



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A chemical biology approach for targeting of ligand-drug conjugates

Hoogendoorn, S.

Citation

Hoogendoorn, S. (2014, January 23). *A chemical biology approach for targeting of ligand-drug conjugates*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/23082>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/23082>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/23082> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Hoogendoorn, Sascha

Title: A chemical biology approach for targeting of ligand-drug conjugates

Issue Date: 2014-01-23

Samenvatting

Een chemisch biologische aanpak voor doelgerichte ligand-medicijn constructen

Membraangebonden receptoren aan de buitenkant van een cel functioneren als een communicatiekanaal tussen de intra- en extracellulaire ruimte. Als een receptor wordt geactiveerd door binding van een ligand, leidt dit tot een scala aan intracellulaire signaleringscascades. Om te voorkomen dat de cel te sterk gestimuleerd raakt, kan het ligand-receptor complex geïnternaliseerd worden, van de membraan naar intracellulaire compartimenten. Synthetische liganden die selectief kunnen binden aan een bepaald type receptor kunnen potentieel ingezet worden om een fluorescent molecuul of een medicijn te sturen naar de cel van interesse. In hoofdstuk 1 worden verschillende strategieën besproken voor het gebruik van synthetische liganden voor receptoren. Deze liganden worden ofwel gebruikt voor visualisatie van ligand binding en het transport van het ligand-receptor complex door de cel, ofwel om doelgerichte therapie mogelijk te maken.

De mannose receptor (MR) behoort tot de familie van C-type lectine-bindende receptoren en wordt tot expressie gebracht door cellen van het immuunsysteem, zoals dendritische cellen en macrofagen. Glycoeiwitten op pathogenen worden herkend door de MR en vervolgens geïnternaliseerd en afgebroken, wat leidt tot een immuunrespons. In een eerdere studie is een synthetisch ligand beschreven, het zogenaamde mannose cluster (MC), dat kan binden aan de MR. Dit cluster is vastgemaakt aan een fluorescente remmer van lysosomale cathepsines (BODIPY-DCG-04) en dit leidde tot de selectieve opname van het construct in dendritische cellen. In hoofdstuk 2 wordt op dit onderzoek voortgeborduurd met de synthese van een aantal vergelijkbare constructen. Door gebruik te maken van pH-afhankelijke BODIPYs kon het proces van opname bestudeerd worden zonder te wassen, omdat de constructen alleen fluorescent zijn in een zuur milieu, zoals in de lysosomen. Er kon worden aangetoond dat de constructen cathepsines remmen, zowel in lysaat als in de cel, en dat de opname in dendritische cellen receptor-afhankelijk is.

Het bewezen nut van de pH-afhankelijke BODIPYs in hoofdstuk 2 leidde tot de ontwikkeling van een nieuwe serie kleurstoffen, zoals beschreven in hoofdstuk 3. Door gebruik te maken van een Knoevenagel-achtige condensatiereactie konden pH-afhankelijke BODIPYs worden gesynthetiseerd met verschillende handvatten voor verdere conjugatie, zoals een azide, alkyn of zuurgroep. Door middel van twee, elkaar opvolgende, Knoevenagel-reacties kon bovendien een extra handvat of een water oplosbare groep geïntroduceerd

worden. De gesynthetiseerde kleurstoffen hadden een vergelijkbare pH-afhankelijkheid als die beschreven in hoofdstuk 2. Bovendien waren de excitatie- en emissiespectra verschoven richting het rood, wat deze stoffen zeer geschikt maakt voor microscopie toepassingen.

In hoofdstuk 4 wordt het mannose cluster wederom gebruikt als doelgericht ligand voor de mannose receptor. Echter, in plaats van een klein molecuul zoals in hoofdstuk 2 werd er nu een 70 kDa groot eiwit, Hsp70, aan vastgemaakt. Recombinant Hsp70, voorzien van een C-terminale extensie met een sortase A herkenningsequentie (LPETGG) en een His-affiniteitssequentie erin, werd tot expressie gebracht en gezuiverd. Vervolgens werd dit 'Hsp70-LPETGG' eiwit geligeerd aan dan wel BODIPY, dan wel BODIPY-mannose cluster met behulp van het bacteriële enzym sortase. De reactie werd eerst geoptimaliseerd op kleine schaal en vervolgens op grote schaal uitgevoerd. Het product, Hsp70-BDP-MC, werd gezuiverd en vervolgens toegevoegd aan het medium van dendritische cellen. Er kon worden aangetoond dat dit eiwit werd opgenomen door de cellen met behulp van microscopie. Blokkering van de receptor (met het natuurlijk voorkomende ligand mannan) zorgde ervoor dat Hsp70-BDP-MC niet meer werd opgenomen, wat een indicatie is voor receptor-gemedieerde opname.

In hoofdstuk 5 werd onderzocht of een synthetische verandering van het mannose cluster er toe kon leiden dat een andere receptor dan de mannose receptor bereikt werd. Daarvoor werd een mannose-6-fosfaat cluster (M6PC) ontworpen en gesynthetiseerd en wederom geconjugeerd aan BODIPY-DCG-04. Cathepsine labelingsexperimenten in lever lysaat lieten zien dat introductie van de fosfaatgroepen op het cluster geen effect had op de labelingsefficiëntie. Experimenten met COS cellen lieten zien dat M6PC-BODIPY-DCG-04, in tegenstelling tot MC-BODIPY-DCG-04, door de cellen werd opgenomen, wat resulteerde in de labeling van lysosomale cathepsines. Voorbehandeling van de COS cellen met mannose-6-fosfaat remde de opname van het construct, wat aangeeft dat het construct inderdaad via de mannose-6-fosfaat receptor werd opgenomen. Voorbehandeling van dendritische cellen met mannan, om de mannose receptor te blokkeren, resulteerde niet in remming van de opname. In conclusie toonden deze experimenten aan dat door een kleine synthetische modificatie de receptor selectiviteit van het ligand kon worden veranderd van de mannose receptor naar de mannose-6-fosfaat receptor.

In de hoofdstukken 6-9 worden verschillende strategieën besproken om doelgerichte moleculen voor de follikelstimulerend hormoon (FSH) receptor te ontwikkelen. In de eerste drie hoofdstukken worden laag moleculair gewicht (LMW) liganden gebruikt, gebaseerd op een eerder gepubliceerde dihydropyridine (DHP) agonist en in hoofdstuk 9 het endogene hormoon FSH. In hoofdstuk 6 werd een reeks aan verbindingen gebaseerd op DHP gesynthetiseerd om erachter te komen wat de beste plek was om het molecuul te functionalisieren zonder de activiteit op de receptor aan te tasten. De gesynthetiseerde verbindingen werden getest in een luciferase assay en hieruit kon een structuur-activiteitsrelatie worden gedestilleerd. Het bleek dat *meta*-gefunctionaliseerde DHPs in combinatie met een polyethyleenglycol linker van lengte $n=3$ de meest potente agonisten opleverde. Met deze bouwsteen konden dimere en fluorescente FSH receptor agonisten worden gemaakt zon-

der dat dit ten koste ging van de activiteit.

Hoofdstuk 7 beschrijft het onderzoek naar de meest optimale kleurstof om vast te maken aan het ligand geïdentificeerd in hoofdstuk 6. Verschillende kleurstoffen konden worden geïntroduceerd wat resulteerde in potente fluorescente agonisten. Deze agonisten waren tevens in staat om de receptor te laten internaliseren, zoals gedemonstreerd in een microscopie internalisatie assay. Het bleek echter dat de meeste van deze fluorescente liganden ook geïnternaliseerd werden in cellen die geen receptor expressie hadden. Alleen in het geval van de hydrofiele en geladen kleurstof Cy5 werd het resulterende ligand DHP-Cy5 selectief via de FSH receptor opgenomen. Deze stof is daarmee een zeer geschikte kandidaat als diagnostisch gereedschap om de aanwezigheid van de FSH receptor op bijvoorbeeld eierstoktumorcellen aan te tonen. Of het mogelijk is om naast een fluorescente kleurstof ook een medicijn te sturen naar cellen die de FSH receptor tot expressie brengen met behulp van het DHP ligand, is beschreven in hoofdstuk 8. Verscheidene moleculen werden gesynthetiseerd welke naast de DHP en de kleurstof ook een of meerdere carboraanen bevatten. Carboranen kunnen gebruikt worden in een tweedelige therapie genaamd "boron neutron capture therapy (BNCT)" voor de bestrijding van kanker. Helaas bleek dat het toevoegen van de vette carboraan structuur resulteerde in de aspecifieke opname van de constructen in cellen die geen receptor bevatten. Een lage mate van selectiviteit kon alleen worden bereikt door Cy5 als kleurstof te gebruiken.

Om te voorkomen dat iedere (kleine) modificatie van het ligand grote invloed heeft op de opname eigenschappen, kan worden gekozen voor een hoog moleculair gewicht (HMW) ligand. Deze strategie is beschreven in hoofdstuk 9 waar sortase werd gebruikt om FSH fluorescent te labelen met BODIPY-MC. Het resulterende FSH-BDP-MC bleek een zeer potente agonist voor de FSH receptor en werd bovendien zeer selectief, samen met de receptor, door de cellen opgenomen. Het werk beschreven in dit proefschrift is samengevat in hoofdstuk 10 en er is tevens een vooruitblik geschetst voor mogelijk vervolgonderzoek. Concluderend laat het hier beschreven onderzoek zien dat doelgerichte moleculen zeer waardevol zijn in het selectief sturen van fluorescente of therapeutisch interessante moleculen naar receptoren op specifieke cellen of weefsels.