Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.

Charakterystyka nowych, zaprojektowanych metodami chemii obliczeniowej inhibitorów aminopeptydazy leucynowej

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna

w formie komentarza do publikacji

Joanna Ziemska

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Bezpieczeństwa Zdrowotnego Środowiska
Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny
pod kierunkiem dr hab. Jolanty Soleckiej, prof. NIZP-PZH oraz dr Małgorzaty Jarończyk

Zbiór publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. Joanna Ziemska, Jolanta Solecka: Tyrosine kinase, aurora kinase and leucine aminopeptidase as attractive drug targets in anticancer therapy – characterization of their inhibitors, Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 2016, 67(4), 329-342, MNiSW 14 pkt.

2. Joanna Ziemska, Adam Guśpiel, Joanna Jarosz, Anna Nasulewicz-Goldeman, Joanna Wietrzyk, Robert Kawęcki, Krzysztof Pypowski, Małgorzata Jarończyk, Jolanta Solecka: Molecular docking studies, biological and toxicity evaluation of dihydroisoquinoline derivatives as potential anticancer agents, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2016, 24, 5302-5314, IF 2,930, MNiSW 30 pkt.

3. Joanna Ziemska, Jolanta Solecka, Małgorzata Jarończyk: QSAR, docking studies and toxicology prediction of isoquinoline derivatives as leucine aminopeptidase inhibitors, Chemical Papers, 2017, 71, 2557-2568, IF 0,963, MNiSW 20 pkt.

4. Joanna Ziemska, Jolanta Solecka, Małgorzata Jarończyk: *In silico* screening for novel leucine aminopeptidase inhibitors with 3,4-dihydroisoquinoline scaffold, Molecules, 2020, 25(7), 1753, IF 3,267, MNiSW 100 pkt.

Łączna punktacja dla cyklu publikacji

IF= 7,16

Wstęp

Zachorowalność na nowotwory i liczba zgonów z ich powodu szybko rośnie na całym świecie. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia, choroby nowotworowe stanowią pierwszą lub drugą główną przyczynę przedwczesnych zgonów ludzi w 134 na 183 kraje świata. Chemioterapia jest jedną z podstawowych metod leczenia chorób nowotworowych i polega na podaniu leków cytostatycznych. Dostępne w lecznictwie substancje przeciwnowotworowe często charakteryzują się niskim indeksem terapeutycznym jak i wysoką toksycznością. Tradycyjne metody poszukiwania nowych leków są skomplikowane, czasochłonne i kosztowne, a także niosą duże ryzyko niepowodzeń. Natomiast, zastosowanie molekularnych metod poszukiwania leków przy użyciu technik teoretycznych, w tym projektowania substancji leczniczych, przyczyniło się do wprowadzenia do lecznictwa nowych cząsteczek w szybszy i bardziej ekonomiczny sposób.

Proces projektowania nowej substancji leczniczej jest wieloetapowy i składa się m.in. z wyboru miejsca docelowego (to jest celu molekularnego, z ang. *target*) dla leku, wyboru modelu badawczego, przeprowadzenia wirtualnych przeszukiwań (z ang. *virtual screening*), wyselekcjonowania i optymalizacji struktur wiodących (z ang. *lead compounds*), syntezy chemicznej wybranych cząsteczek, badań biologicznych i toksykologicznych, a następnie badań przedklinicznych i klinicznych. Do miejsc docelowych dla leków należą najczęściej białka, w tym enzymy i receptory. Jednym z takich enzymów jest aminopeptydaza leucynowa (z ang. *leucine aminopeptidase*, LAP), której nadekspresję obserwuje się w różnych stanach patologicznych, takich jak choroby nowotworowe. Inhibitory aminopeptydaz leucynowych budzą obecnie duże zainteresowanie jako potencjalnie nowe substancje przeciwnowotworowe.

Cel pracy

Głównym celem pracy doktorskiej było zaprojektowanie i scharakteryzowanie nowych inhibitorów LAP poprzez: zaprojektowanie pochodnych izochinoliny z wykorzystaniem różnych metod teoretycznych; wirtualne przeszukiwanie chemicznych baz danych w celu znalezienia pochodnych izochinoliny; zaproponowanie struktur 3D zaprojektowanych związków, znanych inhibitorów oraz cząsteczek pozyskanych z wirtualnych przeszukiwań w centrum aktywnym LAP; określenie oddziaływań tych związków z LAP przy udziale metod modelowania molekularnego oraz badanie zależności aktywności biologicznej badanych związków od ich budowy chemicznej (SAR oraz 3D-QSAR). Ponadto przeprowadzono badania właściwości farmakokinetycznych zaprojektowanych związków *in silico* oraz badań toksykologicznych metodami eksperymentalnymi i *in silico*. Dodatkowo sprawdzono

aktywność biologiczną pochodnych izochinoliny w badaniach eksperymentalnych (*in vitro* zahamowania aktywności LAP oraz na liniach komórek nowotworowych).

Materiały i metody

W pracy zastosowano dwa rodzaje badań: teoretyczne i eksperymentalne. Do metod teoretycznych należały badania modelowania molekularnego przeprowadzone technikami komputerowymi. Związki wybrane do badań pochodziły z wirtualnego przeszukiwania chemicznych baz danych i były projektowane m. in. przy użyciu programu Spark (Cresset, Wielka Brytania). Dokowanie molekularne (z ang. *molecular docking*) przeprowadzone za pomocą oprogramowania ICM-Pro 3.8-5 (Molsoft LLC, USA) i Lead Finder (BioMolTech, Kanada) polegało na obliczeniu najbardziej prawdopodobnej struktury 3D badanych związków, ich ułożenia i oddziaływań w centrum aktywnym białka aminopeptydazy leucynowej. Następną metodą było utworzenie modelu ilościowej zależności struktura-aktywność 3D-QSAR za pomocą oprogramowania Forge 10.4 (Cresset, Wielka Brytania). Model ten wykorzystano do przewidywania aktywności biologicznej nowych związków zaprojektowanych oraz pozyskanych z wirtualnych przeszukiwań. Kolejną metodą zastosowaną w pracy doktorskiej było obliczenie przewidywanych parametrów farmakokinetycznych tj. absorpcji, dystrybucji, metabolizmu, wydalania oraz toksyczności badanych związków przy użyciu programów SwissADME, PaDEL-DDPredictor oraz admetSAR.

Do metod eksperymentalnych należały badania *in vitro* aktywności zahamowania LAP przez zsyntetyzowane związki, analizy właściwości przeciwproliferacyjnych na liniach komórek nowotworowych oraz testy toksykometryczne na zwierzętach.

Podsumowanie najważniejszych wyników

1. Na drodze syntezy chemicznej otrzymano serię 14 zaprojektowanych pochodnych dihydroizochinoliny, dla których wykonano badania teoretyczne oraz eksperymentalne– zahamowania aktywności LAP oraz właściwości przeciwproliferacyjnych.
2. Stwierdzono, że jeden z badanych związków, 6,8-dibenzyloksy-3,4-dihydroizochinolino-3,3-dikarboksylan dietylu wykazuje bardzo wysoką aktywność przeciwproliferacyjną (wyższą niż cisplatyna) wobec niektórych linii komórek nowotworowych. Charakteryzuje się również wysoką wartością współczynnika selektywności SI wobec komórek nowotworowych w stosunku do jego wpływu na komórki prawidłowe. 6,8-dibenzyloksy-3,4-dihydroizochinolino-3,3-dikarboksylan dietylu hamuje cykl komórkowy na etapie przejścia komórki z fazy G1 do S. Wykazano również, że badany związek indukuje apoptozę w komórkach HL-60. Ponadto,

wyniki badań na zwierzętach wykazały, że związek ten charakteryzuje się korzystnym profilem toksykologicznym.

3. Obliczono struktury 3D (ułożenia) ponad 25 000 związków (otrzymanych na drodze projektowania oraz wirtualnego przeszukiwania), w tym 6,8-dibenzyloksy-3,4-dihydroizochinolino-3,3-dikarboksylanu dietylu, w centrum aktywnym aminopeptydazy leucynowej. Określono kluczowe dla zahamowania enzymu LAP oddziaływania badanych związków w jego centrum aktywnym.

4. Uzyskano model 3D-QSAR, który pozwolił na przewidywanie aktywności biologicznej związków zaprojektowanych oraz otrzymanych na drodze wirtualnego przeszukiwania. Zidentyfikowano pola molekularne określające przestrzenne rozmieszczenie korzystnych i niekorzystnych oddziaływań w cząsteczkach badanych związków. Przewidywana aktywność zahamowania LAP wyrażona jako pIC_{50} dla pochodnych izochinoliny powinna wynosić pomiędzy 3,8-6,2.

5. Wyselekcjonowano 42 pochodne izochinoliny (zaprojektowane oraz pozyskane na drodze wirtualnego przeszukiwania) o przewidywanych wysokich aktywnościach zahamowania LAP i silnym wiązaniu z enzymem. Dla wszystkich badanych związków obliczono przewidywaną toksyczność. Dla wybranych 9 związków stwierdzono korzystne właściwości farmakokinetyczne, takie jak wchłanianie, metabolizm oraz podobieństwo strukturalne do zarejestrowanych już leków.

Wnioski

1. Przeprowadzone badania pozwoliły na odkrycie inhibitorów aminopeptydazy leucynowej o nowej strukturze chemicznej – pochodnych izochinoliny, co zostało po raz pierwszy opisane przeze mnie w literaturze.

2. Związek modelowy, 6,8-dibenzyloksy-3,4-dihydroizochinolino-3,3-dikarboksylan dietylu z uwagi na silną inhibicję LAP, wysoką aktywność przeciwproliferacyjną i selektywne działanie wobec komórek nowotworowych, a także na niską toksyczność, może być potencjalnie wykorzystany do badań przedklinicznych i klinicznych, a docelowo brany pod uwagę w terapii przeciwnowotworowej.

3. Wykonane badania teoretyczne, wykorzystujące nowoczesne metody projektowania potencjalnych leków, stanowią istotny wkład w poszukiwanie aktywnych substancji przeciwnowotworowych i mogą przyczynić się do skrócenia etapów i obniżenia kosztów odkrywania nowych leków.