

# Biološka aktivnost analoga i derivata muramil-dipeptida

---

Galić, Leona

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:003680>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Leona Galić  
0058217958**

**BIOLOŠKA AKTIVNOST ANALOGA I DERIVATA  
MURAMIL-DIPEPTIDA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Organska kemija**

**Mentor: doc. dr. sc. Monika Kovačević**

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Biološka aktivnost analoga i derivata muramil-dipeptida

Leona Galić, 0058217958

### Sažetak:

Peptidoglikani su polimeri građeni od ponavljajućih molekula *N*-acetilglukozamina i *N*-acetilmuraminske kiseline koji su međusobno povezani  $\beta$ -glikozidnom vezom te umreženi putem kratkih peptida. Njihovom razgradnjom nastaju manji fragmenti, tzv. muramil-peptidi, od kojih je najmanja strukturna jedinica koja posjeduje adjuvantsku aktivnost muramil-dipeptid [*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamin (MurNAc-L-Ala-D-iGln)]. S obzirom da može izazvati snažni humoralni ili stanični imunološki odgovor, upotreba muramil-dipeptida kao adjuvanta je od iznimne važnosti, te se često koristi za povećanje djelotvornosti lijekova i cjepiva.

Do sada su kao lijek odobreni GMDP, Muroctasin, Murabutid, Mifamurtid i dr., a velik broj analoga i derivata podvrgnut je kliničkim ispitivanjima. Osim iznimne adjuvantske aktivnosti, prisutnost muramil-dipeptida odgovorna je za modulaciju mnogobrojnih bolesti kao što su Crohnova bolest, Alzheimerova bolest te kod stvaranja osteoklasta.

**Ključne riječi:** muramil-dipeptid, peptidoglikan, NOD2 receptori, imunomodulatorska aktivnost, adjuvanti

**Rad sadrži:** 30 stranica, 21 slika, 5 shema 49 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Monika Kovačević

**Datum obrane:** 18. srpnja 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry  
Laboratory for Organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

Biological activity of analogues and derivatives of muramyl dipeptide

Leona Galić, 0058217958

### Abstract:

Peptidoglycans are polymers built from repeating molecules of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid, which are attached to each other by  $\beta$ -glycosidic bonds and bridged by short peptides. Degradation of peptidoglycan chain results in smaller fragments, so-called muramyl peptides. The smallest structural unit possessing adjuvant activity is muramyl dipeptide [*N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MurNAc-L-Ala-D-*i*Gln)]. Administration of muramyl dipeptide as an adjuvant is extremely important and is often used to increase the effectiveness of drugs and vaccines, because of its strong humoral or cellular immune response.

Up to this point, GMDP, Muroctasin, Murabutid, Mifamurtid, etc. have been approved as drugs, and a large number of analogues and derivatives have undergone clinical trials. In addition to exceptional adjuvant activity, the presence of muramyl dipeptide is responsible for the modulation of numerous diseases such as Crohn's disease, Alzheimer's disease, and the formation of osteoclasts.

**Keywords:** muramyl dipeptide, peptidoglycan, NOD2 receptors, immunomodulatory activity, adjuvants

**Thesis contains:** 30 pages, 21 figures, 5 schemes, 49 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Assistant Professor Monika Kovačević

**Thesis defended:** July 18, 2022

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1.. PEPTIDOGLIKAN .....	2
2.1.1. RAZGRADNJA PEPTIDOGLIKANA .....	4
2.2.. MURAMIL-DIPEPTID .....	6
2.2.1. OTKRIĆE MURAMIL-DIPEPTIDA .....	6
2.2.2. KEMIJSKA PRIPRAVA MURAMIL-DIPEPTIDA.....	7
2.2.3. IZOLACIJA MURAMIL-DIPEPTIDA .....	9
2.2.4. ADJUVANTSKA AKTIVNOST MURAMIL-DIPEPTIDA .....	10
2.3.. NOD RECEPTORI .....	11
2.3.1. VEZANJE MURAMIL-DIPEPTIDA ZA NOD2 .....	12
2.3.2. UTJECAJ KEMIJSKE STRUKTURE MURAMIL-DIPEPTIDA NA VEZANJE ZA NOD2 .....	13
2.4.. ANALOZI I DERIVATI MURAMIL-DIPEPTIDA .....	15
2.4.1. GMDP .....	16
2.4.2. MUROCTASIN, ROMURTIDE.....	17
2.4.3. LIPOFILNI DERIVATI MURAMIL-DIPEPTIDA.....	17
2.4.4. MURABUTID .....	18
2.4.5. MIFAMURTID (MTP-PE).....	19
2.4.6. SYNTEX ADJUVANT FORMULATION (SAF).....	20
2.4.7. KONJUGATI MURAMIL-DIPEPTIDA .....	20

2.5.. UTJECAJ MURAMIL-DIPEPTIDA PRI AKTIVACIJI BOLESTI.....	22
2.5.1. CROHNOVA BOLEST .....	22
2.5.2. ALZHEIMEROVA BOLEST .....	23
2.5.3. STVARANJE OSTEOKLASTA.....	24
3. ZAKLJUČAK .....	25
4. POPIS LITERATURE.....	27

## 1. UVOD

Okosnicu staničnih stijenki Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija čini peptidoglikan (murein) čija je glavna funkcija očuvanje strukture i oblika stanice. Peptidoglikani su polimeri građeni od ponavljajućih molekula *N*-acetilglukozamina i *N*-acetilmuraminske kiseline koji su međusobno povezani  $\beta$ -glikozidnom vezom te umreženi putem kratkih peptida. [1] Razgradnjom peptidoglikana nastaju manji fragmenti, tzv. muramil-peptidi, od kojih je najmanja strukturna jedinica koja posjeduje adjuvantsku aktivnost muramil-dipeptid [MDP; *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamin (MurNAc-L-Ala-D-iGln)]. Budući da je dobivanje muramil-dipeptida izolacijom iz bakterijske stanične stijenke nedostavno za pripremu velikog broja derivata, jedan od načina dobivanja MDP je i kemijska sinteza.

S obzirom da može izazvati snažni humoralni ili stanični imunološki odgovor, upotreba muramil-dipeptida kao adjuvanta je od iznimne važnosti, te se često koristi za povećanje djelotvornosti lijekova i cjepiva. Kako bi se poboljšala aktivnosti i selektivnosti muramil-dipeptida, a smanjile nuspojave kao što su povišena temperatura, indukcija autoimune reakcije i upalne reakcije, razvijeni su brojni analozi i derivati ovog spoja.

Do sada su kao lijek odobreni GMDP, Muroctasin, Murabutid, Mifamurtid i dr., a velik broj analoga i derivata podvrgnuti su kliničkim ispitivanjima.

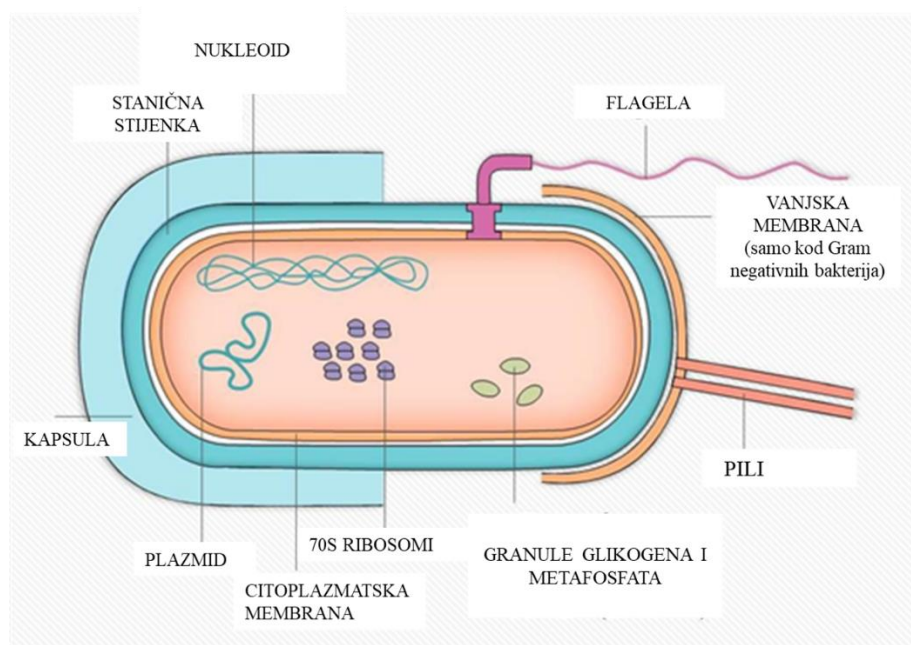
Osim iznimne adjuvantske aktivnosti, prisutnost muramil-dipeptida odgovorna je za aktivaciju te modulaciju u tijeku mnogobrojnih bolesti kao što su Crohnova bolest, Alzheimerova bolest te kod stvaranja osteoklasta.

Cilj ovog preglednog Završnog rada bio je istražiti i opisati pripremu muramil-dipeptida te njegove analoge i derivate, kao i različite bolesti.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikan (murein) je važna sastavnica stanične stijenke bakterija koja omeđuje citoplazmatsku membranu bakterijske stanice. Prisutan je kod Gram-pozitivnih bakterija u debelom sloju te kod Gram-negativnih bakterija u tankom sloju (slika 1). [2]



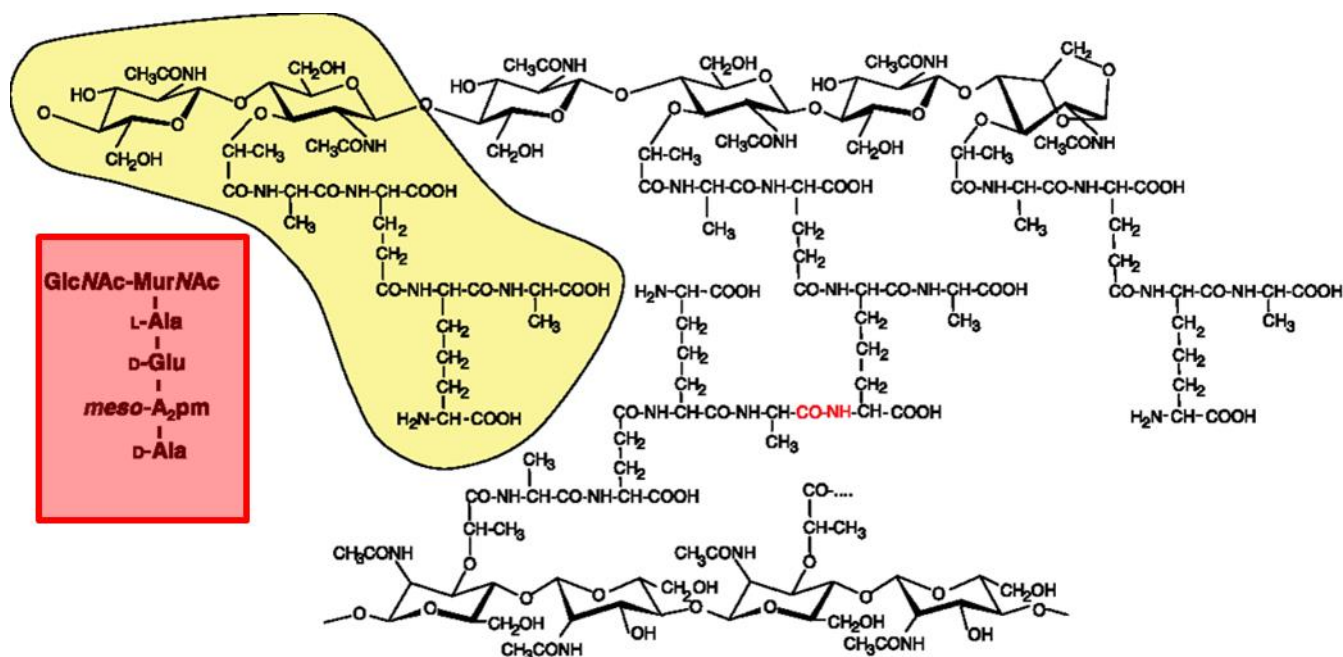
Slika 1. Struktura bakterijske stanične stijenke [prema 3]

Glavna uloga peptidoglikana je očuvanje strukture i oblika stanice održavanjem unutarstaničnog tlaka. Inhibiciju biosinteze peptidoglikana moguće je provesti antibiotikom, a njegovu razgradnju potaknuti lizozimom što rezultira lizom stanice. Peptidoglikan također služi kao osnova za koju će se vezati druge komponente kao što su lipoproteini i teihoična kiselina, te je uključen i u procese rasta i diobe stanica. [4]

Peptidoglikan je građen od linearnih glikanskih lanaca koji su umreženi s kratkim peptidima. Glikanski lanci se sastoje od naizmjeničnih *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) povezanih s  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama. D-laktoil grupa svakog MurNAc ostatka je supstituirana peptidnim lancem čiji je sastav najčešće L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*meso*-A<sub>2</sub>pm (ili L-Lys)-D-Ala-D-Ala (A<sub>2</sub>pm, 2,6-diaminopimelinska kiselina) u rastućem peptidoglikanu, no posljednji D-Ala ostatak se gubi u zreloj makromolekuli. Glikanske niti se unakrsno povezuju preko karboksilne skupine D-Ala na poziciji 4 i amino skupine



diaminokiseline na poziciji 3. Povezivanje može biti izravno ili preko kratkog peptidnog lanca (slika 2).



Slika 2. Struktura peptidoglikana *Escherichie coli* (uokvireni žuti dio označava se skraćenicom koja je uokvirena crvenom bojom) [5]

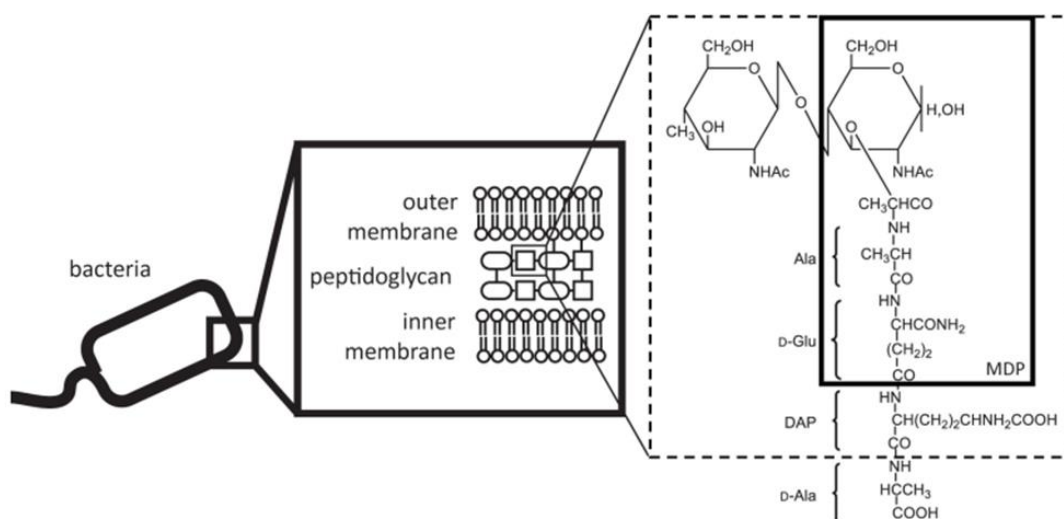
Možemo zaključiti da su kemijske karakteristike ovog polimera određene prisutnošću netipičnog šećera (MurNAc),  $\gamma$ -vezanih D-Glu te neproteinskih aminokiselina (npr. A<sub>2</sub>pm). Navedene strukturne karakteristike polimera pronađene su u svim do sad poznatim bakterijama. Međutim, među različitim vrstama bakterija postoje različitosti u strukturi polimera bilo u peptidnom lancu, lancima glikana ili položaju odnosno sastavu interpeptidnog mosta. Modifikacije peptidoglikana su specifične za određenu vrstu bakterija, a nastaju kao rezultat ekspresije jedinstvenih sintetskih, modifikacijskih i degradacijskih enzima. [6] Također mogu postojati i varijacije u strukturi peptidoglikana između jedinki iste vrste što ovisi o uvjetima rasta (sastav medija, faza rasta, prisutnost antibiotika, intra/ekstracelularni rast itd.) Na primjer, peptidoglikan bakterije *Bacillus subtilis* koja se nalazi u stacionarnoj fazi rasta je u većoj mjeri umrežen nego kod bakterijske stanice iste vrste koja eksponencijalno raste. *Escherichia coli* koja ne raste sadrži umreženiji peptidoglikan, veći udio lipoproteinskih dodataka i kraće glikanske lance od *E. coli* koja se aktivno dijeli. [2]

Prednosti modifikacija peptidoglikana u bakterija su povećana otpornost stanice na antibiotike i enzime domaćina koji razgrađuju staničnu stijenku te nemogućnost detekcije

peptidoglikana odnosno njegovih fragmenata na receptorima domaćina. [2]

### 2.1.1. Razgradnja peptidoglikana

Razgradnja peptidoglikana pomoću razgradnih enzima dovodi do oslobađanja bioaktivnih muramil-peptida (slika 3). Nastanak muramil-peptida iz bakterijskih patogena može imati značajne učinke na patogenezu i pokretanje te regulaciju imunološkog odgovora domaćina. Razlog tome je što su eukariotski organizmi razvili višestruke imunološke receptore za detekciju razgradnih fragmenata peptidoglikana. [2]

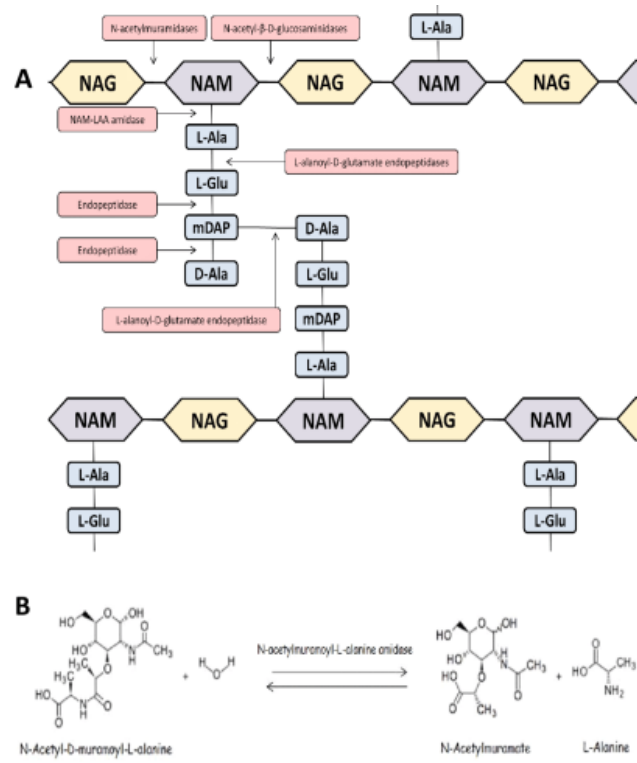


Slika 3. MDP kao komponenta peptidoglikana u staničnoj stijenci [7]

Kako je spomenuto u odjeljku prije, peptidoglikan se sastoji od ponavljajućih sekvenci građenih iz *N*-acetilglukozamina (NAG) i *N*-acetilmuraminske kiseline (NAM).

Bakterije koriste nekoliko vrsta peptidoglikan hidrolizirajućih enzima koji sudjeluju u sintezi i razgradnji stanične stijenke tijekom procesa bakterijskog rasta i diobe. Enzimi koji se vežu za bakterijske stanice te razgrađuju peptidoglikan nazivaju se autolizini. Niz patogenih bakterija sadrži hidrolaze ili autolizine koji su odgovorni za patogenost bakterija kod eukariotskih domaćina. Enzime za razgradnju peptidoglikana karakteriziraju njihove katalitičke specifičnosti, pri čemu dvije vrste ovih enzima - *N*-acetilmuramidaze i *N*-acetilglukozamidaze- djeluju na razgradnju okosnice peptidoglikana cijepajući NAG i NAM podjedinice na različitim mjestima. S druge strane *N*-acetilmuramil-L-alanin amidaze odvajaju šećerne okosnice peptidoglikana od matičnog peptidnog lanca. [8] Još jedna grupa peptidoglikan hidrolaza su litičke transglikozilaze (LTs). One cijepaju vezu između *N*-

acetilmuraminske kiseline i *N*-acetilglukozaminskih šećernih lanaca kako bi se olakšao rast, oslobodio prostor za sekrecijske sustave i flagele ili kako bi se proizveli citotoksični muramil-peptidi. Daljnja razgradnja peptidoglikana uključuje karboksi- i endopeptidaze. Zaključno, može se reći da je za potpunu razgradnju peptidoglikana potrebno više enzima: glikozidaze, amidaze i endopeptidaze (slika 4). [9]



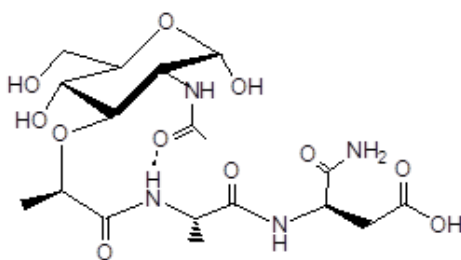
Slika 4. Enzimi koji hidroliziraju peptidoglikan na različitim mjestima [10]

Do potpune razgradnje peptidoglikana ne dolazi uvijek s obzirom da su poznate bakterije koje oslobađaju fragmente peptidoglikana (muramil-peptide) koji imaju snažne biološke učinke na domaćina. [11] Takvi muramil-peptidi obuhvaćaju primjerice, fragment disahard-tetrapeptid peptidoglikana TCT – trahealni citotoksin koji uzrokuje smrt dušnika i vaginalnih cilijarnih epitelnih stanica, dok s druge strane u muramil-peptide spada i muramil-dipeptid (MDP) i njegovi derivati (npr. GMDP) koji utječu na aktivaciju imunološkog odgovora domaćina i imaju adjuvantsku aktivnost u promicanju odgovora antitijela. [12]

## 2.2. MURAMIL-DIPEPTID

### 2.2.1. Otkriće muramil-dipeptida

1974. godine otkriveno je da je muramil-dipeptid najmanja strukturna jedinica potrebna za imunoadjuvantsko djelovanje Freundovog kompletnog adjuvanta [FCA, (engl. *Freund complete adjuvant*)] – jednog od najfunkcionalnijih i najšire korištenih adjuvanta u dosadašnjim istraživanjima. [13] Muramil-dipeptid označava spoj *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-isoglutamin [MurNAc-*L*-Ala-*D*-*i*Gln, muramil-dipeptid (MDP)] (slika 5). Freund i suradnici razvili su FCA 1937. godine, koji se sastoji od inaktiviranih *Mycobacterium tuberculosis* u uljnoj emulziji, a može izazvati snažni humoralni ili stanični imunološki odgovor. [14] Budući da je FCA pokazao u određenoj mjeri toksičnost što je otežalo njegovu kliničku uporabu, bilo je potrebno naći manje, biološki aktivne komponente. [15]

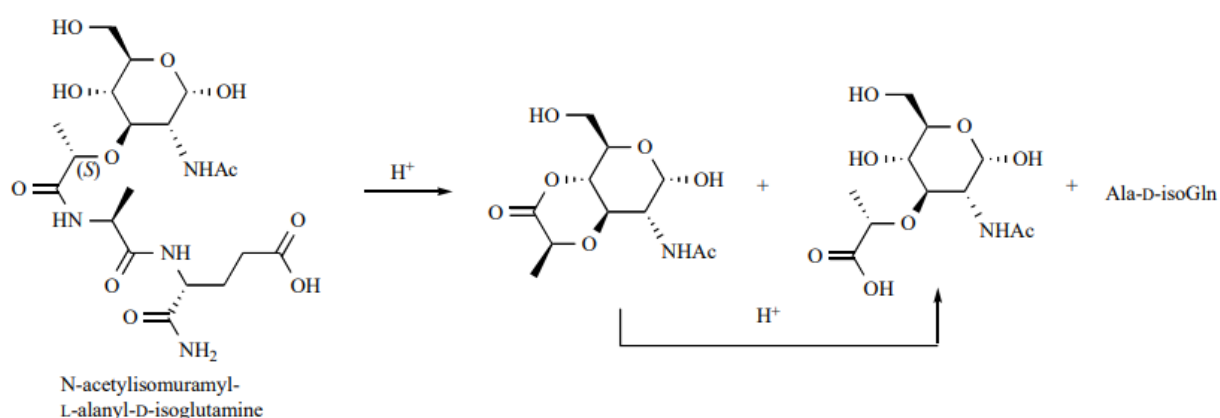


Slika 5. *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-isoglutamin (MDP) [16]

U svrhu što bolje karakterizacije imunostimulacijskog efekta i adjuvantske aktivnosti, pripremljen je veliki broj derivata muramil-peptida koji su podvrgnuti istraživanju odnosa strukture i biološke aktivnosti [SAR, (engl. *Structural-Activity Relationship*)]. Pri tome se pokazalo da na biološku aktivnost modificiranih derivata i analoga veliki utjecaj ima njihova kemijska struktura i stereokemija. Konformacijska analiza MDP primjenom  $^1\text{H}$  NMR-spektroskopije i molekuskog modeliranja potvrdila je tvorbu 10-članog  $\beta$ -okreta ( $\text{CO}_{\text{MurNAc}} \cdots \text{NH}_{\text{Ala}}$  IHB) (slika 5). Alternativni  $\beta$ -okret koji bi bio rezultat  $\text{CO}_{\text{Lac}} \cdots \text{NH}_{\text{iGln}}$  IHB nije potvrđen. U cilju njegove indukcije, *D*-*i*Gln zamijenjen je rigidnim prolinom čime je inducirana tvorba *S*-oblikovane strukture nalik  $\beta$ -okretu u rezultirajućem *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-3-karbometoksimetil-*D*-prolinu (MAP). [16]

### 2.2.2. Kemijska priprava muramil-dipeptida

Muramil-dipeptid moguće je pripraviti kemijskim putem ili izolirati određenim kemijskim postupcima. Za prvu poznatu sintezu *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) iz 1963. godine zaslužni su Jeanloz i Flowers. [17] Muramil-dipeptid (*N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-isoglutamin) može se pripraviti spajanjem 3 podjedinice: *N*-acetil-*D*-glukozamina, mliječne kiseline ili njezinih ekvivalenata te dipeptida Ala-*D*-*i*Gln. Muramil-dipeptid ima (*R*)-konfiguraciju na podjedinici laktata, dok izomer koji se naziva *N*-acetilizomuramil-*L*-alanil-*D*-izoglutamin ima (*S*)-konfiguraciju. Tretiranjem *N*-acetilizomuramil derivata ((*S*)-izomera) octenom kiselinom na 80 °C tijekom 1 sata dolazi do razlaganja na intramolekulski ester i dipeptid s iskorištenjem od 50 %. Za usporedbu, (*R*)-izomer muramil-dipeptida se razgrađuje samo 5 % (shema 1). [7]



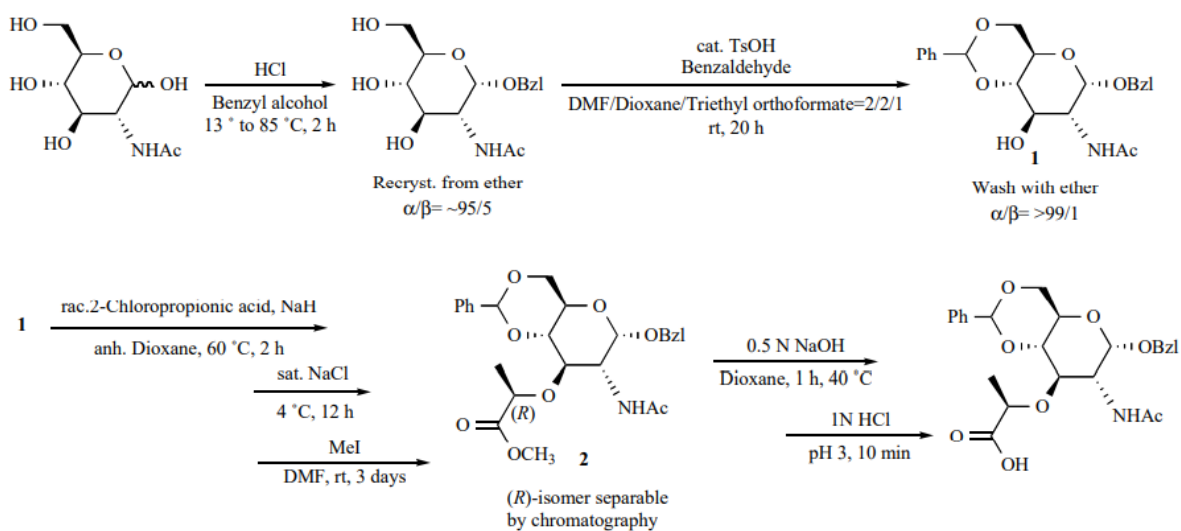
Shema 1. Stabilnost *N*-acetilizomuramil-*L*-alanil-*D*-izoglutamina [7]

Biološkim ispitivanjima kojima je izazvana osjetljivost na *N*-acetil-3-(4-aronofenilazo)-*L*-tirozin u zamorcima otkriveno je da (*S*)-izomer ima smanjenu adjuvantsku aktivnost. Bitno je naglasiti da kiralni centar utječe na stabilnost spoja i njegovu biološku aktivnost pa je nužno proizvesti stereokemijski čist MurNAc dio. [7]

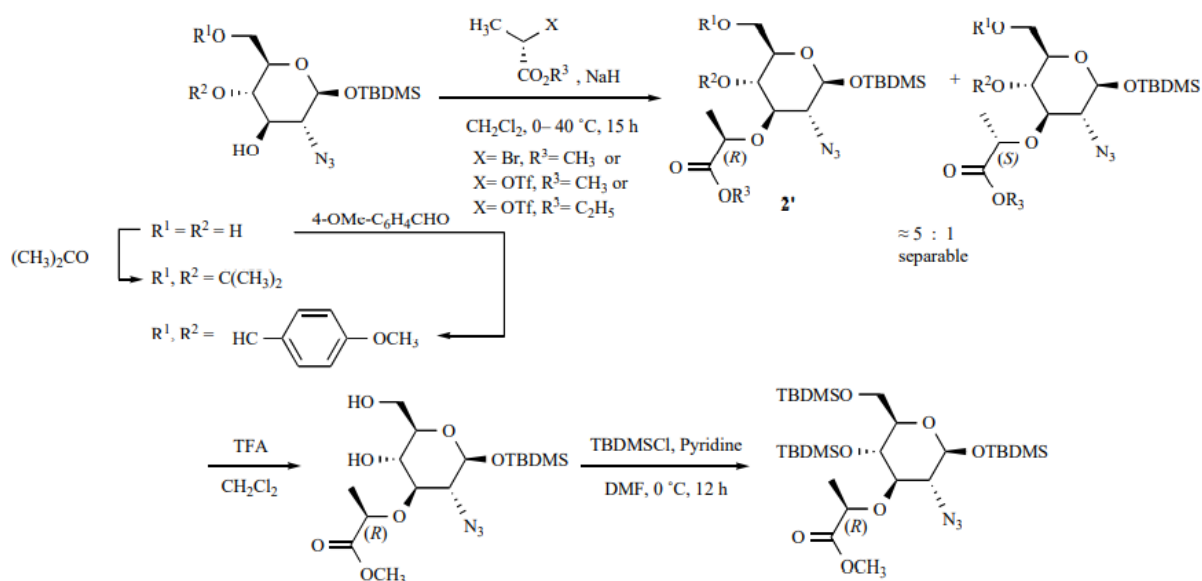
#### *Sinteza MurNAc dijela*

Dva primjera sintetskih postupaka za pripremu MurNAc dijela prikazani su na shemama 2 i 3. [18-20] Kako bi se sintetizirali dijastereomerno čisti derivati *N*-acetilmuraminske kiseline, kao početni spojevi koriste se *D*-glukozamin ili njegovi ekvivalenti. Anomerni produkti mogu se odvojiti kromatografski. U početnim koracima sinteze sve do zaštićenog *D*-glukozamina, (*R*)-izomer (spoj broj 2 na shemi 2 i spoj 2' na shemi 3) moguće je u dobrom iskorištenju kromatografski odvojiti. Sinteza muraminske podjedinice za pripremu muramil-

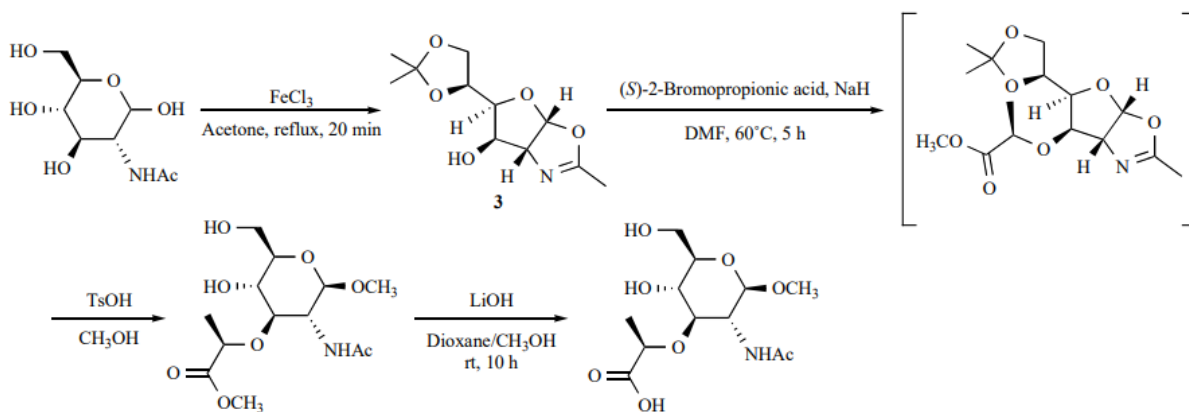
dipeptida i njegovih analoga je zahtjevna i uključuje više stupnjeva. Oksazolinski dio spoja 3 (shema 4) već sadrži NAc skupinu *N*-acetilmuraminske kiseline u zaštićenom obliku. Iz tog razloga moguće je, uz dodatak NaH, selektivno uvesti laktatni lanac na 3-OH mjesto bez dodatne zaštite (shema 4). Na kraju sinteze (shema 5), zaštićena MurNAc se spaja s dipeptidnim esterom (L-Ala-D-Glu(OR)-NH<sub>2</sub>, R=Bzl, *t*-Bu, CH<sub>3</sub>) nakon čega slijedi deprotekcija kako bi se dobio muramil-dipeptid. Postoji niz pristupa za sintezu analoga MDP kako bi se poboljšala njegova farmakološka svojstva zamjenom dijelova šećera ili peptidnih lanaca. [21]



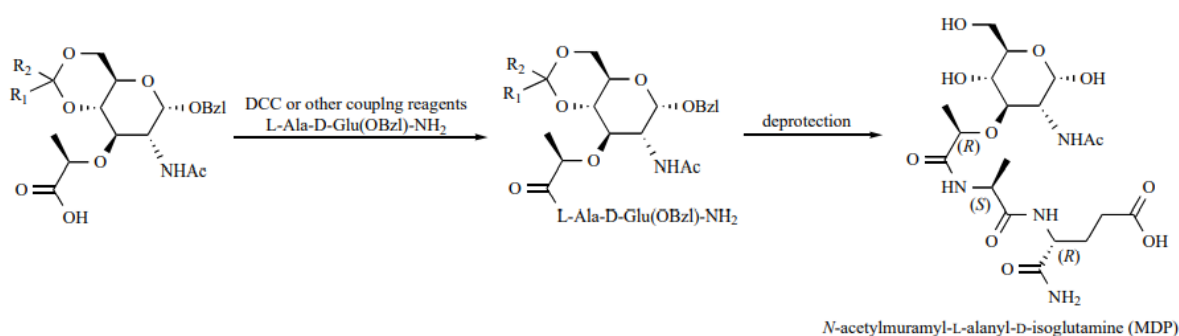
Shema 2. Sinteza prekursora MurNAc (1) [7]



Shema 3. Sinteza prekursora MurNAc (2) [7]



Shema 4. Sinteza metil- $\beta$ -glukozida N-acetilmuraminske kiseline [7]



Shema 5. Sinteza muramil-dipeptida [7]

### 2.2.3. Izolacija muramil-dipeptida

Dobivanje muramil-dipeptida i ostalih fragmenata peptidoglikana iz stanice bakterije je kompleksan proces koji se provodi u nekoliko faza. Prvi korak je uzgoj bakterijskih stanica, a potrebno ga je provoditi u kontroliranim uvjetima jer o njima može ovisiti kemijska struktura peptidoglikana kao što je poredak aminokiselina ili vrijeme *O*-acetilacije. Zatim slijedi tretiranje već prethodno (poglavlje 2.1.1.) spomenutim enzimima za razgradnju peptidoglikana, nakon čega se enzimi inaktiviraju tretiranjem na povišenoj temperaturi. Treći korak uključuje razbijanje stanica, a metoda koja će se upotrijebiti ovisi o dostupnosti opreme. Za uspješno mehaničko razbijanje stanične stijenke mogu se koristiti preše (po Frenchu) koje djeluju na bazi nagle promjene tlaka ili instrumenti za razbijanje stanica vibracijom i staklenim kuglicama. Neke bakterije je teže razbiti nego druge kao što je na primjer *Streptococcus pyogenes*, pa će metoda razbijanja također ovisiti i o vrsti dane bakterije iz koje izoliramo muramil-dipeptid. U idućem koraku koristi se diferencijalno centrifugiranje kako bi se stanične stijenke razbijenih stanica odvojile od cijelih stanica koje su ostale nerazbijene. Kompleksi

peptidoglikana mogu biti kovalentno vezani za teihoičnu kiselinu ili često za ugljikohidrate kao što je na primjer kod streptokoka. Njih je potrebno ukloniti kemijskom hidrolizom, najčešće uporabom trikloroctene kiseline (TCA). Za peptidoglikan su nekovalentno vezani RNA i DNA, a uklanjaju se pomoću RNaza, DNaza. [22] Iz mnoštva peptidoglikanskih fragmenata potrebno je izolirati sam MDP. Kao što će biti opisano u odlomku koji slijedi (2.3.), MDP se specifično veže za NOD2 receptore. Različitim kromatografskim tehnikama, frakcije staničnih lizata se testiraju na sposobnost aktivacije NOD2 te se identificiraju imunostimulirajući fragmenti peptidoglikana. Zatim se masenom spektrometrijom pomoću elektrosprej ionizacije (ESI) određuje o kojem ligandu NOD2 receptora je riječ. [23]

#### 2.2.4. Adjuvantska aktivnost muramil-dipeptida

Adjuvant je sredstvo koje pojačava imunološki odgovor domaćina koji je izazvan spojevima koji nemaju ili imaju vrlo slabo djelovanje. MDP i ostali muramil-peptidi su vrlo učinkoviti adjuvanti koji se koriste za povećanje djelotvornosti lijekova i cjepiva. To postižu aktivacijom ekspresije površinskih markera koji su nužni za staničnu adheziju antigena. Time se povećava fagocitna i antimikrobna aktivnost te se stvara citotoksičnost putem antitijela. [24] MDP i ostali muramil-peptidi (tripeptidi i disaharidni tri- i tetrapeptidi) induciraju imunološki odgovor povećanjem proizvodnje IF- $\gamma$  i drugih citokina koji potiču diferencijaciju i proliferaciju bijelih krvnih stanica limfocita koji služe za obranu organizma. [25] Prilikom prvog kontakta između T limfocita i antigena dolazi do imunološkog odgovora i stvaranja antitijela, a dokazano je da će prethodno izlaganje MDP pojačati imunološke odgovore prilikom budućih kontakata s antigenom. [26] Analози kod kojih je D-izoglutaminski ostatak zamijenjen s D-glutaminom, D-glutaminskom kiselinom ili D-izoasparaginom imaju snižen stimulirajući učinak dok analози s L-glutaminskom kiselinom, L-glutaminom ili L-izoglutaminom uopće nisu aktivni. [25,26]

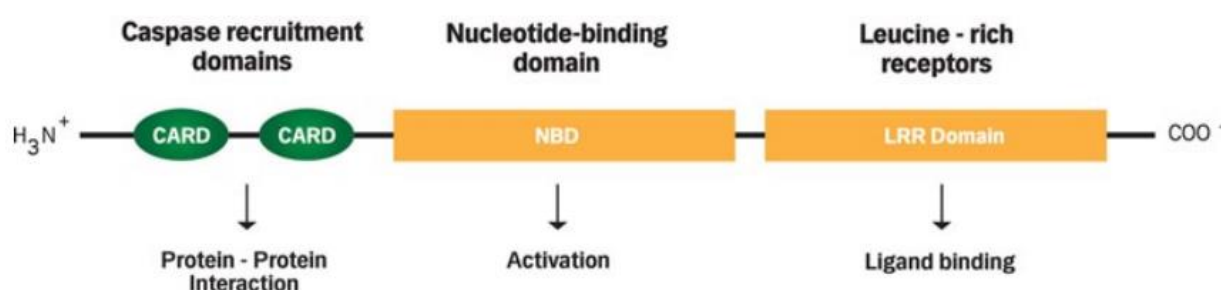
Nadalje, muramil-peptidi izražavaju snažnu sinergiju s drugim ligandima kako bi zajedno izazvali snažniji imunološki odgovor. Na primjer, MDP ima sinergistički učinak s lipopolisaharidima (LPS) koji su pronađeni kod Gram-negativnih bakterija, a imaju sposobnost prepoznavanja Toll-like receptora (TLR4) na površini stanice. Ova sinergija opažena je *in vitro* u ljudskim primarnim stanicama uključujući punu krv, mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC), pročišćene monocitne linije te kod staničnih linija glodavaca. Primjer sinergije MDP i LPS prilikom stvaranja osteoklasta biti će opisan kasnije u odlomku (2.5.3.). [27]



## 2.3. NOD RECEPTORI

Općenito, kako bi se modificirao imunološki sustav sisavaca, bitan je razvoj agonista i antagonista za poticanje ili blokiranje receptora za prepoznavanje patogena (PRR, engl. *pathogen recognition receptors*). PRR agonisti se mogu koristiti kao molekularni adjuvanti samostalno ili kao dio većih (sintetičkih) konstrukcija. Različite skupine PRR-ova su otkrivene tijekom godina, a uključuju Toll-like receptore (TLR), RIG-like receptore (RLR), lektin receptore C-tipa (CLR) i NRL odnosno NOD-like receptore (nukleotidna oligomerizacijska domena). Svaka od ovih skupina receptora prepoznaje specifični molekularni obrazac patogenih mikroorganizama (PAMP, engl. *pathogen associated molecular pattern*). Većina PAMP-ova je komponenta bakterijske stanične stijenke kao što su: lipopolisaharidi, lipoteihoične kiseline, lipoproteini i fragmenti peptidoglikana kao što je MDP. [28]

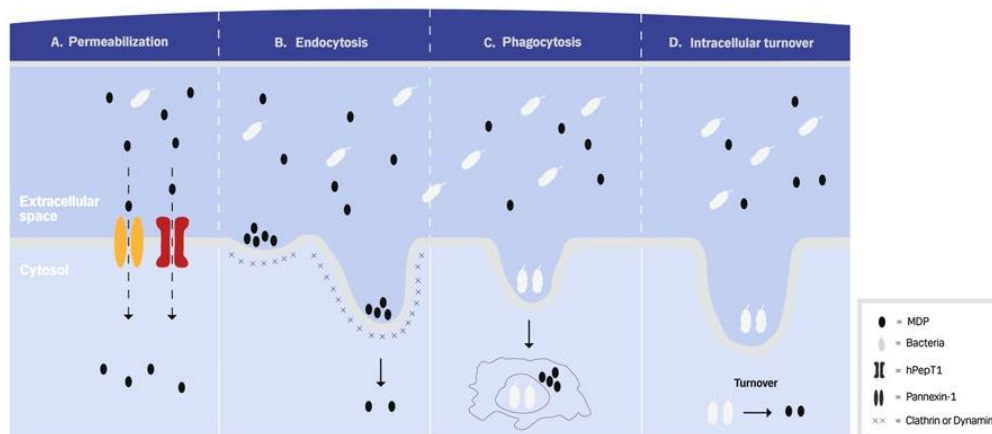
Lipopolisaharidi se vežu za TLR4 receptore dok muramil-dipeptid i njegove derivate specifično prepoznaju NOD2 (CARD15) receptori koji sudjeluju u urođenom i stečenom imunološkom sustavu jer reguliraju proizvodnju citokina, kemokina i antimikrobnih proteina. [29] NLR skupinu, u koju spadaju NOD1 i NOD2 receptori, karakteriziraju tri domene: 1) N-terminalna signalna domena s CARD (engl. *carpase recruitment domain*) domenom 2) NOD (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain*) domenu koja ima mjesto za vezanje ATP-a te je nužna za oligomerizaciju 3) C-terminalna domena koja se sastoji od LRR (engl. *leucine rich repeats*) i za koju će se vezati MDP. NOD2 sastoji se od dvije CARD domene i spada u NLRC (engl. *NRLs containing CARD*) podskupinu (slika 6). [30]



Slika 6. Struktura NOD2 receptora [31]

Ekspresija NOD2 događa se u citoplazmi stanica koje sudjeluju u obrani domaćina, u makrofagima, stanicama dendrita, mononuklearnim stanicama periferne krvi i stanicama crijevnog epitela. [32]

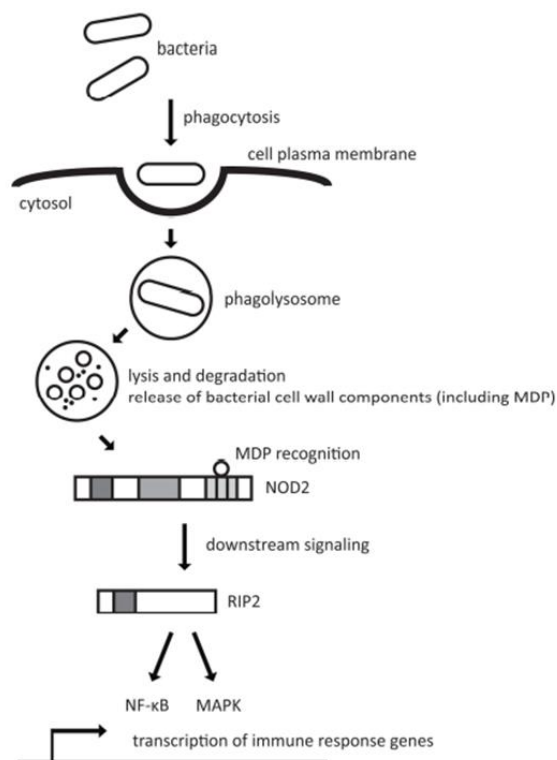
Sekvenca koju specifično prepoznaje NOD1 receptor je L-Ala-D-iGln-*mesodiaminopimelinska* kiselina, dok NOD2 receptor prepoznaje MurNAc-L-Ala-D-iGln što govori da male promjene primarne strukture PGN utječu na to koji će se receptor aktivirati tijekom imunoreakcije. [16] Istraživanjem strukture muramil-dipeptida dokazano je da NOD2 receptori mogu biti aktivirani samo ako se u strukturi MDP nalazi prstenasta struktura *N*-acetilmuraminske kiseline te šećer vezan za dipeptidni dio (L-Ala-D-Glu ili L-Ala-D-*i*Gln). Nedavno je objavljeno da je NOD2 citosolni receptor pa su za prolazak izvanstaničnog muramil-dipeptida do citosola potrebni različiti mehanizmi. [29] Prvi način za prolazak MDP kroz citoplazmatsku membranu je pomoću humanih peptidnih transportera hPepT1 i paneksina-1 (slika 7a). MDP također može ući endocitozom pomoću vezikula koje stvaraju klatrin i dinamin (slika 7b) ili se može dobiti iz bakterija intracelularnim fagocitnim cijepanjem unutar makrofaga (slika 7c). Bakterije također mogu ući u citosol gdje će se autolizirati i otpustiti MDP (slika 7d). [31]



Slika 7. Mehanizmi ulaska MDP u citoplazmu stanice [31]

### 2.3.1. Vežanje muramil-dipeptida za NOD2

Nakon lize bakterijske stanice i razgradnje stanične stijenke, NOD2 receptor prepoznaje MDP. Dolazi do vežanja NOD2 i RIP2 kinaze preko CARD-CARD homofilnih interakcija što je nužan korak za daljnju nizvodnu signalizaciju. Signalizacijom RIP2 dolazi do aktivacije transkripcije nuklearnog faktora kappa B (NF- $\kappa$ B) (slika 8). NF- $\kappa$ B ulazi u jezgru i aktivira velik broj gena koji su odgovorni za imunološki odgovor.



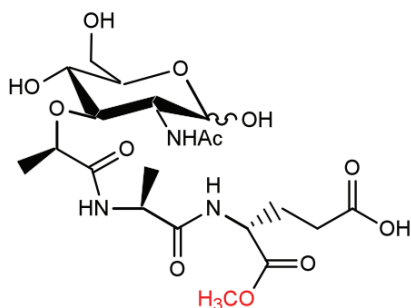
Slika 8. Pojednostavljena shema NOD2 signalnog puta [7]

To se događa pomoću IKK (I $\kappa$ B kinaza) kompleksa te drugih kaskada koje uključuju MAP kinaze. Ove signalne kaskade potiču sintezu citokina i kemokina kao što su interleukin-6 (IL-6), tumorski faktor nekroze (TNF- $\alpha$ ), IL-12 i IL-8. [32] Pretpostavlja se da je NOD2 signalizacija regulirana s nekoliko proteina kao što je na primjer Erbin. On je negativni regulator koji sprječava indukciju aktivnosti NF- $\kappa$ B. [33] U *in vitro* i *in vivo* istraživanjima dokazano je da vezanjem muramil-dipeptida za NOD2 te stimulacijom RIP2 dolazi do aktivacije kaspaze i sinteze IL-1 $\beta$ . [34]

### 2.3.2. Utjecaj kemijske strukture muramil-dipeptida na vezanje za NOD2

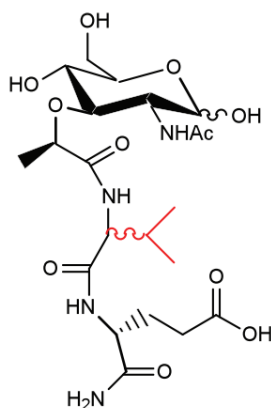
Ranija istraživanja su pokazala da se stimulacijski kapacitet muramil-dipeptida može znatno poboljšati dodatkom acilnih lanaca različitih duljina na dijelove gdje se nalaze takozvani NOD1 i NOD2 aktivirajući ligandi. Time se također postiže poboljšanje kapaciteta ulaska muramil-dipeptida u stanicu domaćina egzocitozom. Rubino i suradnici ispitali su kod 34 derivata MDP kapacitet aktivacije NF- $\kappa$ B koja ovisi o NOD2. [27] Tim istraživanjem pronađeni su analozi koji se mogu primijeniti kao početne točke za razvoj novih terapeutika s imunostimulacijskim svojstvima. Otkriveno je da mnogi derivati MDP koji su modificirani na

mjestu prve ili druge aminokiseline mogu jednako dobro stimulirati NOD2 receptor kao i MDP. Kod sintetskog derivata MurNAc-L-Ala-D-Glu-OCH<sub>3</sub> [MDP (D-Glu<sup>2</sup>)-OCH<sub>3</sub>] (slika 9) terminalni D-izoglutamin je zamijenjen  $\alpha$ -metil esterom D-glutaminske kiseline. Spomenuta modifikacija uzrokuje niži prag aktivacije te izaziva snažnije NOD2 ovisne upalne odgovore *in vitro* i *in vivo*. [27]



Slika 9. MDP (D-Glu<sup>2</sup>)-OCH<sub>3</sub> [27]

S druge strane kod MDP (D-Val<sup>1</sup>) (slika 10) utvrđeno je da ne može stimulirati aktivaciju NF- $\kappa$ B *in vitro* te ne može inducirati upalni odgovor kod BMDM (engl. *Bone-marrow-derived macrophage*) stanica niti prilikom injektiranja miša. MDP (D-Val<sup>1</sup>) nije se pokazao kao funkcionalni adjuvant za izazivanje imunološkog odgovora na ovalbumin kao antigen. [27]

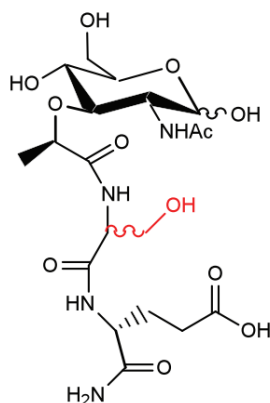


Slika 10. MDP (D/L-Val<sup>1</sup>) [27]

Modifikacijama *N*-acetilmuraminske kiseline muramil-dipeptida može se proizvesti niz različitih derivata, a uvedene modifikacije utjecati će na adjuvantsku aktivnost koja je promatrana u dva različita modela zamoraca. Provedena je imunizacija s vodom obogaćenom MDP u emulzijama mineralnih ulja koje sadrže: (1) heterologne proteinske antigene ili

azobenzenarsonat-*N*-acetil-L-tirozin (indukcija odgođene osjetljivosti – DTH, engl. *Delayed Type Hypersensitivity*) ili (2) encefalitogene proteine i peptide (indukcija eksperimentalnog alergijskog encefalomijelitisa). Proučavanjem odnosa strukture i aktivnosti uočava se da su L-konfiguracija aminokiselina povezanih za muramilni dio MDP te D-konfiguracija glutaminske kiseline važne za zadržavanje ili smanjenje biološke aktivnosti. L-alanin u *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutaminu (MDP-L-D) se može zamijeniti sa drugom L-aminokiselinom kao što je L-serin, dok zamjena L-alanina D-alaninom (MDP-D-D) značajno snižava adjuvantsku aktivnost. Što se tiče zamjene D-izoglutamina, funkcija D-glutaminske kiseline je važna dok  $\alpha$ -amid nije nužan. Primjerice, analozi D-aspartata, D-norleucina i L-izoglutamina (MDP-D-L) su inaktivni dok analozi  $\alpha,\gamma$ -dimetil estera D-glutaminske kiseline pokazuju snažnu adjuvantsku aktivnost. [35]

Uzimajući u obzir rezultate *in vivo* istraživanja MDP (D-Val<sup>1</sup>), Rubino i suradnici dolaze do zaključka da niti jedan derivat MDP koji sadrži D-aminokiselinu na prvom mjestu u molekuli nije u mogućnosti stimulirati NOD2. Pretpostavlja se da su nepodudarnosti između ovih rezultata i rezultata prijašnjih istraživanja posljedica nepreciznosti u prijašnjim metodama mjerenja antigen-specifičnog odgovora. Ova saznanja su poticaj za daljnja istraživanja adjuvantskih sposobnosti derivata MDP posebice kod MDP (L-Val<sup>1</sup>) (slika 10) i MDP (L-Ser<sup>1</sup>) (slika 11) kod kojih je pokazano da mogu aktivirati NOD2 no slabije nego MDP. [27]



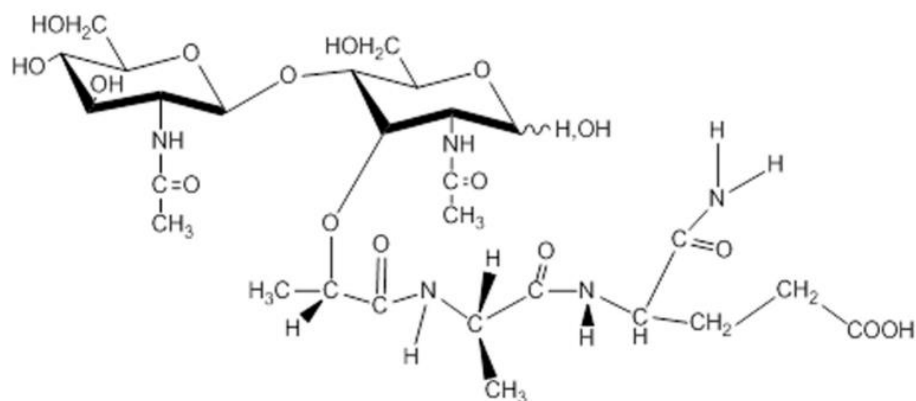
Slika 11. MDP (L-Ser<sup>1</sup>) [27]

#### 2.4. ANALOZI I DERIVATI MURAMIL-DIPEPTIDA

Kako bi se poboljšala aktivnosti i selektivnosti MDP, a smanjile nuspojave kao što su povišena temperatura, indukcija autoimune reakcije i upalne reakcije, razvijaju se brojni analozi i derivati ovog spoja. [16]

### 2.4.1. GMDP

U Rusiji su istraživanja muramil-peptida započela s određivanjem aktivne tvari mliječne kiseline bakterija *Lactobacillus bulgaricus* koja iskazuje antikancerogenu i imunostimulirajuću aktivnost. U institutu za bioorgansku kemiju ruske akademije za znanost (IBCh RAS) je ustanovljeno da je glikopeptid iz *Lactobacillus bulgaricus* derivat muramil-dipeptida *N*-acetilglukozaminil-*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (GMDP) (slika 12). [36]



Slika 12. Struktura *N*-acetilglukozaminil-*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (GMDP)

[37]

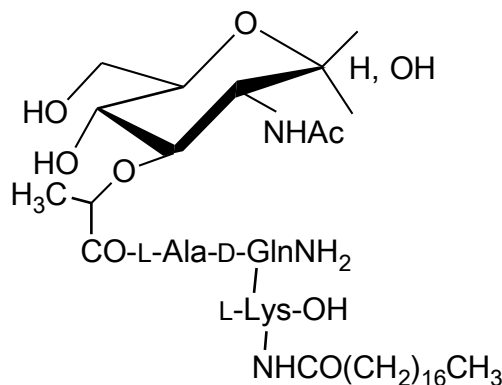
GMDP se razlikuje od MDP po prisutnosti *N*-acetilglukozaminila. Metoda sinteze ovog analoga je razvijena u laboratoriju za kemiju peptida u IBCh RAS. Naknadna istraživanja su pokazala da je GMDP, kao i MDP, ligand NOD2 receptora, a njegova adjuvantska aktivnost je veća nego adjuvantska aktivnost muramil-dipeptida. GMDP stimulira antiinfektivnu otpornost i antitumorski imunitet, aktivira imunokompetentne stanice te inducira sintezu citokina i medijatornih upalnih procesa. Sve ove karakteristike omogućuju stvaranje lijekova s GMDP kao osnovom. GMDP posjeduje manju pirogenost nego MDP. Pirogenost MDP je bila prepreka za njegovu kliničku uporabu i razlog za pronalaženje analoga koji ne posjeduju neželjene nuspojave. [37]

Prvi registrirani lijek koji sadrži GMDP je Licopid. Njegova upotreba započela je 1996. godine, a koristi se za kompleksnu terapiju bolesti koje su popraćene sekundarnim stanjima imunodeficijencije kao što su kronične bolesti, infekcije gornjih i donjih dišnih puteva, gnojno-upalne kožne bolesti, infekcija herpesom, psorijaza i plućna tuberkuloza. GMDP ima ulogu stimuliranja razvoja staničnog i humoralnog imunološkog odgovora. Kod miševa koji su imunizirani BCG (Bacille Calmette-Guerin) cjepivom, GMDP povećava sintezu faktora koji inhibira migraciju makrofaga za 3 puta i povećava proizvodnju antigena 2-5 puta. Izražen

stimulirajući učinak otkriven je pri korištenju GMDP kao adjuvanta u cjepivu protiv HIV-a koje sadrži gp120 antigen, tijekom *in vitro* imunizacije za dobivanje monoklonskih antitijela te u DNA cjepivu protiv *Herpes simplex* virusa i acelularnom cjepivu protiv hripavca.[38]

#### 2.4.2. Muroctasin, Romurtide

Prvi lijek na bazi muroctasina ( $N^2$ -[ $N$ -(acetil-muramil)- $L$ -alanil- $D$ -izoglutaminil]- $N^6$ -stearoil- $L$ -lizin) (slika 13) povećava nespecifičnu otpornost životinja na bakterijske i virusne patogene.



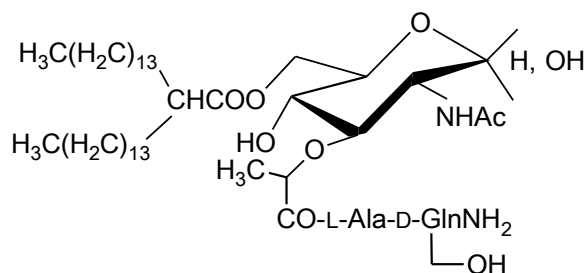
Slika 13. Kemijska struktura  $N^2$ -[ $N$ -(acetil-muramil)- $L$ -alanil- $D$ -izoglutaminil]- $N^6$ -stearoil- $L$ -lizina (Muroctasin, Romurtide) [16]

Od niza MDP derivata, Japanski znanstvenici odabrali su muroctasin jer inducira sintezu citokina IL-6 i IL-1 te GM-CSF (engl. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) [39]. Proučavaju se njegovi učinci na leukopoezu u pacijenata oboljelih od raka nakon kemoterapije i radioterapije. Kao rezultat kliničkih ispitivanja, utvrđeno je da je uporaba romurtida pridonijela brzom obnovi broja leukocita. Stimulacija leukopoeze kod pacijenata sa solidnim tumorima bila je uspješnija nego kod pacijenata s hematološkim malignim tumorima. Daljnja istraživanja pokazala su da romurtide nije učinkovit samo u obnovi leukocita već i trombocita u pacijenata nakon kemoterapije i zračenja. Ovo je prvi derivat muramil-dipeptida s imunoterapijskim djelovanjem koji je odobren za medicinsku uporabu kod liječenja leukopenije. U 2011. otkriveno je da zajednička primjena romurtida i IFN- $\beta$  potiče sazrijevanje stanica dendrita i inhibira rast B16F10 melanoma dok muramil-dipeptid i IFN- $\beta$  nisu imali učinak na rast tumora. [37]

#### 2.4.3. Lipofilni derivati muramil-dipeptida

Jedan od smjerova prilikom stvaranja imunoterapijskih lijekova s muramil-dipeptidima je

razvoj lipofilnih derivata. Lipofilni derivati nastaju vezanjem masnih kiselina ili fosfolipida za muramil-dipeptid. Prvi lipofilni analog MDP koji je prošao 1. fazu kliničkih ispitivanja je 6-*O*-(tetradecilheksadekanoil)-*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (B30-MDP) (slika 14). [40]

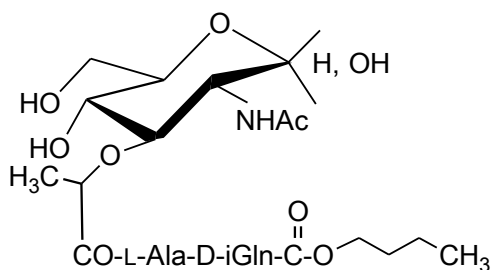


Slika 14. Kemijska struktura 6-*O*-(tetradecilheksadekanoil)-*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (B30-MDP) [16]

Istraživanja su se provodila sa liposomalnim cjepivom koje sadrži hemaglutinin i neuraminidaze influenza virusa te sa i bez B30-MDP. [40] Uključivanje derivata B30-MDP kao adjuvanta u sastav cjepiva omogućava 16 puta jače stvaranje antitijela u odnosu na cjepivo bez derivata. Ugrađivanje ovog adjuvanta u čestice kolesterola (virosome) produžuje proizvodnju antitijela do 6 mjeseci. Nuspojave cjepiva s B30-MDP adjuvantom bile su blage i očekivane.[37]

#### 2.4.4. Murabutid

Murabutid (*N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin-*N*-butil ester) (slika 15) je sintetski analog MDP koji nema pirogena svojstva.



Slika 15. Kemijska struktura *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin-*N*-butil ester (murabutid) [16]

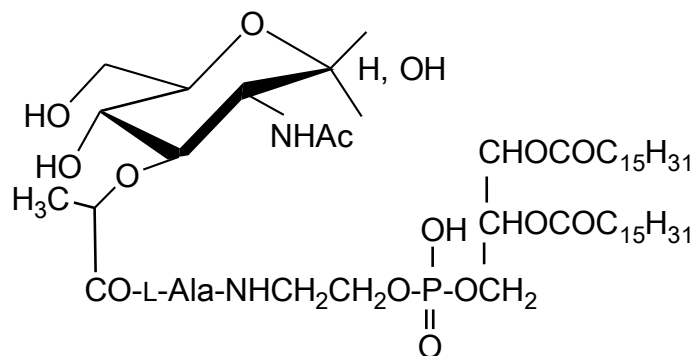
Makrofagi koji su stimulirani murabutidom povećavaju ekspresiju gena koji kodiraju za različite proteine kao što su imunološki medijatori i njihovi receptori, transkripcijski faktori i kinaze, transporteri i proteini uključeni u metaboličku aktivnost stanica. Murabutid također poboljšava otpornost domaćina na mikrobne infekcije i nespecifičnu otpornost na tumore te



inducira stvaranje citokina i kemokina. [37] Prošao je 1. i 2. fazu kliničkih ispitivanja u Francuskoj s minimalnim nuspojavama. Istraživanje je provedeno na 12 zdravih muškaraca te su pronađena samo dva citokina u krvnom serumu. Istovremeno su u serumu svih pacijenata pronađeni topljivi receptori za TNF i IL-1 koji su antagonisti ovih upalnih citokina. [41] Poznato je da poboljšanje imuniteta kod pacijenata zaraženih HIV-om uzrokuje učinkovitiju kontrolu replikacije virusa. Murabutid regulira funkciju makrofaga, stanica dendrita i B limfocita te selektivno aktivira CD4 limfocite što dovodi do supresije replikacije virusa *in vitro*. Prilikom proučavanja sposobnosti murabutida da kontrolira replikaciju virusa HIV-1 u inficiranim monocitima i stanicama dendrita dokazana je supresija replikacije virusa u oba tipa stanica. Murabutid nije utjecao na ulazak virusa u stanicu, aktivnost reverzne transkriptaze i ranu formaciju provirusne DNA u citoplazmi inficiranih stanica. Pokazana je drastična redukcija viralne mRNA u monocitima i stanicama dendrita. [42]

#### 2.4.5. Mifamurtid (MTP-PE)

Muramiltripeptid fosfatidiletanolamin (mifamurtid, MTP-PE) (slika 16) je derivat MDP koji se koristi u adjuvantskoj terapiji koja se zajedno s kemoterapijom koristi kod liječenja osteosarkoma. [43]



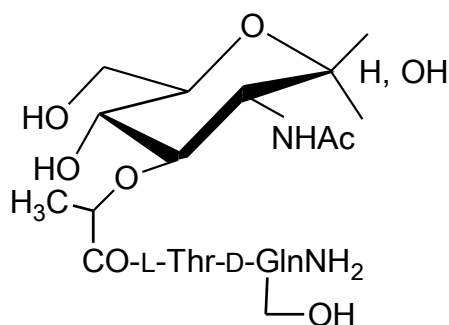
Slika 16. Kemijska struktura muramiltripeptid fosfatidiletanolamina (mifamurtid, MTP-PE)

[16]

To je tumor kostiju koji se najčešće javlja kod djece i mladih i ima smrtni ishod u 30% slučajeva. Primjena mifamurtida prilikom liječenja eliminira nastanak metastaza u plućima i pojačava odgovor na kemoterapiju. [43] Mifamurtid postiže iznimne rezultate kao adjuvant u cjepivu protiv hepatitisa B. Imunogenost je povećana 4-5 puta kao i razina IFN- $\gamma$ . [37]

#### 2.4.6. Syntex adjuvant formulation (SAF)

Syntex adjuvant formulation (SAF) je djelotvorno adjuvantsko sredstvo koje se sastoji od derivata muramil-dipeptida MDP[Thr] (slika 17) u emulziji voda-ulje.



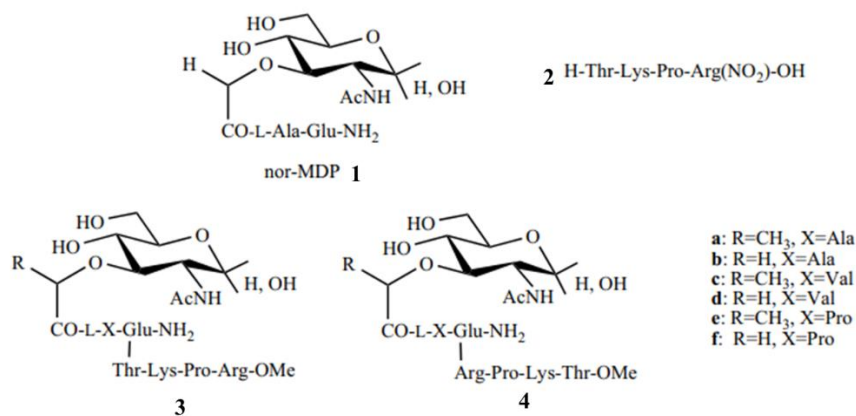
Slika 17. Kemijska struktura *N*-acetil muramil-L-threonil-D-izoglutamin (MDP[Thr]) [16]

Threonil-MDP (*N*-acetil muramil-L-threonil-D-izoglutamin) je bolje adjuvantsko sredstvo od MDP jer ne pokazuje nuspojave. Pokazao se izvrsnim adjuvantom u kontaktima s virusom gripe i malarije. Pokazuje prilagodljivost u kombinaciji s velikim brojem antigena no najučinkovitiji je zajedno s amfifilnim antigenima. Amfifilni antigeni se zadržavaju u uljnom dijelu kapljice SAF-a što dovodi do pojačanog imunološkog odgovora. SAF se koristi kao veterinarsko cjepivo u SAD-u. [44]

#### 2.4.7. Konjugati muramil-dipeptida

Konjugiranjem MDP s biološki aktivnim spojevima ne samo da se zadržavaju prirodna biološka svojstva, već se poboljšavaju i njihova farmakološka svojstva i jača samoobrana infekcijom napadnutog organizma. [16]

Tuftsinsin je tetrapeptid (H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH) koji, kao i MDP, posjeduje imunoadjuvantska svojstva: stimulira fagocitozu makrofaga i granulocita, ostvaruje antibakterijsku i antitumorsku aktivnost. Otkriven je 1970. godine a prirodno je prisutan u ljudskoj krvi. [45] Vrlo se brzo razgrađuje u organizmu, ima vrijeme poluživota 16 minuta pa se iz tog razloga priređuju stabilniji konjugati. Tuftsinsin stvara konjugate s muramil-dipeptidom i nor-muramil-dipeptidom (3a-f, slika 18) koji su testirani korištenjem *in vitro* kultura humanih monocita i limfocita. [46]



Slika 18. Struktura nor-MDP **1**, derivat tuftsina **2**, konjugati MDP/nor-MDP s tuftsinom **3a-f**, konjugati MDP/nor-MDP s retro-tuftsinom **4a-f** [46]

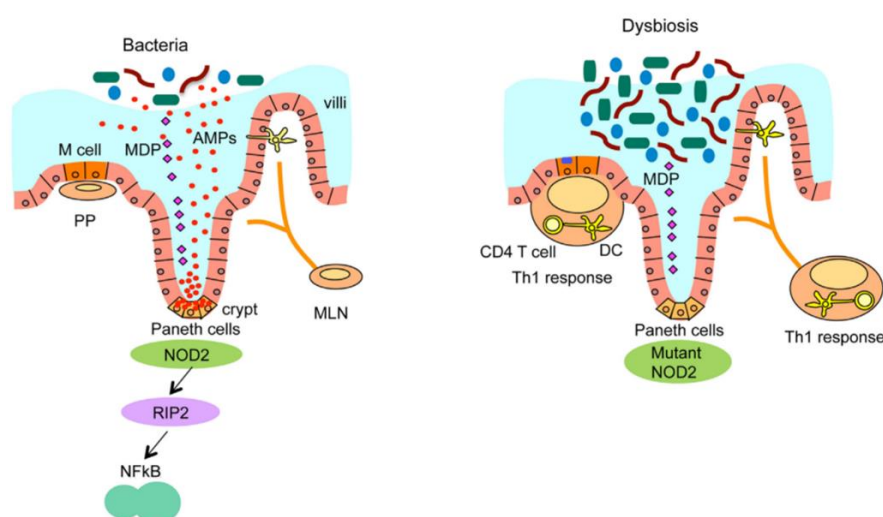
Iako su konjugati tuftsina i MDP odnosno nor-MDP stimulirali stvaranje TNF- $\alpha$  i IL-6 iz monocita i limfocita, uočeno je inhibitorско djelovanje na vijabilnost limfocita i monocita. Smanjenje vijabilnosti povezano je sa stvaranjem slobodnih radikala iz monocita i stimulacijom redoks enzima iz limfocita. Također, konjugati tuftsina nisu povećali citotoksičnu aktivnost prirodnoćubilačkih stanica (engl. *natural killer cells*). Isti tim znanstvenika proučio je imunološka svojstva konjugata muramil-dipeptida i nor-muramil-dipeptida s derivatom tuftsina, retro-tuftsinom (4a-f, slika 18). Retro-tuftsin pokazuje jednaku biološku aktivnost kao i tuftsin no posjeduje veću stabilnost i sposobnost rezistencije na degradaciju. U istraživanju je pokazan pozitivan učinak konjugata retro-tuftsina i MDP/nor-MDP na vijabilnost leukocita i monocita iz periferne humane krvi. Također je uočeno značajno povećanje broja TNF- $\alpha$  iz monocita. Derivat 4a pokazao je veće izlučivanje IL-6 iz mononuklearnih stanica periferne krvi (PMBC) nego što to rade samostalni MDP, tuftsin ili njegov retro analog. Jiang i suradnici u svojem recentnom istraživanju proučili su repetitivne proteine fuzioniranog MDP i tuftsina konjugata iz bakterije *Lactobacillus casei*. 20MT i 40MT (20 i 40 puta ponovljen protein koji nastaje fuzijom MDP i tuftsina) stimuliraju humoralni i stanični imunološki odgovor u miševa. Dokazano je povećanje imunoglobulina IgG i IgA koji se bore protiv virusa gastroenteritisa (engl. Transmissible Gastroenteritis Virus TGEV). [46]

## 2.5. UTJECAJ MURAMIL-DIPEPTIDA PRI AKTIVACIJI BOLESTI

### 2.5.1. Crohnova bolest

Crohnova bolest (CD, engl. *Crohn's disease*) je kronična upalna bolest crijeva (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*), a nastaje kao rezultat promjena u genetičkim, mikrobiološkim i imunološkim čimbenicima. [47] Muramil-dipeptid ima ulogu u aktivaciji upalnih puteva koji su uključeni u patogenezu Crohnove bolesti i pokretanju imunoloških odgovora u crijevnom sustavu. Kao što je ranije opisano, u zdravih ljudi MDP se veže za NOD2 receptore i pomoću različitih kaskada aktivira NF- $\kappa$ B ovisne upalne i antibakterijske odgovore (slika 19 lijevo). U genima koji kodiraju za NOD2 receptore, kod ljudi s Crohnovom bolesti, pronađene su tri vrste mutacija; dvije točkaste (engl. *missense mutation*) i jedna mutacija pomaka okvira čitanja (engl. *frame-shift mutation*). Frame-shift mutacija uzrokuje nastanak skraćenog proteina NOD2 kod kojeg je primijećena smanjena funkcija i slabiji odgovor na MDP. Monouklearne stanice periferne krvi (PBMC) bolesnika s frame-shift mutacijom stvaraju manje protuupalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8. [31]

NOD2 receptori se u visokom stupnju eksprimiraju u Panethovim stanicama koje se nalaze u terminalnom ileumu. One imaju važnu ulogu u urođenoj regulaciji crijevne mikrobiote. Nakon stimulacije s MDP, Panethove stanice izlučuju antimikrobne peptide uključujući lizozim, sekretornu fosfolipazu A2 (sPLA2) i humane  $\alpha$ -defenzine 5 i 6 (HD5 i HD6) u lumenu crijeva. Iz tog razloga, mutacije NOD2 koje se javljaju kod Crohnove bolesti uzrokuju nemogućnost vezanja MDP i regulacije interakcije domaćin-mikrob putem Panethovih stanica što uzrokuje upalu ileuma (slika 19 desno). [47]

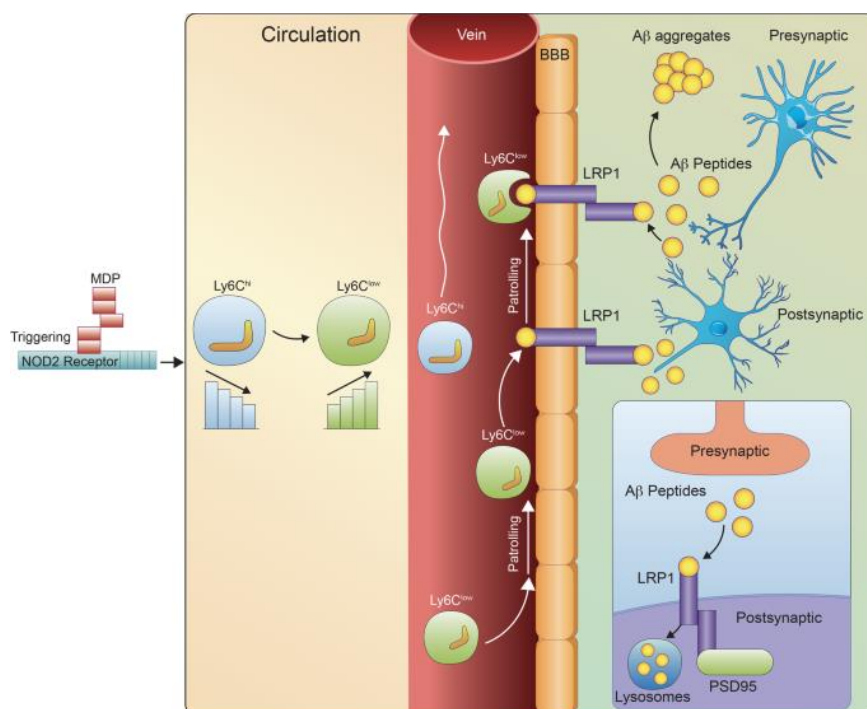


Slika 19. Prikaz zdravih crijeva (*lijevo*) i oboljelih Crohnovom bolešću (*desno*) [47]

### 2.5.2. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je neurodegenerativna bolest koju karakterizira aktivacija urođenih imunoloških stanica unutar središnjeg živčanog sustava (engl. *central nervous system*). U staničnoj membrani neurona nalaze se amiloidni prekursori peptida (APP) koji se normalno razgrađuju pomoću  $\alpha$ - i  $\gamma$ -sekretaze. Ako se  $\beta$ -sekretaza udruži s  $\gamma$ -sekretazom dolazi do degradacije APP na  $A\beta$  (amiloid- $\beta$  peptid) koji nisu topljivi i ne mogu se razgraditi. Gomilanjem  $A\beta$  stvaraju se plakovi (agregati) koji se nakupljaju u prostorima između neurona te oko krvnih žila što uzrokuje simptome Alzheimerove bolesti. Struktura krvno-moždane barijere ograničava pristup određenim topivim molekulama i cirkulirajućim leukocitima u srednjem živčanom sustavu. Monociti i perivaskularni makrofagi su važni za Alzheimerovu bolest jer uzrokuju učinkovitu fagocitozu  $A\beta$  plakova. Dokazana je važnost monocita  $Ly6C^{low}$  koji uklanjaju i transportiraju  $A\beta$  agregate iz moždane mikrovaskulature u krvotok.

Maleki i suradnici su dvofotonskom mikroskopijom istražili imunomodulatorni utjecaj MDP na neuropatologiju miševa s modelom Alzheimerove bolesti. MDP je uspješno prevodio podskupine  $Ly6C^{high}$  monocita u  $Ly6C^{low}$  monocite koji će eliminirati  $A\beta$  plakove (slika 20) [48].



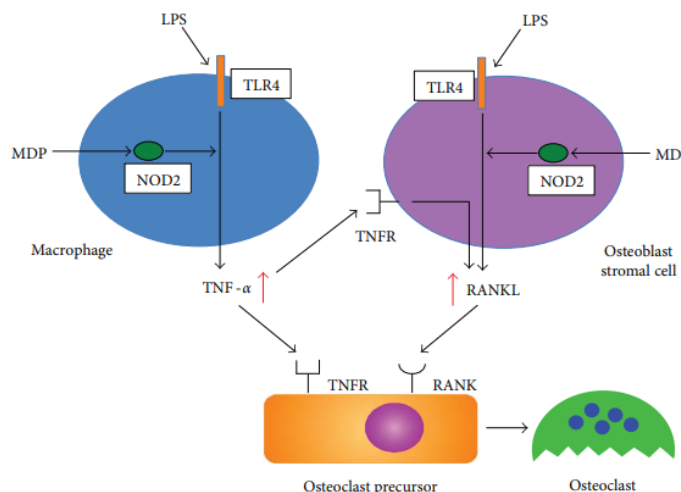
Slika 20. Utjecaj MDP na  $A\beta$  plakove [48]

Rijetki su lijekovi koji ciljaju isključivo specifične podskupine monocita i makrofaga te

iskazuju blage imunomodulatorne učinke na neurodegenerativne bolesti kao što to radi MDP. Istraživanje je dokazalo da kronična primjena MDP u miševa s modelom Alzheimerove bolesti uzrokuje znatno poboljšanje u testovima memorije. Također je potvrđeno da primjena MDP odgađa pojavu fenotipa bolesti i pogoduje korištenju u ranoj fazi. [48]

### 2.5.3. Stvaranje osteoklasta

Osteoklasti su stanice koštanog tkiva koje djeluju tako da degradiraju kost u svrhu remodeliranja. Stvaranje osteoklasta i destrukcija kosti su procesi inducirani lipopolisaharidima (LPS). Lipopolisaharidi su komponente stanične stijenke Gram-negativnih bakterija i endotoksini koji izazivaju upalni odgovor. Formiranje osteoklasta ovisi o stimulaciji aktivatora receptora NF- $\kappa$ B liganda (RANKL) i stimulaciji M-CSF (engl. macrophage colony-stimulating factor). Izloženost LPS inducira stvaranje upalnih citokina kao što je tumorski faktor nekroze TNF- $\alpha$  koji se stvara u stanicama makrofaga (slika 21). Istovremeno MDP pojačava ekspresiju TNF- $\alpha$  induciranog s LPS. TNF- $\alpha$  koji je induciran s LPS i MDP pojačava ekspresiju RANKL u stromalnim stanicama osteoblasta. Nadalje, LPS također inducira ekspresiju RANKL u osteoblastima a MDP pojačava ovu LPS induciranu ekspresiju. TNF- $\alpha$  stvara sinergiju interakcijom s RANKL-om s kojim se veže za prekursor osteoklasta iz kojeg će zatim nastati osteoklast. Možemo zaključiti da MDP i LPS zajedno induciraju stvaranje osteoklasta *in vivo*. [49]



Slika 21. Shema uloge MDP i LPS u stvaranju osteoklasta [49]

### 3. ZAKLJUČAK

1. Peptidoglikan (murein) je važna sastavnica stanične stijenke bakterija koja omeđuje citoplazmatsku membranu bakterijske stanice, a prisutan je kod Gram-pozitivnih i kod Gram-negativnih bakterija.
2. Razgradnjom peptidoglikana nastaju manji fragmenti, *tzv.* muramil-peptidi, od kojih je najmanja strukturna jedinica koja posjeduje adjuvantsku aktivnost muramil-dipeptid [*N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-isoglutamin (MurNAc-*L*-Ala-*D*-iGln)].
3. Freund i suradnici razvili su Freundov kompletni adjuvant (*engl.* Freund complete adjuvant, FCA) koji predstavlja najfunkcionalniji i najšire korišteni adjuvant u dosadašnjim istraživanjima, a sastoji od inaktiviranih *Mycobacterium tuberculosis* u uljnoj emulziji, te može izazvati snažni humoralni ili stanični imunološki odgovor.
4. Kako bi se poboljšala aktivnosti i selektivnosti MDP, a smanjile nuspojave kao što su povišena temperatura, indukcija autoimune reakcije i upalne reakcije, razvijaju se brojni analozi i derivati ovog spoja.
5. GMDP se razlikuje od MDP po prisutnosti *N*-acetilglukozaminila, a istraživanja su pokazala da je GMDP, kao i MDP, ligand NOD2 receptora, a njegova adjuvantska aktivnost je veća nego adjuvantska aktivnost muramil-dipeptida.
6. Muroctasin inducira sintezu citokina IL-6 i IL-1 te GM-CSF, a iznimno je učinkovit kod leukopoeze u pacijenata oboljelih od raka nakon kemoterapije i radioterapije. Kao rezultat kliničkih ispitivanja, utvrđeno je da je uporaba Romurtida pridonijela brzjoj obnovi broja leukocita, uglavnom zbog neutrofila.
7. Murabutid poboljšava otpornost domaćina na mikrobnе infekcije i nespecifičnu otpornost na tumore te inducira stvaranje citokina i kemokina.
8. Mifamurtid, MTP-PE se koristi kao adjuvant kod liječenja osteosarkoma zajedno s kemoterapijom te kao adjuvant u cjepivu protiv hepatitisa B
9. . Syntex adjuvant formulation (SAF) sastoji se od derivata muramil-dipeptida MDP[Thr] koji pokazuje adjuvantsko djelovanje u kontaktu s virusom gripe i malarije i koji se nalazi u emulziji voda-ulje
10. MDP se konjugira s biološki aktivnim spojevima u svrhu poboljšavanja farmakoloških svojstva spoja i jačnja samoobrane infekcijom napadnutog organizma
11. Tuftsin stimulira fagocitozu makrofaga i granulocita, ostvaruje antibakterijsku i antitumorsku aktivnost.

12. Muramil-dipeptid ima ulogu u aktivaciji upalnih puteva koji su uključeni u patogenezu Crohnove bolesti i pokretanju imunoloških odgovora u crijevnom sustavu
13. Gomilanjem A $\beta$  stvaraju se plakovi (agregati) koji se nakupljaju u prostorima između neurona te oko krvnih žila što uzrokuje simptome Alzheimerove bolesti, a MDP uspješno prevodi podkupine Ly6C<sup>high</sup> monocita u Ly6C<sup>low</sup> monocite koji će eliminirati A $\beta$  plakove.
14. Osteoklasti su stanice koštanog tkiva koje djeluju tako da degradiraju kost u svrhu remodeliranja, a MDP i LPS zajedno induciraju stvaranje osteoklasta *in vivo*.



#### 4. POPIS LITERATURE

1. Ribić R, Tomić S (2013) Priprava i imunomodulacijska svojstva modificiranih peptidoglikanskih fragmenata. *Kem Ind* **62** (1-2), 19-31
2. Humann J, Lenz LL (2008) Bacterial Peptidoglycan-Degrading Enzymes and Their Impact on Host Muropeptide Detection. *J Innate Immun* **1**, 88–97
3. Anonymus <<http://www.luerzersarchive.com/goto/url/hotcore.info/babki/bacteria-cell-diagram.html>>, pristupljeno 27.06.2022.
4. Neuhaus FC, Baddiley J (2004) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 686–723
5. Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B (2005) Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the Drosophila innate immune system. *J of Endotoxin Res* **1** (2), 105
6. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 149–167
7. Ogawa C, Liu YJ, Kobayashi KS (2011) Muramyl dipeptide and its Derivatives: Peptide Adjuvant in Immunological Disorders and Cancer Therapy. *Current Bioactive Compounds* **7**, 180-197
8. Scheurwater EM, Pfeffer JM, Clarke AJ (2007) Production and purification of the bacterial autolysin N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase B from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expr Purif* **56**, 128–137
9. Zahrl D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, Beranek A i sur. (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* **151**, 3455–3467
10. Anonymus <[https://www.researchgate.net/figure/A-Typical-peptidoglycan-structure-of-Gram-positive-bacteria-showing-cleavage-sites-by\\_fig7\\_319710923](https://www.researchgate.net/figure/A-Typical-peptidoglycan-structure-of-Gram-positive-bacteria-showing-cleavage-sites-by_fig7_319710923)> pristupljeno 27.6.2022.
11. Park JT, Uehara T (2008) How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 211–227
12. Cookson BT, Cho HL, Herwaldt LA, Goldman WE (1989) Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **57**, 2223–2229

13. Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R, Lederer E (1974) Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **59**, 1317- 1325
14. Freund, J, Casals J, Hismar EP (1937) Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol* **37**, 509
15. Kotani S, Watanabe Y, Kinoshita F, Shimono T, Morisaki I (1975) Immunoadjuvant activities of synthetic N-acetyl-muramyl-peptides or -amino acids. *Biken J* **18**, 105-111
16. Kovačević, M (2014) Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
17. Flowers HM, Jeanloz RW (1963) The synthesis of 2-acetamido-3-*O*- (D-1-carboxymethyl)-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucose (*N*-acetylmuramic acid) and of benzyl glycoside derivatives of 2-amino-2-*O*-(D-1)-carboxymethyl)-2-deoxy-D-glucose (muramic acid). *J Org Chem* **28**, 2983-2986
18. Gigg R, Carrol PM, Warren CD (1965) A synthesis of muramic acid. *J Chem Soc* **46**, 2975-2977
19. Gross PH, Rimpler M (1986) Stereochemically pure derivatives of muramic and isomuramic acids. *Liebigs Ann Chem* 37-45
20. Kubasch N, Schmidt RR (2002) Synthesis of muramyl peptides containing meso-diaminopimelic acid. *Eur. J Org Chem* 2710-2726
21. Kubasch N, Schmidt RR (2002) Synthesis of muramyl peptides containing meso-diaminopimelic acid. *Eur J Org Chem* 2710-2726
22. Rosenthal RS, Dziarski R (1994) Isolation of peptidoglycan and soluble peptidoglycan fragments. *Methods in enzymology* **235**, 253-285
23. Packiam M, Weinrick B, Jacobs Jr. WR, Maurelli AT (2015) Structural characterization of muropeptides from *Chlamydia trachomatis* peptidoglycan by mass spectrometry resolves “chlamydial anomaly”. *PNAS Early Edition* **112** (37), 11660-11665
24. Vogel FR (2000) Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin Infect Dis* **30** (Suppl 3), 266-270
25. Traub S, von Aulock S, Hartung T, Hermann C (2006) MDP and other muropeptides--direct and synergistic effects on the immune system. *J Endotoxin Res* **12** (2), 69-85
26. Takada H, Kawabata Y, Kawata, S, Kusumoto S (1996) Structural characteristics of peptidoglycan fragments required to prime mice for induction of anaphylactoid reactions by lipopolysaccharides. *Infect Immun* **64** (2), 657-659

27. Rubino SJ, Magalhaes JG, Philpott D, Bahr GM, Blanot D, Girardin SE (2013) Identification of a synthetic muramyl peptide derivative with enhanced Nod2 stimulatory capacity. *Innate Immun* **19**, 493-503
28. Willems MMJHP, Zom GG, Meeuwenoord N, Khan S, Ossendorp F, Overkleeft HS i sur. (2016) Lipophilic Muramyl Dipeptide–Antigen Conjugates as Immunostimulating Agents. *ChemMedChem* **11**, 190 – 198
29. Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneca LG, Philpott DJ i sur. (2003) Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* **278** (43), 41702-41708
30. Inohara N, Nunez G (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3** (5), 371- 382
31. Salem M, Seidelin JB, Rogler G, Nielsen OH (2012) Muramyl dipeptide responsive pathways in Crohn’s disease: from NOD2 and beyond. *Cell Mol Life Sci* **70** (18), 3391-3404
32. Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nunez G, Janeway CA i sur. (2002) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416** (6877), 194-199
33. Macdonald TT, Monteleone G (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* **307** (5717), 1920-1925
34. Pan Q, Mathison, J, Fearn C, Kravchenko VV, Da Silva Correia J, Hoffman HM i sur. (2007) MDP-induced interleukin-1b processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. *J Leukoc Biol* **82** (1), 177-183
35. Adam A, Petit JF, Lefrancier P, Lederer E (1981) Muramyl peptides. Chemical structure, biological activity and mechanism of action. *Mol Cell Biochem* **41**, 27-47
36. Bogdanov IG, Dalev PG, Gurevich AI, Kolosov MN, Malékova VP, Plemyannikova LA i sur. (1975) Antitumour Glycopeptides From Lactobacillus Bulgaricus. *FEBS Lett* **57**, 259–261
37. Guryanova SV, Khaitov RM (2021) Strategies for Using Muramyl Peptides - Modulators of Innate Immunity of Bacterial Origin - in Medicine. *Front Immunol* **12** (607178), 1-17
38. Andronova TM, Dozmorov IM, Mustafaev MI, Petrov RV (1991) Synthetic Immunomodulators. *Nauka*
39. Matsumoto K, Ogawa H, Kusama K, Nagase O, Sawaki N, Inage M (1981) Stimulation of non Specific Resistance to Infection Induced by 6-O-acylmuramyl Dipeptide in Mice. *Infect Immun* **32**, 748–758

40. Kaji M, Kaji Y, Kaji M, Ohkuma K, Honda T, Oka T i sur. Phase 1 Clinical Tests of Influenza MDP-virosome Vaccine (KD-5382). *Vaccine* **10** (10), 663–667
41. Darcissac EC, Bahr GM, Pouillart PR, Riveau GJ, Parant MA (1996) Selective Potentiation of Cytokine Expression in Human Whole Blood by Murabutide, a Muramyl Dipeptide Analogue. *Cytokine* **8**(8), 658–66
42. Amiel C, De La Tribonnière X, Vidal V, Darcissac E, Mouton Y, Bahr GM (2002) Clinical Tolerance and Immunologic Effects After Single or Repeated Administrations of the Synthetic Immunomodulator Murabutide in HIV-1-Infected Patients. *JAIDS J Acquired Immune Deficiency Syndromes* **30**, 294–305
43. Uehara T, Fujiwara T, Takeda K, Kunisada T, Ozaki T, Usono H (2015) Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas. *BioMed Res Int* **2015**, 820813
44. Lidgate DM (2008) Preparation of the Syntex Adjuvant Formulation (SAF, SAF-m, and SAF-1) *Methods in Mol Med* **42**, 229-237
45. Najjar VA, Nishioka K (1970) Tuftsin: A natural phagocytosis stimulating peptide. *Nature* **228**, 672-673
46. Siebert A, Gensicka-Kowalewska M, Cholewiński G, Dzierzbicka K (2017) Tuftsin – Properties and Analogs. *Current Med Chem* **24**, 3711-3727
47. Sidiq T, Yoshihama S, Downs I, Kobayashi KS (2016) Nod2: A Critical Regulator of Ileal Microbiota and Crohn's Disease. *Frontiers in Immun* **7** (367), 1-11
48. Maleki AF, Cisbani G, Plante MM, Prefontaine P, Laflamme N, Gosselin J i sur. (2020) Muramyl dipeptide-mediated immunomodulation on monocyte subsets exerts therapeutic effects in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation* **17** (218), 1-12
49. Kitaura H, Ishida M, Kimura K, Sugisawa H, Kishikawa A, Shima K i sur. (2017) Role of Muramyl Dipeptide in Lipopolysaccharide-Mediated Biological Activity and Osteoclast Activity. *Hindawi* **2018**, 1-8

## Izjava o izvornosti

Ja Leona Galić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

  
Vlastoručni potpis