

Załącznik nr 2

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego z dnia 14.03.2019

Autoreferat w języku polskim

dr Jarosław Ruczyński

Pracownia Chemii Związków Biologicznie Czynnych

Katedra Biochemii Molekularnej

Wydział Chemii

Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 2019

H2. Olkowicz M, **Ruczyński J***, Cybal M, Konstański Z, Pertusewicz J, Kamińska B, Rekowski P, „New galanin(1-15) analogues modified in positions 9,10 and 11 act as galanin antagonists on glucose-induced insulin secretion”, *J Physiol Pharmacol*, 58(4), 859-872 (2007). **IF₂₀₀₇ = 4,466**, liczba cytowań 13 (bez autocytowań 11)

H3. **Ruczyński J***, Lewandowska B, Mucha P, Rekowski P, “Problem of aspartimide formation in Fmoc-based solid phase peptide synthesis using Dmab group to protect side chain of aspartic acid”. *J Pept Sci*, 14, 335-341 (2008). **IF₂₀₀₈ = 1,654**, liczba cytowań 13 (bez autocytowań 11)

H4. **Ruczyński J***, Konstański Z, Cybal M, Kocić I, Rekowski P, „Aspartamide modified galanin analogue antagonizes galanin action on Insulin secretion”, *Protein Peptide Lett*, 17, 1182-1188 (2010). **IF₂₀₁₀ = 1,849**, liczba cytowań 10 (bez autocytowań 10)

H5. **Ruczyński J***, Konstański Z, Cybal M, Pertusewicz J, Wójcikowski C, Rekowski P, Kamińska B, "Synthesis and biological properties of new chimeric galanin analogue GAL(1-13)-[Ala^{10,11}]ET-1(6-21)-NH₂", *J Physiol Pharmacol*, 56(2), 273-285 (2005). **IF₂₀₀₅ = 2,212**, liczba cytowań 5 (bez autocytowań 1)

H6. Kocić I, **Ruczyński J**, Szczepańska R, Olkowicz M, Parfianowicz B, Rusiecka I, Rekowski P, „Cell penetrating peptides modulate the vascular action of phenylephrine” *Pharmacol Reports*, 63, 195-199 (2011). **IF₂₀₁₁ = 2,445**, liczba cytowań 4 (bez autocytowań 2)

H7. **Ruczyński J*[§]**, Wierzbicki PM[§], Kogut-Wierzbicka M, Mucha P, Siedlecka-Kroplewska K, Rekowski P, "Cell-penetrating peptides as a promising tool for delivery of various molecules into the cells" *Folia Histochem Cytobiol*, 52(4), 257-269 (2014). Praca przeglądowa, **IF₂₀₁₄ = 1,364**, liczba cytowań 15 (bez autocytowań 14)

H8. Wierzbicki PM, Kogut-Wierzbicka M, **Ruczyński J**, Siedlecka-Kroplewska K, Kaszubowska L, Rybarczyk A, Alenowicz M, Rekowski P, Kmieć Z, "Protein and siRNA delivery by transportan and transportan 10 into colorectal cancer cell lines" *Folia Histochem Cytobiol*, 52(4), 270-280 (2014). **IF₂₀₁₄ = 1,364**, liczba cytowań 10 (bez autocytowań 9)

H9. Rusiecka I, **Ruczyński J**, Alenowicz M, Rekowski P, Kocić I, "Transportan 10 improves the anticancer activity of cisplatin" *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 389, 485-497 (2016). **IF₂₀₁₆ = 2,558**, liczba cytowań 2 (bez autocytowań 2)

H10. Wojciechowska M, **Ruczyński J***, Rekowski P, Alenowicz M, Mucha P, Pieszko M, Miszka A, Dobkowski M, Bluijssen H, "Synthesis and hybridization studies of a new CPP-PNA conjugate as a potential therapeutic agent in atherosclerosis treatment" *Protein Pept Lett*, 21(7), 672-678 (2014). **IF₂₀₁₄ = 1,068**, liczba cytowań 8 (bez autocytowań 4)

H11. Rusiecka I[§], **Ruczyński J*[§]**, Kozłowska A, Bactrog E, Mucha P, Kocić I, Rekowski P, „TP10-dopamine conjugate as a potential therapeutic agent in the treatment of Parkinson’s disease” *Bioconjugate Chemistry* (2019) DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00894. **IF₂₀₁₇ = 4,485** (z 2019 brak danych), liczba cytowań 0

H12. **Ruczyński J[§]**, Rusiecka I[§], Turecka K, Kozłowska A, Alenowicz M, Gągało I, Kawiak A, Rekowski P, Waleron K, Kocić I, „Transportan 10 improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vancomycin” *Sci Rep*, 9(1), 3247 (2019), DOI : 10.1038/s41598-019-40103-w, **IF₂₀₁₇ = 4,122** (z 2019 brak danych), liczba cytowań 0

* autor korespondencyjny

§ równy udział autorów w pracy

Liczbowe zestawienie danych bibliometrycznych (według bazy Web of Science z dnia 11.03.2019)

Publikacje	Liczba publikacji z tzw. listy filadelfijskiej	Sumaryczny IF ¹	Liczba cytowań		Liczba publikacji spoza tzw. listy filadelfijskiej	Liczba komunikatów konferencyjnych
			ogółem	bez autocytowań		
Ogółem	30	53,182	186	145	14	91
Przed uzyskaniem stopnia doktora	9	7,749	40	20	2	15
Po uzyskaniu stopnia doktora	21	45,433	146	125	1 (publikacja) + 10 (materiały konferencyjne) + 1 (wniosek patentowy)	76
Wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	12	29,683	87	71	nie dotyczy	nie dotyczy
Indeks Hirscha	8					

¹ dla publikacji z 2018 i 2019 roku uwzględniono IF z roku 2017

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

WPROWADZENIE

Polipeptydy odgrywają niezmiernie istotną rolę w funkcjonowaniu organizmów żywych. Są hormonami i regulatorami, modułują wydzielanie innych hormonów, wpływają również na nasze zachowanie i samopoczucie, procesy uczenia się i odczuwania bólu. Wśród wielu znanych biologicznie aktywnych peptydów dość liczną grupę stanowią neuropeptydy. Do grupy neuropeptydów zalicza się powstające w komórkach nerwowych polipeptydy pełniące funkcje sygnałowe dla innych komórek. W 1983 roku do tej grupy związków dołączył wyizolowany z tkanek przewodu pokarmowego świni nowy biologicznie czynny peptyd, któremu nadano nazwę **galanina**, od nazwy *N*-końcowego aminokwasu – glicyny oraz *C*-końcowego aminokwasu – alaniny [1].

Struktura galaniny

Galanina (**Gal**) jest 29-peptydem z grupą amidową na *C*-końcu. Wszystkie, opisane dotychczas odmiany gatunkowe galaniny, z wyjątkiem pstrąga, posiadają identyczny *N*-końcowy fragment 1-15 (*tab. 1*). Natomiast galanina człowieka zbudowana jest z 30 reszt aminokwasowych i nie zawiera grupy amidowej na *C*-końcu [2]

Tabela1. Struktura pierwszorzędowa znanych galanin niektórych kręgowców [3]

Gatunek	Sekwencja aminokwasowa
Człowiek	GWTLNSAGYLLGPHA VGNHRFS DK NGLTS-COOH
Świnia	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFHDKYGLA-NH ₂
Pies	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFHEK PGLT -NH ₂
Kot	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFQEK PGLT -NH ₂
Owca	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFHDKHGLA-NH ₂
Krowa	GWTLNSAGYLLGPHA LDSHRSFQDKHGLA-NH ₂
Szczur	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRFS DK HGLT-NH ₂
Mysz	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRFS DK HGLT-NH ₂
Kurczak	GWTLNSAGYLLGPHA VDNHRSFNDKHGFT-NH ₂
Aligator	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFNEKHGIA-NH ₂
Żaba	GWTLNSAGYLLGPHA IDNHRSFNDKHGLA-NH ₂
Pstrąg	GWTLNSAGYLLGPH G IDGHRTLS DK HGLA-NH ₂

Gal jest peptydem szeroko rozpowszechnionym zarówno w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, jak również w wielu tkankach obwodowych [1-14]. Galanina występuje w mózgu oraz rdzeniu kręgowym, w układzie oddechowym, pokarmowym, moczowo-płciowym oraz w takich narządach jak: przysadka mózgowa, trzustka, pęcherz moczowy. Gal wykryto w autonomicznych zwojach nerwowych unerwiających serce, nerki, wątrobę, śledzionę oraz mięśnie gładkie szyjki macicy.

Receptory galaniny

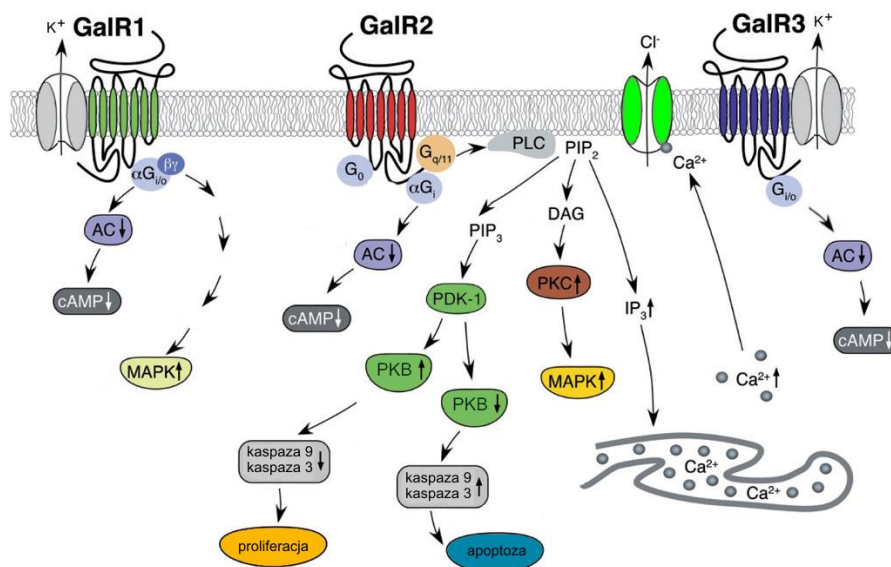
Szereg efektów biologicznych galaniny wynika z pobudzenia przez galaninę swoistych receptorów (GalR), które należą do klasy receptorów błonowych sprzężonych z białkami typu G (GPCR). Dotychczas sklasyfikowano trzy typy receptorów galaninowych: GalR₁, GalR₂ oraz GalR₃, których aktywność pokrywa się z miejscami występowania Gal [4-8, 14-17].

Receptor Gal typu 1 (GalR₁) zlokalizowany jest głównie w mózgu, rdzeniu kręgowym oraz przewodzie pokarmowym (trzustka, jelita). GalR₁ szczura wykazuje 92% homologię sekwencyjną z receptorem ludzkim, co znajduje odzwierciedlenie w niemal identycznych właściwościach farmakologicznych. Pobudzenie receptora GalR₁, sprzężonego z białkiem typu G_{i/o}, redukuje stężenie cAMP (cykliczny adenozyno-5'-monofosforan) poprzez zahamowanie aktywności cyklazy adenylowej, otwiera kanały K⁺ o właściwościach prostowniczych oraz stymuluje aktywność kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK) w sposób wrażliwy na działanie toksyny krztuścowej. GalR₁ wykazuje niskie powinowactwo do fragmentu Gal(2-29) oraz analogu [D-Trp²]Gal(1-29). Lokalizacja oraz charakterystyka farmakologiczna GalR₁ sugeruje, że może on brać udział w regulacji łaknienia, odczuwania bólu, funkcji poznawczych (uczenie się i zapamiętywanie), motoryki przewodu pokarmowego, wydzielania insuliny oraz soku żołądkowego. Wykazano, że może brać również udział w rozwoju depresji i zaburzeń nastroju, epilepsji, choroby Alzheimerera oraz niektórych chorób nowotworowych.

Natomiast, receptor Gal typu 2 (GalR₂) zlokalizowano w podwzgórzu, hipokampie, przysadce, płucach, sercu, nerkach, wątrobie, śledzionie, żołądku i jelicie cienkim. Ludzki receptor GalR₂ wykazuje 85% homologię sekwencyjną z receptorem szczura. W zależności od miejsca występowania, GalR₂ może być sprzężony zarówno z białkami typu G_{q/11} jak i G_{i/o}. W związku z tym, pobudzenie receptora GalR₂ może wywołać szereg przeciwstawnych działań, np. stymulować i hamować egzocytozę, zmniejszać produkcję cAMP, stymulować aktywność fosfolipazy C, uwalniać jony wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów, a także aktywować kanały Cl⁻ zależne od jonów Ca²⁺ oraz stymulować aktywność kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAP). W przeciwieństwie do GalR₁, GalR₂ wykazuje wysokie powinowactwo do fragmentu Gal(2-29), a także analogu [D-Trp²]Gal(1-29). Lokalizacja oraz charakterystyka farmakologiczna GalR₁ sugeruje, że może on odgrywać rolę w regeneracji nerwów, kontroli laktacji, uwalniania hormonu wzrostu, łaknienia, funkcji poznawczych (uczenia się i zapamiętywania), odczuwania bólu oraz zachowania seksualnego. Wykazano również, że może brać udział w rozwoju depresji i zaburzeń nastroju, epilepsji oraz niektórych chorób nowotworowych.

Ostatni w tej grupie receptorów – receptor GalR₃ został zlokalizowany głównie w podwzgórzu, przysadce, rdzeniu kręgowym, korze mózgowej, sercu, płucach, śledzionie, wątrobie, jelicie cienkim, nerkach, jądrach, pęcherzu moczowym oraz nadnerczach. Ludzki receptor GalR₃ wykazuje 90% homologię sekwencyjną z receptorem szczura. Pobudzenie receptora GalR₃ sprzężonego z białkiem G_{i/o} prowadzi do otwarcia kanałów K⁺ o właściwościach prostowniczych oraz zahamowania aktywności cykazy adenylowej. Wykazuje on wysokie powinowactwo do fragmentu Gal(2-29) oraz brak powinowactwa do analogu [D-Trp²]Gal(1-29). Lokalizacja receptora GalR₃ oraz charakterystyka farmakologiczna GalR₃ sugerują, że odgrywa on rolę w procesach kontroli zaburzeń emocjonalnych, łaknienia, odczuwania bólu, wydzielania hormonów przysadki oraz metabolizmu glukozy. Wykazano również jego wpływ na proces spożywania alkoholu (w uzależnieniach od alkoholu).

Mimo odmiennych w wielu przypadkach mechanizmów działania galaniny wszystkie one przebiegają za pośrednictwem w/w wymienionych receptorów sprzężonych z białkami G, które stanowią element łączący receptor z wtórnymi przekąźnikami, jak np. jonami wapnia, cAMP, diacyloglicerolem (DAG) lub 1,4,5-trifosforanem inozytoli (IP₃) [5, 4, 8, 9, 12, 17, 18]. Wtórne przekąźniki uwalniane do cytoplazmy, stymulują lub hamują egzocytozę oraz regulują aktywność kinaz białkowych (rys. 1).



Rysunek 1. Mechanizmy transdukcji sygnałowej w 3 podtypach receptorów Gal (GalR₁, GalR₂, GalR₃) [4]; AC – cyklaza adenylowa, cAMP – cykliczny adenozylo-5'-monofosforan, DAG – diacyloglicerol, G – białko G, IP₃ – 1,4,5-trifosforan inozytoli, MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenami, PDK-1 – zależna od fosfatydyloinozytoli kinaza białkowa, PIP₂ – fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan, PIP₃ – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan, PKB – kinaza białkowa B, PKC – kinaza białkowa C, PLC – fosfolipaza C

Funkcje biologiczne galaniny

Obecność galaniny oraz jej receptorów niemal we wszystkich organach i tkankach zarówno ludzi jak i zwierząt ma ścisły związek z szerokim zakresem aktywności biologicznej galaniny (tab. 2) [4, 5, 7, 8, 10-15]. Wpływa ona bowiem na wydzielanie oraz postsynaptyczne działanie wielu klasycznych neuroprzebieżników, takich jak: acetylocholina (Ach), noradrenalina (NE), serotonina (5-HT) oraz dopamina (DA). Ponadto, współwystępuje z innymi neuropeptydami modulując ich aktywność: neuropeptydem Y (NPY), substancją P (SP), wazopresyną (ADH), naczyniowoaktywnym peptydem jelitowym (VIP) [4, 7, 12].

Tabela 2. Niektóre aktywności biologiczne Gal sugerowane w badaniach *in vivo* i/lub *in vitro* z wykorzystaniem galaniny lub jej analogów [4]

Miejsce działania	Aktywność biologiczna
Przegroda, hipokamp	▪ Hamowanie procesu uczenia się oraz zapamiętywania (podczas rozwoju choroby Alzheimera wzrasta ekspresja receptorów Gal w mózgu)
Ciało migdałowe	▪ Działanie przeciwłękowe (u szczurów)
Podwzgórze	▪ Pobudzenie procesu łaknienia pokarmów (głównie GalR ₁) ▪ Hamujący wpływ na zachowania seksualne samców ▪ Regulowanie wydzielania wazopresyny oraz oksytocyny (GalR ₂) ▪ Modulowanie stanu pobudzenia, wpływ na sen
Podwzgórze, rdzeń przedłużony	▪ Modulowanie aktywności ośrodkowego układu sercowo-naczyniowego, w połączeniu z angiotensyną II
Hipokamp	▪ Wpływ na wzrost neurytów, żywotność neuronów, ▪ Działanie przeciwdrgawkowe (u szczurów i myszy)
Rdzeń kręgowy	▪ Wpływ analgetyczny (znoszący ból) przy ostrej formie bólu (GalR ₁) ▪ Efekt przeczulicy bólowej przy przewlekłej formie bólu (GalR ₂) ▪ Wpływ na wzrost neurytów oraz regenerację nerwów
Mózg	▪ Wzrost spożycia etanolu (poprzez oddziaływanie z GalR ₃)
Układ pokarmowy	▪ Hamowanie wydzielania insuliny, glukagonu, somatostatyny, amylazy oraz sekrecji żołądkowej ▪ Regulowanie aktywności motorycznej mięśni gładkich (zależna od gatunku) ▪ Zmniejszenie ryzyka powstawania wrzodów żołądka i stanów zapalnych jelit
Nerwy obwodowe	▪ Stymulacja regeneracji uszkodzonych nerwów
Tkanki nowotworowe	▪ Wpływ na proliferację komórek (nowotwór drobnokomórkowy płuc, trzustki i przysadki) ▪ Hamowanie rozwoju nowotworów okrężnicy i trzustki (u szczurów) ▪ Hamowanie wzrostu (komórki nerwiaka niedojrzałego i komórki nowotworu płaskonabłonkowego) ▪ Zmniejszenie wielkości guza nowotworowego poprzez zastosowanie z oktreotydem i serotoniną w nowotworach okrężnicy, żołądka i trzustki ▪ Zmniejszanie dopływu krwi do guzów nowotworowych
Mikrokrążenie skórne	▪ Hamowanie tworzenia się obrzęków zapalnych ▪ Zwężenie naczyń krwionośnych
Naskórek skóry	▪ Aktywność przeciwgrzybicza

Gal wpływa na procesy łaknienia pokarmów i przyrost masy ciała. Wykazano, że Gal pobudza apetyt u szczurów, powodując nadmierne spożycie tłuszczu, zmniejsza zużycie energii i sprzyja rozwojowi otyłości [3, 7, 8, 12, 14, 17, 20-22]. Natomiast poprzez pobudzenie receptora GalR₃ wpływa na wzrost spożycia alkoholu.

Udział Gal w regulacji stanów lękowych jest jedną z jej ważniejszych funkcji. Badania wykazały, że iniekcja Gal do ośrodkowego układu nerwowego może wywoływać działanie przeciwłkowe, prawdopodobnie spowodowane obniżeniem poziomu noradrenaliny i glutamianu w ciele migdałowatym i hipokampie [4, 14, 17].

Gal podawana do części grzbietowej hipokampa zwiększa uwalnianie acetylocholinę i pobudza procesy zapamiętywania, poprzez wiązanie się z GalR₂, natomiast podawana do części brzusznej hipokampa, hamuje sekrecję acetylocholinę i upośledza te mechanizmy, poprzez oddziaływanie na GalR₁ [4, 8, 24-26]. Wpływ Gal na powyższe procesy wynika z modulacji transmisji cholinergiczej oraz noradrenergicznej, glutaminergiczej i serotonergiczej.

Hamujący wpływ Gal na wydzielanie acetylocholinę połączony ze wzmożonym przesyłaniem impulsów we włóknach galanergiczych w przodomózgowiu sugeruje związek Gal z zaburzeniami funkcjonowania włókien cholinergiczych, a więc udział w patofizjologii choroby Alzheimera [4, 8, 14, 27, 28].

Gal uczestniczy również w powstawaniu depresji [4, 8, 14, 29-31]. W neuronach miejsca sinawego Gal współwystępuje z noradrenaliną. Gal blokuje aktywność neuronów dopaminergiczych, produkujących noradrenalinę.

Ponadto Gal hamuje odruchy mięśniowe wywołane bodźcami nocycyptywnymi, co sugeruje związek Gal z działaniem przeciwbólowym [4, 8, 14, 17, 32, 33]. U małp, uszkodzenie nerwów obwodowych powoduje wzrost poziomu Gal. Okazało się, że Gal blokuje odruchy mięśni spowodowane uszkodzeniem nerwów. U szczurów natomiast Gal wzmacnia i wydłuża przeciwbólne działanie morfiny.

W badaniach wpływu Gal na funkcje układu krwionośnego uśpionych kotów stwierdzono osłabienie akcji serca oraz spadek ogólnoustrojowego ciśnienia krwi, zaś u ryb, płazów, ssaków oraz człowieka zaobserwowano efekt przeciwny [4, 7, 17, 34, 35]. Sugeruje się, że efekt ten może być wynikiem pobudzenia przez Gal receptora GalR₁ i redukcję wydzielania acetylocholinę z nerwów cholinergiczych przedsionka.

Gal pobudza uwalnianie hormonów do krwi z części gruczołowej przysadki tj. hormonu wzrostu, hormonu adrenokortykotropowego, hormonów gonadotropowych (lutropiny, folikulotropiny) oraz prolaktyn [7, 8, 12, 36, 37].

Wykazano również rolę Gal w stanach zapalnych skóry oraz epilepsji [4, 5, 14, 38-41]. Galanina i jej agony poprzez pobudzenie receptora GalR₁ oraz GalR₂ mogą wywierać działanie przeciwdrgawkowe, co może być szczególnie użyteczne w leczeniu epilepsji.

Gal jest również zaangażowana w procesy neuroregeneracyjne uszkodzonych nerwów oraz działanie neuroprotekcyjne, w których udział mogą mieć receptory GalR₂ [4, 14, 17, 42-44].

Obecność Gal i jej receptorów (GalR₁ i GalR₂) wykazano w niektórych guzach nowotworowych, w związku z tym może mieć wpływ na proliferację komórek nowotworowych (płuc, trzustki, okrężnicy, żołądka, przysadki, mózgu, sutka, guzów neuroblastycznych, czerniaka), powodując zarówno wzrost jak i zmniejszenie wielkości guzów nowotworowych [4, 5, 14, 17, 45, 46].

Galanina wpływa na funkcje motoryczne tkanek mięśniowych przewodu pokarmowego [1, 4, 7-13, 47-56]. Zależnie od gatunku zwierzęcia i rodzaju tkanki, Gal pobudza lub hamuje skurcze mięśni gładkich. Procesy te mogą przebiegać w dwojaki sposób. W pierwszym przypadku Gal wywiera bezpośredni wpływ na mięśniówkę gładką, co wywołuje zależne od stężenia Gal skurcze mięśni gładkich (np. okrężnica myszy, żołądek, jelito czcze, jelito kręte i okrężnica szczura, jelito kręte świnki morskiej, królika i świni, jelito czcze i okrężnica człowieka). Ten rodzaj aktywności Gal związany jest z jej wpływem na wydzielanie pozakomórkowych jonów Ca²⁺ oraz aktywacją układu fosfolipazy C. W drugim przypadku Gal działa jako neuromodulator, wpływając np. na aktywność neuronów cholinergicznym i hamując uwalnianie acetylocholino (ACh) z zakończeń neuronalnych (np. jelito kręte świnki morskiej, odźwiernik i jelito kręte psa). Okazało się, iż działanie Gal redukowane jest przez atropinę (antagona ACh), która hamuje kurczliwość mięśni gładkich. Sugeruje się, że bezpośredni efekt kurczący mięśnie gładkie jest efektem pobudzenia receptora GalR₂, którego wysoki poziom ekspresji stwierdzono w żołądku, oraz GalR₁, którego wysoki poziom ekspresji wykazano w okrężnicy. Poziom ekspresji receptora GalR₃ jest relatywnie niski i ogranicza się głównie do jelita grubego.

Gal jako lokalny wewnątrzkomórkowy regulator wydzielania insuliny działa bezpośrednio na trzustkowe komórki β, odpowiedzialne za produkcję tego hormonu [4, 8, 57-62]. Obniża ona podstawowy poziom insuliny we krwi oraz wpływa hamująco na wydzielanie insuliny stymulowane glukozą. Stwierdzono ponadto inhibitorowy wpływ Gal na wydzielanie innych hormonów trzustkowych: somatostatyny, polipeptydu trzustkowego i glukagonu. Badania *in vivo* oraz *in vitro* wykazały wpływ Gal na wydzielanie insuliny u myszy, szczurów, psów, królików, świń, pawianów i ludzi. Hamujący wpływ Gal na wydzielanie insuliny z wysp

trzustkowych najprawdopodobniej wywoływany jest blokowaniem układu cykazy adenylowej oraz aktywacją zależnych od ATP kanałów K^+ , co wywołuje hiperpolaryzację błony komórkowej i pośrednie działanie na zależne od potencjału kanały Ca^{2+} . Sugeruje się, że efekt ten może być wynikiem pobudzenia przez Gal receptora GalR₁, którego poziom ekspresji jest w trzustce najwyższy. Badania wskazują również na wpływ galaniny na egzocytozę insuliny.

Projektowanie analogów galaniny

Szerokie spektrum aktywności biologicznej Gal może mieć związek z różnymi stanami chorobowymi oraz zaburzeniami, takimi jak: choroba Alzheimera, choroby nowotworowe, cukrzyca, otyłość, epilepsja, depresja, zaburzenia nastroju oraz procesów uczenia się i zapamiętywania, uzależnienie od spożycia alkoholu oraz stany zapalne [4-6, 8, 14, 17]. Możliwość zastosowania Gal oraz jej analogów (szczególnie tych o charakterze antagonistycznym) w terapii oraz diagnostyce medycznej czynią galaninę obiektem intensywnych badań wielu laboratoriów (*tab. 3*).

Tabela 3. Potencjalne możliwości wykorzystania Gal i jej analogów w terapii różnych chorób i zaburzeń [6, 14]

Agon	Antagon
GalR₁ <ul style="list-style-type: none"> ▪ tłumienie bólu ▪ działanie przeciwdrgawkowe ▪ działanie przeciwłękowe ▪ wspomaganie terapii nowotworowych 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ działanie przeciwdepresyjne ▪ poprawa procesów uczenia się i zapamiętywania ▪ regulacja łaknienia (wspomaganie leczenia cukrzycy i otyłości) ▪ hamowanie rozwoju choroby Alzheimera
GalR₂ <ul style="list-style-type: none"> ▪ tłumienie bólu ▪ działanie przeciwdrgawkowe ▪ działanie przeciwłękowe ▪ działanie przeciwdepresyjne ▪ działanie neuroprotektoryjne/neuro-regeneracyjne (np. w chorobie Alzheimera) ▪ wspomaganie terapii nowotworowych 	
GalR₃	<ul style="list-style-type: none"> ▪ działanie przeciwdepresyjne ▪ działanie przeciwłękowe ▪ hamowanie spożycia alkoholu w uzależnieniach ▪ zmniejszenie nasilenia ostrego zapalenia trzustki

Projektowanie nowych związków, które można byłoby wykorzystać w terapii lub diagnostyce medycznej chorób i zaburzeń wywołanych aktywnością galaniny wydaje się szczególnie ważne z klinicznego punktu widzenia. Jednakże projektowania tego typu związków napotyka szereg trudności związanych m.in. z:

- **wielokierunkową aktywnością biologiczną galaniny** – w zależności od miejsca działania (rodzaju tkanki), gatunku zwierzęcia, Gal może działać jako stymulator (np. stymulacja skurczu mięśni gładkich przewodu pokarmowego) lub inhibitor (np. hamowanie wydzielania insuliny z izolowanych trzustkowych wysp Langerhansa)

- **niską efektywnością penetracji galaniny do ośrodkowego układu nerwowego (OUN)** – Gal i jego analogii wykazują niską zdolność do pokonywania bariery krew-mózg (BBB), co utrudnia badanie efektów wywołanych przez Gal w OUN
- **brakiem selektywnych agonów i antagonistów receptorów galaninowych** – co uniemożliwia dokładniejsze scharakteryzowanie profili farmakologicznych oraz roli receptorów Gal różnych podtypów w patogenezie wielu chorób i zaburzeń
- **trudnością rozróżnienia efektów fizjologicznych i farmakologicznych działania galaniny** – ze względu na brak selektywnych agonów i antagonistów galaniny
- **stosunkowo niewielką wiedzą dotyczącą wewnątrzkomórkowych mechanizmów działania galaniny.**

Wskazanie reszt aminokwasowych w cząsteczce Gal odpowiedzialnych za efekty biologiczne i/lub wiązanie z receptorami Gal obecnymi w różnych organach oraz tkankach, pozwala na dokładniejsze poznanie zależności struktura galaniny – aktywność biologiczna. Poznanie tych zależności jest pierwszym i jednym z najważniejszych elementów w procesie projektowania nowych analogów zarówno o właściwościach agonistycznych jak i antagonistycznych w stosunku do galaniny.

Pierwszym krokiem w kierunku znalezienia korzystnych zmian strukturalnych było wskazanie fragmentów odpowiedzialnych za aktywność biologiczną oraz stwierdzenie, które reszty aminokwasowe w cząsteczce Gal są kluczowe dla jej aktywności biologicznej. W badaniach nad receptorami Gal analizowano między innymi wpływ skracania natywnego łańcucha galaniny oraz wpływ zamiany poszczególnych reszt aminokwasowych (np. Ala, tzw. skaning alaninowy) w aktywnym fragmencie Gal(1-16) na powinowactwo do receptorów Gal z podwzgórza oraz rdzenia kręgowego szczura [63, 64]. Wnioski z tych badań są następujące:

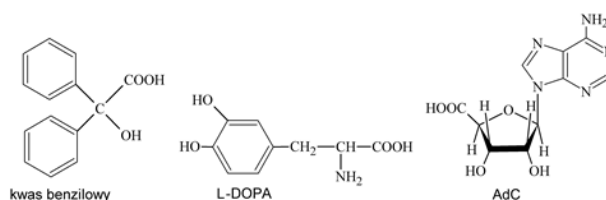
- najbardziej aktywnym fragmentem cząsteczki peptydu jest *N*-końcowy fragment 1-15, odpowiedzialny za wiązanie z receptorami Gal jak i za większość funkcji biologicznych,
- dla pełnej aktywności wymagana jest obecność *C*-końcowego fragmentu, który wzmacnia działanie i chroni *N*-końcowy fragment przed działaniem enzymów proteolitycznych
- dwie pierwsze reszty aminokwasowe tj. Gly¹ i Trp² w cząsteczce Gal są kluczowe dla aktywności i powinowactwa do receptorów; usunięcie Gly¹, podstawienie Trp² inną aromatyczną resztą (D-Trp, Phe, Tyr) lub niearomatyczną (Ile, Ala) obniża w sposób znaczący aktywność peptydu, fragment Gal(3-29) jest nierozpoznawalny przez receptory
- ważną rolę w oddziaływaniu z receptorami Gal odgrywają również reszty: Asn⁵, Tyr⁹, Leu^{10,11}, Gly¹²

- dopuszczalne są zmiany w niektórych pozycjach: 4, 6 oraz w pozycjach za 12 resztą aminokwasową, które nie prowadzą do zaniku powinowactwa do receptorów Gal

Szczególnie interesujących wyników dostarczyły badania, w których *N*-końcowy fragment Gal(1-13) wydłużano przez dołączanie różnych struktur peptydowych lub niepeptydowych do grupy ϵ -aminowej reszty L-Lys, wprowadzonej w pozycję 14 (*tab. 4*). Przyłączenie Lys(X) do *N*-końcowego fragmentu Gal(1-13), gdzie X = kwas benzylowy, L-DOPA (L-3,4-dihydroksyfenyloalanina), L-Tyr lub AdC (kwas adenozyno-5'-karboksylowy), powodowało znaczny wzrost powinowactwa peptydów do receptorów Gal [65].

Tabela 4. Powinowactwa Gal(1-13) i jego analogów do receptorów Gal z podwzgorza szczura [65]

Ligand	K_a [nM]
Gal(1-13)	150
Gal(1-13)-Lys(kwas benzylowy)	10.1
Gal(1-13)-Lys(Tyr)	2.3
Gal(1-13)-Lys(AdC)	1.6
Gal(1-13)-Lys(L-DOPA)	0.4



Znaczącą rolę w badaniach nad fizjologicznymi właściwościami galaniny mogą również odgrywać niskocząsteczkowe niepeptydowe ligandy receptorów Gal (*tab. 5*) [4-6, 14, 17, 66]. Ich duża stabilność w organizmie czyni je użytecznymi narzędziami w badaniach nad receptorami Gal. Istnieje jednak wiele ograniczeń uniemożliwiających ich pełne wykorzystanie. Główną wadą jest ich niskie powinowactwo (rzędu mikromolowego) i/lub brak selektywności względem receptorów Gal, a ponadto niska rozpuszczalność w wodzie oraz interakcja z innymi ważnymi farmakologicznie związkami.

Tabela 5. Powinowactwo i aktywność biologiczna niepeptydowych ligandów receptorów Gal [6, 14]

Ligand	K_i [nM]			Aktywność biologiczna
	GalR ₁	GalR ₂	GalR ₃	
Galnon	11700	34100	–	agon – działanie przeciwdrgawkowe,
Galmic	34200	>100000	–	przeciwdepresyjne, przeciwlękowe, stymulacja wydzielania insuliny
Sch 202596	1700	–	–	antagon
1,1,4,4-tetratlenek ditiepiny	190	>30000	–	antagon
SNAP 37889	>10000	>10000	17,4	antagon – działanie przeciwdepresyjne i
SNAP 398299	>1000	>1000	5,3	przeciwlękowe
GalR3ant	>1000	>10000	15	antagon – działanie przeciwdepresyjne

Hybrydowe analogi galaniny

W poznawaniu fizjologicznych funkcji galaniny oraz mechanizmów jej działania istotną rolę odgrywają hybrydowe ligandy receptorów Gal o charakterze antagonistycznym w stosunku do galaniny [3, 4, 6, 7, 11, 14-17, 66-69]. Na szczególną uwagę w tej grupie związków zasługują hybrydowe peptydy, takie jak: M15, M32, M35, M40 oraz C7, otrzymane przez połączenie *N*-końcowego fragmentu Gal(1-13) z innymi biologicznie czynnymi peptydami lub ich fragmentami (tab. 6). Wykazują one wyjątkowo wysokie powinowactwo do receptorów Gal, chociaż ich szczegółowa charakterystyka farmakologiczna nie została jeszcze dobrze poznana. Co ciekawe, w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem sklonowanych receptorów GalR₁₋₃ ligandy te wykazują agonistyczną aktywność oraz brak selektywności.

Tabela 6. Hybrydowe ligandy receptorów Gal [3, 4, 6, 8, 14, 65, 67-69, 71, 73]

Peptyd	K _d ^a [nM]	Aktywność biologiczna
M15 ; Galantydy; Gal(1-13)-SP(5-11)-NH ₂ GWTLSAGYLLGP-QQFFGLM-NH ₂	0,1	blokuje wpływ Gal na wydzielanie insuliny, GH oraz redukcję Ach
M32 ; Gal(1-13)-NPY(25-36)-NH ₂ GWTLSAGYLLGP-RHYINLITRQRY-NH ₂	0,1	blokuje wpływ Gal na proces łaknienia, częściowo na aktywność cAMP
M35 ; Gal(1-13)-BK(2-9)-NH ₂ GWTLSAGYLLGP-PPGFSPFR-NH ₂	0,3	blokuje wpływ Gal na wydzielanie insuliny, na procesy uczenia się i zapamiętywania
M40 ; Gal(1-13)-PPALALA-NH ₂ GWTLSAGYLLGP-PPALALA-NH ₂	10	wpływa na procesy łaknienia, stymuluje wydzielanie Ach, działanie agonistyczne w trzustce
C7 ; Gal(1-13)-spantyd-NH ₂ GWTLSAGYLLGP-(D-R)PKPQQ(D-W)F(D-W)LL-NH ₂	0,2	blokuje wpływ Gal na procesy łaknienia
GAL(1-13)-[Ala ^{11,15}]ET-1(6-21)-NH ₂ GWTLSAGYLLGP-LMDKEAVYFAHLDIW-NH ₂	205	nieznana
Galparan ; Gal(1-13)-Mas-NH ₂ GWTLSAGYLLGP-INLKALAALAKKIL-NH ₂	5,8	stymuluje wydzielanie insuliny oraz Ach, działanie przeciwbakteryjne, hamuje aktywność cAMP stymulowaną forskoliną
Transportan ; [Lys ¹³]Galparan, Gal(1-12)-Lys ¹³ -Mas-NH ₂ GWTLSAGYLLG-Lys ¹³ -INLKALAALAKKIL-NH ₂	17,4 ^{b,c}	penetracja oraz transport cząsteczek do wnętrza komórek, aktywność przeciwbakteryjna

^a powinowactwo do receptorów Gal z podwzgórza szczura; ^b powinowactwo do receptorów Gal z linii komórkowej ludzkiego czerniaka Bowena; ^c peptyd biotynylowany na Lys¹³

Spśród wymienionych powyżej peptydów hybrydowych (M15, M32, M35, M40 oraz C7) szczególną uwagę zwracały trzy analogi. Pierwszy z nich to hybrydowy analog Gal otrzymany przez połączenie z fragmentem endoteliny-1(6-21), w którym reszty Cys¹¹ i Cys¹⁵ zastąpiono resztami Ala. Fragment analogu Ac-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21) znany jest jako agon receptora ET_B, silnie kurczący mięśnie gładkie naczyń krwionośnych [69]. W połączeniu z Gal(1-13) wykazywał on umiarkowane powinowactwo do receptorów Gal, zaś jego aktywność biologiczna nie była znana [65].

Drugi z nich, to analog zaprojektowany w oparciu o sekwencję fragmentu galaniny oraz mastoparanu (polipeptydu wyizolowanego z jadu osy *Vespula lewisii*) [70-72]. Powstały w ten sposób galparan posiada niektóre z aktywności znamiennej dla analogów Gal, ale pojawiły się także nowe, wynikające z dołączenia mastoparanu (znanego z aktywności insulinotropowej oraz przeciwdrobnoustrojowej).

Efekt działania galparanu sprawdzono w testach na indukowane glukozą wydzielanie insuliny z izolowanych szczyrzych wysp Langerhansa [71]. Galparan okazał się silnym stymulatorem wydzielania insuliny. Efekt ten miał charakter odwracalny i był znacznie silniejszy od tego, jaki wywierał jego komponent, mastoparan. Jednoczesne podanie galaniny i galparanu nie powodowało zmian w insulinotropowym efekcie galparanu.

Galparan stymuluje również wydzielanie acetylocholino *in vivo* w korze czołowej szczyrów [72]. Jest to efekt odwrotny w porównaniu z galaniną, która w hipokampie brzuszny hamuje wydzielanie ACh. Natomiast galparan, analogicznie jak Gal, hamuje aktywność cyklazy adenylowej stymulowaną obecnością forskoliny. Co więcej, zastosowanie galparanu wraz z Gal (w tym samym stężeniu), wykazało addytywny wpływ obu związków na aktywność cyklazy adenylowej.

Powyższe badania pokazały, że efekty biologiczne galparanu (jako silny stymulator wydzielania insuliny oraz ACh) są odmienne od tych, które wykazuje galanina oraz mastoparan i nie są związane z oddziaływaniem tego analogu z receptorami Gal oraz miejscami, w których mastoparan wykazuje swoją aktywność. Sugeruje to, że galparan może wywierać wpływ na egzocytozę w miejscach bardziej odległych od tych, w których wykazują aktywność jego składniki.

Dalsze modyfikacje w strukturze hybrydowego galparanu doprowadziły do otrzymania analogu [Lys¹³]galparan, o zupełnie nowych unikatowych właściwościach [73]. Początkowo peptyd ten nosił nazwę [Lys¹³]galparan, ale odmienne od galaniny i galparanu właściwości tego peptydu sprawiły, że przyjęto dla tego peptydu nazwę **transportan (TP)**. TP jest 27-aminokwasowym analogiem hybrydowego galparanu, w którym resztę proliny w pozycji 13 zastąpiono resztą lizyny.

TP, mimo iż wykazuje względnie wysokie powinowactwo do receptora Gal, to zachował niewiele z aktywności znamiennej dla samej Gal. Pojawiły się natomiast efekty, które wynikały z przyłączenia mastoparanu do sekwencji Gal(1-12) za pomocą reszty Lys¹³. Okazało się, że TP posiada wysoką zdolność translokacji do wnętrza komórki [73]. Wywiera on także pewien wpływ na integralność błony komórkowej, ale nie był on tak silny, jak w przypadku mastoparanu.

Możliwości praktycznego wykorzystania wyżej wymienionego peptydu do transportowania różnego rodzaju biologicznie aktywnych cząsteczek są nieco ograniczone przez cytotoksyczność TP. Wykazano, że peptyd ten hamuje aktywność GTP-azy, ponadto jego translokacji towarzyszy dezintegracja błony komórkowej [73]. Jednakże, TP stosowany w dawkach eksperymentalnych wydaje się nie powodować żadnych efektów ubocznych, gdyż jego toksyczność została stwierdzona tylko w wysokich stężeniach peptydu [74]. Ponadto sugeruje się, że efekt cytotoksyczny TP może również ulegać zmianom w zależności od rodzaju, właściwości i sposobu przyłączenia transportowanej cząsteczki oraz mechanizmu internalizacji [75].

W oparciu o strukturę TP zaprojektowano i otrzymano nowy analog – **transportan 10 (TP10)**, o porównywalnej do TP zdolności do penetracji komórki, ale o mniejszych działaniach niepożądanych (*tab. 7*) [76]. Struktura pierwszorzędowa TP10 przedstawia się następująco:



TP10 jest 21-aminokwasowym peptydem utworzonym przez usunięcie 6 pierwszych reszt aminokwasowych z *N*-końca fragmentu Gal [76]. TP10 nie wywiera wpływu na aktywność GTP-azy, a ponadto tylko w niewielkim stopniu zakłóca integralność błony biologicznej, przy zachowaniu podobnych do TP właściwościach penetrujących. Nie wykazuje on również powinowactwa do receptorów Gal. TP10, ze względu na niewielką toksyczność, może być wykorzystany jako transporter do wnętrza komórek różnego rodzaju cząsteczek.

Tabela 7. Porównanie właściwości penetrujących TP i TP10 oraz ich wpływu na aktywność GTP-azy [76]

Peptyd	Penetracja komórkowa		Szybkość penetracji ($\tau_{0,5}$, min)	Aktywność GTP-azy (IC ₅₀ , μ M)
	0°C	37°C		
Galanina	–	+/-		
Mastoparan	+	+		
Transportan	+++	+++	3,4	22
Transportan 10	+++	+++	8,6	brak wpływu

O właściwościach penetrujących TP oraz TP10 decydują dwie charakterystyczne cechy ich budowy:

- sumaryczny dodatni ładunek cząsteczki w warunkach fizjologicznych spowodowany obecnością w strukturze czterech zasadowych reszt lizyny,
- amfipatyczny charakter cząsteczki wynikający z powinowactwa zarówno do środowiska hydrofilowego jak i hydrofobowego.

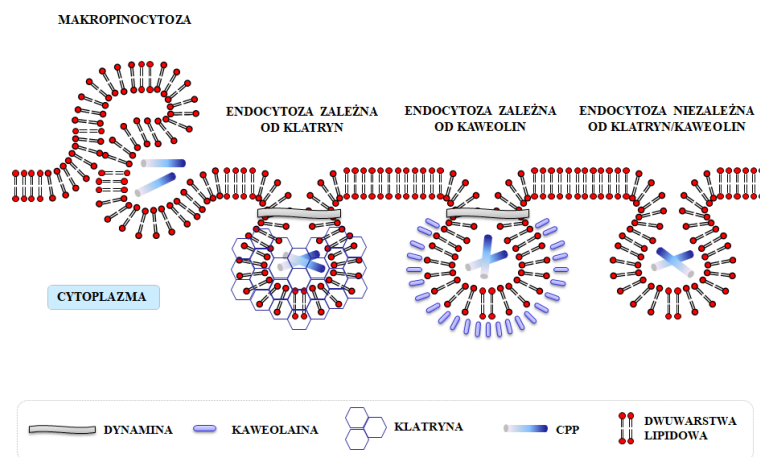
Powyzsze właściwości TP oraz TP10 pozwoliły zakwalifikować je do nowej klasy związków zwanych peptydami penetrującymi komórkę (CPP – *cell-penetrating peptides*) [77-81].

Mimo, że nie istnieje wyraźny podział CPP, można je sklasyfikować pod względem ich właściwości fizykochemicznych (kationowe, amfipatyczne) lub ich pochodzenia (naturalne, hybrydowe lub syntetyczne) (tab. 8). Pod tym względem TP oraz TP10 można zaliczyć do grupy hybrydowych amfipatycznych CPP.

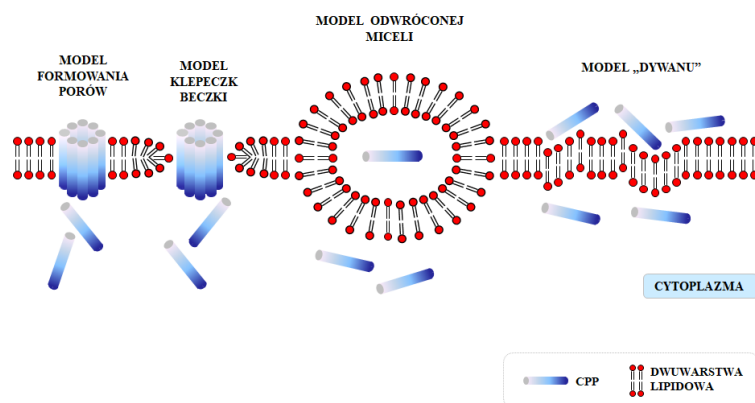
Tabela 8. Klasyfikacja wybranych CPP pod względem ich pochodzenia i właściwości fizykochemicznych

Pochodzenie	Właściwości	Nazwa	Sekwencja
Naturalne	Kationowy	Penetratyna	RQIKIWFQNRRMKWKK
	Kationowy	Tat(48-60)	GRKKRRQRRRPPQ
	Amfipatyczny	pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK
Hybrydowe	Amfipatyczny	Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
	Amfipatyczny	MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKKV
	Amfipatyczny	Pep-1	KETWWWETWWTEWSQPKKRKKV
Syntetyczne	Kationowy	Poliarginina	R_n ($n = 6-12$)
	Amfipatyczny	PTD-4	YARAAARQARA
	Amfipatyczny	MAP	KLALKALKALKAAALKLA

CPP są względnie krótkimi (10-30 reszt aminokwasowych) kationowymi (bogatymi w zasadowe reszty aminokwasowe: Arg, Lys) i/lub amfipatycznymi peptydami [80,81]. Główną cechą tych peptydów jest zdolność pokonywania błony komórkowej oraz transportowania różnego rodzaju cząsteczek do wnętrza komórek, takich jak plasmidy, DNA, siRNA, PNA (peptydowe kwasy nukleinowe), białka, peptydy, liposomy, niskocząsteczkowe leki oraz nanocząstki. Natomiast mechanizmy penetracji komórkowej przez CPP są mało poznane. Wiadomo jednak, że procesy te przebiegają bez nakładu energii, zaś CPP mogą wnikać do wnętrza komórek za pomocą więcej niż jednego mechanizmu. Badania sugerują udział w tych procesach zarówno endocytozy (makropinocytozy oraz endocytozy zależnej i niezależnej od kaweolin i klatryn) jak i mechanizmów nie związanych z endocytozą – bezpośredniej translokacji (model formowania porów, model „klepek beczki”, model „dywanu” oraz model odwróconej miceli) (rys. 2 i 3) [80-82].



Rysunek 2. Mechanizmy transportu z udziałem endocytozy zaproponowane przez Trabulo i wsp.



Rysunek 3. Mechanizmy transportu bezpośredniego przez błonę komórkową zaproponowane przez Trabulo i wsp.

Ponadto sugeruje się, że na mechanizm penetracji CPP (lub jego koniugatu z inną cząsteczką) mają wpływ takie czynniki jak rodzaj zastosowanego CPP, rozmiar i właściwości fizykochemiczne transportowanej cząsteczki, temperatura, rodzaj docelowych komórek, czy też sposób połączenia CPP z transportowaną cząsteczką.

Istnieją dwa główne sposoby koniugacji CPP z innymi biomolekułami [81]. Pierwszy, najczęściej stosowany, obejmuje chemiczną syntezę odpowiednio zmodyfikowanego peptydu, który może kowalencyjnie wiązać się z biomolekułą (np. za pomocą mostka disulfidowego – ulegającego rozpadowi pod wpływem warunków panujących wewnątrz komórki, lub bardziej trwałego łącznika tioeterowego, wiązania amidowego lub estrowego). Druga metoda wykorzystuje kompleksujące właściwości CPP i tworzenie niekowalencyjnych kompleksów z biomolekułami (za pomocą oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych).

Zaletą koniugacji kowalencyjnej jest to, że prowadzi do utworzenia strukturalnie dobrze zdefiniowanego koniugatu, a jeśli linker jest chemicznie trwały, koniugat charakteryzuje się długim okresem półtrwania i pozostaje nienaruszony w eksperymentach *in vivo*. Natomiast ograniczeniami tej metody jest czasochłonna i pracochłonna procedura otrzymywania, stosunkowo wysoki koszt syntezy oraz ryzyko zmiany aktywności biologicznej transportowanej cząsteczki. Zaletą strategii niekowalencyjnej jest jej prostota, uniwersalność w odniesieniu do składu kompleksu CPP-cząsteczka, niższe stężenie potrzebne do wywołania efektu biologicznego oraz brak ingerencji w strukturę transportowanej molekuly, co minimalizuje ryzyko zmiany jej aktywności biologicznej. Z drugiej jednak strony, mogą tworzyć się niekontrolowane struktury kompleksów (o nieznanej stechiometrii), co może komplikować ich użycie w badaniach *in vivo*.

Szczególne zainteresowanie wykorzystaniem CPP w medycynie wynika z ich względnie niskiej cytotoksyczności i braku ograniczeń w odniesieniu do transportowanej cząsteczki [77-82]. CPP wykorzystano m.in. do dostarczania do struktur komórkowych siRNA

(poprzez kompleksowanie CPP z anionowymi grupami wiązania fosfodiesterowego siRNA) oraz kowalencyjnych koniugatów CPP-PNA w strategii antysensowej, w celu zahamowania ekspresji mRNA. Wykazano również możliwość użycia CPP do transportu różnego rodzaju białek i peptydów o znaczeniu terapeutycznym, m.in. istotnych dla procesów proliferacji, apoptozy, stymulacji odporność cytotoksycznej, terapii chorób nowotworowych.

Możliwość selektywnego dostarczania leków przez CPP do komórek nowotworowych jest szczególnie ważna z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej. Wykazano, że kompleksy CPP z niskocząsteczkowymi lekami przeciwnowotworowymi (np. doksorubicyną, metotreksatem czy paklitakselem) mogą indukować apoptozę lekoopornych komórek nowotworowych i zwiększać efektywność terapeutyków. Koniugacja tych leków z CPP pozwala na stosowanie ich w niższych stężeniach oraz zwiększa ich selektywność względem komórek nowotworowych, co zmniejsza ryzyko wystąpienia skutków ubocznych terapii onkologicznych oraz ogranicza rozwój lekooporności na terapeutyk.

CPP, ze względu na możliwość pokonywania bariery krew-mózg, stwarzają także nadzieję na opracowanie nowych strategii w leczeniu chorób OUN, m.in. nowotworów, zakażeń bakteryjnych czy chorób neurodegeneracyjnych [83]. Natomiast pewne podobieństwo niektórych CPP do peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMP) stwarza możliwość ich wykorzystania (również w koniugacji z innymi lekami przeciwdrobnoustrojowymi) w terapii wielu zakażeń bakteryjnych, w tym wywołanych szczepami lekoopornymi.

Możliwość zastosowania CPP (w tym TP) i ich koniugatów w terapii oraz diagnostyce medycznej czynią CPP obiektem intensywnych badań wielu laboratoriów.

OMÓWIENIE CELU PODJĘTYCH BADAŃ I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl 12 publikacji (**H1-H12**), o charakterze interdyscyplinarnym, przedstawiających chemiczną syntezę oraz badania właściwości farmakologicznych wybranych analogów *N*-końcowego fragmentu 1-15 neuropeptydu galaniny oraz jego hybrydowych analogów z innymi biologicznie czynnymi peptydami, ze szczególnym uwzględnieniem transportu oraz jego koniugatów. Galanina wykazuje bardzo szeroki zakres aktywności biologicznych, które mogą mieć związek z różnymi stanami chorobowymi i zaburzeniami (takimi jak choroba Alzheimera, epilepsja, depresja, cukrzyca oraz choroby nowotworowe). W związku z tym znalezienie analogów galaniny wykazujących selektywne właściwości agonistyczne lub antagonistyczne w stosunku do receptorów Gal jest niezwykle ważne dla lepszego poznania efektów fizjologicznych wywołanych jej aktywnością oraz dla opracowania nowych terapii chorób i zaburzeń wywoływanych

aktywnością tego peptydu. Natomiast transportan, jego analogi oraz koniugaty (kowalencyjne lub niekowalencyjne) z innymi biologicznie aktywnymi cząsteczkami mają odmienną od Gal aktywność. Ich unikatowe właściwości penetrujące, umożliwiające transport różnego rodzaju cząsteczek do wnętrza komórek, stwarzają nadzieję na opracowanie nowych strategii leczenia, m.in. chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych czy zakażeń wywołanych lekoopornymi szczepami bakterii.

Główną przyczyną utrudniającą rozróżnienie efektów fizjologicznych i farmakologicznych wywołanych aktywnością Gal w przewodzie pokarmowym jest brak selektywnych antagonistów i agonów receptorów Gal oraz stosunkowo niewielka wiedza dotycząca wewnątrzkomórkowych mechanizmów działania Gal. Wskazanie reszt aminokwasowych w cząsteczce Gal odpowiedzialnych ze efekty biologiczne i/lub wiązanie z receptorami Gal obecnymi w przewodzie pokarmowym, pozwala na dokładniejsze poznanie zależności struktura Gal – aktywność, co jest ważnym elementem w procesie projektowania nowych analogów Gal o właściwościach agonistycznych lub antagonistycznych.

Celem badań podjętych w pracach **H1-H5** było znalezienie polipeptydów wykazujących selektywne właściwości agonistyczne lub antagonistyczne w stosunku do receptorów Gal, obecnych w przewodzie pokarmowym, tj. w mięśniach gładkich żołądka, jelita cienkiego i grubego oraz w komórkach β wysp trzustkowych. W tym celu zsyntezowano oraz oczyszczono (czystość HPLC powyżej 96%) serię analogów fragmentu Gal(1-15)-NH₂ modyfikowanych w pozycjach: 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12 i 14 oraz hybrydowych analogów fragmentu Gal(1-13). Wszystkie analogi zostały otrzymane na drodze chemicznej syntezy na nośniku stałym z wykorzystaniem strategii Fmoc. Następnie peptydy poddano badaniom na kurczliwość mięśni gładkich z dna żołądka (**H4** i **H5**) lub jelita czczego i okrężnicy szczura (**H1**) (badania wykonane w zespole kierowanym przez prof. Jacka Petruszewicza/prof. Ivana Kocić z Katedry Farmakologii Akademii Medycznej w Gdańsku), a także badaniom na indukowane glukozą wydzielanie insuliny z izolowanych szczurzych wysp Langerhansa (**H2**, **H4** i **H5**) (badania wykonane w Laboratorium Endokrynologicznym Instytutu Położnictwa i Chorób Kobiety Akademii Medycznej w Gdańsku, kierowanym przez prof. Czesława Wójcikowskiego).

Wpływ analogów fragmentu Gal(1-15) modyfikowanych w pozycjach 2, 3, 4, 6 i 14 na tkanki mięśni gładkich jelita czczego i okrężnicy

W pracy **H1** przedstawiono wpływ 20 analogów fragmentu Gal(1-15)-NH₂ modyfikowanych w pozycjach 2, 3, 4, 6 i 14 na skurczliwość mięśni gładkich jelita czczego i

okrężnicy szczura (tab. 9). Wcześniej, ich aktywność została scharakteryzowana na mięśniach gładkich z dna żołądka szczura [84, 85]. Badania te zostały wykonane w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora, więc nie zostały uwzględnione w cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe. Natomiast wyniki prezentowane w pracy **H1** są kontynuacją tych badań mających na celu zidentyfikowanie reszt aminokwasowych w cząsteczce Gal odpowiedzialnych za wiązanie się i aktywację receptorów Gal obecnych w mięśniach gładkich jelita czczego oraz okrężnicy szczura, a także opisanie różnic w zależnościach struktura Gal – aktywność biologiczna w wyżej wymienionych tkankach.

Tabela 9. Struktura pierwszorzędowa zsyntezowanych analogów Gal(1-15)-NH₂

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa
Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[D-Trp ²]Gal(1-15)-NH ₂	G- D-Trp -T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[endo-Trp ^{2a} ,Cle ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G- Trp -W-T- Cle -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[des-Thr ³ ,Cle ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W- ~ - Cle -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Pro ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T- Pro -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Cle ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T- Cle -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[des-Leu ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T- ~ -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Ile ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T- Ile -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[D-Leu ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T- D-Leu -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Nle ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T- Nle -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Val ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T- Val -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Nva ⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T- Nva -N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Hse ⁶]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N- Hse -A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Nle ¹⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P- Nle -A-NH ₂
[Asp ¹⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P- Asp -A-NH ₂
[Orn ¹⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P- Orn -A-NH ₂
[Arg ¹⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P- Arg -A-NH ₂
[Dab ¹⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P- Dab -A-NH ₂
[Cit ¹⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P- Cit -A-NH ₂
[Lys ¹⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P- Lys -A-NH ₂
[Dpr ¹⁴]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P- Dpr -A-NH ₂

~ – usunięta reszta aminokwasowa

Badania farmakologiczne wykazały, że Gal świni jest pełnym agonem receptorów Gal w mięśniach gładkich jelita czczego i okrężnicy szczura. Za jej aktywność odpowiada głównie N-końcowy fragment 1-15, natomiast C-końcowy fragment niezbędny jest dla pełnej aktywności Gal zarówno w mięśniach gładkich dna żołądka (wcześniejsze badania) jak i jelita czczego oraz okrężnicy szczura. Chociaż fragment Gal(1-15) wykazywał znaczną aktywność agonistyczną w mięśniach gładkich jelita czczego i okrężnicy (wyższą niż w żołądku), to aktywność ta (wartość EC₅₀) była odpowiednio 2,5-krotnie i 5-krotnie niższa w porównaniu z Gal.

W badaniach z wykorzystaniem analogów fragmentu Gal(1-15) wykazano, że kluczową rolę dla aktywności Gal i wiązania z receptorami Gal, obecnymi w mięśniach gładkich jelita czczego i okrężnicy, odgrywają reszty Trp², Leu⁴, Ser⁶ oraz His¹⁴. Podstawienie aromatycznej

reszty Trp² jej enancjomerem D-Trp, jednoczesne przyłączenie dodatkowej reszty Trp w pozycji 2 i podstawienie Leu⁴ resztą Cle (cykloleucyna, kwas L-1-amino-1-cyklopentanokarboksylowy), jak również usunięcie reszty Leu⁴ lub podstawienie jej enancjomerem D-Leu oraz podstawienie reszty Ser⁶ jej homologiem – Hse (homoseryna, kwas L-2-amino-4-hydroksybutanowy) prowadzi do znacznego obniżenia aktywności Gal(1-15) zarówno w mięśniach gładkich jelita czczego jak i okrężnicy szczura. Podobny wpływ modyfikacji w pozycji Leu⁴ zaobserwowano w mięśniach gładkich izolowanych z dna żołądka szczura [84]. Jednakże podstawienia w pozycji 2 i 6 nie wpływały tak wyraźnie na aktywność Gal(1-15) w mięśniach gładkich z dna żołądka szczura.

Wcześniejsze badania wykazały również, że podstawienie zasadowej reszty His¹⁴, takimi resztami jak Asp, Nle (norleucyna, kwas L-2-aminokapronowy), Cit (cytrulina), Lys, Dab (kwas L-2,4-diaminobutanowy) i Dpr (kwas L-2,3-diaminopropanowy) prowadzi do kilkukrotnego wzrostu aktywności w porównaniu z niemodyfikowaną sekwencją Gal(1-15) [85]. Natomiast w przypadku ich aktywności na mięśniach gładkich jelita czczego i okrężnicy badania nie potwierdziły tego efektu, z wyjątkiem analogu [Cit¹⁴]Gal(1-15)-NH₂, którego aktywność była około 2-krotnie wyższa niż niemodyfikowanego fragmentu Gal(1-15). Co więcej analogi [Arg¹⁴]Gal(1-15)-NH₂, [Dab¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ i [Dpr¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ kurczyły mięśnie gładkie jelita czczego i okrężnicy wyraźnie słabiej niż Gal(1-15).

Na podstawie przeprowadzonych badań trudno jest wyjaśnić podobieństwa oraz różnice w aktywności poszczególnych analogów Gal w żołądku, jelicie czczym oraz okrężnicy. Można jednak przypuszczać, że może mieć to związek z różną dystrybucją podtypów receptorów Gal w w/w tkankach, a tym samym z możliwością aktywowania różnych mechanizmów transdukcji sygnałowej. GalR₁ występuje głównie w okrężnicy i jelicie czczym, GalR₂ głównie w żołądku, a GalR₃ głównie w jelicie czczym i okrężnicy [86, 87].

Przypuszczenia te częściowo mogą również potwierdzać badania z wykorzystaniem analogu [D-Trp²]Gal(1-15)-NH₂, którego aktywność w mięśniach gładkich dna żołądka była względnie wysoka, znacznie niższa w okrężnicy oraz bardzo niska w jelicie czczym. Natomiast dane literaturowe dotyczące powinowactwa tego analogu do sklonowanych podtypów receptorów Gal wykazały, że analog ten ma względnie wysokie powinowactwo do GalR₂, niskie do GalR₁ oraz bardzo niskie/brak do GalR₃, co częściowo pozwala na rozróżnienie podtypu receptora Gal [15, 16].

Powyższe badania pokazały, że reszty aminokwasowe w pozycjach 2, 3, 4, 6 i 14 w cząsteczce Gal odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniu z receptorami Gal, których pobudzenie odpowiedzialne jest za aktywność Gal w mięśniach gładkich jelita czczego i

okreźnicy. Sądzę, że powyższe badania mogą mieć istotne znaczenie nie tylko dla lepszego poznania roli Gal w przewodzie pokarmowym, ale posłużą również do zaprojektowania nowych analogów Gal o właściwościach antagonistycznych lub agonistycznych, które potencjalnie mogą być wykorzystane w terapii i diagnostyce chorób oraz zaburzeń wywołanych aktywnością Gal.

Wpływ analogów fragmentu Gal(1-15) modyfikowanych w pozycjach 6, 8, 9, 10 i 11 na indukowane glukozą wydzielanie insuliny z izolowanych wysp Langerhansa

Celem kolejnej pracy (praca **H2**) była synteza 12 nowych analogów Gal(1-15) modyfikowanych w pozycjach 6, 8, 9, 10 i 11, a następnie badania ich aktywności na indukowane glukozą wydzielanie insuliny z izolowanych szczurzych wysp Langerhansa (*tab. 10*). W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że Gal oraz jej *N*-końcowy fragment 1-15 są pełnymi agonami receptorów Gal obecnych w szczurzych wyspach Langerhansa. Hamowały indukowane glukozą wydzielanie insuliny w sposób zależny od stężenia, chociaż fragment Gal(1-15) wykazywał mniejszą aktywność niż Gal, co sugeruje (podobnie jak badania na mięśniach gładkich), że obecność *C*-końcowego fragmentu Gal wymagana jest dla pełnej aktywacji receptorów Gal w szczurzych wyspach trzustkowych.

Tabela 10. Struktura pierwszorzędowa zsyntezowanych analogów Gal(1-15)-NH₂

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa
Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[D-Ser ⁶]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N- D-Ser -A-G-Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[D-Ser ⁶ ,D-Trp ⁸]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N- D-Ser -A-G- D-Trp -L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Sar ⁸]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A- Sar -Y-L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Phe ⁹]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G- Phe -L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Tyr(PO ₃ H ₂) ⁹]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G- Tyr(PO₃H₂) -L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Trp ⁹]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G- Trp -L-L-G-P-H-A-NH ₂
[D-Leu ¹⁰]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y- D-Leu -L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Val ¹⁰]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y- Val -L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Nva ¹⁰]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y- Nva -L-L-G-P-H-A-NH ₂
[Ile ¹¹]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L- Ile -G-P-H-A-NH ₂
[Pro ¹¹]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L- Pro -G-P-H-A-NH ₂
[Nle ¹¹]Gal(1-15)-NH ₂	G-W-T-L-N-S-A-G-Y-L- Nle -G-P-H-A-NH ₂

Badania z wykorzystaniem analogów Gal(1-15) wykazały ich zróżnicowaną aktywność w porównaniu do niemodyfikowanej sekwencji Gal(1-15). Analogi modyfikowane w pozycji 6 i/lub 8 okazały się silnymi agonami receptorów Gal w trzustce. Zastąpienie reszty Ser⁶ jej enancjomerem D-Ser oraz jednoczesne podstawienie reszty Ser⁶ jej enancjomerem D i reszty Gly⁸ resztą D-Trp, a także podstawienie reszty Gly⁸ jej *N*-metylowaną pochodną Sar doprowadziło do wzrostu aktywności inhibitorowej (większej niż Gal) oraz zwiększyło inhibitorowy efekt

Gal (po zastosowaniu analogów wraz z Gal w tym samym stężeniu). Dwa inne analogi, w których reszta Leu¹¹ została podstawiona jej strukturalnymi izomerami: Nle i Ile, również wykazywały aktywność agonistyczną, ale wyraźnie niższą niż wyżej wymienione analogi i niemodyfikowany fragment Gal(1-15).

Znacznie większe zmiany w aktywności biologicznej Gal(1-15) wykazały modyfikacje, w których reszta Tyr⁹ została zastąpiona jej fosforylowaną pochodną Tyr(PO₃H₂) lub innym aminokwasem aromatycznym – Trp, reszta Leu¹⁰ została podstawiona jej enancjomerem D lub jej homologiem (Val) i izomerem strukturalnym – Nva (kwas L-2-aminowalerianowy). Wykazano, że analogi te (w stężeniu 1 μM) charakteryzują się aktywnością antagonistyczną w stosunku do receptorów Gal w trzustce i stymulują indukowane glukozą wydzielanie insuliny w następującej kolejności uporządkowanej według malejącej aktywności insulinotropowej: [Trp⁹]Gal(1-15)-NH₂ ≈ [D-Leu¹⁰]Gal(1-15)-NH₂ > [Val¹⁰]Gal(1-15)-NH₂ > [Tyr(PO₃H₂)⁹]Gal(1-15)-NH₂ > [Nva¹⁰]Gal(1-15)-NH₂. Natomiast podstawienie reszty Tyr⁹ inną aromatycznym resztą (Phe) oraz zamiana Leu¹¹ resztą Pro doprowadziło do otrzymania analogów o silnych właściwościach insulinotropowych oraz antagonistycznych względem receptorów Gal obecnych w szczurzych wyspach trzustkowych. Szczególnie silne właściwości antagonistyczne posiadał analog [Phe⁹]Gal(1-15)-NH₂.

Powyższe badania wykazały, że reszty aminokwasowe w pozycjach 6, 8, 9, 10 i 11 w cząsteczce Gal pełnią istotną rolę w oddziaływaniu z receptorami Gal, których pobudzenie odpowiedzialne jest za hamujący efekt Gal na indukowane glukozą wydzielanie insuliny z wysp Langerhansa. Sądzę, że wyniki tych badań mogą posłużyć do zaprojektowania nowych analogów Gal o właściwościach antagonistycznych lub agonistycznych. Biorąc pod uwagę fakt, że aktywność Gal w trzustce wynika głównie z pobudzenia receptora GalR₁ [14], to agony tego receptora mogą okazać się użyteczne jako potencjalne leki w terapii przewlekłego bólu, niektórych nowotworów, zaburzeń nastroju oraz epilepsji. Natomiast antagonony receptora GalR₁ mogą być użyteczne jako potencjalne leki w terapii zaburzeń nastroju (depresji), funkcji poznawczych (procesów uczenia się i zapamiętywania), łaknienia, czy choroby Alzheimera.

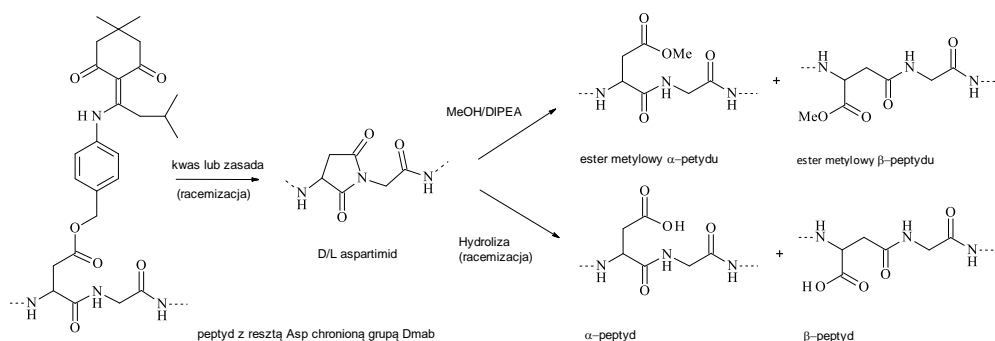
Powstawanie aspartimidu jako reakcja uboczna syntezy analogów Gal(1-15) – wpływ na aktywność biologiczną

Powstawanie aspartimidu (Asi) jest zależną od sekwencji reakcją uboczną syntezy peptydów na nośniku stałym, polegającą na cyklizacji reszty Asp katalizowanej zarówno przez zasady jak i kwasy. W metodzie syntezy peptydów opartej na strategii Fmoc, potraktowanie

peptydylożywicy zasadą (np. 20% roztworem piperydyny) niezbędną do usunięcia osłony Fmoc z grupy aminowej prowadzi do utworzenia aspartimidu. Następnie, w wyniku otwarcia pierścienia aspartimidowego przez nukleofile oraz reakcji racemizacji, powstają dalsze produkty uboczne, tj. β -peptydy oraz α/β piperydynowe pochodne peptydów.

Celem kolejnych badań była synteza analogu Gal(1-15) modyfikowanego w pozycji 14 resztą Asp, a następnie jego cyklizacja („na żywicy”) poprzez utworzenie wiązania amidowego pomiędzy *N*-końcową grupą aminową, a grupą β -karboksylową reszty Asp¹⁴, a także przyłączenie do grupy β -karboksylowej reszty Asp¹⁴ różnych struktur białkowych (aminokwasy) lub niebiałkowych (np. L-DOPA, zasady nukleinowe). Wcześniejsze badania sugerowały, że modyfikowane w ten sposób analogi Gal mogą wykazywać wysokie powinowactwo do receptorów Gal [65].

Zastosowanie pochodnej Asp, w której grupa β -karboksylowa chroniona była za pomocą osłony Dmab (kwazi-ortogonalnej w strategii Fmoc), usuwanej za pomocą 2% roztworu monohydratu hydrazyny, miało umożliwić otrzymanie w/w analogów. Jednakże przeprowadzone syntezy zakończyły się niepowodzeniem. Analiza produktów wykazała, że głównymi produktami reakcji są peptydy zawierające w pozycji 14 aspartimid (Asi) oraz pochodną estru metylowego – Asp(OMe) (rys. 4).



Rysunek 4. Struktura produktów ubocznych towarzyszących syntezie analogów Gal(1-15) z wykorzystaniem pochodnej Asp(ODmab)

Wysoka podatność Asp(ODmab) na tworzenie aspartimidu wynikała prawdopodobnie z obecności w strukturze Dmab grupy *p*-aminobenzylowej, która ulega spontanicznemu procesowi odszczepienia od grupy karboksylowej Asp po reakcji z 2% roztworem monohydratu hydrazyny. Powszechnie wiadomo, że obecność grupy benzylowej (Bzl), standardowo stosowanej w strategii Boc do osłony grupy β -karboksylowej reszty Asp, silnie sprzyja formowaniu aspartimidu. Natomiast zastosowanie standardowej pochodnej Asp(OtBu) w syntezie analogu [Asp¹⁴]Gal(1-15)-NH₂, nie prowadziło do otrzymania produktów zawierających Asi lub Asp(OMe).

Ponieważ źródła literaturowe nie opisywały wcześniej przypadku formowania aspartimidu w trakcie syntezy peptydów z wykorzystaniem pochodnej Asp(ODmab), uzasadnione wydawały się badania, które wskazałyby czynniki mające wpływ na powstawanie aspartimidu oraz pochodnych Asp(OMe). W tym celu przeprowadzono szereg syntez fragmentu Gal(11-15)-NH₂ (modelowego fragmentu zawierającego motyw Asp-Ala) z wykorzystaniem różnych metod tworzenia wiązania peptydowego oraz usuwania osłony Fmoc, a także nośników polimerycznych zawierających różne „linkery”. Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w pracy **H3**.

Badania wykazały, że wyeliminowanie z protokołu syntezy metanolu, jako rozpuszczalnika stosowanego do przemywania żywicy, pomiędzy kolejnymi etapami syntezy, zapobiega powstawaniu pochodnych Asp(OMe). Natomiast wyeliminowanie *N,N*-diizopropylloetyloaminy (DIPEA) z protokołu sprzęgania reszt aminokwasowych (np. przez zastosowanie metody wykorzystującej mieszaninę HOBt/DIC), zastąpienie 20% roztworu piperydyny do usuwania osłony Fmoc mniej zasadowym 6% roztworem piperazyny oraz zastosowanie żywicy z rozbudowanym sterycznie „linkerem”, takiej jak żywica chloro(2'-chloro)tritylowa, zmniejsza ryzyko powstawania aspartimidu do około 5%. Sądzę, że przedstawione wyniki badań mogą być szczególnie użyteczne w procesie projektowania i optymalizacji syntez peptydów, opartych na wykorzystaniu pochodnej Asp(ODmab).

Natomiast wpływ formowania aspartimidu na aktywność biologiczną peptydów jest mało znany. Celem kolejnych badań było sprawdzenie w jaki sposób utworzenie aspartimidu w pozycji 14 w cząsteczce Gal (analog [Asi¹⁴]Gal(1-15)-NH₂) może wpływać na aktywność biologiczną w porównaniu z Gal(1-15)-NH₂ i jego analogiem [Asp¹⁴]Gal(1-15)-NH₂. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiłem w pracy **H4**. Badania na kurczliwość mięśni gładkich z dna żołądka szczura wykazały, że analog [Asi¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ posiada wyraźnie agonistyczną aktywność w stosunku do receptorów Gal. Analog ten miał 2-krotnie mniejszą siłę działania niż [Asp¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ oraz 2-krotnie większą niż niemodyfikowany fragment Gal(1-15)-NH₂.

W testach na indukowane glukozą wydzielanie insuliny ze szczurzych wysp Langerhansa, analog [Asp¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ wykazywał słabą aktywność agonistyczną, hamując oraz nieznacznie redukując inhibitorową aktywność Gal. Natomiast analog [Asi¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ w stężeniu 0,1 μM nie wykazywał hamującego efektu na wydzielanie insuliny, zaś w wyższym stężeniu (1 μM) posiadał aktywność insulinotropową. Ponadto w stężeniu 1 μM analog ten okazał się antagonistą Gal, znosząc całkowicie jej aktywność.

Przypuszczam, że odmienna aktywność analogu [Asi¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ w mięśniach gładkich oraz trzustce może wynikać z oddziaływania tego peptydu z różnymi podtypami receptorów Gal obecnymi w mięśniach gładkich dna żołądka (głównie GalR₂) oraz trzustce (głównie GalR₁), a tym samym z aktywowania różnych mechanizmów transdukcji sygnałowej [14-16, 86, 87]. Przedstawione badania sugerują, że analog [Asi¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ może być znaczącym agonem receptora GalR₂ oraz selektywnym antagonistą receptora GalR₁, co stwarza potencjalne możliwości jego wykorzystania w terapii zaburzeń związanych z pobudzeniem przez Gal tych receptorów.

Właściwości farmakologiczne hybrydowego analogu Gal(1-13)-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂

Szczególne zainteresowanie wzbudzają hybrydowe analogi Gal otrzymane przez połączenie *N*-końcowego fragmentu Gal(1-13) z innymi biologicznie czynnymi peptydami lub ich fragmentami (*tabela 6, strona 14*). Zainteresowanie to wynika z ich wyjątkowo wysokiego powinowactwo do receptorów Gal oraz aktywności antagonistycznej względem Gal. Spośród wymienionych w *tabeli 6* peptydów moją uwagę zwróciły trzy analogi: Gal(1-13)-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂, Gal(1-13)-Mas-NH₂ (galparan) oraz jego analog Gal(1-12)-Lys¹³-Mas-NH₂ ([Lys¹³]galparan, później zwany transportanem).

Pierwszy z nich, to hybrydowy analog Gal otrzymany przez połączenie z fragmentem endoteliny-1(6-21), w którym reszty Cys¹¹ i Cys¹⁵ zastąpiono resztami Ala. Wcześniej analog Ac-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂ znany był jako agon receptora ET_B, silnie kurczący mięśnie gładkie naczyń krwionośnych [69]. W połączeniu z Gal(1-13) wykazywał natomiast umiarkowane powinowactwo do receptorów Gal z podwzgórza szczura [65], zaś jego aktywność biologiczna nie była znana.

Celem badań przedstawionych w pracy **H5** była synteza hybrydowego analogu Gal(1-13)-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂ oraz jego komponentu, Ac-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂, a następnie zbadanie właściwości farmakologicznych tych peptydów na izolowanych mięśniach gładkich z dna żołądka szczura oraz indukowane glukozą wydzielanie insuliny z izolowanych szczurzych wysp Langerhansa. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że analog Gal(1-13)-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂ w testach na kurczliwość mięśni gładkich posiada agonistyczną aktywność, typową dla fragmentu Gal(1-15)-NH₂, zaś jego komponent Ac-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂ kurczy mięśnie gładkie około 3,5-krotnie silniej niż Gal.

Natomiast w testach na indukowane glukozą wydzielanie insuliny ten hybrydowy analog galaniny okazał się agonem receptorów Gal, hamując wydzielanie insuliny silniej niż

Gal. Jego komponent, Ac -[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂, wykazywał również aktywność hamującą, porównywalną z Gal. Gal(1-13)-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂, użyty wraz z Gal w tym samym stężeniu, jeszcze silniej hamował wydzielanie insuliny, sugerując jego silnie agonistyczną aktywność.

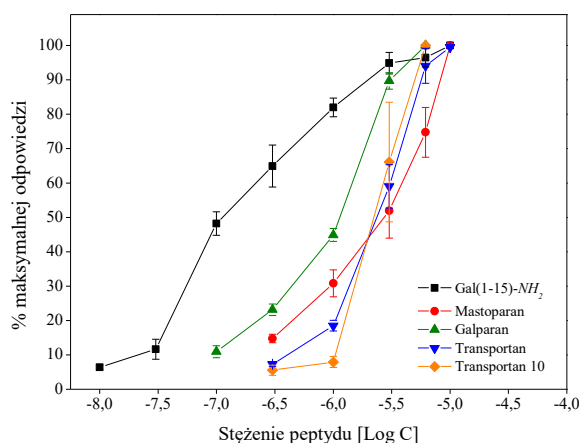
Powyższe badania pokazały, że hybrydowy analog Gal(1-13)-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂ (zaprojektowany jako antagon Gal) wykazuje aktywność agonistyczną w przewodzie pokarmowym (w przypadku wpływu na wydzielanie insuliny, silniejszą niż Gal). Właściwość ta może być potencjalnie użyteczna w badaniach (lub terapii) zaburzeń, w których ważną rolę mogą odgrywać agony receptorów GalR₁ oraz GalR₂ obecnych w OUN. Jednakże wykorzystanie tego analogu może być w pewnym stopniu ograniczone ze względu na jego umiarkowane powinowactwo do receptorów Gal.

Wpływ galparanu, transportanu i transportanu 10 na kurczliwość mięśni gładkich żołądka

Kolejnymi peptydami hybrydowymi, który wzbudziły moje zainteresowanie były analogi Gal(1-13) z mastoparanem – galapran, transportan oraz transportan 10. Analogi te, z wyjątkiem TP10 – który nie jest rozpoznawany przez receptory Gal, wykazywały wysokie powinowactwo do receptorów Gal (*tabela 6*). Badania przeprowadzone przez Ostensona i współpracowników wykazały silnie insulintropowy i antagonistyczny efekt galparanu na indukowane glukozą wydzielanie insuliny [71]. Jednakże, efekt ten prawdopodobnie nie wynikał z pobudzenia receptorów Gal, a raczej był wynikiem wpływu tego peptydu na egzocytozę insuliny. Natomiast aktywność galparanu, TP oraz TP10 w mięśniach gładkich przewodu pokarmowego nie była znana.

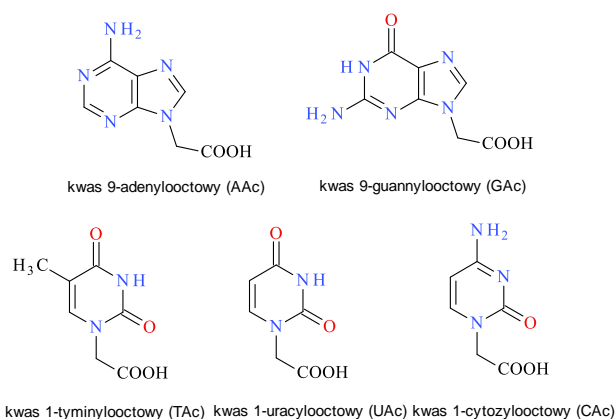
Dlatego celem moich badań była synteza w/w analogów Gal oraz ich komponentu – mastoparanu, a następnie określenie ich aktywności na mięśniach gładkich z dna żołądka szczura. Przeprowadzone badania wykazały, że galapran kurczy mięśnie gładkie z mniejszą siłą działania niż fragment Gal(1-15) (około 4-krotnie niższą), co sugeruje raczej niską aktywność agonistyczną tego analogu (*rys. 5*).

Natomiast TP oraz TP10 wykazywały odpowiednio 9% i 8% procent aktywności Gal(1-15), co potwierdza wcześniejsze obserwacje, iż pomimo względnie wysokiego powinowactwa TP do receptorów Gal, zachował on niewiele z aktywności znamiennej dla galaniny. Mastoparan wykazywał zaledwie 7% aktywności Gal(1-15). Powyższe dane nie zostały dotychczas opublikowane.



Rysunek 5. Wpływ galapanru, TP oraz TP10 na kurczliwość mięśni gładkich z dna żołądka szczura

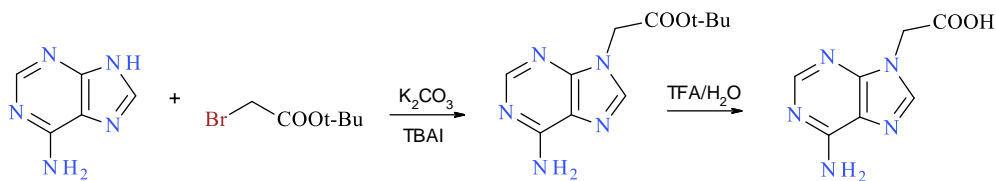
Niska aktywność TP w badaniach na kurczliwość mięśni gładkich skłoniła mnie do zaprojektowania nowych jego analogów, w których do reszty Lys¹³ przyłączone zostały pochodne zasad nukleinowych (rys. 6). Wcześniejsze dane literaturowe sugerowały, że analogi Gal(1-12) modyfikowane przez przyłączenie do C-końca reszty Lys, a następnie do jej grupy ϵ -aminowej różnego rodzaju struktur, w tym zawierających zasady nukleinowe, zwiększa powinowactwo do receptorów Gal [65].



Rysunek 6. Struktura pochodnych zasad nukleinowych przyłączonych do TP w pozycji Lys¹³

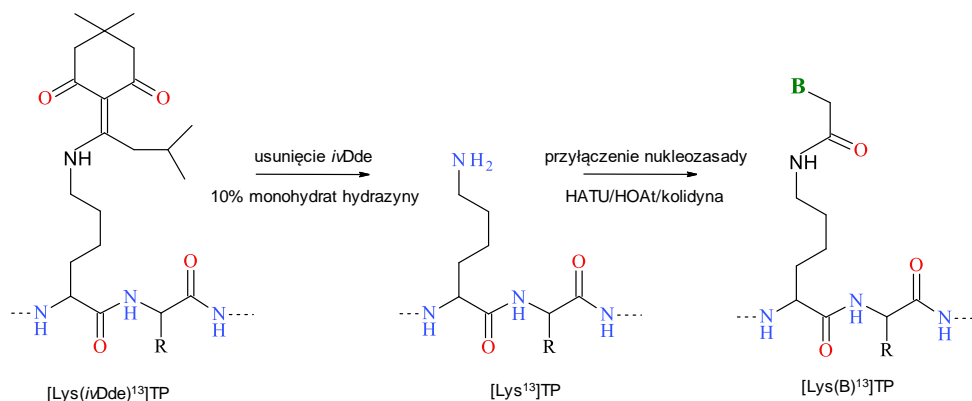
Pochodne zasad nukleinowych otrzymano w wyniku reakcji odpowiedniej zasady (adeniny, 2-amino-6-chloropuryny, tyminy, uracylu i cytozyny) z estrem *t*-butylowym kwasu bromooctowego, w obecności jodku tetrabutylamoniowego (TBAI) oraz K₂CO₃, a następnie usunięcia osłon *tert*-butylowych za pomocą 70% roztworu kwasu trifluorooctowego w dichlorometanie (rys. 7). Wydajności powyższych reakcji były niskie i wynosiły 12-36%, co spowodowane było prawdopodobnie powstawaniem regioizomerów. Otrzymane produkty

oczyszczone zostały techniką chromatograficzną, z wykorzystaniem kolumny wypełnionej żelazem krzemionkowym i różnymi układami rozpuszczalników octan etylu/metanol.



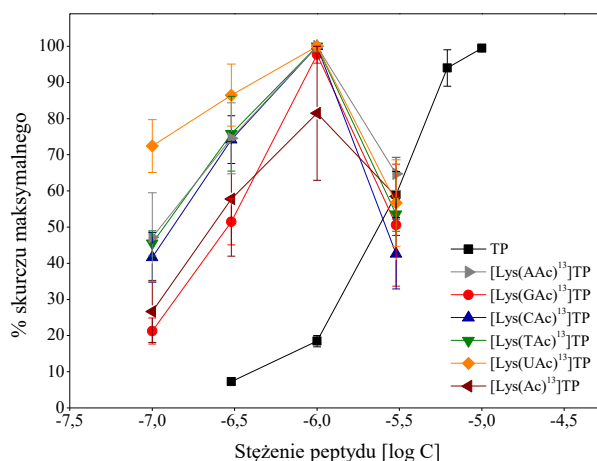
Rysunek 7. Schemat reakcji otrzymywania pochodnych octowych zasad nukleinowych, np. pochodnej adeniny

Oczyszczone pochodne zasad nukleinowych (czystość HPLC >95%) zostały następnie przyłączone do grupy ϵ -aminowej w łańcuchu bocznym Lys¹³. Dodatkowo w jednym z analogów do reszty Lys¹³ przyłączono grupę acetylową (Ac), za pomocą bezwodnika octowego. Przyłączenie w/w struktur do reszty Lys¹³ w sekwencji TP możliwe było dzięki zastosowaniu pochodnej Lys, w której grupa ϵ -aminowa chroniona była osłoną *iv*Dde (kwazi-ortogonalną w strategii Fmoc), usuwaną za pomocą 10% roztworu monohydratu hydrazyny w DMF (rys. 8).



Rysunek 8. Schemat reakcji przyłączania pochodnych zasad nukleinowych do sekwencji TP w pozycji Lys¹³

Badania wpływu w/w analogów na kurczliwość mięśni gładkich z dna żołądka szczura wykazały względnie wyższą ich efektywność niż galparanu i TP, jednakże przebieg krzywych zależności dawka-efekt dla tych peptydów nie był typowy, jak w przypadku Gal i jego analogów (rys. 9). Wszystkie analogi TP najpierw powodowały gwałtowny wzrost aktywności, a następnie, przy stężeniu około 1 μ M, gwałtowny jej spadek. Najniższą aktywność wykazywał analog [Lys(Ac)¹³]TP, z przyłączoną grupą acetylową w pozycji Lys¹³. Prawdopodobnie, ta nietypowa aktywność analogów Gal mogła wynikać z oddziaływaniem tych peptydów z błoną komórkową i zmianą jej właściwości fizykochemicznych, a tym samym z możliwością modulowania aktywności obecnych w niej białek. Otrzymane wyniki nie zostały dotychczas opublikowane.



Rysunek 9. Wpływ TP oraz jego analogów na kurczliwość mięśni gładkich z dna żołądka szczura

Wpływ analogów transportanu na modulowanie aktywności fenylefryny

Modulujący wpływ analogów TP na białka błonowe wydaje się częściowo potwierdzać badania przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (prof. Ivan Kocić). Badania wykazały modulujący wpływ TP10 i w/w analogów TP na zależną od stężenia aktywność fenylefryny, selektywnego agona receptora α_1 -adrenergicznego, stymulującego skurcze mięśni gładkich tętnicy ogonowej szczura. Wykazano, że TP10 oraz analog [Lys(AAc)¹³]TP, w stężeniu 1 μ M (najniższe stężenie wywołujące znaczące zmiany w ich aktywności kurczącej mięśnie gładkie żołądka, rys. 9) zwiększają około 1,5-krotnie działanie kurczące fenylefryny. Natomiast analog z przyłączoną do TP grupą acetylową, [Lys(Ac)¹³]TP, redukował o około 60% wywołane fenylefryną skurcze mięśni gładkich śródbłonna tętnicy ogonowej. Wyniki badań zostały opisane w pracy **H6**.

Na podstawie powyższych badań trudno jest dokładnie wyjaśnić zróżnicowany wpływ analogów TP na aktywność fenylefryny. Jednakże wydają się, że może mieć to związek z wpływem modyfikacji w pozycji Lys¹³ na właściwości fizykochemiczne analogów TP, tj. zasadowość i hydrofobowość badanych peptydów, które odgrywają ważną rolę w oddziaływaniu z błonami komórkowymi. W przypadku analogów TP z przyłączonymi pochodnymi nukleozasad w pozycji Lys¹³, podobnie jak w przypadku TP10, charakter zasadowy i hydrofilowy tych peptydów został zachowany (ze względu na zasadowy i hydrofilowy charakter przyłączonych struktur). Natomiast w przypadku pochodnej z przyłączoną grupą acetylową w pozycji Lys¹³, jej charakter zasadowy uległ osłabieniu i wzrosła hydrofobowość tego peptydu, co mogło mieć wpływ na zdolność oddziaływania tego analogu z błoną komórkową oraz zmniejszenie aktywności fenylefryny.

Uzyskane wyniki należy traktować raczej jako wstęp do badań nad właściwościami TP oraz TP10 związanymi z ich oddziaływaniem na błony komórkowe, penetracją komórkową i transportem różnego rodzaju cząsteczek do wnętrza komórek. Dlatego moje dalsze badania skupiły się na syntezie pochodnych tych peptydów i ich koniugatów oraz badaniu ich właściwości pod względem wykorzystania ich jako CPP.

Podsumowanie stanu wiedzy na temat CPP, ich budowy, klasyfikacji, mechanizmu penetracji, sposobów koniugacji z innymi cząsteczkami, cytotoksyczności *in vitro* oraz wykorzystania ich w badaniach *in vivo* przedstawiłem w pracy przeglądowej **H7** (równy udział autorów z dr hab. Piotrem Wierzbickim).

Wykorzystanie TP i TP10 do dostarczania białka i siRNA do komórek nowotworowych

Selektywne dostarczanie różnego rodzaju związków do komórek nowotworowych jest szczególnie istotne z klinicznego punktu widzenia. Wykorzystanie do tego celu CPP stwarza nadzieje na opracowanie nowych strategii w terapii i diagnostyce onkologicznej [77-81].

Celem badań opisanych w pracy **H8** było oszacowanie cytotoksyczności TP i TP10 (a także ich biotynylowanych pochodnych) względem dwóch linii komórkowych: HT29 (gruczolaka okrężnicy) i HCT116 (raka okrężnicy) oraz skuteczności dostarczania białka (na przykładzie streptawidyny) oraz siRNA do w/w komórek nowotworowych. Badania zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – zespół prof. Zbigniewa Kmiecica.

Chemiczna synteza analogów TP i TP10 z przyłączoną biotyną do *N*-końca peptydów (Biot-TP oraz Biot-TP10), a także w przypadku TP, również do łańcucha bocznego Lys¹³ ([Lys(Biot)¹³]TP) została przeprowadzona metodą opisaną przeze mnie wcześniej, wykorzystującą pochodną Lys(*iv*Dde).

Badania wykazały, że peptydy w stężeniu do 10 μM nie wywołują znaczącego efektu cytotoksycznego względem obu testowanych linii komórkowych (wartości *LD*₅₀). Ich cytotoksyczność zmieniała się w następującej kolejności uporządkowanej według rosnącej cytotoksyczności: [Lys(Biot)¹³]TP < TP10 < TP < Biot-TP < Biot-TP10. W dalszych badaniach stosowano stężenia peptydów w zakresie stężeń 0,5 – 5 μM. Badania z wykorzystaniem cytometrii przepływowej nie wykazały istotnego wpływu peptydów, w zakresie badanych stężeń, na przeżywalność komórek obu linii nowotworowych jak i na cykl komórkowy (apoptozę), z wyjątkiem analogu Biot-TP10, który wykazywał znaczący wpływ na apoptozę komórek obu linii po 48 godzinnym okresie inkubacji.

Następnie sprawdzono efektywność biotynylowanych peptydów do transportowania streptawidyny poprzez utworzenie kompleksów niekowalencyjnych (w stosunku molowym 4:1). Testowane peptydy okazały się skutecznie transportować streptawidynę do komórek obu linii, zaś ich efektywność zmieniała się w następującej kolejności: [Lys(Biot)¹³]TP < Biot-TP < Biot-TP10. Niska efektywność transportu streptawidyny przez analog [Lys(Biot)¹³]TP wynikała prawdopodobnie z trudności w utworzeniu mostków solnych pomiędzy komponentami kompleksu, spowodowanych zawałą przestrzenną.

Ponadto okazało się, że transport streptawidyny przez biotynylowane peptydy jest niezależny od endocytozy, gdyż nie był hamowany przez brefeldynę A (10 µg/mL), inhibitor endocytozy. Jednakże udziału tego mechanizmu transportu nie można było całkowicie wykluczyć, chociażby w przypadku analogu Biot-TP10, gdzie brefeldyna A częściowo zmniejszała efektywność transportu streptawidyny. Obecność kompleksu Biot-TP – streptawidyna-FITC w komórkach linii HT29 została również potwierdzona za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.

Ostatnim etapem prac było sprawdzenie, czy badane peptydy mogą skutecznie dostarczać do komórek nowotworowych linii HT29 i HCT116 niskocząsteczkowe siRNA. Badania potwierdziły, że TP oraz jego analogi mogą skutecznie dostarczać w formie kompleksu niekowalencyjnego siRNA do komórek obu linii nowotworowych, przejawiające się znaczącym zmniejszeniem poziomu ekspresji mRNA specyficznego dla SASH1 – genu supresorowego m.in. nowotworów piersi i okrężnicy [88].

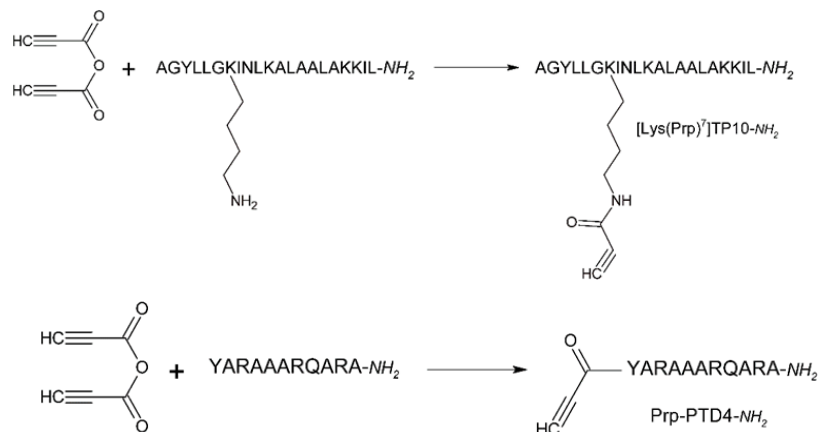
Powyższe obserwacje potwierdziły możliwość wykorzystania TP i TP10 jako transporterów do komórek nowotworowych nie tylko dużych cząsteczek (jak streptawidyna), ale również małych cząsteczek (jak siRNA) w celu wywołania efektu terapeutycznego, bez naruszenia integralności błony komórkowej i niekorzystnego wpływu na przeżywalność komórek.

Wykorzystanie TP10 do zwiększenia aktywności przeciwnowotworowej cisplatyny

Potencjalne możliwości wykorzystania CPP (w tym TP10), jako transporterów dla różnego rodzaju terapeutyków, jest przedmiotem dużego zainteresowania farmakologów. Ich zastosowanie może korzystnie wpłynąć na poprawę strategii przeciwnowotworowych stosowanych w chemioterapii, na przykład przez zmniejszenie lekooporności, zwiększenie zdolności rozpoznawania komórek nowotworowych oraz zwiększenie odpowiedzi terapeutycznej na lek [77-81].

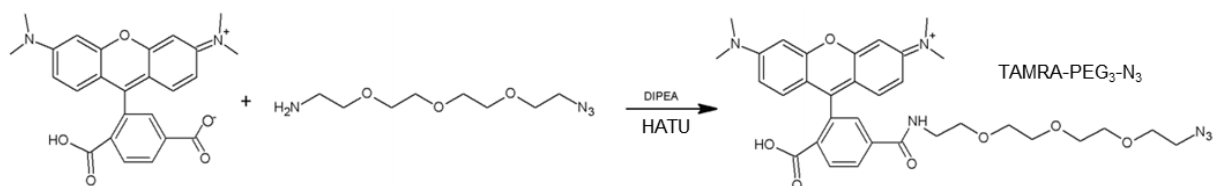
Cisplatyna (cPt), związek przeciwnowotworowy należący do terapeutyków starej generacji, jest wysoce skuteczna w leczeniu różnego rodzaju nowotworów, m.in. mięsaków, raka jajnika, jądra, głowy, płuc. Niestety, cPt wykazuje nadmierną toksyczność, która ogranicza jej stosowanie w onkologii klinicznej. Ponadto, stosowanie cPt w terapii przeciwnowotworowej jest ograniczone również przez rozwój oporności komórek nowotworowych na cPt [89].

Celem badań, których wyniki przedstawione zostały w pracy **H9**, było sprawdzenie czy TP10, a także PTD-4 (inny CPP, analog fragmentu białka Tat(47-57)-NH₂ o 33-krotnie większej zdolności penetrującej niż macierzysty peptyd, *tabela 8*) [90], w kompleksach niekowalencyjnych z cPt może zwiększyć jej aktywność przeciwnowotworową. Oprócz TP10 i PTD-4, dodatkowo zsyntezowane zostały ich pochodne z przyłączoną sondą fluorescencyjną, 6-karboksytetrametylorodaminą (TAMRA). Do połączenia TAMRA z peptydami wykorzystano nową metodę koniugacji – specyficzną 1,3-dipolarną reakcję cykloaddycji Huisgena, znaną również jako "reakcja klik" [91]. Metoda ta jest szybka, wysoce wydajna oraz regio- i chemoselektywna w łagodnych warunkach reakcji. Aby umożliwić połączenie TAMRA z peptydami, do grupy ε-aminowej Lys⁷ w TP10 oraz N-końcowej grupy aminowej w PTD-4 została przyłączona grupa alkinowa w reakcji z bezwodnikiem kwasu propioloowego (*rysunek 10*).



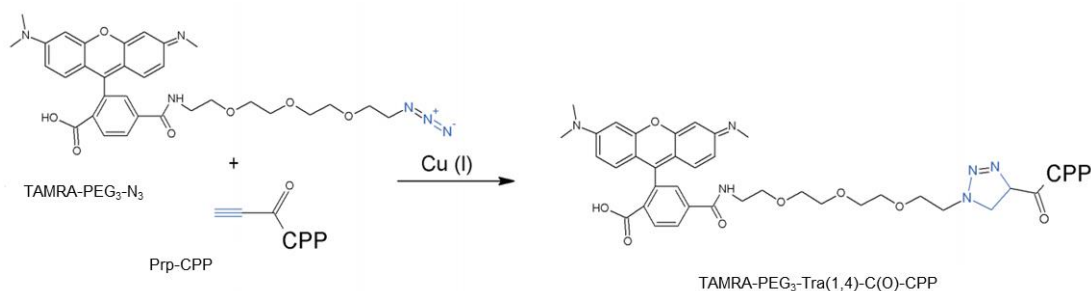
Rysunek 10. Schemat reakcji przyłączenia grupy alkinowej do TP10 i PTD-4

Również TAMRA została odpowiednio zmodyfikowana przez przyłączenie grupy azydkowej wraz z linkerem PEG₃ za pomocą 1-amino-11-azydo-3,6,9-trioksaundekanu (*rysunek 11*).



Rysunek 11. Schemat reakcji przyłączenia linkera H₂N-PEG₃-N₃ do TAMRA

Następnie pochodne alkinowe TP10 i PTD-4 zostały połączone z TAMRA za pomocą „reakcji klik” (rysunek 12).



Rysunek 12. Schemat reakcji przyłączenia TAMRA do TP10 i PTD-4 (CPP) za pomocą „reakcji klik”

Otrzymane peptydy, jak również ich niekowalencyjne kompleksy z cPt, poddane zostały badaniom pod kątem ich aktywności przeciwnowotworowej oraz cytotoksyczności. Badania zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dr Izabela Rusiecka) z wykorzystaniem dwóch linii komórek nienowotworowych – HEK293 (komórki nerkowe ludzkiego zarodka) i HEL299 (komórki płuca ludzkiego zarodka) oraz dwóch linii komórek nowotworowych – HeLa (komórki raka szyjki macicy) i OS143B (komórki kostniakomięsaka).

W teście przeżywalności komórek (test MTT), kompleks TP10 z cPt wykazywał wyższą aktywność przeciwnowotworową niż cPt użyty osobno. Co więcej, TP10 również przejawiał aktywność przeciwnowotworową. Natomiast wpływ kompleksu TP10 z cPt oraz jego składników osobno na przeżywalność komórek nienowotworowych był raczej niewielki. Ponadto, za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej wykazano że, TAMRA-TP10 jak i kompleks TAMRA-TP10+cPt łatwiej uzyskują dostęp do wnętrza komórek nowotworowych niż nienowotworowych.

W przypadku PTD-4, również stwierdzono obecność TAMRA-PTD-4 we wnętrzu komórek nowotworowych. Jednakże w kompleksie z cPt nie zaobserwowano jego internalizacji w komórkach nowotworowych (prawdopodobnie z powodu utraty właściwości penetrujących w wyniku alkilowania łańcuchów bocznych przez cPt). Ponadto, PTD-4 jak i jego kompleks z cPt, nie wykazywał znaczącej aktywności przeciwnowotworowej (badania na komórkach OS149B).

Powyższe badania sugerują, że TP10 w kompleksie niekowalencyjnym z cPt może wzmacniać przeciwnowotworową aktywność cPt (natomiast PTD-4 nie) względem komórek nowotworowych, co potencjalnie może mieć wpływ na zmniejszenie stosowanych w terapiach onkologicznych dawek tego leku oraz na obniżenie cytotoksyczności względem komórek nienowotworowych. Natomiast odpowiedź na pytanie czy wyższa aktywność

przeciwnowotworowa kompleksu TP10 z cPt wynika z jego lepszej kumulacji w komórce nowotworowej, czy też udziału w procesach, które odgrywają istotną rolę w nabytych mechanizmach oporności, zmniejszających skuteczność cPt w terapii przeciwnowotworowej, wymaga dalszych, bardziej szczegółowych badań.

Koniugat CPP-PNA jako potencjalny środek leczniczy w terapii miażdżycy

Niską skuteczność PTD-4 w transportowaniu do wnętrza komórek różnego rodzaju cząsteczek wydają się potwierdzać wcześniejsze badania, których celem było zaprojektowanie i synteza kowalencyjnego koniugatu PTD-4 z PNA (peptydowym kwasem nukleinowym), który efektywnie penetrowałby do wnętrza komórek śródbłonna, wiązał się z mRNA STAT1 i tym samym blokował ekspresję białka STAT1. Białko STAT1 odgrywa ważną rolę w stanach zapalnych naczyń krwionośnych i może być odpowiedzialne za inicjację i progresję miażdżycy [92]. Natomiast PNA, dzięki podobieństwu strukturalnemu do DNA/RNA i unikatowym właściwościom, takim jak wysokie powinowactwo do DNA/RNA, niska podatność na działanie nukleaz i proteaz, wysoka termiczna i chemiczna trwałość, mogą być wykorzystane m.in. do blokowania ekspresji genów, np. STAT1 [93]. Jednakże ich niska zdolność penetracji do wnętrza komórek znacznie ogranicza możliwości ich wykorzystanie w terapii i diagnostyce medycznej.

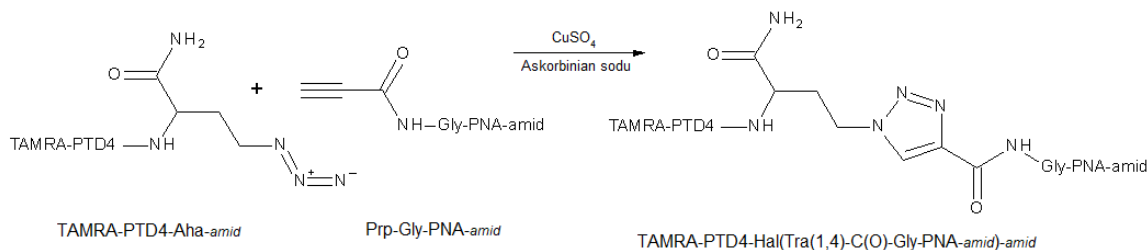
W tym celu zaprojektowano i zsyntezowano kowalencyjny koniugat PTD-4 z PNA (o sekwencji antysensowej składającej się z 13 monomerów – komplementarnej do fragmentu kodonu startowego AUG mRNA STAT1, *rysunek 13*).

mRNA STAT1 (człowieka)	---- GG AUG UCU CAG UGG UAC GAA CUU
PNA (komplementarna sekwencja)	C TAC AGA GTC ACC (N-koniec)

Rysunek 13. Sekwencja fragmentu mRNA STAT1 człowieka (okalający kodon startowy AUG) oraz komplementarnego fragmentu PNA

Dodatkowo do *N*-końca PTD-4 przyłączono sondę fluorescencyjną. Ze względu na poważne reakcje uboczne towarzyszące syntezie PNA (które wpływają na niską wydajność otrzymywanych produktów), synteza koniugatu TAMRA-PTD-4-PNA stanowiła spore wyzwanie syntetyczne. Ponieważ ciągła synteza koniugatu na żywicy nie dawała pozytywnych rezultatów, zastosowano sprawdzoną wcześniej metodę z użyciem „reakcji klik” w celu połączenia PNA z zsyntezowaną wcześniej pochodną PTD-4 z przyłączoną do jej *N*-końca sondą fluorescencyjną (TAMRA) oraz L-azydohomoalaniną (Aha) przyłączoną do jej *C*-końca. Natomiast PNA zmodyfikowano przez dołączenie do jego *N*-końca reszty Gly, a następnie do

jej grupy aminowej – grupy alkinowej za pomocą bezwodnika propiolowego. Przyjęta strategia, chociaż z niewielką wydajnością, pozwoliła na pomyślne otrzymanie zaprojektowanego koniugatu. Schemat reakcji przyłączenia TAMRA-PTD-4-Aha-NH₂ do Prp-Gly-PNA-NH₂ z wykorzystaniem „reakcji klik” przedstawia *rysunek 14*.



Rysunek 14. Schemat otrzymywania koniugatu TAMRA-PTD-4-Gly-PNA

Badania z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej potwierdziły zdolność koniugatu TAMRA-PTD-4-Hal-Gly-PNA-NH₂ do tworzenia trwałych kompleksów z komplementarnymi 20 oligonukleotydowymi sekwencjami zarówno ssDNA STAT1 jak i mRNA STAT1. Zdolność tego koniugatu do formowania kompleksów była identyczna z tą jaką wykazywał jego komponent, PNA niezwiązany kowalencyjnie z PTD-4. Wyniki tych badań (przedstawione w pracy **H10**) sugerują, że wykorzystanie takiego koniugatu do modulowania aktywności i ekspresji STAT1 może stanowić punkt wyjściowy do opracowania nowej strategii w leczeniu miażdżycy.

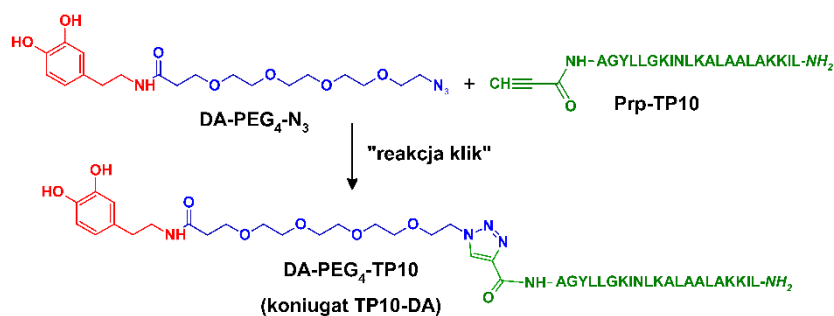
Jednakże badania przeprowadzone z wykorzystaniem komórek linii HMEC (komórki śródbłonna mikronaczyniowego skóry człowieka) oraz mikroskopii fluorescencyjnej, nie potwierdziły skuteczności dostarczania PNA przez PTD-4, a tym samym skuteczności blokowania ekspresji mRNA STAT1. Prawdopodobnie, niska efektywność penetracji koniugatu do komórek śródbłonna mogła wynikać z modyfikacji w obrębie struktury PTD-4 po przyłączeniu sondy oraz PNA, które niekorzystnie wpłynęły na jego właściwości penetrujące. Powyższe dane nie zostały dotychczas opublikowane. Badania komórkowe zostały przeprowadzone w laboratorium kierowanym przez prof. Hansa Bluijssena (Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu) w ramach współpracy naukowej (grant MNiSW nr N N302 016339).

Koniugat TP10-dopamina jak potencjalny środek leczniczy w terapii choroby Parkinsona

Skuteczne dostarczanie różnego rodzaju leków do ośrodkowego układu nerwowego, w tym mózgu, jest głównym wyzwaniem w leczeniu zaburzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona (PD). PD to postępujące zaburzenie neurodegeneracyjne spowodowane

selektywną utratą neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej, co prowadzi do zmniejszenia syntezy dopaminy (DA) [94]. Aktualne leczenie PD jest terapią objawową i wiąże się z wieloma ograniczeniami. Zastosowanie DA jako środka terapeutycznego w leczeniu PD jest mocno ograniczone ze względu na problem z pokonywaniem bariery krew-mózg (BBB) oraz jej podatnością na degradację enzymatyczną z udziałem katecholo-*O*-metylotransferazy (COMT) oraz oksydazy monoaminowej (MAO). Lewodopa (L-DOPA) jest najskuteczniejszym lekiem w objawowym leczeniu PD, lecz jej stosowanie wiąże się z niekorzystnymi efektami ubocznymi w trakcie długoterminowej terapii (głównie fluktuacje ruchowe, dyskinezje).

Celem badań, których wyniki zostały przedstawione w pracy **H11** było zaprojektowanie i synteza koniugatu TP10 z dopaminą, który pokonywałby barierę krew-mózg, wykazywał niską podatność na degradację (z udziałem enzymów proteolitycznych oraz COMT), wysokie powinowactwo do receptorów DA (D₁ i D₂) oraz posiadał aktywność przeciwparkinsonowską. W tym celu zsyntezowano koniugat TP10-DA, w którym TP10 został kowalencyjnie połączony z DA za pomocą „reakcji klik” (rysunek 15). Aby umożliwić to połączenie, TP10 został zmodyfikowany przez przyłączenie do jego *N*-końca grupy alkinowej za pomocą bezwodnika kwasu propiolowego (Prp-TP10), zaś do cząsteczki DA przyłączona została grupa azydkowa za pomocą estru sukcydimidowego kwasu 15-azydo-4,7,10,13-tetraoksyntadekanowego. Zastosowanie linkera PEG₄ miało nie tylko zapewnić efektywne połączenie obu cząsteczek, ale również sprawić, że właściwości biologiczne obu cząsteczek zostaną zachowane.



Rysunek 15. Schemat reakcji przyłączenia DA do TP10 z wykorzystaniem „reakcji klik”

Analiza jakościowa i ilościowa z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem spektrometrii mas (LC-MS) wykazała, że koniugat TP10-DA wyraźnie uzyskuje dostęp do tkanki mózgowej (jego stężenie w homogenatach mysich mózgow po dożylniej iniekcji było około 3-krotnie wyższe niż endogennej DA). Dożylna iniekcja komponentów koniugatu (DA i TP10 osobno), nie powodowała znaczącego wzrostu stężenia DA w homogenatach mysich mózgow, natomiast obecności TP10 w tkance mózgowej nie stwierdzono. Dożylną iniekcję związków i izolację mózgow mysich wykonała dr Izabela Rusiecka.

Nieobecność TP10 w tkance mózgowej prawdopodobnie mogła być spowodowana jego niską zdolnością do penetracji OUN i/lub jego znacznie większą podatnością na degradację (badania porównawcze stabilności TP10 oraz TP10-DA w homogenatch mysich mózgów). Koniugat TP10-DA wykazywał również zdecydowanie mniejszą podatność na reakcję *O*-transmetylacji z udziałem COMT niż DA. Ponadto, badania powinowactwa TP10-DA do receptorów D₁ i D₂ (rekombinowanych, komercyjnie dostępnych) za pomocą kompetycyjnych testów wiązania z wykorzystaniem techniki LC-MS potwierdziły względnie wysokie powinowactwo (wartości K_i) koniugatu do receptorów DA (około 37-krotnie wyższe do D₁ i około 8-krotnie niższe do D₂ niż DA).

Aktywność przeciwparkinsonowska koniugatu TP10-DA oszacowana została za pomocą testów behawioralnych (test słupa i test zawieszenia) z wykorzystaniem przedklinicznego mysiego modelu choroby Parkinsona, w którym objawy PD indukowane były za pomocą MPTP. W obu testach TP10-DA silniej redukował objawy PD wywołane za pomocą MPTP niż L-DOPA (o około 50% i 24%, odpowiednio w teście słupa i teście zawieszenia). Testy behawioralne przeprowadzone zostały w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dr Izabela Rusiecka).

Powyższe badania wykazały, że TP10 może być skutecznie wykorzystany jako transporter dopaminy do OUN. Kowalencyjne przyłączenie DA do TP10 doprowadziło do otrzymania koniugatu, który był zdolny pokonywać barierę krew-mózg (prawdopodobnie w wyniku zmian właściwości fizykochemicznych TP10 po połączeniu z DA, które korzystnie wpłynęły na jego zdolność penetracji BBB) oraz wykazywał aktywność przeciwparkinsonowską (większą niż L-DOPA). Ponadto, koniugat TP10-DA posiadał wysokie powinowactwo do receptorów DA (w przypadku D₁ znacznie wyższe niż DA) oraz znacznie niższą podatność na degradację niż DA lub TP10. Powyższe badania dowiodły, że koniugacja TP10 z DA może być dobrym punktem wyjściowym dla opracowania nowej strategii leczenia choroby Parkinsona. Wcześniej, dane literaturowe nie opisywały przypadku wykorzystania CPP jako transporterów do mózgu leków o potencjalnie przeciwparkinsonowskiej aktywności.

Wpływ TP10 na przeciwdrobnoustrojową aktywność wankomycyny

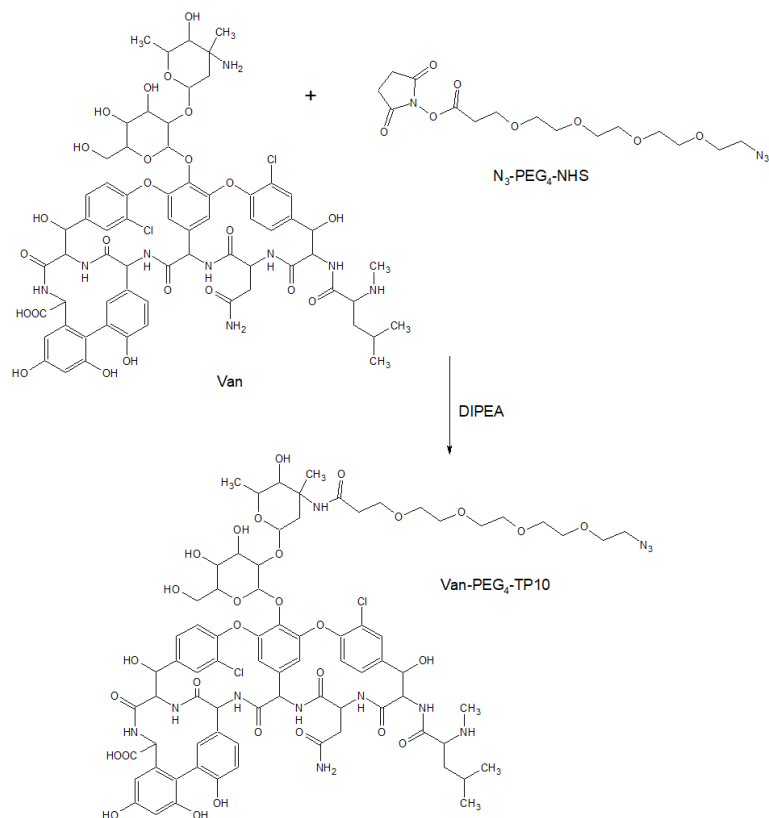
W ostatnich latach wiele grup badawczych skupiło swoją uwagę na peptydach przeciwdrobnoustrojowych (AMP) [95]. AMP, jako ważny element naturalnej odporności organizmu na drobnoustroje, są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie i wykazują szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz niewielki wpływ na rozwój lekooporności.

Wankomycyna (Van) jest glikopeptydowym antybiotykiem często stosowanym w leczeniu zagrażających życiu infekcji wywołanych przez lekoopronne bakterie, takie jak *S. aureus*, *Enterococcus spp.* i *C. difficile*. Pomimo dużego terapeutycznego znaczenia Van, istnieją również pewne ograniczenia w odniesieniu do jego zastosowania jako antybiotyku. Ważnym ograniczeniem jest pojawienie się oporności na Van wśród szczepów MRSA (opornych na działanie metycyliny) i enterokoków [96, 97]. Ponadto, Van w niewielkim stopniu penetruje do wnętrza komórek oraz OUN.

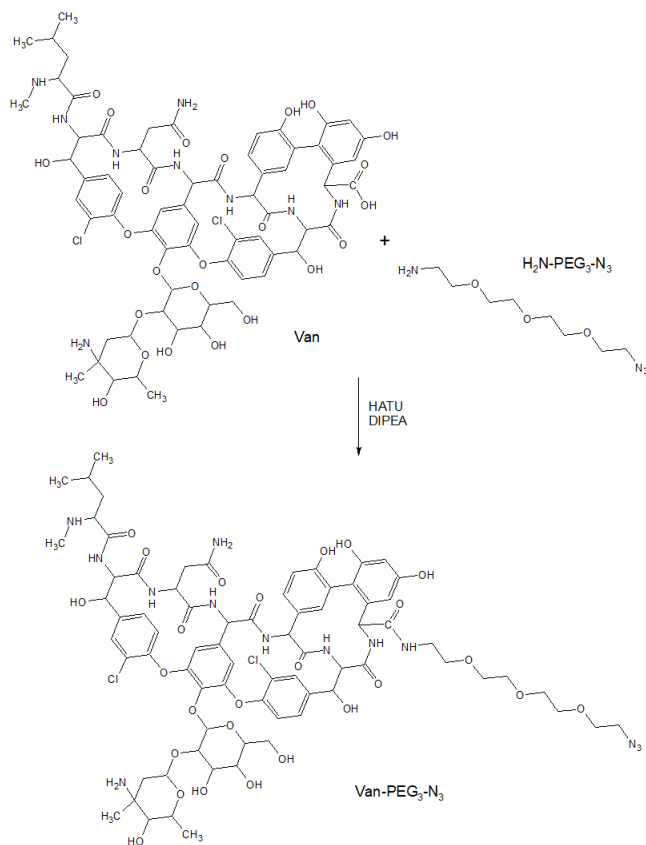
Celem badań opisanych w pracy **H12** było otrzymanie kowalencyjnych koniugatów Van z TP10, sprawdzenie ich aktywności przeciwbakteryjnej oraz potencjalnego wykorzystania w leczeniu zakażeń zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo oraz w OUN. TP10 znany jest nie tylko jako transporter różnego rodzaju cząsteczek przez błony komórkowe, ale także z aktywności przeciwdrobnoustrojowej [98, 99]. Peptyd ten ma właściwości bakteriobójcze, dzięki zdolności do zaburzania integralności błony bakteryjnej i wiązania się z genomowym DNA. TP10 działa bójczo na wiele szczepów bakterii Gram-dodatnich i ujemnych, w tym lekoopronnych szczepów klinicznych oraz zapobiega reakcjom zapalnym.

Ze względu na obecność wielu reaktywnych grup funkcyjnych zarówno w cząsteczce TP10 jak i Van, synteza kowalencyjnych koniugatów Van-TP10 stanowiła spore wyzwanie syntetyczne. Z tego powodu, próby bezpośredniego połączenia Van z TP10 nie powiodły się (prawdopodobnie ze względu na zawadę steryczną, która uniemożliwiała efektywne połączenie obu cząsteczek). Natomiast, zastosowanie do połączenia obu cząsteczek sprawdzonej metody „reakcji klik” doprowadziło do efektywnego utworzenia koniugatów TP10 z Van. W tym celu cząsteczka Van zmodyfikowano na dwa sposoby: (1) przez przyłączenie kwasu 15-azydo-4,7,10,13-tetraoksapentadekanowego (N_3 -PEG₄-COOH) do grupy aminowej w ugrupowaniu cukrowym Van (*rysunek 16*) oraz (2) przyłączenie 1-amino-11-azydo-3,6,9-trioksaundekanu (N_3 -PEG₃-NH₂) do ugrupowania aglikonowego Van (*rysunek 17*).

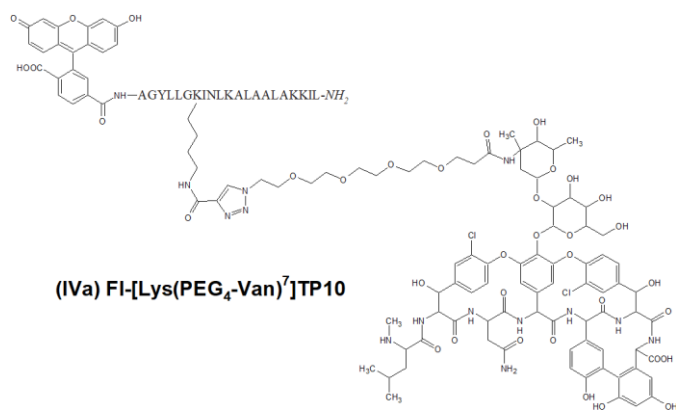
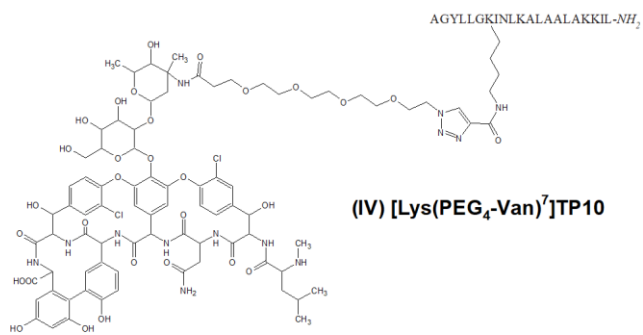
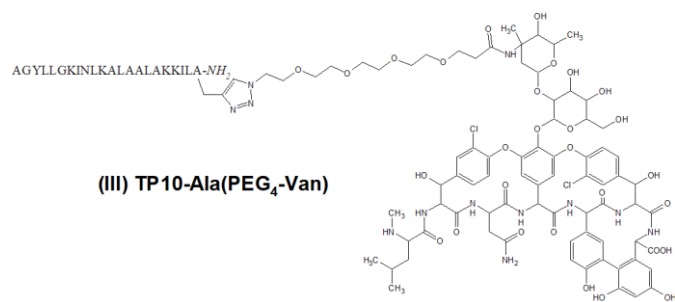
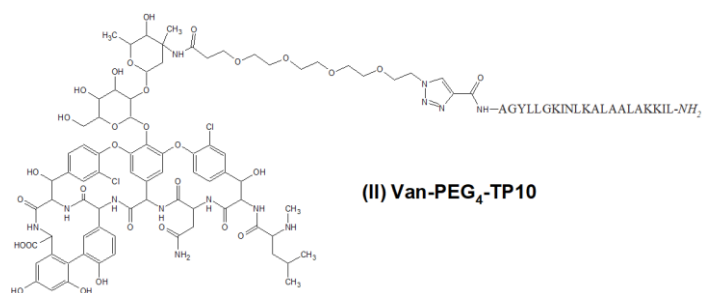
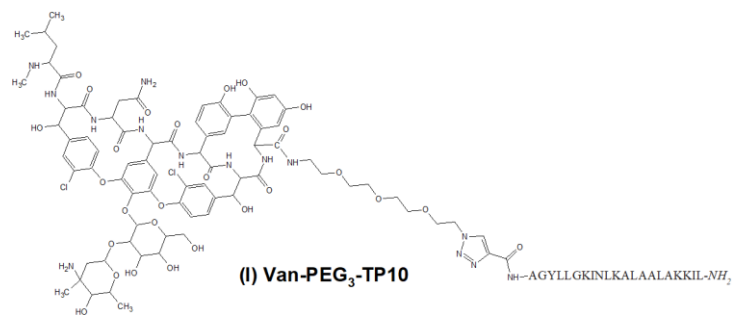
Otrzymaną w ten sposób pochodną Van-PEG₃-N₃ przyłączono do TP10 zmodyfikowanego wcześniej na *N*-końcu grupą alkinową, zaś pochodną Van-PEG₄-N₃ do cząsteczki TP10 zmodyfikowanej wcześniej grupą alkinową (za pomocą bezwodnika kwasu propiolowego) na *N*-końcu, grupie ε-aminowej reszty Lys⁷, a także na *C*-końcu przez wprowadzenie reszty L-proprgiloglicyny (Prg). Dodatkowo koniugat [Lys(PEG₄-Van)⁷]TP10 zmodyfikowano przez przyłączenie do jego *N*-końca sondy fluorescencyjnej – 6-karboksyfluoresceiny. Struktury otrzymanych pochodnych przedstawia *rysunek 18*.



Rysunek 16. Schematy reakcji otrzymania pochodnej Van-PEG $_4$ -N $_3$



Rysunek 17. Schemat reakcji otrzymania pochodnej Van-PEG $_3$ -N $_3$



Rysunek 18. Struktury chemiczne zsyntezowanych koniugatów Van-TP10

Badania aktywności przeciwbakteryjnej zostały przeprowadzone na trzech szczepach *S. aureus*: MRSA N315 (szczep referencyjny, wrażliwy na Van), MRSA 12673 (szczep kliniczny, średnio wrażliwy na Van) i MRSA 6347 (szczep kliniczny, średnio wrażliwy na Van) oraz dwóch szczepach enterokoków: *Enterococcus faecium* 3934825 (szczep kliniczny, oporny na Van i wrażliwy na linezolid) i *Enterococcus faecalis* 3937158 (szczep kliniczny, oporny na Van i linezolid). Przeprowadzone badania pokazały, że szczepy MRSA wykazują umiarkowaną podatność na działanie Van i nieco niższą na działanie TP10, zaś szczepy enterokoków są odporne na działanie Van i TP10. Koniugaty Van-TP10 wykazywały wyższą aktywność przeciwbakteryjną niż Van względem szczepów MRSA, z wyjątkiem koniugatu **III** i **IV**, których aktywność względem szczepu referencyjnego MRSA była wyższa niż Van. Natomiast aktywność przeciwbakteryjna względem szczepów enterokoków była raczej niewielka, z wyjątkiem koniugatu **I** (względem *E. faecalis*) oraz **IV** (względem *E. faecium*).

Obliczone wartości indeksów FIC (*fractional inhibitory concentration*) dla badanych szczepów MRSA sugerowały, że pomiędzy Van i TP10 nie występuje synergia ani antagonizm. Ponadto, w teście lizy erytrocytów nie wykazano aktywności litycznej dla Van (w całym zakresie badanych stężeń), a także koniugatu **I** i **II** (w stężeniach odpowiadających ich wartościom MIC – minimalnego stężenia hamującego) dla szczepów podatnych na ich działanie. Badania (aktywność przeciwdrobnoustrojowa, test lizy) zostały przeprowadzone w Katedrze Mikrobiologii Farmakologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – zespół prof. Krzysztofa Walerona.

Następnie sprawdzono aktywność przeciwbakteryjną Van, TP10 oraz jednego z koniugatów, [Lys(PEG₄-Van)⁷]TP10, względem szczepu *S. aureus* MRSA 12673 zlokalizowanego wewnątrz komórek (linia komórkowa HEK293). Badania wykazały niewielki wpływ Van na przeżywalność populacji bakterii (przeżywalność na poziomie 95%), znacznie większy wpływ TP10 (przeżywalność na poziomie 74%), zaś najwyższy dla koniugatu (przeżywalność na poziomie 29%). Badania wykonane zostały w Katedrze Biotechnologii, Międzyuczelnianego Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dr Anna Kawiak).

Analiza jakościowa z wykorzystaniem koniugatu **IVa** – znakowanego fluoresceiną (badania za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej) oraz jakościowa i ilościowa koniugatu **IV** (analiza za pomocą techniki LC-MS) potwierdziła zdolność koniugatów do pokonywania bariery krew-mózg. Natomiast zdolność Van do pokonywania bariery krew-mózg była niewielka. Analiza ilościowa (LC-MS) wykazała ponad 200-krtonie wyższe stężenie koniugatu **IV** w homogenatach mysich mózgów niż Van. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań,

analiza ilościowa nie wykazała obecności TP10 w homogenatach mysich mózgów. Analizę jakościową za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz izolację mózgów mysich po dożylnym podaniu związków przeprowadziła dr Izabela Rusiecka

Powyższe badania wykazały, że kowalencyjne połączenie Van z TP10 prowadzi do otrzymania koniugatów, które charakteryzowały się większą aktywnością przeciwbakteryjną niż Van, zwłaszcza względem szczepów MRSA, a także zakażeń MRSA zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo, względnie niską toksycznością (test lizy erytrocytów) oraz potencjalną możliwością wykorzystania ich w terapii zakażeń ośrodkowego układu nerwowego (ze względu na zdolność do pokonywania bariery krew-mózg). Wyniki badań dowiodły, że koniugacja TP10 z Van może być dobrym punktem wyjściowym dla opracowania nowej strategii leczenia zakażeń wywołanych lekoopornymi szczepami bakterii, zlokalizowanych zarówno wewnątrzkomórkowo jak i w OUN.

PODSUMOWANIE

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl 12 publikacji przedstawiających chemiczną syntezę oraz badania właściwości farmakologicznych wybranych analogów *N*-końcowego fragmentu 1-15 galaniny oraz jej hybrydowych analogów z innymi biologicznie czynnymi peptydami, ze szczególnym uwzględnieniem transportanu i jego koniugatów.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- Reszty aminokwasowe Trp², Leu⁴, Ser⁶ i His¹⁴ w cząsteczce Gal odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniu z receptorami Gal, których pobudzenie odpowiedzialne jest za aktywność Gal w mięśniach gładkich jelita czczego i okrężnicy – modyfikacje w pozycjach 2, 4 i 6, a także w pozycji 14, z wyjątkiem analogu [Cit¹⁴]Gal(1-15)-NH₂, prowadzą do znacznego obniżenia aktywności w porównaniu z niemodyfikowanym fragmentem Gal(1-15)-NH₂.
- Reszty aminokwasowe w pozycjach Ser⁶, Gly⁸, Tyr⁹, Leu¹⁰ i Leu¹¹ w cząsteczce Gal odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniu z receptorami Gal, których pobudzenie odpowiedzialne jest za hamujący efekt Gal na indukowane glukozą wydzielanie insuliny z wysp Langerhansa – analogi [Phe⁹]Gal(1-15)-NH₂ i [Pro¹¹]Gal(1-15)-NH₂ wykazywały silną aktywność insulintropową i antagonistyczną w stosunku do Gal.
- Pochodna Asp(Dmab), zastosowana w trakcie syntezy analogów Gal, wykazuje silną tendencję do tworzenia aspartimidu (Asi). W jego powstawaniu kluczową rolę odgrywają takie czynniki jak: metoda usuwania osłony Fmoc, metoda sprzęgania aminokwasów oraz wybór odpowiedniej żywicy. Problem powstawania apartimidu z udziałem pochodnej Asp(ODmab) nie był wcześniej opisany w literaturze.

- Analog [Asi¹⁴]Gal(1-15)-NH₂ wykazuje silnie agonistyczną aktywność w mięśniach gładkich żołądka szczura, zaś w trzustce aktywność insulinotropową oraz antagonistyczną w stosunku do Gal.
- Hybrydowy analog Gal(1-13)-[Ala^{11,15}]ET-1(6-21)-NH₂ (zaprojektowany jako antagony Gal o umiarkowanym powinowactwie do receptorów Gal) wykazuje aktywność agonistyczną w przewodzie pokarmowym (w przypadku wpływu na wydzielanie insuliny, znacznie silniejszą niż Gal).
- Hybrydowy analog galaniny – transportan (TP) oraz jego analogi wykazują odmienną od Gal aktywność biologiczną, m.in. niską aktywność w mięśniach gładkich żołądka, modulują aktywność fenylefryny.
- TP i TP10 mogą transportować do wnętrza komórek nowotworowych nie tylko duże cząsteczki takie jak białka (np. streptawidyna), ale również względnie małe cząsteczki (jak np. siRNA) w celu wywołania efektu terapeutycznego, bez naruszenia integralności błony komórkowej i niekorzystnego wpływu na przeżywalność komórek.
- TP10 w kompleksie niekowalencyjnym z cPt może wzmacniać przeciwnowotworową aktywność cPt względem komórek nowotworowych, co potencjalnie może mieć wpływ na zmniejszenie stosowanych w terapiach onkologicznych dawek tego leku oraz na obniżenie cytotoksyczności względem komórek nienowotworowych (potencjalne wykorzystanie we wspomaganiu terapii przeciwnowotworowej).
- PTD-4 (inny peptyd należący do rodziny CPP) penetruje do wnętrza komórki, jednakże w kompleksie niekowalencyjnym z cPt jak również w koniugacie z PNA nie jest w stanie transportować cząsteczek do wnętrza komórek, chociaż koniugat PTD-4-PNA może tworzyć trwałe kompleksy zarówno z RNA jak i DNA.
- „Reakcja klik” może być skutecznie stosowana do syntezy koniugatów peptydów z innymi cząsteczkami (sondami fluorescencyjnymi, np. TAMRA oraz związkami biologicznie czynnymi, np. Van, DA, PNA).
- Kowalencyjny koniugat TP10 z dopaminą pokonuje barierę krew-mózg, a także wykazuje aktywność przeciwparkinsonowską (większą niż L-DOPA), posiada wysokie powinowactwo do receptorów DA (w przypadku D₁ znacznie wyższe niż DA) oraz znacznie niższą podatność na degradację niż DA lub TP10 (potencjalne wykorzystanie w terapii PD).
- Kowalencyjne koniugaty TP10 z wankomycyną charakteryzują się większą aktywnością przeciwbakteryjną niż Van, zwłaszcza względem szczepów MRSA (metycylinoopornych), a także zakażeń MRSA zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo, względnie

niską toksycznością oraz potencjalną możliwością wykorzystania ich w terapii zakażeń ośrodkowego układu nerwowego (ze względu na zdolność do pokonywania bariery krew-mózg) – powyższe osiągnięcie jest przedmiotem zgłoszenia patentowego nr P.428782.

LITERATURA

1. Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, McDonald TJ, and Mutt V. Galanin a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett.* 1983; 164: 124-128.
2. Bersani M, Johnsen AH, Højrup P, Dunning BE, Andreasen JJ, Holst JJ. Human galanin: primary structure and identification of two molecular forms. *FEBS Lett.* 1991; 283(2): 189-194.
3. Langel U, Bartfai T. Chemistry and molecular biology of galanin receptor ligands. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 863: 86-93.
4. Lang R, Gundlach AL, Kofler B. The galanin peptide family: Receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol. Ther.* 2007; 115: 177-207.
5. Lang R, Gundlach AL, Holmes FE, Hobson SA, Wynick D, Hökfelt T, Kofler B. Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity. *Pharmacol Rev.* 2015; 67(1): 118-175.
6. Webling KE, Runesson J, Bartfai T, Langel U. Galanin receptors and ligands. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012; 3: 146.
7. Cisowska A, Ciosek J. Galanin – the biosynthesis, receptors and function – reviews. *Polish Journal of Endocrinology (Endokrynol. Pol.)* 2003; 54: 776-783.
8. Ruczyński J, Rekowski P. Biological activity of galanin and its significance in physiologic and pathologic processes [Biologiczna aktywność galaniny i jej znaczenie w procesach fizjologicznych i patologicznych]. *Postępy biochemii* 2002, 48(4), 306-316.
9. Bartfai T, Hökfelt T, Langel U. Galanin – a neuroendocrine peptide. *Crit. Rev. Neurobiol.* 1993; 7: 229-274.
10. Crawley JN. Biological actions of galanin – review. *Regul. Pept.* 1995; 59: 1-16.
11. Bedecs K, Berthold M, Bartfai T. Galanin – 10 years with a neuroendocrine peptide. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997; 27: 337-349.
12. Bartfai T. Galanin: a neuropeptide with important central nervous system actions. *Back to Psychopharmacology - The Fourth Generation of Progress*, Raven Press, New York 2000; 563-571.
13. Vrontakis MA. Galanin: a biologically active peptide. *Curr. Drug. Targets CNS Neurol. Disord.* 2002; 1: 531-541.
14. Mitsukawa K, Lu X, Bartfai T. Galanin, galanin receptors and drug targets. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(12): 1796-1805.
15. Brancheck T, Smith KE, Walker MW. Molecular biology and pharmacology of galanin receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 863: 94-107.
16. Brancheck TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW. Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21(3): 109-117.
17. Šípková J, Kramáriková I, Hynie S, Klenerová V. The galanin and galanin receptor subtypes, its regulatory role in the biological and pathological functions. *Physiol Res.* 2017; 66(5): 729-740.
18. Karelson E, Langel U. Galaninergic signaling and adenylate cyclase. *Neuropeptides* 1998; 32: 197-210.
19. Crawley JN. The role of galanin in feeding behaviour. *Neuropeptides* 1999; 33: 369-375.
20. Gundlach AL. Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? *Eur J Pharmacol.* 2002; 440(2-3): 255-268.
21. Fang P, Yu M, Guo L, Bo P, Zhang Z, Shi M. Galanin and its receptors: a novel strategy for appetite control and obesity therapy. *Peptides* 2012; 36: 331-339.
22. Millón C, Flores-Burgess A, Castilla-Ortega E, Gago B, García-Fernandez M, Serrano A, Rodriguez de Fonseca F, Narváez JA, Fuxe K, Santín L, Díaz-Cabiale Z. Central administration of galanin N-terminal fragment 1-15 decreases the voluntary alcohol intake in rats. *Addict Biol.* 2017; 24(1): 76-87.

23. Bailey KR, Pavlova MN, Rohde AD, Hohmann JG, Crawley JN. Galanin receptor subtype 2 (GalR2) null mutant mice display an anxiogenic-like phenotype specific to the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007; 86(1): 8-20.
24. Crawley J. Minireview. Galanin-acetylcholine interactions: relevance to memory and Alzheimer's disease. *Life Sci.* 1996; 58: 2185-2199.
25. Ögren SO, Schött PA, Kehr J, Misane I, Razani H. Galanin and learning. *Brain Res.* 1999; 848: 174-182.
26. Schött PA, Hökfelt T, Ögren SO. Galanin and spatial learning in the rat. Evidence for a differential role for galanin in subregions of the hippocampal formation. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1386-1403.
27. Counts SE, Perez SE, Kahl U, Bartfai T, Bowser RP, Deecher DC, Mash DC, Crawley JN, Mufson EJ. Galanin: neurobiologic mechanisms and therapeutic potential for Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* 2001; 7(4): 445-470.
28. Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD, De Lacalle S, Mufson EJ. Galanin in Alzheimer disease. *Mol Interv.* 2003; 3(3): 137-156.
29. Millón C, Flores-Burgess A, Narváez M, Borroto-Escuela DO, Gago B, Santín L, Castilla-Ortega E, Narváez JÁ, Fuxe K, Díaz-Cabiale Z. The neuropeptides Galanin and Galanin(1-15) in depression-like behaviours. *Neuropeptides.* 2017; 64: 39-45.
30. Kuteeva E, Hökfelt T, Wardi T, Ögren SO. Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(12): 1854-1863.
31. Lu X, Sharkey L, Bartfai T. The brain galanin receptors: targets for novel antidepressant drugs. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2007; 6(3): 183-192.
32. Liu HX, Hökfelt T. The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23(10): 468-474.
33. Liu HX, Brumovsky P, Schmidt R, Brown W, Payza K, Hodzic L, Pou C, Godbout C, Hökfelt T. Receptor subtype-specific pronociceptive and analgesic actions of galanin in the spinal cord: selective actions via GalR1 and GalR2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(17): 9960-9964.
34. Potter E. Cardiovascular actions of galanin. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 863:170-174.
35. Díaz-Cabiale Z, Parrado C, Vela C, Razani H, Coveñas R, Fuxe K, Narváez JA. Role of galanin and galanin(1-15) on central cardiovascular control. *Neuropeptides.* 2005; 39(3): 185-190.
36. Hohmann JG, Clifton DK, Steiner RA. Galanin: analysis of its coexpression in gonadotropin-releasing hormone and growth hormone-releasing hormone neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 863: 221-235.
37. Zdrojewicz Z, Sowińska E. The significance of galanin in physiologic and pathologic processes in humans. *Postepy Hig Med Dosw.* 2000; 54(6): 819-833.
38. Bauer JW, Lang R, Jakab M, Kofler B. Galanin family of peptides in skin function. *Exp Suppl.* 2010; 102: 51-59.
39. Lang R, Kofler B. The galanin peptide family in inflammation. *Neuropeptides.* 2011; 45(1): 1-8.
40. Lerner JT, Sankar R, Mazarati AM. Galanin and epilepsy. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(12): 1864-1871.
41. Mazarati AM. Galanin and galanin receptors in epilepsy. *Neuropeptides.* 2004; 38(6): 331-343.
42. Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD, Mufson EJ. Neuroprotective role for galanin in Alzheimer's disease. *Exp Suppl.* 2010; 102: 143-162.
43. Elliott-Hunt CR, Marsh B, Bacon A, Pope R, Vanderplank P, Wynick D. Galanin acts as a neuroprotective factor to the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(14): 5105-5110.
44. Elliott-Hunt CR, Pope RJ, Vanderplank P, Wynick D. Activation of the galanin receptor 2 (GalR2) protects the hippocampus from neuronal damage. *J Neurochem.* 2007; 100(3): 780-789.
45. Rauch I, Kofler B. The galanin system in cancer. *Exp Suppl.* 2010; 102: 223-241.
46. Berger A, Santic R, Hauser-Kronberger C, Schilling FH, Kogner P, Ratschek M, Gamper A, Jones N, Sperl W, Kofler B. Galanin and galanin receptors in human cancers. *Neuropeptides.* 2005; 39(3): 353-359.
47. Ekblad E, Håkanson R, Sundler F and Wahlstedt C. Galanin: neuromodulatory and direct contractile effects on smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol* 1985; 86: 241-246.

48. Fox JE, Brooks B, McDonald TJ, Barnett W, Kostolanska F, Yanaihara C, Yanaihara N, Rokaeus A. Actions of galanin fragments on rat, guinea-pig, and canine intestinal motility. *Peptides* 1988; 9: 1183-1189.
49. Katsoulis S, Schmidt WE, Schwörer H, Creutzfeldt W. Effects of galanin, its analogues and fragments on rat isolated fundus strips. *Br J Pharmacol.* 1990; 101(2): 297-300.
50. Katsoulis S, Clemens A, Morys-Wortmann C, Schworer H, Schaub H, Klomp HJ, Folsch UR, Schmidt WE. Human galanin modulates human colonic motility in vitro. Characterization of structural requirements. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 446-451.
51. Rattan S, Tamura W. Role of galanin in the gastrointestinal sphincters. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 863: 143-155.
52. Delvaux M, Botella A, Fioramonti J, Frexinos J, Bueno L. Galanin induces contraction of isolated cells from circular muscle layer of pig ileum. *Regul Pept.* 1991; 32(3): 369-374.
53. Botella A, Delvaux M, Fioramonti J, Frexinos J, Bueno L. Galanin induces opposite effects via different intracellular pathways in smooth muscle cells from dog colon. *Peptides.* 1994; 15(4): 637-643.
54. Botella A, Delvaux M, Fioramonti J, Frexinos J, Bueno L. Galanin contracts and relaxes guinea pig and canine intestinal smooth muscle cells through distinct receptors. *Gastroenterology.* 1995; 108(1): 3-11.
55. Fontaine J, Lebrun P. Galanin: Ca²⁺-dependent contractile effects on the isolated mouse distal colon. *Eur J Pharmacol.* 1989; 164(3): 583-586.
56. Muramatsu I, Yanaihara N. Contribution of galanin to non-cholinergic, non-adrenergic transmission in rat ileum. *Br J Pharmacol.* 1988; 94(4): 1241-1249.
57. Dunning BE, Ahren B, Veith RC, Böttcher G, Sundler F, Taborsky GJ Jr. Galanin: a novel pancreatic neuropeptide. *Am J Physiol.* 1986; 251(1 Pt 1): E127-133.
58. Ahrén B, Arkhammar P, Berggren PO, Nilsson T. Galanin inhibits glucose-stimulated insulin release by a mechanism involving hyperpolarization and lowering of cytoplasmic free Ca²⁺ concentration. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; 140(3): 1059-1063.
59. Amiranoff B, Lorinet AM, Lagny-Pourmir I, Laburthe M. Mechanism of galanin-inhibited insulin release. Occurrence of a pertussis-toxin-sensitive inhibition of adenylate cyclase. *Eur. J. Biochem.* 1988; 177, 147-152.
60. Ruczyński J, Cybal M, Wójcikowski C, Rekowski P. Effects of porcine galanin, galanin(1-5)NH₂ and its new analogues on glucose-induced insulin secretion. *Polish Journal of Pharmacology* 2002; 54(2): 133-141.
61. Lindskog S, Ahrén B. Galanin: effects on basal and stimulated insulin and glucagon secretion in the mouse. *Acta. Physiol. Scand.* 1987; 129: 305-309.
62. Lindskog S, Dunning BE, Mårtensson H, Ar'Rajab A, Taborsky GJ, Ahrén B. Galanin of the homologous species inhibits insulin secretion in the rat and in the pig. *Acta Physiol. Scand.* 1990; 139: 591-596.
63. Land T, Langel Ü, Löw M, Berthold M, Undén A, Bartfai T. Linear and cyclic N-terminal galanin fragments and analogs as ligands at the hypothalamic galanin receptor. *Int. J. Peptide Prot. Res.,* 1991; 38: 267-272.
64. Bedecs K, Langel U, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Bartfai T. Biological activities of two endogenously occurring N-terminally extended forms of galanin in the rat spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 1994; 259(2): 151-156.
65. Pooga M, Juréus A, Rezael K, Hasanvan H, Saar K, Kask K, Kjellén P, Land T, Halonen J, Mäeorg U, Uri A, Solyom S, Bartfai T, Langel Ü. Novel galanin receptor ligands. *J. Peptide. Res.* 1998; 51: 65-74.
66. Bartfai T, Fisone G, Langel U. Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical perspectives. *Trends Pharmacol Sci.* 1992; 13(8): 312-317.
67. Florén A, Land T, Langel U. Galanin receptor subtypes and ligand binding. *Neuropeptides.* 2000; 34(6): 331-337.
68. Lu X, Lundström L, Langel U, Bartfai T. Galanin receptor ligands. *Neuropeptides.* 2005; 39(3): 143-146.

69. Ihara M, Saeki T, Fukuroda T, Kimura S, Ozaki S, Patel AC, Yano M. A novel radioligand [125I]BQ-3020 selective for endothelin (ETB) receptors. *Life Sci.* 1992; 51(6): PL47-52.
70. Langel U, Pooga M, Kairane C, Zilmer M, Bartfai T. A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase and reverses its inhibition by ouabain. *Regul Pept.* 1996; 62(1): 47-52.
71. Ostenson CG, Zaitsev S, Berggren PO, Efendic S, Langel U, Bartfai T. Galparan: a powerful insulin-releasing chimeric peptide acting at a novel site. *Endocrinology.* 1997; 138(8): 3308-3313.
72. Consolo S, Baldi G, Nannini L, Uboldi MC, Pooga M, Langel U, Bartfai T. Galparan induces in vivo acetylcholine release in the frontal cortex. *Brain Res.* 1997; 756(1-2): 174-178.
73. Pooga M, Hällbrink M, Zorko M, Langel U. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 1998; 12(1): 67-77.
74. Mueller J, Kretzschmar I, Volkmer R, Boisguerin P. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjug Chem.* 2008; 19(12): 2363-2374.
75. El-Andaloussi S, Järver P, Johansson HJ, Langel U. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochem. J.* 2007; 407: 285-292.
76. Soomets U, Lindgren M, Gallet X, Hällbrink M, Elmquist A, Balaspiri L, Zorko M, Pooga M, Bresseur R, Langel U. Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1467(1): 165-176.
77. Morris MC, Deshayes S, Heitz F, Divita G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell.* 2008; 100(4): 201-217.
78. Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol.* 2009; 157(2): 195-206.
79. Copolovici DM, Langel K, Eriste E, Langel Ü. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano.* 2014; 8(3): 1972-1994.
80. Durzyńska J, Przysiecka Ł, Nawrot R, Barylski J, Nowicki G, Warowicka A, Musidlak O, Goździcka-Józefiak A. Viral and other cell-penetrating peptides as vectors of therapeutic agents in medicine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015; 354(1): 32-42.
81. Gallo M, Defaus S, Andreu D. 1988-2018: Thirty years of drug smuggling at the nano scale. Challenges and opportunities of cell-penetrating peptides in biomedical research. *Arch Biochem Biophys.* 2019; 661: 74-86.
82. Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, De Lima MC. Cell-Penetrating Peptides-Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010; 3(4): 961-993.
83. Stalmans S, Bracke N, Wynendaele E, Gevaert B, Peremans K, Burvenich C, Polis I, De Spiegeleer B. Cell-Penetrating Peptides Selectively Cross the Blood-Brain Barrier In Vivo. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0139652.
84. Ruczyński J, Konstański Z, Korolkiewicz R, Rekowski P. Galanin and its new analogues: synthesis and biological activity in rat gastric smooth muscles. *Peptides 2002, Proceedings of 27th European Peptide Symposium, Sorrento 2002, Włochy*, eds. Benedetti E, Padone C, Edizioni Ziino, Napoli, 596-597 (2003).
85. Ruczyński J, Konstański Z, Korolkiewicz R, Petruszewicz J, Rekowski P. Galanin and its analogues: A structure-activity relationship studies in rat isolated gastric smooth muscles. *Letters in Peptide Science* 2002; 9(2-3): 91-99.
86. Anselmi L, Salvatore S, Lakhter A, Hirano A, Tonini M, Sternini C. Galanin receptors in the rat gastrointestinal tract. *Neuropeptides* 2005; 39: 349-352.
87. Anselmi L, Lakhter A, Hirano A, Tonini M, Sternini C. Expression of galanin receptor messenger RNAs in different regions of the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2005; 26: 815-819.
88. Zeller C, Hinzmann B, Seitz S, Prokoph H, Burkhard-Goettges E, Fischer J, Jandrig B, Schwarz LE, Rosenthal A, Scherneck S. SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer. *Oncogene.* 2003; 22(19): 2972-2983.
89. Weiss-Gradzińska W, Krzempek W, Trynda-Lemiesz L. Mechanizm oporności na leki platynowe oraz strategię pokonywania tego zjawiska. *Wiadomości chemiczne* 2013; 67(11-12): 1105-1128.
90. Ho A, Schwarze SR, Mermelstein SJ, Waksman G, Dowdy SF. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2001; 61(2): 474-477.

91. Gogoi K, Mane MV, Kunte SS, Kumar VA. A versatile method for the preparation of conjugates of peptides with DNA/PNA/analog by employing chemo-selective click reaction in water. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(21): e139.
92. Leon ML, Zuckerman SH. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res.* 2005; 54(10): 395-411.
93. Nielsen PE, Egholm M. Peptide nucleic acids (PNA). In Nielsen, P.E. and Egholm, M., Ed.; *Protocols and Applications.*, Horizon Scientific, Norfolk, CT. 1999.
94. Drożak J, Bryła J. Dopamine: not just a neurotransmitter. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2005; 59: 405-420.
95. Pushpanathan M, Gunasekaran P, Rajendhran J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *Int J Pept.* 2013; 2013: 675391.
96. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med.* 2017; 90(2): 269-281.
97. Rybak MJ. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. *Clin Infect Dis.* 2006; 42 Suppl 1:S35-S39.
98. Ruczyński J, Lewandowska B, Olkowicz M, Mucha P, Skupień M, Rekowski P, Wiśniewska K, Dąbrowska-Szponar M. Antimicrobial properties of new mastoparan analogues. *Peptides 2008, Proceedings of 30th European Peptide Symposium, Helsinki 2008, Finlandia*, eds. Lankinen H, 290-291 (2009).
99. Xie J, Gou Y, Zhao Q, Li S, Zhang W, Song J, Mou L, Li J, Wang K, Zhang B, Yang W, Wang R. Antimicrobial activities and action mechanism studies of transportan 10 and its analogues against multidrug-resistant bacteria. *J Pept Sci.* 2015; 21(7): 599-607.

V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Oprócz badań dotyczących syntezy i właściwości farmakologicznych galaniny i jej analogów hybrydowych (głównie transportanu), w obszarze moich zainteresowań naukowych znajduje się tematyka związana z syntezą oraz wykorzystaniem peptydowych kwasów nukleinowych (PNA) do analizy budowy endogennych wirusów z rodziny HERV-W i do badań interakcji allelo-specyficznych PNA z dwuniciowym DNA. W efekcie przeprowadzonych badań, we współpracy naukowej z dr Grzegorzem Machnikiem z Kliniki Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, opublikowane zostały 4 prace:

1. Machnik G, Skudrzyk E, Bułdak Ł, Ruczyński J, Kozłowska A, Mucha P, Rekowski P, Szkróbka W, Basiak M, Bołdys A, Sławska H, Okopień B. Monitoring the Transcriptional Activity of Human Endogenous Retroviral HERV-W Family Using PNA Strand Invasion into Double-Stranded DNA (2018) *Mol Biotechnol*, 60(2), 124-133.
2. Machnik G, Bułdak Ł, Ruczyński J, Gąsior T, Huzarska M, Belowski D, Alenowicz M, Mucha P, Rekowski P, Okopień B. The application of strand invasion phenomenon, directed by peptide nucleic acid (PNA) and single-stranded DNA binding protein (SSB) for

the recognition of specific sequences of human endogenous retroviral HERV-W family (2017) *J Mol Recognit*, 30(5), art. no. e2600.

3. Machnik G, Skudrzyk E, Bułdak Ł, Łabuzek K, Ruczyński J, Alenowicz M, Rekowski P, Nowak PJ, Okopień B. A Novel, Highly Selective RT-QPCR Method for Quantification of MSRV Using PNA Clamping Syncytin-1 (ERVWE1). (2015) *Mol Biotechnol*, 57(9), 801-813.
4. Machnik G, Łabuzek K, Skudrzyk E, Rekowski P, Ruczyński J, Wojciechowska M, Mucha P, Giri S, Okopień B. A peptide nucleic acid (PNA)-mediated polymerase chain reaction clamping allows the selective inhibition of the ERVWE1 gene amplification. (2014) *Mol Cell Probes*, 28(5-6), 237-241.

Moja aktywność naukowa związana jest również z tematyką badań, realizowaną w Pracowni Chemii Związków Biologicznie Czynnych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, która dotyczy wykorzystania 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, tzw. „reakcji klik”, do otrzymywania niebiałkowych aminokwasów opartych na strukturze pierścienia 1,2,3-triazolowego, tzw. aminokwasów triazolowych – TzIAA. Ze względu na podobieństwo strukturalne pierścienia 1,2,3-triazolowego do wiązania peptydowego, istnieje duże zainteresowanie wykorzystaniem TzIAA do otrzymywania struktur naśladujących peptydy. Szczególnie interesujące wydaje się opracowanie metody otrzymywania 1,4,5-trójpodstawionych TzIAA, zawierających w swojej strukturze grupę aminową i grupę karboksylową, które umożliwiają ich łączenie lub wbudowywanie w struktury peptydów za pomocą standardowego protokołu stosowanego w syntezie peptydów. Ponadto, dzięki obecności w strukturze tych pochodnych dodatkowego reaktywnego miejsca możliwe jest przyłączenie do nich różnego rodzaju cząsteczek, np. zasad nukleinowych. Dotychczasowe wyniki badań związanych z tą tematyką zostały opublikowane w pracy:

1. Mucha P, Pieszko M, Miszka A, Ruczyński J, Rekowski P, Załuska I, Kozłowska A, Schumacher A, Deptuła M, Pikuła M. Ru(II)-mediated synthesis and bioactivity evaluation of 1,4,5-trisubstituted N-phthalimido protected 5-bromo-1,2,3-triazolic amino acid. (2018) *Letters in Organic Chemistry*, 15 (4), 282-289.

W obszarze mojej aktywności naukowej znajdowała się również tematyka związana z wykorzystaniem „reakcji klik” do otrzymania koniugatu systeminy z 3'-azydo-2',3'-dideoksytymidyną (AZT – inhibitor odwrotnej transkryptazy, lek przeciwwirusowy).

Systemina (Sys) jest 18-aminokwasowym roślinnym hormonem peptydowym, wyizolowanym z liści pomidora, posiadającym zdolność translokacji poprzez tkanki roślinne i transportowania różnego rodzaju związków biologicznie czynnych do odległych części roślin. Celem badań (prowadzonych w Pracowni Chemii Związków Biologicznie Czynnych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego) była synteza kowalencyjnego koniugatu systeminy z AZT, z wykorzystaniem „reakcji klik” oraz analiza za pomocą elektroforezy kapilarnej (CE) procesu rozprzestrzeniania się tego koniugatu w tkankach roślinnych. Wyniki badań zostały opublikowane w dwóch pracach:

1. Dobkowski M, Szychowska A, Pieszko M, Miszka A, Wojciechowska M, Alenowicz M, Ruczyński J, Rekowski P, Celewicz L, Barciszewski J, Mucha P. 'Click' chemistry synthesis and capillary electrophoresis study of 1,4-linked 1,2,3-triazole AZT-systemin conjugate. (2014) *J Pept Sci*, 20(9), 696-703.
2. Mucha P, Ruczyński J, Dobkowski M, Backtrog E, Rekowski P. Capillary electrophoresis study of systemin peptides spreading in tomato plant. (2019) *Electrophoresis*, 40, 336–342.

Kolejnym obszarem mojej aktywności naukowej były badania dotyczące roli tlenu azotu w patogenezie pooperacyjnej niedrożności jelit (PI). PI jest stanem charakteryzującym się czasowym porażeniem perystaltyki jelit po zabiegach chirurgicznych, zwłaszcza tych wymagających otwartej interwencji chirurgicznej, co prowadzi do wydłużenia czasu i wyższych kosztów hospitalizacji. Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły istotną rolę tlenu azotu w patogenezie PI. W efekcie przeprowadzonych badań (współpraca z dr hab. Romanem Korolkiewiczem z Katedry Farmakologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) opublikowane zostały dwie prace:

1. Korolkiewicz RP, Ujda M, Dąbkowski J, Ruczyński J, Rekowski P, Petruszewicz J. Differential salutary effects of nonselective and selective COX-2 inhibitors in postoperative ileus in rats. (2003) *J Surg Res*, 109(2), 161-169.
2. Korolkiewicz RP, Sein-Anand J, Ruczyński J, Rekowski P, Bieniaszewski L, Chodorowski Z, Petruszewicz J, Ujda M, Dąbkowski J, Bitel M, Kato S, Takeuchi K. The role and interactions of nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO), and prostanoids in the pathogenesis of postoperative ileus in rats. (2004) *J Gastrointest Surg*, 8(3), 346-357.

VI. PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ NAUKOWYCH

W najbliższej przyszłości zamierzam przede wszystkim kontynuować badania naukowe związane z syntezą oraz właściwościami farmakologicznymi koniugatów TP10 (lub innych CPP, np. Tat) z różnymi biologicznie czynnymi związkami. Dotychczas stosowana przeze mnie metoda syntezy koniugatów z wykorzystaniem „reakcji klik” umożliwia zaadoptowanie otrzymanych już azydkowych pochodnych, np. DA lub Van, do otrzymywania ich koniugatów z innymi CPP.

Ostatnie badania na zwierzęcych modelach choroby Parkinsona (PD), a także *postmortem* ludzkich mózgach pacjentów z PD sugerują, że zwiększony stres oksydacyjny w neuronach dopaminergicznych znacznie przyczynia się do rozwoju patogenezy PD. Kluczowym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego jest aktywacja kinazy tyrozynowej c-Abl. Wykazano, że fosforylacja c-Abl jest silnie wzmożona w próbkach mózgow z PD i może prowadzić do utraty neuronów dopaminergicznych. Badania te dają silne podstawy do zastosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej c-Abl jako potencjalnych środków terapeutycznych w leczeniu PD. Ostatnie badania pokazały, że inhibitory kinazy tyrozynowej c-Abl, takie jak imatinib lub nilotinib, powszechnie stosowane w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej (CML), mogą chronić przed utratą neuronów dopaminergicznych. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, synteza koniugatów TP10 z imatinibem może prowadzić do opracowania nowej strategii w łagodzeniu objawów choroby Parkinsona. Spodziewam się, że koniugaty TP10 z imatinibem będą mogły efektywnie pokonywać barierę krew-mózg oraz wykazywać aktywność przeciwparkinsonowską.

W trakcie realizacji w/w zadań zamierzam kontynuować współpracę naukową z naukowcami Katedry Farmakologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, dotyczącą badań farmakologicznych CPP, a także ich koniugatów z innymi biologicznie czynnymi związkami. Planowane są również badania związane z porównaniem (na modelu mysim) zdolności penetracji bariery krew-mózg przez różne CPP (m.in. TP, TP10, Tat, PTD-4) oraz cytotoksyczności wybranych CPP.

Ponadto zamierzam kontynuować współpracę naukową z dr Grzegorzem Machnikiem z Kliniki Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, której celem jest wykorzystanie PNA (jak również ich koniugatów z CPP) do analizy sekwencji endogennych retrowirusów oraz regulacji genów (na poziomie ekspresji) niezbędnych do aktywacji białek endogennych retrowirusów.

