



Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Chemii

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Small-molecule inhibitors, stapled peptides, and homo-PROTACs
against oncogenic proteins: Mdm2 and CD44,
as a basis of anticancer therapy

Beata M. Łabuzek

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem Prof. dr Tadeusza Holaka

Kraków, 2023

Choroby nowotworowe stanowią obecnie główną przyczynę śmierci. Dane statystyczne pokazują, że w wyniku chorób nowotworowych na całym świecie w 2020 roku zmarło 10 milionów ludzi. Według Światowej Organizacji Zdrowia, wzrost liczby nowych przypadków szacowany jest na 47% w ciągu najbliższych dwóch dekad. Obecnie dostępne terapie pozwalają na leczenie tylko niektórych typów nowotworów, często powodując poważne skutki uboczne. Badania mające na celu zrozumienie procesów leżących u podstaw kancerogenezy i kompleksowe scharakteryzowanie zaangażowanych w nie cząsteczek jest niezbędne do wprowadzania nowych strategii przeciwnowotworowych pozwalających na skuteczne leczenie obecnych i przyszłych pacjentów.

Supresor nowotworowy p53, zwany również "strażnikiem genomu", odpowiada za regulację procesów, uznanych za krytyczne dla utrzymania stabilności genetycznej, a tym samym ochrony komórek przed wejściem na drogę transformacji nowotworowej. Pełniąc rolę czynnika transkrypcyjnego p53 w wyniku aktywacji przez czynniki stresowe, głównie uszkodzenia DNA, indukuje ekspresję genów odpowiedzialnych m. in. za zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawę DNA i apoptozę. Wspólną cechą charakterystyczną dla onkogenezy w przypadku niemal wszystkich ludzkich nowotworów jest upośledzenie aktywności p53, na drodze mutacji w genie kodującym białko (TP53) lub poprzez nadekspresję jego negatywnych regulatorów, Mdm2 i MdmX. W związku z tym zarówno prowadzone badania jak i proponowane strategie terapeutyczne, które dążą do przywrócenia aktywności niezmutowanego p53, opierają się na uwolnieniu go spod inhibicji negatywnych regulatorów przy użyciu różnych klas cząsteczek.

Pierwszym celem prowadzonych prac badawczych była identyfikacja związków o potencjale hamującym interakcje p53-Mdm2/MdmX na drodze klasycznej inhibicji lub poprzez ukierunkowanie Mdm2 do degradacji w proteasomie, jak również zapewnienie biochemicznej i strukturalnej charakterystyki wiązania tych cząsteczek z białkami docelowymi.

Niniejsza rozprawa doktorska opisuje badania nad peptydami typu "stapled" (ang. stapled peptides, SP) i małowcząsteczkowymi inhibitorami zdolnymi do blokowania interakcji Mdm2 i MdmX z p53 oraz grupę degraderów homo-PROTAC, które potencjalnie mogą pośredniczyć w proteasomalnej degradacji Mdm2.

Pierwszą klasę antagonistów szlaku p53-Mdm2/MdmX stanowiły peptydy typu "stapled". Peptydy otrzymano w wyniku makrocyklizacji acyklicznych peptydów prekursorowych na drodze reakcji wieloskładnikowych. W oparciu o charakterystykę biochemiczną z wykorzystaniem zmian polaryzacji fluorescencji (ang. fluorescence polarization, FP) i termoforezy mikroskalowej (ang. microscale thermophoresis, MST) określono powinowactwo wiązania wszystkich badanych peptydów względem Mdm2 i MdmX w zakresie nanomolowym. Oddziaływanie peptydów z obydwoma białkami docelowymi wskazuje także na ich potencjał do podwójnej inhibicji. Ponadto, eksperymenty spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) potwierdziły przewidywane wiązanie się reprezentatywnego peptydu w kieszeniach wiążących p53 na powierzchni Mdm2 i MdmX. Dostępne struktury krystaliczne kompleksu białka Mdm2 z wybranymi peptydami dowiodły, że w wyniku makrocyklizacji liniowych peptydów utworzone zostały α -helisy wykazujące charakterystyczny tryb wiązania naśladujący p53 w interakcji z Mdm2. Uzyskane wyniki stanowią solidną podstawę do dalszych badań aktywności biologicznej wybranych peptydów metodami *in vitro* na liniach ludzkich komórek nowotworowych. Pozytywne rezultaty tychże analiz byłyby zaś dużym postępem ku ich dalszej ocenie przedklinicznej.

Druga grupa badanych związków obejmowała cząsteczki homo-PROTAC, które w założeniu miały indukować degradację onkoproteiny Mdm2 w proteasomie, wykorzystując jej natywną aktywność ligazy ubikwitynowej. Przeprowadzone badania koncentrowały się wyłącznie na biochemicznej charakterystyce proponowanych homo-PROTAC-ów w kontekście wiązania z Mdm2 i pośredniczenia w tworzeniu dimerów białka w roztworze. Wykonane pomiary polaryzacji fluorescencji oraz zarejestrowane widma NMR, potwierdziły wiązanie pięciu potencjalnych homo-PROTAC-ów do białka Mdm2. Jedna z badanych cząsteczek homo-PROTAC wykazała również zdolność do dimeryzacji tego białka w roztworze. Potwierdzenie w testach komórkowych właściwości tego związku do ukierunkowania Mdm2 na degradację w proteasomie mogłoby być przełomowym odkryciem, a badane cząsteczki stanowiłyby nowy rodzaj związków mający szansę w strategiach terapeutycznych. Dodatkowo, wyniki te dowiodłyby przydatności metodologii zastosowanej do wstępnego badania homo-PROTAC, zachęcając do wyboru tych samych technik w kontekście oceny innych związków należących do tej klasy.

Trzecia część badań w tematyce szlaku p53-Mdm2 skupiała się na charakterystyce biochemicznej i strukturalnej małowcząsteczkowego inhibitora Mdm2 będącego pochodną cis-imidazoliny Nutlin-3a. W przeprowadzonym teście polaryzacji fluorescencji związek

wykazał pięciokrotnie wyższą siłę blokowania interakcji między Mdm2 a reporterowym peptydem p53 w porównaniu do prekursora Nutlin-3a. Ponadto, wykonane badania NMR potwierdziły wiązanie antagonisty w obrębie kieszeni wiążącej p53 na powierzchni białka. Uzyskana struktura krystaliczna kompleksu tego związku z Mdm2 ujawniła nieoczekiwane zmiany konformacyjne w obrębie cząsteczki wynikające z wprowadzenia egzocyklicznej grupy metylenowej, jednocześnie sugerując, iż jedna cząsteczka badanego inhibitora może oddziaływać z dwiema cząsteczkami białka docelowego. Zaobserwowany efekt nie został jednak potwierdzony w badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem roztworu tego białka, przez co wcześniejszy wynik uznano za artefakt krystalizacyjny i wykluczono formację dimeru jako przyczynę zwiększonej aktywności związku. Niemniej jednak, wprowadzenie modyfikacji do struktury inhibitora i wynikające z tego zmiany konformacyjne wydają się również wpływać na zwiększenie jego aktywności biologicznej w liniach ludzkich komórek nowotworowych.

Główny receptor kwasu hialuronowego, CD44, jest drugim białkiem stanowiącym cenny biomarker prognostyczny oraz obiecujący cel terapii przeciwnowotworowej. CD44 występuje na powierzchni wielu typów komórek. W wyniku oddziaływania z ligandem oraz następującej aktywacji różnych szlaków sygnałowych białko to bierze udział w interakcjach komórka-komórka, komórka-macierz oraz procesach komórkowych takich jak proliferacja, różnicowanie, adhezja, migracja, waskulogeneza czy angiogeneza. Większość z wyżej wymienionych funkcji fizjologicznych CD44 może być z łatwością adaptowana przez komórki nowotworowe, które wykazują nadekspresję różnych izoform tego białka na swojej powierzchni. Przeprowadzone analizy kliniczne udowodniły, że aktywacja CD44 przyczynia się do promowania wzrostu komórek, ich proliferacji, migracji, inwazji, przejścia epithelialno-mezenchymalnego (epithelial-mesenchymal transition, EMT), macierzystości, a także oporności na chemio- i radioterapię w agresywnych postaciach raka.

Możliwość modulowania interakcji między CD44 i jego głównym ligandem, kwasem hialuronowym, za pomocą małych cząsteczek może być obiecującym podejściem do rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych. Dlatego drugim celem pracy doktorskiej było wyselekcjonowanie małocząsteczkowych inhibitorów oddziaływania CD44 z kwasem hialuronowym, a następnie wyjaśnienie ich sposobu wiązania w oparciu o uzyskane struktury krystaliczne kompleksu białko-ligand.

W trakcie podjętych badań zidentyfikowano cztery nowe fragmenty wiążące się z receptorem CD44. Zastosowana technika miareczkowania NMR pozwoliła wyznaczyć, iż powinowactwo wiązania wyselekcjonowanych fragmentów mieściło się w zakresie

milimolowym. Dodatkowo, wybrane związki wykazywały dwa różne sposoby wiązania z białkiem CD44. Pierwszy z nich pozwalał na jednoczesną interakcję z oktamerem kwasu hialuronowego (HA₈), natomiast drugi wydawał się z nim konkurować. W konsekwencji, zidentyfikowane fragmenty, zwłaszcza te, które mogą potencjalnie blokować wiązanie hialuronianu z CD44 wydają się stanowić związki wiodące do dalszej optymalizacji.

Co więcej, jako rezultat dodatkowych eksperymentów z wykorzystaniem testu przesunięcia temperatury topnienia białka (ang. thermal shift assay, TSA), wyodrębniono kolejne fragmenty o potencjale do wiązania CD44, jednakże ortogonalne pomiary jednowymiarowych widm NMR nie potwierdziły tych wyników.

Ostatnia część badań koncentrowała się na próbach krystalizacji kompleksów białko-inhibitor, które miały na celu szczegółową charakterystykę strukturalną dwóch zidentyfikowanych typów oddziaływań pomiędzy CD44, a najbardziej rokującymi fragmentami. W trakcie badań nie udało się uzyskać struktury krystalograficznej dla tych kompleksów. Podjęto również osobne próby krystalizacji ludzkiego CD44 z oktamerem kwasu hialuronowego, mając na uwadze dostępność struktury jedynie dla kompleksu mysiego białka z HA₈, jednak próby te również zakończyły się niepowodzeniem.

Podsumowując, przedstawione badania przyczyniły się do identyfikacji peptydów typu "stapled" oraz małowcząsteczkowego inhibitora o ponadprzeciętnej zdolności do inhibicji białek Mdm2 i MdmX, wskazując na ich potencjał do dalszych badań w kontekście zastosowania klinicznego. Dodatkowo, zaprezentowana ścieżka wstępnej biochemicznej analizy aktywności związków homo-PROTAC pozwoliła na wyróżnienie kandydata do komórkowej oceny jego efektywności w pośredniczeniu krzyżowej degradacji białka Mdm2. Związek ten mógłby stanowić przedstawiciela nowej grupy degraderów o znaczeniu klinicznym, a zastosowana metodyka w przyszłości posłużyłaby do przesiewowej identyfikacji innych cząsteczek tego typu. W toku prowadzonych badań wyróżniono również małowcząsteczkowe związki z potencjałem do rozwoju w kierunku uzyskania silnych inhibitorów białka CD44 o działaniu terapeutycznym.