

Autoreferat rozprawy doktorskiej

„Cykliczne peptydy o aktywności antyangiogennej”

Promotor: Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

Angiogeneza jest procesem biologicznym, który polega na tworzeniu się nowych naczyń krwionośnych z już istniejących w organizmie. Patologiczna forma angiogenezy jest odpowiedzialna za pojawienie się choroby nowotworowej. Jednym z głównych czynników proangiogennych jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGFA₁₆₅, który określany jest jako VEGF₁₆₅), który w sposób selektywny oddziałuje z receptorem (VEGFR) oraz ko-receptorem, którym jest białko neuropilina 1 (NRP-1). Obecnie ekspresję NRP-1 obserwuje się na wielu typach nowotworów co sugeruje, że NRP-1 w komórkach nowotworowych może pełnić funkcje osobnego receptora dla VEGF₁₆₅. Związki, które są w stanie zablokować w sposób selektywny interakcję VEGF₁₆₅/NRP-1 mogą stać się w przyszłości lekami stosowanymi w chorobach nowotworowych.

Celem mojej pracy doktorskiej było projektowanie, synteza oraz badania biologiczne cyklicznych peptydów, których struktura oparta jest na najkrótszym fragmencie heptapeptydu A7R (ATWLPPR) w celu znalezienia silnych inhibitorów układu VEGF₁₆₅/NRP-1. Peptyd A7R został wyizolowany z biblioteki fagowej przez zespół prof. Perreta. Peptyd ten wykazuje w testach *in vivo* oraz *in vitro* właściwości antyangiogenne. Badania struktura – aktywność (SAR) peptydu A7R wykazały, że C-końcowy fragment LPPR jest kluczowy w wykazywaniu przez ten peptyd aktywności biologicznej.

Moje badania dotyczyły syntezy cyklicznych peptydów, gdyż są one stabilniejsze w surowicy ludzkiej krwi w odróżnieniu od ich liniowych odpowiedników. Ta właściwość czyni je bardziej odpowiednimi potencjalnymi kandydatami na leki.

Struktura zaprojektowanych cyklicznych peptydów oparta była na sekwencji LPPR. Zaprojektowane cykliczne peptydy posiadały dwa rodzaje cyklizacji: łańcuch boczny – do łańcucha bocznego oraz głowa – do – łańcucha bocznego. Każdy zaprojektowany peptyd posiadał na C-końcu resztę argininy, która okazała się być kluczowym aminokwasem w wykazywaniu aktywności biologicznej przez peptyd A7R oraz LPPR. Cyklizacja została przeprowadzona za pomocą utworzenia wiązania amidowego pomiędzy pierwszą a trzecią resztą aminokwasu obecnego w sekwencji LPPR. W zależności od przeprowadzonej cyklizacji peptydy różniły się ilością atomów w cyklu (10-15).

Synteza liniowych peptydów oraz cyklizacja została przeprowadzona manualnie korzystając z metody syntezy peptydów na nośniku polimerowym (SPPS), wykorzystując w tym celu nośnik polimerowy Merrifielda oraz prowadząc całą syntezę w oparciu o strategię Fmoc/Boc. Cyklizacja została wykonana za pomocą TBTU. Peptydy były oczyszczane za pomocą RP HPLC i analizowane za pomocą spektrometrii mas.

Wydajności zaprojektowanych cyklicznych peptydów były zazwyczaj niskie. W zależności od rodzaju cyklicznego peptydu w surowym produkcie znajdował się cykliczny monomer, mieszanina cyklicznego peptydu w postaci monomeru wraz z symetrycznym dimerem bądź tylko cykliczny dimer. Świadczy to o tym, że synteza małych cyklicznych peptydów jest niewątpliwym wyzwaniem.

Otrzymałam 15 peptydów (7 cyklicznych monomerów oraz 8 cyklicznych dimerów), których stopień inhibicji układu VEGF₁₆₅/NRP-1 został zbadany za pomocą testu ELISA. Większość otrzymanych cyklicznych peptydów wykazywała wyższą aktywność niż peptyd A7R.

Dla większości cyklicznych monomerów oraz jednego dimeru zostało wykonane modelowanie komputerowe. Struktury peptydów dokowane były do domeny b1 kokryształu NRP-1 z tuftsyną (tetrapeptyd TKPR — jeden z inhibitorów NRP-1). Modelowanie komputerowe dowiodło, że reszta egzocyklicznej argininy odgrywa kluczową rolę w oddziaływaniu z receptorem a grupa aminowa znajdująca się na N-końcu odpowiedzialna jest za oddziaływanie z Glu348 znajdującym się w NRP-1.

Wyniki testu ELISA oraz modelowanie komputerowe wykazało, że zarówno wielkość pierścienia jak i konfiguracja reszt aminokwasów obecnych w sekwencji peptydu jest kluczowa do wykazywania wysokiej aktywności biologicznej przez analizowane peptydy.

Dla trzech najbardziej aktywnych peptydów zostały wykonane badania stabilności w surowicy ludzkiej krwi korzystając z metody LC MS. Badania wykazały, że peptydy te są stabilne w surowicy ludzkiej krwi. Czas półtrwania w zależności od badanego peptydu wahał się od 5 h (monomer) do 32 h (dimer).

Ostatni etap mojej pracy dotyczył optymalizacji syntezy cyklicznych peptydów. W tym celu wykorzystałam różne rodzaje nośników polimerowych (Wang, Wang Tenta Gel), odczynników sprzęgających (TBTU, DIC/Oksyma, HATU), różne warunki prowadzenia reakcji (temperatura pokojowa, reaktor mikrofalowy). Wyniki moich badań wykazały, że wydajność otrzymania produktu monomerycznego zależy głównie od sekwencji oraz od rodzaju zastosowanej cyklizacji.

Otrzymane wyniki moich badań poszerzyły wiedzę na temat związków, których celem jest inhibicja układu VEGF₁₆₅/NRP-1. Wyniki badań struktura – aktywności z całą pewnością mogą posłużyć do projektowania kolejnych związków wykazujących aktywność antyangiogenną. Optymalizacja syntezy może w przyszłości ułatwić otrzymywanie cyklicznych peptydów o potencjalnej aktywności antyangiogennej.