

INHIBITORY PROTEAS JAKO CHEMOTERAPEUTIKA

PETRA RUBEŠOVÁ^{a,b}

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha, ^b Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
rubesova@uochb.cas.cz

Došlo 4.6.19, přijato 31.3.20.

Klíčová slova: proteasa, inhibitor, léčivo, onemocnění

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismus působení proteas
3. Katalytický mechanismus proteas
4. Proteasy jako cílové molekuly pro terapii
5. Inhibitory proteas jako chemoterapeutika
 - 5.1. Léčba vysokého krevního tlaku blokováním angiotensin konvertujícího enzymu
 - 5.2. Matrixové metaloproteasy – cílové molekuly při léčbě rakoviny?
 - 5.3. Sekretasy jako terapeutické cíle pro léčbu Alzheimerovy choroby
 - 5.4. Inhibitory HIV proteasy jako nástroj pro léčbu AIDS
 - 5.5. Léčba žloutenky typu C inhibicí virové serinové proteasy NS3/4A
 - 5.6. Inhibitory dipeptidylpeptidasy-4 pro léčbu diabetu II. typu
 - 5.7. Léčba rakoviny cílená na proteasom
6. Závěr

1. Úvod

Proteolytické enzymy (peptidasy či proteasy¹) jsou velmi účinné biokatalyzátory, které mohou zvýšit rychlost hydrolýzy peptidové vazby až bilionkrát². Proteiny patří mezi nejstabilnější biopolymery. Ke štěpení peptidové vazby je nutná hydrolýza 6 mol l⁻¹ kyselinou chlorovodíkovou po dobu 10 hodin při teplotě 100 °C za anaerobních podmínek. V živých organismech jsou však proteasy schopny hydrolyzovat proteiny během mikrosekund.

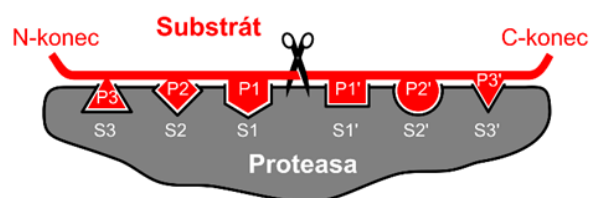
Během evoluce se proteasy adaptovaly na různorodé podmínky (jsou funkční v široké škále pH, v redukčním prostředí atd.)³. Studium jevu proteolýzy začalo objevem pepsinu v roce 1836 a trypsinu v roce 1856. Od té doby byly proteasy identifikovány téměř ve všech organismech⁴.

Proteasy lze dělit podle mechanismu účinku a katalytických aminokyselinových zbytků v aktivním místě do 7 tříd: na cysteinové (C), serinové (S), aspartátové (A), threoninové (T) a glutamátové proteasy (G), metaloproteasy (M) a proteasy neznámého typu (U). Dále jsou proteasy děleny na základě strukturní a evoluční příbuznosti do rodin a klanů. Rodinu tvoří skupina proteas, v níž každý člen vykazuje evoluční a sekvenční příbuznost s nejméně jedním dalším členem dané rodiny. Klan je skupina rodin vykazujících evoluční příbuznost a obsahujících podobné terciární struktury⁵. Z hlediska pozice štěpení se proteasy dělí na endopeptidasy a exopeptidasy. Exopeptidasy štěpí peptidový řetězec buď z N-konce (aminopeptidasy) či C-konce (karboxypeptidasy). Endopeptidasy naopak štěpí uvnitř peptidového řetězce⁶.

Proteasy se účastní regulace mnoha klíčových procesů, jako jsou např. buněčný cyklus, proliferace buněk, buněčná smrt, replikace DNA, remodelace tkání, srážení krve, hojení ran a imunitní odpověď³. Proteasy zároveň hrají zásadní roli i v životním cyklu virů a dalších patogenů. Vzhledem k účasti v patologiích představují molekulární cíle pro terapeutický zásah pomocí inhibičních regulatorů jako chemoterapeutik. Tento přehledný článek se zaměřuje na inhibitory proteas v pozdních fázích klinických testů.

2. Mechanismus působení proteas

Proteasy obecně neštěpí substráty náhodně, ale naopak vykazují vysoký stupeň specifity. Tato specifita není definována jen samotným katalytickým centrem, zásadní roli hrají vazebná podmísta, která se nacházejí po obou stranách katalytického centra, ve kterém je štěpena peptidová vazba (obr. 1). Aktivní místo je tvořeno vazebnými podmísty S3 až S3' (se štěpenou vazbou P1-P1'), do kterých se vážou příslušné aminokyselinové zbytky substrátu.



Obr. 1. Schématické znázornění vazby substrátu proteasou. Aktivní místo proteas je definováno specifickými vazebnými podmísty (S3-S3') dle (cit.⁷). Do těchto podmíst se vážou aminokyselinové zbytky substrátu značené od štěpené peptidové vazby směrem k N-konci P1-P3 a k C-konci P1'-P3'

Proteasy mají různý počet definovaných vazebných podmíst, která určují specificitu enzymu³.

3. Katalytický mechanismus proteas

Existují dva základní typy katalytických mechanismů proteas (obr. 2). U aspartátových a glutamátových proteas a metaloproteas je nukleofilem aktivujícím štěpení peptidové vazby aktivovaná molekula vody (acidobazická katalýza), zatímco u serinových, cysteinových a threoninových proteas tuto úlohu plní nukleofilní skupina katalytického zbytku příslušné klíčové aminokyseliny (kovalentní katalýza)⁴. U kovalentní katalýzy plní funkci báze zbytky histidinu, zatímco při acidobazické katalýze slouží jako kyseliny a báze zbytky aspartátu nebo glutamátu a nebo u metaloproteas atomy kovu.

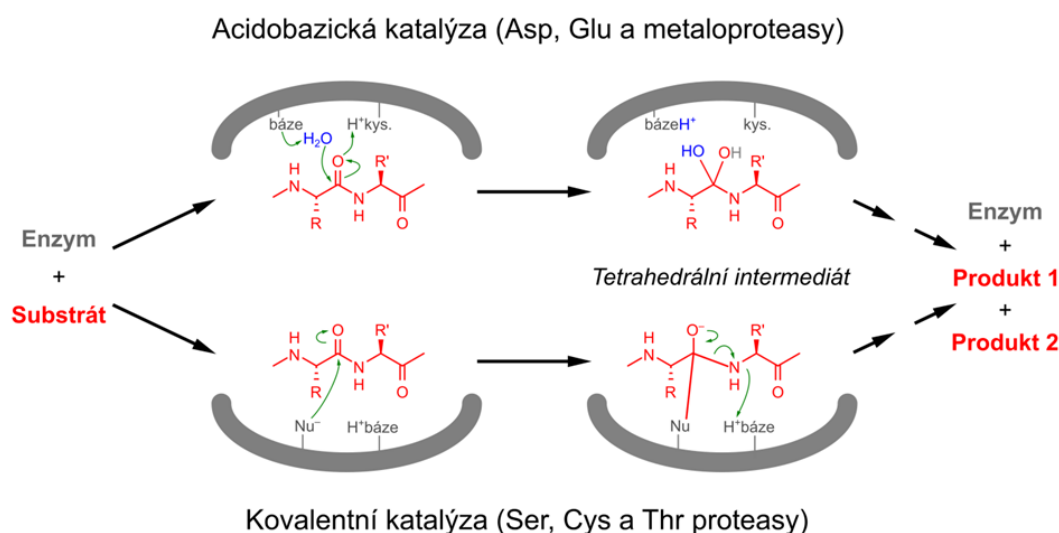
4. Proteasy jako cílové molekuly pro terapii

Patologické stavy vznikají při dysregulaci aktivity proteas. K tomu dochází nadměrnou aktivací či produkcí proteas, anebo absencí jejich přirozeného inhibitoru. Zvýšená proteolýza je příčinou řady patologických procesů, a proto jsou proteasy využívány jako cílové molekuly pro vývoj inhibitorů^{3,8,9}. Úspěšnými příklady jsou např. inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACE) používané při léčbě vysokého krevního tlaku¹⁰, inhibitory HIV-proteasy u AIDS (cit.¹¹) a inhibitory proteasomu u mnohočetného myelomu¹².

5. Inhibitory proteas jako chemoterapeutika

Obecnou strategií pro vývoj nových léčiv cílených proti terapeuticky významným proteasám je identifikace specifického nízkomolekulárního inhibitoru, který dokáže blokovat aktivní místo. Tyto látky jsou často strukturně podobné přirozeným peptidovým substrátům proteasy. Odlišují se od něj např. nehydrolyzovatelnou kostrou nebo přítomností reaktivní skupiny (tzv. „warhead“), která reaguje s katalytickými zbytky. Proteolytické systémy jsou často tvořeny z homologních proteas, které mají identický katalytický mechanismus a podobnou substrátovou specificitu (např. serinové proteasy z kaskády krevního srážení), a proto je potřeba dosáhnout selektivní a účinné inhibice. Při vývoji inhibitorů se řeší dvě klíčové otázky: jak selektivní by měla být inhibice proteasy, aby bylo dosaženo terapeutického výsledku, a jakými strukturními prostředky toho docílit^{4,13,14}.

Farmaceutický průmysl dosud preferoval reverzibilní inhibitory kvůli obavám z imunogenity kovalentně modifikovaných proteinů a z křížové reaktivity a nižší selektivity inhibitorů⁴. To vše je rizikem zejména u dlouhodobé léčby. Nicméně ireverzibilní inhibitory mohou být vysoce efektivní, pokud jsou použity v příslušném terapeutickém kontextu⁴. Příkladem jsou některá parazitární onemocnění, při nichž ireverzibilní inhibitory vykazují vysokou účinnost a nízkou toxicitu, protože se koncentrují v parazitovi a léčba je pouze nárazová⁴. Příkladem je vyvíjený lék na Chagasovu chorobu na bázi vinylsulfonového inhibitoru proteas trypanozomy, který je nyní v preklinických testech¹⁵.



Obr. 2. **Katalytický mechanismus proteas.** Porovnání dvou prvních kroků mechanismů acidobazické a kovalentní katalýzy. Enzym (šedá), substrát (červená), přesun elektronů (zelená), molekula vody (modrá)

5.1. Léčba vysokého krevního tlaku blokováním angiotensin konvertujícího enzymu

ACE (též dipeptidylpeptidasa A) je metaloproteasa, která má ve svém aktivním místě atom zinku. Je součástí systému renin-angiotensin-aldosteron, který reguluje krevní tlak a množství extracelulární tekutiny. ACE zde katalyzuje přeměnu angiotensinu I na peptidový vazokonstrikční hormon angiotensin II. Vývoj inhibitorů ACE začal až po objevu peptidů obsažených v hadím jedu křovinaře žararaka¹⁶. Tyto peptidy inhibují ACE, který rozkládá bradykinin (vazodilatační hormon) a zároveň inhibiči ACE zabraňují vzniku angiotensinu II.

S využitím struktury jednoho peptidu z hadího jedu (nonapeptidu teprotidu) byl vytvořen první komerčně používaný inhibitor ACE kaptopril^{14,17}.

Inhibitory ACE se používají více než 30 let a v současné době je dostupných 13 sloučenin^{10,18} a další jsou v klinických testech. Aplikují se při léčbě kardiovaskulárních chorob včetně vysokého krevního tlaku, srdečního selhání a infarktu myokardu. Mají nízkou molekulovou hmotnost, obsahují chelatační skupinu (fosfinát, thiolový ligand nebo karboxylát), která se váže na zinek v aktivním místě ACE, a interagují v podměstech S1, S1' a S2' (obr. 1). Většina inhibitorů ACE se syntetizuje díky dobré perorální biologické dostupnosti jako esterové prekurzory³.

Krystalová struktura ACE ukázala, že enzym je složen ze dvou homologních domén s odlišnými funkcemi. Doména na C-konci je primárně zodpovědná za produkci angiotensinu II a regulaci krevního tlaku, zatímco N-terminální doména je zapojena do procesu hemokoagulace^{3,19}. To vysvětluje, proč neselektivní sloučeniny inhibující obě domény měly vedlejší účinky. V současné době se využívají zejména inhibitory, které byly navrženy tak, aby preferovaly C-terminální doménu ACE (cit.²⁰).

5.2. Matrixové metaloproteasy – cílové molekuly při léčbě rakoviny?

Matrixové metaloproteasy (MMP) patří do rodiny endopeptidas a řídí metabolický obrat extracelulární matrix (ECM). Za fyziologického stavu kontrolují aktivitu MMP tkáňové inhibitory matrixových metaloproteas (TIMP). Jejich dysregulace je spojena s patologiemi jako jsou např. revmatoidní artritida, osteoartritida, ateroskleróza, fibróza a nádorová onemocnění^{21,22}.

Vysoká hladina MMP koreluje s nepříznivou prognózou u různých nádorů²³. Z proteas byly MMP mezi prvními cílovými molekulami, které byly zvažovány pro boj s rakovinou kvůli jejich úloze v degradaci ECM (cit.³). Pro různé typy rakoviny bylo vyvinuto několik typů inhibitorů MMP, které lze dělit na dvě hlavní skupiny: hydroxamáty (batimastat, marimastat, prinomastat) a nehydroxamáty (neovastat, rebimastat, tanomastat). Po slibných výsledcích preklinických testů u různých modelů rakoviny byly tyto inhibitory testovány v pokročilých klinických studiích, ale všechny selhaly kvůli závažným vedlejším účinkům nebo zanedbatelnému klinickému přínosu^{23–25}. Jako příklad je

možné uvést problémy u marimastatu, který dosáhl II. a III. fáze klinických testů, ve kterých byl testován pro několik typů nádorů, včetně rakoviny plic, prsu, mozku, prostaty a kolorektálního karcinomu^{24,25}. Mnoho pacientů trpělo bolestmi, ztuhlostí a zánětem kloubů, tzv. „muskuloskeletálním syndromem“, který je přisuzován křížové inhibici dvou členů skupiny membránových metaloproteas ADAM, konkrétně ADAM-10 a -17. Jejich inhibice vede k narušení rovnováhy mezi faktorem nádorové nekrózy α (TNF α) a jeho receptory²⁶.

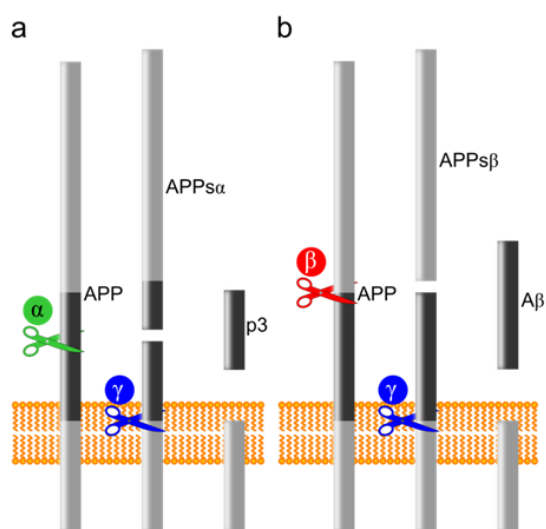
Mezi selektivní inhibitory, u kterých byla vyloučena inhibice ADAM-10 a -17, patří tanomastat, který inhibuje MMP-1, -2, -3, -8, -9 a -13 a dále prinomastat a rebimastat, které navíc inhibují i MMP-14 (cit.²⁷). Studie selektivních inhibitorů MMP neprokázaly pozitivní vliv na přežití pacientů i přesto, že došlo ke snížení muskuloskeletální toxicity. Navíc některé studie stále ukazovaly na významnou kloubní bolest a otoky, potlačení tvorby kostní dřevě a žilní tromboembolismus²⁸.

V současné době se používá jediné léčivo, které cílí MMP, a tím je periostat, derivát antibiotika doxycyklinu. Je to širokospektrý inhibitor MMP používaný pro léčbu zánětu periodontia (ozubice). Používá se subantimikrobiální dávka, která je podávána lokálně. U dospělých je zánět ozubice způsoben zejména periodontopatickými bakteriemi. Následně dochází ke zvýšení aktivity MMP, která je způsobena reakcí organismu na infekci. To vede k destrukci kolagenu a dalších komponent ECM ozubice²⁹.

5.3. Sekretasy jako terapeutické cíle pro léčbu Alzheimerovy choroby

Amyloidový β peptid ($A\beta$) je hlavní složkou plaků u pacientů s Alzheimerovou chorobou (AD). $A\beta$ vzniká proteolýzou amyloidového prekurzorového proteinu (APP) (obr. 3). APP je preferenčně štěpen α -sekretasou, která patří do membránových metaloproteas z rodiny ADAM. Tímto štěpením se APP rozpadá na rozpustnou neuroprotektivní ektodoménu APPs α (ektodoména je doména z membránového proteinu sahající do extracelulárního prostoru) a membránově vázaný C-koncový fragment APP-CTF α , který je následně degradován v lysosomech nebo je dále štěpen aspartátovou proteasou γ -sekretasou. Vznikají krátké netoxické hydrofobní peptidy, které se označují jako p3 fragmenty (obr. 3). Vlastní toxický $A\beta$ vzniká alternativní dráhou, které se účastní aspartátová proteasa β -sekretasa (BACE1) štěpící APP na N-konci domény $A\beta$ (obr. 3). Na C-konci štěpí $A\beta$ doménu γ -sekretasa, čímž vznikají fragmenty $A\beta$ 40 nebo $A\beta$ 42. $A\beta$ 42, také nazývaný β -amyloid, vykazuje vyšší neurotoxicitu a schopnost agregace než $A\beta$ 40 a jde o klíčový biomarker při diagnostice AD (cit.³⁰).

Fragmentace APP α -sekretasou tedy působí proti vzniku AD, protože svojí aktivitou zabraňuje tvorbě $A\beta$ peptidu kompetiční reakcí APP s β -sekretasou. Zvýšení aktivity α -sekretasy má tedy neuroprotektivní účinky³¹. Na regulaci aktivity α -sekretasy se podílejí dráhy řízené vápníkem zahrnující různé kiny (proteinkinasa C, mitogenem aktivované proteinkinasy, tyrosinkinasy). Proto se



Obr. 3. Štěpení amyloidového prekurzorového proteinu (APP). a) štěpení APP zprostředkované α -sekretasou, vedoucí ke vzniku nepatologického produktu p3, b) štěpení β -sekretasou, způsobující vznik amyloidového peptidu (A β)

vývoj léků na AD zaměřuje na vývoj sloučenin, které nepřímo stimulují α -sekretasu³², vývoj přímého aktivátoru α -sekretasy se zdá v krátkodobém horizontu nepravděpodobný. Příkladem je EHT-0202, pozitivní allosterický modulátor GABA receptoru (receptor pro γ -aminomáselnou kyselinu) nebo agonista serotoninového receptoru PRX-03140. Obě tyto látky jsou již testovány ve II. fázi klinických testů, ve kterých vykazují zlepšení kognitivních funkcí u pacientů s AD. Dalším příkladem aktivátoru α -sekretasy je epigallocatechin galát (EGCG), polyfenolová sloučenina ze zeleného čaje, který má jak neuroprotektivní účinky, tak aktivuje proteinkinazu C a tím i α -sekretasu³³.

Navržena a syntetizována byla řada inhibitorů β -sekretasy^{35–38} a γ -sekretasy^{39–42} a do klinických testů vstoupilo 9 z nich. Účinné inhibitory β -sekretasy byly navrženy podle sekvence tzv. švédského mutanta APP, který má vlivem substituce dvou aminokyselin vázajících se do aktivního místa vyšší afinitu k β -sekretase. Zmíněná mutace zvyšuje u pacientů s AD produkci A β a jeho následnou agregaci¹⁴. Tyto inhibitory, které měly štěpitelnou peptidovou vazbu nahrazenou nehydrolyzovatelným analogem tranzitního stavu, byly velmi účinné a selektivní, ale s nízkou membránovou permeabilitou přes hematoencefalickou bariéru³⁴. Inhibitory CTS-21166 a E2609 úspěšně prokázaly snížení hladiny A β v plazmě⁴³. E2609 je nyní v III. fázi klinických testů pod názvem elenbecestat⁴⁴. Podobný efekt vykazoval inhibitor LY2886721, ale klinické testy byly zastaveny ve fázi II kvůli jaterní toxicitě⁴⁵. Inhibitory verubecestat (MK-8931) a lanabecestat (AZD3293 nebo LY3314814) pokročily do klinické fáze III, ale testování bylo přerušeno z důvodu nízkého léčebného účinku^{46,47}.

γ -Sekretasa je podjednotková transmembránová proteasa, jejíž katalytické jádro tvoří presenilin 1 a presenilin 2 (PS1 a PS2). Pomocné proteiny APH-1, nicastrin a PEN2 jsou zapojené do zrání a stabilizace komplexu³⁴. Kromě APP má γ -sekretasa řadu dalších substrátů a vykonává mnoho funkcí^{48,49}, a proto byly nežádoucí účinky inhibitorů γ -sekretasy předvídané³⁴. Nejvýznamnějším substrátem je Notch, signalizační receptor buněčného povrchu, který je klíčový během buněčného vývoje a diferenciace buněk⁵⁰. Dosud provedené klinické studie inhibitorů γ -sekretasy prokázaly významné nepříznivé účinky, stejně jako nedostatek pozitivních účinků^{51,52}. Pro neúčinnost při zpomalení progresu onemocnění, významné zhoršení kognitivních schopností a zvýšenou incidenci rakoviny kůže byl zastaven vývoj inhibitoru semagacestatu (LY450139) ve III. fázi klinických testů⁴² a avagacestatu (BMS708163) v II. fázi klinických testů⁵³.

5.4. Inhibitory HIV proteasy jako nástroj pro léčbu AIDS

Od objevu HIV bylo schváleno 26 sloučenin pro léčbu AIDS (z angl. Acquired Immune Deficiency Syndrome), z toho 10 z nich funguje na bázi inhibice HIV-proteasy. Kombinovaná léčba pomocí inhibitorů HIV-proteasy, reverzní transkriptasy a integrasy je v současnosti nejúčinnější terapií AIDS. Jeden z problémů celoživotní léčby jsou vedlejší účinky inhibitorů HIV-proteasy (cit.⁵⁴). Většina současných inhibitorů vyvolává metabolické syndromy jako je dyslipidémie, lipodystrofie, rezistence na inzulin (zejména sloučeniny amrenavir, lopinavir, ritonavir) a kardiovaskulární a cerebrovaskulární onemocnění¹¹.

Homodimerní proteasa viru HIV-1 je aspartátová proteasa, která je zodpovědná za zpracování polyproteinů Gag a Gag-Pol. V prvním kroku vyštěpí z prekurzorového polyproteinu sama sebe, následně reverzní transkriptasu, RNasu H a integrasu. Nezastupitelná role HIV-1 proteasy při maturaci viru z ní činí oblíbený cíl pro vývoj antivirotik¹¹. Mnoho inhibitorů proteasy HIV-1, jako jsou saquinavir, indinavir, nelfinavir, atazanavir a darunavir, obsahuje hydroxyethylaminovou skupinu, která působí jako analog přechodového stavu. Ritonavir má místo této skupiny hydroxyethylenovou¹⁴.

První generace inhibitorů HIV-proteasy z 90. let (saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir) vykazují mnoho vedlejších účinků. Mají výrazně peptidovou povahu, která má za následek méně výhodné farmakokinetické parametry s potřebou častého dávkování. Největší problém první generace inhibitorů HIV-proteasy je výskyt rezistence⁵⁵. U indinaviru byla potvrzena nežádoucí inhibice glukosového transportéru GLUT4, která vede k omezenému přísunu glukosy do buněk adipocytů a následně lipodystrofii⁵⁶. V případě ritonaviru se po jeho uvedení na trh zjistilo, že zvyšuje cirkulaci jiných inhibitorů HIV-proteasy pomocí inhibice cytochromu P450 3A4, který se významně podílí na jejich metabolizaci, a díky tomu je možné snížit jejich dávkování⁵⁷.

Druhá generace inhibitorů HIV-proteasy (lopinavir, atazanavir, tipranavir, darunavir) se dostala na trh po roce 2000. Lopinavir je zatížen problémem vyvolání inzulinové rezistence a může způsobit systémové hypersenzitivní syndromy a tendinopatii Achillovy šlachy^{58,59}. Atazanavir má dobrou biodostupnost a méně nežádoucích účinků. Například neinhibuje glukosový transportér GLUT4 (cit.⁶⁰). Tipranavir je jediným lékem na AIDS, který není peptidomimetický inhibitor a díky této odlišnosti se používá v případech rezistence. Avšak nežádoucí účinky jsou mnohem vážnější, např. interkranální krvácení a hepatitida^{11,61}. Darunavir mimikuje přirozený substrát HIV-proteasy. Tvoří vodíkové vazby s páteří HIV-proteasy a s aminokyselinovými zbytky, které jsou zodpovědné za katalytickou funkci nebo jsou potřebné k udržení prostorové struktury enzymu. Jedná se o oblasti, které nemohou být jednoduše měněny mutacemi, aniž by došlo ke ztrátě aktivity enzymu. Proto je darunavir odolný ke vzniku rezistence⁶². V současné době je léčba AIDS založena na kombinaci inhibitorů reverzní transkriptasy a HIV-proteasy, zejména pak na darunaviru v kombinaci s ritonavirem⁶³. GS-8374, vyvinutý firmou Gilead Sciences, Inc., je analogem darunaviru⁶⁴, který nevyvolává inzulinovou rezistenci a je nyní v klinických testech fáze III (cit.⁶⁵).

5.5. Léčba žloutenky typu C inhibicí virové serinové proteasy NS3/4A

Virus hepatitidy C (HCV) je RNA virus způsobující vážný zánět jater, který vede k fibróze, cirhóze, hepatocelulárnímu karcinomu a selhání jater. Chronická infekce je způsobena velmi vysokou genetickou variabilitou HCV spolu s několika silnými strategiemi pro překonání imunitní obrany hostitele⁶⁶.

Replikace HCV se odehrává převážně v hepatocytech na membráně endoplazmatického retikula. Virový polyprotein je proteolyticky štěpen hostitelskou signální peptidase, tím vznikají strukturální proteiny (tvořící virové částice) a nestrukturní polyprotein (obsahující enzymy zajišťující replikaci viru a přeprogramování hostitelské buňky). Nestrukturní polyprotein je fragmentován působením dvou virálních proteas – NS2 a NS3 (cit.¹⁴), které jsou součástí virového polyproteinu. Cysteinová proteasa NS2 (také NS2-3) zahajuje štěpení. Pokračuje serinová proteasa NS3, která obsahuje také doménu RNA-helikasy a vytváří komplex (označovaný NS3/4A) s kofaktorem NS4A, který slouží jako kotva k buněčné membráně⁶⁷. NS3/4A interferuje se signalizačními cestami rozpoznávajícími patogeny štěpením signalizačních adaptérů, a tak brání transkripční aktivaci genů interferonové dráhy¹⁴. Proteasa NS3 proto představuje atraktivní cílovou molekulu pro vývoj léků, které se dostávají na trh po roce 2010 (cit.⁶⁶).

První inhibitory proteasy NS3, telaprevir a boceprevir, jsou lineární peptidomimetické inhibitory s reaktivní skupinou α -ketokarboxamidu, která se kovalentně váže na katalytický serin aktivního místa. Makrocyclické reverzibilní inhibitory simeprevir, glecaprevir, grazeprevir a voxilaprevir mají cyklopropansulfonylamidovou skupinu pro

zlepšení vazby s hydrofilní částí aktivního místa^{14,68}. Nejpoužívanějšími léky na bázi inhibitorů proteasy NS3 jsou inhibitory druhé generace (simeprevir) a třetí generace (glecaprevir, grazeprevir, voxilaprevir)^{69–71} dostupné po roce 2013. Používají se v kombinaci s dalšími antiviroty, jako jsou inhibitory virové polymerasy NS5A (cit.^{72,73}). Největším problémem současných inhibitorů NS3 je vznik rezistence, která se může objevit i po jediném podání léku. Z tohoto důvodu jsou u chronické hepatitidy C inhibitory virové proteasy NS3 podávány v kombinaci s interferonem (peginterferon alfa-2a a alfa-2b) a nukleosidovým analogem ribavirinem, který blokuje metabolismus RNA (cit.¹⁴).

5.6. Inhibitory dipeptidylpeptidasy-4 pro léčbu diabetu II. typu

Inkretiny jsou gastrointestinální hormony, které zvyšují sekreci inzulinu v závislosti na hladině krevní glukosy. Dva hlavní jsou GLP-1 (glukagon-like peptide) a GIP (glucose-dependent inzulinotropic peptide)⁷⁴. Tyto hormony jsou inaktivovány serinovou proteasou nazývanou dipeptidylpeptidasa-4 (DPP-4). Inhibicí DPP-4 dojde ke zvýšení hladiny inkretinů, které inhibují produkci glukagonu, což způsobí sekreci inzulinu a snížení hladiny krevní glukosy. Proto jsou inhibitory DPP-4 slibným terapeutickým nástrojem pro léčbu diabetu II. typu⁷⁵.

DPP-4 odštěpuje dipeptidy z volného N-konce peptidových substrátů. Specificky štěpí za zbytky Pro nebo Ala. Sekvence Xaa-Ala/Pro (Xaa je libovolná aminokyselina) se vyskytuje na N-konci u mnoha bioaktivních peptidů a proteinů, a proto mohou mít inhibitory DPP-4 mnoho vedlejších účinků. Kromě DPP-4 existuje v genomu člověka dalších 9 příbuzných enzymů. U neselektivních inhibitorů DPP-4, které inhibovaly DPP-8 a DPP-9, byly zaznamenány nežádoucí účinky u pokusných zvířat⁷⁶. Proto bylo nutné vyvinout selektivní inhibitory DPP-4.

Většina inhibitorů DPP-4 obsahuje zbytek Pro v pozici P1 (obr. 1), případně obsahují v této pozici pětičlenné heterocykly, které napodobují strukturu prolinu. Tyto sloučeniny obvykle tvoří reverzibilní kovalentní vazby s katalytickým zbytkem Ser630. Od roku 2006 byly uvedeny na trh sitagliptin, vildagliptin a anagliptin⁷⁷. Další skupinou jsou inhibitory strukturálně odvozené od xantinu. Do této skupiny se řadí nekovalentní inhibitory alogliptin a linagliptin. Oba inhibitory jsou 10 000krát selektivnější pro DPP-4 než pro DPP-8/-9 (cit.^{14,77}).

5.7. Léčba rakoviny cílená na proteasom

Proteasomy proteolyticky degradují nepotřebné nebo špatně sbalené proteiny buňky a tím udržují homeostázu. Proteasom tvoří válcovité proteinový komplex, který je složený ze čtyř vrstev kruhů, které tvoří centrální pór s průměrem 13 Å (13·10⁻¹⁰ m). Vnitřní kruhy jsou tvořeny β podjednotkami, které obsahují tři až sedm aktivních proteasových míst. Jsou umístěna na vnitřním povrchu centrálního póru, kam musí vstoupit substrát, aby byl degradován. Vnější kruhy jsou tvořené α podjednotkami, jejichž funkcí je regulace vstupu do póru⁷⁸.

Inhibice proteasomu brání degradaci pro-apoptických faktorů, jako je protein p53, což umožňuje aktivaci programované buněčné smrti v neoplastických buňkách. Dále tyto inhibitory indukují apoptózu na úrovni regulace prorrůstových proteinů buněčného cyklu. Jako první inhibitor proteasomu byl pro klinické použití v roce 2008 schválen bortezomib, který se používá k léčbě mnohočetného myelomu. Ve své struktuře má atom boru, který se váže do katalytického místa proteasomu. Tato vazba je kovalentní a kineticky reverzibilní. Klinické studie ukázaly, že bortezomib má vliv na rakovinu pankreatu a nádorů souvisejících s B-buňkami (nehodgkinský lymfom, lymfoblastická leukemie). Další generace inhibitorů proteasomu schválených pro léčbu mnohočetného myelomu zahrnuje ixazomib s mechanismem interakce jako bortezomib a carfilzomib s epoxyketonovou reaktivní skupinou⁷⁹.

6. Závěr

Proteasy hrají zásadní roli v řadě patologických procesů, a proto jsou perspektivním cílem pro léčbu mnoha vážných chorob. Pro vývoj léčiv založených na regulaci proteas je nezbytná detailní znalost proteolytických dějů, které jsou charakteristické jak pro přirozený fyziologický, tak i patofyziologický stav. S rozvojem moderních technologií nyní prudce vzrůstá množství nových informací o funkci a stavbě proteas, které umožňují jejich identifikaci a validaci jako molekulárních cílů pro vývoj účinných a bezpečných léčiv. V této oblasti dosáhl v posledních 30 letech farmaceutický výzkum řady úspěchů a v současné době se několik desítek chemoterapeutik na bázi proteasových inhibitorů používá v klinické praxi nebo je v pokročilých stádiích klinického testování. Mezi tyto inhibitory proteas patří např. látky pro léčbu hypertenze, diabetu, hepatitidy C, AIDS, Alzheimerovy choroby a nádorových onemocnění.

Tato práce vznikla za podpory projektu InterBioMed LO1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Seznam zkratk

Aβ	amyloidový β peptid (amyloid β peptide)
ACE	angiotensin konvertující enzym (angiotensin-converting enzyme)
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ADAM	disintegriny a metaloproteasy (a disintegrin and metalloproteinase)
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
APP	amyloidový prekurzorový protein
DPP	dipeptidylpeptidasa
ECM	extracelulární matrix
EGCG	epigalokatechin galát
GABA	γ-aminomáselná kyselina (γ-aminobutyric acid)
GLP-1	glukagonu podobný peptid-1 (glukagon-like

peptid-1)	
HCV	virus hepatitidy typu C (hepatitis C virus)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
MMP	matrixová metaloproteasa
TIMP	tkáňový inhibitor matrixových metaloproteas (tissue inhibitor of metalloproteinases)
TNF-α	faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α)

LITERATURA

- Barrett A. J., McDonald J. K.: *Biochem. J.* 237, 935 (1986).
- Buttle D. J., Mort J. S. (ed.): *Encyclopedia of Biological Chemistry*, str. 516. Elsevier, New York 2004.
- Turk B.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 785 (2006).
- Drag M., Salvesen G. S.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 9, 690 (2010).
- Rawlings N. D., Barrett A. J.: *Biochem. J.* 290, 205 (1993).
- Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D.: *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 68 (2012).
- Berger A., Schechter I.: *Philos. Trans. R. Soc., B* 257, 249 (1970).
- Palermo C., Joyce J. A.: *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 22 (2008).
- Scott C. J., Taggart C. C.: *Biochimie* 92, 1681 (2010).
- Robles N. R., Cerezo I., Hernandez-Gallego R.: *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 19, 14 (2013).
- Lv Z., Chu Y., Wang Y.: *HIV AIDS (Auckl.)* 7, 95 (2015).
- Bonvini P., Zorzi E., Basso G., Rosolen A.: *Leukemia* 21, 838 (2007).
- Fajtová P., Horn M.: *Chem. Listy* 113, 732 (2019).
- Hamada Y., Kiso Y.: *Biopolymers* 106, 563 (2015).
- McKerrow J. H. a 10 spoluautorů: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 263 (2009).
- Hayashi M. A., Camargo A. C.: *Toxicol.* 45, 1163 (2005).
- Patlak M.: *FASEB J.* 18, 421 (2004).
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548912/>, staženo 16. 1. 2020.
- van Esch J. H., van Gool J. M., de Bruin R. J., Payne J. R., Montgomery H. E., Hectors M., Deinum J., Dive V., Jan Danser A. H.: *J. Hypertens.* 26, 706 (2008).
- Redelinguys P., Nchinda A. T., Sturrock E. D.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056, 160 (2005).
- Bode W., Fernandez-Catalan C., Grams F., Gomis-Ruth F. X., Nagase H., Tschesche H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 878, 73 (1999).
- Arpino V., Brock M., Gill S. E.: *Matrix Biol.* 44, 247 (2015).
- Coussens L. M., Fingleton B., Matrisian L. M.: *Science* 295, 2387 (2002).
- Bramhall S. R., Schulz J., Nemunaitis J., Brown P. D., Baillet M., Buckels J. A. C.: *Br. J. Cancer* 87, 161

- (2002).
25. Sparano J. A., Bernardo P., Stephenson P., Gradishar W. J., Ingle J. N., Zucker S., Davidson N. E.: *J. Clin. Oncol.* 22, 4683 (2004).
 26. Ge L. a 16 spoluautorů: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 2913 (2009).
 27. Lombard M. A., Wallace T. L., Kubicek M. F., Petzold G. L., Mitchell M. A., Hendges S. K., Wilks J. W.: *Cancer Res.* 58, 4001 (1998).
 28. Winer A., Adams S., Mignatti P.: *Mol. Cancer Ther.* 17, 1147 (2018).
 29. Caton J., Ryan M. E.: *Pharmacol. Res.* 63, 114 (2011).
 30. Blennow K.: *J. Neurol. Phys. Ther.* 6, 15 (2017).
 31. Postina R.: *Curr. Alzheimer. Res.* 5, 179 (2008).
 32. Bandyopadhyay S., Goldstein L. E., Lahiri D. K., Rogers J. T.: *Curr. Med. Chem.* 14, 2848 (2007).
 33. MacLeod R., Hillert E. K., Cameron R. T., Baillie G. S.: *Future Sci. OA* 1, FSO11 (2015).
 34. De Strooper B., Vassar R., Golde T.: *Nat. Rev. Neurol.* 6, 99 (2010).
 35. Timmers M. a 17 spoluautorů: *Alzheimers. Dement. (N. Y.)* 2, 202 (2016).
 36. Kennedy M. E. a 23 spoluautorů: *Sci. Transl. Med.* 8, 363 (2016).
 37. Eketjall S., Janson J., Kaspersson K., Bogstedt A., Jeppsson F., Falting J., Haeberlein S. B., Kugler A. R., Alexander R. C., Cebers G.: *J. Alzheimers Dis.* 50, 1109 (2016).
 38. May P. C. a 30 spoluautorů: *J. Neurosci.* 35, 1199 (2015).
 39. Henley D. B., May P. C., Dean R. A., Siemers E. R.: *Expert Opin. Pharmacother.* 10, 1657 (2009).
 40. Bergmans B. A., De Strooper B.: *Lancet Neurol.* 9, 215 (2010).
 41. Gillman K. W. a 21 spoluautorů: *ACS Med. Chem. Lett.* 1, 120 (2010).
 42. Doody R. S. a 13 spoluautorů: *N. Engl. J. Med.* 369, 341 (2013).
 43. Menting K. W., Claassen J. A. H. R.: *Front. Aging. Neurosci.* 6, 165 (2014).
 44. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02956486>, staženo 29. 5. 2019.
 45. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01561430?term=NCT01561430&rank=1>, staženo 17. 6. 2018.
 46. Villarreal S., Zhao F., Hyde L. A., Holder D., Forest T., Sondey M., Chen X., Sur C., Parker E. M., Kennedy M. E.: *J. Alzheimers Dis.* 59, 1393 (2017).
 47. Ye N., Monk S. A., Daga P., Bender D. M., Rosen L. B., Mullen J., Minkwitz M. C., Kugler A. R.: *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 7, 233 (2018).
 48. Kopan R., Ilagan M. X.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 499 (2004).
 49. Kimberly W. T., LaVoie M. J., Ostaszewski B. L., Ye W., Wolfe M. S., Selkoe D. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6382 (2003).
 50. Sorensen E. B., Conner S. D.: *Traffic* 11, 1234 (2010).
 51. Golde T. E., Koo E. H., Felsenstein K. M., Osborne B. A., Miele L.: *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2898 (2013).
 52. Niva C., Parkinson J., Olsson F., van Schaick E., Lundkvist J., Visser S. A.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69, 1247 (2013).
 53. Coric V. a 27 spoluautorů: *JAMA Neurol.* 72, 1324 (2015).
 54. Bradbury R. A., Samaras K.: *Diabetes, Obes. Metab.* 10, 441 (2008).
 55. Ghosh A. K., Osswald H. L., Prato G.: *J. Med. Chem.* 59, 5172 (2016).
 56. Hresko R. C., Hruz P. W.: *PLoS One* 6, 25237 (2011).
 57. Hull M. W., Montaner J. S.: *Ann. Med.* 43, 375 (2011).
 58. Cvetkovic R. S., Goa K. L.: *Drugs* 63, 769 (2003).
 59. Cresswell F. V., Tomlins J., Churchill D. R., Walker-Bone K., Richardson D.: *Int. J. STD AIDS* 25, 833 (2014).
 60. Cahn P. E. a 12 spoluautorů: *J. Int. Assoc. Physicians AIDS Care (Chic.)* 3, 92 (2004).
 61. Orman J. S., Perry C. M.: *Drugs* 68, 1435 (2008).
 62. Lefebvre E., Schiffer C. A.: *AIDS Rev.* 10, 131 (2008).
 63. Lackey P., Mills A., Carpio F., Hsu R., DeJesus E., Pierone G., Henegar C., Fusco J., Fusco G., Wohlfeiler M.: *Clin. Drug Investig.* 37, 51 (2017).
 64. He G-X. a 19 spoluautorů: *MedChemComm* 2, 1093 (2011).
 65. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03890120?cond=GS-9674&rank=4>, staženo 29.5.2019.
 66. Chatel-Chaix L., Baril M., Lamarre D.: *Viruses* 2, 1752 (2010).
 67. Grakoui A., McCourt D. W., Wychowski C., Feinstone S. M., Rice C. M.: *J. Virol.* 67, 2832 (1993).
 68. McCauley J. A., Rudd M. T.: *Curr. Opin. Pharmacol.* 30, 84 (2016).
 69. Linas B. P., Nolen S.: *Infect. Dis. Clin. North Am.* 32, 447 (2018).
 70. Zeuzem S.: *Internist. (Berl.)* 59, 528 (2018).
 71. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C: *J. Hepatol.* 66, 153 (2017).
 72. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-mavyret-hepatitis-c>, staženo 29. 5. 2019.
 73. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-vosevi-hepatitis-c>, staženo 29. 5. 2019.
 74. Efendic S., Portwood N.: *Horm. Metab. Res.* 36, 742 (2004).
 75. McIntosh C. H., Demuth H. U., Pospisilik J. A., Pederson R.: *Regul. Pept.* 128, 159 (2005).
 76. Drucker D. J., Nauck M. A.: *Lancet* 368, 1696 (2006).
 77. Li N., Wang L. J., Jiang B., Li X. Q., Guo C. L., Guo S. J., Shi D. Y.: *Eur. J. Med. Chem.* 151, 145 (2018).
 78. Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., Chandu D.: *J. Biosci.* 31, 137 (2006).
 79. Gandolfi S., Laubach J. P., Hideshima T., Chauhan D., Anderson K. C., Richardson P. G.: *Cancer Metastasis Rev.* 36, 561 (2017).

P. Rubešová (^a *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS, Prague*, ^b *University of Chemistry and Technology, Prague*): **Protease Inhibitors as Chemotherapeutics**

Proteolytic enzymes (peptidases or proteases) are involved in a wide range of human pathologies. Therefore, they represent molecular targets for therapeutic intervention, and protease inhibitors are promising chemotherapeutics. These inhibitory drugs are typically developed as small-molecule compounds that block the protease active site. In this area, pharmaceutical research has achieved a number of successes over the past 30 years, and several dozen protease inhibitors are currently used in clinical practice or are in advanced clinical trials. This review focuses on the most important areas of their application, including the treatment of hypertension, diabetes, hepatitis C, AIDS, Alzheimer's disease, and cancer.

Keywords: protease, inhibitor, drug, disease

Seminář k 100. výročí narození mineraloga prof. Jaroslava Bauera

V letošním roce by oslavil prof. Ing. Jaroslav Bauer, CSc., 100. výročí narození. Svůj profesní život spojil s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze. Zabýval se optickou mineralogií, RTG difrakční fázovou analýzou a technologickým využitím minerálních surovin. Byla mu svěřena mineralogická část průzkumu našich korunovačních a dalších historických klenotů a předmětů na Pražském hradě. Jako studenti a spolupracovníci prof. Bauera považujeme za milou povinnost připomenout si toto významné výročí formou odborného semináře, který se uskuteční dne 8. 10. 2020 ve Strahovském klášteře v Praze.

Důležité termíny:

Zaslání předběžné přihlášky: **do 15. 7. 2020**

Distribuce 2. cirkuláře: **do 31. 7. 2020**

Zaslání závazné přihlášky: **do 15. 8. 2020**

Více viz na: <https://www.vscht.cz/seminar-100-vyroci-jaroslava-bauera>

Kontaktní osoba: Ing. David Koloušek, CSc., Ústav chemie pevných látek VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, david.kolousek@vscht.cz, tel. 220 444 088
