

Maura Malińska
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

Promotorzy: prof. dr hab. Krzysztof Woźniak,
prof. dr hab. Andrzej Kutner

Structure and Charge Density Studies of Pharmaceutical Substances in the Solid State

Struktura i Gęstość Elektronowa Substancji Farmaceutycznych w Ciele Stałym

Streszczenie Pracy Doktorskiej

Siły elektrostatyczne są jednym z najważniejszych czynników decydujących o tworzeniu struktur krystalicznych i kompleksów białko-ligand. Gęstość elektronowa otrzymana z danych doświadczalnych lub teoretycznych umożliwia wgląd w charakter elektronowy struktury krystalicznej oraz cząsteczek wraz z możliwością ilościowej analizy siły oddziaływań. Fakt ten powinien być zastosowany w procesie projektowania ligandów jako bardziej dokładnego podejścia w porównaniu do metod opartych na polach siłowych, co stanowi podwaliny prezentowanej pracy doktorskiej.

W mojej pracy doktorskiej użyłam po raz pierwszy podejścia opartego na banku asferycznych atomów, analizie powierzchni Hirshfelda i Kwantowej Teorii Atomów w Cząsteczkach (ang. *Quantum Theory of Atoms in Molecules*, QTAIM), jako podstawy do analizy oddziaływań pomiędzy ligandem i białkiem. Praca doktorska składa się z dwóch części. Pierwsza część obejmuje doświadczalne badania gęstości elektronowej inhibitorów kinaz białkowych i analizę ich oddziaływań z białkami. Druga część opiera się na analizie 24 kompleksów pomiędzy pochodnymi witaminy D i Receptorem Witaminy D (VDR). Badania porównawcze dotyczące elektrostatycznej energii oddziaływań i potencjału elektrostatycznego wyjaśniły preferencje wiązania małych cząsteczek z białkami (przykład sunitynibu). Analiza licznych kompleksów pomiędzy receptorem a ligandami o podobnej strukturze doprowadziła do zaprojektowania agonistów o najniższej elektrostatycznej energii oddziaływań (analogi witaminy D).

Gęstość elektronowa umożliwia zrozumienie występujących w strukturze krystalicznej oddziaływań. WP1066 jest inhibitorem STAT3, który ułatwia rozprzestrzenianie się guza przez stymulacje angiogenezy i hamowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej. STAT3 można uznać za idealny cel interwencji terapeutycznej. Wyznaczona struktura krystaliczna wykazała że cząsteczki WP1066 w kryształach tworzą dimer, połączony wiązaniem halogenowym $C\equiv N\dots Br$. Wiązania halogenowe skupiają uwagę wielu badaczy, ponieważ

podobnie jak wiązanie wodorowe może mieć wpływ na wiązanie ligandu z białkiem a także brać udział w procesie zwijania białek. Wyznaczona gęstość elektronowa umożliwiła wykazanie anizotropowego rozkładu gęstości deformacyjnej wokół atomu bromu, co wpływa na jego potencjał elektrostatyczny. Potencjał elektrostatyczny wzdłuż wiązania halogenowego wykazuje bardziej dodatni charakter, co nazywane jest dziurą σ (ang. σ -hole) i prawdopodobnie jest przyczyną powstawania tego typu oddziaływań. Dodatkowo analiza bazy struktur krystalicznych (Cambridge Structural Database) i obliczenia teoretyczne potwierdziły że siła badanego wiązania halogenowego jest porównywalna do siły słabego wiązania wodorowego typu C-H...O.

Drugi wysokorozdzielczy pomiar dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego wykonałam dla jabłczanu sunitynibu. Jest to lek stosowany w walce z nowotworami, który blokuje niektóre specyficzne enzymy zwane kinazami białkowymi. Sunitynib jest lekiem zaprojektowanym, który uniemożliwia wiązanie cząsteczek ATP. W bazie struktur białkowych (Protein Data Bank - PDB) umieszczonych jest 6 struktur kompleksów sunitynib-białko, co umożliwiło dogłębną analizę oddziaływań pomiędzy lekiem i celem terapeutycznym. Analiza powierzchni Hirshfeld ujawniła podobny schemat oddziaływań występujących pomiędzy cząsteczkami sunitynibu w kryształach jabłczanu jak i w kieszeni aktywnej. Gęstość elektronowa kompleksów kinaz została zrekonstruowana za pomocą banku pseudoatomów UBDB, co z kolei umożliwiło analizę właściwości elektrostatycznych kinaz VEGFR2, CDK2, G2K, KIT i IT. Podejście QTAIM było pomocne przy odnalezieniu najbardziej konserwowanych oddziaływań pomiędzy ligandem i resztami aminokwasowymi budującymi kieszeń aktywną. Badania wykazały że oprócz oddziaływań podobnych do oddziaływań występujących z ATP (3 wiązania wodorowe) konserwowane jest 6 innych oddziaływań: dwa słabe oddziaływania C-H... O i cztery kontakty C-H... π . Jak wynika z prostego wzoru empirycznego proponowanego przez Espinosa & Lecomte głowa cząsteczki sunitynibu (bez łańcucha bocznego) oddziałuje z podobną energią z kinazami, tylko w przypadku kompleksu CDK2 to oddziaływanie jest silniejsze.

Bardziej ogólne podejście uwzględniające również dalekozasięgowy charakter oddziaływań polega na wykorzystaniu banku asferycznych atomów i metody EPMM (ang. *Exact Potential and Multipole Model*), umożliwiając obliczenie elektrostatycznej energii oddziaływań. Okazuje się, że z wyjątkiem kinazy VEGFR2, wszystkie pozostałe białka z porównywalną siłą wiążą sunitynib. Elektrostatyczna energia oddziaływań dla sunitynib z pominięciem łańcucha bocznego wynosi około $-60 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-16 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ dla VEGFR2). Z punktu widzenia elektrostatyki, siła wiązania sunitynibu nie zależy od tego, czy białko jest w formie aktywnej czy nieaktywnej. Jest to zgodne z kwalifikacją sunitynibu jako inhibitora pierwszego rodzaju. Moja analiza wykazała, że łańcuch boczny dodatkowo wzmacnia siłę wiązania sunitynibu, ponieważ w zależności od białka, przyjmuje on różne konformacje, tak aby maksymalizować siłę oddziaływania z aminokwasami.

mi na powierzchni białka, tworząc dodatkowe wiązania wodorowe lub inne oddziaływania elektrostatyczne. Przykładowo, w strukturze CDK2 sunitynib przyjmuje mniej korzystną konformację, tak aby utworzyć wiązanie wodorowe z Asp86 i Leu134. Prawdopodobnie ten mechanizm ma związek z niską specyficnością sunitynibu, który wiąże się z większością białek zaliczanych do kinaz. W każdym analizowanym kompleksie występują silne oddziaływania z resztami aminokwasowymi, wchodzącymi w skład regionu "zawias" (ang. *hinge*) analizowanych kinaz, które tworzą wiązania wodorowe z sunitynibem. Wiązania te, zgodnie z literaturą, są uważane za niezbędne aby dana cząsteczka skutecznie wiązała się z białkiem. Te same wiązania wodorowe są tworzone z adeniną w momencie tworzenia kompleksu kinazy z ATP/ADP (jeden z substratów reakcji katalizowanej przez kinazy). W przypadku sunitynibu, istnieje jeszcze jedno, stosunkowo silne oddziaływanie elektrostatyczne, obecne we wszystkich analizowanych białkach, jest to oddziaływanie konserwowanej reszty kwasu asparaginowego z fluorem. Pozostałe mocne oddziaływania z sunitynibem są tworzone przez negatywnie naładowane reszty aminokwasowe (sunitynib ma ładunek dodatki) położone w różnych pozycjach, w zależności od białka.

W przeciwieństwie do cząsteczki ATP/ADP, sunitynib jest mały i pasuje do kieszeni aktywnej, niezależnie od stanu aktywacji kinaz białkowych (mała kieszeń dla kinaz nieaktywnych: VEGRF2, KIT i większa kieszeń dla kinaz w postaci aktywnej: białko CDK2, G2K i IT). Elektrostatyczna energia oddziaływań z silnie konserwowaną triadą DFG, która jest odpowiedzialna za zamknięcie kieszeni aktywnej jest podobna dla wszystkich badanych kompleksów. Analiza kinazy KIT w formie nieaktywnym (z sunitynibem) i aktywnej (z ADP), wykazała że oba ligandy oddziałują z resztami aminokwasowymi kieszeni aktywnej z porównywalną siłą, co wyjaśnia dlaczego sunitynib może konkurować z ATP/ADP. Ponadto, odwracalna zmiana konformacji z aktywnej do nieaktywnej kinazy KIT powoduje modyfikacje jego potencjału elektrostatycznego, który wykazuje bardziej negatywne i bardziej pozytywne wartości potencjału elektrostatycznego zrzutowane na powierzchnię van der Waalsa dla postaci aktywnej i nieaktywnej, odpowiednio. Cechy te są zgodne z potencjałem elektrostatycznym sunitynibu i cząsteczki ATP. Wyniki te wyjaśniają preferencje sunitynibu do wiązania się do nieaktywnej postaci KIT. Badania te zostały rozszerzone na większą grupę kinaz białkowych, dla których w PDB znajdują się zdeponowane struktury o identycznej sekwencji i występujące w obu formach: aktywnej i nieaktywnej. Wyniki te wskazują że zmiana stanu aktywacji dla receptorowych kinaz tyrozynowych prowadzi do zmiany potencjału elektrostatycznego.

Różnorodność struktur cząsteczkowych inhibitorów kinaz jest niezwykła, dlatego w kolejnym etapie pracy skupiłam się na ligandach o podobnej strukturze cząsteczkowej i działających na ten sam receptor VDR. Doprowadziło to do zaproponowania nowych agonistów VDR. Elektrostatyczna energia oddziaływań dostępna po rekonstrukcji gęstości elektronowej przy pomocy

UBDB umożliwiła zrozumienie oddziaływań występujących pomiędzy naturalnym ligandem, analogami witaminy D i receptorem. Analiza strukturalna połączona z techniką dopasowania dostępnych kompleksów receptor-ligand wykazała, że istnieje 29 reszt aminokwasowych, które wiążą ligand. Trp286, które jest specyficzne dla VDR, odgrywa kluczową rolę w pozycjonowaniu ligandu. Trp286 tworzy wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe z Ser275, która z kolei oddziałuje z Met272. Trp286 tworzy sieć różnorodnych oddziaływań z ligandem, głównie CH... π , o elektrostatycznej energii oddziaływania równej $-4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, co wskazuje na ich bardzo silny charakter. Elektrostatycznych wkład w całkowitą energię dla oddziaływań dyspersyjnych nie jest najistotniejszy. Dodatkowo, ligand otacza helisę H3 VDR, pierścień A witaminy D oddziałuje z helisą H5, a grupa hydroksylowa w pozycji 24- lub 25- oddziałuje z resztami aminokwasowymi wchodzącymi w skład pętli łączącej helisy H7 i H11. Sieć tych oddziaływań jest odpowiedzialna za powstanie odpowiedniej konformacji receptora niezbędnej do jego dalszego funkcjonowania. Kieszeń aktywna składa się głównie z reszt hydrofobowych, istnieje jednak 6 charakterystycznych wiązań wodorowych dla wszystkich badanych ligandów. Grupa hydroksylowa w pozycji 1- tworzy dwa wiązania wodorowe z Ser237 (H3) i Arg274 (H5), podczas gdy grupa hydroksylowa w pozycji 3- tworzy dwa wiązania wodorowe z Ser278 (H5) i Tyr143. Ich elektrostatyczna energia oddziaływań silnie przyczynia się do sumarycznej energii dla całej kieszeni wiążącej ze średnią wartością energii równą $-8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-19 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-11 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-12 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, odpowiednio. Łańcuch alifatyczny pochodnych witaminy D o dużej swobodzie konformacyjnej przyjmuje rozciągniętą konformację i jest otoczony przez reszty aminokwasów o właściwościach hydrofobowych. Hydroksylowa grupa z pozycji 24 lub 25- tworzy wiązanie wodorowe z His305 wodoru (który leży w pętli łączącej H6 i H7) i His397 (H11) i energii elektrostatycznych oddziaływań jest bliska -13 i $-11 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, odpowiednio.

Całkowita energia elektrostatyczna dla badanych analogów witaminy D mieści się w przedziale od $-53 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ do $-111 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ w zależności od zmian w strukturze molekularnej ligandu. Częsteczki o najniższej elektrostatycznej energii oddziaływania to OCC, KH1, O1C i EIM (nazwa ligandów zgodne z kodami PDB). Przeprowadzona analiza umożliwiła zaproponowanie 4 nowych ligandów, które powinny mieć najniższą elektrostatyczną energię oddziaływań. Geometria kompleksów proponowanych ligandów z VDR otrzymałam przy użyciu programowu dokującego (Autodock4.3), która została wykorzystana do obliczeń elektrostatycznej energii oddziaływań. Końcowy wynik dla proponowanych ligandów TB1 i TB2 otrzymanych metodą EPMM wynosi -153 i $-120 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, co stanowi najniższy wynik spośród analizowanych kompleksów.

Podsumowując, moja praca doktorska stanowi jedną z pierwszych prób wykorzystania eksperymentalnej i modelowanej gęstości elektronowej jako narzędzia w procesie projektowania ligandów. Procedury te mogą być zasto-

sowane dla każdego kandydata na lek z dostępnymi monokryształami i/lub znaną strukturą krystaliczną kompleksu z celem terapeutycznym (białko, DNA, makrocząsteczka). Analiza QTAIM gęstości elektronowej zrekonstruowanej za pomocą banku pseudoatomów może odnaleźć oddziaływania charakterystyczne dla danego kompleksu, a wykorzystując proste metody empiryczne określić także ich energie. Natomiast, analiza całej rodziny pochodnych małych cząsteczek może umożliwić projektowanie nowych ligandów, które następnie należy poddać optymalizacji pod względem innych właściwości fizykochemicznych. Wiele z prezentowanych wyników były już przedmiotem artykułów naukowych (do tej pory, jestem współautorem 23 publikacji). Ostatnie publikacje dotyczące tematów zawartych w pracy doktorskiej są obecnie w przygotowaniu.