

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Tytuł: **Small-molecule inhibitors of the Mdm2-p53 interaction. Substituted 1,5-dihydro-2H-pyrrol-2H-ones and tetrazoles.** (Małocząsteczkowe inhibitory oddziaływania białek Mdm2-p53. Pochodne 1,5-dihydro-2H-pirol-2-onu oraz tetrazolu)

Autor: **Ewa Wrona**

Białko p53, zwane strażnikiem genomu, jest białkiem o właściwościach supresora nowotworowego. W odpowiedzi na mutacje DNA lub inny sters komórkowy, prowadzi do ekspresji białek odpowiedzialnych za naprawę DNA, zatrzymanie podziału komórkowego oraz apoptozę. Brak aktywności białka p53 w komórkach może być wywołany poprzez mutacje samego białka lub przez jego inaktywację.

Głównym negatywnym regulatorem poziomu ekspresji białka p53, jest białko Mdm2, którego nadekspresja jest obserwowana w licznych komórkach nowotworowych. Przywrócenie funkcji białka p53 poprzez zakłócenie wzajemnego oddziaływania białek Mdm2 i p53 może stanowić podstawę rozwoju niegenotoksycznej terapii przeciwnowotworowej.

Celem prezentowanej rozprawy doktorskiej była synteza potencjalnych inhibitorów białka Mdm2 zawierających w swojej strukturze pięcioczłonowy układ heterocykliczny oraz analiza ich właściwości w badanym układzie.

Główna część pracy opisuje 14 pochodnych 1,5-dihydro-2H-pirol-2-onu, w których grupa benzylova, 6-chloroindol oraz druga grupa benzylova (alternatywnie grupa fenylova) zostały zaprojektowane aby naśladować aminokwasy białka p53, istotne z punktu widzenia jego wiązania z białkiem Mdm2. Są to: fenyloalanina¹⁹ (Phe¹⁹), leucyna²⁶ (Leu²⁶) oraz tryptofan²³ (Trp²³). Zaprojektowane związki zostały otrzymane na drodze dwóch dróg syntetycznych. Pierwsza z nich prowadzi do pochodnych 3-(6-chloro-1H-indol-3-ilo)-4-(4-chlorofenylo)maleimidu poprzez reakcje cyklizacji Faulsta. Druga ścieżka syntetyczna prowadzi do otrzymania pochodnych 4-(4-chlorobenzyl)-3-(6-chloro-1H-indol-3-ilo)-maleimidów i wykorzystuje metody substytucji atomów bromu w układzie *N*-metylo-3,4-dibromomaleimidu. Tlenowe analogi maleimidów zostały otrzymane poprzez reakcje transformacji typu laktam-lakton. Ostatnim etapem w obu zaprojektowanych drogach była reakcja Grignarda lub reakcja redukcji grupy karbonylowej pierścienia maleimidu. Struktury otrzymanych związków zostały potwierdzone za pomocą metod rentgenograficznych oraz dwuwymiarowej spektroskopii NMR.

Aktywność otrzymanych pochodnych w badanym układzie białkowym została określona za pomocą pomiarów widm ^1H - ^{15}N HSQC białka Mdm2, miareczkowanego otrzymanymi związkami. Uzyskane wartości stałych dysocjacji znajdują się w granicy od 1 do 400 μM . Analiza zależności aktywności otrzymanych związków od ich struktury ukazuje kilka ważnych tendencji. Najbardziej aktywne okazały się pochodne zawierające w swojej strukturze dwa podstawniki benzytowe oraz grupę 6-chloroindolową pomiędzy nimi. Dodatkowo, atom azotu pierścienia indolowego powinien być nie podstawiony. Najbardziej aktywne związki posiadają stałą dysocjacji poniżej 1 μM . Zarówno pochodne pirol-2-onu jak i ich tlenowe odpowiedniki są dobrymi inhibitorami oddziaływania białek Mdm2-p53.

Struktura krystaliczna kompleksu Mdm2 z najbardziej aktywnymi pochodnymi ukazuje że ich model wiązania z białkiem jest oparty na nieklasycznym mechanizmie. Grupa 6-chloroindolowa nie oddziałuje z kieszenią Trp23 jak przewidywano, lecz bierze udział w licznych interakcjach z powierzchnią białka Mdm2, powodując jego dimeryzację. Otrzymane inhibitory oddziałują również z klasycznymi kieszeniami wiążącymi białka Mdm2 za pośrednictwem podstawników benzytowych (kieszenie Trp23 i Leu26).

Drużga część pracy opisuje syntezę i analizę aktywności pochodnych tetrazolu. Projekt antagonistów opartych na pierścieniu tetrazolu został stworzony przy użyciu platformy AnchorQuery, z wykorzystaniem nowego, czteropunktowego modelu wiązania białka Mdm2. W zaprojektowanej strukturze pojawiają się następujące fragmenty. Jako odpowiednik Trp23 został wybrany kwas 6-chloroindoilo-2-karboksylowy; jako odpowiednik Phe19 pojawia się fragment alifatyczny, natomiast Leu26 została zastąpiona poprzez podstawioną grupę fenyłową. Dodatkowym, czwartym fragmentem, została pochodna eteru benzyłowego. Jej zadaniem jest indukowanie i oddziaływanie z powiększoną kieszenią Leu26. 24 pochodne 1,5-dipodstawionego-1*H*-tetrazolu zostały otrzymane dzięki wykorzystaniu wieloskładnikowej reakcji Ugi (U-4CR). Reagentami koniecznymi do przeprowadzenia tej reakcji były: ester etylowy kwasu 6-chloro-3-fromylo-1*H*-indol-3-ilo-2-karboksylowego, TMSN_3 , różne aminy oraz izocyjanki. Otrzymane produkty zostały poddane hydrolizie dając aktywne kwasowe pochodne. Struktura przykładowego związku otrzymanego w wyniku reakcji Ugi została potwierdzona metodami rentgenograficznymi.

Aktywność wszystkich pochodnych została określona za pomocą metody fluorescencyjnej (FP). Uzyskane wartości znajdują się w granicy od 36.6 do 0.02 μM . Analiza zależności aktywności związków od ich struktury ukazuje kilka tendencji. Największą aktywnością charakteryzują się związki zawierające w swojej strukturze fragment eteru benzyłowo-benzyłowego. Spośród przetestowanych związków, podstawionych różnymi atomami

halogenów, najlepszą aktywność wykazują te zawierające atom fluoru. Wprowadzenie dwóch atomów chloru, w pozycjach orto pierścienia benzylowego, prowadzi do znaczącego obniżenia aktywności. Pochodne tetrazolu, nie zawierające podstawnika odpowiedzialnego za wiązanie z powiększoną kieszenią Leu26, wykazują również satysfakcjonującą aktywność, lecz jest ona niższa niż dla ich wydłużonych odpowiedników. Badania dotyczące opisanych pochodnych tetrazolu są nadal prowadzone i obejmują optymalizację struktury, analizę aktywności (metodami NMR) oraz sposobu ich wiązania do białka Mdm2 (metody rentgenograficzne).