

Peptidomimetici kao terapeutici

Radić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:359119>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

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

Ivana Radić

6945/BT

PEPTIDOMIMETICI KAO TERAPEUTICI
ZAVRŠNI RAD

Modul: Organska kemija

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za Organsku kemiju

PEPTIDOMIMETICI KAO TERAPEUTICI

Ivana Radić, 6945/BT

Sažetak: *Peptidi nisu pogodni za korištenje u terapeutske svrhe iz brojnih razloga. U cilju poboljšanja nepovoljnih svojstava njihove se strukture modificiraju, a nastali spojevi nazivaju se peptidomimetici. Oni oponašaju strukturu i biološki učinak peptida te se mogu koristiti kao lijekovi. Autoimune bolesti posljedica su nemogućnosti razlikovanja vlastitih stanica od stranih antigena pri čemu organizam uništava vlastito tkivo. U terapiji autoimunih bolesti koriste se imunomodulatori. Multipla skleroza autoimuna je bolest kod koje se razara mijelin unutar središnjeg živčanog sustava što rezultira nizom simptoma. Mimetici peptidnih epitopa, supresijom razgradnje mijelina, uspješno se koriste u liječenju multiple skleroze. Liječenju karcinoma pristupa se antigen-specifičnom imunoterapijom čiji je cilj omogućiti stanicama imunostava prepoznavanje tumorskih stanica i selektivno uništavanje.*

Ključne riječi: peptidomimetici, imunomodulatori, autoimune bolesti, multipla skleroza, karcinom

Rad sadrži: 20 stranica, 9 slika, 43 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Lidija Barišić

Rad predan: lipanj 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory of Organic Chemistry

PEPTIDOMIMETICS AS THERAPEUTICS

Ivana Radić, 6945/BT

Abstract: *The peptides are not suitable for therapeutic application for various reasons. Their structures are modified to improve the unfavorable properties and the resulting compounds are named peptidomimetics. They mimic the structure and biological effect of the peptides and can be used as medicaments. Autoimmune diseases are the result of inability to distinguish its own cells from foreign antigens in which the body destroys its own tissue. The immunomodulators are employed in the treatment of autoimmune diseases. Multiple sclerosis is an autoimmune disease that destroys myelin within the central nervous system resulting in a set of symptoms. The protein epitope mimetics are successfully applied in treatment of multiple sclerosis owing to their role in the suppression of degradation of myelin. One of the cancer treatment approaches is based on the antigen-specific immunotherapy, which aims to enable the cells of the immune system to recognise and selectively destroy the tumor cells.*

Keywords: peptidomimetics, immunomodulators, autoimmune diseases, multiple sclerosis, cancer

Thesis contains: 20 pages, 9 figures, 43 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Lidija Barišić, Associate Professor

Thesis delivered: June 2016.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Građa i struktura proteina	2
2.2. Nepovoljna svojstva proteina	3
2.3. Peptidomimetici	5
2.4. Vrste peptidomimetika	5
2.5. Peptidi i peptidomimetici kao terapeutici	6
2.5.1. Imunomodulacija	9
2.5.2. Peptidi i peptidomimetici kao imunomodulatori u terapiji autoimunih bolesti	11
2.5.3. Peptidomimetici u terapiji karcinoma	13
3. ZAKLJUČAK	15
4. POPIS LITERATURE	16

1. UVOD

Proteini imaju esencijalnu ulogu u svim biološkim procesima. Građeni su od dvadeset aminokiselina povezanih amidnim vezama u peptidne i proteinske lance. Njihovim se intra- i intermolekulskim interakcijama ostvaruju različiti strukturni elementi. Unutar trodimenzijske proteinske strukture razlikujemo četiri strukturne razine: primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu.

Korištenje proteina kao terapeutika ograničeno je zbog njihovih nepovoljnih svojstava: (i) *konformacijska fleksibilnost* koja omogućuje interakcije s neželjenim receptorima i proteolitičkim enzimima te (ii) *polarnost* koja otežava transport kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru. Modificiranjem peptidne strukture i "zaključavanjem" peptida u nativnu (bioaktivnu) konformaciju dobiva se nova skupina spojeva nazvana peptidomimeticima. Peptidomimetik oponaša strukturni fragment odgovoran za molekulsko prepoznavanje i interakciju s receptorima.

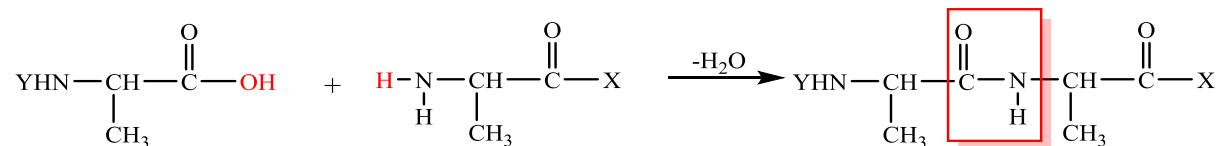
Peptidomimetici su, kao potencijalni terapeutici, predmet brojnih istraživanja u području medicinske kemije i biotehnologije. Razvoj i istraživanje u području peptidnih mimetika kao terapeutika urodilo je njihovom primjenom u liječenju autoimunih bolesti i karcinoma, što će biti opisano u ovom završnom radu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Građa i struktura proteina

Proteini su polimeri građeni iz aminokiselinskih podjedinica. Svi proteini u živim organizmima građeni su iz dvadeset različitih, proteinogenih L-aminokiselina. Proteinogene aminokiseline sadrže amino- i karboksilnu skupinu te α -ugljikov atom na kojeg su vezani vodikov atom i različiti bočni ogranaci. Kemijska svojstva aminokiselinskih bočnih ogranaka određuju ulogu svake pojedine aminokiseline u proteinskoj strukturi i funkciji.

U peptidima se α -karboksilna skupina (C-terminus) jedne aminokiseline vezuje s α -amino-skupinom (N-terminusom) druge aminokiseline amidnom (peptidnom) vezom, pri čemu se gubi jedna molekula vode (slika 1).



Slika 1. Tvorba peptidne veze (X, Y; zaštitne skupine).

Svaki protein ima jedinstven aminokiselinski slijed određen redoslijedom nukleotida u genu. Zahvaljujući interakcijama između aminokiselinskih ostataka, proteini poprimaju različite trodimenzijske strukture, koje je moguće podijeliti na četiri razine (slika 2):

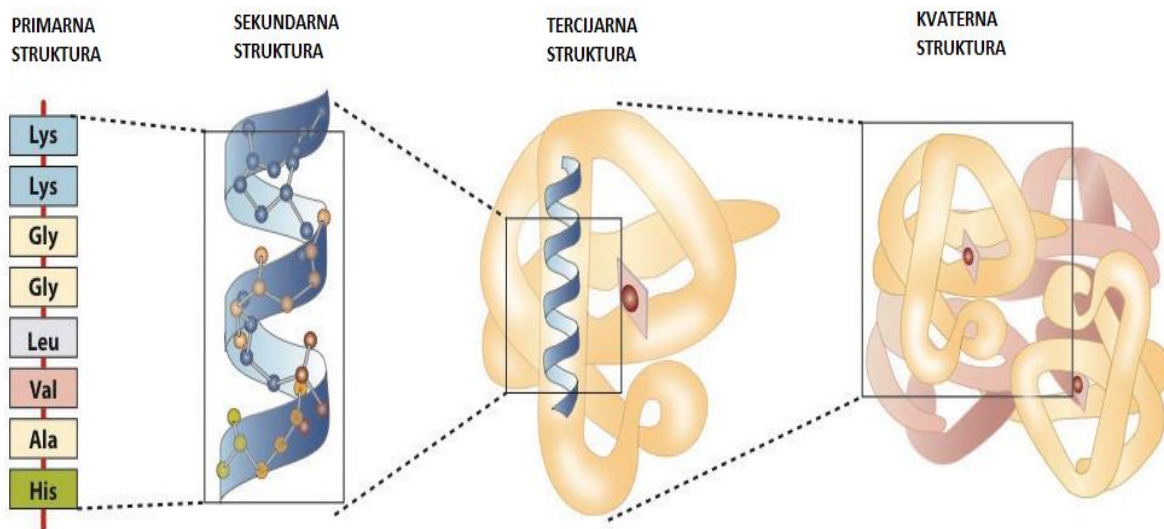
(i) *Primarna struktura* - slijed aminokiselina u proteinskom lancu,

(ii) *Sekundarna struktura* - nastaje kao posljedica stvaranja vodikovih veza između amino- i karbonilnih skupina koje su u linearnom slijedu međusobno blizu. 1951. godine Linus Pauling i Robert Corey uočili su dva najčešća tipa sekundarne strukture: α -uzvojnica i β -nabranu ploču. α -uzvojnica nastaje kada se dio polipeptidnog lanca ovija oko svoje osi, tako da CO-skupina jedne peptidne veze uspostavi vodikovu vezu s NH-skupinom peptidne veze četvrte aminokiseline u aminokiselinskom slijedu. U β -nabranoj ploči vodikove veze nastaju između najbližih amino- i karbonilnih skupina susjednih lanaca. One se mogu uspostaviti između više dijelova polipeptidnog lanca koji mogu biti međusobno paralelno ili antiparalelno usmjereni.

(iii) *Tercijarna struktura* - prostorni odnos u linearnom slijedu međusobno udaljenih bočnih ogranaka. Uglavnom se α -uzvojnice i β -nabrane ploče, povezane regijama petlji, smataju u kompaktne globularne strukture nazvane domenama i čine osnovne jedinice

tercijarne strukture. Veze između bočnih ogranaka mogu biti nekovalentne (ionske, vodikove i hidrofobne interakcije između nepolarnih bočnih ogranaka) te kovalentne (disulfidni mostovi). Vodikova veza može nastati između amidnih skupina osnovnog lanca, između polarnih grupa bočnih ostataka, te između amidnih skupina i polarnih bočnih ogranaka. Disulfidne veze nastaju dehidriranjem dvaju bočnih cisteinskih ostataka. Ionske veze nastaju između pozitivno i negativno nabijenih aminokiselinskih ostataka (lizin, histidin, arginin i asparginska i glutaminska kiselina). Hidrofobne interakcije nastaju približavanjem hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (valin, leucin, izoleucin itd.) Uz izuzetak membranskih proteina, hidrofobne se interakcije ostvaruju prvenstveno u unutrašnjosti proteinske molekule.

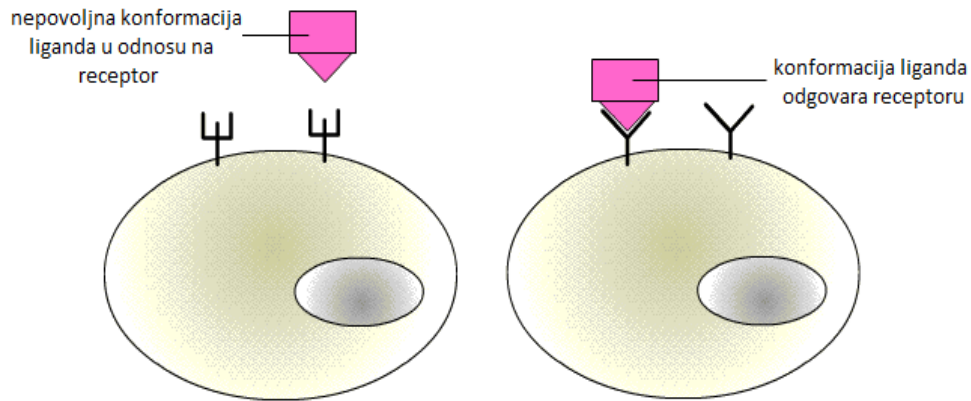
(iv) *Kvaternu strukturu* imaju proteini koji sadrže više od jednog polipeptidnog lanca [1].



Slika 2. Strukturne razine proteina [2].

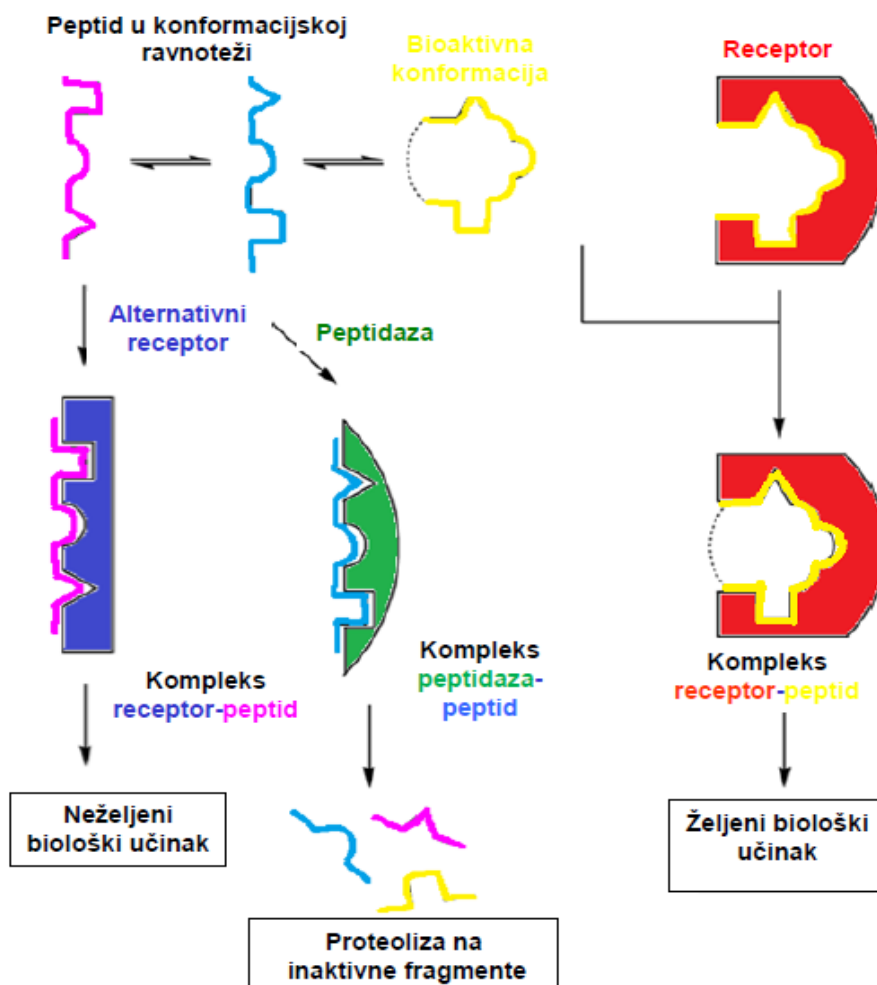
2.2. Nepovoljna svojstva proteina

Osnovni preduvjet za postizanje biološkog odgovora jest strukturna komplementarnost liganda i receptora te njihovo međusobno povezivanje (slika 3). Iz brojnih razloga, peptidi nisu pogodni za korištenje u terapijske svrhe. Uslijed naglašene fleksibilnosti mogu zauzeti mnoštvo konformacija i uspostaviti brojne interakcije s različitim receptorima, što rezultira nepoželjnim nuspojavama (slika 4). Također su podložni djelovanju peptidaza, a njihova molekulska masa i polarni karakter otežavaju prolazak kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru [3].



Slika 3. Komplementarnost liganda i receptora [3].

Da bi se povećala stabilnost i selektivnost peptida, njihove se strukture modificiraju u cilju "zaključavanja" nativne konformacije, a nastali modificirani spojevi nazivaju se peptidomimetici [4].



Slika 4. Fleksibilnost peptida i različiti biološki odgovori [3].

2.3. Peptidomimetici

Bitno je naglasiti razliku između modificiranog peptida i peptidomimetika. Modificirani peptidi definiraju se kao peptidi čiji je osnovni aminokiselinski slijed ostao isti, ali peptid sadrži neprirodne aminokiseline, modificirane cisteinske ostatke ili fosforilirane aminokiseline. Peptidomimetici su spojevi koji oponašaju strukturu i/ili biološki učinak peptida neovisno o kemijskoj strukturi [5].

Prihvaćene su dvije definicije peptidomimetika:

- **Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora [3,6].**
- **Peptidomimetik je spoj čija su sekundarna strukturalna svojstva analogna prirodnom peptidu zbog čega može oponašati njegovu biološku funkciju [3,6-9].**

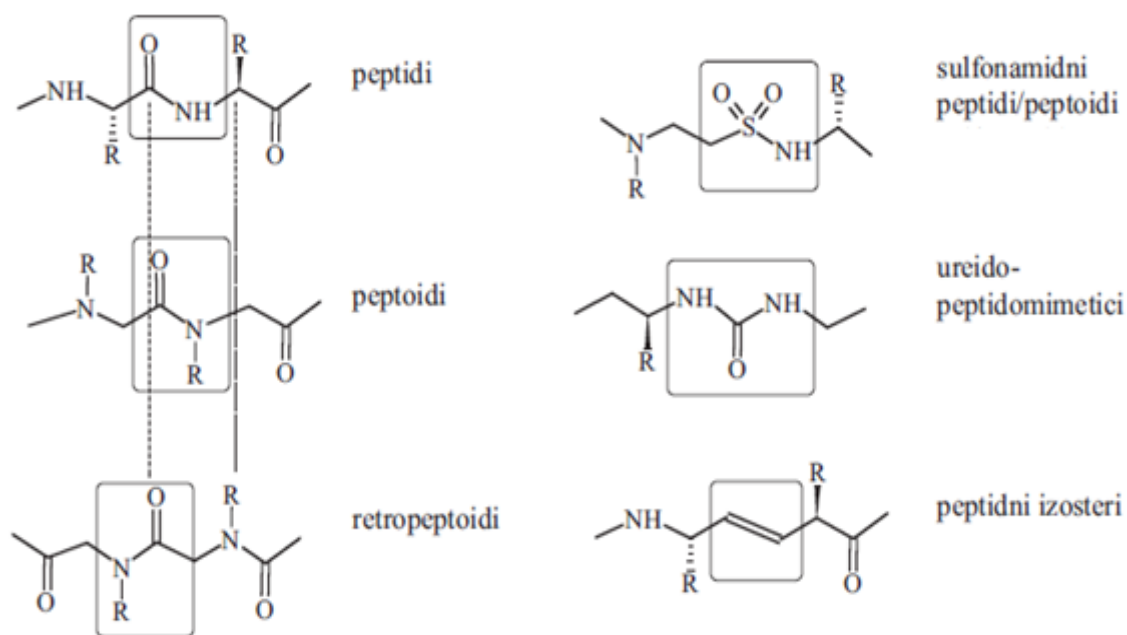
Modifikacijom njihovih nepovoljnih biofarmaceutskih i farmakoloških svojstava omogućena je klinička primjena peptida:

- Uvođenjem polarnih funkcijskih skupina poboljšava se njihova *topljivost u vodi*.
- Prirodni peptidi sastavljeni iz L-aminokiselina podložni su djelovanju endo- i egzopeptidaza zbog čega imaju vrlo nisku stabilnost. *Otpornost na peptidaze* može se poboljšati uvođenjem D-aminokiselina, eliminacijom pojedine amidne veze ili modifikacijom C- ili N-terminalne skupine.
- *Permeabilnost kroz biološke membrane* - krvno-moždane i intestinalne stanice izlučuju hidrolitičke enzime stvarajući biokemijsku barijeru, a istovremeno njihova strukturalna svojstva predstavljaju fizičku barijeru. Zaporeke je moguće prevladati korekcijom fizikalno-kemijskih svojstava i peptida i supstrata [10,11].

2.4. Vrste peptidomimetika

Najjednostavnije modifikacije peptida uključuju: supstituciju funkcijskih skupina u bočnim lancima aminokiselina, zamjenu proteinogene aminokiseline nekom neprirodnom aminokiselinom ili promjenu kiralnosti što podrazumijeva umetanje D-aminokiselina. Supstitucija amidnog vodika alkilnom skupinom utječe na konformaciju peptida jer se gubi donor vodikove veze. N-alkilacija utječe na polarnost molekule i može povećati stabilnost prema proteolitičkim enzimima [5].

Najveći nedostatak nativnih peptida predstavlja hidroliza peptidne veze. Premještanjem bočnih aminokiselinskih lanaca na amidne dušikove atome dobivaju se *peptoidi* [12]. Zamjenom mjesta karbonilne i amino-skupine obrće se smjer peptidnog lanca čime rezultiraju *retropeptidi* (slika 5) [13]. Dobiveni peptidomimetici imaju izmijenjena fizikalno-kemijska svojstva. Gubitak amidnog vodika koji sudjeluje u vodikovim vezama rezultira smanjenom topljivošću u polarnim otapalima, dok dobivena tercijska amidna veza podliježe izomerizaciji. Biološku aktivnost nije moguće predvidjeti, iako istraživanja pokazuju da peptidomimetici s modificiranom peptidnom vezom imaju povećanu aktivnost [5,14].



Slika 5. Peptidomimetici s izmijenjenom amidnom vezom [5].

Ciklički peptidi *in vivo* mnogo su stabilniji od svojih linearnih analoga te predstavljaju potencijalne terapeutike. Nalazimo ih u nizu prirodnih bioaktivnih metabolita [15]. Ciklički analozi peptida i peptidomimetika služe kao modeli za različite strukturne motive [5].

2.5. Peptidi i peptidomimetici kao terapeutici

Male molekule peptidomimetika oponašaju složene proteinske interakcije. Iz funkcionalno važnih konformacija proteina dobivenih iz prirodnih izvora, koje su rezultat smatanja proteina i imaju važnu ulogu u molekulskom prepoznavanju, razvijaju se terapeutici na bazi njihovih mimetika. Razvijene su brojne tehnologije i pristupi za dizajn male molekule

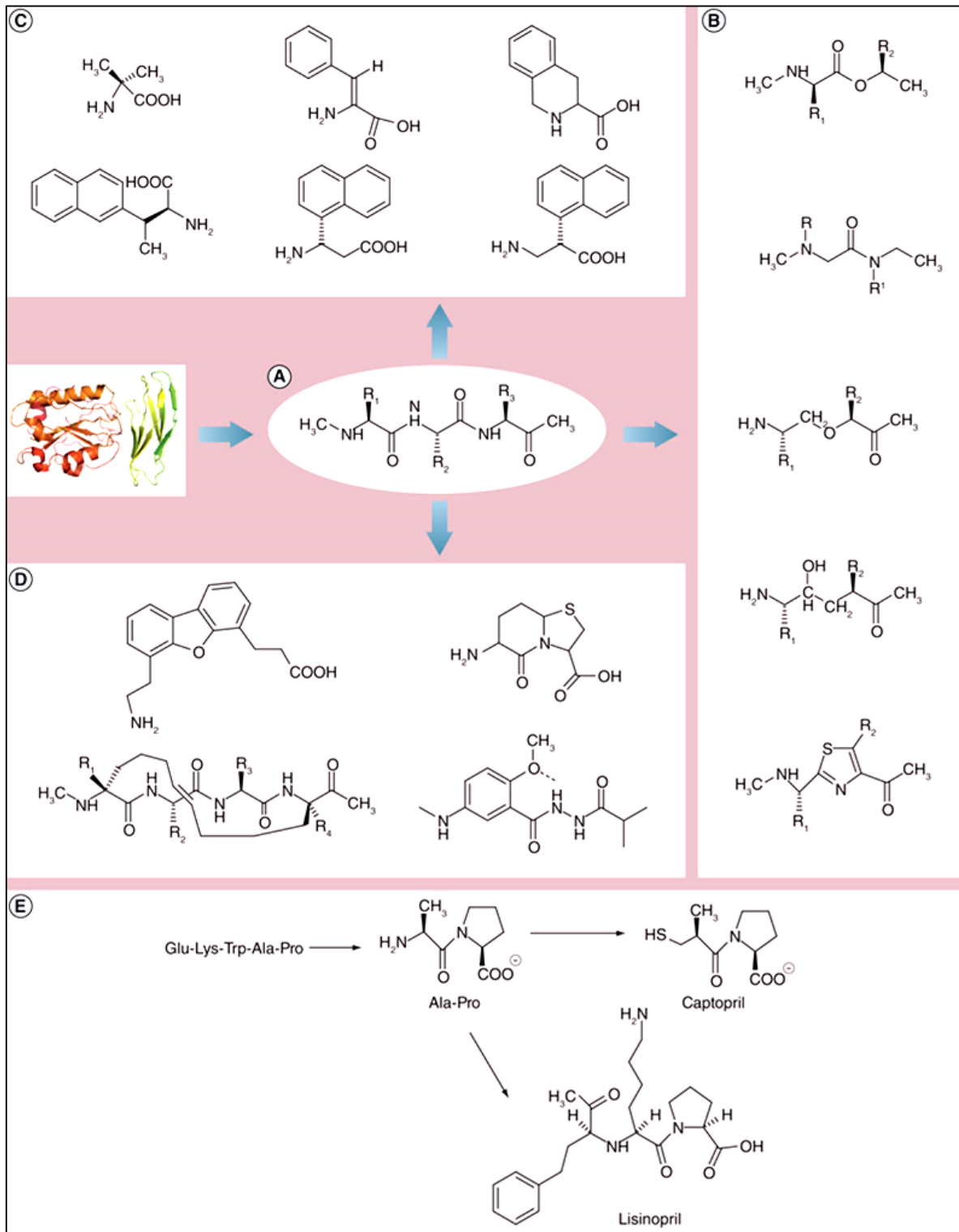
peptidomimetika kao modela velike molekule nativnog proteina. Informacije dobivene proučavanjem odnosa aktivnosti i konformacijskih svojstava peptidnih struktura doprinose dizajnu peptidnih mimetika [16]. U cilju dobivanja visokoselektivnih i metabolički stabilnih analoga bioaktivnih peptidnih sekvenci, modificiraju se peptidne okosnice i aminokiseline te se uvode cikličke strukture.

Izazov u razvoju terapeutika je pronaći malu molekulu koja je u mogućnosti izazvati biološki odgovor. Sintetska kemija kao i detaljan pregled („screening“) prirodnih produkata jedan je od načina dobivanja potencijalno funkcionalnih molekula, no screening zahtijeva izolaciju i karakterizaciju spojeva iz prirodnih ekstrakata što može biti dugotrajan i skup postupak [17,18]. Posljednjih su godina metode molekularne biologije ubrzale procese otkrivanja potencijalnih lijekova te se kombinacijom molekularne biologije i medicinske kemije otvara bioracionalni pristup u dizajnu i sintezi novih lijekova. Iskorištavanjem heterogenosti na molekulskom nivou sintetiziraju se mnogobrojni spojevi tvoreći knjižnice kombinatornih spojeva te tako konstruirani spojevi prolaze klinička ispitivanja. Kombinatorna kemija integralna je komponenta farmaceutskih istraživanja.

Problem istraživanja povezanosti strukture i aktivnosti linearnih peptida predstavlja značajna fleksibilnost peptidne okosnice i aminokiselinskih ogranaka. Ograničenje fleksibilnosti peptida rezultira nižom entropijom vezanja na receptor i višim afinitetom uz pretpostavku pravilnog položaja farmakoforne funkcijske skupine [19]. Dizajniranje bioaktivnih spojeva na bazi konformacijski „zaključanih“ peptidnih analoga ključnih za molekulsko prepoznavanje predstavlja učinkovit pristup razvoju mimetičkih lijekova (slika 6). Strukturna ograničenja u peptidu koja ih zaključavaju u određenu rigidnu konformaciju mogu biti aminokiseline koje doprinose stvaranju sekundarnih struktura uzvojnice. Primjer su sintetski razgranati peptidi koji se koriste kao nosači u izradi sintetskih cjepiva, a oponašaju fizikalno-kemijska svojstva amfipatskih uzvojnica u interakciji s fosfolipidima.

Konstrukcija „zaključanih“ konformacija cikličkih analoga željenih supstrata povećava afinitet vezanja na receptor i rezultira povećanom otpornošću prema proteolitičkoj razgradnji. Najperspektivniji novi pristup predstavlja ciklizacija peptidne okosnice i modifikacija aromatskim aminokiselinama. Takve modifikacije bitno smanjuju podložnost peptida peptidazama i povećavaju permeabilnost kroz biološke membrane. Položaj uvedenog aromatskog ogranka u peptidu različito djeluje na permeabilnost. U cilju poboljšanja prolaska molekule lijeka kroz krvno-moždanu barijeru sintetizirano je nekoliko prolijekova povećane lipofilnosti. Prolijekovi koji na karboksi-terminalnim ograncima sadrže fenilalanin imaju znatno duže vrijeme metaboličke konverzije nego prolijekovi s amino-terminalnim ostatkom

iste aminokiseline. Takvo opažanje sugerira da svaka pojedinačna modifikacija izaziva različite učinke.



Slika 6. Dizajniranje peptidomimetika. (A) epitop proteina s biološkom funkcijom, (B) modifikacija glavnog lanca, (C) modifikacija bočnih ograna, (D) mimetici sekundarnih struktura, (E) primjeri terapijski korisnih peptidomimetika [20].

Jedan od nedostataka peptida kao lijekova je loša biodostupnost, što se može nadomjestiti primjenom retropeptida. Retropeptidi su otporniji na djelovanje peptidaza i imaju mogućnost oponašanja prirodnih L-peptida te se zbog povećane stabilnosti razmatraju kao kandidati za sintetska cjepiva. Retropeptidi mogu dovesti do višeg titra serumskih antitijela koja se pojavljuju ranije nakon imunizacije i zadržavaju se duže u odnosu na klasična cjepiva. Pseudopeptidi koji sadrže reducirane peptidne veze vežu brojne kompleksne molekule te imaju potencijal u razvoju T-limfocitnih cjepiva ili za ciljanje autoreaktivnih T-stanica povezanih s autoimunim bolestima. Retropeptidi također mogu poslužiti kao mete antitijela nastalih u organizmu pacijenata oboljelih od reumatskih autoimunih bolesti. Također mogu dovesti do važnog napretka u razvoju imunodijagnostičkih testova, osobito u slučajevima bolesti karakteriziranih upalnim reakcijama [21].

2.5.1. Imunomodulacija

T-stanice imuno-sustava prepoznaju antigene i strane materijale i uklanjaju ih iz tijela, pri čemu imaju mogućnost razlikovanja antigena od vlastitih stanica [22]. Aktivacija T-stanica u efektorske T-stanice uključuje nekoliko proteina i njihovih interakcija i sastoji se od dva signala. Nakon aktivacije, T-stanice mogu generirati imunološki odgovor [20].

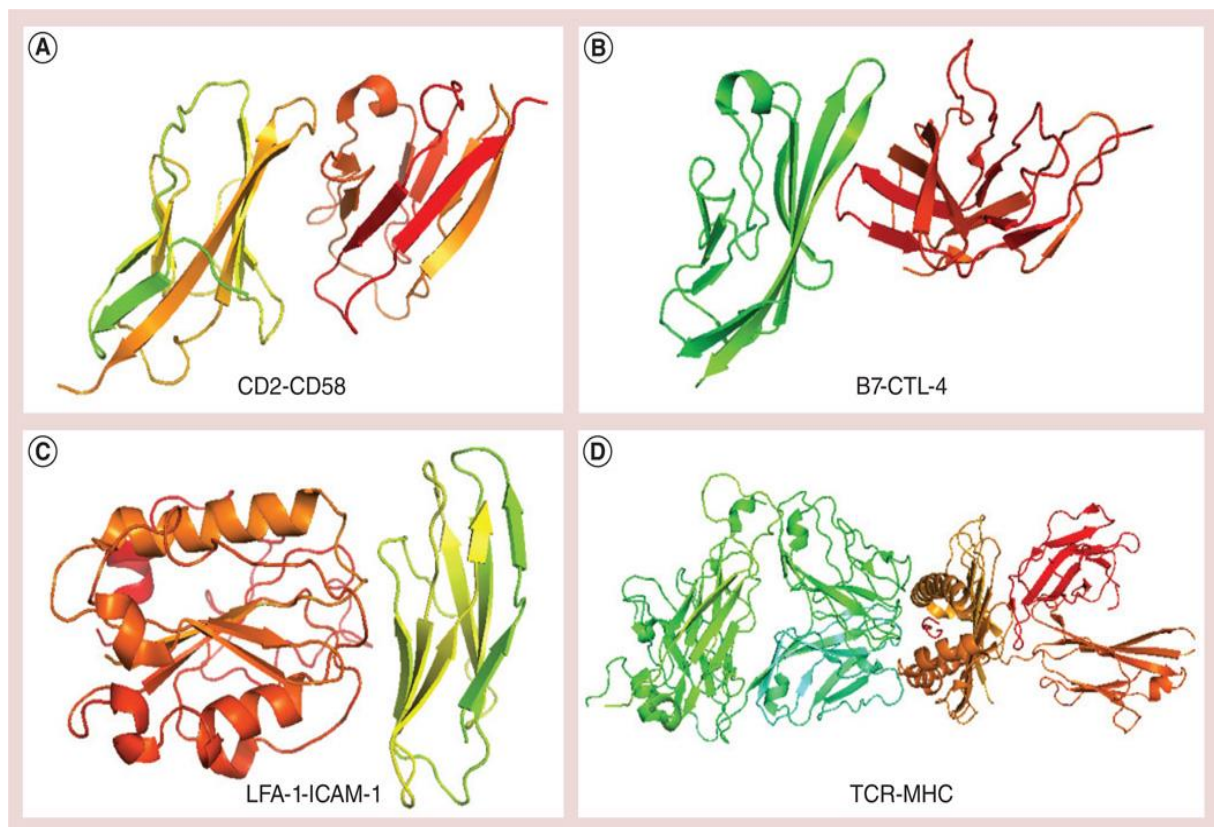
Jedna od mogućih negativnih posljedica imuno-sustava u zdravih ljudi je imunološki odgovor prema transplantiranom organu i posljedično odbacivanje organa. Nadalje, tolerancija i prepoznavanje vlastitih stanica može biti deregulirano, što vodi prema autoimunim bolestima. Autoimune bolesti javljaju se zbog nedostatka imunotolerancije čiji je rezultat nemogućnost razlikovanja vlastitih stanica od stranih stanica i antigena. Autoimune bolesti mogu zahvatiti samo jedan organ ili nekoliko organa (sistemske bolesti). Ukoliko je imunološki odgovor pojačan prema bezazlenim antigenima, pojavljuju se alergije i hipersenzitivnost.

U svim navedenim slučajevima neophodna je imunomodulacija za kontroliranje posljedica dereguliranog imuno-sustava. Imunomodulatori mogu biti male organske molekule, antitijela, peptidi i peptidomimetici [20], a ovisno o učinku dijele se u nekoliko kategorija:

- imunomodulatori koji suzbijaju ili blokiraju imunski odgovor (autoimune bolesti, alergije [23], transplantacija)
- imunomodulatori kao simulatori imuno-sustava (virusne infekcije, karcinom)

- imunomodulatori koji uklanjaju pojedine tipove stanica imuno-sustava specifičnim antigenima (autoimune bolesti, karcinom).

Protein-protein interakcije nužne su za prijenos informacija među stanicama. Jačina imunološkog odgovora ovisi o jačini i trajanju protein-protein interakcija u kojima sudjeluju aminokiselinski ogranci na površini proteina (slika 7). Budući da u navedenim interakcijama sudjeluju proteinski epitopi kao specifični dijelovi proteina ključni za molekulsko prepoznavanje i povezivanje, za modulaciju takvih interakcija mogu se koristiti i njihovi mimetici. Oni oponašaju površinu određenih proteina, interferiraju u protein-protein interakcijama i u konačnici moduliraju imunološki odgovor. Tradicionalno se za moduliranje tih interakcija koriste antitijela, no proteinski lijekovi imaju prednost jer za razliku od antitijela ne postoji mogućnost za izazivanje imunološkog odgovora [24,25].



Slika 7. Kristalne strukture proteinskih kompleksa uključenih u adheziju i kostimulaciju tijekom imunološkog odgovora [20].

2.5.2. Peptidi i peptidomimetici kao imunomodulatori u terapiji autoimunih bolesti

Većina bolesti u ljudi posljedica je prekomjerne ili nedovoljne ekspresije proteina te protein-protein interakcija. Peptidi i peptidomimetici korišteni u terapiji djeluju na proteine koji pokazuju prekomjernu ekspresiju i moduliraju imunološki odgovor. Nekoliko kosimulatornih molekula koje sudjeluju u upalnim procesima i odgovoru T-stanica koriste se za ciljanu terapiju autoimunih bolesti [20,26].

Reumatoidni artritis je kronična, sistemska upalna autoimuna bolest koja rezultira uništavanjem hrskavice i kostiju. Zahvaćeni mogu biti i drugi organi (pluća, srce i krvne žile). Trenutno dostupne terapije uključuju NSAIDS (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), glukokortikoide i modificirajuće antireumatioidne lijekove.

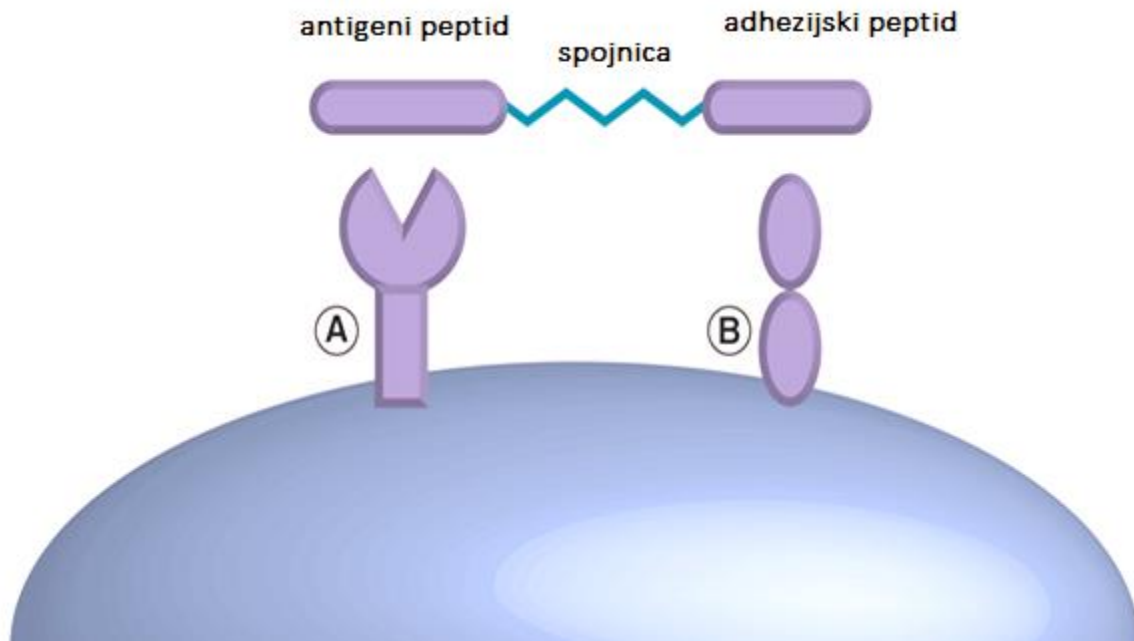
Sistemski eritemski lupus je kronična autoimuna bolest karakterizirana prisutnošću patogenih autoantitijela usmjerenih protiv dvostruke uzvojnice DNA. Brojnost antitijela određuje razvoj simptoma. Najčešće je pogođeno vezivno tkivo pa uslijed bolesti može nastati artritis. Lupus može započeti vrućicom praćenom kožnim osipima te se ponekad razvija upala i nakuplja tekućina u ovojnicama koje okružuju pluća.

Multipla skleroza je upalna autoimuna demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava. Autoreaktivne stanice (T- i B-limfociti) usmjerene na mijelinske peptide uzrokuju razaranje mijelina unutar središnjeg živčanog sustava [27]. Aktivirane CD4+ T-stanice uzrokuju inflamaciju i odgovorne su za direktno i indirektno uništavanje mijelina [33,34]. Multipla skleroza regulirana je mijelinskim epitop-specifičnim IgE koji, povezan s mijelinom, izaziva degranulaciju mastocita, što vodi prema razvoju bolesti [28]. IgE, zajedno sa jedinstvenim mijelinskim epitopima na proteolipidnom proteinu (PLP), mijelin-oligodendrocit-glikoproteinu (MOG) i mijelin-bazičnom proteinu (MBP), uzrokuje mjesno-specifičnu degradaciju mastocita [20,29].

Nedavna istraživanja u ovome području pokazuju da proteaze oslobođene iz mastocita degranulacijom oštećuju mijelin i u konačnici akson. Jedinstveni strukturni epitop na mijelinskoj površini je peptidna sekvenca. Na temelju tih spoznaja, dizajniran je mimetik peptidnog epitopa koji uzrokuje supresiju degranulacije [20].

Korištenje multifunkcionalnih molekula novi je smjer razvoja peptidnih lijekova. Bifunkcionalni peptidomimetici (slika 8) sadrže dva funkcionalna epitopa povezana spojnicom. Dva epitopa vežu se na vezna mjesta dvaju različitih proteina ili na dva vezna

mjesta istog proteina izazivajući imunološki odgovor. Multivalentni dizajn baziran je na činjenici da su protein-protein interakcije imunološkog odgovora multivalentne u prirodi [30-32]. Djelovanje na više veznih mjesta istovremeno poboljšava efikasnost dizajniranog inhibitora. Novi bifunkcionalni peptidni inhibitori (BPI) djeluju na stanice antigena i selektivno inhibiraju imunološki odgovor za specifični antigen [20,33-35].



Slika 8. Koncept bifunkcionalnih peptida: sekvenca (A) može biti antigena, a sekvenca (B) je specifična za površinu receptorskog proteina koji sudjeluje u imunomodulaciji [20].

HIV (virus humane imunodeficijencije) uzrokuje AIDS, a napada imunološki sustav koji je čovjekova obrana protiv bolesti. Virus uništava bijele krvne stanice (T-helper stanice). Korištenje peptidomimetika u terapiji HIV-infekcija započelo je otkrićem inhibitora HIV-proteaze, simetričnog peptida koji je kasnije preveden u peptidomimetik [20]. Najčešće mete lijekova namijenjenih liječenju HIV-infekcija su reverzna transkriptaza, integraza, površinski proteini gp41 i koreceptori. Višestruko rezistentni viralni sojevi ubrzano razvijaju rezistenciju prema trenutno dostupnim lijekovima te je nužan razvoj i istraživanje novih djelotvornih molekula na tom području.

Preintegracijski proteini zauzimaju bitnu ulogu tijekom transfera viralne DNA iz citoplazme u staničnu jezgru te se inhibicijom preintegracijskih kompleksa otvara put zaustavljanju virusne replikacije. Tijekom preintegracije, C-terminalna domena integraze u interakciji je s Vpr proteinom [36], koji je dio HIV-1 preintegracijskog kompleksa. Na primjeru Vpr fragmenta, dizajniran je okta-arginin konjugat. Bočni argininski ogranci ugrađeni su u peptid u svrhu

lakšeg prolaska molekule kroz staničnu membranu. Dizajnirana molekula je peptidomimetik sa anti-HIV aktivnošću, smanjene citotoksičnosti te je otporna prema enzimskoj degradaciji. Ovakvi peptidomimetici uspješni su u moduliranju imunološkog odgovora uzrokovanog aktivnošću integraze [20].

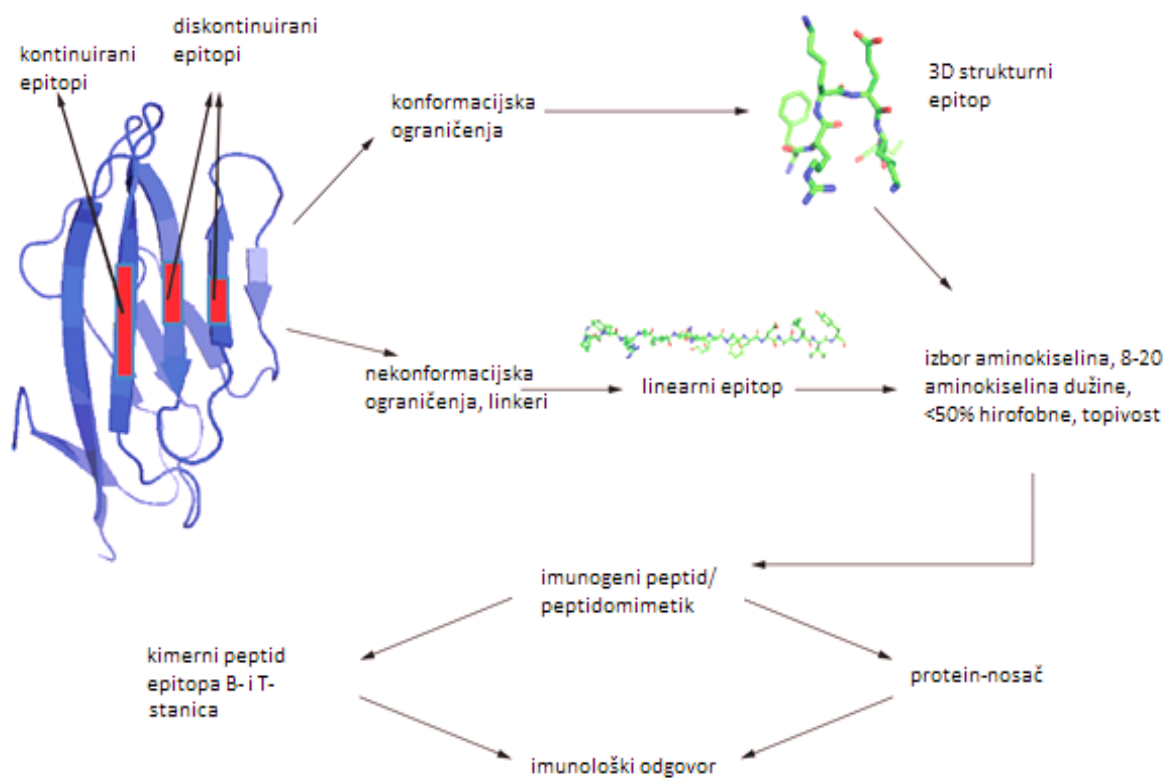
2.5.3. Peptidomimetici u terapiji karcinoma

Programirana smrt stanice (apoptoza) je mehanizam kojim se stanica bori protiv tumora, no taj mehanizam je prigušen kod tumorskog rasta. Stanice raka izbjegavaju imunološki tumorski odgovor blokadom specifičnih T-limfocita interakcijom pojedinih liganda na površini stanica raka i receptora na površini T-limfocita.

Imunoterapija ima prednost pred zračenjem i kemoterapijom jer djeluje specifično na tumorske stanice bez oštećenja zdravog tkiva. Mnogi antitumorski lijekovi su visokotoksični ili rezultiraju povratom bolesti i metastazama. Cilj imunomodulacije u imunoterapiji karcinoma jest omogućiti stanicama imunostava da prepoznaju tumorske stanice i potom ih ciljano unište [37]. Antigen-specifičnom imunoterapijom mogao bi se postići navedeni cilj. Pristup zahtijeva uvođenje stanično-posredovanog imuniteta koji ima mogućnost prepoznavanja i eliminacije stanica koje na sebe imaju vezan antigen. Korištenje terapijskih cjepiva pokazalo se kao uspješna terapija, no korištenje peptida i peptidomimetika u imunoterapiji karcinoma nova je metoda. Imunizacija peptidnim antigenima koji sadrže epitope B- i T-stanica može stimulirati pacijentov imunološki sustav u smjeru nastajanja visoko specifičnih antitijela. Nakon što se u tijelu nalaze antitijela koji prepoznaju antigen karcinoma, terapija se nastavlja bez ponovnog unošenja peptidnog lijeka. Navedeni peptidi dizajnirani su prema epitopima antigena i antitijela [38-41]. Prednost ovakvih terapija je netoksičnost peptidnog lijeka i nemogućnost razvoja rezistencije.

Razvoj lijekova u ovome području vezan je uz HER2-pozitivne i VEGF karcinome. Dizajn epitopa (slika 9) zahtjeva poznate informacije o imunogenosti, hidrofilnosti i sekundarnoj strukturi. Generiranju imunosti pridonose α -uzvojnice, β -nabrane ploče i strukture petlje te se za predviđanje strukture epitopa koriste računalni algoritmi [20].

Dizajniranje antigenog peptida visoko specifičnog prema kancerogenim tumorima moguće je mutacijskim analizama tumora [42,43]. Peptidi kodirani mutiranim genima u stanicama karcinoma mogu biti korišteni kao epitopi T-stanica (m-peptidi) i mogu biti korišteni kao peptidna cjepiva. Navedeni pristupi i tehnologije pridonose dizajniranju personaliziranih lijekova za pacijente koji ne mogu biti liječeni postojećim terapijama [20].



Slika 9. Dizajniranje imunogenog peptida [20].

3. ZAKLJUČAK

- Korištenjem peptidomimetika prevladavaju se nepovoljna svojstva proteina te se oni mogu koristiti kao terapeutici.
- Peptidomimetici ostvaruju poboljšani učinak u odnosu na native peptide.
- Korištenjem proteina i peptidomimetika kao terapeutika sprečavaju se mnoge nuspojave uobičajene za druge vrste lijekova.
- Imunomodulacija peptidima i peptidomimeticima je područje od velikog značaja zbog limitacija tradicionalnih terapija.
- Peptidna molekula koja služi kao imunomodulator blokira, inducira ili modulira imunološki odgovor.
- U terapiji karcinoma tradicionalnim lijekovima razvija se rezistencija, no terapijom peptidnim lijekovima koji sadrže tumorske antigene sistemski se uništava tumor te se sprečava ponovni nastanak.
- Zbog mogućnosti široke primjene i povoljnih svojstava, molekule peptidomimetika u skoroj budućnosti dominirat će farmaceutskom industrijom.

4. POPIS LITERATURE

- [1] Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J. (2013) Biokemija, 6. izd., Školska knjiga, Zagreb.
- [2] Anonymus (2012) Protein chemistry,
<<http://www.slideshare.net/hassansayedramadan/lecture-2-3-protein-chemistry>>. Pristupljeno 18. lipnja 2016.
- [3] Barišić, L. (2015) Lidija Barišić, izv. prof. dr. sc. – Home Page,
<http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organsku_ke_miju/peptidni_mimetici_i_pseudopeptidi>. Pristupljeno 21. travnja 2016.
- [4] Zorc, B. (2008) Peptidomimetici. *Farmaceutski glasnik* **64**, 113-121.
- [5] Jerić, I. (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kem. Ind.* **53**, 495-504.
- [6] Giannis, A., Kolter, T. (1993) Peptidomimetics for Receptor Ligands-Discovery, Development and Medical Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1244-1267.
- [7] Gante, J. (1994) Peptidomimetics-Tailored Enzyme Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **33**, 1699-1720.
- [8] Kahn, M. (1993) Peptide Secondary Structure Mimetics: Recent Advances and Future Challenges. *Synlett.* **11**, 821-826.
- [9] Olsen, G.L., Bolin, D.R., Bonner, M.P., Bös, M., Cook, C.M., Fry, D.C., Graves, B.J., Hatada, M., Hill, D.E., Kahn, M. (1993) Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics. *J. Med. Chem.* **136**, 3039-3049.
- [10] Wang, W., Jiang, J., Ballard, C.E., Wang, B. (1999) Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drugs. *Curr. Pharm. Design* **5**, 265-287.

- [11] Adermann, K., John, K., Ständker, L., Forssmann, W.G. (2004) Exploring natural peptide diversity: novel research tools and drug leads. *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 599-606.
- [12] Kessler, H. (1993) Peptoids- A New Approach to the Development of Pharmaceuticals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 543-544.
- [13] Liskamp, R.M.J. (1994) A new application of modified peptides and peptidomimetics: potential anticancer agents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 305-307.
- [14] Miller, S.M., Simon, R.J., Ng, S., Zuckermann, R.N., Kerr, J.M., Moss, W.H. (1995) Comparison of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-amino acid and N-substituted glycine peptide and peptoid oligomers. *Drug Devel. Res.* **35**, 20-32.
- [15] Lambert, J.N., Mitchell, J.P., Roberts, K.D. (2001) The synthesis of cyclic peptides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **5**, 470-568.
- [16] Horwell, D.C. (1995) The peptoid approach to the design of nonpeptide small molecule agonists and antagonists of neuropeptides. *Trends Biotechnol.* **13**, 132-134.
- [17] Bevan, P., Ryder, H., Shaw, I. (1995) Identifying small-molecule lead compounds: the screening approach to drug discovery. *Trends Biotechnol.* **13**, 115-121.
- [18] Kleinberg, M.L., Wanke, L.A. (1995) New approaches and technologies in drug design and discovery. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* **52**, 1323-1336.
- [19] Zhang, W.J., Nikiforovich, G.V., Perodin, J., Richard, D.E., Escher, E., Marshall, G.R. (1996) Novel cyclic analogs of angiotensin II with cyclization between positions 5 and 7: conformational and biological implications. *J Med Chem.* **39**, 2738-2744.
- [20] Gokhale, A.S., Satyanarayanajois, S. (2004) Peptides and peptidomimetics as immunomodulators. *Immunotherapy* **6**, 755-774.

- [21] Kieber-Emmons, T., Murali, R., Greene, M. (1997) Therapeutic peptides and peptidomimetics. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 435-441.
- [22] Springer, T.A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434.
- [23] Larche, M., Wraith, D.C. (2005) Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat. Med.* **11**, 69-76.
- [24] Hansel, T.T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J.A., George, A.J. (2010) The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 325-338.
- [25] Sathish, J.G., Sethu, S., Bielsky, M.C., Haan, L., French, N.S., Govindappa, K., Green, J., Griffiths, C.E., Holgate, S., Jones, D., Kimber, I., Moggs, J., Naisbitt, D.J., Primohamed, M., Reichmann, G., Sims, J., Subramanyam, M., Todd, M.D., Van Der Laan, J.W., Weaver, R.J., Park, B.K. (2013) Challenges and approaches for the development of safer immunomodulatory biologics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 306-324.
- [26] Jois, S.D., Jining, L., Nagarajarao, L.M. (2006) Targeting T-cell adhesion molecules for drug design. *Curr. Pharm. Design.* **12**, 2797-2812.
- [27] Mcfarland, H.F., Martin, R. (2007) Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* **8**, 913-919.
- [28] Calenoff, E. (2012) Interplaying factors that effect multiple sclerosis causation and sustenance. *ISRN Neurol.* **2012**, 1-27.
- [29] Tsai, M., Grimbaldston, M., Galli, S.J. (2011) Mast cells and immunoregulation/immunomodulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **716**, 186-211.
- [30] Xu, L., Vagner, J., Josan, J. (2009) Enhanced targeting with heterobivalent ligands. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2356-2365.

- [31] Xu, L., Josan, J.S., Vagner, J. (2012) Heterobivalent ligands target cell-surface receptor combinations *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 21295-21300.
- [32] Kiessling, L.L., Gestwicki, J.E., Strong, L.E. (2006) Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew. Chem.* **45**, 2348-2368.
- [33] Badawi, A.H., Kiptoo, P., Wang, W.T. (2012) Suppression of EAE and prevention of blood-brain barrier breakdown after vaccination with novel bifunctional peptide inhibitor. *Neuropharmacology* **4**, 1874-1881.
- [34] Buyuktimkin, B., Wang, Q., Kiptoo, P., Stewart, J.M., Berkland, C., Siahaan, T.J. (2012) Vaccine-like controlled-release delivery of an immunomodulating peptide to treat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol. Pharm.* **9**, 979-985.
- [35] Badawi, A.H., Siahaan, T.J. (2013) Suppression of MOG- and PLP-induced experimental autoimmune encephalomyelitis using a novel multivalent bifunctional peptide inhibitor. *J. Neuroimmunol.* **1**, 20-27.
- [36] Gleenberg, I.O., Herschhorn, A., Hizi, A. (2007) Inhibition of the activities of reverse transcriptase and integrase of human immunodeficiency virus type-1 by peptides derived from the homologous viral protein R (Vpr). *J. Mol. Biol.* **5**, 1230-1243.
- [37] Flower, D.R. (2013) Designing immunogenic peptides. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 749-753.
- [38] Bedke, J., Stenzl, A. (2013) *IMA901*: a peptide vaccine in renal cell carcinoma. *Expert Opin. Invest. Drugs.* **22**, 1329-1336.
- [39] Arens, R., Van Hall, T., Van Der Burg, S.H., Ossendorp, F., Melief, C.J. (2013) Prospects of combinatorial synthetic peptide vaccine-based immunotherapy against cancer. *Semin. Immunol.* **25**, 182-190.

[40] Perez, S.A., Von Hofe, E., Kallinteris, N.L. (2010) A new era in anticancer peptide vaccines. *Cancer* **116**, 2071-2080.

[41] Kaumaya, P.T., Foy, K.C. (2012) Peptide vaccines and targeting HER and VEGF proteins may offer a potentially new paradigm in cancer immunotherapy. *Future Oncol.* **8**, 961-987.

[42] Vence, L.M., Wang, C., Pappu, H. (2013) Chemical castration of melanoma patients does not increase the frequency of tumor-specific CD4 and CD8 T-cells after peptide vaccination. *J. Immunother.* **36**, 276-286.

[43] Overwijk, W.W., Wang, E., Marincola, F.M., Rammensee, H.G., Restifo, N.P. (2013) Mining the mutanome: developing highly personalized immunotherapies based on mutational analysis of tumors. *J. Immunother. Cancer* **1**, 1-4.