

**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika
Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk**



Konrad Kowalski

**Nowe metody otrzymywania i właściwości
biochemiczne związków boru z białkami**

Promotor: prof. dr hab. inż. Janusz Boratyński

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Chemii Biomedycznej

Wrocław 2018

Streszczenie

Związki zawierające bor znajdują szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu. Stosowane są obecnie jako insektycydy, środki bakteriobójcze, odczynniki redukujące (w chemii organicznej), katalizatory, materiały do produkcji pewnych rodzajów ceramiki, składniki ciekłych kryształów czy komponenty odpornych na temperaturę polimerów. Współczesne nauki chemiczne, biomedyczne oraz farmaceutyczne wykazują coraz większe zainteresowanie szczególną grupą związków zawierających atomy boru – tak zwanymi, klastkami boru. Związki te, ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne oraz biochemiczne, wydają się doskonałymi farmakoforami dla tworzenia nowych cząsteczek terapeutycznych.

Obecnie najczęściej wykorzystywanymi w badaniach biomedycznych klastkami boru są karborany – związki o geometrii ikosaedralnej (dwudziestościennej), o 12 wierzchołkach zawierających atomy boru i wodoru bądź boru, wodoru i węgla. Zarówno klastki boru, jak i karborany mają wyjątkowo złożoną strukturę wiązań, gdzie każdy z atomów boru lub węgla powiązany jest z sześcioma innymi atomami. Elektrony biorące udział w tworzeniu struktury są zdelokalizowane, dlatego klastki boru opisuje się jako układy o trójwymiarowej aromaticzności. Równie powszechne są związki składające się z dwóch klastków boru skoordynowanych atomem metalu – metalokarborany. Jednymi z najszerzej badanych tego typu klastków są kompleksy z kobaltem (Co), ale znane są również cząsteczki z innymi metalami, takimi jak: Fe, Cr, Nb, Ni, Cu, Au, Pt, Ru, Re czy Tc. Klastki boru są substancjami abiotycznym o wysokiej trwałości zarówno chemicznej, termicznej, jak i biologicznej. Jako produkty syntezy chemicznej nie mają swoich odpowiedników w znanej nam naturze. W rezultacie substancje aktywne oparte o związki klastków boru usuwane są z organizmu bez naruszenia ich struktury przestrzennej.

Celem niniejszej pracy jest ocena możliwości modyfikacji bioaktywnych białek z użyciem klastków boru oraz wpływu modyfikacji na właściwości fizykochemiczne i biochemiczne protein. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem adduktów oksoniowych (dioksanowy oraz tetrahydopiranowy) 3 różnych klastków boru: *closo*-dodekaboranu, dikarba-*nido*-undekaboranu oraz bis (1,2-dikarbolido) kobaltanu. W pierwszej kolejności podjęto prace mające na celu ocenę reaktywności adduktów klastków boru w środowisku wodno-organicznym względem obecnych w białkach

grup nukleofilowych. Po dobraniu odpowiednich warunków przeprowadzono szereg reakcji z aminokwasami oraz aminokwasami blokowanymi na grupie alfa-aminowej. Badania te wykazały bardzo szeroką reaktywność adduktów oksoniowych zarówno względem grupy hydroksylowej, aminowej, czy tiolowej jak i grup funkcyjnych argininy czy histydyny. Na podstawie otrzymanych wyników opracowano dwie procedury syntezy koniugatów białek i peptydów z adduktami oksoniowymi klasterów boru: reakcję w środowisku wodno-organicznym oraz reakcję w fazie stałej w podwyższonej temperaturze. Metody te zastosowano do syntezy koniugatów klasterów boru z lizozymem jaja kurzego. Oczyszczone przy użyciu chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC) frakcje jednokrotnie podstawionych koniugatów zostały następnie poddane wnikliwej analizie z użyciem chromatografii cieczowej, sprzężonej ze spektrometrią mas, spektroskopii dichroizmu kołowego oraz dynamicznego rozpraszania światła. Połączenie tych technik pozwoliło na określenia zmian w strukturze drugo-, trzeciorzędowej białek oraz ich oddziaływań między sobą będących efektem modyfikacji klasterem boru. Badania wykluczyły wpływ koniugacji z klasterem boru na strukturę drugo- i trzeciorzędową białka. Modyfikacja klasterem boru wywołała jednocześnie znaczące zmiany w zachowaniu koniugatów, prowadząc do indukowanej czasem oraz temperaturą agregacji. Jednocześnie, pomimo obniżenia aktywności biologicznej koniugatów, ich agregacja skompensowała utratę zdolności do lizy ściany komórkowej bakterii gram-dodatnich. Prace te wskazały, jak znaczący wpływ na właściwości fizyko- oraz biochemiczne może mieć modyfikacja białka pojedynczą cząsteczką klasteru boru. Indukowana koniugacją z klasterem boru agregacja białka wydaje się zjawiskiem niepożądanym. Ponadto równolegle prowadzone badania wykazały zdolność klasterów metalokarboranowych do silnego wiązania się w obrębie nisz hydrofobowych ludzkiej albuminy surowiczej (HSA). Niemniej dla wielu leków, szczególnie peptydowych tego typu, multimeryzacja bądź wiązanie z albuminą są strategiami pozwalającymi na zmianę farmakokinetyki, w tym wydłużenia czasu półtrwania leku w ustroju. Celem weryfikacji możliwości przeniesienia właściwości wiązania klasteru metalokarboranowego względem albuminy na cząsteczkę peptydu przeprowadzono syntezę koniugatu klasterów boru z insuliną ludzką. Dowiedziono, że frakcja jednopodstawionych koniugatów metalokarboranu z insuliną ludzką wykazuje zdolność wiązania do HSA około 20-krotnie wyższą niż komercyjnie dostępny długodziałający analog insulin – detemir. Jednocześnie wykluczono modyfikację w obrębie aminokwasów odpowiedzialnych za

wiązanie się insuliny z receptorem dla insuliny, zapewniając potencjalnie brak utraty aktywności biologicznej peptydu.

Podsumowując, prezentowane wyniki wskazują na to, że klastery boru mogą być doskonałymi modulatorami właściwości fizykochemicznych białek terapeutycznych. Umieszczone w sposób celowany w aktywnych hydrofobowych domenach białka mogą zwiększyć siłę wiązania z receptorem bądź wiązanie substratu. Pozornie nieznacząca, z punktu widzenia wpływu na strukturę pierwszo-, drugo- czy trzeciorzędową białka, modyfikacja istotnie wpływa na oddziaływanie z niskocząsteczkowymi ligandami, jak i makrocząsteczkami.