

PB3.3. Vývoj látek proti HBV cílených proti proteinu STING (Birkuš, Nencka)

Cíle výzkumu

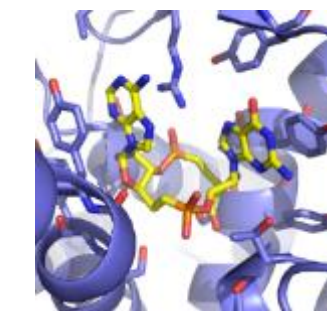
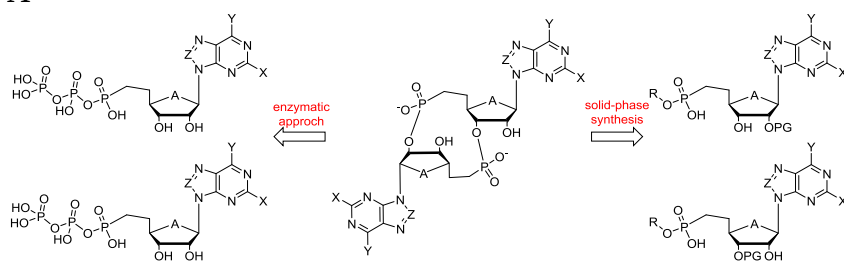
- Návrh a příprava vhodných prekurzorů pro syntézu CDN – nukleotid fosfonáty a jejich dále fosforylovaná analoga.
- Vývoj enzymatických cyklizačních reakcí fosforylovaných analogů nukleotid fosfonátů na CDN.
- Rozpracování možného praktického přístupu k syntéze CDN na pevné fázi.
- Systematické vyhledávání fragmentů molekul s afinitou k proteinu STING pomocí NMR metodologií a vypracování takto objevených fragmentů do molekul s vlastnostmi léčiv.
- Virtuální screening malých molekul s vlastnostmi agonistů STING a chemická optimalizace získaných látek.
- Profilování získaných látek v rámci jejich protivirové a cytostatické aktivity.

Výzkumný plán a metodologie

Hlavním cílem je příprava nových CDN se zvýšenou hydrolytickou stabilitou vůči hostitelským fosfodiesterázám. Tohoto cíle plánujeme dosáhnout záměnou fosfodiesterových vazeb v CDN vazbami fosfonátovými a fosfinátovými. Z chemického hlediska se chceme zejména soustředit na přípravu fosfonátových meziproduktů, užití vhodného chránění a přípravu přímých analogů trifosfátů (nukleosid fosfonáto-difosfátů). Typický příklad cílové struktury se znázorněným postupem práce je uveden na obr. 1A. Vybrané deriváty budou dále optimalizovány na základě počítačového modelování (vzorový model na obr. 1B). V další fázi prozkoumáme možnosti přípravy derivátů CDN enzymatickou cyklizační reakcí pomocí bakteriální nebo eukaryotické dinukleotid-syntázy jako například cGAS, a pomocí chemické cyklizační reakce na pevné fázi (LCAA-CPG).

Bude prozkoumána afinita připravených CDN k rekombinantnímu STING pomocí kalorimetrie a/nebo pomocí techniky SPR (surface plasmon resonance) a schopnost produkce cytokinů v PBMC nebo buněčné linii reportéru. Kondicionované médium z PBMC se syntetickými CDN bude testováno na aktivitu proti HBV v infikovaných PHH. Pro lepší představu o vztahu struktury CDN a jejich biologické aktivity vyřešíme krystalovou strukturu rekombinantního STING s těmito ligandy. Stabilita CDN bude stanovena v S9 mikrozomálních frakcích odvozených z jater a vnitřností a z rekombinantní ENPP1. V rámci zlepšení absorpce v trávicím traktu bude od jednoho nebo dvou nejvhodnějších CDN připraveno adekvátní proléčivo.

A



B

Obr. 1. A) Příklad plánovaných látek a možný přístup k cílovým CDN. B) Molekulární model fosfonátového CDN vázaného na STING (založené na struktuře PDB id: 4LOH)

Nejvhodnější kandidáti na léčivo budou vybráni na základě hodnoty jejich CaCo buněčné absorpce a jejich stability v buněčných kulturách primárních hepatocytů. Budeme sledovat schopnosti kandidátů vyvolat hostitelskou přirozenou imunitní reakci *in vivo* měřením hladin indukovaných cytokinů v plazmě a srovnáním těchto hladin s jejich farmakokinetikou ve zvířecích modelech. Ve finálních fázích bude měřena protivirová aktivita kandidátů na léčivo na “woodchuck” modelu chronické žloutenky B.

Paralelně se budeme zabývat rozsáhlým výzkumem nových nenukleosidových agonistů založených na virtuálním screeningu a NMR testování fragmentů molekul. Použijeme ligandy z databáze Maybridge

(cca 50 tis. látek) případně z databáze ZINC Lead Now (cca 3 mil. látek). Všechny zkoumané vzorky budou vyhodnocovány a vylepšovány semiempirickými výpočetními metodami (PM6 or PM7) za použití programu MOPAC2016 a dockingu do příslušných rentgenových struktur za použití AutoDock Vina. Na základě experimentů NMR-STD (saturation transfer difference) budou identifikovány vhodné vazebné fragmenty a následná podrobná STD analýza nám umožní rozkrýt aktivitu určující parametry ligandů. Nejlepší látky získané pomocí virtuálního a fragmentového screeningu budou podrobeny zkoumání vazebného místa za použití proteinových NMR experimentů. Nejlépe hodnocené struktury budou také detailně charakterizovány pomocí rentgenokystalové analýzy nebo NMR spektroskopie a dále optimalizovány pomocí moderních metodik medicínské chemie. Zpětná vazba z NMR a rentgenostrukturní analýzy nám umožní zvýšení účinnosti výpočetních dockingových experimentů zejména pomocí flexibilizace vhodných reziduí hrajících významnou roli ve vazbě ligandu a proteinu, což usnadní finální optimalizaci struktury nízkomolekulárních agonistů STING.

Stabilita STING agonistů v tělních tekutinách a jejich distribuce do imunitních buněk je hlavní překážkou při klinickém vývoji. Jedním z našich cílů je řešit tento problém syntézou nových fosfonátových derivátů látek, které nemají žádný precedent v odborné a patentové literatuře. Navíc, jen málo odborných publikací, kromě hrstky patentů, je zaměřeno na proléčiva cyklických dinukleotidů (CDN). Naším dalším cílem je připravit lipofilní proléčiva CDN, které umožní prostup těchto látek do imunitních buněk. Tyto přístupy by měly vést k podstatnému zvýšení aktivity CDN. Tato část projektu počítá s podporou našich spolupracovníků z Gilead Sciences.

Zástupci rodiny receptorů rozeznávajících vzor („pattern recognition receptors“), mezi které STING patří, jsou v současné době předmětem mnoha klinických studií zaměřených na léčbu chronické hepatitidy typu B - HBV (TLR7, TLR8, RIG-I)¹ a rakoviny (TLR4, TLR7, TLR 8, TLR9)². Také první generace STING agonistů postoupila do první fáze klinického testování proti rakovině³ a zvažuje se její použití na HBV¹. Navíc probíhá vývoj těchto látek jako adjuvancií do vakcín¹. Fosfonátovou skupinou stabilizovaní agonisté STING proto mohou sloužit k léčbě řady v současné době neléčitelných onemocnění.

1. Chang, J.; Guo, J.T., Treatment of chronic hepatitis B with pattern recognition receptor agonists: Current status and potential for a cure. *Antiviral Res.* 2015, 121,152-159.

2. Iribarren, K.; Bloy, N.; Buqué, A.; Cremer, I.; Eggermont, A.; Fridman, W.H.; Fucikova, J.; Galon, J.; Špíšek, R.; Zitvogel, L.; Kroemer, G.; Galluzzi, L., Trial Watch: Immunostimulation with Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2016, 5(3), e1088631.

3. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02675439>

Časový plán

2018-2022

- Návrh a příprava fosfonátových/fosfinátových analogů CDN
- Biologické a biochemické vyhodnocení aktivity CDN
- Krystalografická analýza CDN se STING
- Počítačové modelování vazby mezi CDN a STING

2018-2019

- Expresce rekombinantního STING, RNPP1 a bakteriální a eukaryotické cyklické dinukleotidsyntázy
- Vývoj buněčných esejí pro sledování aktivity CDN
- Enzymatická syntéza CDN z příslušných nukleosid trifosfátů

2019-2022

- Příprava proléčiv jednoho z CDN kandidátů na léčivo
- S9 průzkum stability CDN a jejich proléčiv, PK/PD kandidátů ve zvířecích modelech a měření anti-HBV aktivity ve “woodchuck” modelu
- Návrh a příprava nízkomolekulárních agonistů STING založená na virtuálním a fragmentovém screeningu.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	<i>Journal of Medicinal Chemistry</i> <i>ACS Chemical Biology</i> <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> <i>Plos One</i> <i>Bioorganic and Medicinal Chemistry</i> <i>Organic and Biomolecular Chemistry</i> <i>Journal of Organic Chemistry</i> <i>ChemBioChem</i> <i>J Virology</i> <i>J Hepatology</i> <i>Molecular Pharmacology</i>
2017	0	
2018	2	
2019	2	
2020	2	
2021	3	
2022	3	
Celkem	12	

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)	<i>Očekáváme ochranu duševního vlastnictví v těchto oblastech:</i> <i>Noví agonisté STINGu založení na CDN.</i> <i>Nízkomolekulární agonisté STINGu.</i>
2017	0	0	
2018	0	0	
2019	1	1	
2020	1	1	
2021	0	0	
2022	0	0	
Celkem	2	2	

Zahraniční spolupráce

- Meziprodukty přípravy cílových látek budou testovány na protivirovou aktivitu v KU Leuven v širokém panelu RNA, DNA a retrovirů.
- Výzkum farmakokinetických a farmakodynamických vlastností cílových molekul bude proveden na zvířecích modelech firmou Gilead Sciences.