

Creu er mwyn dinistrio: Creu rhyngolyn GN8 anghymesur i drin clefydau prion

Bedwyr ab Ion Thomas, Simon E. Ward* a D. Heulyn Jones*†

* *Y Sefydliad Darganfod Meddyginiaethau, Prifysgol Caerdydd*

† *Ysgol Cemeg, Prifysgol Caerdydd*

Cyflwynwyd: 13 Medi 2024; Derbyniwyd: 10 Mehefin 2025

Crynodeb: Yn yr erthygl hon, rydym wedi paratoi sylfaen gadarn er mwyn gallu creu'r PROTACs cyntaf erioed ar gyfer targedu dirywiad y protein prion. Defnyddiwyd cemeg gyfrifiadurol i greu modd rhwymo cynosodedig er mwyn galluogi penderfynu lle i atodi cyd-gysylltydd y PROTAC. Yn sgil hyn, dyluniwyd a syntheseiddiwyd y rhyngolyn GN8 allweddol a fydd yn cael ei ddefnyddio yn y dyfodol i adweithio ag adweithredyddion cyd-gysylltydd ligas E3 i greu'r PROTACs prion cyntaf erioed.

Allweddeiriau: PROTAC, Clefydau Prion, Cemeg Feddyginiaethol, GN8.

Create in order to destroy: synthesis of an unsymmetrical GN8 intermediate to treat prion diseases

In this paper, we have prepared a strong foundation to synthesise PROTACs in order to target the prion protein. Computational chemistry was used to generate a postulated binding mode to suggest a linker attachment point. Following this, a key unsymmetrical GN8 intermediate was designed and synthesised that will be used in the future to react with linker-E3 ligase reactants to create the first ever prion targeting PROTACs.

Key words: PROTAC, Prion Diseases, Medicinal Chemistry, GN8.

Cyflwyniad

Clefydau prin niwroddirwyol heb driniaeth ar eu cyfer yw clefydau prion.¹ Maent yn cynnwys clefydau Creutzfeldt Jakob (CJD),² insomnia teuluol angheuol³ a syndrom Gerstmann–Sträussler–Scheinker.⁴ Mae clefydau prion hefyd yn effeithio ar anifeiliaid, a chlefyd y gwartheg gwallgof yw'r mwyaf adnabyddus ohonynt.⁵ Mae'n hysbys mai camblygiad protein (protein misfolding) sydd wrth wraidd y clefydau ac mae diddordeb yn y maes yn tyfu gan fod posibilrwydd cryf fod mecanwaith tebyg ar waith mewn clefydau niwroddirwyol eraill, megis Clefydau Alzheimer,⁶ sglerosis ochrol amyotroffig (ALS),⁷ a 'frontotemporal dementia'

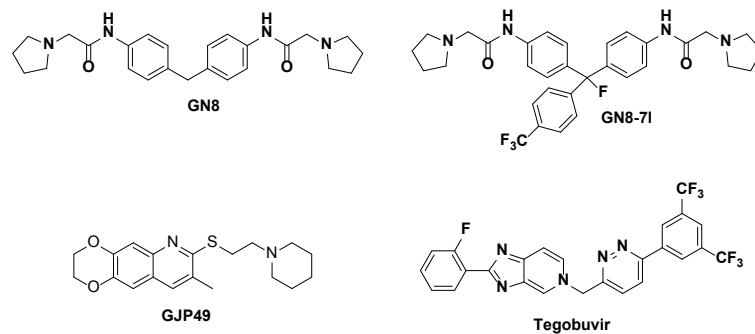
Coleg Cymraeg Cenedlaethol

ISSN: 1741-4261

<http://gwerddon.cymru>

(FTD).⁸ Mae'r galw am driniaeth ar gyfer clefydau prion yn un enbyd ac mae'n debygol o fod yn werthfawr mewn perthynas â chlefydau niwroddirymol eraill.

Ceir hanes hir a llwyddiannus o ddefnyddio moleciwlau bychain i ddatblygu meddyginiaethau, fel arfer moleciwlau sy'n atal neu'n cynyddu actifedd proteinau.⁹ Serch hynny, nid yw'r strategaeth hon wedi dwyn ffrwyth wrth geisio datblygu therapi ar gyfer clefydau prion.^{10, 11} Cyflwr sy'n tarddu o gamblygiad protein cynhenid yn y corff yw clefyd prion. Nid yw'r hyn sydd wrth wraidd y camblygiad yn glir, ond gall newid ffurf y protein arwain at gyfres o gamblygiadau eraill sy'n achosi'r clefyd. Fel modd o drin y clefydau, mae'r defnydd o foleciwlau bychain yn y maes yn canolbwyntio ar naill ai tywyswyr i geisio sefydlogi'r protein prion brodorol (PrP – h.y. nid protein patholegol) rhag camblygu, neu atal y protein prion camblygedig heintus (PrP^{Sc}) rhag dod i gysylltiad â'r protein prion brodorol, PrP.¹² Ceir nifer o wahanol gyfresi cemegol wedi'u creu (Ffigur 1), ond yn anffodus, er cael canlyniadau addawol *in vitro*, mae unrhyw fudd a welir mewn celloedd yn un dros dro. Mae marwolaeth y clefyd mewn arbrofion *in vivo* yn anochel. Y rheswm am hyn yw bod y protein camblygedig (PrP^{Sc}) yn heterogenaidd, h.y. mae sawl gwahanol fath o'r protein camblygedig. Canlyniad hyn yw, er bod tywysydd yn sefydlogi'r math mwyaf niferus, bydd y mathau llai niferus yn parhau i ledaenu nes i'r strategaeth fethu.¹³ Mae'n glir bod angen strategaeth arall i fynd i'r afael â'r clefydau hyn.

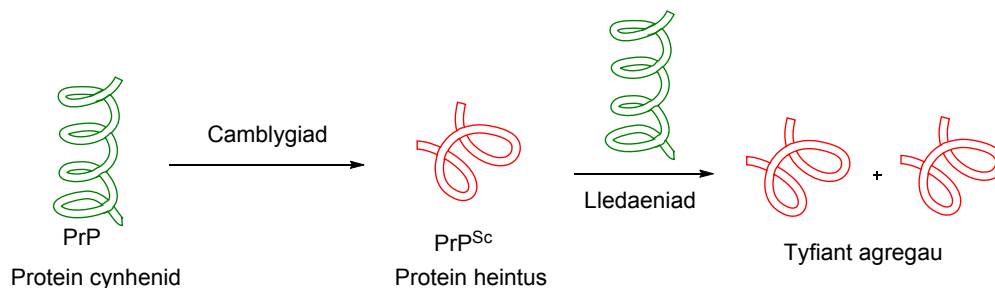


Ffigur 1: Moleciwlau â phriodweddau gwrthbrion

Ein strategaeth

Mae moleciwlau deuweithredol, megis PROTAC,¹⁴ LYTAC,¹⁵ glud moleciwlaidd,¹⁶ a thagiau hydroffobig¹⁷ yn dechnoleg arloesol oherwydd bod ganddynt y gallu i drawsnewid maes cemeg feddyginiaethol, gan gynnwys targedu yn y system nerfol ganolog.¹⁸ Yn hytrach nag atal neu ysgogi proteinau, mae'r dechnoleg hon yn galluogi dirywiad protein gan ddefnyddio mecanwaith cynhenid y gell i reoli lefel proteinau. Gall hynny arwain at y posibilïad o ddatblygu cyffuriau ar gyfer proteinau nad oes modd eu targedu drwy ddulliau arferol (undruggable). Gan fod clefydau prion yn lledaenu wrth i PrP^{Sc} achosi i PrP gamblygu (Ffigur 2), awgrymwn mai PrP ei hun y dylid ei ddiraddio, h.y. mygu'r tân drwy ddileu'r tanwydd. Yn

wir, ni all llygod â PrP allgnociedig gael eu heintio gan PrP^{Sc} a cheir strategaethau addawol i leihau lefelau PrP, megis RNAi¹⁹ a gwrthgyrff²⁰ gwrth-PrP. Er nad yw pwrpas PrP yn hollol hysbys, mae ei allgnociad mewn llygod yn achosi newidiadau mewn ymddygiad, megis gorbryder a phroblemau â'r cof. Serch hynny, mae'n rhaid cydnabod bod yn rhaid i unrhyw driniaeth lwyddiannus allu croesi'r gwahanfur gwaed-ymennydd ac mae'n annhebygol iawn y bydd hyn yn bosibl gyda RNAi a gwrthgyrff. Gellir defnyddio canllawiau Lipinski (<5 cyfrannwr bond hydrogen, <10 derbyniwr bond hydrogen, logP <5 a màs moleciwlaidd <500)²¹ ac yn fwy diweddar optimeiddiad amlbaramedr²² i ddarogan a fydd moleciwl yn debygol o groesi i'r ymennydd; am fanylion pellach gweler tudalen 52 traethawd hir Bedwyr ab Ion Thomas.²³ Er bod moleciwlau PROTAC y tu hwnt i ganllawiau Lipinski,²⁴ mae data cychwynnol yn dangos ei bod yn bosibl addasu priodweddau'r moleciwlau i gyrraedd yr ymennydd mewn crynodiadau therapiwtig.²⁵



Ffigur 2: Model o ledaeniad clefyd prion lle y mae PrP^{Sc} yn ysgogi camblygiad PrP

Felly, creu PROTAC er mwyn diraddio PrP ei hun yw ein strategaeth.²⁶

Mae PROTACs yn gweithio drwy ddod â'r protein dan sylw i gyswllt â ligas E3. Bydd hyn yn arwain at bolywbicwitiniedd i'r protein o ddiddordeb a'i ddinistrio trwy'r system wbicwitin-proteasom (am ragor o wybodaeth am y mecanwaith, gweler erthygl Bedwyr ab Ion Thomas yn Gwerddon Fach).²⁶ Golyga hyn fod PROTACs yn cynnwys tair rhan: 1) ligand sy'n rhwymo i'r protein dan sylw 2) ligand sy'n rhwymo i'r ligas E3 a 3) cydgyswllt.

Canlyniadau

Cyn mynd ati i greu PROTAC, mae'n rhaid ystyried sawl peth er mwyn sicrhau'r siawns orau o lwyddo. Mewn sefyllfa ddelfrydol, buasai gennym strwythur crisial pelydr-X o foleciwl wedi'i rwymo i'r protein targed (PrP yn yr achos hwn). Byddai hyn yn golygu sicrhau bod y moleciwl yn targedu'r protein cywir a hefyd yn rhoi gwybodaeth hynod o ddefnyddiol er mwyn penderfynu lle y dylid atodi cysylltydd y PROTAC heb ymyrryd â rhyngweithiadau'r moleciwl â phoced lipoffilig y protein. Fodd bynnag, ni cheir strwythur crisial pelydr-X o foleciwl wedi'i rwymo i PrP heblaw am glorpromasin.²⁷ Fodd bynnag, mae'r data hyn sy'n cefnogi ei fod yn gweithredu fel gwir rwymydd i PrP yn fregus ac o ansawdd gwan.²⁸

Heb strwythur crisial pelydr-X defnyddiol, mae'n rhaid ystyried pa foleciwl, neu grŵp o foleciwlau, sydd â'r data mwyaf cadarn o fod yn rhwymydd i PrP. Heb os, y moleciwl GN8 a'i analogau yw'r dewis amlwg.²⁹ Paratowyd cyfres o foleciwlau yn seiliedig ar GN8³⁰ sy'n weithredol mewn arbrofion cell, ac efallai'n bwysicach, mae arbrofion Cyseiniant Magnetig Niwclear (CMN/NMR) a bioffiseg Cyseiniant Plasmonau Arwyneb (SPR)²⁹ yn atgyfnerthu bod y moleciwlau wir yn rhwymo i'r protein targed. Mae'n bosibl defnyddio data Perthynas Actifedd Strwythur (SAR) y moleciwlau GN8 er mwyn ystyried lle y gellir atodi'r cyd-gysylltydd, ond mae'r defnydd o gemeg gyfrifiadurol hefyd yn ddefnyddiol.³¹

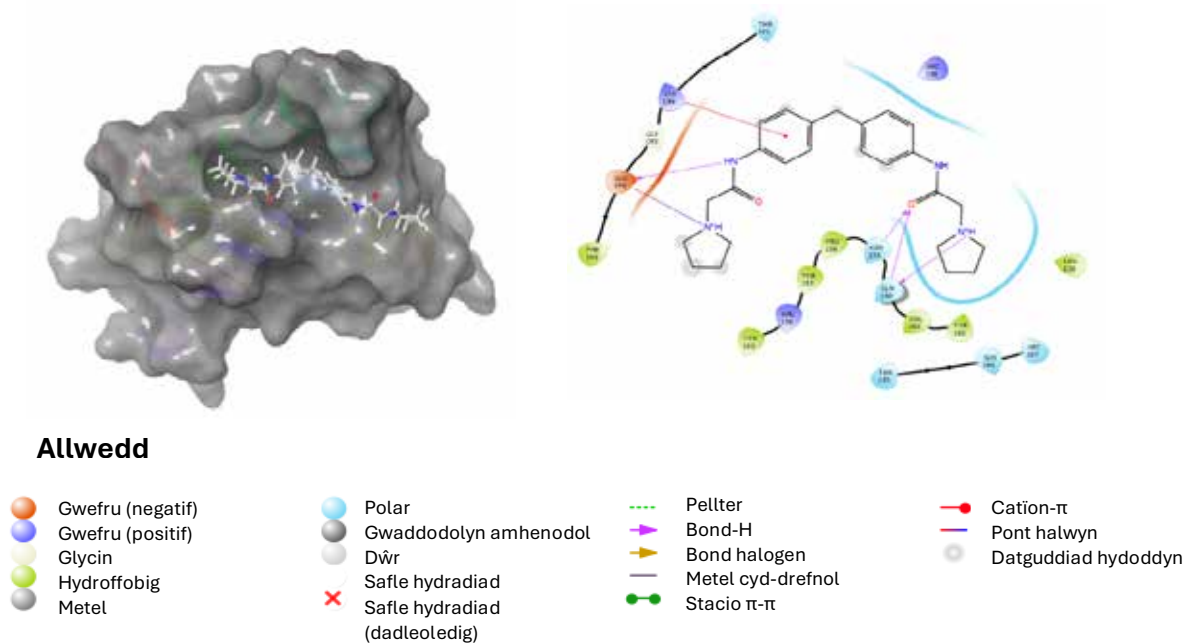
Cemeg gyfrifiadurol

Gall cemeg gyfrifiadurol fodelu sut y gall moleciwl bychan rwymo i brotein, gan ddefnyddio strwythur pelydr-X neu ddata NMR hylifol o'r protein ei hun fel man cychwyn. Mae sawl strwythur crisial ar gael o PrP, ac yn wir, cwblhawyd nifer o astudiaethau cyfrifiadurol eisoes sy'n darogan rhwymo i foleciwlau bychain gan gynnwys GN8 ei hun. Fodd bynnag, penderfynwyd ailadrodd yr arbrofion cyfrifiadurol hyn er mwyn sicrhau ein bod yn atodi'r cysylltydd mewn man synhwyrol.

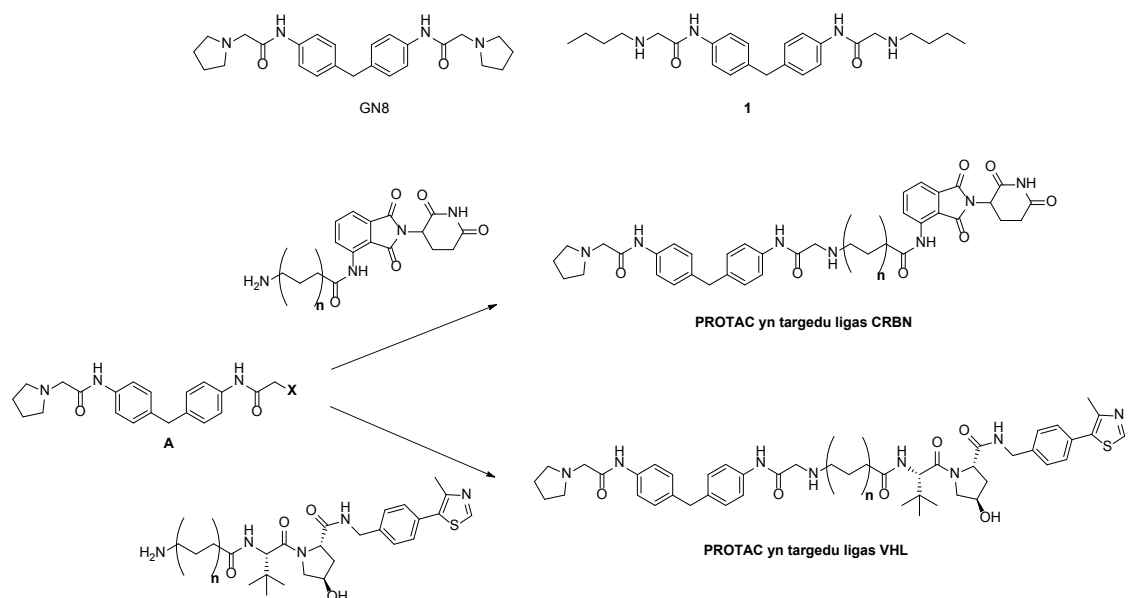
Gan ddefnyddio strwythur PDB:1AG2,³² cyflawnwyd arbrawf Docio Ffit Anwythol gan ddefnyddio meddalwedd Maestro. Dechreuwyd y protocol drwy ddocio GN8 gan ddefnyddio Glide. Er mwyn cynhyrchu *ensemble* o ystumiau ligand, defnyddiwyd radii van der Waals gostyngedig a thorhwynt Coulomb-van der Waals uwch ar gyfer y protein yn rhan o'r weithdrefn. Yn ystod y cam docio, cafwyd gwared dros dro â chadwyni ochr hyblyg iawn. Ar gyfer pob ystum, defnyddiwyd rhagfynegiad strwythur Prime er mwyn lletya'r ligand trwy ailgyfeirio (reorient) canghennau ochr cyfagos ar y protein. Yna, minimeiddiwyd y gwaddodolion hyn a'r ligandau. Yn olaf, ailddociwyd GN8 i strwythur egni isaf cyfatebol y protein, a graddiwyd y cymhlygion a ddilynwyd yn ôl ffwythiant sgorio sy'n cyfuno egniön GlideScore a Prime i roi IFDScore mewn kcal/mol, lle y mae $IFDScore = 1.0 * GlideScore + 0.05 * Prime_Energy$ ar gyfer trachywiredd safonol (SP). Po isaf yw'r IFDScore, y mwyaf sefydlog yw ystum y ligand wrth rwymo i'r protein prion.

Mae ystum egni isaf GN8 a gyfrifwyd yn cyd-fynd â'r hyn a adroddwyd gan eraill. Cyfrifwyd bod GN8 yn rhwymo i'r un 'hot spot' a welwyd mewn nifer o ryngweithiadau pwysig (Ffigur 3). Wrth ystyried lleoliad y cyd-gysylltydd, mae'n rhaid dewis fector sy'n wynebu i ffwrdd o'r protein, h.y. tuag at yr hydoddydd. O edrych ar yr ystum a gyfrifwyd, mae dau safle posibl yn dod i'r amlwg, (1) safle bensylig ganolog GN8 – a fydd yn cael ei drafod mewn erthygl yn y dyfodol agos – a (2) un o garbonau'r grŵp pyrrolidin.

Mae'r moleciwl GN8 ei hun yn gymesur, ac mae creu analogau anghymesur cryn dipyn yn fwy cymhleth. Mae moleciwl **1** wedi'i nodi fel moleciwl sydd â phriodweddau gwrth-prion tebyg i GN8 mewn arbrofion cell, sy'n dangos yn glir nad oes angen i'r grŵp gweithredol amin fod yn un trydyddol (Ffigur 4).³⁰ Hefyd, mae'n rhaid ystyried sut i adeiladu'r PROTACs. Mae PROTACs yn foleciwlau mawr ym myd y moleciwlau bychain sy'n gallu achosi trafferth o ran eu paratoi a'u puro. Gwell felly yw eu creu drwy ddefnyddio adweithiau dibynadwy sydd ond yn creu'r moleciwl mawr yn y cam olaf.



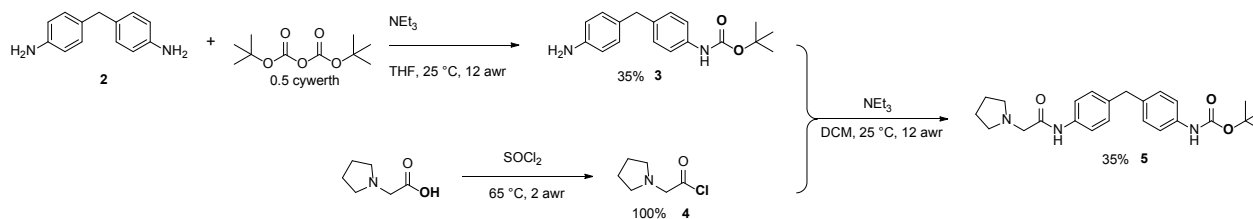
Ffigur 3: Ystum egni isaf GN8 yn rhwymo i PrP, a map rhyngweithiadau rhyngfocilaidd rhwng GN8a PrP



Ffigur 4: (Top) Moleciwlau GN8 ac 1 sydd â phriodweddau gwrth-prion tebyg. (Gwaelod) Sgematig o gam terfynol synthesis dwy gyfres o PROTACs anghymesur gwrth-piron wedi'u seilio ar GN8.

Erbyn hyn, mae'n bosibl archebu adweithyddion cychwynnol sy'n cynnwys y ligand ar gyfer rhwymo i ligas E3 sydd wedi'u cysylltu eisoes â chyd-gysylltyddion o wahanol hydroedd. Yn aml, y grŵp adweithiol amin sy'n bresennol yn y cydgysylltwyr hyn, sy'n golygu bod angen safle electroffilig adweithiol ar yr adweithredyddion eraill. Dyma sylfaen dewis moleciwl **A** fel rhyngolyn hanfodol sy'n cynnwys grŵp ymadael **X**, er mwyn galluogi synthesis y PROTACs anghymesur GN8 gwrth-prion cyntaf erioed.

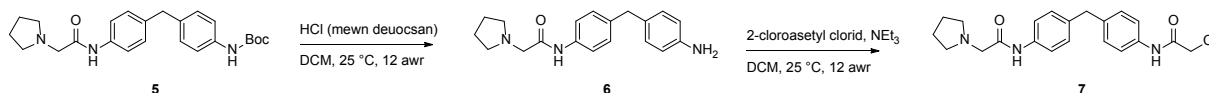
Synthesis



Ffigur 5: Synthesis mono-Boc GN8 5

Cychwynnwyd y synthesis drwy adweithio 4,4'-deuaminodeuffenylmethan **2** gyda hanner cywerth o Boc anhydrid o dan amodau basig. Gwelwyd cymysgedd o'r deunydd cychwynnol, y cynnyrch a ddymunwyd a'r cynnyrch sy'n deillio o adio dau grŵp amddiffynnol Boc. Mae cael y gymysgedd hon yn anochel gan nad yw adio un grŵp Boc yn effeithio ar adweithedd yr amin ar ben draw'r moleciwl. Fe'i golchwyd â hydoddiant o sodiwm hydrogen carbonad, dŵr a heli cyn ei phuro drwy gromatograffaeth ar silica i roi'r cynnyrch **3** â chynnyrch canrannol o 35%. Roedd y data Cyseiniant Magnetig Niwclear (NMR) a'r LC/MS yn cyfateb i'r cynnyrch ac yn cyd-fynd â'r data a gyhoeddwyd.³⁰

Y dilyniant synthetig a gyhoeddwyd eisoes oedd adweithio'r anilin **3** â bromoasetyl bromid, ac yna â chywerth o byrolidin.³⁰ Ein profiad personol yw bod bromoasetyl bromid yn tueddu i greu cynnyrch tywyll, gludiog, na ellid ei buro. Arbrofwyd trwy ychwanegu'r bromoasetyl bromid yn araf, ac ar wahanol dymereddau isel, ond yr un oedd y canlyniad. Er mwyn osgoi'r broblem, dewiswyd paratoi'r clorid asid pyrrolidin-1-yl-asetig **4** drwy wresogi'r asid carbocsylog â gormodedd o thionyl clorid. Ar ôl iddo sychu, fe'i hychwanegwyd at anilin **3** o dan amodau basig er mwyn creu'r cynnyrch a ddymunwyd. Purwyd y cynnyrch drwy gromatograffaeth ar silica i roi'r cynnyrch â chanran cynnyrch **5** o 35%, mewn un cam yn llai na'r hyn a gyhoeddwyd.³⁰

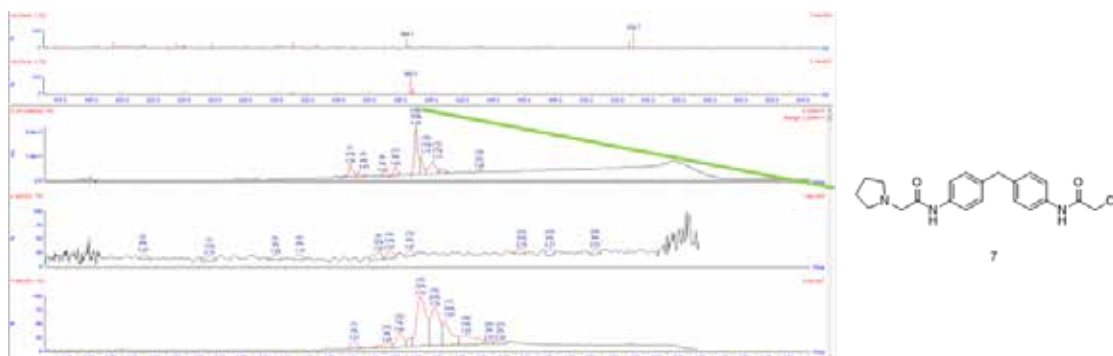


Ffigur 6: Synthesis rhyngolyn GN8 anghymesur 7

Tynnwyd y grŵp Boc i ffwrdd gan ddefnyddio asid hydroclorid mewn deuocsan, ac yn dilyn ei sychu, arunigwyd y cynnyrch fel halwyn hydroclorid oedd â phurdeb digonol ar gyfer y cam olaf o'r dilyniant synthetig (synthetic sequence). Cymerwyd cyfran o'r cynnyrch a'i

olchi â hydoddiant sodiwm hydrogen carbonad i ryddhau'r bas rhydd er mwyn cymharu'r data nodweddiadol â'r hyn a gyhoeddwyd eisoes.

Defnyddiwyd cloroasetyl clorid fel adweithydd ar gyfer y cam olaf er mwyn osgoi'r problemau a welwyd gan bromoasetyl bromid. Gwelwyd tystiolaeth amlwg yng nghromatogram LC/MS o gymysgedd yr adwaith (Ffigur 7) y ffurfiwyd y cynnyrch a ddymunwyd. Gwelwyd tystiolaeth amlwg fod y cynnyrch a ddymunwyd wedi'i greu yng nghromatogram LC/MS o'r adwaith (Ffigur 7).



Ffigur 7: LC/MS yn dangos tystiolaeth o ffurfiad 7 fel prif gynnyrch yr adwaith

Wrth geisio arunigo **7**, gwelwyd ei fod yn ansefydlog mewn amodau golchi â dŵr, hydoddiant sodiwm hydrogen carbonad ac ati. Mae'n debygol mai'r safle electroffilig sy'n adweithiol. Nid yw hyn yn beth drwg; mae'n dangos bod **7** yn rhyngolyn perffaith a fydd yn adweithio yn y modd cywir i adweithyddion addas gan greu'r PROTACs cyntaf anghymesur o GN8.

Casgliad

Yn yr erthygl hon, rydym wedi paratoi sylfaen gadarn i allu greu'r PROTACs cyntaf erioed i dargedu dirywiad y protein prion. Defnyddiwyd cemeg gyfrifiadurol er mwyn deall sut y mae'r moleciwl GN8 yn debygol o rwymo i'r protein prion er mwyn galluogi penderfynu lle i atodi cyd-gysylltydd y PROTAC. Yn sgil hyn, dyluniwyd a syntheseiddiwyd y rhyngolyn GN8 allweddol a fydd yn cael ei ddefnyddio yn y dyfodol i adweithio ag adweithyddion cyd-gysylltydd-ligand ligas i greu'r PROTACs prion cyntaf erioed.

Gwybodaeth ychwanegol

Gwnaethpwyd mesuriadau cromatograffaeth hylif – sbectrometreg màs gan ddefnyddio peiriant Waters™ ACQUITY UPLC-MS â cholofnau ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1.7 µm; 2.1 × 50 mm (Rhif darn: 186002350) neu CORTECS® UPLC® C₁₈ 1.6 µm; 2.1 × 50 mm (Rhif darn: 186007093) gyda system echludydd â graddiant Dŵr/MeOH neu MeCN a naill ai 0.1% NEt₃ neu asid fformig.

Purwyd cynhyrchion drwy gromatograffaeth colofn hylif gan ddefnyddio naill ai:

- A. peiriant Teledyne ISCO CombiFlash® NextGen 300+ (Rhif adnabod: 625250001),
- B. peiriant Biotage® Isolera™ Prime (Rhif darn: ISO-PSV) gyda cholofn gel silica priodol.
- C. peiriant Teledyne ISCO ACCQPrep® HP125 Premium (Rhif adnabod: 625230039R) gyda naill ai colofn RediSep® C₁₈ Prep HPLC Column, 150 × 20mm (100 Å, 5 µm) (Rhif darn: 692203810), neu Gemini® 5 µm NX-C₁₈ 110 Å, LC Column 150 × 21.2 mm AXIA™ (Rhif darn: 00F-4454-P0-AX).

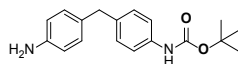
Gwnaethpwyd mesuriadau cyseiniant magnetig niwclear (NMR) gan ddefnyddio Bruker Ascend™ 500 MHz/54 mm neu Bruker UltraShield™ 400 MHz/54 mm.

Defnyddiwyd peiriant Waters™ Xevo™ G2-XS QToF ar gyfer mesuriadau sbectrometreg màs cydraniad uchel (*Electrospray ionization*/ESI).

Prynwyd adweithyddion ac hydoddyddion gan y cyflenwyr canlynol: Merck (Sigma-Aldrich® gynt), Fluorochem, Tocris™ (cwmni Biotechnique®), Thermo Fisher Scientific (Alfa Aesar® gynt), Apollo Scientific, Activate Scientific. Ni phurwyd y deunyddiau ymhellach cyn eu defnyddio yn yr adweithiau.

Synthesis

Tert-bwtyl *N*-[4-[(4-aminoffenyl)methyl]ffenyl]carbamad (**3**)³⁰



Ychwanegwyd hydoddiant o deu-*tert*-bwtyl deucarbonad (55.04 g, 25.22 mmol) mewn THF (75 mL) ar dymheredd ystafell at hydoddiant o 4,4'-deuaminodeuffenylmethan (10 g, 50.44 mmol) a thriethylamin (3.52 mL, 25.22 mmol) mewn THF (250 mL), ac fe'i cymysgwyd ar y tymheredd hwnnw am 12 awr. Tynnwyd yr hydoddydd o'r gymysgedd drwy sychu o dan wasgedd is. Ailhydoddwyd y gwaddod mewn ethyl asetat (1 × 150 mL) a golchwyd yr hydoddiant â hydoddiant dyfrllyd crynodedig o NaHCO₃ (1 × 100 mL), dŵr (1 × 100 mL) a heli (1 × 100 mL). Sychwyd yr haen organig o dan Na₂SO₄, fe'i hidlwyd, ac fe'i crynhowyd o dan wasgedd is. Purwyd y gwaddod drwy gromatograffaeth golofn awtomatig ar gel silica

gan ddefnyddio PE/AcOEt + 1% NEt₃ fel echludydd i roi *tert*-bwtyl *N*-[4-[(4-aminoffenyl)methyl]ffenyl]carbamad (5.466 g, 17.88 mmol, 35% cynnyrch) fel soled di-liw.

UPLC-MS (basig): ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1.7µm; 1.85 mun; m/z 243.2 [M-^tBu+H]⁺ (^tBu yn absennol)

¹ H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.19 (s, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.06 – 7.00 (m, 2H), 6.84 – 6.79 (m, 2H), 6.49 – 6.44 (m, 2H), 4.83 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 1.45 (s, 9H).

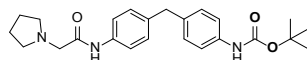
¹³ C NMR (126 MHz, DMSO) δ 152.8, 146.6, 146.5, 137.2, 136.0, 129.0, 128.6, 128.5, 118.2, 114.0, 78.8, 39.8, 28.1.

Pyrolidin-1-yl-asetyl clorid (**4**)



Gwresogwyd asid pyrolidin-1-yl-asetig (676 mg, 5.23 mmol) mewn thionyl clorid (2.0 mL, 27.42 mmol) ar 65°C am 2 awr. Gwardwyd y thionyl clorid gormodol drwy anweddu o dan wasgedd is gan adael pyrolidin-1-yl-asetyl clorid crai. Ailhydoddwyd y pyrolidin-1-yl-asetyl clorid mewn DCM (20 mL).

N-[4-[[4-[(2-pyrolidin-1-ylasetyl)amino]ffenyl]methyl]ffenyl]carbamad (**5**)³⁰

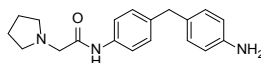


Ychwanegwyd 2-pyrolidin-1-ylasetyl clorid (50 mL, 20 mmol) fesul diferynn at hydoddiant wedi ei oeri i 0 °C o *tert*-bwtyl *N*-[4-[(4-aminoffenyl)methyl]ffenyl]carbamad (5.54 g, 18.25 mmol) a triethylamin (6.36 mL, 45.63 mmol) mewn DCM (50 mL), ac fe'i cymysgwyd dros nos gan adael iddo gyrraedd tymheredd ystafell. Arllwyswyd y gymysgedd i hydoddiant dyfrllyd o NaHCO₃ ac addaswyd y pH i ~9 cyn echdynnu gyda DCM (1 x 50 mL) a'i olchi gyda dŵr (1 x 100 mL) a heli (1 x 100 mL). Sychwyd yr haen organig gyfunol dros MgSO₄, fe'i hidlwyd ac fe'i crynhowyd o dan wasgedd is cyn puro drwy gromatograffaeth golofn awtomatig gan ddefnyddio DCM : 10% MeOH + 1% NEt₃ (1/0 i 0/1) fel echludydd i roi *tert*-bwtyl *N*-[4-[[4-[(2-pyrolidin-1-ylasetyl)amino]ffenyl]methyl]ffenyl]carbamad (2.743 g, 6.36 mmol, 35% cynnyrch) fel soled brown.

UPLC-MS (basig): ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1.7µm; Rt = 1.93 mun; m/z 410.3 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.66 (s, 1H), 7.56 – 7.49 (m, 2H), 7.27 – 7.22 (m, 2H), 7.12 – 7.08 (m, 2H), 7.08 – 7.05 (m, 2H), 6.45 (s, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.05 – 2.94 (m, 4H), 1.94 (p, *J* = 3.3 Hz, 4H), 1.50 (s, 9H).

N-[4-[(4-aminoffenyl)methyl]ffenyl]-2-pyrolidin-1-yl-asetamid deuhydroclorid (**6**)



Ychwanegwyd asid hydroclorig (6 mL, 24 mmol) (4 M mewn deuocsan), fesul diferyn ar dymheredd ystafell, at hydoddiant o *N*-[4-[[4-[(2-pyrolidin-1-ylasetyl)amino]ffenyl]methyl]ffenyl]carbamad (2.74 g, 6.36 mmol) mewn DCM (25 mL). Fe'i cymysgwyd dros nos ar y tymheredd hwn. Monitrowyd yr adwaith drwy UPLC-MS tan iddo gyrraedd ei derfyn. Fe'i crynhowyd o dan wasgedd gostyngedig i roi *N*-[4-[(4-aminoffenyl)methyl]ffenyl]-2-pyrolidin-1-yl-asetamid dehydroclorid (2.484 g, 6.172 mmol, 97% cynnyrch) crai fel soled brown.

UPLC-MS (basig): ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1.7µm; Rt = 1.67 mun; m/z 310.2 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.84 (s, 1H), 10.34 (s, 4H), 7.58 – 7.51 (m, 2H), 7.33 – 7.26 (m, 4H), 7.23 – 7.16 (m, 2H), 4.23 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 3.64 – 3.04 (m, 4H), 2.06 – 1.81 (m, 4H). Mae nifer y protonau yn awgrymu halwyn anilin. (Ychydig o ddeuocsan yn bresennol. DMF yn bresennol hefyd, er na chafodd ei ddefnyddio yn yr un o'r camau – mwy na thebyg o ganlyniad i offer brwnt.)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163.3, 141.1, 136.5, 136.3, 129.9, 129.8, 129.1, 123.1, 119.6, 55.7, 54.0, 22.8. (Mwy na thebyg, mae'r brig ar ~40.0 ppm yn gorgyffwrdd â brig yr hydoddydd, sy'n cynrychioli'r carbon CH₂ sy'n pontio rhwng y ddwy fodrwy aromatig).

Er mwyn cael y cynnyrch ar ffurf dihalwyn, fe'i golchwyd mewn hydoddiant dyfrllyd o NaHCO₃ (20 mL) ac fe'i hechdynnwyd gyda DCM (1 × 20 mL). Cafodd ei sychu dros MgSO₄, ei hidlo, a'i buro drwy gromatograffaeth colofn awtomatig gan ddefnyddio DCM : 10% MeOH + 1% NEt₃ (1/0 i 0/1) fel echludydd i roi *N*-[4-[(4-aminoffenyl)methyl]ffenyl]-2-pyrolidin-1-yl-asetamid (168 mg, 0.542 mmol, 9% cynnyrch) fel soled brown golau.

UPLC-MS (basig): ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1.7µm; Rt = 1.60 mun; m/z 310.2 [M+H]⁺

¹H CNM (500 MHz, CDCl₃) δ 9.05 (s, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.17 – 7.11 (m, 2H), 6.98 – 6.92 (m, 2H), 6.65 – 6.57 (m, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.62 – 3.35 (m, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.73 – 2.65 (m, 4H), 1.90 – 1.80 (m, 4H).

¹³C CNM (126 MHz, CDCl₃) δ 169.0, 144.6, 137.8, 135.7, 131.2, 129.7, 129.4, 119.73, 115.4, 59.8, 54.6, 40.5, 24.1.

N-(4-(4-((3-cloro-2-ocsopropyl)amino)benayl)ffenyl)-2-(pyrolidin-1-yl)asetamid (**6**)



Ychwanegwyd 2-pyrolidin-1-ylasetyl clorid **4** (50 mL, 20 mmol) fesul diferyn at hydoddiant wedi ei oeri i 0 °C o *tert*-bwtyl *N*-[4-[(4-aminoffenyl)methyl]ffenyl]carbamad (185 mg, 0.62 mmol) mewn DCM (4 mL), ac fe'i cymysgwyd dros nos gan adael iddo gyrraedd tymheredd ystafell. Cymerwyd sampl ar gyfer dadansoddiad LC/MS ac arllwyswyd y gymysgedd i mewn i hydoddiant dyfrllyd o NaHCO₃ ac addaswyd y pH i ~9 cyn echdynnu'r deunydd organig gyda DCM (1 × 50 mL) a'i olchi gyda dŵr (1 × 100 mL) a heli (1 × 100 mL). Gwelwyd tystiolaeth (LC/MS) o bresenoldeb y cynnyrch cyn ei drin â dŵr. Mae adweithedd **7** â dŵr yn arddangos ei adweithedd tebygol yn erbyn aminau.

Diolchiadau

Hoffwn ddiolch i'r Coleg Cymraeg Cenedlaethol am yr ysgoloriaeth a wnaeth alluogi gwneud y gwaith ymchwil ac i Dr Ben Wahab am ei gymorth yn ystod yr arbrofion cemeg gyfrifiadurol.

Talfyriadau

ALS	<i>Amyotrophic lateral sclerosis</i> – Sglerosis ochrol amyotroffig
CMN	<i>Nuclear magnetic resonance (NMR)</i> – Cyseiniant magnetig niwclear
ESI	<i>Electrospray ionisation</i> – Ïoneiddiad electrochwistrelliad
FTD	<i>Frontotemporal dementia</i> – Dementia blaen-arleisiol
GN8	Enw'r moleciwl bychan dan sylw
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> – Cromatograffaeth hylif perfformiad uchel
IFD	<i>Induced fit docking</i> – Docio ffit anwythol
LC/MS	<i>Liquid chromatography/mass spectrometry</i> – Cromatograffaeth hylif/spectrometreg màs
LYTAC	<i>LYsosome TArgeting Chimera</i>
PDB	<i>Protein data bank</i> – Banc data protein
PROTAC	<i>PROteolysis TArgeting Chimera</i>
PrP	<i>Native prion protein</i> – Y protein prion brodorol
PrP ^{Sc}	<i>Infectious misfolded prion protein</i> – Y protein prion camblygedig heintus
RNAi	<i>RNA interference</i> – Ymyraeth RNA
SAR	<i>Structure-activity relationship</i> – Perthynas strwythur-actifedd
Sc	<i>Scrapie</i> – Clefyd y crafu
SP	<i>Standard precision</i> – Trachywiredd safonol
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> – Cyseiniant plasmonau arwyneb
UPLC-MS	<i>Ultra-performance liquid chromatography – mass spectrometry</i> – Cromatograffaeth hylif perfformiad uwch – spectrometreg màs

Termau

EC ₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i> – Crynodiad effeithiol hanner macsimaid Mae EC ₅₀ yn fesur o grynodiad cyffur sy'n anwytho ymateb biolegol hanner ffordd rhwng y gwaelodlin a'r macsimwm ar ôl cyfnod penodol.
<i>in vitro</i>	Astudiaethau a gynhelir gan ddefnyddio cydrannau o organebau sydd wedi eu harunigo o'u hamgylchedd biolegol, e.e. micro-organebau, celloedd neu foleciwlau biolegol.
<i>in vivo</i>	Astudiaethau lle y profir effeithiau amrywiaeth o endidau biolegol neu gemegol ar organebau neu gelloedd cyfan byw, gan amlaf anifeiliaid, pobl a phlanhigion, yn hytrach nag echdyniad meinwe neu organeb farw.

K_d	<i>Dissociation constant</i> – Cysonyn daduniad Mewn cemeg, biocemeg a ffarmacoleg, mae cysonyn daduniad yn fath o gysonyn ecwilibriwm sy'n mesur tuedd gwrthrych i wahanu gan ffurfio cydrannau llai mewn modd cildroadwy, e.e. pan fydd cymhlygyn yn gwahanu i ffurfio moleciwlau cydrannol, neu pan fydd halwyn yn gwahanu i ffurfio ïonau cydrannol.
pH	<i>Potential of hydrogen</i> – Potensial hydrogen Mewn cemeg, mae pH yn raddfa logariddmig sy'n dynodi pa mor asidig neu fasig yw hydoddiant. Mae gan hydoddiannau asidig pH is na hydoddiannau basig neu alcaliaidd. Mae gan hydoddiannau niwtral pH o 7.

Cemegion

AcOEt	<i>Ethyl acetate</i> – Ethyl asetad
Boc	<i>tert-Butyloxycarbonyl protecting group</i> – Grŵp amddiffynnol tert-bwtylocsicarbonyl
$CDCl_3$	<i>Deuterated chloroform</i> – Clorofform diwteredig
DCM	<i>Dichloromethane</i> – Deucloromethan
DMF	<i>Dimethylformamide</i> – Deumethylfformamid
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> – Deumethyl sylffocsid
$DMSO-d_6$	<i>Deuterated dimethyl sulfoxide</i> – Deumethyl sylffocsid diwteredig
H	<i>Hydrogen</i> – Hydrogen
HCl	<i>Hydrochloric acid</i> – Asid hydroclorig
MeCN	<i>Acetonitrile</i> – Asetonitril
MeOH	<i>Methanol</i> – Methanol
$MgSO_4$	<i>Magnesium sulfate</i> – Magnesiwm sylffad
$NaHCO_3$	<i>Sodium bicarbonate</i> – Sodiwm deucarbonad
NEt_3	<i>Triethylamine</i> – Triethylamin
PE	<i>Petroleum ether 35-60 °C</i> – Petroliwm ether â ffracsiynau sy'n berwi rhwng 35–60 °C
^t Bu	<i>tertiary Butyl group</i> – Grŵp bwtyl trydyddol
THF	<i>Tetrahydrofuran</i> – Tetrahydroffwrn

Unedau

Å	<i>Angstrom / 10⁻¹⁰ metr</i> – Angstrom / 10 ⁻¹⁰ metr
°C	<i>Degrees Celsius</i> – Gradd Celsius
kcal	<i>Kilocalorie</i> – Cilocalori
mg	<i>Milligram</i> – Miligram
MHz	<i>MegaHertz</i> – MegaHertz
mL	<i>Millilitre</i> – Mililitr
mm	<i>Millimetre</i> – Milimetr
mmol	<i>Millimole</i> – Milimôl

mun	<i>Minute</i> – Munud
m/z	<i>Mass over charge ratio</i> – Cymhareb màs i wefr
µm	<i>Micrometer</i> – Micrometr

Allwedd Cyseiniant Magnetig Niwclear (CMN)

¹³ C	<i>Carbon-13 isotope</i> – Isotop carbon-13
¹ H	<i>Hydrogen-1 isotope</i> – Isotop hydrogen-1
δ/ppm	<i>Chemical shift in parts per million</i> – Shiftt gemegol wedi'i fesur mewn rhan bob miliwn
<i>J</i>	<i>Spin-spin coupling</i> – Cyplu sbin-sbin
s	<i>Singlet</i> – Sengled
d	<i>Doublet</i> – Dwbled
p	<i>Pentet</i> – Pented
m	<i>Multiplet</i> – Amled

Geirfa

Gwaelodlin – *Baseline*

Pwynt mewn arbrawf pan nad yw'r newidyn annibynnol yn bresennol. Mae'r data sy'n cael eu casglu yn cynnwys y gwaelodlin yn ogystal â'r newidyn. Dyma yw sail cyfrifo'r newidyn annibynnol.

Camblygu – *Misfold*

Ystyrir bod protein yn gamblygedig os nad yw'n gallu cyrraedd ei gydffurfiad arferol cynhenid. Gall hyn fod oherwydd mwtaniadau yn y dilyniant asidau amino, neu oherwydd amhariad ar y broses blygu arferol gan ffactorau allanol.

Deuweithredol – *Bifunctional*

Mewn cemeg, deuweithrededd yw presenoldeb dau grŵp gweithredol mewn moleciwl.

Cydffurfiad – *Conformation*

Trefn ofodol atomau o fewn moleciwl. Gall yr atomau fabwysiadu cydffurfiadau gwahanol trwy gylchdroi o amgylch bondiau sengl. Y cydffurfiad sy'n rhoi siâp i foleciwl.

Anghyffuradwy – *Undruggable*

Priodolir y term 'undruggable' i brotein targed â rhyngwynebau gweithredol gwastad sydd heb bocedi ar gyfer rhyngweithiad â ligand.

Gwahanfur gwaed-ymennydd – *Blood-brain barrier*

Mae'r gwahanfur-gwaed ymennydd yn bilen led-athraidd rhwng y gwaed ac interstitiwm yr ymennydd, sy'n gadael pibellau gwaed cerebrol i reoleiddio symudiad moleciwlau ac ionau rhwng y gwaed a'r ymennydd.

Crynnodiad therapiwtig – *Therapeutic concentration*

Crynnodiad cyffur sy'n gallu trin clefyd yn effeithlon heb gael effaith docsig.

Poced lipoffilig – *Lipophilic pocket*

Rhan o brotein sydd â chasgliad o grwpiau gweithredol ag affinedd i foleciwlau lipoffilig.

Torbwynt – *Cut-off*

Gwaddod asid amino – *Amino acid residue*

Asid amino sy'n rhan o brotein.

'Hot spot

Y safle ar y protein PrP sydd â'r nifer fwyaf o ryngweithiadau â moleciwlau bychain.

Y rhan o PrP sy'n fwyaf tebygol o ryngweithio a/neu rwymo â PROTAC wedi ei seilio ar y moleciwl bychan, GN8.

Fector – *Vector*

Cyd-gysylltydd – *Linker*

Rhan o'r PROTAC sy'n cysylltu'r darn sy'n rhwymo i'r protein targed (PrP) a'r ligand ligas E3.

Rhyngfoleciwlaidd – *Intermolecular*

Grŵp gweithredol – *Functional group*

Mewn cemeg, mae grŵp gweithredol yn amnewidyn neu foieti (parth) o fewn moleciwl sy'n achosi adweithiau cemegol nodweddiadol y moleciwl. Mae pob grŵp gweithredol yn adweithio yn yr un modd, neu mewn modd tebyg, hyd yn oed os yw gweddill y moleciwl yn wahanol.

Adweithydd – *Reactant*

Sylwedd neu gyfansoddyn sy'n cael ei ddinistrio yn ystod adwaith gemegol.

Adweithredydd – *Reagent*

Sylwedd neu gyfansoddyn sy'n cael ei ychwanegu at system er mwyn achosi adwaith cemegol, neu er mwyn profi bod un yn digwydd.

Rhyngolyn – *Intermediate*

Mewn cemeg, mae rhyngolyn adwaith yn endid moleciwlaidd sy'n ymddangos o fewn dilyniant adwaith cemegol fesul cam.

Grŵp amddiffyn – *Protecting group*

Mae grŵp amddiffyn yn cael ei ychwanegu dros dro i leihau adweithedd er mwyn sicrhau na fydd y grŵp gweithredol sy'n cael ei amddiffyn yn adweithio yn ystod y cam hwnnw o'r broses synthetig.

Dadamddiffyn – *Deprotect*

Y broses o newid grŵp amddiffyn yn ôl i fod yn grŵp gweithredol drwy adwaith gemegol.

Canllawiau Lipinski

Canllawiau er mwyn rhagfynegi a yw cyfansoddyn cemegol yn debygol o fod yn gyffur y gellir ei gymryd gan glaf trwy'r geg.

Yn gyffredinol, dynoda canllawiau Lipinski nad yw cyffur sy'n cael ei lyncu yn mynd yn groes i fwy nag un o'r meini prawf canlynol:

- Dim mwy na 5 cyfrannwr bond hydrogen
- Dim mwy na 10 derbyniwr bond hydrogen
- Mâs moleciwlaidd llai na 500 Dalton
- Cyfernod dosrannu (*partition coefficient*) octanol-dŵr ($\log P$) llai na 5.

Gweler 'Datblygu Therapiau i Drin Clefydau Prion' am fanylion pellach.²³

Strwythur Crisial Pelydr-X – *X-ray Crystal Structure*

Strwythur moleciwlaidd yn deillio o ddadansoddiad y data pan ddifreithir golau pelydrau X gan grisial.

Llyfryddiaeth

1. Johnson, R. T. (2005), Prion diseases, *The Lancet Neurology*, 4, 635–42.
2. Noor, H., Baqai, M. H., Naveed, H., Naveed, T., Rehman, S. S., Aslam, M. S., Lakdawala, F. M., Memon, W. A., Rani, S., Khan, H., Imran, A. a Farooqui, S. K. (2024), 'Creutzfeldt-Jakob disease: A comprehensive review of current understanding and research', *Journal of the Neurological Sciences*, 467, 123293.
3. Lugaresi, E., a Provini, F. (2007), Fatal familial insomnia and agrypnia excitata, *Rev Neurol Dis*, 4, 145–52.
4. Liberski, P. P. (2012), 'Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease', yn Ahmad, S. I. (gol.), *Neurodegenerative Diseases* (New York, NY: Springer), tt. 128–37.
5. Alarcon, P., Wall, B., Barnes, K., Arnold, M., Rajanayagam, B., a Guitian, J. (2023), 'Classical BSE in Great Britain: Review of its epidemic, risk factors, policy and impact', *Food Control*, 146, 109490.
6. Banerjee, G., Farmer, S. F., Hyare, H., Jaummuktane, Z., Mead, S., Ryan, N. S., Schott, J. M., Werring, D. J., Rudge, P., a Collinge, J. (2024), 'Iatrogenic Alzheimer's disease in recipients of cadaveric pituitary-derived growth hormone', *Nature Medicine*, 30, 394–402.
7. Münch, C., O'Brien, J. a Bertolotti, A. (2011), 'Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 3548–53.
8. Hock, E. M., a Polymenidou, M. (2016), 'Prion-like propagation as a pathogenic principle in frontotemporal dementia', *Journal of Neurochemistry*, 138 (1), 163–83.
9. Beck, H., Härter, M., Haß, B., Schmeck, C., a Baerfacker, L. (2022), 'Small molecules and their impact in drug discovery: A perspective on the occasion of the 125th anniversary of the Bayer Chemical Research Laboratory', *Drug Discovery Today*, 27, 1560–74.
10. Ghaemmaghani, S., Russo, M., a Renslo, A. R. (2014), 'Successes and challenges in phenotype-based lead discovery for prion diseases', *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 6919–29.
11. Barreca, M. L., Iraci N., Biggi S., Cecchetti V., a Biasini E. (2018), 'Pharmacological Agents Targeting the Cellular Prion Protein', *Pathogens*, 7, 27.

12. Kamatari, Y. O., Hayano, Y., Yamaguchi, K., Hosokawa-Muto, J., a Kuwata, K. (2013), 'Characterizing antiprion compounds based on their binding properties to prion proteins: Implications as medical chaperones', *Protein Science*, 22, 22–34.
13. Berry, D. B., Lu, D., Geva, M., Watts, J. C., Bhardwaj, S., Oehler, A., Renslo, A. R., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., a Giles, K. (2013), 'Drug resistance confounding prion therapeutics', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, E4160–9.
14. Churcher, I. (2018), 'Protac-Induced Protein Degradation in Drug Discovery: Breaking the Rules or Just Making New Ones?', *Journal of Medicinal Chemistry*, 61, 444–52.
15. Ramadas, B., Kumar Pain, P., a Manna, D. (2021), 'LYTACs: An Emerging Tool for the Degradation of Non-Cytosolic Proteins', *ChemMedChem*, 16, 2951–3.
16. Sasso, J. M., Tenchov, R., Wang, D., Johnson, L. S., Wang, X., a Zhou, Q. A. (2023), 'Molecular Glues: The Adhesive Connecting Targeted Protein Degradation to the Clinic', *Biochemistry*, 62, 601–23.
17. Xie, S., Zhu, J., Li, J., Zhan, F., Yao, H., Xu, J., a Xu, S. (2023), Small-Molecule Hydrophobic Tagging: A Promising Strategy of Druglike Technology for Targeted Protein Degradation, *Journal of Medicinal Chemistry*, 66, 10917–33.
18. Thomas, B. ab. I., Lewis, H. L., Jones D. H., a Ward, S. E., 'Central Nervous System Targeted Protein Degradation', *Biomolecules*, 2023, 13, 1164.
19. White, M. D., Farmer, M., Mirabile, I., Brandner, S., Collinge, J., a Mallucci, G. R. (2008), 'Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10238–43.
20. Perrier, V., Solassol, J., Crozet, C., Frobert, Y., Mourton-Gilles, C., Grassi, J., a Lehmann, S. (2004), 'Anti-PrP antibodies block PrP^{Sc} replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPC degradation', *Journal of Neurochemistry*, 89, 454–63.
21. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., a Feeney, P. J. (1997), 'Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3–25.
22. Wager, T. T., Hou, X., Verhoest, P. R., a Villalobos, A. (2016), 'Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery', *ACS Chemical Neuroscience*, 7, 767–75.
23. Thomas, B ab I., 'Datblygu therapïau i drin clefydau prion', traethawd PhD, Prifysgol Caerdydd, Caerdydd, 2023.
24. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., a Feeney, P. J. (2001), 'Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3–26.
25. Liu, X., Kalogeropoulou, A. F., Domingos, S., Makukhin, N., Nirujogi, R. S., Singh, F., Shpiro, N., Saalfrank, A., Sammler, E., Ganley, I. G., Moreira, R., Alessi, D. R., a Ciulli, A. (2022), 'Discovery of XL01126: A Potent, Fast, Cooperative, Selective, Orally Bioavailable, and Blood–Brain Barrier Penetrant PROTAC Degradation of

- Leucine-Rich Repeat Kinase 2', *Journal of the American Chemical Society*, 144, 16930–52.
26. Thomas, B., ab I. (2023), 'Clefydau Prin, Clefydau Prion, a Chwilio am Wellhad', *Gwerddon Fach*, <<https://golwg.360.cymru/gwerddon/2115441-clefydau-prin-clefydau-prion-chwilio-wellhad>> [Cyrchwyd: 3 Mehefin 2024].
27. Baral, P. K., Swayampakula, M., Rout, M. K., Kav, N. N. V., Spyropoulos, L., Aguzzi, A., a James, M. N. G. (2014), Structural Basis of Prion Inhibition by Phenothiazine Compounds, *Structure*, 22, 291–303.
28. Stincardini, C., Massignan, T., Biggi, S., Elezgarai, S. R., Sangiovanni, V., Vanni, I., Pancher, M., Adami, V., Moreno, J., Stravalaci, M., Maietta, G., Gobbi, M., Negro, A., Requena, J. R., Castilla, J., Nonno, R., a Biasini, E. (2017), 'An antipsychotic drug exerts anti-prion effects by altering the localization of the cellular prion protein', *PLoS One*, 12, e0182589.
29. Kuwata, K., Nishida, N., Matsumoto, T., Kamatari, Y. O., Hosokawa-Muto, J., Kodama, K., Nakamura, H. K., Kimura, K., Kawasaki, M., Takakura, Y., Shirabe, S., Takata, J., Kataoka, Y., a Katamine, S. (2007), 'Hot spots in prion protein for pathogenic conversion', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 11921–6.
30. Kimura, T., Hosokawa-Muto, J., Kamatari, Y. O., a Kuwata, K., 'Synthesis of GN8 derivatives and evaluation of their antiprion activity in TSE-infected cells' (2011), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 1502–7.
31. Zhou, S., Liu, X., An, X., Yao, X. a Liu, H. (2017), 'Molecular Dynamics Simulation Study on the Binding and Stabilization Mechanism of Antiprion Compounds to the "Hot Spot" Region of PrPC', *ACS Chemical Neuroscience*, 8, 2446–56.
32. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., a Wüthrich, K. (1996), 'NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121–231)', *Nature*, 382, 180–2.