

## Nederlandstalige samenvatting

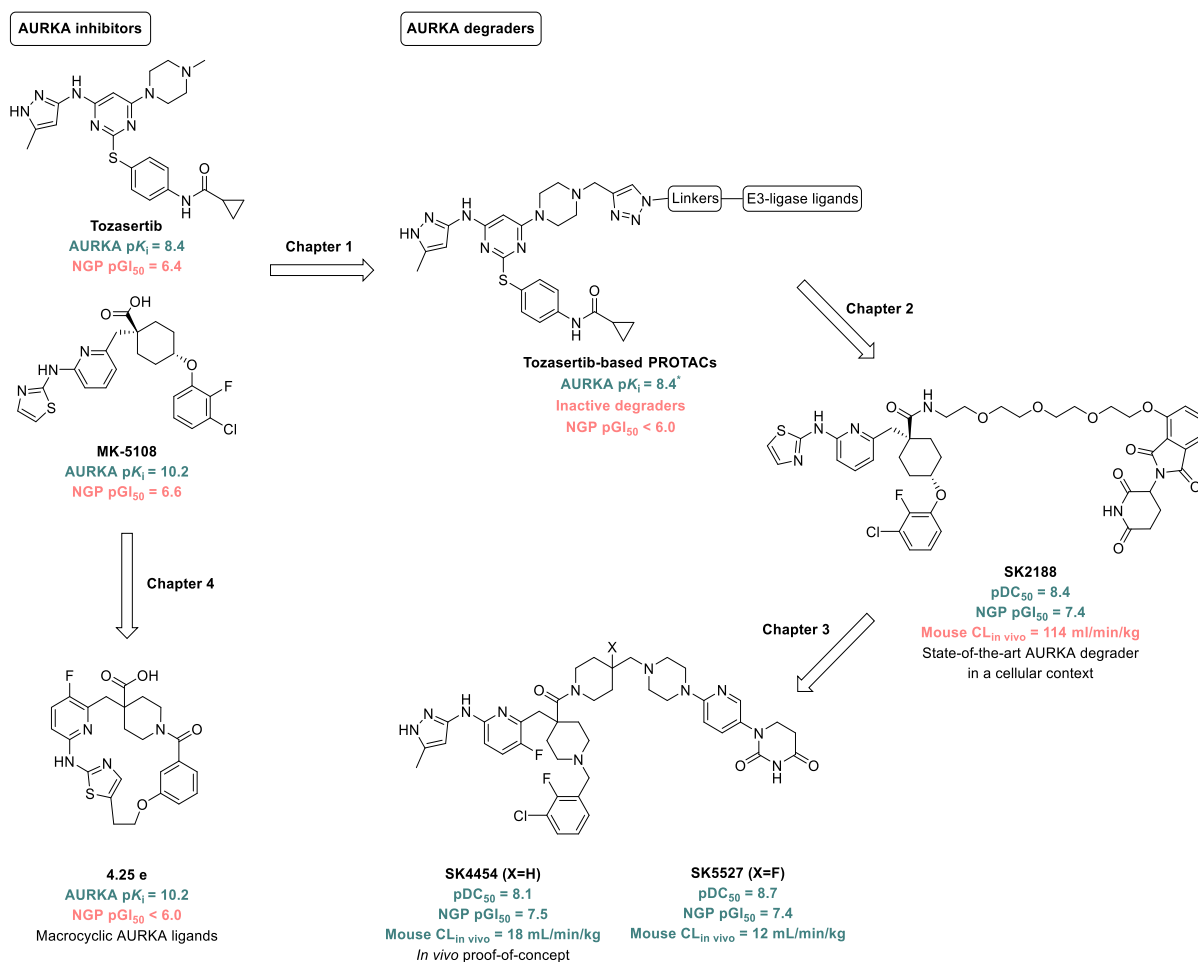
Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) zijn heterobifunctionele moleculen die bestaan uit drie hoofdbestanddelen: (1) een ligand voor het doelwit-eiwit, (2) een linker en (3) een ligand dat een E3 ubiquitine ligase rekruteert. Door het doelwit-eiwit in de nabijheid te brengen van een natuurlijk voorkomend E3-ligase, stimuleren PROTACs de ubiquitineren van dit doeleiwit, waardoor het door het proteasoom wordt afgebroken. Na stimulatie van de ubiquitineren van één enkel doelwit-eiwit, kan de PROTAC zich losmaken en de afbraak van volgende doelwit-eiwitten faciliteren, waardoor het dus een katalytisch werkingsmechanisme bezit. Dit onderscheidt PROTACs van klassieke kleine molecuulremmers, die langdurig dienen te binden aan hun doelwit om een therapeutisch effect te verkrijgen. Hierdoor heeft PROTAC-gemedieerde eiwitafbraak een aanzienlijk therapeutisch potentieel en wordt het beschouwd als een veelbelovend nieuw farmaceutisch paradigma.

Aurora kinase A (AURKA) is een serine/threonine kinase dat vaak verhoogd tot expressie komt in neuroblastoomtumoren en beschouwd wordt als een indicator voor slechte prognose van de ziekte. Het is een belangrijk therapeutisch doeleiwit in neuroblastoom, omwille van zowel zijn kinase-afhankelijke rol tijdens de celdeling, als zijn kinase-onafhankelijke functies, zoals de stabilisatie van het MYCN kankereiwit en zijn rol in het herstellen van DNA-schade. Klassieke kinaseremmers richten zich voornamelijk op de katalytische activiteit van AURKA en niet op de kinase-onafhankelijke functies. Ze leiden ook tot overexpressie van het AURKA, wat kan leiden tot therapieresistentie. Klinisch onderzochte AURKA remmers vertoonden slechts een beperkt effect. Gezien deze beperkingen stelden wij voorop dat gerichte AURKA afbraak met PROTACs zowel de upregulatie zou kunnen tegengaan en het therapeutisch effect zou kunnen versterken door zowel AURKA's kinase-afhankelijke als zijn kinase-onafhankelijke functies te remmen. Daarom is het hoofddoel van dit proefschrift om selectieve en potente AURKA PROTACs te ontwerpen, te synthetiseren en te identificeren en om hun effect op NB-cellen te vergelijken met dit van klassieke AURKA remmers. Een tweede doelstelling is zo'n PROTAC-hit verder te optimaliseren om hun therapeutisch potentieel *in vivo* te onderzoeken.

In **hoofdstuk I** beschrijven we onze pogingen om een AURKA-PROTACs te ontwerpen afgeleid van het AURKA-ligand tozasertib. Ondanks het feit dat meerdere linkers en E3-ligase liganden uitgetest werden, bleek geen van de gesynthetiseerde constructen in staat om AURKA te degraderen. Dit zette er ons toe aan te vertrekken van een ander AURKA-ligand, nl. MK-5108 voor de aanmaak van een serie van cereblon-gerichte bivalente liganden (**hoofdstuk II**). In tegenstelling tot de tozasertib-gebaseerde PROTACs, bleken MK-5108-gebaseerde analogen in staat om AURKA-niveaus te verlagen bij lage PROTAC concentraties. Zo induceerde PROTAC **SK2188** potente, snelle, grondige en selectieve afbraak van AURKA. Vergeleken met de klassieke AURKA remmer MK-5108, veroorzaakte deze PROTAC een 10 keer sterkere remming van de groei van neuroblastoomcellen en patiënt-afgeleide organoïden, wat het therapeutisch potentieel van MK-5108-gebaseerde PROTACs in neuroblastoom onderstreept. Zijn hoge afbraaksnelheid in muizen, maakt **SK2188** echter ongeschikt voor *in vivo* evaluatie. In **hoofdstuk III** hebben we de structuur van SK2188 geoptimaliseerd door verschillende linkers en CRBN- en AURKA-liganden te verkennen, wat uiteindelijk leidde tot de ontdekking van krachtige AURKA-PROTACs **SK4454** en **SK5527**. Deze vertoonden een beter *in vivo* farmacokinetische profiel en zelfs een beperkte orale biologische

beschikbaarheid. Farmacodynamische experimenten toonden aan dat SK4454 de AURKA-niveaus aanzienlijk verlaagde in het neuroblastoomweefsel van IMR-32-xenotransplanterende muizen, wat bewijst dat AURKA-afbraak in tumoren in muizen mogelijk is. Verdere studies met herhaalde toediening zullen het mogelijke therapeutische voordeel van PROTACs moeten aantonen ten opzichte van klassieke AURKA-remmers. In **hoofdstuk IV** onderzochten we het potentieel van omgekende AURKA-remmers om te vormen tot macrocyclische analogen die vastgelegd worden in een conformatie die lijkt op deze aangenomen door de acyclische analogen bij binding aan het AURKA. We toonden aan dat deze macrocyclische AURKA-liganden een uitstekende affiniteit behielden. Hoewel ze er vermoedelijk niet in slagen om NB-cellen binnen te dringen, kunnen ze dienst doen als nieuwe liganden voor toekomstige AURKA PROTACs.

Samengevat, hebben we met succes krachtige, snelle en selectieve Aurora Kinase A-PROTACs ontwikkeld, zoals SK2188. Verdere structurele optimalisatie-inspanningen leidden tot de ontdekking van PROTAC SK4454, die in vivo AURKA-degradatieactiviteit vertoonde. Deze bevindingen vormen een sterke basis voor verdere validatie en de ontwikkeling van AURKA-PROTACs als een nieuwe therapeutische optie voor de behandeling van neuroblastoom.



Overzicht van de ontwikkelde AURKA PROTACs en macrocyclische AURKA inhibitoren in deze PhD thesis. \* $pK_i$ -waarde van PROTAC 1.58d