

KRAS do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej odpowiada domena C określana jako region hiperzmienny HVR (*hypervariable region*). Domena obejmuje reszty aminokwasowe od 167 do 188 dla Kras-4A i 189 dla Kras-4B oraz charakteryzuje się wysokim stopniem zmienności. Cztery ostatnie reszty aminokwasowe domeny C stanowią tzw. motyw CAAX (cysteina, 2 aminokwasy alifatyczne, inna reszta). Modyfikacje potranslacyjne reszt C-terminalnych takie jak prenylacja, rozszczepienie reszt AAX, estryfikacja i palmitoilacja warunkują lokalizację w błonie [18]. Modyfikacje sprawiają, że globularne białko o charakterze hydrofilowym ulega przemianom w białko błonowe zakończone hydrofobowym C-końcowym estrem metylowym cysteiny farnezyli, który łącznie z regionem polilizynowym w przypadku KRAS 4A odpowiada za zakotwiczenie białka w fosfolipidowej błonie plazmatycznej [19]. W zależności od poziomu ekspresji, białka KRAS związane z GTP za pośrednictwem C-końcowego regionu HVR ulegają dimeryzacji lub tworzą klastry wyższych rzędów (z 5-8 monomerów) na wewnętrznej błonie komórkowej w celu sygnalizacji komórkowej [20]. Związane z błoną białko może również zostać wyparte przez fosfodiesterazę (PDE) δ [21].

Charakterystyka powierzchni wiążących KRAS

Pierwsza dogłębna analiza wszystkich dostępnych miejsc wiążących białka KRAS została przeprowadzona przez Zhao i współpracowników [22]. Zgodnie z ich badaniami wyróżnia się trzy klasy kieszeni wiążących ligandy na powierzchni KRAS. Wykazują one specyficzną elastyczność umożliwiając przyłączenie różnorodnych potencjalnych ligandów.

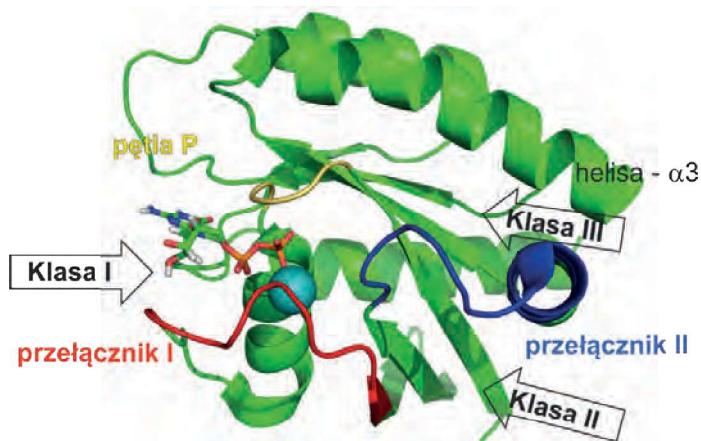
Klasa I (miejsce wiązania nukleotydów) stanowi konserwatywną kieszeń zachowaną do wiązania ligandów stanowiących GTP, GDP i ich analogów z wysokim powinowactwem. Strukturą rdzenia liganda musi być nukleotyd. Związany ligand GTP lokuje się tak, że jego skrajna grupa γ -fosforanowa znajduje się w sąsiedztwie pętli P i Przełącznika-II. Kieszeń klasy I tworzą reszty aminokwasowe strukturalnie zlokalizowane w regionie Pętli P, przełącznika I, przełącznika II i płata allosterycznego. Do reszt warunkujących silne wiązanie ligandów z KRAS zalicza się Gly13, Gly15, Lys16, Ser17, Ala18, Lys117, Phe28, Asp119, Ala146 i Lys147, natomiast resztami mniej zaangażowanymi są Cys12, Val14, Val29, Asp30, Glu31, Tyr32, Asp33, Thr35, Gly60, Gln61, Asn116, Lys117 i Ser145.

Klasa II (kieszeń przełącznika -I/II) ma postać płytkiej kieszeni nieznacznej wielkości na powierzchni KRAS, która pośredniczy w interakcji białko-białko. Po związaniu ligandów regiony przełącznikowe I i II ulegają wyraźnym modyfikacjom celem dostosowania się do struktury ligandów, wskazując na potencjalny efekt allosteryczny miejsca. Jednakże gdy GDP, warunkujące nieaktywną formę białka Kras zajmuje kieszeń wiązania nukleotydów klasy I, Kieszeń klasy II nie wykazuje wyraźnych zmian konformacji. Rdzeń stanowią położone w regionach β 1-3 i przełącznik-II reszty Lys5, Val7, Ser39, Asp54, Leu56, Gly70, Tyr71, Thr74 i Gly75, natomiast sąsiednie reszty Leu6, Glu37, Asp38, Tyr40, Arg41, Ile55 i Met67 warunkują swoiste oddziaływania umożliwiające dopasowanie do różnych ligandów. Płytką powierzchnią cechująca kieszeń wymusza silną interakcję jednej strony liganda ze strukturami β 1-3, Przełącznik-I i Przełącznik-II, przyczyniając się do tego, że jego druga strona może oddziaływać z innymi białkami.

Klasa III (kieszeń przełącznika-II/ α 3) składa się z 18 reszt aminokwasowych. 3 reszty: Val9, Ala11 i Cys12 mieszczą się w pętli P, 1 reszta: Pro34, znajduje się w regionie Przełącznika-I, natomiast 14 reszt: Thr58, Ala59, Gln61, Glu62, Tyr64, Arg68, Asp69, Met72,

Asp92, His95, Tyr96, Gln99, Ile100 i Val103 położonych jest w obrębie pętli Przełącznika-II i helisy α 3. Miejsce wiązania Przełącznika-II/ α 3 cechuje się znaczną elastycznością wiązania różnych ligandów, wykazując różne efekty allosteryczne wobec ligandów. Do klasy III należy zatwierdzony do użytku lek Sotorasib (*AMG510*) celujący w mutację G12C. Sotorasib wiąże kowalencyjnie mutację Cys12 w kieszeni allosterycznej powodując zablokowanie białka w nieaktywnym stanie.

Obszar przełącznika-II/ α 3 wykazuje największe rozmiary oraz zapewnia wysoką elastyczność pozwalającą na opracowanie cząsteczek allosterycznych o znaczeniu klinicznym dla mutacji KRAS [22].



Rys. 2. Struktura białka KRAS [PDB ID: 40BE], z zaznaczonymi pętlami P (żółta), przełącznik I (czerwona), przełącznik II (niebieska), związna cząsteczka GDP oraz jon Mg^{2+} (jasno niebieska sfera) oraz miejscami wiązania ligandów klas I-III

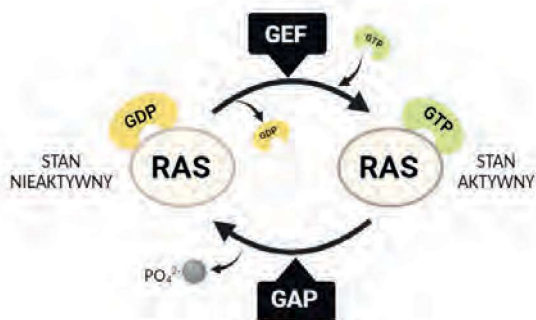
Mechanizm aktywacji i inaktywacji białka KRAS

Białko błonowe KRAS funkcjonuje jako wewnątrzkomórkowy węzeł sygnalizacyjny, który pozwala na transdukcję sygnału pochodzącego z powierzchni komórki do jądra komórkowego poprzez inicjację kaskad sygnalizacyjnych, z których kluczowe to: szlak RAF-MEK-ERK (MAPK), szlak PI3K-AKT-mTOR, szlak TIAM1-RAC i RaGDS-Ral. Kaskady te regulują krytyczne procesy komórkowe takie jak proliferacja, różnicowanie, wzrost, apoptoza, migracja, cykl komórkowy i przeżycie komórek [23], [24]. Transdukcja sygnału za pośrednictwem KRAS jest możliwa wyłącznie wtedy, gdy białko znajduje się w stanie aktywnym. Jest to związane z funkcjonowaniem GTPazyKRas jako „molekularnego przełącznika”, który przełącza się pomiędzy dwoma stanami: formą aktywną, w której związany jest trifosforanem guanozyny (GTP) i formą nieaktywną związaną z difosforanem guanozyny (GDP). Domena katalityczna białek RAS ma względnie stabilną konformację, poza dwoma regionami przełącznikowymi (przełącznik I i przełącznik II), których zmiany konformacyjne determinują interakcje z innymi białkami [25].

Forma aktywna związana z GTP charakteryzuje się ograniczoną konformacją regionów przełącznika I i przełącznika II za sprawą tzw. mechanizmu obciążonej sprężyny, wynikającego z obecności wiązań wodorowych pomiędzy atomami tlenu grupy γ -fosforanowej GTP a grupami NH Thr35 i Gly60 KRAS. Hydroliza GTP, a zarazem dezaktywacja białka do formy GDP powoduje rozerwanie wiązań przywracając elastyczność obszarom przełącznikowym [26].

KRAS wykazuje wewnętrzną aktywność GTP-azy, jednakże jest ona niska dlatego podlega regulacji i przyspieszeniu przez system

GEF/GAP (odpowiednio czynniki wymiany nukleotydów guaninowych i białka aktywujące GTPazę), który reguluje cyklizację pomiędzy nieaktywnym kompleksem KRAS-GDP i aktywnym KRAS-GTP. Czynniki wymiany nukleotydów (GEF) np. SOS1 wiążą KRAS w stanie nieaktywnym związanym z GDP katalizując jego wymianę na rzecz GTP prowadząc tym samym do aktywacji KRAS, natomiast białka aktywujące GTP-azę (GAP) np. neurofibomina1 NF1 powodują hydrolizę GTP i powrót białka do stanu nieaktywnego [27]. Utrata właściwości regulacyjnych wskutek mutacji genu prowadzi do utraty regulacji procesu prowadząc do nadmiernych podziałów [28].



Rys. 3. Schemat regulacji aktywacji i dezaktywacji białka KRAS za pomocą GEF i GAP. Opracowanie własne na podstawie [29]

Mutacje aktywujące

KRAS należy do najczęściej mutujących członków RAS i uchodzi na główny czynnik onkogenny w przypadku inicjacji nowotworu. Na Rys. 4 przedstawiono powiązanie najczęściej występujących mutacji białka KRAS z inicjowanymi przez nie nowotworami. Mutacje somatyczne w obrębie GTPazy KRAS należą do kluczowych mutacji aktywujących kancerogenezę stwierdzanych w ludzkich nowotworach i wiążą się powszechnie ze słabą odpowiedzią na standardowe terapię [6]. Mutacje te są określane jako „mutacje aktywujące” ze względu na fakt, że prowadzą zwykle do obniżenia szybkości samostnej hydrolizy GTP zapobiegają one funkcjonalnej interakcji między KRAS a białkami GAP promującymi hydrolizę GTP, podczas gdy nie zakłócają wiązania GEF i efektorów [6], [7]. Strukturalna podstawa aktywacji w przypadku pozycji Gly12 polega na tym, że zastąpienie glicyny jakąkolwiek inną resztą z wyjątkiem proliny zakłóca wiązanie GAP z KRAS poprzez zderzenia steryczne z kluczową resztą

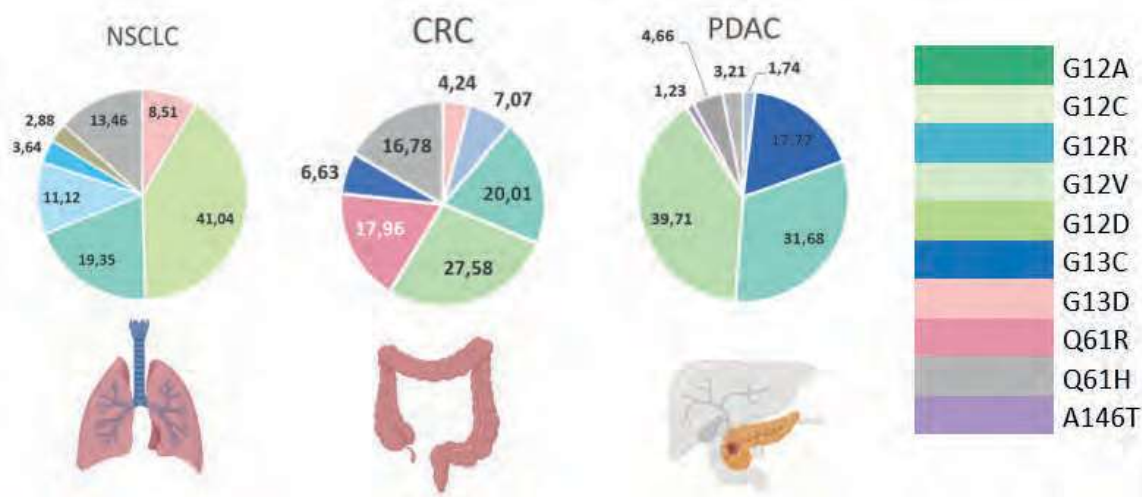
argininową GAP. W związku z tym mutacje prowadzą do akumulacji kompleksu KRAS-GTP, tym samym nadmiernie aktywując szlaki transdukcji sygnału. Kliniczne podejścia do przywrócenia normalnego funkcjonowania KRAS mają na celu przezwycięzenie akumulacji aktywnego kompleksu KRAS:GTP za pomocą różnych środków [7].

Dominują mutacje *missense* pojedynczej zasady, spośród których najpowszechniej występują mutacje kodonu 12 (Gly12), kodonu 13 (Gly13) lub kodonu 61 (Gln61). Mutacje w genie KRAS są najczęstsze w przypadku nowotworów trzustki (PDAC), jelita grubego (CRC) i płaskonabłonkowego raka płuc (NSCLC). Efekty biologiczne poszczególnych mutacji np. typ nowotworu mogą być swoiste dla tkanki lub typu komórki. NSCLC charakteryzuje się dominującą mutacją KRAS^{G12C} (glicyna → cysteina). W przypadku PDAC najczęściej dochodzi do mutacji glicyny na kwas asparaginowy (KRASG12D). Mutacje Gly12 Gln61 nie podlegają hydrolizie z udziałem GAP - neurofibrominy 1 (NF1), podczas gdy KRAS Gly13 jest częściowo podatny na jej działanie [30]. Osoby palące są bardziej narażone na zmiany mutacyjne, dlatego też palenie tytoniu zostało uznane za czynnik onkogenny. Częstość zmiany mutacyjnej może sięgnąć u nich 35% [29]. U osób niepalących mutacje KRAS również mają miejsce choć profil mutacji różni się od profilu mutacji palaczy. U osób niepalących częściej odnotowuje się mutacje KRASG12D, natomiast palaczy częściej dotyczy KRASG12C [31].

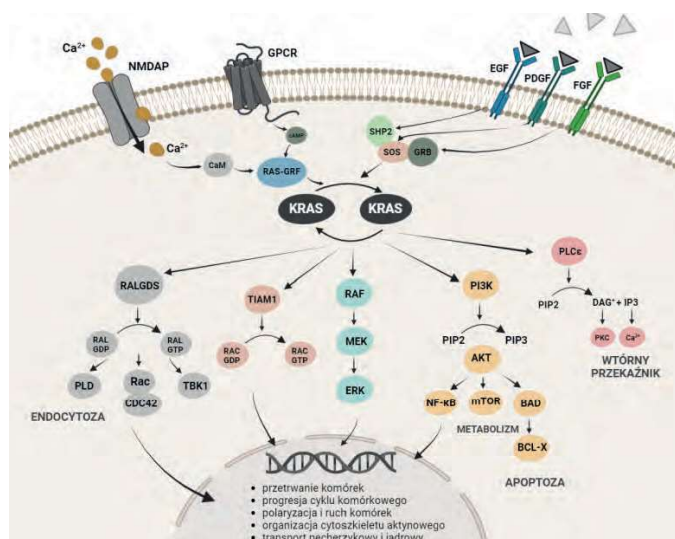
Mutacje KRAS obejmują więcej substytucji, a dane przedstawione w bazie danych CeBioportal, pozwalają zidentyfikować blisko pięćdziesiąt dodatkowych mutacji białka KRAS.

Szlaki sygnalizacyjne regulowane przez KRAS

KRAS jako ściśle regulowany przełącznik molekularny umożliwia sterowanie licznymi ścieżkami sygnałowymi przez cykliczną wymianę GTP/GDP (patrz Rys. 5). W przypadku braku mutacji, w obecności czynników wzrostu takich jak EGF, PDGF i FGF oraz chemokin i jonów Ca²⁺ wiązanie cząsteczki GTP przez KRAS powoduje strukturalne zmiany pomiędzy przełącznikiem I i przełącznikiem II i przybranie konformacji umożliwiającej interakcję z efektorami szlaków sygnalizacyjnych. W ten sposób KRAS reguluje wiele kaskad sygnalizacyjnych, w tym najważniejszy szlak RAF-MEK-ERK (kaskada kinazy białkowej aktywowanej mitogenami), który kontroluje proliferację komórkową, szlak PI3K-AKT-mTOR wpływający na przeżywalność komórek, szlak TIAM1/RAC/PAK, RalGDS/Ral oraz szlak fosfatydy-



Rys. 4. Częstość występowania najbardziej rozpowszechnionych mutacji KRAS. Opracowanie na podstawie [29]



Rys. 5. Szlaki sygnalizacyjne kontrolowane przez białko KRAS [29]

inozytolu PLC ϵ [27]. Regulacja powyższych ścieżek przez natywne białko KRAS nie wywołuje negatywnych skutków w krajobrazie komórkowym zapewniając prawidłowe procesy wewnątrzkomórkowe.

Zmutowane białka Ras są zdolne do utrzymywania się w formie aktywnej. Zmiany punktowe np. w pozycji 12, 13 i 61 mogą prowadzić do przyspieszenia cyklu wymiany GDP/GTP, osłabiając wewnętrzną aktywność hydrolityczną, pozostawiając białko w stale aktywnej formie bądź zaburzać jego wrażliwość względem GAP i GEP. Zmutowany KRAS może przekazywać sygnały i aktywować kaskady sygnałowe bez stymulacji przez zewnątrzkomórkowe czynniki wzrostu [27]. W konsekwencji, intensyfikacja kaskad sygnalizacyjnych prowadzi do nadmiernych nieplanowanych podziałów komórkowych, wpływając tym samym na nadmierne podziały komórkowe, autofagię, przeprogramowanie metaboliczne, unikanie apoptozy i niestabilność genomową [23].

Szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK) stanowi kanoniczny szlak sygnalizacyjny KRAS. KRAS-GTP aktywuje RAF poprzez dimeryzację, następnie RAF oddziałuje i fosforyluje MEK1/2, który z kolei fosforyluje i aktywuje ERK1/2. Aktywność szlaku ERK jest regulowana przez ujemne sprzężenie zwrotne, np. poprzez ERK może fosforylować SOS i hamować jego aktywność i negatywnie wpływać na aktywność RAS. Finalnie ERK transportowany do jądra fosforyluje i aktywuje czynniki transkrypcyjne, takie jak czynnik odpowiedzi na surowicę (SRF), CREB, ELK-1, ETS, NF- κ B, c-Myc oraz rybosomalną kinazę S6, istotnych dla zapoczątkowania procesów kontrolujących proliferację, różnicowanie, migrację, przeżycie i śmierć komórek [32].

KRAS reguluje również szlak TIAM1 wpływający na kształt komórki, migrację, adhezję, tworzenie cytoszkieletu aktynowego, endocytozę i przemieszczanie się komórek pamięci [29]. Ponadto może również regulować szlak fosfatydyloinozytolu poprzez aktywację PLC ϵ . PLC ϵ jest źródłem dwóch przekaźników, diacyloglicerolu (DAG) i trifosforanu inozytolu (IP3), prowadzących do zwiększenia wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, który kontroluje endocytozę, egzocytozę i reorganizację cytoszkieletu [26]. Szlak PI3K-AKT-mTOR jest kluczowy dla procesów podziału, różnicowania, programowana śmierć komórek, a także zdolności do transportu glukozy.

KRAS poprzez interakcję z PI3K inicjuje przekształcenie 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) w 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP3). PIP3 aktywuje kinazę zależną od PDK1 (fosfoinozytolu 1) prowadząc do fosforylacji treoniny 308 białka AKT.

Kontynuacja procesu następuje pod wpływem kompleksu Mtorc2 poprzez fosforylację seryny472 prowadząc do finalnej aktywacji AKT, która transferowana do jądra komórkowego reguluje procesy rozmnażania komórek, apoptozy oraz do procesów metabolicznych [33]. AKT może aktywować białka docelowe mTOR mające znaczenie dla regulacji procesów proliferacji, przeżycia, syntezy białek, procesów metabolicznych, jednakże wykazuje zdolność fosforylacji i aktywacji białek śmierci komórkowej np. Bcl-XL/Bcl-2 (BAD) zamiast hamować procesy apoptyczne.

Strategie terapeutyczne

Od lat 80. ubiegłego wieku, wraz z odkryciem przez naukowców z firmy Merck pierwszego inhibitora proteazy wirusa HIV, projektowanie leków oparte na strukturze, ich iteracyjna synteza oraz testowanie otrzymanych analogów stanowią fundamenty procesu odkrywania leków. Mutacje w genie KRAS odgrywają kluczową rolę w różnych postaciach raka. Celowanie w te mutacje jest uważane za wielkie wyzwanie i cel terapii przeciwnowotworowej. Zwalczenie mutacji KRAS nie było wcześniej skuteczne z powodu silnego powinowactwa rzędu pikomolarnego KRAS do dużej ilości cytoplazmatycznego GTP, utrudniając inhibicję kompetycyjną oraz w odróżnieniu od innych celów molekularnych białko KRAS ma stosunkowo gładką powierzchnię bez ekspresji kieszeni wiążącej lek [5].

Na przełomie 2012 i 2013 r. ukazały się cztery przełomowe prace opisujące potencjalne małe cząsteczki wykazujące zdolność wiązania białka KRAS [22]. Strategie oparte na bezpośrednim celowaniu w mutację KRASG12C doprowadziły w 2013 r. do identyfikacji przez zespół K. Shokata nowej kieszeni allosterycznej - „S-IIP” kluczowej do opracowania kowalencyjnych, nieodwracalnych i selektywnych inhibitorów dla mutantu G12C [8]. Dzięki temu w 2021 i 2022 r. pierwsze dwa inhibitory zostały zatwierdzone przez FDA i EMA, a ich struktura stanowi źródło optymalizacji i projektowania lepszych struktur.

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, rozwój potencjalnych terapii farmakologicznych obejmuje 4 zasadnicze podejścia: (i) inhibicja kowalencyjna i wzrost stężenia KRAS w kompleksie z GDP (stan nieaktywny), (ii) celowanie w interakcję RAS:SOS, aby zapobiec wymianie GDP na GTP, (iii) zakłócenie przyłączania efektora w celu tłumienia sygnalizacji i (iv) nasilenie wiązania GAP ze zmutowanym białkiem RAS celem redukcji poziomu RAS-GTP (dotyczy przypadków, dla których wiązanie GAP jest możliwe we właściwej konformacji) [7].

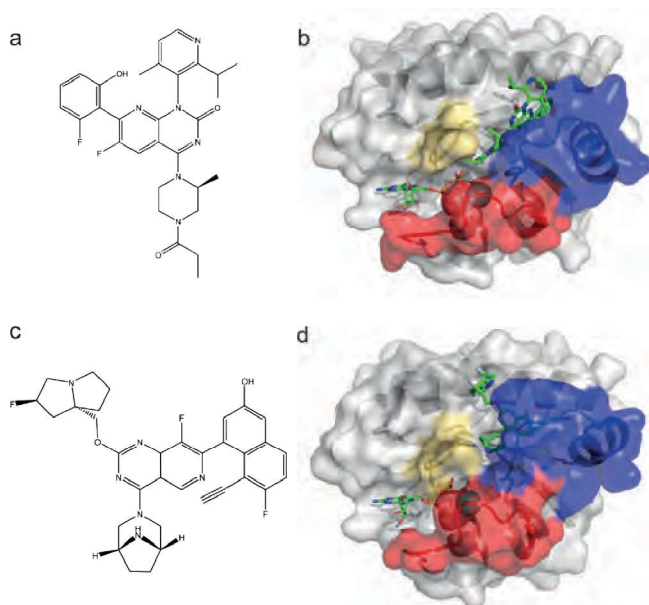
Inhibitory małowęgłczystkowe

Celowanie w KRASG12C opiera się na nukleofilowości tioli cysteinowych. Dlatego też zaletą tej strategii jest fakt, że pozwala na selektywne wiązanie mutantu G12C nie wpływając na natywne białko KRAS. Zmutowana Cysteina 12 zlokalizowana jest w Pętli P, w sąsiedztwie kieszeni nukleotydu oraz regionów przełącznika I i II kluczowych dla interakcji z białkami efektorowymi szlaków sygnalizacyjnych [8].

Sotorasib [AMG510; Lumakras™] jako pierwszy opracowany inhibitor uzyskał zgodę na rozpoczęcie badań klinicznych, a następnie 28 maja 2021 r. został zatwierdzone przez FDA i 10 stycznia 2022 przez EMA do leczenia dorosłych pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym niedrobnokomórkowym rakiem płuca z mutacją KRASG12C (NSCLC) [9]. Nieodwracalne kowalencyjne wiązanie pomiędzy głowicą akryloamidową inhibitora a grupą tiolową reszty cysteiny 12 stanowi kluczową terapeutycznie właściwość AMG510 [34]. AMG510 wiąże trzecią klasę kieszeni KRAS określaną mianem

kieszeni Stwitch II/ α 3 oraz wykazuje interakcje z resztami pętli P oraz przełącznika I i II [22]. Inhibitor wykorzystuje „ukrytą kieszeń” w rejonie SII-P utworzoną przez reszty H95/Y96/Q99. Pomiedzy Y96 a chinazoliną występują oddziaływania π - π , natomiast Q99 i H95 oddziałują poprzez mostki wodne [35], [36].

Wpływ jaki AMG510 wywiera na strukturę i zmiany konformacji KRASG12C opiera się na stabilizacji nieaktywnej formy KRAS związanej z GDP. Kowalencyjne wiązanie AMG510 obniża energię swobodną wiązania KRASG12C – GDP, zwiększając tym samym powinowactwo pomiędzy KRASG12C a GDP. W konsekwencji zmniejsza się elastyczność obszarów przełącznikowych (przełącznika I i II) kluczowych dla wiązania i hydrolizy GTP oraz aktywacji białka. Domena katalityczna rodziny RAS ma względnie stałą konformację z wyjątkiem dwóch obszarów przełącznikowych (SI i SII), których konformacje wpływają na interakcje z innymi białkami. Obszary te charakteryzują się dynamicznymi skorelowanymi ruchami, zapewniając obszary oddziaływań z innymi białkami. Po związaniu AMG510 fluktuacje obszarów przełącznikowych zmniejszają się. AMG510 stabilizuje wiązanie między Cys12 a resztami obszaru przełącznika I (Tyr32, Asp30, Thr35, Asp38), co powoduje usztywnienie kieszeni wiążącej nukleotydy. Wiązanie AMG510 nie utrzymuje KRAS w pojedynczej konformacji o uporządkowanych, całkowicie zamkniętych regionach przełącznika I i II czego można by oczekiwać na podstawie jego struktury krystalicznej [PDB ID: 6OIM], lecz jest to zestaw konformacji [36]. Fluktuacje reszt aminokwasowych są ograniczone, uniemożliwiając przejście do w pełni otwartej formy kieszeni wiążącej nukleotydy, która zapewnia interfejs dla interakcji z czynnikiem wymiany nukleotydów SOS1. Uniemożliwienie oddziaływania z SOS1 zamyka białko w stanie nieaktywnym związanym z GDP [16].



Rys. 7. a) Struktura chemiczna inhibitora AMG510 – Sotorasib; b) kompleks AMG510 z KRAS G12C [PDB ID 8G47]; c) wzór chemiczny inhibitora MRTX1133; d) kompleks MRTX1133 z KRAS G12D [PDB ID: 7RPZ]

Mutacja onkogenna KRAS^{G12D} jest istotnym celem w terapii przeciwnowotworowej ze względu na jej częste występowanie i rolę w nowotworach litych. W przeciwieństwie do mutacji KRASG12C, gdzie efekt inhibicji wynika z obecności nukleofilowej cysteiny tworzącej silne wiązanie kowalencyjne z elektrofilową częścią inhibitora, hamowanie mutantu asparaginianowego jest trudniejsze ze względu na brak reaktywnej reszty w obszarze kieszeni przełącznika II takiej jak C12, co uniemożliwia stabilne nieodwracalne wiązanie kowalencyjne

zmutowanej Asp12 [37]. Odwracalny drobnocząsteczkowy inhibitor niekowalencyjny MRTX1133 opracowany przez firmę Mirati Therapeutics jako pierwszy kompensuje tę trudność i selektywnie wiąże się z KRASG12D wykazując silne powinowactwo wiązania ($-73,16 \pm 5,15$ kcal/mol). Energia ta rozłożona na poszczególne reszty, ujawnia, że reszty Asp69, His95, Met72, Tyr64, Gly60, Asp12 i Val9 mają największy udział w energii wiązania MRTX1133 [38]. Szacowana wartość stałej dysocjacji KD wynosząca 0,2 pM wskazuje na bardzo silne i specyficzne wiązanie między MRTX1133 a białkiem KRAS^{G12D} [39].

Mechanizm działania MRTX1133 opiera się na stabilizacji obszaru wiążącego białko wskutek podwyższenia hydrofobowości, czego efektem są ruchy przełączników I i II, zaburzające oddziaływania z białkami efektorowymi i regulatorowymi, warunkującymi aktywację ścieżek sygnalizacyjnych [38]. MRTX1133 wykazywał silną aktywność komórkową, hamując fosforylację ERK w linii komórkowej AGS z IC50 wynoszącym 2nM. W badaniach in vivo na mysim modelu guza ksenograficznego w linii komórkowej Panc 0403 (mutacja KRASG12D), MRTX1133 wykazał dawkowo zależną aktywność przeciwnowotworową. Przy dawce 30 mg/kg podanej dootrzewnowo, MRTX1133 skutecznie hamował wzrost guza, a przy wyższych dawkach powodował jego regresję [39]. W marcu 2023 r. rozpoczęto fazę I/II badań klinicznych produktu leczniczego zawierającego MRTX1133 jako API (NCT05737706) u dorosłych pacjentów z zaawansowanymi nowotworami litymi m.in. NSCLC, PDAC, rak jelita grubego i odbyticy.

Podsumowanie

Białko KRAS jest jednym z najczęściej mutujących białek przekaźnikowych. Jego liczne mutacje powiązane są z wieloma typami nowotworów, które jeszcze do niedawna uznawane były za nowotwory nie poddające się terapii farmakologicznej. Niemniej jednak, dzięki blisko czterem dekadom badań udało się wprowadzić do farmakoterapii dwa związki wspomagające terapię niedrobnokomórkowego raka płuc zależnego od mutacji KRASG12C czy też nowotworu jelita grubego oraz okrężnicy. Warto również dodać, że obecnie na różnych etapach badań czy to przedklinicznych czy też klinicznych w fazie I lub II jest ponad 12 związków z dużym potencjałem terapeutycznym [1].

Mgr inż. Dagmara ŁOPATKO jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Pracę dyplomową z zakresu wykorzystania metod obliczeniowych w projektowaniu oligoamidowych sond molekularnych zdolnych rozpoznawać powierzchnię białka KRAS, wykonała pod opieką dra inż. Michała Jewgińskiego.

Dr inż. Michał JEWGIŃSKI jest absolwentem Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Pracę doktorską skupiającą się na badaniach strukturalnych i biologicznych dehydropeptydowych mimetyków obronił pod opieką profesora dr hab. Inż. Pawła Kafarskiego na Uniwersytecie Opolskim w roku 2009. Obecnie jest adiunktem na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Jest autorem i współautorem 30 publikacji. Jego obecne zainteresowania naukowe skupiają się wokół projektowania, syntezy i badania oddziaływania zarówno niskocząsteczkowych inhibitorów jak i sond foldamerowych, zdolnych oddziaływać z powierzchniami białek z grupy betalaktamaz oraz z rodziny Ras.

LITERATURA

- [1] C. V Dang, E. P. Reddy, K. M. Shokat, and L. Soucek, "Drugging the 'undruggable' cancer targets," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 8, pp. 502–508, 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.36.
- [2] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

- [3] A. D. Cox and C. J. Der, "Ras history," *Small GTPases*, vol. 1, no. 1, pp. 2–27, Jul. 2010, doi: 10.4161/sgtp.1.1.12178.
- [4] J. Timar and K. Kashofer, "Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 1029–1038, 2020, doi: 10.1007/s10555-020-09915-5.
- [5] K. Parikh *et al.*, "Drugging KRAS: current perspectives and state-of-art review," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 15, no. 1, p. 152, 2022, doi: 10.1186/s13045-022-01375-4.
- [6] J. C. Hunter, A. Manandhar, M. A. Carrasco, D. Gurbani, S. Gondi, and K. D. Westover, "Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations," *Mol. Cancer Res.*, vol. 13, no. 9, pp. 1325–1335, Sep. 2015, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0203.
- [7] K. Nyíri, G. Koppány, and B. G. Vértessy, "Structure-based inhibitor design of mutant RAS proteins—a paradigm shift," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 1091–1105, 2020, doi: 10.1007/s10555-020-09914-6.
- [8] J. M. Ostrem, U. Peters, M. L. Sos, J. A. Wells, and K. M. Shokat, "K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions," *Nature*, vol. 503, no. 7477, pp. 548–551, 2013, doi: 10.1038/nature12796.
- [9] K. S. De, "Sotorasib: First Approved KRAS Mutation Inhibitor for the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 30, no. 9, pp. 1000–1002, 2023, doi: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867329666220907161505>.
- [10] G. A. Hobbs, C. J. Der, and K. L. Rossman, "RAS isoforms and mutations in cancer at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 129, no. 7, pp. 1287–1292, Apr. 2016, doi: 10.1242/jcs.182873.
- [11] A. E. Karnoub and R. A. Weinberg, "Ras oncogenes: split personalities," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 7, pp. 517–531, 2008, doi: 10.1038/nrm2438.
- [12] A. García-España and M. R. Philips, "Origin and Evolution of RAS Membrane Targeting," *Oncogene*, vol. 42, no. 21, pp. 1741–1750, 2023, doi: 10.1038/s41388-023-02672-z.
- [13] J. Kochen Rossi, C. Nuevo-Tapióles, and M. R. Philips, "Differential functions of the KRAS splice variants," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 51, no. 3, pp. 1191–1199, May 2023, doi: 10.1042/BST20221347.
- [14] M. Janakiraman *et al.*, "Genomic and Biological Characterization of Exon 4 KRAS Mutations in Human Cancer," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 14, pp. 5901–5911, Jul. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0192.
- [15] J. M. L. Ostrem and K. M. Shokat, "Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 15, no. 11, pp. 771–785, 2016, doi: 10.1038/nrd.2016.139.
- [16] Y. Li, L. Han, and Z. Zhang, "Understanding the influence of AMG 510 on the structure of KRASG12C empowered by molecular dynamics simulation," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 20, pp. 1056–1067, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.csbj.2022.02.018.
- [17] S. Cao, S. Chung, S. Kim, Z. Li, D. Manor, and M. Buck, "K-Ras G-domain binding with signaling lipid phosphatidylinositol (4,5)-phosphate (PIP2): membrane association, protein orientation, and function," *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 17, pp. 7068–7084, Apr. 2019, doi: 10.1074/jbc.RA118.004021.
- [18] M. Schmick *et al.*, "KRas Localizes to the Plasma Membrane by Spatial Cycles of Solubilization, Trapping and Vesicular Transport," *Cell*, vol. 157, no. 2, pp. 459–471, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.051.
- [19] S. L. Campbell and M. R. Philips, "Post-translational modification of RAS proteins," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 71, pp. 180–192, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.06.015>.
- [20] X. Nan *et al.*, "Ras-GTP dimers activate the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 26, pp. 7996–8001, Jun. 2015, doi: 10.1073/pnas.1509123112.
- [21] J. Cherfills and M. Zeghouf, "Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs," *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 1, pp. 269–309, Jan. 2013, doi: 10.1152/physrev.00003.2012.
- [22] Z. Zhao, N. Bohidar, and P. E. Bourne, "Analysis of KRAS–Ligand Interaction Modes and Flexibilities Reveals the Binding Characteristics," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 63, no. 4, pp. 1362–1370, Feb. 2023, doi: 10.1021/acs.jcim.3c00097.
- [23] M. Roman, E. Hwang, and E. A. Sweet-Cordero, "Synthetic Vulnerabilities in the KRAS Pathway," *Cancers*, vol. 14, no. 12, 2022, doi: 10.3390/cancers14122837.
- [24] M. Nagasaka, Y. Li, A. Sukari, S.-H. I. Ou, M. N. Al-Hallak, and A. S. Azmi, "KRAS G12C Game of Thrones, which direct KRAS inhibitor will claim the iron throne?," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 84, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ctrv.2020.101974.
- [25] M. V. Milburn *et al.*, "Molecular Switch for Signal Transduction: Structural Differences Between Active and Inactive Forms of Protooncogenic ras Proteins," *Science (80-)*, vol. 247, no. 4945, pp. 939–945, Feb. 1990, doi: 10.1126/science.2406906.
- [26] D. Filchtinski, O. Sharabi, A. Rüppel, I. R. Vetter, C. Herrmann, and J. M. Shifman, "What Makes Ras an Efficient Molecular Switch: A Computational, Biophysical, and Structural Study of Ras-GDP Interactions with Mutants of Raf," *J. Mol. Biol.*, vol. 399, no. 3, pp. 422–435, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.03.046>.
- [27] T. Takács, G. Kudlik, A. Kurilla, B. Szeder, L. Buday, and V. Vas, "The effects of mutant Ras proteins on the cell signalome," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 1051–1065, 2020, doi: 10.1007/s10555-020-09912-8.
- [28] A. K. Murugan, M. Grieco, and N. Tsuchida, "RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 59, pp. 23–35, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.007>.
- [29] L. Huang, Z. Guo, F. Wang, and L. Fu, "KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, p. 386, 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00780-4.
- [30] D. Rabara *et al.*, "KRAS G13D sensitivity to neurofibromin-mediated GTP hydrolysis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, no. 44, pp. 22122–22131, Oct. 2019, doi: 10.1073/pnas.1908353116.
- [31] S. Dogan *et al.*, "Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3,026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-Related KRAS-Mutant Cancers," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 22, pp. 6169–6177, Nov. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3265.
- [32] F. Liu, X. Yang, M. Geng, and M. Huang, "Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 8, no. 4, pp. 552–562, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.apsb.2018.01.008.
- [33] Y. Peng, Y. Wang, C. Zhou, W. Mei, and C. Zeng, "PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway?," *Front. Oncol.*, vol. 12, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.819128.
- [34] J. Canon *et al.*, "The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity," *Nature*, vol. 575, no. 7781, pp. 217–223, 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1694-1.
- [35] T. Pantsar, "KRAS(G12C)–AMG 510 interaction dynamics revealed by all-atom molecular dynamics simulations," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 11992, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-68950-y.
- [36] T. Pantsar, "The current understanding of KRAS protein structure and dynamics," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 18, pp. 189–198, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.csbj.2019.12.004.
- [37] V. Dunnett-Kane, P. Nicola, F. Blackhall, and C. Lindsay, "Mechanisms of Resistance to KRASG12C Inhibitors," *Cancers*, vol. 13, no. 1, 2021, doi: 10.3390/cancers13010151.
- [38] A. R. Issahaku *et al.*, "Characterization of the binding of MRTX1133 as an avenue for the discovery of potential KRASG12D inhibitors for cancer therapy," *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, p. 17796, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-22668-1.
- [39] D. Tang and R. Kang, "Glimmers of hope for targeting oncogenic KRAS-G12D," *Cancer Gene Ther.*, vol. 30, no. 3, pp. 391–393, 2023, doi: 10.1038/s41417-022-00561-3.

XIII

11 czerwca 2024 r.

MIĘDZYNARODOWA KONFERENCJA PRZEMYSŁU CHEMII GOSPODARCZEJ

Sponsorzy Strategiczni:



Sponsorzy:



Patroni:



Współpraca medialna:



Organizator:



Więcej informacji:
tel. (22) 253 81 01
konferencja@chemiaibiznes.com.pl
www.chemiaibiznes.com.pl



Kamil WOJTKOWIAK

Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław



Aneta JEZERSKA

Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław



Jarosław J. PANEK*

Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Opis oddziaływań niekowalencyjnych wybranych penicylin metodami chemii obliczeniowej

Non-covalent interactions description of selected penicillins in the framework of computational chemistry

DOI: 10.15199/5.2024.1.5

Oddziaływania niekowalencyjne wewnątrz- i międzycząsteczkowe mają kluczowe znaczenie w nowoczesnym projektowaniu związków aktywnych biologicznie. W artykule omawiamy właściwości fizykochemiczne trzech wybranych związków z grupy penicylin - oksacyliny, ampicyliny i penicyliny G. Dla tych związków zostały wykonane symulacje kwantowo-chemiczne wykorzystując teorię funkcjonału gęstości (DFT). Analizowane były wybrane parametry metryczne, jak również struktura elektronowa (teoria QTAIM i indeks NCI) skondensowanych pierścieni, jak i całych cząsteczek. Symulacje zostały wykonane w fazie gazowej, jak również z uwzględnieniem polaryzacji otoczenia – model CPCM i wody jako rozpuszczalnika. Ostatni fragment badań stanowi analiza oddziaływań niekowalencyjnych pomiędzy opisywanymi penicylinami a ich miejscem wiążącym. Przedstawione wyniki badań wpisują się w założenia komputerowo wspomaganego projektowania leków.

Słowa kluczowe: CADD, penicyliny, oddziaływania niekowalencyjne, DFT, QTAIM, NCI

Intra- and intermolecular non-covalent interactions play an important role in modern design of biologically active compounds. In the paper, we discuss the physicochemical features of three selected compounds from penicillin group – Oxacillin, Ampicillin and Penicillin G. Quantum-chemical simulations on the basis of Density Functional Theory (DFT) were carried out for these compounds. The analyses were performed for selected metric parameters as well as electronic structure (QTAIM and NCI index) of the fused rings and the whole molecules. The simulations were done in the gas phase and taking into account the influence of the polar environment – CPCM model and water as a solvent. The last part of the study is devoted to the non-covalent interactions analysis in the binding site of the penicillins. The presented results are in line with the Computer-Aided Drug Design (CADD) philosophy.

Keywords: CADD, penicillins, noncovalent interactions, DFT, QTAIM, NCI

Wstęp

Komputerowo wspomaganie projektowanie leków (*Computer-Aided Drug Design*, CADD) od lat jest uznaną metodą badawczą wspomagającą techniki eksperymentalne w poszukiwaniu nowych terapeutyków [1]. Jednak dopiero ostatnie dekady przyniosły szersze wykorzystanie metod CADD w praktyce chemii medycznej, a przyczyny tego stanu rzeczy są złożone [2]. Szeroko pojęte metody obliczeniowe chemii strukturalnej są dobrze poznane, a zatem problemem nie jest sam dostęp do właściwych metod, a może nim być natomiast koszt obliczeniowy oraz jakość uzyskiwanych wyników. Proste metody oparte na klasycznych polach siłowych, będące podstawą dokowania (użytecznego w screeningu związków dopasowanych do danego receptora) oraz dynamiki molekularnej zapewniają podstawowy opis zmian konformacyjnych, ale nie są w stanie odtworzyć struktury elektronowej. Metody chemii kwantowej to umożliwiają, ale koszt obliczeniowy utrudnia ich wykorzystanie w obliczeniach masowych typu *high-throughput*, w mniejszym stopniu dotyczy to metod półempirycznych, a w znacznym schematów *ab initio* oraz teorii funkcjonału gęstości. Jednak sama metodologia obliczeń strukturalnych jest dostępna. Poważnym problemem jest częsty brak wiedzy o detalach procesów prowadzących do stanów chorobowych, o mechanizmach działania leków i metabolizmie proleków oraz

dalszych oddziaływaniach z receptorami. Te poważne ograniczenia również mogą być przezwyciężane dzięki metodom modelowania molekularnego, które umożliwiają wgląd w szczegóły oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych, dostarczając wiedzy do racjonalnego projektowania nowych leków i struktur wiodących w ramach CADD. W tym kontekście artykuł opisuje wybraną grupę leków, antybiotyki beta-laktamowe, i na przykładzie trzech wybranych struktur z grupy penicylin pokazuje zastosowanie metod obliczeniowych do analizy oddziaływań niekowalencyjnych warunkujących strukturę i właściwości tych związków chemicznych [1].

Antybiotyki beta-laktamowe działają przede wszystkim na DD-transpeptydazy, enzymy niezbędne do budowy ściany komórkowej bakterii [3]. Z drugiej strony, bakterie wykształciły wiele mechanizmów opornościowych [4], co obecnie powoduje problemy kliniczne z opornością wielolekową. Tymczasem, od odkrycia przez Alexandra Fleminga pierwszego antybiotyku tej klasy, penicyliny G, nie minęło jeszcze 100 lat [5] to przez kilkanaście lat od zauważenia bakterioójczego działania grzybów *Penicillium* pomysł zastosowania w leczeniu ekstraktu z grzybni był w środowisku naukowym lekceważony. Od tego czasu antybiotyki beta-laktamowe rozrosły się do potężnej rodziny obejmującej penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy i monobaktamy [1]. W tym artykule skoncentrowano się na klasycznych przedstawicielach penicylin, pierwotnej, naturalnej penicylinie G

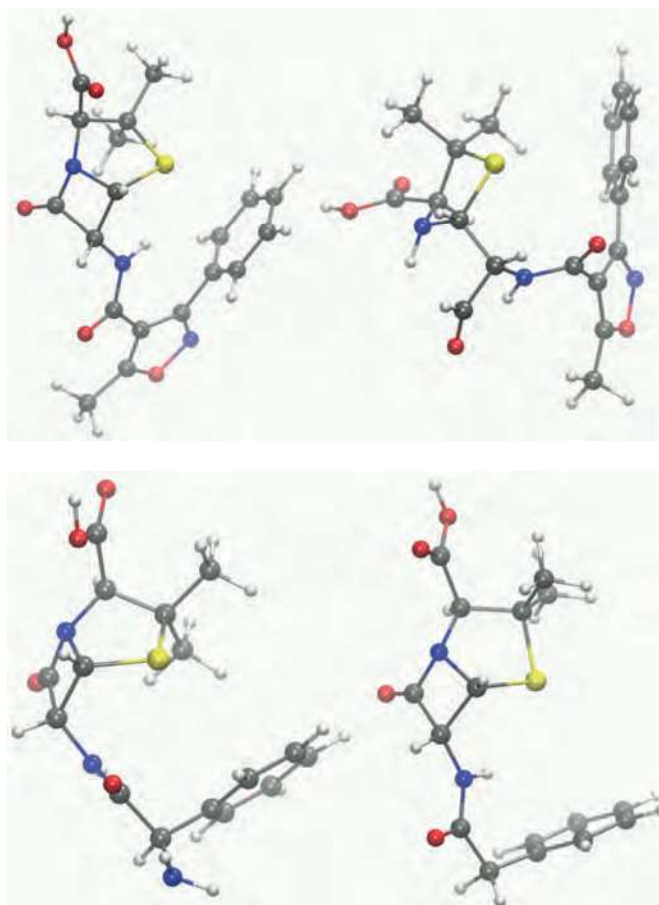
oraz półsyntetycznych, oksacyliny i ampicyliny, przedstawiając ich właściwości cząsteczkowe oraz potencjał tworzenia oddziaływań niekowalencyjnych, wykorzystując metody chemii obliczeniowej.

Metody obliczeniowe

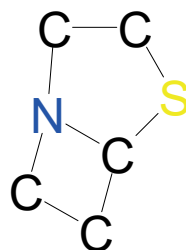
Modele penicylin (oksacyliny, ampicyliny i penicyliny G) zbudowano na podstawie danych zaczerpniętych z białkowej bazy danych (Protein Data Bank) – PDB [6] i bazy danych PubChem [7]. Wykorzystano w tym celu kompleksy białek (4JXG [8], 3ITA [9], 1GM7 [10]), z których wyekstrahowano analizowane cząsteczki. W przypadku oksacyliny przebadano także jej metabolit. Symulacje kwantowo-chemiczne wykonano w fazie gazowej i z zastosowaniem ciągłego modelu rozpuszczalnikowego CPCM [11] wykorzystując Teorię Funkcjonału Gęstości (DFT) [12, 13]. Zastosowano poziom obliczeniowy ω B97X-D3BJ/def2-TZVP [14, 15, 16]. Na symulacje składały się: minimalizacja energii, obliczenie częstości harmonicznych w celu potwierdzenia, że badane cząsteczki znajdują się w minimum na powierzchni energii potencjalnej (PES), a także przygotowanie funkcji falowych do dalszych analiz struktury elektronowej. Symulacje wykonano w programie Orca 5.0.4. [17]. Otrzymane funkcje falowe posłużyły do dalszych analiz struktury elektronowej z zastosowaniem kwantowej teorii atomów w cząsteczkach (QAIM) [18] i indeksu oddziaływań niekowalencyjnych (NCI) [19]. Następnie, przeanalizowano oddziaływania niekowalencyjne pomiędzy cząsteczkami penicylin a ich miejscem wiążącym w białku. Analiza oddziaływań badanych antybiotyków z centrami wiążącymi enzymów została wykonana za pomocą programu LigPlot+ v.2.2 [20] na podstawie struktur zdeponowanych w bazie danych strukturalnych PDB [6]. Wizualizację pozostałych otrzymanych wyników wykonano w programach VMD [21] i AIMall [22]. Programy AIMall oraz Multiwfn [23] posłużyły również do analiz topologicznych i struktury elektronowej.

Wyniki badań i ich dyskusja

Na rys. 1 przedstawiono struktury molekularne badanych penicylin (a w przypadku oksacyliny również jej metabolitu). Jak wynika z przeprowadzonych symulacji, cząsteczki wybranych do badań penicylin wykazują zróżnicowanie konformacyjne, co jest spowodowane wprowadzeniem różnych podstawników i związanych z tym efektów sterycznych i indukcyjnych. Na Schemacie 1 przedstawiono w sposób uproszczony skondensowane pierścienie, obecne we wszystkich trzech badanych penicylinach, które posłużyły do analizy wybranych parametrów metrycznych. Wzięto pod uwagę długości wiązań, a także wartości kątów walencyjnych i torsyjnych (tab. 1). Porównano parametry otrzymane jako wynik symulacji w fazie gazowej z parametrami po uwzględnieniu wpływu otoczenia polarnego. Jak wynika z rezultatów badań zamieszczonych w tab. 1, nie obserwuje się zbyt dużej różnicy w wartościach otrzymanych parametrów metrycznych. Wyjątkiem jest wartość kąta torsyjnego C-C-S-C w penicylinie G, gdyż różni się ona znacząco w porównaniu z oksacyliną i ampicyliną. Jest to świadectwem swobody konformacyjnej alifatycznego pierścienia heterocyklicznego zawierającego atom siarki. Otrzymane wyniki badań potwierdzają nasze wcześniejsze spostrzeżenia dotyczące sztywnych fragmentów molekuł [24]. Jednak należy zauważyć, że obecność otoczenia polarnego moduluje długości wiązań i wartości analizowanych kątów, co przekłada się na przewidywanie wpływu rozpuszczalnika na właściwości fizykochemiczne badanych penicylin.



Rys. 1. Struktury molekularne badanych penicylin (wizualizacja CPK). Panel górny: oksacylina (OXA) i metabolit oksacyliny (1S6); Panel dolny: ampicylina (AIC) i penicylina G (PNN). Oznaczenia atomów: szary – węgiel, żółty – siarka, czerwony – tlen, niebieski – azot, biały – wodór



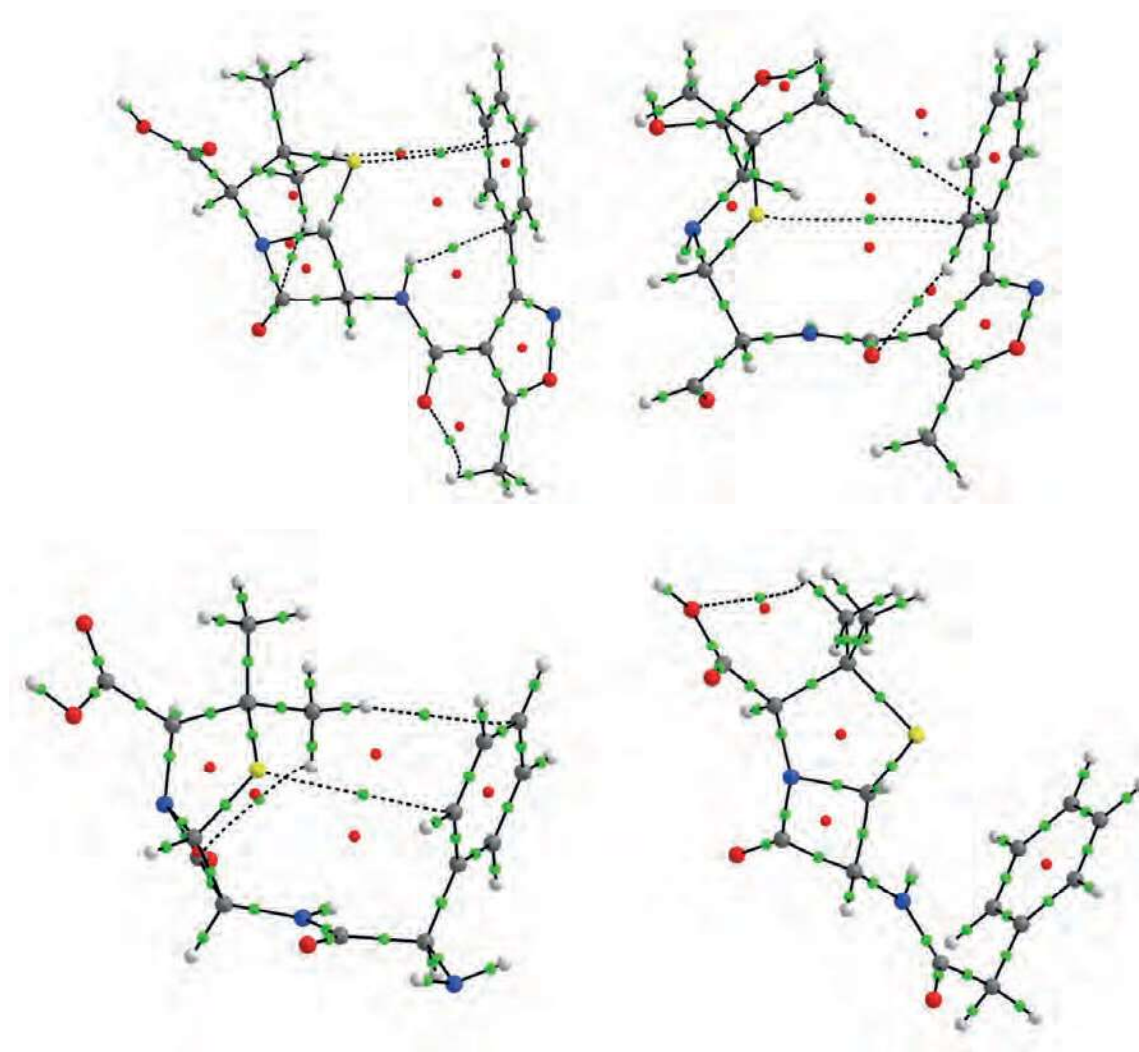
Schemat 1. Struktura pierścienia skondensowanego wykorzystanego w analizie parametrów metrycznych (tab. 1) i QAIM (tab. 2)

Analizę topologiczną i struktury elektronowej badanych penicylin wykonano wg kwantowej teorii atomów w cząsteczkach (QAIM). Na rys. 2 przedstawiono grafy molekularne z zaznaczonymi punktami krytycznymi wiązań i pierścieni. W przypadku metabolitu oksacyliny odnotowano również tzw. klatkowy punkt krytyczny (niebieska kulka). Wyniki badań przedstawione na rys. 2 zostały otrzymane z symulacji w fazie gazowej. Widać jednak, że w zależności od przyjętej konformacji (co spowodowane jest obecnością różnych podstawników, grup funkcyjnych) zaobserwować można różną liczbę wewnętrzząsteczkowych oddziaływań niekowalencyjnych (punkty krytyczne wiązań – linia przerywana). Jak wynika z rys. 2, najwięcej oddziaływań niekowalencyjnych (pięć) można zauważyć w cząsteczce oksacyliny, trzy punkty krytyczne wiązań znaleziono w ampicylinie, natomiast jeden punkt krytyczny w penicylinie G.

W tab. 2 zebrano wartości cząstkowych ładunków atomowych oraz wartości gęstości elektronowej i jej laplasjanu w punkcie krytycznym wiązania w stałym fragmencie analizowanych penicylin

Tab 1. Parametry metryczne pierścieni skondensowanych otrzymane jako wynik symulacji na poziomie obliczeniowym ω B97X-D3BJ/def2-TZVP w fazie gazowej i z uwzględnieniem wpływu otoczenia (model CPCM i woda jako rozpuszczalnik)

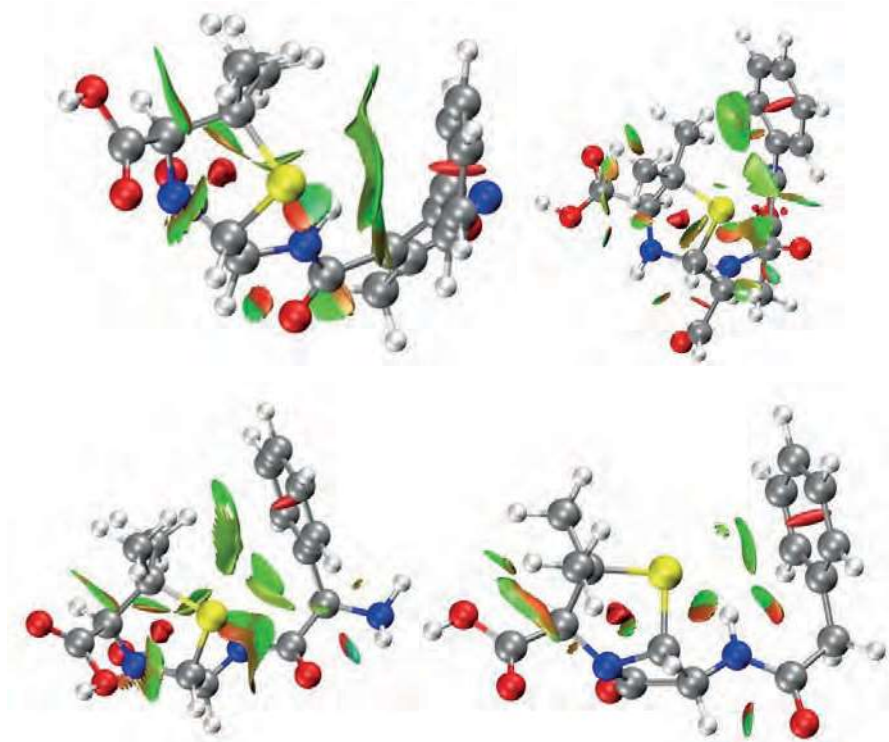
Parametry metryczne	Oksacylina		Ampicylina		Penicylina G	
	Faza gazowa	CPCM	Faza gazowa	CPCM	Faza gazowa	CPCM
Długości wiązań, Å						
C-C	1,5631	1,5630	1,5630	1,5637	1,5691	1,5682
C-S	1,8381	1,8416	1,8357	1,8403	1,8337	1,8367
S-C	1,8110	1,8090	1,7987	1,8003	1,8055	1,8022
C-N	1,4658	1,4682	1,4726	1,4711	1,4678	1,4724
N-C	1,4421	1,4450	1,4455	1,4462	1,4443	1,4482
C-C	1,5575	1,5572	1,5608	1,5611	1,5567	1,5556
C-C	1,5513	1,5477	1,5392	1,5389	1,5444	1,5429
C-N	1,3975	1,3850	1,3866	1,3795	1,3980	1,3849
Kąty walencyjne, °						
C-C-S	104,7	104,9	105,1	105,2	104,4	104,1
C-S-C	95,1	95,2	95,1	95,3	91,2	91,0
S-C-N	106,0	105,7	106,2	105,9	103,9	103,6
C-N-C	116,2	116,5	116,7	117,2	116,9	117,1
C-C-C	84,6	84,5	84,7	84,6	84,0	84,2
C-C-N	91,5	91,9	92,3	92,4	91,5	92,0
Kąty torsyjne, °						
C-C-S-C	17,9	18,0	19,8	18,1	-34,5	-36,2
C-S-C-N	0,3	0,5	-2,45	-0,8	35,2	35,7
S-C-N-C	-21,7	-22,0	-18,5	-19,8	-27,4	-26,7
C-N-C-C	36,0	36,2	33,7	33,8	2,0	0,0
C-C-C-N	-8,7	-7,9	-7,2	-6,7	-13,2	-11,4



Rys. 2. Grafy molekularne cząsteczek penicyliny z zaznaczonymi punktami krytycznymi wiązań (zielone kulki), punktami krytycznymi pierścieni (czerwone kulki) oraz punktem klatkowym (niebieska kulka) otrzymanymi jako wynik analizy QTAIM (ω B97X-D3BJ/def2-TZVP w fazie gazowej). Linie przerywane oznaczają oddziaływania niekowalencyjne. Oznaczenia atomów: szary – węgiel, żółty – siarka, czerwony – tlen, niebieski – azot, biały – wodór

Tab. 2. Wartości wybranych parametrów otrzymanych z QTAIM dla pierścieni skondensowanych. Wynik symulacji na poziomie obliczeniowym ω B97X-D3BJ/def2-TZVP w fazie gazowej i z uwzględnieniem wpływu otoczenia (model CPCM i woda jako rozpuszczalnik)

	Oksacylina		Ampicylina		Penicylina G	
	Faza gazowa	CPCM	Faza gazowa	CPCM	Faza gazowa	CPCM
Wartości ładunków cząstkowych według QTAIM (a.u.)						
qC	0,3911	0,3815	0,3859	0,3816	0,3822	0,3720
qC	-0,0278	-0,0239	-0,0274	-0,0236	-0,0246	-0,0205
qS	-0,0173	-0,0325	0,0231	-0,0177	-0,0203	-0,0320
qC	0,2430	0,2406	0,2423	0,2380	0,2264	0,2220
qN	-1,0881	-1,1061	-1,0993	-1,1120	-1,0764	-1,0983
qC	0,4060	0,4051	0,3956	0,3932	0,4157	0,4132
qC	1,4887	1,4921	1,5102	1,5125	1,4932	1,4933
Wartości gęstości elektronowej i jej laplasjanu w punktach krytycznych wiązań ($\rho = e/a_0^{-3}$; $\nabla^2 \rho = e/a_0^{-5}$)						
C-C	0,2353; -0,5612	0,2352; -0,5613	0,2352; -0,5610	0,2348; -0,5599	0,2322; -0,5477	0,2325; -0,5501
C-S	0,1791; -0,2944	0,1780; -0,2900	0,1803; -0,2997	0,1785; -0,2922	0,1808; -0,3022	0,1797; -0,2974
S-C	0,1873; -0,3338	0,1880; -0,3380	0,1915; -0,3566	0,1910; -0,3541	0,1898; -0,3448	0,1910; -0,3520
C-N	0,2697; -0,6829	0,2679; -0,6764	0,2648; -0,6581	0,2653; -0,6632	0,2681; -0,6699	0,2649; -0,6569
N-C	0,2760; -0,7620	0,2722; -0,7453	0,2725; -0,7433	0,2708; -0,7357	0,2756; -0,7590	0,2712; -0,7392
C-C	0,2411; -0,5892	0,2412; -0,5901	0,2400; -0,5841	0,2396; -0,5826	0,2403; -0,5829	0,2410; -0,5884
C-C	0,2483; -0,6223	0,2499; -0,6312	0,2536; -0,6549	0,2537; -0,6554	0,2507; -0,6349	0,2516; -0,6397
C-N	0,3109; -0,9736	0,3193; -1,0329	0,3190; -1,0299	0,3233; -1,0623	0,3128; -0,9815	0,3214; -1,0454



Rys. 3. Diagramy NCI otrzymane dla badanych penicylin: oksacyliny i jej metabolitu, ampicyliny i penicyliny G. Wyniki otrzymane z symulacji w fazie gazowej

(schemat 1, skondensowane pierścienie). W przypadku wartości ładunków cząstkowych na uwagę zasługuje atom siarki, gdyż w przypadku ampicyliny nastąpiła znaczna zmiana wartości, a nawet znaku, ładunku cząstkowego. Symulacje wykonane w fazie gazowej dały wartość ładunku równą 0,0231, natomiast z modelu CPCM otrzymano wartość -0,0177. Analiza wartości gęstości elektronowej i jej laplasjanu wskazuje na bardzo znikomy wpływ otoczenia polarnego na rozkład gęstości elektronowej w skondensowanych pierścieniach. W przypadku wiązania C-S, obecność otoczenia polarnego obniża wartość gęstości elektronowej w punkcie krytycznym wiązania. W wiązaniu S-C nie zaobserwowano podobnego trendu, gdyż wartość gęstości elektronowej w punkcie krytycznym (CPCM) jest większa w przypadku oksacyliny i penicyliny G, natomiast mniejsza w ampicylinie. Wartość gęstości elektronowej w punkcie krytycznym wiązania C-N jest większa w oksacylinie i penicylinie G, gdy porówna się fazę gazową z otoczeniem polarnym. Odwrotny

trend zaobserwowano w przypadku ampicyliny. Analizując wartość gęstości elektronowej w punkcie krytycznym wiązania N-C widać, że obecność otoczenia polarnego systematycznie obniża tę wartość. Ujemna i znaczna wartość laplasjanu gęstości elektronowej wskazuje na kowalencyjny charakter analizowanych wiązań.

Dopełnieniem analizy oddziaływań niekowalencyjnych, obecnych w cząsteczkach badanych penicylin, jest indeks oddziaływań niekowalencyjnych (NCI). Na rys. 3 i 4 zostały przedstawione wyniki analizy wykonanej dla cząsteczek symulowanych w fazie gazowej, a także z uwzględnieniem otoczenia polarnego. Na rysunkach widać różnokolorowe izopowierzchnie. Izopowierzchnie w kolorze niebieskim wskazują na obecność wiązań wodorowych i halogenowych, ogólnie wskazują na silne oddziaływania. Izopowierzchnie w kolorze zielonym oznaczają obecność oddziaływań typu van der Waalsa. Kolor czerwony oznacza silne odpychanie (np. efekty steryczne w pierścieniu) [19].

Jak wynika z rys. 3 i 4, obecność otoczenia polarnego nie wpływa znacząco w ilościowy sposób na charakter obecnych w cząsteczkach oddziaływań niekowalencyjnych.

Zastosowanie indeksu NCI umożliwia jednak dokładniejszy wgląd w naturę tych oddziaływań w porównaniu z teorią QTAIM. Widzimy, że obecne w badanych penicylinach oddziaływania niekowalencyjne mają charakter słabych oddziaływań van der Waalsa, ale zauważyć też można obecność oddziaływań odpychających (izopowierzchnie w kolorze czerwonym). Dwukolorowe izopowierzchnie świadczą o tym, że oddziaływania przyciągające i odpychające konkurują ze sobą w analizowanych cząsteczkach leków. Ostatnim elementem badań teoretycznych była analiza oddziaływań oksacyliny, ampicyliny i penicyliny G z miejscem wiążącym w białku. Wyniki badań zostały przedstawione na rys. 5.

Antybiotyki beta-laktamowe wiążą się z różnorodnymi typami białek. Jak już wspomniano, podstawowy cel związany z efektem terapeutycznym to bakteryjne białka PBP (penicillin-binding proteins), które nazwano w ten sposób zanim ustalono ich rolę. Są to

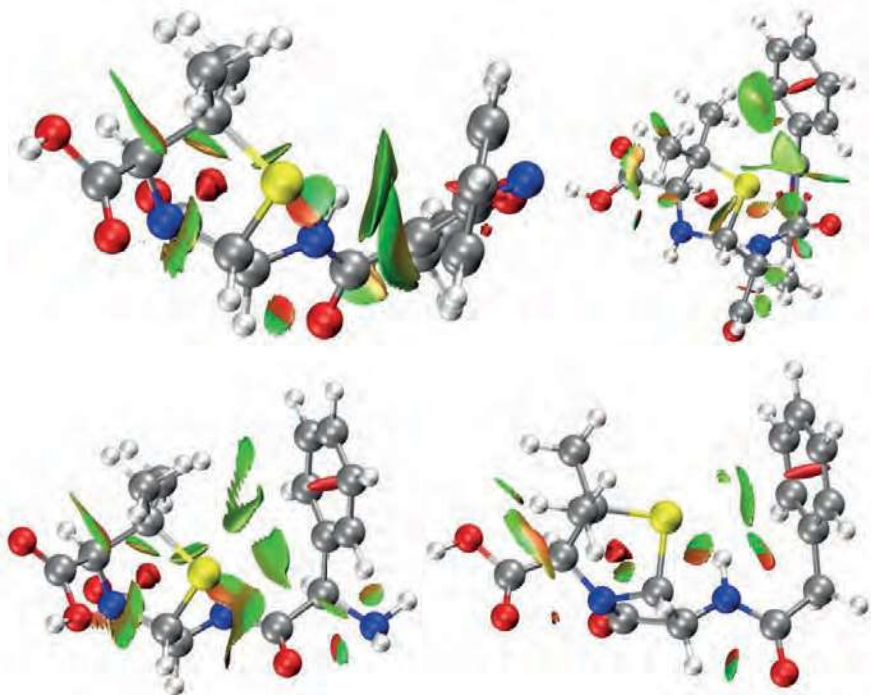
DD-transpeptydazy, sieciujące włókna peptydoglikanów budujących ścianę komórkową bakterii. Podobieństwo strukturalne penicylin i ich analogów do substratu białka PBP, acylo-D-alanylo-D-alaniny, umożliwia dezaktywację transpeptydazy przez tę klasę antybiotyków [3]. Jednak nie są to jedyne cele molekularne dla związków beta-laktamowych, a szczegóły wiązania cząsteczki antybiotyku przez receptor są bardzo zróżnicowane. W dalszej części artykułu przedstawiono, z naciskiem na oddziaływania ligand-gospodarz, trzy przykłady miejsc wiążących antybiotyku beta-laktamowego występującego w strukturach zdeponowanych w bazie PDB [6].

Wiele bakterii nabywa odporności na antybiotyki z grupy penicylin dzięki ekspresji (a zwłaszcza indukowanej nadekspresji) beta-laktamazy klasy AmpC [4]. Przykładu takiej dezaktywacji cząsteczki oksacyliny dostarcza struktura PDB 4JXG [8] oparta na beta-laktamazie wyizolowanej z bakterii *Escherichia coli*. Jak przedstawiono na rys. 5 a), pierścień beta-laktamowy oksacyliny został otwarty i utworzone zostało kowalencyjne wiązanie jego grupy karbonylowej z grupą -OH reszty Ser64, dzięki czemu atomy pochodzące z tego pierścienia mogą tworzyć liczne wiązania wodorowe: atom tlenu grupy karbonylowej oksacyliny (a obecnie – fragmentu estrowego) ze szkieletowymi fragmentami N-H reszt Ser64 i Ala318, zaś atom azotu (obecnie N-H) z grupą -OH reszty Tyr150. Do tego dołączają inne liczne wiązania wodorowe stabilizujące cząsteczkę metabolitu (np. ze szkieletową grupą karbonylową Ala318 i N-H reszty Asn346). Ważną wartością struktury 4JXG jest właśnie uchwycenie produktu pośredniego w procesie dezaktywacji oksacyliny.

Jedną z DD-transpeptydaz bakterii *E. coli*, PBP6, została wykorzystana do wykazania podobieństwa strukturalnego antybiotyków beta-laktamowych do substratu białek PBP. Struktura kompleksu PBP6 z ampicyliną (kod PDB 3ITA [9]) jest zbliżona do analogicznego kompleksu PBP6 z acylo-D-alanylo-D-alaniną [9]. Najważniejsze oddziaływania ligand-gospodarz w centrum wiążącym bakteryjnego PBP6 zobrazowano na rys. 5 b). Jak wskazuje analiza strukturalna, pierścień beta-laktamowy ampicyliny nie tworzy bezpośrednio od-

działywań o charakterze wiązania wodorowego, zaś drugi ze skondensowanych pierścieni wykazuje oddziaływanie o charakterze dyspersyjnym między swoim atomem siarki a resztą Phe271. Przyłączona do tego pierścienia grupa karboksylowa także nie wchodzi w oddziaływania inne niż dyspersyjne z pierścieniem aromatycznym reszty Tyr308. Charakterystyczne wiązania wodorowe tworzą się jedynie pomiędzy grupą karbonylową fragmentu amidowego ampicyliny a grupą N-H reszty Ala306, oraz grupą aminową liganda i szkieletowym fragmentem C=O reszty Leu304. Są to wiązania N-H...O, typowe dla struktur białkowych.

Opisana dezaktywacja beta-laktamów (na przykładzie oksacyliny) nie jest jedynym przykładem biotransformacji tej klasy antybiotyków. Bardzo ważne technologicznie okazały się enzymy z grupy acylaz (amidaz) penicylinowych, umożliwiające częściową hydrolizę naturalnej penicyliny G do kwasu 6-aminopenicylanowego, podstawowego substratu do produkcji penicylin półsyntetycznych. Wgląd w mechanizm tej reakcji daje struktura acylazy penicylinowej bakterii *E. coli*, w kompleksie z penicyliną G [10]. Na rys. 5 c) pokazano, że



Rys. 4. Diagramy NCI otrzymane dla badanych penicylin: oksacyliny i jej metabolitu, ampicyliny i penicyliny G. Rezultaty otrzymane z symulacji z uwzględnieniem ciągłego modelu rozpuszczalnikowego CPCM i wody jako rozpuszczalnika



Rys. 5. Analiza oddziaływań niekwalencyjnych oksacyliny, ampicyliny i penicyliny G w miejscu wiążącym białka

skondensowane pierścienie nie są źródłem silnych wiązań wodorowych, grupa karboksylowa penicyliny G oddziałuje raczej ze środowiskiem zewnętrznym (woda, etanodiol użyty przy krystalizacji), zaś względnie silne według kryterium odległościowego wiązanie wodorowe tworzy się między grupą karboksylową fragmentu amidowego antybiotyku a resztą Ser1. Główną rolę pełnią oddziaływania dyspersyjne i stackingowe, zwłaszcza między pierścieniami fenyłowymi antybiotyku i reszty Phe24, dodatkowo klatkę hydrofobową uzupełniają reszty Phe71 i Phe146. Modyfikacje rejonu fenyłowego w antybiotykach beta-laktamowych są więc ważną strategią zmiany aktywności biologicznej oraz przełamania oporności bakteryjnej.

Podsumowanie

Narzędzia chemii teoretycznej wykorzystano do analizy trzech wybranych cząsteczek penicylin: oksacyliny, ampicyliny i penicyliny G. Wykonano dla nich symulacje wykorzystując teorię DFT i na tej podstawie analizowano całe cząsteczki i ich fragmenty pod kątem zmian parametrów fizykochemicznych. Wyniki badań wskazują, że nie obserwowano istotnych zmian parametrów metrycznych w skondensowanych pierścieniach cząsteczek penicylin. Otoczenie polarne moduluje nieznacznie wartości długości wiązań, wartości kątów, a także ładunków atomowych i gęstości elektronowej w punktach krytycznych wiązań. Analiza topologiczna ujawniła istnienie oddziaływań niekwalencyjnych, wewnątrzcząsteczkowych (obecność punktów krytycznych wiązań). Zauważono, że w zależności od cząsteczki, liczba punktów krytycznych się zmienia odpowiednio w kolejności: oksacylina > ampicylina > penicylina G. Na podstawie wyników uzyskanych dla indeksu oddziaływań niekwalencyjnych (NCI) zauważono, że wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania niekwalencyjne obecne w cząsteczkach badanych penicylin mają (w przeważającej mierze) charakter oddziaływań van der Waalsa. Analiza oddziaływań w miejscu wiążącym białka wykazała, że cząsteczki penicylin są w stanie utworzyć wiązania kowalencyjne, a nie tylko sieć międzycząsteczkowych wiązań wodorowych.

mgr Kamil WOJTKOWIAK (0000-0001-9712-6862) jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, od 2020 roku związany z Zespołem Struktury i Dynamiki Makroukładów, w którym realizuje badania związane z rozprawą doktorską. Do jego głównych zainteresowań naukowych należy badanie oddziaływań niekwalencyjnych przy zastosowaniu podejść opartych o dynamikę molekularną *ab initio* oraz statyczne metody chemii kwantowej. e-mail: kamil.wojtkowiak@uwr.edu.pl

Aneta JEZIEŃSKA (0000-0001-6601-9124) ukończyła studia magisterskie i doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Obecnie jest

zatrudniona na stanowisku profesora uczelni. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół małych i dużych układów przede wszystkim o znaczeniu biologicznym. W swoich badaniach naukowych stosuje bardzo różnorodne narzędzia chemii obliczeniowej. e-mail: aneta.jezierska@uwr.edu.pl

Prof. UWr dr hab. Jarosław J. PANEK (ORCID 0000-0002-2952-9739) jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, z którym od magisterium przez studia doktoranckie aż do chwili obecnej związał swą działalność. Zajmuje się chemią obliczeniową, zarówno z zastosowaniem metod chemii kwantowej, jak i pól siłowych klasycznej mechaniki molekularnej. W obszarze jego zainteresowań naukowych leżą kwestie podziału energii oddziaływania w kompleksach molekularnych oraz struktury i dynamiki makroukładów, zwłaszcza białkowych.

e-mail: jaroslaw.panek@uwr.edu.pl

Adres do korespondencji:

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii, ul. F. Joliot-Curie 14,
50-383 Wrocław

e-mail: jaroslaw.panek@uwr.edu.pl,

telefon: +48 71 3757 224, fax: +48 71 3282 348

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować Wrocławskiemu Centrum Sieciowo-Superkomputerowemu (WCSS) za udostępnienie infrastruktury, czasu obliczeniowego i oprogramowania (grant nr 206).

Bibliografia

- [1] Graham P.: *Chemia medyczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- [2] Cui W., Acouidate A., Wang S., Yu Q., Li Y., Yuan S.: *Discovering Anti-Cancer Drugs via Computational Methods*. Front. Pharmacol. 2020, **11**, 733.
- [3] Yocum R.R., Waxman D.J., Rasmussen J.R., Strominger J.L.: *Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, **76**, 2730–2734.
- [4] Jacoby G.A.: *AmpC β-Lactamases*. Clin. Microbiol. Rev. 2009, **22**, 161–182.
- [5] Fleming, A.: *On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. Brit. J. Exp. Pathol. 1929, **10**, 226–236.
- [6] Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.: *The Protein Data Bank*. Nucl. Acids Res. 2000, **28**, 235–242.
- [7] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxacillin>.
- [8] Wallar B.J., Powers R.A., Docter B.E.: *Crystal Structure of AmpC beta-lactamase from E. coli in Complex with Oxacillin*, <https://doi.org/10.2210/pdb4JXG/pdb>, data dostępny: 31.03.2024.
- [9] Chen Y., Zhang W., Shi Q., Heseck D., Lee M., Mobashery S., Shoichet B.K.: *Crystal structures of penicillin-binding protein 6 from Escherichia coli*. J. Am. Chem. Soc. 2009, **131**, 14345–14354.
- [10] Mcvey C.E., Walsh M.A., Dodson G.G., Wilson K.S., Brannigan J.A.: *Crystal Structures of Penicillin Acylase Enzyme- Substrate Complexes: Structural Insights Into the Catalytic Mechanism*. J. Mol. Biol. 2001, **313**, 139–150.

- [11] Barone V., Cossi M.: *Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model*. J. Phys. Chem. A 1998, **102**, 1995–2001.
- [12] Hohenberg P., Kohn W.: *Inhomogeneous Electron Gas*. Phys. Rev. 1964, **136**, B864–B871.
- [13] Kohn W., Sham L.: *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*. Phys. Rev. 1965, **140**, A1133–A1138.
- [14] Chai J.-D., Head-Gordon, M.: *Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections*. Phys. Chem. Chem. Phys. 2008, **10**, 6615–6620.
- [15] Grimme, S., Ehrlich, S., Goerigk, L.: *Effect of the Damping Function in Dispersion Corrected Density Functional Theory*. J. Comput. Chem. 2011, **32**, 1456–1465.
- [16] Weigend F., Ahlrichs R.: *Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy*. Phys. Chem. Chem. Phys. 2005, **7**, 3297–3305.
- [17] Neese F.: *The ORCA program system*. WIREs Comput. Mol. Sci. 2012, **2**, 73–78.
- [18] Bader R.F.W.: *Atoms in Molecules, A Quantum Theory*. Oxford University Press, 1990.
- [19] Johnson E.R., Keinan, S., Mori-Sánchez, P., Contreras-García, J., Cohen, A.J., Yang W.: *Revealing Noncovalent Interactions*. J. Am. Chem. Soc. 2010, **132**, 6498–6506.
- [20] Laskowski R.A., Swindells M.B.: *LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery*. J. Chem. Inf. Model. 2011, **51**, 2778–2786.
- [21] Humphrey W., Dalke A., Schulten K.: *VMD – Visual Molecular Dynamics*. J. Mol. Graph. 1996, **14**, 33–38.
- [22] Keith T., Gristmill T.: *AIMAll (Version 19.10.12), Software*. Overland Park KS, 2019.
- [23] Lu T., Chen F.: *Multifn: a multifunctional wavefunction analyzer*. J. Comput. Chem. 2012, **33**, 580–592.
- [24] Pocheć, M.; Kułacz, K. Panek, J.J.; Jezierska, A. *How Substitution Combines with Non-Covalent Interactions to Modulate 1,4-Naphthoquinone and Its Derivatives Molecular Features-Multifactor Studies*. Int. J. Mol. Sci. 2021, **22**, 10357.

przemysł chemiczny



Miesięcznik Naukowo-Techniczny Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego



- INŻYNIERIA CHEMICZNA
- TECHNOLOGIA CHEMICZNA
- RYNEK
- BRANŻA
- WYDARZENIA

Przemysł Chemiczny jest najstarszym polskim czasopismem w branży chemicznej, wydawanym od 1917 roku.

Miesięcznik od 1964 r. jest notowany na tzw. liście filadelfijskiej najlepszych naukowych pism świata (IF za 2022 r. wynosi 0,500).

Miesięcznik adresowany jest do **menedżerów przemysłu chemicznego, inżynierów i technologów w przemyśle, projektantów w biurach projektowych** oraz **pracowników naukowych w instytutach naukowo-badawczych** i na **wyższych uczelniach** oraz **studentów chemii**.



przemyslchemiczny



przemysl.chemiczny



company/przemysl-chemiczny

przemysł chemiczny

KONTAKT - REDAKCJA

- ☎ (22) 818 51 71
- ✉ przemyslchemiczny@sigma-not.pl
- 🌐 przemyslchemiczny.com

KONTAKT - WYDAWCZA

- ☎ (22) 818 09 18
- ✉ sekretariat@sigma-not.pl
- 🌐 www.sigma-not.pl