

Prof. dr hab. Monika Wujec

Lublin, 20.03.2016 r.

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Macieja Purwina wykonanej w Zakładzie Chemii Organicznej
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu
Medycznego w Białymstoku

Dynamiczny rozwój gospodarczy, coraz większe uprzemysłowienie, wiążące się z tym skażenie środowiska, współczesny tryb życia mieszkańców aglomeracji miejskich to wszystko doprowadziło do bardzo szybkiego rozwoju chorób nazywanych cywilizacyjnymi. Zaliczamy do nich między innymi choroby układu krążenia, w tym chorobę niedokrwienną serca, nadciśnienie tętnicze, miażdżycę, choroby nowotworowe, cukrzycę, otyłość, choroby układu oddechowego i inne. Większość tych chorób jest ściśle związana z układem hemostazy. Spośród głównych elementów hemostazy można wymienić płytki krwi, ścianę naczyń krwionośnych, osoczowy układ krzepnięcia, endogenne inhibitory krzepnięcia i układ fibrynolizy.

Funkcjonowanie układu fibrynolitycznego opiera się na proteolitycznej aktywności plazminy, odpowiadającej przede wszystkim za usuwanie fibryny, przez przekształcanie jej do produktów degradacji. Ponadto, w warunkach fizjologicznych plazmina pełni znaczącą funkcję w embriogenezie, angiogenezie oraz w gojeniu ran. Znany jest fakt wpływu plazminy na procesy patologiczne, w tym rozwój miażdżycy, niedokrwienie mięśnia sercowego, stany zapalne oraz odkładanie β -amyloidu w chorobie Alheimera.

Badania z ostatnich lat wskazują na aktywny udział układu fibrynolitycznego w progresji nowotworów, w której białka fibrynolizy odgrywają istotną rolę, nie tylko dzięki bezpośredniej aktywności proteolitycznej, ale również przez regulację aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej.

Obecnie zarejestrowane trzy leki działające jako inhibitory plazminy charakteryzuje mała specyficzność działania oraz liczne działania niepożądane.

Celem podjętych przez Doktoranta badań było poszukiwanie syntetycznego, odwracalnego i selektywnego inhibitora plazminy.

Do realizacji założonego celu zaproponowano syntezę na fazie stałej 15 nowych pochodnych kwasu 6-aminoheksanowego (EACA), zawierających peptydowy fragment -Ala-Phe-Lys- zapewniający wiązanie się z plazminą, o potencjalnych właściwościach hamujących aktywność plazminy i innych enzymów układu hemostazy.

Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest opracowana w sposób klasyczny. Zawiera część teoretyczną, cel pracy, będący uzasadnieniem podjęcia tematu, część doświadczalną, wyniki, dyskusję oraz wnioski.

W części wstępnej Autor opisuje mechanizmy hemostazy. W sposób szczególny skupia się na opisie aktywatorów oraz inhibitorów aktywatorów plazminogenu, a także inhibitorów plazminy. Ta część pracy została oparta na 222 pozycjach literaturowych (!), w zdecydowanej większości (50%) pochodzących z obecnego wieku.

Uzasadnienie podjęcia kierunku badań opisane jest w sposób klarowny.

Analizując rozdział poświęcony syntezie chemicznej, daje się zauważyć bardzo dobre przygotowanie praktyczne Doktoranta do prowadzenia tego typu badań.

W celu otrzymania nowych związków magister Purwin zastosował metodę otrzymywania peptydów na fazie stałej. Jako substratów użył fabrycznie przygotowanych Fmoc-aminokwasów: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-EACA-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH oraz trzech nośników polimerowych: żywicy 2-chlorotrytylowej do otrzymywania peptydów w postaci kwasów, żywicy Rink-amidowej do otrzymywania amidów I-rzędowych oraz żywicy 1,5-diaminopentylotrytylowej do otrzymywania peptydów w postaci amidów II-rzędowych. Odczynnikiem sprzęgającym był TBTU (tetrafluoroboran O-(benzotriazolo-1-ylo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy, a przeciwracemizacyjnym HOBt (hydroksybenzotriazol). Zasadą używaną w reakcji tworzenia wiązania peptydowego była DIPEA (diizopropylloetyloamina). Testami barwnymi użytymi do identyfikacji I-rzędowej grupy aminowej był test chloranilowy i test z wykorzystaniem TNBS (kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy).

Zsyntetyzowane peptydy zostały poddane liofilizacji. Scharakteryzowano je oznaczając ich temperaturę topnienia, czas retencji i masę cząsteczkową.

W wyniku syntezy otrzymano 15 peptydów zawierających C-terminalny kwas ϵ -aminokapronowy. Związki zawierały na C-końcu: wolną grupę karboksylową, grupę amidową I-rzędową oraz grupę amidową II-rzędową z resztą 1,5-diaminopentylową.

Następnym etapem pracy były badania aktywności biologicznej *in vitro*.

Dla wszystkich peptydów oceniono aktywność antyamidolityczną wobec sześciu enzymów z grupy proteaz serynowych – plazminy, trombiny, tPA, uPA, kalikreiny oraz trypsyny. Opis eksperymentu przedstawiony w pracy pozwala wnioskować, iż Doktorant sam wykonywał badania biologiczne, co jest godne podkreślenia. Wykonano również test tromboelastometryczny na krwi pełnej badając wpływ zsyntetyzowanych związków na krzepnięcie i fibrylizację. Sprawdzono ponadto, wpływ otrzymanych peptydów na przeżywalność fibroblastów, komórek raka okrężnicy linii DLD-1 oraz komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231.

Na podstawie wyników hamowania aktywności enzymów (Tab. 14-19) wyznaczono wartości IC_{50} . Spośród 15. otrzymanych peptydów, 12 hamowało aktywność plazminy o wartościach stężeń IC_{50} od 0.02 do 11.39 mM. Hamowanie trombiny wykazywały 4 związki o wartościach IC_{50} od 3.85 do 7.59 mM, tPA 3 związki o wartościach IC_{50} od 6.48 do 17.64 mM oraz urokinazy 3 związki o wartościach IC_{50} od 2.61 do 3.38 mM.

Spośród badanych związków najaktywniejszym inhibitorem plazminy był amid H-D-Ala-Phe-Lys-EACA-NH₂ (7) (IC_{50} = 0.02 mM), natomiast najaktywniejszym inhibitorem trombiny peptyd o tej samej sekwencji, lecz z wolną grupą karboksylową H-D-Ala-Phe-Lys-EACA-OH (2) (IC_{50} = 3.85 mM), najaktywniejszym inhibitorem tPA okazał się peptyd H-D-Ala-Phe-EACA-OH (4) (IC_{50} = 6.48 mM), natomiast najaktywniejszym inhibitorem uPA peptyd H-Ala-Phe-EACA-NH₂ (10) (IC_{50} = 2.61 mM).

Na podstawie doniesień literaturowych autor stwierdził, iż najwyższa aktywność biologiczna związku 7. wobec plazminy spowodowana jest prawdopodobnie najlepszym dopasowaniem struktury do centrum aktywnego plazminy. W tym miejscu należy dodać, iż może warto byłoby przeprowadzić badania *in silico* w celu potwierdzenia tej hipotezy.

Biorąc pod uwagę różnorodną strukturę otrzymanych inhibitorów było możliwe wyprowadzenie zależności pomiędzy strukturą peptydów a aktywnością plazminy i innych proteaz. W przypadku peptydów z wolną grupą karboksylową najsilniejsze hamowanie plazminy wykazywał peptyd H-D-Ala-Phe-Lys-EACA-OH (2) o wartości inhibicji 78% w maksymalnym stężeniu 20 mM. Jednocześnie peptyd 2. był najbardziej aktywny wobec trombiny; wykazywał hamowanie tego enzymu w 64%. Zaobserwowano, że usunięcie z sekwencji lizyny spowodowało całkowitą utratę aktywności tylko w przypadku peptydu H-

Ala-Phe-EACA-OH 5, zawierającego L-alaninę, natomiast w przypadku peptydu 4, z alaniną w konfiguracji D, aktywność uległa tylko obniżeniu.

Amidy peptydów 6-9 wykazywały najwyższą aktywność wobec plazminy. Najwyższy procent hamowania plazminy (94%) wykazywał peptyd H-D-Ala-Phe-Lys-EACA-NH₂ (7) będąc jednocześnie najaktywniejszym związkiem w całej zsyntetyzowanej serii. Również w tej grupie zaobserwowano, że usunięcie z sekwencji lizyny spowodowało całkowitą utratę aktywności tylko w przypadku peptydu 10., zawierającego L-alaninę.

Kolejną serię związków stanowiły peptydy zawierające amid II-rzędowy z resztą 1,5-diaminopentylową. Midura-Nowaczek i wsp. zaproponowali wprowadzenie do struktur peptydowych inhibitorów plazminy resztę 1,5-diaminopentylową, jako formę zdekarboksylowanej lizyny – kadawerynę. Rozważania nad tego typu fragmentem oparto na badaniach inhibitorów trombiny zawierających C-terminalną argininę, w których w jej miejsce wprowadzono zdekarboksylowaną strukturę – agmatynę.

Zsyntetyzowane związki 11–14 hamowały plazminę w podobnych wartościach inhibicji około 80%. Najaktywniejszym peptydem tej serii względem plazminy był H-D-Ala-Phe-Lys-EACA-NH-(CH₂)₅NH₂ (12) z wartością IC₅₀ = 1.11 mM. Usunięcie lizyny uniemożliwia hamowanie enzymu.

Następnie przeanalizowano sekwencję -Ala-Phe-EACA-. Tripeptydy z tej grupy różniły się od poprzednio opisaney brakiem lizyny (peptydy 4, 5, 9, 10, 14 i 15) w stosunku do najdłuższej omawianej sekwencji -Ala-Phe-Lys-EACA-. W tej serii związków zaobserwowano zanik hamowania aktywności plazminy przez peptydy zawierające L-Ala w P3. Tetrapeptydy -Ala-Phe-Lys-EACA, zawierające zarówno D- jak i L-Ala - hamowały aktywność plazminy w granicach 80–90%, natomiast usunięcie z sekwencji lizyny spowodowało znaczące obniżenie tej aktywności tylko w przypadku tripeptydów z L-Ala.

Przeanalizowano również sekwencję -Phe-Lys-EACA- (peptydy 1, 6 i 11), która została pozbawiona N-terminalnej alaniny w stosunku do najdłuższej omawianej sekwencji -Ala-Phe-Lys-EACA-. W tej serii zaobserwowano hamowanie plazminy w granicach 60–75%. Najaktywniejszym peptydem tej grupy był związek H-Phe-Lys-EACA-NH₂ (6) o wartości stężenia IC₅₀ = 1.43 mM. Obniżenie aktywności tego typu peptydów uzasadnia konieczność obecności w sekwencji niewielkiej nierozbudowanej przestrzennie hydrofobowej reszty alaniny do wiązania się z plazminą.

Przeprowadzono również porównanie aktywności niektórych zsyntetyzowanych peptydów z danymi dostępnymi w literaturze, dotyczącymi analogicznych peptydów niezawierających kwasu ε-aminokapronowego.

Ze względu na udowodniony wpływ kwasu ϵ -aminokapronowego na aktywność fibrynolityczną, zsyntetyzowane peptydy, zawierające tenże kwas w swojej strukturze poddano testowi tromboelastometrycznemu. Test ten miał na celu zbadanie wpływu peptydów na kinetykę powstawania i stabilność skrzepu w krwi pełnej ludzkiej. Badane wybrane związki w teście tromboelastometrycznym praktycznie nie wpływały na parametry krzepnięcia.

Peptyd -Ala-Phe-Lys- wprowadzono do struktury proleków rozpoznawanych przez plazminę w celu selektywnego wzmocnienia aktywności przeciwnowotworowej oraz zmniejszenia działań niepożądanych. Miało to miejsce np. w przypadku: doksorubicyny, kamptotecyny, paklitakselu, daunorubicyny oraz metotreksatu. Biorąc pod uwagę, iż taka sama sekwencja -Ala-Phe-Lys- jest obecna w zsyntetyzowanych peptydach wykonano również badania wpływu peptydów na komórki zdrowe – fibroblasty oraz komórki zmienione nowotworowo - komórki raka okrężnicy linii DLD-1, komórki raka piersi linii MCF-7 oraz MDA-MB-231. Opisywane peptydy nie wykazywały działania cytotoksycznego na komórki zdrowe i nowotworowe. Wyniki te z jednej strony rozczarowujące, ale z drugiej, mogą posłużyć jako baza do przyszłych syntez w kierunku tejże aktywności.

Podsumowując, praca jest napisana poprawnym językiem. Zawiera 122 strony, 45 rycin, 24 tabele oraz obejmuje 249 odpowiednio dobranych pozycji literaturowych. Praca mgr Macieja Purwina jest przykładem dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej. Autor przeprowadził obszerną dyskusję wyników choć, co rzuca się w oczy, brak dyskusji na temat najważniejszej części tej pracy, a mianowicie syntezy wykonanej osobiście przez Doktoranta. Może warto byłoby podkreślić zalety syntezy na nośniku, celowość zastosowania konkretnej żywicy, jak też strategii. W żaden sposób nie umniejsza to jednak wartości pracy. Uzyskane wyniki pozwolą na racjonalne zaplanowanie syntez kolejnych selektywnych inhibitorów plazminy.

Pragnę ponadto zaznaczyć, iż Doktorant jest współautorem dwóch publikacji tematycznie związanych z rozprawą doktorską.

Reasumując, stwierdzam, że praca mgr Purwina spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, w związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Macieja Purwina do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Maciej Purwin