

SYNTEZA NOWYCH INHIBITORÓW INTERAKCJI BIAŁEK PEX-14-PEX5, JAKO ZWIĄZKÓW O POTENCJALNEJ AKTYWNOŚCI PRZECIWPASOŻYTNICZEJ

Magdalena Dziekońska

Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Opiekun i promotor pracy magisterskiej: **dr hab. Maciej Dawidowski**

Wstęp

Białka PEX odpowiadają za funkcjonowanie glikosomów u *Trypanosoma* i *Leishmania*. Te pasożyty wywołują u ludzi śpiączkę afrykańską, chorobę Chagasa oraz leiszmaniozę. W glikosomach zachodzą ważne reakcje metaboliczne, m.in. glikoliza czy biosynteza steroli. Nie zawierają one informacji genetycznej, dlatego enzymy niezbędne do katalizowania tych reakcji muszą być przetransportowane z cytozolu. Inhibicja **interakcji białek PEX14-PEX5** hamuje ten transport, powodując śmierć pasożyta.

Cele i założenia

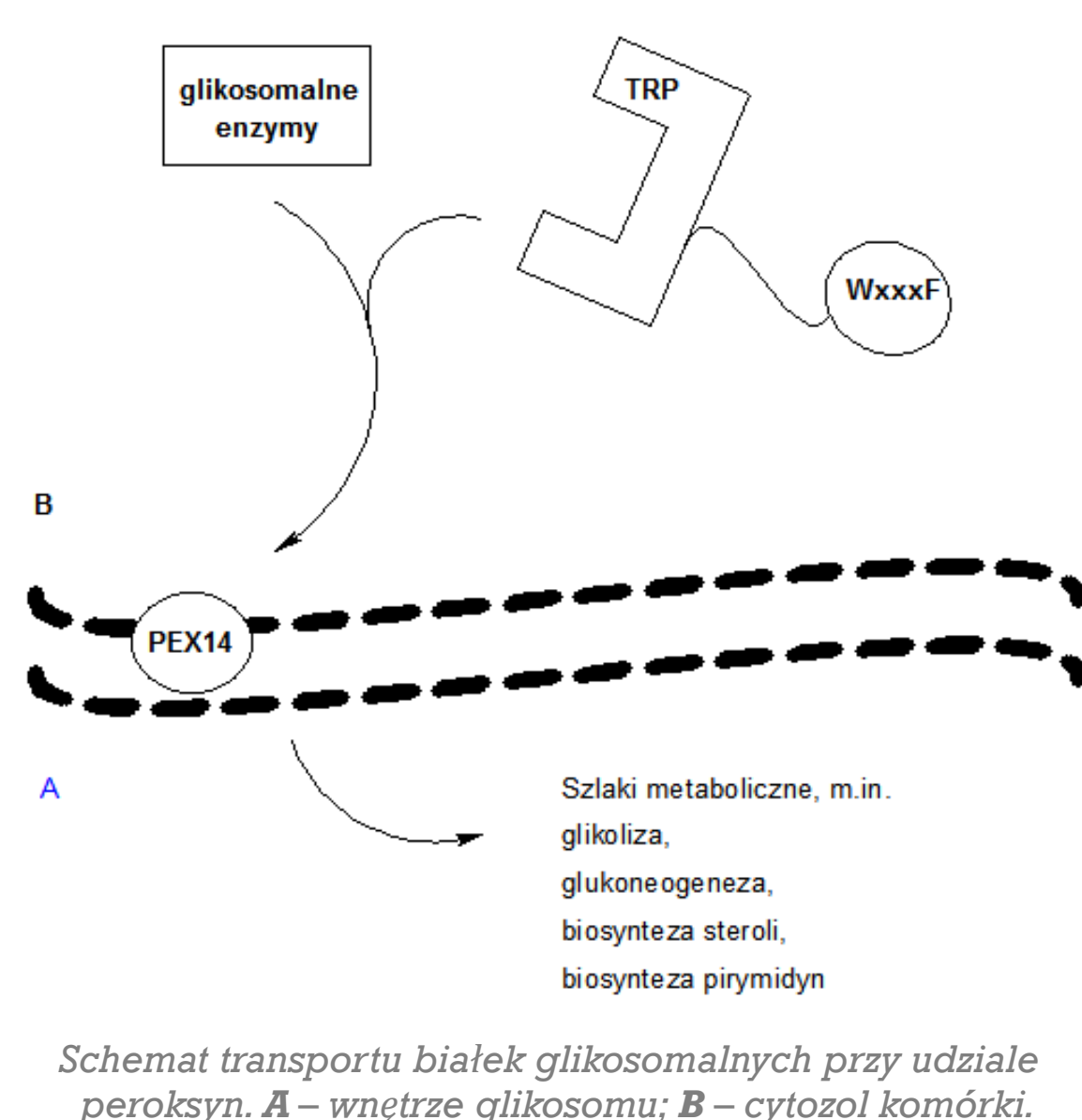
Otrzymanie aktywnych biologicznie związków chemicznych oraz dostarczenie nowych sond molekularnych do badania glikosomów.

Założenia:

- synteza nowych małowymiarowych inhibitorów interakcji białek PEX14-PEX5, bazujących na szkieletach **pirazolo[4,3-c]pirydyny**
- otrzymanie produktu końcowego metodami pośrednią i bezpośrednią
- synteza nowych kwasów boronowych i borinowych, jako substratów do kolejnych reakcji

Podstawy strukturalne

Domena **TRP** białka PEX5 przyląca enzymy glikosomalne w cytozolu. Fragmenty **WxxxF** białka PEX5 są rozpoznawane przez białko PEX14. Tworzy się kompleks obydwu białek przez co możliwy jest transport enzymu do glikosomu.

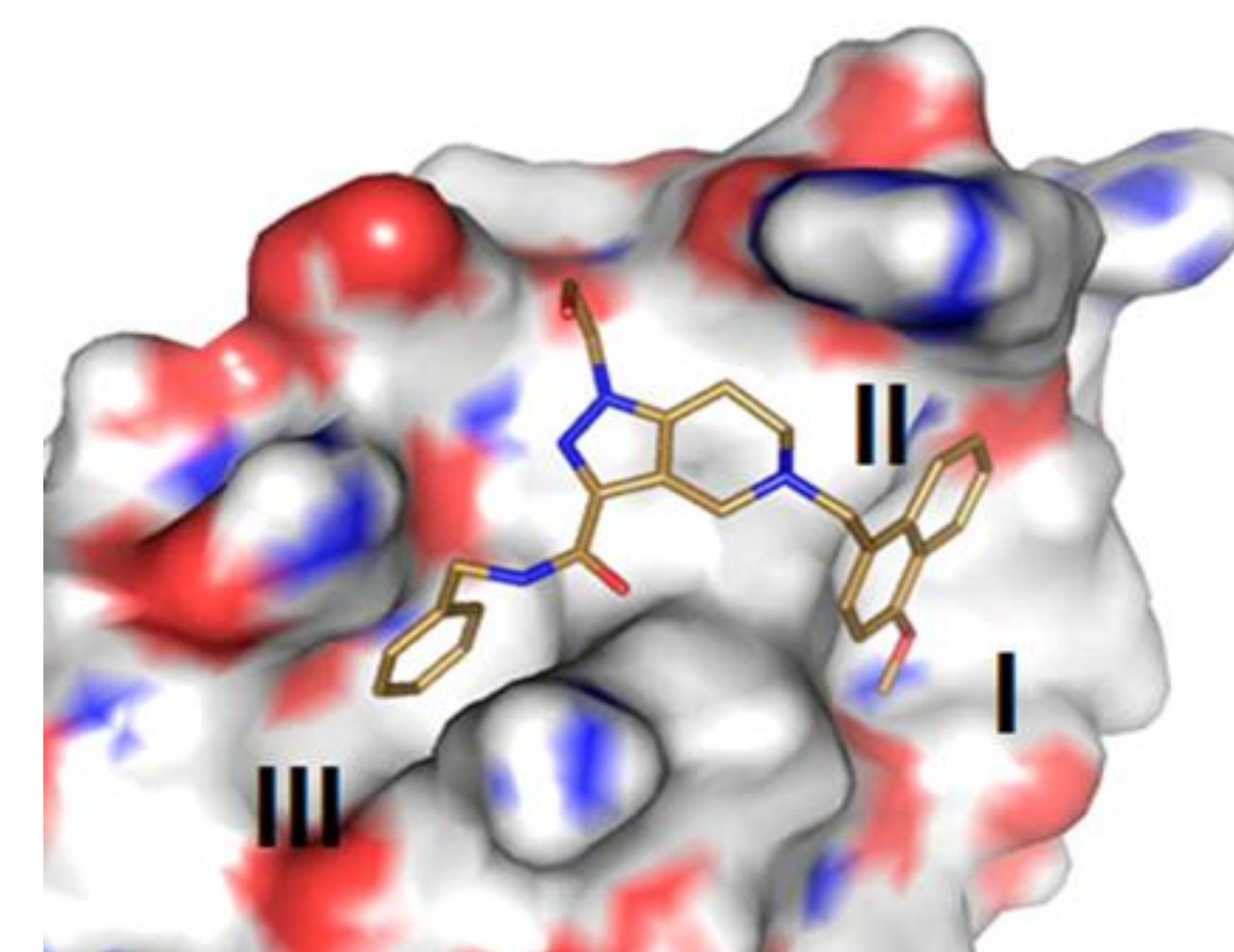


W toku wcześniejszych badań odkryto pierwsze ligandy białka PEX14 – pochodne **pirazolo[4,3-c]pirydyny**.

Grupy aromatyczne ligandu X01 są dopasowane do kieszeni wiążących białka (**III** i **I**). Z kolei rdzeń heterocykliczny związku odpowiada za prawidłowe dystansowanie obu pierścieni oraz tworzy wiązanie $\pi-\pi$ z resztami *Phe* oddzielającymi kieszenie (**II**).

Ligand ten miał **dobrą wiązalność** do białka PEX14 ($IC_{50} = 49 \mu M$) oraz wykazywał **aktywność przeciwpasożytniczą** w stosunku do *Trypanosoma brucei* ($EC_{50} = 9 \mu M$).

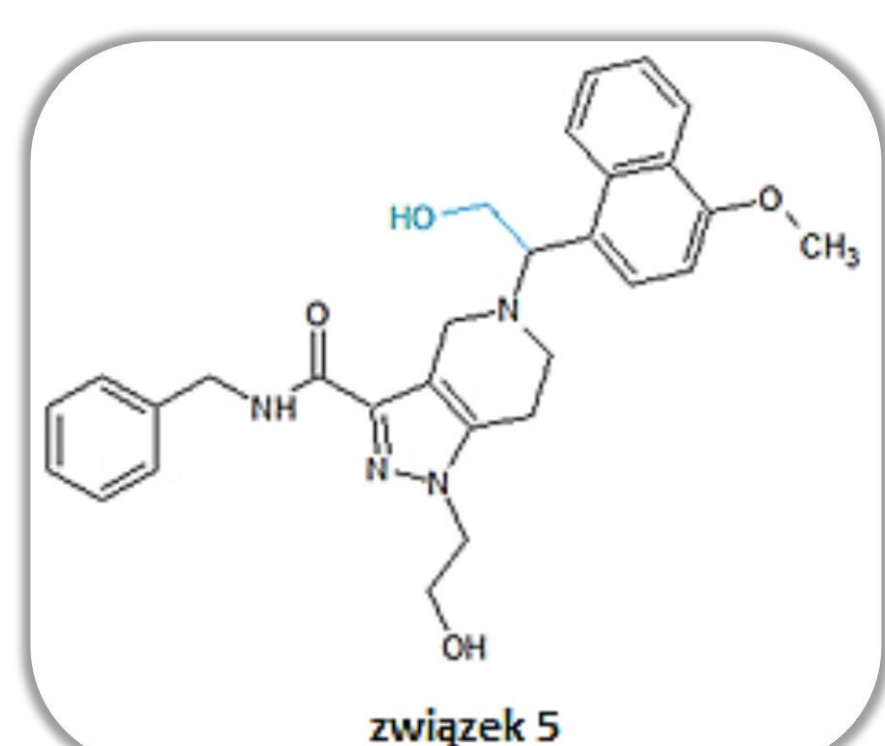
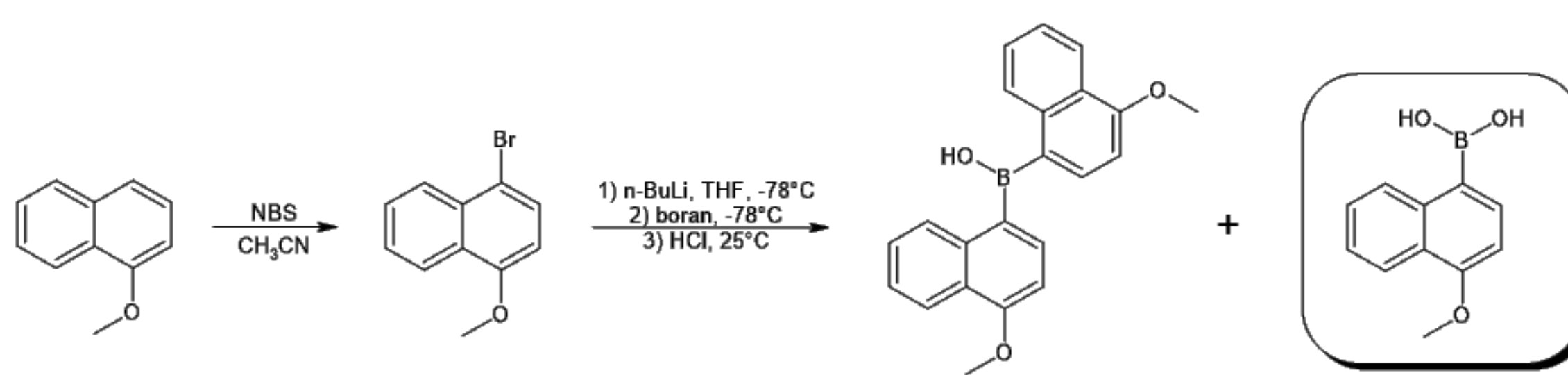
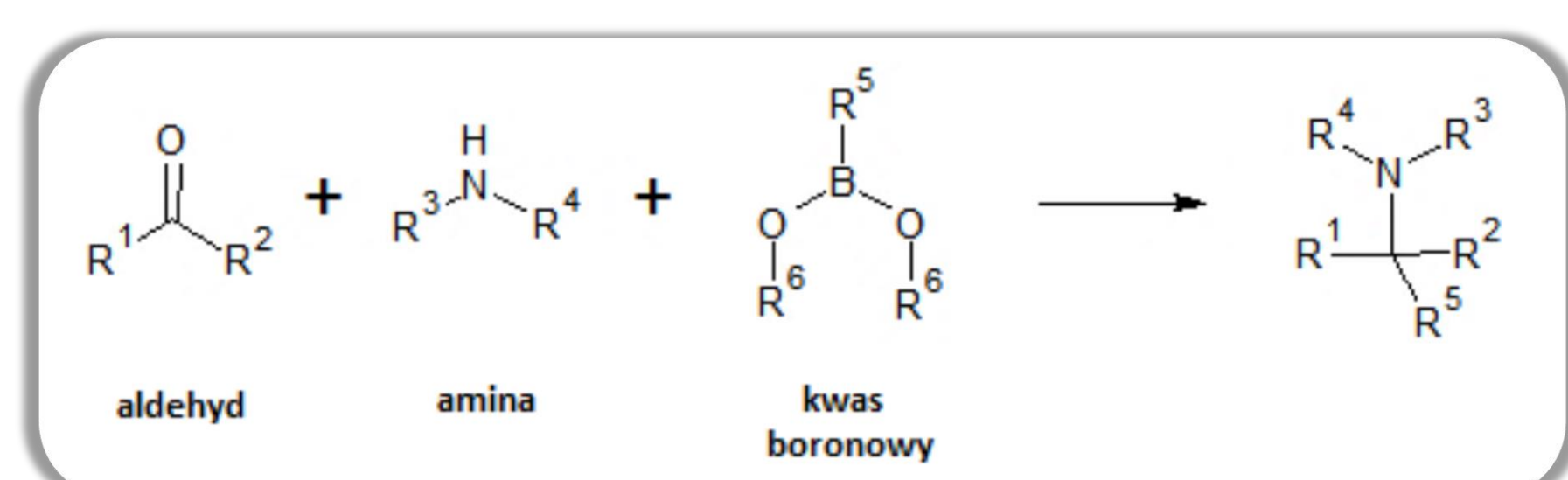
Duży stopień aromatyczności oraz wysoka hydrofobowość rzutowały jednak niekorzystanie na rozpuszczalność i właściwości ADME/farmakokinetykę.



Sposób wiązania ligandu wyjściowego (X01) do powierzchni białka PEX14.

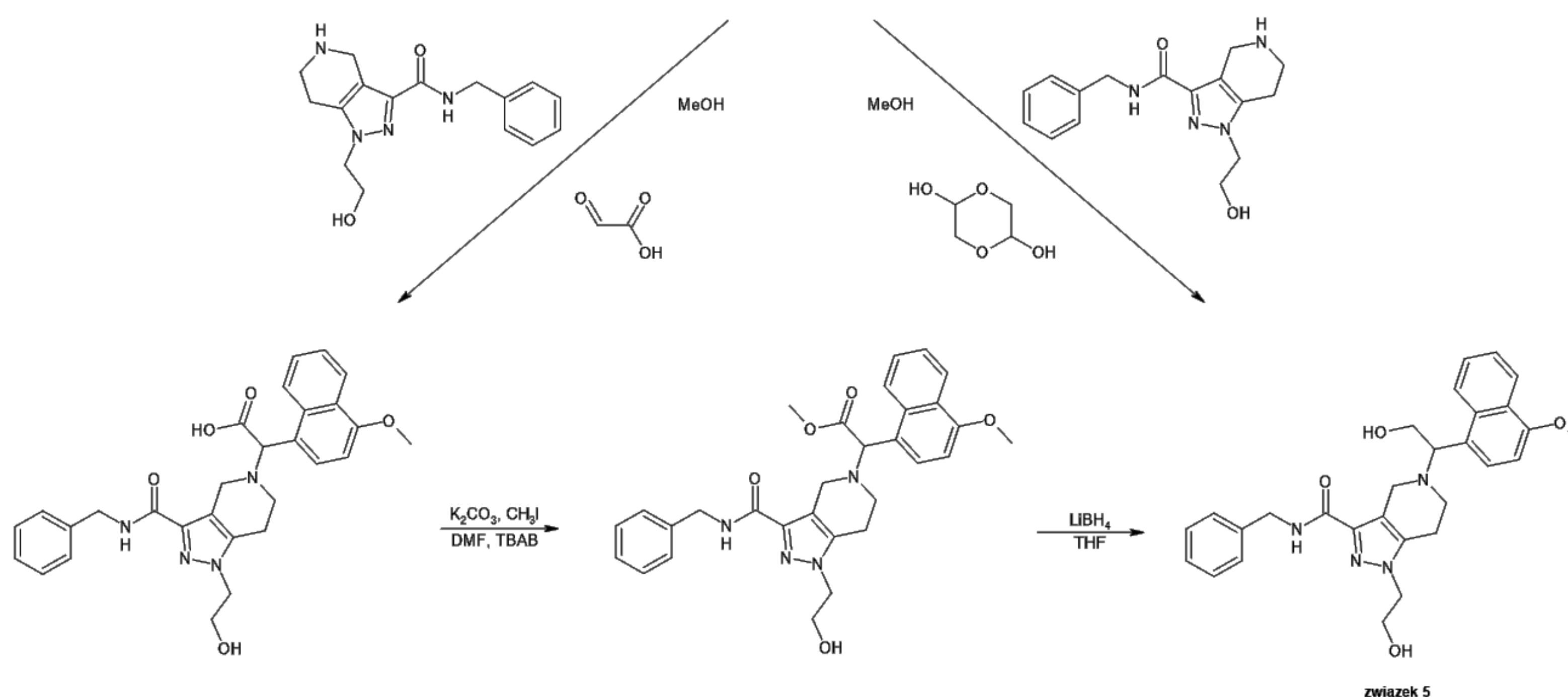
Projektowanie nowego ligandu interakcji białek PEX14-PEX5

Zastosowanie **multikomponentowej reakcji Petasis**, jako metody otrzymania związku 5 drogami - bezpośrednią i pośrednią.



Modyfikacja związku X01 poprzez wprowadzenie:

- **grupy -OH**, zmniejszającej lipofilność cząsteczki
- **atomu węgla o hybrydyzacji sp^3** , co obniża jej polarność
- **donora/akceptora wiązania wodorowego**

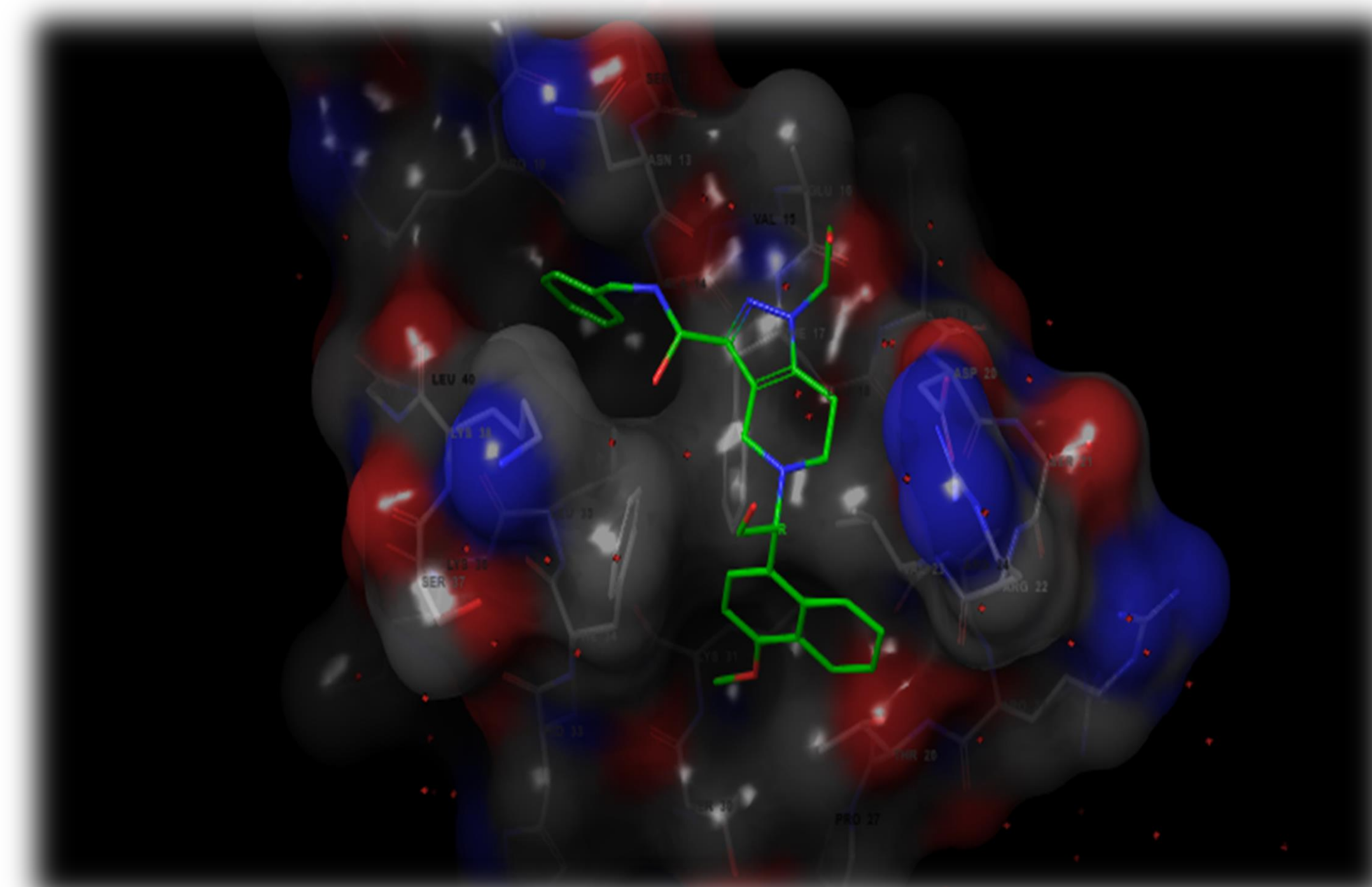


Wyniki i wnioski

- Otrzymałam oczekiwane związki (tożsamość potwierdzona metodami: 1H NMR, ^{13}C NMR oraz HRMS). Nie udało się otrzymać kwasu boronowego.
- Wydajność **reakcji Petasis** otrzymywania związku 5 wynosiła: metodą pośrednią 53 % (z 3 etapów), a dla metody bezpośredniej 79 %.
- Zastosowanie metody pośredniej pozwala na selektywną modyfikację grupy hydroksyetylowej, co może być korzystne podczas **dalszych badań nad optymalizacją związku**.
- Zbadano zdolność rozbijania kompleksu białek PEX14 i PEX5 przez związek 5. Współczynnik IC_{50} mierzony metodą **AlphaScreen** wynosi 19 μM , co oznacza 2,5-krotny wzrost powinowactwa do białka PEX14 w porównaniu do związku wyjściowego (X01). *Badanie wykonano w Instytucie Biologii Strukturalnej Centrum Helmholtza w Monachium*. Badania aktywności pierwotniakobójczej są w toku.
- Związek 5 został przekazany do **badania krystalograficznego** do Grupy badawczej Krystalografii Białek Małopolskiego Centrum Biotechnologii UJ.

Kompleks związku 5 z białkiem PEX14 pokazuje, iż **ma on podobną orientację wobec kieszeni wiążących co związek macierzysty** i wykazuje **zwiększone powinowactwo do białka PEX14**.

Zwiększone powinowactwo do białka PEX14 może mieć więc związek z uczestnictwem grupy -OH w stabilizacji sieci cząsteczek wody otaczających ligand.



Struktura krystalograficzna N-benzyl-1-(2-hydroksyetylo)-6-(2-hydroksyetylo)-(1-(4-metoksy)naftalen-1-yllo)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pirazolo[4,3-c]pirydyno-3-karboksamid (związku 5) w kompleksie z białkiem PEX14.

Przedstawiona praca magisterska powstała w ramach projektu naukowo-badawczego NCN OPUS 16, pt. „Nowe, racjonalnie zaprojektowane modulatory importu enzymów do glikosomu w pasożytach *Trypanosoma*.” (nr rej. 2018/31/B/NZ7/02089), w którym uczestniczę jako stypendystka.

Referencje:

- V. C. Kalel, L. Emmanouilidis, M. Dawidowski, W. Schliebs, M. Sattler, G. M. Popowicz i R. Erdmann, „Inhibitors of glycosomal protein import provide new leads against trypanosomiasis,” *Microbial Cell*, 2017, 4(7): 229-232;
P. Wu, M. Givskov i T. E. Nielsen, „Reactivity and Synthetic Applications of Multicomponent Petasis Reactions,” *Chemical Reviews*, 2019, 119(20): 11245-11290;
M. Dawidowski, L. Emmanouilidis, V. C. Kalel, K. Tripsianes, K. Schorpp, K. Hadian, M. Kaiser, P. Maser, M. Kolonko, S. Tanghe, A. Rodriguez, W. Schliebs, R. Erdmann, M. Sattler i G. M. Popowicz, „Inhibitors of PEX14 disrupt protein import into glycosomes and kill *Trypanosoma* parasites,” *Science*, 2017, 355(6332): 1416-1420.