STRESZCZENIE

Nadmierna aktywacja plazminogenu do plazminy prowadzi do zaburzeń hemostazy, ale także innych powikłań. Przekroczony fizjologiczny poziom plazminy prowadzi do zaburzeń koagulacji, utrudnień w gojeniu się ran, w przebudowie tkanek, w procesie embriogenezy i implantacji blastocysty. Dodatkowo zaburzone są procesy regeneracji mięśni oraz wzrostu neuronów. Plazmina odpowiada również za produkcję β-amyloidu w chorobie Alzheimera. Wpływa na procesy powstawania i rozwoju nowotworów. Obecnie nie ma skutecznych leków o wysokiej specyficzności i małej dawce leczniczej działających, jako inhibitory centrum aktywnego plazminy, a także struktur kringlowych. Zarejestrowane są tylko dwa leki o działaniu antyfibrynolitycznym kwas ε-aminokapronowy (EACA) oraz kwas traneksamowy (AMCHA) oraz jeden lek działający na centrum aktywne, pochodzący z trzustek bydlęcych, zwany aprotyniną.

W niniejszej pracy zsyntetyzowano 15 nowych peptydów, pochodnych kwasu ε-aminokapronowego, zawierających znany fragment -Ala-Phe-Lys-, o powinowactwie do plazminy. Syntezę przeprowadzono na fazie stałej. Otrzymano następujące związki: H-Phe-Lys-EACA-X, H-*D*-Ala-Phe-Lys-EACA-X, H-Ala-Phe-Lys-EACA-X, H-*D*-Ala-Phe-EACA-X i H-Ala-Phe-EACA-X, gdzie odpowiednio X = OH, NH_2 i $NH-(CH_2)_5-NH_2$.

Uzyskano peptydy o wysokim stopniu czystości potwierdzonym przy użyciu HPLC oraz spektrometrii masowej. Badane związki hamowały aktywność plazminy ocenianej metodą amidolityczną przy użyciu syntetycznego substratu chromogennego. Wszystkie peptydy, poza zawierającymi sekwencję H-Ala-Phe-EACA-X, wykazały wyższą inhibicję wobec plazminy niż EACA. Najbardziej aktywnym i selektywnym inhibitorem plazminy okazał się związek H-*D*-Ala-Phe-Lys-EACA-NH_2, który hamował amidolityczną aktywność plazminy (IC_{50} = 0.02 mM) z działaniem antyfibrynolitycznym słabszym od EACA. Kilka z nich wykazało także zdolność hamowania tPA oraz uPA. Otrzymane peptydy, nie wpływały na przeżywalność komórek fibroblastów, komórek nowotworowych okrężnicy linii DLD-1, piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231. Otrzymane rezultaty dają możliwość wykorzystania związku H-*D*-Ala-Phe-Lys-EACA-NH_2, jako selektywnego inhibitora plazminy o potencjalnym działaniu leczniczym.

ABSTRACT

Excessive activation of plasminogen to plasmin results in disorders of hemostasis, as well as other complications. Exceeded physiological levels of plasmin lead to disruption of the coagulation, difficulties in wound healing, tissue remodeling, and in the process of embryogenesis and blastocyst implantation. In addition, processes of muscle regeneration and growth of neurons are impaired. Plasmin is also responsible for the production of β-amyloid in Alzheimer's disease. It has also influence on the processes associated with formation and development of tumors. Currently there are no effective drugs with high specificity and therapeutic low-dose as inhibitors of the active site of plasmin and the kringle structures. They are registered only two drugs with the antifibrinolytic activity: ε-aminocaproic acid (EACA) and tranexamic acid (AMCHA) and one drug acting at the active center, isolated from the pancreas of bovine, known as aprotinin.

In this study 15 new peptide derivatives of ε-aminocaproic acid (EACA), containing known fragment -Ala-Phe-Lys- with the affinity for plasmin have been synthesized. The synthesis was carried out on a solid phase. The following compounds have been synthesized: H-Phe-Lys-EACA-X, H-*D*-Ala-Phe-Lys-EACA-X, H-Ala-Phe-Lys-EACA-X, H-*D*-Ala-Phe-EACA-X) and H-Ala-Phe-EACA-X, where X = OH, NH_2 and NH-$(CH_2)_5$-NH_2.

Peptides with the high purity confirmed by HPLC and mass spectrometry have been obtained. The tested compounds have inhibited the plasmin amidolytic activity using a synthetic chromogenic substrate. All peptides, except containing sequence H-Ala-Phe-EACA-X, where X = -OH, -NH_2, -NH-$(CH_2)_5$-NH_2, have shown higher inhibition against plasmin than EACA. The most active and selective inhibitor of plasmin was the compound H-*D*-Ala-Phe-Lys-EACA-NH_2, which inhibited the amidolytic activity of plasmin (IC_{50} = 0.02 mM) with the antifibrinolytic activity weaker than EACA. Some of them have also inhibited activities of thrombin, tPA, and uPA. The resulting peptides did not affect the viability of fibroblast cells, colon cancer cell line DLD-1, breast MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. The obtained results make it possible to use the compound H-*D*-Ala-Phe-Lys-EACA-NH_2, as selective—plasmin inhibitor with therapeutic potential.