

## Streszczenie

Receptor tachykininowy NK1 (NK1R) wraz ze swoim endogennym ligandem, substancją P (SP), uczestniczy w regulacji wielu procesów fizjologicznych i patologicznych. Ten szeroki udział w fizjologii człowieka, czyni receptor NK1 ważnym terapeutycznym celem molekularnym. Nowsze podejścia do wykorzystania NK1R jako punktu uchwytu dla terapii (np. wielocelowe analgetyki, celowane dostarczanie ładunku terapeutycznego, celowana terapia radionuklidowa, antagonizm endosomowego sygnałowania przez NK1R) wymaga poszukiwania nowych ligandów tego receptora lub stosownych modyfikacji związków już istniejących.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie i synteza biblioteki nowych pochodnych fenyloalaniny i tryptofanu jako potencjalnych ligandów NK1R. W tym kontekście, zaprojektowano serie związków, które a) zawierały kluczowe dla powinowactwa do NK1R elementy osadzone na różnych szkieletach organicznych (serie W/F-71–W/F-74), b) stanowiły rozbudowanie znanego antagonisty NK1R L732,138 (serie W-80–W-84) lub c) były jego modyfikacją (seria W-90). Zaprojektowane związki otrzymano w ramach kilkietapowych syntez, stosując znane techniki syntezy organicznej oraz syntezy peptydów w roztworze. Otrzymano 94 związki, w tym 93 nowe pochodne.

Otrzymane związki poddano ewaluacji biologicznej (przeprowadzonej przez współpracowników). Badania powinowactwa receptorowego wobec NK1R posłużyły analizie zależności struktura–aktywność w otrzymanych bibliotekach w kontekście receptora NK1. Pomimo uwzględnienia w strukturze związków z serii W/F-71–W/F-74 kluczowych dla powinowactwa do receptora NK1 elementów, związki te nie wykazywały znaczącej aktywności wobec NK1R. W ramach przeprowadzonych badań powinowactwa wykazano, że możliwe jest rozbudowanie (na sposób umożliwiający tworzenie koniugatów i związków wielofunkcyjnych) znanego antagonisty NK1R L-732,138 o dodatkowe elementy od N-końca bez utraty powinowactwa do NK1R (seria związków W-80–W-84). Dodatkowo, na podstawie analizy zależności struktura–aktywność w serii związków W-90 stwierdzono, że możliwe jest zastąpienie w strukturze L-732,138 kluczowej dla powinowactwa grupy  $CF_3$  grupą pentafluorosulfanylową ( $SF_5$ , nazywaną też „super- $CF_3$ ”) bez znaczącego spadku powinowactwa.

Innym rodzajem badania *in vitro*, w którym testowana była seria związków W/F-71–W/F-74 było badanie wpływu na żywotność komórek (cytotoksyczność). Przebadane związki cechowały się zróżnicowaną aktywnością wobec komórek nowotworowych COLO679 i prawidłowych BJ. Spośród nich dwa związki charakteryzowały się szczególnym profilem aktywności, wykazując silne działanie cytotoksyczne i selektywne wobec linii komórkowej COLO679, jednocześnie nie wykazując znaczącego powinowactwa wobec NK1R. Korzystając z metod *in silico* (przewidywania SwissTarget oraz dokowanie molekularne) opracowano hipotezę sugerującą możliwość potencjalnego działania tych związków przez receptor CCK2.

Niezależnym celem mojej pracy było opracowanie funkcji oceniających specyficznych dla receptora NK1. W dzisiejszych czasach kluczową rolę w poszukiwaniu nowych substancji czynnych pełnią metody *in silico*, w tym dokowanie molekularne. Funkcje oceniające w dokowaniu molekularnym służą do prognozowania siły wiązania. Niestety, w wielu przypadkach dokowanie, szczególnie pod względem przewidywania energii wiązania, jest niedokładne, co utrudnia praktyczne zastosowanie tych technik. Aby poprawić skuteczność dokowania, wykorzystuje się różnorodne strategie, w tym opracowywanie funkcji oceniających specyficznych dla konkretnych celów molekularnych.

W swoich badaniach obliczeniowych, w pierwszym etapie, wykazałam, że oryginalna funkcja oceniająca programu AutoDock Vina stosunkowo słabo radzi sobie w szacowaniu energii wiązania ligandów z NK1R i odróżnianiu związków aktywnych od nieaktywnych. Kolejno, uzyskane dane eksperymentalne o powinowactwie receptorowym do NK1R nowosyntezyowanych związków oraz dane literaturowe wykorzystano do wytrenowania funkcji specyficznych dla NK1R. Otrzymano nowe funkcje oceniające, które w przesiewie wirtualnym były skuteczniejsze niż oryginalna funkcja oceniająca programu AutoDock Vina.

## Abstract

The neurokinin NK1 receptor (NK1R) along with its endogenous ligand, substance P (SP), takes part in the regulation of many physiological and pathological processes. This vast participation in the human physiology renders the NK1 receptor an important molecular target for therapies. Newer approaches to the application of NK1R as a therapeutic target (e.g., multitarget analgesics; targeted delivery of therapeutic cargo, targeted radionuclide therapy, antagonism of NK1R endosome signalling) require searching for new ligands of this receptor or appropriate modifications of the already existing compounds.

The aim of this doctoral project was the design and synthesis of a library of novel phenylalanine and tryptophan derivatives as potential ligands of NK1R. In this context, designed were a few series of compounds a) that contained structural elements important for the NK1R affinity embedded upon various organic scaffolds (W/F-71–W/F-74 series), or b) that were expanded analogues of the known antagonist NK1R L732,138 (W-80–W-84 series) or c) that were modification of that antagonist (W-90 series). The designed compounds were obtained via a-few-steps synthetic routes, using typical techniques of organic synthesis and those of peptide synthesis in solution. In total, 94 compounds were obtained, including 93 novel derivatives.

The synthesized compounds were evaluated biologically (with the help of collaborators). Data on the NK1R receptor affinity served for the analysis of the structure-activity relationships in the obtained libraries. Despite including structural elements crucial for the NK1R affinity, the compounds of W/F-71–W/F-74 series did not exhibit any significant activity towards NK1R. Furthermore, it was found that it is possible to expand (in a way which enables the formation of conjugates and multifunctional compounds) the known NK1R antagonist, called L-732,138, by including additional elements from as the N-terminal piece, without losing NK1R affinity (W-80–W-84 series). Moreover, on the basis of the analysis of the structure-activity relationships in the compound series W-90, it was established that it is possible to substitute the trifluoromethyl (CF<sub>3</sub>) group, essential for the NK1R affinity, in the L-732,138 structure with a pentafluorosulphanyl group (SF<sub>5</sub>, also called „the super-CF<sub>3</sub>”) without significant affinity decreases.

Another type of *in vitro* studies, in which the compounds of W/F-71–W/F-74 series were tested, was the study of influence on the cell viability (cytotoxicity). The investigated

compounds were characterized by varied activity towards COLO679 cancer cells and normal BJ cells. Among them, two compounds displayed a particular activity profile, exhibiting strong cytotoxic activity and selectivity towards the COLO679 cell line, simultaneously not exhibiting a significant affinity towards NK1R. Based on the *in silico* methods (SwissTarget predictions and molecular docking) a hypothesis was developed suggesting the possibility that these compounds are active *via* CCK2 receptor.

An independent goal of my project was the development of scoring functions specific for NK1R. Nowadays, a key role in searching for new active substances is played by *in silico* methods, including molecular docking. Scoring functions in molecular docking are used for predicting the free energy of binding (binding strength). Unfortunately, in many cases docking is inaccurate (especially when it comes to predicting binding strength) which makes the practical application of these techniques less efficient. In order to improve the effectiveness of docking, various strategies are employed, including the development of scoring functions specific for particular molecular targets.

In the first stage of my computational work, I found that the original scoring function of AutoDock Vina program has a relatively poor efficacy in evaluating the binding energies of NK1R ligands and distinguishing active and nonactive compounds. Next, the obtained experimental data on NK1R affinity of my newly synthesized compounds as well as the literature data were used to train scoring functions specific for NK1R. The new scoring turned out to be more effective in virtual screening compared to the original scoring function of the AutoDock Vina program.