

Autoreferat rozprawy doktorskiej

„Triazolopeptydowe inhibitory kompleksu VEGF₁₆₅/NRP-1”

Promotor: prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

Kompleks sygnałowy VEGF₁₆₅/NRP-1 (ang. Vascular Endothelial Growth Factor/Neuropilin-1 – naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu/neuropilina-1) to istotny szlak komunikacji międzykomórkowej warunkujący zdolność przeżycia organizmu. W ostatnich latach układ ten zyskał duże zainteresowanie ze względu na jego udział w progresji choroby nowotworowej, a także w rozwoju innych chorób zależnych od jego pracy, np. retinoparia cukrzycowa. Podstawowo, VEGF₁₆₅ jest związkiem modelującym proces angiogenezy – powstawania nowych naczyń krwionośnych na bazie istniejących. Proces ten reguluje mechanizmy naprawy uszkodzonych tkanek, a co więcej, jest warunkiem *sine qua non* dla późnych etapów rozwoju choroby nowotworowej. Początkowo mutacje nowotworowe występują jedynie punktowo w postaci awaskularnego i stosunkowo niegroźnego raka *in situ*. Z powodu wzmożonego tworzenia się kompleksu VEGF₁₆₅/NRP-1 powstają dobre warunki do wzrostu nowotworu z perspektywą metastazy w przyszłości, ponieważ naczynia wytworzone na drodze nowotworowej angiogenezy są nieregularne, o zwiększonej przepuszczalności, przez co komórki raka mogą wnikać do światła naczyń krwionośnych i wraz z krwią opuścić ognisko pierwotne. Co więcej, m. in. dzięki VEGF₁₆₅/NRP-1 nowotwory są w stanie wytworzyć swoje mikrośrodowisko, w skład którego wchodzi zrekrutowane natywne komórki nosiciela wydzielające cytokiny o immunosupresyjnych funkcjach. Dzięki temu nowotwór przestaje być rozpoznawany przez układ odpornościowy jako zagrożenie, które należy zwalczać.

Celem mojej pracy doktorskiej było zaprojektowanie i synteza związków opartych o otrzymaną w Pracowni Peptydów strukturę H-Lys(Har)-Xaa-Xaa-Arg-OH, która wykazuje wysoką aktywność inhibicyjną (IC₅₀ = 0,2 μM) w porównaniu do bardzo dobrze opisanego w literaturze peptydu (A7R – IC₅₀ = 5,9 μM). W badaniach polegających na inkubacji w ludzkim osoczu okazało się, że w obrębie -Xaa-Xaa- zachodzi proteoliza enzymatyczna. Z uwagi na powyższe skupiłem się na zaprojektowaniu i syntezie

nowych inhibitorów tworzenia się kompleksu VEGF₁₆₅/NRP-1, które były podstawione w obrębie labilnego fragmentu przez element odporny na działanie proteaz z ludzkiego osocza. Spośród wielu interesujących rozwiązań strukturalnych wybrałem 1,4,-dipodstawione 1,2,3-triazole, które można uznawać za nieklasyczne bioizostery wiązania peptydowego.

Syntezę triazolopeptydów opracowałem w oparciu o strategię syntezy na fazie stałej. W szczególności dotyczyło to opracowania warunków prowadzenia reakcji diazotransferu Wonga oraz reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji katalizowanej jonami Cu(I) na stałym podłożu z użyciem klasycznej żywicy polistyrenowej z linkerem Wanga. Dzięki tej adaptacji udało się znacząco zmniejszyć ilość etapów przeprowadzanych w roztworze. Wszystkie etapy syntezy na stałym nośniku zachodzą z wydajnością ilościową, co zostało potwierdzone przez testy: Kaisera oraz Kaisera z dodatkiem trifenylofosfiny. Co więcej, analiza surowego produktu wykazywała obecność niewielkiej ilości zanieczyszczeń, które w łatwy sposób można oddzielić techniką HPLC w skali preparatywnej. Opracowana metoda posiada charakter modułowy, więc można ją wszechstronnie wykorzystywać do tworzenia dalszych analogów triazolopeptydowych. Syntezy związków opisanych w pracy składają się z 10-14 etapów osiągając wydajności sumaryczne od 15,8% do 26,4% dla oczyszczonych produktów. Zaprojektowałem i otrzymałem 23 analogi triazolopeptydowe.

Po przeprowadzonym teście immunoenzymatycznym, mierzącym zdolność inhibicji tworzenia się kompleksu VEGF₁₆₅/NRP-1 do dalszych badań wybrałem dwa najlepsze analogi **3** (H-Lys(Har)-GlyΨ[Trl]GlyΨ[Trl]Arg-OH; IC₅₀ = 8,4 μM) oraz **4** (H-D-Lys(Har)-GlyΨ[Trl]GlyΨ[Trl]Arg-OH; IC₅₀ = 10,2 μM), które co prawda są słabsze od związku wyjściowego lecz z drugiej strony posiadają zbliżoną aktywność do peptydu A7R.

Analogi **3** oraz **4** poddałem działaniu proteaz obecnych w ludzkim osoczu. Produkty hydrolizy enzymatycznej triazolopeptydów analizowałem techniką HPLC-MS, dzięki temu mogłem określić budowę powstających metabolitów, a więc miejsce hydrolizy w cząsteczce, a także oszacować czasy półtrwania w ludzkim osoczu, które osiągają wartości $t_{1/2} > 48$ godz. Jedyna zaobserwowana hydroliza enzymatyczna zachodziła w analogu **3** w obrębie H-Lys(Har). W przypadku związku **4** w czasie trwania eksperymentu (48 godz.) nie zaobserwowałem żadnej hydrolizy enzymatycznej, co wskazuje na jego odporność na działanie proteaz.

Z uwagi na wartości oszacowanych czasów półtrwania zdecydowałem się sprawdzić wpływ długiej ekspozycji (48 godz.) zdrowych komórek mysiego szpiku kostnego 32D na związek **4** we względnie

dużym stężeniu (100 μM – ok. 10 x IC_{50}) Okazało się, że związek ten nie wykazywał żadnego wpływu na żywotność tych komórek.

Równoległe do badań immunoenzymatycznych przeprowadzono modelowanie oddziaływania triazolopeptyd/NRP-1 na klastrze obliczeniowym OKEANOS, w ramach którego podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania ligand-receptor. Przeprowadzone symulacje nie pozwoliły na jednoznaczne opisanie zachodzących tu zjawisk, lecz w zestawieniu z wynikami dla peptydów poprzednich generacji ich rezultat poszerza wiedzę na temat zależności struktura-aktywność badanych inhibitorów tworzenia się kompleksu VEGF_{165} /NRP-1.

Triazolopeptydy jako nowa klasa inhibitorów kompleksu VEGF_{165} /NRP-1 są związkami, które w przyszłości mogą połączyć w sobie dobrą aktywność biologiczną tego typu peptydomimetyków oraz odporność na hydrolizę enzymatyczną charakterystyczną dla związków małocząsteczkowych.