

Dr hab. Piotr Młynarz, prof. PWr
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Wrocław, 30.08.2018 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Teresy Łeppek zatytułowanej „Projektowanie i synteza peptydowych inhibitorów PACE4 jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych”

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Prahla i stanowi kontynuację wcześniej podjętego kierunku badań nad peptydowymi mimetykami inhibitorów enzymatycznych.

Peptydomimetyki stanowią ważną grupę związków o działaniu biologicznym od działania immunosupresyjnego, mikrobiologicznego, przeciwzapalnego do przeciwnowotworowego. Z tego względu prace badawcze nad nowymi związkami, które naśladują działanie natywnych peptydów, ale ich okres półtrwania w organizmie jest znacznie dłuższy ze względu na modyfikacje strukturalne, są bardzo istotne. Szczególnie są one bardzo ważne w dobie coraz bardziej powszechnie występującej lekooporności bakterii i wirusów. Tak samo znaczącą tematyką są badania nad procesami nowotworzenia, w których różnego rodzaju enzymy odgrywają wiodącą rolę we wzroście, proliferacji i angiogenezie komórek rakowych. Natomiast, poszukiwania nowych terapeutyków związane są z procesami hamowania aktywności wyselekcjonowanych enzymów biorących udział w wyżej wymienionych procesach. Z tego względu trudność w projektowaniu tego typu leków polega na wybraniu takiego związku, który będzie ściśle selektywnym inhibitorem tylko dla wybranego enzymu. W tym kontekście została napisana niniejsza rozprawa doktorska, która zgodnie z moją wiedzą stanowi kontynuację wcześniej podjętych badań na inhibitorami konwertaz probiałkowych.

Rozprawa doktorska ma układ standardowy, została opisana na 174 stronach maszynopisu, składa się z dziesięciu rozdziałów, z których od 1 do 5 stanowią rdzeń pracy w tym: „Przegląd literaturowy”, „Cel pracy”, „Badania własne”, „Część eksperymentalna”, „Podsumowanie uzyskanych wyników”, a pięć dalszych to „Spis rysunków”, „Spis tabel”, „Spis histogramów i schematów”, „Literatura cytowana” i „Dorobek naukowy”.

Na początku pracy przegląd literaturowy wprowadza czytelnika w ogólną charakterystykę konwertaz probiałkowych, od ich pochodzenia poprzez właściwości fizykochemiczne, właściwości fizjologiczne i patofizjologiczne (w chorobach nowotworowych, wirusowych wraz ze szczegółowym opisem konwertazy PCSK9), aż do prezentacji rodzajów inhibitorów konwertaz probiałkowych. W dalszej części pracy Autorka dysertacji opisuje kluczową dla podjętych badań konwertazę probiałkową PACE4. Ta część doktoratu jest dobrze napisana w kontekście przeglądu literaturowego, jednak według recenzenta jest zbyt długa, zawiera 295 przypisów literaturowych (71 stron) z okresu od lat 60 ubiegłego wieku do czasów obecnych. Zdaniem recenzenta ten rozdział powinien wprowadzać czytelnika ściśle w podjętą tematykę, tak jak to ma miejsce w podrozdziałach od 1.2 do 1.4, które bardzo dobrze wyjaśniają genezę podjętych badań.

Kolejnym rozdziałem jest „Cel pracy” na który składają się modyfikacje modelowego inhibitora Multi-Leu (ML) dla enzymu PACE4, poprzez wprowadzenie modyfikacji w pozycji P4 (mimetyki Arg) oraz P5 (mimetyki Leu), a także cyklizację peptydu Multi-Leu poprzez utworzenie wewnątrzcząsteczkowego mostka disulfidowego. Dodatkowo, Autorka pracy postanowiła sprawdzić aktywność biologiczną otrzymanych związków poprzez określenie stałych hamowania aktywności enzymatycznej (K_i) względem PACE4 i furyny. W następnym kroku zdecydowała się przeanalizować aktywność antyproliferacyjną wybranych związków na dwóch liniach komórkowych DU145 (androgenoniezależna) i LNCaP (androgenozależna). W ramach tej pracy p. mgr Teresa Łeppek podjęła się również sprawdzenia stabilności zsyntezowanych peptydów w plazmie mysiej oraz serum ludzkim - tu zdaniem recenzenta Doktorantka miała na myśli osocze i surowice krwi. Tezy pracy w tym rozdziale zostały jasno sprecyzowane, jednak pod koniec znalazł się fragment, który powinien pojawić się moim zdaniem w podsumowaniu wykonanych badań, zaczynający się od stwierdzenia „Przeprowadzone badania pozwoliły na.....”.

Rozdział opisujący badania własne podzielony jest na trzy podrozdziały, na które składają się takie zadania jak projektowanie, synteza chemiczna oraz analiza aktywności otrzymanych inhibitorów. Jako pierwsze zostały opisane modyfikacje przeprowadzone dla peptydu Ac-LLLLRVKR-NH₂ w pozycji P4 oraz P5. Zmiany strukturalne związku zostały przeprowadzone w pozycji P4 (Arg) za pomocą następujących modyfikacji: a) w miejsce α atomu węgla został wstawiony atom azotu; b) został wydłużony łańcuch boczny wraz z połączeniem tej modyfikacji z przeniesieniem grupy α aminowej na atom węgla β ; c) do peptydu została wprowadzona guanidynowana reszta aromatyczna; d) zastosowano *N*-metylację grupy α -aminowej; e) zastosowano zmianę lokalizacji łańcucha bocznego wraz z jego skróceniem; f) został skrócony łańcuch boczny Arg o jedną oraz dwie grupy metylenowe. W sumie została przeprowadzona synteza 10 związków. Następnym krokiem była synteza analogów peptydu z modyfikacją Leu w miejscu P5 poprzez: a) podstawienie metylowanych pochodnych Me-Leu oraz Me-Ile; b) podstawienie mimetykiem zawierającym wydłużony łańcuch boczny o jedną grupę metylenową; c) zamianę Leu na norwalinę oraz peptoid w którym łańcuch boczny został przyłączony do atomu azotu. Następnie zsyntezowane związki zostały przebadane w kierunku określenia aktywności inhibitorowej względem enzymów furyny i PACE4 z zastosowaniem fluorogenicznego substratu *pyro*-Glu-Arg-Val-Lys-Arg-7-amido-4-metylo-kumaryny. Spośród otrzymanych związków jeden wykazał wartość K_i podobną do ML względem PACE4 z podstawioną w pozycji P4 - *N*-metylo-L-argininą. Jak wynika z przeprowadzonych pomiarów dużo korzystniejsza okazała się modyfikacja w miejscu P5, gdzie trzy z zaprojektowanych związków ujawniły podobne właściwości inhibitorowe względem obu enzymów, a jeden z nich z *N*-metylowaną resztą izoleucyny wykazał wartości parametru K_i , poniżej wartości otrzymanej dla peptydu referencyjnego Multi-Leu. W następnym rozdziale zostały wybrane najlepiej rokujące inhibitory (jeden - pozycja P4, cztery - pozycja P5), które zostały podstawione, w jednej serii, w pozycji P1 resztą Amba. Natomiast, druga grupa związków zawierała dodatkowo w pozycji P8 resztę D-Leu. Podobnie jak dla poprzedniej serii inhibitorów, zsyntezowane związki zostały poddane badaniom biologicznym względem tych samych enzymów. Związkami referencyjnymi były dwa Ac-LLLLRVK[Amba] oraz Ac[DL]LLLLRVK[Amba]. Oba związki, które zostały podstawione jedynie w pozycji P1 resztą Amba (modyfikacje MeL^{P5}Amba i MeI^{P5}Amba) wykazały lepsze właściwości inhibitorowe niż ML-Amba. Te same molekuly z zamienioną leucyną L na D w pozycji 8 również wykazały lepsze właściwości, niż związek referencyjny. Pomimo znacznego poprawienia właściwości inhibitorowych, poprzez przyłączenie reszty Amba nie nastąpiła znaczna poprawa selektywności względem jednego z badanych enzymów, najwyższy stosunek selektywności furyna/PACE4, który został otrzymany wynosił 3.2 dla podstawienia DL^{P8}MeL^{P5}Amba^{P1}.

Jednak w przypadku procesów nowotworowych następuje znaczne zwiększenie stężenia enzymu PACE4, z tego względu jak sugeruje Autorka dysertacji, inhibitory powinny oddziaływać w pierwszej kolejności z tym enzymem. W tym miejscu muszę dodać, że otrzymane wyniki stanowią duże osiągnięcie Doktorantki oraz cenne źródło informacji, które można wykorzystać w przyszłości, w projektowaniu inhibitorów konwertaz probiałkowych.

Kolejnym krokiem było wykonanie testów na aktywność antyproliferacyjną wybranych 14 peptydomimetyków stosując jako referencyjne związki ML, ML-Amba oraz Ac-[DL]LLLRVK-Amba. Niestety, żadna z otrzymanych molekuł nie osiągnęła aktywności antyproliferacyjnej lepszej od związków modelowych. Jedynie związki posiadające w pozycji P5 hLeu oraz nVal hamowały proliferację komórek w podobny sposób. Jednak, cząsteczka zawierająca resztę hLeu okazała się toksyczna, co dyskwalifikuje ją jako potencjalny związek o działaniu terapeutycznym. Z drugiej strony peptydy, które wykazały najlepsze stałe inhibicji nie hamowały proliferacji. Fakt ten pokazuje jak trudne jest projektowanie nowych farmaceutyków, w których znaczącą rolę odgrywa cała gama parametrów takich jak budowa strukturalna, przenikalność przez błony, wrażliwość na pH oraz oddziaływanie z pozostałymi enzymami. Z tego względu Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy zsyntezowane analogi peptydowe przenikają przez błony komórkowe. W tym celu do dwóch związków ML-Amba oraz Melle^{P5}Amba^{P1} została dołączona cząsteczka fluoresceiny jako grupa reporterowa zw. 26 i 27. Synteza analogów zawierających ugrupowanie izotiocyaninanowe fluoresceiny została przeprowadzona przez dr Annę Kwiatkowską, a same badania zostały wykonane na Uniwersytecie Sherbrooke w Kanadzie przez Roxane Desjardins. Przeprowadzony eksperyment za pomocą cystometrii przepływowej wykazał, że cząsteczka analogu ML-Amba przechodzi do komórek nowotworowych. Dlatego, aby sprawdzić wpływ samej *N*-metylacji na właściwości peptydów postanowiono dodatkowo zsyntezować związki z punktowymi modyfikacjami *N*-MeLeu w pozycji P6 i P7. Chociaż, aktywność inhibitorowa dla związku 29 była obiecująca to wyniki testów aktywności antyproliferacyjnej okazały się być negatywne. Jak zauważyła sama Doktorantka, *N*-metylowanie reszt aminokwasowych w pozycjach P7-P4 powoduje utratę właściwości antyproliferacyjnych zaprojektowanych związków, z tego względu zjawisko to wymaga dalszych badań, z czym absolutnie się zgadzam.

W podrozdziale 3 badań własnych p. mgr Teresa Łeppek opisuje projektowanie, chemiczną syntezę i aktywność nowej grupy związków cyklicznych, analogów peptydu ML. Chociaż, niniejsze badania otwierają nowe możliwości opracowania skutecznego inhibitora, to jednak brakuje kontynuacji prac w celu wyjaśnienia i dopracowania dotychczas osiągniętych wyników. Autorka dysertacji chciała poprzez cyklizację uzyskać lepszą stabilność enzymatyczną otrzymanych peptydów. W tej części pracy Doktorantka zsyntezowała 9 związków cyklicznych, co wymagało od niej dużych zdolności syntetycznych, szczególnie na etapie oczyszczania nowych peptydomimetyków. Jednak, pomimo wielu wysiłków otrzymane cykliczne peptydy nie wykazały lepszej aktywności hamującej działanie enzymów PACE4 i furyny, oprócz dwóch związków 38 i 39, dla których stałe K_i były tylko o rząd większe od peptydu modelowego ML-Amba. W dalszym ciągu prac zostały przeprowadzone, tak jak dla wszystkich poprzednio zsyntezowanych peptydomimetyków badania właściwości antyproliferacyjnych. Dla związku 38 wartość IC_{50} była zbliżona do modelowego peptydu, podczas gdy dla zw. 39 otrzymano niezbieżne wartości. Następnie dla związków 38 i 39 przeprowadzono test odporności na degradację proteolityczną w mysim osoczu i ludzkiej surowicy, które wykazały wzrost $t_{1/2}$ od 2 do 3 razy. Eksperyment ten wykazał, że oba związki posiadają wyższą stabilność w surowicy ludzkiej, niż w mysim osoczu. Aczkolwiek, moim zdaniem eksperyment ten wykazał dwie zmienności gatunkową oraz jakościową ze względu na użyte płynne składniki krwi (surowica i osocze).

W dalszej części dysertacji opisano właściwości związku 38 względem innych konwertaz probiałkowych PC5/6 oraz PC7, dla których można ułożyć szereg względem największej aktywności PACE4>furyna>PC5/6>PC7, co świadczy o różnicach w specyficzności substratowej testowanych konwertaz probiałkowych.

Następne rozdziały to „Część eksperymentalna” w której podane są szczegółowe procedury syntez oraz wykonanych testów biologicznych. Po nim w kolejności znajduje się podsumowanie badań oraz pozostałe rozdziały wymienione przeze mnie wcześniej.

Moim zdaniem do największych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć zaprojektowanie i syntezę związków 5 oraz 11-14, które posiadały zbliżone lub lepsze właściwości inhibitorowe, niż referencyjny związek ML. Podobnie związki 17, 18, 22, 23 z wprowadzoną w pozycji P1 resztą Amba. Ciekawą obserwacją było również zauważenie większej stabilności proteolitycznej cyklicznych peptydów w surowicy ludzkiej i mysim osoczu. Uważam ten wątek badawczy za bardzo ciekawy i warty kontynuacji. Do niewątpliwych osiągnięć własnych p. mgr Teresy Łeppek należy również bardzo dobre opanowanie warsztatu syntezy peptydomimetyków.

Jednak, mam pytanie do Doktorantki o przyczynę dużej wielowątkowości tej pracy, która co prawda nie doprowadzała do wyjaśnienia zmienności strukturalnych opracowanych inhibitorów wpływających na właściwości hamujących aktywność enzymów PECE4 oraz furyny, ale niewątpliwie stanowi cenny wkład do zrozumienia działania inhibitorów konwertaz probiałkowych.

Podsumowując, zaprezentowane wyniki badań stanowią bardzo szeroko pojęty ciąg przyczynowo-skutkowy zmierzający do opracowania efektywnych inhibitorów PACE4. Praca jest napisana przejrzyście, chociaż zawiera dość dużo kolokwializmów językowych oraz niewielką ilość niedopatrzeń, ale żadne z nich nie wpływają na wartość merytoryczną niniejszej dysertacji.

Pani mgr Teresa Łeppek w swoim dorobku naukowym posiada jedną publikację w European Journal of Cell Biology ze współczynnikiem wpływu IF=3,712, która tematycznie wpisuje się w zakres tej dysertacji oraz cztery inne publikacje. Była współautorką imponującej liczby 26 komunikatów konferencyjnych, co może świadczyć o dużym potencjale publikacyjnym otrzymanych wyników w czasie prowadzenia badań do niniejszej dysertacji. Doktorantka brała również udział w trzech projektach badawczych związanych z podjętą tematyką naukową.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Teresy Łeppek spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

