

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Opracowanie metody syntezy i badanie właściwości nowych inhibitorów kinazy CK2

Kinaza białkowa CK2 jest enzymem powszechnie występującym w komórkach eukariotycznych, biorącym udział w regulacji wielu ważnych dla funkcjonowania komórki procesów, np.: różnicowanie, proliferacja, angiogeneza czy apoptoza. Wykazano podwyższoną aktywność CK2 w wielu typach nowotworów. Jednocześnie stwierdzono, że obniżenie tej aktywności skutkuje zmniejszeniem częstości podziałów komórkowych, lub prowadzi do indukcji apoptozy. Z tego względu CK2 została wytypowana, jako cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej. O słuszności tego wyboru świadczy sukces jednego z najlepszych inhibitorów CK2 - CX-4945 (Silmitasertib), który zakwalifikowany został do drugiej fazy badań klinicznych w leczeniu nowotworu dróg żółciowych. Spośród wielu klas związków obniżających aktywność CK2, szeroko badanymi inhibitorami są pochodne 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazolu (TBBi) i 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazolu (TBBt).

Celem pracy doktorskiej było opracowanie metod syntezy nowych inhibitorów kinazy białkowej CK2, zbadanie wpływu otrzymanych związków na jej aktywność oraz określenie aktywności cytotoksycznej najbardziej skutecznych inhibitorów wobec komórek nowotworowych. Wśród syntezowanych związków były m in.: nowe pochodne TBBi, TBBt i azolo[4,5-*b*]pirydyny oraz zaprojektowane w oparciu o modelowanie komputerowe pochodne 1,5-dihydro-2*H*-pirol-2-onu.

W części literaturowej omówiono budowę kinazy białkowej CK2, przytoczono przykłady funkcji, jakie pełni w organizmie człowieka oraz przedstawiono przykłady podwyższonej aktywności tego enzymu w różnych rodzajach nowotworów. Ponadto dokonano przeglądu znanych inhibitorów CK2, ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych TBBi i TBBt.

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano metody syntezy szeregu nowych pochodnych TBBi i TBBt. Pierwszą grupą były *N*-podstawione pochodne z pierścieniem 1*H*-1,2,3-triazolowym podstawionym w pozycji *C*4 różnymi grupami. Kluczowym etapem ich syntezy była cykloaddycja azydku do alkinu katalizowana jonami miedzi (I). Kolejną grupą związków były *N*-aminoalkilowe pochodne TBBi, TBBt i 4,5,6,7-tetrabromo-2-metylo-1*H*-benzimidazolu (2MeTBBi). Kluczowym etapem, opracowanej kilkietapowej syntezy była reakcja Staudingera, w której azydki organiczne redukowane są do pierwszorzędowych amin za pomocą trifenylofosfiny. Opracowano również metodę syntezy halogenowych pochodnych 1*H*-imidazo[4,5-*b*]pirydyny oraz 1*H*-triazolo[4,5-*b*]pirydyny.

Wszystkie omawiane związki zostały scharakteryzowane oraz został zbadany ich wpływ na aktywność CK2, jak również przeżywalność komórek nowotworowych linii MCF-7, CCRF-CEM i PC-3. Najskuteczniejszymi inhibitorami kinazy CK2 okazały się *N*-aminoalkilowe pochodne TBBi i 2MeTBBi, które obniżały aktywność enzymu do 50% (IC₅₀) przy stężeniach w zakresie 1,5 – 3,6 μM, co jest porównywalne z wynikami dla TBBi (IC₅₀ 1,3 μM) i 2MeTBBi (IC₅₀ 1,8 μM). Ponadto związki te wykazują wysoką aktywność cytotoksyczną wobec nowotworowych linii komórkowych. Inkubacja komórek w obecności 2-(4,5,6,7-tetrabromo-2-metylo-1*H*-benzimidazol-1-ilo)etylo-1-aminy w stężeniu 0,9 μM (MCF-7), 0,7 μM (CCRF-CEM) oraz 1,4 μM (PC-3) skutkowała obniżeniem ich przeżywalności do 50%. Związek ten charakteryzuje się wyższą cytotoksycznością w porównaniu do TBBi, 2MeTBBi, czy nawet CX-4945.

W celu wyjaśnienia sposobu wiązania wybranych inhibitorów w centrum aktywnym CK2, opracowano warunki krystalizacji uzyskując szereg kryształów kompleksów CK2α-inhibitor. Badania te realizowane były na Uniwersytecie w Kolonii (Niemcy) w ramach programu stażowego Erasmus Plus. Badaniu rentgenograficznemu przeprowadzonemu w Europejskim Ośrodku Synchronu Atomowego w Grenoble (ESRF), poddano 14 kryształów uzyskując 4 struktury krystalograficzne o rozdzielczościach w granicach 2,1 - 2,4 Å. Otrzymane struktury posłużyły do badań *in silico* wykorzystujących dokowanie molekularne ligand – receptor w wyniku których ustalono, że pochodne 1,5-dihydro-2*H*-pirol-2-onu posiadające grupę arylową w pozycji *C*4 i grupę aminoarylową z ugrupowaniem o charakterze kwasowym w pozycji *C*3, mogą silnie wiązać się w centrum aktywnym CK2.

Opracowano wieloetapową metodę syntezy nowych tak zaprojektowanych pochodnych 1,5-dihydro-2*H*-pirol-2-onu oraz zbadano ich wpływ na aktywność kinazy CK2 α . Najskuteczniejszym inhibitorem okazał się kwas 3-{[4-(naft-2-yl)-5-okso-2,5-dihydro-1*H*-pirol-3-yl]amino}benzoesowy, który w stężeniu (10 μ M) obniżał aktywność CK2 α do 70%.

Słowa kluczowe: kinaza białkowa CK2, inhibitory ATP-kompetycyjne, aktywność przeciwnowotworowa, 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazol, 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazol, 4,5,6,7-tetrabromo-2-metylo-1*H*-benzimidazol.