

Rozprawa doktorska

**Projektowanie, synteza i badanie właściwości  
farmakologicznych nowych analogów peptydów  
opiodowych**

mgr inż. Anna Adamska-Bartłomiejczyk

Praca wykonana  
w Zakładzie Chemii Biomolekularnej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor  
prof. dr hab. Anna Janecka

Łódź 2017

## STRESZCZENIE

Najsilniej działającym alkaloidem występującym w opium jest morfina, wciąż stosowana w medycynie do uśmierzania silnego bólu pooperacyjnego lub związanego z chorobą nowotworową, pomimo szeregu poważnych efektów ubocznych, takich jak tolerancja, uzależnienie czy dolegliwości sercowo-naczyniowe i żołądkowo-jelitowe.

Morfina działa przez trzy typy receptorów opioidowych: mu, delta i kappa, które należą do grupy receptorów związanych z białkiem G. Receptory te są zlokalizowane w ośrodkowym układzie nerwowym, a także występują w narządach i tkankach peryferyjnych, m. in. w przewodzie pokarmowym.

Rola każdego z trzech głównych typów receptorów opioidowych nie została do końca poznana i jest nadal przedmiotem wielu badań. Uważa się jednak, że największy efekt przeciwbólowy związany jest z pobudzeniem receptora mu.

Odkrycie receptorów opioidowych dało początek poszukiwaniu ich endogennych ligandów. Pierwszym poznany ligand receptora mu-opioidowego była morficeptyna (Tyr-Pro-Phe-Pro-NH<sub>2</sub>), wyizolowana jako produkt enzymatycznego trawienia bydlecej  $\beta$ -kazeiny. W 1997 r. grupa Zadiny wyizolowała endomorfiny (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub> i Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, odpowiednio EM-1 and EM-2) z mózgu wołu i człowieka. Te nowe tetrapeptydy z amidowym C-końcem wykazują bardzo duże powinowactwo i selektywność względem receptora mu i silne właściwości przeciwbólowe. Niestety, związki te nie mogą być stosowane jako leki, ponieważ ulegają szybkiej degradacji enzymatycznej i nie są zdolne do przekroczenia bariery krew-mózg, z czego wynika ich krótki czas działania i ograniczony dostęp do ośrodkowego układu nerwowego. Jednakże, od momentu odkrycia endomorfin poszukuje się analogów tych peptydów o lepszych właściwościach farmakologicznych.

Do niedawna peptydy nie były rozważane jako klasa związków o zastosowaniu terapeutycznym ze względu na małą odporność na degradację enzymatyczną i niską biodostępność. Obecnie panuje inny pogląd i w ciągu ostatniej dekady wzrosło zainteresowanie peptydami jako lekami ze względu na ich silne działanie, niską toksyczność i łatwą syntezę.

Tematem mojej rozprawy doktorskiej było projektowanie nowych analogów peptydów opioidowych, w poszukiwaniu związków o lepszych niż naturalne peptydy właściwościach farmakologicznych. Cyklizacja i wprowadzanie nienaturalnych aminokwasów do sekwencji jest znaną metodą, stosowaną w celu zwiększenia stabilności peptydów w płynach

ustrojowych i ich lipofilowości. W mojej dysertacji zsyntetyzowałam, oczyściłam i zanalizowałam w testach *in vitro* trzy serie nowych analogów peptydów opioidowych. Pierwszą serię stanowiły liniowe analogi morficeptyny modyfikowane fluorowanymi aminokwasami. Powinowactwo tych analogów do peptydów opioidowych zależało od położenia i konfiguracji fluorowanych aminokwasów. Dwa analogi wykazały wyższe niż morficeptyna powinowactwo do receptora mu-opioidowego.

W kolejnych dwóch seriach zsyntetyzowałam cykliczne peptydy oparte na strukturze analogu EM-2, Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH<sub>2</sub>, zmodyfikowane poprzez wprowadzenie *N*-metylowanych lub cyklicznych aminokwasów. Synteza cyklicznych peptydów zawierających *N*-metylowane aminokwasy okazała się bardzo trudna ze względu na zawadę przestrzenną spowodowaną bliskością dwóch grup *N*-metylowych, i wymagała użycia silnego odczynnika kondensującego (DMT/NMM/TsO<sup>-</sup>). Badania *in vitro* wykazały, że *N*-metylacja zwiększyła selektywność analogów względem receptorów opioidowych.

W przypadku peptydów zawierających sześcioczłonowe analogi proliny analiza konformacyjna wykazała, że konfiguracja wiązania Phe<sup>3</sup>-Xaa decyduje o ich powinowactwie do receptorów opioidowych.

## STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The most abundant alkaloid of opium, morphine, is still used in clinics for the treatment of severe postoperative or cancer pain. However, the use of morphine is limited because of its side effects such as tolerance, dependence or cardiovascular and gastrointestinal problems.

Morphine acts through three types of opioid receptors, mu, delta and kappa, which belong to the class of G-protein coupled receptors. They are widely expressed in central nervous system but can also be found in many peripheral organs and tissues, including gastrointestinal tract. The role and distribution of the opioid receptors are still under investigation. However, it is believed that the mu-opioid receptor mediates the most potent antinociceptive effects.

The discovery of opioid receptors was followed by the search for their endogenous ligands. The first identified selective but not very potent mu-receptor ligand was morphiceptin (Tyr-Pro-Phe-Pro-NH<sub>2</sub>) isolated from an enzymatic digest of bovine  $\beta$ -casein. In 1997 Zadina discovered and identified in the bovine brain and human cortex endomorphins (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub> and Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, EM-1 and EM-2 respectively). These new tetrapeptides with amidated C-terminus showed remarkable affinity and selectivity for the mu-receptor. Unfortunately, they are also characterized by relatively rapid enzymatic degradation and inability to cross the blood-brain barrier, resulting in a short duration of action, and very limited delivery to the CNS.

Since the discovery of opioid peptides, there have been extensive studies on the possible use of these peptides as new therapeutic agents. Until recently, peptides have not been considered as good drug candidates due to their low enzymatic stability and poor bioavailability. Now this point of view is changing. In the last decade there has been a rapid expansion in the use of peptides as drugs because of their high potency, selectivity, lower toxicity and easy synthesis.

The aim of my thesis was the search for new endomorphin-2 and morphiceptin analogs with improved pharmacological profile. Cyclization and incorporation of unnatural amino acids are known methods of improving stability of peptides in physiological fluids and increasing their lipophilicity.

In my dissertation, I synthesized, purified and analyzed *in vitro* three series of novel opioid peptide analogs. In the first series, linear morphiceptin analogs were modified by

introduction of fluorinated amino acids. The affinity of the new analogs for opioid receptors depended on the position and configuration of fluorinated amino acids. Two analogs showed higher mu-opioid receptor affinity than morphiceptin.

In the next two series, I synthesized cyclic opioid peptides, based on the structure of the EM-2 analog, Tyr-c[D-Lys-Phe-Phe-Asp]NH<sub>2</sub>, which I modified by incorporation of *N*-methylated or cyclic amino acids. Synthesis of cyclic *N*-methyl amino acid containing peptides constituted a real challenge, because of the steric hindrance exerted by *N*-methyl groups, and required a strong coupling agent (DMT/NMM/TsO<sup>-</sup>). The *in vitro* tests showed that *N*-methylation increased peptides selectivity for opioid receptors.

In the case of peptides containing six-membered analogs of proline, conformational studies revealed that configuration of the Phe<sup>3</sup>-Xaa bond in these peptides determined the opioid receptor preferences.