

Dr hab. Jacek Jemielity, Prof. UW
Laboratorium Chemii Bioorganicznej
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: j.jemielity@cent.uw.edu.pl
tel. 22 5543774

Warszawa 16.10.2018

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Teresy Łeppek

p.t. „Projektowanie i synteza peptydowych inhibitorów PACE4 jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych”

Enzymy proteolityczne zwane proteazami są odpowiedzialne za specyficzną hydrolizę wiązań peptydowych w białkach. Proteazy pełnią kluczowe funkcje w najważniejszych procesach zachodzących w żywych komórkach. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu tych enzymów prowadzą do bardzo poważnych konsekwencji dla całych organizmów, i często leżą u podstaw występowania poważnych schorzeń takich jak między innymi choroby nowotworowe, choroby układu krwionośnego, choroby neurodegeneracyjne, czy autoimmunologiczne. To powoduje bardzo duże zainteresowanie tą grupą enzymów jak również, poszukiwane są ich selektywne inhibitory, które często są rozpatrywane jako potencjalne terapeutyki. Jednakże, aby w złożonych układach biologicznych jakimi są organizmy żywe, w tym najczęściej rozpatrywany w aspektach terapeutycznych organizm ludzki, takie inhibitory były bezpieczne, należy zapewnić hamowanie tylko tej z pośród proteaz, którą ustalono celem terapeutycznym w projektowaniu terapii przeciwko danemu schorzeniu. Zasadniczym celem przedstawionych w rozprawie doktorskiej była synteza potencjalnych inhibitorów peptydowych konwertazy PACE4, która to jest uznana za cel terapeutyczny w projektowaniu nowych terapii przeciwnowotworowych. Ostatnie doniesienia na temat tego, że PACE4 jest nadekspresjonowana w komórkach raka prostaty, a inhibicja tej konwertazy pozwoliła zablokować rozwój nowotworu w sposób niezależny od blokowania wydzielania androgenów, dają dodatkową silną motywację do projektowania i tworzenia jej selektywnych inhibitorów o coraz lepszych farmakodynamicznych i

farmakokinetycznych właściwościach. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Teresy Łeppek wykonana w Pracowni Chemii Peptydów, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Prof. Adama Prahla oraz dr Anny Kwiatkowskiej (University of Sherbrooke, Canada) doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy.

Praca doktorska ma klasyczny układ i liczy 175 stron, jest więc obszernym materiałem naukowym. Na rozprawę składa się przegląd literatury, gdzie opisano stan wiedzy na temat konwertaz ze szczególnym uwzględnieniem PACE4, cel pracy, badania własne, gdzie doktorantka opisuje swoje osiągnięcia dokonane w trakcie realizacji projektu badawczego, oraz część eksperymentalna, gdzie opisuje jak tego dokonała. Na końcu rozprawy znajduje się zwięzłe podsumowanie wyników oraz bogaty spis literatury. Dodatkowo wyodrębniono na końcu pracy listę rysunków, tabel, histogramów i schematów oraz podsumowano dorobek naukowy Kandydatki. W pracy zamieszczono 41 rysunków oraz 31 tabel, starannie przygotowanych pod względem edytorskim, które są bardzo pomocne w śledzeniu toku rozumowania Autorki rozprawy. Mimo, że ilość rysunków jest całkiem spora to czasem, zwłaszcza w przeglądzie literaturowym, miałem wrażenie, że Autorka posługuje się nimi zbyt oszczędnie, zwłaszcza w podrozdziale poświęconym inhibitorom konwertaz. W pracy zacytowano 310 pozycji literaturowych, które w znakomitej większości stanowią prace oryginalne oraz przeglądowe opublikowane w wiodących czasopismach naukowych z chemii, biochemii, biologii molekularnej, medycyny oraz dziedzin pokrewnych. Ta różnorodność aspektów związanych z konwertazami z całą pewnością wymagała od Doktorantki bardzo dużego nakładu pracy, tak aby zjawiska z tym związane dogłębnie zrozumieć, a następnie wykorzystać w swojej pracy badawczej. Z własnego doświadczenia wiem, że to nie jest zadanie łatwe, ale z drugiej strony niezbędne aby świadomie projektować syntezę związków chemicznych o pożądanym właściwościach biologicznych.

Zgodnie z wymaganiami obowiązującej Ustawy o tytule i stopniach naukowych przedmiotem mojej oceny są następujące elementy Rozprawy: a) ogólna wiedza Kandydata w uprawianej dziedzinie naukowej, b) Umiejętność prowadzenia badań naukowych, c) oryginalność rozwiązanego problemu naukowego.

Część poświęcona badaniom własnym to bardzo bogaty materiał badawczy, który pokazuje jak trudnego zadania podjęła się Autorka. Zasadniczym celem badań było uzyskanie analogów peptydu zwanego Multi-Leu, o ulepszonych właściwościach farmakokinetycznych, a w szczególności o zwiększonej odporności na hydrolizę enzymatyczną, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej aktywności inhibitorowej przeciwko PACE4. Sekwencję papytydu Multi-Leu zaproponowano w 2012 roku w pracy Levesque et al. J. Med. Chem współautorstwa obojga promotorów doktorantki. Peptyd ten wykazywał bardzo ciekawe właściwości antyproliferacyjne na komórki raka prostaty, a przy tym różnicował hamowanie aktywności konwertaz PACE4 i furyny. W kolejnych latach powstało kilka

bardzo interesujących prac poświęconych analogom tego peptydu zawierającym modyfikacje w różnych pozycjach jego sekwencji. Praca doktorska mgr Teresy Łeppek jest kontynuacją tej owocnej współpracy promotora, Adama Prahla z Prof. Robertem Day'em i jego Zespołem. Doktorantka przetestowała dwa podejścia w uzyskiwaniu związków o ulepszonych właściwościach, jedno polegające na zastąpieniu reszt argininy (pozycja P4) lub leucyny (pozycja P5) na aminokwasy niebiałkowe, drugie polegające na identyfikacji możliwych miejsc cyklizacji pomiędzy resztami cysteiny i kwasu 3-mekraptopropanowego. W efekcie powstało 39 nowych pochodnych peptydowych, które przebadano pod różnym kątem biochemicznym i komórkowym. W pierwszej części badano peptydy w których argininę P4 podstawiono na inne aminokwasy lub peptoidy oraz analogi modyfikowane w pozycji P5 gdzie w oryginalnym peptydzie znajduje się leucyna. Związki zostały otrzymane metoda syntezy w fazie stałej, przy zastosowaniu żywicy TentaGel S RAM. Czystość związków potwierdzono przy użyciu metody HPLC oraz niskorozdzielczej spektrometrii mas. Przy tej okazji rodzi się komentarz, że zwłaszcza w kontekście potwierdzania struktury, znacznie lepiej byłoby zastosować wysokorozdzielczą spektrometrię mas. Szkoda również, że w części eksperymentalnej nie przedstawiono profili HPLC finalnych związków po oczyszczaniu, oraz ich widm masowych potwierdzających zadeklarowaną wysoką czystość związków poddanych badaniom enzymatycznym i komórkowym. W badaniach związków aktywnych biologicznie przedstawienie jednoznacznych dowodów na czystość i jednorodność badanych związków, jest absolutną koniecznością, zwłaszcza kiedy ilość otrzymanych związków nie umożliwia wykonania badań spektroskopowych (np. NMR). Dlatego też podczas publicznej obrony proszę o przedstawienie reprezentatywnych chromatogramów oraz widm związków końcowych. Nowe peptydowe związki oraz odpowiednie kontrole zostały wykorzystane do badań hamowania aktywności enzymu PACE4. W tym celu doktorantka wykorzystaną sondę fluorogeniczną, która pod wpływem aktywności katalitycznej enzymu uwalnia fluorescencyjny produkt, który może być ilościowo oznaczany w czytniku płytek, co zapewnia wysokoprzepustowość tego podejścia. Co ciekawe pozycja P4 jest kluczowa z punktu widzenia powinowactwa do enzymu. Niemal wszystkie wprowadzone modyfikacje (z wyjątkiem związku 5) w zasadzie pozbawiały peptydy zdolności do hamowania enzymu, natomiast w przypadku modyfikacji pozycji 5 udało się zidentyfikować inhibitor bardziej aktywny (związek 12) ale o zmniejszonej selektywności w stosunku do peptydu referencyjnego, oraz taki który miał porównywalną aktywność i selektywność (związek 11). Wyniki skłoniły Doktorantkę do zaprojektowania kolejnej serii inhibitorów, w tym takich zawierających w pozycji 1 4-amidynobenzylaminę (Amba). Niestety w części pracy dotyczącej badań własnych nie znalazłem uzasadnienia do wprowadzenia tej modyfikacji, choć wyniki uzyskane dla tak modyfikowanych peptydów były bardzo przekonujące. Bardzo chętnie dowiedziałbym się więcej na ten temat podczas publicznej obrony, jaki jest mechanizm zapewniający zwiększoną aktywność inhibitorową za pośrednictwem reszty Amba. Analogi zawierające resztę Amba okazały się silnymi

inhibitorami, chociaż odbyło się to kosztem selektywności (PACE4 vs furyna), choć jak twierdzi Doktorantka nie jest to jeszcze powód do zmartwień. Jakkolwiek, wyciąganie takiego wniosku na podstawie wyników dla jedynie dwóch proteaz jest trochę nazbyt optymistyczne. Wyniki aktywności antyproliferacyjnej dla otrzymanych peptydów przeprowadzone na dwóch liniach komórkowych przeprowadzone przez współpracowników z Kanady pokazują, że otrzymane związki nie spełniły oczekiwań jako potencjalne czynniki terapeutyczne (brak aktywności lub toksyczność). Kolejne próby otrzymania aktywnych związków, mające na celu poprawę przenikalności inhibitorów przez błonę komórkową również nie przyniosły pozytywnych wyników w badaniach komórkowych. Podsumowując tę część pracy doktorskiej, należy podkreślić duży nakład pracy Doktorantki i bardzo cenne podejście iteracyjne w projektowaniu kolejnych związków, co bardzo korzystne w tego typu badaniach nastawionych na osiągnięcie najlepszego efektu biologicznego, ale przy tym też trudne w sytuacji, kiedy prowadzi się badania we współpracy z innymi grupami badawczymi. Brak ostatecznego sukcesu w badaniach komórkowych, biorąc pod uwagę złożoność układu, nie jest szczególnie zaskakujący i z całą pewnością nie powinien wpływać na pozytywną ocenę przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. To co nieco zaskakuje, to brak oceny wpływu modyfikacji na stabilność peptydów w tej części projektu oraz brak dyskusji porównawczej aktywności otrzymanych inhibitorów z innymi analogami peptydu Multi-Leu uzyskanymi i opublikowanymi we współpracy promotora z badaczami z Kanady. Druga część rozprawy obejmuje badania nad cyklizacją peptydowego inhibitora poprzez tworzenie mostka disiarczkowego, pomiędzy resztą cysteiny w pozycjach P5 lub P3 oraz kwasem 3-sulfanylopropionowym podstawionym w pozycjach P8 i P9. Niektóre peptydy zostały jeszcze dodatkowo zmodyfikowane. Wszystkie peptydy otrzymane w ramach tej części projektu zostały również zbadane pod kątem inhibicji PACE4 oraz furyny. Niestety w pierwszym podejściu nie udało się otrzymać związków o istotnej aktywności przeciwko badanym konwertazom. Dopiero w kolejnych seriach udało się uzyskać związki o aktywnościach porównywalnych do peptydu liniowego ML (związki oznaczone numerami 38 i 39), jednakże osiągnięto to dopiero po włączeniu do sekwencji reszty Amba (w stosunku do peptydu liniowego zawierającego Amba ta aktywność była o rząd wielkości niższa). Co ciekawe związek 38 wykazał ciekawe właściwości komórkowe, hamując proliferację komórek DU145 i LNCaP w 50%-ach przy czterokrotnie niższym stężeniu niż peptyd ML, lecz wciąż przy około dwukrotnie wyższym niż jego liniowy analog. Testy w serum mysim i ludzkim wykazały zwiększoną stabilność formy cyklicznej analogu 38 i okres półtrwania dla formy cyklicznej był odpowiednio dłuższy około 2,5- i 1,3-krotnie. Na koniec, najatrakcyjniejszy w badaniach biologicznych peptyd (38) zbadano pod kątem hamowania dwóch innych konwertaz PC5/6 i PC7, w stosunku do których inhibitor był mniej aktywny. Badania przedstawione przez Doktorantkę, pokazują jak trudno uzyskać pożądany efekt biologiczny w tak złożonych układach jakimi są żywe komórki, oraz jak trudno uzyskać strukturę która może być punktem wyjścia do optymalizacji „hitu” do leku o pożądanej farmakodynamice i farmakokinetyce. Nie

mniej jednak dzięki świetnemu warsztatowi syntetycznemu, który pozwolił na otrzymanie pokaźnej biblioteki związków, uzyskano wartościowe informacje na temat zależności pomiędzy strukturą i różnymi typami aktywności otrzymanych peptydów, które to są bezcenne przy poszukiwaniu potencjalnych terapeutyków.

Z całą pewnością przedstawione w rozprawie badania praca Pani magister Łepek dostarczyła wielu istotnych informacji, które zapewne zostaną wykorzystane przez nią samą lub jej następców w projektowaniu inhibitorów o jeszcze lepszych właściwościach, które spełnią wysokie oczekiwania stawiane związkom o znaczeniu terapeutycznym.

W tak obszernej i bogatej tematycznie rozprawie nie sposób uniknąć różnorodnych błędów w tym błędów gramatycznych, braku znaków interpunkcyjnych, tzw. literówek, czy różnego rodzaju pomyłek (jak np. błędna struktura D-leucyny w Tabeli 6) lecz są one bez znaczenia w świetle wysokiej wartości pracy zarówno pod względem edytorskim, a tym bardziej pod względem merytorycznym.

Jeśli chodzi o dorobek naukowy Doktorantki, będący efektem realizacji projektu doktorskiego to obejmuje on jedną publikację w renomowanym czasopiśmie naukowym (European Journal of Cell Biology, IF = 3,532) oraz prezentacje plakatów na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Opublikowane wyniki dotyczą przede wszystkim części związanej z cyklicznymi pochodnymi. Doktorantka jest również współautorką innej pracy w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, ale nie wchodzi ona tematycznie w zakres rozprawy doktorskiej. Dorobek publikacyjny nie jest wprawdzie bogaty ilościowo, ale ważne, że w opublikowanej pracy jest ona wiodącą, pierwszą autorką.

W konkluzji, uważam że przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi bogaty i oryginalny materiał doświadczalny, cenny z punktu widzenia dalszych prac nad związkami o znaczeniu terapeutycznym lub diagnostycznym jak również poznawczym. Rozprawa wnosi istotny wkład w badania nad szerokim zagadnieniem jaki stanowią proteazy, a w szczególności konwertazy jako cele terapeutyczne. W związku z powyższym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia wszelkie warunki określone w Ustawie i wnioskuje do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Tersy Łepek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

