane (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Sekwencje minibialkowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Pogrubioną, czerwoną czcionką zostały zaznaczone mutacje wprowadzone do minibialka **E1** odróżniające jego sekwencję od minibialka wyjściowego **E0**. Kolorem zielonym zostały oznaczone nowe mutacje odróżniające sekwencje zaprojektowanych inhibitorów od sekwencji **E1**.

Peptyd	Sekwencja											
	1	10	20	30	40	46						
<b>E0</b>	AFSSE	QLARL	KREFN	ENRYL	TERRR	QQLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E1</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLWFN	<b>K</b> DRYL	TE <b>W</b> HR	<b>Q</b> KLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E5</b>	AFSSE	QL <b>K</b> WL	KLWFN	<b>K</b> DRYL	TE <b>W</b> HR	<b>Q</b> KLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E6</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLWFN	<b>L</b> DRYL	TE <b>W</b> HR	<b>Q</b> KLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E7</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLWFN	<b>K</b> LRYL	TE <b>W</b> HR	<b>Q</b> KLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E8</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLWFN	<b>K</b> DRYL	TE <b>W</b> WR	<b>Q</b> KLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E9</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLWFN	<b>K</b> DRYL	TE <b>W</b> HR	<b>Q</b> KLSS	<b>I</b> LGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E10</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLWFN	<b>K</b> DRYL	TE <b>Z</b> HR	<b>Q</b> KLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E11</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLWFN	<b>K</b> DRYL	TE <b>W</b> HR	<b>Q</b> BLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E12</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLWFN	<b>K</b> DRYL	TE <b>W</b> HR	<b>Q</b> KL <b>S</b> B	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E13</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLWFN	<b>K</b> DRYL	TE <b>W</b> HR	<b>Q</b> KL <b>S</b> R	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		
<b>E14</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	<b>K</b> W <b>F</b> FN	<b>K</b> DRYL	TE <b>W</b> HR	<b>Q</b> KLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K		

**B** = Norleucyna

**Z** =





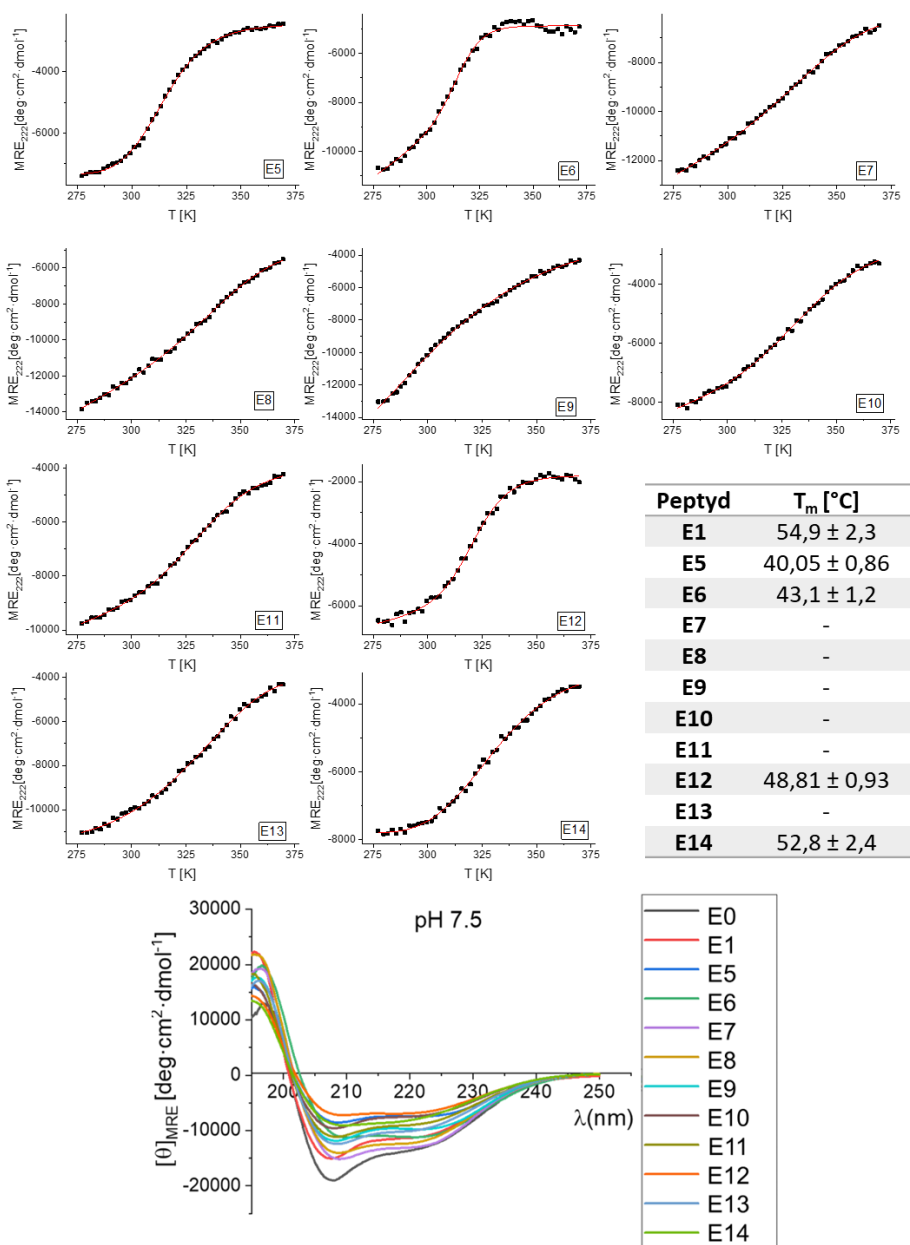
### 3.2.2.2.2. Analiza strukturalna

Wyniki otrzymane z zastosowaniem CD wskazują na brak istotnych zmian konformacyjnych w strukturach inhibitorów **E5–E14** po wprowadzeniu mutacji, co potwierdzają kształty widm oraz obecność minimów charakterystycznych dla  $\alpha$ -helis (**Rysunek 42**). Minibiałka **E6, E7, E8** i **E13** charakteryzują się wyższą eliptycznością w obrębie minimów, niż pozostałe inhibitory z tej grupy co wskazuje na lepiej zdefiniowane fragmenty helikalne w strukturze tych inhibitorów.

Krzywe denaturacji termicznej (**Rysunek 42**) otrzymane dla inhibitorów **E5–E14** wskazują na rozpoczęcie procesu rozfałdowywania części otrzymanych minibiałek (**E7–E11, E13**) w temperaturach zbliżonych lub niższych niż w przypadku peptydu wyjściowego (**E1**). Liniowy kształt krzywych denaturacji termicznej wymienionych peptydów świadczy o destabilizacji struktury na skutek wprowadzonych mutacji oraz uniemożliwia wyznaczenie wiarygodnych wartości temperatur topnienia.

Przeciwnie, w przypadku minibiałek **E5, E6, E12** i **E14** otrzymane wykresy wykazują sigmoidalny kształt z wyraźnie widocznym przejściem z formy sfałdowanej do rozfałdowanej białka (**Rysunek 42**). Taki kształt krzywej denaturacji jest typowy dla kooperatywnie zwijających się białek i świadczy to o większej stabilności peptydów drugiej grupy. Otrzymane w tej grupie wartości  $T_m$  oraz kształt krzywej denaturacji są zbliżone do wyników otrzymanych dla peptydu wyjściowego (**E1**) co świadczy o zachowaniu założonej konformacji minibiałek po wprowadzeniu mutacji.

Wszystkie zsyntetyzowane inhibitory wykazywały tendencję do wytrącania podczas pomiarów temperaturowych dichroizmu kołowego.



**Rysunek 42.** Widma CD, krzywe denaturacji termicznej oraz wyznaczone temperatury rozfałdowywania ( $T_m$ ) dla inhibitorów. Dodatkowo przedstawiono widma CD peptydów **E0** i **E1**, na podstawie których zaprojektowano sekwencje **E5–E14**. Wartość  $T_m$  dla **E7–E11** oraz **E13** nie została wyznaczona ze względu na brak sigmoidalnego kształtu krzywej denaturacji, a tym samym brak możliwości dopasowania wyników do modelu. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE).

### 3.2.2.2.3. Aktywność biologiczna

Peptydy, których krzywe denaturacji termicznej nie wykazywały sigmoidalnego kształtu (**E7–E11** i **E13**), co wskazywało na brak kooperatywnego zwijania, nie zostały poddane analizie pod kątem aktywności biologicznej.

Analiza kinetyki oddziaływania z PD-L1 z wykorzystaniem BLI pozwoliła na otrzymanie wartości  $K_D$  dla części zsyntetyzowanych peptydów. Dla inhibitorów **E5** i **E14** otrzymano wartości niższe niż dla struktury wyjściowej **E1**, a więc wykazują one wyższe powinowactwo do PD-L1 (**Tabela 7**).

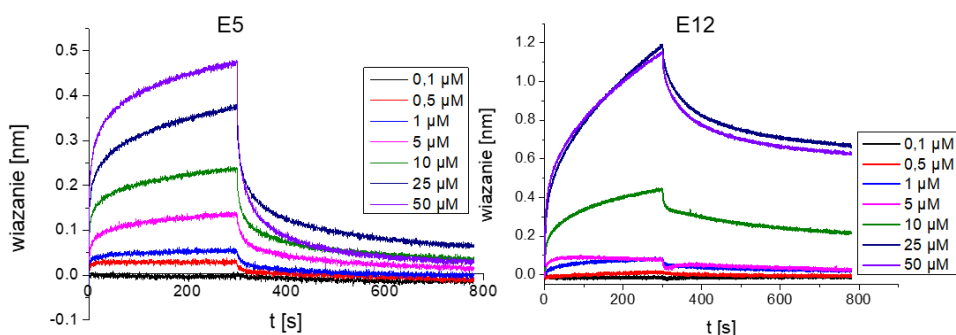
Wyniki HTRF potwierdziły aktywność hamującą względem oddziaływania PD-1/PD-L1 dla wszystkich przebadanych inhibitorów. W pomiarze aktywności hamującej wartości ilości niezdysoncjowanego kompleksu lepsze niż dla **E1** otrzymano dla peptydu **E5** (**Tabela 7**).

Brak korelacji między wynikami z BLI oraz HTRF w przypadku **E14**, gdzie  $K_D$  nowo otrzymanego inhibitora jest niższe niż peptydu startowego (**E1**), a aktywność hamująca mniejsza, może mieć związek z tendencją tego peptydu do wytrącania w buforze do pomiarów HTRF.

Peptydy **E6** i **E12** wykazywały najprawdopodobniej tendencję do agregacji na powierzchni sensora podczas pomiarów z wykorzystaniem BLI. Tendencję do agregacji peptydów na powierzchni sensora podczas pomiarów BLI można wnioskować z kształtu krzywej asocjacji do powierzchni sensora. Dla związków, które nie mają tendencji do agregacji takich jak **E5** krzywa asocjacji osiąga plateau, zaś dla związków z tendencją do agregacji takich jak **E12** wartość sygnału krzywej asocjacji rośnie wraz z czasem (**Rysunek 43**).

**Tabela 7.** Wartości stałej dysocjacji ( $K_D$ ) otrzymane z wykorzystaniem BLI oraz ilość niezdysojowanego kompleksu i wartości połowy maksymalnego stężenia hamującego ( $IC_{50}$ ) zmierzone testem HTRF dla inhibitorów. Wartości  $K_D$  zostały uzyskane z pomiarów przy stężeniach: 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50  $\mu M$ . „Agregacja” oznacza tendencję do agregacji danego peptydu w buforze do pomiarów BLI.

Peptyd	$K_D$ [ $\mu M$ ]	ilość niezdysojowanego kompleksu
		[%] [i] = 5 $\mu M$
<b>E1</b>	26,8 $\pm$ 0,3	55,8 $\pm$ 6,2
<b>E5</b>	14,3 $\pm$ 0,2	39,8 $\pm$ 1,8
<b>E6</b>	agregacja	77,9 $\pm$ 3,9
<b>E12</b>	agregacja	64,9 $\pm$ 7,6
<b>E14</b>	20,8 $\pm$ 0,2	75,0 $\pm$ 2,4



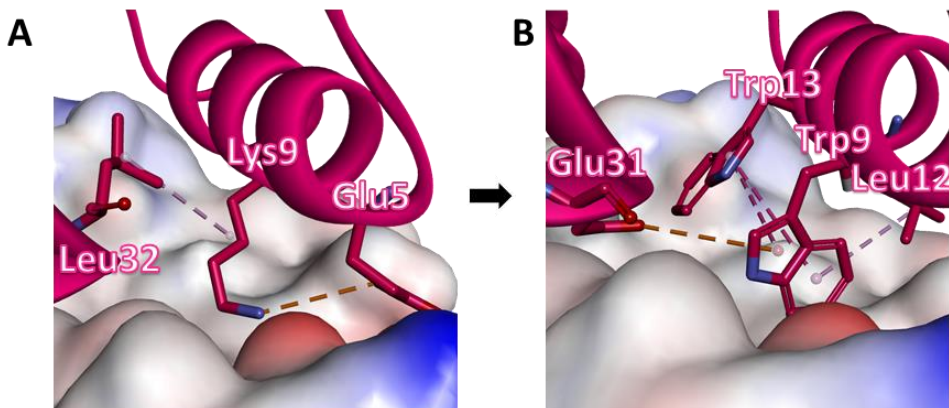
**Rysunek 43.** Wyniki BLI dla inhibitorów **E5** oraz **E12**.

Następnie, inhibitor **E5** został wybrany do przebadania w testach blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach. Niestety, problemy z rozpuszczalnością peptydu w medium komórkowym przeznaczonym do eksperymentu uniemożliwiły przeprowadzenia testów.

#### 3.2.2.2.4. Wnioski

Wyniki otrzymane przy użyciu CD dla inhibitorów **E5–E14** wskazują, że peptydy **E5**, **E6**, **E12** i **E14** wykazują najkorzystniejsze cechy strukturalne. Z kolei wyniki otrzymane za pomocą BLI i HTRF wskazują, że peptyd **E5** wykazuje najwyższe powinowactwo do PD-L1 oraz zdolność do hamowania oddziaływania między PD-1 a PD-L1.

Inhibitor **E5** wykazuje zarówno korzystne cechy strukturalne jak i w kontekście aktywności. Jego krzywa denaturacji sugeruje kooperatywne zwijanie białka, jednak jego wartość  $T_m$  wynosząca  $40,1^\circ\text{C}$  świadczy o stosunkowo niskiej stabilności konformacyjnej (**Rysunek 42**). Niemniej jednak, kształt krzywej denaturacji wskazuje, że proces rozfałdowywania zaczyna się w wyższych temperaturach niż w przypadku **E1** (**Rysunek 32**). Peptyd ten wykazuje wartość  $K_D$  równą  $14,3 \mu\text{M}$ , a ilość niezdysocjowanego kompleksu z HTRF wynosi 39,8%. Oznacza to, że zarówno jego powinowactwo do celu molekularnego, jak i aktywność hamująca, są wyższe niż w przypadku peptydu wyjściowego **E1** (**Tabela 7**). Na podstawie tych wyników oraz modelu strukturalnego można wnioskować, że zamiana Lys9 na resztę tryptofanu prowadzi zarówno do zwiększenia aktywności inhibitora poprzez zapewnienie większej ilości oddziaływań z celem molekularnym (**Rysunek 36**), jak i stabilizacji struktury poprzez zapewnienie oddziaływań w obrębie hydrofobowej powierzchni minibiałka, takich jak oddziaływania typu  $\pi$ -anion z Glu31,  $\pi$ -alkil z Leu12, a przede wszystkim oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$  z Trp13. (**Rysunek 44**). W związku z tym mutacja Trp9 została wprowadzona w inhibitorach podczas kolejnego procesu optymalizacji.



**Rysunek 44.** Wymodelowana struktura kompleksów **E1/PD-L1** (A) i **E5/PD-L1** (B) z zaznaczonymi oddziaływaniami stabilizującymi strukturę minibiałek przez resztę w pozycji 9.

Minibiałko **E6** wykazuje na sigmoidalny kształt krzywej denaturacji, co jest połączone z dużym nachyleniem tej krzywej i wskazuje na proces kooperatywnego zwijania (**Rysunek 42**). Jednak wartość  $T_m$  dla tego białka jest stosunkowo niska i wynosi  $43,1^\circ\text{C}$ . Dodatkowo, inhibitor **E6** wykazuje wysoką intensywność eliptyczności w obszarach minimów w porównaniu do innych minibiałek. Z związku z otrzymanymi wynikami podjęto decyzję o wprowadzeniu mutacji polegającej na zamianie Lys16 na resztę leucyny podczas kolejnej optymalizacji.

Wysoką wartością  $T_m$ , a więc wysoką stabilnością termiczną, charakteryzuje się inhibitor **E12**, dla którego  $T_m$  wynosi  $48,8^\circ\text{C}$  (**Rysunek 42**). Taki efekt zamiany Ser30 na resztę norleucyny może być spowodowany tworzeniem dodatkowych oddziaływań w obrębie inhibitora, na przykład oddziaływań hydrofobowych z Lys27. Mimo że wyniki z BLI wskazują na agregację tego peptydu w buforze do eksperymentu, zdecydowano się wprowadzić mutację Nle30 w nowych sekwencjach podczas kolejnej optymalizacji ze względu na korzystne cechy strukturalne **E12**.

Peptyd **E14**, podobnie jak peptyd wyjściowy **E1**, wykazuje wyższą temperaturę topnienia niż **E12** wynoszące odpowiednio  $48,8^\circ\text{C}$  dla **E12** i  $52,8^\circ\text{C}$  dla **E14**. Jednak kształt krzywych denaturacji **E1** i **E14** sugeruje, że proces rozfałdowywania się tych minibiałek rozpoczyna się w niższych temperaturach niż

w przypadku **E12** (**Rysunek 32 i 42**). Ponadto, wartość  $K_D$  oraz ilość niezdisocjowanego kompleksu wskazują, że peptyd **E14** wykazuje aktywność na poziomie podobnym do peptydu wyjściowego **E1** (**Tabela 7**). Substytucja obecna w peptydzie **E14**, czyli zamiana Leu12 na resztę norleucyny, nie została wprowadzona w żadnym z peptydów z nowej grupy inhibitorów podczas kolejnej optymalizacji.

Mutacje występujące w peptydach **E7** i **E9** prowadziły do spadku stabilności konformacyjnej, o czym świadczy liniowy kształt ich krzywych denaturacji termicznych (**Rysunek 42**). Należy jednak zauważyć, że analiza modelu kompleksu inhibitor/PD-L1 oraz kompleksów PD-L1 z innymi inhibitorami i naturalnym partnerem wiązania PD-1, wskazują na duży potencjał tych mutacji. Modyfikacja wprowadzona w inhibitorze **E7**, polegająca na zamianie Asp17 na resztę leucyny, może zapewniać hydrofobowe oddziaływania z  $_{PD-L1}Ala121$ . Z kolei, mutacja występująca w sekwencji peptydu **E9**, czyli zamiana Glu31 na resztę izoleucyny, zapewnia hydrofobowe oddziaływania z resztą  $_{PD-L1}Tyr56$  znajdującą się w obrębie jednej z hydrofobowej kieszeni. Taki rodzaj oddziaływań z  $_{PD-L1}Ala121$  oraz  $_{PD-L1}Tyr56$  występuje w przypadku oddziaływania PD-L1 z PD-1, atezolizumabem, avelumabem, durvalumabem, durvalumabem, BMS-200, BMS-202, BMS-57 oraz BMS-71. W związku z tym modyfikacje występujące w **E7** i **E9** zostały wprowadzone w kombinacji z innymi mutacjami w nowych sekwencjach podczas kolejnej rundy optymalizacji.

Mutacje wprowadzone w peptydach: **E8**, **E10**, **E11** i **E13** nie zostały wybrane do wprowadzenia podczas projektowania kolejnej grupy inhibitorów ze względu na brak kooperatywnego związania tych peptydów wykazany przez liniowy kształt krzywej denaturacji. Dodatkowo, analiza ich modeli strukturalnych połączona z analizą wyników uzyskanych poprzez pomiary z wykorzystaniem dichroizmu kołowego wskazują, że mutacje te mogą znacząco przyczyniać się do destabilizacji struktury trzeciorzędowej. Na podstawie tej analizy, mutacje wprowadzone w inhibitorach **E8**, **E10**, **E11** i **E13** zostały ocenione jako mniej korzystne niż mutacje wprowadzone w **E7** i **E9**.

### 3.2.2.3. Druga runda optymalizacji w celu zwiększenia aktywności hamującej

#### 3.2.2.3.1. Projektowanie

Druga runda optymalizacji w celu zwiększenia aktywności hamującej została przeprowadzona poprzez połączenie mutacji z poprzedniej grupy (**E5–E13**) najkorzystniejszych pod kątem stabilizacji struktury trzeciorzędowej oraz aktywności (**Tabela 8**). W ten sposób zaprojektowane zostało kolejne 5 sekwencji inhibitorów (**E15–E19**).

Minibiałko **E15** zostało zaprojektowane poprzez połączenie mutacji z peptydów **E5** i **E7**. Następnie postanowiono przeanalizować również wpływ połączenia mutacji **E7** i **E9** i w ten sposób zaprojektowano sekwencje inhibitora **E16**. Dodatkowo, zaproponowano również sekwencje posiadającą mutacje występujące w **E7** i **E9** w połączeniu z mutacją z minibiałka **E5** i w ten sposób zaprojektowano sekwencje **E18**. Ponadto, połączono mutacje występującą w **E5** z mutacjami stabilizującymi strukturę z **E12** (**E17**) i **E6** (**E19**).

**Tabela 8.** Sekwencje minibiałkowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Pogrubioną, czerwoną czcionką zostały zaznaczone mutacje wprowadzone do minibiałka **E1** odróżniające jego sekwencję od minibiałka wyjściowego **E0**. Kolorem zielonym zostały oznaczone nowe mutacje odróżniające sekwencje zaprojektowanych inhibitorów od sekwencji **E1**.

Peptyd	Sekwencja									
	1	10	20	30	40	46				
<b>E0</b>	AFSSE	QLARL	KREFN	ENRYL	TERRR	QQLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K
<b>E1</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>KDRYL</b>	TE <b>WHR</b>	<b>QKLSS</b>	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K
<b>E15</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	<b>QKLSS</b>	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K
<b>E16</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	<b>QKLSS</b>	<b>ILGLN</b>	EAQIK	IWFQN	K
<b>E17</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>KDRYL</b>	TE <b>WHR</b>	<b>QKLSB</b>	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K
<b>E18</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	<b>QKLSS</b>	<b>ILGLN</b>	EAQIK	IWFQN	K
<b>E19</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>LDRYL</b>	TE <b>WHR</b>	<b>QKLSS</b>	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K

**B** = Norleucyna



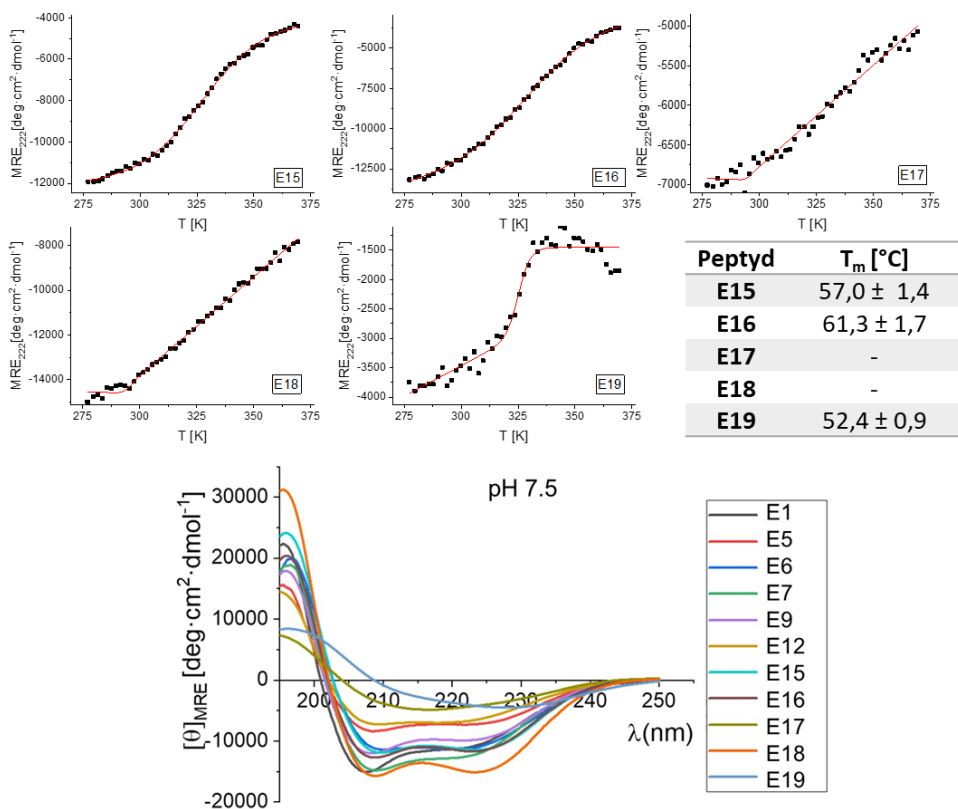
### 3.2.2.3.2. Analiza strukturalna

Analiza widm CD grupy inhibitorów **E15–E19** wskazuje na zachowanie oryginalnej struktury w przypadku minibiałek **E15**, **E16** i **E18**. Natomiast dla peptydów **E17** i **E19** zaobserwowano spadek intensywności eliptyczności, co może wskazywać na zmniejszenie stabilności konformacyjnej na skutek wprowadzonych mutacji (**Rysunek 45**). Dodatkowo peptydy **E15**, **E16** i **E18** wykazują większą intensywność eliptyczności niż peptydy wyjściowy **E5** co wskazuje na większy udział struktur helikalnych w strukturze minibiałka, a tym samym stabilizację struktury trzeciorzędowej.

Krzywe denaturacji termicznej uzyskane dla inhibitorów **E15**, **E16** i **E19** wykazują korzystne cechy takie jak sigmoidalny kształt krzywej oraz wartości  $T_m$  zbliżone do wartości otrzymanej dla peptydu **E1**. Natomiast wyniki otrzymane dla peptydów **E17** i **E18** wykazuje liniowy kształt co świadczy o destabilizacji trzeciorzędowej struktury tych minibiałek na skutek wprowadzonych mutacji i uniemożliwia wyznaczenie temperatury topnienia (**Rysunek 45**).

W związku z uzyskanymi wynikami, peptydy **E15** i **E16** zostały wybrane jako najkorzystniejsze pod kątem zachowania struktury wyjściowego inhibitora **E1**.

Podczas pomiarów temperaturowych dichroizmu kołowego obserwowano wytrącanie się wszystkich zsyntetyzowanych inhibitorów (**E15–E19**). Wytrącanie obserwowano w kuwecie pomiarowej po przeprowadzonym pomiarze, co sugeruje agregację po rozfałdowaniu się białka, podobnie jak w przypadku peptydów z poprzedniej grupy.



**Rysunek 45.** Widma CD, krzywe denaturacji termicznej oraz wyznaczone temperatury rozkładowywania ( $T_m$ ) dla inhibitorów. Dodatkowo przedstawiono widma CD peptydów **E1**, **E5**, **E6**, **E7** i **E9**, na podstawie których zaprojektowano sekwencje **E15–E19**. Wartość  $T_m$  dla **E17** i **E18** nie została wyznaczona ze względu na brak sigmoidalnego kształtu krzywej denaturacji i brak możliwości dopasowania wyników do modelu. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE).

### 3.2.2.3.3. Aktywność biologiczna

Pomiary z wykorzystaniem BLI oraz HTRF zostały przeprowadzone wyłącznie dla peptydów, których wyniki CD wskazywały na kooperatywny proces związania czyli dla **E15**, **E16** i **E19**.

Otrzymane z pomiarów BLI wartości  $K_D$  dla inhibitorów **E15** i **E16** są niższe niż dla struktury wyjściowej **E1**, co wskazuje na większe powinowactwo do PD-L1 (**Tabela 9**). Podobnie, wyniki HTRF potwierdziły aktywność hamującą obu inhibitorów względem oddziaływania PD-1/PD-L1. Dla peptydu **E19** nie wykazano aktywności hamującej, zaś testy z wykorzystaniem BLI wskazywały na agregację peptydu na powierzchni sensora.

Brak korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi przy pomocy BLI, a HTRF dla peptydów **E16** może wynikać z interakcji peptydu ze składnikami zestawu do HTRF co skutkuje zakłóceniem całego pomiaru.

Warto zauważyć, że wartość ilości niezdysojowanego kompleksu dla **E15** jest najniższa ze wszystkich wartości dotychczas otrzymanych w grupie inhibitorów opartych na strukturze domeny „engrailed” i wynosi 39,3% (**Tabela 9**).

**Tabela 9.** Wartości stałej dysocjacji ( $K_D$ ) otrzymane z wykorzystaniem BLI oraz ilość niezdysojowanego kompleksu i wartości połowy maksymalnego stężenia hamującego ( $IC_{50}$ ) zmierzone testem HTRF dla minibiałek. Wartości  $K_D$  zostały uzyskane z pomiarów przy stężeniach: 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50  $\mu M$ . „Agregacja” oznacza tendencję do agregacji danego peptydu w pomiarach BLI. Pomiary mające na celu otrzymanie wartości  $IC_{50}$  przeprowadzono wyłącznie dla peptydu **E15** przy stężeniach: 0,005, 0,05, 0,25, 0,5, 5, 7,15, 25, 50  $\mu M$ , dla pozostałych wartości  $IC_{50}$  nie zostały zmierzone.

Peptyd	$K_D$ [ $\mu M$ ]	ilość niezdysojowanego	
		kompleksu [%] [i] = 5 $\mu M$	$IC_{50}$ [ $\mu M$ ]
<b>E1</b>	26,8 $\pm$ 0,3	55,8 $\pm$ 6,2	3,9 $\pm$ 1,0
<b>E15</b>	22,7 $\pm$ 0,3	39,3 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 0,5
<b>E16</b>	1,10 $\pm$ 0,01	90,5 $\pm$ 3,1	-
<b>E19</b>	agregacja	107,9 $\pm$ 6,2	-

Peptyd **E15** został wybrany do przebadania w testach blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach. Niestety, podobnie jak w przypadku peptydu **E5**, inhibitor **E15** wykazywał niską rozpuszczalność w medium komórkowym i przeprowadzenie pomiarów nie było możliwe.

#### 3.2.2.3.4. Wnioski

Inhibitor **E16**, pomimo wysokiego powinowactwa do PD-L1, co potwierdza wartość  $K_D$  wynosząca 1,10  $\mu\text{M}$ , oraz korzystnych cech strukturalnych, wykazywał bardzo niską zdolność do hamowania oddziaływania między PD-1 a PD-L1. Ilość niezdysoncjowanego kompleksu przy stężeniu inhibitora równym 5  $\mu\text{M}$  wynosiła 90,5% (**Tabela 9**). Taki wynik może wynikać z niespecyficznych interakcji ze składnikami zestawu do HTRF lub niespecyficznego oddziaływania z PD-L1 w miejscach innych niż to, które jest przeznaczone do oddziaływania z PD-1. Z tego powodu inhibitor nie został uwzględniony w kolejnych etapach optymalizacji.

Peptydy **E17**, **E18** i **E19** zostały odrzucone ze względu na liniowy kształt krzywych denaturacji (**E17** i **E18**), tendencje do agregacji w buforze do pomiarów BLI (**E19**) i brak aktywności hamującej w HTRF (**E19**). Wszystkie te ograniczenia mogą wynikać z niskiej rozpuszczalności i skłonności do agregacji tych peptydów, co jest efektem zamiany reszt polarnych na hydrofobowe.

Peptyd **E15** wykazywał najniższą wartość ilości niezdysoncjowanego kompleksu ze wszystkich inhibitorów w tej grupie, która wynosiła 39,3% (**Tabela 7**). Jedynym inhibitorem o wartości zbliżonej był **E5** (39,8%) na bazie którego **E15** został zaprojektowany. Warto jednak zaznaczyć, że **E15** wykazuje wyższą stabilność termiczną niż **E5**, co objawia się wartością  $T_m$  równą 57°C, podczas gdy dla **E5** wynosi ona 40,1°C. Ze względu na te korzystne cechy i brak tendencji do agregacji w buforze do BLI, zdecydowano się wybrać **E15** do dalszych badań z wykorzystaniem HTRF, co pozwoliło uzyskać jego wartość  $IC_{50}$ , wynoszącą 3,1  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.2.4. Optymalizacja w celu zwiększenia rozpuszczalności

#### 3.2.2.4.1. Projektowanie pierwszej grupy

W związku z agregacją otrzymanych inhibitorów podczas pomiarów temperaturowych CD oraz w medium komórkowym przeznaczonym do testów blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach (**E5** i **E15**), dla najlepszego inhibitora (**E15**) przeprowadzono optymalizację w celu zwiększenia rozpuszczalności.

W pierwszej grupie (**E20–E23**) wprowadzono dwa rodzaje mutacji (**Tabela 10** i **11**). Pierwszy rodzaj mutacji polegał na substytucji reszt aminokwasowych w celu osiągnięcia wartości punktów izoelektrycznych (pI) minibiałek zbliżonych do tych, które występują w przypadku minibiałkowego inhibitora oddziaływania PD-1/PD-L1 MOPD-1 (PDB ID: 7RJF<sup>81</sup>), którego pI wynosi 8,30 (**E20**) lub PD-L1 (PDB ID: 4ZQK<sup>66</sup>), którego pI wynosi 7,12 (**E21**, **E23**).<sup>‡</sup> Drugi rodzaj mutacji polegał na zamianie reszt aminokwasowych w pozycjach, które zostały zidentyfikowane przez oprogramowanie The CamSol<sup>130</sup> jako potencjalnie zmniejszające rozpuszczalność cząsteczki, na reszty, które miały zwiększyć rozpuszczalności tego fragmentu (**E22**).

Druga grupa (**E24–E30**) została zaprojektowana poprzez wprowadzenie większej liczby polarnych reszt na powierzchni minibiałek (**Tabele 10** i **11**). W ramach pierwszej strategii (**E24–E27**), mutacje bazowały na liczbie grup bocznych aminokwasów o ładunku dodatnim lub ujemnym w sekwencji minibiałek: **E1** (**E24** i **E25**) oraz **E0** (**E26** i **E27**). Ponieważ minibiałka **E0** oraz **E1** charakteryzowały się zwiększoną rozpuszczalnością w porównaniu do **E15**. Peptydy **E24** i **E25** zawierały 10 reszt o ładunku dodatnim i 5 o ładunku ujemnym. Natomiast peptydy **E26** i **E27** miały 9 reszt o ładunku dodatnim i 6 o ładunku ujemnym. Druga strategia polegała na ogólnym zwiększeniu liczby reszt polarnych na powierzchni inhibitorów (**E28–E30**). W przypadku peptydu **E28**,

---

<sup>‡</sup> Wartości pI zostały obliczone na bazie sekwencji dostępnych w bazie RCSB PDB uzyskane za pomocą kalkulatora dostępnego na: <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>.

w jego sekwencji było 12 reszt o ładunku dodatnim i 7 o ładunku ujemnym, co stanowiło 41,3% reszt w sekwencji posiadających formalny ładunek w fizjologicznym pH. Inhibitor **E29** zawierał mniejszą ilość reszt posiadających ładunek niż **E28** tj. 11 o ładunku dodatnim i 5 o ładunku ujemnym, co odpowiadało 34,8% reszt w całej sekwencji, które posiadają ładunek. Ostatni peptyd z tej grupy, **E30**, posiadał 8 reszt o ładunku dodatnim i 10 o ładunku ujemnym, co stanowiło 39,1% reszt posiadających ładunek w jego sekwencji (**Tabela 10**).

Wszystkie mutacje zostały wprowadzone wyłącznie poza powierzchnią oddziaływania z PD-L1, która pozostała nienaruszona w celu utrzymania aktywności blokujących nowo zsyntetyzowanych inhibitorów (**Tabela 11, Rysunek 46**).

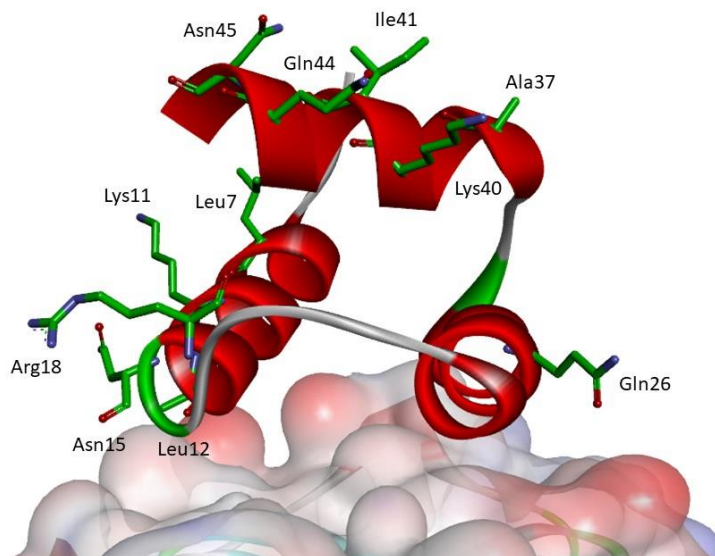
Warto zauważyć, że większość peptydów charakteryzowała się wartością pI powyżej 7, z wyjątkiem peptydu **E30**, dla którego pI wynosiło 5,11 (**Tabela 10**). Ponadto, w przypadku peptydów o najwyższym udziale procentowym reszt o ładunku w pH fizjologicznym, tj. **E28** i **E39**, oczekiwało się największej rozpuszczalności. Niemniej jednak, wprowadzenie dużej liczby mutacji mogło prowadzić do destabilizacji struktury trzeciorzędowej, dlatego zastosowano różne strategie projektowania.

**Tabela 10.** Podsumowanie procedury projektowania inhibitorów wraz z ich wartościami pI, liczbą reszt posiadających formalny ładunek w fizjologicznym pH – dodatni (+) oraz ujemny (-) oraz procentowym udziałem tych reszt w całej sekwencji aminokwasowej - %P. Wartości pI zostały uzyskane za pomocą kalkulatora dostępnego na: <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>, z uwzględnieniem obecności grupy amidowej na końcu karboksylowym.

Peptyd	Metoda projektowania	pI	(+)	(-)	%P
E0	struktura wyjściowa	10,89	9	6	32,6
E1	struktura wyjściowa	10,51	10	5	32,6
E15	struktura wyjściowa	10,64	9	4	28,3
E20	pI MOPD-1	9,38	7	6	28,3
E21	pI PD-L1	7,77	7	7	30,4
E22	The CamSol	10,38	10	5	32,6
E23	pI PD-L1	7,77	6	6	26,1
E24	liczba reszt polarnych E1	10,51	10	5	32,6
E25	liczba reszt polarnych E1	10,51	10	5	32,6
E26	liczba reszt polarnych E0	10,13	9	6	32,6
E27	liczba reszt polarnych E0	10,13	9	6	32,6
E28	zwiększenie liczby reszt polarnych	10,33	12	7	41,3
E29	zwiększenie liczby reszt polarnych	10,62	11	5	34,8
E30	zwiększenie liczby reszt polarnych	5,11	8	10	39,1

**Tabela 11.** Sekwencje minibiałkowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Pogrubioną, czerwoną czcionką zostały zaznaczone mutacje wprowadzone do minibiałka **E1** odróżniające jego sekwencję od minibiałka wyjściowego **E0**. Kolorem zielonym zostały oznaczone mutacje wprowadzone podczas optymalizacji w celu zwiększenia aktywności hamującej, kolorem niebieskim - mutacje wprowadzone w celu zwiększenia rozpuszczalności.

Peptyd	Sekwencja									
<b>E0</b>	AFSSE	QLARL	KREFN	ENRYL	TERRR	QQLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K
<b>E1</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>KDRYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K
<b>E15</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K
<b>E20</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	<b>ELW</b> FN	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	EAQ <b>IE</b>	IWFQN	K
<b>E21</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	<b>ELW</b> FN	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	EAQ <b>IE</b>	<b>EW</b> FQN	K
<b>E22</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	<b>KHW</b> FN	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	EAQIK	<b>EW</b> FQN	K
<b>E23</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	<b>ELW</b> FN	<b>KLGYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	EAQ <b>IE</b>	IWFQN	K
<b>E24</b>	AFSSE	Q <b>E</b> KWL	KLW <b>FN</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	<b>KKLSS</b>	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K
<b>E25</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	<b>ED</b> QIK	<b>KW</b> FQN	K
<b>E26</b>	AFSSE	Q <b>E</b> KWL	KLW <b>FE</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K
<b>E27</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	KLW <b>FN</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	<b>EE</b> QIK	<b>EW</b> FQN	K
<b>E28</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	KLW <b>FD</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	<b>KKLSS</b>	ELGLN	<b>EK</b> QIK	<b>EW</b> FDK	K
<b>E29</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	KLW <b>FD</b>	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	<b>KKLSS</b>	ELGLN	<b>EK</b> QIK	IWFQN	K
<b>E30</b>	AFSSE	Q <b>E</b> KWL	<b>ELW</b> FD	<b>KLRYL</b>	TE <b>WHR</b>	Q <b>KLSS</b>	ELGLN	<b>EE</b> QIK	<b>DW</b> FQD	K



**Rysunek 46.** Wymodelowana struktura kompleksu **E15/PD-L1**. Kolorem zielonym zaznaczono reszty aminokwasowe inhibitora wybrane do dalszych modyfikacji w celu zwiększenia rozpuszczalności



#### 3.2.2.4.2. Analiza strukturalna pierwszej grupy

Zgodnie z oczekiwaniami widma dichroizmu kołowego nowo otrzymanych peptydów wskazują na obecność w strukturze  $\alpha$ -helis, zaś wartości eliptyczności są zbliżone do wyników otrzymanych dla struktur startowych co wskazuje na brak znaczących zmian konformacyjnych po wprowadzeniu mutacji (**Rysunek 48**).

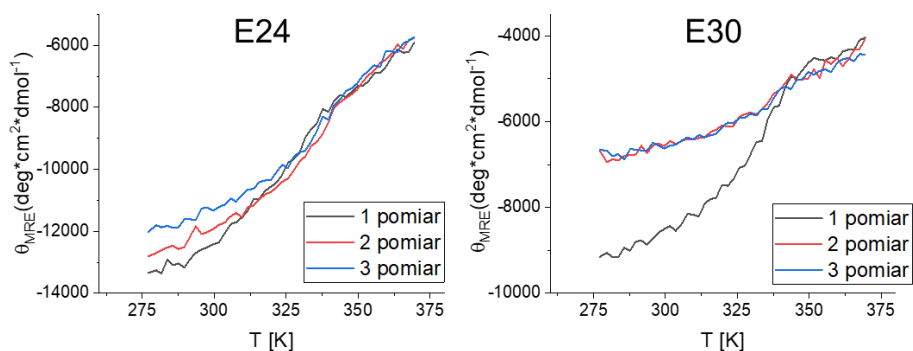
Minibiałka **E24** i **E30** charakteryzują się wyższą intensywnością eliptyczności w obrębie minimów przy długościach fal 208 i 222 nm, niż pozostałe inhibitory z tej grupy co wskazuje na lepiej zdefiniowane struktury helikalne w strukturze tych inhibitorów (**Rysunek 48**).

Podobnie jak w poprzedniej grupie, krzywe denaturacji termicznej (**Rysunek 48**) otrzymane dla nowo zsyntetyzowanych inhibitorów wskazywały, poprzez liniowy kształt krzywej denaturacji, na brak kooperatywnego zwijania oraz niższą stabilność konformacyjną części otrzymanych peptydów (**E21–E23**, **E25**, **E27–E30**). Przeciwnie, w przypadku minibiałek **E20**, **E24** i **E26**, otrzymane wykresy wykazują sigmoidalny kształt z większym nachyleniem krzywej podczas widocznego przejścia z formy sfałdowanej do rozfałdowanej białka. Taki kształt krzywej denaturacji jest typowy dla białek zwijających się kooperatywnie i świadczy to o większej stabilności peptydów drugiej grupy.

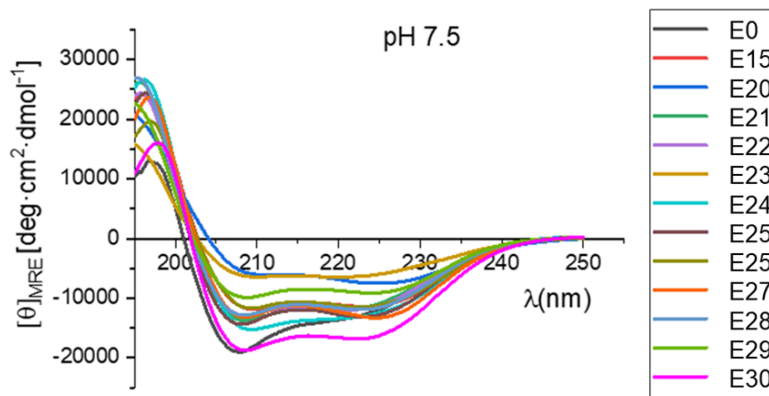
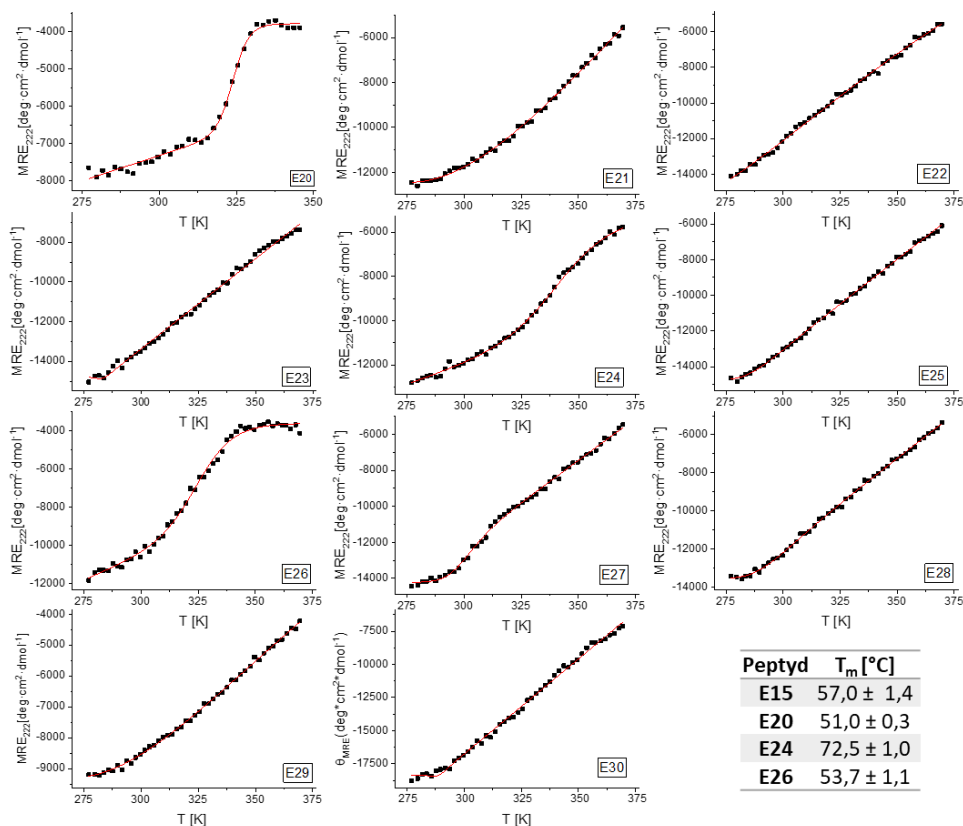
Należy zauważyć, że wszystkie minibiałka z mutacjami wprowadzonymi w obrębie trzeciej helisy (bliżej końca karboksylowego), z wyjątkiem peptydu **E20**, charakteryzowały się liniowym kształtem krzywej denaturacji. Otrzymany wynik wskazuje na istotną rolę reszt znajdujących się w obrębie tej helisy w stabilizowaniu oddziaływań pomiędzy pozostałymi strukturami drugorzędowymi. Minibiałka **E24** oraz **E26**, które nie posiadają mutacji w obrębie tej helisy wykazują sigmoidalny kształt krzywej denaturacji.

Podczas pomiarów temperaturowych dichroizmu kołowego obserwowano wytrącanie części otrzymanych peptydów: **E20**, **E23** oraz **E26–E30**. Wytrącanie obserwowano w kuwecie pomiarowej po pomiarze temperaturowym. W związku z tym kolejne powtórzenia pomiarów temperaturowych CD dawały wyniki charakteryzujące się niższymi wartościami eliptyczności. Ta obserwacja wynika najprawdopodobniej z braku prawidłowej renaturacji tych minibiałek co oznacza,

że wraz ze spadającą temperaturą nie wracają one, po denaturacji, do swojej pierwotnej formy sfałdowanej. Nie zaobserwowano wytrącania w przypadku peptydów: **E21**, **E22**, **E24** i **E25**. Dla tych minibiałek pomiar temperatury CD był powtarzany trzykrotnie i za każdym razem otrzymano takie same krzywe denaturacji co świadczy o braku tendencji do wytrącania tych peptydów podczas pomiarów (**Rysunek 47**). Wśród zsyntetyzowanych w tej grupie peptydów tylko peptyd **E24** stanowił połączenie obu właściwości: braku tendencji do agregacji podczas pomiarów temperatury CD oraz występowanie sigmoidalnego kształtu krzywej denaturacji.



**Rysunek 47.** Porównanie trzech pomiarów krzywej denaturacji CD prowadzonych w tej samej kuwecie, jeden za drugim dla peptydów, dla **E24** i **E31**. Otrzymane krzywe dla peptydu **E24**, który nie wykazuje tendencji do wytrącania podczas pomiarów nakładają się na siebie, co świadczy o prawidłowym procesie renaturacji, przeciwnie do krzywych dla peptydu **E31**



**Rysunek 48.** Widma CD, krzywe denaturacji termicznej oraz wyznaczone temperatury rozfałdowywania ( $T_m$ ) dla inhibitorów. Dodatkowo przedstawiono widma CD peptydów **E0** i **E15** na podstawie których zaprojektowano sekwencje **E20–E30**. Wartości  $T_m$  dla **E21–E23**, **E25**, **E27–E30** nie zostały wyznaczone ze względu na brak sigmoidalnego kształtu krzywej denaturacji, a tym samym brak możliwości dopasowania wyników do modelu. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE)

### 3.2.2.4.3. Aktywność biologiczna pierwszej grupy

Pomiary z wykorzystaniem BLI oraz HTRF zostały przeprowadzone wyłącznie dla peptydów, których wyniki CD wskazywały na kooperatywny proces związania czyli dla **E20**, **E24** i **E26**.

Dla otrzymanych peptydów przeprowadzono analizę kinetyki oddziaływania z PD-L1 z wykorzystaniem metody BLI w celu wyznaczenia stałych dysocjacji ( $K_D$ ). Dla wszystkich analizowanych peptydów otrzymano wartości  $K_D$  niższe niż dla peptydu wyjściowego **E15**, którego wartość  $K_D$  wynosi 23  $\mu\text{M}$  (**Tabela 12**).

Wyniki otrzymane z wykorzystaniem metody HTRF wskazują na brak lub bardzo niską aktywność hamującą wszystkich otrzymanych peptydów przy stężeniu 5  $\mu\text{M}$  (**Tabela 12**).

**Tabela 12.** Wartości stałej dysocjacji ( $K_D$ ) otrzymane z wykorzystaniem BLI oraz ilość niezdisocjowanego kompleksu i wartości połowy maksymalnego stężenia hamującego ( $\text{IC}_{50}$ ) zmierzone testami HTRF dla inhibitorów. Wartości  $K_D$  zostały uzyskane z pomiarów przy stężeniach: 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ .

Peptyd	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	ilość niezdisocjowanego kompleksu [%] [i] = 5 $\mu\text{M}$	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>E1</b>	26,8 $\pm$ 0,3	55,8 $\pm$ 6,2	3,9 $\pm$ 1,0
<b>E15</b>	22,7 $\pm$ 0,3	39,3 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 0,5
<b>E20</b>	12,5 $\pm$ 0,1	91,6 $\pm$ 3,7	-
<b>E24</b>	15,0 $\pm$ 0,1	98,8 $\pm$ 5,2	-
<b>E26</b>	0,84 $\pm$ 0,04	118,4 $\pm$ 2,3	-

#### 3.2.2.4.4. Projektowanie drugiej grupy

Kolejne sekwencje (**E31–E33**) zostały zaprojektowane na bazie wyników otrzymanych w pierwszej grupie (**Tabela 13**). Wartości pI wszystkich zaprojektowanych inhibitorów wynoszą powyżej 10, podobnie do peptydów wyjściowych **E0** i **E1**, zaś procentowy udział reszt polarnych w sekwencji wynosi powyżej 34%. Sekwencje wszystkich inhibitorów w tej grupie bazowały na sekwencji peptydu **E24**, który wykazywał zwiększoną rozpuszczalność, korzystne cechy strukturalne oraz powinowactwo względem PD-L1. W przypadku peptydu **E31**, została wprowadzona mutacja występująca w **E26**, który wykazywał wysoką aktywność oraz kooperatywne związanie. W **E32** dodatkowo wprowadzono dodatkowo naładowaną resztę lizyny w pozycji 15. Zaś w **E33** dołączone zostało 8 reszt występujących w oryginalnym minibiałku **ENH**, o które zostało skrócone podczas projektowania pierwszej grupy inhibitorów (**Tabela 14**).

**Tabela 13.** Podsumowanie procedury projektowania inhibitorów wraz z ich wartościami pI, liczbą reszt posiadających formalny ładunek w fizjologicznym pH – dodatni (+) oraz ujemny (-) oraz procentowym udziałem tych reszt w całej sekwencji aminokwasowej - %P. Wartości pI zostały uzyskane za pomocą kalkulatora dostępnego na: <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>, z uwzględnieniem obecności grupy amidowej na końcu karboksylowym.

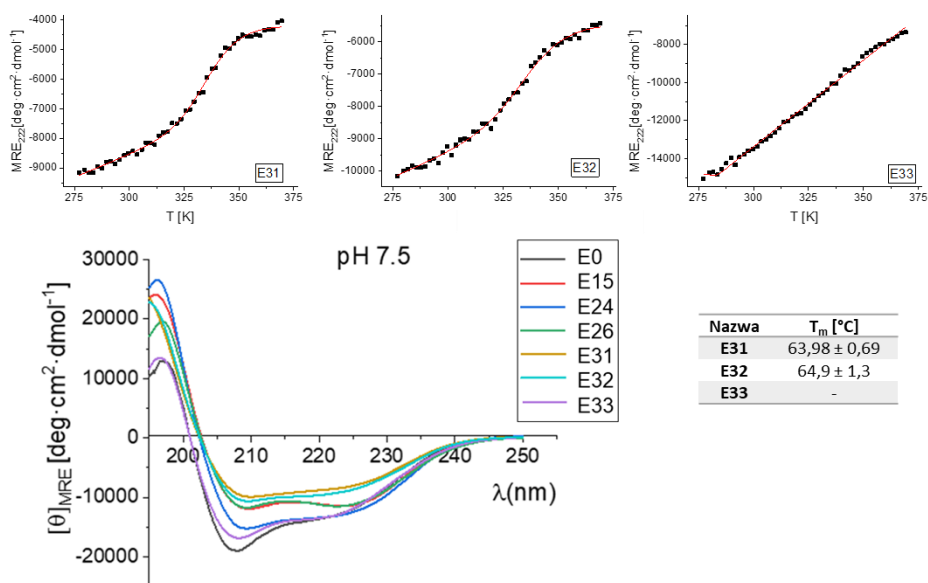
Peptyd	Metoda projektowania	pI	(+)	(-)	%P
<b>E0</b>	struktura wyjściowa	10,89	9	6	32,6
<b>E1</b>	struktura wyjściowa	10,51	10	5	32,6
<b>E15</b>	struktura wyjściowa	10,64	9	4	28,3
<b>E31</b>	na bazie E24 i E26	10,29	10	6	34,8
<b>E32</b>	na bazie E24 i E26 z resztą lizyny	10,62	11	5	34,8
<b>E33</b>	na bazie E24 i E26 z resztą lizyny oraz dodatkowe 8 reszt aminokwasowych z oryginalnej sekwencji ENH	11,34	14	5	35,2

**Tabela 14.** Sekwencje minibiłkowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Pogrubioną, czerwoną czcionką zostały zaznaczone mutacje wprowadzone do minibiłka **E1** odróżniające jego sekwencję od minibiłka wyjściowego **E0**. Kolorem zielonym zostały oznaczone mutacje wprowadzone podczas optymalizacji w celu zwiększenia aktywności hamującej, kolorem niebieskim - mutacje wprowadzone w celu zwiększenia rozpuszczalności.

Peptyd	Sekwencja										
<b>E0</b>	AFSSE	QLARL	KREFN	ENRYL	TERRR	QQLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	
<b>E1</b>	AFSSE	QL <b>KKL</b>	<b>KLW</b> FN	<b>KDR</b> YL	<b>TEW</b> HR	<b>QKL</b> SS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	
<b>E15</b>	AFSSE	QL <b>KWL</b>	<b>KLW</b> FN	<b>KLR</b> YL	<b>TEW</b> HR	<b>QKL</b> SS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	
<b>E31</b>	AFSSE	<b>QEK</b> WL	<b>KLW</b> FE	<b>KLR</b> YL	<b>TEW</b> HR	<b>KKL</b> SS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	
<b>E32</b>	AFSSE	<b>QEK</b> WL	<b>KLW</b> FK	<b>KLR</b> YL	<b>TEW</b> HR	<b>KKL</b> SS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K	
<b>E33</b>	RPRT	AFSSE	<b>QEK</b> WL	<b>KLW</b> FN	<b>KLR</b> YL	<b>TEW</b> HR	<b>KKL</b> SS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	KRAKI

### 3.2.2.4.5. Analiza strukturalna drugiej grupy

Widma CD peptydów **E31–E33** wykazały, że wszystkie trzy nowo zsyntetyzowane inhibitory, zgodnie z założeniami posiadają strukturę helikalną, największą intensywnością eliptyczności charakteryzował się peptyd **E33** (**Rysunek 49**). Jednak krzywa denaturacji tego peptydu wykazała liniowy kształt. Przeciwnie, otrzymane dla minibiłek **E31** i **E32** krzywe denaturacji wykazują sigmoidalny kształt oraz wysoką stabilność termiczną scharakteryzowaną przez wartości  $T_m$  wynoszące ok. 64°C. Wytrącania peptydu w trakcie pomiarów temperaturowych CD obserwowano w przypadku peptydu **E31**, nie obserwowano zaś w przypadku minibiłek **E32** i **E33**. Toteż, tylko peptyd **E32** stanowił połączenie obu właściwości: braku tendencji do agregacji podczas pomiarów temperaturowych CD oraz występowanie sigmoidalnego kształtu krzywej denaturacji.



**Rysunek 49.** Widma CD, krzywe denaturacji termicznej oraz wyznaczone temperatury rozkładowywania ( $T_m$ ) dla inhibitorów. Dodatkowo przedstawiono widma CD peptydów **E0**, **E15**, **E24** i **E26**, na podstawie których zaprojektowano sekwencje **E31–E33**. Wartość  $T_m$  dla **E33** nie została wyznaczona ze względu na brak sigmoidalnego kształtu krzywej denaturacji, a tym samym brak możliwości dopasowania wyników do modelu. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE).

### 3.2.2.4.6. Aktywność biologiczna drugiej grupy

Pomiary z wykorzystaniem BLI oraz HTRF zostały przeprowadzone wyłącznie dla peptydów, których wyniki CD wskazywały na kooperatywny proces związania czyli dla **E31** i **E32** (Tabela 15).

Wyniki otrzymane z wykorzystaniem BLI wskazują na powinowactwo względem PD-L1 obu peptydów, jednak tylko **E32** wykazuje powinowactwo wyższe niż peptydy wyjściowe poprzez wartość  $K_D$  wynoszącą 12  $\mu\text{M}$  (Tabela 15).

Podobnie do wyników otrzymanych poprzez HTRF dla peptydów **E20**, **E24** i **E26**, inhibitory nie wykazują (**E31**) lub wykazują bardzo słabą (**E32**) aktywność hamującą względem układu PD-1/PD-L1 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  (Tabela 15). Wartość ilości niezdisocjowanego kompleksu dla peptydu **E32** wynosi 83% i jest znacznie wyższa niż wartości otrzymane dla peptydów wyjściowych wynoszące 56% i 39% dla odpowiednio **E1** i **E15**.

**Tabela 15.** Wartości stałej dysocjacji ( $K_D$ ) otrzymane z wykorzystaniem BLI oraz ilość niezdisocjowanego kompleksu i wartości połowy maksymalnego stężenia hamującego ( $IC_{50}$ ) zmierzone testami HTRF dla inhibitorów. Wartości  $K_D$  zostały uzyskane z pomiarów przy stężeniach: 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ . Oznaczenie „-”, oznacza, że pomiary dla danego peptydu nie zostały przeprowadzone..

Peptyd	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	ilość niezdisocjowanego kompleksu [%] [i] =5 $\mu\text{M}$	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>E1</b>	26,8 $\pm$ 0,3	55,8 $\pm$ 6,2	3,9 $\pm$ 1,0
<b>E15</b>	22,7 $\pm$ 0,3	39,3 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 0,5
<b>E20</b>	12,5 $\pm$ 0,1	91,6 $\pm$ 3,7	-
<b>E24</b>	15,0 $\pm$ 0,1	98,8 $\pm$ 5,2	-
<b>E26</b>	0,84 $\pm$ 0,04	118,4 $\pm$ 2,3	-
<b>E31</b>	28,4 $\pm$ 0,3	122,4 $\pm$ 15,8	-
<b>E32</b>	12,0 $\pm$ 0,1	83,3 $\pm$ 7,5	-



#### 3.2.2.4.7. Aktywność biologiczna w pH 6.9

Udany proces optymalizacji sekwencji, w celu zwiększenia rozpuszczalności skutkowało otrzymaniem dwóch obiecujących peptydów **E24** i **E32**, które wykazywały połączenie korzystnych cech strukturalnych oraz aktywności biologicznej. Optymalna rozpuszczalność obu peptydów pozwoliła na przeprowadzenie testów blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach<sup>§</sup> i wyznaczenie połowy maksymalnego stężenia efektorowego (ang. *half maximal effective concentration*, EC<sub>50</sub>) dla inhibitorów **E24** oraz **E32** (Rysunek 50).

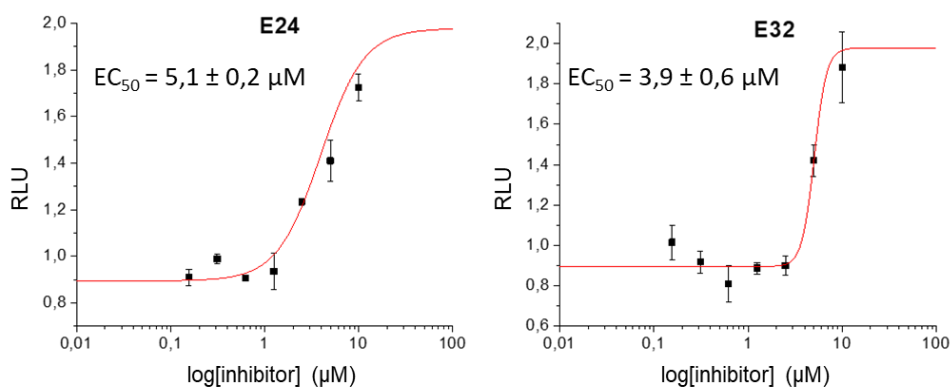
Ze względu na rozbieżne wyniki w standardowym środowisku hodowli komórek przeprowadzono analizę wpływu pH medium na przeżywalność komórek oraz aktywność inhibitorów. Warto zauważyć, że medium RPMI 1640 z L-glutaminą, używane do hodowli komórkowej w tym eksperymencie, zawiera buforujący wodorowęglan sodu. W środowisku hodowli komórek, które było utrzymywane przy 5-10% CO<sub>2</sub>, pH jest stabilne i wynosi 7.4. Jednak poza inkubatorem do hodowli komórek, gdzie występuje obecność tlenu w powietrzu, pH podnosi się do około 8.4. Jest to najprawdopodobniej przyczyną rozbieżnych wyników. Badania przeprowadzone przez dr. Łukasza Skalniaka wykazały, że komórki przeżywają w pH 6.8 lub wyższym, dlatego eksperymenty zostały ostatecznie przeprowadzone w pH 6.9.

Zastosowanie pH 6.7-7.1 do pomiarów jest uzasadnione, ponieważ jest to zakres zewnątrzkomórkowego pH komórek nowotworowych,<sup>131</sup> w którym mają docelowo działać projektowane inhibitory.

Otrzymane wyniki wskazują na brak cytotoksycznych właściwości otrzymanych inhibitorów oraz wysoką aktywność hamującą oddziaływania PD-1/PD-L1 o wartościach EC<sub>50</sub> równych 5,1 μM dla **E24** i 3,9 μM dla **E32**.

---

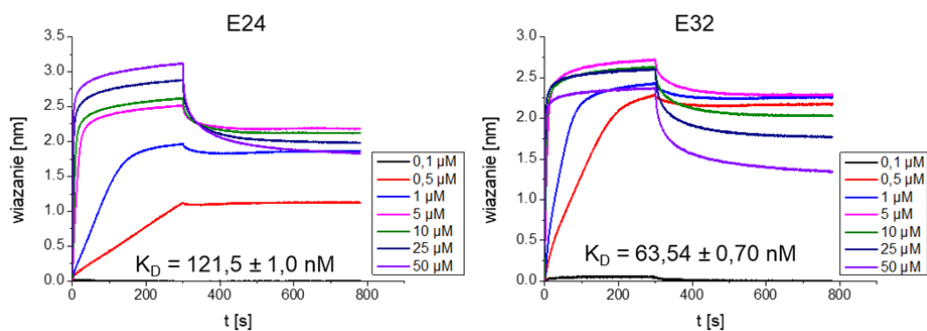
<sup>§</sup> Testy blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach zostały wykonane przez dr hab. Łukasza Skalniaka z Zespołu Chemii Bioorganicznej i Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.



**Rysunek 50.** Wyniki testu blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach dla **E24** i **E32**.

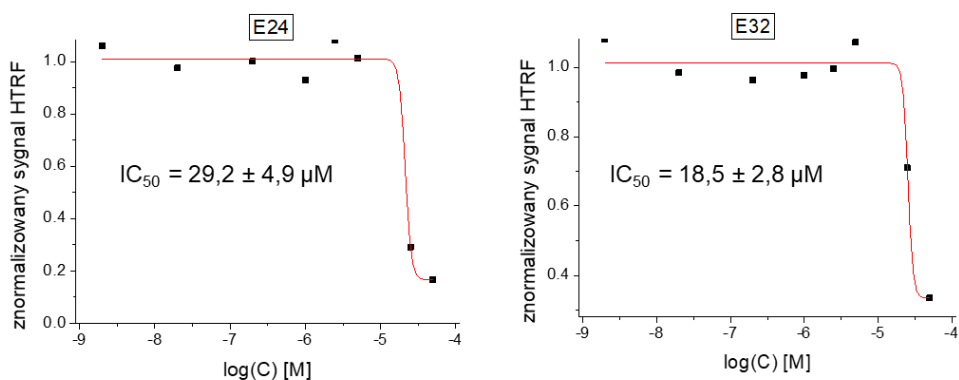
W związku z poczynionymi obserwacjami, przeprowadzono badania aktywności biologicznej z wykorzystaniem BLI i HTRF w obniżonym pH wynoszącym 6.9.

Badania aktywności inhibitorów **E24** oraz **E32** z wykorzystaniem BLI wskazały na większe powinowactwo do PD-L1 w niższym pH w przypadku obu inhibitorów. Dla peptydu **E24** otrzymano wartości  $K_D$  równe 121,5 nM w pH 6.9 oraz 15,0 μM w pH 7.4, zaś dla peptydu **E32** wartości wynosiły 63,5 nM w pH 6.9 oraz 12,0 μM w pH 7.4.



**Rysunek 51.** Wyniki BLI dla inhibitorów **E24** oraz **E32**.

Badania zdolności hamującej oddziaływanie PD-1/PD-L1 przez inhibitory **E24** i **E32** z wykorzystaniem HTRF (**Rysunek 52**) potwierdzają zdolność obu inhibitorów do blokowania oddziaływania w pH 6,9 scharakteryzowaną wartościami  $IC_{50}$  wynoszącymi odpowiednio: 29,2  $\mu$ M dla **E24** oraz 18,5  $\mu$ M dla **E32**.



**Rysunek 52.** Wyniki HTRF dla **E24** i **E32**.

Otrzymane wyniki wskazują na zwiększoną aktywność badanych inhibitorów w środowisku o niższym pH, które wynosi 6,9. Warto zaznaczyć, że zbyt wysokie pH, takie jak 7,4, może niekorzystnie wpływać na rozpuszczalność inhibitorów oraz proces ich zwijania, co z kolei ma wpływ na ich strukturę trzeciorzędową. To z kolei może skutkować spadkiem aktywności inhibitorów.

### 3.2.2.4.8. Wnioski

Zaproponowana strategia optymalizacji rozpuszczalności inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 opartych o strukturę ENH, pozwoliła na otrzymanie peptydów o zwiększonej rozpuszczalności oraz przeprowadzenie testów blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach. Testy te dotyczyły reaktywacji modelowych komórek limfoidalnych linii Jurkat i wykazały, że dwa z otrzymanych inhibitorów, **E24** i **E32**, prowadziły do przywrócenia ich aktywności w obniżonym pH 6.9. Otrzymane wartości  $EC_{50}$  wynosiły odpowiednio: 5,1  $\mu\text{M}$  dla **E24** i 3,9  $\mu\text{M}$  dla **E32**.

Otrzymane wartości charakteryzujące zdolność otrzymanych inhibitorów do hamowania oddziaływania PD-1/PD-L1 są porównywalne do wartości  $IC_{50}$  jedyne go dotąd opublikowanego minibiątkowego inhibitora oddziaływania PD-1/PD-L1, MOPD-1, która wynosi 3,3  $\mu\text{M}$ .<sup>81</sup> Jednakże należy zauważyć, że trzeciorzędowa struktura MOPD-1 jest stabilizowana przez wiązania kowalencyjne, a dokładnie przez występowanie trzech mostków disiarczkowych. W przeciwieństwie do tego, struktury prezentowanych w tej pracy inhibitorów są stabilizowane wyłącznie przez hydrofobowy rdzeń. Warto podkreślić, że dotychczas nie zostały opublikowane inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1 o charakterze minibiątek stabilizowanych przez hydrofobowy rdzeń, które wykazywałyby aktywność porównywalną z inhibitorami przedstawionymi w tej pracy.

Warto zauważyć, że peptydy **E24** i **E32** nie charakteryzowały się największym procentowym udziałem reszt posiadających ładunek w sekwencji aminokwasowej (**Tabela 10**, **Tabela 13**). Peptyd **E24** zawierał taką samą ilość reszt o ładunku dodatnim i ujemnym jak peptyd wyjściowy **E1** i to właśnie dzięki tej strategii udało się otrzymać peptyd o zwiększonej rozpuszczalności przy zachowaniu podobnej aktywności. Peptyd **E32** opierał się na mutacjach wprowadzonych w **E24** tj. wprowadzenie reszt Glu12 oraz Lys26. Miejsce dodatkowej mutacji, która umożliwiła uzyskanie peptydu, zachowującego stabilność, wykazującego wyższe powinowactwo do celu molekularnego i wyższą aktywność hamującą oddziaływanie PD-1/PD-L1 niż **E24**, zostało wybrane na podstawie analizy

peptydu **E26**. Choć charakter mutacji jest inny, gdyż w sekwencji peptydu **E26** wprowadzono resztę Glu15, która w **E32** została zastąpiona przez Lys15, to dzięki badaniom peptydu **E26** zidentyfikowano odpowiednią pozycję w sekwencji, gdzie mutacja nie prowadziła do znaczącej destabilizacji struktury.

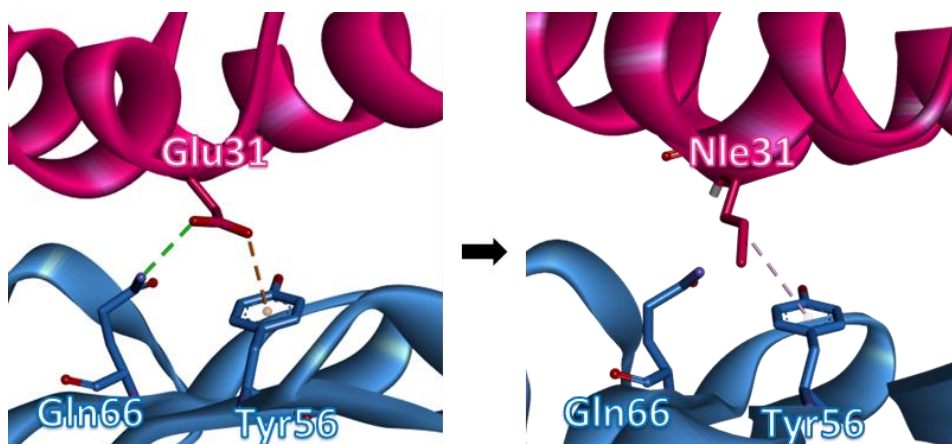
Peptyd **E32** został wybrany do kolejnej rundy optymalizacji ze względu na jego korzystne cechy. Inhibitor ten charakteryzował się sigmoidalnym kształtem krzywej denaturacji, brakiem precypitacji podczas pomiarów temperaturowych CD, wysokim powinowactwem do PD-L1 scharakteryzowanym przez wartość  $K_D$  wynoszącą 12  $\mu\text{M}$  w pH 7.4 oraz zdolnością do reaktywacji modelowych komórek limfoidalnych linii Jurkat opisaną wartością  $EC_{50}$  równą 3,9  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.2.5. Trzecia runda optymalizacji w celu zwiększenia aktywności hamującej

#### 3.2.2.5.1. Projektowanie

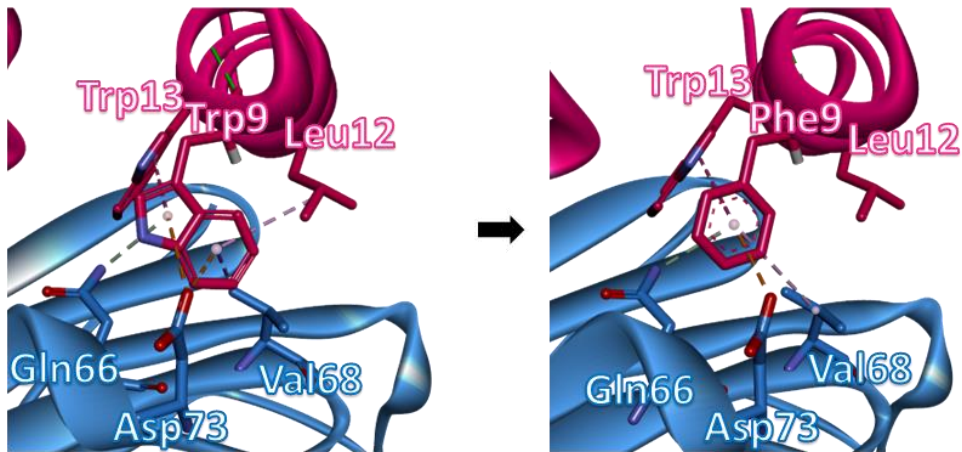
Trzeci etap procesu optymalizacji, mający na celu zwiększenie aktywności hamującej, polegał na połączeniu danych uzyskanych podczas wcześniejszych optymalizacji, które miały na celu zwiększenie aktywności i rozpuszczalności inhibitorów. Wszystkie zaprojektowane inhibitory zachowały mutacje z minibiłka **E32** oraz posiadały pojedyncze mutacje mające na celu zwiększenie ich aktywności (**Tabela 16**). Projektowanie opierało się o dwa podejścia.

Pierwsze podejście polegało na zamianie polarnej reszty Glu31 na resztę niepolarną, ze względu na położenie reszt Glu31 w drugiej hydrofobowej kieszeni w okolicy  $_{PD-L1}$ Tyr56. Ten rodzaj mutacji był już wprowadzony w przypadku peptydów **E9**, **E16** i **E18**, w których w tej pozycji znajdowała się reszta izoleucyny. Inhibitory **E9**, **E16** i **E18** wykazywały niekorzystne cechy strukturalne, charakteryzujące się liniowym kształtem krzywej denaturacji. Jednak wprowadzenie tej mutacji do bardziej stabilnego rusztowania, cechującego się większą rozpuszczalnością, takiego jak **E32**, wydaje się wysoce obiecujące. Dlatego w tej pozycji wprowadzono resztę izoleucyny (**E34**) oraz jako alternatywę resztę norleucyny (**E36**, **Rysunek 53**).



**Rysunek 53.** Mutacja wprowadzona w **E36** w celu zwiększenia aktywności inhibitora.

Drugie podejście polegało na zamianie Trp9 na mniejszą resztę fenyloalaniny, aby zmniejszyć odległość pomiędzy powierzchnią a celem oraz uzyskać powierzchnie, które ściślej do siebie przylegają (**E35**, **Rysunek 54**). Warto zauważyć, że fenyloalanina w tej pozycji może zapewnić te same oddziaływania z celem molekularnym, pomimo mniejszego rozmiaru.



**Rysunek 54** Mutacja wprowadzona w **E35** w celu zwiększenia aktywności inhibitora.

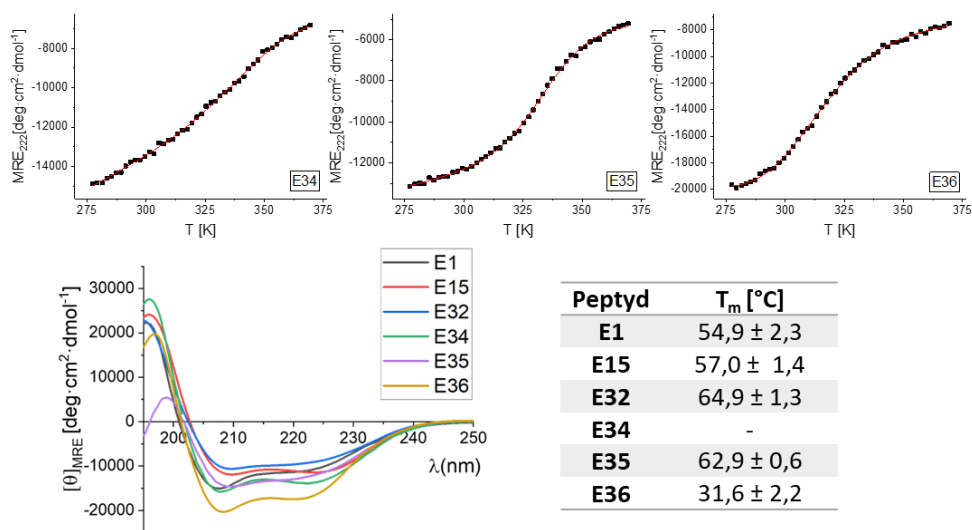
**Tabela 16.** Sekwencje minibiałkowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. Kolorem niebieskim zostały oznaczone mutacje mające na celu zwiększenie aktywności, kolorem żółtym modyfikacje poza miejscem oddziaływania prowadzące do zwiększenia rozpuszczalności.

Peptyd	Sekwencja															
	1	10	20	30	40	46										
<b>E1</b>	AFSSE	QLKKL	KLWFN	KDRYL	TEWHR	QKLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K						
<b>E15</b>	AFSSE	QLK <b>W</b> L	KLWFN	<b>K</b> LRYL	TEWHR	QKLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K						
<b>E32</b>	AFSSE	<b>Q</b> <b>E</b> KWL	KLW <b>F</b> <b>K</b>	KLRYL	TEWHR	<b>K</b> KLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K						
<b>E34</b>	AFSSE	<b>Q</b> <b>E</b> KWL	KLW <b>F</b> <b>K</b>	KLRYL	TEWHR	<b>K</b> KLSS	<b>I</b> LGLN	EAQIK	IWFQN	K						
<b>E35</b>	AFSSE	<b>Q</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>F</b> L	KLW <b>F</b> <b>K</b>	KLRYL	TEWHR	<b>K</b> KLSS	ELGLN	EAQIK	IWFQN	K						
<b>E36</b>	AFSSE	<b>Q</b> <b>E</b> KWL	KLW <b>F</b> <b>K</b>	KLRYL	TEWHR	<b>K</b> KLSS	<b>B</b> LGLN	EAQIK	IWFQN	K						

### 3.2.2.5.2. Analiza strukturalna

Analiza strukturalna minibiłek **E34–E36** z wykorzystaniem CD wykazała obecność minimów charakterystycznych dla występowania  $\alpha$ -helis (**Rysunek 55**). Warto zaznaczyć, że eliptyczność widm CD dla wszystkich peptydów jest wyższa niż dla peptydu wyjściowego **E32**.

W związku z tym można wnioskować, że wprowadzone mutacje miały korzystny wpływ na stabilność konformacyjną helis zawartych w strukturach inhibitorów. Dodatkowo, peptydy **E35** i **E36** wykazują sigmoidalny kształt krzywej denaturacji, co potwierdza, że struktury te charakteryzują się, zgodnie z oczekiwaniami, kooperatywnym zwijaniem. Jednak niekorzystnym efektem wprowadzonych mutacji jest tendencja do wytrącania podczas pomiarów temperaturowych dla inhibitorów **E34** i **E35**. Tendencja ta nie została zaobserwowana dla peptydu **E36**, który dodatkowo charakteryzuje się najwyższą eliptycznością na widmie CD. Niestety, inhibitor **E36** cechuje się niską wartością  $T_m$  równą  $31,6^\circ\text{C}$ .



**Rysunek 55.** Widma CD, krzywe denaturacji termicznej oraz wyznaczone temperatury rozfałdowywania ( $T_m$ ) dla inhibitorów. Dodatkowo przedstawiono widma CD oraz wartości  $T_m$  peptydów **E1**, **E15** i **E32** na podstawie których zaprojektowano sekwencje **E34–E36**. Wartość  $T_m$  dla **E34** nie zostały wyznaczone ze względu na brak sigmoidalnego kształtu krzywej denaturacji, a tym samym brak możliwości dopasowania wyników do modelu. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE)



### 3.2.2.5.3. Aktywność biologiczna

Analiza powinowactwa do celu molekularnego z wykorzystaniem techniki BLI wskazuje, że wszystkie trzy peptydy z tej grupy wykazują wyższe powinowactwo do celu molekularnego w porównaniu do struktur wyjściowych **E1**, **E15** i **E32** (Tabela 17). Dla nowych inhibitorów uzyskano następujące wartości  $K_D$ : 8,25  $\mu\text{M}$  dla **E34**, 4,54  $\mu\text{M}$  dla **E35** i 6,13  $\mu\text{M}$  dla **E36**, podczas gdy dla najlepszego peptydu wyjściowego **E32** wartość  $K_D$  wynosi 12,0  $\mu\text{M}$ . Te wyniki potwierdzają skuteczność zastosowanej strategii projektowania. Najniższą wartością  $K_D$  charakteryzuje się peptyd **E35**, w którym reszta Trp9 została zamieniona na resztę fenyloalaniny. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że wprowadzenie mniejszej reszty o podobnych właściwościach spowodowało, zgodnie z założeniami, zmniejszenie odległości między inhibitorem a celem molekularnym, co przyczyniło się do tworzenia bardziej szczelnego miejsca oddziaływania między obiema powierzchniami.

Wyniki otrzymane w testach HTRF wskazują na brak lub bardzo niską aktywność hamującą otrzymanych inhibitorów. Może to wynikać, podobnie jak w przypadku poprzedniej grupy, ze zbyt wysokiego pH buforu używanego w eksperymencie. Zbyt wysokie pH może wpływać na rozpuszczalność inhibitorów oraz na proces zwijania minibiłek, co z kolei determinuje ich strukturę trzeciorzędową.

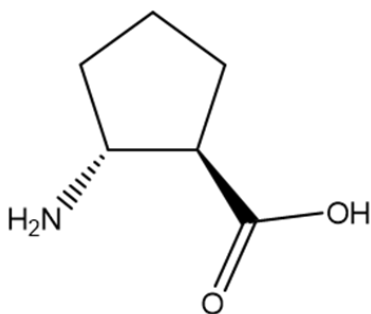
Peptyd **E36** wykazuje najbardziej obiecujące cechy w porównaniu do innych peptydów z tej grupy. Niemniej jednak, istnieje potrzeba przeprowadzenia optymalizacji tego peptydu w celu zwiększenia jego stabilności termicznej.

**Tabela 17.** Wartości stałej dysocjacji ( $K_D$ ) otrzymane z wykorzystaniem BLI oraz ilość niezdysojowanego kompleksy i wartości połowy maksymalnego stężenia hamującego ( $IC_{50}$ ) zmierzone testami HTRF dla minibiałek. Przedstawiono wartości  $K_D$  wyliczone z zestawu pomiarów dla roztworów o stężeniach inhibitora: 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50  $\mu M$ .

Peptyd	$K_D$ [ $\mu M$ ]	ilość niezdysojowanego	
		kompleksu [%] [i] = 5 $\mu M$	$IC_{50}$ [ $\mu M$ ]
<b>E1</b>	26,8 $\pm$ 0,3	55,8 $\pm$ 6,2	3,9 $\pm$ 1,0
<b>E15</b>	22,7 $\pm$ 0,3	39,3 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 0,5
<b>E32</b>	12,0 $\pm$ 0,1	83,3 $\pm$ 7,5	-
<b>E34</b>	8,25 $\pm$ 0,07	90,5 $\pm$ 6,2	-
<b>E35</b>	4,54 $\pm$ 0,04	92,8 $\pm$ 4,7	-
<b>E36</b>	6,13 $\pm$ 0,05	86,6 $\pm$ 2,2	-

### 3.3. Minibiałka zawierające $\alpha$ - i $\beta$ -aminokwasy zaprojektowane *de novo*

Druga część niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy projektowania minibiałek zawierających  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokwasy. Ze względu na ich korzystne właściwości,  $\alpha,\beta$ -peptydy zostały zidentyfikowane jako atrakcyjne rusztowania do budowy związków o aktywności biologicznej. Badania wykazały, że włączenie konformacyjnie usztywnionych  $\beta$ -aminokwasów do sekwencji aminokwasowej powoduje wzrost stabilności otrzymanych peptydów w porównaniu z wariantami zawierającymi wyłącznie  $\alpha$ -aminokwasy. Dodatkowo, włączenie  $\beta$ -aminokwasów zmniejsza podatność peptydów na proteolityczne cięcie, co może korzystnie wpłynąć na ich potencjał jako leków. W projekcie wykorzystano głównie cykliczny  $\beta$ -aminokwas *trans*-ACPC (kwas *trans*-2-aminocyklopentanokarboksylowy, **Rysunek 56**), oparty na strukturze cyklopentanu, który jest konformacyjnie usztywniony i indukuje zwijanie helisy.<sup>132</sup>



**Rysunek 56.** Wzór strukturalny kwasu *trans*-2-aminocyklopentanokarboksylowego (*trans*-ACPC)

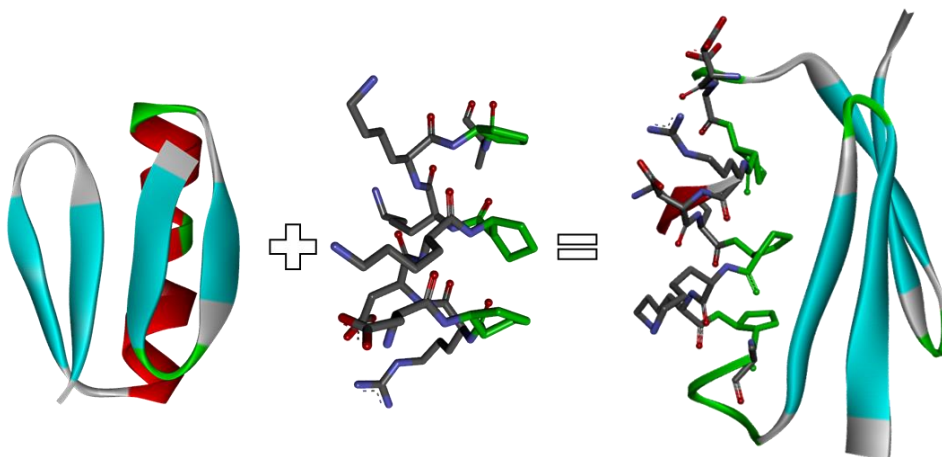
Dotychczas nie zostały opisane peptydowe inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1 zawierające  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokwasy. Toteż  $\alpha,\beta$ -peptydy wydają się obiecującymi kandydatami na nową grupę inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1.

### 3.3.1. Rusztowania zawierające trzy reszty $\beta$ -aminokwasowe

#### 3.3.1.1. Projektowanie *de novo*

Do projektowania pierwszego rusztowania wybrano topologie EEHEE, gdzie 'E' oznacza  $\beta$ -nić, a 'H' — helisę. Jako konformację łańcucha głównego wybrano konformację opublikowanego minibiałka stabilizowanego przez hydrofobowy rdzeń 5UP1 (PDB ID: 5UP1<sup>133</sup>). Powierzchnia zbudowana przez antyrównoległą  $\beta$ -kartkę w strukturze tego minibiałka wydaje się idealnym kandydatem do późniejszego projektowania inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1.

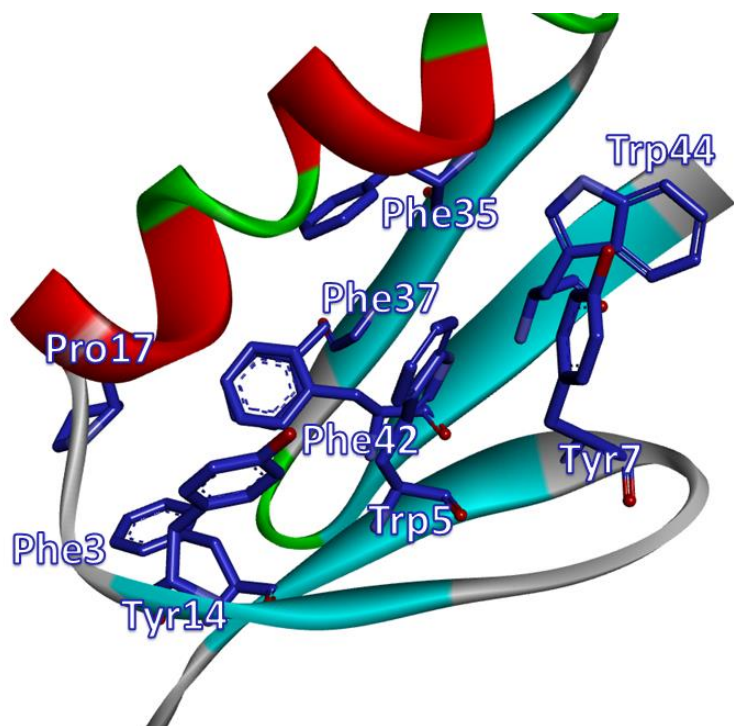
Pierwszym krokiem w projektowaniu rusztowania było zastąpienie  $\alpha$ -helisy helisą zawierającą  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokwasy o motywie  $\alpha\beta\alpha\alpha\beta\alpha\beta$ , gdzie ' $\alpha$ ' oznacza  $\alpha$ -aminokwas, a ' $\beta$ ' — *trans*-ACPC (**Rysunek 57**).



**Rysunek 57.** Schemat przedstawiający strategię włączenia helisy zawierającej  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokwasy do minibiałkowego rusztowania. Włączona została helisa o motywie  $\alpha\beta\alpha\alpha\beta\alpha\beta$  ( $\alpha$  —  $\alpha$ -aminokwas,  $\beta$  — *trans*-ACPC).

Następnie zaprojektowano hydrofobowy rdzeń stabilizujący strukturę trzeciorzędową minibiałka. Zaproponowano zbudowanie hydrofobowego rdzenia głównie z aromatycznych reszt tryptofanu, fenyloalaniny i tyrozyny. Reszty te wprowadzono w pozycjach: 3, 5, 7, 14, 35, 37, 42 i 44, które w modelu były skierowane do wnętrza rdzenia (**Rysunek 58**). W oddziaływania hydrofobowe w rdzeniu zaangażowane są również reszty *trans*-ACPC w pozycjach 20, 24 i 27, skierowane do środka struktury (**Rysunek 57**).

Dodatkowo w hydrofobowych oddziaływaniach stabilizujących trzeciorzędową strukturę rusztowań może brać również udział Pro17. Taki dobór reszt pozwala na wypełnienie hydrofobowego rdzenia oraz zapewni liczne możliwości oddziaływa hydrofobowych takich jak  $\pi$ - $\pi$  czy  $\pi$ -alkil.



**Rysunek 58.** Wymodelowana struktura **K7** z zaznaczonymi resztami tworzącymi hydrofobowy rdzeń minibiłka.

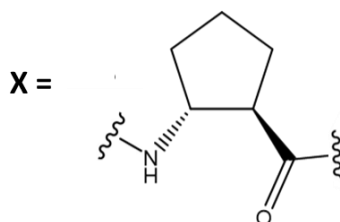
Dobór pozostałych reszt aminokwasowych oraz wybór najkorzystniejszych reszt budujących hydrofobowy rdzeń został przeprowadzony za pomocą protokołu FastDesign oprogramowania Rosetta.

Osiem sekwencji o najlepszej ocenie (ang. *score*) zostało wybranych do dalszych badań (**Tabela 18**). Warto zauważyć, że struktura 5UP1 została wykorzystane jedynie do utworzenia konformacji łańcucha głównego do dalszych modyfikacji i została dodatkowo skrócona o 19 reszt aminokwasowych z końca aminowego (gdzie znajdował się między innymi znacznik histydylowy). Najwyższy procent identyczności między sekwencją minibiłka 5UP1,

a sekwencją rusztowania wynosi jedynie 15% (Tabela 19), a więc zaprojektowane minibiąłka można uznać za nowe sekwencje, zaprojektowanie *de novo*.

**Tabela 18.** Sekwencje minibiąłek zaprojektowanych *de novo*. Kolorem niebieskim zostały oznaczone reszty budujące hydrofobowy rdzeń stabilizujący trzeciorzędową strukturę minibiąłek.

Peptyd	Sekwencja					
	1	10	20	30	40	46
<b>K1</b>	EPY <b>I</b> F	F <b>F</b> DKK	IYI <b>Y</b> R	NPDEX	KRN <b>X</b> K	K <b>X</b> GEK NNG <b>G</b> F KYD <b>G</b> K I <b>F</b> Y <b>F</b> I K
<b>K2</b>	PPY <b>V</b> F	F <b>Y</b> DKY	I <b>Y</b> Y <b>F</b> S	NP <b>K</b> D <b>X</b>	ASS <b>X</b> S	S <b>X</b> ASS SNG <b>N</b> Y S <b>F</b> SGS I <b>F</b> I <b>F</b> I S
<b>K3</b>	QP <b>F</b> I <b>W</b>	Y <b>Y</b> PKY	I <b>F</b> S <b>Y</b> D	EP <b>D</b> S <b>X</b>	SKS <b>X</b> E	S <b>X</b> ASS HNG <b>D</b> F L <b>F</b> SGY D <b>F</b> I <b>W</b> L G
<b>K4</b>	PP <b>F</b> I <b>Y</b>	F <b>W</b> SKY	I <b>Y</b> L <b>Y</b> D	SP <b>D</b> S <b>X</b>	AKS <b>X</b> S	S <b>X</b> ASS SNG <b>N</b> Y S <b>Y</b> D <b>G</b> S I <b>F</b> I <b>W</b> L G
<b>K5</b>	PP <b>W</b> I <b>W</b>	Y <b>Y</b> SKY	I <b>Y</b> Y <b>Y</b> S	SP <b>D</b> S <b>X</b>	AKS <b>X</b> E	S <b>X</b> ASS HNG <b>S</b> Y S <b>F</b> SGS N <b>F</b> F <b>F</b> S K
<b>K6</b>	E <b>K</b> Y <b>I</b> W	F <b>F</b> DKK	I <b>L</b> Y <b>Y</b> D	NP <b>D</b> D <b>X</b>	KRE <b>X</b> K	D <b>X</b> ADK NNG <b>N</b> Y L <b>Y</b> D <b>G</b> K N <b>F</b> I <b>Y</b> L K
<b>K7</b>	EP <b>F</b> I <b>F</b>	Y <b>F</b> DKK	I <b>D</b> Y <b>Y</b> D	NP <b>D</b> D <b>X</b>	RDK <b>X</b> K	K <b>X</b> ADD NNG <b>K</b> F N <b>F</b> NGA I <b>F</b> I <b>W</b> G R

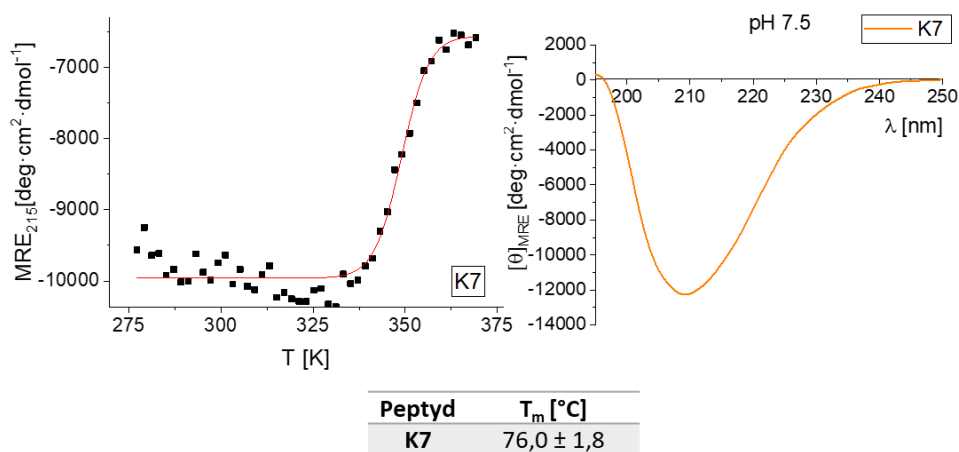


**Tabela 19.** Dopasowanie sekwencji minibiąłek **K1–K8** oraz **5UP1**, pokolorowane według procentu identyczności.

	10	20	30	40		
<b>5UP1/1-45</b>	HMTT	VKLGDI	KVTFDNPE	KAKKYAQKLA	KIYQLTVHVG	GDTH - VK
<b>K1/1-46</b>	EPY <b>I</b>	FFF <b>D</b> KK	I <b>Y</b> I <b>Y</b> RNPDE	<b>X</b> KRN <b>X</b> KK <b>X</b> GEKN	N <b>G</b> GFKYD <b>G</b> K	I <b>F</b> Y <b>F</b> I K
<b>K2/1-46</b>	PPY <b>V</b> F	F <b>Y</b> DKY	I <b>Y</b> Y <b>F</b> S	NP <b>K</b> D <b>X</b> ASS <b>X</b> SS	S <b>X</b> ASSSNGNYS	S <b>F</b> SGS I <b>F</b> I <b>F</b> I S
<b>K3/1-46</b>	QP <b>F</b> I <b>W</b>	Y <b>Y</b> PKY	I <b>F</b> S <b>Y</b> D	EP <b>D</b> S <b>X</b> SKS <b>X</b> ES	S <b>X</b> ASSHNGDF	L <b>F</b> SGY <b>D</b> F I <b>W</b> L G
<b>K4/1-46</b>	PP <b>F</b> I <b>Y</b>	F <b>W</b> SKY	I <b>Y</b> L <b>Y</b> D	SP <b>D</b> S <b>X</b> AKS <b>X</b> SS	S <b>X</b> ASSSNGNYS	S <b>Y</b> D <b>G</b> S I <b>F</b> I <b>W</b> L G
<b>K5/1-46</b>	PP <b>W</b> I <b>W</b>	Y <b>Y</b> SKY	I <b>Y</b> Y <b>Y</b> S	SP <b>D</b> S <b>X</b> AKS <b>X</b> ES	S <b>X</b> ASSHNGS	Y <b>S</b> F <b>S</b> GS N <b>F</b> F <b>F</b> SK
<b>K6/1-46</b>	E <b>K</b> Y <b>I</b> W	F <b>F</b> DKK	I <b>L</b> Y <b>Y</b> D	NP <b>D</b> D <b>X</b> KRE <b>X</b> KD	<b>X</b> ADKNNGN	L <b>Y</b> D <b>G</b> KN <b>F</b> I <b>Y</b> L K
<b>K7/1-46</b>	EP <b>F</b> I <b>F</b>	Y <b>F</b> DKK	I <b>D</b> Y <b>Y</b> D	NP <b>D</b> D <b>X</b> RDK <b>X</b> KK	<b>X</b> ADDN <b>G</b> K	F <b>N</b> F <b>N</b> GA I <b>F</b> I <b>W</b> G R

### 3.3.1.2. Analiza strukturalna zaprojektowanych *de novo* rusztań

Minibiałka **K1–K6** charakteryzowały się niską rozpuszczalnością w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7.5 z widocznym wytrącaniem peptydu z roztworu w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , w związku z czym nie było możliwe przeprowadzenie analizy strukturalnej z wykorzystaniem CD dla tych minibiałek. Jednakże obiecujące wyniki uzyskano dla peptydu **K7** (**Rysunek 59**), który charakteryzował się dobrą rozpuszczalnością w stężeniu 50  $\mu\text{M}$  w buforze fosforanowym o pH 7.5. Widmo CD uzyskane dla tego peptydu wykazuje minimum przy długości fali 208 nm charakterystyczne dla występowania helisy zawierającej  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokwasy.<sup>134</sup> Dodatkowo, krzywa denaturacji termicznej wskazuje na kooperatywne zwijanie minibiałka oraz wysoką stabilność temperaturową scharakteryzowaną przez temperaturę rozfałdowywania wynoszącą 76,0°C.



**Rysunek 59.** Widmo CD i krzywa denaturacji termicznej minibiałka **K7** w buforze fosforanowym o pH 7.5. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. mean residue ellipticity, MRE)

W związku z obiecującymi wynikami dla peptydu **K7** przeprowadzono próby uzyskania bardziej szczegółowych informacji strukturalnych przy pomocy 2D NMR, niestety rozpuszczalność peptydu w buforze fosforanowym o pH 7.5 była zbyt niska i nie udało się otrzymać możliwych do rozwiązania widm NMR. Podjęto też próby uzyskania kryształów **K7** w celu uzyskania struktury

eksperymentalnej przy użyciu krystalografii rentgenowskiej. Krystalizacją prowadzoną wykorzystując metodę wiszącej kropli. Przetestowano 96 buforów korzystając z zestawu Structure Screen 1 oraz Structure Screen 2 firmy Molecular Dimensions. Udało się otrzymać kryształy w 50 mM roztworze  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , jednak były one zbyt małe, co uniemożliwiało dalszą analizę. W związku z tym prowadzono próbę uzyskania kryształów z wykorzystaniem roztworów  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o stężeniach: 12,5, 25, 50, 75, 100, 200 mM oraz dla każdego z nich przygotowano warianty zawierające 0, 5, 10 i 20% PEG3350 oraz PEG8000, łącznie 48 warunków. Niestety, w żadnym z nich nie udało się otrzymać kryształów o charakterystyce umożliwiającej dalszą analizę.

W oparciu o strukturę minibiałka **K7** przeprowadzono optymalizację sekwencji w celu zwiększenia rozpuszczalności oraz zaprojektowano potencjalne inhibitory oddziaływania PD-1/PD-L1.



### 3.3.1.3. Optymalizacja sekwencji rusztowań

Optymalizacja sekwencji rusztowań zawierających trzy reszty  $\beta$ -aminokwasowe została przeprowadzona na bazie sekwencji minibiałka **K7**, które wykazywało najkorzystniejsze cechy strukturalne w grupie. Głównym celem wprowadzonych mutacji było uzyskanie peptydu o zwiększonej rozpuszczalności, co umożliwiłoby bardziej szczegółową analizę strukturalną oraz późniejsze wykorzystanie w celu blokowania oddziaływania PD-1/PD-L1. Optymalizacja polegała na wprowadzeniu mutacji, które zamieniały reszty aromatyczne oraz hydrofobowe na reszty polarne, co mogło prowadzić do zmniejszenia tendencji minibiałek do agregacji. Wszystkie mutacje zostały wprowadzone na powierzchni  $\beta$ -kartki, poza hydrofobowym rdzeniem. (**Tabela 20, Rysunek 60**).

W peptydzie **K8** wprowadzono parę reszt, składającą się z reszty o ładunku ujemnym, tj. Glu4, oraz reszty o ładunku dodatnim, tj. Lys41. Pozycje 4 i 41 znajdują się w bliskim sąsiedztwie w modelu strukturalnym (**Rysunek 60**), co umożliwia oddziaływanie między różnoimiennymi ładunkami, dodatkowo stabilizując strukturę.

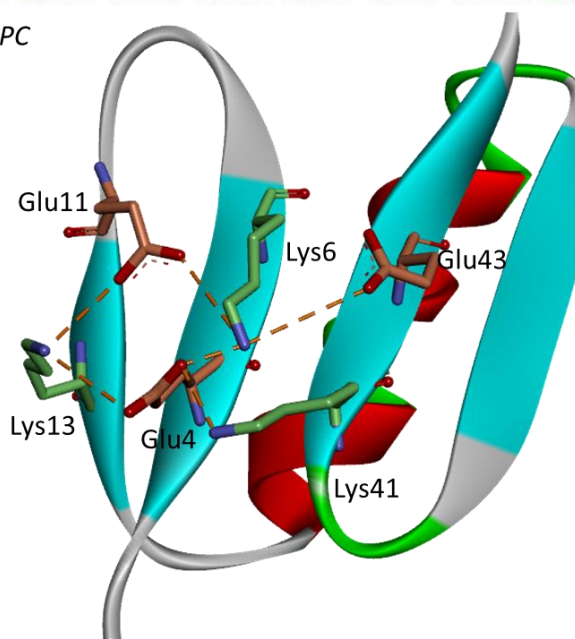
Taką samą strategię zastosowano w przypadku minibiałek **K9–K11**. W przypadku **K9** wprowadzono Glu6 i Lys11, **K10** — Glu6 i Lys43 i **K11** — Glu4 i Lys13 (**Tabela 20, Rysunek 60**).

Ostatni peptyd z tej grupy, **K12**, został zaprojektowany poprzez wprowadzenie mutacji we wszystkich 6 pozycjach — 4, 6, 11, 13, 41 i 43. Również w tym przypadku zastosowano strategię polegającą na oddziaływaniu między różnoimiennymi ładunkami na powierzchni minibiałka. W związku z tym wprowadzono reszty Glu4, Lys6, Glu11, Lys13, Lys41 i Glu43 (**Tabela 20, Rysunek 60**).

**Tabela 20.** Sekwencje zaprojektowanych minibiłek. Kolorem zielonym zaznaczono mutacje wprowadzające reszty o ładunku dodatnim, czerwonym posiadające ładunek ujemny.

Peptyd	Sekwencja										
	1	10	20	30	40	46					
<b>K7</b>	EPFIF	YFDKK	IDYYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	NFNGA	IFIWG	R	
<b>K8</b>	EPF <b>E</b> F	YFDKK	IDYYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	NFNGA	<b>K</b> FIWG	R	
<b>K9</b>	EPFIF	<b>E</b> FDKK	<b>K</b> DYYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	NFNGA	IFIWG	R	
<b>K10</b>	EPFIF	<b>E</b> FDKK	IDYYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	NFNGA	IF <b>K</b> WG	R	
<b>K11</b>	EPF <b>E</b> F	YFDKK	ID <b>K</b> YD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	NFNGA	IFIWG	R	
<b>K12</b>	EPF <b>E</b> F	<b>K</b> FDKK	<b>E</b> DKYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	NFNGA	<b>K</b> F <b>E</b> WG	R	


**X** = *trans*-ACPC



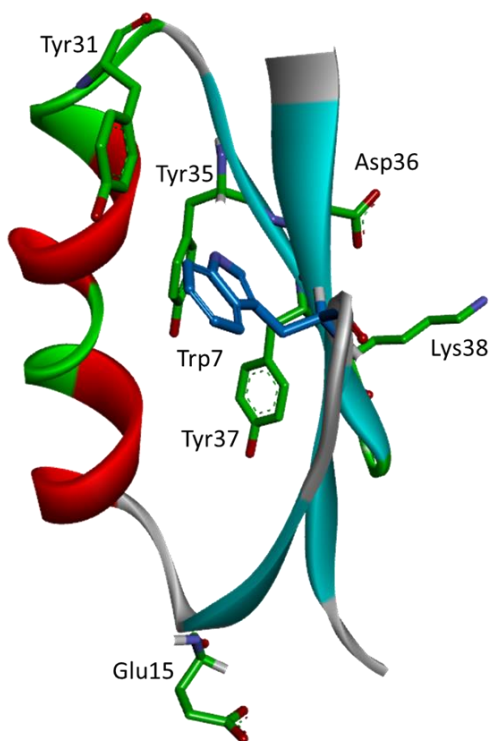
**Rysunek 60.** Modelowa struktura minibiłka **K12** z zaznaczonymi wprowadzonymi mutacjami. Kolorem zielonym zaznaczono reszty o ładunku dodatnim w pH 7, kolorem pomarańczowym posiadające ładunek ujemny.

W drugiej grupie minibiłek zaprojektowanych na bazie minibiłka **K7** wprowadzono mutacje mające na celu zwiększenie rozpuszczalności oraz dodatkowo zwiększenie stabilności rusztowań poprzez zwiększenie stopnia upakowania hydrofobowego rdzenia (**Tabela 21, Rysunek 61**).

**Tabela 21.** Sekwencje minibiałek. Kolorem niebieskim zostały oznaczone reszty mające na celu uzyskanie większej stabilności konformacyjnej poprzez zwiększenie stopnia upakowania rdzenia. Kolorem zielonym reszty zmodyfikowane w celu zwiększenia rozpuszczalności.

Peptyd	Sekwencja
	
<b>K7</b>	EPFIF YFDKK IDYYD NPDDX RDKXK KXADD NNGKF NFNGA IFIWG R
<b>K13</b>	EPFIF YW <b>DKK</b> IDYY <b>E</b> NPDDX RDKXK KXADD Y <b>NGKF</b> NFNGA IFIWG R
<b>K14</b>	EPFIF YFDKK IDYY <b>E</b> NPDDX RDKXK KXADD NNGK <b>Y</b> <b>DYKGA</b> IFIWG R
<b>K15</b>	EPFIF YW <b>DKK</b> IDYY <b>E</b> NPDDX RDKXK KXADD Y <b>NGKY</b> <b>DYKGA</b> IFIWG R

**X = *trans*-ACPC**

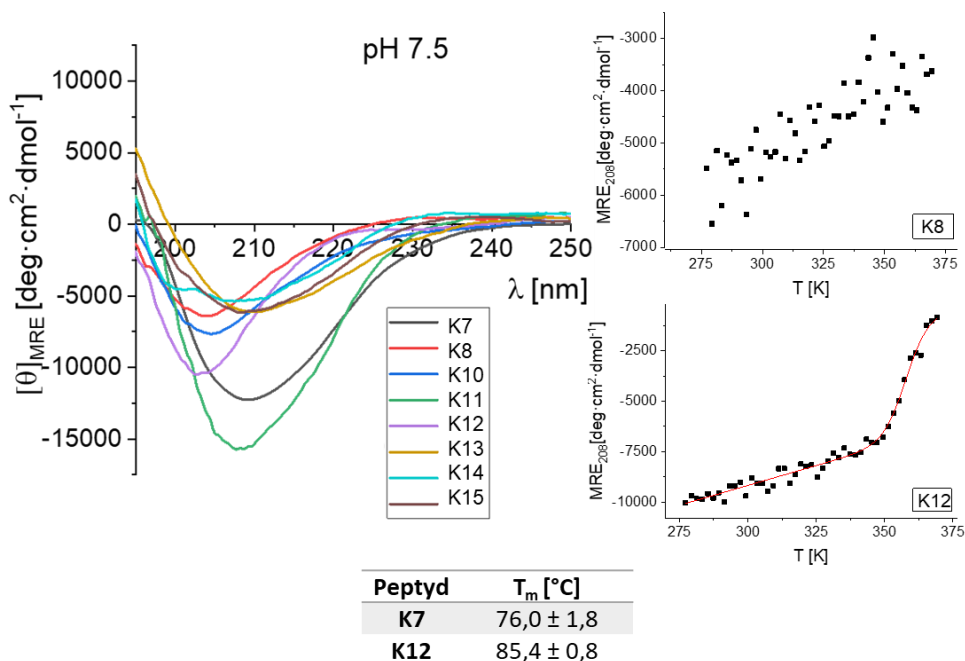


**Rysunek 61.** Modelowa struktura minibiałka **K15** z zaznaczonymi wprowadzonymi mutacjami. Kolorem niebieskim zostały oznaczone reszty mające na celu uzyskanie większej stabilności konformacyjnej poprzez zwiększenie stopnia upakowania rdzenia. Kolorem zielonym reszty zmodyfikowane w celu zwiększenia rozpuszczalności.

W celu zwiększenia stopnia upakowania hydrofobowego rdzenia, wprowadzono zamianę reszty Phe7 na większą resztę aromatyczną – tryptofan. Pozostałe mutacje miały na celu zwiększenie polarności i, co za tym idzie, rozpuszczalności związków. Reszty Phe35 i Phe37 zostały zastąpione przez reszty tyrozyny, które dodatkowo zawierają grupę hydroksylową. Reszty Asn36 i Asn38 zostały zastąpione przez reszty kwasu asparaginowego oraz lizyny, które są polarnymi resztami. Ponadto, znajdując się w bliskiej odległości, mogą oddziaływać ze sobą poprzez mostki solne. Zamiana reszty Asn31 na tyrozinę miała na celu stabilizowanie oddziaływań międzycząsteczkowych oraz zwiększenie rozpuszczalności. Zamiana reszty Asp15 na kwas glutaminowy wynikała z problemu z reakcją uboczną – cyklizacją kwasu asparaginowego podczas syntezy.

### 3.3.1.4. Analiza strukturalna zoptymalizowanych rusztowań

Widma CD wskazują na utratę stabilności konformacyjnej części peptydów (**Rysunek 62**). W przypadku peptydu wyjściowego **K7** minimum występowało przy długości fali 208 nm. W przypadku peptydów **K8**, **K10** i **K12** minimum zostało przesunięte w kierunku niższych długości fal, osiągając około 202 nm, co wskazuje na strukturę nieuporządkowaną w roztworze. Pomiar dla minibiłka **K9** nie zostały przeprowadzone ze względu na zbyt niską rozpuszczalność w buforze fosforanowym. Peptydy **K13–K15** charakteryzowały się niską intensywnością eliptyczności z powodu wytrącania podczas pomiarów i słabej rozpuszczalności



**Rysunek 62.** Widma CD i krzywe denaturacji termicznej dla minibiłek w buforze fosforanowym pH 7.5. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE). Brak pomiar dla peptydu **K9** wynika z jego niskiej rozpuszczalności w buforze, która uniemożliwiła przeprowadzenie pomiarów.

Krzywe denaturacji wszystkich peptydów, z wyjątkiem **K12**, nie wykazywały sigmoidalnego kształtu krzywej przy żadnej długości fali. Brak uporządkowanego kształtu krzywych denaturacji (**Rysunek 62**) najprawdopodobniej wynika z braku uporządkowanej struktury trójwymiarowej peptydów. Pomimo zmian na widmie CD peptydu **K12**, krzywa denaturacji tego peptydu wykazuje sigmoidalny kształt (**Rysunek 62**), co sugeruje kooperatywne zwijanie oraz bardzo wysoką stabilnością temperaturową opisaną wartością  $T_m$  równą 85,4°C. Minibiałko **K12** charakteryzowało się również najwyższą rozpuszczalnością z grupy, a w buforze fosforanowym rozpuszczał się lepiej niż peptyd startowy **K7**. Wysoka rozpuszczalność pozwoliła na przeprowadzenie prób uzyskania bardziej szczegółowych informacji strukturalnych z wykorzystaniem 2D NMR oraz krystalizacji. W przypadku NMR otrzymane widma nie były możliwe do rozwiązania. Nie udało się uzyskać, także, kryształów w żadnym z warunków.

### 3.3.2. Inhibitory na bazie rusztowań zawierających trzy reszty $\beta$ -aminokwasowe

#### 3.3.2.1. Projektowanie

Na bazie peptydu **K7** zaprojektowano również grupę inhibitorów. Mutacje mające na celu wprowadzenie powinowactwa do PD-L1 zostały wprowadzone na powierzchni antyrównoległe ułożonych  $\beta$ -kartek, ze względu na ich podobieństwo do powierzchni PD-1, która oddziałuje z PD-L1. W celu zbudowania modelu kompleksu inhibitor/PD-L1 wykorzystano protokół Docking oprogramowania RosettaDock.

Po skonstruowaniu modelu kompleksu, przeprowadzono analizę struktury pod kątem możliwości wprowadzenia mutacji, które zwiększyłyby aktywność.

Pierwsza proponowana mutacja polegała na zamianie Ile4 na resztę fenyloalaniny. Wprowadzenie w tej pozycji większej, hydrofobowej reszty może umożliwić oddziaływanie typu  $\pi$ -alkil z  $_{PD-L1}$ Val6.

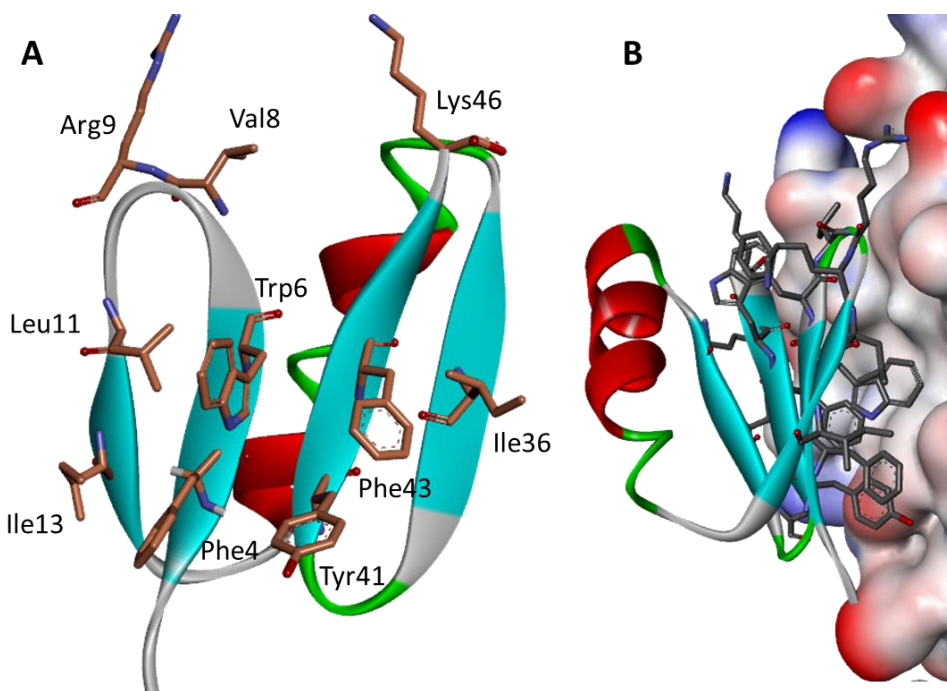
Następnie rozważano wprowadzenie mutacji w pozycji Tyr6. Wprowadzenie w tej pozycji reszty tryptofanu może prowadzić do efektywniejszego wypełnienia objętości pomiędzy powierzchnią PD-L1 a powierzchnią inhibitora. Reszta tryptofanu zapewnia również dodatkowe oddziaływania niepolarne w obrębie hydrofobowej kieszeni z  $_{PD-L1}$ Ile54,  $_{PD-L1}$ Tyr56 oraz  $_{PD-L1}$ Val68. Dodatkowo, obecność hydroksylowej grupy tyrozyny może zakłócać oddziaływania w obrębie hydrofobowej powierzchni, dlatego rozważano w tej pozycji również fenyloalaninę.

Następnie, zaproponowano zamianę polarnej reszty Asp8 na reszty niepolarne, takie jak walina lub prolina, które mogą oddziaływać z resztą  $_{PD-L1}$ Ala52. Reszta prolina wydaje się tu szczególnie obiecująca ze względu na występowanie w obrębie pętli. W tej pozycji rozważano również resztę seryny.

Zaproponowano również zamianę Lys9 na resztę argininy, która dzięki swojemu dłuższemu łańcuchowi bocznemu może tworzyć mostek solny z  $_{PD-L1}$ Asp49. Dalej, rozważano zamianę Ile11 na resztę leucyny, która wydaje się lepiej wpasowywać do kształtu powierzchni PD-L1.

Następnie, Tyr13 zastąpiono resztą hydrofobową, taką jak izoleucyna lub fenyloalanina, ze względu na jej ulokowanie w pobliżu  $_{PD-L1}$ Tyr56. Resztę Asn26 rozważano do zamiany na resztę niepolarną, taką jak izoleucyna lub fenyloalanina, ze względu na jej występowanie w obrębie hydrofobowej kieszeni, w pobliżu  $_{PD-L1}$ Tyr123.

Z kolei, w przypadku Asn38 rozważano jej zamianę na resztę kwasu asparaginowego ze względu na blisko położone reszty  $_{PD-L1}$ Arg113 i  $_{PD-L1}$ Arg125, z którymi może tworzyć oddziaływania polarne. Ile41 znajdującą się na granicy obszaru hydrofobowego i polarnego zastąpiono resztą tyrozyny, asparaginy lub lizyny, co miało zapewnić oddziaływania z oboma obszarami. Małą, niepolarną resztę Ile43 zastąpiono większymi aromatycznymi resztami, takimi jak fenyloalanina lub tryptofan, ze względu na jej położenie na środku hydrofobowej powierzchni oddziaływania z PD-L1.

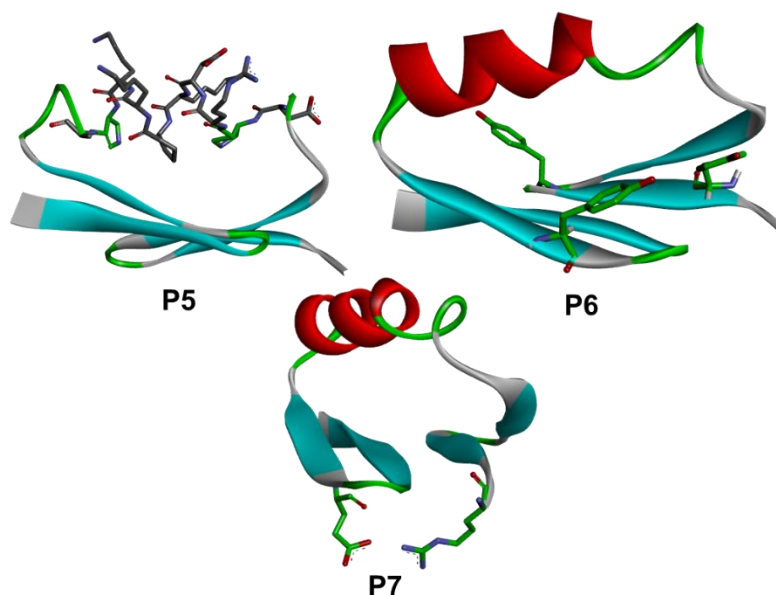


**Rysunek 63.** (A) Wymodelowana struktura **P1** z mutacjami zaznaczonymi kolorem pomarańczowym (B) Wymodelowana struktura kompleksu **P1/PD-L1**



Na bazie powyższej analizy wybrano miejsca i rodzaje mutacji. Następnie poprzez zastosowanie metod obliczeniowych – protokołu FastDesign oprogramowania Rosetta wybrano cztery sekwencje **P1–P4**, o najlepszej ocenie (ang. *score*), które zostały przeznaczone do dalszych etapów badań (**Tabela 22, Rysunek 63**).

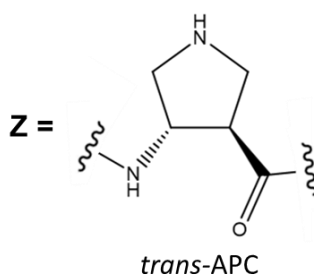
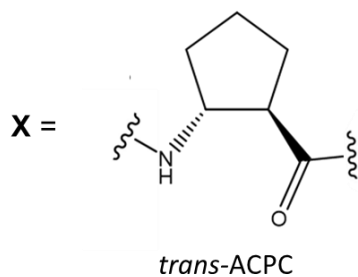
Ze względu na niską rozpuszczalność peptydów z pierwszej grupy (**P1–P4**) wprowadzono do peptydu **P1** mutacje mające na celu zwiększenie rozpuszczalności (**P5–P7, Rysunek 64**). W sekwencji **P5** dwie z trzech reszt *trans*-ACPC zostały zastąpione resztami *trans*-APC, które zamiast pierścienia cyklopentanu zawiera pierścień piperidynowy o większej polarności ze względu na obecność atomu azotu. W inhibitorze **P6** reszty fenyloalaniny (Phe3, Phe7, Phe37) skierowane na zewnątrz hydrofobowego rdzenia zostały zastąpione resztami tyrozyny. W minibiałku **P7** wprowadzona została dodatkowa para Arg1 i Glu38, która zwiększa polarność i może tworzyć mostek solny. Zaobserwowano widoczną poprawę rozpuszczalności peptydu **P6**, która umożliwiła przeprowadzenie dalszych analiz. W związku z tym, mutacje wprowadzone w inhibitorze **P6** zostały wprowadzone w przypadku reszty inhibitorów **P2–P4**, dzięki czemu zaprojektowano minibiałka **P8–P10**.



**Rysunek 64.** Wymodelowana struktura inhibitorów **P5–P7** z zaznaczonymi mutacjami.

Tabela 22. Sekwencje zaprojektowanych minibialkowych inhibitorów.

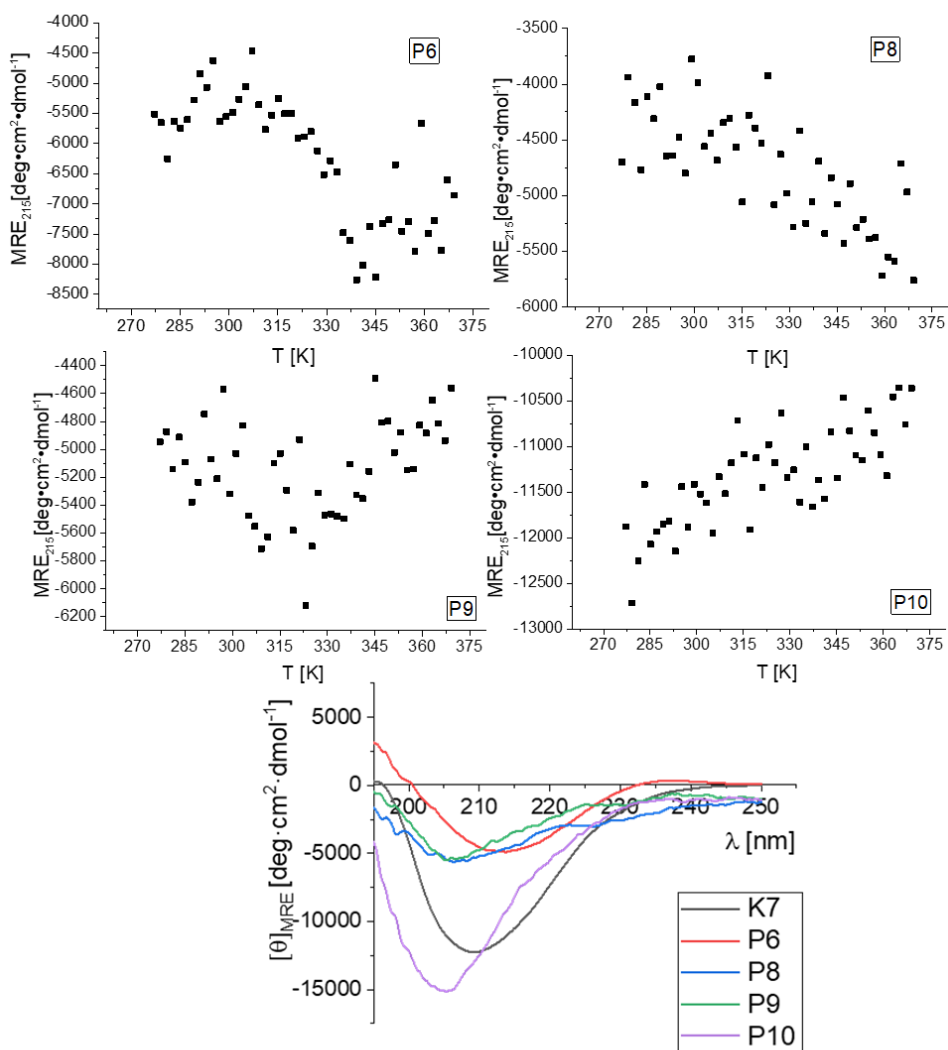
Peptyd	Sekwencja															
<b>K7</b>	1	10	20	30	40	46	EPFIF	YFDKK	IDYYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	NFNGA	IFIWG	R
<b>P1</b>							EPFF <b>F</b>	<b>W</b> FVRK	<b>L</b> DIYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	<b>I</b> FNGA	<b>Y</b> FFWG	<b>K</b>
<b>P2</b>							EPFIF	<b>W</b> F <b>S</b> KK	ID <b>I</b> YD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	<b>I</b> FNGA	<b>N</b> FFWG	<b>K</b>
<b>P3</b>							EPFIF	<b>F</b> FPRK	ID <b>I</b> YD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	<b>F</b> FDGA	<b>K</b> FWWG	<b>K</b>
<b>P4</b>							EPFIF	Y <b>F</b> PKK	ID <b>F</b> YD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	<b>I</b> FDGA	<b>K</b> FWWG	<b>Q</b>
<b>P5</b>							EPFFF	WFVRK	LDIYD	NPDD <b>Z</b>	RDKXX	<b>K</b> ZADD	NNGKF	IFNGA	YFFWG	K
<b>P6</b>							EP <b>Y</b> FF	<b>W</b> FVRK	LDIYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	<b>I</b> YNGA	YFFWG	K
<b>P7</b>							<b>R</b> PFFF	WFVRK	LDIYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	IF <b>E</b> GA	YFFWG	K
<b>P8</b>							EP <b>Y</b> IF	<b>W</b> S <b>K</b> K	IDIYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	<b>I</b> YNGA	NFFWG	K
<b>P9</b>							EP <b>Y</b> IF	<b>F</b> YPRK	IDIYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	<b>F</b> YDGA	KFWWG	K
<b>P10</b>							EP <b>Y</b> IF	<b>Y</b> F <b>P</b> KK	IDFYD	NPDDX	RDKXX	KXADD	NNGKF	<b>I</b> YDGA	KFWWG	Q



### 3.3.2.2. Analiza strukturalna

Przeprowadzenie analizy strukturalnej z użyciem CD dla inhibitorów **P1–P4** oraz **P5** i **P7** nie było możliwe ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność peptydów w buforze fosforanowym pH 7.5. Przeprowadzono również próby rozpuszczenia peptydów w buforze z dodatkiem 5% acetonitrylu oraz 5% DMSO. W żadnym wypadku nie otrzymano rozpuszczalności umożliwiającej przeprowadzenie pomiarów.

Mutacje wprowadzone w peptydach **P6**, **P8**, **P9**, **P10** zwiększyły rozpuszczalność i pozwoliły na przeprowadzenie pomiarów CD w buforze fosforanowym o pH 7.5. Na otrzymanych widmach CD zaobserwowano niższą intensywność eliptyczności (**P6**, **P8**, **P9**) oraz przesunięcie minimum w kierunku niższych długości fal do ok 203 nm (**P10**) wskazują na znaczne obniżenie stabilności konformacyjnej na skutek wprowadzonych mutacji. Potwierdzają to krzywe denaturacji uzyskane dla peptydów, które nie wykazują sigmoidalnego kształtu krzywej i, podobnie jak w przypadku wcześniejszej grupy (**Rysunek 65**), wskazują na brak stabilnej struktury trzeciorzędowej minibiałek.



**Rysunek 65.** Widma CD oraz krzywe denaturacji termicznej przy długości fali 215 nm dla inhibitorów w buforze fosforanowym pH 7.5. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE).

### 3.3.2.3. Aktywność biologiczna

Przeprowadzenie pomiarów aktywności biologicznej z wykorzystaniem BLI dla inhibitorów z tej grupy nie było możliwe ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność peptydów w buforach wykorzystywanych do eksperymentów.

### 3.3.2.4. Wnioski

W pierwszej grupie peptydów **K1–K7** udało się uzyskać jedno rusztowanie, **K7**, które wykazywało korzystne cechy strukturalne, takie jak odpowiednia rozpuszczalność, pozwalająca na przeprowadzenie pomiarów CD, kooperatywne zwijanie oraz wysoką stabilność termiczną, scharakteryzowaną przez wartość  $T_m$  wynoszącą 76°C. Niestety, próby uzyskania bardziej szczegółowych danych strukturalnych za pomocą technik takich jak 2D NMR i krystalografia zakończyły się niepowodzeniem. Niemniej jednak, **K7** zostało wykorzystane jako rusztowanie do projektowania zoptymalizowanych rusztowań oraz inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1.

Celem optymalizacji rusztowań było przede wszystkim zwiększenie ich rozpuszczalności (**K8–K12**) oraz poprawa stabilności konformacyjnej i rozpuszczalności (**K13–K15**). W ramach tych działań udało się uzyskać jedno minibiałko, **K12**, które wyróżniało się zwiększoną rozpuszczalnością oraz wyjątkową stabilnością termiczną, opisaną wartością  $T_m$  równą 85,4°C. Podobnie jak w przypadku peptydu **K7**, próby uzyskania bardziej szczegółowych danych dotyczących struktury nie zakończyły się sukcesem.

Minibiałka należące do pierwszej grupy inhibitorów opartych na strukturze **K7**, oznaczone jako **P1–P4**, charakteryzowały się bardzo niską rozpuszczalnością, co uniemożliwiło przeprowadzenie jakichkolwiek analiz. Ta niska rozpuszczalność prawdopodobnie wynikała z wprowadzenia dodatkowych reszt hydrofobowych, które mogły zwiększać tendencję peptydów do agregacji. Niemniej jednak, przeprowadzono optymalizację sekwencji rusztowań, co doprowadziło do zwiększenia rozpuszczalności dla peptydów **P6**, **P8**, **P9** i **P10**, co umożliwiło przeprowadzenie pomiarów CD. Niestety, wyniki tych pomiarów

nie były obiecujące i wskazywały na niską rozpuszczalność oraz niską stabilność konformacyjną uzyskanych inhibitorów. Dodatkowo, ze względu na wytrącenia w buforach stosowanych w eksperymentach BLI i HTRF, nie była możliwa analiza aktywności biologicznej zaprojektowanych inhibitorów.

Podsumowując, choć uzyskano korzystne cechy strukturalne w przypadku peptydów **K7** i **K12**, projektowanie inhibitorów opartych na tych rusztowaniach nadal stanowi wyzwanie ze względu na problemy z rozpuszczalnością i stabilnością konformacyjną. Do dalszego rozwoju tych rusztowań oraz zaprojektowanych na ich bazie inhibitorów, konieczne są dodatkowe badania strukturalne, takie jak na przykład wykorzystanie technik 2D NMR lub krystalografii. Następnie można przystąpić do dalszych modyfikacji i optymalizacji w celu uzyskania peptydów o lepszych właściwościach biologicznych.

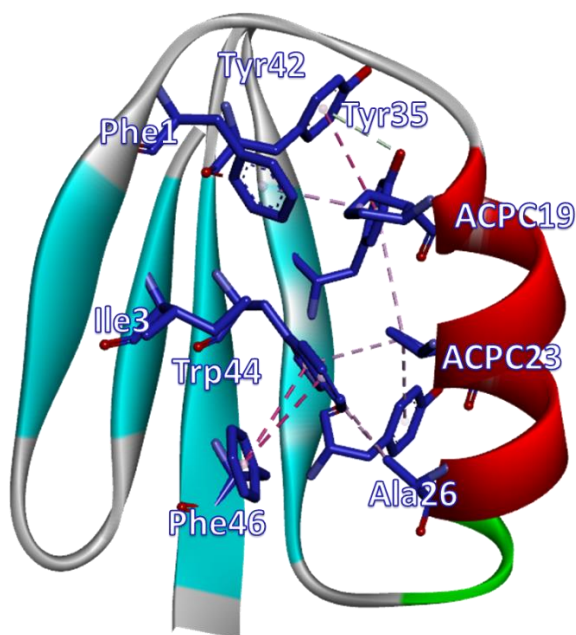
W związku z mało obiecującymi wynikami dla grupy minibiałek zawierających trzy reszty  $\beta$ -aminokwasowe, zaprojektowano nowe rusztowania, tym razem zawierające dwie reszty  $\beta$ -aminokwasowe.

### 3.3.3. Rusztowania zawierające dwie reszty $\beta$ -aminokwasowe

#### 3.3.3.1. Projektowanie

Grupa rusztowań zawierających dwie reszty *trans*-ACPC została zaprojektowana *de novo* na bazie topologii EEHEE, gdzie 'E' oznacza  $\beta$ -nić, a 'H' — helisę zawierającą  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokwasy. Jako konformacją łańcucha głównego do obliczeń wybrano konformację znanego minibiłka, domeny GB1 (PDB ID: 3GB1<sup>135</sup>), o takiej samej topologii.

Strategia projektowania tej grupy minibiłków zakładała: stabilizację trzeciorzędowej struktury peptydów przez występowanie hydrofobowego rdzenia oraz obecność helisy zbudowanej z  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokwasów zawierającej motyw  $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ , gdzie  $\alpha$  oznacza ' $\alpha$ '-aminokwas, a ' $\beta$ ' — *trans*-ACPC. Hydrofobowy rdzeń jest stabilizowany przez oddziaływania niepolarne pomiędzy resztami w pozycjach Phe1, Ile3, Ala26, Tyr33, Tyr35, Tyr42, Trp44 i Phe46, a także resztami *trans*-ACPC w pozycjach 19 i 23, które skierowane są do wnętrza rdzenia (**Rysunek 66**).



**Rysunek 66.** Wymodelowana struktura O5 z zaznaczonymi resztami tworzącymi hydrofobowy rdzeń minibiłka.

Obecność dużych aromatycznych reszt pozwala na uzyskanie wysokiego stopnia upakowania rdzenia, co prowadzi do stabilizacji struktury. Dodatkowo, liczne możliwości oddziaływań między tymi resztami, takie jak interakcje typu  $\pi$ - $\pi$  czy  $\pi$ -alkil, również pozwalają na efektywną stabilizację hydrofobowego rdzenia i w rezultacie całej trzeciorzędowej struktury minibiałka (**Rysunek 66**).

Dodatkowo, w celu zwiększenia stabilności strukturalnej zaprojektowanych rusztowań, wprowadzono w obrębie pierwszej i drugiej  $\beta$ -nici motyw stabilizujący strukturę  $\beta$ -spinki.<sup>136</sup> Motyw ten składa się z dwóch elementów. Pierwszym z nich jest niekowalencyjne oddziaływanie typu kation- $\pi$  pomiędzy dwiema resztami tryptofanu i jedną resztą lizyny na zewnętrznej stronie  $\beta$ -spinki. Drugim elementem jest pętla łącząca nici, zbudowana z motywu pP, gdzie 'p' oznacza D-Pro, a 'P' — L-Pro (**Rysunek 67**).

Pozostałe reszty aminokwasowe zostały wybrane przy użyciu protokołu FastDesign oprogramowania Rosetta. Cztery sekwencje o najlepszej ocenie (ang. *score*), **O1–O3** oraz **O5**, zostały wybranych do dalszych badań. Dodatkowo, zsyntetyzowano sekwencję opartą na **O3**, w której reszty kwasu asparaginowego zostały zastąpione resztami kwasu glutaminowego we fragmentach DG. Ta zmiana była konieczna ze względu na problem z występowaniem reakcji ubocznych prowadzących do cyklizacji kwasu asparaginowego i powstawania aspartamidu (**Tabela 23, Rysunek 67**).

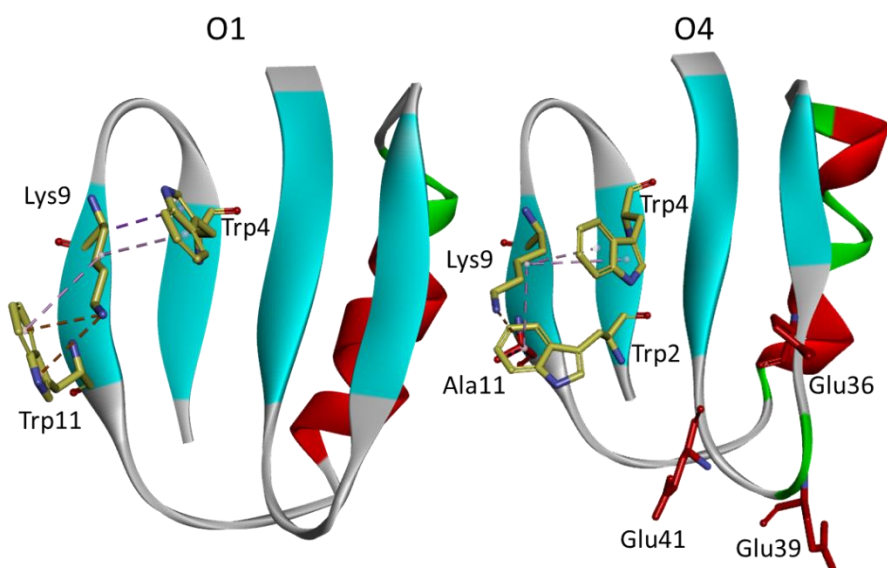
Należy zaznaczyć, że zaprojektowane sekwencje wykazują jedynie 25% identyczności z sekwencją oryginalnego minibiałka – domeny GB1. Dlatego można je uznać za całkowicie nowe sekwencje, zaprojektowane *de novo* (**Tabela 24**).



**Tabela 23.** Sekwencje minibiłek zaprojektowanych *de novo*. Kolorem czerwonym zostały oznaczone reszty aminokwasowe, którymi peptydy **O2–O5** różnią się od peptydu **O1**, żółtym - reszty przeznaczone do tworzenia oddziaływania kation- $\pi$ , niebieskim — pętle pP.

Peptyd	Sekwencja																																																	
<b>O1</b>	F	V	I	W	A	p	P	G	K	R	W	A	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	D	G	K	Y	F	W	I	F	A	P			
<b>O2</b>	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	D	G	K	Y	F	W	I	F	A	P			
<b>O3</b>	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	D	G	E	Y	F	W	I	F	A	P			
<b>O4</b>	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	E	G	R	E	G	E	Y	F	W	I	F	A	P
<b>O5</b>	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	R	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	D	G	K	Y	F	W	I	F	A	P			

**X = *trans*-ACPC**



**Rysunek 67.** Wymodelowane struktury peptydów **O1** i **O4** z zaznaczonymi kolorem żółtym resztami przeznaczonymi do tworzenia oddziaływania kation- $\pi$ , czerwonym zaznaczono pozostałe mutacje.

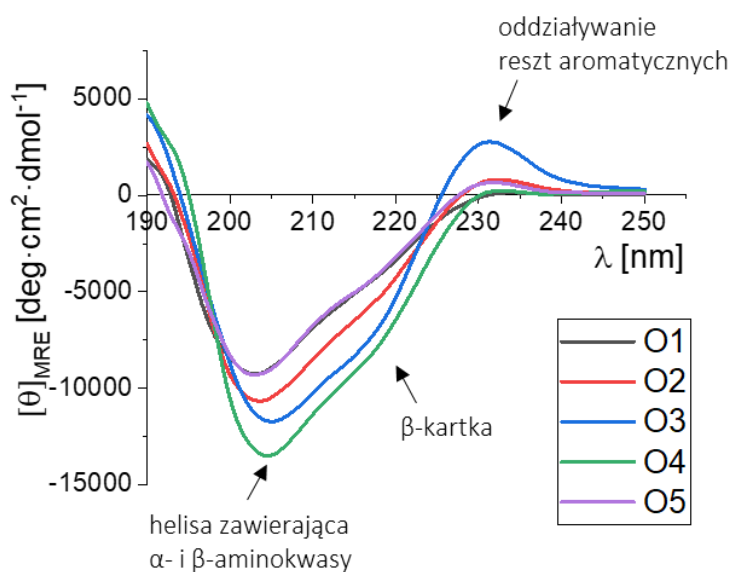
**Tabela 24.** Dopasowanie sekwencji minibiłek **O1–O5** oraz **3GB1**, pokolorowane według procentu identyczności.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48													
<b>3GB1/1-56</b>	M	T	Y	K	L	I	L	N	G	K	T	L	K	G	E	T	T	E	A	V	D	A	A	T	A	E	K	V	F	K	Q	Y	A	N	D	N	G	V	D	G	E	W	T	Y	D	D	A	T	K	T	F	T	V	T	E						
<b>O1/1-48</b>	-	F	V	I	W	A	p	P	G	K	R	W	A	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	D	G	K	Y	F	W	I	F	A	P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....			
<b>O2/1-48</b>	-	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	D	G	K	Y	F	W	I	F	A	P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....			
<b>O3/1-48</b>	-	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	D	G	E	Y	F	W	I	F	A	P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....			
<b>O4/1-48</b>	-	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	E	G	R	E	G	E	Y	F	W	I	F	A	P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>O5/1-48</b>	-	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	R	G	P	D	D	E	X	K	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	D	G	R	D	G	K	Y	F	W	I	F	A	P	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....			

### 3.3.3.2. Analiza strukturalna zaprojektowanych *de novo* rusztowań

W związku z ograniczoną rozpuszczalnością otrzymanych minibiałek w buforze fosforanowym o stężeniu 50 mM o pH 7,5, pomiary CD przeprowadzono również w H<sub>2</sub>O przy stężeniu peptydów wynoszącym 50 μM. W wyniku braku buforu w badanych roztworach, pH różniło się między próbkami: wynosiło 5,24 dla **O1**, 6,05 dla **O2**, 3,71 dla **O3**, 5,03 dla **O4** i 5,52 dla **O5**. Fluktuacje pH były spowodowane niewielką zawartością kwasu trifluorooctowego w próbkach, co wynikało z procesu oczyszczania za pomocą HPLC, gdzie elenty zawierały 0,05% TFA.

Założona struktura minibiałek składa się z 4 antyrównoległe ułożonych nici β oraz helisy zawierającej α- i β-aminokwasy. W związku z tym na widmie CD spodziewano się obecności dwóch minimów przy długościach fal: 206 nm charakterystycznego dla występowania helisy zawierającej α- i β-aminokwasy<sup>137</sup> i 217 nm typowego dla struktury antyrównoległej β-kartki<sup>138</sup> oraz maksimum przy długości fali 230 nm wskazującego na występowanie oddziaływań typu π-π pomiędzy resztami aromatycznymi (**Rysunek 68**).<sup>139,140</sup>



**Rysunek 68.** Widma CD dla minibiałek otrzymane w H<sub>2</sub>O z zaznaczonymi sygnałami wskazującymi na występowanie w strukturze minibiałek założonych, podczas projektowania, struktur drugorzędowych.

Analiza otrzymanych widm CD wykazała, że dla peptydu **O1** widmo CD wykazuje minima przy długościach fal 206 oraz 217 nm, jednak nie obserwuje się żadnego sygnału przy 230 nm (**Rysunek 68, Tabela 25**). Natomiast dla peptydów **O2** i **O3** widoczne są wszystkie trzy sygnały. Peptydy te różnią się od siebie położeniem reszty tryptofanu na powierzchni antyrównoległej  $\beta$ -kartki. W przypadku **O1**, reszta tryptofanu znajduje się w pozycji 11, podczas gdy w **O2** i **O3** jest w pozycji 2. Można przypuszczać, że różnice w wynikach otrzymanych dla tych peptydów wynikają właśnie z oddziaływań pomiędzy Trp2 i Trp4, które występują w minibiałkach **O2** i **O3**, ale nie mają miejsca w **O1** pomiędzy Trp4 a Trp11.

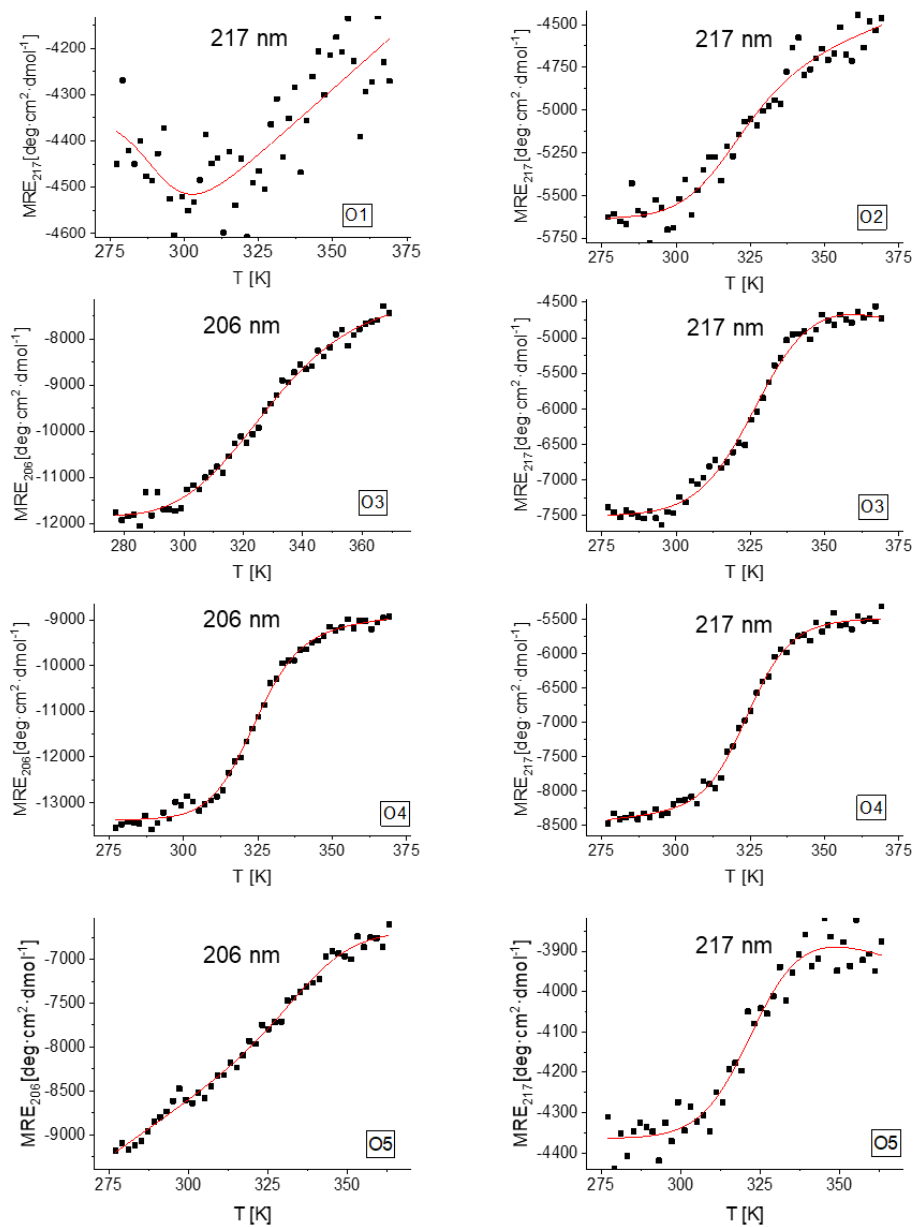
Dodatkowo, krzywe denaturacji peptydów **O1** i **O2** (**Rysunek 69**) wykazują liniowy kształt krzywej przy długościach fal 206 i 230 nm, natomiast dla **O2** przy 217 nm uzyskano sigmoidalny kształt krzywej, co wskazuje na występowanie kooperatywnego zwijania. To może sugerować wyższą stabilność konformacyjną peptydu **O2**, wynikającą z zamiany pozycji reszty tryptofanowej na powierzchni  $\beta$ -kartki. W przypadku **O3** uzyskano sigmoidalny kształt krzywej denaturacji nie tylko przy długości fali 217 nm, ale również przy 206 nm. To może sugerować, że wprowadzona reszta kwasu glutaminowego w pozycji 41 wpływa na stabilizację hydrofobowego rdzenia oraz oddziaływania między helisą a  $\beta$ -kartką. Niestety analiza strukturalna uzyskanego modelu nie dostarcza odpowiedzi na pytanie, dlaczego mutacja K41E prowadzi do zwiększenia stabilności konformacyjnej peptydu. Może to wynikać z niezgodności pomiędzy strukturą modelową, a strukturą rzeczywistą.

Peptyd **O4**, który powstał na bazie **O3**, a wprowadzone mutacje miały na celu uniknięcie reakcji ubocznych na łańcuchu bocznym reszt kwasu asparaginowego, wykazywał, zgodnie z oczekiwaniami, niemal identyczne cechy jak **O3**, z wyjątkiem braku znaczącego maksimum przy 230 nm. Widmo CD peptydu **O5** wykazywało wszystkie trzy minima, jednak kształt sigmoidalny krzywej denaturacji uzyskano tylko dla długości fali 217 nm.

Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, że peptyd **O3** cechuje się najkorzystniejszymi cechami strukturalnymi w porównaniu do pozostałych minibiałek w tej grupie. Widmo CD peptydu **O3** wykazuje obecność wszystkich trzech oczekiwanych minimów przy 206, 217 i 230 nm, co potwierdza obecność oczekiwanych struktur drugorzędowych oraz oddziaływań w obrębie jego struktury (**Tabela 25**). Dodatkowo, uzyskane krzywe denaturacji świadczą o kooperatywnym zwijaniu i stosunkowo wysokiej stabilności termicznej, co jest scharakteryzowane przez wartość  $T_m$  przekraczającą 50°C. Niestety, ze względu na obecność kwasu asparaginowego w fragmentach DG w sekwencji, proces syntezy i oczyszczania peptydu **O3** był znacznie utrudniony. Z tego powodu zdecydowano się kontynuować optymalizację peptydu **O4**, które wykazuje podobne cechy, przy czym reszty kwasu asparaginowego w jego sekwencji zostały zastąpione kwasem glutaminowym.

**Tabela 25.** Podsumowanie wyników pomiarów CD dla peptydów. W tabeli za pomocą oznaczenia ✓ zaznaczono obecność minimów przy długościach fal 205 i 217 nm oraz maksimum przy 230 nm na widmie CD w stałej temperaturze. Dodatkowo w nawiasach podano wartości temperatury rozfałdowywania ( $T_m$ ) dla tych peptydów i długości fal, dla których otrzymano krzywe denaturacji termicznej o sigmoidalnym kształcie świadczące o kooperatywnym zwijaniu minibiałek.

$\lambda$ [nm]	O1	O2	O3	O4	O5
<b>H<sub>2</sub>O</b>					
<b>206</b>	✓	✓	✓ (52,2 ± 4,8°C)	✓ (52,7 ± 0,76°C)	✓
<b>217</b>	✓	✓ (45,8 ± 5,6°C)	✓ (56,4 ± 2,6°C)	✓ (51,51 ± 0,77°C)	✓ (50,9 ± 3,6°C)
<b>230</b>		✓	✓		✓



**Rysunek 69.** Krzywe denaturacji termicznej dla peptydów w H<sub>2</sub>O. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE).

### 3.3.3.3. Optymalizacja rusztozań pod kątem stabilności i rozpuszczalności

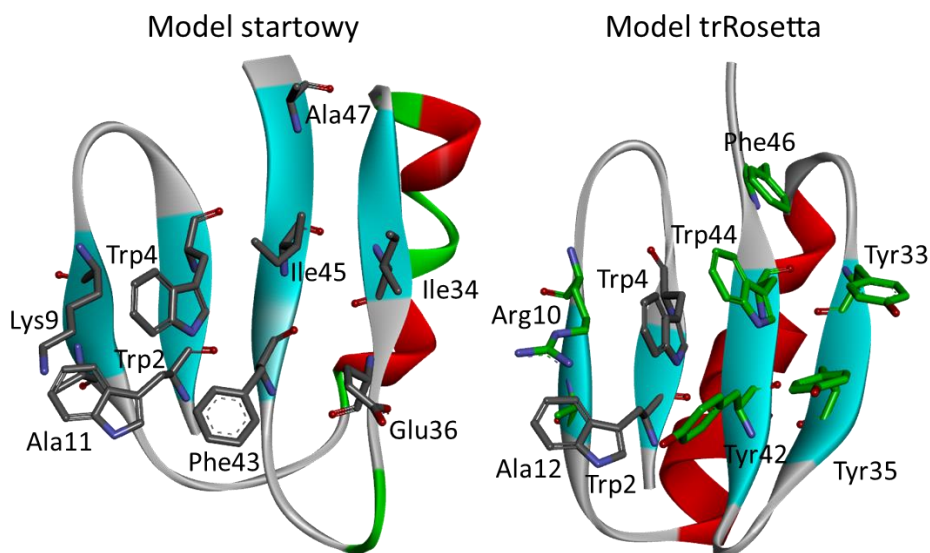
Ze względu na brak jasnego wyjaśnienia wpływu mutacji K41E na stabilizację struktury w przypadku peptydów **O3** i **O4** oraz wątpliwości co do prawidłowości struktury modelowej, podjęto decyzję o przewidzeniu sekwencji zaprojektowanych peptydów za pomocą oprogramowania trRosetta.<sup>141</sup> Dodatkowo, wybrano opcję przewidywania struktury bez wykorzystania szablonów z bazy PDB.

Oprogramowanie trRosetta jest przystosowane wyłącznie do analizy palety naturalnych aminokwasów. W związku z tym, reszty *trans*-ACPC w sekwencji zostały zastąpione alaniną, a reszty D-proliny zostały zastąpione glicyną. Wybór alaniny wynika z jej zdolności do promowania powstawania helisy, a także z faktu, że jej grupa boczna jest mała i hydrofobowa, co minimalizuje dodatkowe oddziaływania, które nie występowały w oryginalnej strukturze. Jednocześnie alanina może stabilizować hydrofobowy rdzeń, podobnie jak *trans*-ACPC, zachowując strukturę helisy zbliżoną do oryginalnej. Zastąpienie D-proliny glicyną zostało przeprowadzone ze względu na podobne właściwości obu aminokwasów. Oba te aminokwasy ze względu na swoje właściwości strukturalne występują w obrębie pętli, których powstawanie determinują. Należy jednak zauważyć, że wprowadzone zmiany obniżają wiarygodność otrzymanych modeli w porównaniu do natywnych peptydów. Mimo to, przeprowadzona analiza może dostarczyć pewnych wskazówek podczas projektowania.

Analiza otrzymanych modeli wykazała, że zarówno model startowy, jak i model uzyskany przy użyciu trRosetty, są bardzo podobne, różniąc się jedynie w szczegółach. Konkretnie, zauważono różnice w położeniu niektórych reszt aminokwasowych na powierzchni  $\beta$ -nici. To oznacza, że pewne reszty, które pierwotnie znajdowały się na powierzchni minibiałka, w strukturze otrzymanej przy użyciu trRosetta znalazły się wewnątrz hydrofobowego rdzenia (**Rysunek 70**).

Różnice w położeniu aminokwasów zaobserwowano w obrębie drugiej, trzeciej i czwartej  $\beta$ -nici. Może to wynikać z obecności reszt hydrofobowych

zarówno w wnętrzu rdzenia, jak i na zewnątrz. Umieszczenie hydrofobowych reszt na zewnątrz rusztowania było podyktowane jego przeznaczeniem do blokowania oddziaływań PD-1/PD-L1 na kolejnych etapach projektowania.



**O4** FWIWA pPGKR AAGPD DDEXK DRXKE AKNKK DIYIY EGREG EYFWI FAP  
**O4\_t** FWIWA GPGKR AAGPD DDEAK DRAKE AKNKK DIYIY EGREG EYFWI FAP

**Rysunek 70.** Model startowy **O4** oraz model otrzymany z wykorzystaniem oprogramowania trRosetta oraz sekwencja **O4** oraz wersja zmodyfikowana w celu analizy w oprogramowaniu rRosetta. W sekwencji, pogrubioną czcionką oznaczono reszty znajdujące się na powierzchni  $\beta$ -karki w modelu startowym, kolorem zielonym reszty znajdujące się na powierzchni  $\beta$ -karki w modelu przewidzianym przez trRosettę.

W związku z otrzymanymi wynikami, przeprowadzono następnie optymalizację sekwencji minibiałka **O4** w celu zwiększenia stabilności i rozpuszczalności peptydów (**Tabela 26**).

Pierwsza strategia polegała na wprowadzenia mutacji w obrębie pierwszej i drugiej  $\beta$ -nici, tak aby na zewnątrz znalazły się reszty o charakterze polarnym, zaś reszt hydrofobowe zostały skierowane do wnętrza hydrofobowego rdzenia. W związku z tym, zamieniono biorące udział w oddziaływaniu  $\pi$ -kation reszty Trp2 i Trp4 na reszty treoniny, które promują powstawanie  $\beta$ -karki oraz mają charakter polarny. W przypadku peptydu **O7** dwie reszty tryptofanu wprowadzono

w pozycjach 3 i 5, aby zwiększyć poziom upakowania hydrofobowego rdzenia oraz umożliwić oddziaływanie typu  $\pi$ -kation z Lys9 lub Arg10 po wewnętrznej stronie minibiałka. Dodatkową resztę treoniny wprowadzono w pozycji 11 (**O8**) lub 12 (**O6** i **O7**) w celu kontrolowania położenia reszt aminokwasowych w obrębie drugiej  $\beta$ -nici.

Druga strategia skupiona była w prowadzaniu mutacji w obrębie trzeciej i czwartej  $\beta$ -nici (**O9–O11**). Podobnie jak we wcześniejszej grupie, w obrębie trzeciej  $\beta$ -nici zostały wprowadzone reszty treoniny na powierzchni, zaś w obrębie czwartej  $\beta$ -nici na powierzchni zostały wprowadzone reszty polarne reszty treoniny, histydyny oraz seryny.

Dodatkowo zaprojektowano peptyd **O12**, który posiadał mutację w obrębie wszystkich czterech  $\beta$ -nici.

**Tabela 26.** Sekwencje minibiałek. Kolorem czerwonym zostały zaznaczone wprowadzone mutacje.

Peptyd	Sekwencja																																															
	1	10	20	30	40	48																																										
<b>O4</b>	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	D	E	X	X	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	E	G	R	E	G	E	Y	F	W	I	F	A	P
<b>O6</b>	F	T	I	T	A	p	P	G	K	R	A	T	G	P	D	D	D	E	X	X	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	E	G	R	E	G	E	Y	F	W	I	F	A	P
<b>O7</b>	F	T	W	T	W	p	P	G	K	R	A	T	G	P	D	D	D	E	X	X	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	E	G	R	E	G	E	Y	F	W	I	F	A	P
<b>O8</b>	F	T	I	T	A	p	P	G	K	R	T	A	G	P	D	D	D	E	X	X	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	I	Y	I	Y	E	G	R	E	G	E	Y	F	W	I	F	A	P
<b>O9</b>	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	D	E	X	X	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	T	Y	T	Y	E	G	R	E	G	E	Y	H	W	H	F	T	P
<b>O10</b>	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	D	E	X	X	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	T	Y	T	Y	E	G	R	E	G	E	Y	H	W	T	F	S	P
<b>O11</b>	F	W	I	W	A	p	P	G	K	R	A	A	G	P	D	D	D	E	X	X	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	T	Y	I	Y	E	G	R	E	G	E	Y	H	W	T	F	S	P
<b>O12</b>	F	T	I	T	A	p	P	G	K	R	A	T	G	P	D	D	D	E	X	X	D	R	X	K	E	A	K	N	K	K	D	T	Y	T	Y	E	G	R	E	G	E	Y	H	W	H	F	T	P

**X = trans-ACPC**



#### 3.3.3.4. Analiza strukturalna zoptymalizowanych rusztowań

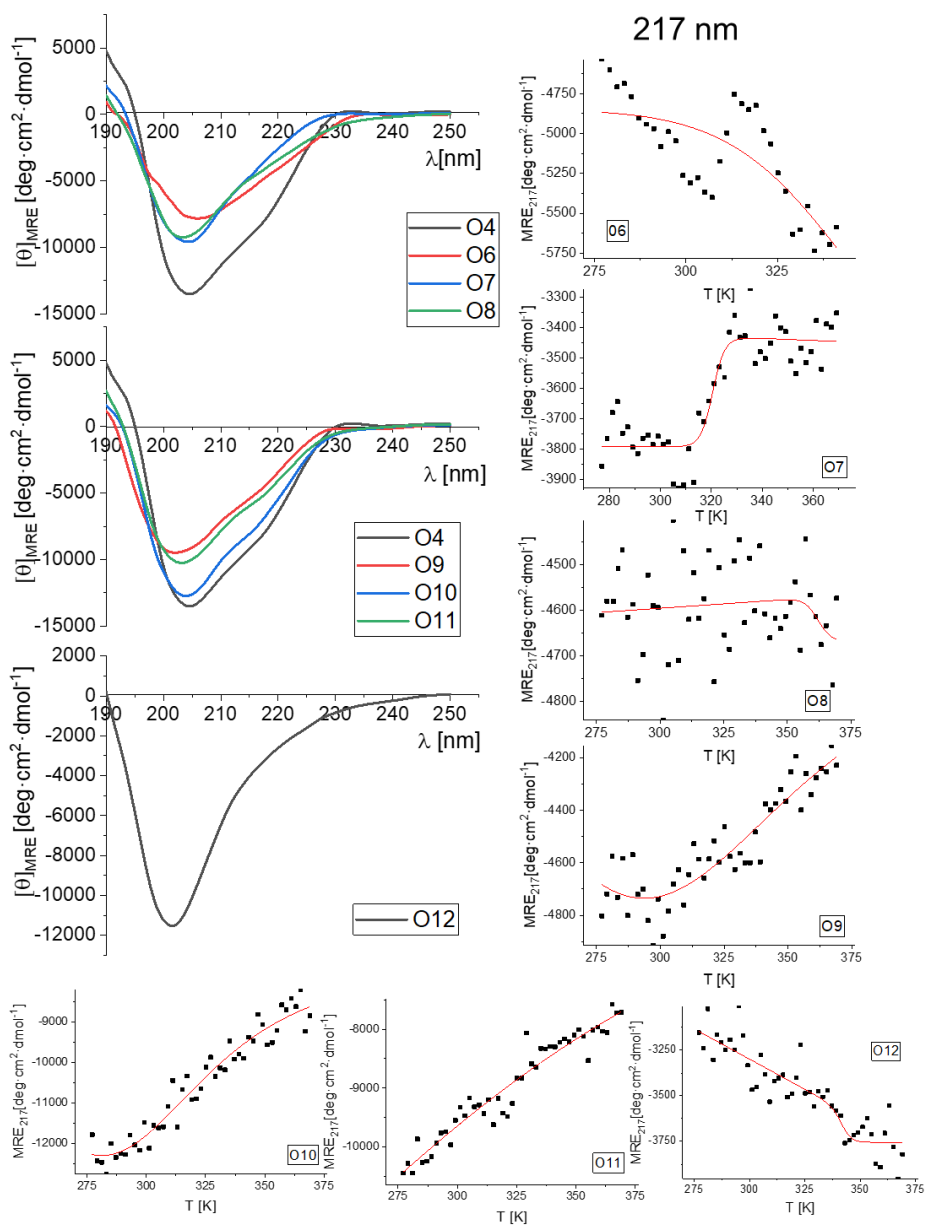
Widma CD dla peptydów **O6–O8** w H<sub>2</sub>O wykazują wyraźnie niższą intensywność sygnału CD oraz brak minimum przy 217 nm. Wskazuje to na destabilizację struktury w wyniku wprowadzonych mutacji i utratę trzeciorzędowej struktury minibiałków. Dodatkowo potwierdza to fakt, że dla żadnego z nowo zsyntetyzowanych peptydów nie uzyskano sigmoidalnego kształtu krzywej denaturacji (**Rysunek 71**).

Otrzymane dla peptydów **O9–11** widma CD w H<sub>2</sub>O charakteryzują się obecnością minimów przy 206 i 217 nm we wszystkich przypadkach, jednak nie występuje żaden sygnał przy 230 nm. Dodatkowo w żadnych przypadku nie występuje sigmoidalny kształt krzywej denaturacji, co świadczy o zmniejszeniu stabilności konformacyjnej w stosunku do minibiałka startowego **O4**.

Dla peptydu **O12** otrzymano widmo CD z pojedynczym minimum przy długości fali 201 nm co wskazuje na całkowicie rozfałdowaną strukturę minibiałka.

Większość peptydów charakteryzowało się niską rozpuszczalnością w 50 mM buforze fosforanowym pH 7.5 (widoczna precypitacji przy stężeniu 25 μM). Dobrą rozpuszczalnością (50 μM) cechował się peptyd **O8** i **O12**, jednak jego widmo CD i krzywe denaturacji wskazują destabilizację struktury i jej całkowite rozfałdowanie.

Otrzymane wyniki wskazują, że zaproponowana strategia optymalizacji struktury poprzez wprowadzenie reszt polarnych, promujących powstawanie β-kartki, na powierzchni zaprojektowanej β-kartki prowadzi do destabilizacji struktury, zamiast zwiększenia jej stabilności i rozpuszczalności. W związku z otrzymanymi obserwacjami, kolejnym krokiem była próba uzyskania bardziej szczegółowych danych strukturalnych dotyczących grupy minibiałek **O1–O5**.



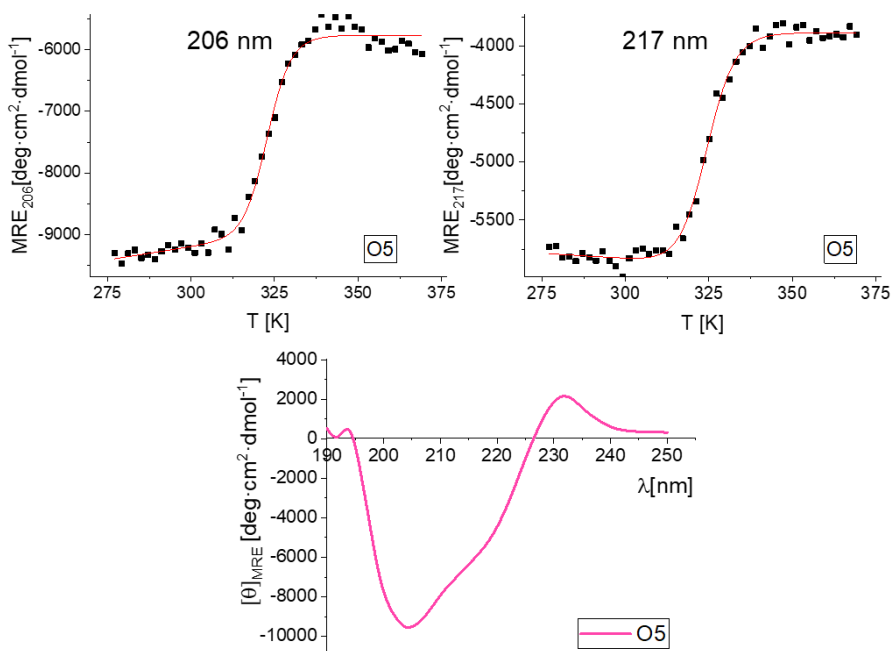
**Rysunek 71.** Widma CD i krzywe denaturacji termicznej przy długości fali 217 nm dla peptydów O6–O12 w H<sub>2</sub>O. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue ellipticity*, MRE).

### 3.3.3.5. Analiza strukturalna rusztowań w pH 6

W związku z otrzymanymi wynikami przeprowadzono analizę strukturalną otrzymanych peptydów w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6. Ze względu na niską rozpuszczalność niemal wszystkich minibiałek, obiecujące wyniki otrzymano tylko dla jednego z nich — **O5** (Tabela 27). Peptyd **O5** charakteryzował się dobrą rozpuszczalnością w buforze fosforanowym o pH 6, w którym dobrze rozpuszczał się w stężeniu 50  $\mu$ M oraz obecnością sygnałów przy wszystkich trzech długościach fal, zarówno w H<sub>2</sub>O, jak i w buforze o pH 6. Pomimo braku sigmoidalnego kształtu krzywej denaturacji przy 206 nm w H<sub>2</sub>O, kształt krzywej denaturacji wskazujący na kooperatywne zwijanie występuje przy tej długości fali w pH 6 (Rysunek 72), co nie było obserwowane dla żadnego innego minibiałka z tej grupy.

**Tabela 27.** Podsumowanie wyników pomiarów CD dla minibiałek **O1–O5**. W tabeli za pomocą oznaczenia  $\checkmark$  zaznaczono obecność minimów przy długościach fal 205 i 217 nm oraz maksimum przy 230 nm na widmie CD w stałej temperaturze. Dodatkowo w nawiasach podano wartości temperatury rozfałdowywania ( $T_m$ ) dla tych peptydów i długości fal, dla których otrzymano krzywe denaturacji termicznej o sigmoidalnym kształcie świadczące o kooperatywnym zwijaniu minibiałek.

$\lambda$ [nm]	O1	O2	O3	O4	O5
<b>Bufor fosforanowy pH 6</b>					
<b>206</b>	-	-	-	-	$\checkmark$ (51,27 $\pm$ 0,39°C)
<b>217</b>	-	-	-	-	$\checkmark$ (49,83 $\pm$ 0,50°C)
<b>230</b>	-	-	-	-	$\checkmark$



**Rysunek 72.** Widma CD i krzywe denaturacji termicznej dla peptydu **O5** w buforze fosforanowym pH 6. Wyniki pomiarów CD zostały znormalizowane ze względu na liczbę reszt aminokwasowych (ang. *mean residue elipticity*, MRE).

W związku z obiecującymi wynikami w pH 6 otrzymanymi dla minibiłka **O5** przeprowadzono próbę otrzymania kryształów tego peptydu w celu uzyskania struktury krystalicznej przy pomocy krystalografii rentgenowskiej. Dotychczas, nie udało się otrzymać kryształów peptydu **O5**.

### 3.3.3.6. Wnioski

Podsumowując, w grupie rusztowań zawierających dwie reszty  $\beta$ -aminokwasowe, peptyd **O3** wykazywał najkorzystniejsze cechy w badaniach w przeprowadzonych w H<sub>2</sub>O. Widmo CD minibiałka **O3** wykazywało obecność oczekiwanych struktur drugorzędowych oraz oddziaływań w obrębie jego struktury, a krzywe denaturacji wskazywały na stosunkowo wysoką stabilność termiczną i kooperatywne związanie. Niestety, synteza tego peptydu była znacznie utrudniona ze względu na cyklizację kwasu asparaginowego. Aby uniknąć tego problemu, opracowano peptyd **O4**, w którym reszty kwasu asparaginowego zostały zastąpione resztami kwasu glutaminowego. Niestety, **O4** nie wykazywał tak korzystnych cech strukturalnych H<sub>2</sub>O, a dokładniej nie miał maksimum na widmie CD przy długości fali 230 nm, co sugeruje brak oddziaływań typu  $\pi$ - $\pi$  pomiędzy resztami aromatycznymi. Warto jednak zauważyć, że pH roztworów obu peptydów znacząco się różniło, wynosząc 3,71 dla **O3** i 5,03 dla **O4**, co było efektem obecności TFA w próbce. Różnice w widmach CD mogą wynikać z tych różnic w pH, co sprawia, że wyniki te są trudne do porównania. Dlatego też przeprowadzono później analizę w buforze o niższym pH wynoszącym 6.

Peptyd **O4** został wybrany do dalszej optymalizacji, ale zaproponowana strategia optymalizacji rusztowań nie przyniosła oczekiwanych rezultatów w zakresie uzyskania peptydów o lepszych właściwościach strukturalnych. Niestety, ilość syntetyzowanych peptydów w tej grupie była znacznie ograniczona z powodu trudności w procesie syntezy. Synteza peptydów o takiej długości, których sekwencje składają się z 48 reszt aminokwasowych, a dodatkowo zawierają nienaturalne aminokwasy, takie jak *trans*-ACPC, jest kosztowna i czasochłonna. Dodatkowo takie próby często kończą się niepowodzeniem lub charakteryzują się bardzo niską wydajnością. Dlatego też zdecydowano się na dalszą analizę już zsyntetyzowanych peptydów.

Analizy przeprowadzone w buforze fosforanowym o pH 6 wykazały, że peptyd **O5** jest najlepszym kandydatem do badań w ustabilizowanym pH. Wyniki CD uzyskane dla minibiałka **O5** wskazują na obecność wszystkich oczekiwanych struktur drugorzędowych oraz oddziaływań, a krzywe denaturacji potwierdzają

jego wysoką stabilność termiczną i kooperatywne zwijanie. W związku z tymi obiecującymi wynikami, peptyd **O5** został wybrany do dalszych badań strukturalnych, które obecnie są prowadzone przy użyciu technik 2D NMR i krystalografii.

Ze względu na trudności w procesie syntezy oraz wątpliwości co do poprawności modelu strukturalnego, zdecydowano się na odłożenie projektowania inhibitorów opartych na rusztowaniach z tej grupy do momentu uzyskania eksperymentalnej struktury. Niepewność dotycząca rzeczywistego ułożenia  $\beta$ -kardk w strukturze uniemożliwia racjonalne projektowanie inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1. W związku z tym na tym etapie nie kontynuowano prac nad projektowaniem inhibitorów.

## 4. PODSUMOWANIE

Celem niniejszej pracy było uzyskanie peptydowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 o potencjale terapeutycznym w immunoterapii przeciwnowotworowej.

Pierwszym etapem pracy była synteza opatentowanego przez firmę Bristol Myers Squibb peptydowego inhibitora oddziałującego z PD-L1 — **pAC65**. Do tego celu zsyntetyzowano niedostępną komercyjnie pochodną tryptofanu oraz zoptymalizowano proces syntezy peptydu zawierającego niekanoniczne reszty aminokwasowe, w tym szczególnie trudne do sprzęgania reszty metylowane na grupie  $\alpha$ -aminowej. Następnie badania zespołu prof. Tadeusza Holaka z Uniwersytetu Jagiellońskiego udowodniły bardzo wysoką aktywność inhibitora **pAC65**, a uzyskana przez nich struktura krystaliczna stanowiła istotną inspirację podczas projektowania kolejnych grup inhibitorów w niniejszej pracy.

W grupie inhibitorów bazujących na znanych rusztowaniach minibiałkowych zawierających wyłącznie  $\alpha$ -aminokwasy, zsyntetyzowano 42 potencjalne inhibitory, 6 z nich zbudowano na bazie rusztowania wiliny, a 36 na bazie domeny „engrailed”. Część inhibitorów z pierwszej grupy charakteryzowały się niską stabilnością konformacyjną, a otrzymane wyniki sugerowały więcej niż jedno miejsce ich oddziaływania na powierzchni PD-L1. Jednakże, zaprojektowana dla nich powierzchnia oddziaływania z celem molekularnym została wykorzystana jako inspiracja do projektowania drugiej grupy. W grupie bazującej na strukturze domeny „engrailed” udało się wprowadzić powinowactwo względem PD-L1 do całkowicie nieaktywnego rusztowania, uzyskując aktywność rzędu mikromolarnego w przypadku wszystkich peptydów już w pierwszej zsyntetyzowanej grupie. Kolejne optymalizacje sekwencji pozwoliły na uzyskanie wyższej aktywności w testach z wykorzystaniem BLI i HTRF. Niestety, wprowadzenie hydrofobowej powierzchni, przeznaczonej do oddziaływania z PD-L1, obejmującej znaczną część białka, negatywnie wpłynęło na rozpuszczalność minibiałek i zwiększyło ich tendencje do agregacji. Niska rozpuszczalność w mediach komórkowych uniemożliwiła przeprowadzenie

testu blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach. W związku z tym, kolejny etap polegał na wprowadzeniu mutacji prowadzących do zwiększenia rozpuszczalności. W efekcie udało się otrzymać odpowiednio wysoką rozpuszczalność i przeprowadzić test oparty na komórkach.

Wyniki otrzymane w teście blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach świadczą o zdolności inhibitorów **E24** i **E32** do reaktywacji modelowych komórek limfoidalnych linii Jurkat w pH 6.9. Otrzymane wartości  $EC_{50}$  wynoszą odpowiednio: 5,1  $\mu\text{M}$  dla **E24** i 3,9  $\mu\text{M}$  dla **E32**. Wartości dotyczące zdolności blokowania interakcji PD-1/PD-L1 przez **E24** i **E32** są zbliżone do wyników uzyskanych dla jedynego wcześniej opublikowanego minibiałkowego inhibitora MOPD-1, który wykazuje aktywność o wartości  $IC_{50}$  wynoszącej 3,3  $\mu\text{M}$ .<sup>81</sup> Warto jednak podkreślić, że MOPD-1 jest stabilizowany dzięki obecności mostków disiarczkowych. W przeciwieństwie do tego, inhibitory przedstawione w niniejszej pracy są stabilizowane wyłącznie przez hydrofobowy rdzeń. Warto podkreślić, że dotychczas nie opublikowano żadnych minibiałkowych inhibitorów interakcji PD-1/PD-L1, które osiągałyby podobną aktywność co inhibitory opisane w naszym badaniu, jednocześnie pozostając stabilizowane przez hydrofobowy rdzeń

W grupie minibiałek zawierających  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokwasy otrzymano 37 minibiałek. Grupa ta składała się z 15 rusztowań i 9 potencjalnych inhibitorów zawierających trzy reszty  $\beta$ -aminokwasowe oraz 12 rusztowań zawierających dwie reszty  $\beta$ -aminokwasowe.

W pierwszej grupie udało się otrzymać dwa rusztowania, **K7** i **K12**, o wysokiej stabilności temperaturowej powyżej 75°C. Dla tych minibiałek przeprowadzono próby uzyskania bardziej szczegółowych informacji strukturalnych z użyciem 2D NMR oraz krystalizacji, które dotychczas nie przyniosły oczekiwanych efektów. Na bazie rusztowania **K7** zaprojektowano 10 potencjalnych inhibitorów. Pierwsza grupa, składająca się z 4 minibiałek, charakteryzowała się bardzo niską rozpuszczalnością, co uniemożliwiło jej przebadania zarówno pod kątem strukturalnym, jak i aktywności. Optymalizacja rozpuszczalności grupy potencjalnych inhibitorów zawierających trzy reszty  $\beta$ -aminokwasowe pozwoliła



na uzyskanie peptydów o zwiększonej rozpuszczalności i przebadanie ich pod kątem strukturalnym z wykorzystaniem dichroizmu kołowego. Nie udało się przeprowadzić testów aktywności biologicznej z wykorzystaniem BLI i HTRF.

W grupie rusztowań zawierających dwie reszty  $\beta$ -aminokwasowe udało się otrzymać rusztowanie **O5**, które wykazuje obiecujące cechy strukturalne, jednak konieczne są jego dalsze analizy z wykorzystaniem np. krystalografii rentgenowskiej. Potwierdzenie zgodności struktury modelowej ze strukturą eksperymentalną umożliwiłoby w przyszłości projektowanie na bazie tego rusztowania nowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1.



## 5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 5.1. Odczynniki

Wszystkie komercyjnie dostępne ropuszczalniki i odczynniki użyte w tej pracy zostały zakupione z firm: Sigma-Aldrich, Merck, Iris Biotech, Lipopharm, Trimen oraz Avantor i nie były dodatkowo oczyszczane. Dostawcą kwasu Fmoc-(1*S*-2*S*)-*trans*-aminocyklopentanokarboksyłowy (*trans*-ACPC) o czystości >95% była firma Synnovator.

### 5.2. Wspomagane komputerowo metody projektowania

Struktury PDB były oglądane za pomocą oprogramowania Discovery Studio 2020, a także przy jego użyciu tworzone były grafiki.

#### 5.2.1. Protokół FastDesign oprogramowania Rosetta

Protokół FastDesign w oprogramowaniu Rosetta<sup>142</sup> został wykorzystany do tworzenia nowych minibiałek na podstawie wcześniejszej analizy strukturalnej. Ta analiza struktury modeli umożliwiała wybór miejsc i rodzajów mutacji, które następnie były poddawane dalszej analizie przy użyciu oprogramowania Rosetta.

Protokół FastDesign umożliwia dokonywanie mutacji w określonych pozycjach w sekwencji białka, korzystając z informacji zawartych w pliku referencyjnym dotyczącym miejsc i rodzajów mutacji. Następnie, dzięki wykorzystaniu metody Monte Carlo, generowane są struktury wraz z ich oceną (ang. *score*).

Wszystkie obliczenia z wykorzystaniem protokołu FastDesign zostały przeprowadzone z użyciem pakietu Rosetta 3.10, z zastosowaniem funkcji oceniającej Beta\_nov15, liczby iteracji równej 5000 oraz filtrów polegających na ograniczeniu liczby reszt alaniny w sekwencji do 20 oraz ograniczeniu liczby par donor/akceptor, które nie tworzą wiązania wodorowego do 5.

### 5.2.2. Docking RosettaDock

Protokół Docking oprogramowania Rosetta<sup>143</sup> został wykorzystany do tworzenia modeli kompleksów rusztowań z PD-L1. Modele te były dalej wykorzystywane do projektowania inhibitorów.

RosettaDock to wielkoskalowy algorytm dokowania, który rozpoczyna się od etapu gruboziarnistego (ang. *coarse-grain stage*) przy użyciu Monte Carlo. Następnie struktury są udoskonalone w etapie wysokiej rozdzielczości, zastępując pseudo-atomy atomami łańcucha bocznego. Wykorzystano strategię próbkowania opartą o dokowanie globalne.

### 5.3. Synteza kwasu (S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)metoksy)karbonylo)amino)-3-(1-(2-(*tert*-butoksy)-2-oksoetylo)-1H-indol-3-yl)propanowego

Synteza została przeprowadzona zgodnie z protokołem<sup>78</sup> z niewielkimi modyfikacjami.

Schłodzono do 0° C roztwór Boc-Trp-OMe (2 g, 6,27 mmol) oraz węglanu cezu (2,5 g, 6,91 mmol) w 20 ml DMF, a następnie dodano do roztworu dodano bromooctanu *tert*-butylu (1,008 ml, 6,91 mmol). Następnie roztwór był mieszany w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po reakcji mieszanina reakcyjna została wlana na lód : 1M HCl (1:1) i ekstrahowana octanem etylu. Faza organiczna została przemyta solanką i wysuszona nad MgSO<sub>4</sub>, a następnie odparowana. Otrzymany produkt był oczyszczony z użyciem chromatografii Flash w układzie 0–50% heksan : octan etylu w celu otrzymania czystego produktu etapu 1-(S)-3-(1-(2-(*tert*-butoksy)-2-oksoetylo)-1H-indol-3-yl)-2-((*tert*-butoksykarbonylo)amino)propanianu metylu (1,632 g, 3,77 mmol, wydajność 60%).

Roztwór produktu etapu 1 (1,632 g, 3,77 mmol) w dioksanie (20 ml) został dodany do roztworu monohydratu wodorotlenku litu (0,158 g, 3,77 mmol) w wodzie (10 ml). Mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez całą noc. Następnie mieszanina została zneutralizowana 1M HCl

i ekstrahowana octanem etylu. Faza organiczna została przemyta solanką i wysuszona nad  $\text{MgSO}_4$ , a następnie odparowana. Produkt został oczyszczony z użyciem chromatografii w układzie 0–50% heksan : octan etylu w celu otrzymania czystego produktu etapu 2 — kwasu (*S*)-3-(1-(2-(*tert*-butoksy)-2-oksoetylo)-1H-indol-3-ilo)-2-((*tert*-butoksykarbonylo)amino)propanowego (0,58 g, 1,4 mmol, wydajność 37%).

Roztwór 4M HCl w dioksanie (10 ml) został schłodzony w kąpieli lodowej w atmosferze argonu. Produkt etapu 2 (0,58 g, 1,4 mmol) został dodany do roztworu HCl, następnie mieszanina reakcyjna była mieszana przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po reakcji, roztwór został odparowany w celu otrzymania produktu etapu 3 — kwasu (*S*)-2-amino-3-(1-(2-(*tert*-butoksy)-2-oksoetylo)-1H-indol-3-ilo)propanowego (0,41 g, 1,3 mmol)

Produkt etapu 3 (0,41 g, 1,3 mmol) został dodany do schłodzonego roztworu  $\text{NaHCO}_3$  (0,3 g, 3,57 mmol) w wodzie (10 ml) o pH 8–9, następnie dodano roztworu Fmoc-OSu (0,501 g, 1,3 mmol) w dioksanie (9 ml). Reakcja była prowadzona 18 godzin, z czego pierwsza godzina w obniżonej temperaturze w łaźni lodowej, a kolejne w temperaturze pokojowej. Po reakcji, pH mieszaniny zostało obniżone do 2 poprzez dodanie 1M HCl, a następnie ekstrahowana dichlorometanem. Faza organiczna została przemyta solanką, osuszona nad  $\text{MgSO}_4$  i odparowana. Produkt był oczyszczany z wykorzystaniem HPLC, 10–90% w układzie woda : acetonitryl na kolumnie C18 lub poprzez chromatografię Flash w tym samym układzie. Otrzymano produkt kwas (*S*)-2-(((9H-fluoren-9-yl)metoksy)karbonylo)amino)-3-(1-(2-(*tert*-butoksy)-2-oksoetylo)-1H-indol-3-yl)propanowy (0,425 g, 0,786 mmol, wydajność 60%).

MS (ESI):  $m/z$  563,2168 ( $M + \text{Na}$ , 100%), wartość teoretyczna:  $m/z$  563,2158 ( $M + \text{Na}$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DCCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7,80 (d,  $J=7,6$  Hz, 2H), 7,67 – 7,60 (m, 2H), 7,39 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H), 7,32 – 7,22 (m, 3H), 7,18 (td,  $J=7,6$ , 0,9 Hz, 1H), 7,08 (td,  $J=7,5$ , 0,9 Hz, 1H), 7,04 (s, 1H), 4,54 (dd,  $J=8,4$ , 4,9 Hz, 1H), 4,36 – 4,23 (m, 2H), 4,23 – 4,14 (m, 1H), 3,43 – 3,35 (m, 2H), 3,25 – 3,09 (m, 1H), 1,55 – 1,38 (m, 9H).

## 5.4. Synteza peptydów

### 5.4.1. Synteza przy użyciu automatycznego syntezyzatora

Peptydy były syntetyzowane z wykorzystaniem metody syntezy peptydów na podłożu stałym (ang. *solid phase peptide synthesis*, SPPS) wspomaganą mikrofalami, w aparatach Biotage® Initiator<sup>+</sup>Alastra lub Liberty Blue CEM. Do syntezy została wykorzystana żywica H-rink amide ChemMatrix® (ładowność: 0,59 mmol/g), która prowadzi do uzyskania na końcu karboksylowym peptydu grupy amidowej, w skali 0,06 mmol. W pierwszym etapie syntezy żywicę namaczano w DMF (20–60 minut), tak aby doszło do jej napełnienia i udostępnienia grup NH<sub>2</sub> przeznaczonych do reakcji. Rozpuszczalnikiem stosowanym w syntezie peptydów był DMF.

Do reakcji sprzęgania wykorzystano odczynniki sprzęgające DIC oraz Oxyma (stężenie 0,5 M w DMF, 5-krotny nadmiar molowy). Reakcję pojedynczego sprzęgania prowadzono dla Fmoc- $\alpha$ -aminokwasów (stężenie 0,1 M w DMF, 5-krotny nadmiar molowy) 15 minut w 75°C (Biotage® Initiator<sup>+</sup>Alastra) lub 4 minuty w 90°C (Liberty Blue CEM), zaś dla Fmoc- $\beta$ -aminokwasów (stężenie 0,1 M, 3-krotny nadmiar molowy) 15 minut w 75°C i 30 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję podwójnego sprzęgania prowadzono dla Fmoc- $\alpha$ -aminokwasów 2 x 1 5 minut w 75°C (Biotage® Initiator<sup>+</sup>Alastra) lub 2x4 minuty w 90°C (Liberty Blue CEM). Dla reszt histydyny i cysteiny prowadzono reakcję w obniżonej temperaturze 50°C przez 10 minut. W przypadku aminokwasów metylowanych na grupie  $\alpha$ -aminowej, w celu zwiększenia wydajności przyłączania następnej reszty aminokwasowej do grupy aminowej, kolejny aminokwas sprzęgany był podwójnie 2 x 15 minut 75°C, a czas drugiego sprzęgania był wydłużony o 6 dodatkowych godzin w temperaturze pokojowej. Do reakcji deprotekcji grupy  $\alpha$ -aminowej stosowano 20% roztwór piperidyny w DMF. Po syntezie żywica była przepłukiwana DCM.

#### **5.4.2. Odcinanie peptydów z żywicy**

Żywica z przyłączonym peptydem po syntezie była przenoszona do polipropylenowej strzykawki ze spiekami, w której peptyd był odłączany od złoża, a grupy boczne odblokowywane. W celu odłączenia zsyntezowanego peptydu od żywicy używana była mieszanina ściągająca w skład której wchodziło TFA:TIS:tioanisol:H<sub>2</sub>O (85:5:5:5), w której żywica była wytrząsana przez 3 godziny. Dla peptydu pAC65 wykorzystano mieszaninę zawierającą EDT w celu uniknięcia utleniania cysteiny (TFA:tioanisol:EDT:anisol, 90:10:6:4). Następnie peptyd był wytrącany z roztworu poprzez dodanie zimnego eteru dietylowego, a powstały osad odwirowany i oczyszczany przy użyciu HPLC.

#### **5.4.3. Cyklizacja**

Cyklizacja peptydu pAC65 była poprzedzona suszeniem peptydu z wykorzystaniem argonu po ściągnięciu peptydu z żywicy. Nieoczyszczony peptyd mieszaninie 0,1 M wodorowęglanu amonu pH 8.5 oraz acetonitrylu (2:1, v:v) oraz mieszaną przez 24 godziny. Następnie roztwór był mrożony w ciekłym azocie i liofilizowany, a w kolejnym kroku oczyszczany przy użyciu HPLC.

#### **5.4.4. Oczyszczanie peptydów**

Peptydy oczyszczane były za pomocą HPLC z wykorzystaniem aparatury UltiMate 3000 LC System (Dionex) oraz Knauer Prep na kolumnie preparatywnej C18 (Thermo Scientific, Hypersil Gold 12 μm, 250 mm x 20 mm) w układzie rozpuszczalników ACN/H<sub>2</sub>O z 0,05% dodatkiem TFA w obu eluentach. Czystość peptydów była oznaczana z wykorzystaniem HPLC analitycznego UFLC Shimadzu na kolumnie C18 (Reprosil Saphir 100 C18, 5 μm, 150 x 4.6 mm) w tym samym układzie rozpuszczalników.

#### 5.4.5. Identyfikacja produktu

Zsyntetyzowane peptydy identyfikowano za pomocą spektrometrii masowej przy użyciu systemu ATERS LCT Premier XE z detektorem czasem przelotu (TOF) i jonizacją *electrospray*.

### 5.5. Dichroizm kołowy (CD)

Pomiary CD zostały wykonane z użyciem spektrofotometru Jasco J-1500 w prostokątnej, kwarcowej kuwecie pomiarowej o długości drogi optycznej 1 mm.

#### 5.5.1. Pomiar widm CD w stałej temperaturze 25°C

Widma CD były mierzone w stałej temperaturze 25°C w zakresie długości fal 195–250 nm, co 0,2 nm, prędkość skanowania 50 nm/min, akumulując dane z pięciu skanów. Dla peptydów z serii **E** i **V** pomiary wykonywano w 50 mM buforze fosforanowym pH 7.5, w stężeniu 60 µM dla **E** i 50 µM dla **V**. Dla peptydów z serii **O** i **K** pomiary wykonywano w H<sub>2</sub>O w stężeniu 50 µM.

Intensywność CD została przedstawiona jako resztowa eliptyczność molowa ( $[\Theta]_{\text{MRE}}$ ) z uwzględnieniem liczby reszt aminokwasowych w sekwencji.

#### 5.5.2. Pomiary temperaturowe CD

Wszystkie pomiary stabilności temperaturowej były prowadzone w zakresie temperatur 4–96°C, co 2°C.

Pomiary dla peptydów z serii **V** i **E** były prowadzone przy długości fali 222 nm w stężeniu 50 µM dla **V** i 60 µM dla **E** w 50 mM buforze fosforanowym pH 7.5. Dla peptydów z serii **O** pomiary były prowadzone przy długościach fal 206, 217 oraz 230 nm w H<sub>2</sub>O. Dla peptydów z serii **K** pomiary były prowadzone w buforze fosforanowym pH 7.5 w zakresie długości fal 200–230 nm, co 1.



Temperaturę rozfałdowywania (ang. *melting temperature*,  $T_m$ ) wyznaczano, z użyciem programu OriginPro 2019, poprzez dopasowanie otrzymanych wykresów do równania:

$$y = \frac{1}{1 + e^{-\frac{h \cdot (1 - \frac{x}{T_m})}{x}}} * (b_f - b_u + m_f * x) + b_u,$$

gdzie  $b_f$  i  $b_u$  odnoszą się do eliptyczności, odpowiednio w stanie sfałdowanym i rozfałdowanym, a  $m_f$  do nachylenia wykresu dla stanu sfałdowanego.

## 5.6. Pomiary NMR

Pomiary NMR były prowadzone w buforze fosforanowym o pH 7.5 z 10% dodatkiem D<sub>2</sub>O lub w H<sub>2</sub>O z 10% dodatkiem D<sub>2</sub>O na spektrometrze Bruker Avance™ przy 600 MHz dla <sup>1</sup>H.

## 5.7. Krystalizacja

Krystalizację peptydów prowadzono z wykorzystaniem metody wiszącej kropli, na przezroczystych płytkach 24-dołkowych (Molecular Dimensions #MD3-16) poprzez umieszczenia na dnie dołka 300 µl rezerwuar oraz naniesienie na płytkę szklaną kropli składających się z roztworu peptydu i rezerwuaru w stosunku 1:1, 1:2 i 2:1 (peptyd:rezerwuar). Następnie płytki odwrócone do dołu były przyklejane na wierzchu dołków.

Jako rezerwuary wykorzystano komercyjnie dostępne zestawy roztworów do krystalizacji: Structure Screen 1 (50 roztworów, Molecular Dimensions #MD1-01) oraz Structure Screen 2 (50 roztworów, Molecular Dimensions #MD1-02)

Stężenia peptydów użyte w eksperymencie zależały od ich rozpuszczalności, dobieranie stężenia rozpoczynano od przygotowania roztworu o maksymalnym stężeniu peptydu w H<sub>2</sub>O, następnie testowano rozpuszczalność peptydu w stosunku peptyd: rezerwuar 1:1 w kilku wybranych roztworach do krystalizacji. Jeśli w większości przypadków widoczna była precypitacja, zmniejszano stężenie, aż do otrzymania klarownych kropli w większości, jednak nie wszystkich, próbach. W przypadku peptydu **K7** użyto stężenia 4 mg/ml, a **O4** – 8 mg/ml.

## 5.8. Interferometria biowarstwowa (BLI)

Analiza kinetyki oddziaływania z celem molekularnym, a tym samym wyznaczenie stałej dysocjacji wiązania inhibitora z PD-L1 zostały przeprowadzone z wykorzystaniem interferometrii biowarstwowej (ang. *biolayer interferometry*, BLI) z użyciem sprzętu Octet RED96 (ForteBio). Otrzymane dane były przetwarzane z wykorzystaniem zintegrowanego ze sprzętem oprogramowania.

Bufor używany do pomiarów składał się z 10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % Tween20, 0,5% BSA. W pierwszym etapie eksperymentu, biotynylowane ludzkie PD-L1 (Sino Biological #10084-H08H-B) w stężeniu 1  $\mu\text{g/ml}$  było wiązane do biosensora pokrytego streptawidyną (SAX, Sartorius #18-5117). Testowane peptydy rozpuszczone w stężeniu 1 mM w  $\text{H}_2\text{O}$  były rozcieńczane w buforze do pomiarów do odpowiednich stężeń. Pomiar kinetyki wiązania odbywał się poprzez zanurzenie załadowanych biosensorów w roztworze peptydu o odpowiednim stężeniu (asocjacja), a następnie zanurzenie biosensorów w buforze (dysocjacja).

Dla inhibitorów z serii **V** wartości  $K_D$  wyliczono z pomiarów w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ . Dla inhibitorów z serii **E** z zestawu pomiarów w stężeniach inhibitora: 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ .

## 5.9. Homogenna czasowo rozdzielcza fluorescencja (HTRF)

Test HTRF był przeprowadzany z wykorzystaniem 96-dołkowych białych płytek o zmniejszonej objętości (CisBio #66PL96025) oraz zestawu do pomiaru oddziaływania PD-1/PD-L1 (CisBio #64PD1PEG) zgodnie z protokołem dla zestawu. Pomiar HTRF były prowadzone w 3 powtórzeniach, na fluorymetrze CLARIOstar® z filtrem wzbudzenia przy 337 nm poprzez pomiar intensywności fluorescencji przy długościach fal 620 i 665 nm. Od otrzymanych danych odjęto wartości tła, obliczono stosunek 665/620, odjęto wartości kontroli negatywnej, znormalizowano względem kontroli pozytywnej oraz uśredniono. Błąd pomiarowy obliczono poprzez obliczenie odchylenia standardowego próbki

z 3 pomiarów. Wartości  $IC_{50}$  zostały otrzymane z zestawu pomiarów w różnych stężeniach poprzez dopasowanie wyników z użyciem funkcji DoseResp oprogramowania OriginPro 2019.

Pomiar aktywności hamującej był prowadzony w stężeniach 50  $\mu\text{M}$  dla serii **V**, 5  $\mu\text{M}$  dla serii **E**. Dla peptydu **E1** wartość  $IC_{50}$  została wyliczona z serii pomiarów przy stężeniach: 0,02, 0,02, 0,2, 1, 2,5, 5, 25, 50  $\mu\text{M}$ , dla peptydu **E15** przy stężeniach: 0,005, 0,05, 0,25, 0,5, 5, 7,15, 25, 50  $\mu\text{M}$ .

### **5.10. Test blokowania immunologicznego punktu kontrolnego oparty na komórkach\*\***

Test blokowania immunologicznego punktu kontrolnego oparty na komórkach został przeprowadzony z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego testu PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay (Promega, Madison, WI, USA) zgodnie z protokołem zapewnionym przez producenta.

Test ten polega na hodowli dwóch linii komórkowych: sztucznych komórek prezentujących antygen CHO-K1 z nadekspresją PD-L1 oraz białka aktywatora TCR (komórki CHO/TCRAct/PD-L1) i komórek Jurkat z nadekspresją PD-1 oraz genu lucyferazy kontrolowanego przez NFAT (Jurkat Effector Cells, Jurkat-ECs). Wiązanie aktywatora TCR z TCR skutkuje aktywacją komórek Jurkat-EC, co powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego NFAT, a dalej ekspresję lucyferazy, której efektem działania jest luminescencja mierzona w eksperymencie. Oddziaływanie PD-1/PD-L1 powoduje zmniejszenie poziomu aktywacji komórek Jurkat-EC. Zablockowanie interakcji PD-1/PD-L1 pozwala na przywrócenie aktywacji tychże komórek.

W celu przeprowadzenia eksperymentu komórki CHO/TCRAct/PD-L1 były hodowane na białych płytkach 96-dołkowych (gęstość: 10 000 komórek/dołek).

Po 24 godzinach hodowli, dodawano inhibitorów w odpowiednich stężeniach. Ze względu na rozbieżności w wynikach dla peptydów, w eksperymencie od tego

---

\*\* Testy blokowania immunologicznego punktu kontrolnego opartego na komórkach zostały wykonane przez dr hab. Łukasza Skalniaka z Zespołu Chemii Bioorganicznej i Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

momentu wykorzystywano medium RPMI-1640 o obniżonym przez dodatek HCl pH równym 6.9. Inkubacja z inhibitorami trwała 24h w 37 °C w 5% CO<sub>2</sub>.

Przygotowanie roztworów inhibitorów polegało na przygotowaniu roztworów o stężeniu 2 mM w wodzie. Dodatkowo, przeprowadzono kontrolę prawidłowości stężenia peptydu poprzez rozcieńczenie wyjściowego roztworu 2 mM do 100 μM w 8M GuHCl, inkubację przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie pomiar absorbancji próbki przy długości fali 280 nm. Następnie z prawa Lamberta-Beera obliczono stężenie w próbce i na jego bazie skorygowano dalsze rozcieńczenia.

Po inkubacji z inhibitorami, dodawane były komórki Jurkat T (gęstość 20 000 komórek/dołek) oraz inhibitory w odpowiednim stężeniu. Jako kontroli negatywnej używano DMSO, natomiast kontrolę pozytywną stanowił roztwór durvalumabu o stężeniu 2,5 mg/ml.

Pomiar aktywacji komórek efektorowych, poprzez pomiar bioluminescencji, prowadzono po 6 godzinach inkubacji (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) i 20 minutach dodatkowej inkubacji z odczynnikiem Bio-Glo (Promega) w temperaturze pokojowej. Pomiar bioluminescencji prowadzono z wykorzystaniem wielomodowego czytnika mikropłytek Tecan Spark 20M. Dane zostały przedstawione jako krotność indukcji sygnału luminescencyjnego względem kontroli czyli komórek z DMSO. Punkty danych reprezentują wartości średnie ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Wartości EC<sub>50</sub> zostały obliczone poprzez dopasowanie krzywej Hilla do danych eksperymentalnych przy użyciu oprogramowania OriginPro 2019. Dla peptydów E24 i E32 pomiary prowadzono w stężeniach: 0,156; 0,312; 0,62; 1,25; 2,5; 5; 10 μM.

## 5.11. Charakterystyka otrzymanych peptydów

Nazwa	MS obliczone [M + 4H] <sup>4+</sup>	MS doświadczalne [M + 4H] <sup>4+</sup>	HPLC analityczne Czas retencji [min]
<b>pAC65</b>	944,4868	944,4897 <sup>††</sup>	16,369
<b>V0</b>	1017,2969	1017,2976	15,334
<b>V1</b>	1050,8143	1050,8152	15,112
<b>V2</b>	1038,0798	1038,0769	16,391
<b>V3</b>	1063,3302	1063,3738	16,644
<b>V4</b>	1054,5643	1054,5657	15,265
<b>V5</b>	1046,5759	1046,5762	16,368
<b>V6</b>	1050,5474	1050,5767	15,831
<b>ENH</b>	1654,9085	1655,2543	12,453
<b>E0</b>	1407,2498	1407,2576	12,876
<b>E1</b>	1420,7699	1421,0298	13,196
<b>E2</b>	1406,2686	1406,4773	13,186
<b>E3</b>	1431,2811	1431,2969	13,475
<b>E4</b>	1408,5187	1409,0365	12,702
<b>E5</b>	1435,2660	1435,8171	13,963
<b>E6</b>	1417,0171	1417,1238	13,992
<b>E7</b>	1420,2842	1420,2935	14,401
<b>E8</b>	1433,0250	1433,1809	15,042
<b>E9</b>	1417,0281	1417,0281	13,761
<b>E10</b>	1435,5232	1435,5095	13,228
<b>E11</b>	1417,5392	1417,7002	13,837
<b>E12</b>	1427,2295	1427,5198	13,575
<b>E13</b>	1438,0371	1438,0303	13,216
<b>E14</b>	1421,0219	1421,0193	13,270
<b>E15</b>	1434,7803	1434,7378	15,128
<b>E16</b>	1416,2946	1416,7837	15,098
<b>E17</b>	1441,7789	1442,2077	14,099
<b>E18</b>	1430,7926	1430,7800	15,531
<b>E19</b>	1432,7789	1431,4614	15,242
<b>E20</b>	1439,4956	1439,7422	15,713
<b>E21</b>	1435,2540	1435,247	15,674
<b>E22</b>	1444,7635	1445,3025	14,814
<b>E23</b>	1410,4847	1410,7689	15,977
<b>E24</b>	1438,7809	1438,8449	14,675
<b>E25</b>	1449,5324	1449,9120	14,991

<sup>††</sup> Dla peptydu pAC65 podano MS doświadczalne [M + 2H]<sup>2+</sup>

<b>E26</b>	1442,5198	1442,8904	14,562
<b>E27</b>	1453,2732	1452,8496	15,215
<b>E28</b>	1454,0485	1453,828	14,909
<b>E29</b>	1449,3018	1449,9533	14,412
<b>E30</b>	1454,4858	1454,6719	15,209
<b>E31</b>	1442,5289	1442,8167	14,893
<b>E32</b>	1442,2920	1442,7510	14,808
<b>E33</b>	1406,2405	1406,2773	14,491
<b>E34</b>	1441,5562	1441,5416	15,245
<b>E35</b>	1435,7952	1435,7934	14,598
<b>E36</b>	1410,2833	1409,8951	15,687
<b>O1</b>	1431,9908	1431,8962	12,686
<b>O2</b>	1425,0125	1424,9830	12,985
<b>O3</b>	1425,5029	1425,220	13,412
<b>O4</b>	1446,2490	1446,5391	13,291
<b>O5</b>	1446,5391	1446,2490	12,832
<b>O6</b>	1444,2240	1444,4888	12,325
<b>O7</b>	1397,2146	1397,3623	13,207
<b>O8</b>	1397,2146	1397,6377	11,847
<b>O9</b>	1437,2055	1437,2064	11,403
<b>O10</b>	1424,6987	1424,2116	10,094
<b>O11</b>	1427,7079	1427,7471	11,872
<b>O12</b>	1402,1920	1402,396	10,403
<b>K1</b>	1424,3257	1424,3257	12,691
<b>K2</b>	1297,3749	1297,5413	13,847
<b>K3</b>	1357,1422	1356,8895	16,598
<b>K4</b>	1304,6315	1304,672	17,813
<b>K5</b>	1339,6227	1339,3822	14,321
<b>K6</b>	1434,4807	1434,7445	12,274
<b>K7</b>	1393,6942	1393,8225	13,847
<b>K8</b>	1401,6825	1401,8976	12,367
<b>K9</b>	1389,1877	1389,1940	12,645
<b>K10</b>	1389,1877	1388,9341	12,737
<b>K11</b>	1389,1887	1389,4509	12,727
<b>K12</b>	1391,8988	1391,8988	11,028
<b>K13</b>	1418,9540	1419,5437	13,933
<b>K14</b>	1408,7026	1408,9656	12,857
<b>K15</b>	1430,7104	1430,9607	13,264
<b>P1</b>	1412,4773	1412,4773	14,948
<b>P2</b>	1384,7031	1384,9554	13,965
<b>P3</b>	1406,4590	1406,2149	13,701
<b>P4</b>	1403,4470	1403,1994	13,544

<b>P5</b>	1415,7097	1415,8834	14,522
<b>P6</b>	1427,2034	1427,8756	13,705
<b>P7</b>	1425,7275	1426,0468	14,554
<b>P8</b>	1393,3010	1393,3010	12,525
<b>P9</b>	1418,2091	1418,2369	13,964
<b>P10</b>	1412,1953	1412,1865	12,749

**Gradient HPLC:** 0–2 min 10% B; 2–32 min 90% B; 32–37 min 90% B; 37–40 min 10% B; 40–45 min 10% B; kolumna: C18 Reprosil Sapir 100 C18, 5 µm, 150 x 4.6 mm

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Keskin, O., Gursoy, A., Ma, B., Nussinov, R. & Aviv, T. Principles of Protein-Protein Interactions: What are the Preferred Ways For Proteins To Interact? *Chem. Rev.* **108**, 1225–1244 (2008).
2. Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* **22**, 3486–3492 (2003).
3. Winter, A., Higuero, A. P., Marsh, M., Sigurdardottir, A., Pitt, W. R. & Blundell, T. L. Biophysical and computational fragment-based approaches to targeting protein-protein interactions: Applications in structure-guided drug discovery. *Q. Rev. Biophys.* **45**, 383–426 (2012).
4. Smith, M. C. & Gestwicki, J. E. Features of Protein-Protein Interactions that Translate into Potent Inhibitors: Topology, Surface Area and Affinity. *Expert Rev. Mol. Med.* **23**, 1–7 (2012).
5. Geppert, T., Hoy, B., Wessler, S. & Schneider, G. Context-based identification of protein-protein interfaces and ‘hot-spot’ residues. *Chem. Biol.* **18**, 344–353 (2011).
6. Lu, H., Zhou, Q., He, J., Jiang, Z., Peng, C., Tong, R. & Shi, J. Recent advances in the development of protein-protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 1–23 (2020).
7. Richter, A., Rose, R., Hedberg, C., Waldmann, H. & Ottmann, C. An Optimised Small-Molecule Stabiliser of the 14-3-3-PMA2 Protein-Protein Interaction. *Chem. A Eur. J.* **18**, 6520–6527 (2012).
8. Prota, A. E., Bargsten, K., Zurwerra, D., Field, J. J., Díaz, J. F., Altmann, K. H. & Steinmetz, M. O. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* **339**, 587–590 (2013).
9. Bryan, C. M., Rocklin, G. J., Bick, M. J., Ford, A., Majri-Morrison, S., Kroll, A. V., Miller, C. J., Carter, L., Goreshnik, I., Kang, A., DiMaio, F., Tarbell, K. V. & Baker, D. Computational design of a synthetic PD-1 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, 1–9 (2021).
10. Hassin, O. & Oren, M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **22**, 127–144 (2023).
11. Vousden, K. H. & Lu, X. Live or let die: The cell’s response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 594–604 (2002).
12. Peterson-Kaufman, K. J., Haase, H. S., Boersma, M. D., Lee, E. F., Fairlie, W. D. & Gellman, S. H. Residue-Based Preorganization of BH3-Derived  $\alpha/\beta$ -Peptides: Modulating Affinity, Selectivity and Proteolytic Susceptibility in  $\alpha$ -Helix Mimics. *ACS Chem. Biol.* **176**, 139–148 (2015).
13. Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., Decock, J. & Elkord, E. Immune checkpoints in the tumor microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* **65**, 1–12 (2019).
14. Brito, A. F. & Pinney, J. W. Protein-protein interactions in virus-host systems. *Front. Microbiol.* **8**, 1–11 (2017).
15. Marković, V., Shaik, J. B., Ožga, K., Ciesiołkiewicz, A., Perez, J. L., Rudzińska-Szostak, E. & Berlicki, Ł. Peptide foldamer-based inhibitors of



- the SARS- CoV-2 S protein – human ACE2 interaction. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **38**, 1–13 (2023).
16. Lu, L., Yu, F., Debnath, A. K. & Jiang, S. Development of Small-molecule HIV Entry Inhibitors Specifically Targeting gp120 or gp41. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 1074–1090 (2016).
  17. Ivanov, A. A., Khuri, Fadlo, R. & Fu, H. Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 393–400 (2013).
  18. Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K. & Honjo, T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J. Biomed. Sci.* **24**, 1–11 (2017).
  19. Seliger, B., Marincola, F. M., Ferrone, S. & Abken, H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol. Med.* **14**, 550–559 (2008).
  20. Sobhani, N., Tardiel-Cyril, D. R., Davtyan, A., Generali, D., Roudi, R. & Li, Y. CTLA-4 in regulatory T cells for cancer immunotherapy. *Cancers* **13**, 1–18 (2021).
  21. Mansh, M. Ipilimumab and cancer immunotherapy: A new hope for advanced stage melanoma. *Yale J. Biol. Med.* **84**, 381–389 (2011).
  22. Koh, B., Tan, D. J. H., Lim, W. H., Wong, J. S. L., Ng, C. H., Chan, K. E., Wang, M., Yong, W. P., Dan, Y. Y., Wang, L. Z., Tan, N., Muthiah, M., Kow, A., Syn, N. L., Huang, D. Q. & Yau, T. Trial watch: immunotherapeutic strategies on the horizon for hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* **12**, 1–13 (2023).
  23. Yang, J. & Hu, L. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules. *Med. Res. Rev.* **39**, 265–301 (2019).
  24. Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 515–548 (2005).
  25. Shinohara, T., Taniwaki, M., Ishida, Y., Kawaichi, M. & Honjo, T. Structure and Chromosomal Localization of the Human PD-1 Gene (PDCD1). *Genomics* **23**, 704–706 (1994).
  26. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T. & Honjo, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13866–13871 (2001).
  27. Pascolutti, R., Sun, X., Kao, J., Maute, R., Ring, A. M., Bowman, G. R. & Kruse, A. C. Structure and dynamics of PD-L1 and an ultra high-affinity PD-1 receptor mutant. *Structure* **24**, 1719–1728 (2016).
  28. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J. Immunol.* **173**, 945–954 (2004).
  29. Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Boussiotis, V. A., Carter, L. L., Carreno, B. M.,

- Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 261–268 (2001).
30. Cortez, M. A., Ivan, C., Valdecanas, D., Wang, X., Peltier, H. J., Ye, Y., Araujo, L., Carbone, D. P., Shilo, K., Giri, D. K., Kelnar, K., Martin, D., Komaki, R., Gomez, D. R., Krishnan, S., Calin, G. A., Bader, A. G. & Welsh, J. W. PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *J. Natl. Cancer Inst.* **108**, 1–9 (2015).
  31. Andorsky, D. J., Yamada, R. E., Said, J., Pinkus, G. S., Betting, D. J. & Timmerman, J. M. Programmed death ligand 1 is expressed by non-Hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4232–4244 (2011).
  32. Akiyama, M., Matsuda, Y., Arai, T. & Saeki, H. PD-L1 expression in malignant melanomas of the skin and gastrointestinal tract. *Oncol. Lett.* **19**, 2481–2488 (2020).
  33. Zhang, X., Schwartz, J.-C. D., Guo, X., Bhatia, S., Cao, E., Lorenz, M., Cammer, M., Chen, L., Zhang, Z.-Y., Edidin, M. A., Nathenson, S. G. & Almo, S. C. Structural and Functional Analysis of the Costimulatory Receptor Programmed Death-1. *Immunity* **20**, 337–347 (2004).
  34. Lin, D. Y. W., Tanaka, Y., Iwasaki, M., Gittis, A. G., Su, H. P., Mikami, B., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N. & Garboczi, D. N. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3011–3016 (2008).
  35. Zak, K. M., Kitel, R., Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G. & Holak, T. A. Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure* **23**, 2341–2348 (2015).
  36. Boisgerault, N. & Bertrand, P. Inside PD-1/PD-L1,2 with their inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **256**, 1–23 (2023).
  37. Shi, D., Zhou, S., Liu, X., Zhao, C., Liu, H. & Yao, X. Understanding the structural and energetic basis of PD-1 and monoclonal antibodies bound to PD-L1: A molecular modeling perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1862**, 576–588 (2018).
  38. Cheng, X., Veverka, V., Radhakrishnan, A., Waters, L. C., Muskett, F. W., Morgan, S. H., Huo, J., Yu, C., Evans, E. J., Leslie, A. J., Griffiths, M., Stubberfield, C., Griffin, R., Henry, A. J., Jansson, A., Ladbury, J. E., Ikemizu, S., Carr, M. D. & Davis, S. J. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J. Biol. Chem.* **288**, 11771–11785 (2013).
  39. Maute, R. L., Gordon, S. R., Mayer, A. T., McCracken, M. N., Natarajan, A., Ring, N. G., Kimura, R., Tsai, J. M., Manglik, A., Kruse, A. C., Gambhir, S. S., Weissman, I. L. & Ring, A. M. Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 6506–6514 (2015).
  40. Robert, C., Ribas, A., Wolchok, J. D., Hodi, F. S., Hamid, O., Kefford, R., Weber, J. S., Joshua, A. M., Hwu, W. J., Gangadhar, T. C., Patnaik, A.,

- Dronca, R., Zarour, H., Joseph, R. W., Boasberg, P., Chmielowski, B., Mateus, C., Postow, M. A., Gergich, K., *et al.* Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: A randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* **384**, 1109–1117 (2014).
41. Gunturi, A. & McDermott, D. F. Nivolumab for the treatment of cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **24**, 253–260 (2015).
  42. Davis, C. M. & Lewis, K. D. Brief overview: cemiplimab for the treatment of advanced basal cell carcinoma: PD-1 strikes again. *Ther. Adv. Med. Oncol. Rev.* **14**, 1–5 (2022).
  43. Keam, S. J. Toripalimab: First Global Approval. *Drugs* **79**, 573–578 (2019).
  44. Lee, A. & Keam, S. J. Tislelizumab: First Approval. *Drugs* **80**, 617–624 (2020).
  45. Markham, A. & Keam, S. J. Camrelizumab: First Global Approval. *Drugs* **79**, 1355–1361 (2019).
  46. Hoy, S. M. Sintilimab: First Global Approval. *Drugs* **79**, 341–346 (2019).
  47. Markham, A. Dostarlimab: First Approval. *Drugs* **81**, 1213–1219 (2021).
  48. Socinski, M. A., Jotte, R. M., Cappuzzo, F., Orlandi, F., Stroyakovskiy, D., Nogami, N., Rodríguez-Abreu, D., Moro-Sibilot, D., Thomas, C. A., Barlesi, F., Finley, G., Kelsch, C., Lee, A., Coleman, S., Deng, Y., Shen, Y., Kowanzetz, M., Lopez-Chavez, A., Sandler, A., *et al.* Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2288–2301 (2018).
  49. Sidaway, P. Urological cancer: Atezolizumab: an alternative to cisplatin? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 139 (2017).
  50. Kim, E. S. Avelumab: First Global Approval. *Drugs* **77**, 929–937 (2017).
  51. Syed, Y. Y. Durvalumab: First Global Approval. *Drugs* **77**, 1369–1376 (2017).
  52. Horita, S., Nomura, Y., Sato, Y., Shimamura, T., Iwata, S. & Nomura, N. High-resolution crystal structure of the therapeutic antibody pembrolizumab bound to the human PD-1. *Sci. Rep.* **6**, 1–8 (2016).
  53. Lee, J. Y., Lee, H. T., Shin, W., Chae, J., Choi, J., Kim, S. H., Lim, H., Won Heo, T., Park, K. Y., Lee, Y. J., Ryu, S. E., Son, J. Y., Lee, J. U. & Heo, Y. S. Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Nat. Commun.* **7**, 1–10 (2016).
  54. Na, Z., Yeo, S. P., Bharath, S. R., Bowler, M. W., Balikçi, E., Wang, C. I. & Song, H. Structural basis for blocking PD-1-mediated immune suppression by therapeutic antibody pembrolizumab. *Cell Res.* **27**, 147–150 (2017).
  55. Lu, D., Xu, Z., Zhang, D., Jiang, M., Liu, K., He, J., Ma, D., Ma, X., Tan, S., Gao, G. F. & Chai, Y. PD-1 N58-Glycosylation-Dependent Binding of Monoclonal Antibody Cemiplimab for Immune Checkpoint Therapy. *Front. Immunol.* **13**, 1–11 (2022).
  56. Liu, H., Guo, L., Zhang, J., Zhou, Y., Zhou, J., Yao, J., Wu, H., Yao, S., Chen, B., Chai, Y., Qi, J., Gao, G. F., Tan, S., Feng, H. & Yan, J.

- Glycosylation-independent binding of monoclonal antibody toripalimab to FG loop of PD-1 for tumor immune checkpoint therapy. *MAbs* **11**, 681–690 (2019).
57. Lee, S. H., Lee, H. T., Lim, H., Kim, Y., Park, U. B. & Heo, Y. S. Crystal structure of PD-1 in complex with an antibody-drug tislelizumab used in tumor immune checkpoint therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **527**, 226–231 (2020).
  58. Liu, K., Tan, S., Jin, W., Guan, J., Wang, Q., Sun, H., Qi, J., Yan, J., Chai, Y., Wang, Z., Deng, C. & Gao, G. F. N-glycosylation of PD-1 promotes binding of camrelizumab. *EMBO Rep.* **21**, 1–12 (2020).
  59. Park, U. B., Jeong, T. J., Gu, N., Lee, H. T. & Heo, Y. S. Molecular basis of PD-1 blockade by dostarlimab, the FDA-approved antibody for cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **599**, 31–37 (2022).
  60. Herbst, R. S., Soria, J., Kowanetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Kohrt, H. E. K., Horn, L., Lawrence, D. P., Rost, S., Way, D. N. A., Francisco, S. S., Ave, W. K. & Carolina, N. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A. *Nature* **515**, 563–567 (2016).
  61. Liu, K., Tan, S., Chai, Y., Chen, D., Song, H., Zhang, C. W. H., Shi, Y., Liu, J., Tan, W., Lyu, J., Gao, S., Yan, J., Qi, J. & Gao, G. F. Structural basis of anti-PD-L1 monoclonal antibody avelumab for tumor therapy. *Cell Res.* **27**, 151–153 (2017).
  62. Tan, S., Liu, K., Chai, Y., Zhang, C. W. H., Gao, S., Gao, G. F. & Qi, J. Distinct PD-L1 binding characteristics of therapeutic monoclonal antibody durvalumab. *Protein Cell* **9**, 135–139 (2018).
  63. Lee, H. T., Lee, J. Y., Lim, H., Lee, S. H., Moon, Y. J., Pyo, H. J., Ryu, S. E., Shin, W. & Heo, Y. S. Molecular mechanism of PD-1/PD-L1 blockade via anti-PD-L1 antibodies atezolizumab and durvalumab. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
  64. Zhang, F., Qi, X., Wang, X., Wei, D. & Wu, J. Structural basis atezolizumab of the therapeutic. *Oncotarget* **8**, 90215–90224 (2017).
  65. Naidoo, J., Page, D. B., Li, B. T., Connell, L. C., Schindler, K., Lacouture, M. E., Postow, M. A. & Wolchok, J. D. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann. Oncol.* **26**, 2375–2391 (2015).
  66. Zak, K. M., Grudnik, P., Guzik, K., Zieba, B. J., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G. & Holak, T. A. Structural basis for small molecule targeting of the programmed death ligand 1 (PD-L1). *Oncotarget* **7**, 30323–30335 (2016).
  67. Guzik, K., Zak, K. M., Grudnik, P., Magiera, K., Musielak, B., Törner, R., Skalniak, L., Dömling, A., Dubin, G. & Holak, T. A. Small-Molecule Inhibitors of the Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Interaction via Transiently Induced Protein States and Dimerization of PD-L1. *J. Med. Chem.* **60**, 5857–5867 (2017).
  68. Chupak, L. S. & Zheng, X. Compounds useful as immunomodulators. Bristol-Myers Squibb Co. 2015; WO 2015/034820 A1.
  69. Chupak, L. & Zheng, X. Compounds useful as immunomodulators. Bristol-

- Myers Squibb Co. 2017; US 9,850,225 B2.
70. Skalniak, L., Zak, K. M., Guzik, K., Magiera, K., Musielak, B., Pachota, M., Szelazek, B., Kocik, J., Grudnik, P., Tomala, M., Krzanik, S., Pyrc, K., Dömling, A., Dubin, G. & Holak, T. A. Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget* **8**, 72167–72181 (2017).
  71. Almahmoud, S. & Zhong, H. A. Molecular modeling studies on the binding mode of the PD-1/PD-L1 complex inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–15 (2019).
  72. Guzik, K., Tomala, M., Muszak, D., Konieczny, M., Hec, A., Błaszkiwicz, U., Pustuła, M., Butera, R., Dömling, A. & Holak, T. A. Development of the Inhibitors That Target the PD-1/PD-L1 Interaction—A Brief Look at Progress on Small Molecules, Peptides and Macrocycles. *Molecules* **24**, 1–30 (2019).
  73. Musielak, B., Kocik, J., Skalniak, L., Magiera-Mularz, K., Sala, D., Czub, M., Stec, M., Siedlar, M., Holak, T. A. & Plewka, J. CA-170 - A Potent Small-Molecule PD-L1 Inhibitor or Not? *Molecules* **24**, 1–13 (2019).
  74. Lee, D. H. Update of early phase clinical trials in cancer immunotherapy. *BMB Rep.* **54**, 70–88 (2021).
  75. Di, L. Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties. *AAPS J.* **17**, 134–143 (2015).
  76. Wójcik, P. & Berlicki, Ł. Peptide-based inhibitors of protein-protein interactions. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **26**, 707–713 (2016).
  77. Miller, M. M., Mapelli, C., Allen, M. P., Bowshe, M. S., Boy, K. M., Gillis, E. P., Langley, D. R., Mull, E., Poirier, M. A., Sanghvi, N., Sun, L. Q., Tenney, D. J., Yeung, K. S., Zhu, J., Reid, P. C., Scola, P. M. & Cornelius, L. A. Macrocyclic inhibitors of the PD-1/PD-L1 and CD80(B7-1)/PD-L1 protein/protein interactions. Bristol-Myers Squibb Co. 2014; US 20140294898 A1.
  78. Miller, M. M., Mapelli, C., Allen, M. P., Bowsher, M. S., Gillis, E. P., Langley, D. R., Mull, E., Poirier, M. A., Sanghvi, N., Sun, L.-Q., Tenney, D. J., Yeung, K.-S., Zhu, J., Gillman, K. W., Zhao, Q., Grant-Young, K. A. & Scola, P. M. Macrocyclic inhibitors of the PD1/PDL1 and CD80 (B7-1)/PD-L1 protein/protein interactions. . Bristol-Myers Squibb Co. 2018; US 9,879,046 B2.
  79. Magiera-Mularz, K., Skalniak, L., Zak, K. M., Musielak, B., Rudzinska-Szostak, E., Berlicki, Ł., Kocik, J., Grudnik, P., Sala, D., Zarganes-Tzitzikas, T., Shaabani, S., Dömling, A., Dubin, G. & Holak, T. A. Bioactive Macrocyclic Inhibitors of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint. *Angew. Chemie* **129**, 13920–13923 (2017).
  80. Liu, J., Chen, Z., Li, Y., Zhao, W., Wu, J. B. & Zhang, Z. PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Front. Pharmacol.* **12**, 1–8 (2021).
  81. Yin, H., Zhou, X., Huang, Y. H., King, G. J., Collins, B. M., Gao, Y., Craik, D. J. & Wang, C. K. Rational Design of Potent Peptide Inhibitors of the PD-1:PD-L1 Interaction for Cancer Immunotherapy. *J. Am. Chem. Soc.*

- 143**, 18536–18547 (2021).
82. Ciesiolkiewicz, A., Lizandra Perez, J. & Berlicki, Ł. Mini-proteins in medicinal chemistry. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **71**, 1–10 (2022).
  83. Zhu, S., Darbon, H., Dyason, K., Verdonck, F. & Tytgat, J. Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *FASEB J.* **17**, 1765–1767 (2003).
  84. Lavergne, V., J. Taft, R. & F. Alewood, P. Cysteine-Rich Mini-Proteins in Human Biology. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 1514–1533 (2012).
  85. Arolas, J. L., Aviles, F. X., Chang, J. Y. & Ventura, S. Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 292–301 (2006).
  86. Tamaoki, H., Miura, R., Kusunoki, M., Kyogoku, Y., Kobayashi, Y. & Moroder, L. Folding motifs induced and stabilized by distinct cystine frameworks. *Protein Eng.* **11**, 649–659 (1998).
  87. Chiche, L., Heitz, A., Gelly, J.-C., Gracy, J., Chau, P., Ha, P., Hernandez, J.-F. & Le-Nguyen, D. Squash Inhibitors: From Structural Motifs to Macrocyclic Knottins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 341–349 (2005).
  88. Heitz, A., Le-Nguyen, D. & Chiche, L. Min-21 and Min-23, the smallest peptides that fold like a cystine-stabilized  $\beta$ -sheet motif: Design, solution structure, and thermal stability. *Biochemistry* **38**, 10615–10625 (1999).
  89. Le-Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L., El Hajji, M. & Castro, B. Characterization and 2D NMR study of the stable [9-21, 15-27] 2 disulfide intermediate in the folding of the 3 disulfide trypsin inhibitor EETI II. *Protein Sci.* **2**, 165–174 (1993).
  90. Heitz, A., Avrutina, O., Le-Nguyen, D., Diederichsen, U., Hernandez, J. F., Gracy, J., Kolmar, H. & Chiche, L. Knottin cyclization: Impact on structure and dynamics. *BMC Struct. Biol.* **8**, 1–19 (2008).
  91. Heitz, A., Chiche, L., Le-Nguyen, D. & Castro, B. Folding of the Squash Trypsin Inhibitor EETI II: Evidence of Native and Non-Native Local Structural Preferences in a Linear Analogue. *Eur. J. Biochem.* **233**, 837–846 (1995).
  92. Camarero, J. A. Cyclotides, a versatile ultrastable micro-protein scaffold for biotechnological applications. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **27**, 5089–5099 (2017).
  93. Claeson, P., Göransson, U., Johansson, S., Luijendijk, T. & Bohlin, L. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. *J. Nat. Prod.* **61**, 77–81 (1998).
  94. Wang, C. K. L., Kaas, Q., Chiche, L. & Craik, D. J. CyBase: A database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic Acids Res.* **36**, 206–210 (2008).
  95. Mulvenna, J. P., Wang, C. & Craik, D. J. CyBase: a database of cyclic protein sequence and structure. *Nucleic Acids Res.* **34**, 192–194 (2006).
  96. Camarero, J. A. & Campbell, M. J. The potential of the cyclotide scaffold for drug development. *Biomedicines* **7**, 1–19 (2019).
  97. De Veer, S. J., Kan, M. W. & Craik, D. J. Cyclotides: From Structure to Function. *Chem. Rev.* **119**, 12375–12421 (2019).
  98. Gründemann, C., Koehbach, J., Huber, R. & Gruber, C. W. Do plant

- cyclotides have potential as immunosuppressant peptides? *J. Nat. Prod.* **75**, 167–174 (2012).
99. Gründemann, C., Thell, K., Lengen, K., Garcia-Käufer, M., Huang, Y. H., Huber, R., Craik, D. J., Schabbauer, G. & Gruber, C. W. Cyclotides Suppress Human T-Lymphocyte Proliferation by an Interleukin 2-Dependent Mechanism. *PLoS One* **8**, 1–12 (2013).
  100. Hellinger, R., Muratspahić, E., Devi, S., Koehbach, J., Vasileva, M., Harvey, P. J., Craik, D. J., Gründemann, C. & Gruber, C. W. Importance of the Cyclic Cystine Knot Structural Motif for Immunosuppressive Effects of Cyclotides. *ACS Chem. Biol.* **16**, 2373–2386 (2021).
  101. Pennington, M. W., Czerwinski, A. & Norton, R. S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic Med. Chem.* **26**, 2738–2758 (2018).
  102. Iadonato, S. P. & Munoz, E. J. Modifications and uses of conotoxin peptides. Kineta co. 2016; WO 2016/073949 A1.
  103. Romero, H. K., Christensen, S. B., Di Cesare Mannelli, L., Gajewiak, J., Ramachandra, R., Elmslie, K. S., Vetter, D. E., Ghelardini, C., Iadonato, S. P., Mercado, J. L., Olivera, B. M. & McIntosh, J. M. Inhibition of  $\alpha 9\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptors prevents chemotherapy-induced neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 1825–1832 (2017).
  104. Wang, C. K. & Craik, D. J. Linking molecular evolution to molecular grafting. *J. Biol. Chem.* **296**, 1–11 (2021).
  105. Mehta, L., Dhankhar, R., Gulati, P., Kapoor, R. K., Mohanty, A. & Kumar, S. Natural and grafted cyclotides in cancer therapy: An insight. *J. Pept. Sci.* **26**, 1–16 (2020).
  106. Wang, C. K., Gruber, C. W., Cemazar, M., Siatskas, C., Tagore, P., Payne, N., Sun, G., Wang, S., Bernard, C. C. & Craik, D. J. Molecular grafting onto a stable framework yields novel cyclic peptides for the treatment of multiple sclerosis. *ACS Chem. Biol.* **9**, 156–163 (2014).
  107. Lee, M. S., Gippert, G. P., Soman, K. V, Case, D. A., Peter, E., Lee, M. I. N. S., Gippert, G. P., Soman, K. V, Case, D. A. & Wright, P. E. Three-Dimensional Solution Structure of a Single Zinc Finger DNA-Binding Domain. *Science* **245**, 635–637 (2016).
  108. Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G. & Raschellà, G. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov.* **3**, 1–12 (2017).
  109. Zhang, W., Xu, C., Bian, C., Tempel, W., Crombet, L., MacKenzie, F., Min, J., Liu, Z. & Qi, C. Crystal structure of the Cys2His2-type zinc finger domain of human DPF2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **413**, 58–61 (2011).
  110. Sudol, M. & Hunter, T. New wrinkles for an old domain. *Cell* **103**, 1001–1004 (2000).
  111. Macias, M. J., Hyvönen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M. & Oschkinat, H. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* **382**, 646–649 (1996).

112. Macias, M. J., Gervais, V., Civera, C. & Oschkinat, H. Structural analysis of WW domains and design of a WW prototype. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 375–379 (2000).
113. Porter Goff, K. L., Nicol, D., Williams, C., Crump, M. P., Zieleniewski, F., Samphire, J. L., Baker, E. G. & Woolfson, D. N. Stabilizing and Understanding a Miniprotein by Rational Redesign. *Biochemistry* **58**, 3060–3064 (2019).
114. Blundell, T. L., Pitts, J. E. & Tickle, I. J. X-ray analysis (1.4-Å resolution) of avian pancreatic polypeptide: Small globular protein hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 4175–4179 (1981).
115. Barua, B., Lin, J. C., Williams, V. D., Kummner, P., Neidigh, J. W. & Andersen, N. H. The Trp-cage: Optimizing the stability of a globular miniprotein. *Protein Eng. Des. Sel.* **21**, 171–185 (2008).
116. Nygren, P. Å. Alternative binding proteins: Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* **275**, 2668–2676 (2008).
117. Chiu, T. K., Kubelka, J., Herbst-Irmer, R., Eaton, W. A., Hofrichter, J. & Davies, D. R. High-resolution x-ray crystal structures of the villin headpiece subdomain, an ultrafast folding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7517–7522 (2005).
118. Clarke, N. D., Kissinger, C. R., Desjarlais, J., Gilliland, G. L. & Pabo, C. O. Structural studies of the engrailed homeodomain. *Protein Sci.* **3**, 1779–1787 (1994).
119. Sia, S. K. & Kim, P. S. Protein grafting of an HIV-1-inhibiting epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9756–9761 (2003).
120. Cao, L., Goreshnik, I., Coventry, B., Case, J. B., Miller, L., Kozodoy, L., Chen, R. E., Carter, L., Walls, A. C., Park, Y. J., Strauch, E. M., Stewart, L., Diamond, M. S., Veessler, D. & Baker, D. De novo design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors. *Science* **370**, 426–431 (2020).
121. Chan, D. C., Chutkowski, C. T. & Kim, P. S. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15613–15617 (1998).
122. Sheffer, A. L., Champion, M., Levy, R. J., Li, H. H., Horn, P. T. & Pullman, W. E. Ecallantide (DX-88) for acute hereditary angioedema attacks: Integrated analysis of 2 double-blind, phase 3 studies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 153–159 (2011).
123. Levy, J. H. & O'Donnell, P. S. The therapeutic potential of a kallikrein inhibitor for treating hereditary angioedema. *Expert Opin. Investig. Drugs* **15**, 1077–1090 (2006).
124. Mulligan, V. K. The emerging role of computational design in peptide macrocycle drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **15**, 833–852 (2020).
125. Curreli, F., Haque, K., Xie, L., Qiu, Q., Xu, J., Yong, W., Tong, X. & Debnath, A. K. Synthesis, antiviral activity and resistance of a novel small molecule HIV-1 entry inhibitor. *Bioorganic Med. Chem.* **23**, 7618–7628 (2015).



126. Das, R. & Baker, D. Macromolecular modeling with Rosetta. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 363–382 (2008).
127. Bhardwaj, G., Mulligan, V. K., Bahl, C. D., Gilmore, J. M., Harvey, P. J., Cheneval, O., Buchko, G. W., Pulavarti, S. V. S. R. K., Kaas, Q., Eletsky, A., Huang, P. S., Johnsen, W. A., Greisen, P. J., Rocklin, G. J., Song, Y., Linsky, T. W., Watkins, A., Rettie, S. A., Xu, X., *et al.* Accurate de novo design of hyperstable constrained peptides. *Nature* **538**, 329–335 (2016).
128. Morellato-Castillo, L., Acharya, P., Combes, O., Michiels, J., Descours, A., Ramos, O. H. P., Yang, Y., Vanham, G., Ariën, K. K., Kwong, P. D., Martin, L. & Kessler, P. Interfacial cavity filling to optimize CD4-mimetic miniprotein interactions with HIV-1 surface glycoprotein. *J. Med. Chem.* **56**, 5033–5047 (2013).
129. Surmiak, E., Magiera-Mularz, K., Musielak, B., Muszak, D., Kocik-Krol, J., Kitel, R., Plewka, J., Holak, T. A. & Skalniak, L. PD-L1 inhibitors: Different classes, activities, and mechanisms of action. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–13 (2021).
130. Sormanni, P., Aprile, F. A. & Vendruscolo, M. The CamSol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. *J. Mol. Biol.* **427**, 478–490 (2015).
131. Persi, E., Duran-Frigola, M., Damaghi, M., Roush, W. R., Aloy, P., Cleveland, J. L., Gillies, R. J. & Ruppin, E. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. *Nat. Commun.* **9**, 1–11 (2018).
132. Cabrele, C., Martinek, T. A., Reiser, O. & Berlicki, Ł. Peptides containing  $\beta$ -amino acid patterns: Challenges and successes in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **57**, 9718–9739 (2014).
133. Rocklin, G. J., Chidyausiku, T. M., Goreshnik, I., Ford, A., Houliston, S., Lemak, A., Carter, L., Ravichandran, R., Mulligan, V. K., Chevalier, A., Arrowsmith, C. H. & Baker, D. Global analysis of protein folding using massively parallel design, synthesis, and testing. *Science* **357**, 168–175 (2017).
134. Bejger, M., Fortuna, P., Drewniak-Świtalska, M., Plewka, J., Rypniewski, W. & Berlicki, Ł. A computationally designed  $\beta$ -amino acid-containing miniprotein. *Chem. Commun.* **57**, 6015–6018 (2021).
135. Kuszewski, J., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. Improving the packing and accuracy of NMR structures with a pseudopotential for the radius of gyration. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2337–2338 (1999).
136. Stanojlovic, V., Müller, A., Moazzam, A., Hinterholzer, A., Ożga, K., Berlicki, Ł., Schubert, M. & Cabrele, C. A Conformationally Stable Acyclic  $\beta$ -Hairpin Scaffold Tolerating the Incorporation of Poorly  $\beta$ -Sheet-Prone Amino Acids. *ChemBioChem* **23**, 1–11 (2022).
137. Drewniak-Świtalska, M., Barycza, B., Rudzińska-Szostak, E., Morawiak, P. & Berlicki, Ł. Constrained beta-amino acid-containing miniproteins. *Org. Biomol. Chem.* **19**, 4272–4278 (2021).
138. Greenfield, N. & Fasman, G. D. Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* **8**, 4108–4116

- (1969).
139. Freskgard, P. O., Mårtensson, L. G., Jonasson, P., Jonsson, B. H. & Carlsson, U. Assignment of the Contribution of the Tryptophan Residues to the Circular Dichroism Spectrum of Human Carbonic Anhydrase II. *Biochemistry* **33**, 14281–14288 (1994).
  140. Kelly, S. & Price, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 349–384 (2005).
  141. Du, Z., Su, H., Wang, W., Ye, L., Wei, H., Peng, Z., Anishchenko, I., Baker, D. & Yang, J. The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nat. Protoc.* **16**, 5634–5651 (2021).
  142. Fleishman, S. J., Leaver-Fay, A., Corn, J. E., Strauch, E. M., Khare, S. D., Koga, N., Ashworth, J., Murphy, P., Richter, F., Lemmon, G., Meiler, J. & Baker, D. Rosettascripts: A scripting language interface to the Rosetta Macromolecular modeling suite. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
  143. Gray, J. J., Moughon, S., Wang, C., Schueler-Furman, O., Kuhlman, B., Rohl, C. A. & Baker, D. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. *J. Mol. Biol.* **331**, 281–299 (2003).