Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński

Autoreferat pracy doktorskiej pt.

Synthesis and characterization of small-molecule inhibitors that target the programmed cell death ligand 1 protein

mgr Damian Muszak

Zespół Biologii Chemicznej i Projektowania Leków

Promotor:

prof. dr Tadeusz Holak

Promotor pomocniczy:

dr Ewa Surmiak

Kraków, 2020

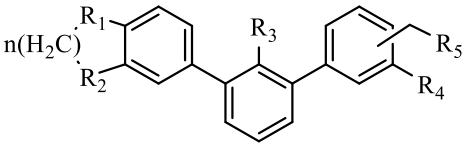
Główną nadzieją współczesnej medycyny jest opracowanie skutecznych metod leczenia nowotworów. Częstą przyczyną ich występowania jest dezaktywacja układu odpornościowego poprzez blokowanie szlaków komunikacji międzykomórkowej. Chorobowo zmienione komórki nie są prawidłowo rozpoznawane przez co nie mogą zostać zneutralizowane i usunięte z organizmu.

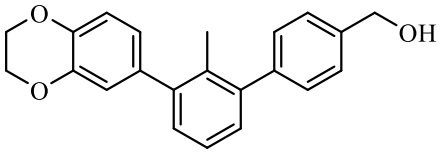
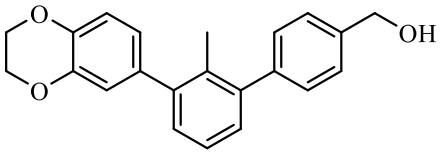
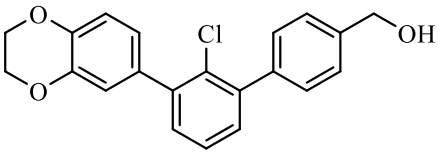
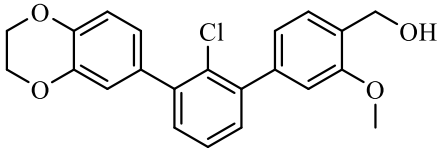
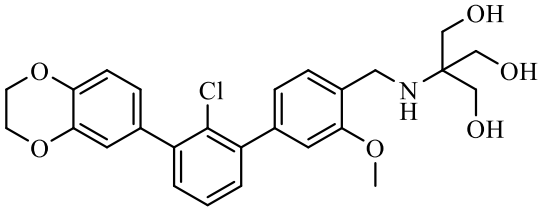
Jednym z czynników odpowiedzialnych za hamowanie aktywności limfocytów T jest receptor programowanej śmierci komórkowej 1 (*programmed cell death protein 1*; PD-1), ulokowany na powierzchni błony komórkowej komórek układu odpornościowego. Oddziaływanie białka PD-1 z jego naturalnym ligandem PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*) powoduje dezaktywację limfocytów T. Nadekspresja PD-L1 występuje w wielu typach nowotworów, na przykład w raku płuca, pęcherza czy czerniaku. Blokowanie interakcji PD-1/PD-L1 stało się podłożem immunoterapii, opartej na przeciwciałach monoklonalnych (*monoclonal antibodies,* mAbs), która odniosła spektakularny sukces w leczeniu wielu nowotworów. Sześć z testowanych klinicznie przeciwciał zostało zaakceptowanych przez Agencje Żywności i Leków (FDA) i są obecnie używane w onkologii. Terapia oparta na przeciwciałach posiada jednak kilka wad. Koszt leczenia jest wysoki, ze względu na sposób otrzymywania przeciwciał i bardzo restrykcyjne warunki ich przechowywania. Przeciwciała charakteryzują się dodatkowo niską zdolnością penetracji guza oraz słabą kontrolą farmakokinetyki, z czego wynika ich toksyczność. Podejrzewa się, że odkrycie niskocząsteczkowych inhibitorów oddziaływania PD-1/PD-L1 przyniesie rozwiązanie opisanych problemów. Ostatnimi czasy można dostrzec zintensyfikowanie poszukiwanie inhibitorów opisanego oddiaływania, co odzwierciedla się w dużej liczbie zgłoszeń patentowych i podkreśla ważność opracowanego przeze mnie zagadnienia.

Celem projektu była synteza potencjalnych inhibitorów skierowanych na oddziaływanie białek PD-1/PD-L1 opartych na rdzeniach: *N*-(4-(dimetylamino)benzylo)-*N*-metyloacetamidu, 1-indanolu, *N*-fenylo-δ-walerolaktamu, *N*-bifenylo-δ-walerolaktamu i 2'-metylo-*m*-terfenylu, zaprojektowanych na podstawie analizy struktury znanego inhibitora białka PD-L1, opisanego w literaturze. Wszystkie zaplanowane w ten sposób cząsteczki zostały pomyślnie zsyntezowane z użyciem syntez liniowych lub częściowo zbieżnych. Aktywności otrzymanych związków zostały ocenione metodą pomiarów fluorescencji czasowo rozdzielczej (*Homogenous Time Resolved Fluorescence*; HTRF). Badania wykazały, że tylko inhibitory zbudowane na rdzeniu terfenylowym charakteryzują się wysokim potencjałem do blokowania oddziaływania PD-1/PD-L1.

W dalszych etapach badań, struktura rdzenia terfenylowgo została zoptymalizowana, poprzez syntezę szeregu pochodnych (Rysunek 1) i ewaluację ich aktywności po każdej modyfikacji, co w konsekwencji doprowadziło do uzyskania cząsteczek o bardzo wysokich powinowactwach do białka PD-L1 charakteryzujących się nanomolowymi wartościami IC_{50}.

Struktura optymalizowanej pochodnej terfenylu:



Krok:	Optymalizowany fragment cząsteczki:	Znaleziony fragment o najwyższym potencjale w blokowaniu oddziaływania PD-1/PD-L1:
1	R_1, R_2	 46% niezdysocjowanego kompleksu PD-1/PD-L1 przy 5.0 μM inhibitora
2	Pozycja podstawnika R_5 w proksymalnym pierścieniu fenylowym.	 46% niezdysocjowanego kompleksu PD-1/PD-L1 przy 5.0 μM inhibitora
3	R_3	 1% niezdysocjowanego kompleksu PD-1/PD-L1 przy 5.0 μM inhibitora
4	R_4	 7% niezdysocjowanego kompleksu PD-1/PD-L1 przy 500 nM inhibitora
5	R_5	 0% niezdysocjowanego kompleksu PD-1/PD-L1 przy 5.0 nM inhibitora

Rysunek 1. Poszczególne kroki optymalizacji strukturalnej zaprojektowanej pochodnej terfenylu.

Podczas optymalizacji wzięto pod uwagę rodzaj podstawników przyłączonych do dystalnego pierścienia fenylowego (krok 1), pozycję grupy hydroksymetylowej (krok 2), podstawnik przy atomie węgla C-2' centralnego pierścienia aromatycznego (krok 3), rodzaj grupy alkoksylowej w proksymalnym pierścieniu tworzącym terfenyl (krok 4) oraz rodzaj aminowego ogona przyłączony do grupy metylenowej (krok 5).

Wspomagana komputerowo analiza relacji struktura-aktywność wykazał, że optymalnym podstawnikiem, analizowanym w pierwszym kroku optymalizacji, jest glikol etylenowy, tworzący wraz z pierścieniem fenylowym układ benzodioksanu, co zostało potwierdzone eksperymentalnie. Typ podstawnika przyłączonego do węgla C-2' centralnego pierścienia arylowego jest mniej rygorystyczny, wprowadzenie podstawników -Br, -CN lub -Cl jest korzystne dla interakcji, z niewielką preferencją podstawnika chlorowego.

Wprowadzenie podstawnika metoksylowego przyłączonego do atomu C-3 dystalnego pierścienia fenylowego wpływa pozytywnie na wzrost powinowactwa optymalizowanej struktury, jednakże dalsze jego wydłużanie znacznie obniża aktywność cząsteczki.

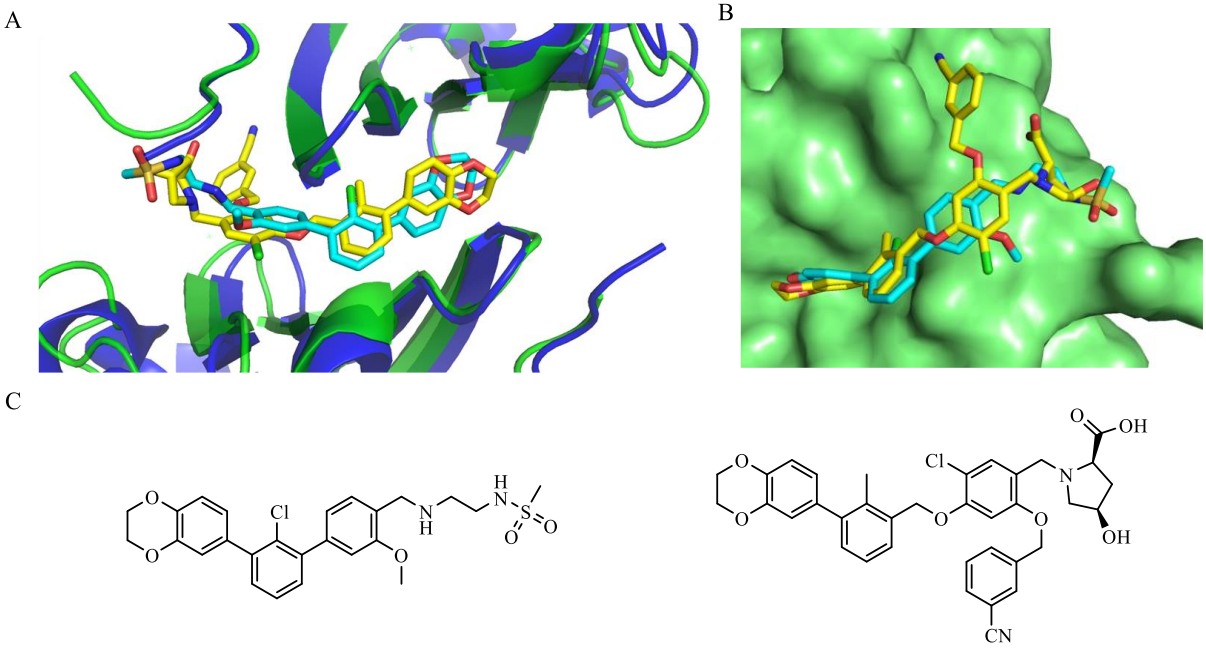
Największy wpływ na powinowactwo molekuły do białka PD-L1 ma rodzaj podstawnika przyłączonego do grypy metylenowej. Najlepsze rezultaty otrzymano poprzez wprowadzenie tris(hydroksymetylo)aminometanu, jednak wydłużenie z użyciem pochodnych etylenodiaminy także pozytywnie wpływa na aktywność otrzymanych cząsteczek.

Fragmenty z kroków 1, 2 i 4 zsyntezowane zostały na drodze krzyżowego sprzęgania Suzukiego z użyciem 2,6-dibromotoluenu lub 1,3-dibromo-2-chlorobenzenu, odpowiednich pochodnych kwasu fenyloboronowego oraz $Pd(dppf)Cl_2$ jako katalizatora. Etap 3 optymalizacji został osiągnięty z zastosowaniem reakcji Sandmeyera wychodząc z aminowej pochodnej terfenylu, zaś w kroku 5 przeprowadzono alkohol w chlorową pochodną z użyciem $SOCl_2$ oraz katalitycznych ilości *N,N*-dimetyloformamidu, po czym użyto jej w reakcjach alkilowania amin.

Zdolność otrzymanych molekuł do aktywacji limfocytów T została poddana ocenie *in-vitro* na liniach komórkowych. Sześć spośród nich wykazało aktywność, z wartościami EC_{50} w zakresie 1.03 - 11.08 μM.

Sposób oddziaływania finalnych cząsteczek z białkiem PD-L1 określono z użyciem protonowej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (*^{1}H Nuclear Magnetic Resonance*; ^{1}H NMR). Otrzymane widma jednoznacznie świadczą o oligomeryzacji białka po dodaniu

inhibitora. Dimeryzacja białka została potwierdzona także techniką rentgenografii strukturalnej (Rysunek 2).



Rysunek 2. Porównanie sposobu oddziaływania jednej ze zoptymalizowanych pochodnych terfenylu (niebieski) oraz wiodącego inhibitora oddziaływania PD-1/PD-L1 (żółty): A) oddziaływanie dwóch monomerów tworzących dimer; B) ułożenie na powierzchni monomeru PD-L1; C) porównanie struktury zoptymalizowanej pochodnej tefrenylu (lewa) oraz wiodącego inhibitora PD-L1, BMS-1166 (prawa).

Otrzymana struktura krystaliczna ujawniła niskocząsteczkowy inhibitor znajdujący się w środku homodimeru, wypełniający głęboki, hydrofobowy kanał uformowany na styku dwóch cząsteczek białka. Uzyskana informacja strukturalna może być użyteczna w dalszej optymalizacji inhibitorów PD-L1 opartych na rdzeniu terfenylowym.