

STRESZCZENIE

Już od najdawniejszych czasów medycyna skupiała się na poszukiwaniu jak najbardziej dopasowanych i skutecznych metod leczenia. Obecnie bardzo dynamiczny rozwój diagnostyki medycznej oraz technik projektowania nowych leków pozwala na tworzenie terapii dla wielu chorób na poziomie molekularnym. Wśród leków, które co roku pojawiają się na rynku medycznym, na szczególną uwagę zasługują te, których działanie oparte jest na hamowaniu aktywności enzymów proteolitycznych. Inhibitory proteaz stanowią zróżnicowaną grupę cząsteczek biologicznie aktywnych, dla których udokumentowano także działanie przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciw pasożytnicze czy przeciwnowotworowe. Sukcesy stosowania inhibitorów enzymów proteolitycznych w leczeniu takich chorób jak zakażenie HIV, wirusem zapalenia wątroby typu C czy grypy, z całą pewnością zachęcają naukowców do poszukiwania nowych inhibitorów, które mogłyby być stosowane w nowoczesnych terapiach. Niniejsza praca stanowi przegląd wybranych informacji dotyczących inhibitorów enzymów, zwłaszcza inhibitorów proteaz, które są zarejestrowanymi lekami wprowadzonymi na rynek medyczny oraz nowych związków chemicznych o obiecującym potencjale leczniczym.

WPROWADZENIE

Początki medycyny pod obecnie znaną postacią mają swoje korzenie na terenach starożytnego Wschodu, Grecji oraz Rzymu. Ówczesni lekarze swoją aktywność medyczną bardzo często łączyli z obrzędami sakralnymi. Już wówczas, pomimo mocno ograniczonych możliwości badawczych, medykom przyświecał jeden cel - na podstawie szczegółowych obserwacji i doświadczeń wyciągali oni wnioski odnośnie prawidłowej diagnozy oraz opracowania metody terapii jak najlepszej dla pacjenta. Współczesna medycyna nadal czerpie z wielu idei zaszczerpionych przez Hipokratesa, jednak dzięki coraz dokładniejszym metodom diagnostycznym oraz bardzo szybko rozwijającym się badaniom nad syntezą nowych leków, możemy w bardzo specyficzny sposób podejść do leczenia wielu chorób. Poznanie mechanizmu działania leków na poziomie molekularnym daje szansę na uniknięcie wielu działań ubocznych oraz pozwala na rozwój terapii spersonalizowanych.

Jednym ze sposobów leczenia na poziomie molekularnym jest zastosowanie inhibitorów enzymów. Zahamowanie aktywności enzymatycznej ściśle sprecyzowanych biokatalizatorów, poprzez zastosowanie ich odwracalnych lub nieodwracalnych inhibitorów, w prosty sposób pozwala między innymi na zmniejszenie żywotności patogennych mikroorganizmów, ograniczenie do minimum namnażania wirionów lub zahamowanie powstawania szkodliwych metabolitów w naszym organizmie. Dotychczas bardzo często jako inhibitory enzymów stosowano nanocząsteczki metali, które charakteryzują się przede wszystkim wysoką skutecznością jako czynniki przeciwbakteryjne [1]. Jednak na uwagę zasługuje również inna grupa związków biologicznie aktywnych, jakimi są inhibitory enzymów proteolitycznych. Ich funkcjonowanie w komórkach organizmów żywych skorelowane jest z proteazami, które stanowią dużą i zróżnicowaną grupę białek [2-4]. Enzymy te są zaangażowane między innymi w procesy krzepnięcia krwi, zaplanowanej śmierci komórki, osmoregulacji, przemodelowania tkanek oraz szeroko pojętej odporności [5]. W związku z pełnieniem przez proteazy tak wielu ważnych funkcji należy mieć na uwadze, że mogą one również stać się poważnym zagrożeniem dla ogólnoustrojowej homeostazy, jeżeli nie będą podlegały ściśle kontrolowanej regulacji. W uniknięciu negatywnych skutków niekontrolowanej proteolizy pomagają takie procesy jak kontrola ekspresji, sekrecji i aktywacji proenzymów, ale także mechanizmy naturalnego hamowania aktywności proteaz. Utrzymanie równowagi pomiędzy prawidłową aktywnością proteaz a skierowanymi przeciwko nim inhibitorami niejednokrotnie decyduje o zachowaniu prawidłowego funkcjonowania komórki, tkanki, a także całego organizmu [6]. Dodatkowo, potwierdzone wieloma

Katarzyna Szalapatka✉

Monika Osińska-Jaroszuk

Anna Jarosz-Wilkołazka

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

✉ Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel.: (81) 537 50 51, e-mail: katarzyna.szalapatka@poczta.umcs.lublin.pl

Artykuł otrzymano 30 października 2017 r.
Artykuł zaakceptowano 16 listopada 2017 r.

Słowa kluczowe: inhibitory enzymów proteolitycznych, proteazy, inhibitory specyficzne, projektowanie nowych leków

Wykaz skrótów: FDA (ang. *Food and Drug Administration*) – Agencja Żywności i Leków; HCV (ang. *Hepatitis C Virus*) – wirus zapalenia wątroby typu C; HIV (ang. *Human Immunodeficiency Virus*) – ludzki wirus niedoboru odporności; SAP (ang. *Secreted Aspartyl Proteinases*) – proteiny aspartylowe wydzielane przez *Candida albicans*; SARS (ang. *Severe Acute Respiratory Syndrome*) – zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej; WHO (ang. *World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia

Podziękowania: Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego Preludium (2014/15/N/NZ7/04092) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

badaniami działanie przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne czy przeciwnowotworowe wielu naturalnych i syntetycznych inhibitorów enzymów proteolitycznych przyczyniło się do tego, że na stałe cząsteczki te zostały wprowadzone do wielu terapii jako zarejestrowane leki. W grupie inhibitorów proteaz wciąż prowadzone są badania nad wyselekcjonowaniem nowych substancji, które mogłyby się stać potencjalnymi terapeutykami (Tab. 1). W niniejszym artykule opisano aktywność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą i przeciw pasożytniczą inhibitorów enzymów ze szczególnym uwzględnieniem związków, które są stosowanymi lekami.

DZIAŁANIE PRZECIWWIRUSOWE

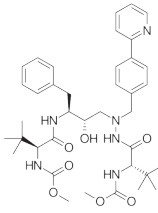
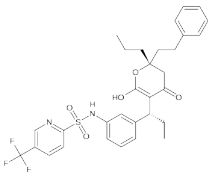
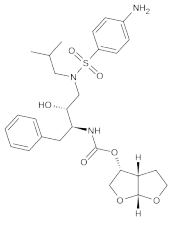
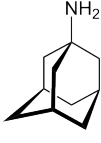
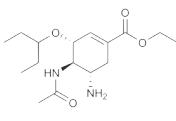
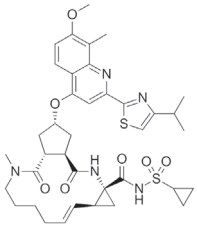
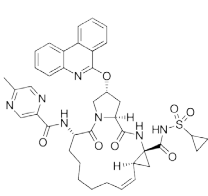
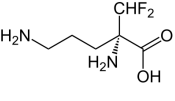
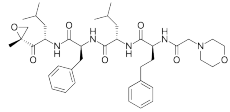
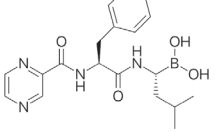
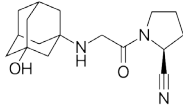
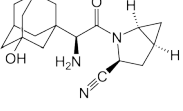
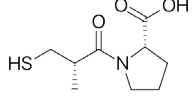
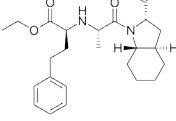
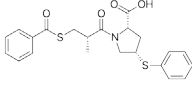
Replikacja wirionów obejmuje stały kilkietapowy cykl. Jednym z jego kluczowych elementów jest proteolityczna obróbka nowo zsyntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych, podczas której powstają białka strukturalne i niestrukturalne. Ponieważ reakcja ta towarzyszy cyklowi replikacji każdego wirusa, sprawia to, że proteazy stają się poważnym celem do projektowania leków przeciwwirusowych. Największa uwaga skupiona jest oczywiście na poszukiwaniu leków dla chorób przewlekłych (wywołanych między innymi przez HIV, ang. *Human Immunodeficiency Virus* czy herpeswirusy) oraz tych, które mogą powodować występowanie epidemii na dużą skalę (SARS, ang. *Severe Acute Respiratory Syndrome*, wirus denga) [7].

Proteaza HIV-1 należy do rodziny proteaz aspartylowych (posiada kwas asparaginowy w pozycji 25. w miejscu aktywnym) i jest symetrycznym homodimerem, który składa się z dwóch identycznych podjednostek zawierających

99 reszt aminokwasowych. Centrum enzymu tworzy szczytowa wiązająca substrat, która reaguje z różnymi miejscami cięcia białek Gag i GagPol [8,9]. W leczeniu zakażenia HIV-1 stosowanych jest kilka inhibitorów tego enzymu. Są one niskocząsteczkowymi peptydomimetycznymi inhibitorami, których budowa została opracowana na podstawie podobieństwa strukturalnego do naturalnych substratów dla tego enzymu. Najczęściej inhibitory te stosowane są w terapii łączonej z inhibitorami odwrotnej transkryptazy. Pierwszym inhibitorem proteazy HIV, który w roku 1995 został zaakceptowany w Stanach Zjednoczonych przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) w ramach przyspieszonych przepisów zatwierdzających stosowanie, był Saquinawir. Według badań prowadzonych na komórkach u osób przewlekle zakażonych HIV, stężeniem wymaganym do zahamowania 50% replikacji wirusa było stężenie od 20 do 500 nM tej substancji. Rok później na rynek amerykański wprowadzono drugą nową leki, Ritonawir i Indinawir. W przypadku tego drugiego związku w badaniach *in vitro* wykazano, że dla zahamowania 95% replikacji wirusa wystarczyło stężenie już od 25 do 100 nM Indinawiru. W związku z tak pozytywnymi wynikami badań Indinawir stał się jednym z najpopularniejszych inhibitorów proteaz stosowanych w leczeniu zakażenia HIV. Jednak sukces w stosowaniu tego leku nie był długotrwały. Wprowadzenie terapii z użyciem Indinawiru wiązało się z narażeniem pacjentów na krystalizację inhibitora w nerkach, co doprowadzało do kamicy. Częstymi ubocznymi objawami po zażyciu leku były również bóle głowy, zmęczenie oraz różnego rodzaju objawy gastryczne [8,10]. Te niekorzystne dla pacjentów powikłania związane ze stosowaniem leku spowodowały, że zaprojektowano drugą generację inhibitorów, wśród których

Tabela 1. Przykłady nowych inhibitorów enzymów, które mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w medycynie.

Inhibitor	Enzym	Czynnik patogeny/choroba	Dane źródłowe
Aprotynina i jej pochodne	Proteazy IPA	Wirus grypy	[13]
Pochodne α -aminofosfonianów	Proteaza NS3/4A	HCV	[15]
Inhibitor ATBI z <i>Bacillus</i> sp.	Proteaza HIV-1	HIV	[38]
Inhibitor K11777	Katepsyna B i L	Koronawirusy, flawowirusy	[39]
Lentin	Odwrotna transkryptaza HIV-1	HIV	[40]
Trichogin	Odwrotna transkryptaza HIV-1	HIV	[41]
α -1-antytrypsyna	Elastaza neutrofilowa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[23]
acetylo-Dap(dnp)-Ala-Arg↓Arg-Ala-Lys(Abz)-Gly	OmpT z <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	[42]
Pepstatyna	Proteazy SAP	<i>Candida albicans</i>	[29]
Odanacatib	Katepsyna K	Osteoporoza	[43]
Inhibitor RXP A380	Enzym konwertujący angiotensynę (ACE)	Nadciśnienie	[44]
Inhibitor RXP 407	Enzym konwertujący angiotensynę (ACE)	Nadciśnienie	[44]
Inhibitor TMC-95A	Proteasom 26S	Procesy nowotworowe	[45]
Marizomib	Proteasom 26S	Procesy nowotworowe	[46]
Beloranib	Proteasom 26S	Procesy nowotworowe	[46]
Marimastat	Metaloproteazy	Procesy nowotworowe	[47]
TIMPs – TIMP-1, TIMP-2 (<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>)	Metaloproteazy	Procesy nowotworowe (angiogeneza - migracja błony podstawnej)	[48]
Inhibitor TFPI (<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>)	Czynnik Xa	Zaburzenia krzepnięcia krwi	[49]
Vasoflux	Czynnik IXa	Zaburzenia krzepnięcia krwi	[50]
Inhibitor CTI (<i>Corn Trypsin Inhibitor</i>)	Czynnik XIIa	Zaburzenia krzepnięcia krwi	[51]

Czynnik patogenny/choroba	Struktura i nazwa leku		
HIV			
	a. Atazanavir	b. Tipranavir	c. Darunavir
	Wirus grypy		
d. Amantadyna		e. Oseltamivir	f. Zanamivir
Wirus zapalenia wątroby typu C			
	g. Simeprevir	h. Paritaprevir	i. Grazoprevir
	Leki przeciw pasożytnicze		
j. Eflornityna		k. Benznidazol	
Procesy nowotworowe (inhibitory proteasomu)			
	l. Carfilzomib		l. Bortezomib
Cukrzyca typu II			
	m. Vildagliptyna		n. Saksagliptyna
Nadciśnienie tętnicze			
	o. Kaptopryl	p. Trandolapryl	r. Zofenopryl

Rycina 1. Struktury wybranych cząsteczek inhibitorów enzymów, które są obecnie powszechnie stosowanymi lekami.

znalazły się Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir (Ryc. 1a), Tipranavir (Ryc. 1b) oraz zaakceptowany przez FDA w 2006 roku Darunavir (Ryc. 1c). Mimo iż Darunavir został zaprojektowany jako bardzo silny lek (IC_{50} od 1 do 5 nM substancji) z przeznaczeniem dla pacjentów, u których stwierdzono lekooporność, można go również z powodzeniem stosować u osób chorych, znajdujących się na wczesnych etapach leczenia ze względu na bardzo ograniczone występowanie skutków ubocznych [8].

Innym niebezpiecznym wirusem, który odpowiada za wysoką śmiertelność wśród dzieci i osób starszych, jest wirus grypy. Wśród leków, które obecnie są stosowane w leczeniu zakażenia tym wirusem, możemy wymienić pochodne amantadyny (Symmetrel, Ryc. 1d), które specyficznie blokują kanały jonowe M2 wirusa grypy A oraz Oseltamivir (Ryc. 1e) i Zanamivir (Ryc. 1f), które odpowiadają za supresję neuraminidazy wirusa grypy A i B [11,12]. Jednak już ponad 30 lat temu stwierdzono, że do prawidłowej aktywacji wirusa grypy wymagana jest specyficzna proteaza, która jest charakterystyczna dla gospodarza. Jest to tzw. proteaza IAP (ang. *Influenza Activating Protease*) i jest ona elementem koniecznym do przeprowadzenia prawidłowego cyklu replikacyjnego. Aktywność tego enzymu jest związana z proteolitycznym cięciem wirusowego białka hemaglutyniny (HA), które po zejściu tej reakcji gromadzi się w postaci homotrimeru tworzącego zewnętrzne „kolce” na powierzchni wirionu. Hemaglutynina jest syntetyzowana jako białko prekursorowe HA0 (~ 75 kD) i jest proteolitycznie rozszczepiana na dwa fragmenty - HA1 (55 kD) oraz HA2 (20 kD). Punkt cięcia proteolitycznego w cząsteczce hemaglutyniny znajduje się w miejscu nazywanym miejscem monozasadowym, które jest charakterystyczne dla wszystkich ludzkich H1-H3 podtypów wirusa oraz ptasich podtypów wirusa H1-H16 o niskiej patogenności. W związku z katalizowaniem reakcji cięcia hemaglutyniny przez trypsyno-podobne proteazy organizmu gospodarza zwiększana jest infekcyjność wirusa. Konsekwencją tego działania jest uszkodzenie nabłonka dróg oddechowych oraz następująca po nim stymulacja proteaz gospodarza do pośredniczenia w procesie zapalnym, pojawiającym się w miejscu zainfekowania. Prowadzone na przestrzeni ostatnich lat badania dowiodły, że zastosowanie aprotyniny izolowanej z wołowych płuc w istotny sposób może wpływać na ograniczenie proteolitycznej aktywacji wirusa grypy oraz zahamowanie jego rozprzestrzeniania się, a także złagodzenie patologicznych procesów zapalnych [13].

Szacuje się, że obecnie na Ziemi żyje około 130-150 milionów osób z przewlekłym zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *Hepatitis C Virus*), a co roku do tej puli dołącza około 3-4 milionów nowych potencjalnych pacjentów. Chociaż u wielu osób zakażenie to przebiega bezobjawowo, to ludzie przewlekle chorzy narażeni są na rozwój marskości wątroby, która jest bardzo poważnym problemem wśród starzejących się populacji na całym świecie. Skuteczne obecnie terapie przeciwko HCV skierowane są przeciwko kluczowej dla cyklu replikacyjnego wirusa proteazie serynowej - bifunkcjonalnemu, niestrukturalnemu białku 3 (NS3/4A). Białko to składa się z elementu funkcjonalnego (NS3) oraz kofaktora (NS4A) i odpowiada za dwie oddzielne czynności: aktywność proteazy serynowej

oraz NTPazy/RNA helikazy [9,14]. Oba te elementy powiązane są z przetwarzaniem poliprotein wirusowych, replikacją RNA i w konsekwencji tworzeniem nowych wirionów. Ponadto proteaza NS3/4A jest w stanie blokować wrodzone szlaki immunologiczne i modulować szlaki sygnalizacyjne czynników wzrostu, jednocześnie wpływając na wzrost patogenności i oporności HCV [15]. W 2011 roku FDA zaakceptowała do użytku dwa leki, które są inhibitorami proteazy NS3/4A, Telaprevir i Boceprevir i są stosowane w kombinacji z PEG-INF- α oraz rybawiryną. Substancje te są ketoamidowymi inhibitorami, tworzącymi kowalencyjne, ale odwracalne wiązania z proteazą NS3/4A [16]. Jednak niedługo później przestały być one dostępne i zastąpiono je skuteczniejszymi lekami nowej generacji - Simeprevirem (Ryc. 1g), który można stosować osobno oraz Paritaprevirem (Ryc. 1h) i Grazoprevirem (Ryc. 1i), które są stosowane w kombinacji z innymi lekami. Nowa generacja leków w przeciwieństwie do poprzedniej opierała się na opracowaniu niekowalencyjnych odwracalnych inhibitorów proteazy NS3/4A [17]. Mimo wielu zaproponowanych substancji o działaniu hamującym namnażanie HCV badania nad syntezą nowych związków nie ustają. Jednymi z najnowszych substancji o charakterze inhibitorów proteazy NS3/4A są zaproponowane przez polski zespół badawczy pod kierownictwem Skoreńskiego pochodne α -aminofosfonianów. Ich zdecydowaną zaletą jest to, że ich działanie skierowane jest wyłącznie na proteazy serynowe i związki te nie reagują z resztami cysteinowymi czy aspartyłowymi oraz metaloproteazami. Ponadto nie stwierdzono toksyczności tych związków w badaniach *in vivo* [15].

DZIAŁANIE PRZECIWBAKTERYJNE

Patogeny pochodzenia bakteryjnego wykorzystują całe spektrum czynników wirulencji, które umożliwiają im sprawne rozprzestrzenianie się, uchylanie się przed działaniem układu odpornościowego gospodarza oraz kolonizację jego tkanek. Wśród tych czynników istotne miejsce zajmują enzymy proteolityczne. Odgrywają one przede wszystkim rolę w pozyskiwaniu substancji odżywczych poprzez bezpośrednią degradację składników tkanek organizmu gospodarza. Obecnie dostępne antybiotyki swoje działanie opierają przede wszystkim na zaburzeniach w syntezie ściany komórkowej lub syntezie białka. Ze względu na niezwykle szybko rozprzestrzeniającą się antybiotykooporność, proteazy bakteryjne i cząsteczki ich inhibitorów są bardzo obiecującymi substancjami do projektowania nowych leków o działaniu przeciwbakteryjnym [7].

Metaloproteazy są najczęściej występującymi enzymami proteolitycznymi wśród patogenów pierwotnych i oportunistycznych. Bardzo często są powiązane z mobilnymi elementami materiału genetycznego (np. plazmidami, tzw. wyspami patogenności czy zintegrowanymi fagami), a ich ekspresja nie jest konstytutywna, lecz regulowana poprzez sygnały środowiskowe, co może sprawiać dodatkową trudność w trakcie projektowania specyficznych inhibitorów-leków [18]. Wśród klasycznych przykładów bakteryjnych metaloproteaz możemy wymienić aureolizynę *Staphylococcus aureus*, która odpowiada za modulację odpowiedzi immunologicznej, wpływając stymulująco na limfocyty i hamując produkcję immunoglobulin. Dodatkowo wpływa

ona także na rozregulowanie aktywności proteolitycznej organizmu gospodarza poprzez inaktywację serpin [19]. Kolejnym przykładem szkodliwego działania metaloproteaz mogą być elastaza LasB i alkaliczna proteaza AprA *Pseudomonas aeruginosa*, które odpowiadają za degradację laminin i powstawanie zapalenia rogówki [20]. Równie niebezpieczne i niepożądane działanie wykazuje proteaza VVP *Vibrio vulnificus*, która powoduje zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych i uszkodzenia tkanki krwiotwórczej, co przyczynia się do powstawania charakterystycznych obrzękniętych zmian skórnych [21].

W związku z wcześniej wspomnianym niekonstytutywnym charakterem wielu proteolitycznych czynników patogenności u bakterii, znalezienie skutecznie działającego specyficznego inhibitora proteaz staje się dużym wyzwaniem. Substancje biologicznie czynne pozyskiwane są z bardzo różnorodnych źródeł, a ich aktywność sprawdzana jest pod kątem działania przeciwko różnym patogenom. Niskocząsteczkowe inhibitory proteaz znajdują się na przykład w jadzie pszczelim. Z jadu azjatyckich pszczół miodnych *Apis cerana* wyizolowano inhibitor proteaz AcVSPI, którego działanie opiera się na hamowaniu aktywności proteaz serynowych oraz drobnoustrojowej plazminy, która również jest proteazą serynową. Naukowcy nie stwierdzili jednak hamowania takich enzymów jak trombina lub elastaza. Inhibitor AcVSPI wykazuje wysokie podobieństwo strukturalne do niskocząsteczkowego inhibitora proteaz serynowych Api m 6 i zawiera domenę trypsyno-podobną, w obrębie której znajduje się 10 reszt cysteinowych. Inhibitor ten wykazywał również skuteczne hamowanie rozwoju szczepów *Escherichia coli* i *Bacillus thuringiensis* oraz grzyba *Beauveria bassiana* [22].

Zapalenie płuc wywoływane przez szpitalne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* jest trzecią co do częstotliwości przyczyną zgonów wśród pacjentów w szpitalach w Stanach Zjednoczonych. Podczas zapalenia płuc dochodzi do ciężkiej niedokrwistości, a wydzieliny układu oddechowego wzbogacają się w serynową proteazę, elastazę neutrofilową. Enzym ten powoduje uszkodzenia proteolityczne tkanek w drogach oddechowych, przez co zwiększa się stan zapalny, a także dochodzi do narastającej inwazji komórek bakteryjnych na nabłonek oddechowy. Sytuacja ta przyczynia się do niekontrolowanego namnażania bakterii, ograniczenia zdolności do wymiany gazowej oraz wtłaczania płynów do dróg oddechowych. W związku z tymi objawami wysunięto hipotezę, że zahamowanie aktywności elastazy neutrofilowej może zmniejszyć częstotliwość występowania zapalenia płuc oraz jego nasilenie. Jako prototypowy inhibitor zaproponowano ludzką α -1-antytrypsynę, która jest zaliczana do białek ostrej fazy. Badania przeprowadzono na myszach transgenicznym, które wykazywały zdolność do ekspresji tego inhibitora w płucach. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono zmniejszenie o 90% śmiertelności z powodu zakażenia *Pseudomonas aeruginosa* wśród zwierząt transgenicznych w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt nietransgenicznych. Ponadto podanie zewnętrzne ludzkiej α -1-antytrypsyny myszom nietransgenicznym również obniżało ich śmiertelność. Działanie inhibitora opiera się tutaj głównie na ograniczeniu wytwarzania uszkodzeń w tkance płucnej, obniżeniu stężenia bakterii w

płucach i krwi oraz obniżeniu stężenia cyrkulujących cytokin. Te pozytywne wyniki badań zachęcają do zastosowania α -1-antytrypsyny jako naturalnego mediatora odpornościowego w profilaktyce zachorowań na zapalenie płuc wywołwane przez *Pseudomonas aeruginosa* [23].

Inhibitory enzymów proteolitycznych mogą również działać synergistycznie z innymi substancjami, obniżając przeżywalność patogenów. Jednym z przykładów takiego działania może być połączenie laktoferycyny B (kationowego peptydu antymikrobiologicznego, pochodzącego z N-końcowego fragmentu bydłczej laktoferyny) z wybraną mieszkanką inhibitorów proteaz (EDTA, bestatyną czy pepstatyną). W badaniach przeprowadzonych przez Ulvatne i współpracowników takie „koktajle” powodowały obniżenie żywotności szczepów *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus* [24]. Bogatym źródłem do poszukiwania substancji aktywnych o charakterze inhibitorów enzymów mogą być również różnego rodzaju ekstrakty grzybowe obfitujące w substancje białkowe. Oczyszczone poszczególne składniki takich mieszanin bardzo często wykazują zdolności hamowania wzrostu różnych mikroorganizmów, a także aktywności enzymów wirusowych (np. odwrotnej transkryptazy HIV) [25].

DZIAŁANIE PRZECIWGRZYBICZE

Najczęściej występujące choroby grzybicze wywoływane są przede wszystkim przez patogeny oportunistyczne z rodzaju *Candida* (w szczególności *Candida albicans*, *Candida glabrata* i *Candida parapsilosis*) oraz rodzaju *Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus calidoustus*), a także przez grzyby z rodzajów *Fusarium*, *Rhizopus* czy *Mucor* [26]. Grzybice obserwowane są przede wszystkim u pacjentów z obniżoną zdolnością do występowania prawidłowej odpowiedzi immunologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem osób chorych na AIDS nie poddanych żadnemu leczeniu. Wśród tej grupy pacjentów szczególnie rozpowszechnioną grzybicą była dotychczas kandydoza gardła. Jednak dzięki wprowadzeniu terapii HAART (ang. *Highly Active Antiretroviral Therapy*), w której stosowane są kombinacje trzech leków antyretrowirusowych, np. dwa nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy i jeden inhibitor proteazy, zaobserwowano zdecydowane obniżenie zachorowalności na ten rodzaj grzybicy i obecnie jest ona jednym z marginalnych powikłań wśród osób zakażonych HIV [27]. Jednymi z najczęściej badanych proteaz pochodzenia grzybowego są proteinazy aspartylowe *Candida albicans* (SAP, ang. *Secreted Aspartyl Proteinases*). W toku prowadzonych badań stwierdzono, że inhibitory stosowane przeciwko wirusowym proteazom aspartylowym w terapii zakażeń HIV również skutecznie hamują aktywność proteaz SAP u *Candida* sp., co tłumaczy opisane wcześniej obniżenie częstotliwości występowania kandydoz u chorych na AIDS [7]. Wśród zbadanych leków, które wpływają na zdolność do obniżenia adhezji komórek *Candida albicans* do powierzchni komórek endotelialnych gospodarza, można wymienić trzy skuteczne leki: Saquinawir, Indinawir oraz najefektywniejszy z nich trzech Ritonawir (powodujący obniżenie adhezji *Candida albicans* o 55% przy zastosowaniu dawki 500 μ M leku) [27].

Jakkolwiek kontrowersyjne wydawałoby się znaczenie proteaz w procesie patogenezy chorób grzybiczych, należy nadmienić, że bardzo często proteazy aspartylowe, serynowe, metalopeptydazy oraz aminopeptydazy, karboksypeptydazy i dipeptydylopeptydazy są wydzielane zewnątrzkomórkowo przez patogenne gatunki grzybów. Są one również klasyfikowane jako czynniki wirulencji, które decydują o inwazji i kolonizacji tkanek gospodarza poprzez hydrolizę białek i niszczenie komórek oraz cząsteczek należących do naturalnej bariery ochronnej organizmu [28].

Mimo że proteazy są tylko jedną spośród wielu grup będących czynnikami wirulencji u grzybów, pomagają one w przeprowadzeniu inwazji na tkanki gospodarza i ułatwiają grzybom unikanie odpowiedzi immunologicznej. Dlatego też tak bardzo pożądane jest znalezienie specyficznych inhibitorów proteaz, które w połączeniu z obecnie używanymi lekami przeciwgrzybiczymi będą wpływały na zmianę integralności ściany i błony komórkowej oraz będą wywoływały zaburzenia w replikacji DNA grzybów. Jednym z proponowanych do tego celu inhibitorów może być pepstatyna. Jest to cząsteczka o szerokim spektrum działania, należąca do klasy inhibitorów proteaz aspartylowych, która hamuje adhezję komórek *Candida albicans*, zapobiegając inwazji komórek grzyba lub powstawaniu uszkodzeń w obrębie tkanki śluzowej poprzez hamowanie proteaz SAP [29].

Ważne jest również zwrócenie uwagi na fakt, że grzybowe proteazy są bardzo silnymi alergenami, a większość z nich należy do rodziny proteaz serynowych. Podanie inhibitora proteaz serynowych podczas procesu uwrażliwiania z zastosowaniem proteazy i antygenów *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus niger* miało wpływ na obniżenie alergicznego odczynu zapalnego oraz hiper-odpowiedzi immunologicznej w badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym. Dlatego też jednym z istotnych kierunków badań stało się poszukiwanie inhibitorów serynowej proteazy alkalicznej wydzielanej przez *Aspergillus fumigatus*, która odpowiada za niszczenie komponentów ludzkiego układu odpornościowego [30].

DZIAŁANIE PRZECIWPASOŻYTNICZE

Choroby pasożytnicze wywoływane przez pierwotniaki (w tym malaria, leiszmanioza, choroba Chagasa) są jednymi z najgroźniejszych chorób zakaźnych na świecie. Charakteryzują się wysoką śmiertelnością i zachorowalnością w szczególności na terenach krajów rozwijających się. Powodami, dla których ich leczenie jest tak bardzo utrudnione, są konieczność prowadzenia długotrwałej terapii przeciw pasożytniczej, z którą wiąże się występowanie wielu skutków ubocznych oraz występowanie zjawiska lekooporności. Dlatego też badania ostatnich dekad były skoncentrowane na poszukiwaniu nowych substancji do projektowania leków przeciw pasożytniczych. Enzymy proteolityczne wydają się być w tym wypadku jednymi z najlepszych celów nadających się do ograniczenia rozprzestrzeniania się pasożytów, ponieważ są one u pierwotniaków kluczowymi czynnikami wirulencji oraz pełnią istotne funkcje w trakcie zachodzenia interakcji z organizmem gospodarza i we własnym metabolizmie komórkowym [7].

Malaria jest chorobą wywołowaną głównie przez *Plasmodium falciparum* oraz *Plasmodium vivax*. Z danych oszacowanych przez WHO (ang. *World Health Organization*) wynika, że w roku 2015 zgłoszono aż 214 milionów przypadków występowania malarii, z czego około 438 000 zakończyło się zgonem. Pojawienie się lekooporności u pasożytów spowodowało, że uprzednio stosowane leki przestały być skuteczne. Obecnie standardowe procedury leczenia obejmują kombinowaną terapię opartą na artemizynie (ACTs, ang. *Artemisinin-based Combination Therapies*). Niestety, w roku 2009 potwierdzono, że *Plasmodium falciparum* wytworzyło oporność również na artemizynę, w związku z czym konieczne stało się znalezienie nowego skutecznego leku. Wiele propozycji w trakcie poszukiwania terapeutyku skierowanych było w stronę pasożytniczych proteaz aspartylowych, plazmepsyn. Niestety, trudność w znalezieniu odpowiedniej substancji polegała na tym, że zaproponowany do zastosowania inhibitor musiałby działać wyjątkowo selektywnie, nie powodując zahamowania aktywności homologicznych ludzkich proteaz aspartylowych [31]. Jednym z przykładów skutecznego nowego inhibitorowego leku przeciwko malarii mogą być pochodne pirymidynowe, które hamują aktywność prokariotycznej zależnej od ATP proteazy ClpP, zlokalizowanej w reliktowym plastydzie pasożyta. Dla tego jednego enzymu zaprojektowana została cała seria inhibitorów *in silico*. Spośród wielu zaproponowanych związków wybrano jeden o potencjalnym znaczeniu klinicznym. Jego działanie opierało się na ograniczeniu wzrostu i prawidłowej segregacji apikoplastu w kolejnych cyklach komórkowych po zastosowaniu substancji aktywnej, czego wynikiem było obumieranie komórek pasożyta [32].

Choroba Chagasa, wywołwana przez pierwotniaka *Trypanosoma cruzi*, dotyka około 8-10 milionów ludzi na całym świecie i powoduje ponad 10 000 zgonów rocznie. Choroba ta jest endemiczna dla krajów Ameryki Łacińskiej, gdzie jest główną przyczyną bardzo częstych niewydolności serca. Ostra faza choroby trwa około 8 tygodni i może być bezobjawowa. Większość zarażonych osób (około 70%) przechodzi przez ostrą fazę choroby bez jej przejścia w fazę przewlekłą. Jednak pozostałe 30% doświadcza przewlekłej choroby, która jest śmiertelna. Leczenie farmakologiczne jest ograniczone do stosowania benznidazolu (Ryc. 1k), nitroimidazolu, nifurtimoksu i nitrofuranu. Leki te są jednak skuteczne jedynie w fazie ostrej choroby, a w momencie przejścia w fazę przewlekłą stają się zupełnie bezużyteczne. Powodują one również szereg skutków ubocznych jak alergiczne reakcje skórne, toksyczność dla układu nerwowego, gorączka oraz niepożądane objawy ze strony układu pokarmowego. Do zaprojektowania nowych leków zaproponowano kilka białek enzymatycznych *Trypanosoma*. Są to między innymi rodezaina i kruzaina, które są proteazami cysteinowymi katepsyno L-podobnymi i odgrywają rolę w pośredniczeniu w odpowiedzi pomiędzy pasożytem a gospodarzem. Za skuteczne hamowanie tych enzymów odpowiadają pochodne fluoroketonów, które działają już w nanomolarnych stężeniach i wykazują dogodną farmakokinetykę, która została potwierdzona we wstępnych badaniach przedklinicznych [33].

PODSUMOWANIE

Dzięki temu, że inhibitory enzymów proteolitycznych są tak bardzo dużą i zróżnicowaną grupą związków biologicznie aktywnych, stwarzają wiele możliwości do poszukiwania dla nich nowych zastosowań jako specjalistyczne leki. Obecnie prowadzonych jest wiele badań nad poszukiwaniem zupełnie nowych cząsteczek oraz związków pochodnych dla substancji, które wykazywały już potwierdzone działanie terapeutyczne i zostały wprowadzone na listę powszechnie stosowanych leków. Opracowywane są również specjalistyczne programy komputerowe, które pozwalają na szybkie projektowanie struktur nowych i bardzo specyficznych inhibitorów [34-37]. Jednak droga od wynalezienia nowej substancji czynnej do wdrożenia jej do użytku medycznego jest bardzo długa. Niejednokrotnie tysiące proponowanych związków chemicznych, o interesujących właściwościach *in vitro*, odrzucane są już we wczesnych fazach badań klinicznych. Obecność związków o charakterze inhibitorów proteaz w grupie stosowanych już leków daje nadzieję na znalezienie nowych terapeutyków wśród tego rodzaju preparatów.

PIŚMIENNICTWO

1. Ahmed KBY, Raman T, Veerappan A (2016) Future prospects of antibacterial metal nanoparticles as enzyme inhibitors. *Mater Sci Eng C* 68: 939-947
2. Rawlings ND, Tolle DP, Barret AJ (2010) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 378: 705-716
3. Rawlings ND (2010) Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie* 92: 1463-1483
4. Rawlings ND (2016) Peptidase specificity from the substrate cleavage collection to the MEROPS database and a tool to measure cleavage site conversion. *Biochimie* 122: 5-30
5. Ashton-Rickard PG (2013) An emerging role for serine protease inhibitors in T lymphocyte immunity and beyond. *Immunol Lett* 152: 65-76
6. Dunaevsky YE, Popova VV, Semenova TA, Beliakova GA, Belozersky MA (2013) Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: Classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. *Biochimie* 101: 10-20
7. Sabotić J, Kos J (2012) Microbial and fungal protease inhibitors – current and potential applications. *Appl Microbiol Biot* 93: 1351-1375
8. Wensing AMJ, van Maarseveen NM, Nijhuis M (2010) Fifteen years of HIV protease inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antivir Res* 85: 59-74
9. Patick AK, Potts KE (1998) Protease inhibitors as antiviral agents. *Clin Microbiol Rev* 11: 614-627
10. Plosker GL, Noble S (1999) Indinavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs* 58: 1165-1203
11. Pinto LH, Lamb RA (2006) The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem* 281: 8997-9000
12. Moscona A (2005) Oseltamivir resistance – disabling our influenza defences. *New Eng J Med* 353: 2633-2636
13. Zhirnov OP, Klenk HD, Wright PF (2011) Aprotinin and similar protease inhibitors as drug against influenza. *Antivir Res* 92: 27-36
14. Bretner M (2015) Specyficzne inhibitory enzymów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym. *Post Bioch* 61: 292-297
15. Skoroński M, Pachota M, Pyrc K, Sieńczyk M, Oleksyszyn J (2017) Novel peptidyl α -aminoalkylphosphonates as inhibitors of hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antivir Res* 144: 286-298
16. Perni RB, Almquist SJ, Byrn RA, Chandorkar G, Chaturvedi PR, Courtnej LF, Decker CJ, Dinehart K, Gates CA, Harbeson SL, Heiser A, Kalkeri G, Kolaczowski E, Lin K, Lunog Y, Rao BG, Taylor WP, Thomson JA, Tung RD, Wei Y, Kwong AD, Lin C (2006) Preclinical profile of VX-950, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor

of hepatitis C virus NS3-4A serine protease. *Antimicrob Agents Chem* 50: 899-909

17. Götte M, Feld JJ (2016) Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insight. *Nat Rev Gastro Hepat* 13: 338-351
18. Władyka B, Pustelny K (2008) Regulation of bacterial protease activity. *Cell Mol Biol Lett* 13: 212-229
19. Prokesová L, Porwit-Bohr Z, Baran K, Potempa J, Pospisil M, John C (1991) Effect of metalloproteinase from *Staphylococcus aureus* on *in vitro* stimulation of human lymphocytes. *Immunol Lett* 27: 225-230
20. Matsumoto K (2004) Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratal keratitis. *Biol Chem* 385: 1007-1016
21. Miyoshi S, Shinoda S (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* 2: 91-98
22. Yang J, Lee KS, Kim BO, Choi YS, Yoon HJ, Jia J, Jin BR (2017) Anti-fibrinolytic and anti-microbial activities of a serine protease inhibitor from honeybee (*Apis cerana*) venom. *Comp Biochem Physiol, Part C* 201: 11-18
23. Pott GB, Beard KS, Bryan CL, Merrick DT, Shapiro L (2013) Alpha-1-antitrypsin reduces severity of *Pseudomonas pneumonia* in mice and inhibits epithelial barrier disruption and *Pseudomonas* invasion of respiratory epithelial cells. *Front Public Health* 1: 1-13
24. Ulvatne H, Haukland HH, Samuelsen O, Krämer M, Vorland LH (2002) Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. *J Antimicrob Chemother* 50: 461-467
25. Xu X, Yan H, Chen J, Zhang X (2011) Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnol Adv* 29: 667-674
26. Boekhout T, Gueidan C, de Hoog S, Samson R, Varga J, Walther G (2009) Fungal taxonomy: new developments in medically important fungi. *Curr Fungal Infect Rep* 3: 170-178
27. Bektić J, Lell CP, Fuchs A, Stoiber H, Dprth C, Lass-Flörl C, Borg-von Zepelin M, Dierich MP, Würzner R (2001) HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cell *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31: 65-71
28. Segal BH (2006) Molecular pathogenesis of fungal infections. W: Runge MS, Patterson C (red) Principles of molecular medicine. Humana Press, Totowa, New Jersey, str. 920-933
29. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6: 915-926
30. Behnsen J, Lessing F, Schindler S, Wartenberg D, Jacobsen ID, Thoen M, Zipfel PF, Brakhage AA (2010) Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. *Infect Immun* 78: 3585-3594
31. Roy KK (2017) Targeting the active sites of malarial proteases for anti-malarial drug discovery: approaches, progress and challenges. *Int J of Antimicrob Agents* 50: 297-302
32. Mundra S, Thakur V, Bello AM, Rathore S, Asad M, Wei L, Yang J, Chakka SK, Mahesh R, Malhotra P, Mohammed A, Kotra LP (2017) A novel class of *Plasmodium* ClpP protease inhibitors as potential anti-malarial agents. *Bioorganic Med Chem*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.08.049>
33. Ferreira LG, Andricopulo AD (2017) Targeting cysteine proteases in trypanosomal disease drug discovery. *Pharmacol Ther*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.004>
34. Bauer RA (2015) Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov Today* 20: 1061-1073
35. Hamada Y, Kiso Y (2015) New directions for protease inhibitors directed drug discovery. *Biopolymers* 106: 563-579
36. Donald RGK, Skwish S, Forsyth RA, Anderson JW, Zhong T, Burns C, Lee S, Meng X, LoCastro L, Jarantow LW, Martin J, Lee SH, Taylor I, Robbins D, Malone C, Wang L, Zamudio CS, Youngman PJ, Phillips JW (2009) A *Staphylococcus aureus* fitness test platform for mechanism-based profiling of antibacterial compounds. *Chem Biol* 16: 826-836
37. Brouwer AJ, Ceylan TC, Jonker AM, van der Linden T, Liskamp RMJ (2011) Synthesis and biological evaluation of novel irreversible serine

- protease inhibitors using amino acid based sulfonyl fluorides as an electrophilic trap. *Bioorganic Med Chem* 19: 2397-2406
38. Vathipadikeal V, Umasankar PK, Patole MS, Rao M (2010) Molecular cloning, over expression, and activity of a peptidic HIV-1 protease inhibitor: Designed synthesis gene to functional recombinant peptide. *Peptides* 31: 16-21
39. Zhou Y, Vedantham P, Lu K, Agudelo J, Carrino Jr R, Nunneley JW, Barnard D, Pöhlmann S, McKerrow JH, Renslo AR, Simmons G (2015) Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Res* 116: 76-84
40. Ngai PHK, Ng TB (2003) Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sci* 73: 3363-3374
41. Guo YX, Wang HX, Ng TB (2005) Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 26: 575-580
42. Dekker N, Cox CR, Kramer A, Egmond MR (2001) Substrate specificity of the integral membrane protease OpmT determined by spatial addressed peptide libraries. *Biochemistry* 40: 1694-1701
43. Costa AG, Cusano NE, Silva BC, Cremers S, Bilezikian JP (2011) Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 7: 447-456
44. Regulska K, Stanisz B, Regulski M, Marius M (2014) How to design a potent, specific and stable angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Drug Discov Today* 19: 1731-1743
45. Kisselev AF, Goldberg AL (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8: 739-758
46. Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS (2012) Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol* 19: 99-115
47. Hidalgo M, Eckhardt SG (2001) Development of matrix metalloproteases inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93: 178-193
48. Kurzyk A (2015) Angiogeneza – możliwości, problemy, perspektywy. *Post Bioch* 6: 25-34
49. Harish BS, Uppuluri KB (2017) Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. *Int J Biol Macromol*, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.115>
50. Peters RJ, Spickler W, Theroux P, White H, Gibson M, Molhoek PG, Anderson HV, Weitz JL, Hirsh J, Weaver WD (2001) Randomized comparison of a novel anticoagulant, vasoflux, and heparin as adjunctive therapy to streptokinase for acute myocardial infarction: results of the VITAL study (Vasoflux International Trial for Acute Myocardial Infarction Lysis). *Am Heart J* 142: 237-243
51. Hansson KM, Nielsen S, Elg M, Deinum J (2014) The effect of the corn trypsin inhibitor and inhibiting antibodies for FXIa and FXIIa on coagulation of plasma and whole blood. *J Thromb and Haemost* 12: 1678-1686

Inhibitors of enzymes with potential medical applications

Katarzyna Szalapat[✉], Monika Osińska-Jaroszuk, Anna Jarosz-Wilkolażka

Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Skłodowska-Curie University, 19 Akademicka St., 20-033 Lublin, Poland

[✉]e-mail: katarzyna.szalapat@poczta.umcs.lublin.pl

Key words: protease inhibitors, proteases, specific inhibitors, design of new drugs

ABSTRACT

From the earliest times, medicine has focused on finding the most suitable and effective treatment for every patient. At present, a dynamic development of diagnostic methods and techniques for designing new drugs allows to create therapies for many diseases at the molecular level. Among the many drugs appearing on the medical market every year, special attention should be paid to those whose action is based on the inhibition of proteolytic enzyme activity. Protease inhibitors are a diverse group of biologically active molecules for which antiviral, antimicrobial, antifungal, antiparasitic or anticancer effects have been documented. Successes in the treatment of HIV infection, hepatitis C and influenza diseases certainly encourage researchers to look for new inhibitors that could be used in new therapies. This paper provides an overview of selected information on enzyme inhibitors, especially protease inhibitors, which are already registered medicines and substances that are promising candidates for medical use.