

# ZAVIRALCI IN STABILIZATORJI INTERAKCIJ MED PROTEINI

## INHIBITORS AND STABILIZATORS OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

AVTOR / AUTHOR:

Kaja Bergant, mag. farm.

Doc. dr. Andrej Perdih, mag. farm

*Kemijski inštitut*

*Hajdrihova 19, 1001 Ljubljana, Slovenija*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: andrej.perdih@ki.si

## 1 INTERAKCIJE MED PROTEINI

Proteini se za uspešno opravljanje svojih funkcij pogosto povezujejo z drugimi proteini in pri tem tvorijo široke visokoorganizirane proteinske mreže. Te interakcije med proteini označujemo tudi z izrazom interakcije protein-protein (PPI, *protein-protein interactions*) in opisujejo nekovalentne povezave med dvema ali več proteini (1). PPI predstavljajo obsežen del vseh makromolekulskih interakcij, ki sestavljajo celotni celični interaktom (1). Po zadnjih ocenah je teh interakcij pri človeku okrog 300.000, identificirali pa so že več kot 500 proteinov, ki vstopajo v PPI pri različnih organizmih (2).

### POVZETEK

Nekateri proteini za uspešno opravljanje svojih funkcij vstopajo v interakcije z drugimi proteini in pri tem tvorijo široke visokoorganizirane proteinske mreže. Te interakcije med proteini imenujemo tudi interakcije protein-protein (PPI) in so prisotne na vseh nivojih organizacije celic. Večje poznavanje vloge teh interakcij in potreba po novih, varnejših in učinkovitejših zdravilih sta v zadnjem desetletju proteine, ki sodelujejo v PPI, uvrstila v nabor proteinskih tarč skupaj s klasičnimi tarčami iz skupin encimov, receptorjev, ionskih kanalov in z ligandi aktiviranih transkripcijskih dejavnikov. V prispevku najprej obravnavamo načrtovanje in karakterizacijo spojin, ki lahko modulirajo te interakcije. Nato predstavljamo kratek pregled nekaterih zaviralcev PPI, ki so v klinični uporabi ali v kliničnih raziskavah, skupino stabilizatorjev PPI ter uporabo peptidov in njihovih derivatov pri modulaciji PPI.

### KLJUČNE BESEDE:

interakcije protein-protein, zaviralci in stabilizatorji PPI, načrtovanje učinkovin

### ABSTRACT

In order to perform their functions, some proteins interact with other proteins forming widely organized protein networks important in various regulatory biological processes. Such interactions among two or several protein partners are called protein-protein interactions (PPI) and are present on all levels of cellular organization. The ongoing pressure to supply novel, safer and more effective therapies to the patient has added proteins involved in PPI to the collection of established pharmaceutically relevant protein targets such as enzymes, receptors, ionic channels and ligand-activated transcription factors. In this review, several features of designing compounds that can modulate protein-protein interactions are presented along with a short overview of several inhibitors of PPI either already in the clinical practice or currently in clinical trials. We also discuss an emerging group of molecules that stabilize the PPI as well as survey the utilization of peptides and their analogues in this field.

### KEY WORDS:

protein-protein interactions, inhibitors and stabilizers of PPI, drug design

PPI delimo na homooligomerne, kjer interagirata dve identični proteinski molekuli oz. podenoti, in heterooligomerne interakcije, kjer sta proteina različna. Oligomeri v homooligomernih interakcijah so lahko organizirani na izologni ali heterologni način. Izolagna povezava vsebuje enaki površini na obeh monomerih, medtem ko sta površini pri heterologni povezavi različni (3).

Druga pogosta delitev PPI je delitev na obligatorne in neobligatorne PPI. V nasprotju z neobligatornimi protomeri, obligatorni PPI *in vivo* ne obstajajo kot samostojni stabilni monomeri oz. kompleksi. PPI delimo tudi na permanentne, kjer so PPI stabilne, in tranzitivne PPI, ki se pojavijo le ob izpolnjevanju določenih pogojev, kot so: pH, koncentracija, prisotnost spojin (npr. GTP, fosfatni ioni itd.). Identificirali so tudi več PPI, ki se jih tudi ne da enostavno uvrstiti v nobeno izmed naštetih kategorij, saj izkazujejo vmesne lastnosti omenjenih skupin (3).

Za PPI velja, da so glavne medmolekulske sile, ki jih stabilizirajo, predvsem hidrofobne in deloma tudi elektrostatske interakcije (4). Jakost PPI variira od šibkih, ki imajo afinitetne konstante vezave v mikromolarnem območju, do močnih, kjer je jakost vezave lahko tudi v pikomolarnem področju, in je le-ta odvisna tudi od prisotnosti posttranslacijskih modifikacij na proteinih (npr. fosforilacije in metilacije), kofaktorjev in koncentracije drugih potencialnih vezavnih partnerjev in ligandov (4).

Raziskave so pokazale, da so številne PPI ključne pri delovanju mnogih bioloških procesov, kot so: celični metabolizem, transport, prenos signalov znotraj in med celicami ter programirana celična smrt – apoptoza (4, 5). Njihovo poznavanje je torej nujno za poglobljeno razumevanje signalnih in regulatornih biokemijskih poti v celici ter za vpogled v medcelično komunikacijo (6).

PPI imajo zaradi svoje regulatorne in signalne funkcije tudi pomembno vlogo pri številnih patoloških stanjih, kot so npr. rakave bolezni, vnetni procesi, avtoimunske ter druge bolezni, in so v zadnjih letih zaradi večjega poznavanja molekularnega in fiziološkega ozadja postale privlačne tarče razvoja novih učinkovin (6). Z vključitvijo slednjih smo tako pridobili pomembno novo skupino proteinskih tarč, ki dopolnjuje klasične skupine, kot so encimi, receptorji, ionski kanali in z ligandi aktivirani transkripcijski dejavniki (7). Več zdravilnih učinkovin, ki delujejo preko tega mehanizma, so že uvedli v zdravljenje različnih bolezni. Nekatere modulirajo PPI tako, da preprečijo tvorbo PPI, druge pa za terapevtski učinek stabilizirajo nastali proteinski kompleks. Več kot deset takšnih modulatorjev PPI je že v klinični uporabi, še več molekul pa je v različnih stopnjah kliničnih raziskav (7). Sintezna učinkovina tirofiban prepreči agregacijo trombo-

citov preko zaviranja PPI in je tudi prva zdravilna učinkovina, ki so jo razvili iz računalniško načrtovane spojine vodnice (8). Več modulatorjev PPI je iz skupine naravnih spojin, ki so pomemben vir modulatorjev PPI (9). Tako so molekule iz skupine taksanov (npr. paklitaksel in docetaksel) učinkovite protirakave učinkovine, naravno spojino ciklosporin A pa uporabljamo kot imunosupresivno učinkovino.

V prispevku bomo predstavili nekatere pristope pri načrtovanju modulatorjev PPI, predvsem zaviralcev PPI. Obravnavali bomo tudi primere molekul, ki so vstopile v klinična preizkušanja za zdravljenje različnih patoloških stanj. Nadalje se bomo posvetili drugi pomembni skupini molekul – stabilizatorjem PPI, ki prav tako s predstavniki, uvedenimi v zdravljenje, širijo paradigmo modulacije PPI kot uspešnega pristopa pri zdravljenju bolezenskih stanj. Dotaknili se bomo tudi vloge sintezno modificiranih peptidov in njihovih derivatov pri prvih korakih razumevanja modulacije PPI. Bralca, ki bi o področju želel dobil še širšo sliko, želimo napotiti tudi na več obsežnejših pregledov tega področja v angleškem jeziku (5-7, 10-15).

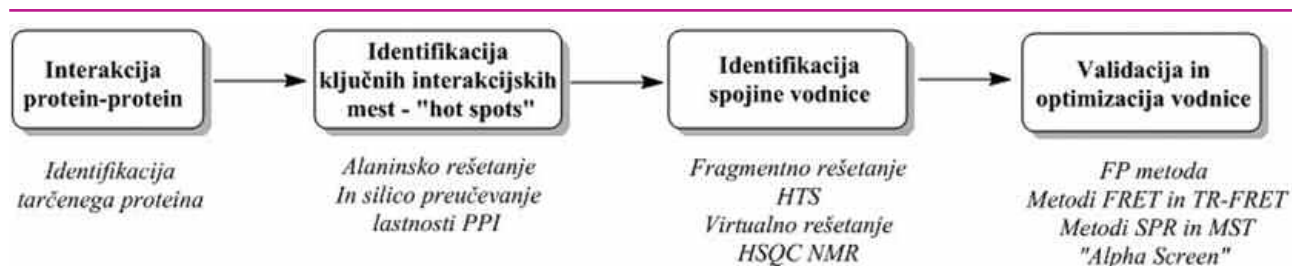
## 2 NAČRTOVANJE IN OVREDNOTENJE MODULATORJEV INTERAKCIJ MED PROTEINI

Do prvih pomembnih korakov pri razvoju na področju modulatorjev PPI je prišlo v časovnem razdobju 1995–2005. Takrat so ugotovili, da je mogoče PPI učinkovito zavirati z majhnimi organskimi molekulami (7). Strukturno gledano so modulatorji PPI navadno večji in bolj hidrofobni od klasičnih zdravilnih učinkovin, zato velja, da je razvoj modulatorjev PPI zahtevnejši od ciljanja klasičnih farmacevtsko relevantnih tarč. Navkljub tem omejitvam modulatorji PPI v primerjavi z malim molekulami pogosto ponujajo možnost selektivne vezave, saj so površine med proteini bolj raznolike (6, 7). Pomembna prednost pa je tudi manjša dovzetnost teh površin za mutacije in posledične odpornosti proti razvitim učinkovinom (6). Slika 1 prikazuje stopnje pri načrtovanju in ovrednotenju predvsem zaviralcev PPI (5, 6, 13). Tako kot pri načrtovanju molekul, ki interagirajo s klasičnimi farmacevtskimi tarčami, tudi tu večinoma uporabljamo kombinacijo eksperimentalnih in računskih tehnik.

### 2.1. INTERAKCIJSKA MESTA »HOT SPOTS« ZA NAČRTOVANJE MODULATORJEV PPI

Proteini se povezujejo med seboj z obsežnimi ploskimi površinami in dolgimi kanali z veliko površino, navadno med 1500



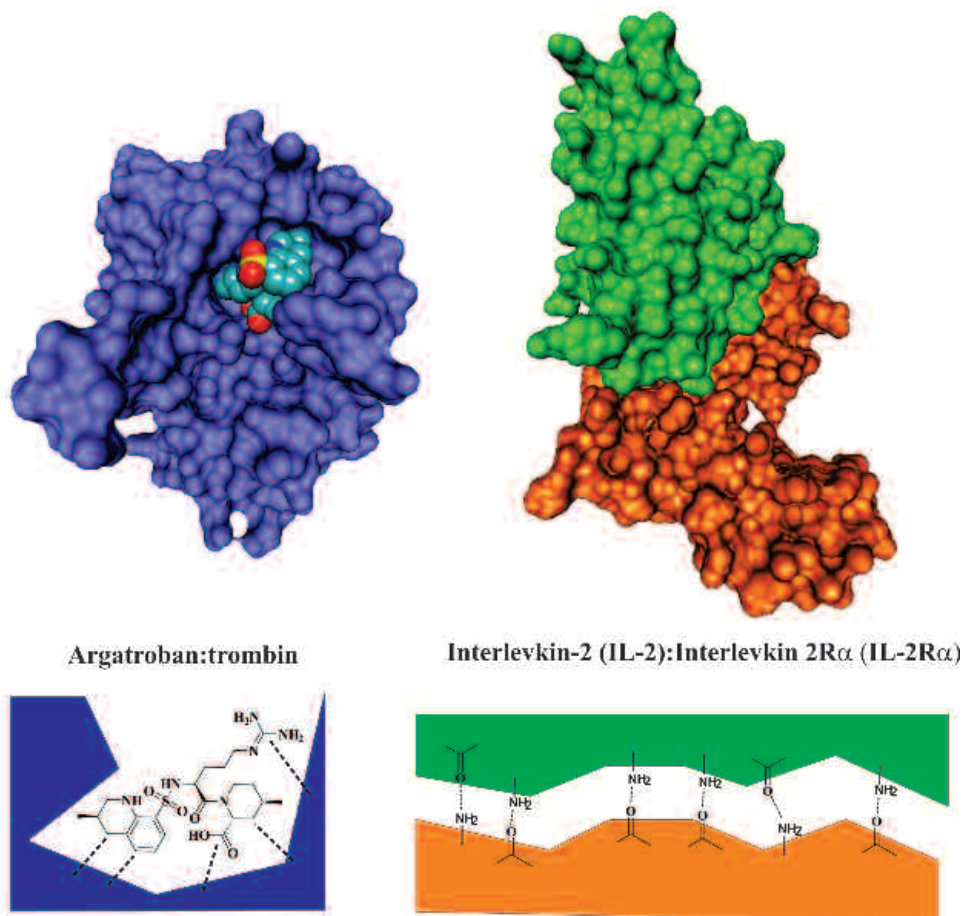


Slika 1: Faze načrtovanja zaviralcev interakcij med proteini in nekatere metode, ki jih uporabljamo v posameznih korakih.

Figure 1: Steps in the design of the inhibitors of protein-protein interactions and overview of some commonly used methods.

in  $3000 \text{ \AA}^2$  brez izraženih ali definiranih aktivnih mest (slika 2), ki imajo pri klasičnih tarčah, ki običajno vežejo nizkomo-  
lekulske ligande, bistveno manjšo površino (med 300 in  $500 \text{ \AA}^2$ ) (7, 11). Ugotovili so, da ploske interakcijske površine PPI

vsebujejo topološko dobro definirana mesta, kjer je skon-  
centrirana večina vezavne energije med dvema proteinoma. Angleški izraz za ta ključna interakcijska področja je »hot spots«, kar lahko prevedemo tudi kot »vroče točke« (slika 2)



Slika 2: Strukturni in shematski prikaz interakcije med proteinsko tarčo (trombin) in ligandom – organsko molekulo argatroban (PDB:1DWC) ter PPI med interlevkinom 2 (IL-2) in njegovim receptorjem IL-2Rα (PDB:1Z92).

Figure 2: Structural and shematic represnetation of an interaction between a target protein (thrombin) and a small molecule (argatroban) (pdb:1DWC) and a protein–protein interaction between interlevkin 2 (IL-2) and its receptor IL-2Rα (PDB:1Z92).

(4, 5, 10). Poenostavljeno si jih lahko predstavljamo kot nekakšna »aktivna mesta« celotnega področja PPI in predstavljajo okoli 20 do 30 % interakcijske površine, kar znaša med 250 in 900 Å<sup>2</sup> (7). Teorija področij »hot spots« je pomembna pri načrtovanju modulatorjev, predvsem zaviralcev PPI, saj je ciljnanje na te dele interakcijske površine, kjer se nahajajo ključni aminokislinski preostanki, učinkovit način, da preprečimo tvorbo PPI. Tako načrtovanje spojin, ki bi te interakcije modulirale, strukturno omejimo le na te dele interakcije med proteinoma (11, 12).

Področja »hot spots« lahko odkrijemo s pomočjo alaninskega rešetanja, kjer posamezne aminokislinske ostanke sistematično zamenjamo z alaninom in ovrednotimo razliko v vezavni energiji po vsaki zamenjavi (4). Vse bolj se uveljavljajo tudi *in silico* metode, s katerimi računalniško izvedemo preiskovanje interakcijskih površin med proteini in identificiramo ključna interakcijska področja, hitreje in cenejše kot z *in vitro* eksperimentalnimi tehnikami. Za razumevanje medmolekulske prepoznavne in energetike PPI uporabljamo tudi metode molekulskih simulacij, kot so molekulska dinamika, metadinamika in druge računske metode proučevanja PPI (6, 16).

## 2.2. IDENTIFIKACIJA SPOJIN VODNIC – FRAGMENTNO REŠETANJE IN REŠETANJE HTS

Najpogostejši eksperimentalni orodji, ki ju uporabljamo pri rešetanju in identifikaciji organskih molekul kot spojin vodnic modulatorjev PPI, sta fragmentno rešetanje in rešetanje visokih zmogljivosti (HTS). NMR spektroskopijo, predvsem tehniko <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC, pogosto uporabljamo pri fragmentnem načrtovanju za potrditev in opredelitev vezave fragmentov na tarčni protein, ki sodeluje v PPI. Tudi tu imajo pomembno vlogo pri izboru spojin računalniške metode, ki omogočajo virtualno rešetanje knjižnic molekul, tako z uporabo znanih ligandov kot z uporabo tarčnega proteina (5, 6).

Pri fragmentnem rešetanju poskušamo identificirati manjše fragmente; navadno molekule z molekulsko maso, manjšo od 200 Da, ki se vežejo na izbrano tarčo in imajo možnost nadaljnje optimizacije. Lahko identificiramo tudi več fragmentov, ki interagirajo na različnih mestih PPI in jih nato povežemo v končno molekulo (slika 3) (16). Na sliki 3 predstavljamo tudi primer fragmentnega načrtovanja zaviralca PPI med antiapoptotičnim proteinom Mcl-1 in BH3 domeno proapoptotičnega proteina, ki bi bil uporaben v protirakavi terapiji. Tu so najprej identificirali vezavo dveh različnih fragmentov v področje »hot spot« proteina Mcl-1 in ju nato združili v spojino vodnico (17). Druga metoda identifikacije

spojin vodnic modulatorjev PPI je rešetanje visokih zmogljivosti (HTS, *high-throughput screening*), kjer eksperimentalno rešetamo knjižnice večjih molekul. Izbrane zadetke nato sintezno optimiziramo do želenih lastnosti (6).

## 2.3. OVREDNOTENJE MODULACIJE PPI

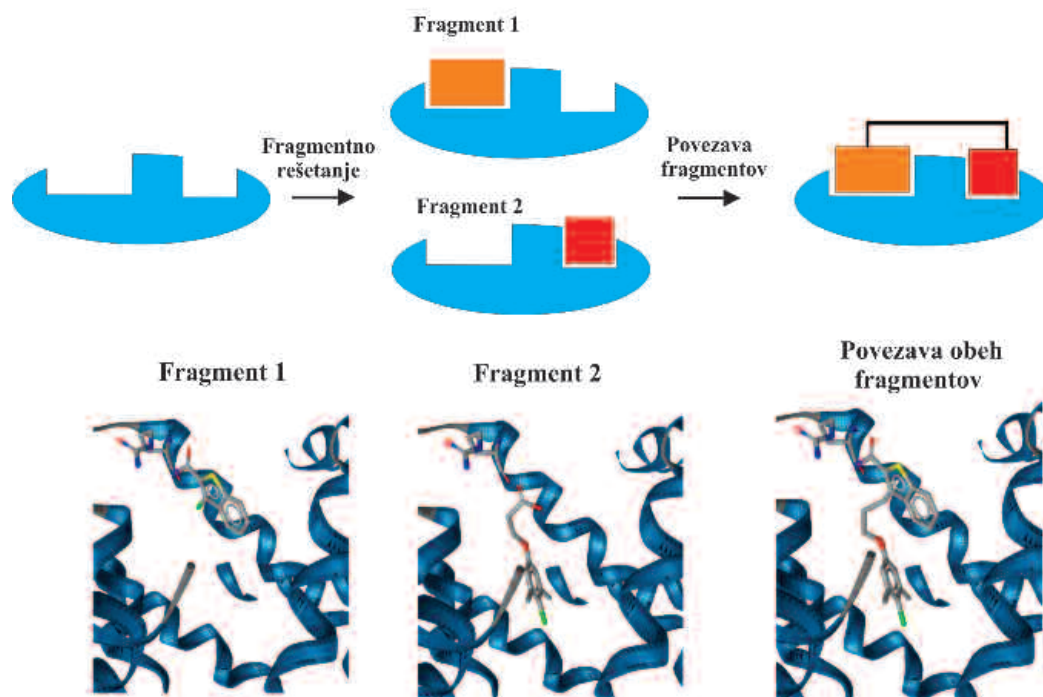
Pri identifikaciji vezave molekule na tarčni protein moramo ovrednotiti tudi nivo modulacije (npr. zaviranja) PPI. Metodi, ki ju najpogosteje uporabljamo, sta fluorescenčna polarizacija (FP) in metoda prenosa energije z resonanco fluorescence (FRET) oz. njena časovno odvisna različica, metoda TR-FRET (13).

Pri fluorescenčni polarizaciji (FP) eno izmed molekul PPI označimo s fluoroforjem in nato s pomočjo linearno polarizirane svetlobe njegove elektrone vzbudimo na višji energijski nivo. Označene molekule nato emitirajo absorbirano energijo pri višji valovni dolžini z manjšo energijo. Do tega pojava pride zaradi gibanja in trkov molekul v raztopini med ekscitacijo in emisijo ter prehodov na nižje rotacijske in vibracijske energijske nivoje znotraj ekscitiranega elektronskega nivoja. Večje molekule kot tudi kompleksi (npr. kompleks protein1-protein2 na sliki 4) rotirajo počasneje kot manjše entitete (npr. kompleks protein1-zaviralec), zato se lahko fluorescenčno označene molekule ločijo po velikosti. Tako ovrednotimo nivo vezave zaviralca na tarčni protein, označen s fluoroforjem (13).

Pri metodi FRET označimo oba proteina z različnima fluoroforjema in izkoristimo pojav Försterjevega prenosa resonančne energije (slika 4). Ko dovedemo energijo  $\lambda E_D$ , spravimo donorski kromofor 1 v vzbujeno elektronsko stanje. Le-ta preko mehanizma sklopitve dipol-dipol prenese energijo  $\lambda E_{D-A}$  na akceptorski fluorofor 2, ki je ravno take intenzitete, da povzroči elektronski prehod le-tega na elektronsko vzbujeno stanje. Akceptorski fluorofor 2 nato seva energijo  $\lambda E_{MA}$  preko mehanizma fluorescence, ki jo detektiramo. Pomembno je izpostaviti, da je učinkovitost pojava FRET obratno sorazmerna z razdaljo med obema fluoroforoma, kar pomeni, da metoda omogoča tudi določanje razdalje med fluoroforoma. To je osnovni princip ovrednotenja PPI, saj se v prisotnosti zaviralca razdalja med fluoroforoma poveča in zato ne opazimo več pojava FRET, ampak le izsevano fluorescenco donorskega fluorofora z energijo  $\lambda E_{mD}$ . V praksi uporabljamo modificirano metodo TR-FRET (*time-resolved FRET*), kjer kot donorske fluorofore običajno uporabimo komplekse lantanidnih (Ln<sup>3+</sup>) ionov. Slednji po ekscitaciji sproščajo energijo počasneje in zato lažje ločimo želeno fluorescenco zaradi pojava FRET od ostalih izsevanih fluorescenc (ozadja) in tako izboljšamo občutljivost in selektivnost metode (13).







*Slika 3: (Zgoraj) Shematski prikaz metode fragmentnega rešetanja (17), (Spodaj) Primer načrtovanja zaviralca PPI proteina Mcl-1 z metodo fragmentnega načrtovanja (18).*

*Figure 3: (Above) Overview of the fragment screening method (based on ref. 17), (Below) Example of the fragment-based design of the lead PPI inhibitor compound of the Mcl-1 protein (based on ref. 18).*

Poleg omenjenih dveh metod se za evalvacijo vezave ligandov PPI uporabljajo tudi številne druge metode, kot so: encimskoimunski test (ELISA), površinska plazmonska resonanca (SPR), mikrotermoforeza (MST), izotermalna kalorimetrija (ITC), metoda AlphaScreen, mikroskopija na atomsko silo (AFM) itd. (6, 10, 13).

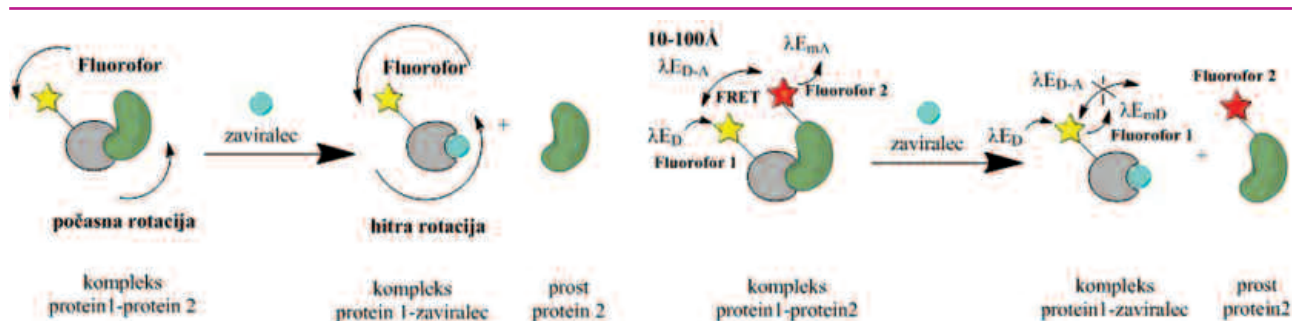
### 3 ZAVIRALCI INTERAKCIJ MED PROTEINI

Uveljavljena razdelitev zaviralcev PPI upošteva kompleksnost interakcijske površine partnerskega proteina, ki se veže na tarčni protein. Zaviralce PPI delimo v tri skupine: skupino, kjer interakcijsko področje predstavlja linearni peptid, nadalje skupino, kjer interakcijsko področje pred-

stavlja element sekundarne strukture, ter tretjo skupino, kjer interakcijsko področje predstavlja več elementov, ki tvorijo terciarno strukturo (npr. vijačnica alfa in del linearnega peptida) (7).

V prvi skupini na sliki 5 je eden izmed prvih zaviralcev PPI, ki so prišli v klinično uporabo, tirofiban (7, 8). Deluje tako, da prepreči interakcijo fibrinogena z integrinskim receptorjem IIb/IIIa in deluje kot antiagregatorna učinkovina. Načrtovan je bil kot mimetik linearnega tripeptida proteina fibrinogena RGD oz. Arg-Gly-Asp (8).

Veliko molekul, ki delujejo kot inhibitorji PPI, ima protirakavo delovanje, saj PPI regulirajo številne signalne in regulatorne poti v celici, kar lahko izkoristimo tudi v terapevtske namene. Primer je molekula LCL-161, ki je trenutno v drugi fazi kliničnih preizkušanj za zdravljenje multiplega mieloma (19). Mehanizem delovanja te molekule je zaviranje PPI med inhibicijskim apoptotičnim proteinom (IAP) in različnimi proteolitičnimi kaspazami. Tudi bromodomene, »epi-



Slika 4: Shematski prikaz metode fluorescentne polarizacije (FP) in metode prenosa energije z resonanco fluorescence (FRET).  
Figure 4: Schematic representation of the fluorescent polarization (FP) method and Förster resonance energy transfer (FRET) method.

genetski bralci«, ki se vežejo na acetilirane lizine histonov in tako aktivirajo različne gene, so pomembne protirakave tarče. Molekula I-BET762, ki inhibira PPI med bromodomeno in acetiliranimi lizini na N-terminalnih koncih histonov, je v kliničnih raziskavah za zdravljenje rakavih bolezni (20). Razvoj inhibitorjev PPI je usmerjen tudi v odkrivanje novih protivirusnih učinkovin. Primer ene izmed teh je molekula v klinični uporabi BI-224436, ki inhibira PPI med HIV integrazo in linearnim peptidom kofaktorja LEDGF/p75 (*lens epithelial derived growth factor*), ki je pomemben za učinkovitejšo integracijo virusne DNA v gostiteljev genom, saj zaščiti HIV integrazo pred proteolizno razgradnjo in stimulira njeno katalitično aktivnost (21, 22).

Pri skupini molekul na sliki 5, kjer interakcijsko področje predstavlja element sekundarne strukture, je molekula ABT-263 (navitoklaks) v kliničnih raziskavah kot potencialna protirakava učinkovina. ABT-263 deluje kot zaviralec PPI med antiapoptotičnimi proteini iz družine Bcl (npr. Bcl-2, Bcl-xL in Bcl-w) in proapoptotičnimi proteini (npr. Bax ali Bid). Antiapoptotični proteini Bcl so močno izraženi v rakavih celicah in zaviranje povzroči apoptozo rakavih celic. Ključni strukturni element PPI med obema skupinama, ki je služil za načrtovanje, je vijačnica alfa (t. i. domena BH3) na proapoptotičnih proteinih (23).

Pomembna tarča je tudi E3 ubikvitin-protein ligaza, znana tudi kot »murine double minute 2« (MDM2), ki je regulator celičnega tumor-supresorskega proteina p53, ki sproži apoptozo. MDM2 je ključen pri razgradnji proteina p53, saj kompleks MDM2/p53 sproži razgradnjo p53 preko ubikvitinske poti in s tem poskrbi za majhno koncentracijo p53 v normalnih celicah. MDM2 je bolj izražena v rakavih celicah, saj se tako rakava celica izogne prehodu v apoptozo. Molekula v kliničnih vrednotenjih RG7388 (idasanutlin) zavre PPI med transkripcijskim faktorjem p53 in MDM2 in izkazuje obetavno protirakavo delovanje. Ključni

strukturni element interakcije med MDM2 in p53, ki so ga uporabili za načrtovanje, je bila vijačnica alfa na proteinu p53 (24).

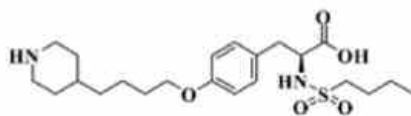
Primerov molekul, ki oponašajo kompleksnejšo terciarno strukturo proteina, katerega vezavo zavirajo, je manj in so večinoma v začetnih fazah raziskav. Molekula SP4206 (slika 5) deluje tako, da prepreči PPI med interlevkinom 2 (IL-2) z njegovim receptorjem IL-2R $\alpha$ . Poleg vezave v del proteinskega kanala IL-2, ki tvori interakcije z vijačnico alfa molekule IL-2R $\alpha$ , molekula pokrije še nekatere sosednje interakcije med IL-2R $\alpha$  in IL-2 (25). Vrednotijo tudi nove protivirusne spojine za zdravljenje okužb s humanimi papiloma (HPV) virusi, ki preprečijo PPI med helikazo E-2 in transkripcijskim faktorjem E-2 virusa HPV (7) .

## 4 STABILIZACIJA INTERAKCIJ MED PROTEINI

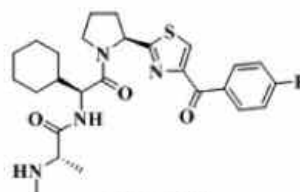
Molekule, ki stabilizirajo PPI, omogočajo trajnejšo stabilizacijo homooligomernega ali heterooligomernega kompleksa med proteinskim partnerji. Mehanizem stabilizacije lahko poteka preko direktne vezave molekule med oba proteinska partnerja in tako povečane stabilnosti PPI ali pa preko alosteričnega mehanizma vezave molekule le z enim proteinskim partnerjem, ki prav tako vodi do povečane stabilizacije celotnega kompleksa (13, 14).

Primeri direktnih stabilizatorjev PPI so imunosupresivne zdravilne učinkovine naravnega izvora: rapamicin, ciklosporin A, FK506, in spojine iz skupine taksanov (npr. paklitaksel in docetaksel), ki so že uvedene v terapijo raka (slika 6). Več stabilizatorjev PPI, predvsem naravnega izvora, uporabljamo tudi kot kemijska orodja za proučevanje re-

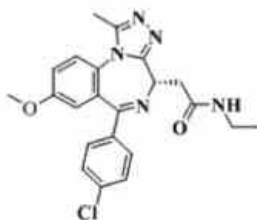


**Interakcijski del PPI: Linearni peptid**

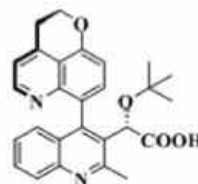
tirofiban<sup>8</sup>  
integrinski receptor IIb/IIIa



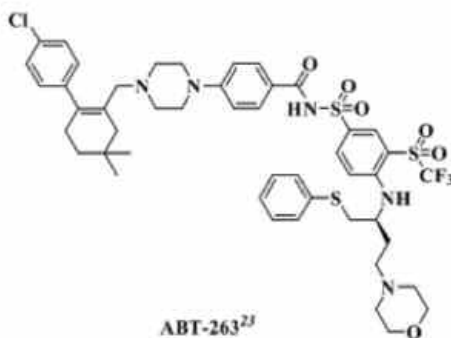
LCL-161<sup>19</sup>  
inhibicijski apoptotični protein (IAP)



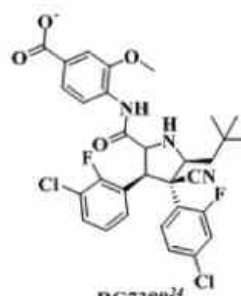
1-BET762 (GSK525762)<sup>20</sup>  
bromodomene (BET)



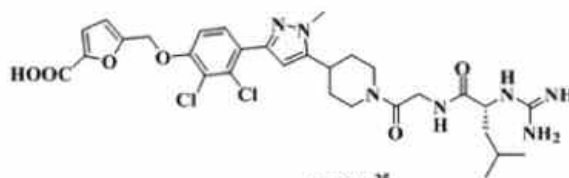
BI 224436<sup>21</sup>  
HIV integraza

**Interakcijski del PPI: Element sekundarne strukture**

ABT-263<sup>23</sup>  
proteini družine Bcl-2



RG7388<sup>24</sup>  
protein MDM2

**Interakcijski del PPI: Terciarna struktura**

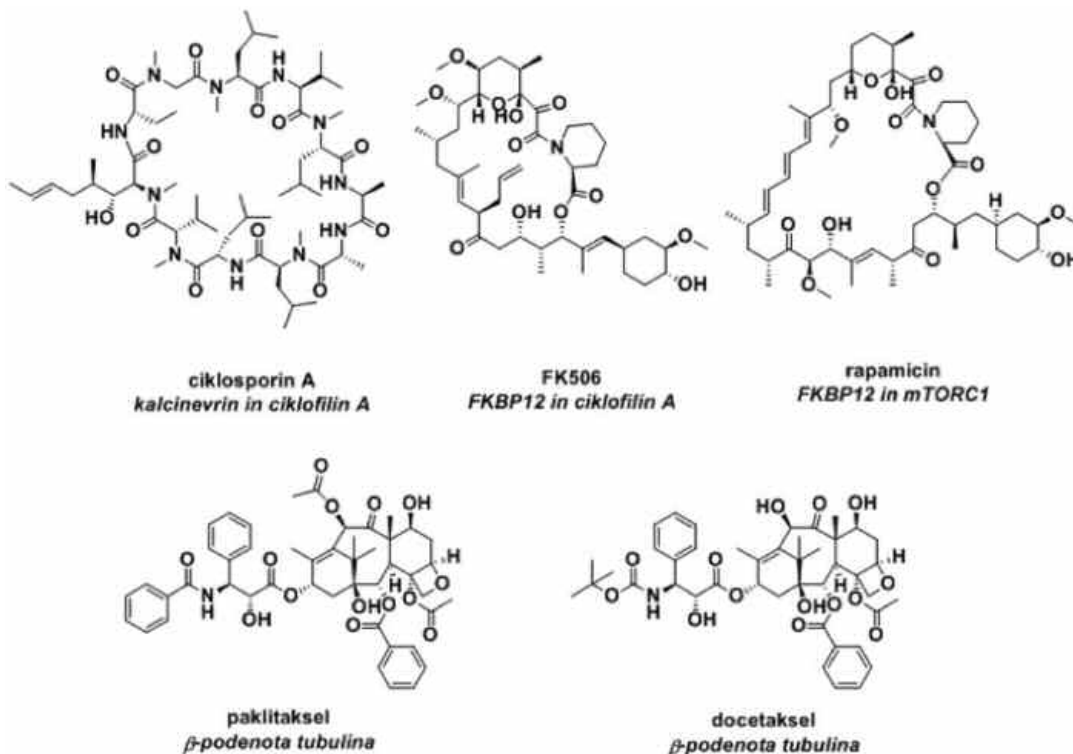
SP4206<sup>25</sup>  
interleukin-2 (IL-2)

**Slika 5:** Primeri izbranih zaviralcev PPI, razdeljeni glede na kompleksnost interakcijske površine proteina, katerega vezavo zavirajo. Naveden je tudi tarčni protein vsakega predstavljenega zaviralca.

**Figure 5:** Examples of selected inhibitors of protein-protein interactions classified based on the complexity of the surface of the binding PPI partner. Target protein of each discussed inhibitor is also provided.

gulacijskih in signalnih poti tako v človeških kot rastlinskih celicah, npr. brefeldin A, forskolin, fusikokin A, avksin, jasmonat in inozitol tetrafosfat. Za mnoge navedene učinkovine so šele po uvedbi v terapijo pri natančnejših razi-

skavah ugotovili, da delujejo kot stabilizatorji PPI. Zato je tak pristop k modulaciji PPI še v zgodnejših fazah razvoja in ima še precejšen neizkoriščen terapevtski potencial (13, 14).



Slika 6: Primeri stabilizatorjev PPI v klinični praksi. Navedeni so tudi pripadajoči proteini, ki sodelujejo v posamezni stabilizaciji PPI (13,14).  
 Figure 6: Examples of molecules that stabilize protein-protein interactions used in clinical practice. Corresponding proteins involved in each PPI stabilization are also outlined (13,14).

Mehanizem delovanja treh omenjenih imunosupresivnih učinkovin ima veliko podobnosti. Ciklosporin A se veže na protein ciklofilin A, ki je peptidil-proлил izomeraza. Ta kompleks protein-ligand v nadaljevanju tvori stabilni makromolekularni kompleks z regulatornim in katalitičnim delom fosfataze kalcinevrin, ki je odgovorna za stimulacijo imunskega odziva. Zaradi specifične geometrije s ciklosporinom A stabilizirane PPI med kalcinevrinom in ciklofilinom A je sterično blokirano encimsko aktivno mesto kalcinevrina in s tem stimulacija imunskega odziva. Podoben mehanizem delovanja ima FK506, le da se ta najprej veže na receptor za FK506, imenovan FKBP12 oz. tudi *FK506 Binding Protein*, ki je prav tako kot ciklofilin A peptidil-proлил izomeraza, nato pa ta tvori analogen kompleks protein-protein-ligand s kalcinevrinom, kar onemogoči njegovo encimsko aktivnost. Rapamicin se prav tako najprej veže na FKBP12, nato pa tvori stabilno PPI s protein kinazo mTORC1 (*mammalian TOR complex 1*), ki tudi prepreči encimsko aktivnost mTORC1, ključno za imunski odziv (13, 14). Učinkovini paklitaksel in docetaksel uporabljamo pri zdravljenju več rakavih bolezni in sta glavni predstavnici druge

skupine t. i. alosteričnih stabilizatorjev PPI. Glavni mehanizem delovanja je alosterična stabilizacija PPI med  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenotama tubulina, ki sestavljata citoskelet (mikrotubule) in s tem zaviranje njegove normalne depolimerizacije in razgradnje. Stabilizacija te PPI je posledica vezave omenjenih učinkovin na  $\beta$ -podenoto tubulina. Zato kromosomi niso pravilno pritrjeni na delitveno vreteno in tak sistem ne more preiti pomembne kontrolne regulatorne točke v procesu mitoze celice, kar sproži proces apoptoze (13).

## 5 UPORABA PEPTIDOV IN DERIVATOV KOT MODULATORJEV PPI

Male organske molekule in spojine naravnega izvora niso edini vir modulatorjev PPI. Zaradi velike in ploske interakcijske površine PPI ter težav pri identifikaciji interakcijskih žepov, predvsem v začetnih stopnjah razvoja, imajo pomembno vlogo tudi konformacijsko omejeni in ciklični pep-





tidi, peptidomemitiki ter tudi protitelesa. Sami nativni krajši peptidi pa ne morejo delovati kot učinkoviti zaviralci PPI zaradi termodinamsko neugodne izgube entropije pri vezavi na tarčo (10).

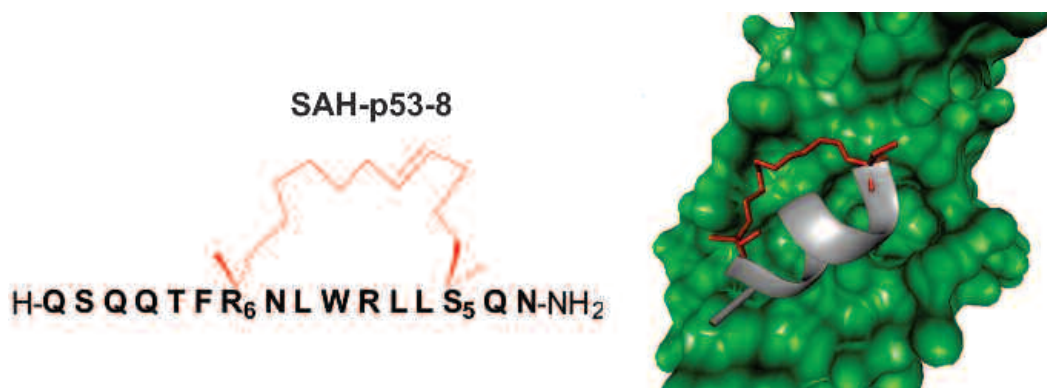
Tako načrtovane peptidne in peptidomimetične molekule so fleksibilnejše in omogočajo preiskovanje in identifikacijo ključnih interakcijskih področji ter so skupaj z alaninskim rešetanjem pomembna stopnja razvoja modulatorjev PPI, predvsem zaviralcev. Njihove slabosti so zlasti slaba biološka uporabnost in potencialna imunogenost. Te lastnosti lahko z različnimi pristopi izboljšamo, vseeno pa so te molekule večinoma le vmesna stopnja razvoja modulatorjev PPI (10).

Konformacijsko omejeni peptidi, ki oponašajo sekundarno strukturo enega izmed proteinov, so pomembni pri študiju PPI. Izmed mnogih pristopov bi izpostavili skupino t. i. »spetih peptidov« (»stapled peptides«). Gre za kratke, večinoma  $\alpha$ -helikalne peptide, ki so ključni interakcijski del enega izmed proteinov. Z uvedbo »sponke« krajše, navadno olefinske verige, ki poveže dva aminokislinska preostanka peptida, lahko omejimo konformacijsko mobilnost in izboljšamo vezavo takšnih peptidov na tarčni protein (6, 10). Pogosto identifikacija ugodnega spetega peptida pomaga pri naslednjem koraku, ko poskušamo razviti peptidomimetično molekulo z manj peptidnimi elementi in tako dobiti molekule z boljšo biološko uporabnostjo (6). Slika 7 prikazuje strukturo tako razvitega spetega peptida SAH-p53-8, tj. ključnega dela tumorskega supresorja p53, in njegovo interakcijo s proteinom MDM2, ki je pomemben pri rakavih boleznih (13).

Kot zaviralce PPI uporabljamo tudi protitelesa. Njihove prednosti so visoka specifičnost vezave in stabilnost v človeškem serumu. Zahtevnost njihove izdelave in omejena biološka uporabnost pa omejujejo njihovo terapevtsko uporabnost (5). Primer uporabe protitelesa kot zaviralca PPI je molekula daklizumab, ki jo uporabljamo v klinični praksi za zdravljenje nevrodegenerativne avtoimunske bolezni multiple skleroze. Deluje tako, da zavira PPI med interleukinom 2 (IL-2) in njegovim receptorjem (26).

## 6 SKLEP

Interakcije med proteini (PPI) so ključni del celične organizacije in signalizacije. Z večjim razumevanjem njihovih povezav predstavljajo nov nabor tarč pri razvoju učinkovin za širok spekter bolezenskih stanj. Zadnje desetletje razvoja modulatorjev PPI je prineslo več novih učinkovin, uvedenih v terapijo, ter še več molekul, ki so sedaj v fazah kliničnih raziskav. Sočasno poteka tudi razvoj novih eksperimentalnih tehnik, ki omogočajo identifikacijo in karakterizacijo PPI. Poleg zaviralcev PPI poteka tudi intenziven razvoj stabilizatorjev PPI ter spojin, ki delujejo preko alosteričnih mehanizmov. Modulatorji PPI obsegajo širok kemijski prostor, ki ga, poleg malih organskih molekul, sestavljajo tudi spojine naravnega izvora, veliko vlogo pri razumevanju in načrtovanju novih molekul imajo tudi konformacijsko omejeni



*Slika 7: Struktura načrtovanega spetega peptida (SAH-p53-8), mimitika tumorskega supresorja p53, in njegova vezava na protein MDM2 (PDB:3V3B).*

*Figure 7: Structure of the designed stapled peptide (SAH-p53-8), mimetic of the tumor suppressor p53, and its binding conformation to MDM2 protein (PDB:3V3B).*

peptidi in peptidomimetiki. Vse večje poznavanje interakcija bo v prihodnosti še povečalo nabor tarč iz teh kompleksnih mrež pri identifikaciji terapevtikov nove generacije.

## 7 LITERATURA

1. De Las Rivas J, Fontanillo C. Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Comput Biol* 2010; 6(6): 1-8.
2. Zhang QC, Petrey D, Deng L et al. Structure-based prediction of protein-protein interactions on a genome-wide scale. *Nature* 2012; 490(7421): 556-560.
3. Nooren IM, Thornton JM. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J* 2003; 22(14): 3486-3492.
4. Keskin O, Gursoy A, Ma B et al. Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact? *Chem Rev* 2008; 108(4): 1225-1244.
5. Arkin MR, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(4): 301-317.
6. Laraia L, McKenzie G, Spring DR et al. Overcoming chemical, biological, and computational challenges in the development of inhibitors targeting protein-protein interactions. *Chem Biol* 2015; 22(6): 689-703.
7. Arkin MR, Tang Y, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. *Chem Biol* 2014; 21(9): 1102-1114.
8. Hartman GD, Egbertson MS, Halczenko W et al. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. discovery and design of exosite inhibitors. *J Med Chem* 1992; 35(24): 4640-4642.
9. Jukič M, Perdih A, Šolmajer T. Integriran pristop iskanja spojin vodnic naravnega izvora z uporabo eksperimentalnih in računalniško podprtih metod. *Farm Vestn* 2012; 63(1): 54-63.
10. Nevola L, Giralt E. Modulating protein-protein interactions: the potential of peptides. *Chem Commun* 2015; 51(16): 3302-3315.
11. Wells JA, McClendon CL. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* 2007; 450(7172): 1001-1009.
12. Mullard A. Protein-protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(3): 173-175.
13. Milroy LG, Grossmann TN, Hennig S et al. Modulators of protein-protein interactions. *Chem Rev* 2014; 114(9): 4695-4748.
14. Bier D, Thiel P, Briels J et al. Stabilization of protein-protein interactions in chemical biology and drug discovery. *Prog Biophys Mol Biol* 2015; 19(1): 1-10.
15. Fischer G, Rossmann M, Hyvönen M. Alternative modulation of protein-protein interactions by small molecules. *Curr Opin Biotechnol* 2015; 35: 78-85.
16. Rakers C, Bermudez M, Keller BG et al. Computational close up on protein-protein interactions: how to unravel the invisible using molecular dynamics simulations? *WIREs Comput Mol Sci* 2015; 5(5): 345-359.
17. Perdih A, Kotnik M, Oblak M et al. Uporaba orodij računalniške kemije pri načrtovanju in iskanju novih spojin vodnic. *Farm Vestn* 2010; 61(4): 185-260.
18. Friberg A, Vigil D, Zhao B et al. Discovery of potent myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) inhibitors using fragment-based methods and structure-based design. *J Med Chem* 2013; 56(1): 15-30.
19. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP Proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther* 2013; 9: 1285-1304.
20. Mirguet O, Gosmini R, Toum, J et al. Discovery of epigenetic regulator I-BET762: lead optimization to afford a clinical candidate inhibitor of the BET bromodomains. *J Med Chem* 2013; 56(19): 7501-7515.
21. Fader LD, Malenfant E, Parisien M et al. Discovery of BI 224436, a noncatalytic site integrase inhibitor (NCINI) of HIV-1. *ACS Med Chem Lett* 2014; 5(4): 422-427.
22. Fenwick C, Amad M, Bailey MD et al. Preclinical profile of BI 224436, a novel HIV-1 non-catalytic-site integrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(6): 3233-3244.
23. Tse, C, Shoemaker AR, Adickes J et al. ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008; 68(9): 3421-3428.
24. Ding Q, Zhang Z, Liu JJ et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J Med Chem* 2013; 56(14): 5979-5983.
25. Thanos CD, DeLano WL, Wells JA. Hot-spot mimicry of a cytokine receptor by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(42): 15422-15427.
26. Waldmann TA, O'Shea J. The Use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(5): 507-512.

