

Badania interakcji analogów ftalimidu z makromolekułami

Aleksandra Kotynia^{1,*}, Edward Krzyżak¹, Dominika Szkatuła², Aleksandra Marciniak¹

¹Katedra i Zakład Podstaw Nauk Chemicznych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Borowska 211a, 50-556 Wrocław

²Katedra i Zakład Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Borowska 211, 50-556 Wrocław

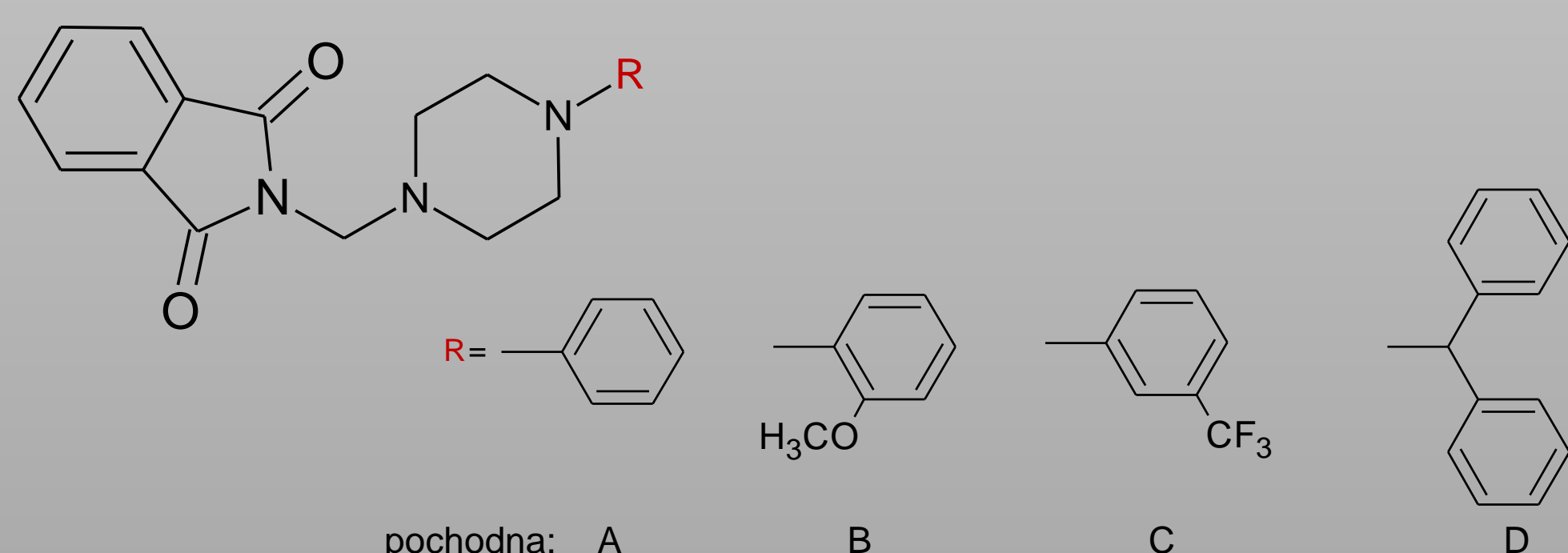


WPROWADZENIE

W badaniach farmakodynamiki i farmakokinetiki nowych środków terapeutycznych ważnym etapem jest analiza ich interakcji z makromolekułami takimi jak białka osocza [1]. Informacje o wiązaniu leków z białkami pozwalają na określenie stężeń postaci wolnej i związanej farmaceutyków [2]. Frakcja płynna krwi składa się między innymi z białek osocza, takich jak albumina, kwaśna glikoproteina α_1 , przeciwciała, fibrynogen czy globuliny [2, 3]. Powszechnie weryfikuje się oddziaływanie niskocząsteczkowych cząsteczek tylko z albuminą, a przecież na równowagę lek/osocze mają także wpływ inne jego komponenty. W związku z tym celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie oddziaływań nowych pochodnych ftalimidów z trzema białkami osocza.

MATERIAŁY I METODOLOGIA

Celem pracy było scharakteryzowanie interakcji czterech N-podstawionych 1H-izoindoło-1,3(2H)-dionów - analogów ftalimidu z makromolekułami. Wybrano cztery pochodne:



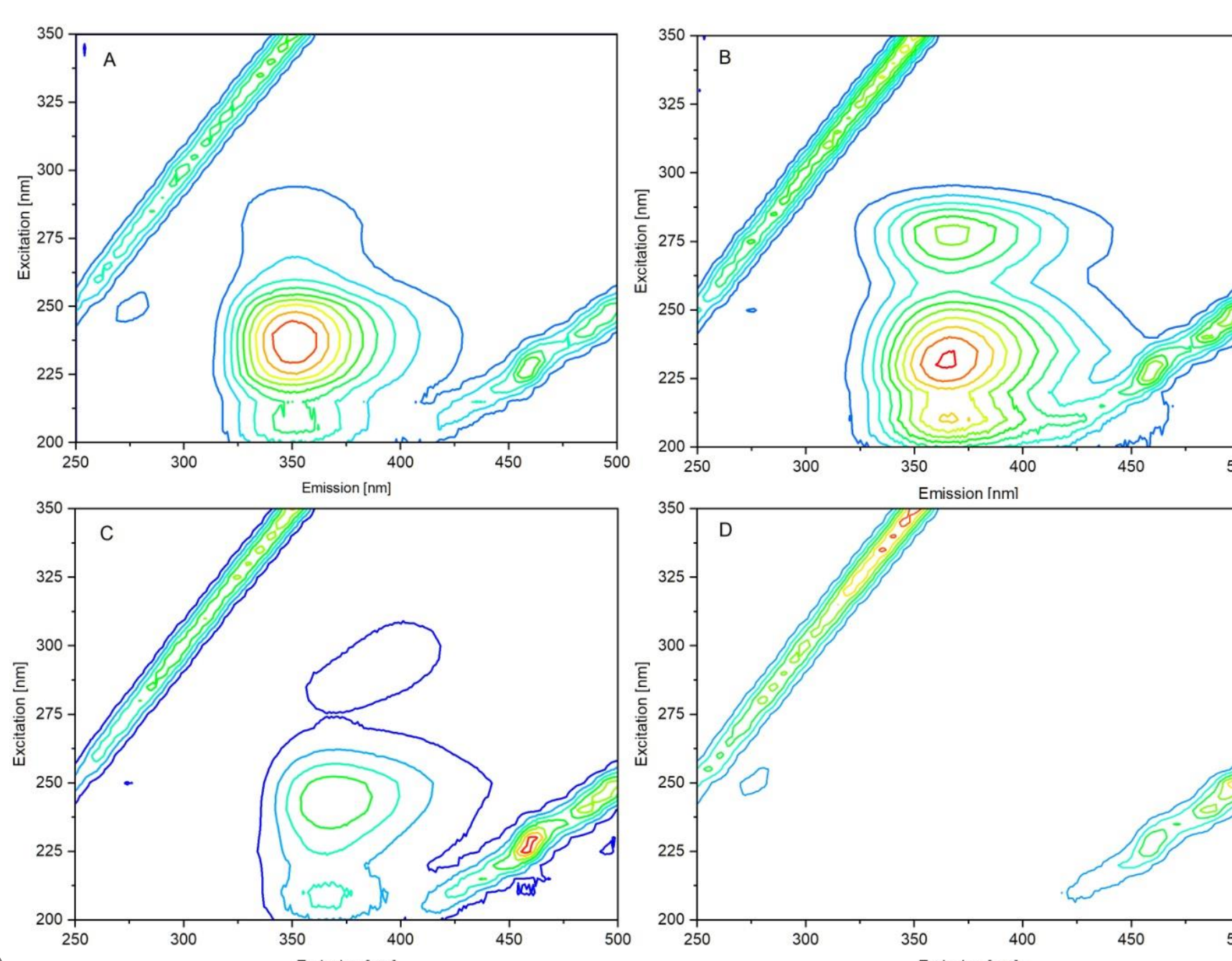
Wcześniejsze badania dowiodły, że związki te nie są toksyczne oraz wykazywały powinowactwo do cyklooksygenaz COX-1 i COX-2. Otrzymane wyniki były porównywalne z referencyjnym meloksikamem, a dla analogów B i D stosunek COX2/COX1 był większy. Ponadto związki te wykazywały aktywność wychwytywania zarówno ROS, jak i NO. Można zatem oczekiwać, że nowe pochodne ftalimidu będą się charakteryzować działaniem przeciwbólowym i przeciwzapalnym [4]. W związku z tym zasadne są dalsze badania w kontekście transportu i dystrybucji tych związków w krwiobiegu. Badania oparto na trzech najważniejszych białkach osocza albuminie (BSA), α_1 -kwaśnej glikoproteinie (AAG) oraz gamma globulinie (GG).

Wykorzystano metody analityczne takie jak spektroskopię fluorescencyjną, i dichroizm kołowy (CD), posłużyły one do określenia siły i sposobu wiązania analogów ftalimidu z białkami osocza. Dodatkowo modelowanie molekularne pozwoliło na precyzyjne wskazanie rodzaju i miejsca oddziaływań.

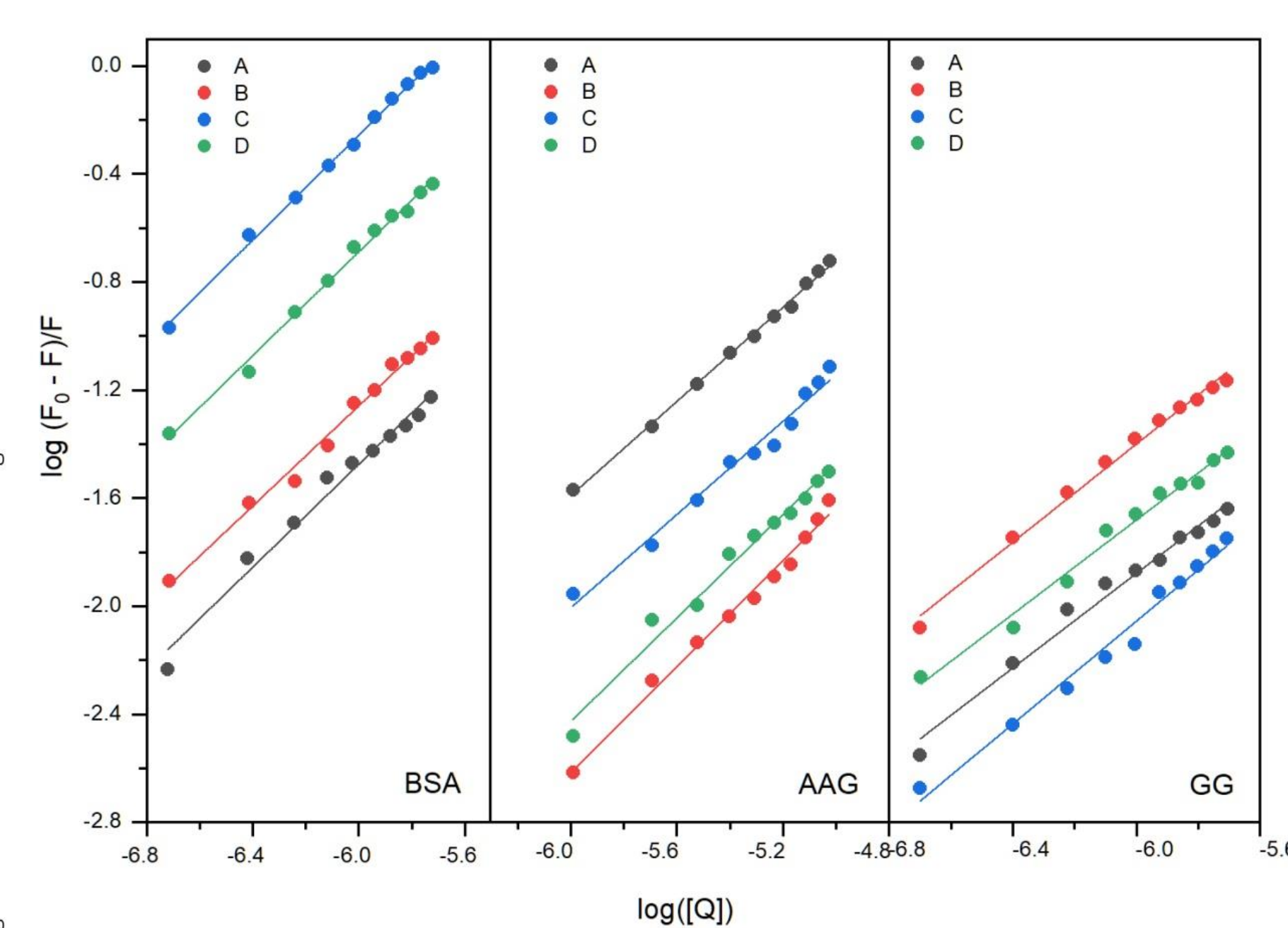
SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCYJNA

Parametry termodynamiczne i parametry wiązania ftalimidów A-D do białek osocza.

I	Quenching constants			Binding parameters		Thermodynamic parameters		
	$K_q \times 10^4$ [L·mol ⁻¹]	$k_q \times 10^{12}$ [L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]	logK _b	$K_b \times 10^4$ [L·mol ⁻¹]	n	ΔG° [kJmol ⁻¹]	ΔH° [kJmol ⁻¹]	ΔS° [Jmol ⁻¹ ·K ⁻¹]
BSA								
A	3.00	5.00	4.27 ± 0.22	1.89	0.96 ± 0.04	-24.66	-166.58	-477.89
B	5.24	8.73	4.30 ± 0.20	2.01	0.93 ± 0.03	-24.73	-114.32	-301.63
C	53.42	89.00	5.64 ± 0.12	43.61	0.98 ± 0.02	-32.06	-127.43	-321.09
D	19.40	32.30	5.07 ± 0.16	11.72	0.96 ± 0.03	-28.90	-63.19	-115.48
AAG								
A	1.93	3.22	3.63 ± 0.09	4.27	0.87 ± 0.02	-20.37	-119.64	-334.22
B	0.24	0.40	3.27 ± 0.19	1.86	0.98 ± 0.04	-18.68	-176.19	-530.35
C	0.76	1.27	3.17 ± 0.24	1.48	0.86 ± 0.05	-18.05	-179.82	-544.65
D	0.33	0.55	3.32 ± 0.25	2.09	0.96 ± 0.05	-19.01	-221.88	-683.07
GG								
A	1.66	2.77	3.04 ± 0.22	1.10	0.79 ± 0.04	-17.51	-215.08	-665.20
B	4.63	7.72	3.65 ± 0.15	4.47	0.81 ± 0.03	-20.67	-169.35	-500.59
C	1.38	2.30	3.22 ± 0.27	1.58	0.84 ± 0.05	-18.34	-131.90	-382.36
D	2.61	4.35	3.19 ± 0.20	1.55	0.78 ± 0.03	-18.24	-129.80	-375.63

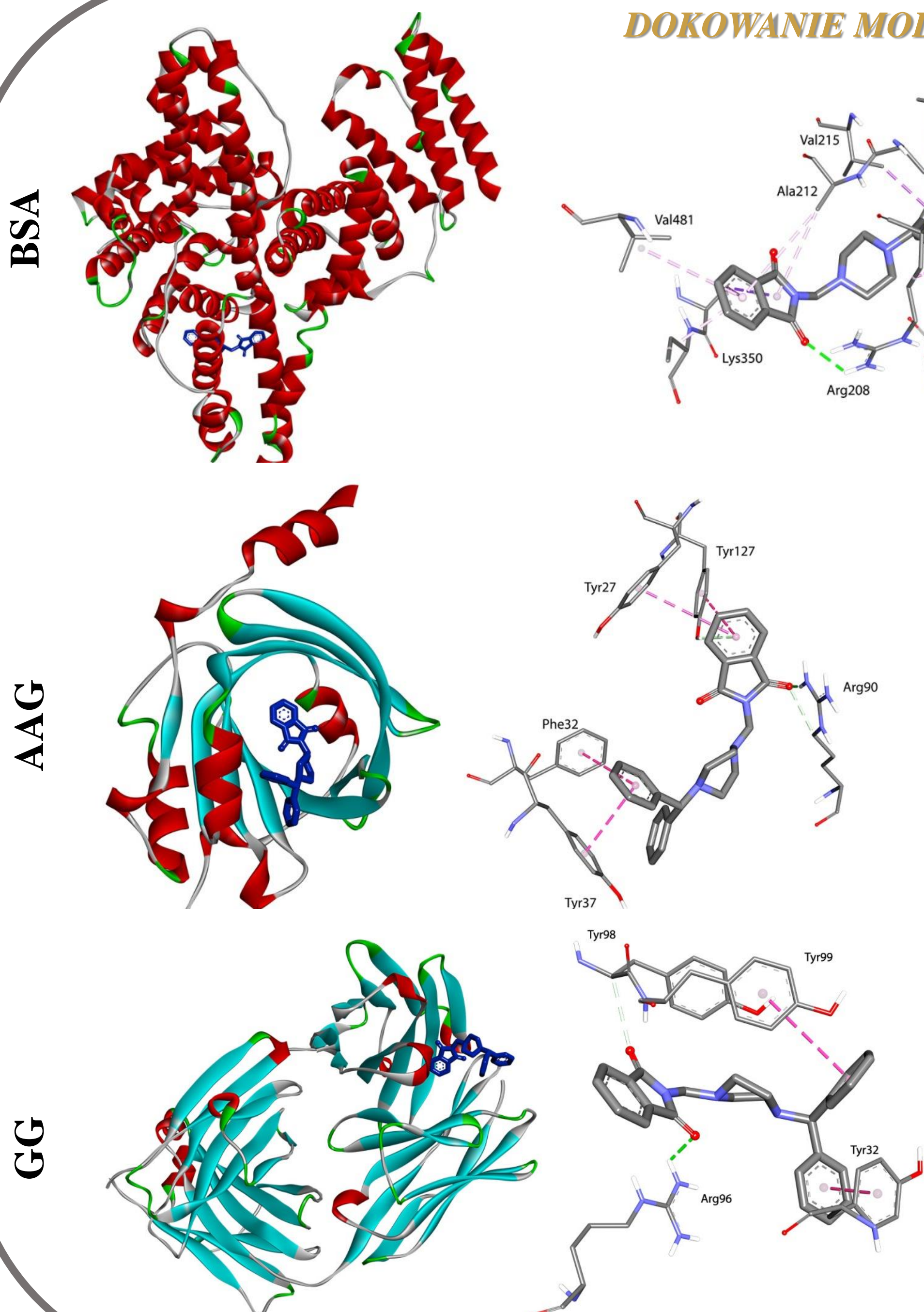


Konturowe wykresy 3D widm fluorescencji związków A-D.



Wykresy regresji liniowej jako zależności podwójnego logarytmu dla wygaszania BSA, AAG i GG spowodowanego przez wzrost stężenia A-D.

DOKOWANIE MOLEKULARNE



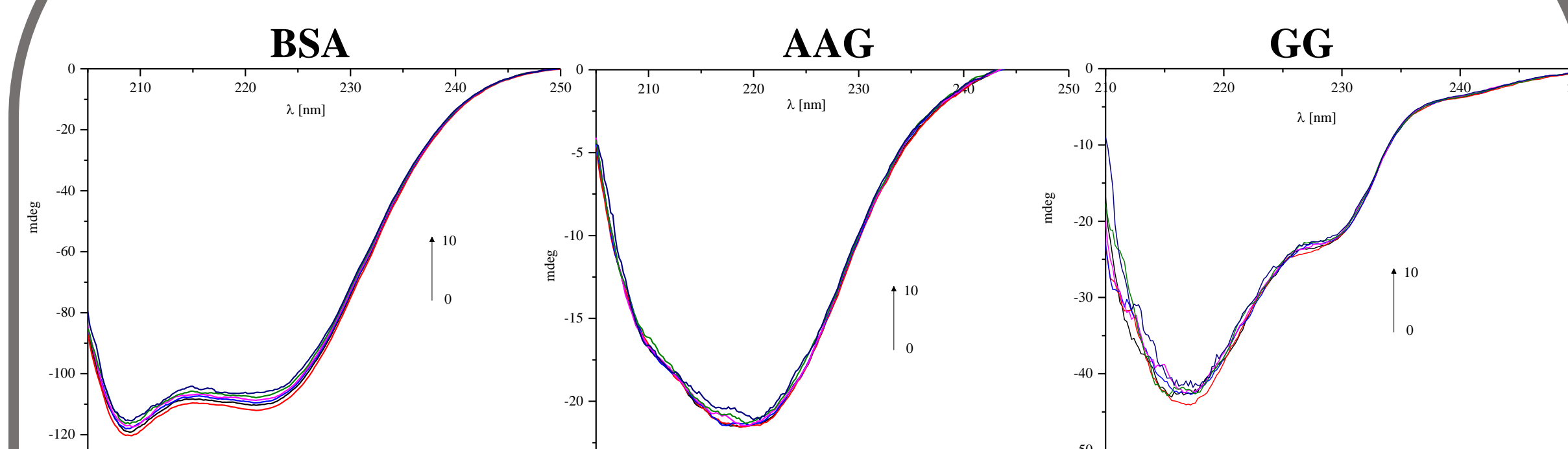
Analogi ftalimidu mogą tworzyć stabilne kompleksy z białkami osocza ponieważ teoretycznie wysymulowana swobodna energia wiązania (ΔG°) mieści się w przedziale: -27,42- -37,91 kJmol⁻¹. BSA posiada dwa dobrze zdefiniowane miejsca wiązania dla leków, jednak powinowactwo do miejsca wiązania II jest bardziej preferowane. Stwierdzono, że najsilniej wiąże się związek D do wszystkich badanych białek, ale różnice są niewielkie w porównaniu z pozostałymi analogami, które wiążą się z podobną siłą. Dodatkowo z przeprowadzonego dokowania wynika, że istotny w oddziaływaniu jest łańcuch boczny Arg, którego grupa guanidynowa uczestniczy w wiązaniu wodorowym z pochodnymi A-D. Zidentyfikowano również oddziaływania: π - σ , π -alkil, π -kation, π -anion oraz stabilizujące kompleks z ftalimidami kontakty hydrofobowe i siły Van der Waalsa.

Wartości wolnej energii wiązania (ΔG°) dla interakcji pochodnych ftalimidów A-D z białkami.

	Binding Free Energy ΔG° [kJmol ⁻¹]			
	BSA		AAG	GG
	site I	site II		
A	-32.22	-34.39	-31.64	-33.83
B	-31.89	-32.69	-33.23	-31.90
C	-27.42	-30.85	-33.18	-35.09
D	-34.19	-37.91	-37.62	-35.12

Pochodna D w kieszeni aktywnej białek oraz wizualizacja 3D miejsca wiązania.

SPEKTROSKOPIA CD



Widma CD białek po dodaniu pochodnej A.

Proces wiązania się małych cząsteczek do białek może być monitorowany przez zmiany w ich strukturze drugorzędowej. Destabilizacja struktury białek była niewielka po dodatku badanych pochodnych ftalimidów. Zarówno dla BSA jak i AAG obserwowano spadek procentowego udziału α -helisy na rzecz β -kartki. W przypadku GG szczegółowa analiza była niemożliwa ze względu trudny do wyeliminowania na szum widm.

Zmiana w procentowym udziale struktury drugorzędowej białek po związaniu ze związkami A-D.

	α -helix	β -sheet	β -turn	other
pochodna A				
BSA	-2.6%	+2.4%	+0.1%	+0.2%
AAG	-1.0%	+0.7%	+0.1%	+0.3%
pochodna B				
BSA	-1.7%	+1.1%	+0.1%	+0.5%
AAG	-1.5%	+0.7%	+0.1%	+0.7%
pochodna C				
BSA	-1.7%	+1.6%	0.0%	0.0%
AAG	-1.3%	+0.2%	+0.1%	+0.9%
pochodna D				
BSA	-1.4%	+1.4%	+0.1%	0.0%
AAG	-2.0%	+0.4%	+0.1%	+1.4%

DYSKUSJA I PODSUMOWANIE

Związki A, B i C wykazują właściwości fluorescencyjne. Stwierdzono, że $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ to 237/351, 232/367 i 243/370 nm odpowiednio dla analogów A, B i C. Natomiast związek D nie wykazuje właściwości fluorescencyjnych. Dlatego też zastosowano długość fali wzbudzenia białek 300 nm. Pasma emisyjne białka maleje wraz ze wzrostem stężenia pochodnych ftalimidu co świadczy o tworzeniu się kompleksów w stanie podstawowym. Mechanizm wygaszania jest statyczny. Tworzą się kompleksy o stechiometrii 1:1. Pochodne C i D tworzą bardziej stabilne kompleksy z BSA. Związki A-D mogą być wiązane przez BSA w dwóch możliwych miejscach I lub II, w zależności od tego, które jest dostępne. Jednakże dokowanie molekularne oraz pomiary wiązania kompetycyjnego fluorescencji z fenylobutazonem i ibuprofenem sugerują, że preferowane jest miejsce II. Natomiast interakcje badanych ftalimidów z AAG i GG są słabsze niż w przypadku albuminy, ponieważ stałe wiązania z białkami mają podobną wartość. Tworzenie się kompleksów ftalimidów z białkami nie destabilizuje ich struktury drugorzędowej.

Badania zostały sfinansowane przez Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, grant nr SUBK.D290.24.035 (A.M.).

LITERATURA

- [1] Filip, Z. et al. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2013, 9, 943-954
- [2] Hemalatha, K. et al. *J. Lumin.* 2016, 178, 163-171
- [3] Mayer, J. et al. (Eds.) *Protein, Total*; W.B. Saunders: Saint Louis, MO, USA, 2013; 642-643
- [4] Szkatuła D. et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22 (14), 7678.