

Streszczenie

Proteazy są hydrolazami katalizującymi rozcinanie wiązań peptydowych. Znaczną część z nich stanowią enzymy wydzielane do płynów ustrojowych. Oprócz tych enzymów występujących w formie rozpuszczalnej, istnieje także podgrupa proteaz zakotwiczonych w błonie komórkowej. Trzej przedstawiciele tej grupy (matryptaza-1 (MT1), matryptaza-2 (MT2) oraz furyna) są obiektem badań przedstawionych w niniejszej pracy.

MT1 i MT2 są serynowymi proteazami zakotwiczonymi w błonie komórkowej. MT1 została odkryta w komórkach raka piersi jako nowy enzym degradowujący macierz zewnątrzkomórkową. Enzym ten jest szeroko rozpowszechniony w licznych tkankach nabłonkowych, gdzie odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu integralności nabłonka. W zdrowych tkankach aktywność MT1 jest ściśle regulowana przez dwa niezależne mechanizmy: autoaktywację oraz inhibicję przez inhibitory aktywatora czynnika wzrostu hepatocytów HAI-1 i HAI-2. Zaburzona równowaga pomiędzy MT1 a jej inhibitorami prowadzi do deregulacji aktywności enzymu, a w konsekwencji do licznych stanów patologicznych. Podwyższoną ekspresję MT1 wykazano w różnych nowotworach nabłonkowych, takich jak rak prostaty, piersi, jajnika, szyjki macicy czy żołądka. Co więcej, nadekspresja MT1 w nowotworach piersi i prostaty koreluje ze stopniem zaawansowania nowotworu oraz może stanowić negatywny czynnik prognostyczny dla pacjenta. Z tego względu MT1 jest uważana za atrakcyjny cel terapeutyczny w leczeniu nowotworów, a jej inhibitory stanowią obiecującą grupę potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Z kolei ekspresję MT2 obserwuje się głównie w hepatocytach. Liczne badania podkreślają rolę MT2 w homeostazie żelaza u człowieka, choć jej dokładna funkcja w tym procesie nie jest wciąż w pełni poznana. Co istotne, w przeciwieństwie do MT1, odnotowano odwrotną zależność pomiędzy ekspresją MT2, a rozwojem nowotworów. Obecność MT2 w komórkach raka piersi jest uważana za dobry prognostyk dla pacjenta. Podkreśla to konieczność opracowania wysoce specyficznych inhibitorów, które selektywnie blokują jedynie MT1, związaną z rozwojem nowotworów, a nie wpływają na aktywność MT2.

Furyna jest najlepiej scharakteryzowaną subtylizyno-podobną konwertazą proproteinową. Enzym ten jest również określany jako PACE (ang. Paired Basic Amino Acid Cleaving Enzyme). Furyna składa się z 794 reszt aminokwasowych i jest białkiem zakotwiczonym w błonie komórkowej typu I. Jest szeroko rozpowszechniona w ludzkim organizmie. Wysoki poziom ekspresji furyny obserwuje się w śliniankach, wątrobie oraz szpiku kostnym. W komórce jest zlokalizowana w dwóch miejscach: na powierzchni lub w sieci trans-Golgiego. W sieci trans-Golgiego furyna odpowiada za przekształcanie i aktywację głównie białek gospodarza, takich jak czynniki wzrostu, hormony, cząsteczki adhezyjne, czynniki krzepnięcia krwi czy receptory. Z kolei na powierzchni komórki furyna przetwarza liczne

substraty patogenne. Furyna bierze udział w rozwoju wielu chorób zapalnych, neurodegeneracyjnych oraz infekcji bakteryjnych i wirusowych. Jej aktywność jest powiązana również z rozwojem licznych nowotworów, m.in. jelita grubego, płuc, skóry, mózgu, głowy i szyi. Ponadto, furyna aktywuje toksyny bakteryjne (np. toksynę błoniczą czy egzotoksynę *Pseudomonas*). Z kolei wirusy (m.in. HIV, wirus grypy, dengi, Ebola, czy Marburg) wykorzystują furynę gospodarza do przetwarzania glikoprotein znajdujących się na ich powierzchni, proces ten skutkuje rozpoczęciem infekcji.

Celem mojej pracy było zaprojektowanie oraz otrzymanie silnych, selektywnych, niekowalencyjnych inhibitorów MT1 i furyny. Strukturą wyjściową dla nowych inhibitorów MT1 był skrócony analog inhibitora wyizolowanego ze skóry płaza *Huia versabilis*, należący do rodziny inhibitorów Bowmana-Birki, (ang. *Huia versabilis* Bowman-Birk inhibitor, HV-BBI), który wykazywał niezwykle silną aktywność wobec MT1 ($K_i = 8$ nM) oraz niemal tysiąckrotnie wyższą selektywność względem MT2. Otrzymanie selektywnych inhibitorów zdolnych do hamowania aktywności tylko jednej z matryptaz jest zadaniem niezwykle wymagającym ze względu na podobną budowę MT1 i MT2. Z kolei inhibitory furyny zostały zaprojektowane w oparciu o strukturę silnego inhibitora furyny, będącego analogiem inhibitora trypsyny wyizolowanego z nasion słonecznika (ang. Sunflower trypsin inhibitor-1, SFTI-1). Struktury wspomnianych inhibitorów zostały przedstawione poniżej (cyklizacja została oznaczona symbolem „&”).

HV-BBI: Ser-Val-Ile-Gly-Cys(&)-Trp-Thr-Lys-Ser-Ile-Pro-Pro-Arg-Pro-Cys(&)-Phe-Val-Lys-NH₂

SFTI-1: &¹Gly-Arg-Cys(&²)-Thr-Lys-Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&²)-Phe-Pro-Asp&¹

Moje badania początkowo skupiały się na opracowaniu inhibitora specyficznego wobec MT1. Zsyntezowałam dwa znakowane 5(6)-karboksylfluoresceiną analogi silnego inhibitora MT1, (zaprojektowanego na podstawie struktury SFTI-1). Jeden z tych peptydów został dodatkowo poddany *N*-metylowaniu w celu zwiększenia jego stabilności proteolitycznej. Jednak po zidentyfikowaniu bardziej skutecznego inhibitora MT1, będącego analogiem HV-BBI (inhibitor **3**), to właśnie ta struktura stała się związkiem wyjściowym w dalszych pracach.

Badania z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej wskazały, że zastąpienie reszty Phe13 w inhibitorze **3** mogłoby wzmocnić jego oddziaływanie z enzymem, a tym samym zwiększyć jego aktywność inhibitorową. W związku z tym Phe13 została zastąpiona różnymi pochodnymi Phe, zawierającymi bardziej rozbudowane łańcuchy boczne, a także aminokwasami różniącymi się rozmiarem i właściwościami fizykochemicznymi, takimi jak Lys. Niestety, modyfikacja ta nie poprawiła aktywności inhibitorowej. Dlatego, przeprowadziłam skanowanie alaninowe w celu zidentyfikowania reszt aminokwasowych kluczowych dla oddziaływań z enzymem. Wyniki tych badań pozwoliły mi wytypować aminokwasy, które potencjalnie można usunąć, aby uzyskać inhibitory o obniżonej masie cząsteczkowej. Celem zmniejszenia rozmiaru cząsteczki było zwiększenie stabilności proteolitycznej

oraz ewentualnej biodostępności inhibitorów. Zaprojektowałam i zsyntetyzowałam dziewięć skróconych analogów inhibitora **3**. Ponadto otrzymałam analog, w którym mostek disulfidowy zastąpiłam mostkiem triazolowym, aby zwiększyć stabilność inhibitora w warunkach redukujących. **Dwa skrócone analogi wykazały aktywność inhibitorową porównywalną z inhibitorem wyjściowym. Co istotne, analog o niższej masie cząsteczkowej wykazywał najwyższą stabilność w surowicy ludzkiej spośród wszystkich badanych inhibitorów MT1.**

Drugą grupą związków, które zsyntetyzowałam stanowiły inhibitory furyny. Wykorzystując strukturę silnego inhibitora furyny (analogu SFTI-1) opracowanego wcześniej przez grupę Fittlera stworzyliśmy bibliotekę peptydów z użyciem chemii kombinatorycznej. Kolejne etapy iteracyjnej dekonwolucji biblioteki peptydowej pozwoliły określić optymalne aminokwasy w pozycjach P1, P2, P4 oraz P5. Po wybraniu najbardziej obiecującego inhibitora furyny, wprowadziłam dodatkowy aminokwas zasadowy na *N*-końcu, zgodnie z doniesieniami literaturowymi wskazującymi na pozytywny wpływ takiej modyfikacji na siłę hamowania furyny. Zastosowałam również dodatkową cyklizację w celu zwiększenia stabilności proteolitycznej peptydów. **Badania enzymatyczne umożliwiły zidentyfikowanie trzech silnych inhibitorów (40, 42, 46) wykazujących nanomolowe wartości K_i aktywność wobec furyny.** Następnie otrzymałam analogi tych inhibitorów znakowane 5(6)-karboksylfluoresceiną oraz dodatkowy analog jednego z nich, w którym mostek disulfidowy zastąpiłam mostkiem triazolowym.

Jeden z inhibitorów furyny (**42**) oraz jego analogi z wymienionym mostkiem disulfidowym zostały poddane ocenie pod kątem aktywności przeciwnowotworowej. Badania te nie przyniosły jednak jednoznacznych wniosków. Analogi zawierające mostki triazolowy (peptyd **44**) oraz diselenowy (peptyd **45**) wykazały zwiększoną aktywność przeciwnowotworową wobec linii komórkowych U251 i A549 w porównaniu z inhibitorem wyjściowym (zawierającym mostek disulfidowy). Jednakże zastosowany w badaniach, jako kontrola pozytywna, komercyjny inhibitor furyny (Dec-RVKR-CMK) nie wykazał aktywności przeciwnowotworowej. Może to sugerować, że aktywność przeciwnowotworowa peptydów **44** oraz **45** niekoniecznie wynika z hamowania furyny.

Z kolei badania przeciwwirusowe przeprowadzone wobec wirusa Zika (ZIKV) wykazały, że wszystkie trzy silne inhibitory furyny (**40, 42, 46**) obniżały miano ZIKV. Co istotne, najsilniejszy inhibitor furyny wykazał również najsilniejszą aktywność przeciwwirusową wobec ZIKV, przewyższając działanie komercyjnego, nieselektywnego inhibitora furyny Dec-RVKR-CMK. **Ważnym aspektem jest również niższa cytotoksyczność naszego inhibitora oraz około pięciokrotnie wyższy indeks terapeutyczny (SI). Wyniki te wskazują na potencjalne zastosowanie terapeutyczne tego inhibitora w leczeniu zakażeń Flawiwirusami.**

Ponadto w związku z *N*-metylowaniem wybranych peptydów w celu zwiększenia ich stabilności w surowicy ludzkiej, zdecydowałam się zoptymalizować tę metodę. Do niedawna powszechnie stosowaną

procedurą w naszej grupie była czterogodzinna, trzyetapowa metoda *N*-metylowania na nośniku stałym. Biorąc pod uwagę doniesienia wskazujące na znaczące przyspieszenie syntezy peptydów osiągnęte dzięki zastosowaniu ultradźwięków, postanowiłam zbadać, czy technika ta mogłaby zastąpić standardowe wytrząsanie podczas procesu *N*-metylowania. Jako związek modelowy do badań wybrałam tripeptyd Arg-Trp-Gly-NH₂. Każdy etap procedury był przeze mnie stopniowo skracany. **W rezultacie zoptymalizowałam i istotnie skróciłam całkowity czas trwania procesu *N*-metylowania peptydu na nośniku stałym, z 4 godzin do 40 minut.** Po ustaleniu optymalnych warunków metoda została następnie zastosowana do *N*-metylowania różnych aminokwasów znajdujących się na *N*-końcu w modelowym tripeptydzie. Testowanymi resztami były: His, Ser, Trp, Tyr, Asp, Glu, Cys, Phe i Ala. Ponadto oceniłam wydajność skróconej metody wykorzystując syntezytor peptydów wspomagany mikrofalami oraz standardową wytrząsarkę laboratoryjną. W końcowym etapie, po potwierdzeniu efektywności zoptymalizowanej metody, zsyntetyzowałam peptyd metylowany w trzech pozycjach, co dodatkowo potwierdziło użyteczność tej metody.