

Podczas spalania wyrobów gumowych mogą powstawać szkodliwe substancje, co stanowi największy problem ekologiczny. Można temu jednakże zapobiec stosując do spalania zużytych opon obrotowe, bezdymowe piece cementowe do wypalania klinkieru. W temperaturze ponad 1273 K opona w piecu cementowym ulega całkowitemu spaleniu, nie pozostaje z niej popiół ani żużel, a dodatkowo zawarte w oponach metale są trwale związane z uzyskanym klinkierem, polepszając jego właściwości. Opony całe lub rozdrobnione mogą służyć jako paliwo podstawowe bądź dodatkowe do produkcji pary, energii elektrycznej, cementu, papieru, stali lub w spalarniach śmieci. Taki sposób spalania zużytych opon ma ważny aspekt ekologiczny z uwagi na to, iż pył zatrzymywany jest w elektro-filtrach, emisja dwutlenku siarki i związków organicznych nie zwiększa się, zmniejsza się natomiast emisja tlenków azotu [3, 4].

## Podsumowanie

Zużyte opony należą do odpadów silnie obciążających środowisko naturalne. Odporność na uszkodzenia mechaniczne oraz działanie warunków panujących na drogach (temperatura, woda) to główne cechy decydujące o właściwościach użytkowych opony, ale jednocześnie odpowiedzialne za trudności związane z jej zagospodarowaniem po zakończeniu użytkowania. Dlatego też wciąż poszukuje się nowych metod mających na celu usunięcie takiego

rodzaju odpadu bez nadmiernego obciążenia środowiska naturalnego.

## Literatura

- [1] [http://www.biznes.newseria.pl/news/tylko\\_15\\_proc\\_zuzytych,p1444579517](http://www.biznes.newseria.pl/news/tylko_15_proc_zuzytych,p1444579517)
- [2] Parasewicz W., 2009, Odzysk i recykling opon samochodowych Elastomery, 4, 46-48.
- [3] Gronowicz J., Kubiak T., 2007, Recykling zużytych opon samochodowych, Problemy Eksploatacji, 2, 5-18.
- [4] Smejda-Krzewicka A., Bociong K., Skrodzka J., Piwowarczyk A., Rzymiski W. M., 2012, Przegląd metod recyklingu wyrobów gumowych, Przetwórstwo Tworzyw. 5, 518-522.
- [5] [http://panoramafirm.pl/%C5%9B%C4%85skie,tarnog%C3%B3rski,tarnowskie\\_g%C3%B3ry,stefana\\_batorego,11/gumpax-ayujzf\\_nwf.html](http://panoramafirm.pl/%C5%9B%C4%85skie,tarnog%C3%B3rski,tarnowskie_g%C3%B3ry,stefana_batorego,11/gumpax-ayujzf_nwf.html)
- [6] Januszkiewicz K., Melaniuk M., Ryms M., Klugmann-Radziemska E., 2010, Możliwość wykorzystania całych używanych opon, Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska, 12.
- [7] Januszewicz K., Melaniuk M., Klugmann-Radziemska E., 2010, Zagospodarowanie zużytych opon w świetle prawodawstwa obowiązującego w Polsce, Elastomery, 2, 10-16.
- [8] <http://www.eprzewoznik.pl/technika-opony/opony-bieżnikowane-goodyear-kmax-krok-ku-oszczednosciom/>
- [9] <http://tworzywa.com.pl/Oferta/Oferta-184-Linia-dorozdrabniania-opon-samochodowych-354311.html>
- [10] <http://www.rynekinfrastruktury.pl/mobile/drogi-z-ekologiczna-nawierzchnia-48554.html>
- [11] Robaczyński T., 2009, Recykling opon. Cz. I. Źródła pozyskiwania zużytych opon 1, 22-23.

**Julia Krzywik, Joanna Katarzyńska**

joanna.katarzynska@p.lodz.pl

*Institut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka*

# Renesans peptydów a nowe cele terapeutyczne

Peptydy spełniają w organizmie wiele ważnych funkcji: są hormonami, neuroprzekaznikami, immunomodulatorami, wpływają na metabolizm oraz odpowiadają za degradację białek mikroorganizmów, działając jako antybiotyki. Ich niewątpliwą zaletą jest wysoka selektywność przy stosunkowo niskiej dawce niezbędnej do wywołania efektu biologicznego. I jeśli dodać do tego brak toksycznych metabolitów, praktycznie bez możliwości akumulacji w organizmie – peptydy byłyby idealnymi lekami [1, 2]. Dlaczego więc mamy tak mało leków peptydowych?

Peptydy od lat wzbudzały zainteresowanie ze względu na potencjalne możliwości zastosowania w terapii wielu chorób. Najbardziej spektakularnymi przykładami, które funk-

cjonują na rynku farmaceutycznym od ponad pół wieku są insulina, oksytocyna czy cyklosporyna, ale na półkach aptek zadomowiły się już także: oktreetyd (analog somatostatyny, Sandostatin), leuprorelina (analog gonadoliberyny, Lupron), goserelina (kolejny analog gonadoliberyny, Zoladex), czy octan glatirameru (Copaxone). Warto dodać, że obecnie zarejestrowanych jest ponad 100 preparatów o strukturze peptydowej [3]. Wciąż jest to jednak jedynie niewielki procent zważywszy na liczbę wszystkich dostępnych obecnie na rynku preparatów. Jakie są główne wady peptydów, które nie pozwalają na ich skuteczne zastosowanie w terapii? Przede wszystkim niska stabilność enzymatyczna, krótki okres półtrwania, szybki klirens wątrobowy i nerkowy, ale



i niedostateczny transport bierny przez błonę komórkową czy też problemy z formulacją, wszystko to drastycznie obniża absorpcję i dystrybucję leku peptydowego w organizmie. Jednocześnie ekskrecja nietoksycznych metabolitów aminokwasowych następuje stosunkowo łatwo i szybko. Wysoka wrażliwość peptydów na działanie enzymów proteolitycznych obecnych w przewodzie pokarmowym (endo- i egzopeptydaz, amino- i karboksypeptydaz, których w ludzkim układzie pokarmowym jest ok. 600, więc oczekiwany efekt biologiczny często nie trwa dłużej niż 1 min) osłabiała penetrację śluzówki jelita i praktycznie wykluczała możliwość ich doustnego podania, często pozostawiając dożylną drogę podania jako jedyną do wyboru [4].

Osiągnięciem ubiegłego wieku było opracowanie skutecznych metod poprawiających niską biodostępność i stabilność metaboliczną peptydów poprzez wprowadzenie różnego typu modyfikacji np. nienaturalnych aminokwasów (D-, N-metylo,  $\alpha, \alpha$ -dipodstawionych itp.), zastąpienie wiązań amidowych bioizosterycznymi odpowiednikami, cyklizację łańcucha peptydowego, czy wreszcie utworzenie koniugatów z polimerami itp. [1, 2]. Konstrukcja peptydomimetyków na skalę przemysłową była jednak kosztowna, niejednokrotnie niemożliwa do przeprowadzenia. Obecnie, dzięki możliwości sekwencjonowania genomu, rozwojowi inżynierii genetycznej, poznane zostały mechanizmy biosyntezy peptydów pochodzących z naturalnych źródeł, zawierających w swej strukturze nieproteinogenne aminokwasy. W ten sposób otwarto drogę do rozwoju nowych technologii syntetycznych, łączących techniki chemiczne, enzymatyczne, rekombinowane, wykorzystujące transgeniczne zwierzęta lub rośliny bądź układy ekspresji bez udziału komórek [3, 5]. Wraz z rozwojem nanotechnologii zoptymalizowane zostały oraz opracowane również nowe metody dostarczania leków peptydowych. Zaobserwowano np., że forma mikroemulsji skuteczniej zwiększa dostępność biologiczną i odporność na degradację enzymatyczną aniżeli klasyczna forma stała. Tak samo iniekcje podskórne, domięśniowe i dożylnie, które powodują dyskomfort i często prowadzą do słabego zdyscyplinowania pacjentów, są ograniczane kosztem alternatywnych dróg podania, czy to wykorzystujących błonę śluzową (leki podawane podjęzykowo, donosowe, wziewne), czy też systemy transdermalne (leki w postaci plastrów) [3, 6-8]. Najbardziej obiecująca wydaje się być enkapsulacja leku peptydowego w postaci mikro- i nanocząstek z zastosowaniem liposomów, dendrymerów, fulerenów czy nanorurek węglowych. W ten sposób peptyd chroniony jest przed działaniem enzymów, a jednocześnie ułatwiony zostaje jego transport przez błonę komórkową. Uwolnienie peptydu połączone z degradacją nanocząstki następuje

bowiem dopiero w założonym miejscu przeznaczenia [9].

Postęp w dziedzinie biologii molekularnej ułatwił rozumienie fizjologicznych i patologicznych funkcji peptydów i zapoczątkował nową erę w terapii z udziałem peptydów i białek. Rosnące zapotrzebowanie na nowe terapie przyczyniło się do ożywienia zainteresowania peptydami, głównie z powodu możliwości selektywnego wpływania na oddziaływania „białko-białko”, które to interakcje stanowią obecnie wyzwanie dla wielu badaczy. Jaka jest rola oddziaływań pomiędzy białkami w organizmie ludzkim? Ogromna, bo takie oddziaływania występują w większości procesów zachodzących na poziomie komórkowym, np. aby doszło do stanu zapalnego w tkankach, jako odpowiedzi układu immunologicznego np. na alergen, musi dojść do oddziaływania pomiędzy cząstką adhezyjną zlokalizowaną w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych (ICAM)-1 a antygenem związanym z funkcją limfocytów (LFA)-1, obecnym na powierzchni komórek odpornościowych, wówczas nastąpi ich migracja do sąsiadujących tkanek i „rozlanie” stanu zapalnego [10]. Poza tym układ immunologiczny nie obroni organizmu przed patogenem, jeśli nie dojdzie do aktywacji limfocytów T w wyniku uruchomienia ścieżki sygnałowej zależnej od fosfatazy białkowej – kalcyneuryny. Kalcyneuryna musi utworzyć kompleks z kalmoduliną i jonami wapnia, aby doszło do produkcji interleukiny 2 (IL-2), rezultatem czego jest wywołanie odpowiedzi komórkowej [11]. Innym przykładem jest aktyna, która utworzy mikrofilamenty odpowiedzialne za ruchliwość komórki, jeśli dojdzie do jej interakcji z profiliną. Wspomniane włókna białkowe zanikną, jeśli aktyna będzie oddziaływać z ADF/kofiliną [12]. Podobne przykłady można mnożyć – wszystkie dowodzą niezwyklej istotności interakcji „białko-białko” dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych (rys.1).



Rys. 1. Przykłady oddziaływań „białko-białko” na poziomie komórkowym [2]

Wspomnieć w tym miejscu należy, że stosowane w tej chwili metody leczenia, bazujące na klasycznych lekach

małocząsteczkowych nakierowane są głównie na takie, z reguły pojedyncze cele, jak enzymy, receptory sprzężone z białkiem G (GPCR s), nośniki i receptory hormonów jądrowych (NHR s) oraz kanały jonowe [13]. Jednakże w leczeniu chorób zakaźnych, serca, cukrzycy, nowotworów czy chorób autoimmunologicznych okazują się być one niewystarczające. Przyczyny można upatrywać w złożonej etiologii wielu chorób, których terapia musi obejmować kilka celów molekularnych, a nie jeden, jak dawniej przypuszczano. Poza tym stosowanie substancji leczniczych o masie poniżej 500 Da nie zawsze daje spodziewane rezultaty lecznicze, co często wynika z nieefektywnego oddziaływania z docelowymi białkami. Dlaczego? Otóż okazuje się, że powierzchnia interakcji „białko-białko” to obszar ok. 300-4800 Å<sup>2</sup>, podczas gdy lek małocząsteczkowy może co najwyżej stymulować fragment 300-1000 Å<sup>2</sup> [14, 15]. Dodatkowo struktura białka nie jest stała, przystosowuje się do oddziaływania z ligandem w momencie kontaktu, przy czym bezpośrednio za przekazanie sygnału odpowiedzialne są jedynie pewne krótkie fragmenty o powierzchni ok. 100 Å<sup>2</sup> (*hot spots* bądź *interfaces*). Ustalono, że składają się one zwykle od trzech do dziesięciu reszt aminokwasowych, wśród których najczęściej spotykanymi są reszty proliny, izoleucyny, tyrozyny, tryptofanu, asparaginy i argininy [16]. Jeśli *hot spots* są rozmieszczone blisko siebie, to mała cząsteczka jest w stanie efektywnie wywoływać założony efekt biologiczny, w przeciwnym wypadku, gdy miejsca oddziaływania są oddalone od siebie, odpowiedź pozostaje zakłócona.

Peptydy, z racji swojej budowy, są naturalnymi ligandami białek, mogą selektywnie modulować ich wybrane fragmenty w celu uruchomienia konkretnej ścieżki sygnałowej. Samo przekazanie sygnału to złożona sieć wzajemnej interakcji białek, które pośrednicząc w wewnątrzkomórkowej propagacji informacji biologicznej, wpływają na zachowanie homeostazy komórkowej. Sygnały mogą pochodzić z powierzchni komórki i są przekazywane do miejsca docelowego w komórce. Zdarzeniem inicjującym przekazanie sygnału jest rozpoznanie przez receptory specyficznych ligandów, w następstwie czego dochodzi do proliferacji, migracji, angiogenezy, odpowiedzi immunologicznej czy śmierci komórki. Sygnalizacja biologiczna wymaga utworzenia kompleksów białkowych aktywowanych i we właściwym czasie, i we właściwym miejscu, a ich powstawanie powinno być zarówno odwracalne, jak i przemijające, jeśli homeostaza komórkowa ma być zachowana. Moc i czas trwania sygnału ma kluczowe znaczenie dla działania hormonów, cytokin i czynników wzrostu oraz innych specyficznych cząstek regulatorowych, pośredniczących w ich działaniu. Procesy sygnałowe mają charakter przejściowy dzięki wtórnym

modyfikacjom białek, zachodzącym z udziałem tzw. negatywnych cząstek sygnałowych, cząstek efektorowych czy enzymów, regulujących tworzenie wyższych kompleksów białkowych. Jednak wysoka złożoność interakcji białek czyni często te oddziaływania podatnymi na zakłócenia, wynikające z mutacji elementów uczestniczących w mechanizmie przekazywania sygnału. Już sama zmiana w proporcjach i lokalizacji wspomnianych elementów wpływa na trwałość i stabilność powstających kompleksów białkowych. W wielu przypadkach stanowi to przyczynę rozwoju różnych chorób, dla których ukierunkowane sposoby leczenia obejmują hamowanie albo inicjowanie określonych oddziaływań „białko-białko” w celu utrzymania konkretnej odpowiedzi biologicznej przywracającej stan równowagi w komórce [17].

Obecne techniki badawcze dają możliwość uzyskania informacji o sekwencji i konformacji fragmentów białkowych odpowiedzialnych bezpośrednio za wzajemne interakcje. W pierwszej kolejności następuje wyłonienie „zastępczych” ligandów peptydowych (aptamerów) o dobrze zdefiniowanej strukturze I- i II-rzędowej. Izolacja i wykorzystanie aptamerów peptydowych jako inhibitorów poszczególnych elementów sygnalizacyjnych stanowi doskonały punkt wyjścia dla opracowania wysoce selektywnych leków [18]. W dalszym etapie bowiem konstruuje się peptydomietyki o działaniu antagonistycznym lub agonistycznym w stosunku do docelowych receptorów bądź substraty dla enzymów, które są w stanie sterować nieprawidłowymi procesami biologicznymi zachodzącymi w organizmie [2, 19]. Możliwość wpływania na interakcje „białko – białko” stanowi ważną strategię terapeutyczną, jednakże nie jest procesem prostym, głównie ze względu na dużą różnorodność takich oddziaływań (szacuje się je na ok. 300 000), jak również na fakt stosunkowo wysokiego stężenia białka w komórce (ok. 100 mg w 1 ml). Poza tym do wywołania zaburzenia wystarczają często „subtelne” zmiany w toku trwania samego eksperymentu, zwłaszcza w warunkach *in vivo*, co w konsekwencji może prowadzić do niewłaściwych wniosków. Utrudnienie stanowi też sama struktura białka, które może zawierać takie same lub różne podjednostki. Co więcej, oligomery mogą być tworzone już w trakcie syntezy białka na rybosomach jako „kompleksy obligatoryjne”, jak również mogą później formować „kompleksy nieobligatoryjne”, regulowane przez wtórne zmiany składników uczestniczących w ich tworzeniu. Złożoność kompleksów białkowych wraz z kompleksem transkrypcyjnym determinują dużą ilość różnych oddziaływań pomiędzy wieloma zaangażowanymi w te oddziaływania elementami składowymi, a skutki przerwania jednego oddziaływania są kompensowane



przez inne interakcje. Parametry kinetyczne, lokalizacja wewnątrzkomórkowa, dostępność struktury docelowej, immunogenność i stabilność konstrukcji białkowej, którą ligand peptydowy moduluje, decydują więc o jego potencjalnej użyteczności terapeutycznej. Najbardziej atrakcyjne wydaje się być zastosowanie peptydów jako inhibitorów konkurencyjnych dla każdej funkcjonalnej domeny białka docelowego, co znacznie zwiększa subtelność ukierunkowanej ingerencji [20, 21].

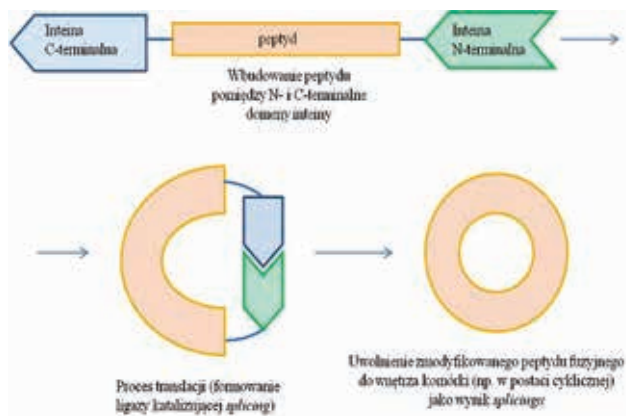
Badania interakcji „białko-białko” są obecnie możliwe dzięki rozwojowi nowych technologii, takich jak np. technika prezentacji fagowej (*phage display*), prezentacji mRNA (*mRNA display*) czy prezentacji rybosomowej (*ribosome display*) [22, 23]. Najczęściej używana i najstarsza technika prezentacji fagowej zakłada użycie bakteriofagów nitkowatych typu M13 i f1 infekujących *E. coli*, do genomu których wprowadza się odcinek DNA kodujący określony peptyd. Następuje ekspresja informacji genetycznej prowadząca do utworzenia peptydu fuzyjnego, połączonego z białkiem powierzchniowym, budującym otoczkę bakteriofaga. W ten sposób peptyd fuzyjny prezentowany jest na zewnątrz wirionu, podczas gdy wprowadzone DNA pozostaje wewnątrz cząstki faga. Technika ta (zwana też często biopanningiem) pozwala na analizę przesiewową ogromnej ilości różnych wariantów peptydowych struktur, z których każda ma swoją sekwencję DNA. Po selekcji fagów wiążących docelową cząstkę, dokonuje się ich amplifikacji w komórkach *E. coli*, a następnie ustala się sekwencję peptydu fuzyjnego na podstawie sekwencjonowania DNA faga. W ostatnich latach technika *phage display* była głównie stosowana do selekcji przeciwciał, wiążących się z docelowym białkiem. Metoda prezentacji mRNA zakłada z kolei transkrypcję DNA, kodującego określony peptyd, na mRNA, po czym następuje ligacja mRNA z fragmentem DNA wiążącym puromycynę. W dalszej kolejności selekcji peptydów dokonuje się po translacji mRNA prowadzonej *in vitro*. Prezentacja rybosomowa jest techniką podobną do *mRNA display*, ponieważ też polega na przepisywaniu cząstek mRNA na odpowiadające im peptydy, ale jednocześnie peptyd ciągle pozostaje związany z rybosomem. Dodać należy, że sekwencja nukleotydowa kodująca peptyd uzyskiwana jest na drodze odwrotnej transkrypcji z udziałem reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą RTPCR. Ponieważ reakcja jest bardzo czuła, pojedyncza prezentacja rybosomowa może być wykorzystana do bardzo wielu testów. Biblioteki fagowe, mRNA, rybosomowe, są doskonałymi narzędziami umożliwiającymi testowanie licznych peptydów i białek.

Wykorzystując wspomniane metody, stworzono takie biblioteki peptydowe, które obejmowały sekwencje o zdefi-

niowanej strukturze II-rzędowej, złożone nie tylko z kodowanych, ale i również nienaturalnych aminokwasów. Możliwe stało się zaprojektowanie związków o zadanej stabilności, przenikalności przez błony komórkowe, i ewentualnie charakteryzujących się biodostępnością doustną (doustna forma podania nadal nastrocza problemów w przypadku związków o masie powyżej 500 Da). Pasaqualini et al. dzięki technice prezentacji fagowej wykonanej *in vivo* otrzymali peptydy, które były w stanie dotrzeć do naczyń krwionośnych mózgu i nerek i osiągnąć tam swój efekt biologiczny [24]. Arap et al. z kolei zastosowali technikę prezentacji fagowej w organizmie ludzkim, dzięki czemu odkryli peptyd kodowany przez gen Il-11, którego zwiększoną ilość zaobserwowano w nowotworowo zmienionych komórkach prostaty [25]. Firma PeptiDream, stosując metodę prezentacji fagowej, wygenerowała trylionową bibliotekę struktur makrocyklicznych mimikujących cyklosporynę [26, 27]. Z kolei Ra Pharmaceuticals wykorzystała technikę prezentacji mRNA w celu wyselekcjonowania potencjalnych antagonistów mcl-1 (białka różnicowania komórek białaczki szpikowej) i Ras (białka zaangażowanego w komórkową transdukcję sygnału), które okazały się zdolne do stosunkowo łatwego pokonywania bariery komórkowej, a co za tym idzie, do osiągnięcia trwałego efektu biologicznego [28, 29].

Odrębną techniką jest katalizowana przez inteiny ligacja peptydów i białek SICLOPPS (*Split Intein Catalyzed Ligation Of Proteins and PeptideS*), która pozwala otrzymać peptydy wewnątrz żywych komórek. Peptydy te sprzęgnięte z systemem selekcji genetycznej, głównie z genami repeterowymi, ułatwiają identyfikację inhibitorów enzymów bądź cząstek wiążących białka [22, 30]. Ideą metody jest inkorporacja danej sekwencji peptydowej pomiędzy N- i C-terminalne domeny białkowe naturalnej *split* inteiny, która uczestniczy w procesach posttranslacyjnych zachodzących w niektórych organizmach (klasycznym przykładem jest cyjanobakteria *Nostoc punctiforme* i jej gen *NpuDnaE* kodujący taką inteinę). Podczas ekspresji dwie domeny inteinowe łączą się, tworząc aktywną ligazę białkową, która katalizuje proces trans splicingu, prowadzący do uwolnienia peptydu, najczęściej w formie cyklicznej typu „głowa do ogona” (*head to tail*). Cykliczny peptyd tworzy się dzięki obecności reszt o charakterze nukleofilowym: cysteiny, seryny bądź treoniny, które mogą ulec ligacji dzięki możliwości tworzenia wiązań estrowych (depsipeptydowych) na skutek przegrupowań N O acylowych. Kritzer et al. zastosował metodę SICLOPPS do utworzenia biblioteki cyklopeptydów w komórkach drożdży. Z pięciomilionowej puli wyizolował dwa cykliczne peptydy, które efektywnie blokowały toksyczną  $\alpha$ -synukleinę, odpowiedzialną za rozwój choroby Parkinsona [31].





Rys. 2. Schemat przebiegu SICLOPPS [22]

Biorąc pod uwagę dokonany postęp w dziedzinie biotechnologii, peptydy po raz pierwszy od dziesięcioleci mają realną szansę na zawładnięcie rynkiem farmaceutycznym. Wiek XX należał do leków małocząsteczkowych, które ze względu na hydrofobowy charakter oraz niską masę cząsteczkową idealnie dopasowywały się do zasad ustalonych przez Lipińskiego [32] i potwierdzonych przez analizę Vebra et al. [33]. Reguła Lipińskiego (*Lipinski's Rule of Five*, R05) wskazywała główne cechy fizykochemiczne, którymi powinien charakteryzować się lek o dobrej biodostępności po doustnym podaniu, a mianowicie

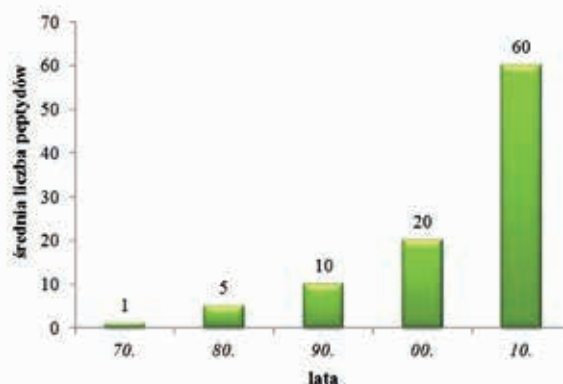
- nie więcej niż 5 donorów wiązań wodorowych,
- nie więcej niż 10 akceptorów wiązań wodorowych,
- masa molowa poniżej 500 Da,
- współczynnik podziału woda-oktanol ( $\log P$ ) poniżej 5.

Jednakże stosowanie się do reguły Lipińskiego doprowadziło w pewnym sensie do kryzysu innowacyjności w przemyśle farmaceutycznym. Pomimo odkrywania dużej liczby potencjalnych kandydatów, rynek środków leczniczych pozostawał do początków XXI wieku na stałym, niewysokim poziomie. Jak wynika z danych zamieszczonych w Annual Reports in Medicinal Chemistry za lata 1980-2011, do roku 1980 zarejestrowano 20 nowych leków i poziom ten pozostawał do 2011 roku niezmienny – pomimo rozwoju nowoczesnych technik badawczych i wzrastających nakładów finansowych.

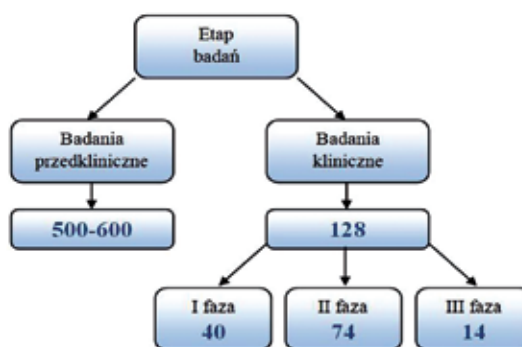
Początek XXI wieku to czas przeciwnał monoklonalnych, skądinąd nie stosujących się do klasycznych zasad wskazanych przez Lipińskiego, a mimo to sprawnie wprowadzonych do terapii chorób związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu odpornościowego. Jednakże stosowanie przeciwnał wiąże się z pewnymi ograniczeniami, wynikającymi z ich niskiej stabilności, biodostępności czy immunogenności oraz wysokich kosztów produkcji. W porównaniu do nich peptydy wydają się posiadać więcej

zalet. Mają wyższą aktywność na jednostkę masy, lepiej penetrują chorobowo zmienione tkanki, odznaczają się mniejszą immunogennością, są z reguły wolne od zanieczyszczeń mikrobiologicznych i nie tworzą dobrze rozwiniętych struktur III i IV-rzędowych, posiadają też lepszą stabilność w temperaturze pokojowej, jak również niższe są koszty ich produkcji. Peptydy mogą więc wypełnić brakującą lukę pomiędzy strukturami małocząsteczkowymi a wielkocząsteczkowymi, zwłaszcza, że (jak to już było wspomniane) są już metody usprawniające ich parametry farmakokinetyczne (absorbpcję, dystrybucję, metabolizm, ekskrecję i toksyczność – ADMET) [2].

Liczba związków o budowie peptydowej w badaniach klinicznych wzrosła sześćdziesięciokrotnie w przeciągu 40 lat (rys. 3) [34]. Ale to w ostatnim dziesięcioleciu obserwowany jest znaczący wzrost liczby terapii peptydowych na rynku (tabela 1). Liczba zarejestrowanych leków peptydowych systematycznie rośnie – z grubsza podwaja się co dziesięć lat. Podczas gdy w latach 2001 – 2010 wprowadzono do obrotu ok. 10 leków peptydowych, to w ciągu ostatnich pięciu lat przybyło już 6 dodatkowych terapeutyków o budowie peptydowej, a ok. 500-600 peptydów jest na etapie badań przedklinicznych, przy czym tylko 14 dotarło do III fazy badań klinicznych (rys. 4) [34, 35].



Rys. 3. Średnia liczba peptydów w badaniach klinicznych na przestrzeni 40 lat [34]



Rys. 4. Schematyczne zestawienie liczby testowanych peptydów na etapie badań przedklinicznych i klinicznych [34, 35]

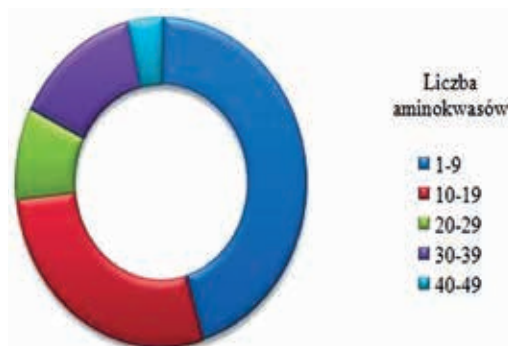


Tabela 1. Leki peptydowe zarejestrowane w latach 2002 – 2012 [2]

Nazwa handlowa	Nazwa zwyczajowa	Cel terapeutyczny	Schorzenie	Rok
Forteo	Teryparatyd	Agonista PTH1R parathormonu (1-34)	Zapalenie kości i stawów	2002
Fuzeon	Enfuwirtyd	Inhibitor oddziaływań białko-białko	HIV	2003
Prialt	Zykonotydyd	Inhibitor kanałów Ca <sup>2+</sup>	Analgezyja	2004
Byetta	Eksenatydyd	Agonista GLP-1 R peptydu glukagonopodobnego	Cukrzyca typu II	2005
Symlyn	Pramlintydyd	Analog amyliny	Cukrzyca typu I/II	2005
Somatuline	Lanreotydyd	Analog SSTsomatostatyny	Akromegalia	2007
Nplate	Romiplostym	Analog trombopoetyny	Hematologia – immunologiczna plamica małopłytkowa	2008
Egrifta	Tesamorelina	Agonista GHRF hormonu uwalniającego czynnik wzrostu	Lipodystrofia	2010
Victoza	Liraglutyd	Agonista GLP-1 R peptydu glukagonopodobnego	Cukrzyca typu II	2010
Bydureon	Eksenatydyd LAR	Agonista GLP-1 R peptydu glukagonopodobnego	Cukrzyca typu II	2011
Surfaxin	Lucinaktant	Surfaktant płucny	Zespół zaburzeń oddychania noworodka	2012
Omontys	Peginesatydyd	Analog erytropoetyny	Anemia–niedokrwistość nerkopochodna	2012
Signifor	Pazyreotydyd	Analog somatostatyny	Choroba Cushinga	2012
Kyprolis	Carfilzomib	Inhibitor proteasomu	Szpiczak mnogi	2012
Linzess	Linaklotydyd	Agonista cykazy guanylowej 2C	Zespół jelita drażliwego i przewlekłe zaparcia idiopatyczne	2012
Gattex	Teduglutyd	Analog peptydu glukagonopodobnego	Zespół krótkiego jelita	2012

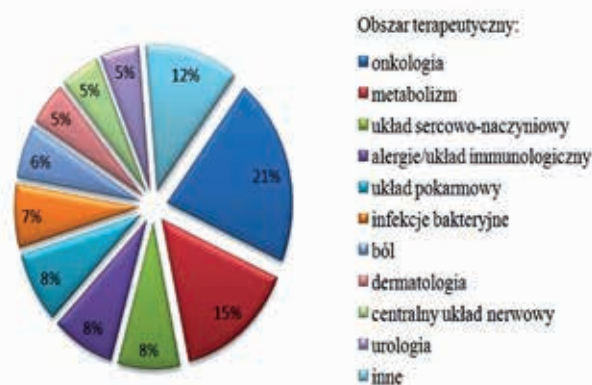
Największy udział w rynku farmaceutycznym mają peptydy o sekwencjach krótszych aniżeli 20-aminokwasowe (75%). Przy czym zaznaczyć należy, że prezentowane dane nie uwzględniają przeciwciał, bo mimo peptydowej budowy posiadają zbyt duże masy cząsteczkowe, aby według definicji, mogły być zaliczane do peptydów (rys. 5) [1-3].

Największy odsetek wśród dopuszczonych do badań klinicznych stanowią związki do zastosowań w leczeniu nowotworów i zaburzeń metabolicznych, odpowiednio 21% i 15% (rys. 6) [36]. Terapie peptydowe, obejmujące schorzenia układu immunologicznego, to obecnie tylko 8%,



Rys. 5. Rozkład zależności pomiędzy długością sekwencji peptydowej a liczbą dostępnych na rynku preparatów peptydowych [3]

ale prezentowany rozkład uwzględnia również nakłady finansowe ponoszone na innowacyjne leki w poszczególnych obszarach terapeutycznych, a zarazem pomija przeciwciała monoklonalne. Dane literaturowe sugerują w każdym razie, że w 2014 roku badania kliniczne w obszarze immunologii przechodziło około 140 peptydów. Ich potencjał terapeutyczny może być rozważny pod kątem blokowania lub modulowania odpowiedzi immunologicznej bądź indukowania tolerancji immunologicznej [37].



Rys. 6. Rozkład udziału potencjalnych leków peptydowych w badaniach klinicznych pod względem obszaru terapeutycznego zastosowania [36]

Reasumując, obecny renesans peptydów wydaje się być kompromisem przyjętym przez przemysł farmaceutyczny jako odpowiedź na coraz większe zapotrzebowanie na substancje lecznicze o masie pomiędzy 500 Da (klasyczne leki niskocząsteczkowe) a 5000 Da (przeciwciała) ze względu na koszty *versus* spodziewany efekt biologiczny. Rynek leków o budowie peptydowej (w tym przeciwciała) szacowany jest na ok. 40 bilionów dolarów rocznie, co stanowi ok. 10% udziału w całym światowym rynku farmaceutycznym i ma tendencję zwyżkową (dwukrotnie wyższą aniżeli leki niskocząsteczkowe) [3, 36]. Jest to niewątpliwie związane z rozwojem biologii molekularnej, lepszym zrozumieniem fizjologicznych funkcji peptydów, ich stabilności metabolicznej, sposobów podania i technologii formułacji leków peptydowych, jak również z postępem w metodach syntezy peptydomimetyków.

### Literatura

- [1] Sewald N., Jakubke H.-D., Peptides: Chemistry and Biology, 2<sup>nd</sup> Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2009.  
 [2] Dunn B.M., Peptide Chemistry and Drug design, 1<sup>st</sup> Edition, John Wiley&Sons Inc. 2015.  
 [3] Craik D.J., Fairlie D.P., Liras S., Price D., 2013, The Future of Peptide-based Drugs, Chem. Biol. Drug Des., 81, 136 – 147.  
 [4] Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J., Khrestchatsky M., 2010,

Synthetic therapeutic peptides: science and market, Drug Discov. Today, 15, 40 – 56.

[5] Witt K.A., Gillespie T.J., Huber J.D., Egleton R.D., 2001, Davis T.P., Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability, Peptides, 22, 2329 – 2343.

[6] Antosova Z., Mackova M., Kral V., Macek T., 2009, Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever?, Trends Biotechnol., 27, 628 – 635.

[7] Yin N., Brimble M.A., Harris P.W.R., Wen J., 2014, Enhancing the Oral Bioavailability of Peptide Drugs by using Chemical Modification and Other Approaches, Med. Chem., 4, 763 – 769.

[8] Uhlig T., Kyprianou T., Martinelli F.G., Oppici C.A., Heiligers D., Hills D., Calvo X.R., Verhaert P., 2014, The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation, EuPA Open Proteom., 4, 58 – 69.

[9] Sanvicens N., Marco M.P., 2008, Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine., Trends Biotechnol., 26, 425 – 433.

[10] Lawson, C. and Wolf, S., 2009, ICAM-1 signaling in endothelial cells, Pharmacology Reports, 61, 22–32.

[11] Liu, J.O., 2009, Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation, Immunological Reviews, 228, 184–198.

[12] Bernstein, B.W., Bamburg, J.R., 2010, ADF/cofilin: a functional node in cell biology, Trends in Cell Biology, 20, 187 – 195.

[13] Betz, U.A., Farquhar, R., Ziegelbauer K., 2005, Genomics: success or failure to deliver drug targets?, Curr. Opin. Chem. Biol., 9, 387 – 391.

[14] Pal A., Chakrabarti P., Bahadur R., Rodier F. Janin J., 2007, Peptide segments in protein – protein interfaces, J. Biosci., 32, 101 – 111.

[15] Smith M.C., Gestwicki J.E., 2012, Features of Protein-Protein Interactions that Translate into Potent Inhibitors: Topology, Surface Area and Affinity, Expert Rev. Mol. Med., 14, e16.

[16] Jones, D.S., Silverman, A.P., Cohran J.R., 2008, Developing therapeutic proteins by engineering ligand – receptor interactions, Trends Biotechnol., 26, 498 – 505.

[17] Sillerud, L.O. and Larson, R.S., 2005, Design and structure of peptide and peptidomimetic antagonists of protein – protein interaction. Curr. Protein Pept. Sci., 6, 151 – 169.

[18] Baines, I.C. and Colas, P., 2006, Peptide aptamers as guides for small – molecule drug discovery. Drug Discov. Today, 11, 334 – 341.

[19] Hummel G., Reineke U., Reimer U., Translating Peptides into Small Molecules in Exploiting Chemical Diversity for Drug Discovery, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2006, 184-200.

[20] Seet, B.T., Dikic I., Zhou M.M., Pawson T., 2006, Reading protein modifications with interaction domains, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7, 473 – 483.

[21] Chene P., 2006, Drugs targeting protein – protein interactions, ChemMedChem, 1, 400 – 411.

[22] Bhat A., Roberts L.R., Dwyer J.J., 2015, Lead discovery and optimization strategies for peptide macrocycles, Europ. J. Med. Chem., 94, 471 – 479.

[23] Lipovsek D., Pluckthun A., 2004, In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display, J. Immunol. Methods, 290, 51 – 67.



- [24] Pasqualini R, Ruoslahti E., 1996, Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries, *Nature*, 380, 364 – 366.
- [25] Arap W, Haedicke W, Bernasconi M, Kain R, Rajotte D, Krajewski S, Ellerby HM, Bredeisen DE, Pasqualini R, Ruoslahti E., 2012, Targeting the prostate for destruction through a vascular address, *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99, 1527 – 1531.
- [26] Terret N., 2013, Producing orally bioavailable biologics, *Drug Discov. Dev.*, <http://www.dddmag.com/articles/2013/05/producing-orally-bioavailable-biologics>, 30.10.2015.
- [27] Passioura T., Suga H., 2013, Flexizymes mediated genetic reprogramming as a tool for noncanonical peptide synthesis and drug discovery, *Chem. Eur. J.*, 19, 6530 – 6536.
- [28] Funamoto S, Sasaki T, Ishihara S, Nobuhara M, Nakano M, Watanabe-Takahashi M, Saito T, Kakuda N, Miyasaka T, Nishikawa K, Saido TC, Ihara Y., 2013, Substrate ectodomain is critical for substrate preference and inhibition of g-secretase, *Nat. Commun.*, 4, 3529 – 3541.
- [29] Josephson K., Ma Z, Wang Z., Sun Y., Tobe S., Perlmutter S., Vyasamneni R., Ye P., Boyer N., Arata M., Pattavina K., Seyb K., Zheng H., Sollomoni I., Nims E., de Koning E., Ricardo A., Treco D., 2013, Discovery of high affinity cyclic peptidomimetics binding Mcl-1 and Ras, *Mol. Cancer Ther.*, 12, C212.
- [30] Scott C.P., Abel-Santos E., Wall M., Wahnon D.C., Benkovic S.J., 1999, Production of cyclic peptides and proteins in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 13638 – 13643.
- [31] Kritzer J.A., Hamamichi S., McCaffery J.M., Santagata S., Naumann T.A., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Lindquist S., 2009, Rapid selection of cyclic peptides that reduce alpha-synuclein toxicity in yeast and animal model, *Nat. Chem. Biol.* 5, 655 – 663.
- [32] Lipiński, C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J., 1997, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 3 – 25.
- [33] Veber, D.F., Johnson S.R., Cheng H.-Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D., 2002, Molecular Properties that Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates, *J. Med. Chem.* 45, 2615 – 2623.
- [34] Lax R., 2013, The Future of Peptide Development in the Pharmaceutical Industry, *PharManufacturing: Int. Peptide Rev.*, 10 – 15.
- [35] Kaspar A.A., Reichert J.M., 2013, Future directions for peptide therapeutics development, *Drug Discov. Today* 18, 807 – 817.
- [36] Tsomaia N., 2015, Peptide therapeutics: Targeting the undruggable space, *Eur. J. Med. Chem.*, 94, 459 – 470.
- [37] Zhou Ch., Lu R., Lin G., Yao Z., 2011, The latest developments in synthetic peptides with immunoregulatory activities, *Peptides* 32, 408 – 414.

## Katarzyna Klemba

„Katarzyna Klemba” <175030@edu.p.lodz.pl>

*Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka*

# Biogazownia jako potencjalne źródło zagrożeń emisjami odorowymi oraz działania prewencyjne

## Wstęp

W ostatnich dziesięcioleciach następuje dynamiczny rozwój technologii biogazowych w różnych krajach i regionach świata (Stany Zjednoczone, Niemcy, Szwecja, kraje Azji Południowo-wschodniej), którego celem jest produkcja energii ze źródeł odnawialnych. Podczas beztlenowej fermentacji biomasy pochodzącej z rolnictwa lub innych źródeł wydziela się biogaz, czyli mieszanina metanu i ditlenku węgla, zawierająca także niewielkie stężenia siarkowodoru, amoniaku, wodoru, tlenu, pary wodnej (zwykle w zakresie 45-85% CH<sub>4</sub>, 14-48% CO<sub>2</sub>, 0,05-0,8% H<sub>2</sub>S, 0,005-0,04% NH<sub>3</sub>, 0,2-1% H<sub>2</sub>, do 2% O<sub>2</sub> i 2-7% H<sub>2</sub>O), ślady siloksanów i innych substancji. Zawartość poszczególnych składników biogazu otrzymywanego w procesach fermentacji biomasy nie jest stała, lecz zależy od specyfiki realizowanego procesu tech-

nologicznego oraz rodzaju materiału wsadowego [1-12]. Dostawa surowców do biogazowni, proces ich fermentacji, pozyskiwanie i oczyszczanie biogazu mogą być potencjalnym źródłem szeregu uciążliwości i zagrożeń dla otoczenia, zwłaszcza jeżeli występują błędy w projekcie instalacji lub jej wykonaniu, uchybienia w procedurach BHP, a także ogólnie niska kultura techniczna w firmie [13, 14].

Celem niniejszej pracy jest analiza zagrożeń odorowych, powodowanych przez uciążliwe związki chemiczne siarki i azotu zawarte w biogazie. Oprócz aspektów dotyczących tego problemu należy pamiętać, iż główny składnik biogazu – metan jest wybuchowy. Zagrożenie eksplozją w przypadku mieszaniny utworzonej z metanu, powietrza i gazu obojętnego (N<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>) istnieje w granicach zawartości metanu od 4,9% (DGW – dolna granica wybuchowości) do 15,4% GGW (górną granicą wybuchowości). Jeżeli do