

Antivirové peptidy a jejich využití pro léčbu chřipky

Sylvie Skaličková^a, Ondřej Zítka^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Therapeutical application of antiviral peptides against influenza virus

Influenza spreads around the world in seasonal epidemics and it is caused by a variety of species and strains of viruses, in any given year some strains can die out while others create epidemics, while yet another strain can cause a pandemic. The peptides may present the new generation of antiviral drugs with the broad spectrum of activity. The antiviral effects depend on their structure as well as the target part of the virus. We showed the manner of action of peptides on the influenza virus. The entry blocker peptides interact with hemagglutinin and inhibit the viral fusion. Furthermore the peptides are capable to disrupt viral envelope or block the viral replication. The perceptivity of therapeutic peptides is supported by wild abilities of their synthesis, possibility of modifications, synthesis for specific action, minimizing the emergence of resistance. Clearly, all these studies are promising, and need to be expanded.

Přijato k publikování: 21. 5. 2014

Klíčová slova: antivirové peptidy, protivirová terapie, virus chřipky

Úvod

Součástí vrozeného a adaptovaného imunitního systému všech savců jsou peptidy¹, které vykazují účinnou chemickou obranu eukaryotických buněk proti bakteriím, houbám a virům². V současnosti jsou často diskutované peptidy se schopností inhibovat virové infekce jako je HIV, hepatitis, herpes simplex a v neposlední řadě virus chřipky³. Mimo přírodní peptidy vytvořené živočišnými organismy pro obranu před patogeny, je zde velký pokrok v jejich laboratorní přípravě. A to jak za pomoci bakteriofágů, tak syntézou umělou, obvykle na pevném nosiči⁴. Pomocí moderních metod, například knihovnou fágového displeje (Ph. D.), lze sledovat interakce mezi peptidem a virem, ale i navrhnout vhodné sekvence, které by vykazovaly nejvyšší účinnost proti danému viru⁵. Neméně užitečné jsou také softwarové programy umožňující provedení prediktivních studií, kterými je možné sledovat možnosti protein-protein, protein-peptid interakce a lze zaznamenat změny konformace původního proteinu⁶. Neméně studovanou oblastí antivirových pep-

tidů je jejich enkapsulace do nanotransportérů jako jsou liposomy nebo různé nanokonstrukty. Díky tomuto propojení lze na jedné straně zvýšit jejich selektivitu a účinnost ochranou proti biodegradaci v organismu a na straně druhé volbou vhodného transportéru lze zamezit jejich toxicitě vůči okolním buňkám v organismu⁷.

Chemické a fyzikální vlastnosti peptidů

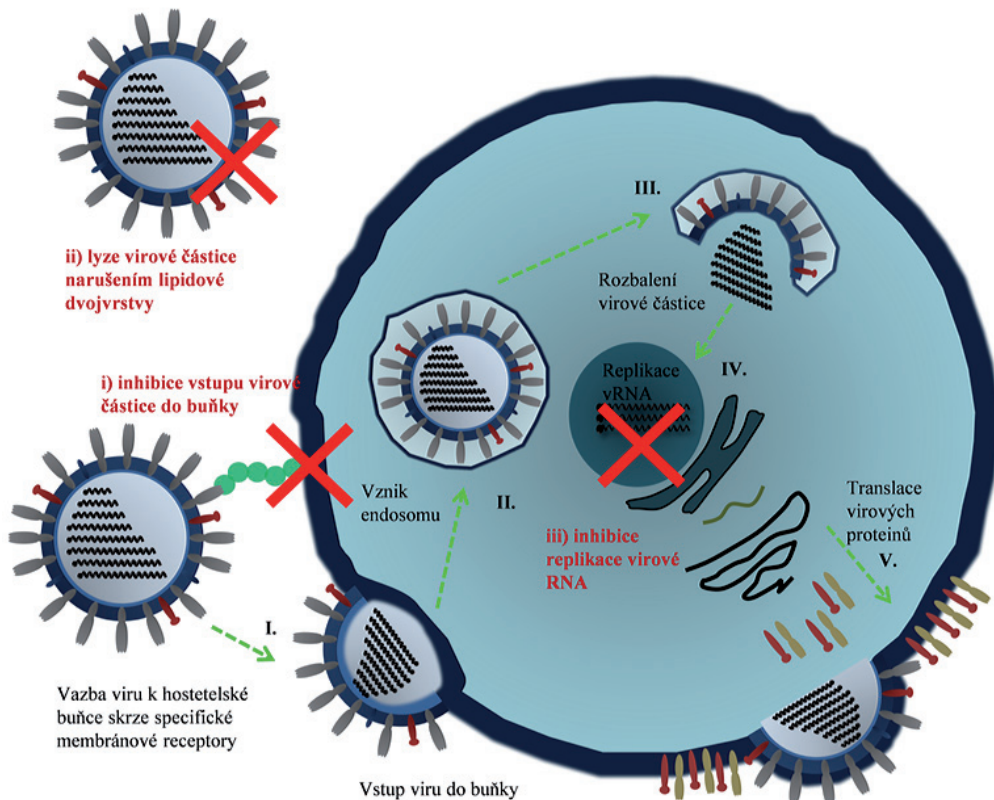
Primární struktura peptidu a případně z ní vyplývající sekundární struktura ovlivňují jeho výsledný náboj. Z tohoto pohledu lze peptidy rozdělit na anionické, a kationické. Anionické peptidy vykazují celkový náboj v rozmezí od -1 do -7 a je u nich běžná posttranslační modifikace při jejich biologické syntéze, která je klíčová pro antimikrobiální aktivitu. Kationické peptidy vykazují celkový náboj od +2 do +9 a amfipatické vlastnosti, které jim umožňují reagovat a narušovat lipidové membrány patogenních mikroorganismů⁸. Zatímco primární struktura je u většiny peptidů značně homologní, u sekundárních struktur dochází

ke značné konformační variabilitě. Na základě sekundární struktury peptidů je lze rozdělit na α -helikální peptidy tvořící nejpočetnější skupinu a konformaci β -listu, která se vyznačuje poměrně malým množstvím helikálních domén organizovaných dle amfipaticity. Mimo tyto dvě nejpočetnější skupiny se vyskytují peptidy s rozvolněnou strukturou, nebo uspořádané do smyčky. Všechny peptidy vykazují schopnost tvořit amfipatickou nebo amfilní konformaci, která je charakteristická periodicky se opakujícími úseky, ve kterých se střídají hydrofobní a hydrofilní domény⁹. Díky různorodé struktuře peptidů se mění jejich hydrofobicita, velikost, náboj, amfipatie, úhly polárních vazeb tak stejně jako tyto vlastnosti určují jejich mechanismus účinku a specifitu,

kteřá je dána rozdíly ve složení a struktuře membrán savčích buněk a virů¹⁰.

Interakce virů s peptidy

Interakce peptidů s částicí viru nejsou dosud komplexně prozkoumány, avšak byly obecně popsány tři mechanismy: i) peptidy interagují se složkami virové obálky a tím je dosažena inhibice adheze a invaze částice do hostitelské buňky, ii) peptidy naruší lipidovou dvojvrstvu virové obálky obdobně jako je tomu u patogeních mikroorganismů a dochází k lyzi částice, iii) peptidy inhibují replikaci virové RNA či DNA, většinou interakcí s virovou DNA/RNA polymerázou, která katalyzuje replikaci nukleové kyseliny¹¹ (**Obr. 1**).



Obrázek 1: Schéma působení peptidů v protivirové terapii: i) peptidy interagují se složkami virové obálky a tím je dosažena inhibice adheze a invaze částice do hostitelské buňky, ii) peptidy naruší lipidovou dvojvrstvu virové obálky a dochází k lyzi částice, iii) peptidy inhibují replikaci virové RNA či DNA, většinou interakcí s virovou DNA/RNA polymerázou

Peptidy interagující se složkami virové obálky (blokátory vstupu)

Chřipkový virus je pleomorfní částice sférického nebo vláknitého tvaru. Virová RNA je uložena v helikoidální kapsidě a nukleokapsida je obalena lipidovou membránou, které na svém povrchu nese dva glykoproteiny hemaglutinin (HA) a neuramidiázu, zodpovědné za patogenitu viru¹². Působení antivirových peptidů je zaměřeno na interakci s těmito proteiny tím, že je omezena nebo zastavena jejich funkce a virus tak není schopen proniknout do hostitelské buňky¹³. Do této skupiny patří 20-ti aminokyselinový peptid, odvozený od signální sekvence růstového faktoru⁴ fibroblastů, který se specificky váže na chřipkový HA protein u většiny mutací chřipkových virů *in vivo* i *in vitro*. Mimo jiné vykazuje nízkou cytotoxicitou vůči tkáňovým buňkám¹⁴. Peptid C₁₇H₃₅CO-ARLPRTMVHPKPAQP-NH₂ s konzervativní sekvencí ARLPR, který se přímo váže na podjednotku hemaglutininu byl navržen pomocí knihovny fágového displeje. Díky strukturální podobnosti s kyselinou sialovou blokuje vstup viru do hostitelské buňky. Další antivirové peptidy patří do skupiny cyklických delta defenzinů, tzv. retrocyklinů, které jsou tvořeny spojením N a C domény dvou peptidů^{13,15}. Předchozí studie potvrdily jejich schopnost inhibovat fúzi HIV viru s hostitelskou buňkou a podobným mechanismem přes HA také fúzi viru chřipky^{16,17}.

Peptidy působící na virovou obálku

Virová obálka se formuje z buněčné membrány hostitelských buněk^{18,19}. Obálky chřipkového viru jsou bohaté na sfingolipidy a cholesterol²⁰, který jim udává amfipatické vlastnosti a negativní náboj²¹ vytvářející elektrostatické membránové interakce s pozitivně nabitými kationickými antimikrobiálními peptidy^{22,23}. Peptidy náležící do skupiny katelicidinů jsou zapojeny do imunitního systému²⁴ a vykazují schopnost přímo deaktivovat virovou částici narušením lipidové dvojvrstvy²⁵. První izolovaný peptid z této skupiny je lidský LL-37 peptid²⁶. Jeho účinky byly studovány na viru způsobující neštovice (VACV), který patří do stejné rodiny jako chřipkový virus. Mechanismus účinku byl popsán pomocí kobercového modelu²⁵, kdy se

peptidy nevmezeřují do membrány, ale seřazují se paralelně k dvojvrstvě, setrvávají v kontaktu s lipidovými skupinami a pokrývají okolní oblast. Orientace peptidů vede k lokálním poruchám ve stabilitě membrány, což má za následek tvorbu trhlin, vytékání složek cytoplazmy, porušení membránového potenciálu a ve výsledku dezintegraci membrány. Dalším peptidem, u kterého byly prokázány antivirotické účinky je melitin (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂), který byl izolován z jedu včely evropské (*Apis mellifera*)^{27,28}. Bylo potvrzeno, že jeho primární struktura je schopna deformovat lipidovou dvojvrstvu, vytvářet umělé póry, což vede k protržení a lyzi virové částice²⁹. S tímto peptidem jsou spojovány dva mechanismy účinku; a to kobercový model³⁰ a model toroidního póru^{31,32}, který je charakteristický shlukem peptidů na povrchu mikrobiální membrány podobně jako je tomu u kobercového modelu. Následně dochází k postupnému vkládání peptidů do lipidové dvojvrstvy kolmo k mikrobiální membráně a tím dochází k její deformaci.^{33,34} Zcela odlišným mechanismem se vyznačují peptidy, které jsou schopné se koncentrovat v prostředí o nízkém pH (pHlip), například v místě infikované plicní tkáně. Tyto peptidy jsou ve vodě rozpustné membránové peptidy, slabě reagující s buněčnou membránou při neutrálním pH bez toho aniž by vstoupily do lipidové dvojvrstvy. Pokud je pH prostředí nižší než 7, pHlip peptidy vstoupí do membrány a vytváří stabilní transmembránové α -helix struktury, které lze využít jako nosič různých léčiv určených pro inaktivaci virové částice³⁵.

Peptidy, které jsou schopny inhibovat replikaci virové RNA

Pod virovým obalem se nachází strukturální matrixový protein M1 obalující molekulu RNA, nukleoprotein tvořící kapsidu a virovou RNA polymerázou, která je nezbytná pro virovou transkripci. Peptidová terapie je v tomto případě zacílena na interakci s virovou RNA polymerázou, která je složena ze tří proteinových podjednotek PB1, PB2 a PA, kódovaných třemi segmenty virového genomu^{36,37}. Polymerázový komplex se specificky naváže na 5'-konec genomové RNA, tím se aktivuje k vazbě na čepičku

buněčné mRNA. Dochází ke změně konformace genomové RNA do vlásenkové struktury, čímž se aktivuje endonukleáza polymerázového komplexu. Endonukleáza štěpí čepičku buněčné mRNA a dojde k vytvoření aktivního transkripčního komplexu³⁸. Antivirová terapie je v tomto případě zacílená na interakci mezi virovou polymerázou a peptidem, který navázáním na specifický úsek virové polymerázy zabrání jejímu rozštěpení a tím nedochází k transkripci virového genomu. Příkladem zmíněného způsobu inhibice je 25 aminokyselinový peptid odvozený z N domény PB1 podjednotky, kde navázáním na specifické místo trimeru způsobí narušení vazby PA-PB³⁹. V porovnání s ostatními druhy terapeutik přináší peptidy, které inhibují virus chřipky interakci s virovou polymerázou, mnoho výhod v antivirové terapii v porovnání s ostatními druhy léčiv. Oproti jiným terapeutikům mají odlišný mechanismus účinku a tím výrazně snižují pravděpodobnost křížové rezistence. Dále mají nepostradatelné aminokyseliny pro podjednotky PB1, PB2 a PA velmi konzervativní sekvence u všech kmenů viru chřipky a tím jsou účinné v širokém spektru virových rodů. V neposlední řadě je zde možnost zacílit odlišné interakční místa v polymerázovém komplexu, například mezi PA a PB1, tak jako mezi PB1 a PB2. Díky tomu lze vytvořit antivirový „koktejl“, který by měl značnou účinnost proti mutantům viru, které unikly působení protilátek⁴⁰.

Závěr

Chřipkové viry pravidelně způsobují každoroční epidemii, která prochází napříč světem. Současné terapeutické přístupy mají proti viru dostatečnou efektivitu, avšak díky častým mutacím chřipkového genomu dochází k rezistenci tohoto viru proti již některým používaným léčivům. Peptidová terapie představuje novou generaci antivirotik se širokým spektrem působení. Jejich účinek může být zacílený i na bakteriální infekce, které se často spouští po oslabení organismu vzniklou virózou. Antivirové působení peptidů závisí na jejich struktuře stejně tak jako na cíli inhibice virové částice. V tomto přehledu jsou uvedeny hlavní strategie antivirové terapie proti viru chřipky. Peptidy blokující vstup do

hostitelské buňky interagují s povrchovým glykoproteinem hemaglutininem a tím zabrání vstup virové částice do hostitelské buňky. Další skupina peptidů je schopna narušit lipidový obal viru a tím částici lyzovat a inaktivovat. Nejrozšířenějším modelem pro tyto interakce je kobercový model nebo model toroidního póru, avšak není vyloučeno, že ostatní peptidy mohou vykazovat další mechanismy účinku jako je model sudové skruže nebo micelárních agregátů. Neméně významnou skupinou jsou peptidy, které přímo inhibují replikaci viru a to interakci s virovou RNA polymerázou. Antivirové peptidy se jeví jako perspektivní terapeutika nejen proti viru chřipky, ale také i pro ostatní virové onemocnění, například HIV, VACV nebo lidského papilomaviru (HPV).

Tato práce byla financována z projektu PGS17_2013

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Wiesner J., Vilcinskas A.: Virulence, 1, 440 (2010).
2. Lok S. M., Costin J. M., Hrobowski Y., Hoffmann A. R., Rowe D. K., Kukkaro P., Holdaway H., Chipman P., Fontaine K. A., Holbrook M. R., Garry R. F., Kostyuchenko V., Wimley W. C., Isern S., Rossmann M. G., Michael S. F.: Plos One, 7, (2012).
3. Albericio F., Kruger H. G.: Future Medicinal Chemistry, 4, 1527 (2012).
4. Saladino R., Botta G., Crucianelli M.: Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 12, 277 (2012).
5. Castel G., Chteoui M., Heyd B., Tordo N.: Molecules, 16, 3499 (2011).
6. Hetenyi C., van der Spoel D.: Protein Science, 11, 1729 (2002).
7. Rajendran L., Knoelker H.-J., Simons K.: Nature Reviews Drug Discovery, 9, 29 (2010).
8. Teixeira V., Feio M. J., Bastos M.: Progress in Lipid Research, 51, 149 (2012).
9. Doležilková I., Macková M., Macek T.: Chemické Listy, 105, 346 (2011).
10. Brogden K. A.: Nature Reviews Microbiology, 3, 238 (2005).

11. Yang J., Li M. M., Shen X. T., Liu S. W.: *Viruses-Basel*, 5, 352 (2013).
12. Medina R. A., Garcia-Sastre A.: *Nature Reviews Microbiology*, 9, 590 (2011).
13. Cederlund A., Gudmundsson G. H., Agerberth B.: *Febs Journal*, 278, 3942 (2011).
14. Jones J. C., Turpin E. A., Bultmann H., Brandt C. R., Schultz-Cherry S.: *Journal of Virology*, 80, 11960 (2006).
15. Doss M., White M. R., Tecle T., Gantz D., Crouch E. C., Jung G., Ruchala P., Waring A. J., Lehrer R. I., Hartshorn K. L.: *Journal of Immunology*, 182, 7878 (2009).
16. Wang W., Cole A. M., Hong T., Waring A. J., Lehrer R. I.: *Journal of Immunology*, 170, 4708 (2003).
17. Doss M., Ruchala P., Tecle T., Gantz D., Verma A., Hartshorn A., Crouch E. C., Luong H., Micewicz E. D., Lehrer R. I., Hartshorn K. L.: *Journal of Immunology*, 188, 2759 (2012).
18. Nayak D. P., Barman S.: *Advances in Virus Research*, Vol 58, 58, 1 (2002).
19. Ono A., Freed E. O.: *Virus Structure and Assembly*, 64, 311 (2005).
20. Schaap I. A. T., Eghiaian F., des Georges A., Veigel C.: *Journal of Biological Chemistry*, 287, 41078 (2012).
21. Needham B. D., Trent M. S.: *Nature Reviews Microbiology*, 11, 467 (2013).
22. Anaya-Lopez J. L., Lopez-Meza J. E., Ochoa-Zarzosa A.: *Critical Reviews in Microbiology*, 39, 180 (2013).
23. Mercer D. K., O'Neil D. A.: *Future Medicinal Chemistry*, 5, 315 (2013).
24. Barlow P. G., Svoboda P., Mackellar A., Nash A. A., York I. A., Pohl J., Davidson D. J., Donis R. O.: *Plos One*, 6, e25333 (2011).
25. Dean R. E., O'Brien L. M., Thwaite J. E., Fox M. A., Atkins H., Ulaeto D. O.: *Peptides*, 31, 1966 (2010).
26. Bals R., Wang X. R., Zasloff M., Wilson J. M.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 9541 (1998).
27. Raghuraman H., Chattopadhyay A.: *Bioscience Reports*, 27, 189 (2007).
28. Lee M. T., Hung W. C., Chen F. Y., Huang H. W.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 5087 (2008).
29. Ladokhin A. S., White S. H.: *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1514, 253 (2001).
30. Lu N.-Y., Yang K., Li J.-L., Yuan B., Ma Y.-Q.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828, 1918 (2013).
31. Gordon-Grossman M., Zimmermann H., Wolf S. G., Shai Y., Goldfarb D.: *Journal of Physical Chemistry B*, 116, 179 (2012).
32. Gordon-Grossman M., Gofman Y., Zimmermann H., Frydman V., Shai Y., Ben-Tal N., Goldfarb D.: *Journal of Physical Chemistry B*, 113, 12687 (2009).
33. Oren Z., Shai Y.: *Peptide Science*, 47, 451 (1998).
34. Benachir T., Lafleur M.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1235, 452 (1995).
35. Li N., Yin L., Thevenin D., Yamada Y., Limmon G., Chen J. Z., Chow V. T. K., Engelman D. M., Engelward B. P.: *Future Microbiology*, 8, 257 (2013).
36. Neumann G., Brownlee G. G., Fodor E., Kawaoka Y.: *Biology of Negative Strand Rna Viruses: The Power of Reverse Genetics*, 283, 121 (2004).
37. Deng T., Sharps J., Fodor E., Brownlee G. G.: *Journal of Virology*, 79, 8669 (2005).
38. Martin-Benito J., Ortin J.: *Advances in Virus Research*, Vol 87, 87, 113 (2013).
39. Chase G., Wunderlich K., Reuther P., Schwemmler M.: *Methods*, 55, 188 (2011).
40. Palu G., Loregian A.: *Antiviral Research*, 99, 318 (2013).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.