Synteza pochodnych dibenzo[*b*,*e*]azepiny, dibenzo[*b*,*f*][1,4]oksazepiny i pirydo[2,3-*b*] [1,4]benzotiazepiny - nowych inhibitorów tworzenia kompleksu PEX14-PEX5, o potencjalnym działaniu przeciwpasożytniczym

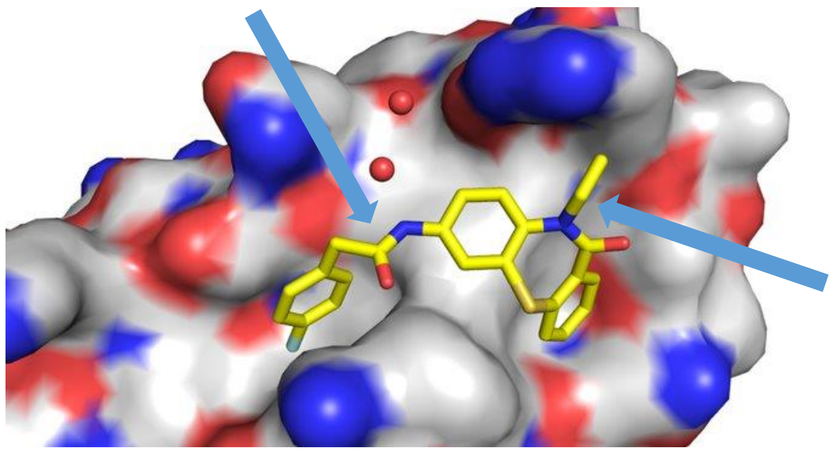
mgr Emilia Pykacz

Promotor i opiekun naukowy pracy: dr. inż. Michał Nowacki
Kierownik projektu: dr. hab. Maciej Dawidowski
Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej

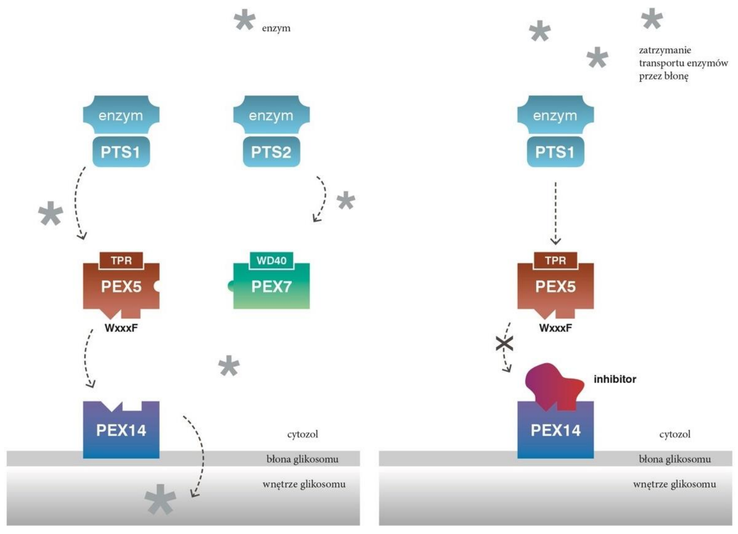
Wstęp

Pasożyty z rodzaju *Trypanosoma* (*T.brucei* i *T.cruzi*) odpowiedzialne są za rozwój tzw. Zaniedbanych chorób tropikalnych takich jak śpiaczka afrykanska i choroba Chagasa. Te schorzenia dotykają populacje ludzi na obszarach subtropikalnych Afryki i Ameryki Południowej, gdzie - ze względu na niski status socjoekonomiczny – fundusze na poszukiwania nowych substancji leczniczych są ograniczone. Obecnie dostępna farmakoterapia cechuje się słabym profilem bezpieczeństwa, w związku z czym konieczne jest prowadzenie badań mających na celu odkrycie i udoskonalenie nowych cząsteczek o potencjalnym działaniu przeciwpasożytniczym.

Glikosomy są to organelle charakterystyczne dla pasożytów z rodzaju Trypanosoma zaangażowane w ważne dla ich przeżycia procesy metaboliczne. Białka zwane peroksynami (PEX) okazały się dobrym celem molekularnym dla nowych potencjalnych leków przeciw świdrowcom. Odkryto, że blokowanie interakcji między białkami PEX14 i PEX5 hamuje translokację enzymów metabolicznych do wnętrza glikosomu, prowadząc do śmierci pasożyta.



Struktura kokryształu białka PEX14 z alokowanym ligandem odkrytym w badaniu przesiewowym AlphaScreen. Strzałkami zaznaczone są miejsca optymalizacji struktury w celu zwiększenia wiązania z lipofilowym łańcuchem bocznym argininy oraz z kieszenią tryptofanową na powierzchni białka.



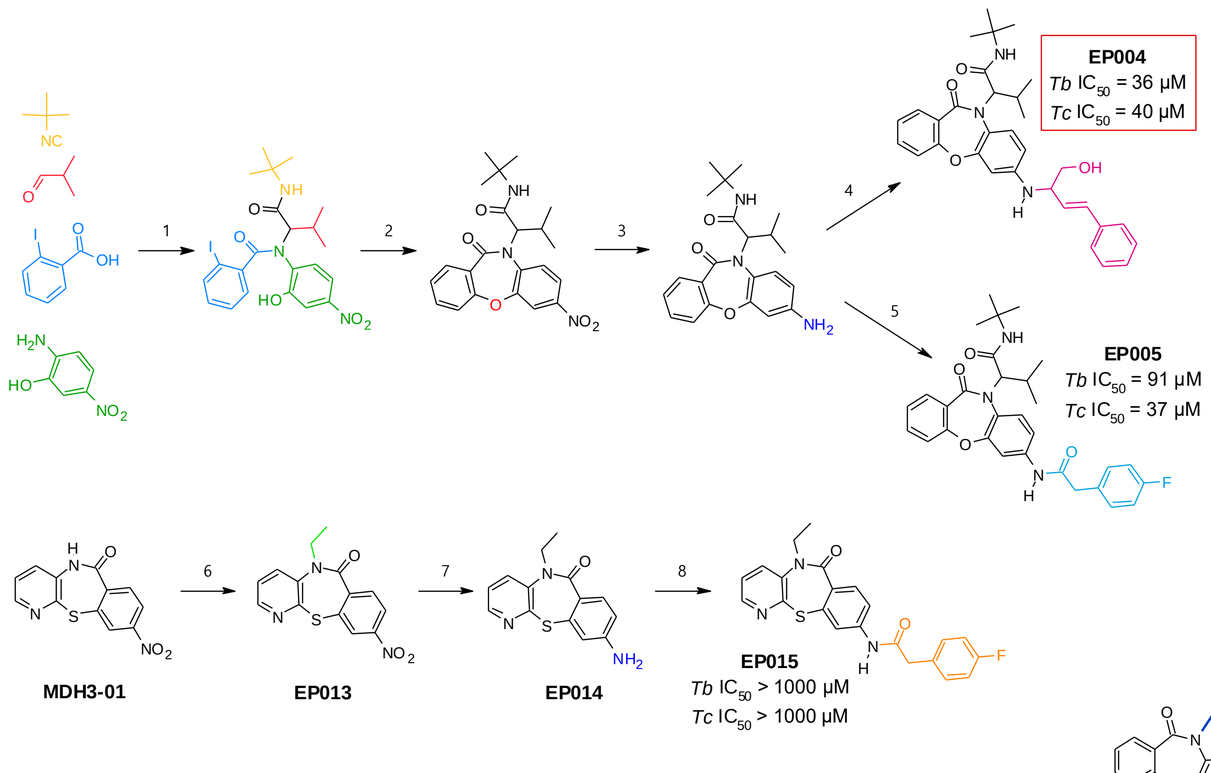
Utworzenie kompleksu białek PEX15-PEX5 umożliwia translokację enzymów metabolicznych do wnętrza glikosomu. Blokada interakcji tych białek prowadzi do nagromadzenia enzymów glikosomalnych w cytozolu, wyczerpania adenozynotrifosforanu i akumulacji glukozy.

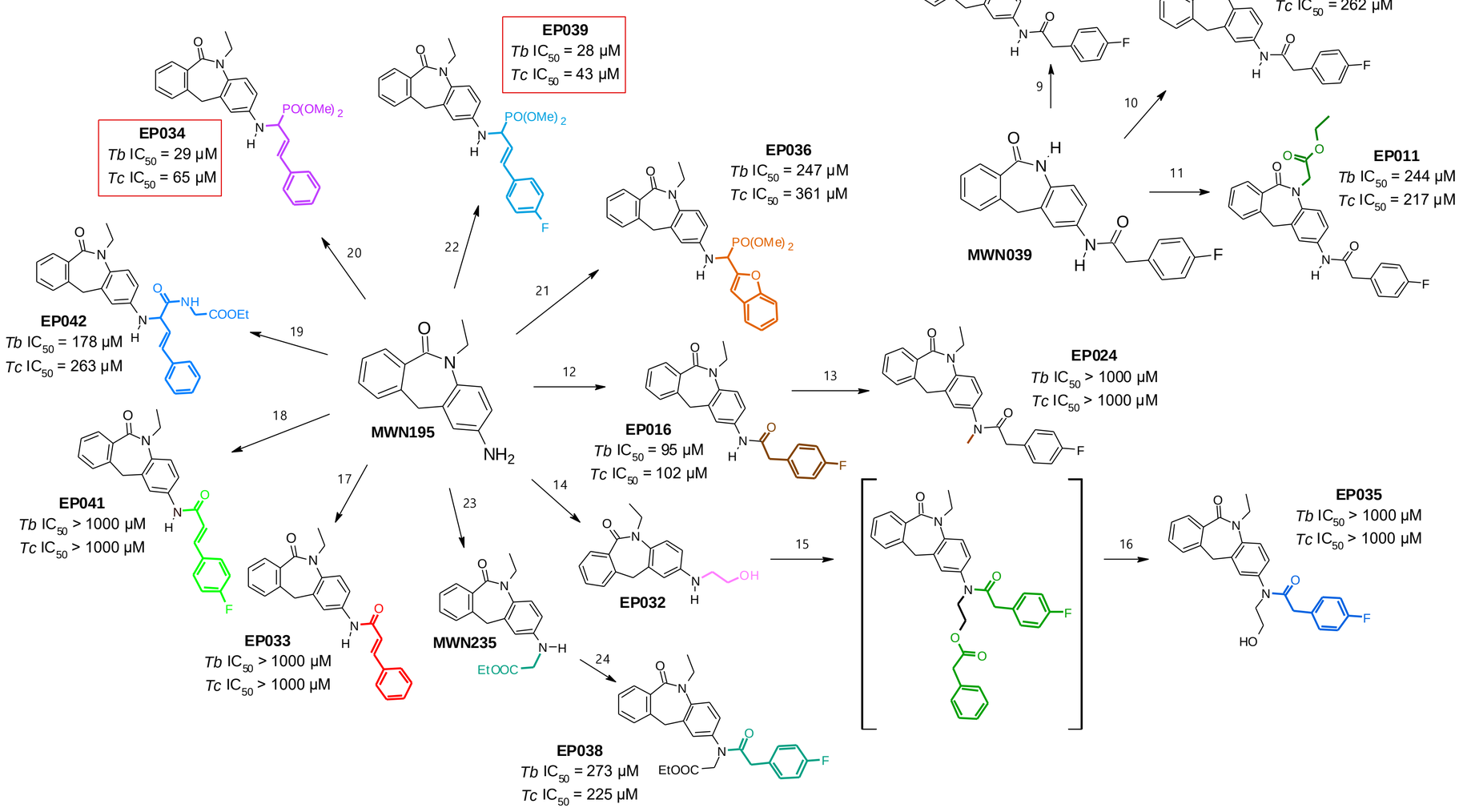
Cel pracy

Synteza pochodnych dibenzo[*b*,*e*]azepiny, dibenzo[*b*,*f*][1,4]oksazepiny i pirydo[2,3-*b*] [1,4]benzotiazepiny – związków o potencjalnym działaniu przeciwpasożytniczym przeciwko pierwotniakom z rodzaju *Trypanosoma*, hamującym powstawanie kompleksu PEX14-PEX5. Otrzymanie nowych zaprojektowanych pochodnych zostało zaplanowane używając metody chemii klasycznej i reakcji multkomponentowych, ze względu na skomplikowaną trójcykliczną strukturę cząsteczek.

Materiały i metody

Struktura szkieletu dibenzo[*b*,*f*][1,4]oksazepiny i pirydo[2,3-*b*] [1,4]benzotiazepiny została zidentyfikowana za pomocą badania przesiewowego AlphaScreen. Następnie dokonano bioizosterycznej modyfikacji cząsteczki w celu otrzymania metabolicznie stabilniejszej pochodnej dibenzo[*b*,*e*]azepiny. Docelowe pochodne zaprojektowano z myślą o optymalizacji łączenia się z powierzchnią białka PEX14 w istotnych miejscach wiązania ligandu. Różne reakcje multikomponentowe jak rekacja Ugiego, Petasisa oraz Kabachnika-Fieldsa ułatwiły otrzymanie skomplikowanej struktury trójcyklicznej z skondensowanym pierścieniem siedmioczłonowym, a także alokowanie rozbudowanych podstawników w celu zwiększenia powinowactwa do białka PEX14. Struktury otrzymanych pochodnych były potwierdzone metodami spektralnymi i chromatograficznymi (^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR, ^{31}P NMR, LC-MS, TLC).





Reagenty i warunki reakcji:

1. MeOH, 55 °C (15%) lub rT (24%);
2. CuI, chlorowodorek *N*,*N'*-dimetyloglicyny, Cs_2CO_3, 1,4-dioksan, 115 °C (35%) lub 110 °C (45%);
3. $SnCl_2$, EtOH, rT (72%); 4. *E*-PhCH=CHB(OH)$_2$, (HOCH$_2$CHO)$_2$, MeOH, rT (100%);
5. *p*-FC$_6$H$_4$CH$_2$COOH, EDC*HCl, DMAP, Et$_3$N, DCM, -15 °C – rT (51%);
6. C$_2$H$_5$Br, K_2CO_3, ACN, DMF, rT (100%);
7. $SnCl_2$, EtOH, rT (66%);
8. *p*-FC$_6$H$_4$CH$_2$COOH, EDC*HCl, DMAP, Et$_3$N, DCM, -15 °C – rT (18%) 9. CH$_3$I, K_2CO_3, DMF, temp.pok. (57%);
10. *i*-PrBr, K_2CO_3, TBAB, KI, DMF, temp. pok. (67%);
11. BrCH$_2$COOC$_2$H$_5$, Cs_2CO_3, DMF, temp. pok. (88%).
12. *p*-FC$_6$H$_4$CH$_2$COOH, EDC*HCl, DMAP, Et$_3$N, DCM, -15 °C – temp.pok. (50%);
13. CH$_3$I, 50% r-r NaOH, TBAB, 1,4-dioksan, rT (59%);
14. (HOCCH$_2$CHO)$_2$, NaBH(OAc)$_3$,CH$_3$COOH, Na_2SO_4, K_2CO_3, THF (84%);
15. *p*-FC$_6$H$_4$CH$_2$COOH, EDC*HCl, DMAP, Et$_3$N, DCE, -15 °C – rT;
16. NaOH, 1,4-dioksan, rT (26%);
17. C$_6$H$_5$CH$_2$COOH, EDC*HCl, DMAP, Et$_3$N, DCM, -15°C – rT (95%);
18. *p*-FC$_6$H$_4$CH=CHCOOH, EDC*HCl, DMAP, Et$_3$N, DCM, -15 °C – rT (75%);
19. C$_6$H$_5$CH=CHCHO, CNCH$_2$COOC$_2$H$_5$, C$_6$H$_5$P(=O)H(OH), MeOH, 80 °C (23%);
20. C$_6$H$_5$CH=CHCHO, POH(OMe)$_2$, THF, rT – 40 °C (39%);
21. Benzo[*b*]furan-2-karboksyaldehyd, POH(OMe)$_2$, THF, rT – 80 °C (72%); 22. *p*-FC$_6$H$_5$CH=CHCHO, POH(OMe)$_2$, THF, rT. – 60 °C (79%);
23. 24. BrCH$_2$CO$_2$Et, AcONa, EtOH. 80 °C (42%)
24. *p*-FC$_6$H$_4$CH$_2$COOH, EDC*HCl, DCM, -15 °C – rT. (66%).

Wyniki i wnioski

W wyniku syntezy chemicznej składającej się z reakcji chemii klasycznej i reakcji multikomponentowych pomyślnie otrzymano pierwsze inhibitory interakcji PEX14-PEX5 w dobrych wydajnościach. Niektóre z nich wykazały aktywność inhibicji już w stężeniach mikromolowych i posłużyły jako wzór do projektowania pochodnych w dalszych badaniach nad nowymi środkami przeciwpasożytniczymi

Efektywność związków w rozbijaniu kompleksu białek PEX14-PEX5 mierzona była za pomocą testu AlphaScreen [μM]: *T. brucei* (*Tb* EC$_{50}$), *T. cruzi* (*Tc* EC$_{50}$)

Literatura

J. R. Haanstra *et al. Biochim Biophys Acta* **2016**, 1863, 1038-1048.
W. Schliebs *et al. J Biol Chem* **1999**, 274, 5666-5673.
J. Sadoski *et al. J Biol Chem* **2001**, 276, 34524-34529.
G. J. Gatto, *et al. Nat Struct Biol* **2000**, 7, 1091-1095.
C. Neufeld *et al. EMBO J* **2009**, 28, 745-754.
L. Emmanouilidis *et al. Biochim Biophys Acta* **2016**, 1863, 804-813.
T. Furuya *et al. Proc Nat Ac Sci USA* **2002**, 99, 14177-14182.
J. R. Haanstra *et al. Proc Nat Ac Sci USA* **2008**, 105, 17718-17723.
M. Dawidowski *et al. Science* **2017,** 355, 1416–1420.
M. Dawidowski *et al. J. Med. Chem.* **2020,** 63, 847–879.

Praca magisterska została wykonana w ramach projektu badawczego finansowanego z grantu NCN Opus (UMO-2018/31/B/NZ7/02089)

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY