

Małgorzata Katarzyna Sobocińska
Wydział Chemii
Katedra Biotechnologii Molekularnej
Pracownia Chemii Makromolekuł Biologicznych

Promotor: dr hab. Elżbieta Kamysz, prof. UG

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

„Synteza i badania biologiczne endogennych inhibitorów enkefalinaz i ich analogów jako potencjalnych substancji leczniczych w terapii nieswoistych chorób zapalnych jelit i bólu trzewnego”

Leczenie farmakologiczne i/lub utrzymanie remisji w nieswoistych chorobach zapalnych jelit (NChZJ) do których zaliczamy głównie: chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) i wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG) jest obecnie jednym z największych wyzwań w dziedzinie gastroenterologii. Główne cele w terapii anty-NChZJ obejmują leczenie stanu zapalnego oraz złagodzenie objawów klinicznych m.in. zaburzenia motoryki jelit oraz bóle trzewne. Jedną z najnowszych strategii proponowanych w farmakoterapii NChZJ jest celowanie w endogenny układ opioidowy. Endogenne peptydy opioidowe takie jak enkefaliny (Met-enkefalina i Leu-enkefalina) uczestniczą w mechanizmach antynocycepcji [1], regulacji ruchliwości żołądkowo-jelitowej [2], regulacji układu immunologicznego [3, 4], układu sercowo-naczyniowego [5, 6], odpowiedzi przeciwzapalnej, hormonalnej i behawioralnej [7, 8]. Działanie endogennych opioidów w organizmie jest silnie regulowane przez ich metabolizm, a okres półtrwania enkefalin w ludzkim osoczu wynosi zaledwie kilka minut [9], co znacząco utrudnia ich zastosowanie farmakologiczne. Aminopeptydaza N (APN), neutralna endopeptydaza (NEP), peptydaza dipeptydylowa III (DPP III) oraz konwertaza angiotensyny (ACE) są głównymi enzymami rozkładającymi enkefaliny. Proteazy te są szeroko rozpowszechnione w ludzkim organizmie i w sposób istotny są zaangażowane w modulację fizjologiczną i procesy patofizjologiczne w przewodzie pokarmowym [10]. Szczurza sialorfina (Gln-His-Asn-Pro-Arg), ludzka opiorfina (Gln-Arg-Phe-Ser-Arg) oraz bydlęca spinorfina (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) są endogennymi inhibitorami enzymów rozkładających enkefaliny. Badania potwierdziły skuteczność sialorfiny, opiorfiny i spinorfiny w blokowaniu aktywności enkefalinaz zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Dowiedziono, że inhibitory te wykazują przy tym silne działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne, immunologiczne, metaboliczne bezpośrednio oraz pośrednio poprzez wpływ

na poziom enkefalin [11 – 14]. Pośrednia aktywacja receptorów opioidowych przez sialorfinę, opiorfinę i spinorfinę ma dwie zasadnicze zalety: hamowanie enkefalinaz nie wywołuje niepożądanych skutków, które towarzyszą systemowemu stosowaniu opioidów oraz ogranicza opioidowe działanie w czasie i przestrzeni umożliwiając lepszą kontrolę aktywności farmakologicznej. Śledząc doniesienia literaturowe związane z tematyką sialorfiny, opiorfiny i spinorfiny można zauważyć, że od czasu odkrycia i poznania funkcji endogennych inhibitorów enkefalinaz, prowadzone są prace mające na celu zaprojektowanie silnych i stabilnych inhibitorów APN i NEP.

W ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej zajmowałam się syntezą Leu/Met-enkefalin, endogennych inhibitorów enkefalinaz oraz ich analogów. Badaniem wpływu sialorfiny, opiorfiny, sialorfiny i ich analogów na degradację enkefalin. Oceną podatności peptydowych inhibitorów enkefalinaz na degradację metaboliczną w ludzkim osoczu oraz enzymatyczną względem NEP. Przeprowadzone zostało również modelowanie molekularne *in silico* oddziaływań endogennych inhibitorów enkefalinaz i ich analogów z APN i NEP. Scharakteryzowano działanie przeciwzapalne endogennych inhibitorów enkefalinaz i ich analogów oraz przeprowadzono badania działania przeciwbólowego enkefalin oraz sialorfiny, opiorfiny i spinorfiny w mysim modelu bólu trzewnego.

W pierwszej części pracy zsyntetyzowałam Leu-/Met-enkefalinę, peptydowe inhibitory enkefalinaz: sialorfinę, opiorfinę i spinorfinę oraz zaprojektowałam i syntezowałam 74 analogi inhibitorów enkefalinaz. Syntezę peptydów wykonałam na nośniku stałym z wykorzystaniem strategii Fmoc/tBu na żywicy chloro-(2-chloro)tritylowej i amidowej. Po zakończeniu syntezy i zdjęciu z nośnika, peptydy były oczyszczone techniką RP-HPLC i zidentyfikowane za pomocą MALDI-TOF MS oraz RP-HPLC. Otrzymane peptydy (czystość powyżej 95% wg RP-HPLC) przebadalam pod kątem ich wpływu na degradację enkefalin względem NEP i APN przy użyciu RP-HPLC w warunkach *in vitro*. Następnie sialorfinę, opiorfinę i spinorfinę oraz wybrane ich analogi (pięć peptydów) scharakteryzowałam pod kątem stabilności metabolicznej w ludzkim osoczu. Dla sialorfiny i jej syntetycznego analogu (Palm-Lys-Lys-Gln-His-Asn-Pro-Arg), który był silniejszym inhibitorem NEP niż związek wyjściowy i wykazywał silne działanie przeciwzapalne w mysim modelu ChL-C (model ostry) wykonałam dodatkowo w warunkach *in vitro* przy użyciu techniki RP-HPLC charakterystykę podatności na degradację enzymatyczną względem NEP.

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono modelowanie molekularne *in silico* oddziaływań endogennych inhibitorów enkefalinaz i ich analogów z APN i NEP przy

współpracy z dr Arturem Giełdoniem z Pracowni Symulacji Polimerów Katedry Chemii Teoretycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Wykonane symulacje komputerowe umożliwiły wyjaśnienie przyczyny wzrostu i/lub obniżenia aktywności badanych peptydów względem APN i NEP.

Dla sialorfiny, opiorfiny i spinorfiny oraz ich czterech analogów o najlepszym profilu farmakologicznym spośród otrzymanych związków przeprowadzono badania w modelach zwierzęcych NChZJ. Badania *in vivo* zostały wykonane w ramach współpracy z prof. dr. hab. n. med. Jakubem Fichną i dr n. med. Maciejem Sałagą z Zakładu Biochemii Międzywydziałowej Katedry Chemii i Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Sialorfina w mysim modelu ChL-C (model ostry, półprzewlekły, przewlekły) wykazała działanie przeciwzapalne. W modelu ostrym działanie sialorfiny było silniejsze od „klasycznego” leku stosowanego w NChZJ (5-ASA) i było blokowane przez antagonistów receptorów MOR i KOR. Przeprowadzone badania nie wykazały działania przeciwzapalnego sialorfiny w mysim modelu WZJG. Spośród badanych *in vivo* analogów endogennych inhibitorów enkefalinaz w mysim ostrym modelu ChL-C silne działanie przeciwzapalne wykazywał peptyd Palm-Lys-Lys-Gln-His-Asn-Pro-Arg. Natomiast podanie analogu opiorfiny Palm-Lys-Lys-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg nie wpływało na stan zapalny.

Dodatkowo w celu podkreślenia istotności badań oraz translacji wyników badań przedklinicznych na warunki kliniczne dokonano oceny poziomu ekspresji APN i NEP u pacjentów z NChZJ. Poziom mRNA dla APN wzrasta w jelicie grubym u pacjentów z ChL-C i WZJG, a dla NEP pozostaje niezmienny lub ma tendencję do obniżania się odpowiednio w ChL-C i WZJG. Poziom białka w tej samej tkance nie wykazał różnic dla APN, natomiast w przypadku NEP ulegał wyższej ekspresji u pacjentów z ChL-C. Różnic w ekspresji APN i NEP w surowicy nie zaobserwowano.

W badaniach w modelu zwierzęcym bólu trzewnego jedynie enkefalin i sialorfina wykazywały działanie przeciwbólne.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazują, że modulacja poziomu enkefalin poprzez hamowanie aktywności enzymów zaangażowanych w ich degradację może być atrakcyjną alternatywą dla obecnie stosowanych leków przeciwzapalnych. Sialorfina i jej analog Palm-Lys-Lys-Gln-His-Asn-Pro-Arg łagodzą objawy chorób czynnościowych i zapalnych przewodu pokarmowego i stanowią solidną podstawę do dalszych badań nad enkefalinazami jako potencjalnym celem terapeutycznym w terapii NChZJ.

BIBLIOGRAFIA

1. Collins S., Verma-Gandhu M., *Gut*. 2006; 55: 756 – 757
2. Klupińska G., Walecka-Kapica E., Moskwa A., *Terapia*. 2005; 6: 45 – 48
3. Jankovic D.B., Maric D., *Int J Neurosci*. 1990; 51: 167 – 169
4. Salzet M., Tasiemski A., *Dev Comp Immunol*. 2001; 25: 177 – 185
5. Feuerstein G., Siren A.L., *Isi Atlas Scie Pharmacol*. 1987; 1: 280 – 283
6. Simon W., Schaz K., Ganten U., Stock G., Schlorandd K.H., Ganten D., *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1978; 55: 237 – 241
7. Konecka A.M., *Postęp Biochemii*, PWN, red.: Zielińska Z., Warszawa 1980
8. Bilkei-Gorzo A., Racz I., Michel K., Mauer D., Zimmer A., Klingmüller D., Zimmer A., 2008; 33: 425 – 436
9. Janecka A., Staniszevska R., Gach K., Fichna J., *Peptides*. 2008; 29: 2066 – 2073
10. Gabrilovac J., Cupic B., Breljak D., Zekusic M., Boranic M., Expression of CD13/aminopeptidase N and CD10/neutral endopeptidase on cultured human keratinocytes., *Immunol. Lett*. 2004; 91: 39 – 47
11. Rougeot C., Messaoudi M., Hermitte V., Rigault A.G., Blisnick T., Dugave Ch., Desor D., Rougeon F., *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 14: 8549 – 8554
12. Rougeot C., Hualme J.F., Ungeheuer M.N., Wisner A., Dufour E., Patent, EP 1577320 A1
13. Wisne A., Dufour E., Messaoudi M., Nejdj A., Marcel A., Ungeheuer M.N., Rougeot C., *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 17979 – 17984
14. Nishimura K., Hazato T., Masui. 1993; 42: 1497 – 14503