

'Design, synthesis, and activity evaluation of small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 interaction'

Streszczenie

Wykazano, że receptor programowanej śmierci 1 (PD-1) ma istotny wpływ na regulację autoimmunizacji, w tym zarówno na indukcję, jak i utrzymanie obwodowej tolerancji. Jednakże wiązanie PD-1 z jego ligandem PD-L1 skutkuje zahamowaniem odpowiedzi immunologicznej organizmu. Utworzenie kompleksu PD-1/PD-L1 skutkuje również zahamowaniem proliferacji limfocytów T, uwalnianiem cytokin oraz działaniem cytotoksycznym, co prowadzi do apoptozy swoistych dla nowotworu limfocytów T. Niemniej jednak dowiedziono, że wprowadzenie antagonisty ukierunkowanego na interakcję PD-1/PD-L1 pozwala na modulację odporności. Obecnie metody immunoterapeutyczne stopniowo zaczynają wypierać bardziej konwencjonalne metody leczenia nowotworu, takie jak chemioterapia i radioterapia. Wdrożenie strategii opartych na immunoterapii poprzez wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych (mAb) wykazało wyraźnie, że modulacja odpowiedzi immunologicznych może przywrócić funkcje specyficznych limfocytów T i normalizować odpowiedzi przeciwnowotworowe, będąc tym samym skuteczną strategią w leczeniu raka. Niestety, poza wymienionymi zaletami, zastosowanie mAb w terapii wiąże się z licznymi niedogodnościami, takimi jak: zły profil farmakokinetyczny przy podawaniu doustnym, niekorzystne skutki uboczne pochodzenia immunologicznego (irAE) oraz słaba penetracja guza ze względu na duże rozmiary (150 kDa) przeciwciała. Ponadto terapie oparte na wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych są skorelowane z wysokimi kosztami, co ogranicza możliwości adaptacyjne tego podejścia immunoterapeutycznego. Jednakże, imponujące wyniki badań klinicznych uzyskanych z użyciem mAb sprawiły, że intensywnie poszukuje się małowcząsteczkowych inhibitorów ukierunkowanych na punkt kontrolny PD-1/PD-L1. Zastosowanie małowcząsteczkowych antagonistów PD-1/PD-L1 mogłoby przezwyciężyć niedogodności związane ze stosowaniem mAb, zapewniając jednocześnie alternatywne podejście immunoterapeutyczne. Dlatego poszukiwanie niskocząsteczkowych inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego PD-1/PDL1 jest intensywnie rozwijającym się tematem badawczym, a optymalizacja struktury potencjalnych antagonistów stała się również przedmiotem mojego zainteresowania.

Głównym celem zrealizowanych badań była optymalizacja struktury, przeprowadzenie syntezy organicznej oraz analiza aktywności biochemicznej otrzymanych związków pod kątem ich zastosowania jako antagonistów PD-L1. W prezentowanej rozprawie doktorskiej

zaprojektowano, otrzymano i zbadano dziesięć grup drobnocząsteczkowych inhibitorów punktu immunologicznego PD-1/PD-L1.

Początkowo w ramach prowadzonych badań zsyntetyzowano immunomodulatory PD-1/PD-L1 w postaci pochodnych 1,1'-bifenylu. Fragmenty stanowiące rdzenie poszczególnych grup molekuł zostały zoptymalizowane dzięki takim metodom jak: badanie przesiewowe *in silico* zaprojektowanych krótkich fragmentów, przeprowadzone przy udziale oprogramowania AutoDock Vina, zintegrowanego z PyRx; spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), połączona z testem dysocjacji indukowanej słabym antagonistą (*w*-AIDA); pomiary fluorescencji czasowo-rozdzielczej (HTRF, Homogenous Time Resolved Fluorescence) oraz na podstawie znanych dotychczas w literaturze struktur antagonistów białka PD-L1. Stosując syntezę zbieżną i liniową, z powodzeniem otrzymano inhibitory pochodzące od 2H-benzo[b][1,4]oksazyn-3(4H)-onu, 2-bromo-1,1'-bifenylu, 1,1':2',1''-terfenylu, 2-fluoro-1,1'-bifenylu, 2-chloro-1,1'-bifenylu oraz 2-jodo-1,1'-bifenylu. W sumie otrzymano 29 krótkich końcowych inhibitorów PD-1/PD-L1. Przedstawiona praca opisuje zarówno drogi syntezy, jak i pełną i precyzyjną charakterystykę otrzymanych inhibitorów.

Wstępnie powinowactwo otrzymanych związków w stosunku do punktu kontroli immunologicznej PD-1/PD-L1 określono przy użyciu techniki HTRF. Związki wykazujące znaczne powinowactwo do dysocjacji kompleksu PD-1/PD-L1 poddano dalszym badaniom na liniach komórkowych, poprzez test blokady immunologicznego punktu kontrolnego hPD-1/hPD-L1. Zaobserwowany wzrost aktywności lucyferazy dowiódł zależnej od TCR stymulacji komórek T Jurkat dla niektórych związków.

Spośród otrzymanych związków najbardziej zadowalające wyniki uzyskano dla inhibitora **3.17** jako pochodnej 2-bromo-1,1'-bifenylu. Częsteczka charakteryzowała się połową maksymalnego stężenia hamującego - IC₅₀ na poziomie 15,0 ± 0,2 nM i połową maksymalnego stężenia skutecznego - EC₅₀ na poziomie 6,6 ± 0,8 μM oraz brakiem cytotoksyczności w zakresie aż do 100 μM stężenia związku. Ponadto zbadano profil oddziaływania **3.17** z dimerycznym PD-L1 dzięki użyciu oprogramowania Protein-Ligand Interaction Profiler. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła wyróżnić rdzeń bifenylowy jako część cząsteczki odpowiedzialną za zakotwiczenie inhibitora w szczelinie hydrofobowej dimerycznego PD-L1, zapewniając tym samym oddziaływanie typu π-π z Tyr56_A. Inne ważne oddziaływania typu niewiążącego stwierdzono między centralnym pierścieniem aromatycznym cząsteczki **3.17** a Tyr56_B. Co więcej spośród wykrytych oddziaływań wiązanie wodorowe pomiędzy grupą OH- z Tyr56_B i atomem N z grupy rozpuszczającej a także

oddziaływanie pomiędzy atomem N z Asn63_B, a atomem O z grupy -COOH kwasu L-pipekolinowego wykazały kluczowy i stabilizujący efekt wiązania cząsteczki. Dodatkowo zaobserwowano utworzenie mostka solnego pomiędzy trzeciorzędowym atomem N kwasu L-pipekolinowego, a grupą -COOH z Asp122_A świadczącego o znaczeniu aminokwasu wbudowanego w strukturę cząsteczki.

Ponadto prezentowana praca zawiera opis otrzymanej struktury krystalicznej inhibitora o rdzeniu 2-fluoro-1,1'-bifenylu – **3.54** z dimerycznym białkiem h-PD-L1. Uzyskane dane pozwoliły zrozumieć interakcje molekularne **3.54** z targetem białkowym i pokazały, że ugrupowanie 1,4-benzodioxanu zaangażowane w oddziaływanie z Tyr56_A i zapewniające dalsze kontakty z Ile54_A i Ala121_B jest kluczowe dla profilu wiązania cząsteczki. Ponadto, poza wykrytymi licznymi oddziaływaniami hydrofobowymi, można zaobserwować wiązanie wodorowe pomiędzy grupą rozpuszczającą tris(hydroksymetylo)aminometanu cząsteczki a Asp122_A. Ostatnie z wymienionych oddziaływań dowodzi wprost, że grupa rozpuszczająca jest nie tylko odpowiedzialna za rozpuszczalność związku, ale jest także niezbędna do zapewnienia odpowiednich interakcji z białkiem.

W ramach kontynuacji badań podjęto próbę syntezy grupy wydłużonych, małowcząsteczkowych antagonistów punktu kontroli immunologicznej PD-1/PD-L1. W rezultacie otrzymano 30 struktur końcowych jako pochodnych rdzeni 2,3-dihydro-1H-indenu, 2,2'-dimetylo-1,1'-bifenylu, 2-fluoro-2'-metylo-1,1'-bifenylu i 3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oksazyny. Spośród wskazanych, najlepsze właściwości wykazały pseudo C₂-symetryczne pochodne 2-fluoro-2'-metylo-1,1'-bifenylu oraz 2,2'-dimetylo-1,1'-bifenylu. Osiem z otrzymanych pochodnych (**7.29**, **7.31-7.37**) charakteryzowało się IC₅₀ w zakresie do 15 nM, a dziewięć spośród otrzymanych antagonistów (**5.6-5.8**, **7.31-7.36**) wykazywało EC₅₀ w zakresie do 500 nM. A zatem dowiedziono, że zastosowana modyfikacja małych cząsteczek związana z ich wydłużeniem i powiększeniem ich struktury, przyczyniła się do wzmocnienia wiązania inhibitorów poprzez zwiększenie liczby jego oddziaływań z białkiem PD-L1.

Podsumowując, wyniki przedstawionych w tej rozprawie badań, związanych zarówno z analizą zależności struktura-aktywność (SAR), jak i otrzymywaniem związków metodami syntezy organicznej, mogą przyczynić się do powstania nowej klasy potencjalnych inhibitorów punktu kontroli immunologicznej PD-1/PD-L1.