

mgr Anna Nieścioruk
Wydział Chemii, UW
Pracownia Peptydów

Autoreferat rozprawy doktorskiej

„ Biokoniugaty o potencjalnej aktywności antyangiogennej”

Promotor: Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

Promotor pomocniczy: dr Dorota Nieciecka

Choroby nowotworowe są aktualnie jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Jednym z kluczowych procesów rozwoju nowotworów jest angiogeneza. Jest to proces tworzenia nowych naczyń włosowatych z już istniejących naczyń krwionośnych. Powstałe naczynia włosowate umożliwiają dostarczenie tlenu i składników odżywczych do komórek nowotworowych ułatwiając progresję guzów nowotworowych, inwazję komórek nowotworowych i tworzenie przerzutów. Spośród różnych czynników proangiogennych najbardziej istotnym jest czynnik śródbłonna naczyń VEGF-A, którego główna forma VEGF₁₆₅ wiąże się z wysokim powinowactwem do receptorów kinaz tyrozynowych VEGFRs na powierzchni komórek śródbłonna. Utworzenie kompleksu VEGF₁₆₅/VEGFR jest etapem, który wywołuje proliferację komórek, migrację i rozprzestrzenianie naczyń krwionośnych. To wiązanie ligandu do receptora może być znacznie zwiększone przez oddziaływanie VEGFR z koreceptorem neuropiliną-1 (NRP-1). NRP-1 jest transbłonową glikoproteiną, która także występuje w nadekspresji na powierzchni błon komórkowych różnych typów nowotworów, np. nowotworu płuc, żołądka, okrężnicy, raka piersi, trzustki i glejaka, sugerując jej rolę w zwiększonej progresji naczyń krwionośnych oraz agresywności nowotworu i złego rokowania. Zahamowanie angiogenezy stanowi obecnie jeden z ważnych kierunków poszukiwań nowych leków w terapiach przeciwnowotworowych.

Przedstawiona praca doktorska prezentuje syntezę dwóch rodzajów koniugatów o potencjalnej aktywności antyangiogennej, zaprojektowanych tak aby selektywnie oddziaływały z NRP-1. Pierwsza grupa obejmuje koniugaty peptydu lub peptydomimetyku z nanocząstkami magnetycznymi, a druga koniugaty peptydu A7R z lekiem przeciwnowotworowym-5-fluorouracylem (5-FU). W przypadku koniugatów z nanocząstkami magnetycznymi w pierwszej kolejności dobrano warunki reakcji przyłączania do nanocząstek heptapeptydu A7R (H-Ala-Thr-

Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH), którego antyangiogenne i przeciwnowotworowe właściwości zostały udowodnione przez grupę profesora Perreta z Uniwersytetu Paris 13. Do syntezy koniugatów wykorzystano nanocząstki magnetyczne zbudowane z ferrytu niklowo-cynkowego o ogólnym wzorze $Ni_{0,5}Zn_{0,5}Fe_2O_4$, których powierzchnia została zmodyfikowana kwasem sebacynowym (kwasem dekanodiowym). Największym wyzwaniem w tej części pracy był dobór odpowiednich warunków reakcji oraz odpowiednich metod fizykochemicznych do scharakteryzowania otrzymanego koniugatu. Finalnie peptyd A7R został przyłączony do nanocząstek magnetycznych za pomocą wiązania amidowego a do potwierdzenia skutecznej koniugacji wykorzystano m.in. takie metody jak spektroskopia w podczerwieni, termogravimetria, transmisyjna mikroskopia elektronowa. Wstępne badania cytotoksyczności otrzymanego koniugatu na dwóch liniach komórkowych nowotworowej i normalnej z ekspresją NRP-1 wykazały, że nanocząstki zmodyfikowane peptydem A7R wykazują działanie cytotoksyczne (zarówno na komórki nowotworowe jak i normalne), w przeciwieństwie do samego peptydu A7R i nanocząstek zmodyfikowanych kwasem sebacynowym.

W kolejnej części praca ukazuje badania nad sposobem połączenia z nanocząstkami magnetycznymi peptydomimetyku H-Lys(hArg)-Dab-Pro-Arg-OH opracowanym w Pracowni Peptydów, wykazującym lepszą zdolność inhibicji układu VEGF₁₆₅/NRP-1. W związku z tym, że peptydomimetyk posiada aż trzy grupy aminowe w cząsteczce, do których potencjalnie można przyłączyć nanocząstek uprzednio został sfunkcjonalizowany o kwas pent-4-ynowy. Następnie peptydomimetyk został przyłączony za pomocą pierścienia triazolowego do nanocząstek magnetycznych, których kwas sebacynowy został dodatkowo związany z cząsteczką H₂N-PEG(3)-N₃.

Ostatnia część pracy przedstawia syntezę dwóch koniugatów 5-fluorouracylu z peptydem A7R, różniących się linkerem pomiędzy A7R a lekiem przeciwnowotworowym. W pierwszym koniugacie 5-FU był połączony z peptydem A7R za pomocą kwasu octowego, a w drugim za pomocą kwasu bursztynowego, co zapewniło połączenie obu cząsteczek odpowiednio za pomocą wiązania amidowego i estrowego. Celem otrzymania tego typu koniugatów było sprawdzenie czy połączenie 5-FU z peptydem A7R wpłynie na zmniejszenie toksyczności 5-FU względem normalnych komórek. Przeprowadzone badania *in vitro* na normalnej i nowotworowej linii komórkowej wykazały, że koniugat z wykorzystaniem jako łącznika kwasu octowego nie wykazuje działania cytotoksycznego wobec obu linii komórkowych. Natomiast koniugat z wykorzystaniem jako linkera kwasu bursztynowego okazał się znacznie bardziej toksyczny niż sam 5-fluorouracyl.

W ramach zrealizowanej pracy doktorskiej udało się opracować warunki reakcji dla każdego z zaplanowanych koniugatów peptydu/peptydomimetyku z nanocząstkami magnetycznymi a także wybrać odpowiednie metody fizykochemiczne do ich scharakteryzowania. Otrzymano również

zaplanowane koniugaty 5-fluorouracylu z peptydem A7R. Przeprowadzone wstępne testy *in vitro* koniugatów są dowodem na to, że nie zawsze otrzymany koniugat posiada pożądane właściwości biologiczne. Mam nadzieję, że zapoczątkowane badania w ramach mojej pracy doktorskiej powiększyły zasób wiedzy w zakresie tematyki koniugatów peptydów z nanocząstkami i będą dalej rozwijane w Pracowni Peptydów bowiem nanotechnologia odgrywa coraz większą rolę w medycynie i farmacji.