

Received: 2009.06.02
Accepted: 2009.06.26
Published: 2009.07.22

Peptydy – nowa klasa leków przeciwnowotworowych*

Peptides: A new class of anticancer drugs

Ryszard Smolarczyk, Tomasz Cichoń, Stanisław Szala

Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Peptydy są nową klasą leków przeciwnowotworowych. Można je podzielić na dwie podklasy: peptydy przeciwbakteryjne, które preferencyjnie wiążą się z komórkami nowotworowymi oraz peptydy syntetyzowane chemicznie, które wiążą się swoiście z określonymi celami molekularnymi znajdującymi się na komórkach nowotworowych.

Peptydy przeciwbakteryjne wiążą się z błonami komórkowymi lub mitochondrialnymi. Wiążąc się z błoną komórkową doprowadzają do jej dezorganizacji. Inne dostają się do wnętrza komórki nie naruszając błony komórkowej i rozbijają błonę mitochondrialną.

Dzięki wykorzystaniu bibliotek fagowych, czy aptamerów, możliwe jest znalezienie peptydów syntetycznych blokujących lub aktywujących docelowe białka w komórkach nowotworowych oraz w komórkach mikrośrodowiska guza. Peptydy te mogą mieć właściwości antyangiogenne, mogą wpływać na zmniejszanie zdolności do przerzutowania nowotworu, a także blokować enzymy, których aktywność jest niezbędna we wzroście guza.

W pracy omówiono właściwości peptydów należących do obu podklas oraz przedstawiono próby ich zastosowania w terapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe:

peptydy przeciwbakteryjne • peptydy syntetyczne • terapia przeciwnowotworowa

Summary

Peptides are a novel class of anticancer agents embracing two distinct categories: natural antibacterial peptides, which are preferentially bound by cancer cells, and chemically synthesized peptides, which bind specifically to precise molecular targets located on the surface of tumor cells. Antibacterial peptides bind to both cell and mitochondrial membranes. Some of these peptides attach to the cell membrane, resulting in its disorganization. Other antibacterial peptides penetrate cancer cells without causing cell membrane damage, but they disrupt mitochondrial membranes. Thanks to phage and aptamer libraries, it has become possible to obtain synthetic peptides blocking or activating some target proteins found in cancer cells as well as in cells forming the tumor environment. These synthetic peptides can feature anti-angiogenic properties, block enzymes indispensable for sustained tumor growth, and reduce tumor ability to metastasize. In this review the properties of peptides belonging to both categories are discussed and attempts of their application for therapeutic purposes are outlined.

Key words:

antibacterial peptides • synthetic peptides • anticancer therapy

* Publikacja finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 3P05A 161 29.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=891548>

Word count: 3056

Tables: 1

Figures: 4

References: 47

Adres autora: dr Ryszard Smolarczyk, Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddz. w Gliwicach, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: rsmolarczyk@io.gliwice.pl

1. WSTĘP

W terapii przeciwnowotworowej coraz większe zainteresowanie budzą peptydy przeciwbakteryjne izolowane z różnych organizmów, jak i peptydy syntetyzowane chemicznie. Peptydy przeciwbakteryjne, dzięki swym właściwościom kationowym, wiążą się preferencyjnie z komórkami nowotworowymi, prowadząc do ich śmierci. Natomiast peptydy przeciwnowotworowe syntetyzowane chemicznie projektowane są tak, by łączyły się z określonymi celami, co zapewnia im dużo większą swoistość. Rozpoznają one ściśle określone cele znajdujące się na komórkach nowotworowych.

W pracy omówiono właściwości peptydów przeciwbakteryjnych i peptydów syntetyzowanych chemicznie oraz przedstawiono próby ich zastosowania w terapii przeciwnowotworowej.

2. PEPTYDY PRZECIWBAKTERYJNE JAKO LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Peptydy przeciwbakteryjne są izolowane z mikroorganizmów oraz niektórych komórek owadów, roślin, płazów, ptaków, ryb czy ssaków z komórkami ludzkimi włącznie. Dotąd wyizolowano już ich setki, a przykłady niektórych takich peptydów umieszczono w tabeli 1.

Peptydy te ze względu na swój kationowy charakter preferencyjnie wiążą się z błoną komórek bakterii mocniej niż z błoną prawidłowych komórek eukariotycznych.

Wywodzące się z protoplastów bakteryjnych mitochondria komórek eukariotycznych mają błonę podobną do błony komórek prokariotycznych. Dlatego peptydy przeciwbakteryjne po dostaniu się do wnętrza komórek eukariotycznych mogą niszczyć mitochondria i wywoływać śmierć komórek.

Powierzchnia komórek nowotworowych różni się pod względem niektórych cech od komórek prawidłowych. Błona komórkowa komórek nowotworowych, w przeciwieństwie do błony komórek prawidłowych jest bogata w kwas sjałowy [28]. Komórki prawidłowe mają na swojej powierzchni znacznie mniej cząsteczek ujemnie naładowanych, jak na przykład fosfatydyloseryna czy oglikozylowana mucyna, niż komórki nowotworowe [19]. Prawdopodobnie ujemnie naładowana błona komórek nowotworowych zmniejsza przyleganie komórek do błony podstawnej bogatej w kwas hialuronowy. Błona komórek nowotworowych wykazuje większą „płynność”, co umożliwia łatwiejsze działanie peptydów przeciwbakteryjnych. Komórki nowotworowe, ze względu na dużą liczbę kosmków, mają większą powierzchnię. Pozwala to na wiązanie

się z błoną większej liczby cząsteczek peptydów. Kosmki te mają różne kształty i rozmiary, co pozwala na przyleganie komórek oraz komunikację między komórkami nowotworowymi a mikrośrodowiskiem. Mogą one także pełnić rolę w selektywnym przyleganiu peptydów kationowych do komórek nowotworowych [19]. Różnice w budowie błon komórkowych, a także duża powierzchnia komórek nowotworowych z obecnymi kosmkami na powierzchni mogą powodować, że komórki nowotworowe będą spenetrowane z większą wybiórczością przez peptydy przeciwbakteryjne niż komórki prawidłowe.

3. MECHANIZM NISZCZENIA BŁON KOMÓRKOWYCH PRZEZ PEPTYDY PRZECIWBAKTERYJNE

Peptydy przeciwbakteryjne najczęściej niszczą komórki przez dezintegrację błony komórkowej lub błony mitochondrialnej. Mechanizm działania opiera się na elektrostatycznym oddziaływaniu peptydu z powierzchnią błony komórkowej. Ujemnie naładowana błona komórkowa łączy się z dodatnio naładowanym peptydem [7]. Po związaniu się z błoną peptydy zaburzają jej strukturę i naruszają jej ciągłość. W zależności od budowy peptydu istnieją trzy mechanizmy niszczenia błon: „klepek beczki”, „pierścieniowy” lub „dywanowy”.

3.1. Model „klepek beczki”

W modelu „klepek beczki” (barrel-stave model) peptydy mające strukturę α -helisy tworzą wiązkę w błonie z kanałem w jej centrum (ryc. 1). Przypomina to beczkę zbudowaną z klepek. Klepkami są peptydy umieszczone w błonie. Hydrofobowe regiony helisy ustawiają się w regionie lipidów błonowych, natomiast hydrofilowa część peptydu wiąże się z hydrofilowymi głowami lipidów i tworzy wewnętrzną część szczeliny. Pory powstałe w błonie powodują wyciekanie elementów cytoplazmy i spadek potencjału błonowego [35]. Peptydy liczące mniej niż 23 aminokwasy nie mają wystarczającej długości, aby przejść przez błonę i niszczyć ją na zasadzie modelu „klepek beczki” [26]. Peptydami, które powodują niszczenie błony na zasadzie mechanizmu „klepek beczki” są: gramicydyna A, alametycyna [21].

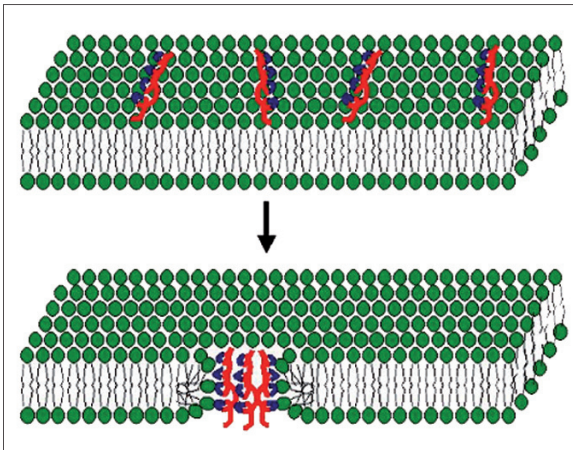
3.2. Model „pierścieniowy”

W modelu „pierścieniowym” (toroidal-pore model) peptydy przeciwbakteryjne przenikają w dwuwarstwę lipidową błony i powodują, że monowarstwa lipidowa zagina się do wnętrza i tworzy szczelinę (ryc. 2). W szczelinie znajdują się głowy lipidowe oraz peptydy. W tym typie niszczenia błony, polarne fragmenty peptydu wiążą się z polarnymi głowami grup lipidowych [7]. Model ten różni

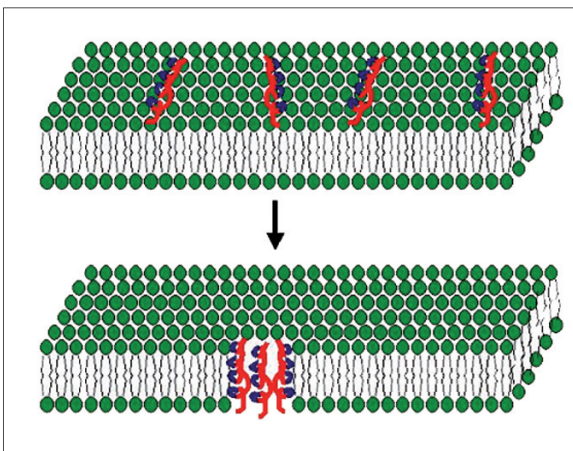
Tabela 1. Peptydy przeciwnowotworowe

Nazwa peptydu	Sekwencja aminokwasowa	Działanie
Peptydy przeciwbakteryjne jako leki przeciwnowotworowe		
Cekropina A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK	właściwości cytotolityczne w stosunku do komórek nowotworowych
Cekropina B	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL	właściwości cytotolityczne w stosunku do komórek nowotworowych
Magainina 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	właściwości cytotolityczne w stosunku do komórek nowotworowych
Aureina 1.2	GLFDIIKKIAESF	właściwości cytotolityczne w stosunku do komórek nowotworowych
Citropina 1.1	GLFDVIKKVASVIGGL	właściwości cytotolityczne w stosunku do komórek nowotworowych
Melittyna	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	właściwości cytotolityczne w stosunku do komórek nowotworowych
Defensyna (HNP-2)	CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWAFCC	właściwości cytotolityczne w stosunku do komórek nowotworowych i hamowanie angiogenezy
Laktoferrycyna B	FKCRRWQWRMKLGPASITCVRRAF	niszczenie błony komórkowej komórek nowotworowych i niszczenie mitochondriów
Tachyplesyna	KWCFRVCYRGICYRRCR	niszczenie komórek nowotworowych przez wiązanie się z hialuronianem
PR-39	RRRPRPPYLPRLPPPPFPRLPPRIPPGFPPRFPFRFP	wzrost ekspresji synekanu-1 hamowanie migracji i tworzenia przerzutów
Peptydy syntetyczne jako leki przeciwnowotworowe		
CA(1-8)MA(1-12)	KWKLFKKIGIGKFLHLAKKF	destabilizacja błony komórkowej komórek nowotworowych
CAMEL	KWKLFKKIGAVLKVL	niszczenie błony mitochondrialnej komórek nowotworowych
D-K ₄ R ₂ L ₉	KLIRLLkklIRLILK	właściwości cytotolityczne w stosunku do komórek nowotworowych
D-K ₆ L ₉	LKILKklkLKLkLL	właściwości cytotolityczne w stosunku do komórek nowotworowych
RGD-4C ₀ (KLAKLAK) ₂	ACDCRGDCFCGGklaklaklaklak	niszczenie komórek śródbłonkowych naczyń krwionośnych guzów i komórek nowotworowych przez dezorganizację błony mitochondriów
PTD-5 ₀ (KLAKLAK) ₂	RRQRRTSKLMKRGGklaklaklaklak	dezorganizacja błony mitochondriów
NGR	NGR	wiązanie się z białkiem aminopeptydazy N i hamowanie angiogenezy
RGD	RGD	wiązanie się z receptorem integrynowym $\alpha_v\beta_3$ i hamowanie angiogenezy
YIGSR	YIGSR	blokowanie działania lamininy 1; hamowanie adhezji komórek nowotworowych
EC-1	WTGWCLNPEESTWGFCTGSF	hamowanie fosforylacji domeny ErbB2; zmniejszenie proliferacji komórek nowotworowych
HWGF	HWGF	hamowanie metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9; blokowanie migracji komórek nowotworowych
F56	WHSDMEWWYLLG	blokowanie aktywności VEGF
SP5.2	NGYEIEWYSWVTHGMY	blokowanie aktywności receptora VEGFR1 (Flt-1)
BP1	SHRYRLAIQLHASDSSSSCV	blokowanie aktywności receptora VEGFR1 (Flt-1) i jego wiązania z białkiem PIGF
K237	HTMYHHYQHHL	blokowanie aktywności receptora VEGFR2 (KDR)

Dużymi literami oznaczone są aminokwasy w formie L, natomiast małymi literami aminokwasy w formie D.



Ryc. 1. Model „klepek beczki”. W modelu tym peptydy kumulują się na powierzchni błony. Następnie peptydy wchodzą w dwuwarstwę lipidową na kształt klepek beczki i tworzą pory. Hydrofobowe regiony helisy ustawiają się w regionie lipidów błonowych, natomiast hydrofilowa część peptydu tworzy wewnętrzną część szczeliny. Na czerwono zaznaczono rejony hydrofilowe peptydu, na niebiesko rejony hydrofobowe

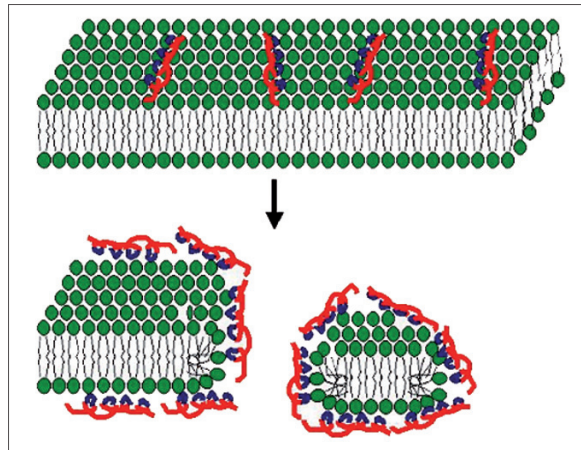


Ryc. 2. Model „pierścieniowy” Związane z błoną peptydy grupują się, a następnie zaginają monowarstwę lipidową, przez co powstający otwór (por) jest wyścielony przez lipidowe głowy oraz przez sam peptyd. Na czerwono zaznaczono rejony hydrofilowe peptydu, na niebiesko rejony hydrofobowe

się od modelu „klepek beczki” tym, że peptydy są zawsze związane z głowami lipidów, nawet podczas przenikania w warstwę lipidową. Peptydami, które powodują niszczenie błony na zasadzie mechanizmu „pierścieniowego” to: melittyna, magainina [37].

3.3. Model „dywanowy”

W modelu „dywanowym” peptydy nie przenikają w dwuwarstwę lipidową, ale kumulują się na jej powierzchni (ryc. 3). Wiążą się elektrostatycznie z głowami fosfolipidowymi w wielu miejscach pokrywając powierzchnię błony [7]. Takie „dywanowe” ułożenie peptydów na powierzchni błony powoduje jej destabilizację. Prowadzi to do jej pęknięcia, obniżenia potencjału błonowego i wycieknięcia składników cytoplazmy z komórki [35]. Peptydy



Ryc. 3. Model „dywanowy”. Peptydy na zasadzie oddziaływania elektrostatycznego łączą się z głowami lipidów błonowych pokrywając błonę jak dywan. Peptyd powoduje niszczenie błony podobnie jak detergenty, niszczą wiązania lipidowe lub prowadząc do powstania miceli. Na czerwono zaznaczono rejony hydrofilowe peptydu, na niebiesko rejony hydrofobowe

niszczą błonę przez zerwanie wiązań lipidowych, podobnie jak to się dzieje z użyciem detergentów. Możliwe jest również tworzenie miceli z fragmentów błony po zniszczeniu dwuwarstwy lipidowej. Peptydem, który powoduje niszczenie błony na zasadzie mechanizmu „dywanowego” jest cekropina.

4. PODZIAŁ PEPTYDÓW PRZECIWBAKTERYJNYCH STOSOWANYCH W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Peptydy najczęściej nie mają określonej konformacji w roztworach wodnych. Natomiast, gdy zwiążą się z błoną komórkową przybierają odpowiednią strukturę drugorzędową. Możemy zatem wyróżnić peptydy, które mają kształt α -helisy, β -harmonijki lub peptydy liniowe.

4.1. Peptydy zawierające strukturę α -helisy

Jest to najliczniejsza grupa peptydów, która wykazuje właściwości niszczenia błon komórek bakterii, błon komórek nowotworowych, a także po dostaniu się do komórki eukariotycznej – błon mitochondrialnych.

Do tej grupy peptydów przeciwbakteryjnych wykazujących właściwości przeciwnowotworowe zaliczamy cekropinę A i B. Cekropiny po raz pierwszy opisano u ćmy *Hyalophora cecropia*. Później znaleziono te peptydy również u ssaków. Składają się one z 34-39 aminokwasów. Cekropinę A (KWKLFFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK) i cekropinę B (KWKVFFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL) cechuje obecność dwóch α -helis. Zarówno cekropina A, jak i cekropina B wykazują właściwości cytolityczne w stosunku do kilku różnych linii komórek nowotworowych. Nie powodują one niszczenia prawidłowych komórek fibroblastów, limfocytów i erytrocytów w stężeniu toksycznym dla komórek nowotworowych [26]. Istnieją dane wskazujące, że cekropiny A i B wykazują dużą toksyczność względem komórek raka pęcherza moczowego z niewielkim efektem toksycznym w stosunku do komórek prawidłowych fibroblastów [41]. Skojarzenie cekropiny A z 5-fluorouracylem

przynosi dodatkowy efekt cytotoksyczny przeciwko komórkom ostrej białaczki limfatycznej. Kombinacja peptydów przeciwbakteryjnych i chemioterapeutyków może być zatem użyteczna w terapii przeciwnowotworowej [26].

Peptydem zawierającym strukturę α -helisy jest także magainina. Jest to peptyd izolowany ze skóry żaby afrykańskiej *Xenopus laevis*. Magaininy są zbudowane z 21-27 aminokwasów. Peptydy te wykazują silne właściwości przeciwnowotworowe. Magainina 2 (GIGKFLHSACKFGKAFVGEIMNS) jest peptydem, który zabija komórki nowotworowe w stężeniu 2–10 razy niższym niż dla komórek prawidłowych [22]. Wykazuje ona toksyczność względem komórek raka pęcherza moczowego, piersi, komórek białaczki i innych komórek nowotworowych [25]. Magainina A powoduje tworzenie się porów w błonach mitochondrialnych [26].

Aureina 1.2 jest izolowana z komórek skóry australijskiej żaby *Litoria raniformis*. Zbudowana jest z 13 aminokwasów. Peptyd ten jest toksyczny dla 57 z 60 testowanych ludzkich komórek nowotworowych i nie jest toksyczny dla erytrocytów [19].

Z komórek skóry żaby drzewnej *Litoria citropa* wyizolowano peptyd Citropina 1.1 (GLFDVIKKVASVIGGL). Składa się on z 16 aminokwasów i, podobnie jak aureina, zabija komórki nowotworowe w stężeniu niższym niż hemolizuje erytrocyty [19].

Peptydem przeciwbakteryjnym mającym konformację α -helisy jest melittyna (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ). Jest ona zbudowana z 26 aminokwasów i występuje w jadzie pszczoły miodnej *Apis mellifera*. Melittyna wykazuje właściwości lityczne zarówno dla komórek nowotworowych, jak i komórek prawidłowych. Cechuje się silnymi właściwościami hemolitycznymi [37]. Jednak komórki białaczki mysiej są 10 razy bardziej wrażliwe na jej działanie niż komórki prawidłowe. Melittyna może być również połączona z awidyną. Takie połączenie sprawia, że awidyna jest swoście cięta przez metaloproteinazę 2, która występuje w nadmiarze w komórkach nowotworowych i komórkach śródbłonkowych naczyń nowotworowych. Pozwala to na względnie swoiste zabijanie przez melittynę komórek z dużą ilością tej metaloproteinazy [18].

4.2. Peptydy zawierające strukturę β -harmonijki

Niektóre peptydy, które wykazują właściwości przeciwnowotworowe, przyjmują w błonie komórkowej strukturę β -harmonijki.

Do tej grupy peptydów zalicza się defensyny. Jest to grupa peptydów zbudowanych z 29 do 45 aminokwasów. Charakterystyczna dla tej grupy jest obecność sześciu cystein, które tworzą trzy wiązania dwusiarczkowe. Wiązania te nadają peptydom strukturę β -harmonijki [19]. Najlepiej poznane są defensyny izolowane z ludzkich komórek. Ludzkie α -defensyny pochodzą z ludzkich neutrofilów (human neutrophil peptide – HNP) i z komórek Panetha, które umiejscawiają się w dolnych częściach krypt jelitowych. Natomiast β -defensyny są izolowane z komórek nabłonkowych wielu narządów [26]. Defensyny zabijają różne komórki nowotworowe, np.: komórki szpiczaka,

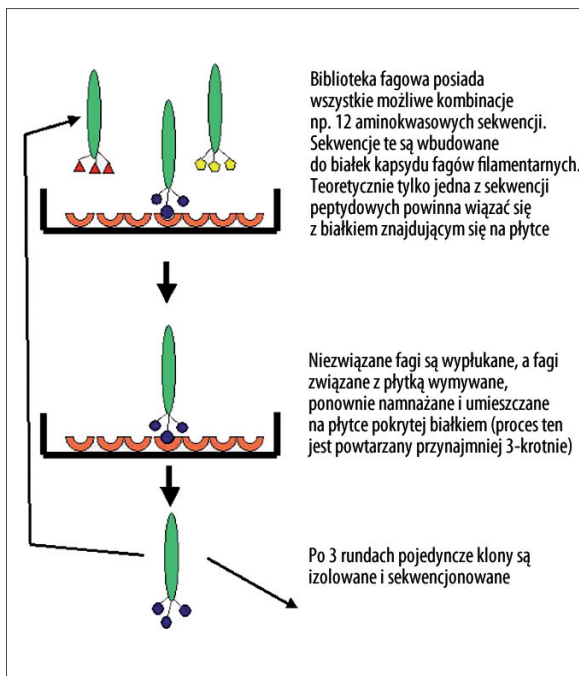
chłoniaka, raka jamy ustnej. Poza tym wykazano, że α -defensyny hamują angiogenezę przez wiązanie się z integralną $\alpha_3\beta_1$. Proces ten hamuje zależne od VEGF (vascular endothelial growth factor) wiązanie integralny z fibronektyną, i w konsekwencji, migrację komórek śródbłonkowych [26]. Stosowanie w terapii przeciwnowotworowej defensyn jest jednak ograniczone przez ich toksyczność dla fibroblastów.

Laktotferrycyna jest peptydem powstałym w wyniku hydrolizy przez kwaśną pepsynę laktotferryny, białka wiążącego żelazo. Jest ona obecna w neutrofilach, w mleku i ślinie. Laktotferrycyna, izolowana z krowiego mleka (laktotferricin B – FKRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF) jest zbudowana z 25 aminokwasów. Zawiera w swojej sekwencji dwie cysteiny tworzące wiązanie dwusiarczkowe. Laktotferrycyna wykazuje silne właściwości przeciwnowotworowe przeciwko komórkom białaczki, włóknakomiesaka, neuroblastomy i innym typom nowotworów [16]. Peptyd ten zabija komórki w stężeniu, które nie jest toksyczne dla komórek prawidłowych. Wiąże się on z błoną komórkową i powoduje tworzenie w niej porów. Przez powstałe pory do komórki dostaje się peptyd, który powoduje niszczenie mitochondriów i, w rezultacie, śmierć komórki. Mimo że laktotferrycyna nie niszczy komórek nowotworowych po podaniu dożylnym, to podanie miejscowe hamuje wzrost guzów i tworzenie przerzutów. Hamowanie proliferacji i migracji komórek śródbłonkowych jest spowodowane zahamowaniem aktywności bFGF (basic fibroblast growth factor) i VEGF przez laktotferrycynę.

Tachyplesyna jest peptydem zbudowanym z 17 aminokwasów (KWCFRVCYRGICYRRCR) pochodzącym z kraba *Tachyplesus tridentatus*. W cząsteczce tej znajdują się dwa wiązania dwusiarczkowe, pozwalające peptydowi uzyskać strukturę β -harmonijki. Tachyplesyna zabija komórki nowotworowe przez wiązanie do hialuronianu, który występuje w nadmiarze w komórkach ludzkiego raka gruczołu krokowego. Hialuronian ulega wysokiej nadekspresji zarówno w wielu typach komórek nowotworowych, jak i w błonie komórek śródbłonkowych biorących udział w procesie tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Skonstruowano również chimeryczny peptyd zawierający motyw aminokwasowy RGD (rozpoznający integralną $\alpha_3\beta_1$) oraz tachyplesynę jako domenę efektorową. Po dostaniu się do wnętrza komórki peptyd ten niszczy mitochondria i powoduje śmierć komórek w procesie apoptozy. Podanie tego chimerycznego peptydu znacznie hamuje wzrost guzów czerniaka B16 u myszy [8].

4.3. Peptydy liniowe

Jednym z niewielu peptydów liniowych mających właściwości przeciwnowotworowe jest peptyd PR-39 (RRRPRPPYLPRPRPPFFPRLLPRIPPGFPPRFPPRFPP). Jest on izolowany z jelita cienkiego świni i z neutrofilów. Zbudowany jest z 39 aminokwasów i nie ma określonej konformacji. PR-39 przechodzi do wnętrza komórki bez niszczenia błony komórkowej. Po dostaniu się do cytoplazmy wiąże się z odpowiednimi białkami, które zwiększają ekspresję synekanu 1. Nadekspresja tego białka może hamować migrację komórek i tworzenie przerzutów, gdyż zwiększony poziom synekanu 1 jest związany z redukcją inwazyjności komórek nowotworowych [19].



Ryc. 4. Przeszukiwanie biblioteki fagowej, identyfikacja i izolacja swistego peptydu wiążącego się z określonym białkiem. Na płytkę pokrytą określonym białkiem nanoszone są fagi biblioteki fagowej. Fagi wiążą się z białkiem i pozostają na płytce. Niezwiązane fagi są odpłukiwane. Następnie związane z białkiem fagi są wmywane, namnażane i nanoszone ponownie na płytkę opłaszczoną białkiem. Proces ten jest powtarzany 3-krotnie. Pojedyncze klony są izolowane i sekwencjonowane. Otrzymana sekwencja aminokwasowa zostanie następnie wykorzystana do chemicznej syntezy określonego peptydu

5. PEPTYDY SYNTETYCZNE JAKO LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Peptydy naturalnie występujące mają często właściwości hemolityczne, które uniemożliwiają ich użycie w terapii *in vivo*. Dlatego coraz więcej prób dotyczy uzyskania peptydów syntetycznych, które takich właściwości nie mają.

Łatwość ich syntezy i możliwość modyfikacji aminokwasów pozwala na projektowanie nowych peptydów o określonych właściwościach [24]. Ze względu na swoje małe rozmiary peptydy potrafią głęboko przenikać tkankę docelową [28]. Na ogół peptydy są mniej immunogenne w porównaniu do często stosowanych w terapii białek. Poza tym odpowiednio zaprojektowane i skonstruowane peptydy zawierają sekwencje umożliwiające dość dużą swoistość wiązania z odpowiednim celem komórkowym [36].

W porównaniu z komórkami prawidłowymi komórki nowotworowe czy komórki mikrośrodowiska guza mają dużo więcej niektórych receptorów [15,39,44]. Komórki nowotworowe cechują się np. zwiększoną liczbą receptorów z rodziny VEGFR (receptor naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu), które biorą udział w tworzeniu naczyń krwionośnych w obrębie guza, a także w stymulacji wzrostu komórek nowotworowych oraz ich migracji i tworzeniu przerzutów [12,13]. Receptorami występującymi w zwiększonej liczbie w nowotworach są także receptory z rodziny EGFR (receptor czynnika wzrostu naskórka). Białka

te aktywują wzrost komórek nowotworowych, ich przeżycie, migrację [30]. Różnice w rodzaju i liczbie receptorów na powierzchni komórek nowotworowych mogą być wykorzystane w terapii celowanej przeciwko komórkom nowotworowym lub komórkom środowiska guza. Z takimi celami molekularnymi mogą się łączyć swoiście peptydy otrzymywane syntetycznie. Przykłady takich peptydów zamieszczono w tabeli 1.

6. IDENTYFIKACJA SWOISTYCH PEPTYDÓW

Najczęściej swoiste peptydy uzyskuje się za pomocą biblioteki fagowej peptydów lub za pomocą peptydowych aptamerów.

Biblioteka fagowa zawiera wszystkie możliwe kombinacje krótkich (np. 7 czy 12 aminokwasowych firmy New England Biolabs) aminokwasowych sekwencji. Z biblioteki tej można zidentyfikować i wyizolować peptydy, które będą się wiązały ze ściśle określonym białkiem [23,29]. Najczęściej chodzi o wiązanie peptydu z białkiem receptorowym lub określonym ligandem (ryc. 4).

Aptamery peptydowe podobnie jak biblioteki fagowe mogą służyć do poszukiwania peptydów o ściśle określonym powinowactwie do szukanych cząsteczek – najczęściej receptorów lub ligandów. Nazywa się je czasami „chemicznymi przeciwciałami” [20]. Aptamery można uzyskiwać selekcyjując z puli o losowych sekwencjach takie, które wiążą docelową cząsteczkę najbardziej swoiście [6]. Zaletami aptamerów jest ich duża swoistość wiązania z określonymi celami molekularnymi. Aptamery nie wykazują właściwości immunogennych [20]. Poza tym, ze względu na swoje małe rozmiary, łatwiej docierają do komórek nowotworowych. Są jednak szybko usuwane z krwi.

7. MECHANIZM DZIAŁANIA SYNTETYCZNYCH PEPTYDÓW

Dzięki wykorzystaniu bibliotek fagowych, czy aptamerów, możliwe jest znalezienie peptydów blokujących lub aktywujących docelowe białka w komórkach nowotworowych oraz w komórkach mikrośrodowiska guza. Peptydy te mogą mieć właściwości antyangiogenne, mogą wpływać na zmniejszanie zdolności do przerzutowania nowotworu, a także blokować enzymy, których aktywność jest niezbędna we wzroście guza [5,10].

7.1. Peptydy niszczące błonę komórkową komórek nowotworowych lub ich mitochondria

Jednym z przykładów takich peptydów jest peptyd zbudowany z fragmentu cekropiny A i fragmentu magaininy 2 (CA(1-8)MA(1-12)). Aminokwasy 1-8 są pierwszymi ośmioma aminokwasami cekropiny A, a aminokwasy 9-20 pierwszymi dwunastoma aminokwasami magaininy 2. Peptyd ten wykazuje silne właściwości przeciwnowotworowe przy jednoczesnym braku właściwości hemolitycznych. Peptyd ten przybiera konformację α -helisy, co umożliwia mu oddziaływanie z ujemnie naładowaną błoną i pozwala na jej destabilizację [3,38].

Peptydem będącym hybrydem fragmentu cekropiny A i fragmentu melittyny jest CAMEL (CA(1-7)M(2-9)). Powoduje on niszczenie błony komórek bakterii, a także

blony mitochondrialnej. Peptyd ten nie wykazuje właściwości hemolitycznych. Peptyd CAMEL umiejscawia się na mitochondriach i powoduje ich pęcznienie i dezorganizację blony mitochondrialnej, co w konsekwencji prowadzi do śmierci martwiczej komórek. Podanie peptydu CAMEL myszom z guzami czerniaka mysiego B16-F10 powodowało znaczne zahamowanie wzrostu guzów, a dodatkowe podanie plazmidowego DNA zawierającego gen mysiej IL-12 pozwoliło na całkowite wyleczenie 60% myszy leczonych [Smolarczyk i wsp., 2009, wysłana do redakcji].

Syntetycznym peptydem wykazującym właściwości przeciwnowotworowe jest peptyd D-K₆R₂L₉. Jest to peptyd zbudowany z 3 rodzajów aminokwasów: leucyny, lizyny i argininy, z których 1/3 jest w postaci D-aminokwasów. Peptyd ten powoduje śmierć komórek czerniaka B16-F10, ale nie fibroblastów. Peptyd nie ma właściwości hemolitycznych [33]. Dożylne podanie peptydu hamuje wzrost raka płuca myszy. Peptyd D-K₆L₉ wiąże się swoiście z fosfatydyloseryną występującą w zewnętrznej stronie blony komórek nowotworowych (w komórkach prawidłowych fosfatydyloseryna znajduje się po wewnętrznej stronie blony). Peptyd ten jest zbudowany z aminokwasów zarówno w postaci D jak i L. Papo i wsp. wykazali, że podanie tego peptydu D-K₆L₉ hamuje wzrost guzów gruczołu krokowego i raka piersi oraz tworzenie przerzutów u myszy [31,32].

7.2. Peptydy wiążące się z komórkowymi receptorami

Swoiste dostarczanie peptydów do określonych komórek w organizmie jest dużym postępem w terapii przeciwnowotworowej. Często celem terapii są swoiste dla komórek nowotworowych czy komórek mikrośrodowiska guza receptory dla niektórych białek. Przykładem może być swoiste wiązanie się peptydu zawierającego motyw NGR z białkiem aminopeptydazy N. Białko to ulega nadekspresji w komórkach śródbłonkowych naczyń nowotworowych oraz w samych komórkach nowotworowych. Zahamowanie aktywności aminopeptydazy N przez peptyd zawierający motyw NGR hamuje proces angiogenezy [1,4].

7.3. Peptydy wiążące się z białkami powierzchniowymi

Białka powierzchniowe komórek wiążące się z różnymi elementami macierzy pozakomórkowej odgrywają dużą rolę w powstawaniu przerzutów oraz procesie angiogenezy. Peptydy hamujące aktywność tych białek mogą być wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej.

Peptydem syntetycznym jest peptyd chimeryczny RGD-4C_{-p}(KLAKLAK)₂. Motyw RGD umożliwia swoiste wiązanie się z integryną $\alpha_5\beta_3$, która występuje w większej ilości w komórkach śródbłonkowych naczyń nowotworowych oraz w niektórych typach nowotworów, np. w mysim czerniaku B16-F10 [40]. Domena efektorowa jest zbudowana z D-aminokwasów KLAKLAKKLAKLAK. Powoduje ona niszczenie mitochondriów po dostaniu się tego peptydu do wnętrza komórki i śmierć w procesie apoptozy [11]. Podanie tego peptydu myszom z guzami czerniaka B16-F10 znacznie hamuje ich wzrost [40].

Wcześniej wspomniany motyw RGD swoiście rozpoznaje integrynę $\alpha_5\beta_3$. Związanie się peptydu RGD z domeną

$\alpha_5\beta_3$ hamuje proces angiogenezy, migrację komórek nowotworowych oraz tworzenie przerzutów [43,47].

Przykładem peptydu syntetycznego jest także peptyd YIGSR, który blokuje działanie lamininy 1. Laminina 1 jest białkiem powierzchniowym, które występuje w dużej ilości na powierzchni wielu typów nowotworów. Zablockowanie tego białka hamuje przyleganie komórek nowotworowych do macierzy pozakomórkowej, przez co zmniejsza ich migrację [46].

7.4. Inhibitory kinaz

Kinazy białkowe odgrywają ważną rolę w wielu procesach, takich jak apoptoza, podziały komórkowe czy transkrypcja genów [34]. Poszukuje się więc peptydów blokujących wiązanie kinaz z ich substratami. Receptory tyrozynowe naskórkowego czynnika wzrostu EGF (epidermal growth factor) i ErbB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) ulegają nadekspresji w wielu nowotworach. Peptyd EC-1 wiąże się swoiście z domeną ErbB2 i hamuje fosforylację jej wewnątrzkomórkowej domeny. EC-1 jest 20-aminokwasowym cyklicznym peptydem. Podanie tego peptydu hamuje proliferację komórek raka piersi [34,27].

7.5. Inhibitory proteaz

Komórki nowotworowe wytwarzają różne enzymy proteolityczne (katepsyny, metaloproteiny (MMP), urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA)), biorące udział w degradacji macierzy pozakomórkowej [45]. Cykliczny peptyd zbudowany z czterech aminokwasów HWGF swoiście hamuje metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9, co prowadzi do zahamowania migracji komórek nowotworowych i zdolności tworzenia przerzutów [4].

7.6. Peptydy antyangiogenne

Angiogeneza polega na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych z już istniejących [14]. Czynnikiem odpowiedzialnym za tworzenie naczyń krwionośnych jest głównie naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Białko to aktywuje komórki śródbłonkowe do podziałów i tworzenia nowych naczyń. Białko VEGF jest głównym celem w terapii antyangiogennej [9]. Peptyd F56 (WHSDMEWWYLLG) wiąże się swoiście z VEGF i blokuje jego wiązanie się z receptorem VEGFR1 (Flk-1), co w konsekwencji hamuje wzrost guzów i tworzenie przerzutów [2]. Inne peptydy hamujące angiogenezę to peptydy wiążące się z receptorami VEGFR1 (Flt-1) i VEGFR2 (KDR). Peptydem, który hamuje receptor VEGFR1 jest SP5.2, zbudowany z 16 aminokwasów (NGYEIEWYSWVTHGMY). Peptyd ten hamuje proliferację i migrację komórek śródbłonkowych oraz tworzenie nowych naczyń krwionośnych *in vivo* [10]. Znany jest również peptyd BP1 (SHRYRLAIQLHASDSSSSCV), który swoiście hamuje wiązanie łożyskowego czynnika wzrostu PIGF (placenta growth factor) z receptorem VEGFR1 [42]. Podanie peptydu BP1 hamowało migrację i przerzutowanie komórek nowotworowych, a podanie go myszom z guzami raka piersi MDA-MB-231 zmniejszało liczbę spontanicznych przerzutów o 94%. Natomiast peptydem, który blokuje aktywność receptora VEGFR2 jest K237 (HTMYHHYQHHL). W doświadczeniach *in vitro* peptyd ten hamował proliferację i migrację komórek śród-

błonkowych. Natomiast w doświadczeniach *in vivo* zaobserwowano zahamowanie wzrostu guzów raka sutka i tworzenia przerzutów [17].

8. PODSUMOWANIE

Ze względu na łatwość otrzymywania i dużą skuteczność terapeutyczną, peptydy wydają się obiecującymi lekami w terapii przeciwnowotworowej. Naturalnie występujące peptydy przeciwbakteryjne często mają właściwości przeciwnowotworowe. Peptydy te preferencyjnie wiążą się z błonami komórek nowotworowych. Natomiast syntetyzowane chemicznie mogą się wiązać swoiście z określonymi celami molekularnymi w komórce. Pod wpływem

swoistych peptydów komórki nowotworowe mogą ginąć w wyniku niszczenia błony komórkowej lub mitochondrialnej. Działanie peptydów może powodować również zablokowanie aktywności wybranych białek niezbędnych w przeżyciu, proliferacji, migracji oraz zdolności do tworzenia przerzutów komórek nowotworowych. Niezależnie od już istniejących peptydów nadal trwają poszukiwania nowych peptydów swoiście niszczących komórki nowotworowe oraz komórki mikrośrodowiska nowotworowego w tym komórki śródbłonkowe naczyń nowotworowych, makrofagi czy fibroblasty związane z nowotworami. Dopiero odpowiednia kombinacja leków działających na różne molekularne cele, może przynieść sukces w postaci całkowitego wyleczenia.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Allen T.M.: Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 750–763
- [2] An P., Lei H., Zhang J., Song S., He L., Jin G., Liu X., Wu J., Meng L., Liu M., Shou C.: Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library. *Int. J. Cancer*, 2004; 111: 165–173
- [3] Bastos M., Bai G., Gomes P., Andreu D., Goormaghtigh E., Prieto M.: Energetics and partition of two cecropin-melittin hybrid peptides to model membranes of different composition. *Biophys. J.*, 2008; 94: 2128–2141
- [4] Bhutia S.K., Maiti T.K.: Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends Biotechnol.*, 2008; 26: 210–217
- [5] Borghouts C., Kunz C., Groner B.: Current strategies for the development of peptide-based anti-cancer therapeutics. *J. Pept. Sci.*, 2005; 11: 713–726
- [6] Borghouts C., Kunz C., Groner B.: Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2005; 5: 783–797
- [7] Brogden K.A.: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005; 3: 238–250
- [8] Chen Y., Xu X., Hong S., Chen J., Liu N., Underhill C.B., Creswell K., Zhang L.: RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth. *Cancer Res.*, 2001; 61: 2434–2438
- [9] D'Andrea L.D., Del Gatto A., Pedone C., Benedetti E.: Peptide-based molecules in angiogenesis. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2006; 67: 115–126
- [10] El-Mousawi M., Tchistiakova L., Yurchenko L., Pietrzynski G., Moreno M., Stanimirovic D., Ahmad D., Alakhov V.: A vascular endothelial growth factor high affinity receptor 1-specific peptide with antiangiogenic activity identified using a phage display peptide library. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 46681–46691
- [11] Ellerby H.M., Arap W., Ellerby L.M., Kain R., Andrusiak R., Rio G.D., Krajewski S., Lombardo C.R., Rao R., Ruoslahti E., Bredesen D.E., Pasqualini R.: Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat. Med.*, 1999; 5: 1032–1038
- [12] Ellis L.M., Hicklin D.J.: VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 579–591
- [13] Fischer C., Mazzone M., Jonckx B., Carmeliet P.: FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 942–956
- [14] Folkman J.: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.*, 2002; 29: 15–18
- [15] Furuya M., Yonemitsu Y.: Cancer neovascularization and proinflammatory microenvironments. *Curr. Cancer Drug. Targets*, 2008; 8: 253–265
- [16] Gifford J.L., Hunter H.N., Vogel H.J.: Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol. Life Sci.*, 2005; 62: 2588–2598
- [17] Hetian L., Ping A., Shumei S., Xiaoying L., Luowen H., Jian W., Lin M., Meisheng L., Junshan Y., Chengchao S.: A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 43137–43142
- [18] Holle L., Song W., Holle E., Wei Y., Wagner T., Yu X.: A matrix metalloproteinase 2 cleavable melittin/avidin conjugate specifically targets tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Oncol.*, 2003; 22: 93–98
- [19] Hoskin D.W., Ramamoorthy A.: Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1778: 357–375
- [20] Ireson C.R., Kelland L.R.: Discovery and development of anticancer aptamers. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 2957–2962
- [21] Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.: Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006; 19: 491–511
- [22] Kamysz W., Okrój M., Łukasiak J.: Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.*, 2003; 50: 461–469
- [23] Landon L.A., Zou J., Deutscher S.L.: Is phage display technology on target for developing peptide-based cancer drugs? *Curr. Drug Discov. Technol.*, 2004; 1: 113–132
- [24] Latham P.W.: Therapeutic peptides revisited. *Nat. Biotechnol.*, 1999; 17: 755–757
- [25] Lehmann J., Retz M., Sidhu S.S., Suttman H., Sell M., Paulsen F., Harder J., Unteregger G., Stöckle M.: Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *Eur. Urol.*, 2006; 50: 141–147
- [26] Mader J.S., Hoskin D.W.: Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2006; 15: 933–946
- [27] Mendoza F.J., Espino P.S., Cann K.L., Bristow N., McCrea K., Los M.: Anti-tumor chemotherapy utilizing peptide-based approaches – apoptotic pathways, kinases, and proteasome as targets. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2005; 53: 47–60
- [28] Monk B.C., Harding D.R.: Peptide motifs for cell-surface intervention: application to anti-infective and biopharmaceutical development. *BioDrugs*, 2005; 19: 261–278
- [29] Mori T.: Cancer-specific ligands identified from screening of peptide-display libraries. *Curr. Pharm. Des.*, 2004; 10: 2335–2343
- [30] Normanno N., De Luca A., Bianco C., Strizzi L., Mancino M., Maiello M.R., Carotenuto A., De Feo G., Caponigro F., Salomon D.S.: Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 2006; 366: 2–16
- [31] Papo N., Braunstein A., Eshhar Z., Shai Y.: Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic D-, L-amino Acid Peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion. *Cancer Res.*, 2004; 64: 5779–5786
- [32] Papo N., Seger D., Makovitzki A., Kalchenko V., Eshhar Z., Degani H., Shai Y.: Inhibition of tumor growth and elimination of multiple metastases in human prostate and breast xenografts by systemic inoculation of a host defense-like lytic peptide. *Cancer Res.*, 2006; 66: 5371–5378
- [33] Papo N., Shahar M., Eisenbach L., Shai Y.: A novel lytic peptide composed of DL-amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 21018–21023
- [34] Pero S.C., Shukla G.S., Armstrong A.L., Peterson D., Fuller S.P., Godin K., Kingsley-Richards S.L., Weaver D.L., Bond J., Krag D.N.: Identification of a small peptide that inhibits the phosphorylation of ErbB2 and proliferation of ErbB2 overexpressing breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 2004; 111: 951–960
- [35] Powers J.P., Hancock R.E.: The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 2003; 24: 1681–1691

- [36] Sato A.K., Viswanathan M., Kent R.B., Wood C.R.: Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2006; 17: 638–642
- [37] Sato H., Feix J.B.: Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1758: 1245–1256
- [38] Shin S.Y., Lee S.H., Yang S.T., Park E.J., Lee D.G., Lee M.K., Eom S.H., Song W.K., Kim Y., Hahn K.S., Kim J.I.: Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of alpha-helical antibiotic peptide, P18 and its analogs. *J. Pept. Res.*, 2001; 58: 504–514
- [39] Shojaei F., Ferrara N.: Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist. Updat.*, 2008; 11: 219–230
- [40] Smolarczyk R., Cichoń T., Graja K., Hucz J., Sochanik A., Szala S.: Antitumor effect of RGD-4C-GG-D(KLAKLAK)₂ peptide in mouse B16(F10) melanoma model. *Acta Biochim. Pol.*, 2006; 53: 801–805
- [41] Suttman H., Retz M., Paulsen F., Harder J., Zwergel U., Kamradt J., Wullich B., Unteregger G., Stöckle M., Lehmann J.: Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol.*, 2008; 8: 5
- [42] Taylor A.P., Goldenberg D.M.: Role of placenta growth factor in malignancy and evidence that an antagonistic PlGF/Flt-1 peptide inhibits the growth and metastasis of human breast cancer xenografts. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 524–531
- [43] Tucker G.C.: Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2003; 4: 722–731
- [44] Whiteside T.L.: The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 2008; 27: 5904–5912
- [45] Wilson T.J., Singh R.K.: Proteases as modulators of tumor-stromal interaction: primary tumors to bone metastases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1785: 85–95
- [46] Witkowska E., Oriowska A., Izdebski J., Salwa J., Wietrzyk J., Opolski A.: New analogues of laminin active fragment YIGSR: synthesis and biological activity *in vitro* and *in vivo*. *J. Pept. Sci.*, 2004; 10: 285–290
- [47] Zitzmann S., Ehemann V., Schwab M.: Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells *in vivo*. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5139–5143

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.