

Imię i nazwisko autora rozprawy: Marcin Tomasz Kawczyński
Dyscyplina naukowa: Chemia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: „Synteza koniugatów inhibitorów enzymatycznych o strukturze aminokwasowej z peptydami penetrującymi jako potencjalnych związków przeciwgrzybowych.”

Tytuł rozprawy w języku angielskim: “Synthesis of the conjugates of amino acid’s structure enzymatic inhibitors with cell-penetrating peptides as a potential antifungal agents.”

Promotor

prof. dr hab. inż. Maria J. Milewska

„Wyobraźnia bez wiedzy może stworzyć rzeczy piękne. Wiedza bez wyobraźni najwyżej doskonale.”

Albert Einstein

Najszczerze i najserdeczniejsze podziękowania:

*Za pomoc, rady, cierpliwość i wyrozumiałość
mojej promotorce prof. dr hab. inż. Marii Milewskiej.*

*Za życzliwość i wsparcie merytoryczne
prof. dr hab. Zbigniewowi Maćkiewiczowi.*

*Za cenne uwagi i poświęcony czas
prof. dr hab. inż. Sławomirowi Milewskiemu.*

*Za wiele praktycznych rad i pomoc
prof. dr hab. inż. Ryszardowi Andruszkiewiczowi.*

*Joannie Kreczko, która uczyła mnie
stawiać pierwsze kroki w syntezie peptydów
i wspierała przez cały czas.*

*Za wykonanie badań biologicznych
Marcie Schielmann i Dorocie Koperkiewicz.*

*Za pomoc przy oczyszczaniu związków
dr inż. Katarzynie Tylingo-Kozłowskiej.*

*Wszystkim pracownikom i doktorantom Wydziału,
z którymi miałem przyjemność pracować -
za ciepłe przyjęcie na PG, życzliwą atmosferę i wszelką pomoc
z całego serca dziękuję.*

*Pracę dedykuję
rodzicom, rodzeństwu i żonie,
bez wsparcia których,
z pewnością nigdy by nie powstała.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	7
STRESZCZENIE	9
I CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	11
1. WSTĘP	11
2. RÓŻNICE W BUDOWIE KOMÓREK GRZYBÓW I SSAKÓW JAKO POTENCJALNE MIEJSCE DZIAŁANIA CHEMOTERAPEUTYKÓW	13
2.1. CELE MOLEKULARNE DLA PRZYKŁADOWYCH ZWIĄZKÓW O DZIAŁANIU PRZECIWGRZYBOWYM	13
3. SYNTAZA GLUKOZAMINO-6-FOSFORANU – POTENCJALNY CEL MOLEKULARNY DLA CHEMOTERAPII PRZECIWGRZYBOWEJ	16
3.1. INHIBITORY SYNTAZY GLUKOZAMINO-6-FOSFORANU JAKO POTENCJALNE CHEMOTERAPEUTYKI	20
4. NANONOŚNIKI UŁATWIAJĄCE PRZENIKANIE PRZEZ BŁONY BIOLOGICZNE	23
4.1. TYPY NOŚNIKÓW CZĄSTECZEK BIOLOGICZNIE CZYNNYCH.....	23
4.2. PEPTYDY PENETRUJĄCE	27
4.3. RODZINY PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH	28
4.4. MECHANIZMY PRZENIKANIA PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH PRZEZ BŁONY BIOLOGICZNE.....	37
4.5. KONIUGATY CPP Z SUBSTANCJAMI BIOLOGICZNIE CZYNNYMI JAKO POTENCJALNE PROLEKI	46
II CEL I ZAKRES PRACY	49
III OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja	50
1. SYNTEZA PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH I ICH KONIUGATÓW Z INHIBITORAMI	53
1.1. SYNTEZA NA NOŚNIKU STAŁYM (SPPS) PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH I ICH KONIUGATÓW Z INHIBITOREM NA N-KOŃCU SEKWENCJI.....	53
1.2. PRÓBY SYNTEZY KONIUGATÓW NOŚNIKÓW Z INHIBITORAMI NA C-KOŃCU SEKWENCJI METODĄ SPPS	56
1.3. SYNTEZA W ROZTWORZE KONIUGATÓW NOŚNIKÓW Z INHIBITORAMI NA C- KOŃCU SEKWENCJI.....	57

1.4.	OCZYSZCZANIE OTRZYMANYCH PEPTYDÓW I KONIUGATÓW	64
1.5.	ANALIZA OTRZYMANYCH ZWIĄZKÓW.....	66
1.6.	OTRZYMYWANIE KONIUGATÓW JONOWYCH	67
1.7.	SYNTEZA CHRONIONYCH POCHODNYCH KWASU <i>N</i> ³ -(4-METOKSYFUMAROILO)-L-2,3-DIAMINOPROPANOWEGO	68
1.8.	SYNTEZA KONIUGATÓW CPP POŁĄCZONYCH Z FMDP POPRZEZ GRUPĘ ε- AMINOWĄ N-KOŃCOWEJ RESZTY LIZYNY.....	70
2.	OKREŚLENIE WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNYCH OTRZYMANYCH PEPTYDÓW I ICH KONIUGATÓW	72
2.1.	HEMOLIZA LUDZKICH ERYTROCYTÓW	76
IV PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....		78
V CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA		81
1.	SYNTEZA PEPTYDÓW NA FAZIE STAŁEJ	82
1.1.	SYNTEZA PEPTYDÓW NA FAZIE STAŁEJ PRZY UŻYCIU ŻYWICY CHLORO-2'-CHLOROTRYTYLOWEJ	82
1.2.	PRZYŁĄCZANIE DO PEPTYDÓW INNYCH ZWIĄZKÓW NIŻ STANDARDOWE AMINOKWASY.....	85
1.3.	ODŁĄCZENIE PEPTYDU Z ŻYWICY CHLORO-2'-CHLOROTRYTYLOWEJ Z RETENCJĄ OSŁON GRUP BOCZNYCH RESZT AMINOKWASOWYCH.....	88
2.	SYNTEZA PEPTYDÓW ORAZ KONIUGATÓW Z FMDP NA C-KOŃCU METODĄ ESTRÓW AKTYWNYCH.....	89
2.1.	<i>N</i> - <i>TERT</i> -BUTOKSYKARBONYLOAMINOKWASY.....	89
2.2.	ZMYDLANIE PEPTYDU (REAKCJA HYDROLIZY ESTRÓW METYLOWYCH PEPTYDÓW) – PRZEPIS OGÓLNY	90
2.3.	OTRZYMYWANIE PEPTYDÓW METODĄ MIESZANYCH BEZWODNIKÓW – BOC- AA-AA-OMe – PRZEPIS OGÓLNY	90
2.4.	ESTER PEPTYDYLO- <i>N</i> -HYDROKSYSUKCYNIMIDYLOWY – PRZEPIS OGÓLNY	92
2.5.	OTRZYMYWANIE PEPTYDÓW METODĄ ESTRÓW AKTYWNYCH – BOC-AA- AA-OMe – PRZEPIS OGÓLNY	92
2.6.	PEPTYD Z WOLNĄ GRUPĄ A-AMINOWĄ (USUWANIE OSŁONY TYPU BOC) – PRZEPIS OGÓLNY.....	94

3.	SYNTEZA POCHODNYCH KWASU N^3 -(4-METOKSYFUMAROILO)- N^2 - <i>TERT</i> - BUTOKSYKARBONYLO-L-2,3-DIAMINOPROPANOWEGO (FMDP)	95
3.1.	WODOROMALEINIAN METYLU	95
3.2.	WODOROFUMARAN METYLU	96
3.3.	FUMARAN <i>N</i> -HYDROKSYSUKCYNIMIDYLOWOMETYLOWY	96
3.4.	<i>N-TERT</i> -BUTOKSYKARBONYLO-L-ASPARAGINA (BOC-ASN).....	96
3.5.	KWAS N^2 - <i>TERT</i> -BUTOKSYKARBONYLO-L-2,3-DIAMINOPROPANOWY (BOC- A_2 PR).....	96
3.6.	KWAS N^2 - <i>TERT</i> -BUTOKSYKARBONYLO- N^3 -(4-METOKSYFUMAROILO)-L-2,3- DIAMINOPROPANOWY (BOC-FMDP)	96
3.7.	KWAS N^2 -(9-FLUORENYLOMETOKSYKARBONYLO- N^3 -(4- METOKSYFUMAROILO)-L-2,3-DIAMINOPROPANOWY (FMOC-FMDP)	96
4.	KWAS (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)- <i>N-TERT</i> -BUTOKSYKARBONYLO-2-AMINOCYKLOPENTANOWY (BOC- <i>CIS</i> -PENTACYNA)	97
5.	SYNTEZA N^5 -[N^2 - <i>TERT</i> -BUTOKSYKARBONYLO- N^3 -(4- METOKSYFUMAROILO)-L-2,3-DIAMINOPROPANOILO]- N^2 - <i>TERT</i> - BUTOKSYKARBONYLO-LIZYNY [BOC-LYS(BOC-FMDP)]	98
5.1.	N^2 - <i>TERT</i> -BUTOKSYKARBONYLO- N^3 -(4-METOKSYFUMAROILO)-L-2,3- DIAMINOPROPANIAN <i>N</i> -HYDROKSYSUKCYNIMIDYLU (BOC-FMDP-NSu) 98	
5.2.	N^5 -[N^2 - <i>TERT</i> -BUTOKSYKARBONYLO- N^3 -(4-METOKSYFUMAROILO)-L-2,3- DIAMINOPROPANOILO]- N^2 - <i>TERT</i> -BUTOKSYKARBONYLO-L-LIZYNA [BOC- LYS(BOC-FMDP)]	98
6.	SYNTEZA 6-FOSFORANU D-AMINOGLUKITOLU	98
7.	SYNTEZA KONIUGATÓW JONOWYCH ARG ₈ Z INHIBITORAMI.....	99
	SUMMARY	100
	BIBLIOGRAFIA.....	102
	DOROBEK.....	118

Wykaz stosowanych skrótów

Użyte w pracy skróty, symbole i oznaczenia są zgodne z postanowieniami Połączonej Komisji Nomenklatury Chemicznej i Biochemicznej IUPAC-IUB zawartymi w *Eur. J. Biochem.*, **1984**, *139*, 9-37 oraz w Abbreviations and symbols in peptide science: a revised guide and commentary *J. Peptide Sci.* **2006**, *12*, 1-12.

W pozostałych przypadkach zastosowane zostały skróty powszechnie stosowane w chemii aminokwasów, peptydów i białek.

- A₂pr kwas 2,3-diaminopropanowy
- Ac grupa acetylowa
- ACN acetonitryl
- ATP adenozyno-5'-trifosforan
- BADP *E-N*³-(4-okso-4-fenilo-2-butenilo)-L-2,3-diaminopropanowy
- BIP Peptydowe inhibitory Bax (*ang.* Bax-Inhibiting Peptides)
- Boc grupa *tert*-butyloksykarbonylowa
- CPP peptydy penetrujące (*ang.* Cell-Penetrating Peptides)
- DCC *N,N*-dicykloheksylokarbodiimid
- DCM chlorek metylenu
- DIC *N,N*-diizopropylkarbodiimid
- DIPEA diizopropylloetyloamina
- DMF *N,N*-dimetyloformamid
- DNA kwas deoksyrybonukleinowy
- FAM 5(6)-karboksyfluoresceina
- FCDP kwas *N*³-fumaroilo-L-2,3-diaminopropanowy
- FdUMP 5-fluorodeoksyurydino-5'-monofosforan
- FITC izotiocyjanianofluoresceina
- FMDP kwas *N*³-(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowy
- Fmoc grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
- GFP białko zielonej fluorescencji (*ang.* Green fluorescent protein)
- GlcN-6-P D-glukozamino-6-fosforan
- GlcN-ol-6P 2-amino-2-deoksy-D-glukitol-6-fosforan

- HIV wirus zespołu nabytego braku odporności
- HOBt *N*-hydroksybenzotriazol
- HPLC wysokosprawna chromatografia cieczowa
- K-FGF czynnik wzrostu fibroblastów Kaposi'ego
- MeOH metanol
- MALDI desorpcja laserowa z udziałem matrycy (*ang.* Matrix-assisted laser desorption/ionization)
- Mca grupa 4-acetylo-7-metoksykumarynowa
- MIC minimalne stężenie inhibicji (*ang.* minimal inhibitory concentration)
- MTS sekwencja translokacji błonowej (*ang.* Membrane translocating sequences)
- NSu grupa *N*-hydroksysukcynimidylowa
- Pbf grupa 2,2,4,6,7-pentametylodihydrobenzofuranosulfonowa
- PTD peptydowa domena transdukcji (*ang.* Peptide transduction domain)
- RNA kwas rybonukleinowy
- SPSP synteza peptydów na nośniku stałym (*ang.* Solid phase peptide synthesis)
- Tat transaktywator transkrypcji (*ang.* Trans-activator of transcription)
- TDBTU tetrafluoroboran *O*-(3,4-dihydro-4-okso-1,2,3-benzotriazolo-3-ilo)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy
- TFA kwas trifluoroctowy
- TFE trifluoroetanol
- TIS triizopropylosilan
- TOF analizator czasu przelotu (*ang.* Time of flight)
- UDP urydyno-5'-difosforan

Streszczenie

Grzybice układowe w ostatnich dekadach zaczęły stanowić poważny problem ze względu na dużą śmiertelność chorych, ograniczoną liczbę skutecznych i bezpiecznych leków oraz lekooporność patogennych grzybów. Wielu naukowców poszukuje obecnie nowych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych.

Badania w tym kierunku prowadzone są od lat na Politechnice Gdańskiej. Głównym tematem zainteresowania jest grzybowy enzym syntaza glukozamino-6-fosforanu, który katalizuje jedną z istotnych reakcji w syntezie ściany komórkowej. Selektywnym i silnym inhibitorem tego enzymu, odkrytym w trakcie tych badań, jest kwas N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowy (FMDP). Niestety, aktywność przeciwgrzybowa FMDP jest niska z powodu problemów z przenikaniem do wnętrza komórek grzyba, co wynika ze znacznej polarności cząsteczki oraz słabego powinowactwa do permeaz aminokwasowych.

Prowadzone przeze mnie badania miały na celu otrzymanie koniugatów FMDP (i innych inhibitorów), które rozwiązałyby problem przenikalności, a jednocześnie utrzymały właściwości inhibicyjne FMDP. Koniugaty te poza inhibitorem zawierały wyselekcjonowane peptydy penetrujące (CPP), które są w stanie transportować związane z nimi kowalencyjnie lub jonowo inne związki.

W wyniku prowadzonych prac otrzymałem dwadzieścia jeden peptydów o potencjalnych właściwościach penetrujących, z których sześć jest nowych, nieopisanych w literaturze. Ponadto trzydzieści pięć ich koniugatów w różnych połączeniach, głównie z FMDP, ale też z innymi inhibitorami, takimi jak kwas *E-N*-(4-okso-4-fenilo-2-butenoiło)-L-2,3-diaminopropanowy (BADP, związek działający na podobnej zasadzie co FMDP) i *cis*-pentacyna mająca udowodnione działanie przeciwgrzybowe. Ponadto otrzymałem siedem połączeń peptydów penetrujących ze znacznikami fluorescencyjnymi.

W zależności od miejsca przyłączenia inhibitorów do sekwencji peptydowej stosowałem różne strategie syntetyczne. Koniugaty z inhibitorem dołączonym do N-końca sekwencji otrzymywałem wykorzystując syntezę na fazie stałej (SPPS). Natomiast koniugaty z C-końcowym inhibitorem syntetyzowałem albo metodą klasyczną, albo mieszaną, tzn. peptyd tworzyłem na fazie stałej, następnie usuwałem go

ze złoża z retencją wszystkich grup ochronnych i w końcu przyłączałem FMDP klasycznymi metodami wykorzystując aktywację poprzez estry aktywne. Jeżeli FMDP było przyłączone do grupy aminowej w łańcuchu bocznym, wtedy niezbędna była synteza odpowiednio chronionej pochodnej typu N^{ϵ} -FMDP-Lys, którą traktowałem jak każdy inny aminokwas. Wszystkie niezbędne substraty pochodne inhibitorów otrzymałem we własnym zakresie opierając się na/lub adaptując metody opisane w literaturze.

Wszystkie otrzymane związki, zarówno peptydy penetrujące, jak i ich koniugaty z inhibitorami enzymatycznymi zostały poddane badaniom biologicznym. Wyniki w/w badań wykazują, że większość otrzymanych związków jest aktywnych względem szczepów *Candida albicans* w podłożu minimalnym, zaś kilka z nich prezentuje aktywność przeciwgrzybową w podłożu RPMI-1640. Przy czym przebadane peptydy penetrujące takich właściwości nie posiadają. Świadczy to o zwiększeniu aktywności biologicznej przyłączonego do nich inhibitora. Dodatkowo okazało się, że większość z otrzymanych koniugatów nie wykazuje znacznych właściwości hemolitycznych. Nieoczekiwanie koniugaty nie wykorzystywały potencjału do przenikania błon, a prawdopodobnie przedostawały się do wnętrza komórek dzięki grzybowym permeazom oligopeptydowym. Jednakże koniugaty FMDP z oligokationowymi CPP są pierwszymi pochodnymi peptydów penetrujących o właściwościach przeciwgrzybowych, co uzasadnia podstawowe założenia niniejszej pracy.

I Część teoretyczna

1. Wstęp

Wiek XX obfitował w wiele nowych osiągnięć na polu medycyny, m. in. zostały odkryte antybiotyki, które znalazły zastosowanie jako chemoterapeutyki. Ograniczyło to w znacznym stopniu liczbę zakażeń bakteryjnych i śmiertelność z tym związaną. Niestety w ostatnich kilku dekadach zaobserwowano wzrost zakażeń spowodowanych przez różnego rodzaju grzyby. Wiele czynników miało na to wpływ, jednak jednym z najistotniejszych jest lekkomyślne, powszechne stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania. Wprowadzanie antybiotyków w tak dużej skali prowadzi do wyjaławiania organizmu, zaburzenia równowagi ustroju i skutkuje większą podatnością na infekcje wywołane, zarówno przez grzyby endogenne, jak i saprofity. Duże rozpowszechnienie antybiotyków sprawia również, że częściej pojawiają się tzw. szczepy lekooporne [1].

Szczególnie podatne na infekcje grzybicze są osoby z zaburzeniami odporności typu komórkowego, zarówno wrodzonego, jak i nabytego (AIDS) [2]. Również zagrożeni są pacjenci leczeni chemoterapeutykami przeciwnowotworowymi, sterydami, immunosupresantami, a także osoby po przeszczepie szpiku kostnego [3–6]. Śmiertelność w konsekwencji grzybic układowych wśród chorych na białaczkę, bądź po przeszczepie szpiku kostnego sięga nawet 80% [7].

W użyciu jest niewiele medykamentów skutecznych w leczeniu zakażeń grzybowych. Od dawna, powszechnie stosowana jest Amfoterycyna B należąca do makrolidów polienowych, charakteryzująca się szerokim spektrum działania. Wykazuje ona jednak znaczną neurotoksyczność [8]. Innym lekiem jest Flukonazol z grupy azoli, jednak jest on skuteczny przeciwko wąskiej grupie grzybów (głównie z rodzaju *Candida* i niektórych grzybów o budowie zbliżonej do drożdży) [9]. Stosunkowo mało toksyczna 5-fluorocytozyna jest stosowana wyłącznie w kombinacji z Amfoterycyną B [10]. Ponadto jej spektrum działania jest dość wąskie, a długotrwałe stosowanie powoduje oporność u wcześniej wrażliwych szczepów [11].

Niedawno wprowadzono kilka nowych leków azolowych, np. Vorykonazol, który jest pochodną Flukonazolu. Jego działanie polega na inhibicji syntezy ergosterolu w komórce grzyba [12]. Wykazuje działanie wobec szczepów, które są odporne na

Flukonazol, a także *Asparagillus terrus*, który jest oporny na Amfoterycynę B. Ponadto rzadziej niż w wypadku Amfoterycyny występują efekty uboczne [13]. Jednak z racji tego, że metabolizowany jest przez cytochrom P440 wchodzi w interakcje z innymi lekami.

Na początku XXI wieku wprowadzono kilka leków należących do grupy echinokandyn (syntetycznych pochodnych lipopeptydów z grzybów) [14]. Są to m.in.: kaspofungina, mikafungina oraz anidulafungina. Mają dość szerokie działanie: statyczne wobec drożdżaków z rodzaju *Candida* (w tym na szczepów opornych na „azole”) i bójcze wobec grzybów pleśniowych *Aspergillus*, zarazem nie powodują poważniejszych efektów ubocznych i nie wykazują znacznych interakcji z innymi lekami [13]. Niemniej już pojawiły się doniesienia o szczepach opornych na echinokandyny [15].

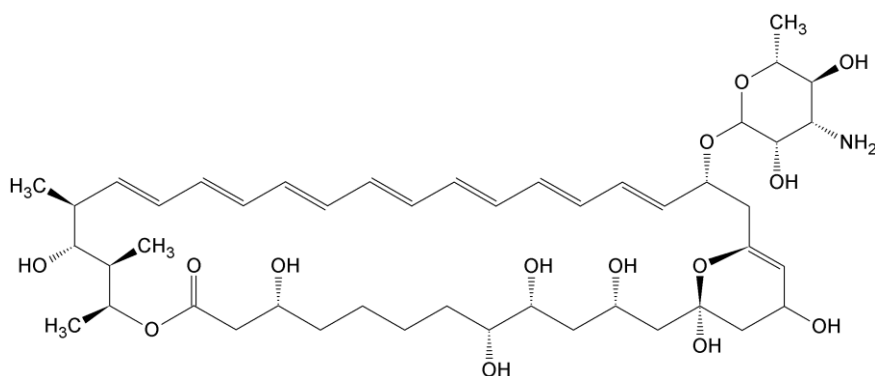
Powyższy krótki przegląd leków stosowanych w chemoterapii grzybic układowych wskazuje, że żaden z nich nie jest pozbawiony wad. W związku z tym nadal ważnym celem jest poszukiwanie nowych związków, które mogłyby stać się lekami o większej aktywności, szerszym spektrum działania, nie wywołującymi oporności i o mniejszej toksyczności wobec pacjenta.

2. Różnice w budowie komórek grzybów i ssaków jako potencjalne miejsce działania chemoterapeutyków

Grzyby, w przeciwieństwie do bakterii, należą do domeny *Eukaryota*, w związku z tym ich komórki, podobnie jak zwierzęce, posiadają jądro komórkowe. Jednak od komórek zwierzęcych odróżnia je kilka cech budowy oraz ścieżek metabolicznych. Jedną z najistotniejszych różnic jest obecność ściany komórkowej u grzybów. Ten właśnie element, jak również szlaki metaboliczne biosyntezy jej składników, są potencjalnymi, selektywnymi celami dla chemoterapeutyków, ponieważ selektywne inhibitory biosyntezy ściany komórkowej nie powinny, przynajmniej teoretycznie, mieć wpływu na komórki zwierzęce lub ludzkie [16].

2.1. Cele molekularne dla przykładowych związków o działaniu przeciwgrzybowym

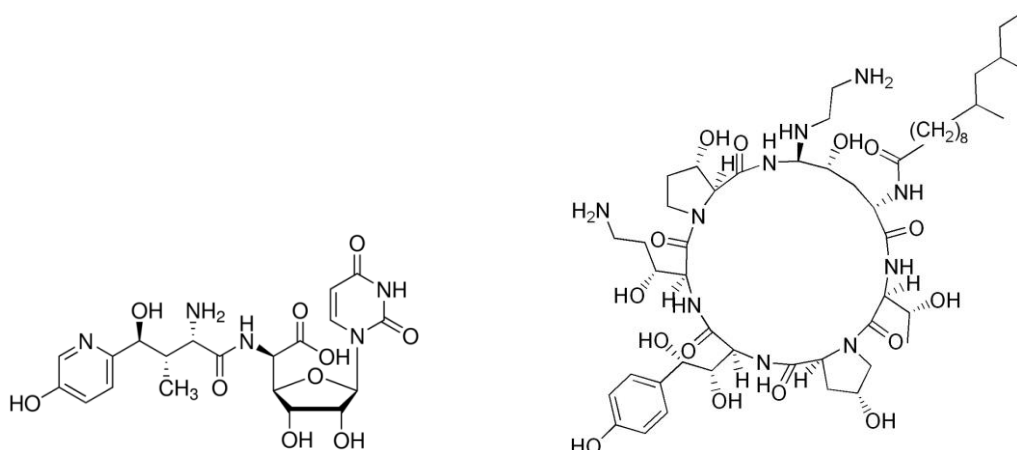
Amfoterycyna B, należąca do antybiotyków polienowych, nie wpływa na biosyntezę ściany komórkowej, jednak jej budowa (sprężone wiązania nienasycone) pozwala na tworzenie kompleksów ze sterolami występującymi w błonie komórkowej, przy czym wykazuje ona większe powinowactwo do ergosterolu obecnego w błonie komórek grzyba niż do cholesterolu, występującego w komórce ssaków. W efekcie następuje zaburzenie gospodarki elektrolitami, m. in. przenikanie na zewnątrz jonów K^+ , co powoduje zahamowanie rozwoju komórki grzyba [17].



Rys. 1. Struktura Amfoterycyny B

W komórkach grzybów występuje enzym deaminaza cytozynowa, nieobecny w komórkach ssaków. Enzym ten przekształca 5-fluorocytozynę w 5-fluorouracyl, który wbudowywany jest do RNA, co prowadzi do błędów w translacji. Drugi szlak prowadzi do przekształcenia fluorouracylu do 5-fluorodeoksyurydno-5'-monofosforanu (FdUMP) będącego inhibitorem syntazy tymidylanowej [18,19].

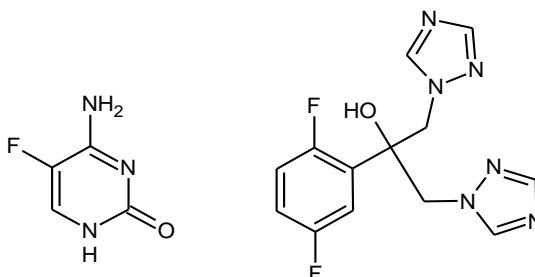
Istnieje kilka enzymów, których inhibicja może doprowadzić do zaburzenia biosyntezy ściany komórkowej grzyba. Jest to m. in. syntaza chitynowa, która katalizuje ostatnią reakcję biosyntezy chityny. Nikkomycyny i polioksyny (peptydonukleotydy) są selektywnymi inhibitorami tego enzymu [20], jednak w przypadku nikkomycyny stwierdzono znaczną toksyczność wobec komórek zwierzęcych [21].



Rys. 2. Struktura nikkomycyny Z (z lewej) i kaspofunginy (z prawej)

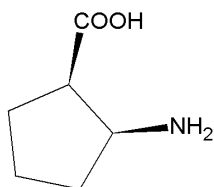
Innym enzymem stanowiącym dogodny cel dla chemoterapeutyków jest syntaza β -(1,3)-glukanowa odpowiedzialna za syntezę β -glukanu, który jest niezbędnym składnikiem ściany komórkowej wielu gatunków grzybów. Selektywnymi inhibitorami tego enzymu są m.in. echinokandyny (kaspofungina, mikafungina, anidulafungina) [22].

Azole (np. Flukonazol) hamują działanie demetylazy α -14 lanosterolu biorącej udział w syntezie ergosterolu – sterolu będącego składnikiem błony komórkowej grzybów. W efekcie w komórce odkłada się 24-metylenodihydrolanosterol, co prowadzi do destabilizacji błony komórkowej. Nie stanowi to problemu dla komórek ssaków, ponieważ te związki są skutecznie zastępowane przez cholesterol [13].



Rys. 3. Struktura 5-fluorocytozyny (z lewej) i flukonazolu (z prawej)

Kolejnym potencjalnym chemoterapeutycznym przeciwgrzybowym jest *cis*-pentacyna (kwas (1*R*,2*S*)-2-aminocyklopentanowy). Został on wyizolowany z bakterii *Bacillus cereus* [23]. W badaniach *in vitro* związek ten wykazywał słabą aktywność przeciwko grzybom z rodzaju *Candida* oraz jeszcze mniejszą, bądź praktycznie żadną, przeciwko innym mikroorganizmom. Jednakże w badaniach *in vivo* na myszach *cis*-pentacyna wykazała znaczącą aktywność przeciw grzybicom układowym. Porównano aktywność tego związku do Amfoterycyny B i Ketokonazolu. Amfoterycyna B, co prawda ma mniejszą dawkę terapeutyczną, jednakże *cis*-pentacyna nie wykazywała praktycznie żadnej toksyczności względem myszy, nawet przy dożylniej dawce 1 g/kg masy ciała [24].



Rys. 4. Struktura *cis*-pentacyny

Cis-pentacyna wnika do wnętrza komórek poprzez permeazy, przede wszystkim przez permeazy prolinowe (wyższe stężenia aminokwasów biogennych mogą powodować inhibicję tej formy transportu). Badania wykazują, że *cis*-pentacyna nie jest wbudowywana przez komórkę do białek, ani nie oddziałuje z tRNA. Stwierdzono natomiast oddziaływanie z syntazą prolylo-tRNA, co w efekcie zaburza biosyntezę białek. Antybiotyk ten przenika do komórki w dużych stężeniach i jest prawdopodobne, że zaburza też jej inne funkcje [25].

3. Syntaza glukoamino-6-fosforanu – potencjalny cel molekularny dla chemoterapii przeciwgrzybowej

Syntaza glukoamino-6-fosforanu (GlcN-6-P) jest enzymem, który katalizuje pierwszy etap syntezy heksozamin [26]. Produktem tej nieodwracalnej reakcji jest D-glukoamino-6-fosforan, który w kolejnych reakcjach szlaku przekształcany jest w UDP-GlcNAc (urydyno-5'-difosforan-*N*-acetyloglukozaminy). Związek ten jest prekursorem peptydoglikanów i lipopolisacharydów (bakterie), chityny (grzyby) oraz glikolipidów i glikoprotein u zwierząt [27]. O ile zaburzenie funkcjonowania enzymu syntazy GlcN-6-P jest dla grzybów i bakterii w konsekwencji zabójcze [28], to krótkotrwała inhibicja enzymu nie powoduje efektu toksycznego dla organizmów ssaczych [16]. Ta różnica w konsekwencjach zahamowania aktywności enzymu może stanowić podstawę selektywnej toksyczności inhibitorów syntazy GlcN-6-P.

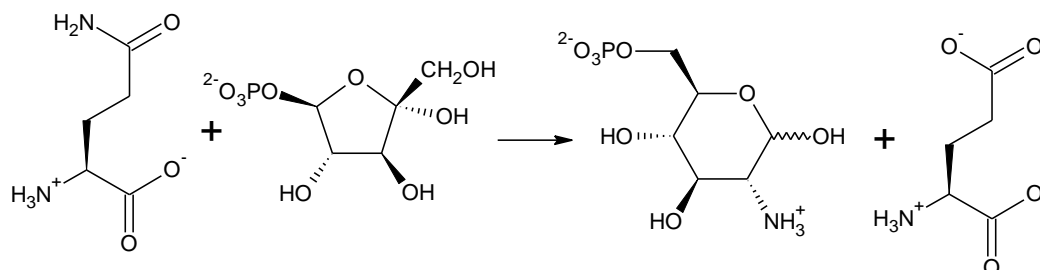
Syntaza GlcN-6-P zależnie od pochodzenia może różnić się strukturą. W przypadku bakterii składa się z dwóch identycznych podjednostek i ma masę 130-150 kDa, zaś w przypadku *Eukaryota* podjednostki tworzą tetramer, a enzym ma masę około 320-340 kDa. Różnica wielkości podjednostek enzymu prokariotycznego i eukariotycznego to około 70-90 reszt aminokwasowych. Punkt izoelektryczny syntazy GlcN-6-P jest dość niski i waha się od 4,1 do 5. Niezależnie od pochodzenia na N-końcu sekwencji łańcucha polipeptydowego białka znajdują się reszty zaangażowane w wiązanie L-glutaminy, w tym reszta Cys1, zaś na C-końcu – reszty wiążące D-fruktozo-6-fosforan, w tym reszta lizyny zlokalizowana zwykle jako czwarta od końca. Sekwencje te są konserwatywne w przeciwieństwie do fragmentu, który występuje tylko u *Eukaryota* [29].

Syntaza GlcN-6-P należy do tzw. amidotransferaz glutamino-zależnych. W strukturze enzymów należących do tej rodziny występują dwie domeny: domena syntazowa oraz domena hydrolizująca L-glutaminę. Ta druga domena występuje w dwóch typach, które dzielą rodzinę na dwie klasy: I (*Triad*) i II (*Ntn*). Główną różnicą jest umiejscowienie katalitycznej reszty cysteiny i sposób jej aktywowania. W przypadku klasy I reszta cysteiny umiejscowiona jest w centralnym regionie (w pozycji od 80 do 90) i stanowi część triady Cys-His-Glu, a nukleofilowość jest wzmacniana podobnie jak w przypadku proteinaz cysteiny [30]. Klasa II (do której należy syntaza GlcN-6-P) ma umiejscowioną cysteinę na N-końcu sekwencji i nie

towarzyszą jej żadne reszty aminokwasowe, które wzmacniałyby jej nukleofilowy charakter. Następuje to przez autoaktywację z udziałem nieprotonowanej grupy α -aminowej cysteiny oraz cząsteczki wody, która łączy grupy: α -aminową z tiolową cysteiny [31].

Syntaza GlcN-6-P, podobnie jak inne amidotransferazy, nie wymaga do katalizowania reakcji ATP ani żadnych kofaktorów. Różnicą jest to, że większość amidotransferaz może wykorzystywać amoniak w zastępstwie glutaminy jako źródło grupy aminowej [32,33], co nie dotyczy syntazy GlcN-6-P.

Reakcja katalizowana przez syntazę GlcN-6-P polega na przekazaniu ugrupowania aminowego, pochodzącego z grupy amidowej łańcucha bocznego L-glutaminy (hydroliza glutaminy z wydzieleniem amoniaku) na D-fruktozo-6-fosforan (przeniesienie amoniaku na cząsteczkę Fru-6-P oraz następczy proces jego izomeryzowania do GlcN-6-P). W efekcie powstaje cząsteczka D-glukozy-6-fosforanu oraz kwasu L-glutaminowego (Rys. 5). Enzym wykazuje specyficzność wobec L-glutaminy jako donora grupy aminowej (nie można jej zastąpić amoniakiem) oraz D-fruktozo-6-fosforanu jako substratu [29].

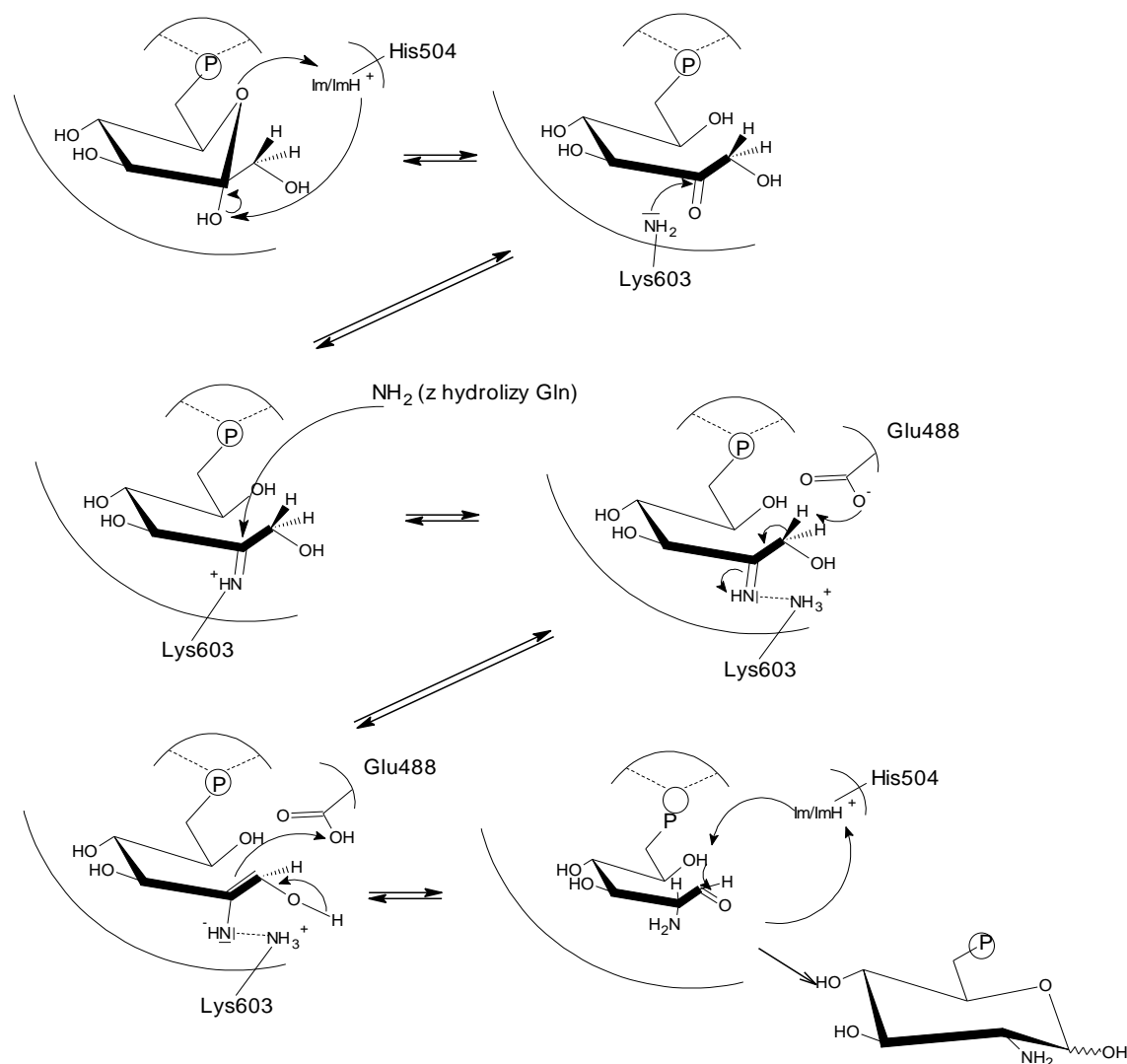


Rys. 5. Schemat reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P według [29]

Mechanizm katalizy poznany został dla wersji enzymu pochodzącego z bakterii *E. coli* i dla tego białka zidentyfikowano reszty aminokwasowe centrum aktywnego istotne dla katalizy. W pierwszym etapie reakcji (Rys. 6) do domeny enzymu przyłączany jest Fru-6-P, następnie otwarty zostaje pierścień jednostki węglowodanowej [34]. Prawdopodobnie reszta His504 przenosi atom wodoru z grupy hydroksylowej przy atomie węgla C1 na heterocykliczny atom tlenu [35].

W kolejnym etapie powstałe ugrupowanie karbonylowe reaguje z atomem azotu grupy aminowej pochodzącej z łańcucha bocznego Lys603. W efekcie powstaje zasada Schiffa, która ułatwia atak grupy NH_2 , pochodzącej z hydrolizy Gln, na sąsiadujący z nią atom węgla C2 [36]. Grupa aminowa zostaje przeniesiona z glutaminy

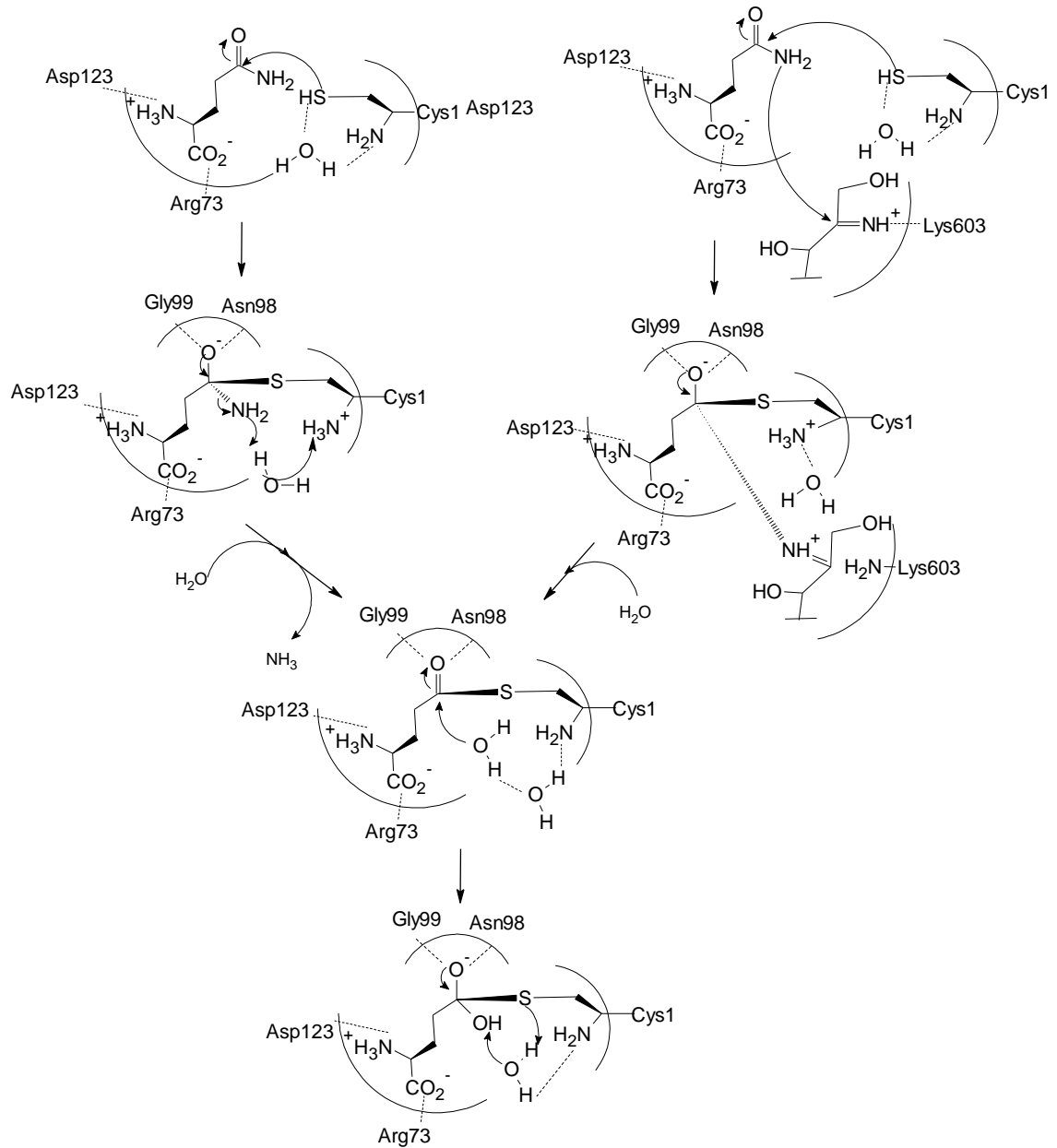
(mechanizm opisany w dalszej części) dzięki czemu powstaje fruktozoimino-6-fosforan, który następnie jest izomeryzowany do GlcN-6-P. W tej reakcji Glu488 występuje jako akceptor protonu z atomu węgla C1, a następnie jako donor protonu na atom węgla C2, zaś Lys603 stabilizuje substrat w miejscu aktywnym. His504 ponownie przenosi proton, tym razem z grupy hydroksylowej atomu węgla C5 (atom tlenu tworzy wiązanie z atomem węgla C1 zamykając pierścień) na atom tlenu grupy karbonylowej przy atomie węgla C1 [37].



Rys. 6. Mechanizm izomeryzacji Fru-6-P przez syntazę GlcN-6-P [29]

Istnieją dwie koncepcje hydrolizy L-glutaminy, z których żadna nie została jednoznacznie potwierdzona (obie przedstawione na Rys. 7). W obu przypadkach reszta Cys1 jest autoaktywowana przy udziale cząsteczki wody. Pierwsza koncepcja zakłada atak nukleofilowej grupy tiolowej na amidowy atom węgla w wyniku czego uwolniona

zostaje cząsteczka amoniaku (następnie przenoszona do domeny syntazowej) [35]. Druga koncepcja zakłada „atak sprzężony”, w którym następuje jednoczesny atak: grupy amidowej glutaminy na elektrofilowy atom węgla, tworzący zasadę Schiffa w domenie syntazowej, oraz grupy tiolowej Cys1 na amidowy atom węgla [38,39].



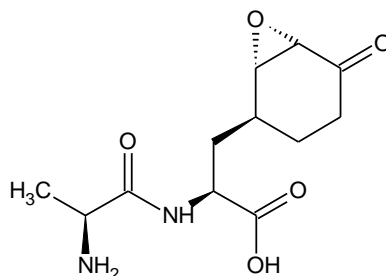
Rys. 7. Dwa alternatywne proponowane mechanizmy przeniesienia grupy aminowej przez syntazę GlcN-6-P według [29]

3.1. Inhibitory syntazy glukozamino-6-fosforanu jako potencjalne chemoterapeutyki

Aktywność aminotransferaz glutaminy, do których należy syntaza GlcN-6-P, może być zahamowana poprzez alkilowanie grupy tiolowej Cys1 – znajdującej się w domenie odpowiedzialnej za wiązanie glutaminy [40]. Istnieje wiele związków o charakterze elektrofilowym, które mogłyby być inhibitorami syntazy GlcN-6-P. Jednak, aby można było je rozważać jako potencjalne chemoterapeutyki, muszą wysoce selektywnie i nieodwracalnie łączyć się z centrum aktywnym enzymu.

Inhibitory syntazy GlcN-6-P, które są analogami glutaminy zawierają przeważnie reaktywne, elektrofilowe ugrupowania, które atakują nukleofilową grupę tiolową cysteiny.

Jednym z takich związków jest antykapsyna, C-końcowy aminokwas dipeptydowego antybiotyku tetainy. Tetaina po wnikięciu do komórki zostaje zhydrolizowana przez peptydazy i uwolniona w tym procesie antykapsyna hamuje działanie syntazy GlcN-6-P [41]. Pomimo wysokiej aktywności przeciwgrzybowej, związek ten posiada wadę – jest cytotoksyczny dla ludzkich komórek (hamuje aktywność polimerazy DNA) [42].

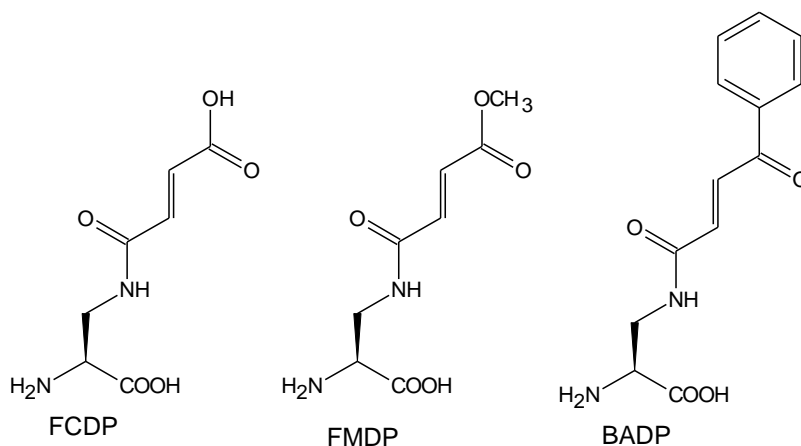


Rys. 8. Struktura tetainy (bacylizyny)

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej od wielu lat trwają badania nad inhibitorami syntazy GlcN-6-P. W głównym obszarze zainteresowań leżą analogi glutaminy – pochodne kwasu L-2,3-diaminopropanowego. Pierwszym związkiem tego typu, którego aktywność jako inhibitora syntazy GlcN-6-P została potwierdzona, jest kwas N^3 -(4-karboksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowy (FCDP) (Rys. 9) [43].

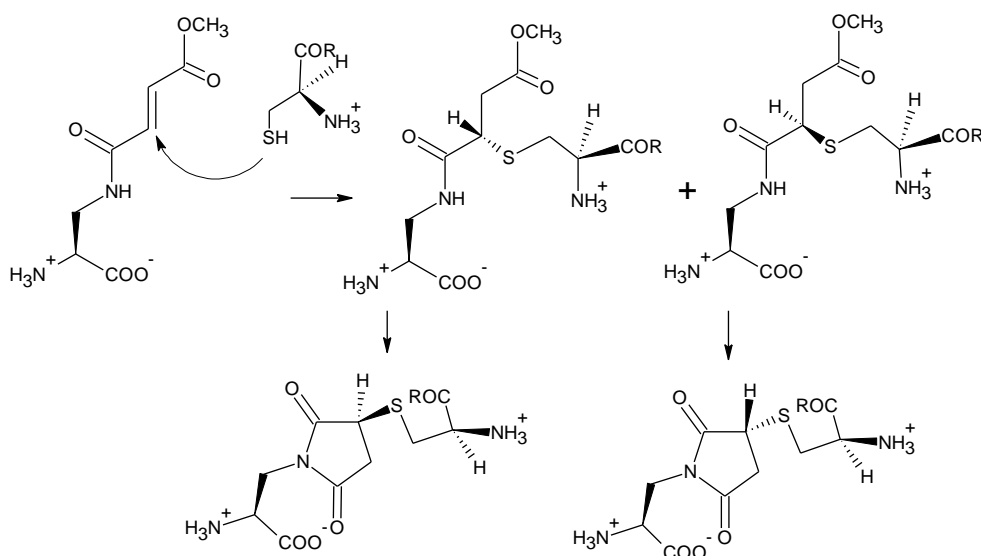
Rozpoczęto prace nad opracowaniem struktury bardziej skutecznego inhibitora. W ten sposób otrzymano kwas N^3 -(4-metoksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowy (FMDP)

[44] (Rys. 9) – jeden z najsilniej działających, poznanych dotąd nieodwracalnych, inhibitorów syntazy GlcN-6-P.



Rys. 9. Struktura inhibitorów syntazy GlcN-6-P pochodnych kwasu L-2,3-diaminopropanowego

FMDP oraz inne inhibitory tego typu, jak chociażby kwas *E-N*-(4-okso-4-fenyl-2-butenilo)-L-2,3-diaminopropanowy – BADP (Rys. 9), oddziałują z domeną odpowiedzialną za wiązanie L-glutminy (Rys. 10). Wiązanie podwójne węgiel-węgiel o charakterze elektrofilowym reaguje z nukleofilową grupą tiolową łańcucha bocznego Cys1 (reakcja addycji Michaela). Wiązanie powstaje pomiędzy atomem siarki, a atomem węgla w położeniu β względem grupy estrowej. Następnie ma miejsce atak nukleofilowy amidowego atomu azotu na atom węgla grupy estrowej, w wyniku którego powstaje pięcioczłonowy pierścień. Produkt tej reakcji odpowiedzialny jest za inhibicję syntazy GlcN-6-P [45].



Rys. 10. Mechanizm inhibicji syntazy GlcN-6-P przez FMDP

Pomimo wysokiego stopnia inhibicji enzymu, FMDP wykazuje dość słabą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Jest to spowodowane dużą polarnością cząsteczki, która ma problemy z pokonaniem bariery jaką stanowi błona komórkowa [46], a ponadto FMDP wykazuje słabe powinowactwo do permeaz aminokwasowych – białek transportowych o dużej specyficzności substratowej. Dlatego też zaproponowano sposób na „przemycenie” cząsteczki FMDP (lub innego inhibitora aminokwasowego) poprzez połączenie go z innym aminokwasem, bądź krótkim peptydem. Jak pokazały badania [46,47] połączenia w postaci dipeptydu wykazują *in vitro* aktywność większą niż wolne FMDP. Wyróżnia się tu przede wszystkim Nva-FMDP oraz tripeptyd Lys-Nva-FMDP. Przenikają one błonę komórkową na zasadzie aktywnego transportu poprzez permeazy peptydowe. Takie połączenia wykazują aktywność nie tylko przeciwgrzybiczą, ale również przeciw bakteriom Gram-dodatnim. Ponadto w przeciwieństwie do tetainy nie działają cytotoksycznie na komórki ssaków [29].

Niemniej w przypadku transportu aktywnego istnieje niebezpieczeństwo, że mikroorganizmy szybko nabędą odporność na dany związek – utraci on możliwość wnikiwania do wnętrza komórki. Dogodnym celem byłoby znalezienie takiego sposobu transportu, który nie będzie zależny od błonowych białek transportowych.

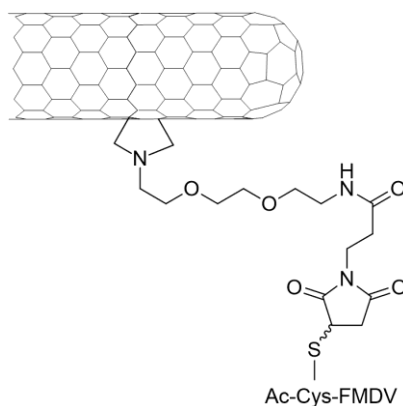
Inhibitorami syntazy GlcN-6-P mogą być nie tylko pochodne L-glutaminy, ale również związki będące analogami intermediatów stanu przejściowego reakcji katalizowanej przez ten enzym. Do wspomnianej grupy zaliczyć można fosforylowane aminocukry w tym m.in. 6-fosforan 2-amino-2-deoksy-D-glukitolu (ADGP) oraz jego pochodne, które są najsilniejszymi inhibitorami syntazy GlcN-6-P. Jednakże podobnie jak opisane powyżej pochodne glutaminy wykazują bardzo słabe właściwości przeciwgrzybowe. Przyczyną jest bardzo słabe ich wchłanianie poprzez transport aktywny komórek oraz brak możliwości dyfuzji bezpośrednio poprzez błonę komórkową. Modyfikacje mające na celu zwiększenie lipofilowości cząsteczki zwiększyły jej aktywność biologiczną. Zastosowanie skuteczniejszych metod transportu poprzez błony może zaowocować silniejszym działaniem przeciwgrzybowym [48].

4. Nanonośniki ułatwiające przenikanie przez błony biologiczne

W ostatnim czasie co raz popularniejsze stają się badania dotyczące transportu substancji aktywnych do wnętrza komórek przy wykorzystaniu różnego rodzaju nośników. W większości przypadków ideą jest, aby przetransportować do wnętrza komórki, a mianowicie zainfekowanych komórek ludzkich lub nowotworowych, czy też komórek drobnoustroju wywołującego infekcję, związek o potencjalnej aktywności biologicznej wykorzystując różne mechanizmy przenikania cząsteczek przez błony komórkowe. Zabieg ten stosować można, gdy cząsteczka biologicznie aktywna ma problemy z przeniknięciem do wnętrza komórki. Najczęściej nośniki wykorzystują mechanizmy, których komórka nie może zablokować (np. bezpośrednia dyfuzja poprzez błonę komórkową) lub mechanizmy, które komórkę „oszukują”.

4.1. Typy nośników cząsteczek biologicznie czynnych

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat powstało wiele koncepcji nośników związków biologicznie czynnych. Wśród nośników o strukturze związków organicznych należy wyróżnić m.in.: nanorurki, dendrymery, „parasole molekularne”, analogi sideroforów, lipidów izoprenowych czy peptydy penetrujące.



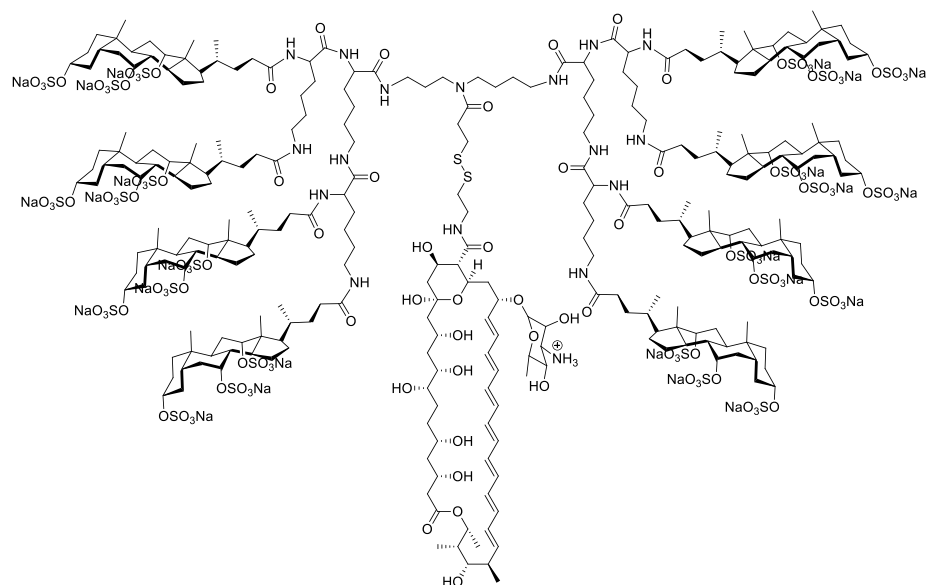
Rys. 11. Koniugat cylindrycznej nanorurki z epitopem pochodzącym z wirusa FMDV

W ostatnich dwóch dekadach nastąpił gwałtowny rozwój badań nad wykorzystaniem nanostruktur do transportu aktywnych cząsteczek do komórek. Jedną z najczęściej opisywanych struktur są nanorurki. Są to puste wewnątrz, cylindryczne cząsteczki, które mogą być jednowarstwowe (jedna warstwa grafenu) lub wielowarstwowe (warstwy grafenu tworzą wiele rurek jedna w drugiej). Są to dość małe i hydrofobowe cząstki, które są w stanie przenikać przez błony biologiczne. Mogą

również przenosić w swoim wnętrzu, bądź przyłączone na powierzchni, niewielkie cząsteczki aktywne biologicznie [49]. Większość z opisanych do tej pory koniugatów nanorurek dotyczą leków przeciwnowotworowych, zaś połączenia z substancjami przeciwdrobnoustrojowymi są dość nieliczne (**Rys. 11**) [50].

Ciekawymi związkami, mogącymi służyć jako nośniki są dendrymery – cząsteczki składające się z rdzenia, od którego, we wszystkich kierunkach, odchodzą „gałęzie” zakończone jedną z grup funkcyjnych. Do takich gałęzi można przyłączać inne cząsteczki o określonych właściwościach [51]. Dendrymery wnikają do wnętrza komórek, głównie za pośrednictwem endocytozy, dlatego mogą być stosowane jako nośniki mniejszych cząsteczek. W większości przypadków stosuje się jeden z trzech sposobów łączenia dendrymerów z innymi substancjami. Pierwszy polega na uwięzieniu hydrofobowej cząsteczki pomiędzy „gałęziami” dendrymeru na zasadzie oddziaływań hydrofobowych. Dzięki temu można transportować związki o słabej rozpuszczalności w środowisku wodnym. Kolejnym sposobem jest tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy transportowanym związkiem a grupami funkcyjnymi znajdującymi się na powierzchni dendrymeru. Trzecim natomiast jest wytworzenie elektrostatycznej równowagi pomiędzy molekułą dendrymeru a większą cząsteczką biologicznie czynną (np. kwasem nukleinowym lub białkiem). Dendrymery mogą być także stosowane jako nośniki antybiotyków, leków przeciwgrzybowych, przeciwwirusowych, czy przeciwmalarycznych [50].

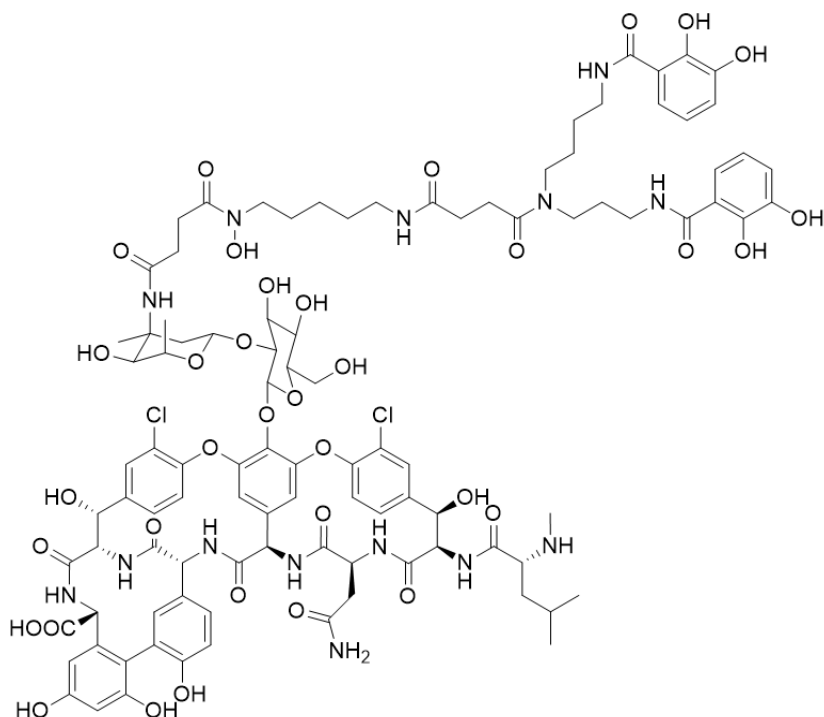
Kolejnym interesującym nośnikiem cząsteczek biologicznie czynnych są tzw. „parasole” molekularne. Są to związki, które składają się z kilku amfipatycznych części przyłączonych do rdzenia. Te amfipatyczne elementy cząsteczki są w stanie eksponować na zewnątrz swoją hydrofobową lub hydrofilową stronę – zależnie od polarności środowiska. Dzięki temu, że „parasol” w środowisku wodnym może odkrywać swoją stronę hydrofilową i ukrywać wewnątrz część hydrofobową, zaś w środowisku niepolarnym na odwrót – jest w stanie przenikać poprzez błony lipidowe. Do rdzenia parasola, za pomocą linkera, można przyłączyć związki aktywne biologicznie, które w ten sposób zostają dostarczone do wnętrza komórki. Badania potwierdziły możliwość transportu cząsteczek biologicznie aktywnych do wnętrza komórek przez „parasole” molekularne. Daje to realne szanse na zastosowanie takich struktur jako nanonośników leków (**Rys. 12**) [52,53].



Rys. 12. Koniugat „parasola” molekularnego połączonego z Amfoterycyną B labilnym mostkiem disulfidowym

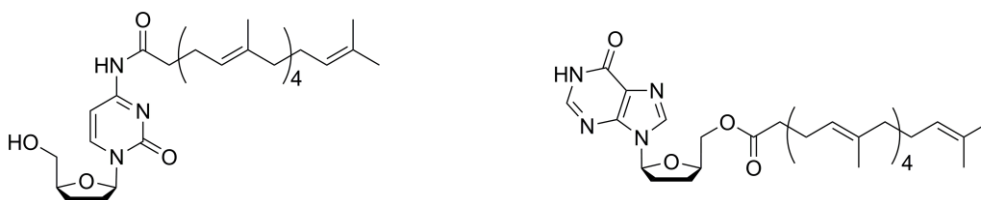
Dość obiecującym nośnikiem dla potencjalnych leków są również związki budowane na bazie sideroforów. Siderofory są to związki produkowane przez różnego rodzaju mikroorganizmy w celu łatwiejszego pozyskiwania jonów Fe^{3+} z otoczenia. Najczęściej są niedużymi peptydami, zawierającymi fragmenty katecholowe, hydroksamowe lub α -hydroksykarboksylowe, których zadaniem jest chelatowanie jonów żelaza(III). Powstające kompleksy są wchłaniane do wnętrza komórki [54]. Idea wykorzystania sideroforów jako nośników powstała wraz z odkryciem sideromycyn – naturalnych antybiotyków będących analogami bakteryjnych sideroforów, łączących się z inhibitorami szlaków metabolicznych. Wtedy zaczęto badania nad syntetycznymi analogami zawierającymi część chelatującą jon żelazowy oraz antybiotyk (**Rys. 13**).

Mechanizm działania polega na tym, że koniugat częścią sideroforową chelatuje jon żelaza(III), a następnie jest wchłaniany do wnętrza komórki mikroorganizmu. Następnie reduktaza żelaza(III) uwalnia jon z chelatu i redukuje go do Fe^{2+} . Następnie linker łączący część sideroforową i antybiotyk jest cięty enzymatycznie uwalniając lek do cytoplazmy [55].



Rys. 13 Koniugat sideroforu katecholowo-hydroksamowego z wankomycyną

Kolejną propozycją nośnika są związki o strukturze lipidów izoprenowych. Stwierdzono, że kowalencyjny koniugat skwalenu z cząsteczkami aktywnymi biologicznie (Rys. 14) prowadzi do spontanicznego tworzenia się nanostruktur w środowisku wodnym. Takie połączenia znacząco zwiększają aktywność względem niezwiązanego związku biologicznie czynnego. Badania nad tymi związkami są jeszcze na dość wczesnym etapie i wymagają dalszych prac nad ich wpływem na komórki ssaków [56].



Rys. 14. Koniugaty skwalenu z nukleozydami

4.2. Peptydy penetrujące¹

Jeszcze pod koniec lat osiemdziesiątych XX wieku powszechnie uważano, że związki polarne (w tym peptydy i białka) nie mają możliwości swobodnego przenikania przez błony biologiczne. Nieco później odkryto grupę peptydów, które poprzez specyficzne oddziaływania z błoną komórkową mają możliwość przenikania na jej drugą stronę. Związki te są zwane peptydami penetrującymi (*ang.* CPP – Cell Penetrating Peptides; również PTD – *ang.* Peptide Transduction Domains, MTS – *ang.* Membrane Translocating Sequences, Trojan peptides). Wiele spośród tych peptydów, poprzez tworzenie koniugatów, poprawia przenikalność innych, nawet znacznie większych związków, które normalnie nie mogłyby pokonać bariery jaką stanowi błona komórkowa.

Właściwości penetrujące pewnych typów peptydów po raz pierwszy odkryto, gdy stwierdzono, że białko będące transaktywatorem transkrypcji (TAT) wirusa HIV przenika do wnętrza komórek limfocytów. Zdolność ta wynikała z obecności specyficznego fragmentu oligopeptydowego o określonej sekwencji [57]. Wkrótce podobne właściwości stwierdzono dla fragmentu białka homeotycznego muszki owocowej (*Drosophila*), który nazwano penetratyną [58,59].

Te dwa odkrycia skłoniły naukowców do dalszych badań nad mechanizmami penetracji błon komórkowych przez białka i peptydy. Kolejne sekwencje poprawiające przenikanie błon znaleziono w białkach wirusowych, a także komórkach drobnoustrojów oraz organizmów wyższych [60]. Do chwili obecnej odkryto cały szereg takich sekwencji, jak również wykazano zdolności penetracyjne dla wielu peptydów, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i całkowicie syntetycznych sekwencji zaprojektowanych na podstawie analizy strukturalnej wcześniej odkrytych CPP [61].

Trudno podać jedną, spójną definicję peptydów penetrujących. Można powiedzieć, że CPP są krótkimi peptydami, liczącymi od 5 do 40 reszt aminokwasowych, które posiadają zdolność wnikania do wnętrza komórki za pomocą różnych mechanizmów, w tym niewymagających dostarczenia energii oraz endocytozy, bez angażowania specyficznych receptorów i stereospecyficznego rozpoznawania.

¹ Podrozdział został opracowany na podstawie publikacji autora: M. T. Kawczyński, J. Kreczko, Z. Maćkiewicz „Peptydy penetrujące – rodzaje i mechanizmy przenikania przez błony komórkowe” *Wiad. Chem.* **2015**, *69*, 9-33

Większość CPP nie posiada właściwości toksycznych, chociaż są znane przykłady CPP o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [62]. Przyłączenie CPP (kowalencyjnie lub jonowo) do innych aktywnych biologicznie cząsteczek znacznie zwiększa zdolność przenikania przez błonę komórkową tych ostatnich [61,63].

Istnieje wiele związków o budowie peptydowej, białkowej czy kwasów nukleinowych będących potencjalnymi lekami, jednakże nie są zbyt aktywne, gdyż konieczny jest kompromis pomiędzy przenikalnością przez błony a efektywnością oddziaływania z celami molekularnymi wewnątrz komórek [64]. Połączenie takich związków z CPP może stanowić szansę na zwiększenie ich przenikalność do komórek, a co za tym idzie poprawę efektywności. Ponadto takie połączenia bardzo często są w stanie przenikać do wnętrza jądra komórkowego, a nawet pokonywać barierę krew-mózg [65].

4.3. Rodziny peptydów penetrujących

Peptydy penetrujące można podzielić według różnych kryteriów: mechanizmu pokonywania błony komórkowej, pochodzenia peptydów, ich budowy i sekwencji, lub sposobu tworzenia koniugatów. Z uwagi na pochodzenie można wyróżnić CPP naturalne oraz syntetyczne, których sekwencja jest albo próbą naśladowania naturalnych peptydów penetrujących, albo są to tzw. peptydy chimeryczne, które stanowią połączenie dwóch naturalnych sekwencji peptydów [66].

Jednakże wydaje się, że najbardziej uzasadniony sposób podziału opiera się na wspólnych elementach strukturalnych, które rzutują na ich właściwości. Pod tym względem wśród znanych CPP wyróżnić można cztery główne grupy: CPP oligokationowe, CPP amfipatyczne, CPP zawierające reszty proliny oraz CPP hydrofobowe. W Tabela 1. przedstawione zostały przykłady peptydów należących do tych grup, ich sekwencje aminokwasowe oraz przykłady zastosowania jako nośników substancji trudno penetrujących błony biologiczne [67].

Tabela 1. Wybrane rodziny peptydów penetrujących

Klasyfikacja	Rodzina	Przykładowy CPP	Pochodzenie	Sekwencja	Przykład przenieszonego związku
Amfipatyczne	Penetratyny	pAntp	Domena homeotyczna Antennapedia	RQIKIWFQ NRRMKW K [60]	Polo-box [68]
		pIsl	Domena homeotyczna Isl-1	RVIRVWF Q NKRCCKDK K [60]	Biotyna [69]
	Chimerowe CPP	Transportan	Galanina i mastoparanem	GWTLNSA GYLLGKIN LKALAAL AKKIL [60]	siRNA [70]
		MPG	HIV-1 gp41 i NLS	GALFLGFL GAAGSTM GAWSQPK KKRKV [60]	siRNA [71]
	Pochodne peptydów przeciwdrobnoustrojowych	Buforyna 2	Żołądek ropuchy	TRSSRAGL QWPVGRV HRLLRK [60]	GFP [72]
		SynB (1)	Protegryny	RGGRLSYS RRRFSTST GR [60]	Dokсорubicyna [73]
		PAF26	Syntetyczny	RKKWFW [74]	
	Pochodne białka hCT	hCT (9-32)	Ludzka kalcytonina	LGTYTQDF NKFHTFPQ TAIGVGAP [60]	GFP [75]
Oligoationowe	Rodzina Tat	Tat (49-60)	Białko wirusa HIV-1	RKKRRQ RRRPPQ [60]	β -galaktozydaza [65]
		Poliarginina	Pochodna Tat	R _n (gdzie n=6-10) [60]	Cyklosporyna A [76]
Peptydy hydrofobowe	Pochodne czynnika wzrostu fibroblastów	Sekwencja sygnałowa Kaposi FGF	Kaposi FGF	AAVALLP A VLLALLAP [77]	NF- κ B [77]
Bogate w prolinę	SAP		γ -zeina	VRLPPPVR LPPPVRLP PP [78]	Fluorofor [78]

4.3.1. CPP amfipatyczne

W sekwencji peptydów z tej rodziny charakterystyczną cechą jest przede wszystkim obecność zasadowych reszt aminokwasowych (argininy i lizyny) oraz reszt aminokwasów hydrofobowych (głównie tryptofanu i fenyloalaniny). Ich amfipatyczność może być pierwotna – istnieje wyraźny podział w sekwencji na część hydrofobową i hydrofilową (przykładem może być syntetyczny PAF26 – przeciwdrobnoustrojowy CPP o sekwencji RKKWFW) lub wtórna – która jest efektem powstawania struktur drugorzędowych peptydów (np. α -helikalnych), gdzie sprotonowane grupy łańcuchów bocznych reszt aminokwasów zasadowych układają się po przeciwnej stronie struktury niż łańcuchy boczne reszt hydrofobowych aminokwasów [78].

Przeprowadzone badania syntetycznych sekwencji amfipatycznych CPP wykazały, że peptydy powinny być zbudowane głównie z reszt tryptofanu oraz argininy. W części analogów reszty hydrofilowe umieszczono na obu końcach, zaś w innych w środkowym odcinku sekwencji. Okazało się, że lepszą przenikalność wykazują peptydy z ładunkiem rozmieszczonym na końcach sekwencji. Ponadto nadmiar reszt tryptofanu osłabiał właściwości penetrujące [79].

4.3.1.1. Penetratyny

Białka homeotyczne są jednym z czynników biorących udział w transkrypcji. Po raz pierwszy wykryto je u muszki owocowej (*Drosophila*), a następnie u innych zwierząt oraz roślin. Wiążą one DNA za pośrednictwem sekwencji 60 reszt aminokwasowych noszącej nazwę domeny homeotycznej. Sekwencja ta jest bardzo konserwatywna w obrębie danego gatunku. Zbudowana jest z trzech α -helis, przy czym trzecia rozpoznaje docelowe miejsce w helisie DNA.

Zdolność penetratyny do przenikania błon komórkowych odkryta została w 1994 r. podczas badania roli domeny homeotycznej w rozwoju układu nerwowego [58]. Wtedy właśnie zaobserwowano przenikanie peptydu przez błonę komórkową. Później powtórzono te obserwacje przy udziale innych domen i białek homeotycznych, które dały podstawy do stworzenia koncepcji peptydów penetrujących [59,80].

Badając różnego rodzaju mutanty stwierdzono, że największy wpływ na przenikanie błon komórkowych ma sekwencja trzeciej helisy [81]. Zsyntetyzowano fragment trzeciej helisy składający się z szesnastu reszt aminokwasowych (43-58: $^{43}\text{RQIKIWF}^{50}\text{QNRRM}^{55}\text{KWKK}$). Istotnie, peptyd ten przenikał przez błony biologiczne i był w stanie wnikać do jądra komórki. Ponadto translokacja następowała we wszystkich typach badanych komórek ze 100% skutecznością, zarówno w temperaturze 4, jak i 37°C, co wskazuje na niezależny od dostarczania energii mechanizm [82]. Co ciekawe, badania z użyciem spektroskopii dichroizmu kołowego wskazują, że w środowisku wodnym peptyd ten nie tworzy helisy; jednak powstaje ona w środowisku hydrofobowym (np. wewnątrz błony komórkowej) [83].

Jako główny sposób transportu penetratyn do wnętrza komórki zaproponowano mechanizm odwróconej miceli. Oczywiście nie można wykluczyć innych mechanizmów, jednak wykonane badania wskazują na znaczny udział takiego właśnie procesu [59]. Pewien udział we wnikanii do wnętrza komórki ma prawdopodobnie endocytoza. Wskazuje na to zmniejszenie przenikalności po zastosowaniu inhibitorów metabolizmu oraz endocytozy. Ponadto wiązanie penetratyny na powierzchni komórki z glikozaminoglikanami może inicjować endocytozę transportowanego „ładunku” o dużej masie [84].

4.3.1.2. CPP chimerowe

Transportan, przykładowy peptyd chimerowy, zbudowany jest z 27 reszt aminokwasowych. W sekwencji tego peptydu można wyróżnić dwie części: N-końcową, dodekapeptydowego fragmentu galaniny (neuropeptydu) oraz mastoparanu (peptydu pochodzącego z jadu os; ma on zdolność oddziaływania z błoną komórkową). Obie części połączone są resztą lizyny [85]. Jego sekwencja przedstawia się następująco: $\text{GWTLNSAGYLLG}^{13}\text{KINLKALAALAKKIL}$.

Analogicznie do innych peptydów penetrujących, widać tu wyraźny podział na część hydrofilową zawierającą reszty lizyny i argininy oraz hydrofobową zawierającą między innymi tryptofan.

Badania przenikania transportanu z zastosowaniem inhibitorów endocytozy dowodzą, że nie występuje ona podczas translokacji tego peptydu przez błonę, a rzeczywisty mechanizm translokacji jest niezależny od energii metabolicznej. Wykazano też, że przenikalność nie zależy od rodzaju komórki, a transportan jest

w stanie przeniknąć nie tylko do cytoplazmy, ale także do jądra komórkowego. W przypadku transportu najprawdopodobniej największy udział w przenikaniu błon ma „mechanizm dywanowy” [85].

4.3.1.3. CPP pochodne peptydów przeciwdrobnoustrojowych (CAMP)

Naturalne kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (*ang.* Cationic antimicrobial peptides) zawierają przeważnie od 13 do 50 reszt aminokwasowych. W ich budowie wyróżnić można domenę o sekwencji ze znacznym udziałem reszt hydrofobowych oraz domenę złożoną z reszt aminokwasów z kationową grupą w łańcuchu bocznym (lizyna i arginina). Syntetyczne pochodne CAMP mają znacznie krótszą sekwencję (nawet poniżej 10 reszt aminokwasowych) [74].

Większość CAMP ma możliwość wnikania w błonę komórkową mikroorganizmów, co często prowadzi do lizy komórki. Jednak część z nich jest w stanie przenikać poprzez błonę w bardziej subtelny sposób. Te właśnie zaliczyć można do peptydów penetrujących [86].

Związek, znany w literaturze pod skrótem PAF26, jest heksapeptydem o sekwencji RKKWFW, który ma działanie przeciwdrobnoustrojowe. Mechanizm tego działania nie został jeszcze do końca poznany [87], ale w toku badań stwierdzono, że PAF26 jest zdolny do pokonywania błon biologicznych.

Widoczny jest podział tego peptydu na część o charakterze hydrofilowym (arginina i dwie reszty lizyny) oraz hydrofobowym (fenyloalanina i dwie reszty tryptofanu). Taka budowa ściśle wiąże się ze zdolnością do przenikania błon. Okazuje się, że prawdopodobnie mechanizm przenikania jest zależny od stężenia peptydu. W niskich stężeniach transport zależny jest od energii, zaś przy wyższych – przejście przez błonę następuje niezależnie od energii. Jako najbardziej prawdopodobny sposób przenikania błon dla CAMP postulowany jest „mechanizm dywanowy”. Prawdopodobnie właściwości penetrujące w sposób niezależny od energii wykazuje jedynie wersja PAF26, w której N-końcowa grupa α -aminowa jest acetylowana, a C-końcowa grupa α -karboksylowa występuje w formie amidowej.

4.3.2. Peptydy oligokationowe

Ta grupa peptydów charakteryzuje się obecnością wysokiego, wypadkowego ładunku dodatniego cząsteczki. Przyczyną jest duży udział w sekwencji zasadowych reszt aminokwasowych argininy i/lub lizyny oraz praktycznie całkowity brak reszt o charakterze kwasowym. Arginina pełni szczególną rolę w mechanizmach przenikania błon. Ze względu na obecność grupy guanidynowej w łańcuchu bocznym, tworzy wiązania wodorowe z fosfolipidami na powierzchni błony komórkowej, co może mieć istotne znaczenie dla przenikania tej rodziny CPP [88]. Wymiana reszt argininy na cytrulinę pozbawia całkowicie CPP zdolności do transdukcji [89].

4.3.2.1. Białko Tat

Białko Tat (*ang.* Trans-activator of transcription) zostało wyizolowane z wirusa HIV-1. Naturalnie białko to pokonuje błonę komórkową limfocytów T i łączy się z mRNA na 5' końcu nici, gdzie umiejscowiony jest element TAR (*ang.* Trans-activation responsive element). Oddziaływanie z RNA ma miejsce poprzez domenę TAT o sekwencji RKKTTYRRR, natomiast za odpowiedź jądra komórkowego (*ang.* NLS – nuclear localisation signal) i wnikanie do wnętrza jądra odpowiada fragment o sekwencji GRKKR [90].

Zdolność do penetracji błon biologicznych dla białka Tat zaobserwowano po raz pierwszy, gdy wykazano, że koniugat zawierający fragment złożony z trzydziestu sześciu reszt aminokwasowych (37-72) połączony z β -galaktozydazą (177 kDa) był w stanie przedostać się do wnętrza komórki zwierzęcej [91]. Kolejne eksperymenty pozwoliły ustalić, że za penetrację odpowiedzialny jest fragment Tat(49-57) o sekwencji RKKRRQRRR [92].

Na podstawie badań analogów peptydu Tat z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych oraz inhibitorów procesów komórkowych (szerszy opis w dalszej części) wykazały, że duży udział w przenikaniu ma proces endocytozy, który jest zależny od energii. Właściwości penetrujące są jednak niezbędne do opuszczenia endosomu, aby uchronić peptyd oraz transportowany związek przed lizą [60].

Podobne właściwości wykazują syntetyczne analogi fragmentu Tat(49-57) zbudowane z reszt argininy i/lub lizyny. Zaliczyć tu należy przede wszystkim

oktaargininę i dekalizynę. Argininowy analog wykazuje nawet dwudziestokrotnie lepsze działanie niż oryginalny fragment peptydu Tat [91].

4.3.2.2. Poliarginina

Właściwości penetrujące błony komórkowe, jak wspomniano wyżej, prezentuje również poliarginina. W obecnej chwili jest to najczęściej wykorzystywany, syntetyczny peptyd penetrujący. Z reguły peptydy te zbudowane są od 6 do 16 reszt argininy. „Ładunek” może być przyłączany, zarówno kowalencyjnie, jak i jonowo – w obu przypadkach poliarginina zachowuje swoje właściwości [93].

Dla poliargininy postuluje się przenikanie bezpośrednio, gdzie główną rolę odgrywa mechanizm adaptacyjny – peptyd otacza się ujemnie naładowanymi grupami na powierzchni błony komórkowej i dzięki temu jest w stanie się w niej zanurzyć [66]. Aby zmniejszyć wpływ enzymów peptydolitycznych na poliargininę skutecznie wykorzystuje się jej analogi D. Niestety ze względu na odporność enzymatyczną utrudnione jest usuwanie jej z organizmu, a co za tym idzie zwiększona toksyczność [93].

4.3.3. CPP hydrofobowe

W porównaniu do kationowych czy amfipatycznych CPP, rodzina ta jest stosunkowo nieliczna. Można ją podzielić na takie, które zbudowane są wyłącznie z hydrofobowych reszt aminokwasowych oraz takie, które w sekwencji zawierają nieliczne, reszty aminokwasowe ze zjonizowanymi grupami w łańcuchu bocznym, jednak całkowity ładunek pozostaje niewielki [94].

Hydrofobowy fragment domeny sygnałowej czynnika wzrostu fibroblastów Kaposi’ego (K-FGF) o sekwencji AAVALLPAVLLALLA był jednym z prekursorów tej rodziny CPP. Peptyd ten wykazywał dobrą przenikalność do komórek, podobnie jak jego koniugat z większymi fragmentami peptydowymi – sekwencją lokalizacji jądrowej, tzw. NLS [77].

Następne badania czynnika wzrostu fibroblastów doprowadziły do opisanie kolejnych peptydów takich, jak fragment FGF12 o sekwencji PIEVCMYREP nazwany CPP-C. Białko, z którego pochodzi, nie oddziałuje na żadne receptory wzrostu fibroblastów, jednak ma zdolność przenikania do wnętrza komórki. Również koniugaty

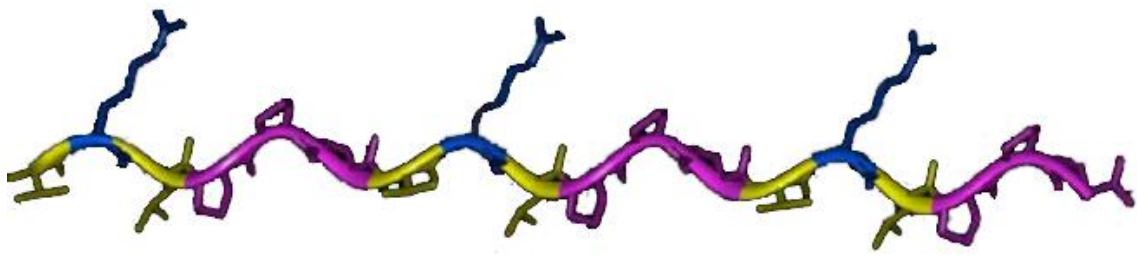
tych sekwencji z innymi peptydami są zdolne do penetracji błony komórkowej, a nawet wnikania do jądra komórkowego [95].

Innymi ciekawymi przedstawicielami tej rodziny są pentapeptydowe fragmenty białka Ku70, wybrane z tzw. domeny inhibitorowej Bax. Bax jest induktorem programowanej śmierci komórki, zaś jedną z ról białka Ku70 jest jego inhibicja. Omawiane peptydy o przykładowych sekwencjach: PMLKE, VPALR, IPALK, VPTLK w literaturze występują pod nazwą BIP (*ang.* Bax-Inhibiting Peptides – Peptydowe inhibitory Bax). Pomimo niewielkiego rozmiaru, peptydy BIP są w stanie transportować przez błonę komórkową tak duże białko jak GFP [96].

Mechanizm przenikania błon biologicznych przez te peptydy nie został jeszcze jednoznacznie ustalony. Do tej pory zakładano, że CPP-C przenika poprzez endocytozę, a następnie ‘ucieka’ z endosomu [95]. Wstępne badania nad peptydem K-FGF wykazały, że jego przenikanie do komórki jest niezależne od ATP [77]. Syntetyczne, hydrofobowe CPP prawdopodobnie są w stanie przenikać do wnętrza komórki bezpośrednio. Otrzymano je z biblioteki stworzonej na podstawie obliczeń statystycznych bazujących na sekwencjach poznanych już CPP. Takie peptydy wykazały przenikalność w badaniach z wykorzystaniem sztucznej błony fosfolipidowej, co pozwoliło odrzucić mechanizm endocytozy. Badania te znalazły potwierdzenie w eksperymentach na żywych komórkach [97].

4.3.4. CPP bogate w prolinę

Niektóre peptydy z tej grupy można zaklasyfikować jako peptydy amfipatyczne wtórne ze względu na powstające struktury poliproliny II połączonej z hydrofilowymi resztami aminokwasów. Powstająca w ten sposób helisa zawiera 3,0 reszty aminokwasowe na skręt [78]. Przykładem może być peptyd SAP (*ang.* Sweet Arrow Peptide) o sekwencji: VRLPPP VRLPPP VRLPPP, pochodzący z białka γ -zeiny. Połowę reszt aminokwasowych w sekwencji tego peptydu stanowią cząsteczki proliny, dzięki czemu tworzy się wspomniana wcześniej helisa. W pozycjach 2, 8, 14 znajdują się zasadowe reszty argininy, które odpowiadają za hydrofilową stronę peptydu, zaś walina w pozycjach 1, 7 i 13 tworzy fragment o właściwościach hydrofobowych (**Rys. 15**) [78].



Rys. 15. Trójwymiarowa struktura helisy peptydu SAP o sekwencji VRLPPPVRLPPPVRLPPP bogatego w prolinę. Hydrofilowe reszty Arg skierowane są w jednym kierunku, zaś hydrofobowe reszty Val i Leu w przeciwnym. Na podstawie lit. [98]

Przeprowadzono również badania nad peptydami zbudowanymi na bazie 4-polihydroksyproliny. Zmodyfikowano reszty 4-hydroksyproliny w taki sposób, że do grupy hydroksylowej przyłączano podstawniki o charakterze hydrofobowym lub kationowym. Następnie łączono je na przemian: jedna reszta hydroksyproliny z hydrofobowym podstawnikiem i dwie z hydrofilowym. Otrzymano w ten sposób helisę zawierającą 3,0 reszty na skręt (analogicznie jak struktura poliproliny II) o właściwościach amfipatycznych. Stwierdzono, że otrzymany peptyd wykazywał zdolność przenikania błon komórkowych [99].

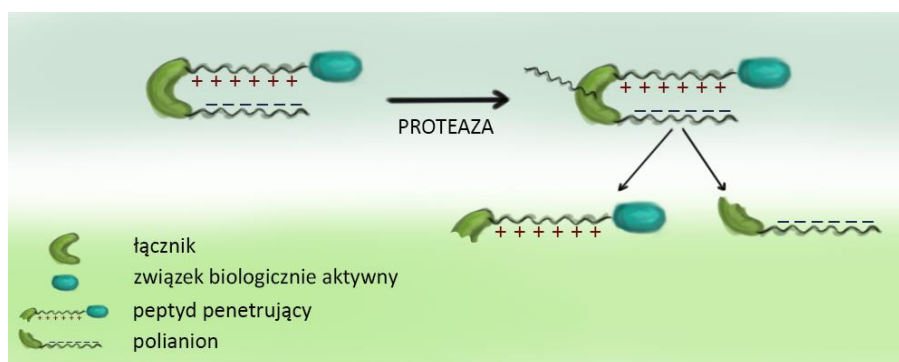
Peptyd SAP oraz jego analogi, podobnie jak γ -zeina, mają tendencję do agregacji w długie fibryle. Tworzą się one, z opisanych powyżej helis, układając się hydrofobową stroną do wnętrza, a hydrofilową na zewnątrz powstającej struktury. Powstają w ten sposób cylindryczne micelle, które łącząc się dalej tworzą fibryle [98]. Przypuszcza się, że może mieć to związek z przenikaniem peptydu do wnętrza komórek, gdyż dodatkowo naładowane łańcuchy boczne aminokwasów będą oddziaływały z ujemnymi ładunkami fosfolipidów [100].

Sugeruje się, że właściwości penetrujące posiadają także mniejsze oligopeptydy takie, jak np. VRLPPP, jednakże nie zostało to jednoznacznie potwierdzone [101].

4.3.5. Aktywowalne peptydy penetrujące (ACCP)

W 2004 roku przeprowadzono badania z wykorzystaniem syntetycznych peptydów, które później nazwano aktywowalnymi peptydami penetrującymi (ACPP). W ich budowie wykorzystano fragmenty poznanych i opisanych CPP, które zmodyfikowano poprzez dodanie kolejnych elementów. W strukturze ACPP wyróżnić można trzy domeny: pierwszą jest właściwy peptyd penetrujący (analog białka Tat,

który zawiera w dużej mierze kationowe reszty aminokwasowe: argininy i lizyny), druga domena to łącznik (linker) wrażliwy na działanie enzymu proteolitycznego, zaś trzecia domena to inhibitor transdukcji, będący peptydem posiadającym w sekwencji ujemnie naładowane łańcuchy boczne (głównie kwasu glutaminowego). Taka budowa sprawia, że oddziaływanie dodatnio naładowanych łańcuchów bocznych z fosfolipidami błony komórkowej jest znacznie utrudnione i peptyd nie wykazuje przenikalności do momentu, gdy linker nie zostanie przecięty przez odpowiednią proteazę. Wtedy peptyd zaczyna działać tak jak penetrujący (Rys. 16) [102].



Rys. 16. Mechanizm działania ACPP: Część polianionowa oddziałuje z częścią polikationową; w wyniku działania proteaz dochodzi do rozerwania linkera i odblokowania części kationowej, a tym samym umożliwienia przenikania CPP

Jednym z wykorzystywanych obecnie linkerów w ACPP jest peptydowa sekwencja PLGLAG. Stanowi ona substrat dla metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). ACPP z takim łącznikiem może zostać wykorzystany do transportu leku przeciwnowotworowego. Wynika to z faktu, że komórki nowotworowe charakteryzują się dużą produkcją MMP. Dzięki temu koniugat wnika do wnętrza komórek głównie w miejscach powstawania guza [103]. Z powodzeniem prowadzone są również badania nad zastosowaniem ACPP osadzonych na powierzchni nanocząstek będących lekami [104].

4.4. Mechanizmy przenikania peptydów penetrujących przez błony biologiczne

Dotychczasowe badania pozwoliły na zaproponowanie kilku możliwych mechanizmów transportu peptydów penetrujących przez błony biologiczne. Większość z nich nie wyklucza się nawzajem i mogą występować równocześnie, a ich udziały mogą być różne dla danego peptydu i często zależą od warunków zewnętrznych takich, jak: stężenia CPP, temperatura czy pH.

Mechanizmy wnikania CPP do komórki można podzielić na zależne od energii, czyli wszelkiego rodzaju endocytozy, które wykorzystują energię metaboliczną, zgromadzoną w komórce w postaci ATP oraz transport bezpośredni – niezależny od energii i temperatury. W czasie transportu bezpośredniego dochodzi do lokalnej destabilizacji błony komórkowej, co umożliwia peptydom przedostawanie się na jej drugą stronę. W początkowych badaniach nad CPP postulowano właśnie ten mechanizm przenikalności, jednak później go odrzucono, aby ostatecznie potwierdzić poprzez doświadczenia prowadzone w niskich temperaturach oraz w obecności inhibitorów endocytozy [105,106].

Peptydy penetrujące wykazują kilka charakterystycznych, wspólnych dla większości cech, które mają duże znaczenie dla transportu poprzez błony komórkowe. Jedną z ważniejszych jest obecność w sekwencji dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych argininy i lizyny (nie dotyczy to hydrofobowych CPP). Ich rolą jest oddziaływanie z ujemnie naładowanymi fosfolipidami i proteoglikanami występującymi na powierzchni błony komórkowej. Wykazano, że to reszta argininy ma większe znaczenie dla przenikalności aniżeli reszta lizyny [107]. Wynika to, prawdopodobnie, z większej ilości wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy grupą guanidynową argininy, a grupami fosforanowymi, sulfonowymi lub karboksylowymi składników błony komórkowej [88].

Natomiast aminokwasy o charakterze hydrofobowym w sekwencji peptydu mają istotny wpływ na możliwość przenikania, jednakże zbyt duża hydrofobowość cząsteczki może prowadzić do zmniejszenia tego procesu na skutek retencji takiego peptydu wewnątrz błony komórkowej [108]. Szczególną rolę odgrywają reszty aminokwasów aromatycznych, a w szczególności tryptofanu, nie tylko ze względu na jego hydrofobowość, ale również większą gęstość elektronową wynikającą z obecności elektronów π w pierścieniu aromatycznym. Tryptofan ma także duży udział w destabilizacji błony komórkowej [109]. Może on oddziaływać z białkami błonowymi oraz glikozaminoglikanami, co ułatwia przenikanie CPP na drugą stronę błony komórkowej [110].

Badania potwierdziły, że konfiguracja absolutna reszt aminokwasowych w sekwencji peptydów nie ma znaczącego wpływu na przenikalność przez błony, ponieważ postulowane mechanizmy transportu nie angażują żadnych specyficznych

receptorów. Ma to miejsce również w przypadku tworzenia struktur drugorzędowych jak np. helis, które jeśli są zbudowane z reszt D-aminokwasów to struktura jest odbiciem lustrzanym struktury opartej na L-aminokwasach i oddziałuje z błoną komórkową w analogiczny sposób. Jediną różnicą jest dłuższa akumulacja peptydów zbudowanych z D-aminokwasów wewnątrz komórek. Wynika to z większej odporności na działanie enzymów tnących wiązania peptydowe [78,83,84].

Endocytoza

Endocytoza to proces zachodzący praktycznie w każdej komórce. Jest regulowany przez komórkę i zależy od energii. Jego celem jest dostarczanie do komórki niezbędnych substancji z otoczenia.

Jako mechanizm translokacji poprzez błony komórkowe, endocytozę można podzielić na dwa etapy: wniknięcie przez endocytozę oraz ucieczkę z endosomu. Różne rodzaje endocytozy mają swój udział w transporcie większości peptydów penetrujących, ale w przypadku pochodnych białka Tat jej udział jest większy niż innych mechanizmów.

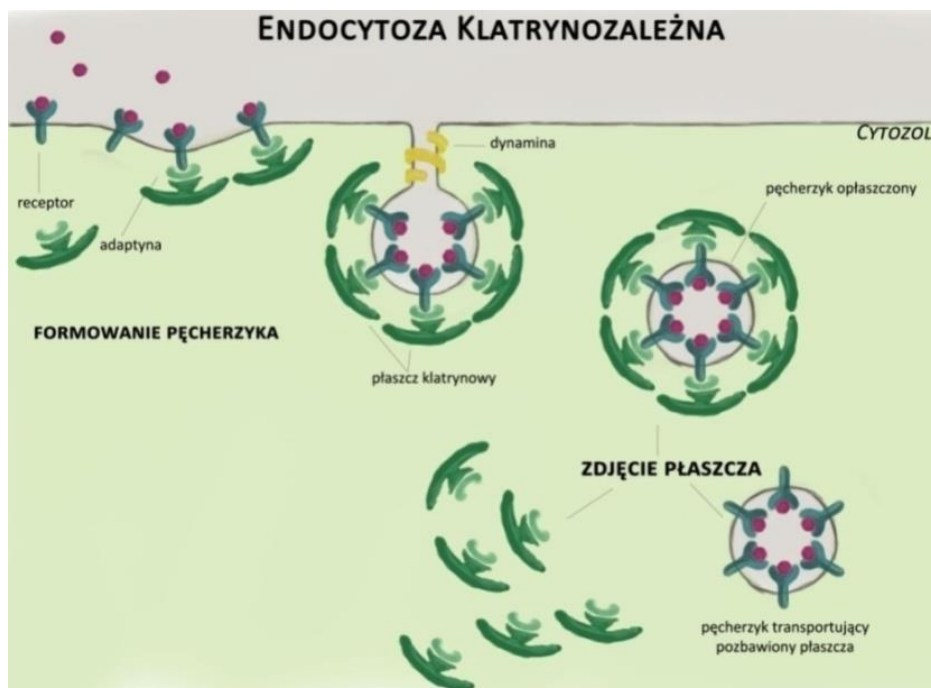
Badania nad mechanizmem zaczęły się od obserwacji przeniesienia dużego enzymu (β -galaktozydazy) przez krótki fragment białka Tat do wnętrza komórki ssaczej [65]. Stwierdzono, że białko Tat posiada dwie domeny: jedna z nich – domena podstawowa – inicjuje wniknięcie do wnętrza jądra komórkowego i może odpowiadać za pokonywanie błon biologicznych, a drugą jest przylegająca α -helisa, poprzez którą białko oddziałuje z RNA [111]. Omawiana struktura występowała również w przypadku penetratyn – co wtedy było uznawane za istotne w procesie ich przenoszenia do wnętrza komórki [82].

Przy zastosowaniu znakowania fluorescencyjnego przebadano przenikalność grupy analogów peptydu Tat z delecją w domenie podstawowej lub w α -helisie. Na podstawie tych doświadczeń jednoznacznie udowodniono, że domena z α -helisą praktycznie nie ma wpływu na transdukcję przez błonę komórkową. Jako prototyp peptydu penetrującego Tat uznano sekwencję GRKKRRQRRR, która zawiera wspomniany już fragment łączący białko Tat z RNA oraz motyw NLS. Ponadto stwierdzono, że usunięcie z sekwencji fragmentu α -helisy zmniejszyło cytotoksyczność peptydu [112]. Skan alaninowy sekwencji peptydu Tat wykazał, że wymiana

któregokolwiek aminokwasu powoduje znaczne osłabienie transportu przez błony [113,114].

Początkowo postulowany niezależny od energii mechanizm wnikania Tat do komórki został zakwestionowany [115]. Badania przenikalności przy użyciu znaczników fluorescencyjnych wskazywały na akumulację peptydu wewnątrz komórek. Wiadomo jednak, że peptydy Tat chętnie łączą się z ujemnie naładowanymi grupami, nie tylko z peptydoglikanami i fosfolipidami występującymi na powierzchni błony komórkowej, ale także z powierzchniami szklanymi i plastikowymi. Proces przemywania stosowany w tych badaniach nie wystarczył do usunięcia pozostałego peptydu ze znacznikiem, co w konsekwencji prowadziło do zafałszowania końcowych wyników [115]. Zatem endocytoza jako mechanizm przenikania peptydu Tat do wnętrza komórki nie mogła być odrzucona. Na podstawie dalszych badań stwierdzono, że peptyd Tat znacznie chętniej łączy się z glikozaminoglikanami na powierzchni komórki, niż z ujemnie naładowanymi fosfolipidami tworzącymi ścianę komórkową [116–118]. Znalazło to potwierdzenie podczas testów na mutantach z zaburzoną syntezą glikozaminoglikanów, ponieważ peptyd Tat nie transportował „ładunku” do wnętrza komórki [119].

Badania pełnej sekwencji peptydu Tat oraz jej koniugatów z fluorochromami, w których zmieniono metodykę postępowania, aby uniknąć zanieczyszczeń [120], z wykorzystaniem inhibitorów endocytozy klatrynozależnej, wykazały znaczny spadek przenikania do wnętrza komórki (Rys. 17). Jednakże eksperymenty z zastosowaniem inhibitorów endocytozy zależnej od tratw lipidowych nie ujawniły znaczącego spadku przenikania peptydu Tat [120–122]. Opublikowano też badania prowadzone na koniugatach peptydu Tat z rekombinazą Cre oraz koniugatu GST-Tat-GFP, które jako prawdopodobny mechanizm transdukcji wskazują makropinocytozę lub endocytozę klatrynozależną [123–125]. Sugeruje to różnorodność mechanizmów odpowiadających za transport peptydu Tat oraz jego analogów i koniugatów poprzez błonę komórkową.

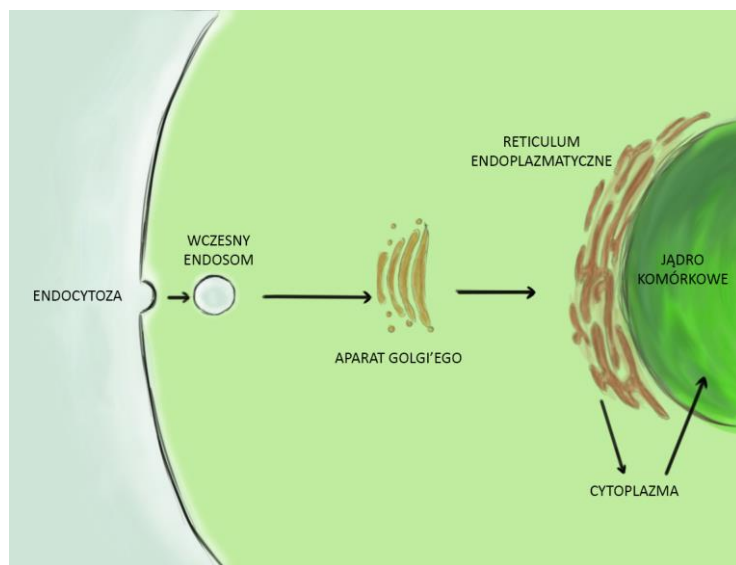


Rys. 17. Mechanizm endocytozy klatrynozależnej

W toku badań dowiedziono, że peptyd Tat ma możliwość regulowania endocytozy w komórce, oddziałując na aktynę w cytoszkielecie, co wywołuje endocytozę [126].

Niezależnie od tego jaki rodzaj endocytozy, czy pinocytozy towarzyszy wnikaniu peptydu Tat do wnętrza komórki problemem pozostaje ucieczka z endosomu, aby nie doprowadzić do rozkładu „ładunku” transportowanego przez peptyd. Mechanizm tego procesu nie został jeszcze dokładnie poznany. Jedną z postulowanych wersji jest przedostawanie się peptydu do innych organelli komórkowych nim trafi do cytoplazmy. Odbywa się to na zasadzie wstecznego transportu wczesnego endosomu do aparatu Golgiego; następnie do *retikulum* endoplazmatycznego i stamtąd do cytoplazmy (Rys. 18) [60].

Ponadto prowadzono badania, w których zmniejszono udział endocytozy, co miało zapobiegać degradacji CPP wraz z przyłączonym „ładunkiem”. Okazało się, że prosta modyfikacja polegająca na acylowaniu N-końca peptydu nienasyconymi kwasami tłuszczowymi zwiększa udział bezpośredniego transportu, a w przypadku zachodzącej, mimo wszystko endocytozy, ułatwia ucieczkę z endosomu [127].



Rys. 18. Proponowana droga „ucieczki” CPP z pęcherzyka endosomalnego [60]

Odwrócona micela

Mechanizm odwróconej miceli, jako główny sposób przenikania błon, został zaproponowany dla penetratyny. Aby ustalić jakie czynniki wpływają na przenikanie penetratyny przez błony biologiczne oraz na jakiej drodze się to odbywa, zsyntetyzowano kilka analogów tego peptydu. Związek zbudowany z D-aminokwasów o takiej samej sekwencji oraz analog o odwróconej sekwencji (58-43) wykazywały taką samą przenikalność jak penetratyna w temperaturach: 4 i 37°C. Wyklucza to udział chiralnych receptorów błonowych w procesie przenikania. Prawdopodobna była możliwość wnikania peptydów w procesie pinocytozy, gdyż nie jest zatrzymywana w temperaturze 4°C, nie nasycy się, a receptory błonowe nie biorą w niej udziału. Jednak badania akumulacji tych peptydów nie wykazały oznak pinocytozy, zaś peptydy znajdowały się, zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym. Te argumenty przemawiały za odrzuceniem pinocytozy jako mechanizmu transdukcji penetratyny. Ponadto D-aminokwasowa pochodna wykazała większą akumulację, co jest dość typowe dla tego rodzaju peptydów, gdyż D-aminokwasowe peptydy trudniej ulegają proteolizie [83,128].

Aby ocenić wpływ konformacji penetratyny na jej właściwości transdukcji, przeprowadzono eksperyment, który polegał na przyłączeniu L-cysteiny na N- i C-końcu, a następnie utworzeniu mostka disulfidowego w celu otrzymania peptydu o strukturze cyklicznej. Okazało się, że peptyd w formie liniowej przenika przez błonę

komórkową, zaś forma cykliczna nie. Zatem należy wnioskować, że struktura przestrzenna ma istotny wpływ na przenikanie peptydu przez błonę komórkową [129].

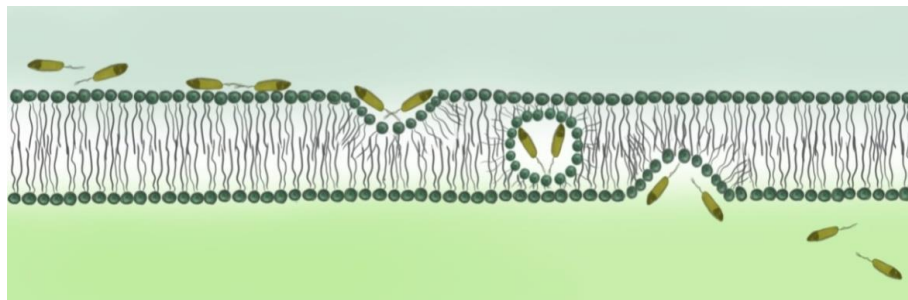
Otrzymano także dwa analogi penetratyny, w których zmieniono niektóre reszty aminokwasowe na L-prolinę: w jednym – zamiast 50-tej reszty glutaminowej, zaś w drugim przypadku wymieniono reszty 45, 50 i 55 (odpowiednio: izoleucyna, glutamina, lizyna). Prolina utrudnia organizowanie się peptydu w helisę; jest tzw. „łamaczem α -helis”. Okazało się, że oba analogi zachowały zdolność do przenikania błon, jednak badanie z użyciem mikroskopii elektronowej pokazało, że nie miały one dostępu do jądra komórkowego [128].

Aby ocenić wpływ amfifilowości na transdukcję penetratyny otrzymano analog, w którym wymieniono 48 i 56 resztę tryptofanu na L-feniloalaninę. Analog ten nie przenikał przez błonę komórkową. Można z tego faktu wnioskować, że amfifilowość cząsteczki nie jest wystarczająca do penetracji błony [82]. Wskazuje to również na istotną rolę reszt tryptofanu. Dokładniejszych danych dostarczyły badania, w których analog domeny homeotycznej z delecją Trp56 był w stanie przenikać przez błonę komórkową [130].

Zaobserwowano, że na przenikanie peptydu wpływa długość sekwencji. Analogi penetratyny skracane od C-końca bardzo szybko traciły swoją zdolność do transdukcji, natomiast usuwanie N-końcowych reszt aminokwasowych powodowało znacznie mniejszy spadek przenikalności. Heptapeptyd (52-58) wykazuje 60% przenikalności oryginalnej penetratyny [129].

Skan alaninowy wskazuje na istotną rolę reszt lizyny i argininy. Wymiana reszty tryptofanu Trp48 na L-alaninę sprawia, że peptyd całkowicie traci zdolność przenikania przez błony [81,131].

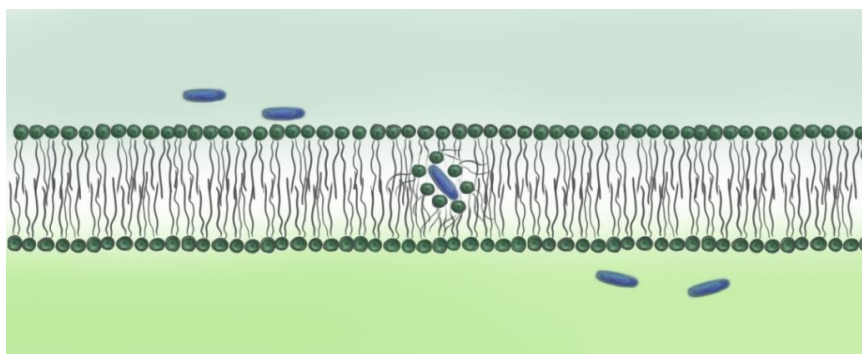
Na podstawie powyższych informacji zaproponowano mechanizm tzw. odwróconej miceli (**Rys. 19**). Postulowano, że CPP jest stabilizowany na powierzchni komórki w wyniku oddziaływań elektrostatycznych reszt obdarzonych ładunkiem dodatnim – lizyny i argininy – z ujemnie naładowanymi „głowami” fosfolipidów. W tym momencie reszta Trp48 inicjuje powstanie odwróconej miceli wokół CPP, która „przenosi” go na drugą stronę błony komórkowej. Możliwy jest też wariant, w którym powstanie odwróconej miceli zaburza strukturę błony, co pozwala na przenikanie kolejnych cząsteczek peptydu.



Rys. 19. Mechanizm wnikania CPP do wnętrza komórki na zasadzie odwróconej miceli

Przenikanie adaptacyjne

Mechanizm przenikania adaptacyjnego występuje m.in. w transporcie poliargininy (Rys. 20). Peptyd ten oddziałuje dodatnio naładowanymi grupami guanidynowymi z fosfolipidami, jednocześnie tworząc z nim wiązania wodorowe. W ten sposób dodatni ładunek peptydu jest maskowany, co znacznie obniża jego polarność. Peptyd, dzięki temu, może „zanurzyć” się w błonie komórkowej i w ten sposób przedostać się na jej drugą stronę. Mechanizm adaptacyjny pokazuje jak istotny wpływ na przenikanie peptydów penetrujących ma potencjał elektrostatyczny błony komórkowej oraz obecność dodatnio naładowanych grup, szczególnie guanidynowych argininy [132].



Rys. 20. Schemat mechanizmu przenikania adaptacyjnego

Mechanizm dywanowy

Mechanizm dywanowy został zaproponowany m.in. dla peptydu PAF26. Jego N-końcowa część zawiera dwie reszty lizyny oraz jedną argininy, natomiast w C-końcowej części cząsteczki znajdują się dwie reszty tryptofanu oraz jedna fenyloalaniny. W strukturze PAF26 widoczny jest wyraźnie podział na dwie części: jedną obdarzoną ładunkiem i drugą o charakterze hydrofobowym. W tym przypadku można zauważyć pewne podobieństwa do penetratyny, która zawiera znaczną ilość

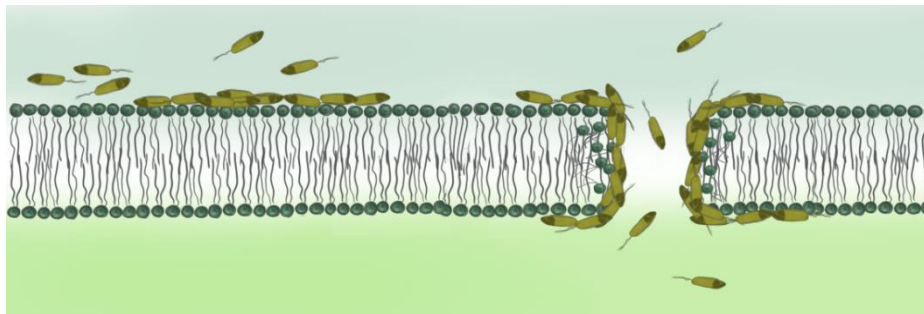
naładowanych reszt aminokwasowych w jednej części oraz resztę tryptofanu, która miała istotne znaczenie dla właściwości tego peptydu [81,131].

PAF26 jest zbyt krótkim peptydem, aby tworzyć drugorzędowe struktury. Potwierdzają to badania za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego [133].

Porównano działanie PAF26 z KR20 – zbudowanym z dwudziestu reszt aminokwasowych – peptydem przeciwdrobnoustrojowym, stanowiącym fragment większego peptydu K126 pochodzącego z katelicydiny LL37 [74]. Ten eksperyment nie wykazał niczego niespodziewanego, jednak był inspiracją do kolejnego doświadczenia – postanowiono zsyntetyzować koniugat obu tych peptydów. Co ciekawe był on co najmniej równie skuteczny jak każdy z osobna, a w większości przypadków przewyższał je aktywnością. Chciano jednak sprawdzić, czy wydłużenie sekwencji KR20 o sześć reszt aminokwasowych nie wpływa na skuteczność tego peptydu. Zsyntetyzowano więc peptyd, który jest analogiem KR20 dłuższym o sześć reszt aminokwasowych (sześć dodatkowych reszt były to kolejne reszty aminokwasowe z sekwencji peptydu K126). Nie wykazywał on jednak skuteczności większej niż KR20. Kolejną próbą wyjaśnienia tego zjawiska była synteza peptydu P20 (o sekwencji: RKRPFW), który jest analogiem PAF26, nie posiadającym jednak właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Jego koniugat z KR20 również wykazał aktywność większą niż sam peptyd KR20 (choć nadal mniejszą niż koniugat PAF26-KR20). Dzięki temu stwierdzić można, że zarówno PAF26, jak i jego analog P20 (nie posiadający właściwości przeciwdrobnoustrojowych) muszą ułatwiać wnikanie KR20 do wnętrza komórki.

Mechanizm przenikania PAF26 nie jest jeszcze do końca ustalony i najprawdopodobniej zależy od jego stężenia. Przy niskich stężeniach peptydu następuje endocytoza i przeniesienie peptydu z endosomu do wakuoli, skąd następnie przedostaje się do cytoplazmy. Znakowany fluorescencyjnie analog AAAPFW zawierający część hydrofobową (WFW) został znaleziony w wakuolach, ale nie w cytoplazmie w przeciwieństwie do drugiego – RKKAAA z domeną kationową (RKK), który akumulował się na otoczce komórki w ogóle nie przenikając do wnętrza [62]. Przy wyższych stężeniach peptyd przenika bezpośrednio przez błonę komórkową do wnętrza komórki [134]. W takich warunkach peptyd prawdopodobnie oddziałuje dodatkowo naładowanym fragmentem z ujemnie naładowanymi „głowami” fosfolipidów

błonowych. Na powierzchni błony komórkowej tworzy się warstwa zwana „dywanem”, która po osiągnięciu odpowiedniego stężenia miejscowo destabilizuje błonę, w której tworzą się pory i peptyd jest w stanie przeniknąć do wnętrza komórki (Rys. 21) [135].



Rys. 21. Tworzenie „dywanu” i przenikanie przez błonę komórkową CAMP według [100]

Przenikanie przypominające elektroporację

Część badaczy sugeruje udział mechanizmu przypominającego elektroporację w przenikaniu penetratyn i wiąże ją z rozkładem ładunków na zewnątrz i wewnątrz komórki. Powyżej pewnego stężenia peptydu, który zawiera dodatnio naładowane łańcuchy boczne, asymetryczne rozłożenie ładunku po obu stronach błony komórkowej może powodować silne naprężenia elektryczne w błonie. Prowadzi to do powstania defektów w strukturze fosfolipidów błony komórkowej, co znacząco ułatwia peptydom pokonanie membrany [136].

Wejście na granicy domen transbłonowych

Obszary błony komórkowej znajdujące się pomiędzy różnymi domenami transbłonowymi mogą zawierać defekty, które mogą ułatwiać przenikanie peptydom penetrującym, bądź działać jako miejsca „zarodkowania” tworzących się porów. Takie domeny mogą powstawać poprzez oddziaływanie peptydów z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, co może prowadzić do lokalnej reorganizacji błony komórkowej [137].

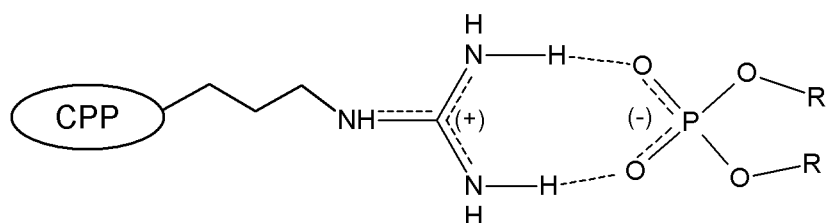
4.5. Koniugaty CPP z substancjami biologicznie czynnymi jako potencjalne proleki

Peptydy penetrujące mogą stanowić potencjalne wektory poprawiające przenikalność do wnętrza komórek dla różnego rodzaju biologicznie czynnych związków (*ang.* Cargo lub “ładunek”). Znane są połączenia CPP z następującymi substancjami: białkami [65], oligopeptydami [138], siRNA [83,84], kwasami peptydonukleinowymi [139], oligonukleotydami [140], czy też nanocząstkami [102].

Należy jednak zauważyć, że jak do tej pory żaden koniugat peptydu penetrującego z lekiem nie wyszedł poza pierwszą i drugą fazę testów klinicznych [141].

Tworzenie koniugatów pomiędzy peptydem a „ładunkiem” może następować poprzez tworzenie wiązań jonowych lub kowalencyjnych. W przypadku wiązania kowalencyjnego najprostszą metodą jest utworzenie wiązania peptydowego, amidowego lub estrowego pomiędzy CPP a związkami, którego przenikalność ma zostać zwiększona. „Ładunek” wewnątrz komórki zostaje odszczepiony na drodze cięcia enzymatycznego. Innym sposobem jest wprowadzanie na koniec sekwencji reszty L-cysteiny, która tworzy wiązanie disulfidowe z grupą tiolową „ładunku”, a rozerwanie tego wiązania ma miejsce w redukującym środowisku cytoplazmy [142].

Kompleksy jonowe mogą być tworzone pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych (również N-końcem sekwencji), a ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi, sulfonowymi lub karboksylowymi „ładunku”. Szczególnie pożądane w strukturze peptydu są grupy guanidynowe (Rys. 22). Badania nad połączeniem jonowym oktaargininy z fosfidomycyną – inhibitorem enzymatycznym o strukturze aminokwasowej – wykazały, że koniugat był efektywnie transportowany do komórek bakteryjnych; skuteczniej niż w przypadku analogicznego połączenia wiązaniem kowalencyjnym [143].



Rys. 22. Schemat wiązań wodorowych pomiędzy grupą guanidynową a grupą fosforanową [100].

W literaturze ciągle przybywa doniesień o związkach, których koniugaty z CPP charakteryzowały się zwiększoną przenikalnością przez błony komórkowe, a tym samym poprawiły ich działanie. Jednym z przykładów może być dostarczanie fragmentów DNA (w postaci niekowalencyjnych koniugatów) do komórek eukariotycznych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Stwarza to możliwość zastosowania CPP w terapii genowej [144]. W tym wypadku peptydy penetrujące wydają się konkurować z wektorami wirusowymi, których wykorzystanie natrafia na takie

problemy jak immunogenność, toksyczność oraz ograniczenia w produkcji na większą skalę [145].

Peptydy penetrujące w podobny sposób mogą zostać wykorzystane do transportu siRNA. Eksperymentuje się z połączeniami kowalencyjnymi, ale mimo wszystko koniugaty jonowe wykazują lepszą wydajność [146]. Badania udowodniły, że podawanie dożylnie koniugatu peptydu MPG z siRNA cykliny B1 (białko pełniące ważną rolę w cyklu komórkowym) powodował zahamowanie wzrostu nowotworu [147].

Wykorzystanie CPP do transportu białek wydaje się wręcz intuicyjne. Badania pokazały, że mogą to być nawet bardzo duże cząsteczki jak np. β -galaktozydaza (117 kDa). Koniugat taki przenikał do wszystkich komórek myszy, także do mózgu [65]. Większość koniugatów tego rodzaju jest tworzona poprzez wiązania kowalencyjne. Niestety aktywność białek wiąże się z ich strukturą wyższej rzędową, która może zostać zaburzona w czasie tworzenia koniugatów lub podczas transportu przez błonę komórkową, a to może znacznie obniżyć skuteczność leku.

Prowadzone są również badania nad zwiększeniem przenikalności przez błony nanocząstek. Ich koniugaty z CPP mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów, infekcji drobnoustrojowych czy jako kontrast w badaniach rezonansem magnetycznym. Przykładem może być superparamagnetyczny tlenek żelaza połączony z polimerem, na którego powierzchni osadzono łańcuchy peptydu Tat. Badania przeprowadzone na linii komórek Caco-2 (z gruczołaka jelita grubego) pokazały, że taki koniugat wykazał znacznie większą przenikalność niż nanocząsteczki pozbawione peptydu Tat [148].

Ponadto prowadzono badania nad efektywnością połączonych z peptydami penetrującymi potencjalnych leków takich, jak np. koniugaty δ -peptydowego inhibitora kinazy proteinowej C z peptydem Tat, mogącym znaleźć zastosowanie w leczeniu ostrego zawału serca [149], czy koniugat cyklosporyny i poliargininy, który wykazuje pewien potencjał w leczeniu łuszczycy [150].

II Cel i zakres pracy

Głównym celem badań, których wyniki opisano w niniejszej pracy doktorskiej, była synteza wybranych peptydów penetrujących oraz ich koniugatów z inhibitorami enzymatycznymi o strukturze aminokwasowej jako potencjalnych związków o działaniu przeciwgrzybowym.

Realizacja tego celu wymagała:

- opracowania metod syntezy substratów niezbędnych do otrzymywania koniugatów, przede wszystkim odpowiednio chronionych związków biologicznie czynnych;
- opracowania i optymalizacji metod syntezy połączeń CPP z w/w związkami biologicznie aktywnymi;
- przekazania otrzymanych koniugatów CPP z inhibitorami do badań biologicznych

W zakres przeprowadzonych badań wchodziły następujące zadania szczegółowe:

- synteza na fazie stałej (SPPS) wyselekcjonowanych peptydów penetrujących w dwóch wersjach: z wolną grupą karboksylową oraz w postaci amidów;
- synteza koniugatów w/w peptydów z kwasem N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowym (FMDP) i amidem N^3 -(4-metoksyfumaroiło)-L-2,3-diaminopropanowym (FMDP-NH₂), kwasem *E-N*-(4-okso-4-fenyl-2-butenoiło)-L-2,3-diaminopropanowym (BADP) oraz (1*R*,2*S*)-*cis*-pentacyną na N- lub C-końcu łańcucha peptydowego;
- synteza koniugatów wybranych peptydów z 5(6)-karboksyfluoresceiną;
- identyfikacja związków przy użyciu spektrometrii mas;
- oczyszczanie preparatów przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC);
- synteza pochodnych FMDP, *cis*-pentacyny oraz aminokwasów – substratów do otrzymywania w/w koniugatów.

III Omówienie wyników i dyskusja

Na chwilę obecną istnieje stosunkowo niewiele leków o działaniu przeciwgrzybowym, które można, bezpiecznie dla pacjentów, stosować w leczeniu grzybic układowych. Wspomnianych wcześniej przyczyn takiego stanu rzeczy jest wiele, jak chociażby duża cytotoksyczność dla komórek ludzkich, wąskie spektrum działania tych leków oraz szybkie nabywanie lekooporności przez wcześniej skutecznie leczone szczepy grzybów. Dlatego wprowadzenie nowych, skutecznych związków o działaniu przeciwgrzybowym mogłoby zapełnić tę lukę. Związki takie, jak FMDP czy BADP jako silne, nieodwracalne inhibitory syntazy glukozamino-6-fosforanu mogłyby stać się potencjalnymi lekami. Niestety ze względu na słabą przenikalność przez błony biologiczne nie znajdują takiego zastosowania. Dlatego od lat poszukiwane są metody wprowadzania tych związków do komórek grzyba. Część z tych sposobów okazała się nietrafiona, zaś inne, pomimo że skuteczne w badaniach, na dłuższą metę nie mogą być stosowane ze względu na szybko nabywaną oporność komórek grzybów.

Zainspirowani badaniami nad peptydami penetrującymi, postanowiliśmy sprawdzić możliwości wprowadzania do komórek grzyba wspomnianych inhibitorów, wykorzystując drogi transportowe peptydów penetrujących. Dzięki takiemu zabiegowi z jednej strony omija się problem wysokiej polarności cząsteczek inhibitorów, a jednocześnie komórki grzybowe nie powinny nabywać oporności, ponieważ transport CPP odbywa się, między innymi, na drodze bezpośredniego przenikania przez błonę komórkową, a w związku z tym komórka nie ma żadnej możliwości regulowania tego procesu. Dotychczasowe badania nad CPP donoszą, że większość peptydów tego rodzaju nie jest sama w sobie szkodliwa dla komórek ssaczych lub ma niewielką toksyczność [141], co ułatwiłoby ich zastosowanie kliniczne.

Budowa peptydów penetrujących pozwala na łatwe łączenie ich ze wspomnianymi inhibitorami, które mają strukturę *N*-acylowanych α -aminokwasów. Dlatego w trakcie syntezy, odpowiednio chronioną cząsteczkę inhibitora można potraktować jak kolejny aminokwas przyłączany do sekwencji.

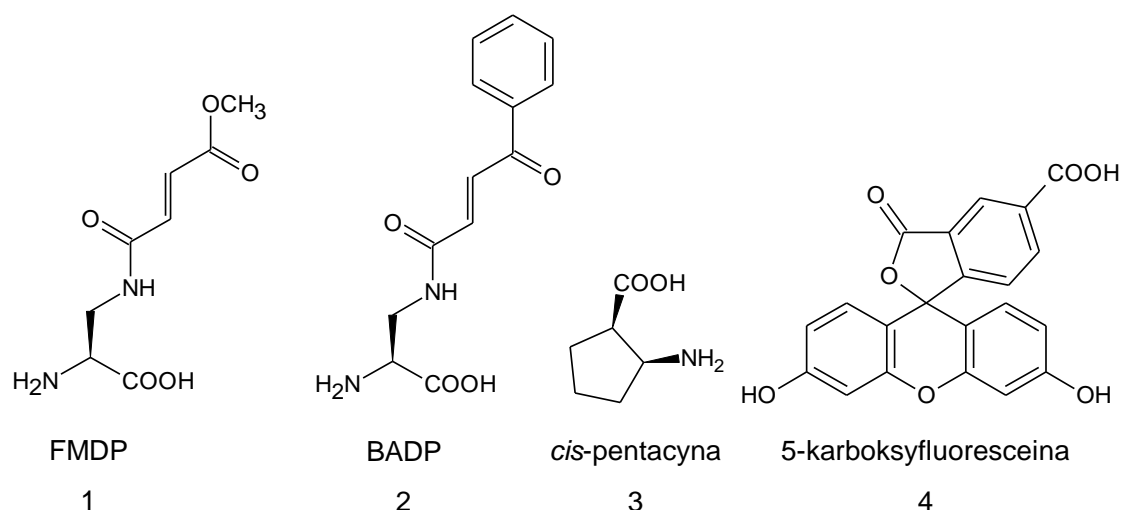
Jako, że inhibitory zostały wybrane, należało znaleźć najbardziej optymalny peptyd, który mógłby stanowić dla nich nośnik. Na podstawie przeglądu literaturowego wytypowałem kilka sekwencji CPP o różnym charakterze i mechanizmach przenikania

[101,151–153]. Przyjąłem ponadto założenie, że CPP mające być nośnikami dla FMDP i innych związków powinny być stosunkowo krótkie (5 – 11 reszt aminokwasowych). W trakcie badań listę tę rozszerzyłem o kolejne pochodne (Tabela 2), które pozwalały powiększyć wachlarz otrzymanych koniugatów, co z kolei dawało szansę na otrzymanie lepszych rezultatów [154].

Tabela 2. Otrzymane sekwencje peptydów penetrujących wykorzystanych do syntezy koniugatów z inhibitorami.

PEPTYD	SEKWENCJA	SKRÓT	OPIS
„Małe peptydy penetrujące”	VPMLK VPMLK-NH₂	P1 P1N	Syntetyczne peptydy zbudowane jedynie z pięciu reszt aminokwasowych, nietoksyczne dla człowieka.
	KLPVM KLPVM-NH₂	P2 P2N	
Dekapeptyd KSL-W	KKVVFVVKFK KKVVFVVKFK-NH₂	P3 P3N	Syntetyczny peptyd o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Nie wykazuje toksyczności dla komórek ludzkich.
Peptyd TAT ⁴⁹⁻⁵⁷	RKKRRQRRR RKKRRQRRR-NH₂	P4 P4N	Peptyd o udowodnionej dobrej przenikalności przez błony komórkowe.
Oktaarginina R ₈	RRRRRRRR (plus sekwencja zbudowana z D-aminokwasów)	R₈ D-R₈	Syntetyczne, silnie kationowe analogi opracowane na bazie peptydu TAT.
Nonalizyna K ₉	KKKKKKKKK	K₉	
Peptyd PAF 26	RKKWFW RKKWFW-NH₂	P5 P5N	Kationowy peptyd o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.
Analogi peptydu PAF26	RRRFFF RRRFFF-NH₂	RF RFN	Omawiane wcześniej właściwości penetrujące często zależą od obecności w sekwencji reszt Arg/Lys wraz z Trp/Phe. Te peptydy to uproszczona wersja PAF 26, które zbudowane są wyłącznie z wymienionych aminokwasów
	FFRRR FFRRR-NH₂	FR FRN	
	KKKWWW	KW	
	RRRWWW	RW	
Peptyd bogaty w prolinę	VRLPPP VRLPPP-NH₂	P6 P6N	Wykazana dobra przenikalność

W toku badań zsyntetyzowałem koniugaty wymienionych wyżej peptydów (Tabela 2) z: inhibitorami syntazy GlcN-6-P (**Rys. 23, 1 i 2**), *cis*-pentacyną (**Rys. 23, 3**) i 5(6)-karboksylfluoresceiną (FAM) (**Rys. 23, 4**), stosując różne warianty syntezy oraz miejsca połączeń CPP z inhibitorami. Ponadto założyłem, że inhibitory będą połączone z CPP wiązaniem amidowym mogącym ulegać hydrolizie wewnątrz komórek.



Rys. 23. Związki, które przyłączano do peptydów penetrujących

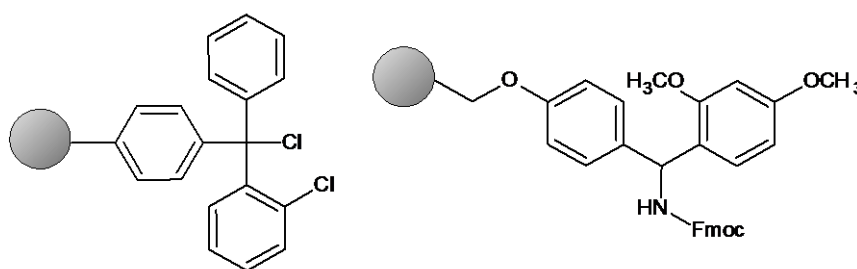
W konsekwencji w trakcie badań otrzymałem dwadzieścia jeden bazowych peptydów o potencjalnych właściwościach penetrujących, z których sześć jest nowych, nieopisanych w literaturze. Ponadto otrzymałem trzydzieści dwa ich koniugaty na N-końcu, sześć na C-końcu i dwa w bocznym łańcuchu sekwencji peptydowej z FMDP **1**, BADP **2**, *cis*-pentacyną **3** oraz 5(6)-karboksylfluoresceiną (FAM) **4**. Dodatkowo otrzymałem dwa połączenia jonowe oktaargininy z FMDP oraz 6-fosforanem D-aminoglukitolu.

1. Synteza peptydów penetrujących i ich koniugatów z inhibitorami

1.1. Synteza na nośniku stałym (SPPS) peptydów penetrujących i ich koniugatów z inhibitorem na N-końcu sekwencji

Oligopeptydy o sekwencjach wymienionych w Tabeli 2 otrzymałem w postaci niezmodyfikowanej oraz większość w postaci amidu, aby stanowiły odnośniki w badaniach biologicznych.

Stosowałem manualną syntezę na fazie stałej wykorzystując strategię Fmoc/t-Bu. Używałem żywicy chloro-2'-chlorotrytylowej (stopień osadzenia 1,6 mmol/g) oraz żywicy Amide Rink (stopień osadzenia 0,71 mmol/g) (Rys. 24). W przypadku pierwszej żywicy osadzenie pierwszego aminokwasu odbywało się w obecności czterokrotnego ekwiwalentu molowego DIPEA przez 2 godziny. Stosowanymi rozpuszczalnikami w reakcjach oraz cyklach przemywania były DMF oraz DCM. W przypadku żywicy amidującej osadzenie pierwszego aminokwasu nie różni się od przyłączania kolejnych – żywica zabezpieczona jest osłoną typu Fmoc, którą należy zdjąć i przystąpić do reakcji kondensacji aminokwasu.

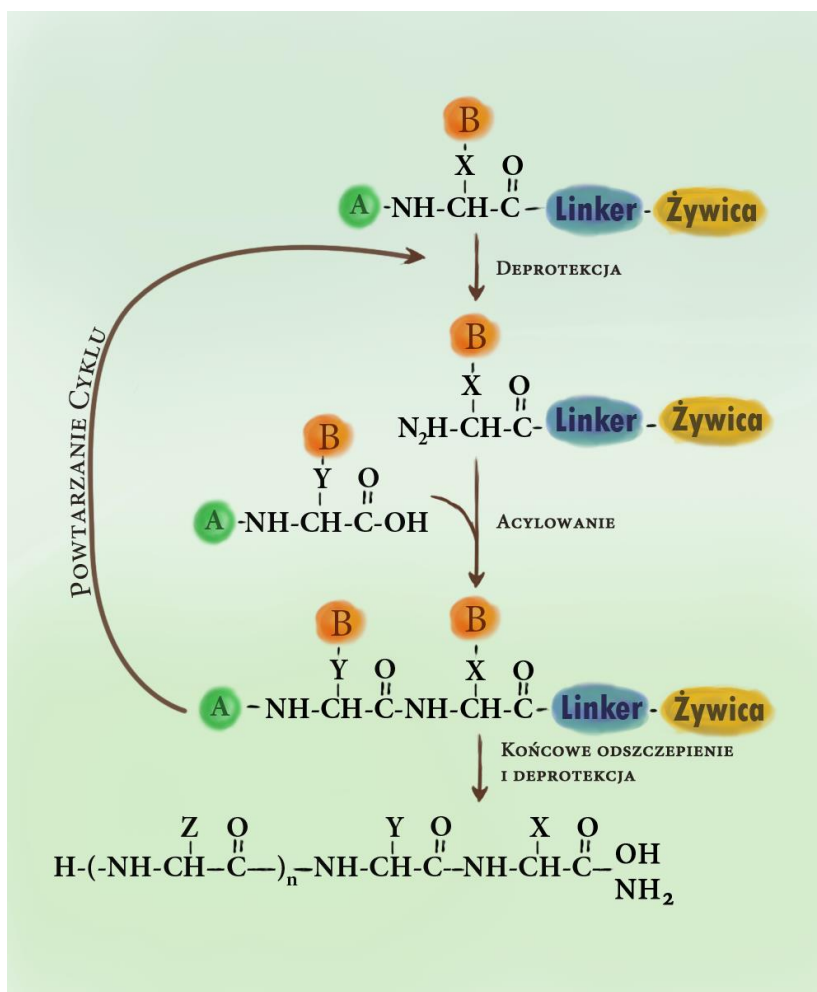


Rys. 24. Schemat linkera żywicy chloro-2'-chlorotrytylowej (z lewej) oraz Amide Rink (z prawej)

W obu przypadkach kondensację przeprowadzałem przy zastosowaniu mieszaniny 2,5-krotnego molowego nadmiaru HOBt (1-hydroksybenzotriazol) i DIC (*N,N'*-diizopropylkarbodiimid) w reakcji z 2,5-krotnym nadmiarem odpowiedniego aminokwasu. Reakcja prowadzona była przez 90 minut. Wydłużanie łańcucha następowało w cyklach, jak to przedstawiłem na Rys. 25.

Potwierdzeniem prawidłowego przebiegu reakcji był test chloranilowy, czyli poddanie niewielkiej ilości żywicy reakcji z 2% roztworem chloranilu w DMF oraz 2% roztworem aldehydu octowego w DMF. W przypadku obecności wolnych grup aminowych po kilku minutach ziarna żywicy zmieniały barwę, przeważnie na zieloną

bądź granatową. W przypadku chronionych grup aminowych opisana reakcja nie zachodzi.



Rys. 25. Kolejne kroki w syntezie peptydów na nośniku stałym; A – ugrupowanie ochronne grupy α -aminowej, B – ortogonalne do osłony A ugrupowanie ochronne grup funkcyjnych łańcucha bocznego aminokwasu

Przed rozpoczęciem odłączania peptydu od żywicy należało zdjąć osłonę Fmoc z N-końcowej grupy aminowej; w przypadku koniugatów z grupą Boc pomijałem ten etap, gdyż jest ona odporna na działanie kwaśnego środowiska. Następnie przeprowadzałem odszczepienie peptydu z nośnika stosując mieszaninę zawierającą kwas trifluoroctowy, fenol, triizopropylometylosilan oraz wodę. Reakcję prowadziłem 1,5 godziny. W przypadku związków zawierających reszty argininy reakcja uwalniania peptydu z nośnika przebiegała dłużej czyli 2 do 2,5 godziny ze względu na możliwość retencji osłony Pbf. Roztwór peptydu wkraplałem do zimnego eteru dietylowego,

a powstały osad odwirowałem zlewając supernatant. Po wysuszeniu i zliofilizowaniu otrzymanego produktu mógł on być poddany analizie i oczyszczaniu.

Po zsyntetyzowaniu niezbędnych ilości FMDP otrzymałem koniugaty, gdzie inhibitor umieszczony był na N-końcu sekwencji. Synteza okazała się mało problematyczna, ponieważ budowa (*N*-acyloaminokwas) i właściwości Boc-FMDP pozwalały na jego przyłączenie do sekwencji tak, jak każdego innego substratu aminokwasowego, zaś osłona Boc sekwencji grupy aminowej FMDP była zdejmowana podczas procesu odszczepiania koniugatu z żywicy. W celach porównawczych otrzymałem kilka N-koniugatów z innymi inhibitorami – BADP oraz z *cis*-pentacyną, która ma udowodnione działanie przeciwgrzybowe [24].

Aby potwierdzić przenikalność do komórek grzybowych peptydów penetrujących otrzymałem koniugaty z przyłączoną do N-końca łańcucha peptydowego 5(6)-karboksylfluoresceiną (FAM) stosując analogiczną metodę syntezy. Pierwotnie próbowałem znaczyć peptydy izotiocjanianem fluoresceiny (FITC). Jednak zastosowanie popularnego FIC okazało się utrudnione ze względu na konieczność stosowania dodatkowych linkerów.

Dla jednego z peptydów, dla którego wyniki badań koniugatów wydawały się obiecujące (**P3**), otrzymałem również koniugat, w którym inhibitor został przyłączony do łańcucha bocznego lizyny znajdującej się na N-końcu sekwencji. W tym przypadku przyłączanie *N*^α-Boc-lizyny do *N*^α-FMDP przeprowadziłem w roztworze, a następnie stosując standardową strategię Fmoc wprowadziłem otrzymaną cząsteczkę – *N*^α-Boc-Lys(FMDP)-OH do sekwencji CPP.

Ponieważ badania pokazują, że peptydy, które na C-końcu posiadają grupę amidową są mniej podatne na proteolizę w organizmie [155], postanowiłem zsyntetyzować kilka koniugatów w takiej postaci, aby przekonać się czy będzie to miało wpływ na ich aktywność przeciwgrzybową. Wymagało to zastosowania odpowiedniej żywicy, a mianowicie Amide Rink, która podczas odszczepiania peptydu z nośnika pozostawia na C-końcu grupę amidową.

W wyniku syntez prowadzonych metodą SPPS otrzymałem trzydzieści trzy następujące koniugaty z fragmentem biologicznie czynnym na N-końcu sekwencji:

- **FMDP-P1**
- **FMDP-P2**
- **FMDP-P3**
- **FMDP-P3**
- **FMDP-P4**
- **FMDP-P5**
- **FMDP-P6**
- **FMDP-RW**
- **FMDP-KW**
- **FMDP-R₈**
- **FMDP-D-R₈**
- **FMDP-K₉**
- **Ac-FMDP-P5**
- **BADP-P1**
- **BADP-P5**
- **cisP-P5**
- **FMDP-Lys(Mca)-Lys-Val-Phe-Trp-Val-Lys-Phe-Lys**
- **Ac-cisP-P5**
- **FAM-P3**
- **FAM-P5**
- **FAM-P5N**
- **FAM-R₈**
- **FAM-KW**
- **FAM-RW**
- **FMDP-P1N**
- **FMDP-P2N**
- **FMDP-P3N**
- **FMDP-P4N**
- **FMDP-P5N**
- **FMDP-P6N**
- **cisP-P5N**
- **FMDP-RFN**
- **FMDP-FRN**

1.2. Próby syntezy koniugatów nośników z inhibitorami na C-końcu sekwencji metodą SPPS

W związku z tym, że wcześniej przeprowadzone badania wykazały, iż dipeptydy połączone z FMDP wykazują lepsze właściwości przeciwgrzybowe, gdy inhibitor ma wolną grupę karboksylową [47] postanowiłem otrzymać również koniugaty peptydowe z FMDP przyłączonym do C-końca łańcucha peptydowego. Pierwotnie do tego celu chciałem zaadoptować metodę syntezy na nośniku stałym. Jednak okazało się to nie tak prostym zadaniem jak otrzymywanie N-końcowych koniugatów. Otrzymane przeze mnie Fmoc-FMDP, musiało być jako pierwsze przyłączone do żywicy, ponieważ syntezę według stosowanej strategii prowadzi się od C- do N-końca. Niestety tą drogą nie udało się otrzymać nie tylko prostego dipeptydu Ala-FMDP, ale nawet przyłączenie do nośnika, a następnie uwolnienie z niego FMDP prowadziło do skomplikowanej

mieszaniny związków pochodzących z rozkładu inhibitora. Okazało się, że FMDP jest nietrwałe w środowisku deprotekcji osłony typu Fmoc (20% piperydyna w DMF). Wymagało to całkowitej zmiany podejścia do problemu i zastosowania mniej konwencjonalnych metod syntezy w/w koniugatów.

1.3. Synteza w roztworze koniugatów nośników z inhibitorami na C-końcu sekwencji

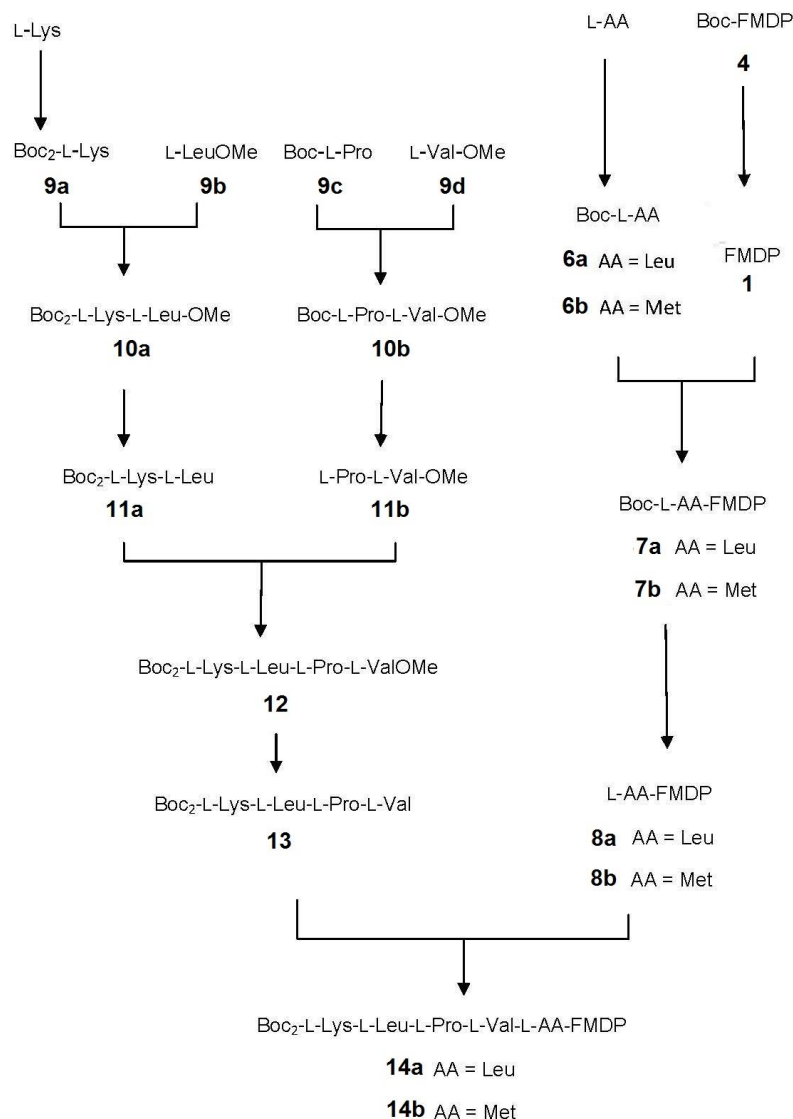
1.3.1. Synteza „klasyczna” C-końcowych koniugatów

Synteza w roztworze koniugatów nośników z inhibitorami na C-końcu sekwencji została przeprowadzona we współpracy z magistrantką, p. Joanną Skok. Stosowana początkowo metoda mieszanych bezwodników prowadziła do produktów z bardzo małą wydajnością, pomimo długiego czasu reakcji. Lepsze rezultaty udało się osiągnąć przy zastosowaniu aktywacji w postaci estrów z *N*-hydroksysukcynimidem. Jako nośniki wykorzystano krótkie peptydy (KLPVM i KLPVL), a aminokwasy wykorzystywane w syntezie, poza lizyną, w łańcuchach bocznych nie posiadały grup funkcyjnych, które wymagałyby stosowania dodatkowych grup ochronnych. Zastosowanie tej metody do syntezy dłuższych peptydów, zwłaszcza zawierających liczne reszty argininy, lizyny i tryptofanu nie zdałoby egzaminu.

Stosując „klasyczną” metodę syntezy, otrzymaliśmy dwa analogi pentapeptydu zawierające FMDP lub FMDP-NH₂ na C-końcu łańcucha peptydowego o następujących sekwencjach:

- **Lys-Leu-Pro-Val-Leu-FMDP 14a**
- **Lys-Leu-Pro-Val-Met-FMDP 14b**
- **Lys-Leu-Pro-Val-Met-FMDP-NH₂ 14c**

Przyjęta przez nas strategia syntezy pentapeptydów polegała na połączeniu ze sobą dwóch wcześniej otrzymanych i odpowiednio chronionych dipeptydów: Lys-Leu **11a** oraz Pro-Val **11b**. Jednocześnie prowadziliśmy reakcje sprzęgania chronionej metioniny **6a** lub leucyny **6b** z solą FMDP **1** lub amidem FMDP **5** (Rys. 26).



Rys. 26. Schemat klasycznej syntezy C-końcowych koniugatów CPP z FMDP

Syntezę pentapeptydu rozpoczęliśmy od wprowadzenia grupy ochronnej *tert*-butoksykarbonylowej (Boc) na atomy azotu oraz estryfikacji grup karboksylowych odpowiednich aminokwasów. W przypadku lizyny grupę ochronną należało założyć, zarówno na grupę α -aminową, jak i na tę w łańcuchu bocznym. Była to standardowa reakcja polegająca na wkraplaniu roztworu pirowęglaanu di-*tert*-butylu (Boc₂O) w dioksanie do wodnego roztworu aminokwasu w wodzie w obecności węglanu sodu. Aby osłonić obie grupy aminowe użyliśmy dwukrotnego ekwiwalentu molowego pirowęglaanu względem aminokwasu. Reakcja jednoczesnego zakładania obydwu osłon

zaszła z zadawalającą wydajnością 63%, a produkt **9a** otrzymaliśmy w postaci bezbarwnego oleju.

Estry metylowe **9b** i **9d** zsyntetyzowaliśmy w bezpośredniej estryfikacji aminokwasów metanolem wobec katalitycznych ilości chlorku tionylu.

Porównaliśmy dwa sposoby tworzenia wiązań peptydowych, a mianowicie metodę mieszanych bezwodników oraz estrów aktywnych.

Syntezę dipeptydu (Boc)₂-Lys-Leu-OMe **10a** metodą mieszanych bezwodników przeprowadziliśmy w bezwodnym THF, świeżo destylowanym z nad LiAlH₄. Reakcja otrzymywania mieszanego bezwodnika polegała na kondensacji chloromrówczanu izobutyli z *N*-chronionym aminokwasem w obecności trietyloaminy w celu zobojętnienia wydzielającego się HCl. Wkraplanie roztworu drugiego aminokwasu w THF odbywało się w temperaturze poniżej 0°C, w wyniku czego dochodziło do mętnienia roztworu. Koniec reakcji sprzęgania oraz czystość surowego produktu ocenialiśmy na podstawie analizy TLC. Otrzymany produkt w postaci oleju, który oczyszciliśmy z wykorzystaniem kolumnowej preparatywnej chromatografii cieczowej, był analizowany metodami spektroskopowymi.

W analogiczny sposób otrzymaliśmy kolejny dipeptyd o sekwencji Boc-Pro-Val-OMe **10b**. Surowy produkt dwukrotnie oczyszczaliśmy chromatograficznie w układach o różnych polarnościach ze względu na dużą rozbieżność współczynników R_f produktów ubocznych. Otrzymaliśmy czysty produkt z wydajnością 71%.

Kolejno, aby połączyć otrzymane związki w tetrapeptyd (Boc)₂-Lys-Leu-Pro-Val-OMe **12** należało „zdząć” ochrony grup funkcyjnych: *tert*-butoksykarbonylową oraz ester metylowy z wyjściowych dipeptydów.

Zdjęcie ochrony metylowej przeprowadziłem w oparciu o przepis opisany wcześniej w literaturze [156]. Reakcja polegała na rozpuszczeniu w bezwodnym eterze dietylowym peptydu **11a** oraz trimetylosilanolanu potasu. Na podstawie analiz TLC ustaliliśmy, że reakcja przebiegła całkowicie dopiero po trzech dobach. Aby uzyskać produkt z wolną grupą karboksylową przeprowadziliśmy standardowe czynności prowadzące do uwolnienia peptydu z jego soli sodowej. Metoda ta okazała się niestety mało wydajna (35% końcowego produktu). W kolejnych próbach estry metylowe **8a** i **9** zmydlaliśmy klasycznie 1M roztworem wodno-metanolem (1:1 v/v) NaOH.

Zdejmowanie ochrony Boc z dipeptydu **10b** przeprowadziliśmy wykorzystując bezwodny metanol wysycony HCl (5,77 g HCl/150 mL metanolu). Produkt Pro-Val-OMe **11b** z wolnym *N*-końcem uzyskaliśmy po 5 godzin. Reakcja zaszła z wydajnością 98%.

Reakcję łączenia dwóch dipeptydów w tetrapeptyd (Boc)₂-Lys-Leu-Pro-Val-OMe **12** również przeprowadziliśmy metodą mieszanych bezwodników. Surowy, oleisty produkt **12** oczyściliśmy wykorzystując chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym.

Próby przyłączenia estru metylowego metioniny do otrzymanego tetrapeptydu **13** zakończyły się niepowodzeniem; proces ten doprowadził do powstania wielu produktów ubocznych, a oczyszczanie powstałego pentapeptydu metodą chromatografii kolumnowej nie powiodło się. Tak niejednoznaczny przebieg reakcji sprzęgania najprawdopodobniej był spowodowany obecnością w strukturze peptydu atomu siarki z niewiążącą parą elektronową, która mogła reagować z powstającymi produktami oraz z substratami.

Zastosowaliśmy zatem inne podejście w celu otrzymania pożądanego produktu. Uzyskaliśmy FMDP z wolną grupą aminową, zarówno w postaci natywnej, jak i w postaci soli sodowej. FMDP połączyliśmy metodą mieszanych bezwodników z Boc-Met **6b** lub Boc-Leu **6a** uzyskując odpowiednio Boc-Met-FMDP **7b** lub Boc-Leu-FMDP **7a**. Tak otrzymane dipeptydy **7** kondensowaliśmy z wcześniej zsyntetyzowanym tetrapeptydem **13** otrzymując koniugat **14a** i **b**. Analogiczne reakcje przeprowadziliśmy dla FMDP-NH₂ **5** i otrzymaliśmy koniugat **14c**.

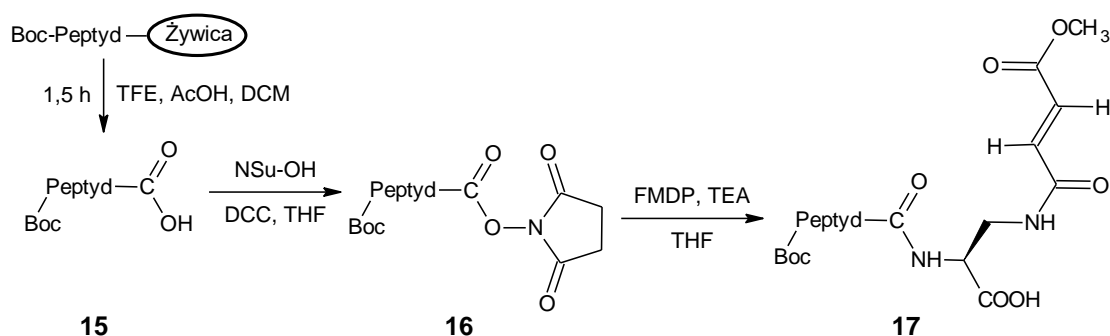
Ponadto, tak jak wspomniałem, dla porównania przeprowadziliśmy syntezę Boc-Met-FMDP **7b** oraz tetrapeptydu **13** stosując metodę estrów aktywnych – *N*-hydroksysukcynimidylowych. W pierwszym etapie otrzymaliśmy ester aktywny aminokwasu z chronioną grupą aminową. Reakcja przebiegała pomiędzy równomolowymi ilościami aminokwasu z chronioną grupą aminową i *N*-hydroksysukcynimidem w świeżo przedestylowanym THF. Po odsączeniu powstałego osadu dicykloheksylomocznika z przesączu izolowaliśmy krystaliczne estry aktywne *N*-chronionych aminokwasów lub peptydów.

Otrzymane estry aktywne łączyliśmy z odpowiednim aminokwasem, bądź peptydem z wolną grupą aminową. Reakcje sprzęgania prowadzone były w roztworze

THF w temperaturze pokojowej. Proces sprzęgania z udziałem estrów *N*-hydroksysukcynimidylowych aminokwasów w każdym przypadku przebiegał z wydajnościami rzędu 70-90%, co czyni tę metodę znacznie wydajniejszą w porównaniu z przeprowadzonymi, analogicznymi syntezami metodą mieszanych bezwodników. Produkty można było stosunkowo łatwo oczyścić, wykorzystując chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym. Ze względu na niższą reaktywność, a co za tym idzie większą selektywność estrów, produkt główny był zanieczyszczony w mniejszym stopniu. Część produktów otrzymaliśmy w postaci krystalicznej. Struktury wszystkich otrzymanych związków potwierdziłem metodami spektroskopowymi.

1.3.2. „Mieszana” synteza w roztworze koniugatów nośników z inhibitorami na C-końcu sekwencji

W związku z ograniczeniami opisanymi w poprzednim paragrafie, postanowiłem otrzymać koniugaty z C-końcowym FMDP poprzez kombinację dwóch metod syntezy (Rys. 27). W pierwszym etapie otrzymywałem CPP na nośniku stałym (schemat syntezy peptydów na żywicy przedstawiony został na Rys. 25), a następnie zdejmowałem związki z żywicy w ten sposób, aby zostały zachowane wszystkie ugrupowania ochronne łańcuchów bocznych i terminalnej grupy aminowej. W drugim etapie wykorzystując doświadczenia z syntezy klasycznej przyłączałem w roztworze do chronionego CPP sól FMDP.



Rys. 27. Schemat metody przyłączania FMDP na C-końcu peptydu z retencją osłon grup funkcyjnych

Taka strategia wymagała ode mnie przede wszystkim opracowania optymalnej metody odszczepienia z nośnika peptydów z zachowanymi grupami ochronnymi łańcuchów bocznych oraz końcowej grupy aminowej, ponieważ wolne grupy aminowe (lub ugrupowanie guanidynowe arginy) mogłyby wchodzić w reakcję konkurencyjną

do grupy aminowej FMDP z estrami aktywnymi **16**. Z drugiej strony, zachowanie osłon na reszcie tryptofanu również jest istotne ze względu na wrażliwość pierścienia indolowego na utlenianie, co mogło mieć znaczenie podczas prowadzenia długotrwałych reakcji z FMDP.

Stosowana przeze mnie żywica chloro-2'-chlorotrytylowa jest bardzo wrażliwa na środowisko kwaśne, zaś większość osłon łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych jest w miarę odporna na obniżone pH środowiska lub krótkotrwałe wyższe stężenia kwasu (dla argininy stosowałem osłonę Pbf, zaś dla lizyny i tryptofanu Boc). Dlatego do procesu odszczepienia można było zastosować stosunkowo łagodną mieszaninę, która w krótkim okresie nie powodowałaby „deprotekcji” reszt aminokwasowych danej sekwencji. Wykorzystywane początkowo przeze mnie roztwory kwasu trifluoroctowego o niskim stężeniu (1% w DCM) powodowały częściowe usuwanie grup ochronnych łańcuchów bocznych (nawet w przypadku oktaargininy, gdzie stosunkowo trwała osłona Pbf ulegała zdjęciu na jednej lub dwóch resztach argininy w sekwencji). Podobnie działo się przy zastosowaniu 50% kwasu octowego w DCM. Skrócenie czasu odłączania doprowadzało do spadku wydajności reakcji. Po przetestowaniu kilku standardowych układów, postanowiłem wykorzystać do procesu odszczepiania peptydów z żywicy, roztworów zawierających w swoim składzie trifluoroetanol (TFE), który z jednej strony wykazuje dość łagodny kwasowy charakter, a z drugiej jest dobrym rozpuszczalnikiem dla wszelkiego rodzaju peptydów. W wyniku systematycznych badań, najodpowiedniejszym okazał się roztwór kwasu octowego i TFE w DCM (2:1:7 v/v). Reakcję, w zależności od rodzaju odszczepianego peptydu, prowadziłem przez 1 do 1,5 godziny. Według standardowej procedury roztwór peptydów po odszczepieniu wkrapla się do zimnego eteru celem wytrącenia; ale w przypadku peptydów silnie niepolarnych może się zdarzyć, że związek okaże się rozpuszczalny i w takiej mieszaninie. W przypadku zsyntezowanych przeze mnie peptydów ten problem nie wystąpił – otrzymywałem chronione peptydy w postaci stałej. Tak otrzymane chronione peptydy ze względu na wspomnianą niską polarność, znacząco ograniczały wybór rozpuszczalników do przeprowadzenia reakcji z FMDP, którego polarność, z kolei, jest stosunkowo duża. Ponadto ze względu na wielkość CPP, zawady steryczne i niską polarność nie wszystkie peptydy udało się przeprowadzić w formę estru aktywnego, niezależnie czy był stosowany *N*-hydroksysuccynimid

z *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidem, czy TDBTU. Zastosowanie linkera w postaci dodatkowej reszty alaniny na C-końcu ułatwiło sytuację np. w przypadku oktaargininy. W ten sposób otrzymałem:

- **Ac-[Arg(Pbf)]₈**
- **Ac-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Phe-Trp(Boc)**
- **Boc-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Phe-Trp(Boc)**
- **Boc-[Arg(Pbf)]₃Phe₃**
- **Boc-[Lys(Boc)]₃[Trp(Boc)]₃**

Część omawianych syntez wykonałem we współpracy z magistrantką p. Małgorzatą Sikorską.

W celu otrzymania estrów *N*-hydroksysukcynimidylowych **16** wcześniej zsyntetyzowane na nośniku chronione peptydy **15** poddawaliśmy reakcji kondensacji z *N*-hydroksysukcynoimidem. Jako czynnik sprzęgający, wykorzystywaliśmy *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC). Reakcje prowadziliśmy w bezwodnym THF najpierw w łaźni lodowej przez 30 minut, a następnie przez 24h w temperaturze pokojowej. Produkty izolowaliśmy w standardowy sposób i identyfikowaliśmy za pomocą spektrometrii mas. Otrzymaliśmy następujące estry sukcyimidylowe:

- **Boc-[Arg(Pbf)]₈-Ala-NSu**
- **Ac-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Phe-Trp(Boc)-NSu**
- **Boc-[Lys(Boc)]₃[Trp(Boc)]₃-NSu**
- **Boc-[Arg(Pbf)]₃(Phe)₃-NSu**
- **Boc-Phe₃[Arg(Pbf)]₃-NSu**

Aby otrzymać koniugaty z C-końcowym FMDP, otrzymane estry aktywne **16** poddaliśmy reakcji sprzęgania z chlorowodorkiem FMDP, bądź chlorowodorkiem FMDP-NH₂ w obecności TEA (trietyloaminy). Reakcja była prowadzona przez 24h, a jej postęp był monitorowany przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Po zakończeniu reakcji izolowaliśmy w standardowy sposób chronione C-koniugaty FMDP lub jego amidu. Po usunięciu w standardowych warunkach wszystkich grup ochronnych otrzymywałem koniugaty z FMDP na C-końcu sekwencji.

Jedna z zaplanowanych modyfikacji syntetyzowanych peptydów penetrujących polegała na wprowadzeniu reszty acetylowej na grupę aminową, a następnie

przyłączenie FMDP do C-końca otrzymanego związku. Aby zrealizować takie założenie, po przyłączeniu ostatniego aminokwasu z grupą Fmoc na N-końcu, usunąłem tę osłonę za pomocą piperydyny. Następnie przeprowadziłem reakcję acetylowania wykorzystując mieszaninę DCM:DMF:DIPEA:Ac₂O (5:5:1:1 v/v/v/v). Po zakończeniu reakcji, odszczepiałem *N*-acetylo-CPP zgodnie z opracowaną procedurą odszczepiania peptydu z żywicy przy retencji pozostałych grup ochronnych.

Dla części koniugatów, które zdecydowałem się otrzymywać tą drogą, pomimo stosowania długiego czasu reakcji i bezwodnych rozpuszczalników, produkt powstawał w znikomych ilościach, zaś ester aktywny rozpadał się pozostawiając w mieszaninie peptyd z wolną grupą karboksylową. Natomiast dla kilku w/w sekwencji udało otrzymać się estry aktywne na grupie karboksylowej i pomyślnie przeprowadzić syntezę z FMDP. Usuwanie grup ochronnych, izolowanie produktu i oczyszczanie otrzymanych koniugatów było już stosunkowo proste.

W ten sposób otrzymałem:

- **Arg₈-Ala-FMDP**
- **Ac-Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp-FMDP**
- **Lys₃Trp₃-FMDP**
- **Arg₃Phe₃-FMDP**
- **Phe₃Arg₃-FMDP**

Związki zostały zidentyfikowane przy pomocy spektrometrii mas.

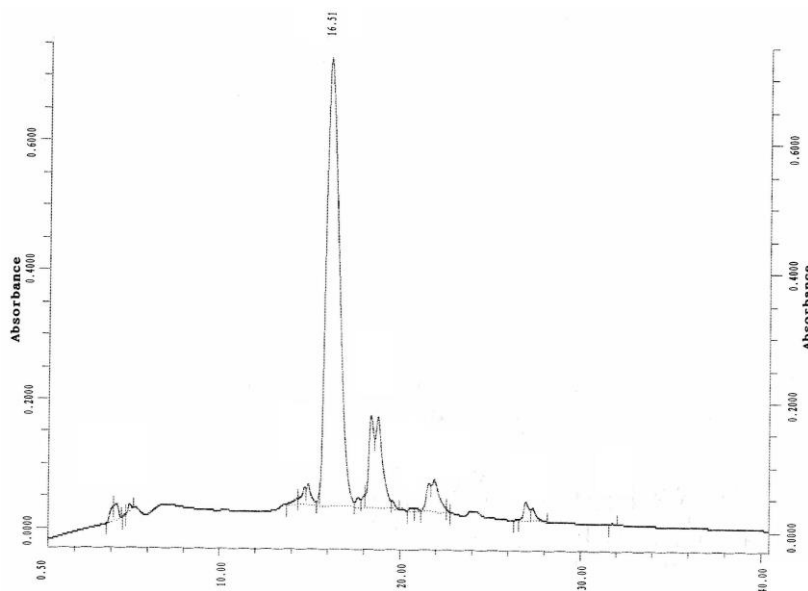
1.4. Oczyszczanie otrzymanych peptydów i koniugatów

Wszystkie otrzymane przeze mnie peptydy oraz koniugaty kowalencyjne były oczyszczane przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej na odwróconych fazach (RP-HPLC). Zarówno podczas analiz, jak i w oczyszczaniu stosowałem kolumny ze złożem modyfikowanym C8. Rozdzielanie prowadziłem stosując gradient rozpuszczalników 0,1% TFA w wodzie i 0,1% TFA w acetonitrylu. Ustawienia gradientu dostosowywałem indywidualnie do każdego peptydu zależnie od jego właściwości. Większość peptydów penetrujących charakteryzuje się stosunkowo dużą polarnością, w związku z czym ich elucja następowała zwykle pomiędzy 10 a 40% ACN. Peptydy z chronionymi grupami łańcuchów bocznych wykazywały znacznie mniejszą polarność, tym samym eluowały pomiędzy 90 a 100% ACN. Obecność

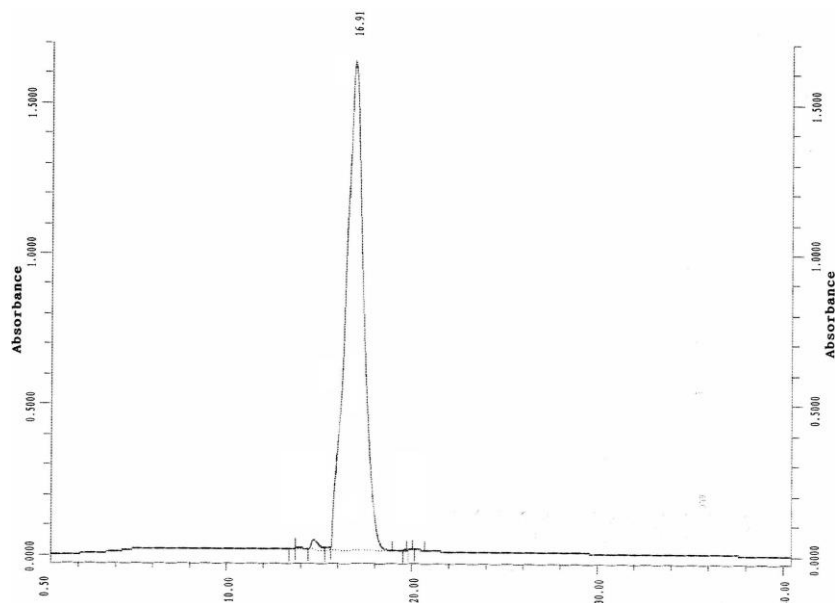
przyłączonych inhibitorów nie wpływała znacząco na zmianę polarności związków – ze względu na aminokwasową budowę i obojętny elektrycznie łańcuch boczny, który nie zmieniał ogólny ładunek cząsteczki.

Przepływ w przypadku oczyszczania na kolumnach semipreparatywnych ustawiałem pomiędzy 4 a 5 ml/min.

Proces oczyszczania poprzedzała analiza MS surowego peptydu otrzymanego po zdjęciu z żywicy. Jeśli w widmie przeważał sygnał pochodzący od pożądanego produktu wykonywałem analizę HPLC przy zastosowaniu szerszego gradientu, aby określić procentowy skład eluentu, w którym główny produkt opuszcza kolumnę. Pozwoliło mi to na określenie odpowiedniego gradientu do oczyszczania. Samo oczyszczanie odbywało się w dłuższym czasie i przy węższym gradiencie, co pozwala na lepsze odseparowanie poszczególnych pików. W czasie tego procesu zbierałem wypływający eluent odpowiadający odpowiednim pikom na chromatogramie, dzieląc go na odpowiednie frakcje, które następnie poddawałem analizie MS oraz analitycznej HPLC, która określała czystość produktu. Efekty tych procesów przedstawiają przykładowe chromatogramy (Rys. 28 i Rys. 29).



Rys. 28. Chromatogram dla peptydu FMDP-KKVVFWVKFK (FMDP-P3) przed oczyszczaniem. Czas elucji głównego produktu to 16,51 min. Widoczne są jeszcze inne sygnały, które pochodzą od zanieczyszczeń

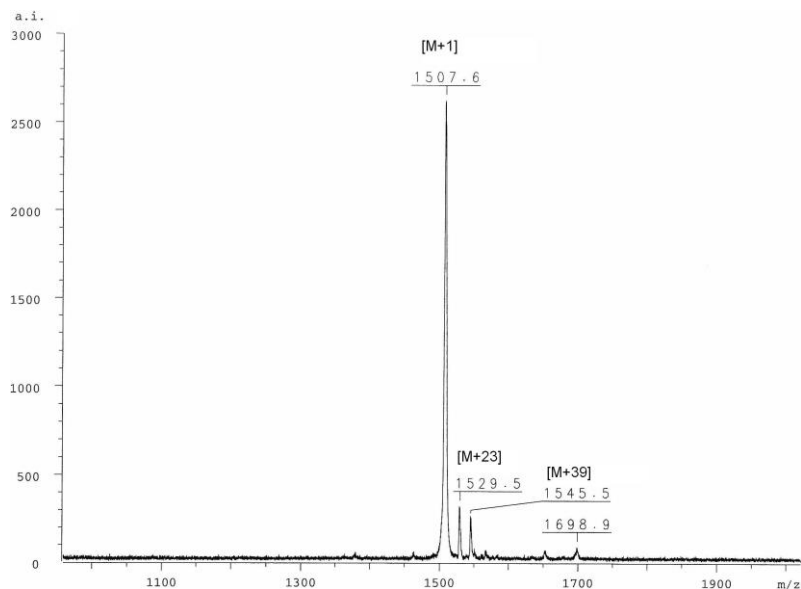


Rys. 29. Chromatogram dla peptydu – FMDP-KKVFWVKFK (FMDP-P3) po oczyszczeniu. Powierzchnia głównego pikę 98%. Po zebraniu odpowiedniej frakcji nie stwierdzam sygnałów pochodzących od zanieczyszczeń.

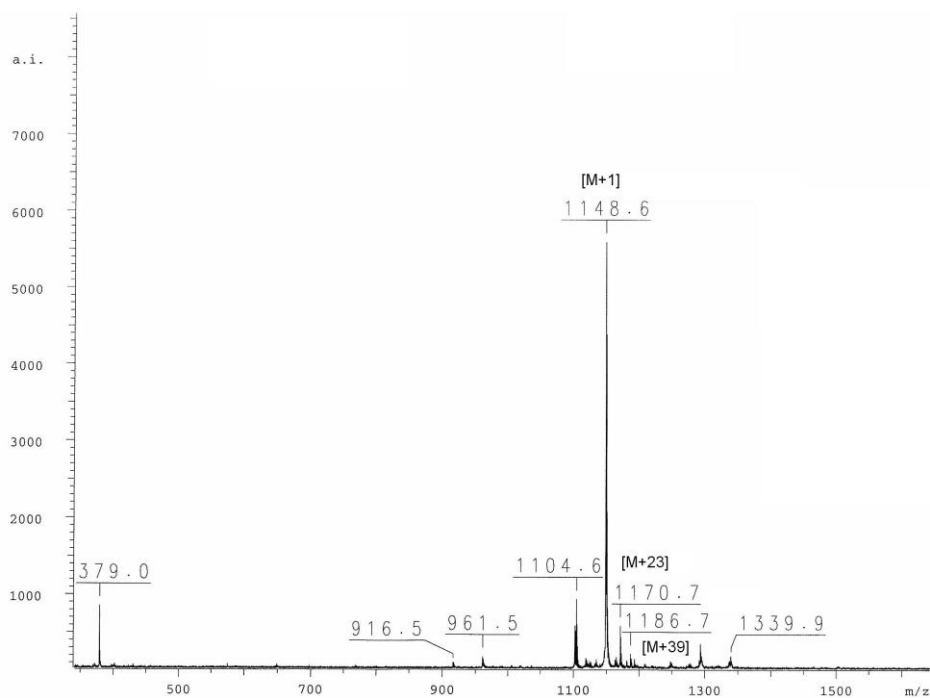
1.5. Analiza otrzymanych związków

Masa otrzymanych związków określana była przy wykorzystaniu spektrometrii mas: MALDI-TOF-MS oraz ESI-MS. Widma wykonywane były dla surowych produktów przed procesem oczyszczania, jak i dla poszczególnych frakcji pochodzących z oczyszczania. Otrzymane spektrogramy wskazywały wartości m/z odpowiednich pików pseudomolekularnych, a co za tym idzie pozwalały określić masę cząsteczki. W przypadku peptydów oraz ich koniugatów syntezowanych na nośniku stałym jest to metoda wystarczająca do potwierdzenia struktury pierwszorzędowej. W przypadku związków niepeptydowych strukturę potwierdzałem poprzez badania spektroskopowe NMR, spektrometrię mas oraz temperaturę wrzenia lub topnienia.

Czystość peptydów oraz koniugatów określałem na podstawie analiz HPLC. Porównywałem powierzchnię głównego pikę na chromatogramie, pochodzącego od produktu, do pików pochodzących od zanieczyszczeń. Czystość przekazywanych do badań biologicznych związków z reguły nie była niższa niż 97%. **Rys. 30 i Rys. 31** przedstawiają widma mas przykładowych koniugatów.



Rys. 30. Widmo MS dla peptydu FMDP-KKVVFWVKFK (FMDP-P3). Widoczne są jony pseudomolekularny o m/z 1507,6 (M+H) oraz adduktów 1529,5 (M+Na) i 1545,5 (M+K). Przy wartości m/z 1698 widać pik od pozostałych, niewielkich ilości zanieczyszczeń.

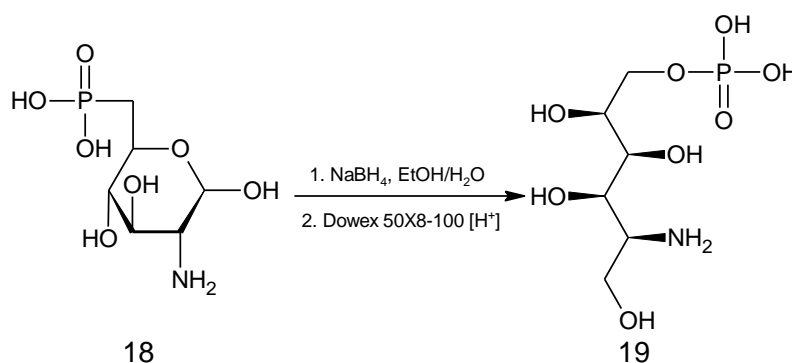


Rys. 31. Widmo MS dla peptydu FMDP-RKKFW (FMDP-P5). Widoczne są jony: pseudomolekularny o m/z 1148,6 (M+H) oraz adduktów 1170,7 (M+Na) i 1186,7 (M+K). Pozostałe sygnały o niewielkiej intensywności stanowią śladowe zanieczyszczenia peptydu.

1.6. Otrzymywanie koniugatów jonowych

Niektóre z peptydów penetrujących (głównie kationowych, takich jak poliarginina) mogą transportować określone związki nie tylko łącząc się z nimi

kowalencyjnie, ale również tworząc koniugaty oparte na wiązaniach jonowych [157]. Często takie połączenia mają nawet lepsze właściwości penetrujące niż analogiczne koniugaty typu kowalencyjnego. Dlatego podjąłem się również syntezy koniugatu FMDP z oktaargininą, w którym oddziaływanie pomiędzy składnikami jest typu jonowego. Dla porównania zsyntetyzowałem również analogiczny koniugat oktaargininy z fosforanem aminoglukitolu (GlcN-ol-6P) **19**, znanym inhibitorem syntazy GlcN-6-P, analogiem stanu przejściowego reakcji katalizowanej przez ten enzym. GlcN-ol-6P otrzymałem poprzez redukcję 6-fosforanu D-glukozaminy **18** borowodorkiem sodu w niskiej temperaturze. Następnie nadmiar borowodoru był rozkładany poprzez dodanie kwasu. Oczyszczanie odbywało się przy zastosowaniu chromatografii jonowymiennej (Rys. 32). Następnie wolną oktaargininę mieszałem w roztworze wodnym z 4 ekwiwalentami molowymi inhibitora. W związku z tym, że reakcja nie prowadzi do powstania żadnych produktów ubocznych, a produkt nie wymaga dodatkowego oczyszczania, poddawałem go liofilizacji w celu usunięcia rozpuszczalnika.



Rys. 32. Schemat syntezy 6-fosforanu D-aminoglukitolu

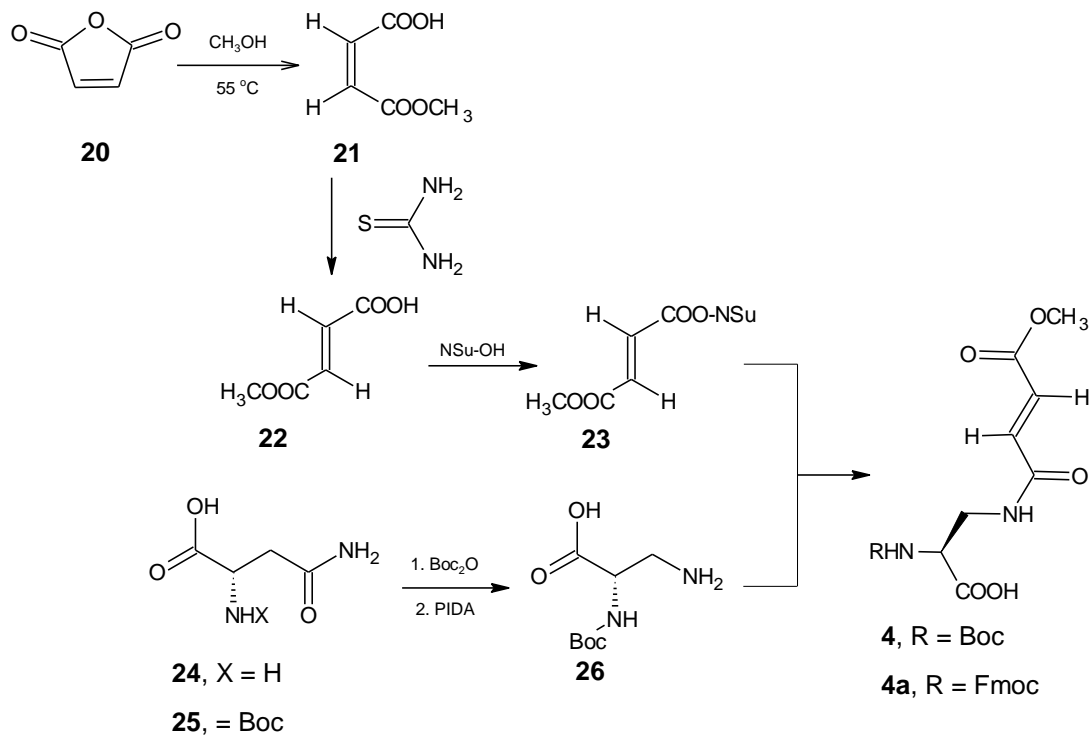
W ten sposób otrzymałem:

- Arg₈ • 4 FMDP
- Arg₈ • 4 GlcN-ol-6P

1.7. Synteza chronionych pochodnych kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowego

W każdej przeprowadzanej przeze mnie syntezie niezbędne było otrzymanie chronionej pochodnej inhibitora syntazy GlcN-6-P, który następnie miał stanowić część koniugatu – najczęściej było to w różny sposób chronione FMDP.

Otrzymywanie Boc-FMDP opiera się na sześciu etapach opisanych w literaturze [45], w których równoległe otrzymuje się dwa związki: ester *N*-hydroksysukcynimidylowometylowy fumaranu **23** oraz kwas *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowy **26**. Schemat opisanych przemian chemicznych przedstawiłem na Rys. 33.



Rys. 33. Schemat syntezy Boc-FMDP i Fmoc-FMDP

Pochodne kwasu L-2,3-diaminopropanowego w swojej strukturze mają niebiałkowy α -aminokwas, który można syntetyzować wychodząc z L-asparaginy **24**.

Pierwszym etapem jest zabezpieczenie grupy α -aminowej aminokwasu osłoną typu uretanowego, Boc. W następnym etapie przeprowadza się degradacyjne przegrupowanie Hoffmana, polegające na zamianie grupy amidowej w aminową z jednoczesnym skróceniem łańcucha węglowego o jeden atom węgla. Reakcję tę przeprowadziłem przy użyciu *1,1*-diacetyljodozobenzenu (PIDA), ze względu na stosunkowo łagodne warunki procesu oraz krótki czas. W efekcie otrzymałem kwas *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowy **26** (Boc-A₂pr).

Drugą częścią cząsteczki kwasu *N*³-(4-metoksyfumaroylo)-L-2,3-diaminopropanowego jest reszta 4-metyloksyfumaroylowa przyłączona do atomu azotu przy

trzecim atomie węgla A₂pr. Substratem wyjściowym w syntezie wodorofumaranu metylu **22** był bezwodnik maleinowy **20**.

Z bezwodnika maleinowego, w reakcji estryfikacji z metanolem, otrzymuje się monoester metylowy kwasu maleinowego (wodoromaleinian metylu) **21**, który następnie izomeryzowałem do wodorofumaranu metylu **22**. Reakcja ta przebiega w obecności tiomocznika.

Na tak otrzymany monoester **22** działałem *N*-hydroksysukcynoimidem w obecności dicykloheksylokarbodiimidu (DCC). Po oddzieleniu osadu dicykloheksylokarbodiimidu izolowałem ester *N*-hydroksysukcynimidylowometylowy **23**.

W reakcji Boc-A₂pr **26** z fumaranem *N*-hydroksysukcynoimidylometylu **23** otrzymywałem Boc-FMDP **4**, który po wyizolowaniu wykorzystałem jako substrat do syntezy koniugatów z peptydami penetrującymi.

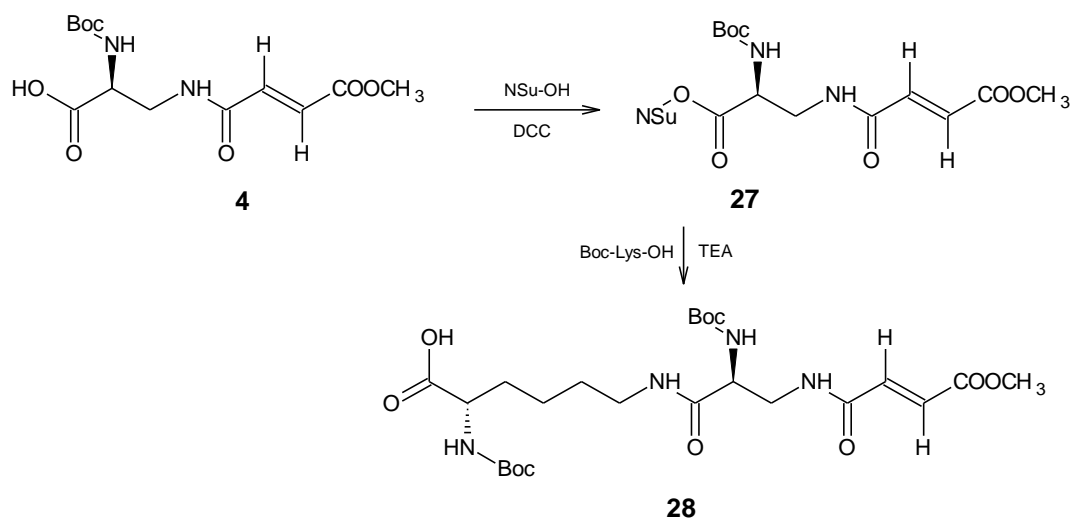
Synteza kwasu *N*²-(-9-fluorenylometoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksy-fumaroilo)-*L*-2,3-diaminopropanowego (Fmoc-FMDP) **4a** z Fmoc chronionej asparaginy nastęrczała wielu trudności, a reakcja przebiegała z niezadowalającą wydajnością. W związku z tym, syntezę tej pochodnej wykonałem wymieniając osłonę Boc grupy aminowej na 9-fluorenylometoksykarbonylową. Po usunięciu ochrony *tert*-butoksykarbonylowej z pochodnej FMDP **4**, działałem na otrzymany aminokwas estrem *N*-hydroksysukcynoimidylowym Fmoc (Fmoc-NSu). Izolacja otrzymanego produktu **4a** była analogiczna do tej stosowanej w syntezie Boc-FMDP **4**.

1.8. Synteza koniugatów CPP połączonych z FMDP poprzez grupę ε-aminową N-końcowej reszty lizyny

Oprócz koniugatów CPP z FMDP jako resztą N- lub C-terminalną przeprowadziłem także syntezę koniugatu peptydu **P3** z FMDP, w którym inhibitor był przyłączony do grupy ε-aminowej w łańcuchu bocznym reszty lizyny. Przyjęta strategia syntezy polegała na otrzymaniu odpowiednio chronionej reszty lizyny połączonej z FMDP wiązaniem amidowym, a następnie przyłączenie takiej pochodnej lizyny jako ostatniej w sekwencji podczas syntezy koniugatu metodą SPPS. Dzięki temu można było uniknąć degradacji reszty FMDP.

Pierwszym etapem było otrzymanie estru sukcyimidylowego Boc-FMDP **27**, analogicznie jak to było opisane dla innych aminokwasów. Kolejnym krokiem była reakcja sprzęgania *N*^α-Boc-*L*-lizyny bez osłony na łańcuchu bocznym z estrem **27**.

Po zakończeniu tej reakcji możliwe było wyizolowanie produktu N^α -Boc-Lys(Boc-FMDP) **28** (Rys. 34).



Rys. 34. Schemat syntezy N^α -Boc-Lys(Boc-FMDP)

2. Określenie właściwości biologicznych otrzymanych peptydów i ich koniugatów

Badania biologiczne otrzymanych związków zostały wykonane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej przez dr Martę Schielmann oraz mgr Dorotę Koperkiewicz. Badania te obejmowały określenie aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* wobec modelowych szczepów *C. albicans* oraz aktywności hemolitycznej wobec erytrocytów. Jako związek referencyjny wykorzystano w tych badaniach tripeptyd Lys-Nva-FMDP zsyntetyzowany przez prof. R. Andruszkiewicza z Katedry Technologii Leków i Biochemii.

Określono parametry charakteryzujące aktywność przeciwgrzybową 48 spośród zsyntetyzowanych przez mnie peptydów typu CPP i ich koniugatów z inhibitorami.

Dla każdego przebadanego związku wyznaczano wartości MIC (MIC₅₀, MIC₈₀ i MIC₉₀ – minimalne stężenia powodujące zahamowanie wzrostu w 50%, 80% i 90%) charakteryzujące jego aktywność przeciwgrzybową *in vitro*.

Aktywność badano wobec trzech szczepów z rodzaju *Candida*: *C. albicans* SC 5314, *C. albicans* ATCC 10231 oraz *C. albicans* $\Delta opt1-opt5\Delta ptr2\Delta ptr22\Delta$ (w skrócie $opt1-5\Delta ptr$). Szczep $opt1-5\Delta ptr$ jest mutantem pozbawionym wszystkich genów kodujących permeazy peptydowe, wobec czego wyniki oznaczenia aktywności wobec tego mutantu, pozwalały na określenie, czy badany peptyd jest transportowany przez permeazy peptydowe.

Oznaczenie przeprowadzono w dwóch podłożach: podłożu minimalnym YNB-GS (zawiera glutaminian sodu /GS/ jako źródło azotu) oraz podłożu RPMI-1640, którego skład przypomina skład osocza krwi, w tym zestaw aminokwasów tam występujący. Wyniki przedstawiam w Tabelach 3 i 4.

Tabela 3 Wyznaczone wartości MIC ($\mu\text{g/ml}$) dla peptydów i koniugatów wyznaczone w pożywce YNB-GS

Peptyd lub koniugat	Pożywka YNB-GS								
	<i>C. albicans</i> SC 5314			<i>C. albicans</i> ATCC 10231			<i>C. albicans</i> opt1-5 Δ ptr		
	MIC ₉₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀
P1	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P2	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
KW	100	50	25	>>100	50	6,25	50	50	25
R ₃ F ₃	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P6	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
R ₈	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
D-R ₈	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
K ₉	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P1N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P2N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P3N	50	25	25	50	25	12,5	25	25	12,5
P4N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P5N	>>100	>>100	100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P6N	>>100	100	100	100	100	50	>>100	>>100	>>100
BADP-P1	100	100	25	25	6,25	3,125	>>100	>>100	>>100
BADP-P5	>>100	>>100	>>100	100	100	100	>>100	>>100	>>100
CisP-P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P1	0,2	0,1	0,05	0,1	0,05	0,05	>>100	>>100	>>100
FMDP-P2	0,4	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	>>100	>>100	>>100
FMDP-P3	1,6	0,8	0,8	3,125	0,8	0,4	>>100	>>100	>>100
FMDP-P5	1,6	0,8	0,4	0,8	0,4	0,2	>>100	>>100	>>100
FMDP-KW	1,6	0,8	0,2	0,4	0,4	0,2	50	25	25
FMDP-P6	6,125	3,1	1,6	1,6	0,8	0,4	>>100	>>100	>>100
FMDP-R₈	12,5	6,25	6,25	6,25	6,25	3,125	12,5	6,25	3,125
FMDP-D-R ₈	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-K₉	50	25	12,5	25	12,5	6,25	100	25	12,5
P2-FMDP	3,1	0,4	0,2	12,5	0,2	0,1	>>100	100	50
KW-FMDP	6,25	3,125	1,6	3,125	1,6	0,8	>>100	100	12,5
RF-FMDP	>>100	50	25	50	50	25	>>100	>>100	>>100
R₈-A-FMDP	100	50	25	100	50	25	>>100	100	50
FMDP-P1N	3,125	3,125	1,6	12,5	0,8	0,4	>>100	>>100	>>100
FMDP-P2N	25	12,5	6,25	25	12,5	6,25	>>100	>>100	>>100
FMDP-P3N	100	50	50	50	25	12,5	50	25	6,25

FMDP-P4N	>>100	>>100	12,5	>>100	50	12,5	>>100	>>100	>>100
FMDP-P5N	12,5	6,25	6,25	6,25	3,125	1,6	>>100	>>100	>>100
FMDP-RFN	>>100	>>100	12,5	>>100	>>100	>>100	>>100	100	50
FMDP-FRN	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P6N	>>100	100	50	100	100	50	>>100	>>100	>>100
cisP-P5N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>100	>>100	>>100
Ac-cisP-P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>100	>100	>>100	>>100	>>100
AcFMDP-P5	3,125	1,6	0,8	1,6	0,8	0,4	>>100	>>100	>>100
ε-FMDP-P3	6,25	6,25	3,125	3,125	1,6	0,8	>>100	>>100	>>100
R₈-4FMDP	0,4	0,	0,1	25	6,25	3,125	0,4	0,2	0,1
R ₈ -4AGDP	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
Lys-Nva-FMDP	0,8	0,2	0,1	0,8	0,4	0,2	>>100	>>100	>>100
FAM-KW	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	100

Tabela 4. Wyznaczone wartości MIC (µg/ml) dla peptydów i koniugatów w pożywce RPMI-1640.

Peptyd lub koniugat	Pożywka RPMI-1640								
	<i>C. albicans</i> SC 5314			<i>C. albicans</i> ATCC 10231			<i>C. albicans</i> opt1-5Δptr		
	MIC ₉₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀
P1	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P2	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
KW	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
RF	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P6	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
R ₈	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
D-R₈	>>100	100	50	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
K ₉	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P1N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P2N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P3N	100	100	100	100	100	100	100	100	100
P4N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P5N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P6N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
BADP-P1	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
BADP-P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
CisP-P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P1	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P2	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P3	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-KW	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P6	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-R₈	100	50	25	>>100	100	50	>>100	100	50
FMDP-D-R ₈	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-K ₉	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P2-FMDP	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100

KW-FMDP	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
RF-FMDP	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
R₈-A-FMDP	100	50	25	>>100	100	50	>>100	>>100	100
FMDP-P1N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P2N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P3N	100	50	25	100	50	6,25	100	100	50
FMDP-P4N	50	50	25	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P5N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-RFN	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-FRN	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-P6N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
cisP-P5N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
Ac-cisP-P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
AcFMDP-P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
FMDP-K₉	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	25	>>100	>>100	>>100
ϵ -FMDP-P3	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
R ₈ -4FMDP	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
R ₈ -4AGDP	>>100	>>100	100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
Lys-Nva-FMDP	100	50	25	20	25	12,5	>>100	>>100	>>100
FAM-KW	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100

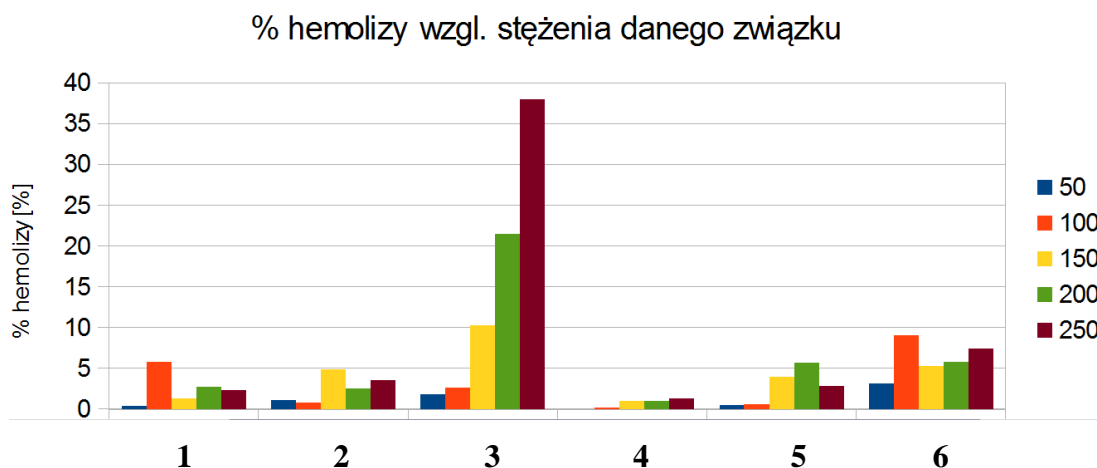
Na podstawie uzyskanych wyników można sformułować następujące wnioski:

1. Peptydy nośnikowe poza peptydami **P3** (w obu podłożach) oraz **KW** (w podłożu minimalnym) nie wykazują aktywności przeciwgrzybowej. Aktywność peptydu **P3** potwierdzają dane literaturowe [151].
2. Większość zaprojektowanych i otrzymanych koniugatów peptydów nośnikowych z FMDP wykazuje aktywność w podłożu YNB-GS wobec komórek *C. albicans* SC5314 i ATCC 10231; wyjątek stanowi FMDP-D-Arg₈. Natomiast w podłożu RPMI-1640 aktywność stwierdzono jedynie dla **F3N**, Arg₈-Ala-FMDP, FMDP-Arg₈ i **F4**.
3. Słabą aktywność lub brak aktywności stwierdzono dla koniugatów peptydów nośnikowych z *cis*-pentacyną.
4. Jonowy kompleks Arg₈ z FMDP wykazuje silną aktywność przeciwgrzybową w podłożu minimalnym, natomiast stwierdzono brak takiej aktywności w podłożu RPMI-1640. Kompleks Arg₈ z ADGP nie wykazuje aktywności przeciwgrzybowej.

5. Brak aktywności wobec *C. albicans* opt1-5Δptr części koniugatów aktywnych wobec *C. albicans* SC5314 wskazuje, że mogą być one transportowane do komórek grzybowych przez permeazy peptydowe. Oznacza to, że prawdopodobnie także same peptydy nośnikowe występujące w tych koniugatach nie zachowują się jak peptydy penetrujące, czyli nie są transportowane do komórki w sposób niezależny od energii metabolicznej, lecz wnikają za pomocą permeaz peptydowych. Nie budzące wątpliwości działanie charakterystyczne dla peptydów penetrujących stwierdzono jedynie dla oligokationowych Arg₈ i Lys₉, których koniugaty: FMDP-Arg₈, Arg₈-Ala-FMDP oraz FMDP-Lys₉ wykazują podobne działanie wobec komórek *C. albicans* SC5314 i opt1-5Δptr.

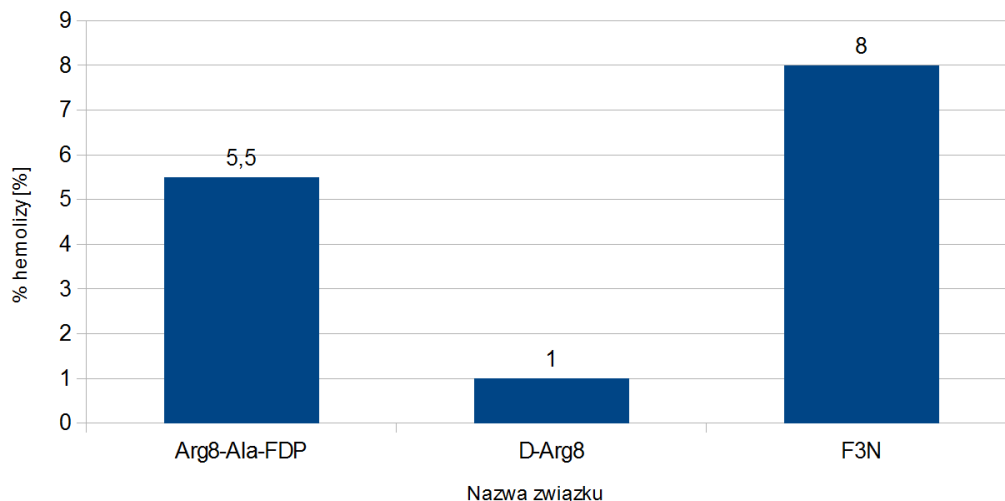
2.1. Hemoliza ludzkich erytrocytów

Dla wybranych peptydów przeprowadzono badania dotyczące hemolizy ludzkich erytrocytów. Wyniki przedstawiono na Rys. 35.



Rys. 35. Procent hemolizy ludzkich erytrocytów dla wybranych związków w zależności od jego stężenia µg/ml. 1 - R₈-A-FMDP, 2 - D-R₈, 3 - R₈×4 FMDP, 4 - R₈×AGDP, 5 - P₄, 6 - FMDP-P₃N

Większość przebadanych peptydów wykazywała znikome właściwości hemolityczne. Wyjątkiem był związek jonowy Arg₈·FMDP. Zarówno peptydy z FMDP, jak i bez FMDP nie wykazują szczególnych właściwości hemolitycznych. Należy zwrócić szczególną uwagę na koniugat **F3N**, który wykazując aktywność przeciwgrzybową, także w podłożu RPMI-1640, nie wykazuje właściwości hemolitycznych.



Rys. 36 Procent hemolizy powodowanej działaniem peptydu D-Arg₈ i dwóch koniugatów w stężeniach odpowiadających wartościom MIC₉₀ danego związku.

W przypadku peptydów, których wartość stężenia MIC₉₀ udało się określić we wcześniejszych badaniach, określono stopień hemolizy, który przedstawiono na powyższym wykresie (Rys. 36). Stężenie MIC₉₀ wyznaczono tylko dla trzech przebadanych peptydów. Reszta z nich wykazywała MIC₉₀ powyżej badanego zakresu 100 µg/ml. Wszystkie otrzymane wartości są znikomo małe i nie osiągają nawet 10%.

IV PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem przeprowadzonych badań, których wyniki opisano w niniejszej rozprawie doktorskiej, było wyselekcjonowanie i synteza peptydów znanych z literatury jako CPP oraz opracowanie metod otrzymywania ich koniugatów z inhibitorami enzymatycznymi o strukturze aminokwasowej. Połączenia takie miałyby charakteryzować się lepszym przenikaniem do komórek patogennych drożdżaków *C. albicans*, a tym samym większą aktywnością biologiczną. Łącznie zaprojektowałem i otrzymałem trzydzieści sześć nowych koniugatów peptydów penetrujących (w tym dla sześciu nieopisanych wcześniej peptydów penetrujących) z FMDP, BADP i *cis*-pentacyną. Główne wnioski dotyczące przyjętych strategii syntezy i sposobów ich realizacji są następujące:

- Możliwe jest otrzymywanie N-końcowych koniugatów peptydów penetrujących (zarówno z wolną grupą karboksylową, jak również w postaci amidów) z inhibitorami będącymi pochodnymi kwasu L-2,3-diaminopropanowego przy zastosowaniu syntezy peptydów na fazie stałej (SPPS) ze strategią typu t-Bu/Fmoc.
- Otrzymywanie koniugatów z FMDP na C-końcu lub wewnątrz łańcucha polipeptydowego nie jest możliwe przy zastosowaniu standardowej metody syntezy na fazie stałej (SPPS). FMDP okazuje się nietrwałe w warunkach przeprowadzanej syntezy (głównym czynnikiem degradującym jest prawdopodobnie środowisko zasadowe).
- Skuteczną metodą aktywacji w reakcji sprzęgania FMDP oraz chronionych pochodnych peptydowych jest zastosowanie estrów aktywnych, a przede wszystkim *N*-hydroksysukcynimidylowych. Estry *N*-hydroksysukcynimidylowe można otrzymać, zarówno dla FMDP (w przypadku tworzenia N-końcowych koniugatów), jak i dla peptydów z chronionymi łańcuchami bocznymi (w przypadku przyłączania FMDP na C-końcu).
- Aby uzyskać koniugaty zawierające FMDP na C-końcu sekwencji peptydowej należy zastosować metodę „mieszaną” czyli otrzymać peptyd penetrujący odszczepiony z żywicy z retencją grup ochronnych na łańcuchach bocznych, a następnie przeprowadzić go w ester *N*-hydroksysukcynimidylowy i połączyć z cząsteczką FMDP w roztworze.

- Najbardziej optymalną mieszaniną do odszczepiania z zachowaniem osłon łańcuchów bocznych, otrzymanych przez mnie peptydów jest wykorzystanie roztworu zawierającego dichlorometan, kwas octowy oraz trifluoroetanol w proporcji objętościowej 7:1:2. Przy jej zastosowaniu powstaje najmniej produktów zawierających częściowo, bądź całkowicie usunięte osłony.

W wyniku określenia aktywności biologicznej otrzymanych peptydów nośnikowych i ich koniugatów z aminokwasowymi inhibitorami enzymatycznymi możliwe jest sformułowanie następujących wniosków:

- Cel główny projektu badawczego będącego podstawą rozprawy doktorskiej został osiągnięty. Wykazano, że możliwe jest zaprojektowanie i otrzymanie koniugatów peptydów penetrujących z FMDP, w których FMDP jest połączony z nośnikiem wiązaniem peptydowym jako aminokwas N- lub C-końcowy lub wiązaniem amidowym z grupą aminową w łańcuchu bocznym lizyny, wykazujących aktywność przeciwgrzybową. Tego typu koniugaty CPP z inhibitorami enzymatycznymi o strukturze aminokwasowej wykazujące aktywność przeciwgrzybową nie były dotychczas znane z literatury.
- Wysoka lub bardzo wysoka aktywność przeciwgrzybowa otrzymanych koniugatów, przy jednoczesnym braku takiej aktywności samych nośników peptydowych, potwierdza, że inhibitor jest uwalniany z koniugatu po wniknięciu do komórki i hamuje aktywność syntazy GlcN-6-P. Fakt aktywności koniugatu FMDP-Arg₈ i braku aktywności koniugatu FMDP-D-Arg₈ sugeruje, że za uwolnienie inhibitora odpowiedzialne są wewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne, które nie hydrolizują wiązań peptydowych z udziałem aminokwasów szeregu D.
- Brak aktywności szeregu koniugatów wobec mutantu *C. albicans* opt1-5Δptr sugeruje, że występujące w ich strukturach nośniki peptydowe są transportowane przez permeazy peptydowe, tak więc nie są klasycznymi peptydami penetrującymi. Wynik ten wskazuje na potrzebę weryfikacji przynależności szeregu peptydów uważanych dotychczas za CPP do tej klasy.

- Aktywność przeciwgrzybowa koniugatów kationowych CPP z FMDP, wykazana także w podłożu RPMI-1640, którego skład odpowiada składowi związków małocząsteczkowych osocza krwi, chociaż niezbyt wysoka (wartości MIC w zakresie 25 – 100 $\mu\text{g/ml}$), stanowią zachętę do dalszej optymalizacji struktury koniugatów w nadziei otrzymania związków bardziej aktywnych.

V Część doświadczalna

Informacje ogólne

Widma NMR zostały zmierzone na aparacie Unity Plus pracującym odpowiednio dla protonów (^1H NMR) przy 500 MHz; dla jąder fosforu (^{31}P NMR) – 162 MHz.

Widma mas zostały wykonane w Zespole Pracowni Fizyko-Chemicznych Uniwersytetu Gdańskiego na spektrometrze mas MALDI-TOF firmy BIFLEX III. Jako matryca wykorzystywany był kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB) lub α -cyjano-4-hydroksycynamonowy (CCA).

Analizę ESI-MS przeprowadzono na aparacie Applied Biosystems MD SCIEX 4000 Q TRAP LC/MS/MS System.

Analityczne chromatogramy zostały wykonane na zestawie chromatograficznym firmy Waters: pompa dwukanałowa (Waters 600E Delivery System), dwuwiązkowy detektor absorpcyjny (Waters 2487 Dual Lambda Absorban Detector). Zastosowano kolumnę Kromasil C8 o średnicy ziaren złoża 5 μm , długości 25 cm, przekroju 4,5 mm.

Płytki TLC i żel krzemionkowy. Do chromatografii TLC zastosowano płytki TLC Silica gel 60 F254 firmy Merck. Do chromatografii kolumnowej zastosowano żel krzemionkowy Geduron® Si 60 (40-63 μm) firmy Merck.

Lampa UV. Do detekcji substancji rozdzielanych techniką TLC zastosowano lampę UV Benda Typ Nu-4 KL o długości fali $\lambda=254$ nm oraz $\lambda=366$ nm.

Wywoływacze płytek TLC. Jako wywoływacze płytek TLC zastosowano ninhydrynę, pary jodu oraz wywoływacz molibdenowo-cerowy.

Temperatury topnienia otrzymanych związków nie były korygowane.

Pomiary **skręcalności** zostały wykonane na polarymetrze Rudolph Autopol II przy długości fali 589 nm.

Reagenty i rozpuszczalniki. Reagenty i rozpuszczalniki pochodziły ze źródeł komercyjnych firm Iris Biotech, Merck oraz SigmaAldrich.

1. Synteza peptydów na fazie stałej

1.1. Synteza peptydów na fazie stałej przy użyciu żywicy chloro-2'-chlorotrytylowej

1 g żywicy chloro-2'-chlorotrytylowej o teoretycznym stopniu osadzenia 1,6 mmol/g umieszczono w naczynku do syntezy (o objętości 10 ml). Przez jedną godzinę wytrząsano ją w 7 ml mieszaniny rozpuszczalników DMF:DCM 1:1 (v:v), po czym odsączono. Dodano 1 eq. molowy pierwszego N-końcowego aminokwasu Fmoc-AA oraz 4 eq. molowe diizopropylodetyloaminy (DIPEA). Całość wytrząsano przez dwie godziny, a następnie odsączono i przemywano trzykrotnie DCM (3×7 ml), trzykrotnie DMF (3×7 ml) i ponownie trzykrotnie porcją DCM (3×7 ml). Następnie dodano 7 ml mieszaniny DCM:MeOH:DIPEA 17:2:1 (v:v:v) i wytrząsano przez 5 minut. Po odsączeniu mieszaniny dodano drugą jej porcję i wytrząsano przez 15 minut. Po odsączeniu wykonano kolejny cykl trwający 30 minut. Następnie żywicę przemyto DCM (3×7 ml), DMF (3×7 ml) i DCM (3×7 ml), a następnie eterem dietylowym (2×7 ml). Żywicę umieszczono w eksykatorze próżniowym do ustalenia stałej masy. Po ustaleniu stałej masy obliczono rzeczywisty stopień osadzenia na podstawie przyrostu masy względem początkowej masy żywicy wg wzoru:

$$\text{rzeczywisty stan osadzenia aminokwasu} = \frac{m_c - m_p}{M}$$

gdzie:

m_c – masa żywicy po osadzeniu pierwszego aminokwasu

m_p – początkowa masa żywicy

M – masa molowa osadzanego aminokwasu wraz z osłonami

Żywicę z osadzonym aminokwasem przemyto 7 ml mieszaniny rozpuszczalników DMF:DCM 1:1 (v:v). Następnie po odsączeniu dodano 7 ml 25% roztworu piperydyny w DMF i wytrząsano przez 5 minut, a po odsączeniu ponownie wytrząsano z 7 ml tego samego roztworu przez 15 minut. Po odsączeniu wykonano dwa cykle przemywania na zmianę DMF i DCM po trzy razy każdym (3×7 ml). Reakcję usuwania grupy Fmoc monitorowano przy pomocy testu chloranilowego. Do żywicy z osadzonym aminokwasem bez osłony na grupie aminowej dodano 2,5 eq. molowego (zgodnie z obliczonym rzeczywistym stopniem osadzenia żywicy) kolejnego Fmoc-AA, 2,5 eq. *N*-hydroksybenzotriazolu (HOBt) oraz 2,5 eq. diizopropylodetylokarbodiimidu (DIC), rozpuszczonych w DCM (6 ml) z niewielkim dodatkiem DMF. Całość wytrząsano

przez 2 godziny następnie odsączone, a wynik reakcji sprawdzono testem chloranilowym. Następnie żywicę przemyto trzema porcjami DCM (3×7 ml) i trzema DMF (3×7 ml). Opisana powyżej procedurę powtarza się tak długo aż otrzymany zostanie peptyd o pożądanej sekwencji. Po ukończeniu dołączania kolejnych reszt aminokwasowych do otrzymanej wg powyższej procedury żywicy z osadzonym peptydem, bez grupy Fmoc wprowadzano 8 ml mieszaniny kwas trifluorooctowy:fenol :woda:triizopropylometylosilan (4,4:0,25:0,25:0,1 v:v:v). Powstały roztwór mieszano przez 2 godziny, a następnie przesączono i wkroplono do schłodzonego eteru dietylowego (40 ml). Wytrącony osad odwirowano i suszono w eksykatorze próżniowym do uzyskania stałej masy.

Otrzymano:

- **P1** Val-Pro-Met-Leu-Lys;
MS-SI: znaleziono m/z 587,2 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{27}H_{50}N_6O_6S$
586,3513
- **P2** Lys-Leu-Pro-Val-Met
MS-SI: znaleziono m/z 587,4 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{27}H_{50}N_6O_6S$
586,3513
- **P3** Lys-Lys-Val-Val-Phe-Trp-Val-Lys-Phe-Lys
MS-SI: znaleziono m/z 1308,9 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{68}H_{105}N_{15}O_{11}$
1307,812
- **P5** Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp
MS-SI: znaleziono m/z 950,6 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{49}H_{67}N_{13}O_7$ 949,5286
- **P6** Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro
MS-SI: znaleziono m/z 678,3 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{32}H_{55}N_9O_7$ 677,4224
- **RF** Arg₃Phe₃
MS-SI: znaleziono m/z 928,6 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{45}H_{65}N_{15}O_7$ 927,5191
- **KW** Lys₃Trp₃
MS-SI: znaleziono m/z 961,5424 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{51}H_{68}N_{12}O_7$
960,5334
- **RW** Arg₃Trp₃
MS-SI: znaleziono m/z 1045,4 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{51}H_{68}N_{18}O_7$
1044,552

- **R₈ Arg₈**
MS-SI: znaleziono m/z 1268,8 $[M+1]^+$, obliczone dla C₄₈H₉₈N₃₂O₉
1266,819
- **D-R₈ D-Arg₈**
MS-SI: znaleziono m/z 1268,7 $[M+1]^+$, obliczone dla C₄₈H₉₈N₃₂O₉
1266,819
- **K₉ Lys₉**
MS-SI: znaleziono m/z 1171,9 $[M+1]^+$, obliczone dla C₅₄H₁₁₀N₁₈O₁₀
1170,865

1.1.1. Synteza peptydów na fazie stałej przy użyciu żywicy amidowej

W przypadku stosowania żywicy amidowej nie ma specjalnej procedury przyłączenia pierwszego aminokwasu. Linker żywicy zabezpieczony jest osłoną Fmoc, którą należy usunąć i postępować zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.1, stosując 2,5 eq molowy Fmoc-AA oraz odczynników kondensujących w stosunku do teoretycznego stopnia osadzenia żywicy podanego przez producenta.

Stosując takie postępowanie otrzymano:

- **P1N Val-Pro-Met-Leu-Lys-NH₂**
MS-SI: znaleziono m/z 586,1 $[M+1]^+$, obliczone dla C₂₇H₅₁N₇O₅S
585,3672
- **P2N Lys-Leu-Pro-Val-Met-NH₂**
MS-SI: znaleziono m/z 586,0 $[M+1]^+$, obliczone dla C₂₇H₅₁N₇O₅S
585,3672
- **P3N Lys-Lys-Val-Val-Phe-Trp-Val-Lys-Phe-Lys-NH₂**
MS-SI: znaleziono m/z 1307,8 $[M+1]^+$, obliczone dla C₆₈H₁₀₆N₁₆O₁₀
1306,828
- **P4N Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-NH₂**
MS-SI: znaleziono m/z 1339,5 $[M+1]^+$, obliczone dla C₅₃H₁₀₇N₃₁O₁₀
1338,618
- **P5N Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp-NH₂**
MS-SI: znaleziono m/z 949,6 $[M+1]^+$, obliczone dla C₄₉H₆₈N₁₄O₆ 948,5446
- **P6N Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro-NH₂**

MS-SI: znaleziono m/z 676,5 $[M]^+$, obliczone dla $C_{32}H_{56}N_{10}O_6$ 676,4384

- **RFN Arg₃Phe₃-NH₂**

MS-SI: znaleziono m/z 927,4 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{45}H_{65}N_{15}O_7$ 926,5351

- **FRN Phe₃Arg₃-NH₂**

MS-SI: znaleziono m/z 927,5 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{45}H_{65}N_{15}O_7$ 926,5351

1.2. Przyłączanie do peptydów innych związków niż standardowe aminokwasy

Boc-FMDP, Boc-BADP, Boc-*cis*-pentacynę oraz 5(6)-karboksylfluoresceinę przyłączano do sekwencji na N-końcu łańcucha zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.1 dla Fmoc-aminokwasów z wykorzystaniem tych samych odczynników kondensujących (HOBt oraz DIC). Po przyłączeniu w/w związków nie prowadzono bezpośredniego usuwania ugrupowania *tert*-butoksykarbonylowego.

Do żywicy z koniugatem peptydowym wprowadzano mieszaninę kwas trifluorooctowy:fenol:woda:triizopropylometylosilan (4,4:0,25:0,25:0,1 v:v:v:v) (10 ml na 1 g żywicy). Mieszano roztwór przez 2 godziny, a następnie przesączano go do schłodzonego eteru dietylowego (50 ml). Wytrącony osad odwirowano i suszono w eksykatorze próżniowym do uzyskania stałej masy.

Otrzymano w opisany sposób:

- **FMDP-P1**

MS-SI: znaleziono m/z 785,1 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{35}H_{60}N_8O_{10}S$
784,4153

- **FMDP-P2**

MS-SI: znaleziono m/z 785,3 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{35}H_{60}N_8O_{10}S$
784,4153

- **FMDP-P3**

MS-SI: znaleziono m/z 1507,6 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{76}H_{115}N_{17}O_{15}$
1506,876

- **FMDP-Lys(Mca)-Lys-Val-Phe-Trp-Val-Lys-Phe-Lys**

MS-SI: znaleziono m/z 1724,3 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{88}H_{123}N_{17}O_{19}$
1723,021

- **Lys(FMDP)-Lys-Val-Phe-Trp-Val-Lys-Phe-Lys**

- MS-SI: znaleziono m/z 1507,8 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{76}H_{115}N_{17}O_{15}$
1506,876
- **FMDP-P4**
MS-SI: znaleziono m/z 1537,0 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{61}H_{117}N_{33}O_{14}$
1535,946
 - **FMDP-P5**
MS-SI: znaleziono m/z 1148,6 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{57}H_{77}N_{15}O_{11}$
1147,593
 - **FMDP-P6**
MS-SI: znaleziono m/z 876,5 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{40}H_{65}N_{11}O_{11}$
875,4865
 - **FMDP-RW** FMDP-Arg₃Trp₃
ESI-MS: znaleziono m/z 1243,6159 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{59}H_{78}N_{20}O_{11}$
1242,616
 - **FMDP-R₈** FMDP-Arg₈
MS-SI: znaleziono m/z 1465,7 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{56}H_{108}N_{34}O_{13}$
1464,884
 - **FMDP-D-R₈** FMDP-D-Arg₈
MS-SI: znaleziono m/z 1465,8 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{56}H_{108}N_{34}O_{13}$
1464,884
 - **FMDP-K₉** FMDP-Lys₉
MS-SI: znaleziono m/z 1370,4 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{62}H_{120}N_{20}O_{14}$
1368,929
 - **FMDP-KW** FMDP-Lys₃Trp₃
MS-ESI: znaleziono m/z 1159,6052 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{59}H_{78}N_{14}O_{11}$
1158,597
 - **Ac-FMDP-P5**
MS-SI: znaleziono m/z 1190,5 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{59}H_{79}N_{15}O_{12}$
1189,603
 - **BADP-P1**
MS-SI: znaleziono m/z 831,3 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{40}H_{61}N_8O_9S$
829,4282

- **BADP-P5**
MS-SI: znaleziono m/z 1194,0 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{62}H_{78}N_{15}O_{10}$
1192,606
- **cisP-P5**
MS-SI: znaleziono m/z 1061,3 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{55}H_{76}N_{14}O_8$
1060,597
- **Ac-cisP-P5**
MS-SI: znaleziono m/z 1103,7 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{57}H_{78}N_{14}O_9$
1102,608
- **FAM-P3**
MS-SI: znaleziono m/z 1666,6 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{89}H_{115}N_{15}O_{17}$
1665,860
- **FAM-P5**
MS-SI: znaleziono m/z 1309,6 $[M+2]^+$, obliczone dla $C_{70}H_{77}N_{13}O_{13}$
1307,576
- **FAM-P5N**
MS-SI: znaleziono m/z 1308,5 $[M+2]^+$, obliczone dla $C_{70}H_{78}N_{14}O_{12}$
1306,592
- **FAM-R₈** FAM-Arg₈
MS-SI: znaleziono m/z 1625,9 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{69}H_{108}N_{32}O_{15}$
1624,867
- **FAM-KW** FAM-Lys₃Trp₃
MS-ESI: znaleziono m/z 1319,5868 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{72}H_{78}N_{12}O_{13}$
1318,581
- **FAM-RW** FAM-Arg₃Trp₃
MS-SI: znaleziono m/z 1403,7 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{72}H_{78}N_{18}O_{13}$
1402,600
- **FMDP-P1N**
MS-SI: znaleziono m/z 783,4 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{35}H_{62}N_{10}O_8S$
782,4473
- **FMDP-P2N**

MS-SI: znaleziono m/z 783,5 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{35}H_{62}N_{10}O_8S$
782,4473

- **FMDP-P3N**

MS-SI: znaleziono m/z 1505 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{76}H_{117}N_{19}O_{13}$
1503,908

- **FMDP-P4N**

MS-SI: znaleziono m/z 1535,9 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{76}H_{117}N_{19}O_{13}$
1534,962

- **FMDP-P5N**

MS-SI: znaleziono m/z 1147,6 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{57}H_{78}N_{16}O_{10}$
1146,609

- **FMDP-P6N**

MS-SI: znaleziono m/z 874,6 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{40}H_{67}N_{13}O_9$ 873,5185

- **cisP-P5N**

MS-SI: znaleziono m/z 1059,3 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{55}H_{78}N_{16}O_6$
1058,629

- **FMDP-RFN** FMDP-Arg₃Phe₃-NH₂

MS-SI: znaleziono m/z 1125,5 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{53}H_{76}N_{18}O_{10}$
1124,599

- **FMDP-FRN** FMDP-Phe₃Arg₃-NH₂;

MS-SI: znaleziono m/z 1125,6 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{53}H_{76}N_{18}O_{10}$
1124,599

1.3. Odłączenie peptydu z żywicy chloro-2'-chlorotrytylowej z retencją osłon grup bocznych reszt aminokwasowych

Żywicę z peptydem oraz mieszaniną dichlorometan:trifluoroetanol:kwas octowy 7:2:1 (v:v:v) mieszano przez 2 godziny. Następnie na niewielkiej ilości należy ocenić czy peptyd wytrąci się w eterze dietylowym (ze względu na bardzo niską polarność produktu); jeśli peptyd wytrąca się należy całość przesączyć do schłodzonego eteru dietylowego, a otrzymany osad odwirować i suszyć w eksykatorze próżniowym. Jeśli peptyd rozpuszcza się w eterze dietylowym należy zastosować bardziej polarny rozpuszczalnik i postępować podobnie jak opisano powyżej.

Otrzymano:

- **Ac-[Arg(Pbf)]₈** MS-SI: znaleziono m/z 3326,7 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{154}H_{228}N_{32}O_{34}S_8$ 3325,486
- **Ac-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Phe-Trp(Boc)**
MS-SI: znaleziono m/z 1628,7 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{84}H_{117}N_{13}O_{18}S$ 1627,836
- **Boc-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Phe-Trp(Boc)**
MS-SI: znaleziono m/z 1674,9 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{86}H_{123}N_{13}O_{19}S$ 1673,878
- **Boc-[Arg(Pbf)]₃Phe₃**
MS-SI: znaleziono m/z 1684,6 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{84}H_{113}N_{15}O_{16}S_3$ 1683,765
- **Boc-Lys(Boc)₃Trp(Boc)₃**
MS-SI: znaleziono m/z 1571,0 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{81}H_{126}N_{12}O_{19}$ 1570,926

2. Synteza peptydów oraz koniugatów z FMDP na C-końcu metodą estrów aktywnych

2.1. *N*-tert-butoksykarbonyloaminokwasy

Otrzymano standardową metodą działając na wodny roztwór soli sodowej aminokwasu roztworem pirowęglału di-*tert*-butylu (Boc_2O) w dioksanie.

- **Boc-Asn** – otrzymano jako biały osad o tt. 170-171°C z wydajnością 67%; $[\alpha]_D^{25}$ -7 (*c*2, DMF); $R_f = 0,67$ (n-butanol:kwas octowy:woda=4:1:1; v/v/v); (tt. lit. 174-176°C) [158].
- **Boc-Pro 9c** – otrzymano jako biały osad o tt. 130-131°C; $[\alpha]_D^{25}$ -60 (*c*2, AcOH); (tt. lit. 133-135°C) [159].
- **Boc-Met 6b** – otrzymano jako olej; $[\alpha]_D^{25}$ -21 (*c*1, MeOH); $R_f = 0,85$ (n-butanol:kwas octowy:woda=4:1:1; v/v/v)
 1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 1,4 (s, 9H); 2 (m, 1H); 2,1 (s, 3H); 2,2 (m, 1H); 2,6 (m, 2H); 4,3 (m, 1H); 6,8 (m, 1H)

- **Boc₂-Lys 9a** – otrzymano jako olej z wydajnością 85%; $R_f=0,77$ (chloroform:metanol:kwas octowy=10:0,25:0,5; v/v/v)
 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 1,4 (s, 18H); 1,6 (m, 4H); 1,7 (m, 2H); 2,9 (t, $J=7\text{Hz}$, 2H); 3,6 (m, 1H); 4,3 (m, 1H); 6,7 (m, 2H)

2.2. Zmydlanie peptydu (reakcja hydrolizy estrów metylowych peptydów) – przepis ogólny

W kolbie kulistej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 0,58 mmol estru, który rozpuszczono w 30 ml metanolu. Następnie do roztworu dodano wodny roztwór NaOH (2,4 g NaOH/20 ml wody). Całość mieszano 24 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik, a pozostały wodny roztwór zakwaszono przy pomocy NaHSO_4 do osiągnięcia $\text{pH}\sim 2$. Warstwę wodną przemyto dwukrotnie eterem dietylowym, a następnie ekstrahowano octanem etylu. Połączone warstwy organiczne osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, po czym odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem.

- **Boc-Lys(Boc)Leu 11a** – otrzymano 0,194g w postaci oleju; $R_f= 0,36$ (Układ toluen: AcOEt: EtOH (8:2:0,5 v/v/v))
- **Boc-Lys(Boc)-Leu-Pro-Val 13**– otrzymano 0,224g w postaci oleju; $R_f= 0,4$ (Układ toluen: AcOEt: EtOH (8:2:0,5 v/v/v))

2.3. Otrzymywanie peptydów metodą mieszanych bezwodników – Boc-AA-AA-OMe – przepis ogólny

W trójszyjnej kolbie kulistej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w termometr, wkraplacz i chłodnicę zwrotną umieszczono 3 mmol związku Boc-AA oraz 3 mmol trietyloaminy, które rozpuszczono w 70 ml bezwodnego THF. Następnie kolbę umieszczono w łaźni chłodzącej i utrzymywano mieszaninę w temperaturze -15°C . Stale mieszając wkroplono 3 mmol chloromrówczanu izobutyłu w takim tempie, aby temperatura mieszaniny nie przekroczyła 0°C . Roztwór mieszano przez 1h w temperaturze -5°C . Po tym czasie do mieszaniny wkroplono zawiesinę 3 mmol AA-OMe w 20 ml bezwodnego THF, ciągle mieszając i utrzymując temperaturę -5°C . Reakcję prowadzono przez 24h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny dodano 100 ml chloroformu, a następnie przemywano 50 ml wody, następnie 50 ml nasyconego roztworu NaHSO_4 , wodą oraz 50 ml nasyconego roztworu

NaHCO₃ i ponownie porcjami 50 mL wody do uzyskania obojętnego pH. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano surowy produkt, który następnie oczyszczono dwukrotnie na kolumnie chromatograficznej (w której fazę stacjonarną stanowił żel krzemionkowy 43-60 μm). Fazę ruchomą stanowił układ CHCl₃: MeOH: CH₃CN (8:0,25:0,25 v/v/v).

- **(Boc)₂-Lys-Leu-OMe 10a** – otrzymano 1,96 g (4,1 mmol, 71%) czystego produktu w postaci oleju. R_f = 0,73 (CHCl₃: MeOH: NH₃ (8:0,5:0,1 v/v/v)) MS-ESI znaleziono *m/z* 496,3091 [M+Na]⁺, obliczone dla C₂₃H₄₃N₃O₇: 473,3103;
¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6,48 (s, 1H); 5,13 (s, 1H); 4,69 (s, 1H); 4,59 (q, 1H); 4,07 (d, 1H); 3,72 (s, 3H); 3,11 (qv, 2H); 1,82 (m, 2H); 1,62 (m, 6H); 1,52 (m, 1H); 1,44 (s, 18H); 0,93 (d, 6H)
- **Boc-Pro-Val-OMe 10b** – otrzymano 0,72 g (2,19 mmol, 35%) czystego produktu w postaci oleju. R_f = 0,35 (CHCl₃: MeOH (8:0,5 v/v)) [α]_D²⁵ -86 (c 0,25, CHCl₃) (lit. [α]_D²⁵ -88 (c 0,25, CHCl₃) [160]) MS-ESI znaleziono *m/z* 239,2061 [M+1]⁺, obliczone dla C₁₆H₂₈N₂O₅: 238,1998;
¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6,53 (s, 1H); 4,47 (d, 1H); 4,36 (d, 1H); 3,73 (s, 3H); 3,49 (m, 2H); 2,39 (s, 2H); 2,16 (s, 2H); 1,89 (s, 1H); 1,47 (s, 9H); 0,95 (s, 6H)
- **(Boc)₂-Lys-Leu-Pro-Val-OMe 12** – otrzymano 78 mg (0,12 mmol, 29%) czystego produktu (w postaci oleju. R_f = 0,74 (CHCl₃: MeOH (40:1,5 v/v)), MS-ESI znaleziono *m/z* 692,4761 [M+Na]⁺, obliczone dla C₃₃H₅₉N₅O₉: 669,4313;
- **Boc-Met-FMDP 7b** – otrzymano 350 mg (53%) surowego produktu w postaci oleju. R_f = 0,87 (n-butanol :CH₃COOH :H₂O (4:1:1 v/v/v)), MS-ESI znaleziono *m/z* 448,1595 [M+1]⁺, obliczone dla C₁₈H₂₉N₃O₈S: 447,1675;

- **Boc-Met-FMDP-NH₂** – otrzymano 151 mg (65%) surowego produktu w postaci oleju, który oczyszczono chromatograficznie. $R_f = 0,85$ (n-butanol :CH₃COOH :H₂O (4:1:1 v/v/v)).
MS-ESI znaleziono m/z 447,5155 [M+1]⁺, obliczone dla C₁₈H₃₀N₄O₇S: 446,5184;

2.4. Ester peptydylo-*N*-hydroksysukcynimidyłowy – przepis ogólny

W kolbie kulistej o pojemności 250 ml rozpuszczono 13 mmoli związku Boc-AA_n, w 60 ml bezwodnego THF oraz 13 mmoli (1,50 g) *N*-hydroksysukcynimidu. Mieszaninę umieszczono w łaźni lodowej, a następnie wkraplano do niej roztwór 13 mmoli (2,68 g) *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) w świeżo przedestylowanym THF (20 ml). Następnie kontynuowano mieszanie przez 18h w temperaturze pokojowej, po czym odsączono wytworzony osad. Rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstały olej zalano chloroformem i niewielką ilością heksanu. Po upływie 24h odsączono osad estru związku.

- **Boc-Leu-NSu** – otrzymano 2,25 g (60%) czystego związku w postaci białego ciała stałego; $R_f = 0,79$ (Układ heksan: AcOEt (1:1 v/v)),
- **Boc-Met-NSu** – otrzymano 1,3 g (94%) czystego związku w postaci białego ciała stałego; $R_f = 0,6$ (Układ heksan: AcOEt (1:1 v/v));
- **Boc-Lys(Boc)-NSu** – otrzymano 3,07 g (80%) czystego związku w postaci oleju; $R_f = 0,37$ (Układ heksan: AcOEt (1:1 v/v));
- **Boc-Lys(Boc)-Leu-NSu** – otrzymano 1,61 g (70%) czystego związku w postaci oleju; $R_f = 0,33$ (Układ heksan: AcOEt (1:1 v/v));
- **Boc-Pro-NSu** – otrzymano 2,47 g (86%) czystego związku w postaci oleju; $R_f = 0,53$ (Układ heksan: AcOEt (1:1 v/v)),
- **Boc-Lys(Boc)-Leu-Pro-Val-NSu** – otrzymano 0,69 g (97%) czystego związku w postaci oleju; $R_f = 0,55$ (Układ heksan: AcOEt (1:2 v/v))

2.5. Otrzymywanie peptydów metodą estrów aktywnych – Boc-AA-AA-OMe – przepis ogólny

W kolbie kulistej o pojemności 100 ml rozpuszczono w bezwodnym THF 30 mmoli estru aktywnego aminokwasu oraz 33 mmoli (4,6 ml) trietyloaminy. Do roztworu wkroplono zawiesinę 30 mmoli aminokwasu z wolną grupą aminową w

THF z dodatkiem 33 mmoli (4,6 ml) trietyloaminy. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h. Po zakończeniu reakcji oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstały olej zalano 30 ml chloroformu. Następnie roztwór przemyto 10 ml wody, po czym 10 ml roztworu NaHSO₄ i ponownie 10 ml wody. Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, a rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt krystalizowano z mieszaniny rozpuszczalników chloroformu i heksanu, bądź oczyszczano metodą kolumnowej chromatografii cieczerwowej.

Otrzymano:

- **Boc-Leu-FMDP 7a** – otrzymano 90 mg (60%) czystego związku w postaci białego ciała stałego; R_f=0,35 (heksan:AcOEt (1:1 v/v),
¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 8,34 (s, 1H); 8,08 (s, 1H); 7,12 (d, 1H); 6,81 (d, 1H); 4,76 (q, 1H); 4,28 (q, 1H); 3,79 (s, 3H); 3,77 (s, 2H); 3,69 (s, 2H); 1,86 (q, 1H); 1,78 (t, 2H); 1,44 (s, 9H); 0,97 (d, 6H)

- **Boc-Met-FMDP 7b** – otrzymano 135 mg (64%) czystego związku w postaci białego ciała stałego; R_f=0,35 (Układ heksan: AcOEt (1:1 v/v)), MS-ESI znaleziono *m/z* 448,1595 [M+1]⁺, obliczone dla C₁₈H₂₉N₃O₈S: 447,1675;

Boc-Lys(Boc)-Leu-OMe 10a – otrzymano 2,93 g (90%) czystego związku w postaci oleju; R_f = 0,59 (Układ heksan: AcOEt (1:1 v/v))
MS-ESI znaleziono *m/z* 474,3210 [M+1]⁺, obliczone dla C₂₃H₄₃N₃O₇: 473,3103;

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 6,48 (s, 1H); 5,13 (s, 1H); 4,69 (s, 1H); 4,59 (q, 1H); 4,07 (d, 1H); 3,72 (s, 3H); 3,11 (qv, 2H); 1,82 (m, 2H); 1,62 (m, 6H); 1,52 (m, 1H); 1,44 (s, 18H); 0,93 (d, 6H)

- **Boc-Pro-Val-OMe 10b** – otrzymano 2 g (76%) surowego produktu, który następnie oczyszczono metodą kolumnowej chromatografii cieczerwowej w układzie heksan: AcOEt (7:3 v/v). Ostatecznie otrzymano 1,83 g (70%) czystego związku; R_f= 0,38 (Układ heksan: AcOEt (7:3 v/v)),
[α]_D²⁵ -86 (c 0,25, CHCl₃) (lit. [α]_D²⁵ -88 (c 0,25, CHCl₃) [160])

MS-ESI znaleziono m/z 239,1965 $[M+1]^+$, obliczone dla $C_{16}H_{28}N_2O_5$:
238,1998;

1H NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 6,53 (s, 1H); 4,47 (d, 1H); 4,36 (d, 1H); 3,73 (s, 3H); 3,49 (m, 2H); 2,39 (s, 2H); 2,16 (s, 2H); 1,89 (s, 1H); 1,47 (s, 9H); 0,95 (s, 6H),

- **Boc-Lys(Boc)-Leu-Pro-Val-OMe 12** – otrzymano 1,55 g (80%) surowego produktu, który następnie oczyszczono metodą kolumnowej chromatografii ciekowej w układzie heksan: AcOEt (1:1,5 v/v). Ostatecznie otrzymano 1,35 g (70%) czystego związku; $R_f = 0,44$ (Układ heksan: AcOEt (1:2 v/v)), MS-ESI znaleziono m/z 692,4076 $[M+Na]^+$ obliczone dla $C_{33}H_{59}N_5O_9$ 669,4313;
- **(Boc)₂-Lys-Leu-Pro-Val-Leu-FMDP 14a** – otrzymano 180 mg (81%) surowego produktu w postaci białego ciała stałego; $R_f = 0,3$ (Układ AcOEt), MS-ESI znaleziono m/z 989,5721 $[M+Na]^+$, obliczone dla $C_{46}H_{78}N_8O_{14}$ 966,5264;
- **(Boc)₂-Lys-Leu-Pro-Val-Met-FMDP 14b** – otrzymano 195 mg (66%) surowego produktu w postaci oleju; $R_f = 0,58$ (Układ AcOEt), MS-ESI znaleziono m/z 1007,5076 $[M+Na]^+$, obliczone dla $C_{45}H_{76}N_8O_{14}S$ 984,5202;
- **(Boc)₂-Lys-Leu-Pro-Val-Met-FMDP·NH₂ 14c** – otrzymano 160 mg (60%) surowego produktu w postaci oleju; $R_f = 0,61$ (Układ AcOEt), MS-ESI znaleziono m/z 984,5762 $[M+H]^+$, obliczone dla $C_{45}H_{77}N_9O_{13}S$ 983,5362;

2.6. Peptyd z wolną grupą α -aminową (usuwanie osłony typu Boc) – przepis ogólny

W kolbie kulistej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 0,50 mmol chronionego związku, a następnie dodano 0,5 ml roztworu metanolu wysyconego HCl (5,77 g HCl/150 ml metanolu). Roztwór mieszano przez 5h, po czym odparowano rozpuszczalnik. Produkt przemywano trzykrotnie eterem dietylowym, który odparowywano w celu pozbycia się pozostałości kwasu.

- **Pro-Val-OMe 11b** – otrzymano 0,106 g (0,46 mmol, 98%) produktu w postaci oleju; $R_f = 0,85$ (Układ n-butanol : CH_3COOH : H_2O (4:1:1 v/v/v))
- **L-Leu-FMDP 8a**
 $^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ [ppm]: 8,34 (s, 1H); 8,08 (s, 1H); 7,12 (d, 1H); 6,81 (d, 1H); 4,76 (q, 1H); 4,28 (q, 1H); 3,79 (s, 3H); 3,77 (s, 2H); 3,69 (s, 2H); 1,86 (q, 1H); 1,78 (t, 2H); 0,97 (d, 6H)
- **P2-FMDP**
MS-SI: znaleziono m/z 785,3 $[\text{M}+1]^+$, obliczone dla $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}$
784,4153
- **Ac-P5-FMDP**
MS-SI: znaleziono m/z 1190,5 $[\text{M}+1]^+$, obliczone dla $\text{C}_{59}\text{H}_{79}\text{N}_{15}\text{O}_{12}$
1189,603
- **R₈-A-FMDP Arg₈-Ala-FMDP**
MS-SI: znaleziono m/z 1537,7 $[\text{M}+1]^+$, obliczone dla $\text{C}_{59}\text{H}_{113}\text{N}_{35}\text{O}_{14}$
1536,755
- **RF-FMDP (Arg)₃(Phe)₃-FMDP**
MS-SI: znaleziono m/z 1128,6 $[\text{M}+1]^+$, obliczone dla $\text{C}_{53}\text{H}_{77}\text{N}_{17}\text{O}_{11}$
1127,599
- **KW-FMDP (Lys)₃(Trp)₃-FMDP**
MS-ESI: znaleziono m/z 1159,6052 $[\text{M}+1]^+$, obliczone dla $\text{C}_{59}\text{H}_{78}\text{N}_{14}\text{O}_{11}$
1158,597
- **FR-FMDP (Phe)₃(Arg)₃-FMDP**
MS-SI: znaleziono m/z 1126,7 $[\text{M}+1]^+$, obliczone dla $\text{C}_{53}\text{H}_{75}\text{N}_{17}\text{O}_{11}$
1125,583

3. Synteza pochodnych kwasu N^3 -(4-metoksyfumaroilo)- N^2 -tert-butoksykarbonylo-L-2,3-diaminopropanowego (FMDP)

3.1. Wodoromaleinian metylu 21

Otrzymano według procedury literaturowej [161] wychodząc z 98g (1 mol) bezwodnika maleinowego i 32 g (1 mol) bezwodnego metanolu. Otrzymano 93,6 g wodoromaleinianu metylu w postaci cieczy z wydajnością 72%. Produkt bez dodatkowego oczyszczania poddano reakcji izomeryzacji do wodorofumaranu metylu.

3.2. Wodorofumaran metylu 22

Otrzymano według procedury literaturowej [161] wychodząc z 93,6 g (0,72 mola) wodoromaleinian metylu i 4,5 g (65 mmoli) tiomocznika. Wodorofumaran metylu izolowano z wydajnością całkowitą 57,5% (53,8 g) o tt 138-140°C (tt lit. 142-144°C) [161].

3.3. Fumaran *N*-hydroksysukcynimidylowometylowy 23

Otrzymano według zmodyfikowanej procedury literaturowej [45] wychodząc z 13 g (0,1 mol) wodorofumaranu metylu i 11,5 g (0,1 mol) *N*-hydroksysukcynoimidu. Produkt w postaci białego ciała stałego izolowano z wydajnością 54,6% (12,4 g); tt 91-93°C (octan etylu); (tt lit. 93,5-94,5°C) [45], R_f 0,55 (octan etylu:heksan=1:1 v/v)

3.4. *N*-*tert*-butoksykarbonylo-*L*-asparagina (Boc-Asn) 25

Otrzymano według procedury literaturowej [158] wychodząc z 66 g (0,45 mola) asparaginy i 114 g (0,5 mol) pirowęgłanu di-*tert*-butylu (Boc₂O). Otrzymano *N*-*tert*-butoksykarbonylo-*L*-asparaginę z wydajnością całkowitą 53,3% (55,6 g) o tt 173-175°C (tt lit. 174-176°C) [158]; R_f 0,66 (n-butanol:kwas octowy:woda=4:1:1 v/v/v).

3.5. Kwas *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*L*-2,3-diaminopropanowy (Boc-A₂pr) 26

Otrzymano według procedury literaturowej [162] wychodząc z 5 g (21 mmola) Boc-*L*-Asn. i 8,3 g (25 mmola) diacetyljodozobenzenu (PIDA). Produkt o tt 204-205°C izolowano z wydajnością 55,1% (2,42 g); (tt lit. 198-200°C) [162]; R_f 0,52 (octan etylu:metanol:woda=5:1:0,75 v/v/v).

3.6. Kwas *N*²-*tert*-butoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowy (Boc-FMDP) 4

Otrzymano według procedury literaturowej [45] wychodząc z 4,54 g (20 mmol) fumaranu *N*-hydroksysukcynimidylowometylowego i 4,8 g (20 mmol) Boc-*L*-A₂pr i 1,68 g (20 mmoli). Otrzymano produkt z wydajnością 63% (4,8 g), tt 71-72°C (tt lit. 72-74°C) [45]; R_f 0,39 (octan etylu:metanol:woda=5:1:0,75 v/v/v).

3.7. Kwas *N*²-(9-fluorenylometoksykarbonylo-*N*³-(4-metoksyfumaroiło)-*L*-2,3-diaminopropanowy (Fmoc-FMDP) 4a

2,53 g (0,8 mmola) Boc-FMDP rozpuszczono w 30 ml kwasu trifluorooctowego (TFA) i pozostawiono na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie odparowano

kwasy, a pozostały osad dwukrotnie przemyto eterem dietylowym. Suchy osad rozpuszczono w 20 ml wody i dodano 0,67 g (0,8 mmola) wodorowęglanu sodu, a następnie wkraplano roztwór 2,69 g (0,8 mmola) *N*-(9-fluorenylo-metoksykarbonylo)sukcynoimidu (Fmoc-NSu) w 30 ml dioksanu. Reakcję pozostawiono na 18 godzin w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji odparowano część mieszaniny, a pozostały roztwór rozcieńczono wodą i przemywano eterem naftowym, a następnie eterem dietylowym. Roztwór zakwaszono NaHSO₄ do pH 2 i ekstrahowano trzema porcjami octanu etylu. Warstwę organiczną przemywano wodą do uzyskania odczynu obojętnego, a następnie suszono nad bezwodnym MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego odparowano rozpuszczalnik otrzymując proszek o barwie kremowej z wydajnością 74% (2,42 g), tt 122°C;

MS-SI: znaleziono m/z 439,2 [M+1]⁺, obliczone dla C₂₃H₂₂N₂O₇ 438,1427

4. Kwas (1*R*,2*S*)-*N*-*tert*-butoksykarbonylo-2-aminocyklopentanowy (Boc-*cis*-pentacyna)

0,41 g (3,18 mmola) kwasu (1*R*,2*S*)-2-aminocyklopentanokarboksylowego i 0,34 g (3,2 mmola) węglanu sodu rozpuszczono w 5 ml wody i schłodzono w lodzie. Do mieszaniny wkraplano porcjami 0,69 g (3,2 mmol) pirowęglanu di-*tert*-butylu rozpuszczonego w 5 ml dioksanu, a następnie mieszano przez godzinę w temp. 5°C. Mieszanie kontynuowano w temp. pokojowej przez 15h. Po tym czasie mieszaninę zakwaszono doprowadzono do pH 2 działając roztworem wodorosiarczanu sodu, a następnie ekstrahowano trzema porcjami octanu etylu (3x10 ml). Warstwę organiczną przemywano wodą do uzyskania obojętnego odczynu i suszono nad bezwodnym MgSO₄. Następnie rozpuszczalnik odparowano otrzymując biały bezpostaciowy produkt z wydajnością 55% (0,4 g);

MS-SI: znaleziono m/z 230,1 [M+1]⁺, obliczone dla C₁₁H₁₉NO₄ 229,1314

5. Synteza N^5 -[N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanoilo]- N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-lizyny [Boc-Lys(Boc-FMDP)]

5.1. N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanian *N*-hydroksysukcynimidylu (Boc-FMDP-NSu) 27

Wychodząc z 630 mg (2 mmole) Boc-FMDP, 230 mg (2 mmole) *N*-hydroksysukcynoimidu oraz 452 mg (2,2 mmole) DCC w 10 ml bezwodnego THF otrzymano produkt **27** w postaci białego ciała stałego izolowano z wydajnością 60% (500 mg).

MS-ESI znaleziono m/z 414,1362 [M+H]⁺, obliczone dla C₁₇H₂₃N₃O₉ 413,1434;

5.2. N^5 -[N^2 -*tert*-butoksykarbonylo- N^3 -(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanoilo]- N^2 -*tert*-butoksykarbonylo-L-lizyna [Boc-Lys(Boc-FMDP)] 28

W kolbie kulistej o pojemności 50 ml rozpuszczono 1,2 mmola (500mg) estru aktywnego Boc-FMDP **29** w 10 ml chloroformie, a następnie wkropiono zawiesinę 1,3 mmoli (325mg) Boc-Lys-OH i 1,3 mmoli (0,18 ml) trietyloaminy w 5 ml chloroformu. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 24h. Po zakończeniu reakcji oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w 10% wodnym roztworze KHSO₄ i ekstrahowano chloroformem (4×10 ml). Połączone warstwy organiczne osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, a rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano metodą kolumnowej chromatografii cieczonej. Otrzymano 360 mg Boc-Lys(Boc-FMDP) **28** w postaci oleju z wydajnością 55%.

MS-ESI znaleziono m/z 545,2685 [M+H]⁺, obliczone dla C₂₄H₄₀N₄O₁₀ 544,2744;

¹H NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 8,34 (m, 1H); 8,08 (m, 2H); 8 (m, 1H); 7,12 (d, 1H); 6,81 (d, 1H); 4,76 (q, 1H); 4,28 (q, 1H); 3,79 (s, 3H); 3,47 (d, 2H); 3,29 (m, 2H); 1,76 (q, 2H); 1,55 (m, 2H); 1,28 (m, 2H); 0,97 (s, 18H)

6. Synteza 6-fosforanu D-aminoglukitolu 19

100 mg (0,39 mmola) 6-fosforanu D-glukozaminy rozpuszczono w 15ml mieszaniny etanol:woda (2:1), powstały roztwór ochłodzono w lodzie. Do energicznie mieszanego roztworu dodawano małymi porcjami 40 mg (1 mmol) NaBH₄. Po dodaniu

całości borowodorku roztwór pozostawiono 5h w temperaturze pokojowej, a następnie dodano kolejne 40 mg (1 mmol) NaBH₄ i pozostawiono na kolejne 12h. W celu rozłożenia nieprzereagowanego borowodorku sodu do mieszaniny poreakcyjnej dodano kilka kropel 10% HCl (pH 4). Roztwór zawierający nadmiar jonów nieorganicznych odparowano, rozpuszczono w 5 ml wody i oczyszczono przy pomocy chromatografii jonowymiennnej – Dowex 50X8-100 [H⁺]. Frakcję zawierającą produkt wymyło za pomocą wody. Obecność produktu sprawdzono za pomocą TLC stosując układ n-butanol:woda:kw. octowy (2:1:1 v:v) (R_f = 0,21). Otrzymano 47 mg związku **19** z wydajnością 47%.

MS-ESI znaleziono m/z 262,0595 [M+H]⁺; obliczone dla C₆H₁₆NO₈P 261,0614;

¹H NMR (D₂O) δ [ppm]: 3,9 (m, 3H); 3,7 (m, 2H); 3,6 (m, 2H); 3,4 (m, 1H)

³¹P NMR (D₂O) δ [ppm]: 5,5

7. Synteza koniugatów jonowych Arg₈ z inhibitorami

Otrzymano w oparciu o procedurę literaturową [143]. 40 mg (0,032 mmol) Arg₈ (oktaargininy) rozpuszczono w 2 ml 10% roztworze acetonitrylu w wodzie. Następnie dodano 4 eq. (0,128 mmol) odpowiedniego inhibitora rozpuszczonego w 2 ml 10% roztworu acetonitrylu w wodzie. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny a następnie poddano liofilizacji.

Produkty otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością ilościową.

- Arg₈ • 4 FMDP
- Arg₈ • 4 GlcN-ol-6P

SUMMARY

The common use of antibacterial antibiotics and several modern medical technologies giving rise to attenuation of human immunological system, have caused a substantial increase in frequency of disseminated mycoses. These infections are nowadays considered a serious clinical problem, due to the high mortality rate, limited number of effective antifungal drugs and high level of antifungal drug resistance. Search for new antifungals, especially targeting novel molecular targets in fungal cells, is therefore an urgent need.

Research in this subject have been performed at Gdańsk Univeristy of Technology where they focused on glucosamine 6-phosphate (GlcN-6-P) synthase. This fungal enzyme catalyzing a crucial reaction in the cell wall biosynthesis, is known as a potential target for antifungal chemotherapy and *N*³-(4-methoxyfumaroyle)-L-2,3-diaminopropanonic acid (FMDP) is an effective and selective inhibitor of this enzyme. Unfortunately FMDP is a highly hydrophilic molecule and is poorly taken up by fungal cells.

In my study I have synthesized conjugates of FMDP and other enzymatic inhibitors of amino acid structure with oligopeptides as potential antifunals. These conjugates contain an inhibitor and a chosen cell-penetrating peptide (CPP) as a molecular carrier. I have synthesized 22 potential CPPs, including 6 novel compounds and their 35 conjugates with FMDP, BADP [(*E*)-*N*³-(4-oxy-4-phenyl-2-butenoyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid], *cis*-pentacin and 7 conjugates with fluorescent indicators.

Conjugates containing the inhibitor as an classical N-terminal residue have been synthesized using a standard SPPS strategy. On the other hand, conjugates with a C-terminal inhibitor have been synthesized in solution or by the approach in which a CPP carrier has been prepared by SPPS synthesis and an inhibitor has been then added by the active ester methodology. A conjugate containing FMDP as a substituent attached to the lysine side chain has been also obtained.

All of the compounds (including CPPs and conjugates) have been tested for their antifungal activity. Most of them demonstrated good activity in minimal medium but only some of the were active in the complex RPMI-1640 medium. Rather unexpectedly come of the carriers have not confirmed a CPP potential but have been transported by

fungal oligopeptide permeases. In contrast, conjugates of FMDP with oligocationic CPPs are the first reported CPPs' derivatives with antifungal activity, thus confirming a rationale of the basic strategy employed in this work.

Bibliografia

- [1] F. Meunier, „Targeting fungi: A challenge"; *Am. J. Med.*; **99**; 60–67 (1995).
- [2] D.J. Sheehan, C.A. Hitchcock, M. Carol, „Current and Emerging Azole Antifungal Agents"; *Clin. Microbiol. Rev.*; **12**; 40–79 (1999).
- [3] S. Sternberg, „The emerging fungal threat"; *Science*; **266**; 1632–1634 (1994).
- [4] R. Saral, „*Candida* and *Aspergillus* infections in immunocompromised patients: an overview"; *Clin. Infect. Dis.*; **13**; 487–492 (1991).
- [5] J.R. Perfect, „Management of the immunocompromised patient: impact of fungal infections"; *Rev. Infect. Dis.*; **13**; 473 (1991).
- [6] A. Wald, W. Leisenring, J.-A. van Burik, R.A. Bowden, „Epidemiology of *Aspergillus* Infections in a Large Cohort of Patients Undergoing Bone Marrow Transplantation"; *Cancer Res.*; 1459–1466 (1997).
- [7] S. Lin, J. Schranz, S.M. Teutsch, „Aspergillosis Case-Fatality Rate : Systematic Review of the Literature"; *Clin. Infect. Dis.*; **32**; 358–366 (2001).
- [8] J.R. Wingard, P. Kubilis, L. Lee, G. Yee, M. White, L. Walshe, R.A. Bowden, E. Anaissie, J. Hiemenz, J. Lister, „Clinical Significance of Nephrotoxicity in Patients Treated with Amphotericin B for Suspected or Proven Aspergillosis"; *Clin. Infect. Dis.*; **29**; 1402–1407 (1999).
- [9] A.H. Groll, S.C. Piscitelli, T.J. Walsh, „Clinical pharmacology of systemic antifungal agents"; *Adv. Pharmacol.*; **44**; 343–500 (1998).
- [10] A.H. Groll, T.J. Walsh, „Antifungal chemotherapy: advances and perspectives"; *Swiss Med. Wkly.*; **132**; 303–312 (2002).
- [11] W.E. Dismukes, „Introduction to Antifungal Drugs"; *Clin. Infect. Dis.*; **30**; 653–657 (2000).
- [12] L.B. Johnson, C.A. Kauffman, „Voriconazole : A New Triazole Antifungal Agent"; *Clin. Infect. Dis.*; **36**; 630–637 (2003).
- [13] S.C. Metcalf, D.H. Dockrell, „Improved outcomes associated with advances in therapy for invasive fungal infections in immunocompromised hosts"; *J. Infect.*; **55**; 287–299 (2007).
- [14] D.W. Denning, „Echinocandins: a new class of antifungal"; *J. Antimicrob. Chemother.*; **49**; 889–891 (2002).

- [15] M.-T. Baixench, N. Aoun, M. Desnos-Ollivier, D. Garcia-Hermoso, S. Bretagne, S. Ramires, C. Piketty, E. Dannaoui, „Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review"; *J. Antimicrob. Chemother.*; 1076–1083 (2007).
- [16] C.J. Bates, W.R. Adams, R. E. Handschumacher, „Control of the Formation of Uridine Diphospho-N-acetyl- hexosamine and Glycoprotein Synthesis in Rat Liver"; *J. Biol. Chem.*; **241**; 1705–1712 (1966).
- [17] B.F. Kania, M. Juniak, „Polienowe antybiotyki makrolidowe w zwalczaniu grzybic u zwierząt"; *Mikol. Lek.*; **17**; 124–127 (2010).
- [18] A. Vermes, H.J. Guchelaar, J. Dankert, „Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions."; *J. Antimicrob. Chemother.*; **46**; 171–179 (2000).
- [19] J. Sastre Toraño, A. Vermes, H.-J. Guchelaar, „Simultaneous determination of flucytosine and fluorouracil in human plasma by high-performance liquid chromatography"; *Biomed. Chromatogr.*; **15**; 89–94 (2001).
- [20] R.K. Li, M.G. Rinaldi, „In Vitro Antifungal Activity of Nikkomycin Z in Combination with Fluconazole or Itraconazole."; *Antimicrob. Agents Chemother.*; **43**; 1401–1405 (1999).
- [21] N.H. Georgopapadakou, „Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on β -1,3-glucan synthase inhibitors"; *Expert. Opin. Investig. Drugs.*; **10**; 269–280 (2001).
- [22] O.A. Cornely, K. Schmitz, S. Aisenbrey, „The first echinocandin: caspofungin"; *Response*; **45**; 56–60 (2002).
- [23] M. Konishi, M. Nishio, K. Saitoh, T. Oki, H. Kawaguchi, T. Miyaki, „Cispentacin, a new antifungal antibiotic. Production, Isolation, physico-chemical properties and structure"; *J. Antibiot.*; **42**; 1749–1755 (1989).
- [24] T. Oki, M. Hirano, K. Tomatsu, K.I. Numata, H. Kamei, „Cispentacin, a new antifungal antibiotic. In Vitro Antibacterial Activity"; *J. Antibiot.*; **42**; 1756–1762 (1989).
- [25] J.O. Capobianco, D. Zakula, M.L. Coen, R.C. Goldman, „Anti-*Candida* Activity of cispentacin: the Active Transport by amino acid permeases and possible mechanism of action"; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **190**; 1037–1044

- (1993).
- [26] B. Badet, P. Vermoote, P.-Y. Haumont, F. Lederer, F. Le Goffict, „Glucosamine Synthetase from *Escherichia coli*: Purification, Properties, and Glutamine-Utilizing Site Location"; *Biochemistry*; **26**; 1940–1948 (1987).
- [27] J.M. Buchanan, „The amidotransferases."; *Adv. Enzym. Relat. Areas Mol. Biol.*; **39**; 91–183 (1973).
- [28] W.L. Whelan, C.E. Ballou, „Sporulation in D-glucosamine auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*: meiosis with defective ascospore wall formation"; *J. Bacteriol.*; **124**; 1545–1557 (1975).
- [29] S. Milewski, „Glucosamine-6-phosphate synthase — the multi-facets enzyme"; *Biochim. Biophys. Acta*; **1597**; 173 – 192 (2002).
- [30] J.L. Smith, „Structures of glutamine amidotransferases from the purine biosynthetic pathway"; *Biochem. Soc. Trans.*; **23**; 894–898 (1995).
- [31] J.A. Brannigan, G. Dodson, H.J. Duggleby, P.C. Moody, J.L. Smith, D.R. Tomchick, A.G. Murzin, „A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation"; *Nature*; **378**; 416–419 (1995).
- [32] S. Gosh, H.J. Blumenthal, E. Davidson, S. Roseman, „Glucosamine metabolism. V. Enzymatic synthesis of glucosamine 6-phosphate."; *J. Biol. Chem.*; **235**; 1265–73 (1960).
- [33] B.M. Pogell, R.M. Gryder, „Enzymatic synthesis of glucosamine 6-phosphate in rat liver"; *J. Biol. Chem.*; **228**; 701–711 (1957).
- [34] B. Badet, P. Vermoote, F. Le Goffict, „Glucosamine Synthetase from *Escherichia coli*: Kinetic Mechanism and Inhibition by N³-Fumaroyl-L-2,3-diaminopropionic Derivatives"; *Biochemistry*; **27**; 2282–2287 (1988).
- [35] A. Teplyakov, G. Obmolova, M.-A. Badet-Denisot, B. Badet, „The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase"; *Protein Sci.*; **8**; 596–602 (1999).
- [36] B. Golinelli-Pimpaneau, B. Badet, „Possible involvement of Lys603 from *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase in the binding of its substrate fructose 6-phosphate"; *J. Biochem.*; **201**; 175–182 (1991).
- [37] B. Golinelli-Pimpaneau, F. Le Goffict, B. Badet, „Glucosamine-6-phosphate Synthase from *Escherichia coli* : Mechanism of the Reaction at the Fructose 6-

- Phosphate Binding Site"; *J. Am. Chem. Soc.*; **111**; 3029–3034 (1989).
- [38] M.-A. Badet-Denisot, C. Leriche, F. Massiere, B. Badet, „Nitrogen transfer in E. Coli Glucosamine-6P Synthase. Investigation using substrate and bisubstrate analogs."; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; **5**; 815–820 (1995).
- [39] S. Milewski, M. Hoffmann, R. Andruszkiewicz, E. Borowski, „Investigation of Mechanism of Nitrogen Transfer in Glucosamine 6-Phosphate Synthase with the Use of Transition State Analogs"; *Bioorg. Chem.*; **25**; 283–296 (1997).
- [40] H. Zalkin, „Glutamine amidotransferases."; *Meth. Enzym.*; **113**; 263–264 (1985).
- [41] H.J. Rogers, G.G.F. Newton, E.P. Abraham, „Production and purification of bacilylsin."; *J. Biochem.*; **97**; 573–578 (1965).
- [42] B. Woynarowska, A. Witkowski, E. Borowski, „Pleiotropic Effect of anticapsin on HeLa S3 Cells"; *Acta Biochem. Pol.*; **34**; 369–376 (1987).
- [43] B.B. Molloy, D.H. Lively, R.M. Gale, M. Gorman, L.D. Boeck, C.E. Higgens, R.E. Kastner, L.L. Huckstep, N. Neuss, „A new dipeptide antibiotic from *Streptomyces collinus*, lindenbein"; *J. Antibiot.*; **25**; 137–140 (1972).
- [44] H. Chmara, R. Andruszkiewicz, E. Borowski, „Inactivation of glucosamine-6-phosphate synthetase from *Salmonella typhimurium* LT 2 SL 1027 by N^3 -fumarylcarboxyamido-L-2,3-diamino-propionic acid"; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **120**; 865–872 (1984).
- [45] R. Andruszkiewicz, H. Chmara, S. Milewski, E. Borowski, „Synthesis of N^3 -fumaramoyl-L-2,3-diaminopropanoic acid analogues, the irreversible inhibitors of glucosamine synthetase."; *Int. J. Pept. Protein Res.*; **27**; 449–453 (1986).
- [46] N. Kucharczyk, M.A. Denisot, F. Le Goffict, B. Badet, „Glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*: determination of the mechanism of inactivation by N^3 -fumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic derivatives."; *Biochemistry*; **17**; 3668–3676 (1990).
- [47] R. Andruszkiewicz, H. Chmara, S. Milewski, E. Borowski, „Synthesis and biological properties of N^3 -(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid dipeptides, a novel group of antimicrobial agents."; *J. Med. Chem.*; **30**; 1715–1719 (1987).
- [48] A.M. Janiak, M. Hoffmann, M.J. Milewska, S. Milewski, „Hydrophobic Derivatives of 2-Amino-2-deoxy-D-glucitol-6-phosphate: A New Type of D-

- Glucosamine-6-phosphate Synthase Inhibitors with Antifungal Action"; *Bioorg. Med. Chem.*; **11**; 1653–1662 (2003).
- [49] B.S. Wong, S.L. Yoong, A. Jagusiak, T. Panczyk, H.K. Ho, W.H. Ang, G. Pastorin, „Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs"; *Adv. Drug Deliv. Rev.*; **65**; 1964–2015 (2013).
- [50] A.S. Skwarecki, S. Milewski, M. Schielmann, M.J. Milewska, „Antimicrobial molecular nanocarrier – drug conjugates"; *Nanomedicine*; **12**; 2215–2240 (2016).
- [51] D. Astruc, E. Boisselier, C. Ornelas, „Dendrimers Designed for Functions: From Physical, Photophysical, and Supramolecular Properties to Applications in Sensing, Catalysis, Molecular Electronics, Photonics, and Nanomedicine"; *Chem. Rev.*; **110**; 1857–1859 (2010).
- [52] V. Janout, M. Lanier, S.L. Regen, „Molecular Umbrellas"; *J. Am. Chem. Soc.*; **118**; 1573–1574 (1996).
- [53] V. Janout, S.L. Regen, „Bioconjugate-Based Molecular Umbrellas"; *Bioconjugate Chem.*; **20**; 183–192 (2009).
- [54] R.C. Hidera, X. Konga, „Chemistry and biology of siderophores"; *Nat. Prod. Reports*; **27**; 637–657 (2010).
- [55] V. Braun, A. Pramanik, T. Gwinner, M. Koberle, E. Mohn, „Sideromycins: tools and antibiotics"; *Biometals*; **22**; 3–13 (2009).
- [56] P. Couvreur, B. Stella, L.H. Reddy, H. Hillaireau, C. Dubernet, D. Desmaële, S. Lepêtre-Mouelhi, F. Rocco, N. Dereuddre-Bosquet, P. Clayette, V. Rosilio, V. Marsaud, J.-M. Renoir, L. Cattel, „Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics"; *Nano Lett*; **6**; 2544–2548 (2006).
- [57] A.D. Frankel, C.O. Pabo, „Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus"; *Cell*; **55**; 1189–1193 (1988).
- [58] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, „Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis."; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **88**; 1864–1868 (1991).
- [59] A. Prochiantz, „Messenger proteins: Homeoproteins, TAT and others"; *Curr. Opin. Cell Biol.*; **12**; 400–406 (2000).
- [60] C. Foerg, H.P. Merkle, „On the biomedical promise of cell penetrating peptides: limits versus prospects."; *J. Pharm. Sci.*; **97**; 144–62 (2008).

- [61] Ü. Langel, Handbook of Cell-Penetrating Peptides, Second Edition, CRC Press, 2006.
- [62] A. Muñoz, E. Harries, A. Contreras-Valenzuela, L. Carmona, N.D. Read, J.F. Marcos, „Two functional motifs define the interaction, internalization and toxicity of the cell-penetrating antifungal peptide PAF26 on fungal cells."; *PLoS One*; **8**; e54813 (2013).
- [63] C. Bechara, S. Sagan, „Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?"; *FEBS Lett.*; **587**; 1693–702 (2013).
- [64] A.M. Gewirtz, D.L. Sokol, M.Z. Ratajczak, „Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects."; *Blood*; **92**; 712–36 (1998).
- [65] S.R. Schwarze, „In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse"; *Science*; **285**; 1569–1572 (1999).
- [66] J. Ruczynski, P.M. Wierzbicki, M. Kogut-Wierzbicka, P. Mucha, K. Siedlecka-Kroplewska, P. Rekowski, „Cell-penetrating peptides as a promising tool for delivery of various molecules into the cells"; *Folia Histochem. Cytobiol.*; **52**; 257–269 (2014).
- [67] M.T. Kawczyński, J. Kreczko, Z. Maćkiewicz, „Peptydy penetrujące - rodzaje i mechanizmy przenikania przez błony komórkowe."; *Wiad. Chem.*; **69**; 9–33 (2015).
- [68] J. Yuan, A. Krämer, F. Eckerdt, M. Kaufmann, K. Strebhardt, „Efficient internalization of the polo-box of polo-like kinase 1 fused to an antennapedia peptide results in inhibition of cancer cell proliferation"; *Cancer Res.*; **62**; 4186–4190 (2002).
- [69] K. Kilk, M. Magzoub, M. Pooga, L.E.G. Eriksson, Ü. Langel, A. Gräslund, „Cellular Internalization of a Cargo Complex with a Novel Peptide Derived from the Third Helix of the Islet-1 Homeodomain. Comparison with the Penetratin Peptide"; *Bioconjugate Chem.*; **12**; 911–916 (2001).
- [70] M. Pooga, M. Hallbrink, M. Zorko, Ü. Langel, „Cell Penetration by Transportan"; *FASEB*; **12**; 67–77 (1998).
- [71] F. Simeoni, M.C. Morris, F. Heitz, G. Divita, „Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: Implications for delivery of siRNA into mammalian cells"; *Nucleic Acids Res.*; **31**; 2717–2724 (2003).

- [72] K. Takeshima, A. Chikushi, K.K. Lee, S. Yonehara, K. Matsuzaki, „Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes"; *J. Biol. Chem.*; **278**; 1310–1315 (2003).
- [73] C. Rousselle, M. Smirnova, P. Clair, J.M. Lefauconnier, A. Chavanieu, B. Calas, J.M. Scherrmann, J. Temsamani, „Enhanced delivery of doxorubicin into the brain via a peptide-vector-mediated strategy: saturation kinetics and specificity."; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; **296**; 124–131 (2001).
- [74] A. Muñoz, B. López-García, J.F. Marcos, „Studies on the mode of action of the antifungal hexapeptide PAF26."; *Antimicrob. Agents Chemother.*; **50**; 3847–55 (2006).
- [75] Z. Machova, C. Mühle, U. Krauss, R. Tréhin, A. Koch, H.P. Merkle, A.G. Beck-Sickinger, „Cellular Internalization of Enhanced Green Fluorescent Protein Ligated to a Human Calcitonin-Based Carrier Peptide"; *Chem. Biochem.*; **3**; 672–677 (2002).
- [76] J.B. Rothbard, S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P.L. McGrane, P.A. Wender, P.A. Khavari, „Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation"; *Nat. Med.*; **6**; 1253–1256 (2000).
- [77] Y.-Z. Lin, S. Yao, R.A. Veach, T.B. Torgerson, J. Hawgier, „Inhibition of Nuclear Translocation of Transcription Factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence"; *J. Biol. Chem.*; **270**; 14255–14258 (1995).
- [78] J. Fernández-Carneado, M.J. Kogan, S. Castel, E. Giralt, „Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of γ -zein"; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; **43**; 1811–1814 (2004).
- [79] A. Shirani, J. Shahbazi Mojarrad, S. Mussa Farkhani, A. Yari Khosroshahi, P. Zakeri-Milani, N. Samadi, S. Sharifi, S. Mohammadi, H. Valizadeh, „The Relation Between Thermodynamic and Structural Properties and Cellular Uptake of Peptides Containing Tryptophan and Arginine"; *Adv. Pharm. Bull.*; **5**; 161–168 (2015).
- [80] A. Prochiantz, A. Joliot, „Can transcription factors function as cell-cell signalling molecules?"; *Mol. Cell Biol.*; **4**; 814–819 (2003).

- [81] I. Le Roux, S. Duharcourt, M. Volovitch, A. Prochiantz, E. Ronchi, „Promoter-specific regulation of gene expression by an exogenously added homedomain that promotes neurite growth."; *FEBS Lett.*; **368**; 311–314 (1995).
- [82] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassing, A. Prochiantz, „The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes."; *J. Biol. Chem.*; **269**; 10444–10450 (1994).
- [83] G. Drin, H. Déméné, J. Temsamani, R. Brasseur, „Translocation of the pAntp peptide and its amphipathic analogue AP-2AL"; *Biochemistry*; **40**; 1824–1834 (2001).
- [84] G. Drin, S. Cottin, E. Blanc, A.R. Rees, J. Temsamani, „Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides"; *J. Biol. Chem.*; **278**; 31192–31201 (2003).
- [85] M. Pooga, M. Hällbrink, M. Zorko, Ü. Langel, „Cell penetration by transportan."; *FASEB J.*; **12**; 67–77 (1998).
- [86] J.F. Marcos, M. Gandía, „Antimicrobial peptides: to membranes and beyond"; *Expert Opin. Drug Discov.*; **4**; 659–671 (2009).
- [87] L. Carmona, M. Gandía, B. López-García, J.F. Marcos, „Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to the cell-penetrating antifungal peptide PAF26 correlates with endogenous nitric oxide (NO) production"; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **417**; 56–61 (2012).
- [88] J.B. Rothbard, T.C. Jessop, R.S. Lewis, B.A. Murray, P.. Wender, „Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells"; *J. Am. Chem. Soc.*; **126**; 9506–9507 (2004).
- [89] M. Zorko, Ü. Langel, „Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery"; *Adv. Drug Deliv. Rev.*; **57**; 529–545 (2005).
- [90] K.-T. Jeang, H. Xiao, E.A. Rich, „Multifaceted Activities of the HIV-1 Transactivator of Transcription, Tat"; *J. Biol. Chem.*; **274**; 28837–28840 (1999).
- [91] D.J. Mitchell, L. Steinman, D.T. Kim, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, „Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers"; *J. Pept. Res.*; **56**; 318–325 (2000).
- [92] S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, J. Barsoum,

- „Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells"; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **91**; 664–668 (1994).
- [93] N. Purkayastha, K. Eyer, T. Robinson, P.S. Dittrich, A.K. Beck, D. Seebach, „Enantiomeric and Diastereoisomeric (Mixed) l / D-Octaarginine Derivatives – A Simple Way of Modulating the Properties of Cell-Penetrating Peptides."; **10**; 1165–1184 (2013).
- [94] F. Milletti, „Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape"; *Drug Discov. Tod.*; **17**; 850–860 (2012).
- [95] Y. Kojima, M. Nakayama, T. Nishina, H. Nakano, M. Koyanagi, K. Takeda, K. Okumura, H. Yagita, „Importin β 1 protein-mediated nuclear localization of Death Receptor 5 (DR5) limits DR5/Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells"; *J. Biol. Chem.*; **286**; 43383–43393 (2011).
- [96] J. Gomez, S. Matsuyama, „Cell-Penetrating Pentapeptides and Bax-Inhibiting Peptides: Protocol for Their Application"; *Meth. Mol. Biol.*; **683**; 465–471 (2011).
- [97] J.R. Marks, J. Placone, K. Hristova, W.C. Wimley, „Spontaneous Membrane-Translocating Peptides by Orthogonal High-throughput Screening"; *J. Am. Chem. Soc.*; **133**; 8995–9004 (2011).
- [98] S. Pujals, J. Fernández-Carneado, C. López-Iglesias, M.J. Kogan, E. Giralt, „Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly."; *Biochim. Biophys. Acta*; **1758**; 264–79 (2006).
- [99] Y.A. Fillon, J.P. Anderson, J. Chmielewski, „Cell Penetrating Agents Based on a Polyproline Helix Scaffold"; *J. Am. Chem. Soc.*; **127**; 11798–11803 (2005).
- [100] R. Fischer, M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel, R. Brock, „Break on through to the other side - biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides."; *Chem. Biochem.*; **6**; 2126–2142 (2005).
- [101] S. Pujals, E. Giralt, „Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides"; *Adv. Drug Deliv. Rev.*; **60**; 473–484 (2008).
- [102] T. Jiang, E.S. Olson, Q.T. Nguyen, M. Roy, P.A. Jennings, R.Y. Tsien, „Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides"; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **101**; 17867–17872 (2004).

- [103] E.S. Olson, T.A. Aguilera, T. Jiang, L.G. Ellies, Q.T. Nguyen, E.H. Wong, L.A. Gross, R.Y. Tsien, „In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer."; *Integr. Biol.*; **1**; 382–93 (2009).
- [104] H. Xia, G. Gu, Q. Hu, Z. Liu, M. Jiang, T. Kang, D. Miao, Q. Song, L. Yao, Y. Tu, H. Chen, X. Gao, J. Chen, „Activatable cell penetrating peptide-conjugated nanoparticles with enhanced permeability for site-specific targeting delivery of anticancer drug."; *Bioconjugate Chem.*; **24**; 419–30 (2013).
- [105] C.-Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I.D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, „Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization."; *J. Biol. Chem.*; **284**; 33957–65 (2009).
- [106] K. Park, „Unraveling the penetration: Model giant plasma membrane vesicles for study of cell-penetrating peptides"; *J. Control. Rel.*; **153**; 117–125 (2011).
- [107] P. a Wender, D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, J.B. Rothbard, „The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters."; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **97**; 13003–13008 (2000).
- [108] M. Magzoub, L.E. Eriksson, A. Graslund, „Comparison of the interaction, positioning, structure induction and membrane perturbation of cell-penetrating peptides and non-translocating variants with phospholipid"; *Biophys. Chem.*; **103**; 271–288 (2003).
- [109] D.I. Chan, E.J. Prenner, H.J. Vogel, „Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action"; *Biochim. Biophys. Acta*; **1758**; 1184–1202 (2006).
- [110] C. Bechara, M. Pallerla, Y. Zaltsman, F. Burlina, I.D. Alves, O. Lequin, S. Sagan, „Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis"; *FASEB*; **27**; 738–749 (2012).
- [111] E.P. Loret, E. Vives, P.S. Ho, H. Rochat, J.J. Van Rietschoten, W.C. Johnson, „Activating region of HIV-1 Tat protein: vacuum UV circular dichroism and energy minimization"; *Biochemistry*; **30**; 6013–6023 (1991).
- [112] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, „A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell

- Nucleus"; *J. Biol. Chem.*; **272**; 16010–16017 (1997).
- [113] E. Vives, C. Granier, P. Prevot, B. Lebleu, „Structure–activity relationship study of the plasma membrane translocating potential of a short peptide from HIV-1 Tat protein"; *Lett. Pept. Sci.*; **4**; 429–436 (1997).
- [114] T. Suzuki, S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, „Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides"; *J. Biol. Chem.*; **277**; 2437–2443 (2002).
- [115] J.P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M.J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, „Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake."; *J. Biol. Chem.*; **278**; 585–90 (2003).
- [116] P.E.G. Thorén, D. Persson, E.K. Esbjörner, M. Goksör, P. Lincoln, B. Nordén, „Membrane Binding and Translocation of Cell-Penetrating Peptides"; *Biochemistry*; **43**; 3471–3489 (2004).
- [117] A. Ziegler, X.L. Blatter, A. Seelig, J. Seelig, „Protein Transduction Domains of HIV-1 and SIV TAT Interact with Charged Lipid Vesicles. Binding Mechanism and Thermodynamic Analysis"; *Biochemistry*; **42**; 9185–9194 (2003).
- [118] J. Seelig, „Interaction of the Protein Transduction Domain of HIV-1 TAT with Heparan Sulfate : Binding Mechanism and Thermodynamic Parameters"; *Biophys. J.*; **86**; 254–263 (2004).
- [119] S. Console, C. Marty, C. García-Echeverría, R. Schwendener, K. Ballmer-Hofer, „Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) „protein transduction domains” promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans"; *J. Biol. Chem.*; **278**; 35109–35114 (2003).
- [120] J.P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, L. V. Chernomordik, „Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors"; *J. Biol. Chem.*; **280**; 15300–15306 (2005).
- [121] A. Vendeville, F. Rayne, A. Bonhoure, N. Bettache, P. Montcourrier, B. Beaumelle, „HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses."; *Mol. Biol. Cell*; **15**; 2347–2360 (2004).

- [122] T.B. Potocky, A.K. Menon, S.H. Gellman, „Cytoplasmic and Nuclear Delivery of a TAT-derived Peptide and a β -Peptide after Endocytic Uptake into HeLa Cells"; *J. Biol. Chem.*; **278**; 50188–50194 (2003).
- [123] P. Sazani, S.H. Kang, M.A. Maier, C. Wei, J. Dillman, J. Summerton, M. Manoharan, R. Kole, „Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs."; *Nucleic Acids Res.*; **29**; 3965–3974 (2001).
- [124] I.M. Kaplan, J.S. Wadia, S.F. Dowdy, „Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis."; *J. Control. Release*; **102**; 247–253 (2005).
- [125] A. Fittipaldi, A. Ferrari, M. Zoppé, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram, M. Giacca, „Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins."; *J. Biol. Chem.*; **278**; 34141–34149 (2003).
- [126] A. Mishra, G.H. Lai, N.W. Schmidt, V.Z. Sun, A.R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T.J. Deming, D.T. Kamei, G.C.L. Wong, „Translocation of HIV TAT peptide and analogues induced by multiplexed membrane and cytoskeletal interactions."; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **108**; 16883–8 (2011).
- [127] J.-M. Swiecicki, M. Di Pisa, F. Lippi, S. Chwetzoff, C. Mansuy, G. Trugnan, G. Chassaing, S. Lavielle, F. Burlina, „Unsaturated acyl chains dramatically enhanced cellular uptake by direct translocation of a minimalist oligo-arginine lipopeptide"; *Chem. Commun.*; 4–7 (2015).
- [128] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, „Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent"; *J. Biol. Chem.*; **271**; 18188–18193 (1996).
- [129] P.M. Fischer, N.Z. Zhelev, S. Wang, J.E. Melville, R. Fåhræus, D.P. Lane, „Structure-activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin."; *J. Pept. Res.*; **55**; 163–172 (2000).
- [130] G. Mainguy, M.L. Montesinos, B. Lesaffre, B. Zevnik, M. Karasawa, R. Kothary, W. Wurst, A. Prochiantz, M. Volovitch, „An induction gene trap for identifying a homeoprotein-regulated locus"; *Nat. Biotechnol.*; **18**; 746–749 (2000).
- [131] B. Christiaens, J. Grooten, M. Reusens, A. Joliot, M. Goethals, J. Vandekerckhove, A. Prochiantz, M. Rosseneu, „Membrane interaction and

- cellular internalization of penetratin peptides"; *Eur. J. Biochem.*; **271**; 1187–1197 (2004).
- [132] P.A. Wender, W.C. Galliher, E.A. Goun, L.R. Jones, T.H. Pillow, „The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms"; *Adv. Drug Deliv. Rev.*; **60**; 452–472 (2008).
- [133] B. López-García, J.F. Marcos, C. Abad, E. Pérez-Payá, „Stabilisation of mixed peptide/lipid complexes in selective antifungal hexapeptides"; *Biochim. Biophys. Acta*; **1660**; 131–137 (2004).
- [134] A. Muñoz, J.F. Marcos, N.D. Read, „Concentration-dependent mechanisms of cell penetration and killing by the de novo designed antifungal hexapeptide PAF26"; *Mol. Microbiol.*; **85**; 89–106 (2012).
- [135] Y. Shai, „Mode of action of membrane active antimicrobial peptides"; *Biopolymers*; **66**; 236–248 (2002).
- [136] H. Binder, G. Lindblom, „Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes."; *Biophys. J.*; **85**; 982–995 (2003).
- [137] P. Joanne, C. Galanth, N. Goasdoué, P. Nicolas, S. Sagan, S. Lavielle, G. Chassaing, C. El Amri, I.D. Alves, „Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry."; *Biochim. Biophys. Acta*; **1788**; 1772–81 (2009).
- [138] J.S. Wadia, S.F. Dowdy, „Modulation of Cellular Function by TAT Mediated Transduction of Full Length Proteins"; *Curr. Protein Pept. Sci.*; **4**; 97–104 (2003).
- [139] M. Pooga, U. Soomets, A. Hällbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J.-X. Hao, X.-J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hökfelt, T. Bartfai, Ü. Langel, „Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo"; *Nat. Biotechnol.*; **16**; 857–861 (1998).
- [140] A. Astriab-Fisher, D. Sergueev, M. Fisher, B.R. Shaw, R.L. Juliano, „Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions"; *Pharm. Res.*; **19**; 744–54 (2002).
- [141] N.-Q. Shi, X.-R. Qi, B. Xiang, Y. Zhang, „A survey on „Trojan Horse” peptides: opportunities, issues and controlled entry to „Troy”."; *J. Control. Rel.*; **194**; 53–

- 70 (2014).
- [142] M. Hällbrink, A. Florén, A. Elmquist, M. Pooga, T. Bartfai, Ü. Langel, „Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides"; *Biochim. Biophys. Acta*; **1515**; 101–109 (2001).
- [143] C. Sparr, N. Purkayastha, B. Kolesinska, M. Gengenbacher, B. Amulic, K. Matuschewski, D. Seebach, F. Kamena, „Improved efficacy of fosmidomycin against plasmodium and mycobacterium species by combination with the cell-penetrating peptide octaarginine"; *Antimicrob. Agents Chemother.*; **57**; 4689–4698 (2013).
- [144] K. Kilk, S. EL-Andalousi, P. Järver, A. Meikas, A. Valkna, T. Bartfai, P. Kogerman, M. Metsi, Ü. Langel, „Evaluation of transportan 10 in PEI mediated plasmid delivery assay"; *J. Control. Rel.*; **103**; 511–523 (2005).
- [145] D.J. Glover, H.J. Lipps, D.A. Jans, „Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans"; *Nat. Rev. Genet.*; **6**; 299–310 (2005).
- [146] L. Crombez, G. Divita, „A non-covalent peptide-based strategy for siRNA delivery."; *Biochem. Soc. Trans.*; **35**; 44–46 (2007).
- [147] P. Kumar, H. Wu, J.L. McBride, K.-E. Jung, M.H. Kim, B.L. Davidson, S.K. Lee, P. Shankar, N. Manjunath, „Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system"; *Nature*; **448**; 39–43 (2007).
- [148] C. Wang, L. Qiao, Q. Zhang, H. Yan, K. Liu, „Enhanced cell uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through direct chemisorption of FITC-Tat-PEG600-b-poly(glycerol monoacrylate)"; *Int. J. Pharm.*; **4300**; 372–380 (2012).
- [149] J. Bian, Z.B. Popović, C. Benejam, M. Kiedrowski, L.L. Rodriguez, M.S. Penn, „Effect of Cell-Based Intercellular Delivery of Transcription Factor GATA4 on Ischemic Cardiomyopathy"; *Circ. Res.*; **100**; 1626–1633 (2007).
- [150] S.H.C. Lee, R. Jefferies, P. Watt, R. Hopkins, F. Sotzik, S. Reid, A. Armson, A. Boxell, U. Ryan, „In vitro analysis of the TAT protein transduction domain as a drug delivery vehicle in protozoan parasites"; *Exp. Parasitol.*; **118**; 303–307 (2008).
- [151] A. Semlali, K.P. Leung, S. Curt, M. Rouabhia, „Antimicrobial decapeptide KSL-W attenuates *Candida albicans* virulence by modulating its effects on Toll-like

- receptor , human β -defensin , and cytokine expression by engineered human oral mucosa"; *Peptides*; **32**; 859–867 (2011).
- [152] J. Gomez, J. Chen, J. Ngo, D. Hajkova, I.-J. Yeh, V. Gama, M. Miyagi, S. Matsuyama, „Cell-Penetrating Penta-Peptides (CPP5s): Measurement of Cell Entry and Protein-Transduction Activity"; *Pharmaceuticals*; **3**; 3594–3613 (2010).
- [153] B. López-García, W. Ubhayasekera, R.L. Gallo, J.F. Marcos, „Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37"; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **356**; 107–113 (2007).
- [154] G. Tunnemann, G. Ter-Avetisyan, R.M. Martin, M. Stockl, A. Hermann, M.C. Cardoso, „Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines"; *J. Pep. Sci.*; **14**; 469–476 (2008).
- [155] S.M. Miller, R.J. Simon, S. Ng, R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, W.H. Moos, „Proteolytic Studies of Homologous peptide and N-Substituted Glycine Peptoid Oligomers"; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; **4**; 2657–2662 (1994).
- [156] A. Larson, J. Chen, A. Klibanov, „Conjugation to polymeric chains of influenza drugs targeting M2 ion channels partially restores inhibition of drug-resistant mutants"; *J. Pharm. Sci.*; **102**; 2450–2459 (2013).
- [157] F. Heitz, M.C. Morris, G. Divita, „Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics"; *Br. J. Pharmacol.*; **157**; 195–206 (2009).
- [158] R.A. Davis, M. Kotiw, „Synthesis of the fungal natural product (–)-xylariamide A"; *Tetrahedron Lett.*; **46**; 5199–5202 (2005).
- [159] X. Ji, M. Su, J. Wang, G. Deng, S. Deng, Z. Li, C. Tang, J. Li, J. Li, L. Zhao, H. Jiang, H. Liu, „Design, synthesis and biological evaluation of hetero-aromatic moieties substituted pyrrole-2-carbonitrile derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors"; *Eur. J. Med. Chem.*; **75**; (2014).
- [160] W. Wu, Z. Zhang, L.S. Liebeskind, „In situ carboxyl activation using a silatropic switch: a new approach to amide and peptide constructions."; *J. Am. Chem. Soc.*; **133**; 14256–14259 (2011).
- [161] S.M. Spatz, H. Stone, „Methyl Hydrogen Fumarate"; *J. Org. Chem.*; **23**; 1559 (1958).

- [162] A. Metrano, S. Miller, „Peptide-Catalyzed Conversion of Racemic Oxazol-5(4H)-ones into Enantiomerically Enriched α -Amino Acid Derivatives"; *J. Org. Chem.*; **79**; 1542–1544 (2014).

Dorobek

Publikacje w czasopismach naukowych

1. **Marcin T. Kawczyński**, Joanna Kreczko-Kurzawa, Zbigniew Maćkiewicz, Peptydy penetrujące – rodzaje i mechanizmy przenikania przez błony komórkowe”, *Wiadomości Chemiczne*, 69, **2015**, 9-33
2. Andrzej Skwarecki, Marcin T. Kawczyński, Marta Schielmann, Aleksandra Wiśniewska, Sławomir Milewski, Maria J. Milewska; „Antifungal oligopeptides incorporating an inhibitor of homoserine dehydrogenase” – manuskrypt w przygotowaniu
3. Marta Schielmann, Piotr Szweda, Katarzyna Gucwa, **Marcin Kawczyński**, Maria J. Milewska, Dorota Koperkiewicz, Joachim Mosrchhauser, Sławomir Milewski; „Molecular basis of *Candida albicans* resistance to antifungal oligopeptides.”; *FEMS Yeast Research* – przesłano do redakcji

Publikacje monograficzne w materiałach pokonferencyjnych

1. **Marcin T. Kawczyński**, Joanna Kreczko; „Cell-penetrating peptides – mechanism of transduction and synthesis – short review.”, *PhD Interdisciplinary Journal*, 2013, 31-36.
2. Tomasz Kostrzewa, **Marcin T. Kawczyński**, Sandra Skibiszewska, Zbigniew Maćkiewicz; „Wrzodzące zapalenie jelita grubego – wpływ nikotyny na przebieg choroby”, **2015**; Monografia w materiałach pokonferencyjnych Ogólnopolskiego Mikrosymposium Chemików w Białymstoku.

Komunikaty

1. **Marcin T. Kawczyński**, Maria J. Milewska, Joanna Kreczko, Ryszard Andruszkiewicz, Zbigniew Maćkiewicz; „Peptydy penetrujące (CPP) jako potencjalne nośniki inhibitorów syntazy glukozamino-6-fosforanu”, *I Ogólnopolska Konferencja Studentów i Doktorantów Nauk Ścisłych: Człowiek – Nauka - Środowisko*. Gdańsk, 2012, 39
2. Joanna Kreczko, Joanna Boros-Majewska, Magdalena Mizerska-Dudka, Justyna Czupryniak, Małgorzata Sobocińska, **Marcin T. Kawczyński**, Zbigniew Maćkiewicz, Sławomir Milewski, Martyna Kandefer-Szerszeń, Tadeusz Ossowski; „Sialorphin and its analogues – designing new generation of painkillers.”, *Early Stage Researchers Meeting*, London, 2012
3. **Marcin T. Kawczyński**, Joanna Kreczko; „Cell-penetrating peptides – mechanism of transduction and synthesis – short review.”, *Biotech Conference*, Sopot, 2013
4. **Marcin T. Kawczyński**, Marta Schielmann, Joanna Kreczko, Zbigniew Maćkiewicz, Maria J. Milewska, Sławomir Milewski; wystąpienie ustne: „Nowe przeciwgrzybowe koniugaty peptyd-inhibitor”, *III Ogólnopolska Konferencja Studentów i Doktorantów Nauk Ścisłych: Człowiek – Nauka - Środowisko*. Gdańsk, 2014, 32
5. **Marcin T. Kawczyński**, Marta Schielmann, Joanna Kreczko, Zbigniew Maćkiewicz, Maria J. Milewska, Sławomir Milewski; „Novel antifungal peptide-inhibitor conjugates”, *IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauk o Leku*. Korytnica, 2014, 27

6. **Marcin Kawczyński**, Marta Schliemann, Maria J. Milewska, Sławomir Milewski; „Koniugaty peptyd-inhibitor jako potencjalne leki przeciwgrzybowe”, 58 Zjazd PTChem, Gdańsk 2015
7. Andrzej Skwarecki, Marta Schliemann, **Marcin Kawczyński**, Aleksandra Wiśniewska, Maria J. Milewska; „Syntaza dipeptydów o aktywności przeciwgrzybowej zawierających inhibitor dehydrogenazy homoserynowej”; 58 Zjazd PTChem, Gdańsk 2015