

Autor: Paulina Fortuna
Promotor: dr hab. Łukasz Berlicki, prof. PWr
Politechnika Wrocławska
Wydział Chemiczny
Zakład Chemii Bioorganicznej

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Projektowanie i synteza inhibitorów oddziaływania białko-białko dla układów: menina-MLL i p53-MDM2

Oddziaływania białko-białko odgrywają istotną rolę w wielu procesach biologicznych oraz pełnią kluczowe role w rozwoju wielu chorób, w tym różnych typów nowotworów. Niestety odkrycie nowych syntetycznych inhibitorów oddziaływania białko-białko jest bardzo trudnym zadaniem wynikającym z konieczności dopasowania niskocząsteczkowych związków do powierzchni białka. W niniejszej pracy skupiono się na otrzymaniu peptydowych inhibitorów oddziaływania białko-białko dla dwóch układów menina-MLL oraz p53-MDM2/X. Leki na bazie peptydów wykazują wiele niekorzystnych właściwości, m.in. charakteryzują się niską stabilnością proteolityczną. Jednakże dzięki modyfikacjom obejmującym szkielet jak również łańcuchy boczne, można uzyskać cząsteczki o pożądanych właściwościach, w tym o wysokiej stabilności proteolitycznej, która jest szczególnie ważna w ich terapeutycznym zastosowaniu.

W niniejszej pracy doktorskiej poszukiwano nowych, wysokoaktywnych peptydowych inhibitorów dla układów oddziałujących białek: p53-MDM2 oraz menina-MLL. W obu przypadkach inhibitory mogą mieć zastosowanie jak leki przeciwnowotworowe. Ogólna strategia projektowania polegała na usztywnieniu struktury peptydów w konformacji aktywnej poprzez wprowadzenie reszt β -aminokwasowych lub cyklizację. Celem tych modyfikacji było zwiększenie aktywności inhibitorowej oraz zmniejszenie podatności na proteolizę.

Wyjściowym punktem badań było zaprojektowanie peptydowych inhibitorów oddziaływania białko-białko dla układów: menina-MLL i p53-MDM2, wykorzystując dotychczas opublikowane struktury krystaliczne fragmentów oddziaływania białek przy zastosowaniu metod komputerowych. Kolejnym etapem pracy było opracowanie metody syntezy otrzymania zaplanowanych struktur, co obejmowało syntezę odpowiednich bloków budulcowych, syntezę peptydów na podłożu stałym oraz modyfikację grup bocznych (w tym cyklizację). Następnie otrzymane peptydy zostały poddane testom aktywności biologicznej względem wybranych układów białko-białko. Uzyskane wyniki pozwoliły na optymalizację mającą na celu uzyskania jak najbardziej aktywnych peptydów. W końcowym etapie badań dla wybranych peptydów otrzymano struktury krystaliczne kompleksu białko-peptyd, a także wyznaczono podatność na proteolizę.

Przeprowadzono skan β -aminokwasowy peptydowego inhibitora oddziaływania p53-MDM2 (syntezowano i zbadano 24 peptydy), na którego podstawie wskazano możliwe miejsca podstawienia β -aminokwasów. Zaprojektowano i otrzymano 11 peptydów zawierających 3 lub 4 usztywnione reszty β -aminokwasowe (kwas *cis*- lub *trans*-2-aminocyklopentanokarboksylowy). Na podstawie dichroizmu kołowego wykazano preferencję wszystkich otrzymanych peptydów w kierunku konformacji helikalnej. Najaktywniejsze peptydowe inhibitory oddziaływania p53-MDM2 wykazywały o 2 rzędy wyższą aktywność inhibitorową w porównaniu do α -peptydowego PMI, najbardziej aktywny peptyd wykazywał $K_i = 0.4$ nM względem MDM2 i $K_i = 23$ nM względem MDMX.

Zaprojektowano liniowe oraz cykliczne peptydowe inhibitory oddziaływania menina-MLL. Opracowano efektywną metodę syntezy cyklicznych peptydów z użyciem reakcji metatezy (katalizator Grubbsa 2 generacji) i reakcję uwodornienia peptydu na podłożu stałym z użyciem katalizatora Wilkinsona. Przeprowadzono optymalizację struktury biorąc pod uwagę długość łącznika, N- i C-koniec oraz reszty Phe9 i Ala11, w sumie otrzymując 26 peptydów. Syntezowano peptydowe inhibitory oddziaływania menina-MLL o aktywności inhibitorowej w zakresie nanomolarnym, z których najaktywniejszy peptyd miał $IC_{50} = 19$ nM.