

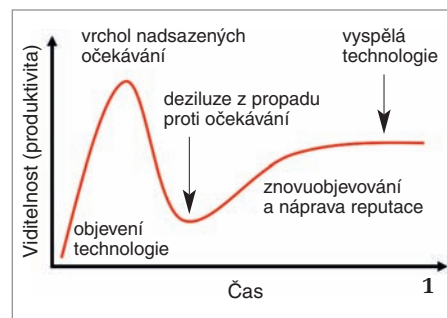
Inhibice proteáz – (r)evoluční návrat prověřené taktiky boje s infekčními chorobami

Moderní vědecké přístupy založené na genomice a molekulární biologii výrazně urychlují identifikaci klíčových molekul podílejících se na patogenezi infekčních onemocnění. Ta přitom stále patří mezi hlavní faktory ohrožující zdraví a prosperitu rostoucí světové populace. Mezi klíčové proteiny produkované patogenními organismy se řadí celá škála proteolytických enzymů (proteáz). Možnost cílené inhibice proteáz virů, patogenních bakterií a parazitů pomocí nízkomolekulárních inhibitorů představuje zásadní strategii pro hledání nových terapeutik proti způsobovaným chorobám. Ze tří novodobých příkladů, uvedených v následujícím příspěvku, lze vyzorovat probíhající renesanci racionálního designu inhibitorů proteáz jako osvědčené cesty k novým lékům na toho času asi nejvýznamnější infekční choroby lidstva – malárii a právě probíhající pandemii covidu-19.

Proteázy – významné faktory virulence

Infekční nemoci vyvolává jejich původce. Tím mohou být různé mikroorganismy – nejčastěji bakterie nebo viry, značná část infekčních chorob je také způsobovaná parazity. Termín parazit pochází z klasického řeckého slova, které se používalo k označení „hosta, který přijde na večeři a neodejde“, nebo „třídy kněží, kteří měli jídlo na veřejné náklady“ (Clitodemus, Athenaeus Grammaticus, asi 378 př. n. l.). V moderním medicínském pojetí slovo parazit označuje eukaryotické organismy, které žijí v hostitelích (endoparaziti) nebo na nich zevně parazitují (ektoparaziti) a mají prospěch ze získávání živin na jejich úkor (odtud český ekvivalent cizopasnici). Mezi parazity se přitom řadí eukaryotické organismy od jednobuněčných protist až po složité mnohobuněčné červy a krevsající členovce, neřadíme mezi

ně houbové organismy (i když v širším biologickém pojetí mohou mít rovněž parazitické strategie podobně jako prokaryota). Existují stovky druhů parazitů infikujících člověka. Globálně se za nejrozšířenější endoparazitární infekce člověka považují toxoplazmóza (původcem je toxoplazma), enterobióza (roupy), askarióza (škrkavky), ankylostomóza (měchovci) a trichomoníáza (bičinky). Jako relativně méně časté, ale člověku nejnebezpečnější, a to zejména v tropických oblastech, se dají označit především malárie (zimničky), amebióza (měňavky), leishmanióza (ničivky), schistosomióza (krevničky) nebo Chagasova choroba (trypanozoma). Tyto nemoci postihují stovky milionů lidí na celém světě, ročně téměř milion usmrtí, a představují tudíž obrovskou sociální a ekonomickou zátěž. Velmi důležití jsou také paraziti hospodářských a divokých



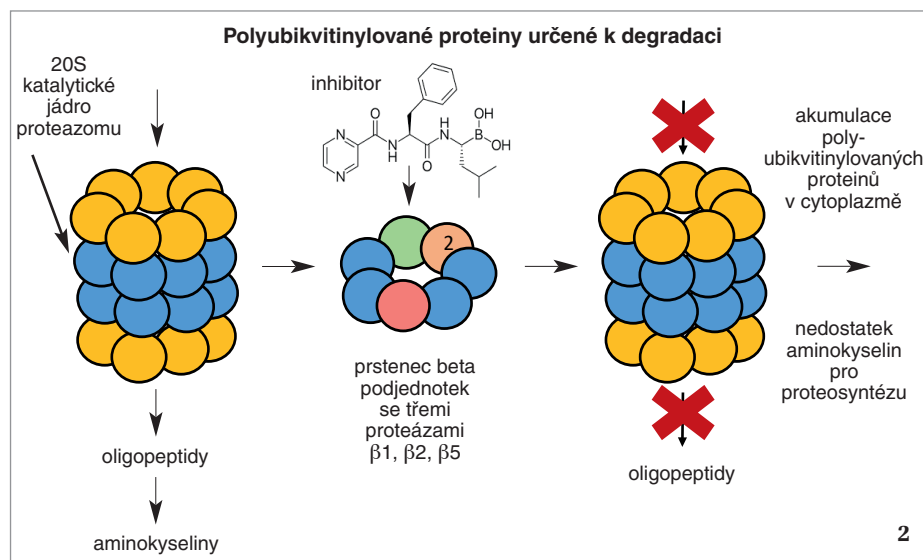
1 Hype křivka firmy Gartner – graf, který ukazuje vyspělost a připravenost nových technologií v čase pomocí jakéhosi životního cyklu technologie (tzv. Hype Cycle). Ten má pět vyznačených fází – od objevení technologie až po jasné definování její použitelnosti jako standardního nástroje produktivity. Blíže v textu

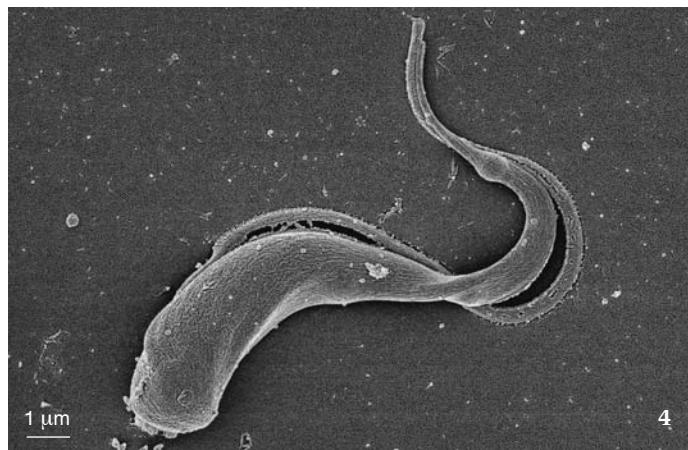
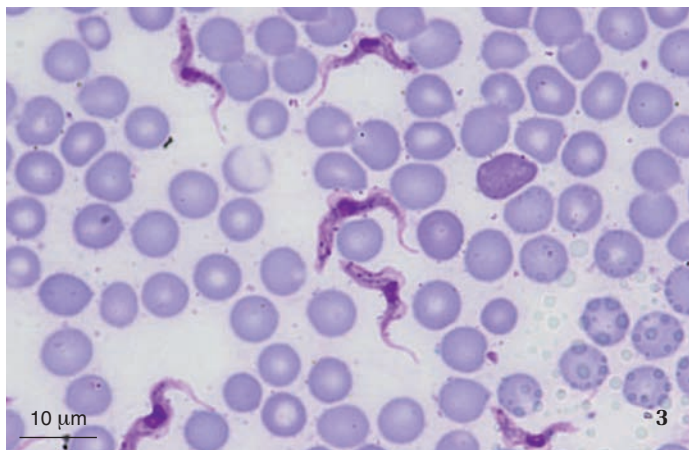
zvířat ovlivňující celosvětové hospodářství a prosperitu lidské populace. Další paraziti pak způsobují nemoci přenosné ze zvířat na člověka (zoonózy).

Mezi hlavními faktory virulence patogenů a parazitů bývají často identifikovány proteolytické děje, důležité pro vývoj a rozmnožování, ale také pro interakci s orgány a buňkami hostitelů včetně bezobratlých přenašečů. Z pohledu biochemie je proteolýza rozkladem proteinů hydrolyzou peptidových vazeb v jejich aminokyselinovém řetězci. Nekatalyzovaná proteolýza přitom probíhá extrémně pomalu a trvá stovky let. Organismy proto již od počátku evoluce používají enzymy, jejichž katalytickou funkci je hydrolyzovat peptidové vazby proteinů. Tato početná skupina enzymů, souhrnně nazývaných proteázy (proteolytické enzymy, proteinázy nebo peptidázy), hraje klíčové role téměř v každém biologickém jevu uvnitř i vně jednotlivých organismů. Typickou rolí je aktivace jiných enzymů jejich cíleným štěpením, které vede ke zpřístupnění aktivního místa substrátům, nebo naopak inaktivace proteinů jejich proteolytickou degradací. Enzymologové klasifikují proteázy do „klanů“ skupených podle mechanismu působení a pojmenovaných podle reziduí nebo chemických skupin zapojených do tohoto mechanismu. Na základě hlavní katalytické aminokyseliny přítomné v aktivním místě enzymu dělíme proteázy na aspartátové, cysteinové, glutamové, serinové a treoninové. K nim se dále řadí metaloproteázy s dvojmocným kovovým iontem navázaným ke zbytkům v katalytickém místě. Serinové proteolytické enzymy jsou v přírodě nejzastoupenější, následované metaloproteázami, cysteinovými, aspartátovými a treoninovými proteázami.

Inhibice proteáz jako strategie léčby infekčních onemocnění

Důkazy o tom, že cílená inhibice proteáz virů, patogenů a parazitů dokáže relativně rychle – řečneme porovnatelně s působením antibiotik – zastavit nebo zcela odstranit infekci z těla obratlovců, pocházejí z poslední dekády 20. století. V té době byly objeveny inhibitory retrovirální proteázy, které jsou dodnes klíčovou součástí léčby infekce HIV a představují asi nejvýznamnější úspěch tohoto přístupu. Stra-

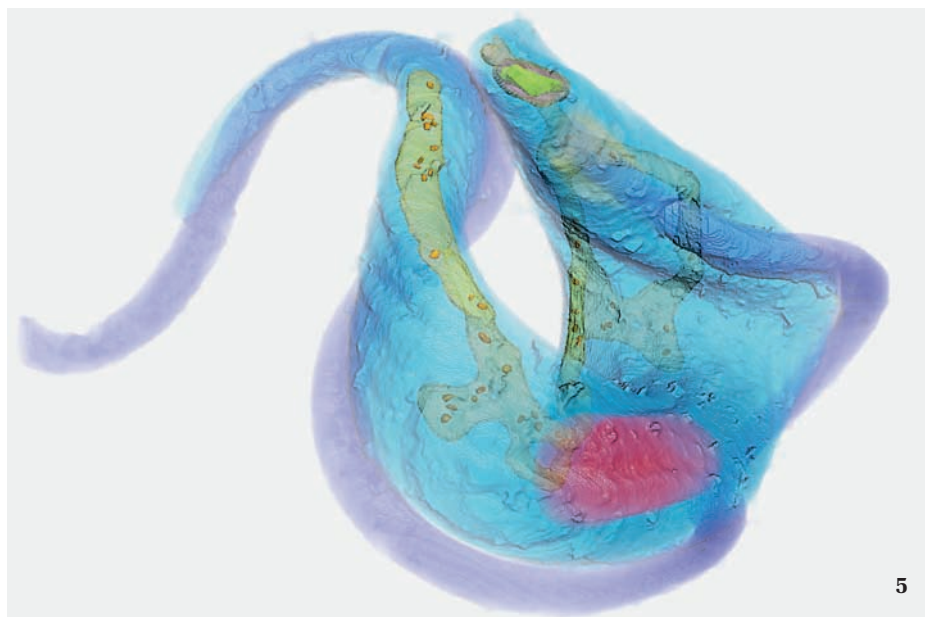




2 Znázornění principu inhibice aktivních katalytických podjednotek proteazomu. Inhibice způsobuje akumulaci proteinů určených k degradaci a nedostatek aminokyselin pro proteosyntézu, v důsledku toho se zastaví buněčné děje a buňka umírá. Inhibice se vyjadřuje hodnotou IC50 (inhibiční koncentrace), která představuje koncentraci zkoušené látky mající za následek 50% úhyn či 50% snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolnímu vzorku. Pokud daný inhibitor přednostně působí na proteazom parazita a při stejné dávce není toxický pro proteazom napadeného hostitele, lze o něm uvažovat jako o potenciálním terapeutiku. Index selektivity (SI) je poměr IC50 hodnot pro parazitické a hostitelské buňky. Čím vyšší je poměr SI, tím bude teoreticky účinnější a bezpečnější nový lék.

3 až 5 Krevní stadium trypanozomy *Trypanosoma brucei* na barveném nátěru krve nakaženého jedince pod světelným mikroskopem (obr. 3), ze skenovacího elektronového mikroskopu (4) a snímek ze 3D transmisního elektronového tomografického modelu (5) s vyznačeným jádrem (červeně), mitochondrií a kinetoplastem (zeleně) a bičíkem (fialově). Foto M. Tesařová (obr. 4) a T. Bílý (5), Laboratoř elektronové mikroskopie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích

tegie cílené inhibice proteáz parazitů byla v té době také ověřena v myších modelech např. u Chagasovy choroby (*Trypanosoma cruzi*) a malárie (*Plasmodium vivax*), kde ale tento přístup narazil při schvalování klinických pokusů vedoucích ke komerčním lékům. V následných letech navíc přístup cílené inhibice proteolytických enzymů v boji s infekcí zdaleka nenaplnil původní očekávání, což vedlo k určité skepsi a odklonění od tohoto přístupu. Vzpomínám si, jak se mnozí starší kolegové v oboru před pěti až deseti lety na různých konferencích věnovaných proteázám podivovali nad výrazným poklesem kdysi enormního zájmu o tyto enzymy ze stran biotechnologických a farmaceutických firem. Nasnadě bylo, že v objevování nových léků, stejně jako v ostatních oblastech vědeckého a technického vývoje, existují mapovatelné módní trendy – strategie inhibice proteáz jako cesta k novým lékům zkrátka nebyla v té době „in“ nebo se tehdy pozornost farmaceutického prů-



myslu z praktických i komerčních důvodů obracela spíše na terapeutické monoklonální protilátky apod. Zájem o proteolytické enzymy jako molekulární cíle pro léčbu totiž celkem přesně sleduje známou křivku Hype Cycle americké výzkumné, poradenské a informační firmy Gartner (obr. 1), představující vyspělost, přijetí a sociální aplikaci konkrétních technologií. Tato křivka demonstruje vývoj od inovace přes přehnaná očekávání a následný propad zájmu a deziluzi až k dosažení stabilních produktivních platform. Jako „zákon“ (či spíše empirickou poučku) ho definoval již v 70. letech 20. století americký vědec a futurolog Roy Amara větu: „Máme sklon přeceňovat význam nových technologií v krátkodobém horizontu a podceňovat jejich dopad v horizontu dlouhodobém.“ Objevování léků na základě proteinové struktury je technika, která přesně sledovala tento trend – byla nesmírně módní během 80. let, po zveřejnění struktury prvních důležitých proteinů použitelných jako cíle pro chemoterapii. Deziluze nastala během následujícího desetiletí snížením kvality těchto „racionálních“ přístupů ve prospěch rozvíjejících se možností kombinatorické chemie a velkokapacitního testování (high-throughput screening). V průběhu poslední dekády se však pomyslné kyvadlo otočilo zpět a tzv. racionální design nových léků pomocí strukturální biologie a proteinového inženýrství aktivních biomolekul je nyní vyspělou vědní dis-

ciplínou, která našla své stabilní místo ve vývoji nových léků. A to bezesporu platí i pro navrhování nových inhibitorů proteáz na základě jejich struktury a fyzikálně-chemických vlastností a testování jejich účinku vůči infekčním chorobám. Důkazem mohou být tři následující příklady jakési renesance tohoto přístupu. První dva se budou týkat parazitů, třetí odbočí k virům a současné pandemii covidu-19.

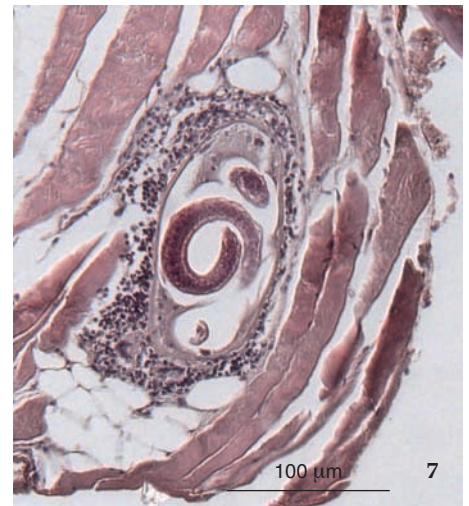
● Selektivní inhibice proteazomu parazitů

Proteazom je velký proteinový komplex odpovědný za řízenou degradaci proteinů, které jsou buňkou označeny malým proteinem ubiquitinem (polyubikvitinylovány). Proteazom je permanentně produkován všemi eukaryotickými buňkami, v jejichž jádru a cytoplazmě se podílí na regulaci mnoha buněčných procesů. Jak je vidět z obr. 2, válcovité 20S katalytické jádro proteazomu je tvořeno dvěma vnějšími prstenci podjednotek α obklopujícími dva vnitřní prstence skládající se ze 7 podjednotek β . V každém ze dvou β prstenců jsou tři proteázy ($\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$) zodpovědné za degradaci proteinů. Cílená inhibice aktivity katalytických podjednotek proteazomu buněk člověka je používanou strategií protinádorové chemoterapie – inhibitory proteazomu epoxyketon carfilzomib a dva peptidové deriváty kyseliny borité, bortezomib a ixazomib, jsou schváleny pro léčbu mnohočetného myelomu.

V posledních letech si však strategie inhibice proteolytických podjednotek proteazomu vybudovala nové renomé také jako účinný způsob léčby infekčních onemocnění. Nové inhibitory, které přednostně působí na parazitární a nikoli na hostitelské proteazomy, jsou považovány za potenciální nová léčiva. Tato strategie byla potvrzena jako účinná u většiny závažných onemocnění způsobovaných jednobuněčnými parazity (Khare a kol. 2016), včetně malárie nebo leishmaniózy, a nemocí, jejichž původci jsou různé druhy trypanozom (např. u spavé nemoci způsobené *T. brucei*, obr. 3–5). Selektivní inhibice proteazomu je také účinnou strategií použitelnou proti schistosomiáze způsobené krevničkou střevní (*Schistosoma mansoni*; Bibo-Verdugo a kol. 2019). To je již relativně komplikovaný mnohobuněčný parazit, evolučně daleko bližší svému hostiteli než jednobuněčná protozoa, proto možnost cílené inhibice proteazomu tohoto parazita předstírá univerzální aplikovatelnost uvedeného přístupu i vůči dalším mnohobuněčným parazitickým helmintům (obr. 6–9). Naše doposud nepublikovaná data naznačují selektivní efekt proteazomových inhibitorů dokonce i vůči krevsajícím klíšťatům, což jsou členovci (kmen Arthropoda). Největší význam přitom mají selektivní inhibitory proteazomu pro léčbu malárie, protože proteazom hraje zásadní roli po celý životní cyklus zimničky tropické (*Plasmodium falciparum*), a inhibitory tak vykazují účinnost proti všem jejím životním stádiím (Li a kol. 2016). Konstrukce nových antimalarik vychází ze 6 „zavedených tříd“ inhibitorů proteazomu: β -laktonů, α - a β -epoxyketonů, peptidových aldehydů, kyseliny borité, vinylsulfonů a cyklických peptidů. Nejnovější generace těchto inhibitorů dosahují o dva až tři řády vyšší selektivity vůči proteazomu zimničky tropické než vůči proteazomu savčího hostitele. To vytváří silný předpoklad pro minimální toxicitu a vedlejší účinky nových antimalarik založených na inhibici proteazomu. Tyto inhibitory navíc působí i na kmene *P. falciparum*, které jsou rezistentní k léčbě aktuálně používanými antimalariky. Proteazomové inhibitory kromě toho mohou při kombinovaném podání např. s artemisininem – antimalarikum původem z pelyňku ročního (*Artemisia annua*), za jehož objev byla v r. 2015 udělena Nobelova cena za fyziologii nebo medicínu – vykazovat synergetický účinek, což silně podporuje další snahy o vývoj komplexních léků založených na vhodné kombinaci těchto látek.

● Plazmepsiny – znovuobjevené molekulární cíle pro léčbu malárie

Druhým příkladem jsou aspartátové proteázy zimničky tropické a jiných zástupců výtrusovců (Apicomplexa), které jsou strukturně i evolučně příbuzné lidskému pepsinu nebo lyzozomálnímu katepsinu D. Tyto enzymy využívají dvou zbytků kyseliny asparagové ve svém aktivním místě a vynikají schopností specificky najít unikátní štěpné místo uvnitř proteinu a štěpit ho na velké peptidové úseky – patří mezi endoproteázy. Proto je organismy často používají ke specifickému cílení štěpení vybraných proteinů a mnohdy tak plní zásadní

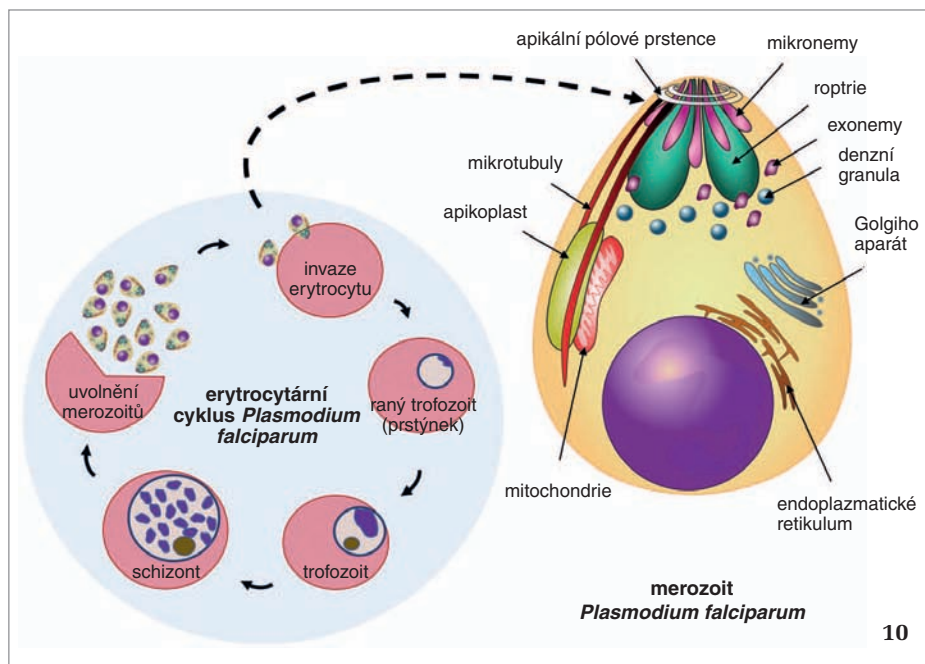


6 až 9 Selektivní inhibice proteazomu je ověřenou strategií i proti mnohobuněčným helmintům. Dospělci krevničky střevní (*Schistosoma mansoni*, motolice – Trematoda, obr. 6), cysta svalovce stočeného (*Trichinella spiralis*, hlístice – Nematoda) v preparátu svalové tkáně obratlovce (7), vlasovec oční (*Loa loa*, hlístice), izolovaný z podkoží člověka (8) a dospělec motolice thajské (*Opisthorchis viverrini*) izolovaný ze střeva kočky domácí (9).

Snímky R. Kuchty, Laboratoř helmintologie Parazitologického ústavu BC AV ČR, pokud není uvedeno jinak

10 Cyklus zimničky tropické (*Plasmodium falciparum*) v červených krvinkách (erythrocytech člověka, vlevo). Po invazi krvinky je parazit obklopen parazitoformní vakuolou, která přetrvává během vývoje v raný trofozoit (prstýnek), trofozoit až po mnohojaderný schizont. Ze schizontu vznikají noví jedinci (schizogonie), parazitoformní vakuola se rozpadá, dochází k narušení červené krvinky a dceřiní merozoiti se uvolní. Proces se cyklicky opakuje. Fialově – jádro, hnědě – trávicí vakuola, kde probíhá trávení hemoglobinu. Vpravo schematický detail merozoitu zimničky tropické. Apikální komplex, důležitý pro invazi a uvolnění z krvinek, se skládá ze strukturální části tvořené pólovými prstenci, na které se upínají subpelikulární mikrotubuly vybíhající dále do buňky. Mikronemy, roptrie, denzní granula a exonemy představují sekretorickou část apikálního komplexu, která se účastní procesů uvolnění a invaze červených krvinek. Blíže v textu. Všechny orig. D. Sojka

biologické role. U výtrusovců tato skupina enzymů prodělala zajímavý vývoj, kdy genovou duplikací a mutací původního genu kódujícího aspartátovou proteázu podobnou pepsinu došlo k tomu, že většina genomů těchto organismů kóduje hned několik homologních variant (izoenzymů) aspartátových proteáz. Jejich následný vývoj do 6 evolučních podskupin je spojen s různými funkcemi důležitými pro parazitární způsob života a pro uzavření komplikovaného životního cyklu výtrusovců (Sojka a kol. 2016). Genom zimničky kóduje celkem 10 navzájem příbuzných aspartátových proteáz podobných savčímu pepsinu a souhrnně nazývaných plazmepsiny



10

(uváděných zkratkou PpFM a římským číslem I–X), přičemž plazmepsin III se označuje jako histo-aspartátová proteáza (HAP).

Plazmepsiny jsou již po desetiletí považovány za potenciální cíle antimalarických léků vzhledem k známému účinku léků založených na inhibici aspartátové proteázy HIV, na koinfekci malárie u HIV pozitivních pacientů. Jako cílové enzymy efektu inhibitorů HIV proteázy byly zprvu pokládány plazmepsiny PpPMI, PpPMII, PpPMIV a HAP, podílející se na trávení hemoglobinu, který *P. falciparum* využívá jako zdroj aminokyselin ke splnění svých nutričních požadavků během invaze červených krvinek hostitele (obr. 10). To ale bylo později vyvráceno s poukazem na značnou schopnost funkční zaměnitelnosti (redundanci) trávících plazmepsinů a cysteininových proteáz – tzv. falcipainů. PpPMVI, PpPMVII a PpPMVIII nejsou produkovány krevními stadii zimničky – zřejmě hrají klíčovou roli v interakcích mezi parazitem a přenašečem (komárem). Role posledních tří plazmepsinů, PpPMV, PpPMIX a PpPMX, byla objasněna teprve nedávno, a to zejména za výrazné podpory nových metod funkční genomiky.

Značnému zájmu se v poslední dekádě těší PpPMV, aspartátová proteáza lokalizovaná do sekretorického aparátu buněk parazita *P. falciparum* – konkrétně do endoplazmatického retikula (ER). PpPMV je zodpovědný za proteolytické štěpení tzv. PEXEL motivu na N-konci několika stovek proteinů produkovaných parazitem a tímto způsobem jim umožňuje, aby byly vyloučeny skrze parazitoforní vakuolu obklopující parazita až do hostitelské krvinčičky (Boddey a kol. 2010). Je tedy „vrátným“, jenž po předložení vstupenky v podobě PEXEL motivu umožní sekreci těchto proteinů do hostitelské buňky, kterou následně proteiny modifikují ve prospěch přežití a množení parazita. PpPMV je proto nezbytný pro rozvoj malárie a jeho inhibice pomocí nanomolárních koncentrací peptidových inhibitorů imitujících motiv PEXEL vede k eliminaci parazita z krve hostitele.

V nedávné době se pak podařilo zjistit specifické funkce PpPMIX a PpPMX (Pino

a kol. 2017). Jejich role souvisí s unikátní schopností výtrusovců parazitovat a rozmnožovat se uvnitř jiných eukaryotických buněk. Invazivní stadia výtrusovců (zoiti) používají k aktivní invazi do hostitelských buněk jedinečný aparát známý jako apikální komplex (odtud název celého kmene Apicomplexa). Skládá se ze strukturálních částí (u merozoitů krevničiek jsou to tubuly a polární kruhy), kterou doplňují tři typy sekrečních organel – vláknité mikronemy, lahovitě roptrie a tzv. denzní granula (obr. 10). Tyto orgány vylučují obrovské množství proteinů zprostředkujících invazi a modifikaci hostitelských buněk. Mnoho těchto proteinů je produkováno ve formě neaktivních prekurzorů vyžadujících proteolytickou aktivaci pomocí specifických proteáz. Mezi ty relativně dobře popsané asociované s apikálním komplexem patří serinové proteázy podobné subtilizinům z bakterie *Bacillus subtilis*, které jsou u *P. falciparum* označovány jako PpSUB1, 2 a 3 (Sajid a kol. 2000) a lokalizovány do speciálního typu denzních granul – exonem. Nově se k těmto proteázám řadí i navzájem blíže příbuzné plazmepsiny PpPMIX a PpPMX, u nichž se v nedávné době prokázalo, že jsou nezbytné v krevním stadiu malárie pro opuštění napačených a k invazi do nových červených krvinek hostitele. PpPMIX se nachází v roptriích a může být aktivujícím enzymem (tzv. maturázou) pro proteiny v této organelle. PpPMX je vyžadován pro správnou proteolytickou aktivaci PpSUB1, tudíž zřejmě stojí v aktivační kaskádě nad ním, a je tak nadřazeným proteolytickým enzymem. PpPMIX a PpPMX jsou selektivně inhibovatelné peptidomimetickým hydroxyetylaminem 49c, ale i jinými inhibitory. Tyto látky úspěšně blokují cyklické množení malarických plasmodií, a to jak v kultuře červených krvinek infikovaných *P. falciparum*, tak v myších infekčních modelech malárie. Efekt je patrný ve velmi nízkých (subnanomolárních) koncentracích a dané sloučeniny tak představují značný potenciál pro vývoj nové generace velmi účinných antimalarik bez nežádoucích vedlejších účinků.

● Inhibitory SARS-CoV-2 proteáz jako nové léky proti covidu-19?

Posledním názorným příkladem renesance terapeutických strategií založených na aplikaci nízkomolekulárních inhibitorů proteáz je aktuální celosvětová snaha o vyvinutí účinné léčby covidu-19, které jsme podrobně věnovali pozornost v únorovém vydání loňské *Živy* (2020, 2: XXX–XXXI). Koronaviry včetně SARS-CoV-2 obsahují genom složený z jednoho dlouhého řetězce RNA, kódujícího syntézu dvou dlouhých polyproteinů 1a a 1ab, které virus potřebuje k replikaci nových virových částic. Tyto polyproteiny tvoří vlastně jeden řetězec aminokyselin složený z jednotlivých proteinů potřebných pro replikaci/transkripci genetické informace v hostitelských buňkách a několik strukturálních virálních proteinů. Kromě toho polyproteiny obsahují dvě proteázy: SARS-CoV-2 hlavní proteáza M^{pro} (známou také jako 3CL proteáza nebo 3CL^{pro}) a cysteininovou proteázu PL^{pro}. Obě mají zásadní úlohu při množení viru v infikované buňce, protože štěpí zmíněné polyproteiny kódované virem na jednotlivé funkční proteinové celky, a přirozeně tak představují atraktivní cíle pro specifickou léčbu onemocnění covid-19 spočívající v jejich inhibici (Ulrich a Nitsche 2020). SCoV2-PL^{pro} navíc proteolyticky působí proti ubikvitinylaci a proti cytokiny indukované ISGylací proteinů – značení proteinů produktem interferon-stimulovaného genu 15 (ISG15, Shin a kol. 2020). Tím zásadně mění hostitelskou imunitní odpověď na virovou infekci. Deaktivace proteázy SCoV2-PL^{pro} pomocí inhibitorů, jako je GRL-0617, tak kromě negativního vlivu na množení viru v těle zabraňuje jeho cytopatogenním účinkům – cílená inhibice SCoV2-PL^{pro} proto může jak potlačit infekci SARS-CoV-2, tak podporovat antivirovou imunitu infikovaných jedinců.

Mnoho výzkumných týmů a farmaceutických společností v současné době používá nejmodernější techniky pro racionální navrhování a vývoj nových inhibitorů na základě proteinové struktury a fyzikálně-chemických vlastností aktivního místa SARS-CoV-2 proteáz. Nové inhibitory mají za cíl selektivně inhibovat proteázy SARS-CoV-2 a některé jsou již ve fázi klinických studií. To jen potvrzuje renesanci nebo spíše časem prověřenou vyspělost racionálního designu proteázových inhibitorů jako platformy použitelné pro hledání nových léčiv, a to i v případě výzev, jako je boj s celosvětovou pandemií.

Podpořeno projektem Grantové agentury České republiky (18-01832S) a Centrem pro výzkum patogenity a virulence parazitů (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000759), financovaným Evropským fondem pro regionální rozvoj (ERDF) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy. Snímky z elektronového mikroskopu byly pořízeny za podpory Národní infrastruktury pro biologické a medicínské zobrazování (Czech BioImaging – LM2015062).

Použitá literatura uvedena na webové stránce *Živy*. K dalšímu čtení např. *Živa* 2003, 3 a 5; 2015, 3: 101–104; 2019, 5: 264–266; 2020, 6: 282–285.