



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Design of selective inhibitors for human immunoproteasomes

Dekker, P.M.

Citation

Dekker, P. M. (2024, November 28). *Design of selective inhibitors for human immunoproteasomes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4170343>

Version: 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/1887/4170343>

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

Nederlandse samenvatting

De hedendaagse klinische proteasoomremmers bortezomib, carfilzomib en ixazomib worden gebruikt voor hematologische kankers zoals de ziekte van Kahler en mantel cel myeloom. Ze zijn zeer effectief, maar hebben daarbij ook zware neveneffecten. Geen van de drie bovengenoemde klinische proteasoomremmers kunnen onderscheid maken tussen het immunoproteasoom en het constitutieve proteasoom, maar remmen de katalytisch actieve β -subunits van beide isovormen bij nanomolaire concentraties. Recentelijk is aangetoond dat het merendeel van de hematologische kankers overwegend het immunoproteasoom tot expressie brengen. Dit maakt het remmen van het constitutieve proteasoom een neveneffect. Om ervoor te zorgen dat remmers even effectief zijn, maar minder toxisch dan de klinische remmers, is het van belang dat remmers niet het constitutieve proteasoom remmen maar enkel het immunoproteasoom. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift betreft de ontwikkeling van immunoproteasoom selectieve remmers die gebaseerd zijn op de algemene structuur van een van de meest effectieve klassen van proteasoom remmers: oligopeptide epoxyketonen.

Hoofdstuk één bespreekt het katalytische mechanisme waarmee het 20S proteasoom eiwitten degradeert. Tevens wordt het mechanisme besproken waarmee eiwit-gebaseerde epoxyketonen het nucleofiele threonine residu van het proteasoom covalent irreversibel vastleggen. Daarbij wordt er ook een overzicht gegeven van de ontwikkeling van verschillende generaties aan proteasoomremmers, met specifiek aandacht voor remmers die één of meerdere proteasomale katalytisch actieve monomeren remmen. De introductie eindigt met een beschrijving van een competitieve activiteit-gebaseerde eiwit profileringsassay (ABPP) waarmee het merendeel van alle remmers die te vinden zijn in dit proefschrift getest zijn op potentie en selectiviteit als proteasoomremmers.

Hoofdstuk twee bouwt verder op het werk van Dr. E. Maurits. De remmer LU-005i wordt gebruikt als een basis voor de ontwikkeling van een bibliotheek van eiwit epoxyketonen die allen een serine analoog hebben op de P3 positie en een 2-morpholinoacetyl motief of N-Boc piperazinyll motief op P4. Met gebruik van de ABPP-assay werd de potentie en selectiviteit van deze remmer geanalyseerd, en hieruit bleek dat onafhankelijk van het residu op P3 of P4 geen van de

remmers in staat waren de β 1c of β 2c activiteiten te remmen. Aanvullend hierop bleken alle remmers met een *O*-gebenzyleerde serine analoog op de P3 positie of een *N*-Boc piperazinyll motief op de P4 positie hele sterke remmers voor de β 5c activiteit. Van de P3-serine analogen bleken morpholine-homoserine, morpholine-asparagine en *N*-Boc piperazinyll-homoserine de meest interessante remmers, omdat ze of heel potent waren voor alle immunoproteasoom activiteiten of omdat ze een verbeterde immunoproteasoom (ten opzichte van constitutieve proteasoom) selectiviteit vertoonden. Naast het evalueren van de potentie en selectiviteit van de gesynthetiseerde remmers zijn ook twee remmers gekristalliseerd met het gist proteasoom om met behulp van deze structuren meer te begrijpen over de relatie tussen de moleculaire structuren en hun selectiviteit. Uit de analyse van de gecokristalliseerde structuren met daarin morpholino-homoserine en morpholino-pentahomoserine bleek dat beide verbindingen zich bevonden in de β 2 en β 5 eiwitten van het gist proteasoom. Ook bleek dat beide liganden op dezelfde manier gebonden waren als LU-005i, de remmer die aan de basis stond voor alle nieuwe gesynthetiseerde remmers. Verder werden er nieuwe interacties gevonden aan de hand van de nieuwe kristalstructuren. Concreet bleek dat de homoserine en de pentahomoserine op de P3 positie een extra waterstofbinding aan konden gaan met de residuen in de S3 pocket.

Hoofdstuk drie beschrijft het ontwerp, de synthese en de biochemische evaluatie van LU-005i gebaseerde remmers die een hydroxymethyl epoxyketon dan wel een veresterde variant daarvan bevatten. Een kleine bibliotheek van P1' gesubstitueerde proteasoomremmers werd gesynthetiseerd met een LU-005i analoog die in plaats van een methyl een hydroxymethyl groep bevat bij het epoxyketon. Aanvullend hierop werd de hydroxymethyl groep veresterd met twee aminozuur isomeren en dertien *N*-Boc beschermde aminozuren, die vervolgens ontschermd konden worden waarmee een bibliotheek van 25 nieuwe moleculen werd gemaakt. De synthese van het hydroxymethyl gemodificeerde epoxyketon wijkt af van de synthese van de gangbare methyl epoxyketonen. In plaats van gebruik te maken van carbolithiëring als strategie voor het vormen van het α,β -onverzadigde keton, wordt nu gebruik gemaakt van een één-pots procedure waarbij het hydroxymethyl-enon wordt gevormd door gebruik van formaldehyde in een combinatie van een Horner-Wadsworth-Emmons en een Morita-Baylis-Hillman reactie. Vervolgens kon na epoxidering van het enon het gewenste epoxide verkregen worden. Uit de biochemische analyse van de

gesynthetiseerde bibliotheek bleek dat de remmer met de hydroxymethyl-gemodificeerde epoxyketon groep selectief het immunoproteasoom remt zonder het constitutieve proteasoom aan te tasten. Daarnaast bleek ook dat een aantal van de varianten waarbij de hydroxymethyl groep veresterd was ook sterk selectief waren voor het immunoproteasoom. Zo bleek dat de *N*-Boc beschermde aminozuur esters: alanine, asparagine, asparaginezuur, glutaminezuur en proline, selectief waren voor het immunoproteasoom. Ook de onbeschermde aminozuur esters, alanine, valine, isoleucine, asparaginezuur, en cysteïne bleken sterk selectief te zijn voor het immunoproteasoom. Uit verdere experimenten bleek ook dat de esters met isomeren van alanine selectief waren voor het immunoproteasoom.

Hoofdstuk vier verbreedt het thema van gesubstitueerde epoxyketonen en introduceert drie nieuwe variaties. In variatie één wordt de hydroxymethyl groep uit hoofdstuk drie gecarbamoyleerd met een *O*-tert-butyl beschermd alanine. In variatie twee wordt het epoxyketon gesubstitueerd met een carboxylzuur die dan meteen gecondenseerd wordt met een *O*-methyl beschermde alanine. Variatie drie wordt geïntroduceerd met de Morita-Baylis-Hillman reactie. Hierbij worden twee stereoisomeren van het enon gevormd die daarna met behulp van een stereoselectieve epoxidering twee nieuwe gesubstitueerde epoxyketonen geeft. Vervolgens werden alle drie de variaties getest voor hun selectiviteit en potentie als proteasoomremmers. Helaas bleek dat geen van de nieuwe remmers effectief het proteasoom blokkeerde.

Hoofdstuk vijf beschrijft verkennende studies aan verbindingen die geïnspireerd zijn op de ontwerpen van hoofdstukken twee en drie. De serine analoog op de P3 positie en de introductie van de hydroxymethyl groep en verestering daarvan op de P1' positie werden gecombineerd in één remmer. Er werd gekozen om verbindingen te synthetiseren die een homoserine of een asparagine groep hadden op de P3 positie. Voor de P1' positie werd specifiek gekozen voor de introductie van de hydroxymethyl groep en de verestering daarvan met een *N*-Boc beschermde alanine groep. Uiteindelijk lukte het alleen om enkele combinaties te synthetiseren van verbindingen met homoserine op de P3 positie. Zo lukte het om de volgende combinaties te synthetiseren: een *O*-benzyl beschermde homoserine op P3 gecombineerd met een hydroxymethyl groep op P1', een onbeschermde homoserine op P3 gecombineerd met een hydroxymethyl groep op P1' en een *O*-benzyl beschermde homoserine op P3

gecombineerd met een *N*-Boc beschermde alanine veresterd met de hydroxymethyl op P1'. Deze drie nieuwe peptide epoxyketonen werden naderhand geanalyseerd voor hun selectiviteit en potentie voor het proteasoom en daaruit bleek dat beide varianten die een *O*-benzyl homoserine op de P3 positie zeer potent de β 2i en β 1i activiteiten remden. Daarnaast remden deze varianten ook de β 5c activiteit erg sterk. De variant met de onbeschermde homoserine op de P3 positie daarentegen, bleek veel selectiever voor het immunoproteasoom en remde in mindere mate de β 5c activiteit, maar was tegelijkertijd wel minder potent voor de β 1i activiteit.

Hoofdstuk zes tenslotte geeft een samenvatting van de resultaten beschreven in experimentele hoofdstukken, en geeft een aantal richtingen voor mogelijk toekomstig onderzoek, gebaseerd op deze resultaten.