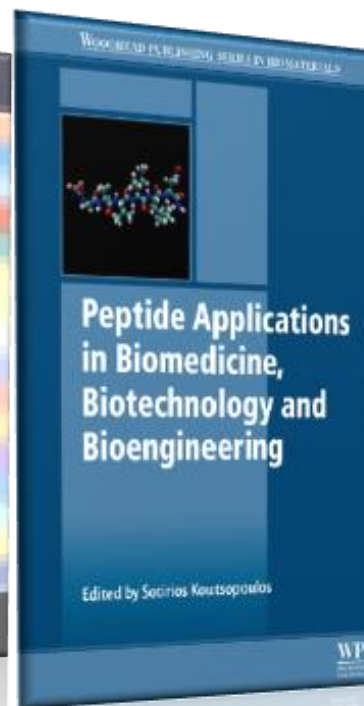
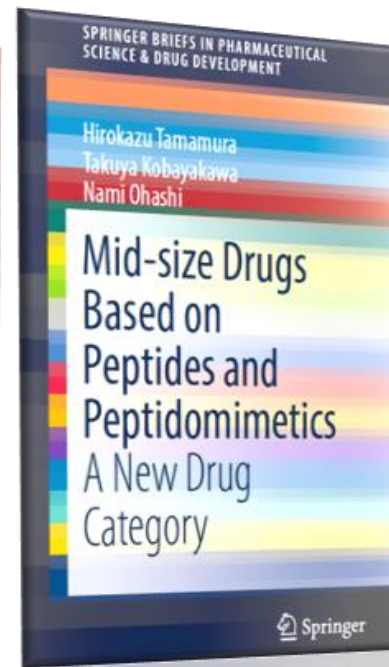
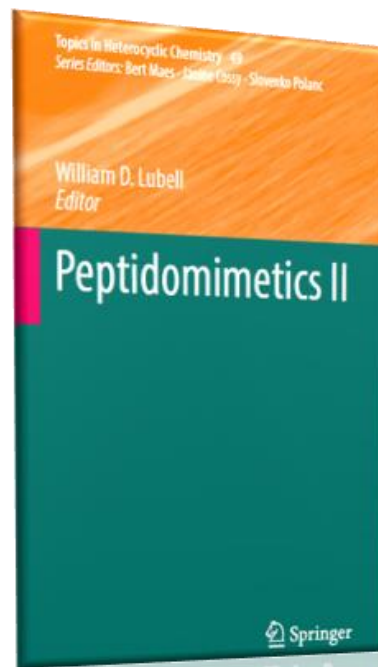
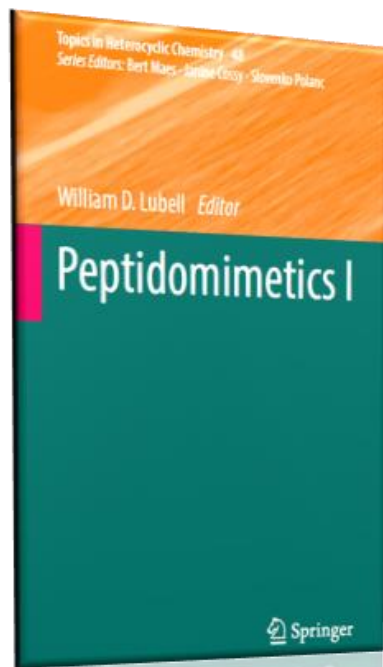
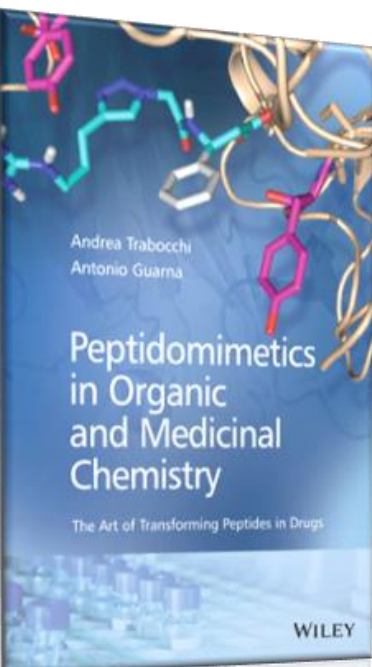




Peptidni mimetici i pseudopeptidi

Prof. dr. sc. Lidija Barišić

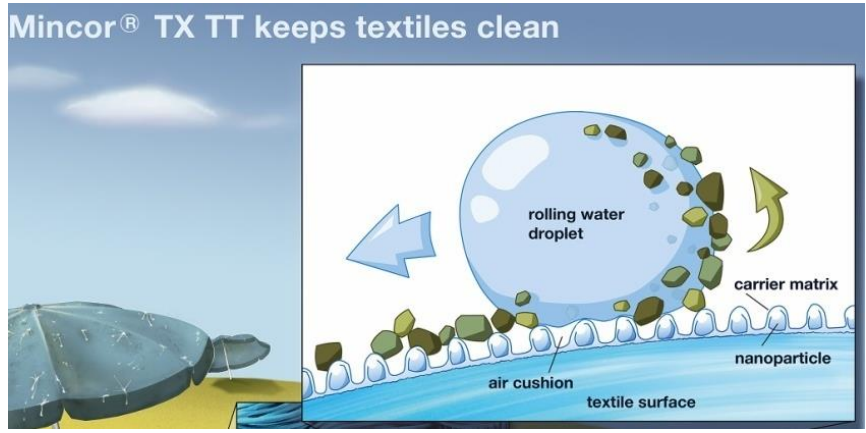




- Biomimikrija¹ (*bios*, život + *mimesis*, oponašati), princip prema kojemu se Priroda koristi kao model, učiteljica i mjera.
- “Nature’s elegant processes, refined over the course of evolution, provide myriad examples of systems that operate with unparalleled simplicity, efficiency and durability. It is the essence of elegance in engineering.”¹

- Brojna rješenja u inženjerskim disciplinama inspirirana su biološkim fenomenima:²

- bioinženjerstvo i biotehnologija,
- biomehanika,
- biomedicinsko inženjerstvo,
- biofizika,
- bionika,
- biomimetika.



- Tehnološke inovacije inspirirane Prirodom.³

¹ A. M. Czyzewski, A. E. Barron *AIChE Journal* 54 (2008) 2.
² L. H. Shu et al, *CIRP Annals - Manufacturing Technology* 60 (2011) 673.
³ <http://www.mnn.com/earth-matters/wilderness-resources/photos/7-amazing-examples-of-biomimicry/copying-mother-nature>



Chicago Spire



Bad Gleichenberg, Austria

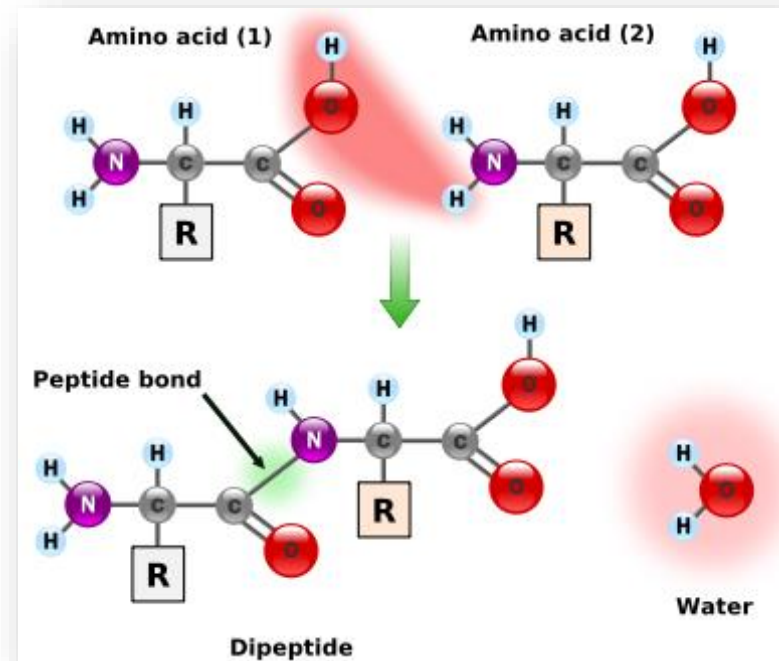


Helix Bridge, Singapore



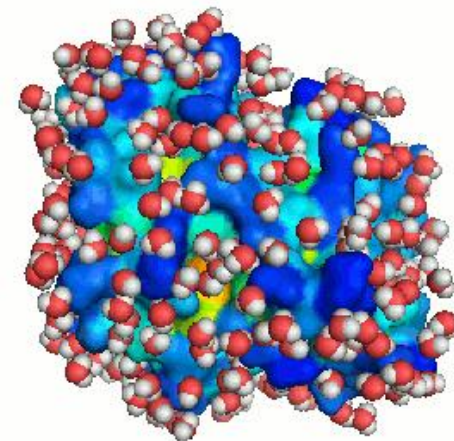
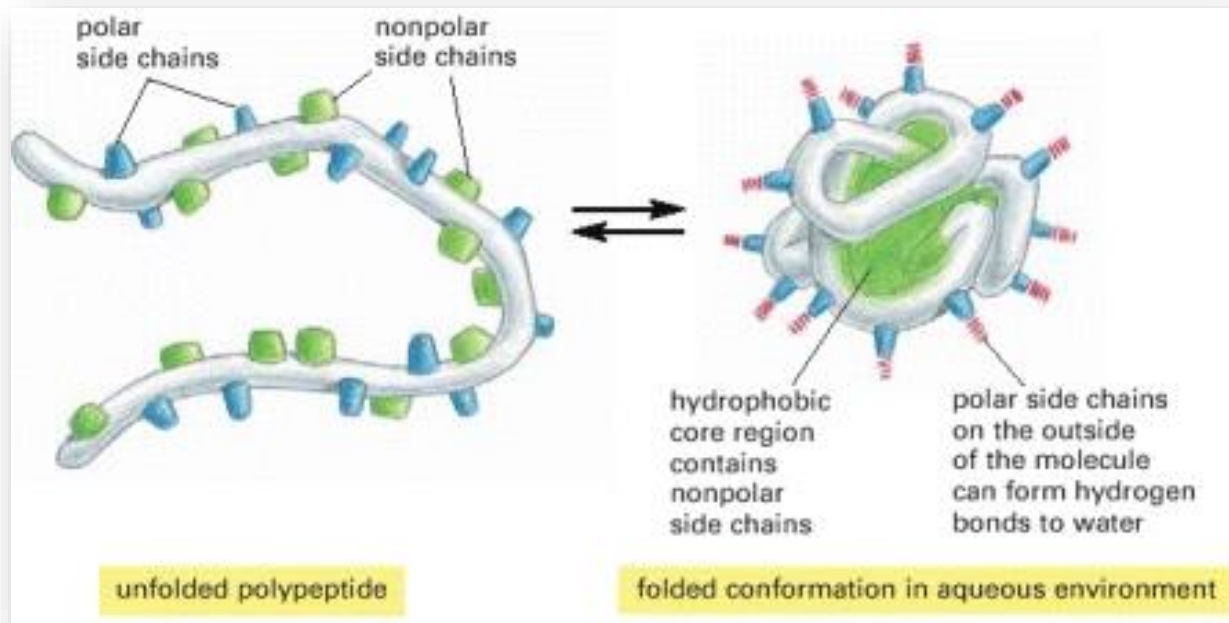
Proteini

tvorba peptidne veze



- Proteini (*protos*, grčki): primaran, najvišeg prioriteta.
- Prisutni su u svim stanicama i imaju ključnu ulogu u održavanju strukture i funkcionalnosti svih oblika života:
 - enzimska kataliza,
 - transport i pohrana drugih molekula,
 - mehanička potpora i zaštita imuniteta,
 - koordinirano kretanje,
 - stvaranje i prijenos živčanih impulsa,
 - kontrola rasta i diferencijacije.
- Proteini su biološke makromolekule građene iz 20 proteinogenih aminokiselina povezanih peptidnom vezom (20 aminokiselina može tvoriti do 8000 različitih tripeptida te preko 64 milijuna heksapeptida!).
- Bočni ogranci R vezani na glavni lanac ne sudjeluju u tvorbi peptidne veze, ali se odlikuju različitim svojstvima: veličinom, oblikom, nabojem, sposobnošću sudjelovanja u vodikovim vezama te kemijskom reaktivnošću.
- Neki bočni ogranci su nepolarni i hidrofobni (“water-fearing”), neki su nabijeni, neki sadrže funkcijske skupine, itd.

- **Nabiranje proteina ima ključnu ulogu u regulaciji biološke aktivnosti.**
- Važan faktor koji upravlja nabiranjem proteina je distribucija polarnih i nepolarnih aminokiselina.
- Nepolarni (hidrofobni) bočni ogranči nakupljaju se u unutrašnjosti molekule kako bi izbjegli kontakt s vodenom okolinom u stanici.
- Suprotno tomu, polarni i nabijeni ogranči nastoje se zadržati blizu površine molekule kako bi mogli stvarati vodikove veze s vodom i drugim polarnim molekulama u stanici.



B. Alberts et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.

C. M. Dobson, Nature 2003, 426, 884.



- L-Aminokiseline međusobno se povezuju u polipeptidne lance koji se tijekom i poslije sinteze smataju (nabiru) u 3D-strukture pri čemu se ostvaruju brojne različite konformacije (prostorni rasporedi atoma u molekuli).



- **Nativna konformacija (termodinamički najstabilnija konformacija) proteina određuje njegovu funkcionalnost.**

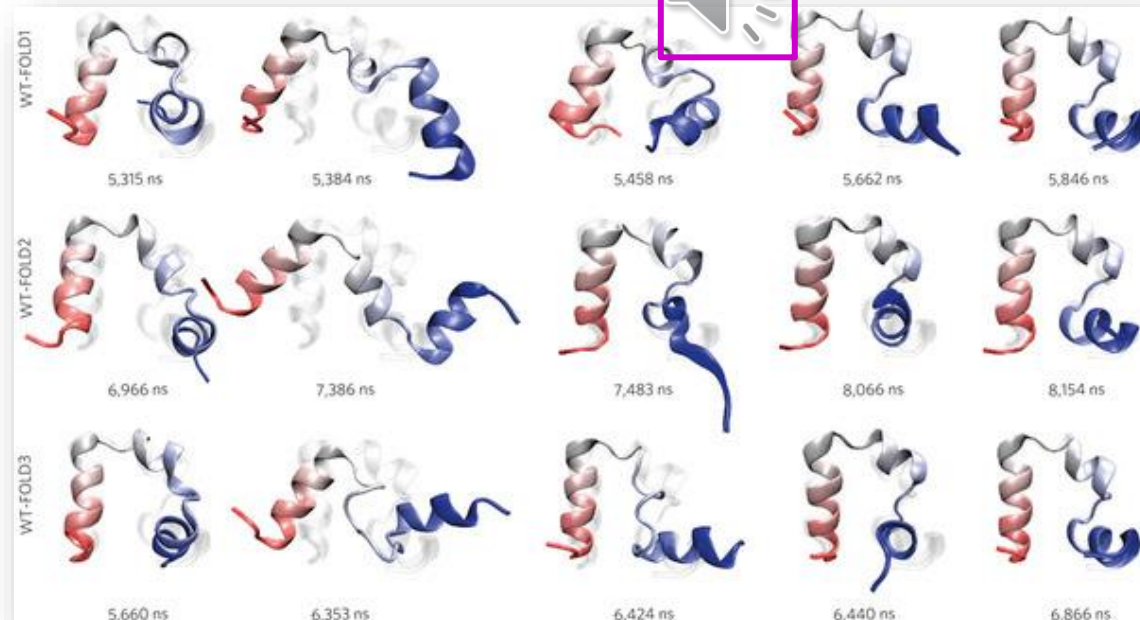
- Koliko vremena treba proteinu izgrađenom iz 100 aminokiselina za smatanje u nativnu konformaciju?

- Uz pretpostavku da svaki aminokiselinski ostatak ostvaruje tri konformacije, broj mogućih konformacija za cijelu sekvenciju iznosi $3^{100} = 5 \times 10^{47}$,

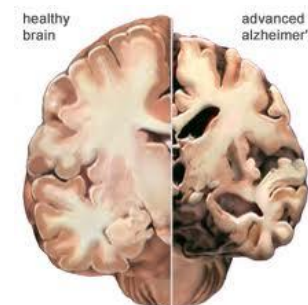
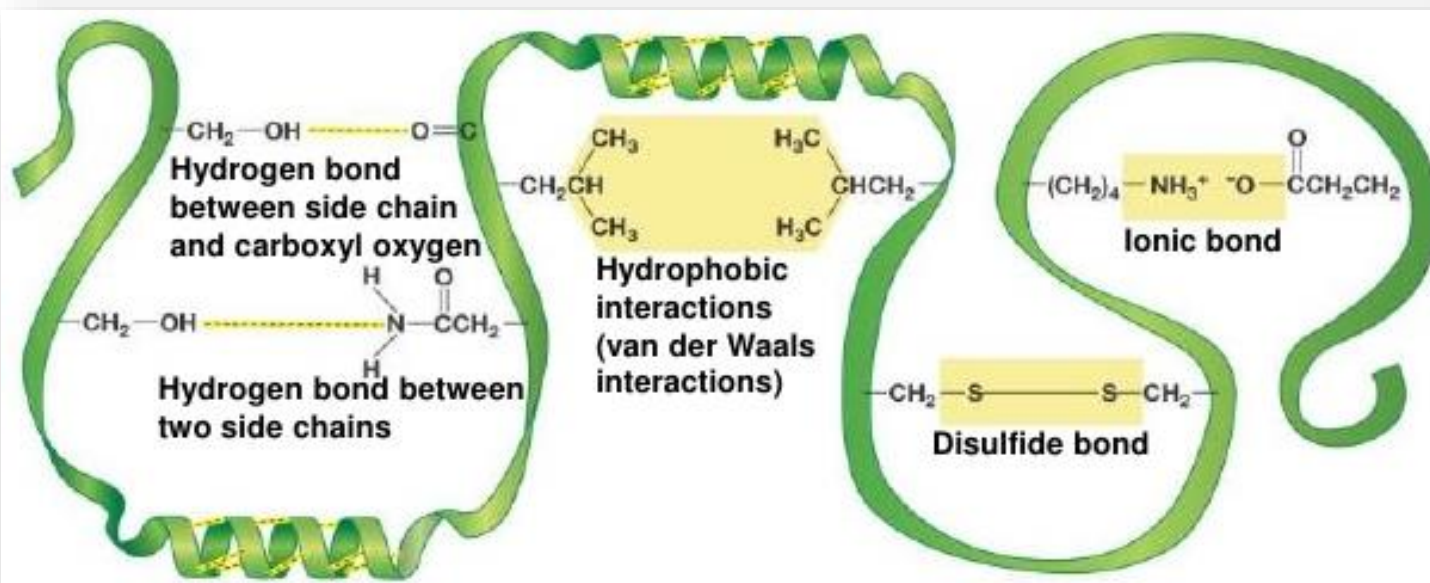


- ako protein “isprobava” moguće konformacije brzinom $10^{13}/s$, trebat će mu $5 \times 10^{47}/10^{13} s = 5 \times 10^{34} s = 1,6 \times 10^{27}$ godina!

- “Levinthalov paradoks”: proteinima za spontano nabiranje treba manje od 1s!



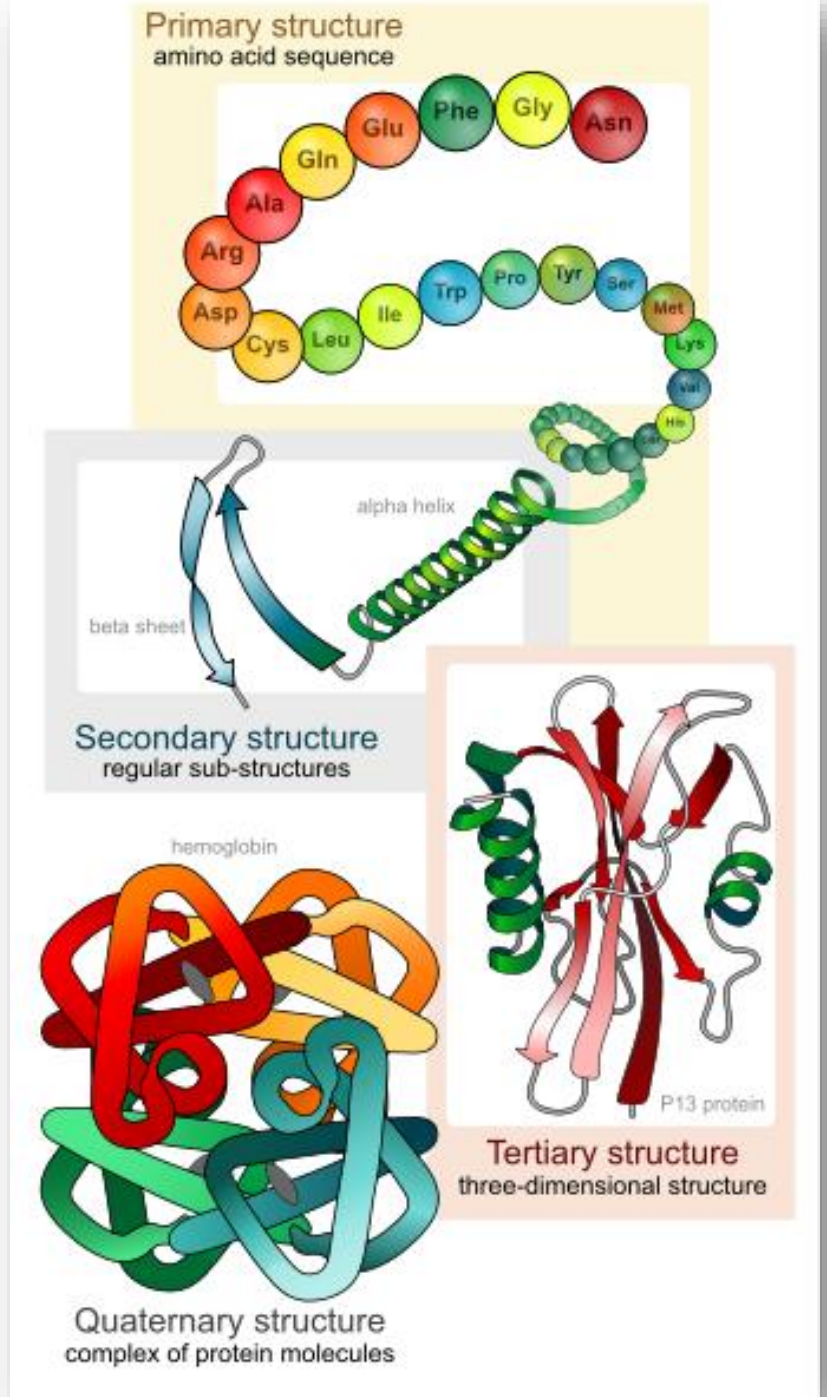
- Nabiranje proteinskih lanaca ograničeno je slabim nekovalentnim vezama (vodikove veze, ionske veze i van der Waalsove interakcije) koje se uspostavljaju između različitih dijelova lanca.
- Iako su te veze i do 300 puta slabije od kovalentnih veza, njihova brojnost i simultanost omogućuju da se dvije regije peptidnog lanca međusobno čvrsto drže.



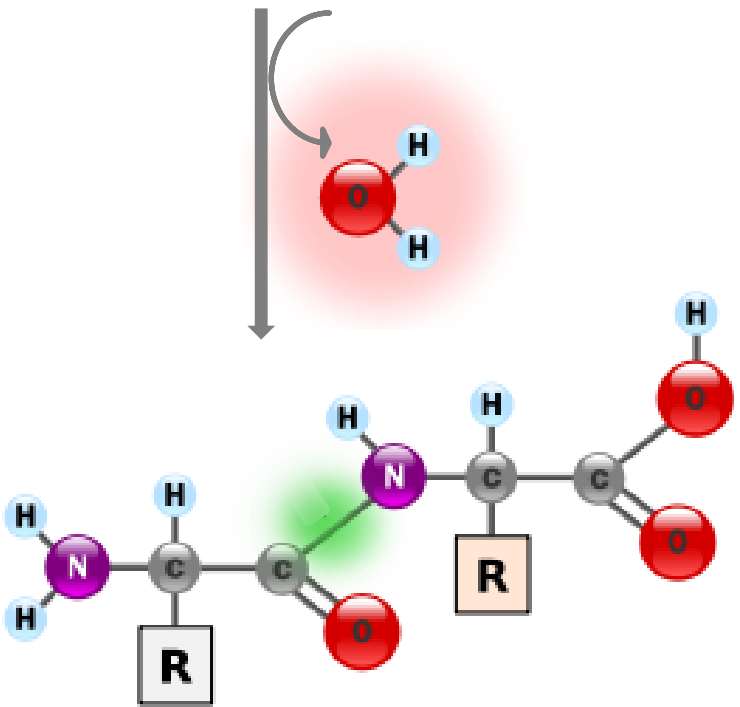
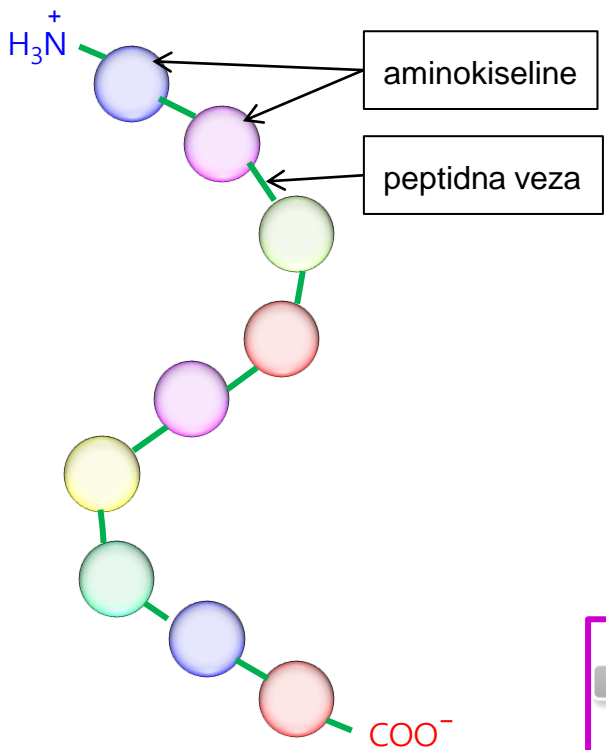
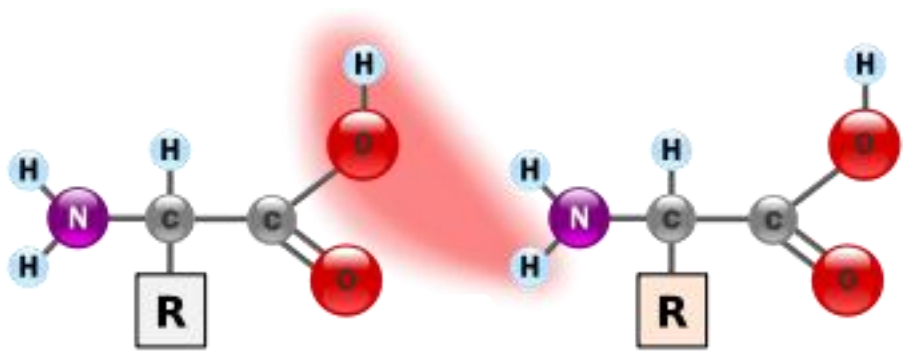
- Prema tome, stabilnost svake nabrane strukture određena je združenim utjecajem mnogobrojnih nekovalentnih veza.
- Posljedica svih tih interakcija je da svaki pojedini protein ima specifičnu 3D-strukturu, određenu slijedom aminokiselina u njegovom lancu.
- Pogrešnim savijanjem proteinskih lanaca mogu nastati amiloidna vlakna (plak) koja se nakupljaju u tkivima uzrokujući teška kronična oboljenja (amilodjoza); nakupljanjem amiloidnog plaka u mozgu nastaju neurodegenerativne bolesti (Alzheimerova, Parkinsonova bolest).

• Biolozi i kemičari razlikuju četiri strukturne razine u arhitekturi proteina:

- I. Primarna struktura: slijed aminokiselina u lancu.
- II. Sekundarna struktura: prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu međusobno blizu.
- III. Tercijarna struktura: prostorni odnos aminokiselinskih ostatak koji su u linearnom slijedu udaljeni.
- IV. Kvaterna struktura: odnosi se na proteine građene iz više polipeptidnih lanaca.

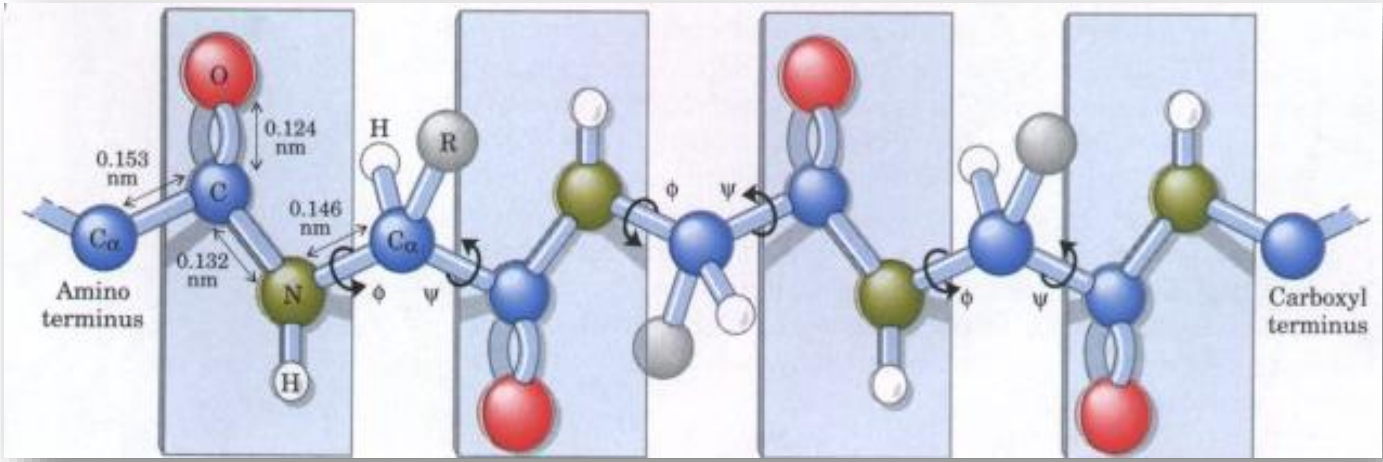
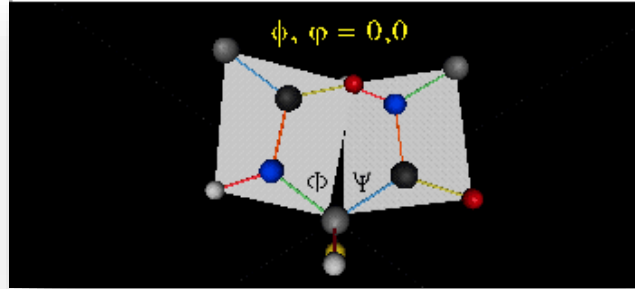
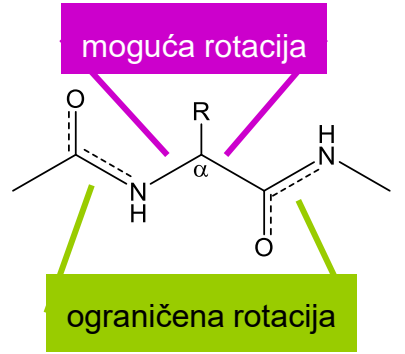
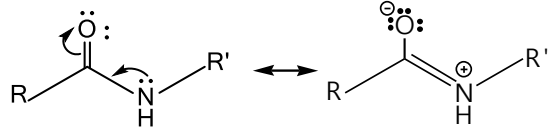


• Primarna struktura određena je slijedom kovalentno vezanih aminokiselina.



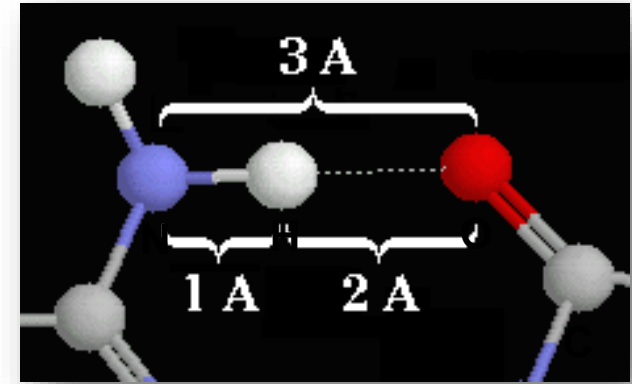
• **Peptidna veza:** stabilna u laboratorijskim uvjetima (cijepa se djelovanjem koncentriranih kiselina ili baza pri visokim temperaturama); nestabilna prema proteazama i peptidazama (cijepa se pri vrlo blagim uvjetima).

- Zbog djelomičnog dvostrukog karaktera, **peptidna je veza planarna** (C_{α} , C, O, N, H i C_{α} leže u istoj ravnini) i **kruta** (nema rotacije oko veze između karbonilnog ugljika i dušikova atoma).
- Rotacija oko jednostrukih veza $C_{\alpha}-N$ i $C_{\alpha}-C(O)$ ovisi o veličini i naboju bočnog ogranka, a omogućuje nabiranje peptidnih lanaca.
- Pet je faktora koji utječu na konformacijsku ravnotežu peptidnih lanaca: (i) diedarski kutevi Φ (opisuje rotaciju oko $C_{\alpha}-N$ veze) i Ψ (opisuje rotaciju oko $C_{\alpha}-C(O)$ veze), (ii) vodikove veze, (iii) sterička ometanja susjednih skupina, (iv) odbijanja i privlačenja nabijenih skupina te (v) hidrofobnost i hidrofilitnost.



- Sekundarna struktura - sterički odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu međusobno blizu. Ostvaruje se njihovim međusobnim nekovalentnim interakcijama (vodikova i ionska veza, hidrofobne i van der Waalsove interakcije).

- Pri tomu su od posebnog značaja intra- i intermolekulske **vodikove veze** u kojima kao donor sudjeluje **amidna skupina**, dok **karbonilna grupa** ima ulogu akceptora.



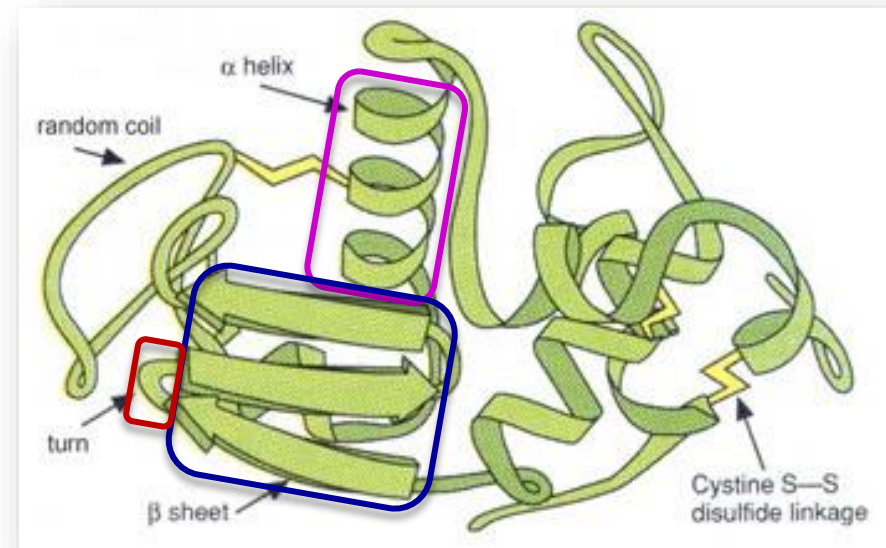
- Elementi sekundarne strukture:



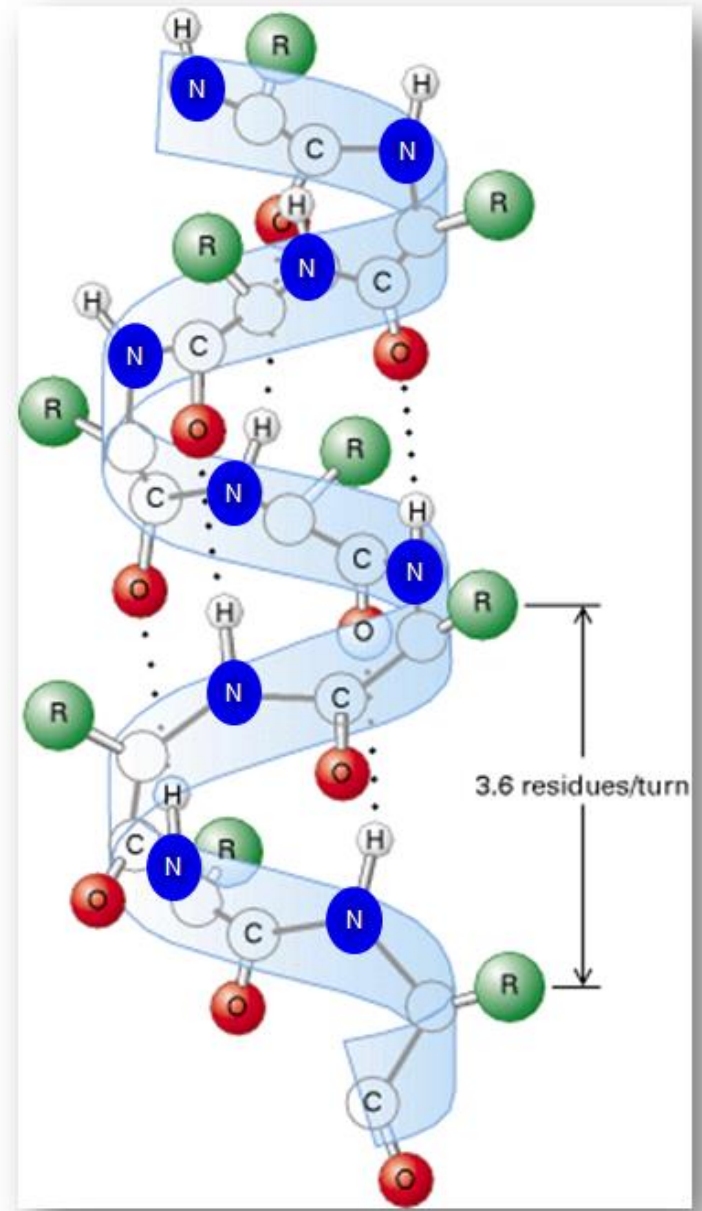
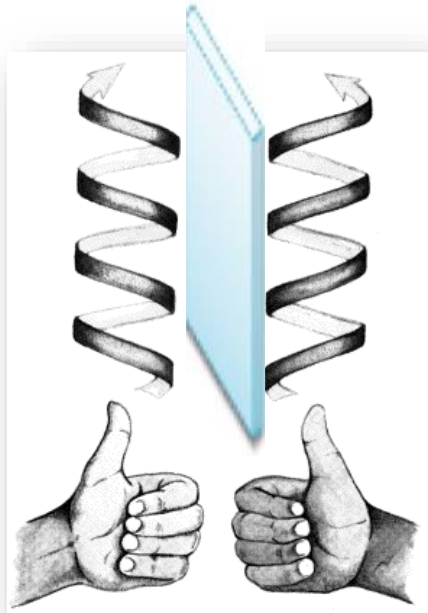
- α -uzvojnica,
- β -nabrana ploča,
- okret.

- Nastanak određene sekundarne strukture uvjetovan je svojstvima aminokiselina iz kojih je građen peptidni lanac:

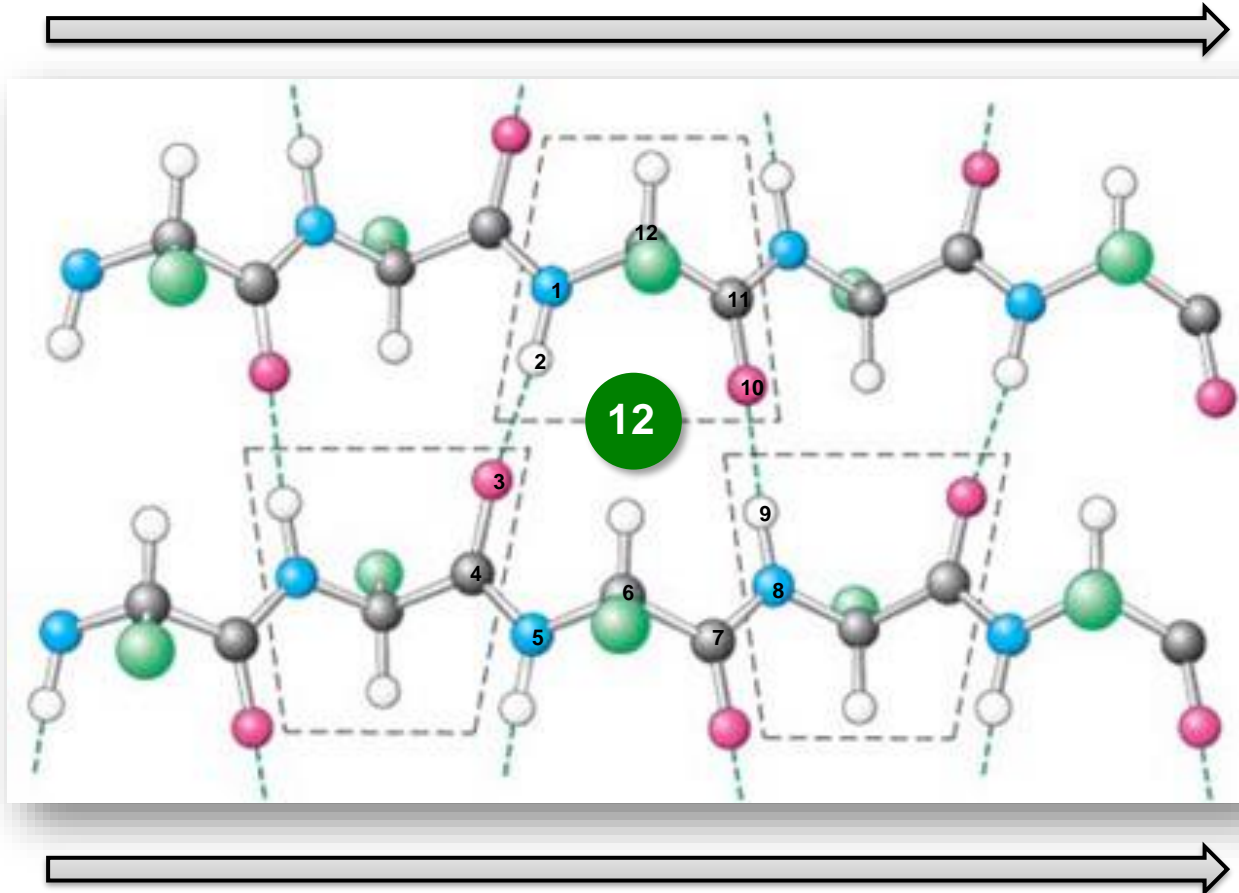
- α -uzvojnica: Ala, Glu, Leu.
- β -ploča: Val, Ile.
- okret: Gly, Pro, Asn, Ser.



- α -Uzvojnica: polipeptidni lanac je tijesno spiralno uvijen tvoreći štapićastu strukturu. Pri tomu su **aminokiselinski ogranci** usmjereni prema van u uzvojitom rasporedu.
- Uzvojnica je stabilizirana intramolekulskim vodikovim vezama između NH-skupine ostatka i i CO-skupine ostatka $i+4$ unutar istoga lanca tvoreći 13-člane prstenove.
- U prirodnim peptidima uzvojnice su (*P*)- ili desne orijentacije.

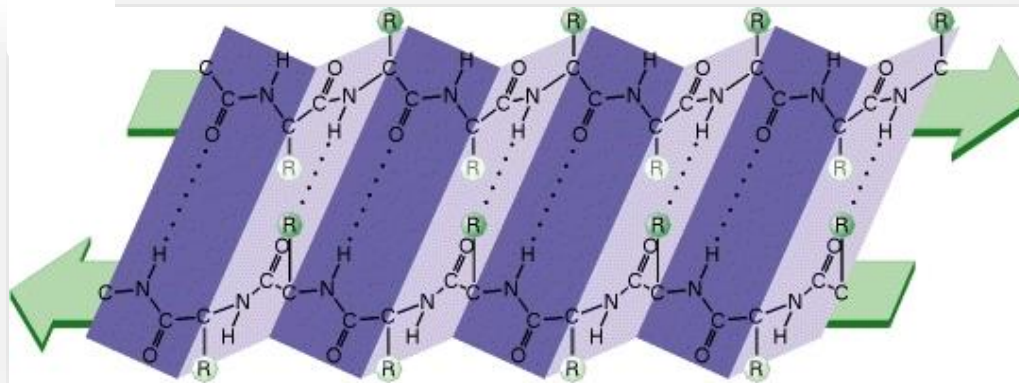
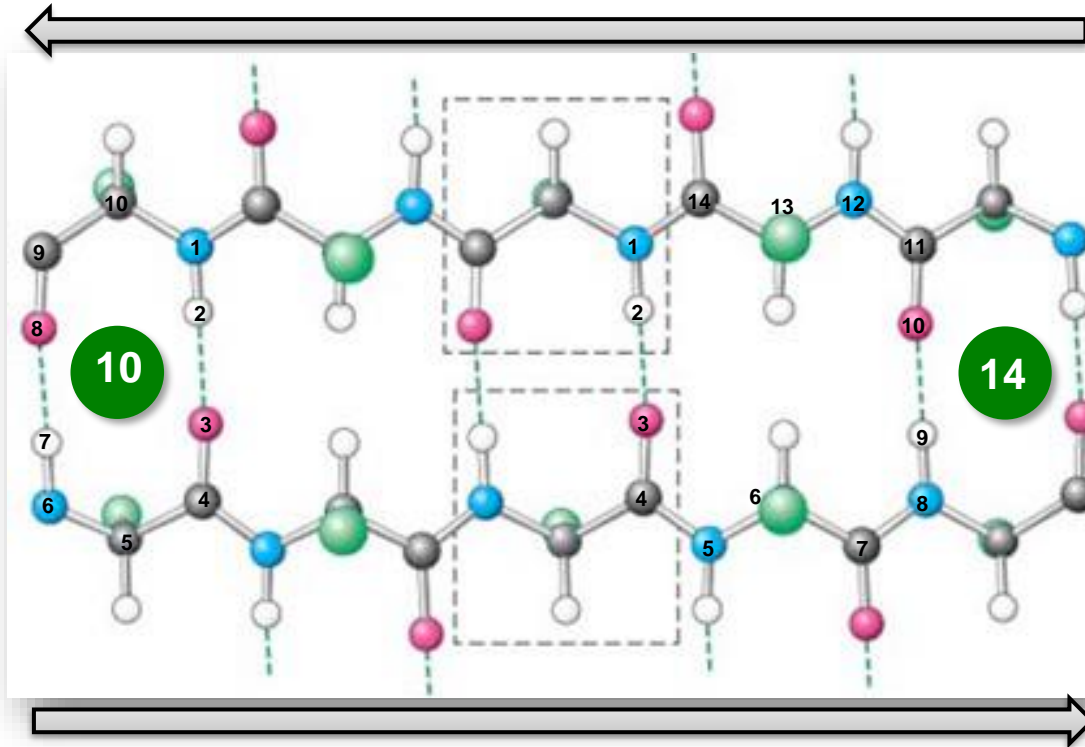


- β -Nabrana ploča: polipeptidni je lanac istegnut (nije uvijen kao u α -uzvojnici).
 - paralelna β -nabrana ploča: dijelovi lanca orijentirani su u istom smjeru s obzirom na N - i C -terminus, a vodikove veze između peptidnih lanaca ravnomjerno su pomaknute, zatvarajući određeni kut u odnosu na drugi lanac i tvoreći 12-člane prstenove.

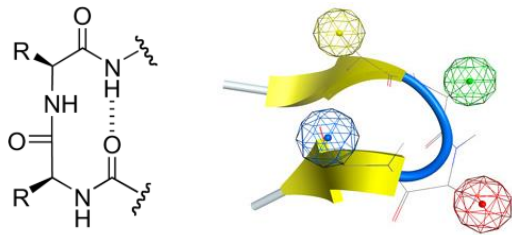




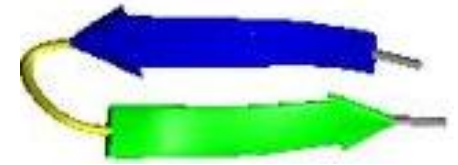
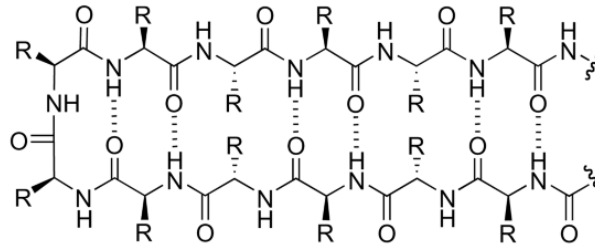
- antiparalelna β -nabrana ploča: dijelovi lanca orijentirani su u suprotnom smjeru s obzirom na N - i C -terminus, a **vodikove veze** između peptidnih lanaca gotovo su okomite na susjedni segment, tvoreći 10- i 14-člane prstene.



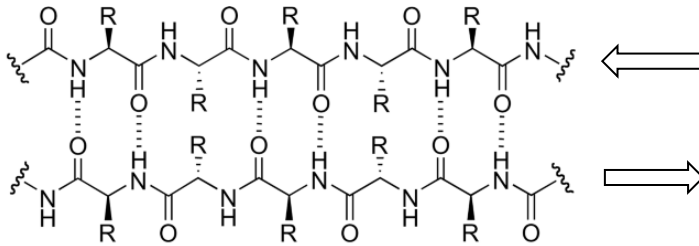
• prirodne strukture β -ploča:



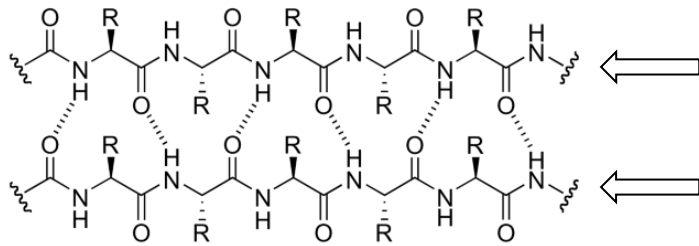
β -okret



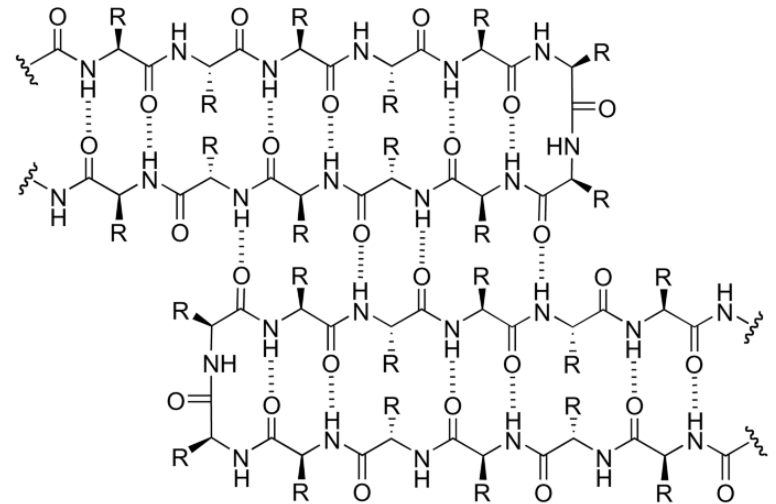
β -ukosnica



antiparalelna β -ploča

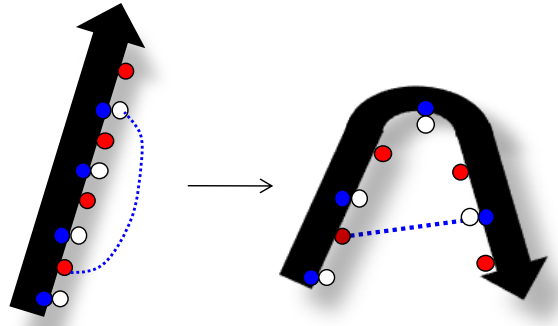
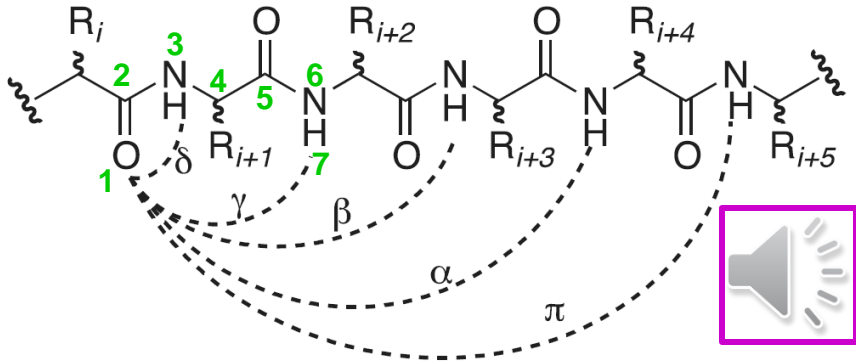


paralelna β -ploča

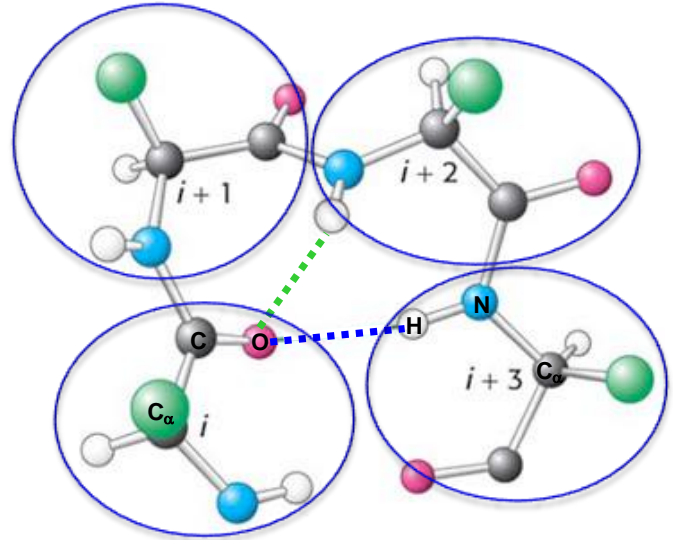


interakcija susjednih β -ploča

- Okreti:** imaju važnu ulogu u savijanju proteina i utječu na njihovu stabilnost. Odgovorni su za kompaktni, globularni oblik proteinskih molekula, jer omogućavaju promjenu smjera polipeptidnih lanaca. Ovisno o broju konstituirajućih ostataka dijele se na α , β , γ , δ i π -okrete. Stabilizirani su intramolekulskim $\text{NH}\cdots\text{OC}$ vodikovim vezama: zatvaranjem 7-članog prstena nastaju **γ -okreti**, 10-člani prsten odgovara **β -okretu**, dok 13-člani prsten rezultira α -uzvojnicom.

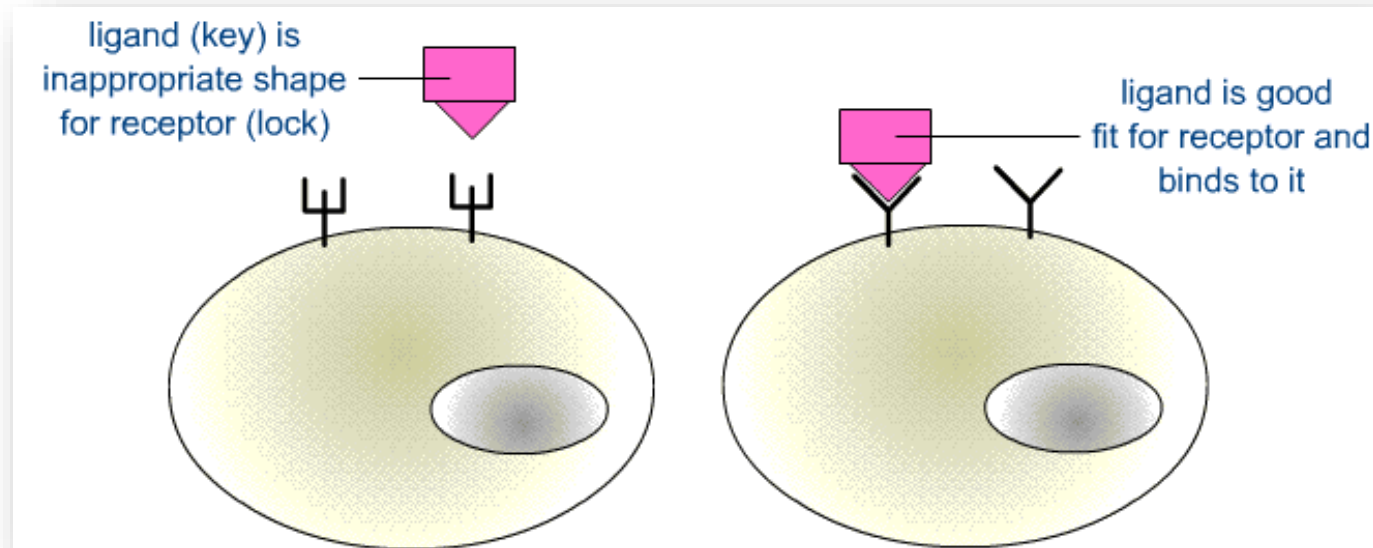


- β -Okreti** su najčešći okreti, a definiraju se kao **tetrapeptidne sekvencije** u kojima udaljenost između $\text{C}_\alpha(i)$ i $\text{C}_\alpha(i+3)$ mora biti manja ili jednaka 7\AA . Odlikuju se vrlo izraženim hidrofiličnim svojstvima, zbog čega su smješteni na površini proteinske molekule, te sudjeluju u procesima molekuskog prepoznavanja kao i u interakcijama peptidnih supstrata s njihovim receptorima.

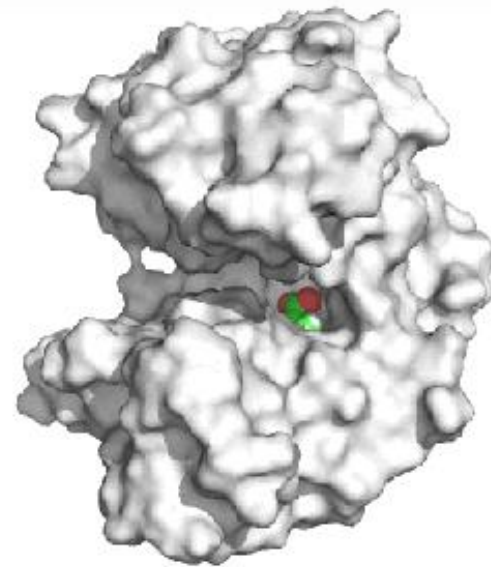
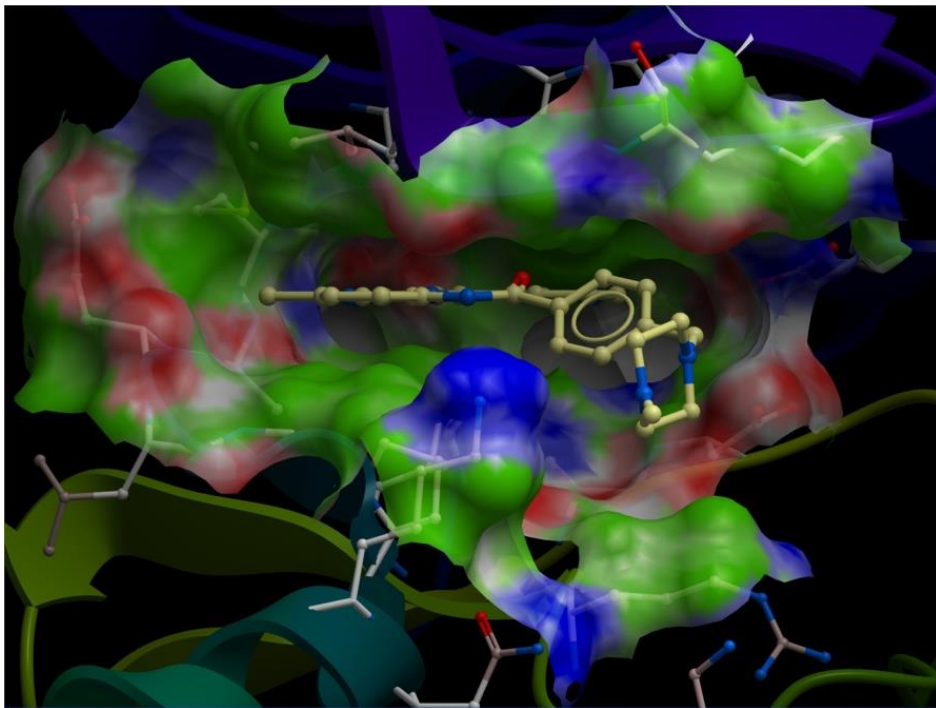
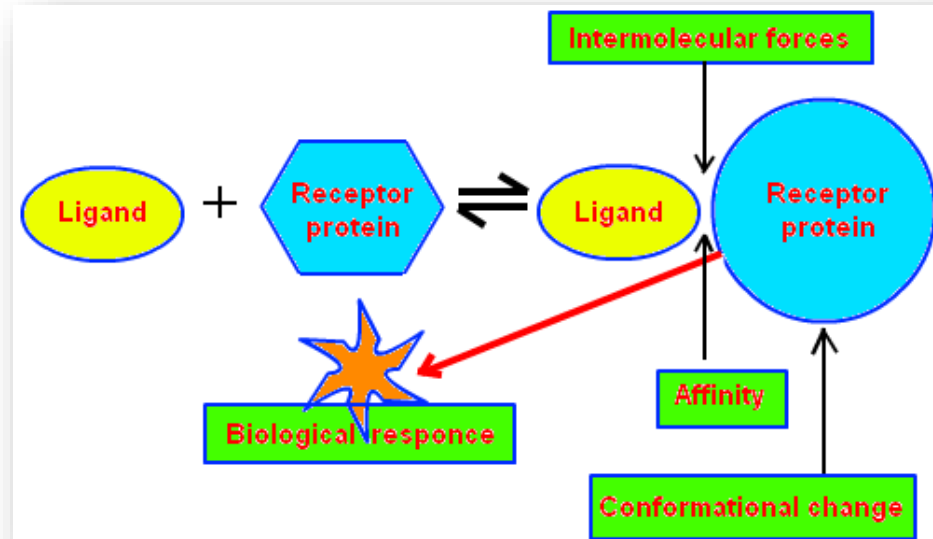


Kako struktura određuje funkciju proteina?

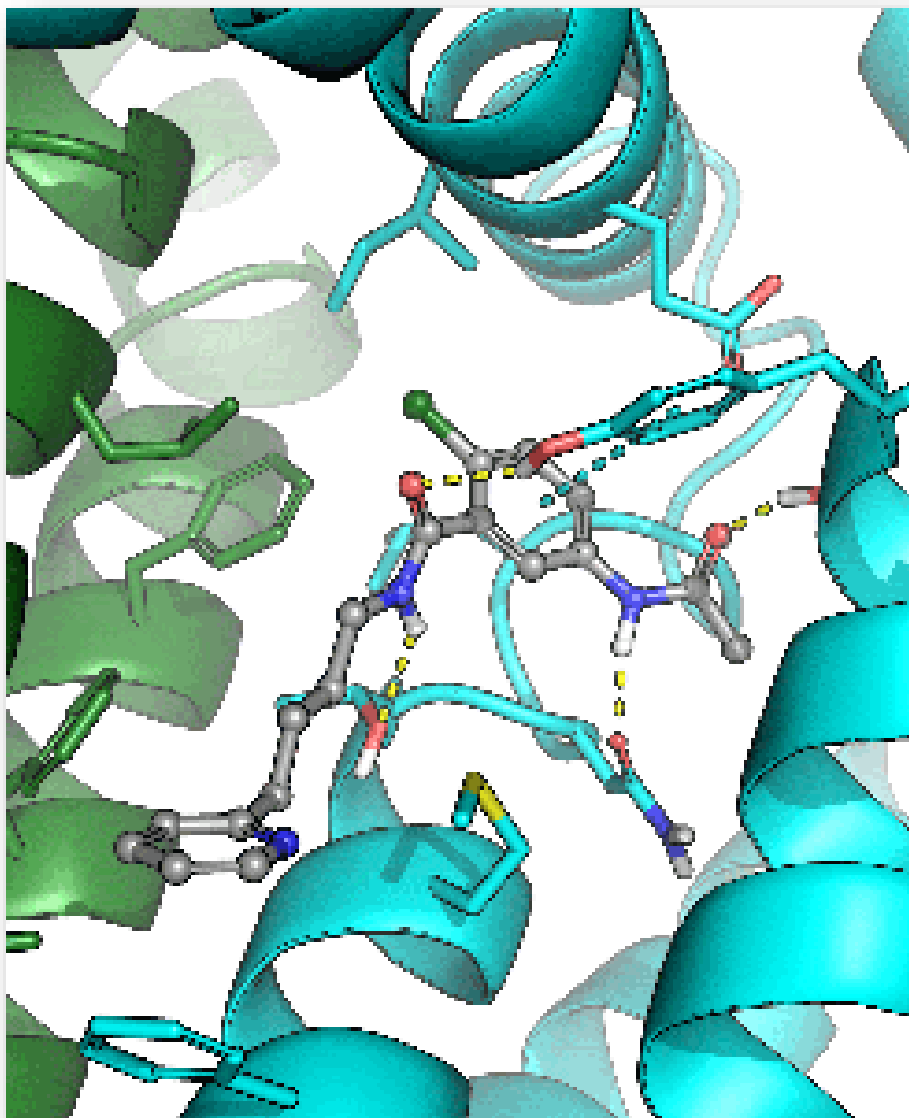
- Paul Ehrlich, 1907.: “***Corpora non agunt nisi fixata***” - Molekule ne djeluju ako nisu povezane.
- Međusobno povezivanje dviju molekula nekovalentnim vezama (vodikovim, van der Waalsovim) osnovni je preduvjet za postizanje biološke funkcionalnosti (vezivanjem antitijela na antigen stimulira se imunostav; stanične se reakcije potiču vezivanjem hormona za receptore na površini stanice; kataliza reakcije započinje vezivanjem enzima za supstrat).
- Temeljni preduvjet za uspješno povezivanje jest **strukturna komplementarnost** liganda i receptora: trodimenzijske strukture moraju odgovarati jedna drugoj oblikom, ali i veličinom, nabojem, te hidrofobnim odnosno hidrofilnim svojstvima.



- Receptor je biološka makromolekula (lipoproteini ili glikoproteini, jednostavni proteini, nukleinske kiseline i lipidi) koja doprinosi biološkom odgovoru nakon interakcije s ligandom.
- Ligand (lat. *ligare*, vezati) je molekula koja se intermolekulskim vezama (ionske, vodikove, Van der Waalsove) može povezivati s drugim molekulama tvoreći stabilne komplekse.
- Molecular Docking (molekulsko pristajanje): simulacija konfiguracije, puta i energije vezanja između proteina i liganda.

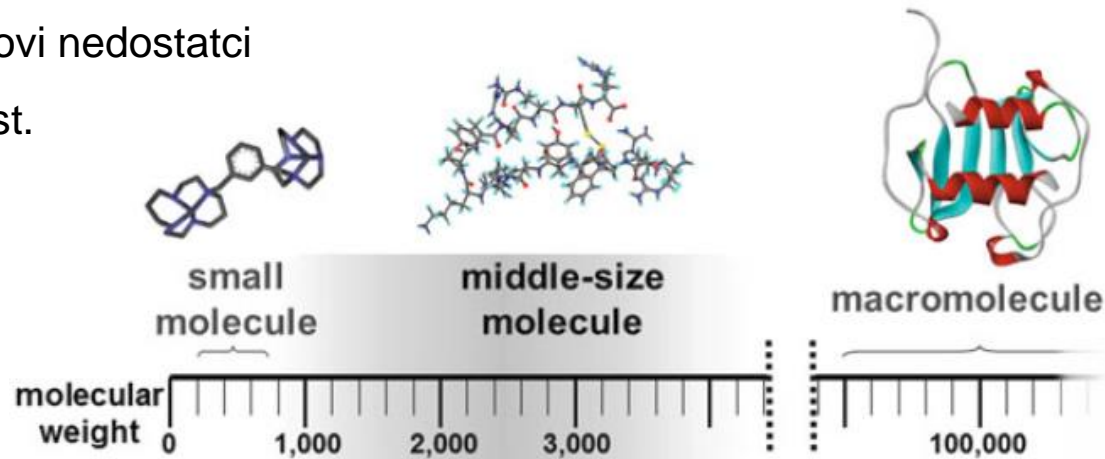


- Simulacija interakcija s proteinskim veznim mjestom: vezno mjesto nalazi se između plave i zelene uzvojnice, a vodikove veze i π -interakcije između liganda i veznog mjesta prikazane su isprekidanim žutim i plavim linijama.



Mogu li se peptidi koristiti kao lijekovi?

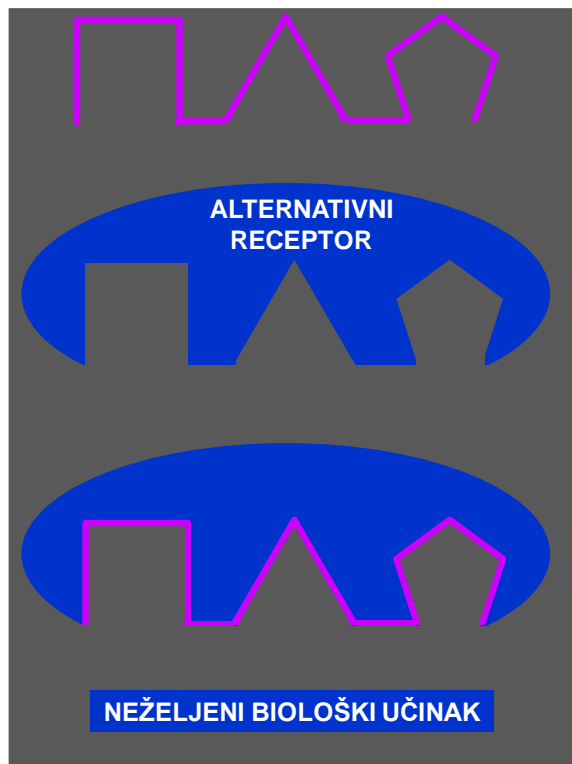
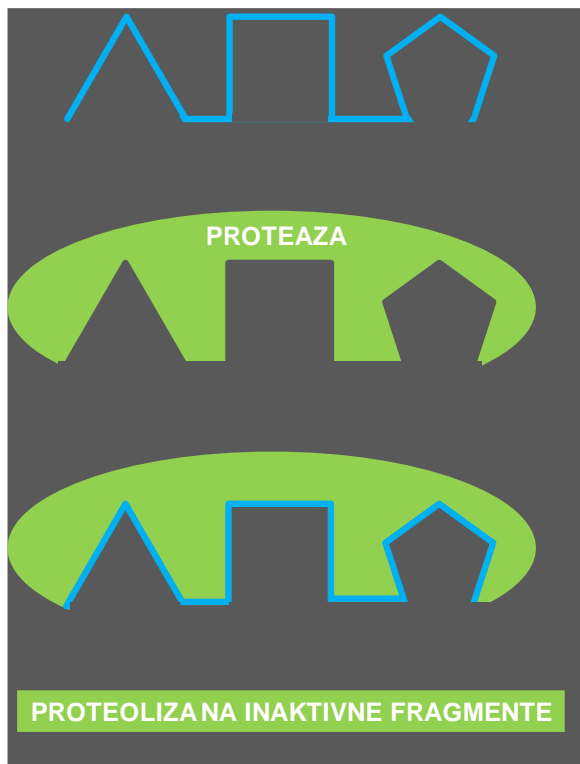
- Peptidi i peptidni derivati pripadaju molekulama srednje veličine. Njihova se svojstva mogu unaprijediti u odnosu na male molekule i makromolekule, pri čemu nastaju lijekovi srednje veličine (engl. *Mid-size drugs*) koji ciljaju ne samo enzimsku aktivna mjesta i džepove receptora, već i protein-protein interakcije.
- Male molekule i makromolekule imaju svoje prednosti i nedostatke. Prednosti malih molekula su oralna biodostupnost i niska imunogenost, dok su njihovi nedostaci niska specifičnost i nuspojave. S druge strane, makromolekule se odlikuju visokom specifičnošću i ne izazivaju brojne nuspojave, dok su njihovi nedostaci niska primjenjivost i visoka imunogenost.
- Molekule srednje veličine, dizajnirane kao lijekovi (mid-size drugs), zadržavaju prednosti i reduciraju nedostatke vezane uz male molekule i makromolekule. Peptidi se, kao molekule srednje veličine, intenzivno razvijaju kao lijekovi nove generacije.



	adaptability	cell permeability	antigenicity	specificity	side effect
small molecule	○	○	○ (low)	△	△
macro-molecule	×	×	×	○	○ (a few)



- Iako sudjeluju u važnim imunološkim i neurološkim procesima peptidi nisu pogodni za korištenje u terapeutske svrhe:
 - njihova im velika fleksibilnost omogućava interakciju s različitim receptorima što rezultira nepoželjnim nuspojavama,
 - podliježu proteolitičkom djelovanju peptidaza iz gastrointestinalnog trakta i seruma,
 - velika molekulska masa i polarni karakter otežava njihov transport kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru.



- **Peptidomimetici kao zamjena za peptide u njihovim interakcijama s receptorima predstavljaju moguće rješenje za spomenute prepreke u korištenju peptida kao terapeutika:**
 - niska stabilnost - prirodni peptidi sačinjeni iz L-aminokiselina podložni su djelovanju endopeptidaza (cijepaju unutarnje amidne veze) i egzopeptidaza (započinju hidrolizu na N- ili C-terminusu peptidnog lanca); otpornost peptida na hidrolitički učinak peptidaza može se poboljšati: (i) eliminacijom pojedine amidne veze, (ii) uvođenjem D-aminokiselina te (iii) kemijskom modifikacijom terminalnih skupina,
 - slaba topljivost u vodi - može se poboljšati uvođenjem polarnih funkcijskih skupina,
 - slaba permeabilnost kroz biološke barijere - krvno-moždane i intestinalne stanice izlučuju hidrolitičke enzime stvarajući biokemijsku barijeru; istovremeno, njihova strukturna svojstva određuju fizičku barijeru. Ove se zapreke mogu prevladati korekcijom fizičko-kemijskih svojstava i peptida i supstrata.
- Dakle, klinička primjena biološki aktivnih peptida omogućena je modifikacijom njihovih nepovoljnih farmakoloških i biofarmaceutskih svojstava.

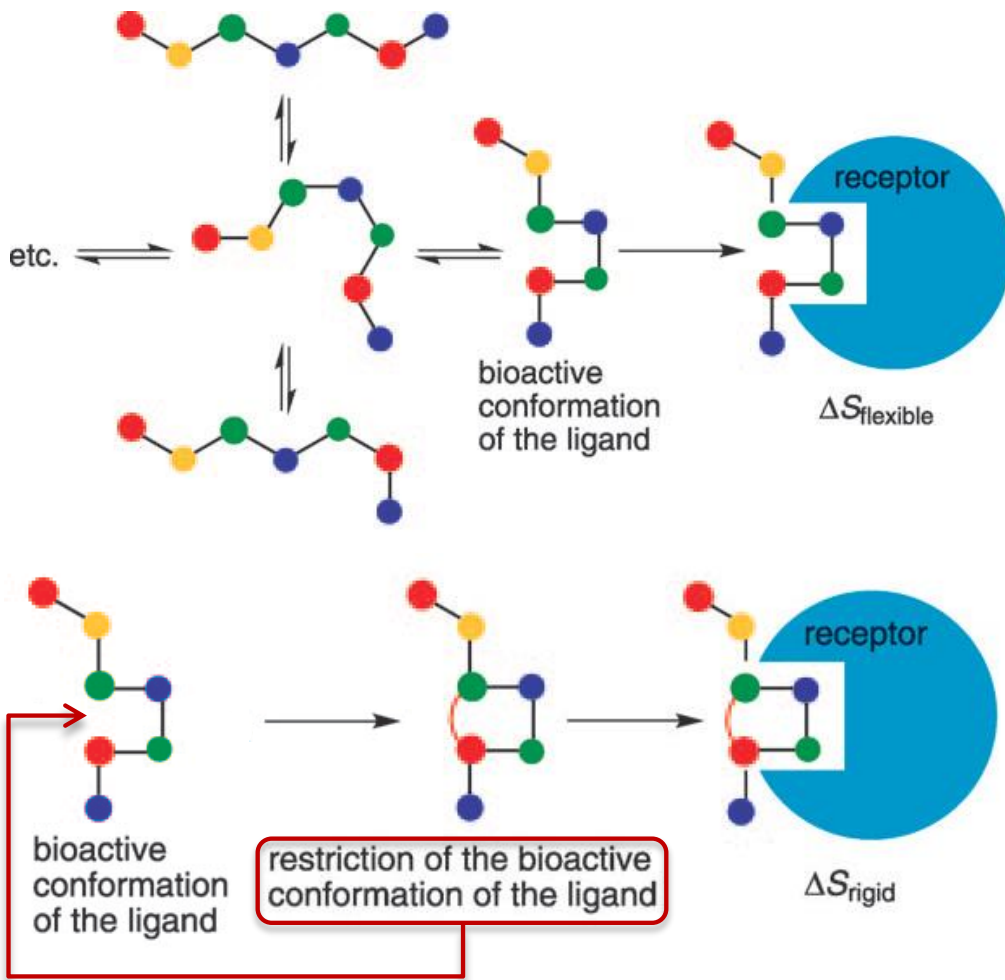


- Peptidomimetici su spojevi čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnih peptida i proteina i zadržavaju njihovu sposobnost interakcije s biološkim metama te ostvaruju jednak biološki učinak.



- Peptidomimetici se moraju odlikovati sljedećim farmakološkim svojstvima:

- metabolička stabilnost,
- dobra biodostupnost (brzina apsorpcije i količina aktivne tvari, odnosno lijeka koji dospije u sistemsku cirkulaciju te se zatim izlučuje kroz urin),
- afinitet i selektivnost za receptore (postiže se smanjenjem konformacijske slobode, odnosno uvođenjem različitih **konformacijskih ograničenja** što rezultira zauzimanjem rigidne konformacije),
- minimalne nuspojave.

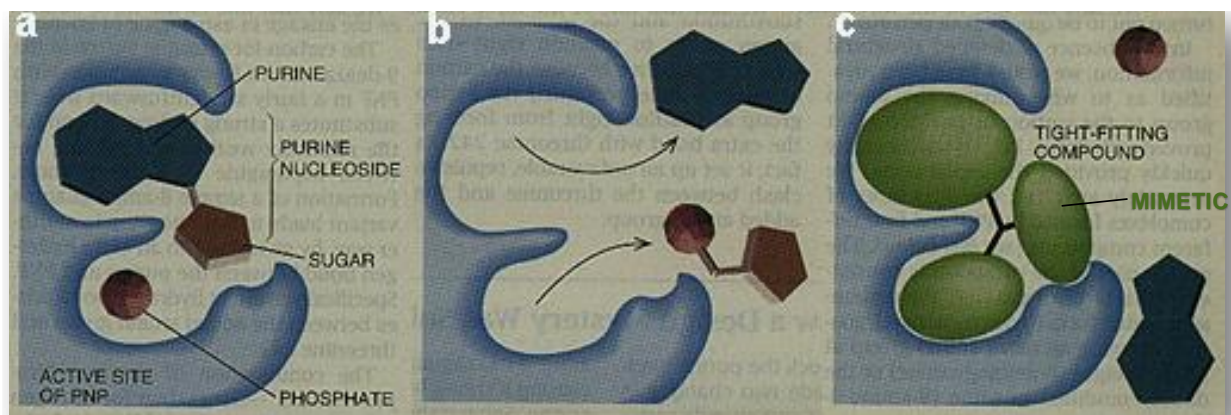


A. Giannis et al, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32 (1993) 1244.
 R. M. J. Liskamp et al, *ChemBioChem* 12 (2011) 1626.
 J. Vagner et al, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 292.

- Zahtjevi za modificiranim peptidima s unaprijeđenim farmakodinamičkim i farmakokinetičkim svojstvima (povećana djelotvornost, selektivnost, metabolička stabilnost i bioraspoloživost, a smanjena toksičnost) doveli su do razvoja **peptidomimetike**, interdisciplinarnog znanstvenog područja koje objedinjuje organsku kemiju, biokemiju, farmakologiju i biotehnologiju.

- **Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili blokirati biološki učinak peptidnog receptora.**

- Primjer peptidomimetika koji blokira biološki učinak peptidnog receptora:



- **Mimetik** aktivnog mjesta **PNP** (**purin-nukleozid-fosforilaza**; cijepa vezu između **purina** i **šećera** dajući slobodnu **purinsku bazu** i **fosforilirani šećer**) inhibira aktivnost enzima (medicinska primjena u liječenju autoimunih bolesti, leukemije T-stanica, sprečavanju odbacivanja transplantiiranih organa).

J. Gante, *J. Angew. Chern. Int. Ed.* 33 (1994) 1699.

M. Kahn, *Synlett* 11 (1993) 821.

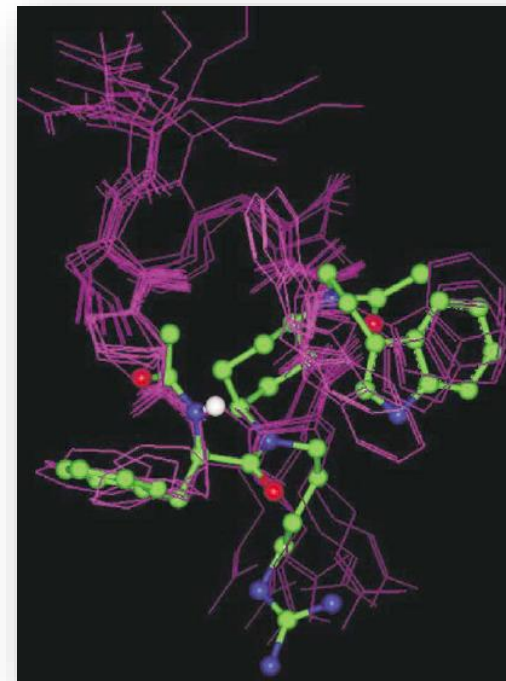
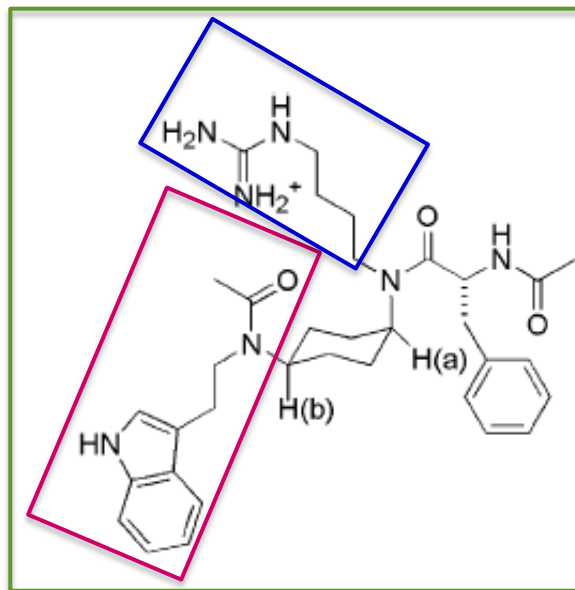
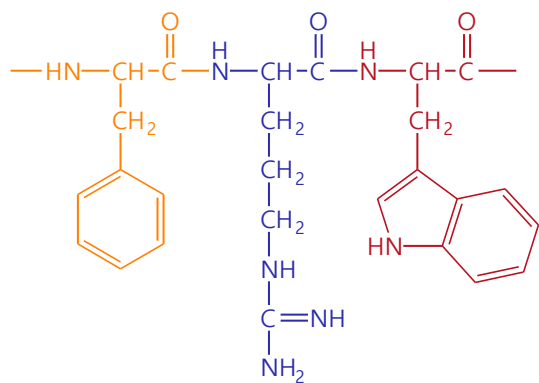
G. L. Olsen et al, *J. Med. Chem.* 136 (1993) 3039.

N. Livnah et al, *Bulletin of the Israel Chemical Society* 20 (2005) 32.

C. E. Bugg et al, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 1812.



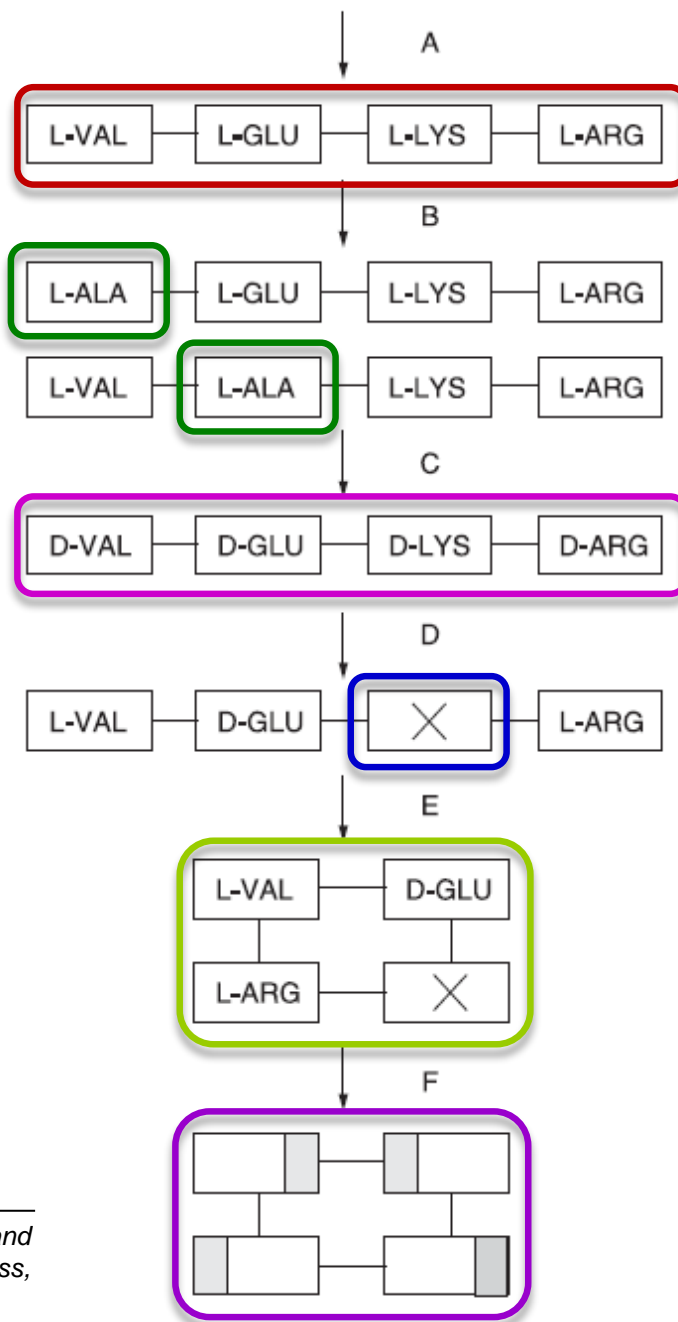
- Peptidomimetik je spoj čija su sekundarna strukturna svojstva analogna prirodnom peptidu zbog čega može oponašati njegovu biološku funkciju.
- Primjer peptidomimetika koji oponaša biološki učinak peptidnog receptora:
 - ciklički peptid **Ac-Nle-cyclo[Asp-Pro-D-Phe-Arg-Trp-Lys]-NH₂** djeluje kao agonist receptora melanokortina (MCRs) (agonisti potiču receptor na željeni odgovor) zahvaljujući konformaciji fragmenta **-D-Phe-Arg-Trp-** koja je komplementarna MCRs-u,
 - ispitani su brojni ciklički sustavi u cilju pronalaska onoga koji najbolje oponaša konformaciju tog fragmenta,
 - **cikloheksanski mimetik**: triptaminska skupina na C₄ oponaša **Trp**, dok butil-gvanidin na C₁ oponaša **Arg**.

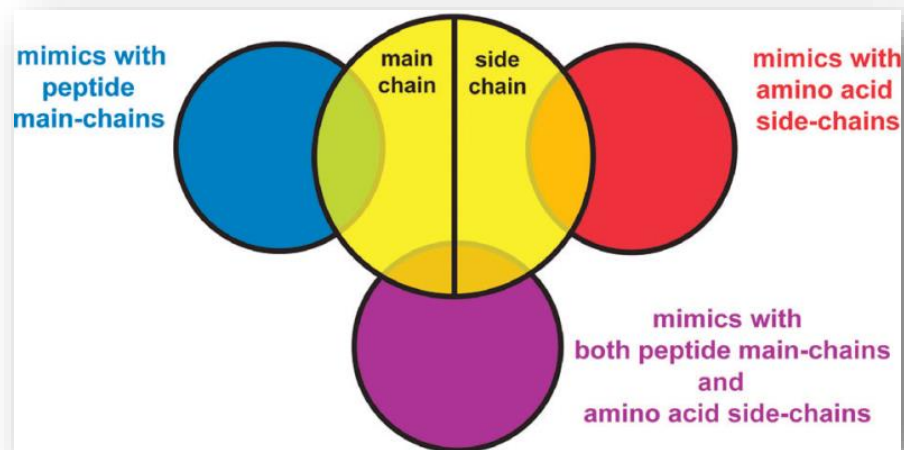
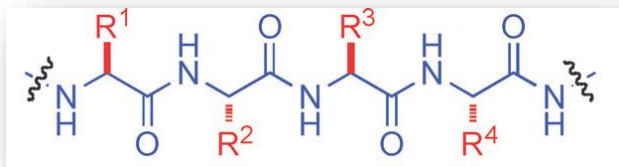


Molekulski i biokemijski pristup u dizajnu peptidomimetika



- A. identifikacija najmanjeg bioaktivnog fragmenta,
- B. "Ala-Scan" kojim se identificiraju aminokiseline važne za biološku aktivnost,
- C. promjena konfiguracije pojedinačnih aminokiselina,
- D. zamjena pojedinačnih aminokiselina s neprirodnim aminokiselinama ili njihovim mimeticima,
- E. ciklizacija u cilju ograničavanja konformacijske slobode,
- F. zamjena fragmenata cikličkog peptida s bioizosterima u cilju dobivanja nepeptidne organske molekule.



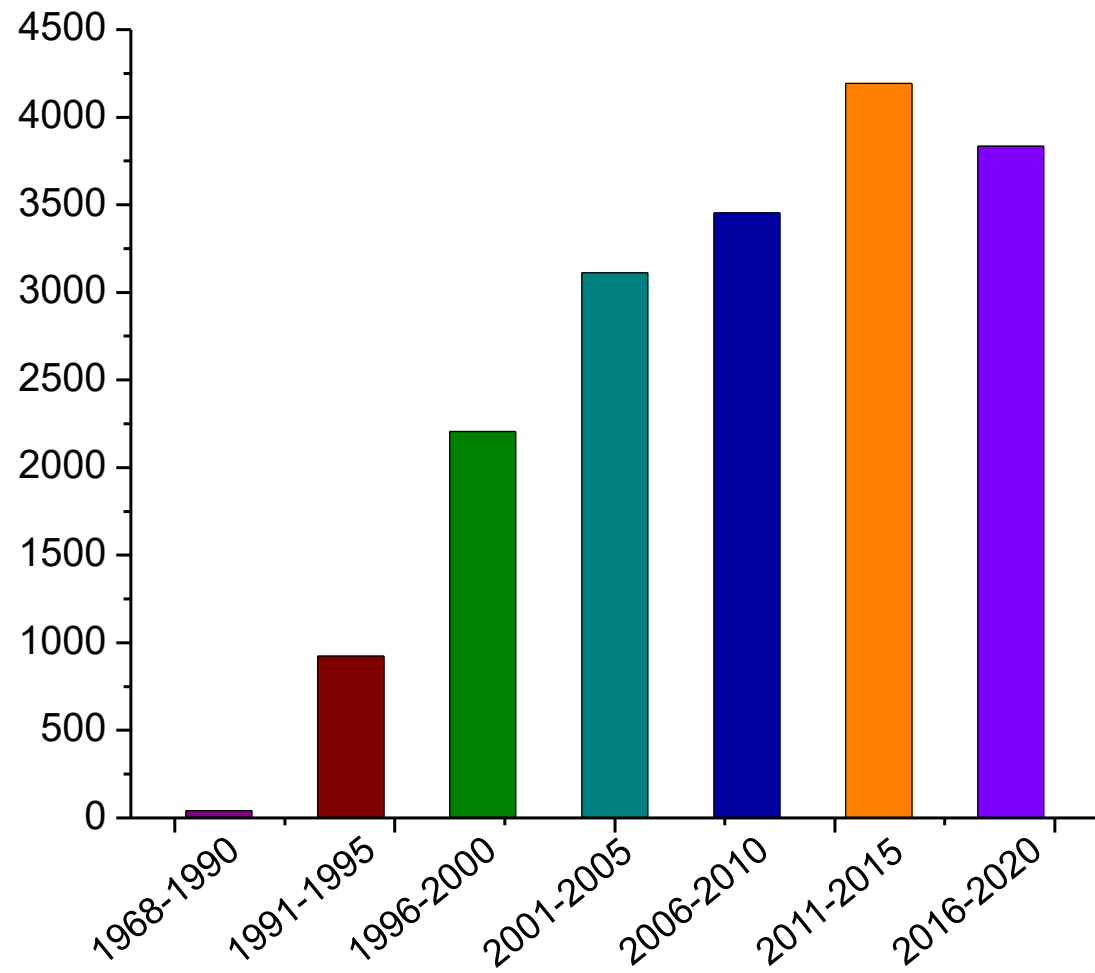


- **Mimetici glavnog lanca (okosnice):** amidne veze glavnog peptidnog lanca supstituirane su izosternim skupinama ($-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CF}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CSNH}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, itd.) čime se utječe na rotacijsku slobodu, obrasce intra- i intermolekulskih vodikovih veza, polarnost, hidrofobnost i oralnu biodostupnost.
- **Mimetici aminokiselinskih bočnih ogranaka:** osiguravaju strukturnu i konformacijsku raznolikost - krucijalni značaj u peptidnoj mimikriji.
- **Mimetici s modificiranim glavnim lancem i bočnim ogranacima.**



• Web of Science, pretraga* uključuje sljedeće teme:

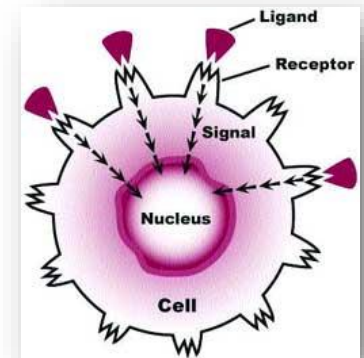
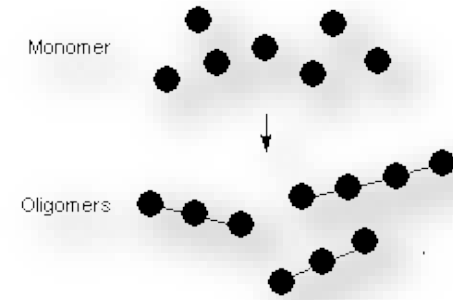
- Peptidomimetic(s),
- Peptide mimetic(s),
- Protein mimetic(s),
- Peptide mimicry,
- Protein mimicry.



* Pretraživanje je provedeno 7. siječnja 2020.

Pregled pojmova karakterističnih za područje peptidnih mimetika

- **Oligomeri:** tvari koje se sastoje od višestruko ponavljajućih jedinica niske relativne molekulske mase.
- **Foldameri:** lančaste molekule ili oligomeri koji poprimaju elemente sekundarne strukture stabilizirane nekovalentnim interakcijama.
- **Ligandi:** tvari (hormoni, lijekovi, funkcijske skupine) koje se specifično i reverzibilno vežu za drugu molekulu tvoreći kompleks.
- **Receptori:** proteini u stanici ili na površini stanice za koji se vežu ligandi, uzrokujući promjene u staničnoj aktivnosti.
- **Agonisti:** prirodne ili sintetske molekule koje oponašaju funkciju liganada (potiču receptor na željeni odgovor)..
- **Antagonisti:** prirodne ili sintetske molekule koje inhibiraju funkciju liganada.



Agonists and Antagonists

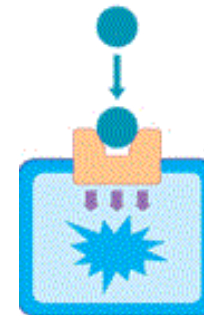
Agonists

Drugs that occupy receptors and activate them.

Antagonists

Drugs that occupy receptors but do not activate them. Antagonists block receptor activation by agonists.

Agonist alone



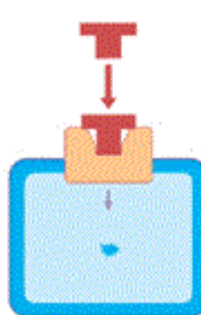
Full activation

Agonist + antagonist



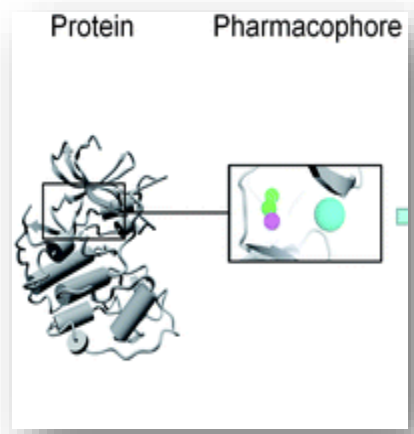
Less activation

Antagonist alone

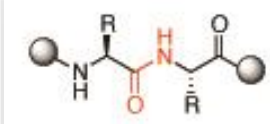


No activation

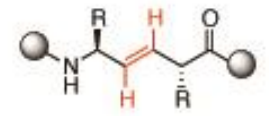
- **Farmakofor:** komplet steričkih i elektronskih svojstava neophodan za optimalnu interakciju sa specifičnom biološkom metom.



- **Izosteri:** dvije ili više različitih molekula koje sadržavaju jednak broj ukupnih ili valentnih elektrona, a odlikuju se sličnim svojstvima.



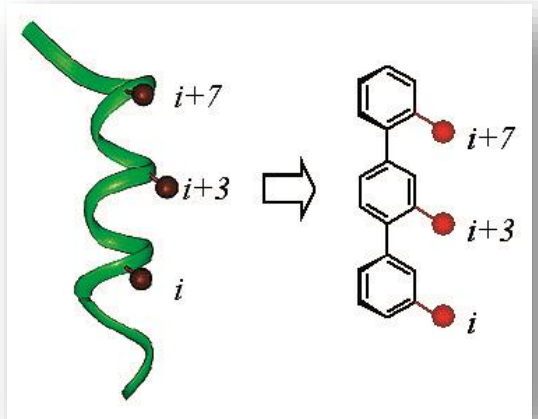
Peptide
amide bond highlighted in red



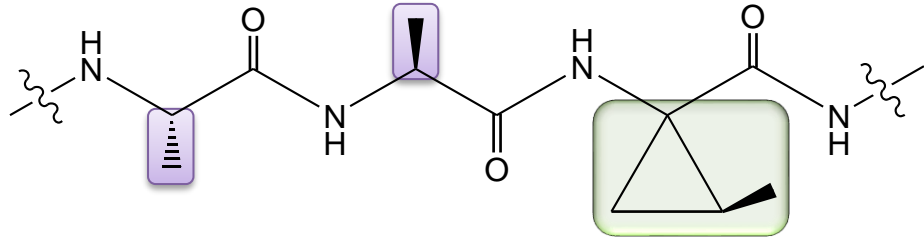
Alkene Peptide Isostere
alkene mimics the geometry of an amide but lacks H-bond donor and acceptor



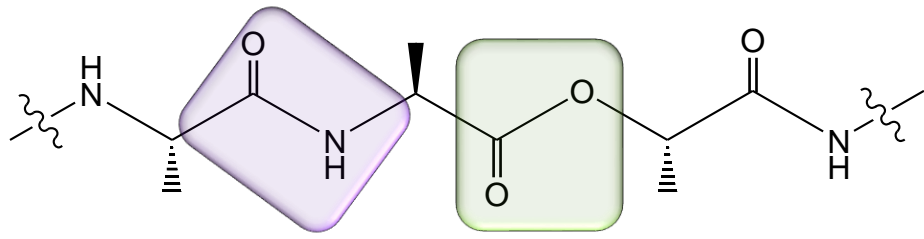
- **Peptidomimetik:** molekula koja oponaša trodimenzijski prostor peptida, te ima sposobnost izazivanja biološkog učinka nakon vezivanja na receptor.



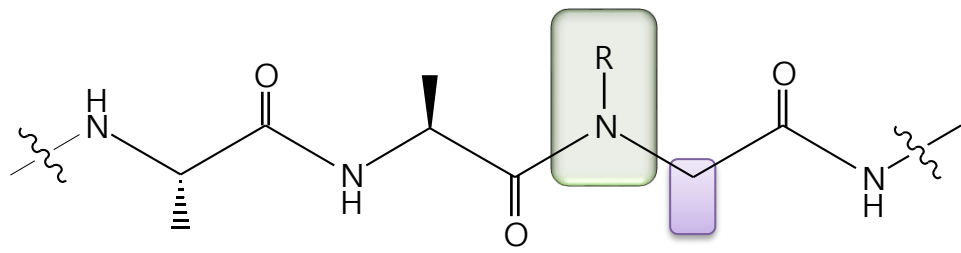
- **Peptidni analog:** peptidomimetik s modificiranim bočnim ograncima.



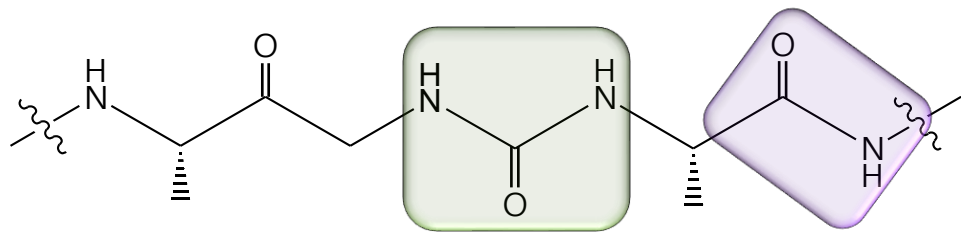
- **Depsipeptid:** pseudopeptid u kojem je amidna veza zamijenjena esterskom.

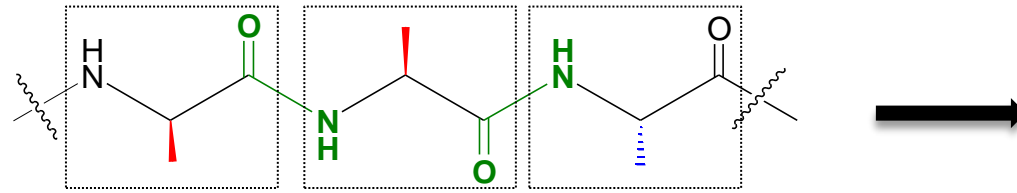


- **Peptoid:** peptidomimetik u kojemu je bočni lanac pomaknut sa C α atoma na amidni dušikov atom.

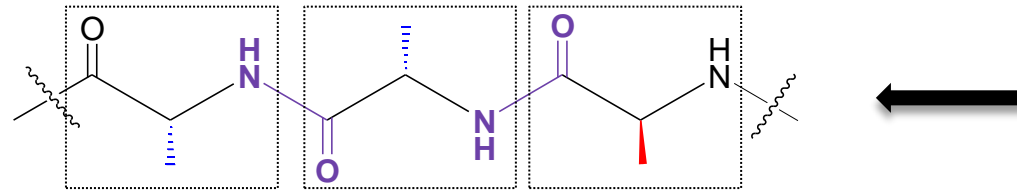


- **Ureidopeptid:** peptidomimetik u kojemu je amidna veza zamijenjena ureido-skupinom.

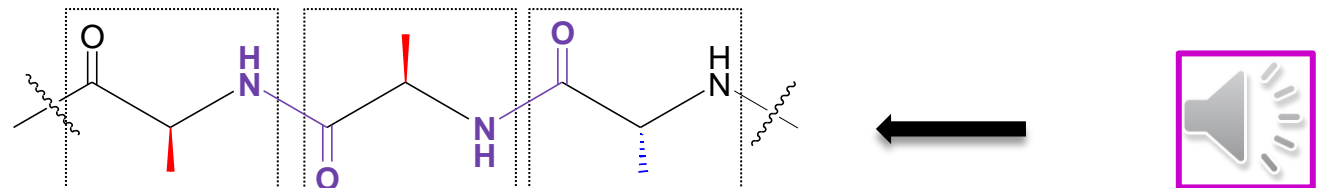




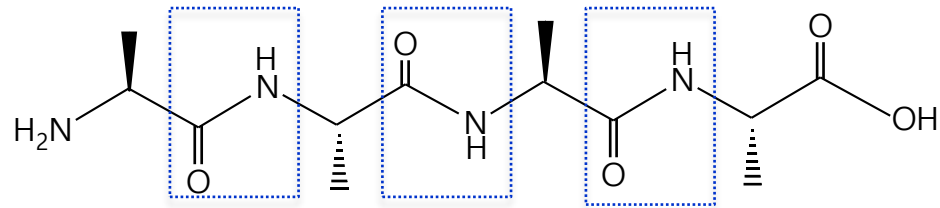
- **Retro-inverzni peptid:** izmijenjena je konfiguracija pripadajućih aminokiselina (L-aminokiseline zamijenjene su s D-aminokiselinama i obrnuto); obrnut je smjer peptidnog lanca [zamijenjene su peptidne veze (-NHCO- umjesto -CONH-)].



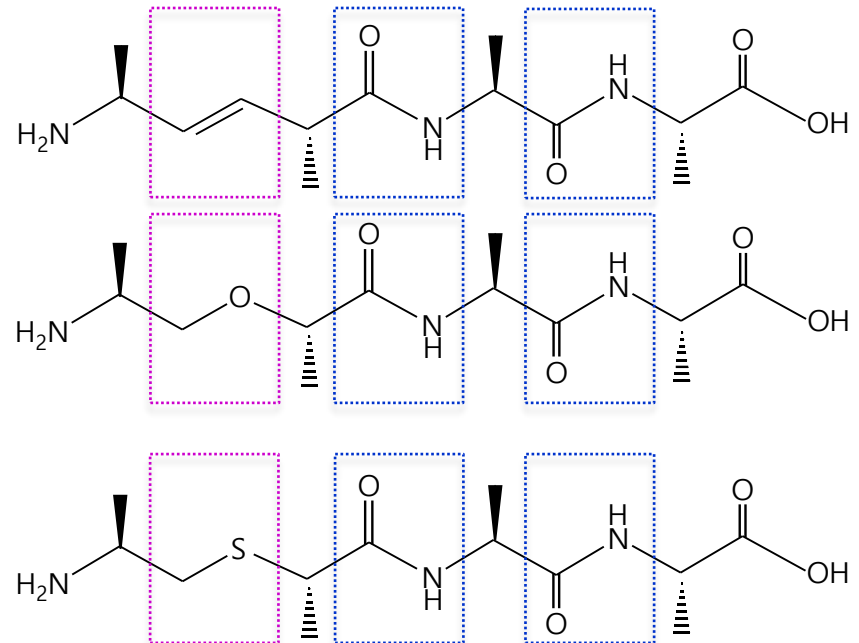
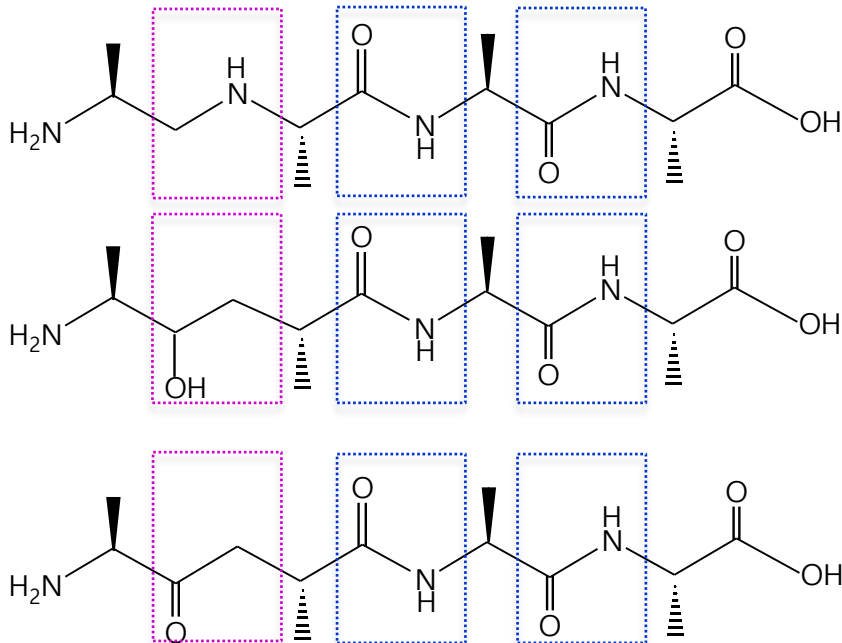
- **Retropeptid:** konfiguracija je zadržana, a obrnut je smjer peptidnog lanca [zamijenjene su peptidne veze (-NHCO- umjesto -CONH-)].



- Obrtanje smjera amidne veze u brojnim slučajevima minimizira utjecaj peptidaza, tj. *in vivo* dramatično produljuje poluvrijeme života mimetika!



- **Pseudopeptid:** (i) peptidomimetik koji sadržava **pseudopeptidnu vezu** kao surogat **amidne veze** ili (ii) poliamid građen iz neproteinogenih α -aminokiselina.



- Uvođenjem pseudopeptidnih veza povećava se otpornost prema enzimskoj degradaciji, ostvaruju se konformacijske izmjene koje se odražavaju na karakter vodikovih veza i fleksibilnost, te se povećavaju specifičnost, potencijal i biološka aktivnost receptora!



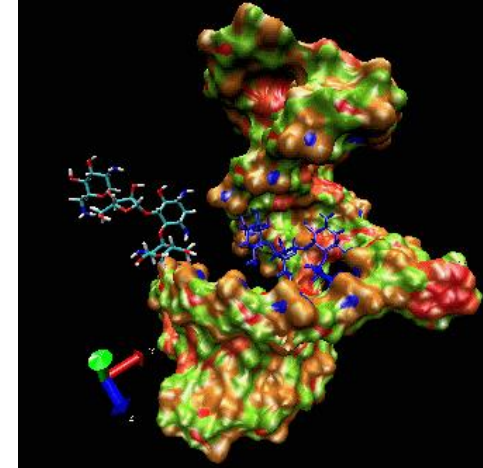
Peptidni mimetici i pseudopeptidi

Mimetic α -uzvojnice

Prof. dr. sc. Lidija Barišić

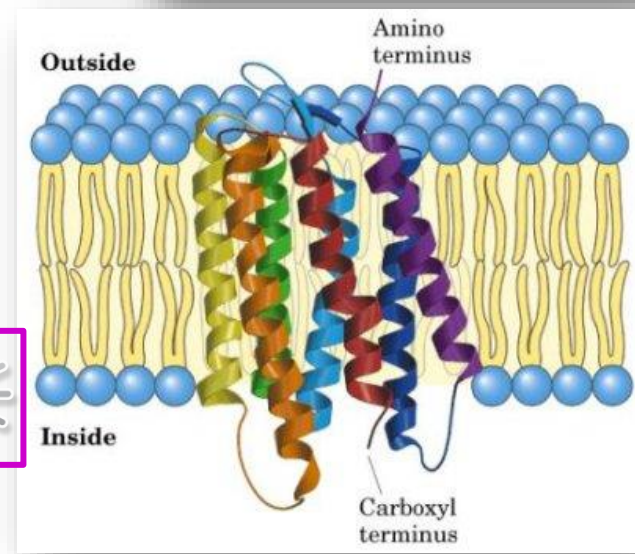
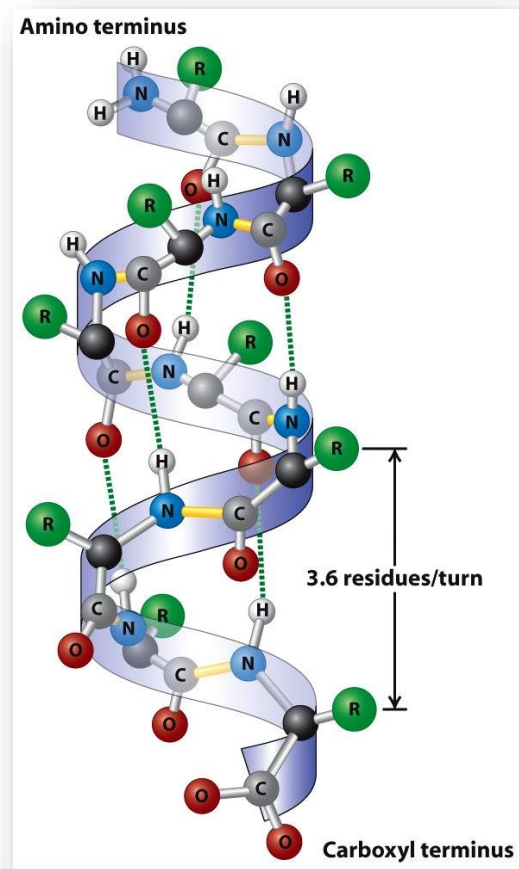
Mimetići sekundarnih struktura

- Potreba za razumijevanjem, kontrolom i oponašanjem funkcije prirodnih peptida nametnula je ideju oponašanja sekundarnih struktura (α -uzvojnice, β -ploče i okreta).
- S obzirom da **struktura proteina diktira njegovu funkciju**, sposobnost sintetske molekule da oponaša strukturu nekog prirodnog proteina izravno će utjecati na njezinu biološku učinkovitost.
- Priroda funkciju proteina kontrolira uglavnom preko **protein-protein interakcija** koje su upravljane hidrofobnošću, vodikovim i ionskim vezama, te van der Waalsovima interakcijama između površina dvaju proteina.
- Mimikrija velikih proteinskih površina bila bi izuzetno zahtjevna; taj je zadatak pojednostavljen okrićem proteinskih “hot-spots”, aminokiselinskih ostataka koji doprinose slobodnoj energiji vezivanja, odnosno mjesta na ciljanom proteinu koja imaju veliku sklonost k vezivanju liganda. Visoko uređeni motivi sekundarnih struktura (α -uzvojnice, β -ploče i okreti) predstavljaju takva mjesta.
- **Dizajn malih molekula koje oponašaju elemente sekundarne strukture te ostvaruju jednaku ili sličnu funkcionalnost doveo je do propulzivnog razvoja polja peptidomimetike.**

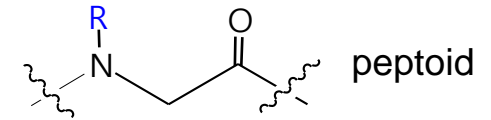
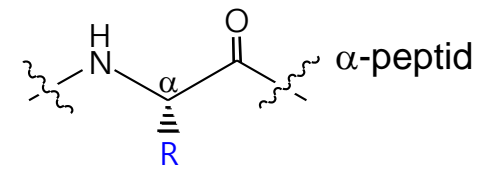


Mimetici α -uzvojnice

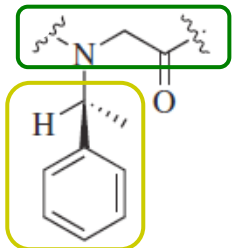
- α -Uzvojnica nastaje umatanjem jednog polipeptidnog lanca pri čemu nastaje čvrsti cilindar. Karbonilna skupina svake aminokiseline povezana je vodikovom vezom s NH-skupinom aminokiseline smještene četiri ostatka dalje. Svaki puni zavoј uzvojnice sadrži 3,6 aminokiselinskih ostataka.
- Kratke regije α -uzvojnica prisutne su u proteinima lociranim u staničnoj membrani** (transportnim proteinima i receptorima). Takvi transmembranski proteini prolaze kroz membranu kao α -uzvojnice sačinjene iz nepolarnih aminokiselina. Hidrofilna polipeptidna okosnica uvija se u uzvojnici dok se hidrofobni bočni ogranci usmjeravaju prema van, čime se uzvojnica zaklanja od hidrofobnog lipidnog okruženja.
- α -Uzvojnica, kao najčešći element sekundarne strukture u proteinima, predstavlja najčešći cilj peptidne mimetike.
- Mimetici α -uzvojnice mogu biti blago derivatizirani prirodni peptidi, ali i male molekule koje imaju sličnost s heličnom strukturom.



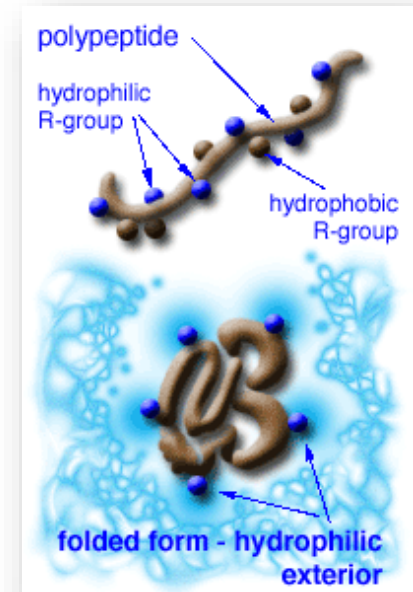
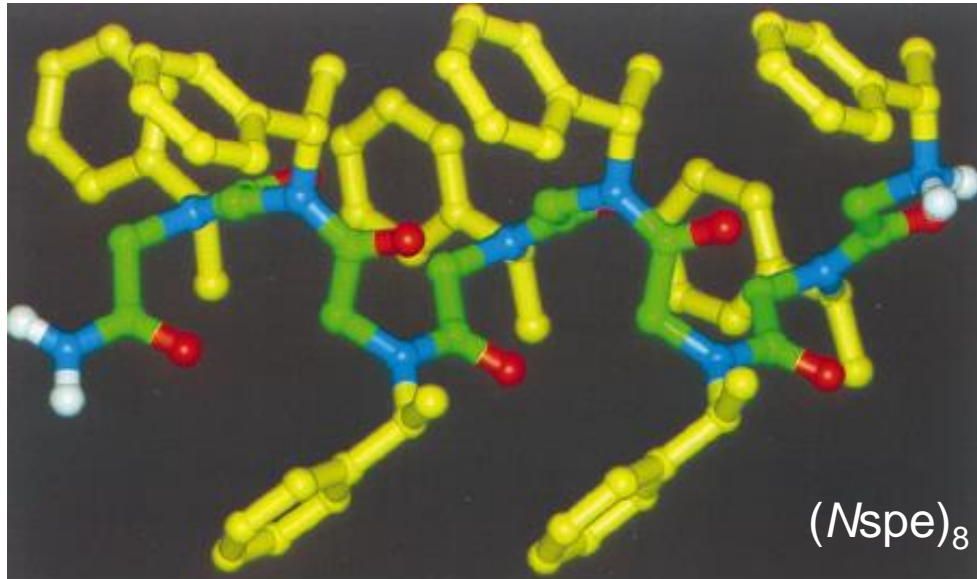
Peptoidi



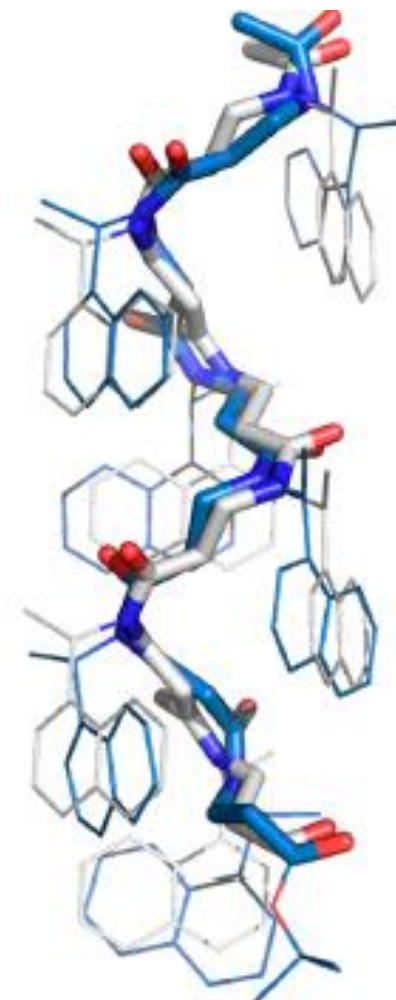
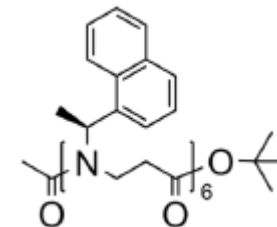
- U peptoidima je, za razliku od peptida, bočni ogranak s C_{α} atoma premješten na amidni dušik što rezultira ne samo gubitkom kiralnosti već i gubitkom sposobnosti sudjelovanja u vodikovoj vezi.
- **Heličnost** je inducirana uvođenjem **kiralnih hidrofobnih bočnih ogranaka**.
- Nabiranje peptoida ne induciraju vodikove veze te su njihove uzvojnice stabilne i u kompeticijskim otapalima.



Nspe
(S)-N-(1-feniletil)glicin



- Bioaktivni peptoidi sadrže kationske, hidrofobne aromatske ili alifatske bočne ogranke kako bi se uspostavila helična struktura poželjnih hidrofobnih svojstava, nužna za antimikrobnu aktivnost peptoida.
- Za razliku od prirodnih antimikrobnih peptida koji podliježu proteolizi, peptoidni mimetici čija je amidna veza modificirana (peptoidi ne sadrže amidni proton!) stabilni su prema proteazama.
- Prisutnost hidrofobnih skupina na amidnom dušiku omogućava njihovu bolju permeabilnost kroz stanične membrane.
- Razmatranja moguće terapijske uporabe peptoida podrazumijevaju odgovore na pitanja: kojom se brzinom eliminiraju iz tijela?, nakupljaju li se u tijelu i gdje?, ponašaju li se u organizmu kao ksenobiotici ?, jesu li hepatotoksični?.
- Peptoidi se istražuju kao mogući farmaceutici u području plućnih surfaktanata, antibiotika te kao antikancerogeni agensi.

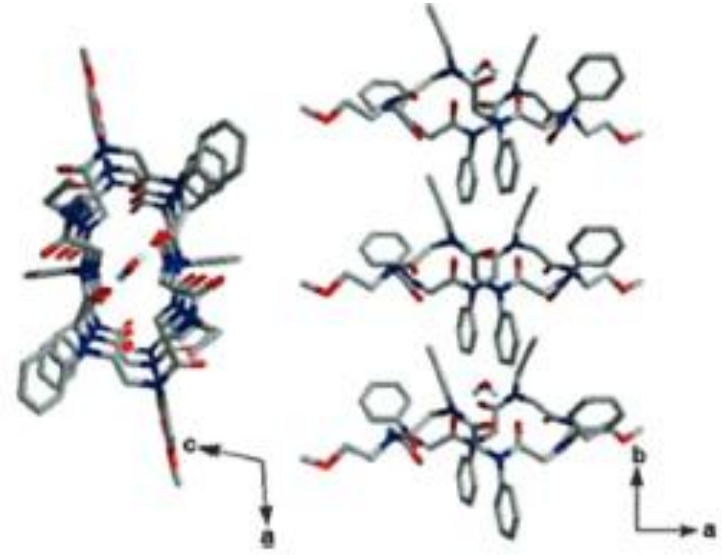
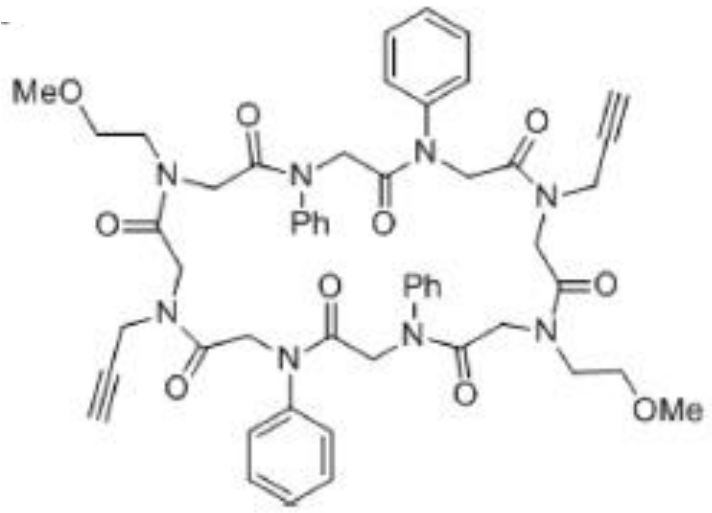
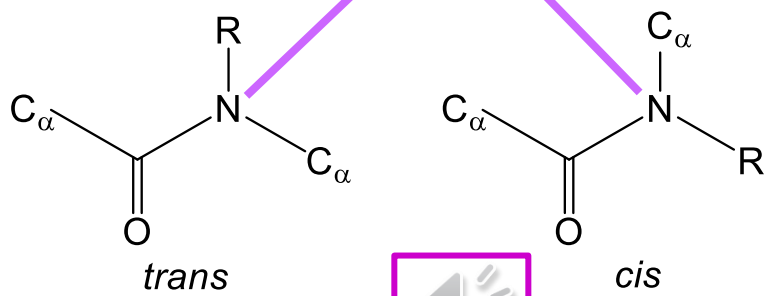


• Uz nedostatak kiralnog centra, peptoidi su karakterizirani prisutnošću tercijarne amidne skupine.

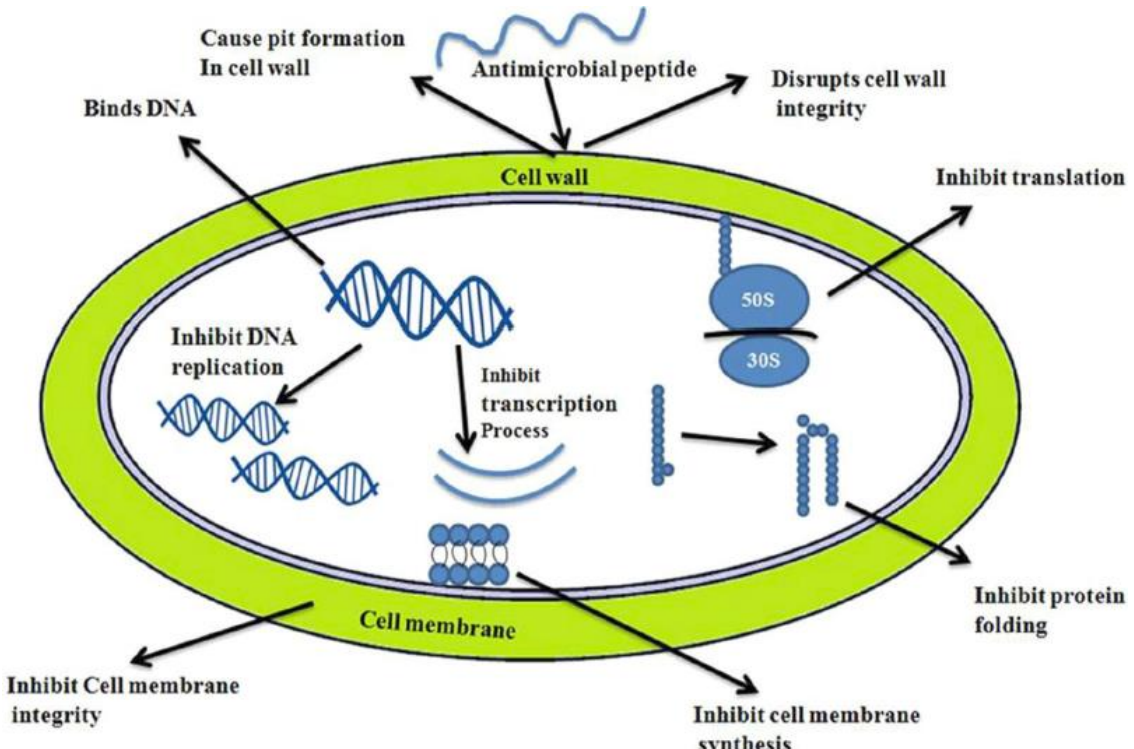
• Tercijarna amidna veza omogućava povećanu fleksibilnost (moguća je *cis*- i *trans*-konformacija svake amidne skupine što udvostručava broj mogućih konformacija), a s povećanjem konformacijske slobode smanjuje se sposobnost vezivanja za željeni receptor.

• Konformacijska fleksibilnost peptoida može se ograničiti ciklizacijom:

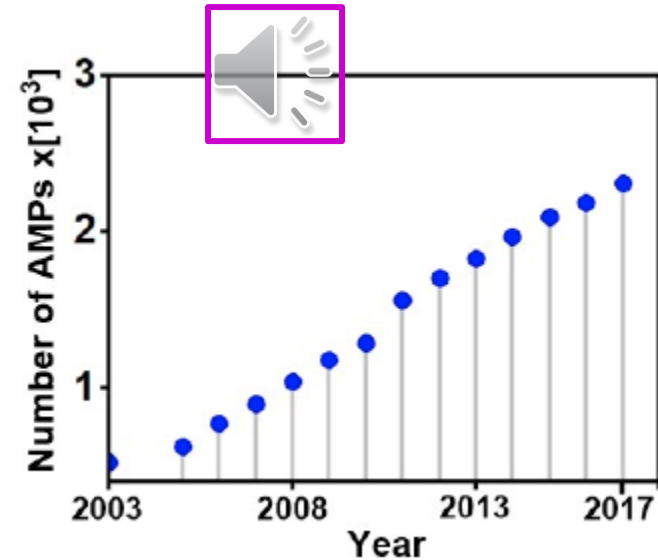
tercijarni amidni dušik



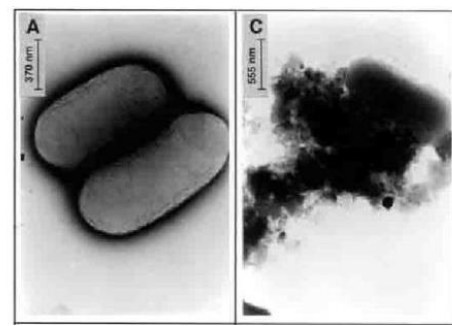
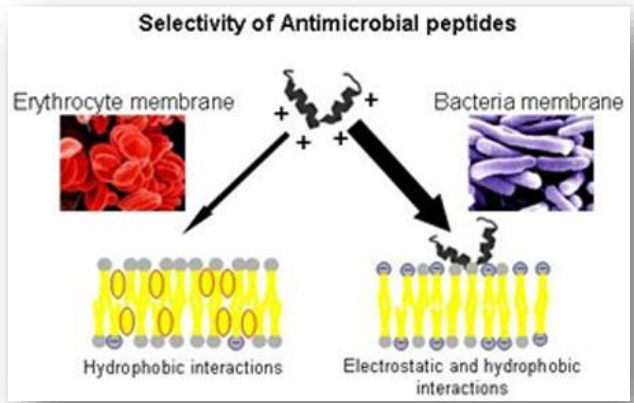
- Amfipatska uzvojnica antimikrobnih peptida (AMP) vezuje se za staničnu membranu uslijed čega dolazi do tvorbe pora i destabilizacije lipidnog dvosloja te pucanja stanične membrane. Nakon ulaska u stanicu, neki AMP mogu dodatno sudjelovati u različitim interakcijama, npr. vezivanju s nukleinskim kiselinama ili inhibiciji enzima, čime se dodatno promovira antimikrobna aktivnost. Antimikrobna selektivnost i potencijal AMP ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima: naboju, sekundarnoj strukturi, hidrofobnosti, veličini te omjeru hidrofobnih i hidrofilnih ostataka. Među brojnim skupinama AMP-a najproučavaniji su kationski AMP koji se vezuju na negativno nabijene lipopolisaharide ili fosfolipide na bakterijskoj membrani te ostvaruju vrlo visoku citotoksičnost.



- AMP izolirani iz prirodnih izvora smatraju se sigurnima za primjenu kod ljudi te se ispituju kao moguća zamjena za konvencionalne lijekove, a nalaze primjenu i u preradi hrane. Klinički razvoj AMP i moguća terapijska primjena ograničeni su visokim troškovima izolacije i prerade, toksičnošću te proteolitičkom nestabilnošću.
- Zadnjih se godina broj novootkrivenih AMP naglo povećava, zahvaljujući razvoju metoda i tehnika za izolaciju, detekciju masenom spektrometrijom, sekvencioniranje i strukturnu karakterizaciju. Tako je do 2015. bilo registrirano 2493 AMP (uključujući i sintetske), a od tada do prve polovice 2018. registrirano još 2981 AMP!
- Različiti antimikrobni agensi poput peptida i bakteriocina (nizina) koriste se kao biokonzervansi, u cilju produženja roka trajanja namirnica. (Bakteriocini se definiraju kao skupina proteinskih spojeva, sintetiziranih na ribosomima, a odlikuju se koncentracijski-ovisnim multifunkcijskim svojstvima). Prisutni su kod svih bakterijskih vrsta, a posebno kod bakterija mliječne kiseline.
- Nekoliko je prednosti njihovog korištenja u konzerviranju hrane: sigurni su za konzumaciju, nisu toksični prema eukariotskim stanicama, odlikuju se širokim spektrom aktivnosti prema mikroorganizmima koji uzrokuju kvarenje hrane te su otporni na promjene pH i temperature.

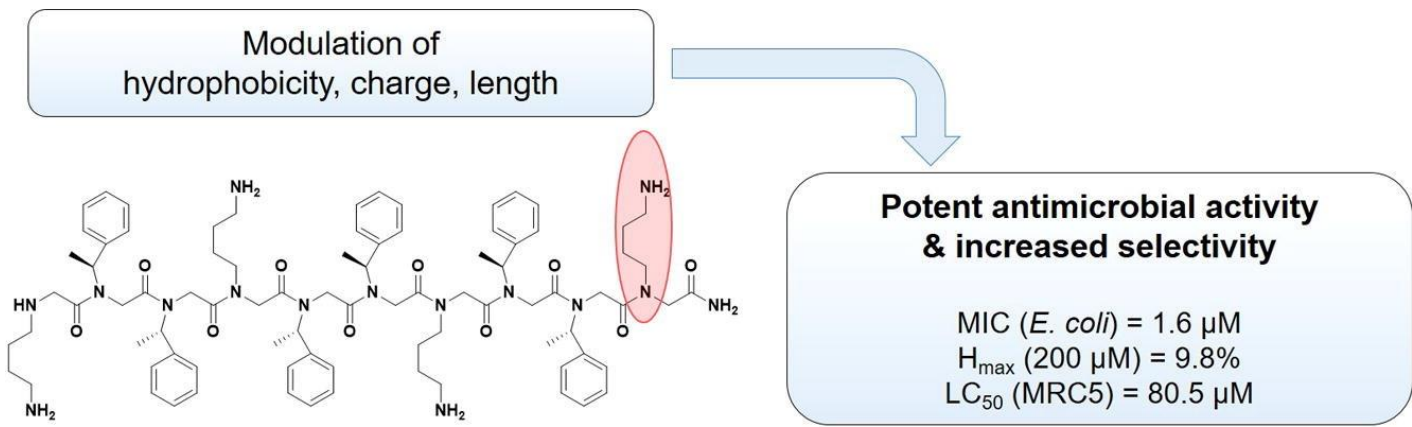


- AMP (engl. *antimicrobial peptide*) uglavnom su kationski peptidi (pozitivno nabijeni) što olakšava njihovo vezanje na negativno nabijenu vanjsku površinu bakterijske membrane kao i membrane kanceroznih stanica.

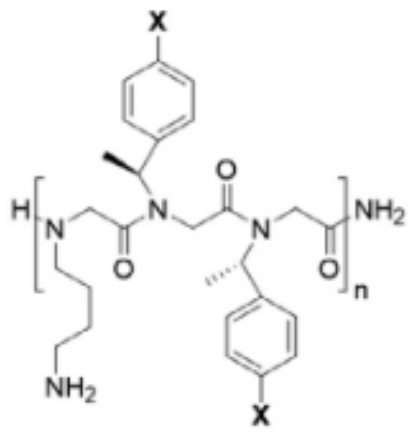


- E. coli prije (lijevo) i poslije (desno) tretiranja AMP LL-37 (Shai, Y. *Current Pharmaceutical Design* 2002 (8) 715.

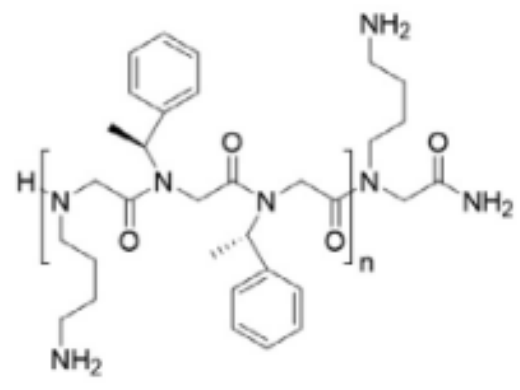
- U citiranom radu opisana je serija amfipatskih peptoida s hidrofobnim i kationskim skupinama u bočnim ograncima kako bi se ispitaio utjecaj bočnog ogranka i duljine sekvencije na antimikrobnu aktivnost.



- Peptoidi **1-7** zauzimaju konformaciju uzvojnice građene iz tri ili četiri ponavljajuće jedinice, od kojih je svaka sadrži po tri monomera (dva hidrofobna i jedan kationski). Takav helični peptoid, s kationskim i hidrofobnom ostatcima oponaša i amfipatska i helična svojstva AMP-a.



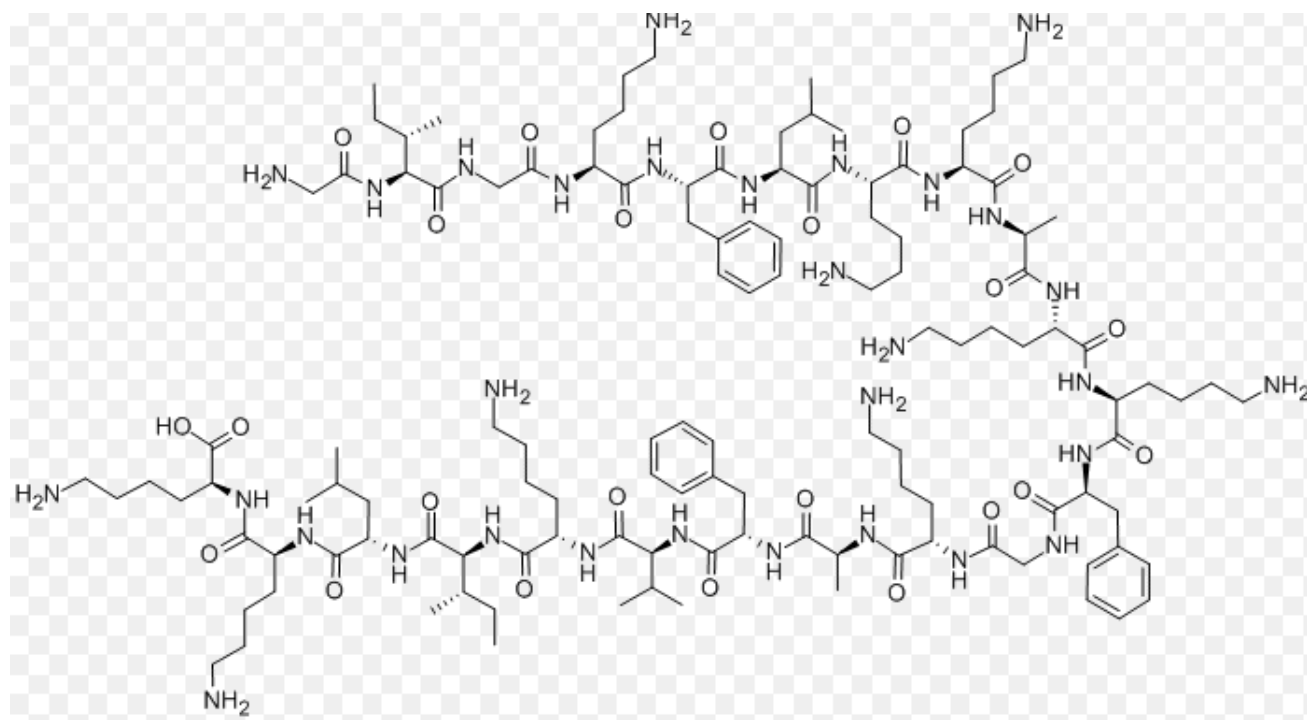
1 : $n = 4$, $X = -H$ / **2** : $n = 3$, $X = -H$
3 : $n = 4$, $X = -Cl$ / **4** : $n = 4$, $X = -CH_3$
5 : $n = 4$, $X = -F$



6 : $n = 4$
7 : $n = 3$



- Njihov antimikrobni i citotoksični potencijal uspoređen je s poznatim AMP-om peksigananom (sadrži hidrofobne i kationske ostatke). Riječ je o visokopotentnom analogu magainina izgrađenom iz 22 aminokiseline.



- Dva kontrolna spoja (peptoid **1** i peksiganan) pokazali su se potentnim antimikrobnim spojevima. Peptoid **2**, iako sadrži istu ponavljajuću sekvenciju kao **1**, nešto je slabijeg antimikrobnog potencijala. Hidrofobni analozi **3-5** pokazuju slabu do umjerenu antimikrobnu aktivnost protiv *E. coli*, dok su prema *B. subtilis* aktivniji, s izuzetkom najhidrofobnijeg peptoida **3** (sadrži Cl-atom na *p*-položaju). Suprotno tome, peptoid **5** koji sadrži F-atom na *p*-položaju pokazuje MIC-vrijednosti usporedive sa spojem **1** što ne iznenađuje jer se F-atom u brojnim istraživanjima pokazao učinkovitim izosterom H-atoma. Peptoidi **6** i **7** koji sadrže dodatni lipofilni Nlys-ostatak pokazuju i poboljšanu antibakterijsku aktivnost u odnosu na **1** i **2**.



- Hidrofobni peptoidi **3-5**, kao i peptoid **1**, uzrokuju potpunu hemolizu eritrocita. Niski postotak hemolize u slučaju peptoida **7** (9,8%) indicira njegovu visoku antibakterijsku selektivnost.

Antibacterial and hemolytic activities of peptoids and pexiganan.

Compounds	MIC ^a (μM)		HD ₁₀ /HD ₅₀ ^b	H _{max} ^c (200 μM)
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>		
1	1.6	0.8	9.1/63.4	100
2	3.1	1.6	119.5/>200	38.7 ± 5.4
3	>6.1	6.1	<6.25/10.4	100
4	>6.1	0.8	<6.25/8.3	100
5	3.1	0.4	<6.25/<6.25	100
6	1.6	0.4	19.5/>200	48.1 ± 3
7	1.6	0.8	>200/>200	9.8 ± 0.8
Pexiganan	0.8	0.4	113.4/>200	21.5 ± 2.9

^a MIC: minimal inhibitory concentration. These concentrations represent the mean values of three independent experiments performed in duplicate.

^b HC₁₀ and HC₅₀ are the concentrations of the compounds that cause 10% and 50% hemolysis of rat erythrocytes, respectively.

^c H_{max} is the percent (%) hemolysis at the highest concentration tested (200 μM).

- Sljedeći zadatak bio je istražiti ostvaruju li kationski amfipatski peptoidi **1-7** citotoksičnu aktivnost protiv stanica leukemije i raka prostate te normalnih stanica fibroblasta. Općenito, LC₅₀-vrijednosti u skladu su s postotkom hemolize eritrocita. Peptoidi **3-5** koji su već pri niskim koncentracijama uzrokovali hemolizu eritrocita pokazali su i relativno niske LC₅₀-vrijednosti protiv kanceroznih i zdravih stanica. Peptoid **7** koji je imao najslabiju hemolitičku aktivnost pokazao je i nisku citotoksičnost.

LC₅₀ values (μM) against cancer cells (Jurkat and LNCaP) and normal cells (MRC5).^a

	Jurkat	LNCaP	MRC5
1	2.21	5.0	8.0
2	18.6	27	40.0
3	1.58	10.0	3.0
4	ND ^b	12.0	8.0
5	2.47	9.5	9.5
6	5.04	ND ^b	10.0
7	28.9	ND ^b	80.5
Pexiganan	ND ^b	ND ^b	21.2

^a These concentrations represent mean values of three independent experiments performed in duplicate.

^b ND: Not Determined.



- Zaključno, hidrofobni peptoidi **3-5** neselektivno su toksični prema stanicama sisavaca, dok peptoid **7** ostvaruje antibakterijsku aktivnost. Osim toga, **7** pokazuje i nisku hemolitičku aktivnost što ga čini obećavajućim kandidatom za terapijsku primjenu.

R. N. Zuckermann et al, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 10646.

K. D. Stigers et al, Curr. Opin. Chem. Biol. 3 (1999) 714.

J. A. Patch et al, Curr. Opin. Chem. Biol. 6 (2002) 872.

B. Yoo et al, Curr. Opin. Chem. Biol. 12 (2008) 714.

T. Godballe et al, Chem. Biol. Drug. Des. 77 (2011) 107.

C. Baldauf et al, Phys. Biol. 3 (2006) S1.

Horst Kessler et al, Angew. Chem. Int. Ed. 47 (2008) 2595.

F. De Riccardis, Chem. Comm. 33 (2008) 3927.

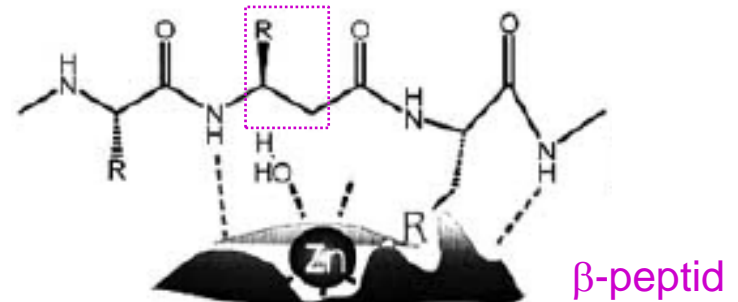
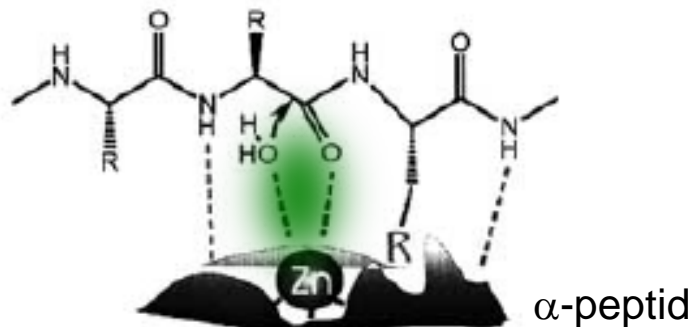
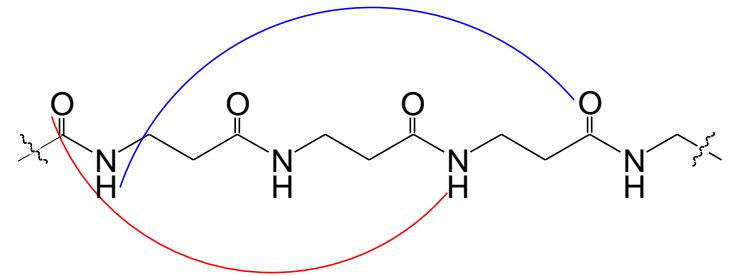
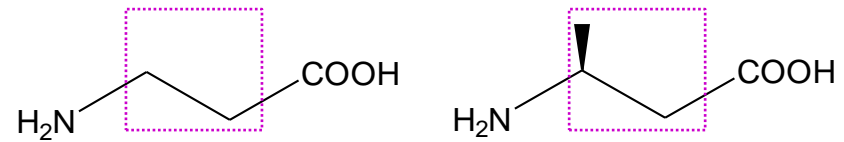
K. Kirshenbaum et al, Org. Lett. 9 (2007) 5003.

L. A. Wessjohann et al, Org. Lett. 10 (2008) 205.

I. Dijkgraaf et al, J. Nucl. Med. 47 (2006) 153.

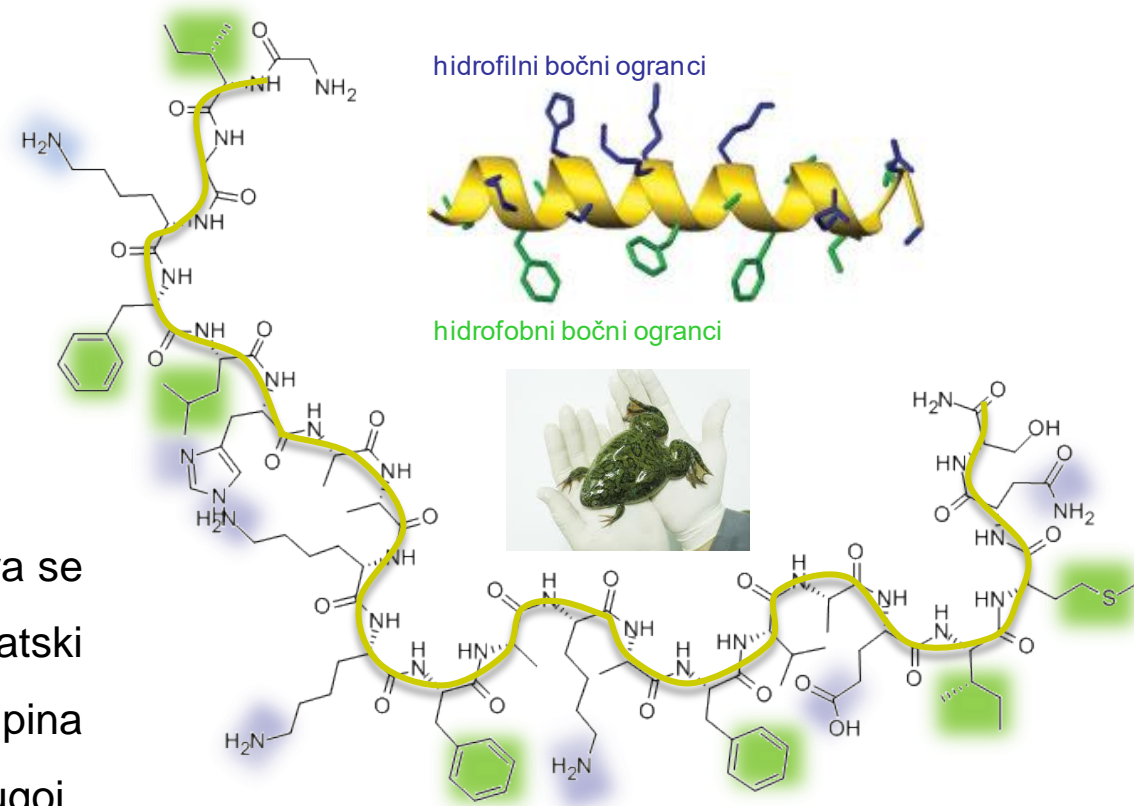
β -Peptidi

- Produljavanjem peptidnoga lanca za jednu metilensku skupinu može se povećati njegova otpornost prema peptidazama.
- Izvode se iz β -aminokiselina u kojima su *N*- i C-terminus razdvojeni **dvama C-atomima**.
- Formiraju visokostabilne **12-** ili **14-**člane helične strukture, ali i β -plohe i okrete (analogno α -peptidima).
- U odnosu na α -peptide, odlikuju se povećanom metaboličkom i strukturnom stabilnošću što je demonstrirano na primjeru vezivanja za aktivno mjesto metaloendopeptidaze: **karbonilna skupina iz α -peptida stupa u interakciju s Zn**, dok se kod β -peptida ista interakcija ne opaža.

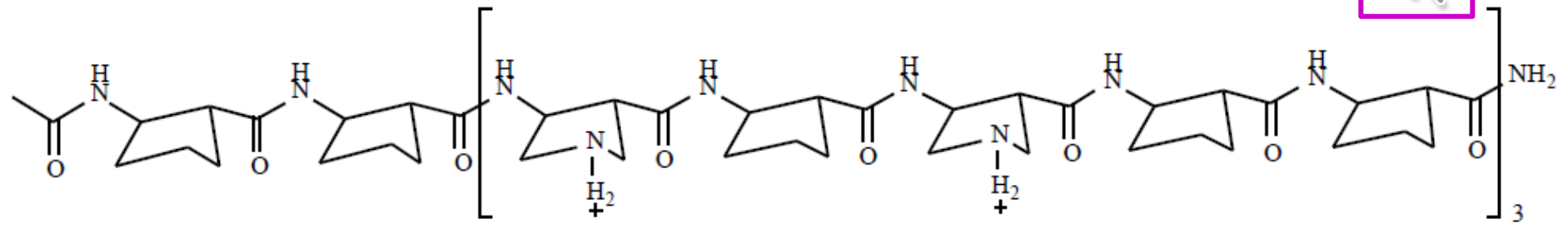


- Njihova su strukturna svojstva iskorištena u dizajnu antimikrobnih β -peptida.

- Magainin, peptidni antibiotik, izoliran iz kože *Xenopus laevis*,
- djelotvoran protiv virusa, bakterija, protozoa, kvasaca, funga,
- citotoksični učinak na stanice raka,
- inhibira virus Herpes simplex.



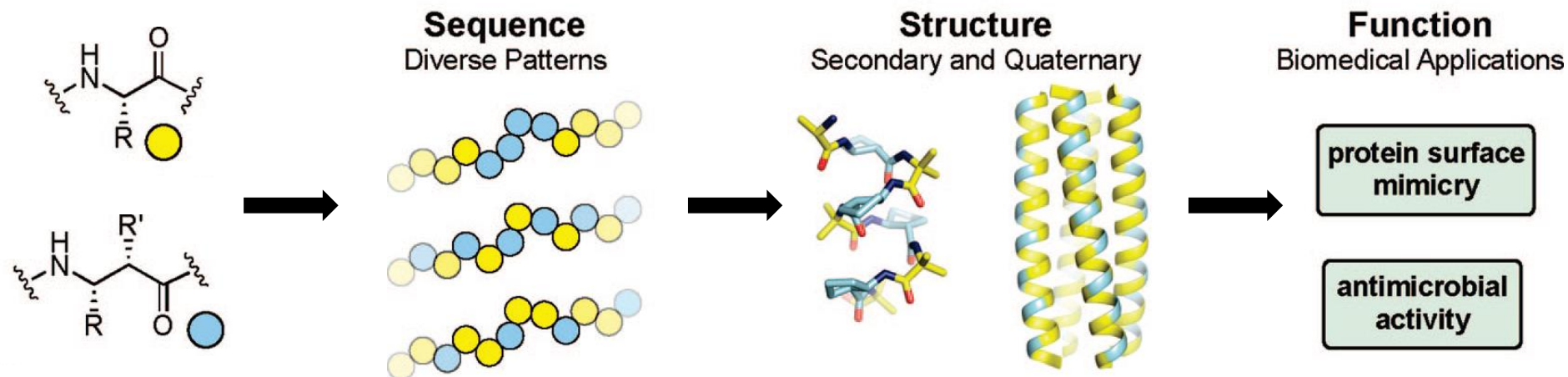
- Njegov mimetik, peptid β -17, stabilizira se tvorbom 12-člane uzvojnice, a amfipatski karakter (prisutnost hidrofobnih skupina na jednoj, te hidrofilnih skupina na drugoj strani uzvojnice) osigurava prisustvom hidrofobnih i kationskih skupina.



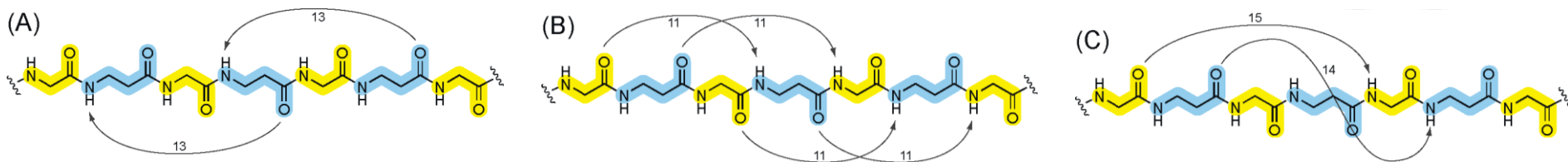
- Poboljšana biološka aktivnost u odnosu na prirodni peptid (djelotvoran je protiv četiri bakterijske vrste, uključujući i dva patogena rezistentna na uobičajene antibiotike).

Foldameri s heterogenom okosnicom

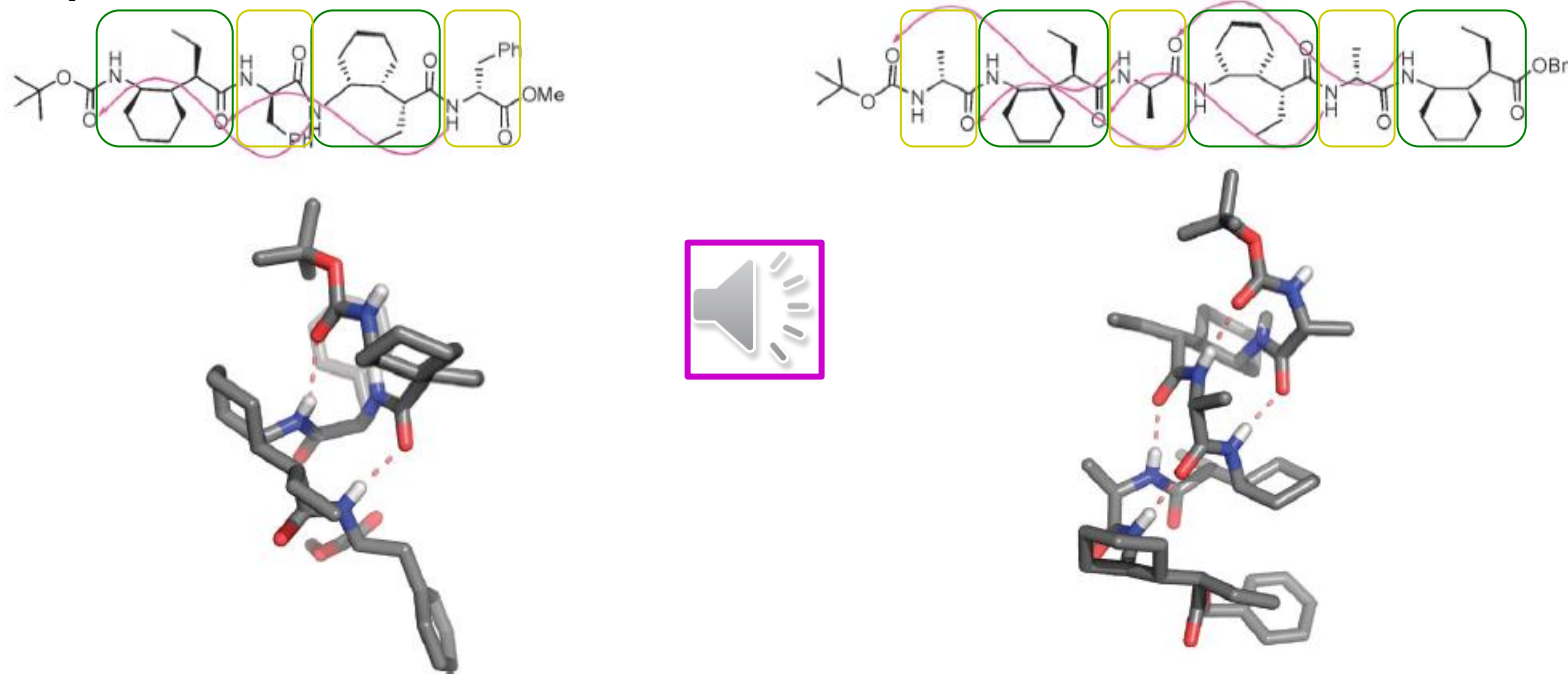
- Foldameri su neprirodni oligomeri koji se smataju poprimajući visokouređenu sekundarnu i kvaternu strukturu, oponašajući arhitekturu prirodnih proteina.
- Za razliku od homogenih foldamera čiji građevni blokovi pripadaju istoj skupini spojeva, heterogeni foldameri su načinjeni iz ponavljajućih jedinica koje pripadaju različitim skupinama spojeva.
- Kemija foldamera započela je modifikacijom prirodnih α -peptida s njihovim β - i γ -analogima.
- Najbolje su opisani mješoviti foldameri nastali kombinacijom α - i β -aminokiselina,
- sadrže podjedinice različitih tipova α - α - α - α - β - β - β - β -, α - β - α - β - α - β -, α - α - β - α - α - β , ... te pokazuju visoku rezistenciju na djelovanje proteaza.



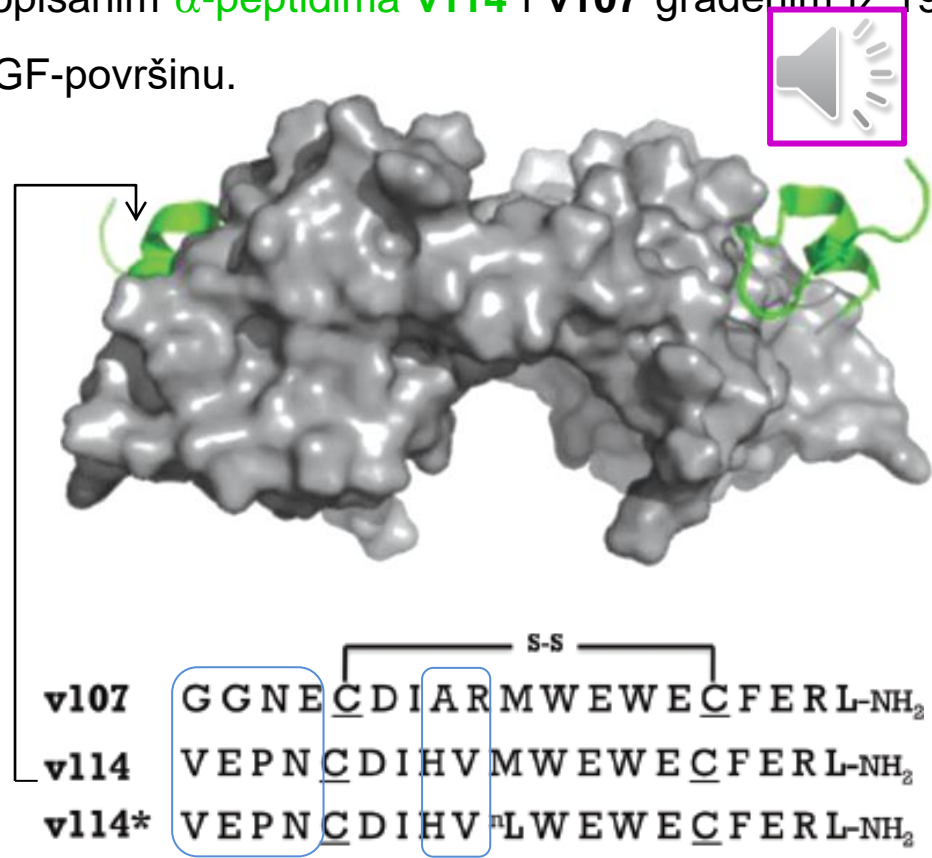
- Sustavnim kombiniranjem α - i β aminokiselina ostvaruju se različiti strukturni motivi (A, B, C,...) koji podliježu interkonverziji (kod prikazanog α/β -peptida izmjenjuju se helične strukture B i C).



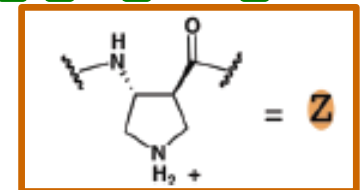
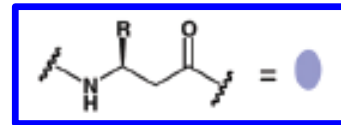
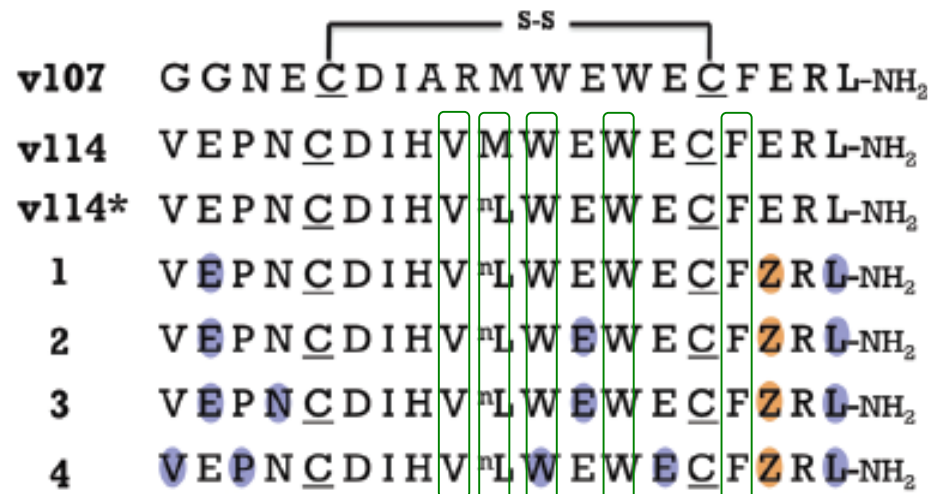
- Kombiniranjem α -i γ -aminokiselina pripremljeni su oligomerni tetrapeptid (sekvencija $\gamma\alpha\gamma\alpha$) i heksapeptid (sekvencija $\alpha\gamma\alpha\gamma\alpha\gamma$) koji u čvrstom stanju i u otopini zauzimaju konformacije 12-članih uzvojnica.



- Istražuju se različite strategije za mimikriju α -heličnih segmenata s proteinske površine, a u cilju stvaranja inhibitora uzvojnicom posredovanih PPI. Opisani su heterogeni foldameri koji se vezuju za prepoznavajuću površinu vaskularnog endotelnog faktora fasta (VEGF, protein odgovoran za rast novih krvnih žila), a bazirani su na ranije opisanim α -peptidima **v114** i **v107** građenim iz 19 aminokiselinskih ostataka koji se vezuju na VEGF-površinu.
- Peptid **v114**, sastavljen iz α -aminokiselina, u prethodnim se istraživanjima pokazao najboljim ligandom za vezno mjesto VEGF, dok ligand **v107** ostvaruje tri puta slabije vezivanje. Oba peptida sadrže jednu disulfidnu vezu, a razlikuju se na pozicijama 1-4, 8 i 9.
- Glavni cilj zamjene $\alpha \rightarrow \beta$ jest zadržati afinitet za VEGF i smanjiti proteolitičku nestabilnost.
- Sistematska evaluacija zamjene $\alpha \rightarrow \beta$ u toj 19-članoj sekvenciji omogućila je identifikaciju homologa koji sadrži $\sim 30\%$ β -ostataka, a zadržava visok afinitet za VEGF te pokazuje rezistenciju prema proteolizi. Takvi α/β -peptidi inhibiraju VEGF-stimuliranu proliferaciju humanih endotelnih stanica pupčane vene.



- Ala-scanom peptida **v114** utvrđeno je da bočni ogranci ostataka **V9, M10, W11, W13** i **F16** igraju ključnu ulogu u vezivanju s VEGF. Usljedio je β -scan kako bi se utvrdilo koji položaji u peptidu **114** toleriraju zamjenu $\alpha \rightarrow \beta$ (plavo označava β -aminokiselinu, a narančasto cikličku β -aminokiselinu). Osim toga, kako bi se spriječila moguća tvorba sulfoksida, provedena je zamjena M10 \rightarrow norleucin (nL) dajući prototip **v114*** koji se odlikuje visokim afinitetom za VEGF.



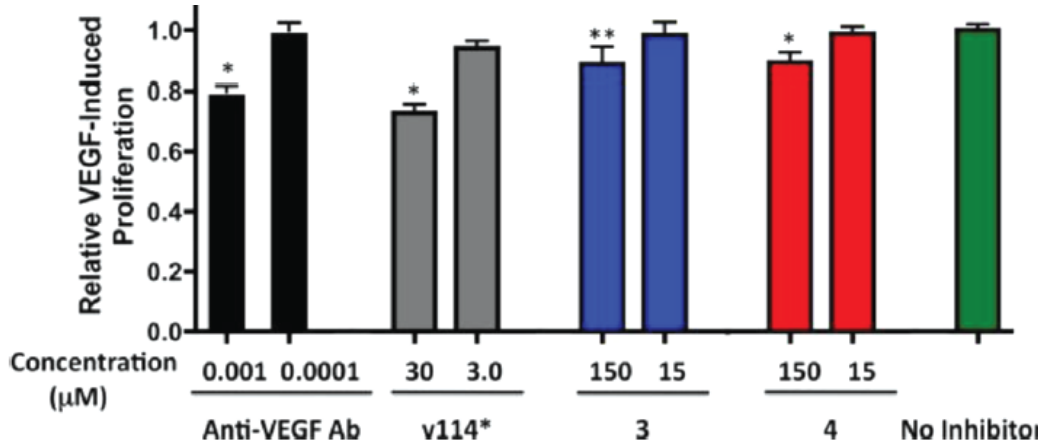
- α/β -peptid **1**, sa zamjenom $\alpha \rightarrow \beta$ na položajima **E2** i **L19** te $\alpha \rightarrow$ ciklo- β (**Z**) na **E17**, zadržao je vrlo visok afinitet za VEGF ($K_i = 0,26 \mu M$). α/β -peptid **2** s četverostrukom zamjenom $\alpha \rightarrow \beta$ također je pokazao afinitet za VEGF ($K_i = 0,74 \mu M$). U odnosu na prototip **v114***, zamjena $\alpha \rightarrow \beta$ i $\alpha \rightarrow$ ciklo- β (**Z**) u peptidima **3** i **4** rezultirala je smanjenjem afiniteta za VEGF.

oligomer	$K_i (\mu M)^a$
v107	0.60
v114	0.070
v114*	0.060
1	0.26
2	0.74
3	1.6
4	4.6

oligomer	$t_{1/2}$ (min) ^b
v107	—
v114	—
v114*	1.6
1	—
2	—
3	24
4	300

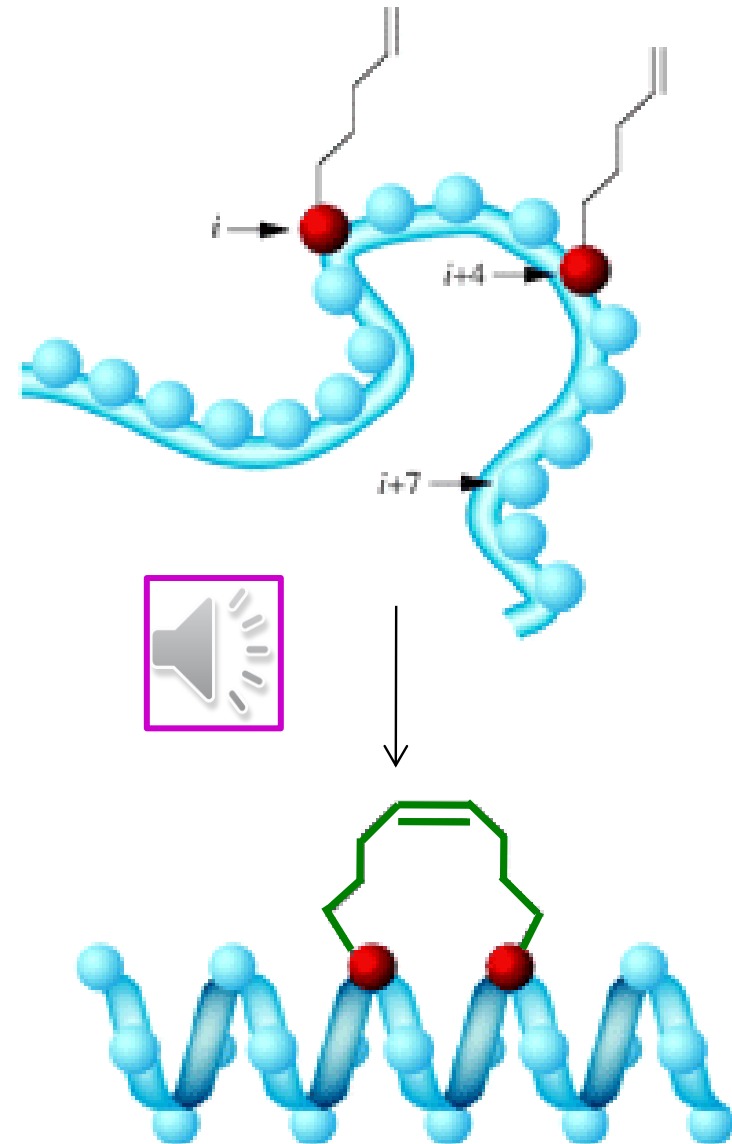


- Utjecaj zamjene $\alpha \rightarrow \beta$ na proteolitičku stabilnost ispitan je u prisutnosti proteinaze K. Peptid **v114*** razgrađuje se vrlo brzo ($t_{1/2} = 1,6$ min). α/β -peptid **3** pokazao se 15 puta stabilnijim u odnosu na prototip **v114***, a MS-analiza utvrdila je da kod oba peptida do cijepanja dolazi između ⁿL10 i W11. U nadi da će pokazati veću rezistenciju prema proteolizi testiran je α/β -peptid **4** (koji sadrži šest zamjena $\alpha \rightarrow \beta$ uključujući i W11!). Njegovo vrijeme polu-života iznosi 300', što ga čini 190 puta rezistentnijim prema proteinazi K u odnosu na prototip **v114***, te >10 puta rezistentnijim u odnosu na **3**. Afinitet mimetika **4** za VEGF je nešto niži u odnosu na mimetik **3** (~ 3 puta).
- Izlaganjem VEGF inducira se proliferacija humanih endotelnih stanica pupčane vene (HUVEC), a **v114*** inhibira VEGF-induciranu HUVEC-proliferaciju. Stoga je u nastavku istraživanja ispitan inhibicijski učinak α/β -peptida **3** i **4**. Kao pozitivna kontrola korišteno je anti-VEGF protutijelo koje punu inhibiciju ostvaruje već pri 0,001 μ M. Peptid **v114*** pri konc. 30 μ M potpuno inhibira VEGF-stimuliranu HUVEC-proliferaciju. α/β -peptidi **3** i **4** pokazuju slabiji inhibitorski potencijal (što ne iznenađuje s obzirom da imaju i slabiji afinitet za VEGF u odnosu na **v114***).
- Kako pri inhibitornim koncentracijama peptidi **3** i **4** nisu toksični, dobiveni rezultati sugeriraju da ti spojevi mogu blokirati VEGF-posredovanu transdukciju signala preko receptora na površini stanice.

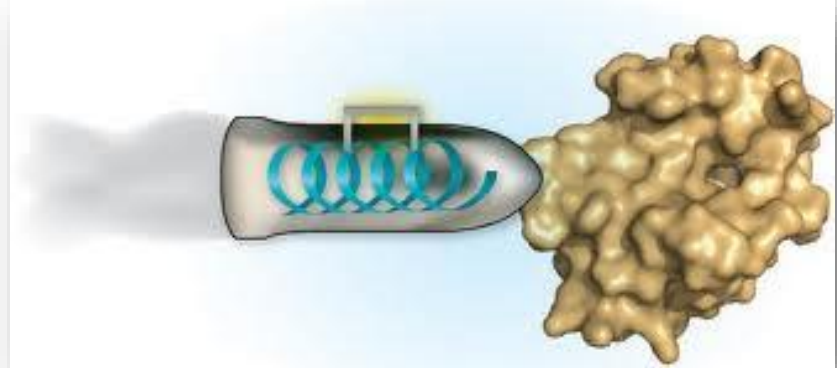


“Uvezani” (stapled) peptidi

- Često kratke peptidne sekvencije, makar smještene i u središtu visoko stabilne α -uzvojnice, ne mogu poprimiti uređenu strukturu.
- Jednostavnim modifikacijama može se “prisiliti” peptid da zauzme konformaciju uzvojnice: tvorbom **kovalentne spojnice** smanjuje se udaljenost između ostataka koji bi se trebali nalaziti na istoj strani uzvojnice (povećanje heličnosti i do 80%).
- Zahvaljujući hidrofobnoj ugljikovodikovoj spojnici, stabilizirane uzvojnice lakše prolaze kroz lipidni dvosloj.
- Peptidna veza prisilno stabiliziranih peptida manje je izložena, što rezultira njihovom povećanom stabilnošću na djelovanje proteaza.
- Metoda “uvezivanja” peptida korištenjem nepeptidnih premostica omogućava pretvaranje vrlo malih peptida (10-15 aminokiselinskih ostataka) u biološki aktivne spojeve.



- Djeluju kao inhibitori HIV-1 (zahvaljujući visokom afinitetu vezivanja na proteine iz virusnog omotača).
- Induciraju apoptozu stanica raka (inhibiraju protein β -katenin koji, prisutan u hiperaktivnom obliku, uzrokuje nekontroliran rast stanica raka debelog crijeva, kože, mozga i jajnika).
- Uvezani (“stapled”) citokini (hormoni koje luče stanice imunostava) ublažavaju aktivnost interleukina-13 odgovornog za astmatične napade.



“*Magic bullets in nature's arsenal*”



STAPLED PEPTIDES

Cell Permeable

Specific

Stable



Drug Properties	Peptides	Stapled Peptides
Cell penetration	--	++
Specificity	++	++
Stability	--	++

J. A. Kritzer, *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010) 566.

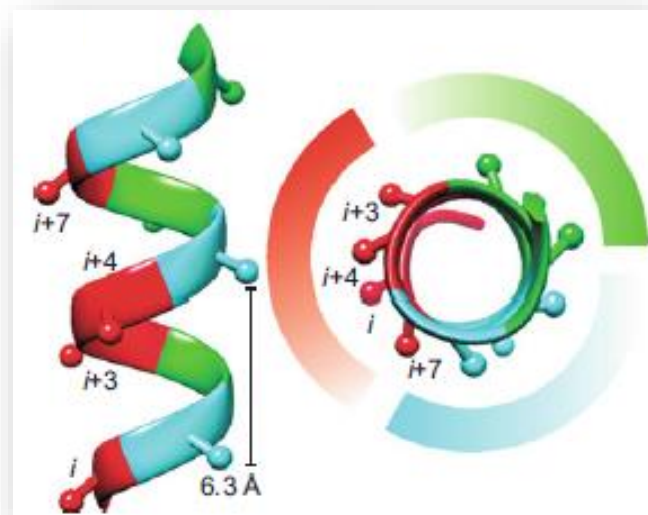
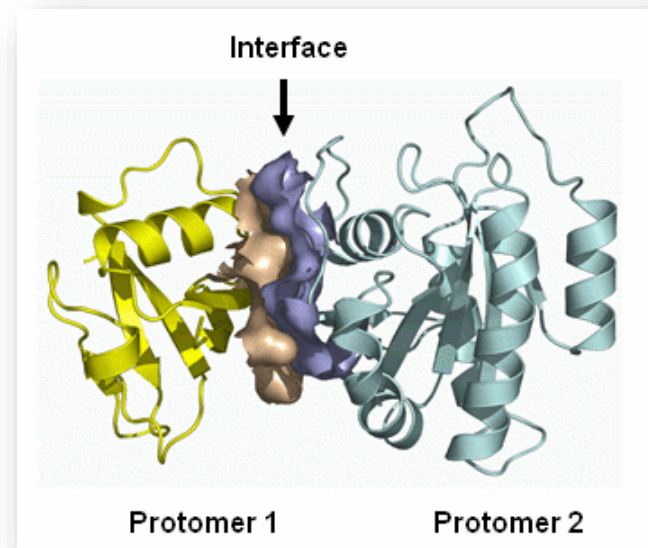
W. Wolfson, *Chem. Biol.* 16 (2009) 910.

H. Zhang et al, *Retrovirology* 8 (2011) 28.

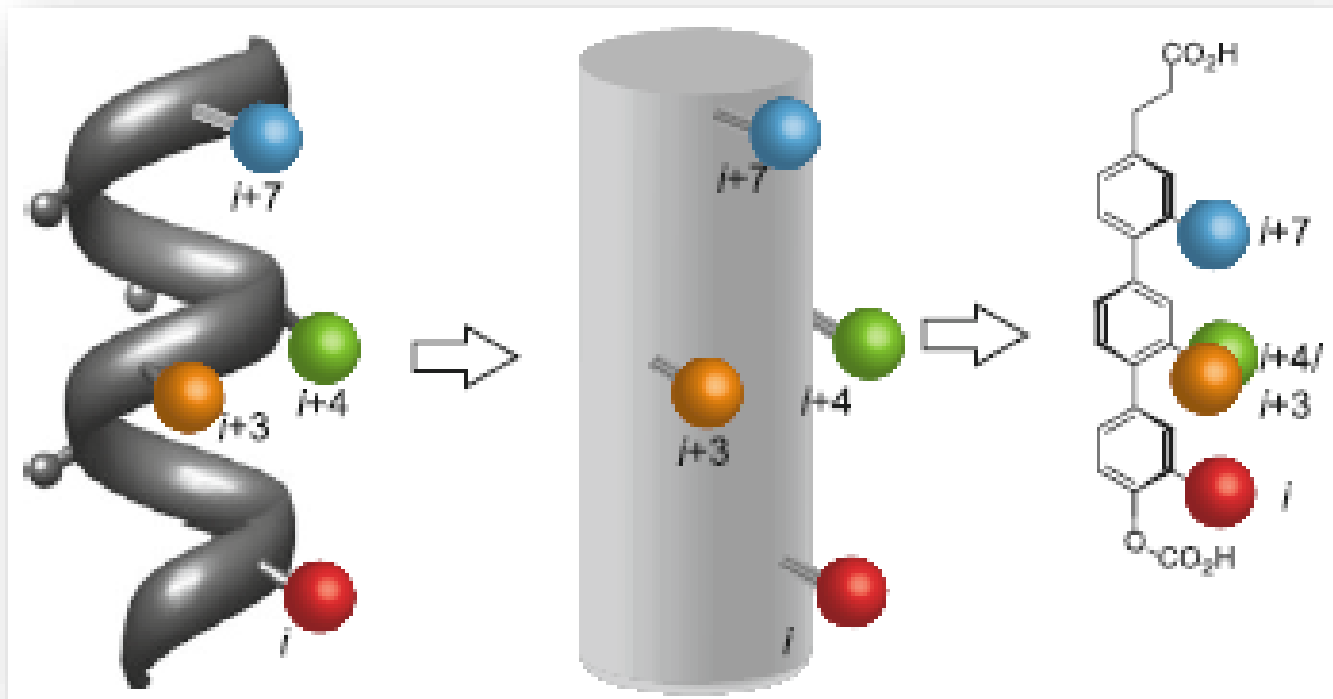
Verdine, G. *American Chemical Society's (ACS) National Meeting & Exposition, Anaheim, California, 2011.*



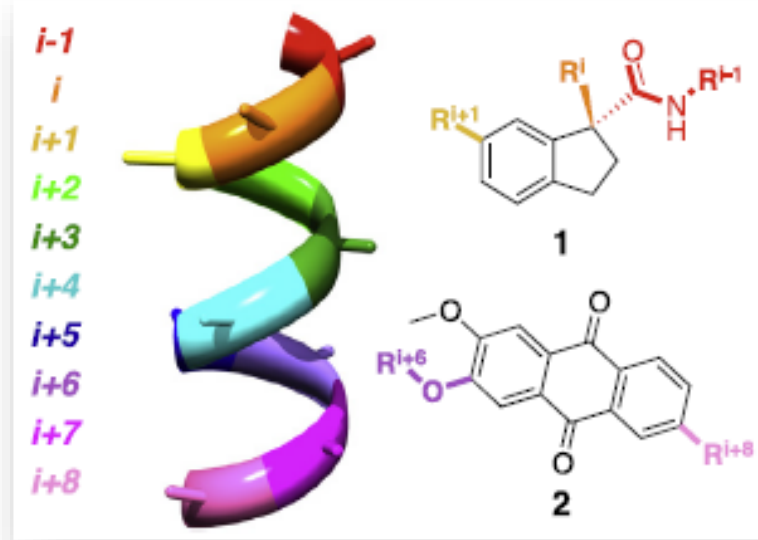
- Protein-protein interakcije (PPI) imaju ključnu ulogu u različitim biološkim procesima (proliferacija, rast i diferencijacija, apoptoza).
- Poremećaji u PPI dovode do bolesti (HIV, karcinom, dijabetes i neurodegenerativne bolesti).
- Izniman biokemijski i medicinski značaj uloge α -uzvojnica u protein-protein, protein-nukleinska kiselina i protein-lipid interakcijama potaknuo je istraživanja malih nepeptidnih molekula i molekularnih kalupa koji oponašaju α -uzvojnica.
- Mimikrija proteinskih α -heličnih domena predstavlja uspješnu strategiju za razvoj sintetskih modulatora PPI. Motiv α -uzvojnice je najčešći element sekundarne strukture prisutan na površini i u unutrašnjosti proteina, te je uključen u interakcije s drugim molekulama. Aminokiselinski bočni ogranci raspoređuju se u tri odvojene regije, čineći tako tri moguća pristupa za molekularno prepoznavanje.



- Bočni ogranci strše van uzvojnice i definiraju njezinu površinu, zbog čega njihova orijentacija utječe na interakciju uzvojnice s drugim makromolekulama i ligandima.
- Bočni ogranci na pozicijama i , $i+4$ i $i+7$ pozicionirani su na istoj strani uzvojnice. S obzirom da se PPIs uglavnom opažaju na jednoj strani uzvojnice, mimikrija segmenta proteinske strukture koji sadrži spomenute hot-spot ostatke došla je u fokus istraživanja. Drugim riječima, mimikrija topografije α -uzvojnice omogućava dizajn inhibitora PPI. Topografski mimetici su posebno zanimljivi jer mogu biti sintetski skrojeni tako da unaprijede poželjna svojstva poput specifičnosti, afiniteta, metaboličke stabilnosti i topljivosti.

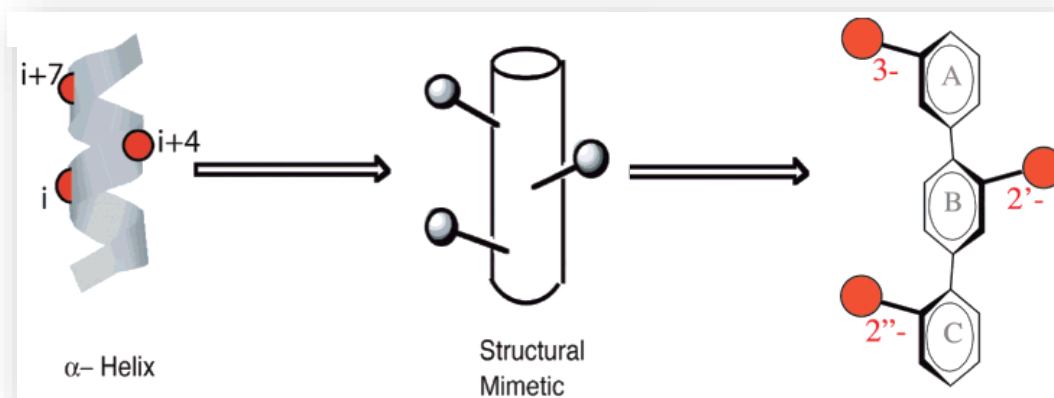


- S 1,6-disupstituiranim i 1,1,6-trisupstituiranim indanima započela su istraživanja malih molekula i molekulskih kalupa kao mimetika α -uzvojnice.
- 1,1,6-Trisupstituirani indan **1** dizajniran je da oponaša $i-1$, i i $i+1$ ostatke α -uzvojnice s ciljem mimikrije prirodnog neuropeptida neurokinina koji kontrolira kontrakcije glatkih mišića kardiovaskularnog i urinarnog sustava. Mimetik je pokazao selektivnost prema receptorima prirodnog analoga.

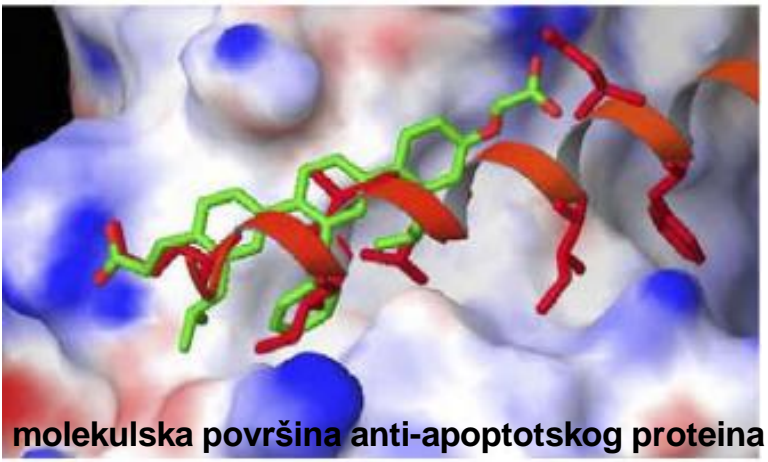
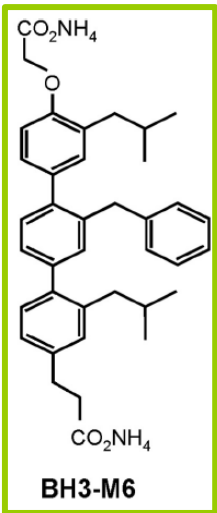


- Antracenski kalup **2**, supstituiran na pozicijama 2 i 7, oponaša ostatke $i+6$ i $i+8$ iz uzvojnice. Kao inhibitor apoptotskog proteina Bim/Bcl-2 oponaša Asp67 i Ile65 iz Bim-uzvojnice.
- Sintetizirani su terfenilni mimetici α -uzvojnice dizajnirani tako da fenilni supstituenti oponašaju ostatke i , $i+3$ ili $i+4$ te $i+7$, dok

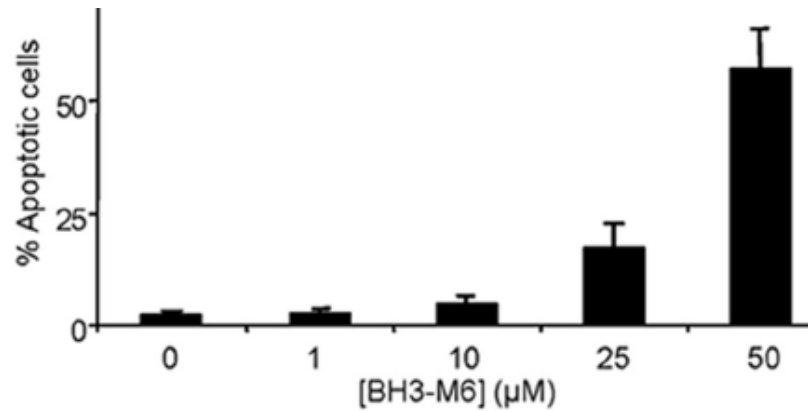
terfenilni kalup zauzima isti prostor kao i helična okosnica. Pokazali su se inhibitorima p53/Mdm2 interakcije (Mdm2 onkogeni protein je stanični antagonist tumor-supresorskog proteina p53).



- Stanice raka preživljavaju izbjegavanjem apoptoze, uslijed prekomjerne izloženosti anti-apoptotskim proteinima (Bcl-2, Bcl-X_L i Mcl-1) koji se vezuju na **BH3 α -heličnu domenu** iz pro-apoptotskih proteina (Bax, Bak, Bad i Bim) čime inhibiraju njihovu aktivnost.
- Dizajnirani su **BH3-M6 mimetici α -uzvojnice iz BH3** koji se vezuju na anti-apoptotske proteine, čime sprječavaju njihovo vezivanje na proapoptotske Bak- i Bim-BH3 proteine.



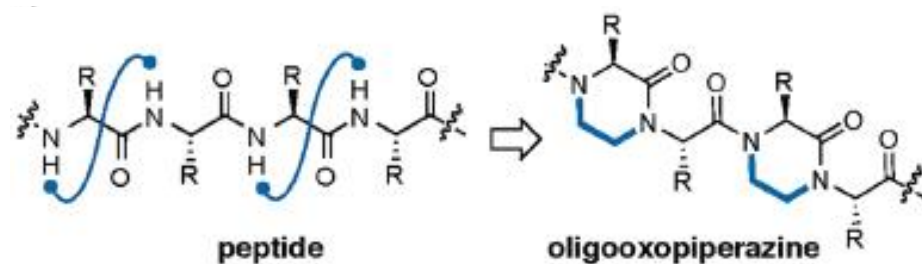
- Dakle, **BH3-M6** inhibira vezivanje **α -uzvojnice iz BH3** na anti-apoptotske proteine.



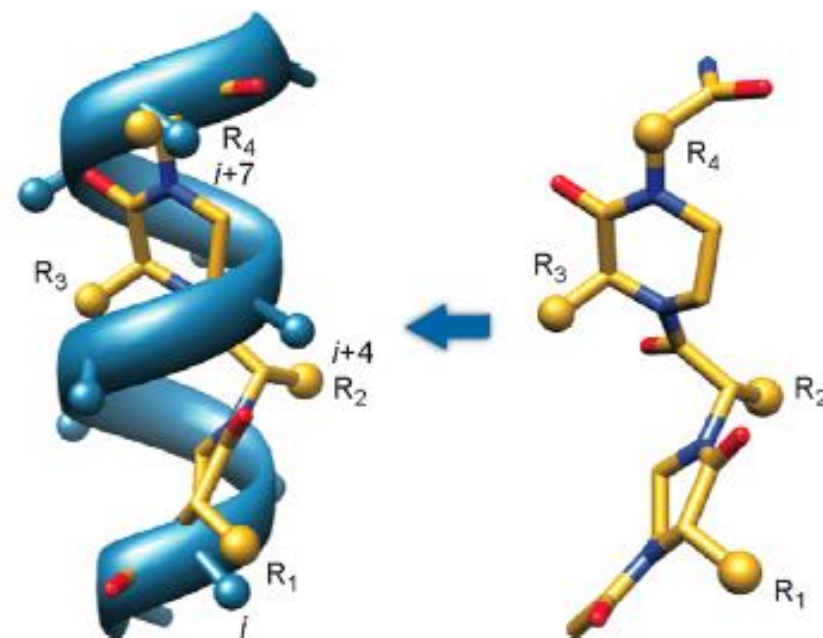
- Nedostatak aromatskih mimetika uzvojnice ogleda se u nemogućnosti razlikovanja kiralnih proteinskih veznih mjesta. Za razliku od terfenila koji se odlikuju aksijalnom kiralnošću, većina aromatskih mimetika uzvojnice ne sadrži kiralnu okosnicu. Taj se nedostatak može prevladati dizajnom topografskih mimetika načinjenih iz aminokiselinske okosnice na koju su vezani prirodni i neprirodni bočni ogranci.



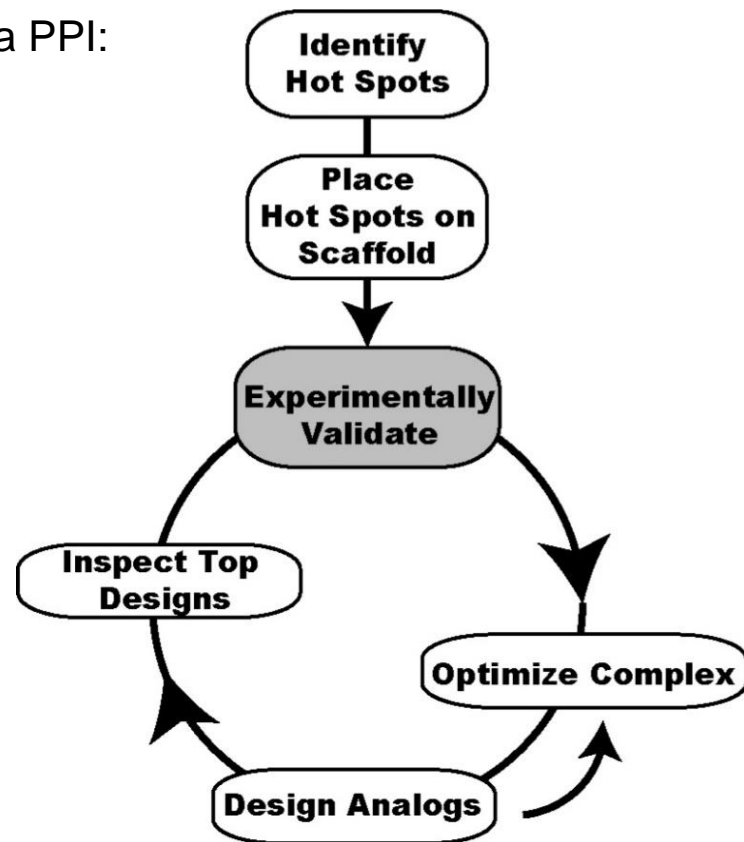
- Optimalna konformacija potrebna za mimikriju heličnih bočnih ogranaka podrazumijeva prstenastu geometriju oksopiperazinskog dimera, čija je prednost prisutnost kiralne okosnice. Osim toga, oksopiperazini se dugi niz godina primjenjuju u medicinskim istraživanjima.



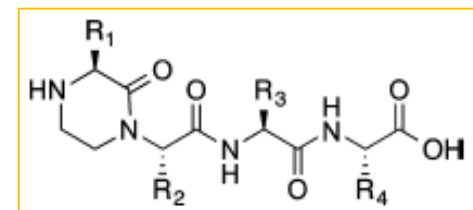
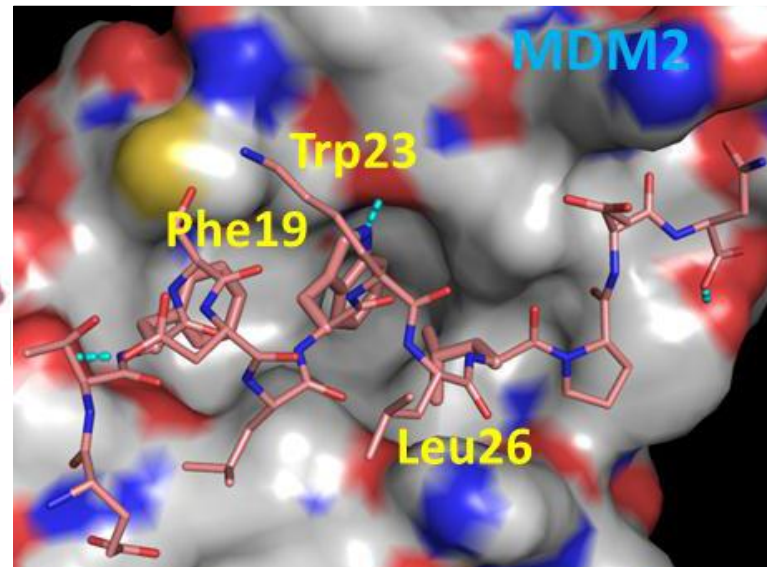
- Oksopiperazinski mimetici uzvojnice (OHM, engl. *Oxopiperazine Helix Mimetic*) dizajnirani su tako da inhibiraju PPI oponašajući helične proteinske receptore.



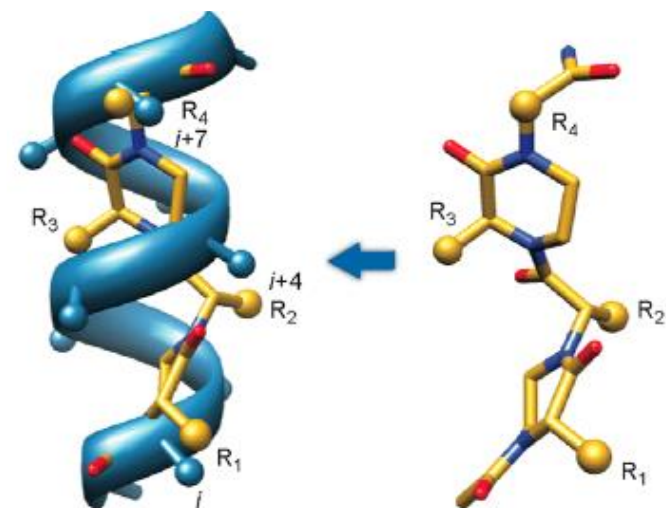
- Dizajn peptidomimetika predstavlja proces predviđanja aminokiselinske sekvencije koja će se nabrati u željenu strukturu i ostvariti željenu funkcionalnost.
- Ključni koraci u dizajnu molekularnih kalupa kao inhibitora PPI:
 - ✓ ala-scan radi identifikacije hot-spots odn. aminokiselinskih ostataka uključenih u PPI,
 - ✓ mimikrija odn. prijenos tako identificiranih hot-spots na kalup,
 - ✓ optimizacija konformacije kompleksa ligand-protein i dizajn analoga hot-spotova,
 - ✓ najpotentnijim kandidatima za inhibitore PPI određuje se afinitet vezanja za ciljane proteinske površine,
 - ✓ eksperimentalna validacija.



- Tumor-supresorski (sprječava tvorbu karcinoma) **protein p53** igra krucijalnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima, a njegova je mutacija detektirana u ~ 50% karcinoma. Onkogeni protein Mdm2 ima ulogu antagonista proteina p53. Tvorba **p53/Mdm2** kompleksa regulira ravnotežu između rasta stanice i zastoja staničnog ciklusa. Stoga je nužno razviti inhibitore interakcije **p53/Mdm2** (PPI).



- p53 sa svoja tri hidrofobna ostatka: Phe19, Trp23 i Leu26 (FWL) ostvaruje ključne kontakte s Mdm2. Stoga je 1. korak u dizajnu oksopiperazinskih kalupa inhibitora PPI modeliranje tih ostataka na kalupu. Oksopiperazinski dimer ima na raspolaganju 4 aminokiselinska ostatka, od kojih se 3 (R_1 , R_2 i R_4) preklapaju s bočnim ograncima ostataka i , $i+4$ i $i+7$ iz α -uzvojnice. Znači, ostatak R_3 iz kalupa, za kojeg je utvrđeno da ne sudjeluje u kontaktu s receptorom, dostupan je za smještaj topljivih skupina ili malih bočnih ogranka koji nisu kemijski reaktivni.



- Dizajnirani su OHM 1-4 u kojima je očuvana sekvencija iz p53 veznog džepa u Mdm2 (FWL), te sadrže hidrofobne, anionske ili kationske ostatke na poziciji R₃. Takvi nepeptidni ligandi zauzimaju p53 vezni džep u Mdm2, pri čemu Leu i Phe na toj R₃-poziciji najviše doprinose afinitetu mimetika za vezno mjesto Mdm2.



mimetic	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	K _d (μM) ^a
1	Phe	Trp	Ala	Leu	OH	65 ± 8
2	Phe	Trp	Lys	Leu	OH	≥200
3	Phe	Trp	Leu	Leu	OH	7.9 ± 0.5
4	Phe	Trp	Phe	Leu	OH	6.9 ± 1.3

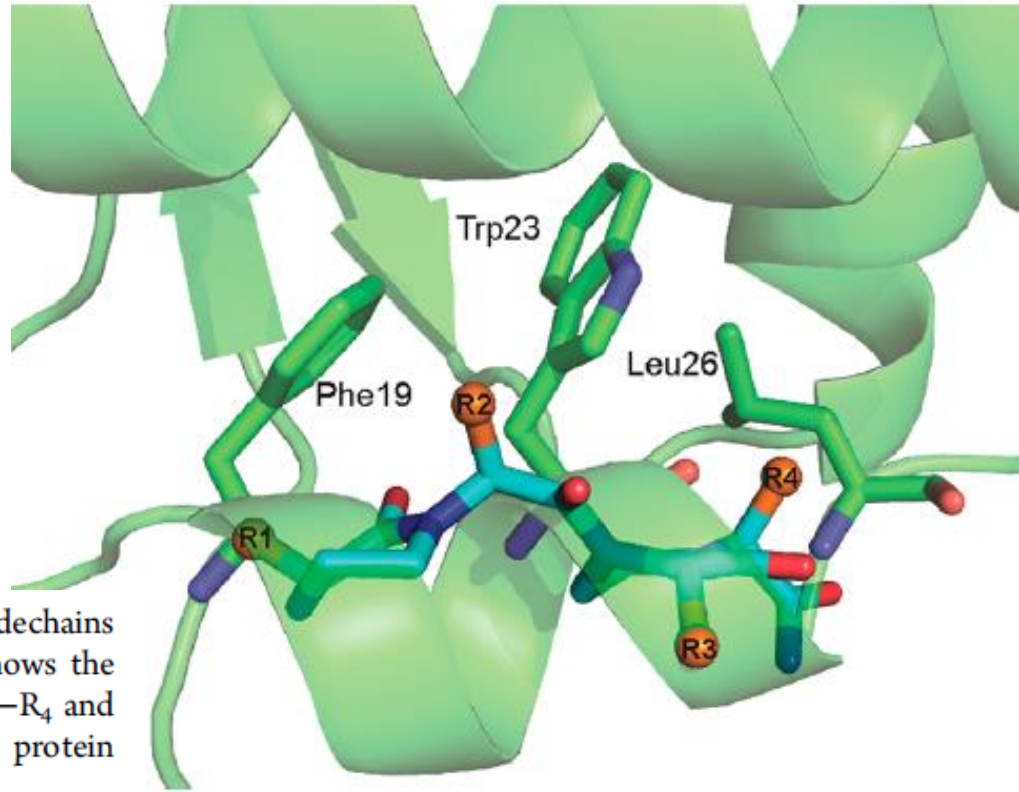
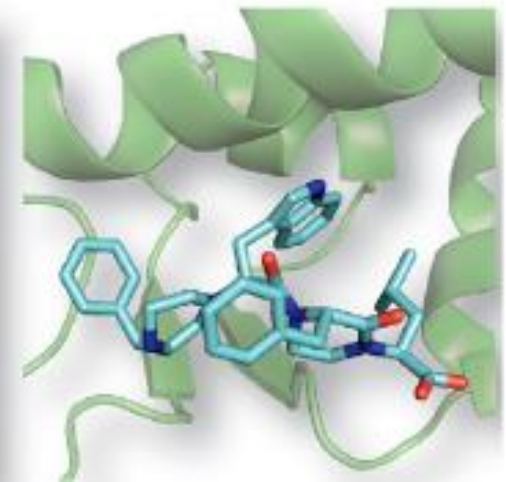
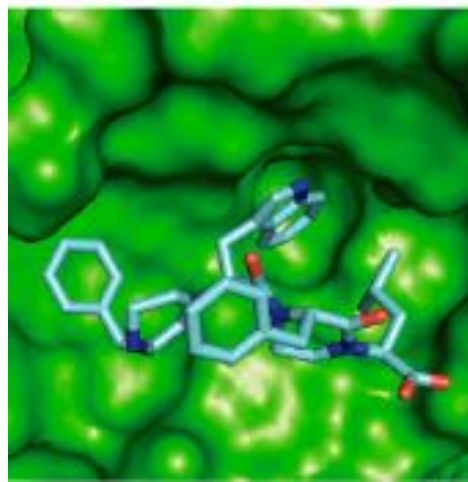
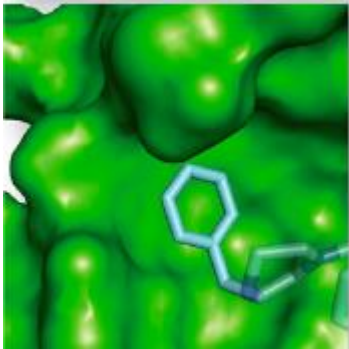


Figure 4. Docking of the oxopiperazine scaffold (cyan) with sidechains shown in orange in p53 binding pocket of Mdm2. Figure shows the relative positioning of the oxopiperazine dimer side chains R₁–R₄ and p53 hotspot residues Phe19, Trp23, and Leu26 within the protein pocket.

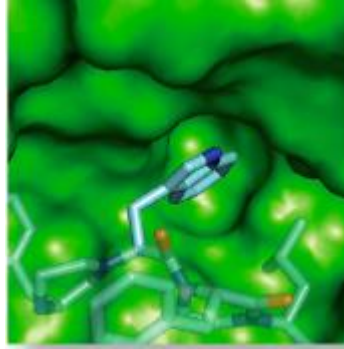
- Spoj **4**, koji pokazuje najveći afinitet za Mdm2, ostvaruje nekoliko energetski povoljnih interakcija s Mdm2 zahvaljujući oponašanju p53-hotspot-ostataka. Njegovi R₁, R₂ i R₄-ostatci sudjeluju u interakciji s Mdm2-veznim mjestom:



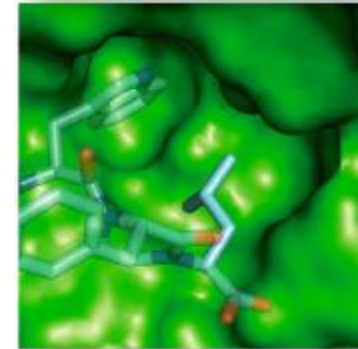
Konformacija mimetika **4** u veznom džepu Mdm2.



R₁ ostatak (Phe) u interakciji s ostacima Ile61, Met62 i Tyr67 iz Mdm-džepa.



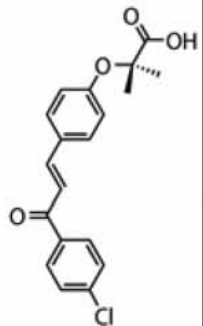
R₂ ostatak (Trp) u interakciji s ostacima Leu54, Leu57, Gly58, Ile61, Phe86 iz Mdm-džepa.



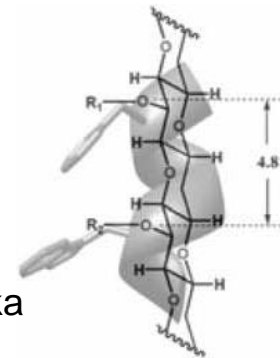
R₄ ostatak (Leu) u interakciji s ostacima Leu54, Val93, His96, Ile99 i Ile103 iz Mdm-džepa.

- Konačni je zaključak da oksopiperazinski kalup iz mimetika **4** zauzima isti Mdm-džep kao i hot-spots iz p53-uzvojnice čime je inhibirana interakcija tumor-supresorskog proteina s njegovim antagonistom Mdm2-proteinom.

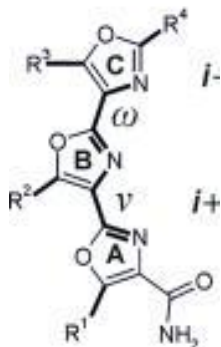
Benzilidenacetofenonski
mimetiци α -uzvojnice
zauzimaju istegnutu
konformaciju na veznim
proteinskim površinama.



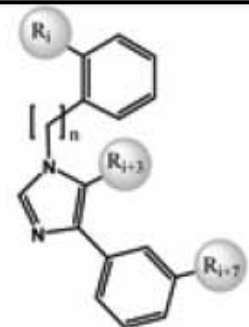
Trans-policiklički eteri:
udaljenost između
kisikovih atoma
(4,8 Å) gotovo je
identična intervalu
između i i $i+4$ ostataka
 α -uzvojnice (5Å).



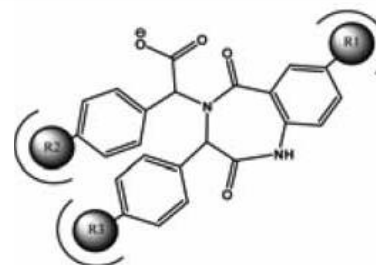
Polarni teroksazolni
kalupi oponašaju i ,
 $i+3$ i $i+7$ položaje α -
uzvojnice.



Trisupstituirani
imidazoli oponašaju i ,
 $i+3$ i $i+7$ položaje
 α -uzvojnice.



1,4-Benzodiazepin-2,5-dioni
oponašaju bočne ogranke
 α -uzvojnice.



C. G. Cummings et al *Current Opinion in Chemical Biology* 14 (2010) 341.

J. M. Davis et al, *Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 326.

D. C. Horwell et al, *Tetrahedron* 51 (1995) 203.

D. C. Horwell et al, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4 (1994) 2825.

D. C. Horwell, et al, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996) 33.

O. Kutzki et al, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 11838.

H. Yin et al, *Angew. Chem., Int. Ed.* 44 (2005) 4130.

Hang Y. et al, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 10191.

R. Stoll et al, *Biochemistry* 40 (2001) 336.

H. Oguri et al, *Tetrahedron Lett.* 46 (2005) 2179.

M. D. Cummings et al., *Chem. Biol. Drug Design* 67 (2006) 201.

C. P. Gomes, et al, *Eur. J. Org. Chem.* 17 (2012) 3270.

Y.-X. Lu et al, *Chem. Commun.* 46 (2010) 9019.

A. Tošovská et al, *Org. Lett.* 12 (2010) 1588.

Peptidni mimetici i pseudopeptidi

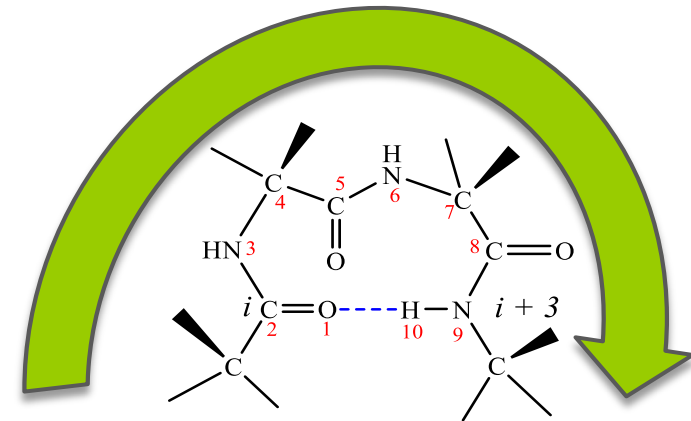
Mimeticici okreta i β -ploča

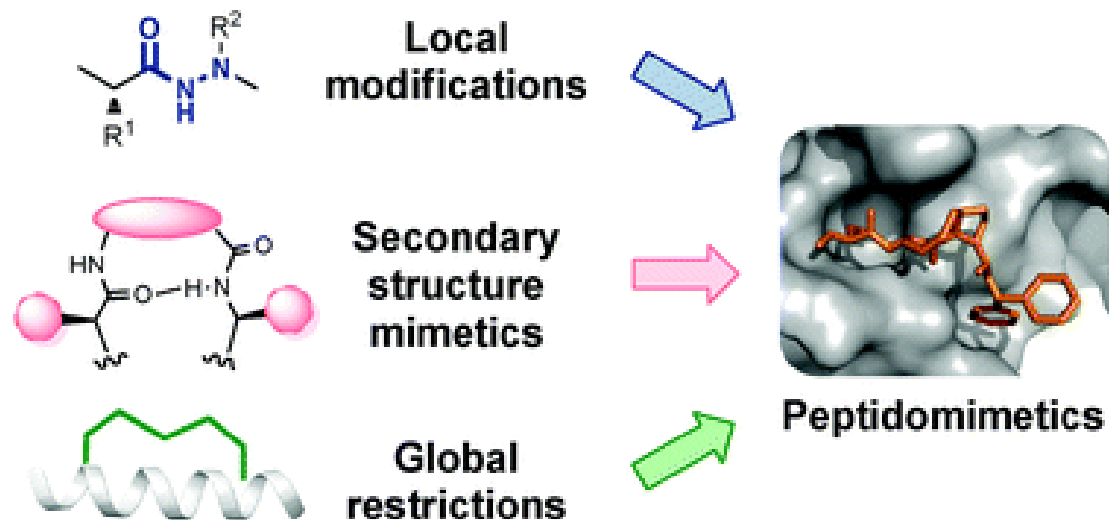
Prof. dr. sc. Lidija Barišić





- Protein-protein interakcije (PPI) imaju esencijalnu ulogu u brojnim biološkim procesima.
- Kontrolirano uplitanje u takve interakcije, koje predstavlja golem potencijal za razvoj novih terapeutika, suočava se s brojnim izazovima [dodirna površina uključena u specifično prepoznavanje obično je dosta velika (750-1500 Å) i plitka, vezne su regije često nepovezane zbog čega su sintetski peptidi uglavnom beskorisni, itd.].
- Proteinske sekundarne strukture esencijalne su za specifično prepoznavanje u PPI. Pri tom β -okreti imaju krucijalnu ulogu u mnogim biološkim prepoznavajućim sustavima (npr. u interakcijama hormona i njihovih receptora, antitijela i antigena), te postoji veliki interes za razvoj malih spregnutih mimetika β -okreta kao potentnih i selektivnih terapijskih agenasa.
- Okreti su mjesta na kojima peptidni lanac mijenja svoj smijer. Najčešće se opažaju na izloženim površinama proteina, te su stoga uključeni u molekulsko prepoznavanje.
- Okreti su stabilizirani intramolekulskim vodikovim vezama.
- U γ -okretima dolazi do tvorbe 7-članih prstenova, dok su u β -okretima prisutni 10-člani prstenovi.



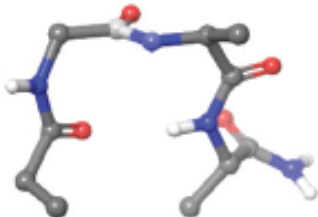
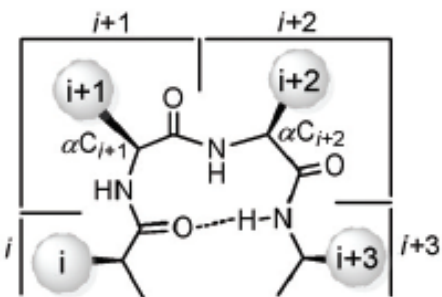


Key learning points

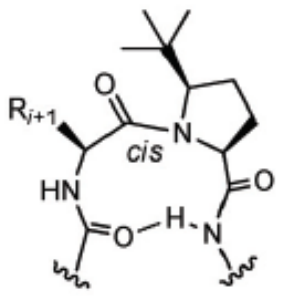
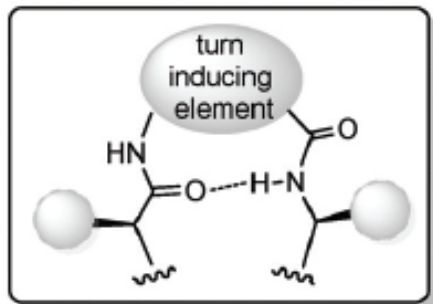
1. Advantages of peptidomimetics over peptides.
2. Definition and classification of peptidomimetics.
3. Synthetic strategies and molecules for local modifications, secondary structure mimetics, global restrictions.
4. Applications of peptidomimetics in drug discovery.

“This field is moving towards the development of high molecular weight peptidomimetic with a significant peptide character, although the development of small molecule peptidomimetics will likely remain timely, in line with the increasing interest to peptide research and development in both pharma and biotech taking advantage of multidisciplinary science and technology expanding peptide chemical and target spaces.”

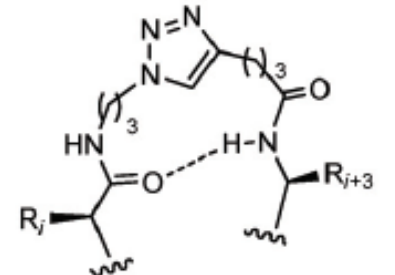
- Najčešća dva sintetska alata koja se koriste pri dizajnu mimetika okreta su:
 - ✓ Elementi koji induciraju tvorbu okreta (*turn inducing elements*)
 - ✓ Mali molekularni kalupi kao strukturni mimetici (*small molecular scaffolds as structural mimetics*).



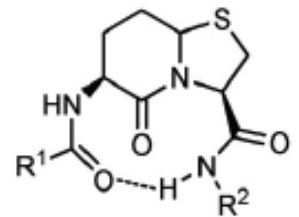
(a) turn inducing elements



t-butylproline as type VI β -turn inducer

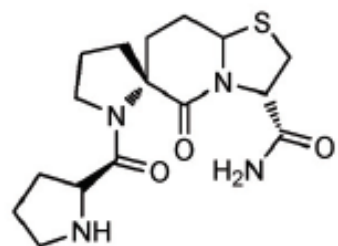
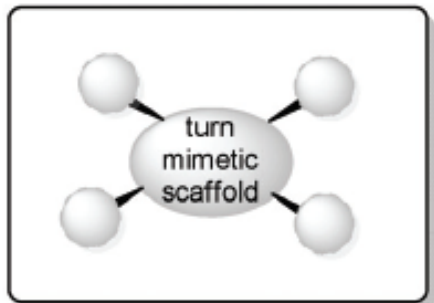


triazole ring (and triethylene moiety) as Pro-Gly isostere and turn inducer

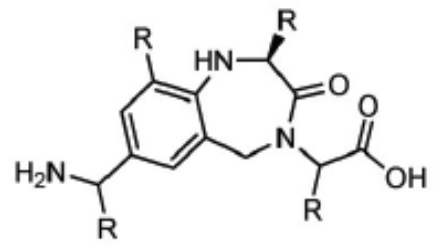


thiazolidino-2-piperazinone as D-Ala-L-Pro isostere and type II' β -turn inducer in Gramidicin S

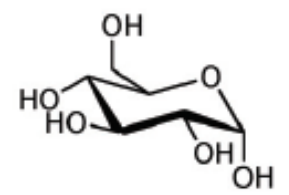
(b) turn mimetic scaffolds



[5.6.5]spiro-bicyclic lactam as Pro-Leu-Gly and β -turn mimetic



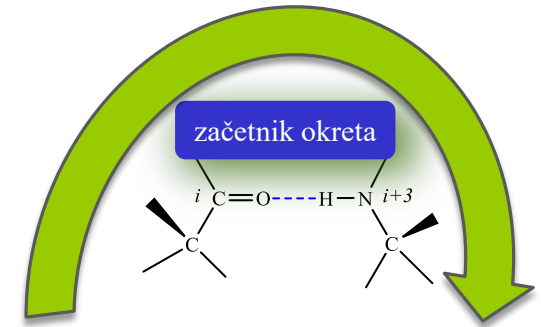
benzodiazepine as β -turn mimetic scaffold



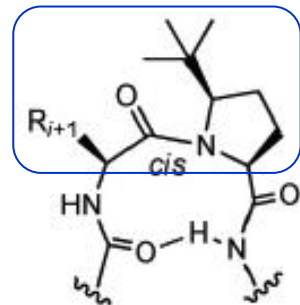
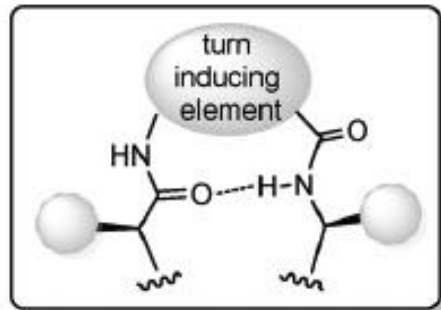
β -D-glucose as β -turn mimetic scaffold

Elementi koji induciraju tvorbu β -okreta (začetnici okreta)

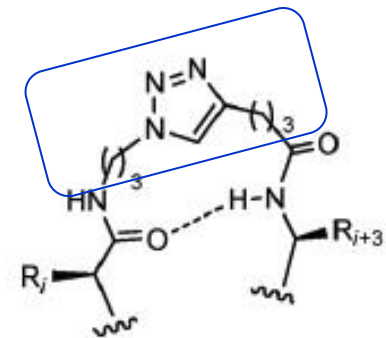
- Ovaj se pristup zasniva na zamjeni aminokiselinskih ostataka $i+1$ i/ili $i+2$ s pogodnim elementom koji može inducirati tvorbu okreta i reducirati konformacijsku slobodu pripadajuće sekvencije.
- U prirodnim β -okretima vrlo je visoka populacija prolinskih ostataka, pa se stoga analozi prolina (D-Pro, *t*-butilprolin) često koriste kao začetnici okreta.
- Nadalje, kao začetnici okreta primijenjuju se i α -aminoizobutirična kiselina, pipekolin- i morfolin-izvedeni heterociklički spojevi, triazolni prstenovi, spregnuti dipeptidni izosteri poput bicikličkih D-aminokiselina baziranih na prolinu, tiazolidino-2-piperidinonski kalupi, itd.



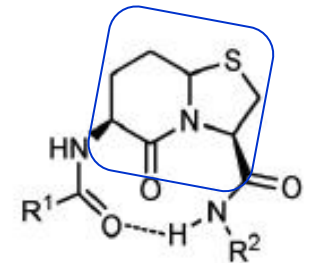
(a) turn inducing elements



t-butylproline as type VI β -turn inducer

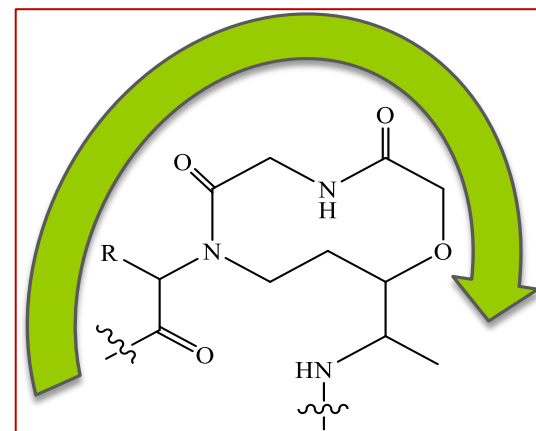
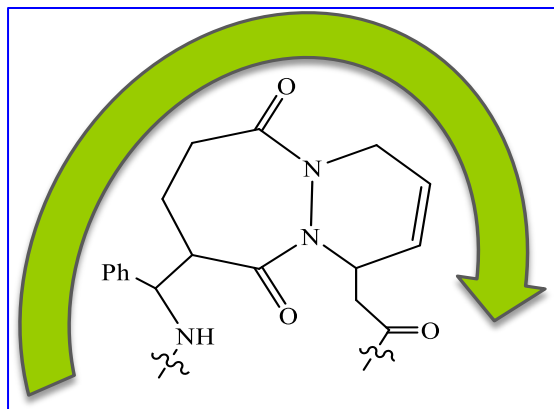
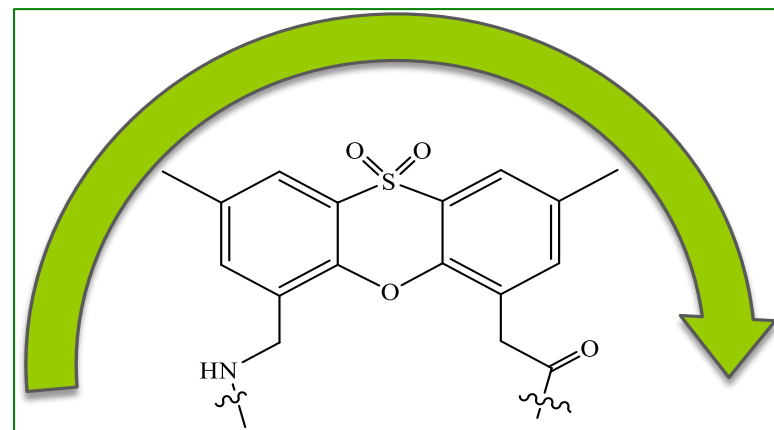
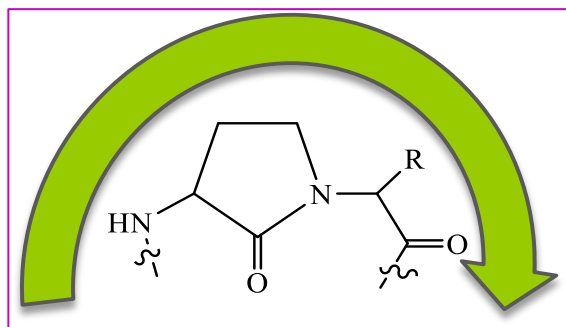


triazole ring (and triethylene moiety) as Pro-Gly isostere and turn inducer



thiazolidino-2-piperazinone as D-Ala-L-Pro isostere and type II' β -turn inducer in Gramidicin S

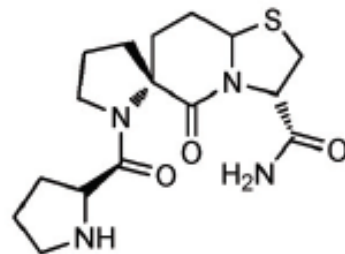
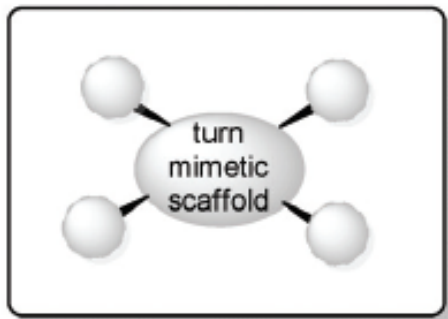
- Jedan od brojnih pristupa u dizajnu mimetika β -okreta s umetnutim začetnicima okreta temelji se na lokalnoj ciklizaciji peptidne okosnice, čime se smanjuje fleksibilnost peptida. Umetanjem cikličke β -laktamske "brave" umjesto ostataka $i+1$ i $i+2$, peptid se fiksira u *trans*-konformaciji koja pogoduje tvorbi vodikove veze. Rigidnu konformaciju moguće je postići kombinacijom kovalentne spojnice i ciklizacije, umetanjem amidne skupine ili etilenskog mosta te brojnim drugim pristupima pomoću kojih se ostaci i i $i+3$ dovode u neposrednu blizinu što je preduvjet za tvorbu vodikove veze $\text{NH}_{i+3} \cdots \text{OC}_i$.



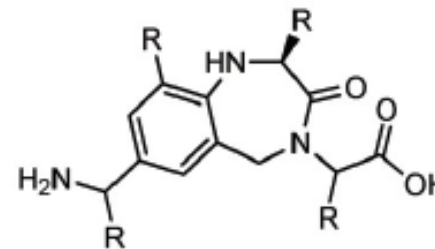
- Ovaj se pristup bazira na korištenju rigidnih kalupa koji zamjenjuju peptidnu okosnicu, a pri tom pozicioniraju bočne ogranke u prostorni raspored kakav nalazimo u regijama okreta iz prirodnih peptida. Takvi kalupi zadržavaju sličnost s središnjom dipeptidnom sekvencijom $i+1$ i $i+2$, ali ne sadrže amidne veze što ih čini puno stabilnijima, a ujedno i konformacijski spregnutima. Uobičajeno sadrže amino- i karbonilnu skupinu na suprotnim položajima u kalupu, koje su raspoložive za umetanje u peptid, a povezuju se istom vodikovom vezom kakva se nalazi u prirodnim okretima.
- Dizajn takvih molekularnih kalupa uključuju spirocikličke laktame (na slici prikazani spirociklički laktam oponaša sekvenciju Pro-Leu-Gly omogućujući tako modulaciju aktivnosti dopaminskog receptora), glukozu, makrociklizaciju, itd.



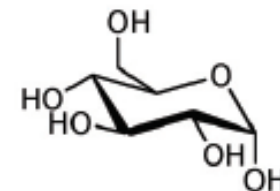
(b) turn mimetic scaffolds



[5.6.5]spiro-bicyclic lactam as Pro-Leu-Gly and β -turn mimetic

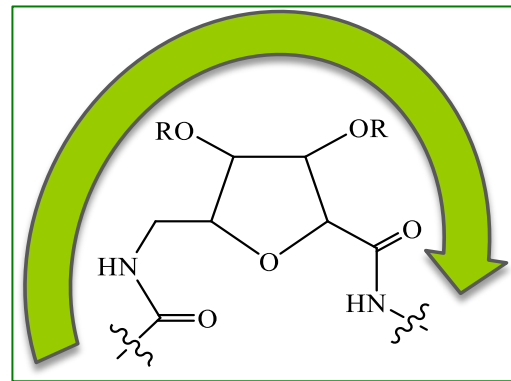
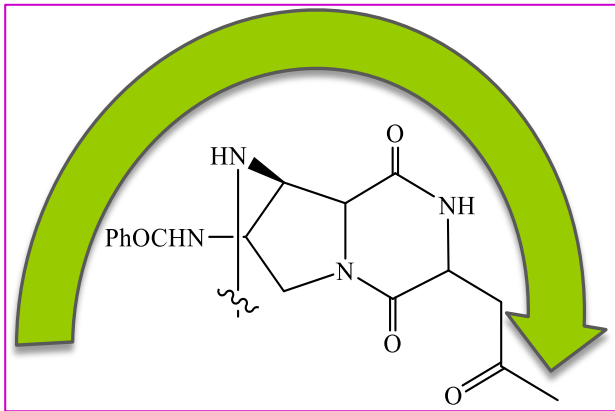
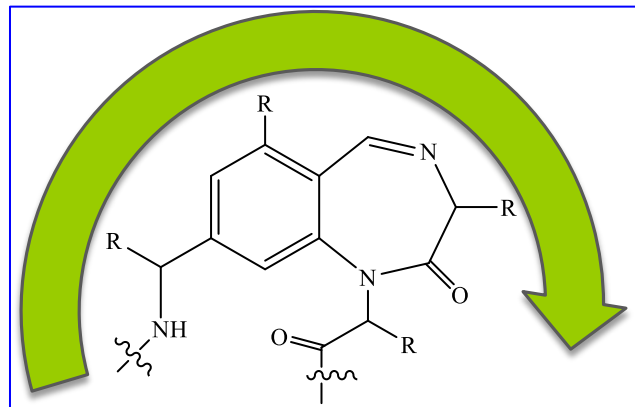
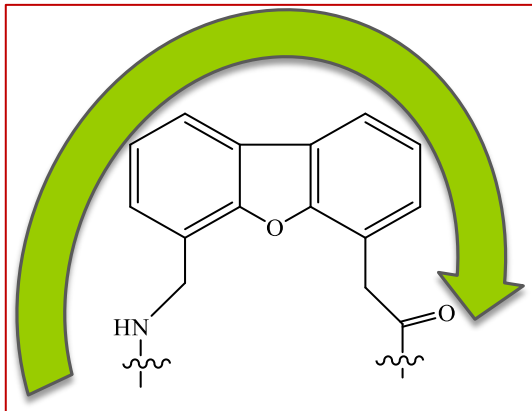


benzodiazepine as β -turn mimetic scaffold

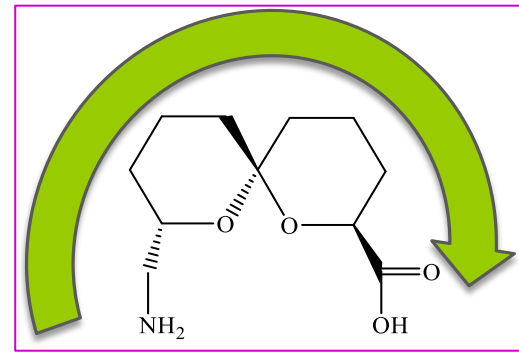
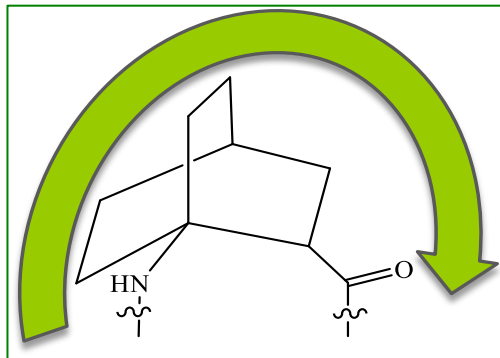


β -D-glucose as β -turn mimetic scaffold

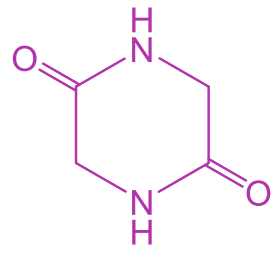
- Primjeri nepeptidnih kalupa s pomoću kojih se ograničava konformacijska fleksibilnost: funkcionalizirani dibenzofurani, benzodiazepini, diketopiperazini i šećeri.



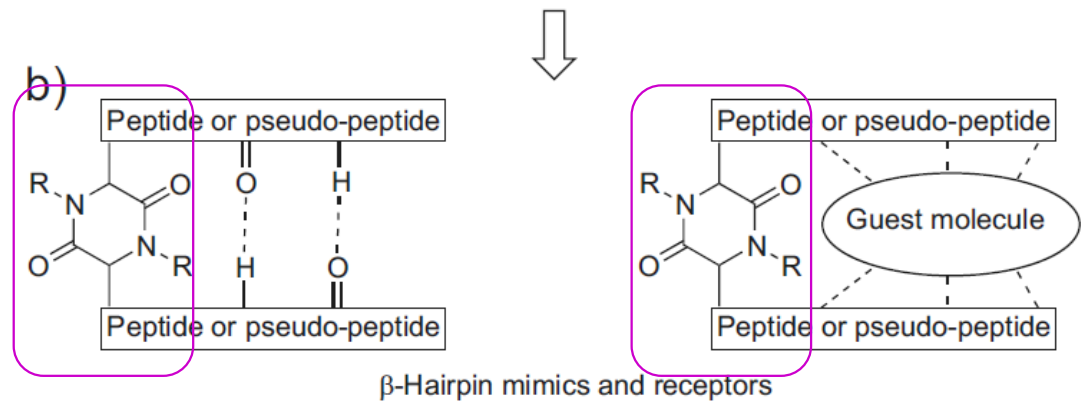
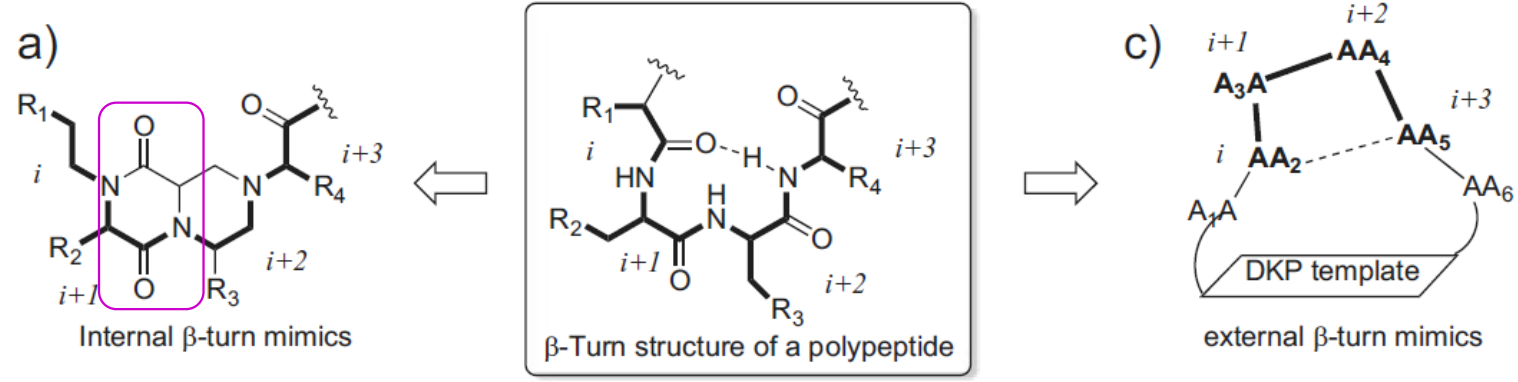
- Konformacijsku fleksibilnost moguće je ograničiti i premoščivanjem peptidne okosnice pomoću (S)-aminobiciklo-[2.2.2]-oktankarboksilne kiseline i 6,6-spiroketal-aminokiseline.



- **2,5-Diketopiperazini (DKPs)** su male heterocikličke molekule nastale ciklizacijom dviju aminokiselina. Zahvaljujući jednostavnoj sintezi te mogućoj prisutnosti čak šest funkcijskih skupina, DKP se istražuju kao mogući lijekovi i katalizatori. Prisutni su u mnogim prirodnim produktima.

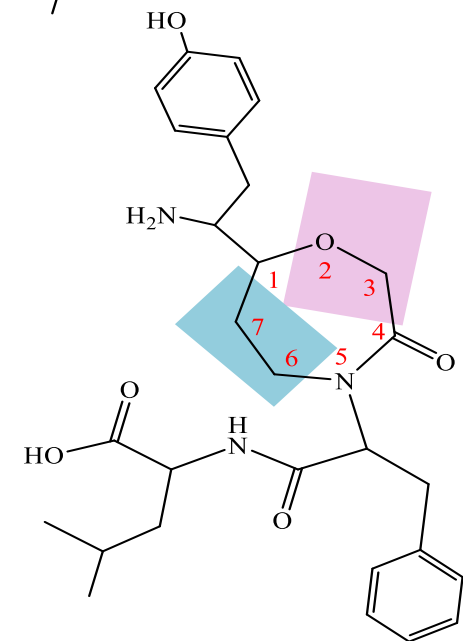
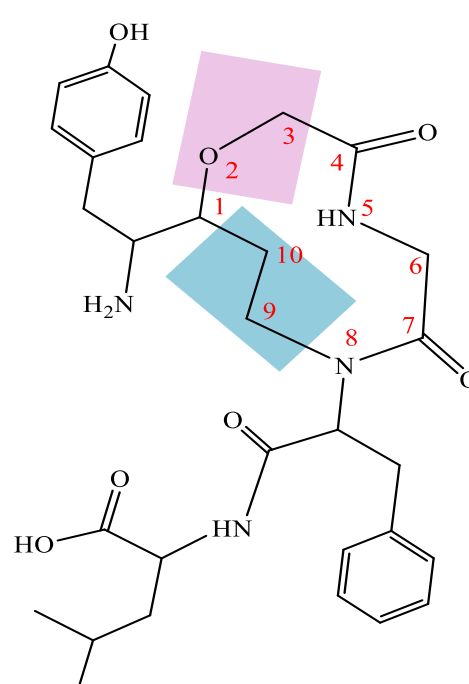
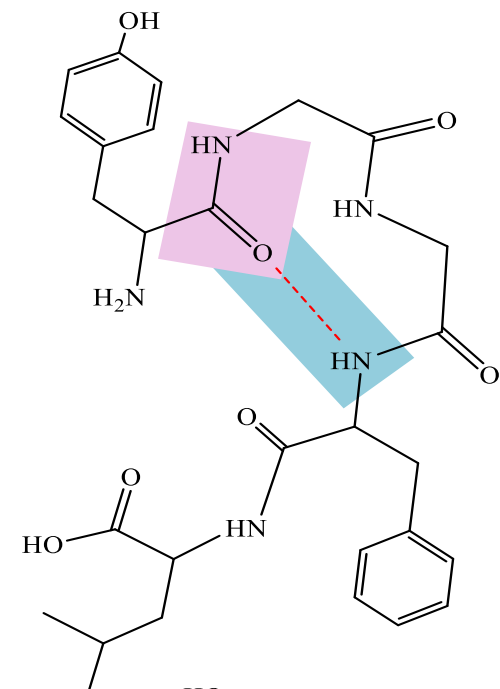


- Mimikrija β -okreta s pomoću DKP provodi se na tri načina: (a) unutarnji mimetik: DKP je dio rigidnog kostura koji oponaša strukturu β -okreta, (b) mimetik β -ukosnice: DKP je ugrađen u peptidni ili pseudopeptidni lanac u kojem inducira U-okret, (c) vanjski mimetik: DKP ima ulogu kalupa koji u cikličkim peptidima stabilizira strukturu β -okreta.



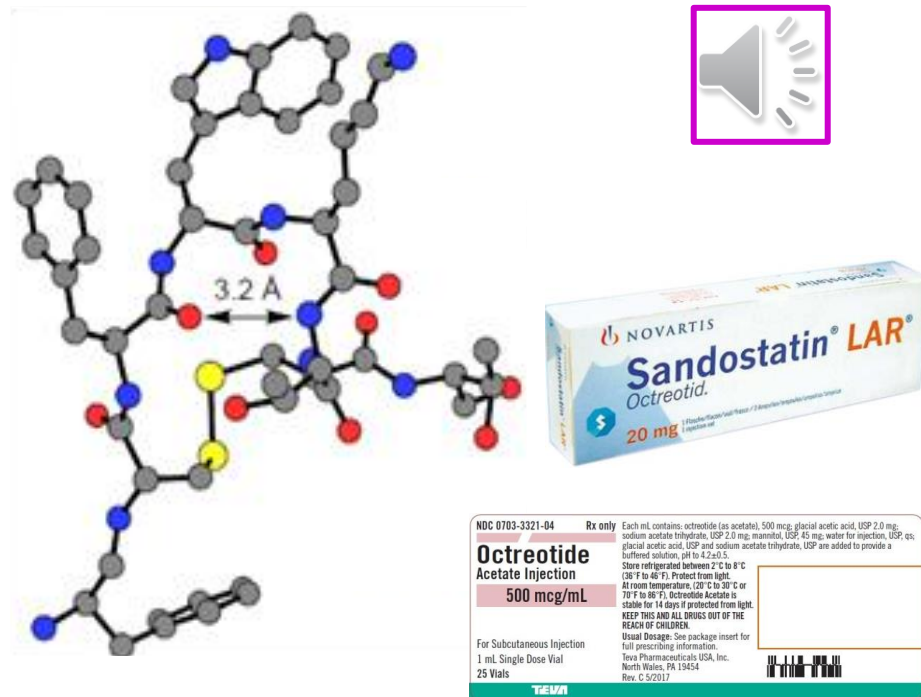
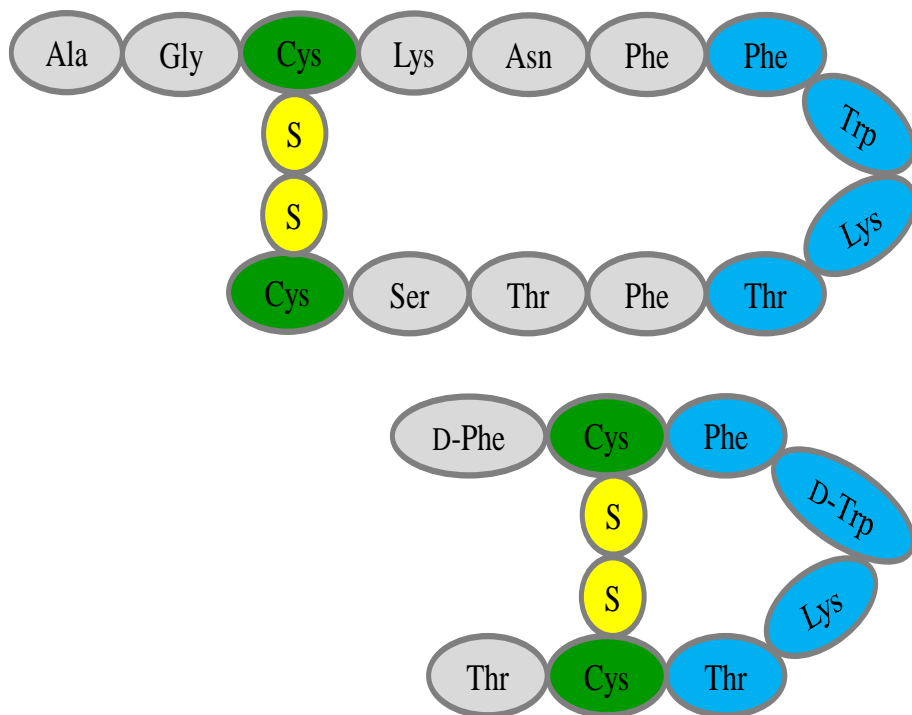
Mimetici β -okreta iz Leu-enkefalina

- Leu-enkefalin, endogeni opioidni peptid sekvencije Tyr–Gly–Gly–Phe–Leu djeluje kao agonist opijatnih receptora i odgovoran je za smanjenje intenziteta boli. Njegova je bioaktivna konformacija stabilizirana unutarmolekulskom vodikovom vezom $\text{NH}_{\text{Phe } i+3} \cdots \text{OC}_{\text{Tyr } i}$ koja tvori β -okret.
- Zamjenom dvaju glicinskih ostataka iz Leu-enkefalina s 10-članom cikličkom strukturom kao kalupom pripremljen je njegov mimetik prikazan na donjoj slici lijevo, dok je izostavljanjem dvaju glicinskih ostataka i uvođenjem 7-članog prstena pripremljen mimetik prikazan na donjoj slici desno. U oba je mimetika unutarmolekulska vodikova veza zamijenjena s **etilenskom premosnicom**, a istovremeno je amidna skupina između ostataka i te $i+1$ zamijenjena **eterskom izosternom skupinom** za koju se pokazalo da je kompatibilna s opioidnim receptorima.

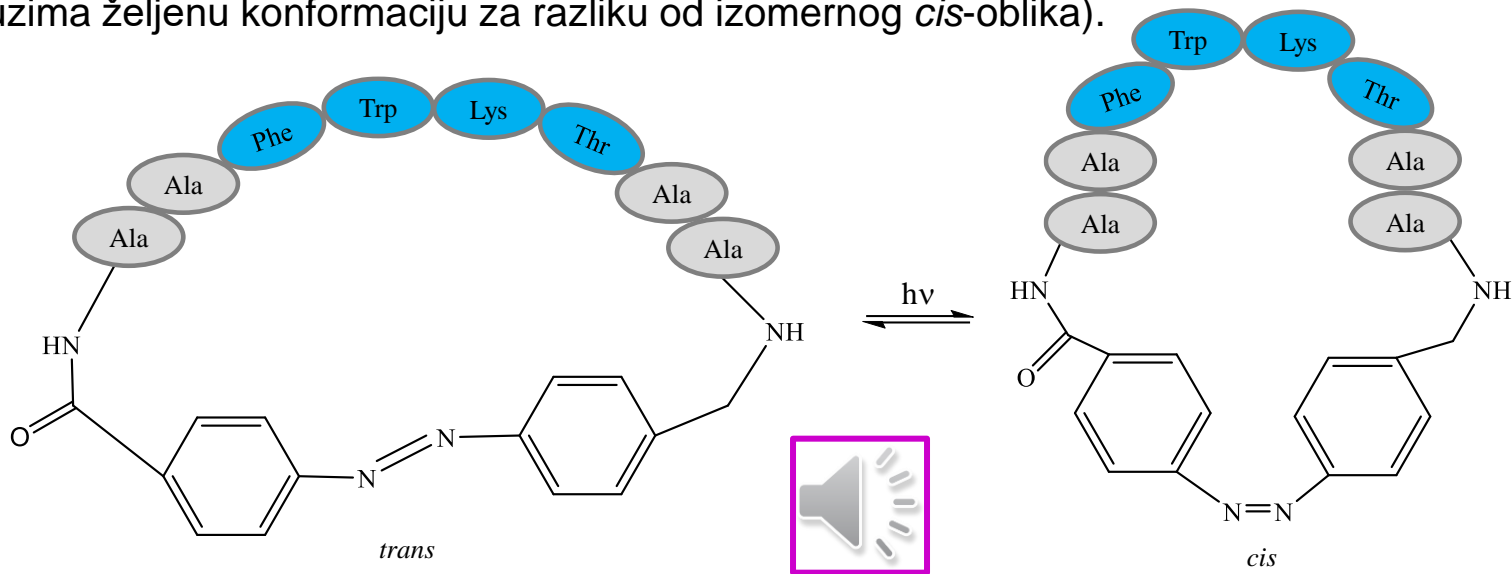


Mimetici β -okreta iz somatostatina

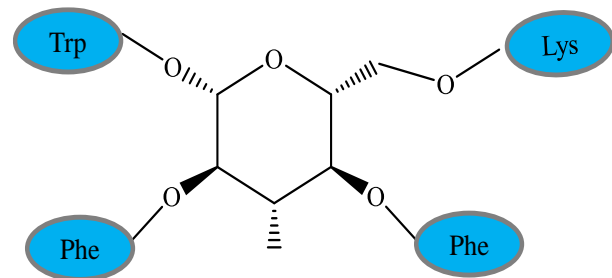
- Okreti su prepoznavajući elementi u reakcijama brojnih peptidnih hormona poput angiotenzina, bradikininina i somatostatina.
- Somatostatin, ciklički tetradekapeptid, je hormon koji sudjeluje u regulaciji lučenja hormona rasta i u regulaciji probavnog sustava. Njegova bioaktivna konformacija neophodna za vezivanje i prijenos signala sadržana je u tetrapeptidnoj sekvenciji Phe-Trp-Lys-Thr koja definira β -okret. Zamjenom L-Trp s D-Trp i skraćivanjem 14-članog peptidnog lanca somatostatina dobiven je 8-člani peptid oktretid, mimetik koji se pokazao učinkovitijim inhibitorom hormona rasta, glukagona i inzulina u odnosu na prirodni somatostatin.



- Opisan je i ciklički, svjetlom aktivirani mimetik β -okreta kao analog somatostatina. Umetanjem azobenzenskog kalupa nasuprot tetrapeptidne vezne regije Phe-Trp-Lys-Thr odgovorne za biološku aktivnost somatostatina induciran je β -okret u pripremljenom mimetiku i to zračenjem (*trans*-ciklopeptid ne zauzima željenu konformaciju za razliku od izomernog *cis*-oblika).

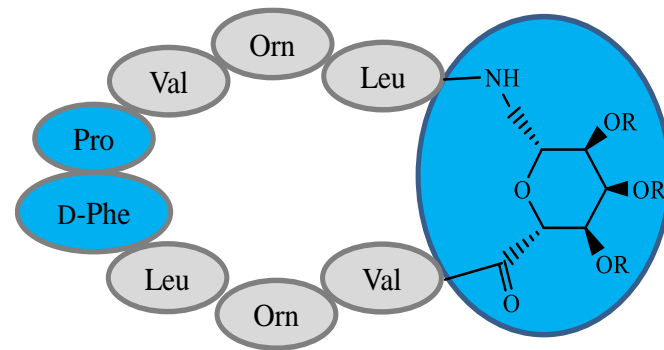
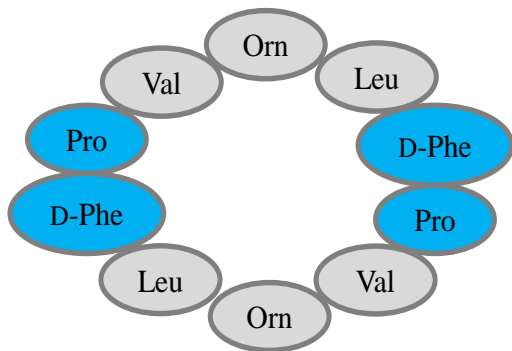


- β -D-glukoza pokazala se pogodnim kalupom za smještanje aminokiselinskih ostataka nađenih u regiji β -okreta u somatostatinu. Prednost glukoznog kalupa u odnosu na ostale mimetike jest mogućnost uvođenja bočnih aminokiselinskih ostataka reakcijama esterifikacije (radije nego tvorbom C–C veza). Nadalje, glukoza ima dobro definirana stereokemijska svojstva te je komercijalno dostupna. Mimetici β -okreta temeljeni na glukozi odlikuju se poboljšanim farmakokinetičkim profilom u odnosu na mimetike bazirane na drugim cikličkim kalupima.



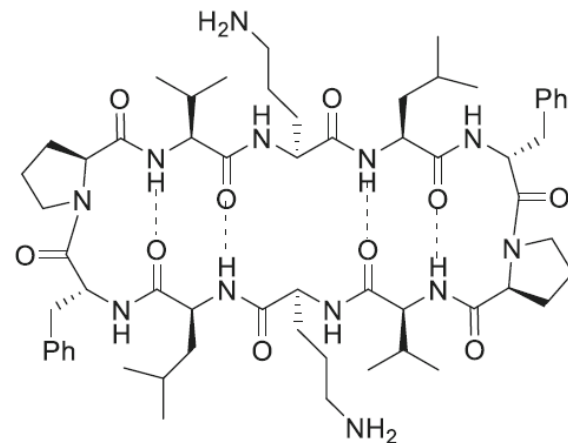
Mimetići β-okreta iz gramicidina

- Gramicidin S, ciklodekapeptid sekvencije [ciklo(Pro–D-Phe–Leu–Orn–Val)₂] s pomoću dvaju dipeptida –Pro–D-Phe– zauzima strukturu β-okreta, dok su dva tripeptida –Leu–Orn–Val– istegnuta u konformaciju β-ploče. Njegov je antimikrobni učinak posljedica tvorbe pora u vanjskoj membrani mikrobne stanice. Pri dizajnu i sintezi njegovih mimetika korištene su različite strategije: umetanje neprirodnih aminokiselina, modifikacija veličine prstena te modifikacija regija β-okreta i β-ploče. Zamjenom dipeptida –Pro–D-Phe– iz regije β-okreta sa šećernim kalupima pripravljeno je nekoliko mimetika koji su se pokazali manje toksičnima u odnosu na gramicidin S te su pokazali slabiju antimikrobnu aktivnost. Kao kalupi za indukciju okreta ispitivane su šećerne aminokiseline različitih veličina prstena, pri čemu je najbolja konformacijska i hidrofobna svojstva ostvario mimetik s piranoznim kalupom.



- Unatoč velikom terapeutskom potencijalu, svega je nekoliko kationskih antimikrobnih peptida (CAP, engl. *Cationic Antimicrobial Peptide*) u kliničkoj primjeni. Najčešći uzrok neuspjeha CAPs u kliničkim istraživanjima predstavlja tek prosječna aktivnost u odnosu na poznate lijekove kao i hemolitička aktivnost kojom ubijaju crvene krvne stanice.

- Gramicidin S (GS) jedan je od najproučavanijih CAPs. Aktivan je protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (MIC 3-11 μM !) te gljivica. Uzrokuje perturbaciju lipidnog dvosloja uslijed čega dolazi do tvorbe pora i curenja staničnog sadržaja te u konačnici i do smrti stanice.

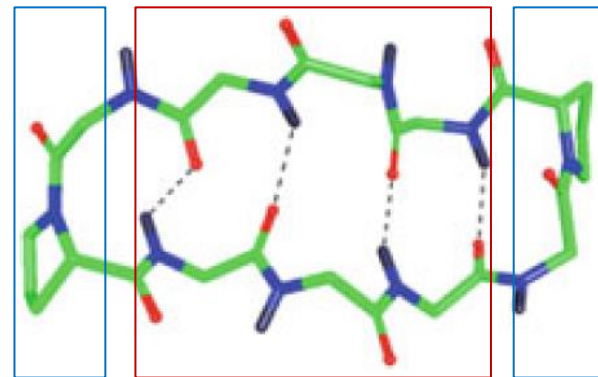


- Zadnjih 70-ak godina provedena su brojna istraživanja na razvijanju modificiranih verzija GS s povećanim potencijalom, smanjenom citotoksičnošću i unaprijeđenim terapijskim indeksom (terapijski indeks: pokazatelj sigurnosti lijeka koji se određuje kao omjer njegove toksične i terapijske doze).

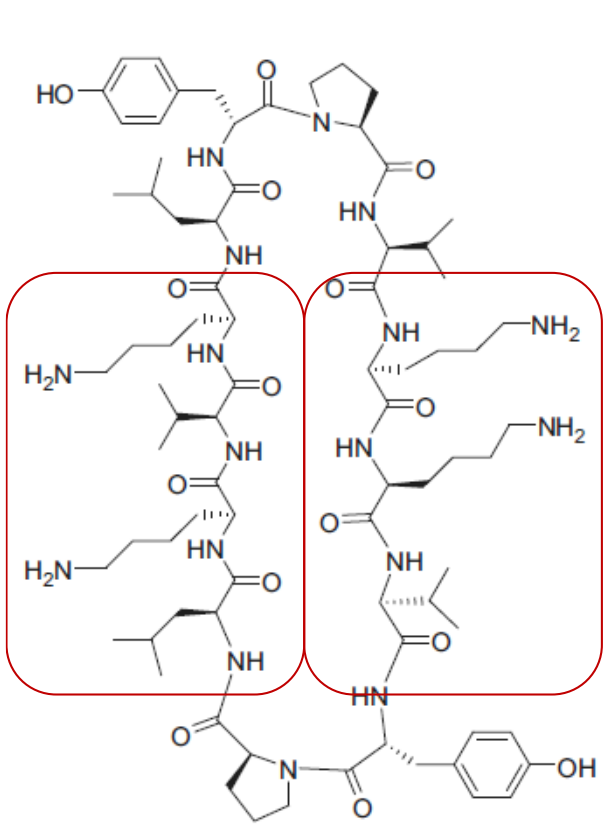
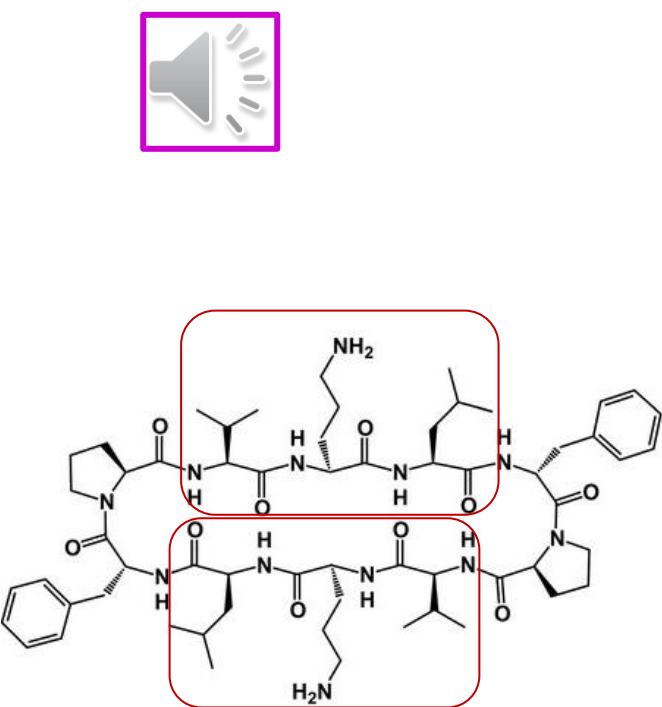
- C_2 -simetrična struktura cikličkog dekapeptida GS zauzima konformaciju β -nabrane ploče u kojoj su Val, Orn i Leu pozicionirani duž dviju antiparalelnih β -niti.



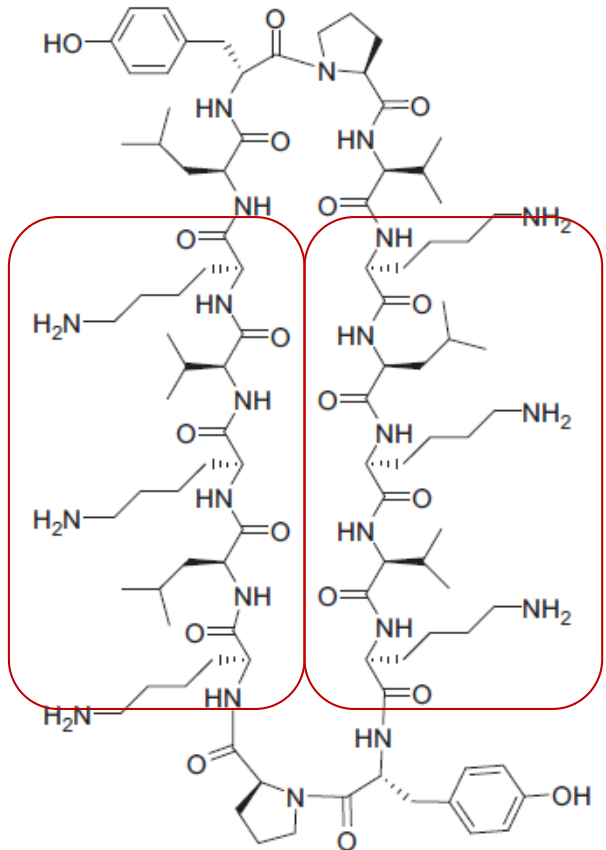
- D-Phe-D-Pro sekvencija zauzima konformaciju β -okreta, koji dvije β -niti postavljaju u antiparalelnu orijentaciju.



- Na temelju SAR-studija identificirane su karakteristike GS nužne za njegovu aktivnost: hidrofobnost, hidrofilitnost, veličina prstena, struktura β -ploče i geometrija β -okreta.
- Sintetizirani su i ispitani “produljeni” analozi GS-a, izgrađeni od 14 odnosno 16 aminokiselinskih ostataka (s povećanim udjelom hidrofилnih Lys-skupina).



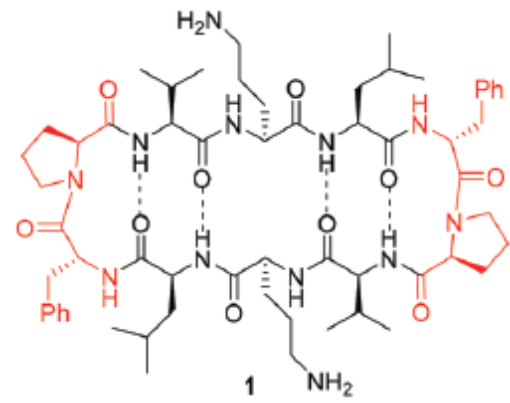
3i cyclo-(VK*KVdYP⁶LKVKLdYP¹⁴) GS14-L3



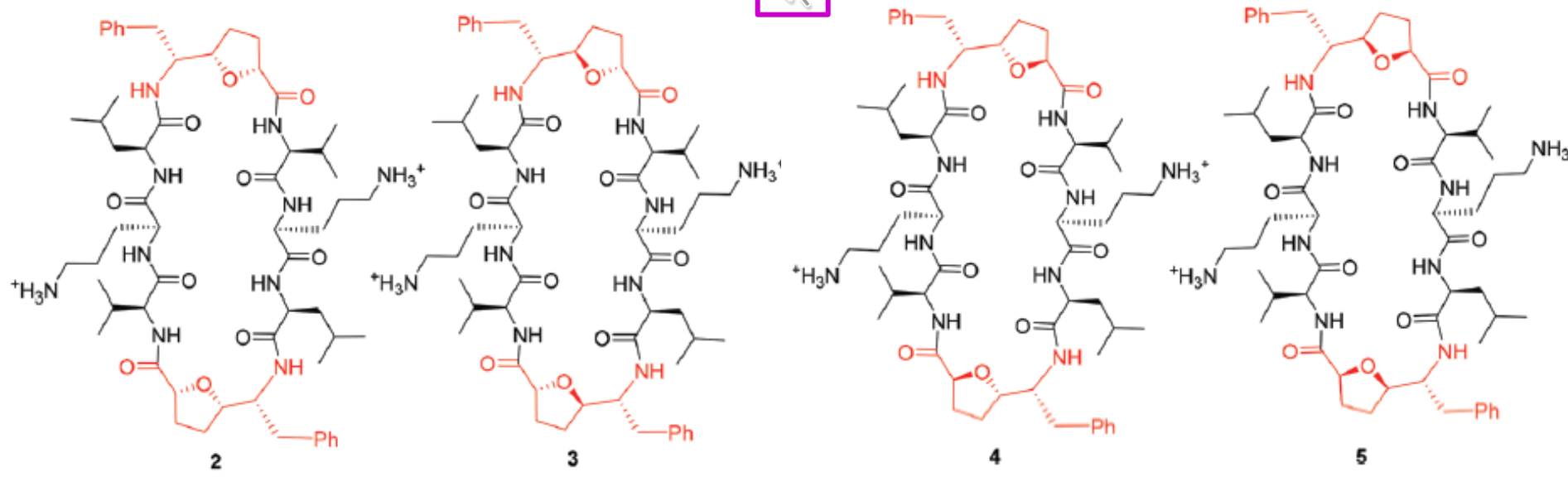
3j cyclo-(VKLVKdYP⁸KLKVKLdYP¹⁶) GS16

- Prikazani mimetici ostvarili su šest puta bolji terapijski indeks u odnosu na GS. Nadalje, pokazali su se i vrlo djelotvornima prema brojnim bakterijskim sojevima.

- Tuberkuloza je, nakon HIV-a, drugi vodeći uzročnik smrti u svijetu. Posebno je alarmantan podatak da 4% novih i 45% ranije tretiranih slučajeva pokazuje rezistenciju, s tim da su se ove brojke utrostručile u razdoblju 2009.-2013. Stoga je ispitan je mogući antituberkulozni učinak GS-mimetika.



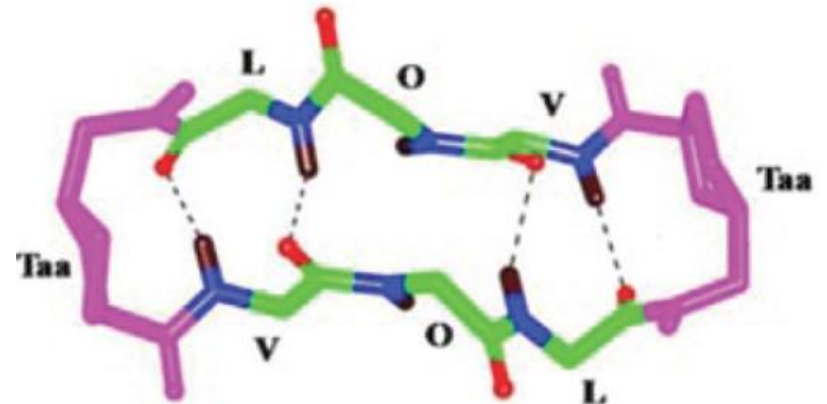
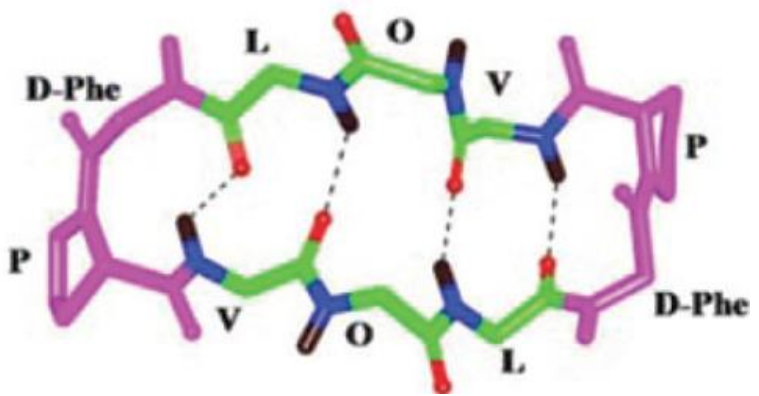
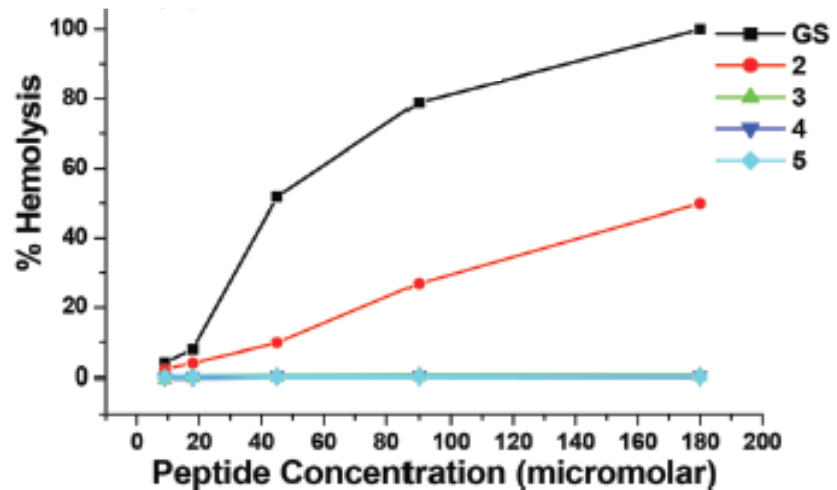
- U tu su svrhu pripremljeni GS-analozi čija je D-Phe-D-Pro sekvencija iz regije β -okreta modificirana s prikladno funkcionaliziranim tetrahidrofuranskim aminokiselinom (Taa). Riječ je o dipeptidnom izosteru koji se odlikuje (*R*)-konfiguracijom kako bi se zadržala orijentacija D-Phe ostatka iz okreta, te THF prstenom koji oponaša njegovu prolinom-induciranu strukturu. Za potrebe SAR-studije pripremljena su 4 mimetika sa svim mogućim kombinacijama stereocentara na pozicijama 2 i 5 iz THF-prstena.



- GS je pokazao najniži MIC prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama te Mycobacterium tuberculosis (MTB).
- Za razliku od GS, koji se pokazao visokotoksičnim prema eritrocitima (50%-tna hemoliza pri 40 μ M), mimetik **2** koji je pokazao najbolju strukturnu podudarnost s GS, pokazao je i očuvanu antibakterijsku aktivnost. Nadalje, mimetik **2** odlikuje se 5 puta slabijom hemolitičkom aktivnošću pri 45 μ M koncentraciji.

Table 1 Antibacterial activities of GS and its analogues 2–5

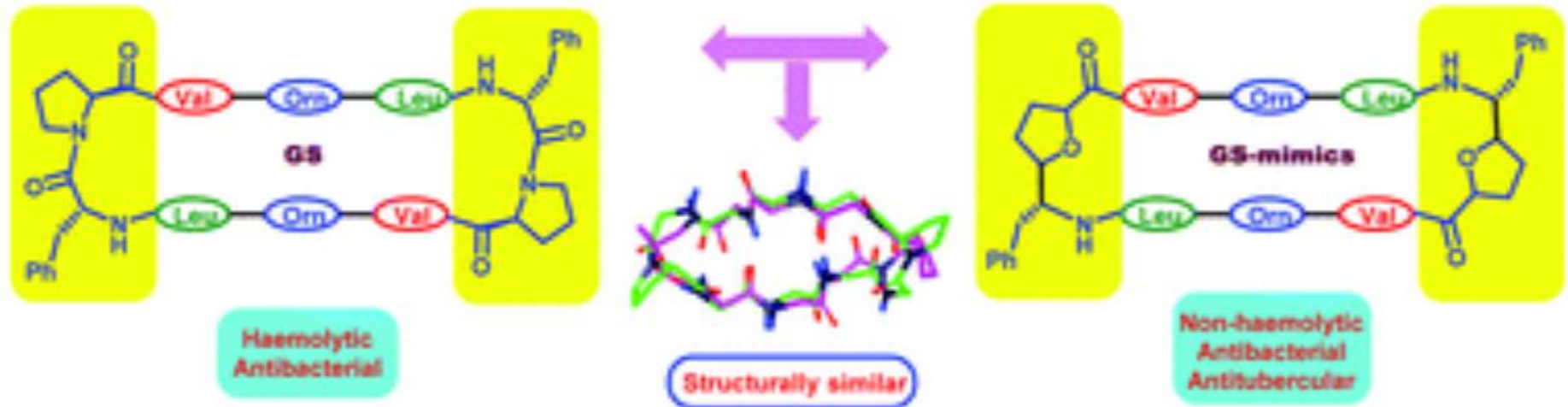
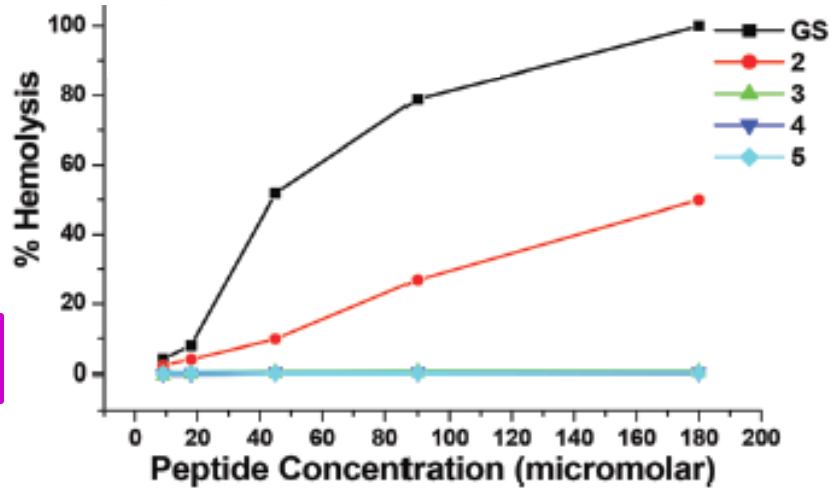
Peptide	MIC (μ M)			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>P. auroginosa</i> ATCCBAA427
GS	17.5	8.8	35	44
2	18	11	37	37
3	200	150	180	>200
4	>200	>200	>200	>200
5	70	50	140	140



- Preostali mimetici pokazali su slabu (5) ili nikakvu antibakterijsku aktivnost (3 i 4).
- Mimetici 2 i 3 pokazali su dobru antituberkuloznu aktivnost, dok su se najpotentnijima pokazali mimetici 4 i 5 [(MIC = 6,25 μM), ne pokazuju hemolitički učinak]. Osim toga, ostvaruju i baktericidnu aktivnost (MBC = 12,5 μM).

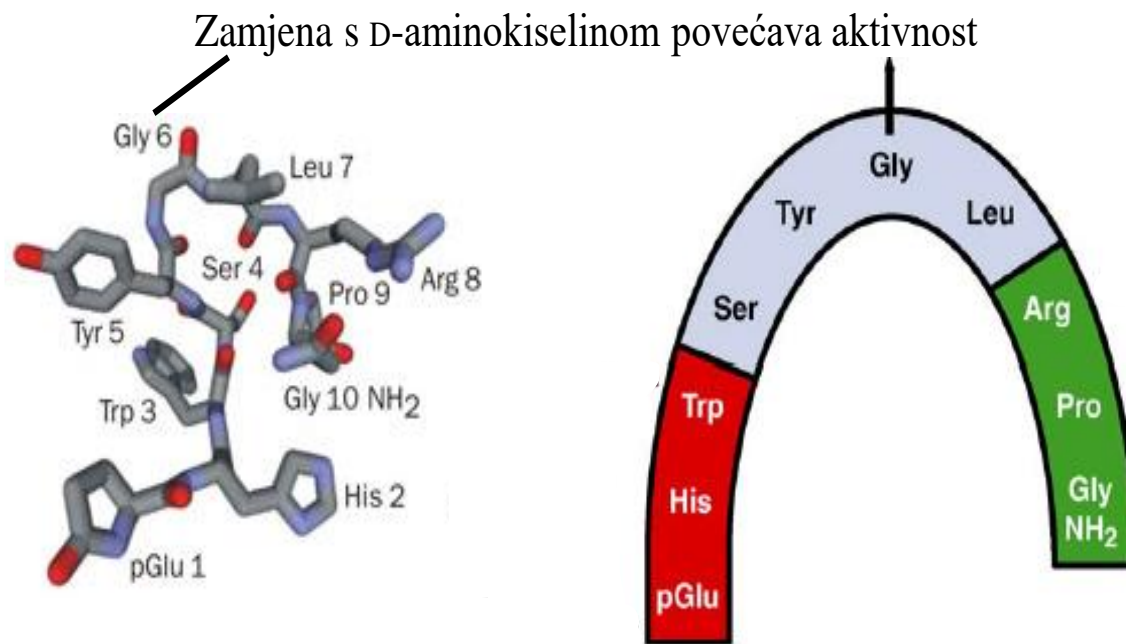
Table 2 Anti-tubercular activities of GS and its analogues 2-5

Peptide	MIC ^a (μM)	CC ₅₀ ^b (μM)	MBC ^c (μM)
GS	0.7	10	ND ^e
2	3.12	29	ND
3	6.25	40	ND
4	6.25	151	12.5
5	6.25	134	12.5



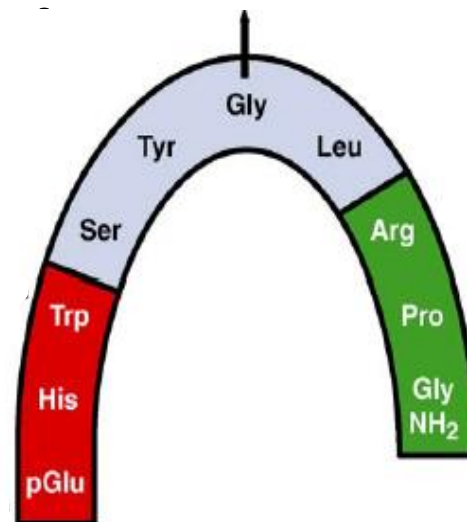
Mimetici β -okreta iz gonadotropina

- Agonisti receptora gonadotropina (hormona koji regulira rast, spolni razvoj i reproduktivnu funkciju) ubrajaju se među prve uspješne primjere primjene peptidomimetike u dizajnu lijekova. Prema rezultatima studije odnosa strukture i aktivnosti (SAR, engl. *structure-activity relationship*), vezivanjem gonadotropina za odgovarajući receptor dolazi do približavanja njegovih *N*- i *C*- krajeva, što je indikacija β -okreta. Oba kraja sudjeluju u vezivanju na receptor. *N*-kraj sudjeluje i u aktivaciji receptora, a bilo kakva supstitucija u tom području dovodi do antagonističkog učinka. Peptidna okosnica iz gonadotropina savijena je oko Gly⁶. Supstitucija ove pozicije s D-aminokiselinama stabilizira konformaciju i smanjuje metaboličku degradaciju.

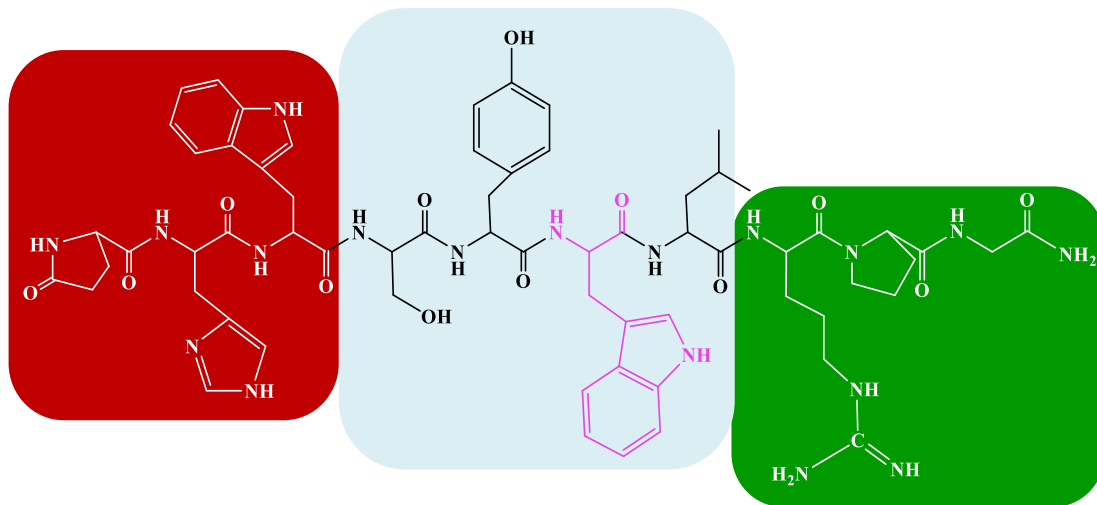




- Supstitucijom Gly⁶ s D-Trp inducirana je konformacija β -okreta u rezultirajućem triptorelinu, a biološka je aktivnost značajno povećana. Triptorelin smanjuje razinu testosterona u krvi što omogućuje njegovu primjenu u liječenju uznapredovalog raka prostate. Osim toga, utvrđeno je da snižava razinu estrogena i dovodi do smanjenja kronične boli uzrokovane endometriozom.



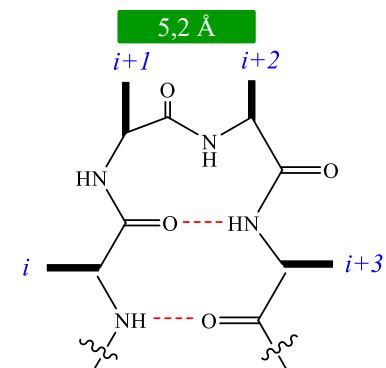
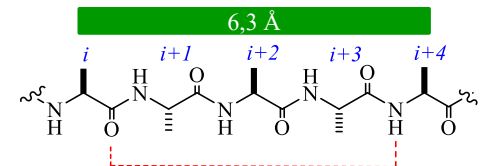
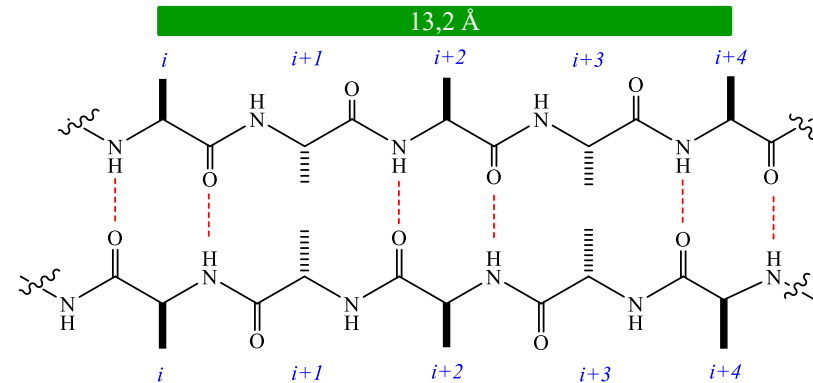
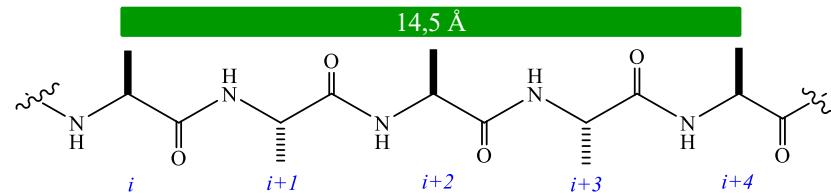
- Supstitucijom Gly⁶ s D-Ser(*t*-Bu) unaprijeđena je proteolitička stabilnost tako dobivenog mimetika goserelina koji se primjenjuje u liječenju benignih ginekoloških bolesti, te karcinoma prostate i dojke.



-
- K. D. Stigers et al, Curr. Opin. Chem. Biol. 3 (1999) 714.*
- B. L. Sibanda et al, Nature 316 (1985) 170.*
- N Sewald et al, Peptides: Chemistry and Biology, Wiley, Weinheim, 2009.*
- G. R. Marshall, Curr. Opin. Struct. Biol. 2 (1992) 904.*
- J. B. Ball et al, J. Mol. Recognit. 3 (1990) 55.*
- S. M. Butterfield et al, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 9580.*
- L. Belvisi et al, Eur. J. Org. Chem. 1999, 389.*
- P. Chitnumsub et al, Bioorg. Med. Chem. 7 (1999) 39.*
- R. R. Gardner et al, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 1806.*
- Y. J. Chung et al, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 10555.*
- F. Albericio et al, Chem. Biol. Drug. Des. 71 (2008) 125.*
- T. R. Webb et al, J. Comb. Chem.9 (2007) 704.*
- G. Luckner et al, Chem. Biol. Drug. Des. 67 (2006) 127.*

Mimetici β -ploče

- Najjednostavniji peptidni strukturni element je β -nit s linearno ili zupčasto raspoređenim amino-kiselinama. Amidne veze u β -niti gotovo su koplanarne, a bočni ogranci su naizmjenično raspoređeni iznad i ispod ravnine peptidne okosnice. Između aminokiselinskih ostataka unutar β -niti ne uspostavljaju se vodikove veze zbog čega ima izduženu konformaciju. Izolirane β -niti nisu uobičajene; međutim, susjedne β -niti najčešće se međusobno povezuju vodikovim vezama tvoreći β -ploče čime se stabilizira proteinska struktura
- β -Niti karakterizira najveća moguća udaljenost između bočnih ogranaka čime su smanjena njihova sterička odbijanja, a istovremeno je osigurana velika izloženost okosnice otapalu ili receptoru. Nakon združivanja β -niti u β -ploču smanjuje se udaljenost između ostataka, pri čemu vodikove veze zaklanjaju okosnicu od interakcija s otapalom i ligandima. Međutim, bočni ogranci, koji su u β -ploči usmjereni na suprotne strane, izloženi su enzimima.

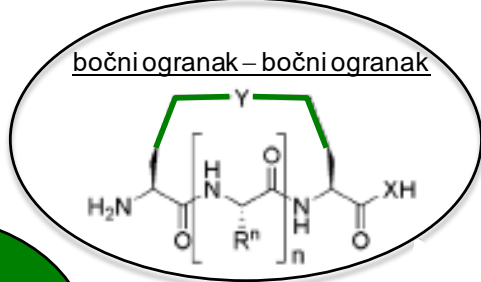
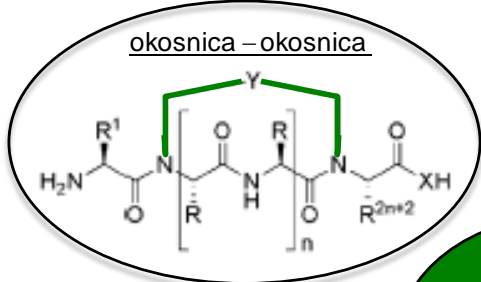


- β -Ploče čine više od trećine elemenata sekundarne strukture i imaju ključnu ulogu u različitim biološkim procesima koji se dovode u vezu s normalnom funkcijom organizma, ali i patološkim stanjima, npr. mnogi proteini skloni su agregaciji pri čemu nastaju plakovi, strukture netopljivih β -ploča, koji uzrokuju progresivna neurološka oboljenja
- Udio proteaza u genomu čovjeka iznosi 2%, dok se u genomu infektivnih organizama nalazi 1-5% proteaza. Proteolitički se enzimi vezuju na svoje supstrate i inhibitore koristeći istegnute β -niti, dijelove β -ploča, kao prepoznavajuće elemente. I mnogi drugi biomolekulski receptori koriste β -niti kao prepoznavajuće elemente, te stoga njihovi mimetici mogu naći primjenu u medicini kao inhibitori enzima i antagonisti.

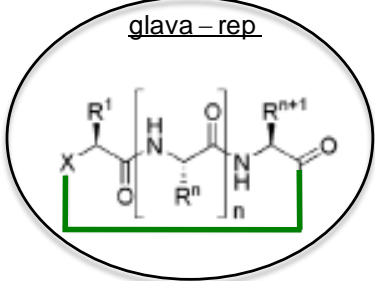
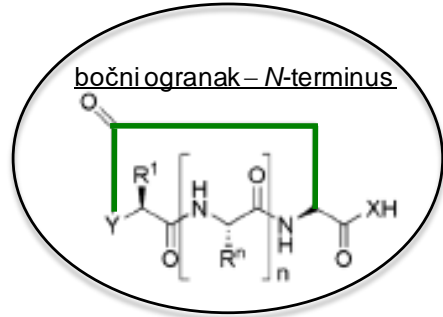
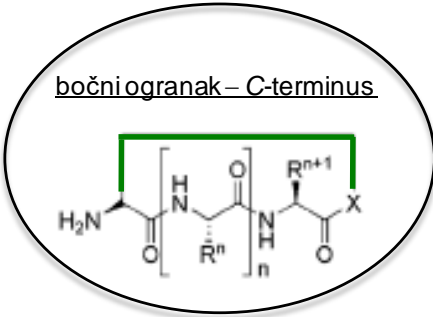


- Najjedostavniji pristup u dizajnu mimetika β -ploče zasniva se na korištenju kratkih peptida kao mimetika odgovarajućih proteinskih regija koje sudjeluju u prepoznavanju s drugim proteinima ili DNA. Međutim, kratki peptidi imaju brojna nepovoljna svojstva koja onemogućuju njihovu terapijsku primjenu i zahtijevaju prilagodbe koje će ih učiniti farmakološki prihvatljivijim kandidatima za lijekove. U tom se smislu često provodi ciklizacija bočni ogranak – bočni ogranak, bočni ogranak – okosnica ili okosnica – okosnica kao metoda kojom se peptid “prisiljava” da zauzme bioaktivnu konformaciju. Osim postizanja konformacijski rigidnih struktura, ciklizacijom se ostvaruje i povećana proteolitička stabilnost.

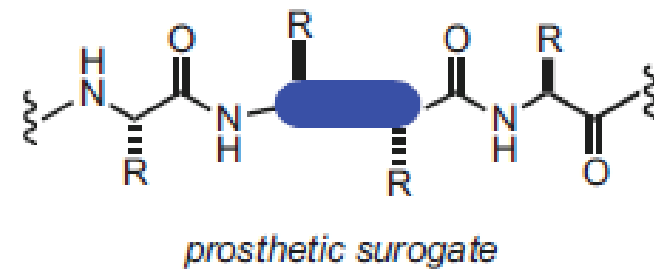
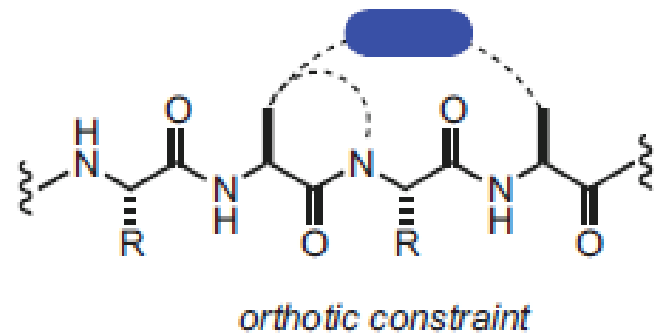
- Za prepoznavanje s proteinom receptor koristi male proteinske fragmente (α -uzvojnice, okrete, β -ploče) koji poprimaju uređenu strukturu. Imajući na umu svojstva prirodnih peptida koja ih čine terapijski slabo iskoristivima, dizajniraju se i pripremaju mimetici struktura uključenih u procese prepoznavanja. Prema glavnim načelima medicinske kemije, povećanje afiniteta za receptor ostvarit će se fiksiranjem molekule u oblik koji odgovara tom receptoru. Priroda koristi ciklizaciju (bočni-ogranak-bočni ogranak, bočni ogranak-okosnica, okosnica-okosnica) kao metodu kojom “prisiljava” peptid da zauzme bioaktivnu konformaciju. Osim postizanja konformacijski rigidnih struktura, ciklizacijom se ostvaruje i povećana proteolitička stabilnost.



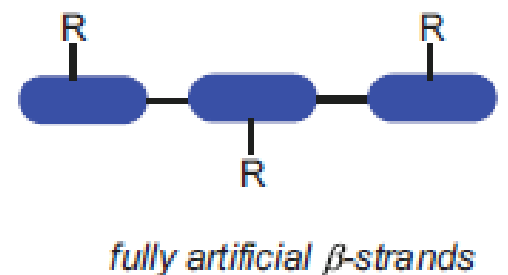
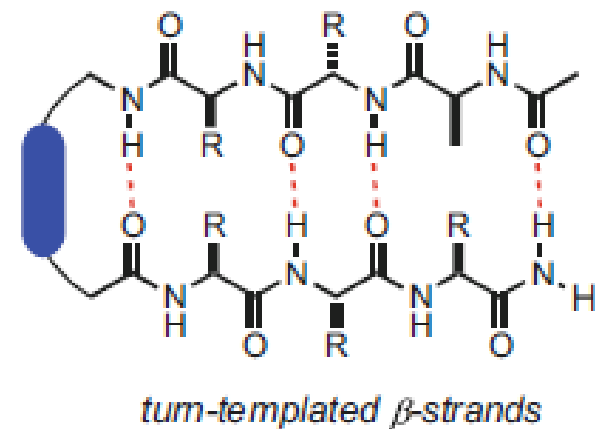
ciklizacija se povoljno odražava na metaboličku stabilnost i farmakokinetička svojstva



- Peptidomimetički pristup u stabilizaciji β -niti i β -ploča često podrazumijeva ciklizaciju koja za posljedicu ima ograničenje diedarskih kuteva. Takav “ortotski” pristup zadržava kompoziciju okosnice prirodnog peptida, a ograničenje se postiže uvođenjem kovalentnih veza, najčešće ciklizacijom bočnih ogranaka ili dijelova okosnice. S druge strane, “prostetički” pristup u stabilizaciji β -ploča zasniva se na zamjeni kratkih odsječaka okosnice s rigidnim, neprirodnim elementom.

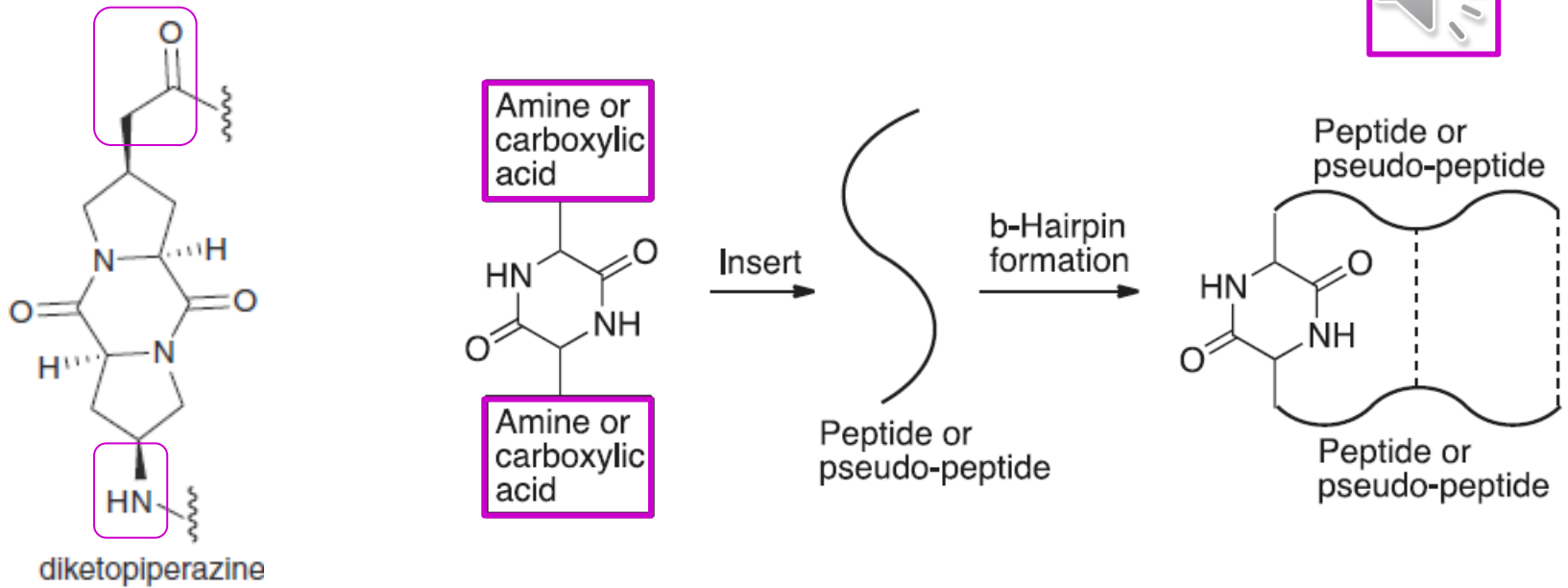


- Najčeći nukleatori struktura nalik β -pločama su neprirodni surogati, izosteri amidne veze te začetnici okreta. Pored toga, razvijeni su umjetni mimetici β -niti, izgrađeni iz nepeptidnih oligomera, čija topološka i kemijska svojstva odgovaraju konformacijski istegnutim peptidima.

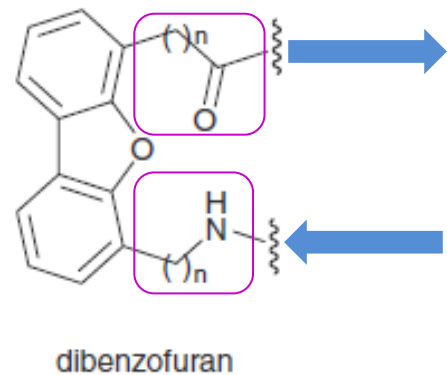


Kalupi za nukleaciju β -ploča

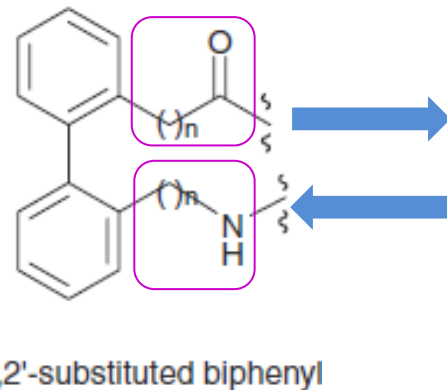
- Najčešći nukleatori β -ploča u proteinima su okreti, mjesta nam kojima lanac naglo obrće svoj smjer uslijed tvorbe vodikove veze između aminokiselinskih ostataka u toj regiji. Razvijeno je nekoliko različitih kalupa (templata) za indukciju okreta (aromatski, prolinski, itd.). Templati moraju sadržavati **dvije reaktivne ručice (funkcijske skupine)** na koje se mogu vezati N- i C-terminus polipeptidnog lanca. Veličina kalupa mora osigurati udaljenost među vezanim lancima dostatnu za uspostavu vodikovih veza.
- Diketopiperazinski (DKP) kalupi funkcionalizirani amino- i karboksilnim skupinama nakon ugradnje u peptidni ili pseudopeptidni lanac induciraju tvorbu β -ukosnice.



- Dibenzofuranski kalup s dvije metilenske skupine u reaktivnoj ručici pokazao se učinkovitijim u stabilizaciji β -ploče u odnosu na kraći analog s jednom metilenskom skupinom.



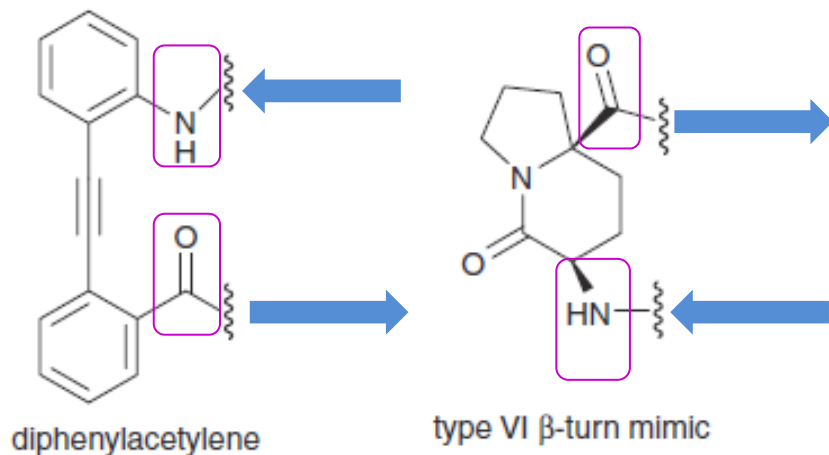
- 2,2'-Supstituirani bifenilni kalupi koriste se kao nukleatori okreta u cikličkim peptidima. Za razliku od kraćih analoga ($n < 2$), analog s dvije metilenske skupine zauzima konformaciju okreta.



- 2,3'-Supstituirani bifenilni kalupi kao nukleatori β -ploča primjenjuju se u dizajnu nabranih peptida koji pokazuju antiangiogenu aktivnost ili inhibiraju dimerizaciju HIV-1 proteaze.

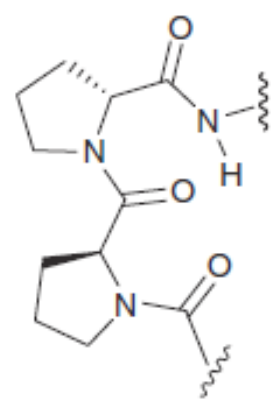


- 2-Amino-2'-karboksi-difenilacetilenski kalup inducira tvorbu ukosnice čija stabilnost ovisi o relativnoj konfiguraciji na kalup vezanih peptidnih lanaca.

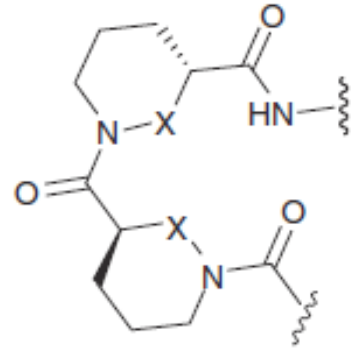


- Konjugiranjem aminokiselina s indolizidinonskim kalupom inducira se tvorba β -okreta, čija stabilnost ovisi o aminokiselinskoj sekvenciji.

- Učinkovite začetnike okreta predstavljaju i heterokiralni dipeptidi L-Pro-D-Pro te di-β-aminokiselinski segment (R)-nipekotinska-(S)-nipekotinska kiselina. Dioksi-nipekotinski segment (X = O) inducira stabilnije strukture okreta u odnosu na segment X = CH₂.

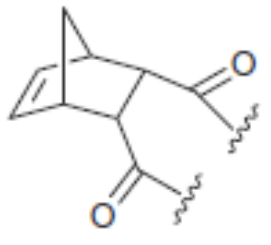
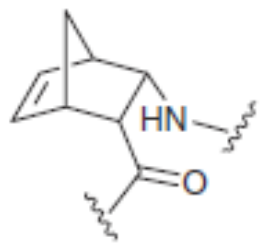


Pro-D-Pro

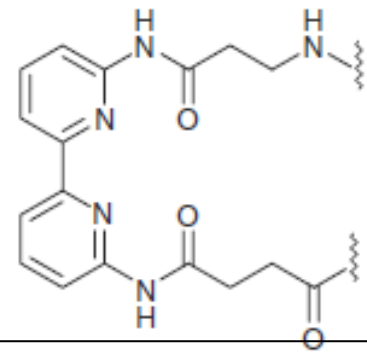
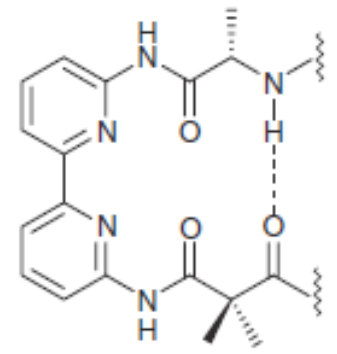
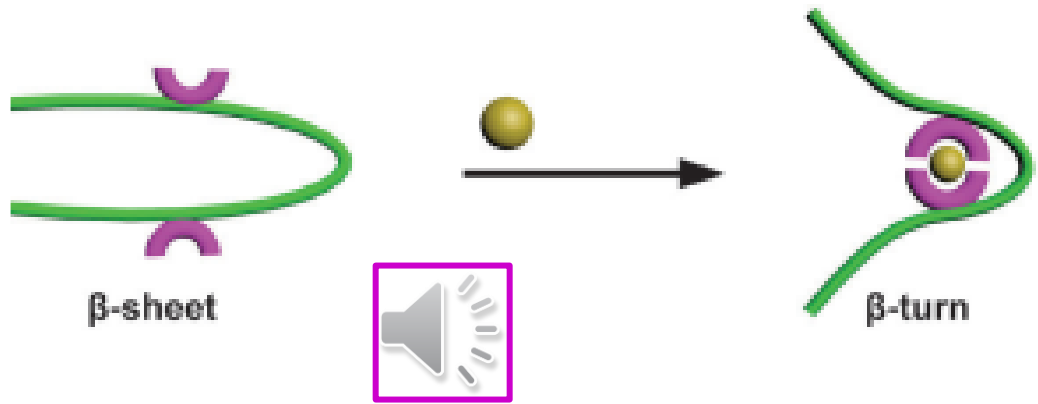


X = CH₂: Nip-D-Nip
X = O: di-oxaNip

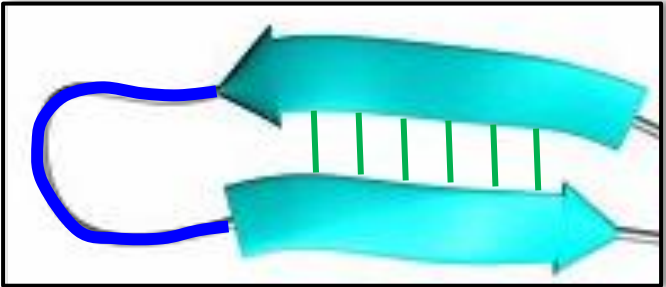
- Opisani su norbornenski derivati funkcionalizirani β-aminokiselinama i dikarboksilnim kiselinama. β-Aminokiselininski kalup pogodan je za vezanje antiparalelnih β-niti koje se međusobno povezuju vodikovim vezama dovodeći do tvorbe β-ploče, dok je dikiselinski norbornenski kalup pogodan za vezivanje paralelnih peptidnih lanaca.



- U slučaju bipiridinskih kalupa, tvorba β-ploča inducirana je dodatkom Cu(II) iona čime peptidni lanci dolaze u položaj pogodan za uspostavu vodikovih veza.



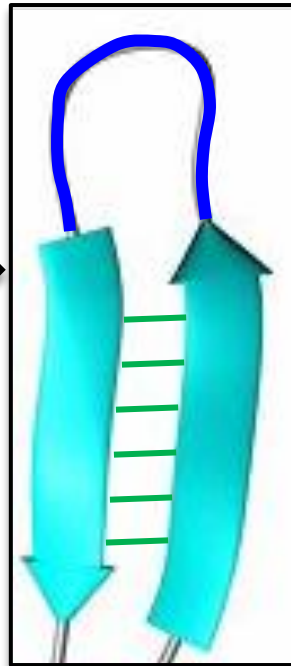
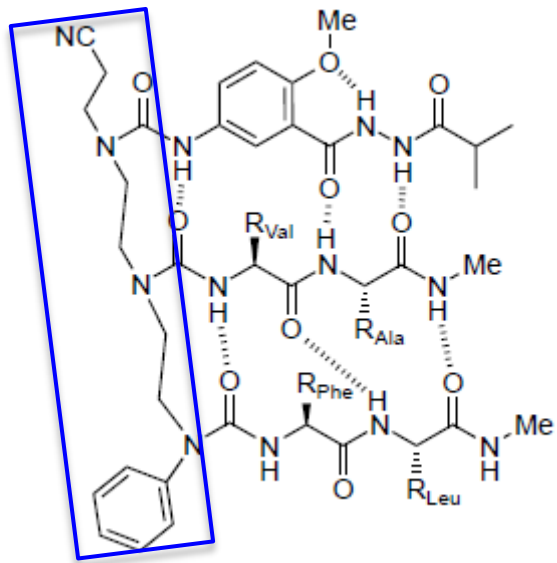
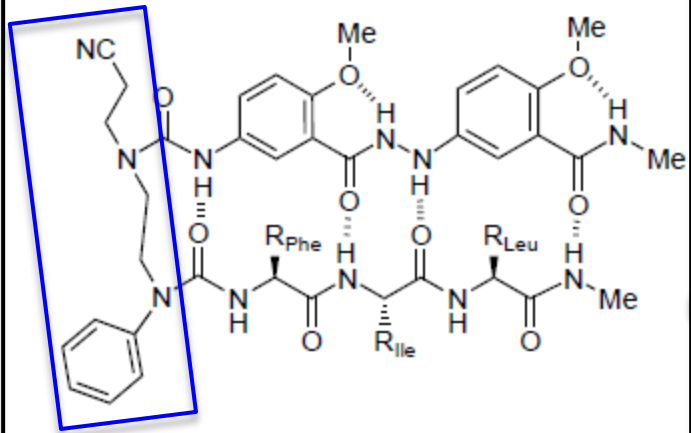
- Mimetiци β -plohe nastali kombinacijom **začetnikâ okreta** s peptidnim lancima:



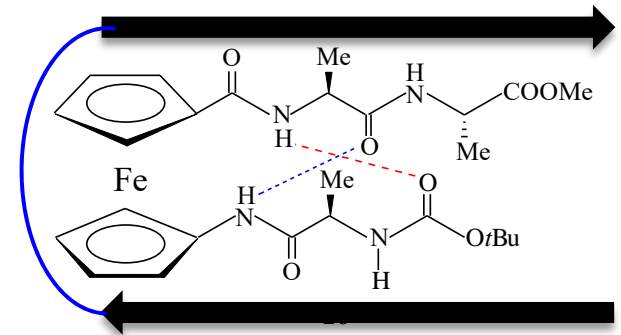
- hibridni oligomer izveden kombinacijom *anti*- α,β -disupstituiranih β -aminokiselina s α -depsi-peptidnim začetnikom okreta.

- β -heksapeptid čija je konformacija β -plohe inducirana **elementom okreta**.

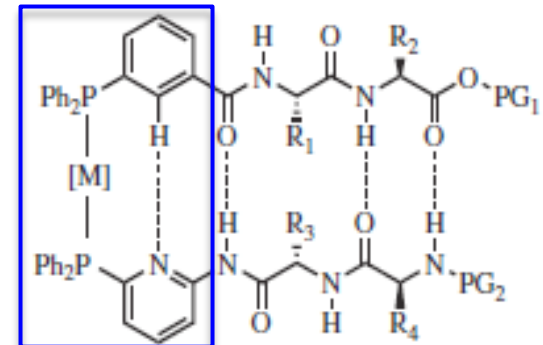
- *N,N*-oligoureidni kalup dizajniran tako da omogući približavanje peptidnih lanaca.



- Umetanjem ferocenskog kalupa u peptidni lanac dolazi do tvorbe dviju simultanih unakrsnih *intramolekulskih* vodikovih veza pri čemu se inducira antiparalelna β-ploča.



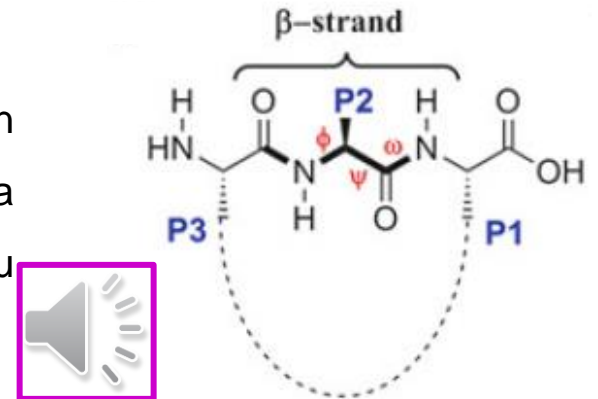
- Kratki peptidni fragmenti vezani na fenil- i piridin-fosfinske ligande zauzimaju konformaciju β-ploče nakon keliranja.



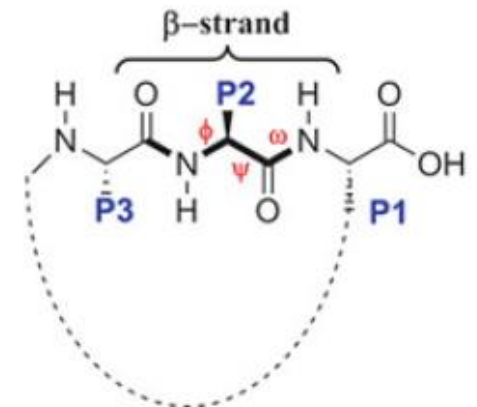
-
- S. Krauthauser et al, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 11719.
- D. Seebach et al, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38 (1999) 1595.
- E. Junquera et al, *J Org Chem* 64 (1999) 2527.
- L. Barišić et al, *Chem. Commun.* 17 (2004) 2004.
- S. Chowdhury et al, *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 3018.
- A. Banerjee et al, *Int. J. Biomed. Sci.* 6 (2010) 216.
- B. M. J. Walker et al, *Tetrahedron Letters* 42 (2001) 5801.
- R. M. J. Liskamp et al, *Wiley-VCH Verlag* 2008.
- R. Xu et al, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 4898.
- M. Bois-Choussy et al, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 9309.
- C. J. Arnusch et al, *Eur. J. Org. Chem.* (2003), 3131.
- H. T. den Brink et al, *J. Org. Chem.* 71 (2006) 1817.
- S. Fernandez-Lopez et al, *Nature* 412 (2001) 452.
- T. D. Clark et al, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 651.
- D. A. Kelkar et al, *Biochimica et Biophysica Acta* 1768 (2007) 2011.

Makrociklički inhibitori proteaza (mimetiци β -niti)

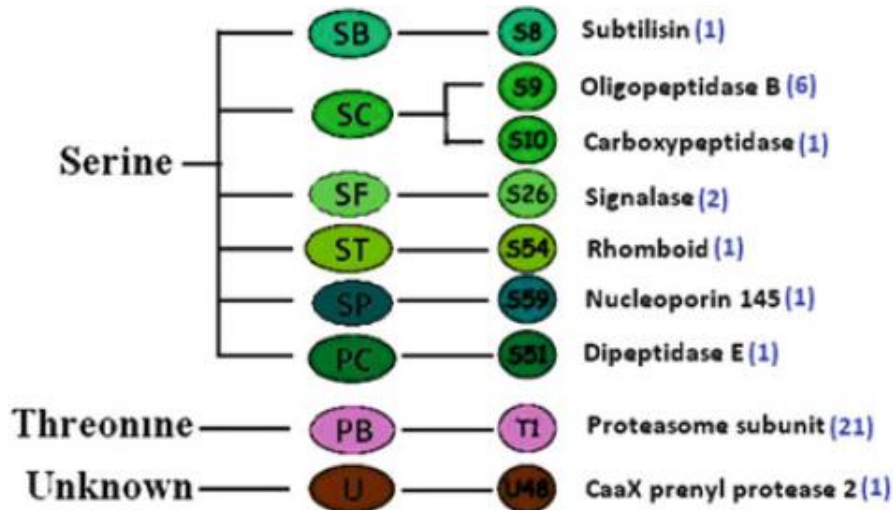
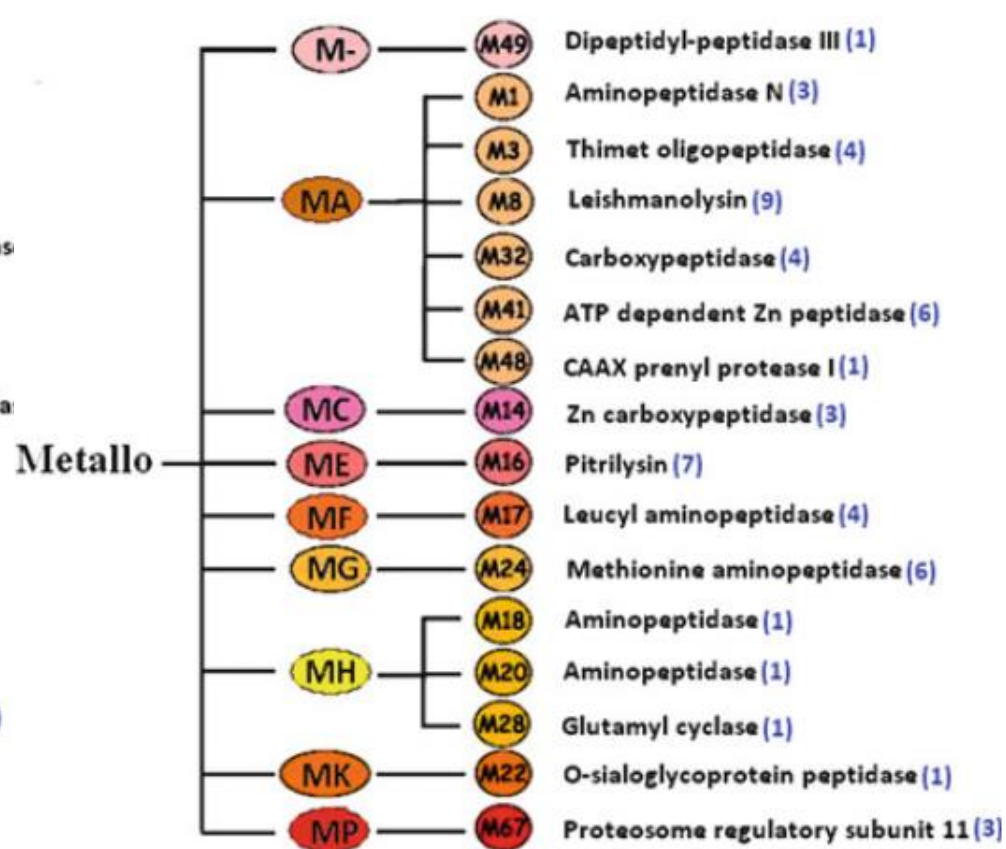
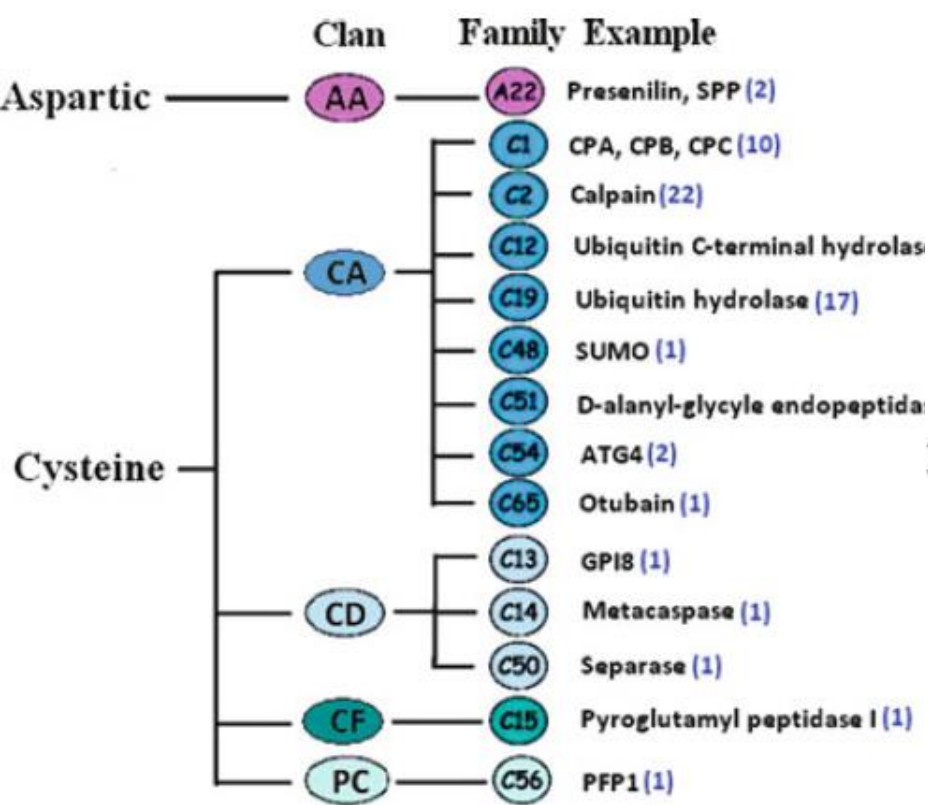
- S obzirom da 6 poznatih skupina proteaza igra glavnu ulogu u regulaciji ključnih bioloških procesa, mogućnost njihove inhibicije predstavlja važan terapijski pristup kod liječenja mnogih bolesti. Proteaze se za svoje supstrate i inhibitore vezuju tako da je aminokiselinska okosnica iz inhibitora ili supstrata spregnuta u istegnutu β -nit. Stoga se glavni pristup u dizajnu inhibitora bazira na preorganizaciji njegove strukture u konformaciju β -niti. Pri tom je prepoznavajuća sekvencija iz enzima uvijek je uključena u dizajn inhibitora, pri čemu se svaki aminokiselinski ostatak (P) iz inhibitora vezuje s komplementarnim veznim džepom u aktivnom mjestu proteaze.
- Ugradnjom odgovarajućeg makrocikla u okosnicu inhibitora moguće je preorganizirati njegovu strukturu u β -nit (geometrija β -niti definirana je kutovima Φ , Ψ and ω) i tako reducirati entropiju vezanja za ciljanu proteazu. Time se povećava i stabilnost inhibitora, makrocikličkog peptidomimetika, prema proteolitičkom cijepanju, što povećava njegov terapijski potencijal.



side chain to side chain cyclization

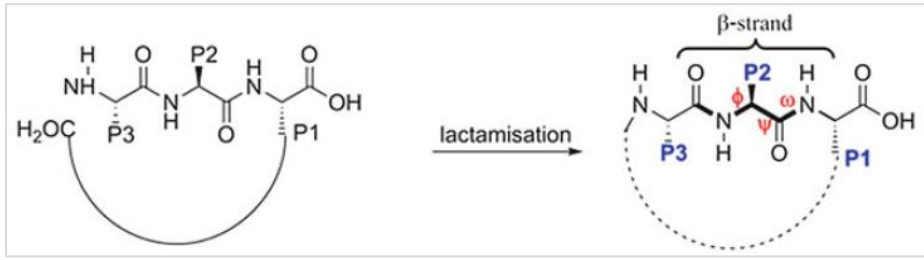
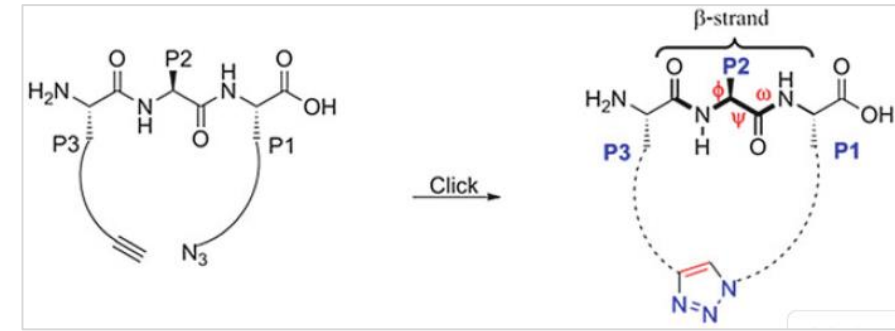
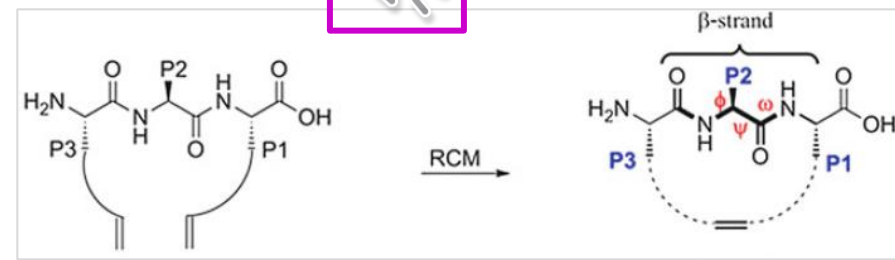
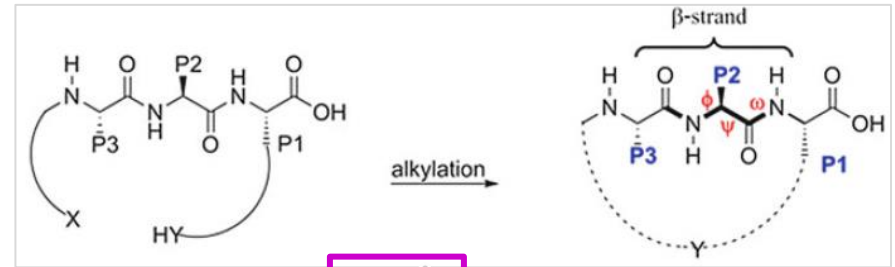
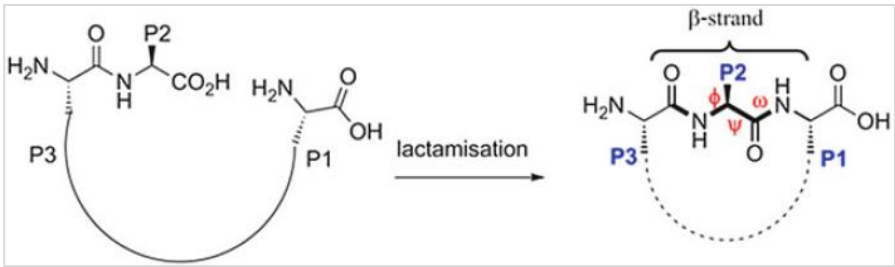


side chain to N-terminus cyclization

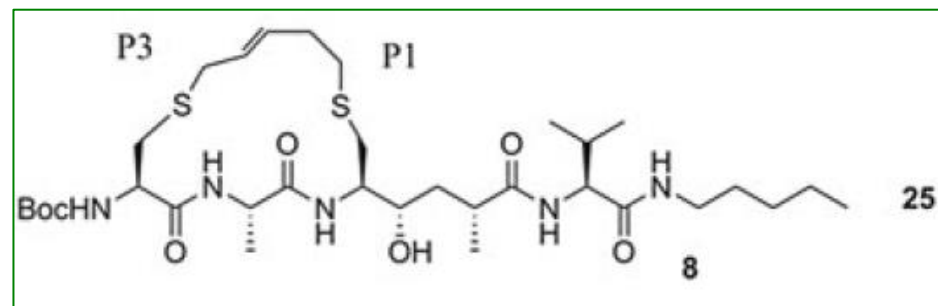
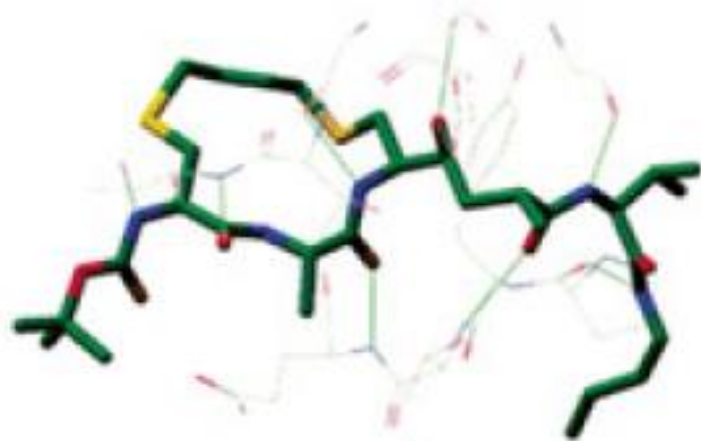


Clans and families of *L. major* peptidases. Nomenclature is done on the basis of the MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk/>). The estimated number of peptidases in each family is represented by *numbers within brackets*.

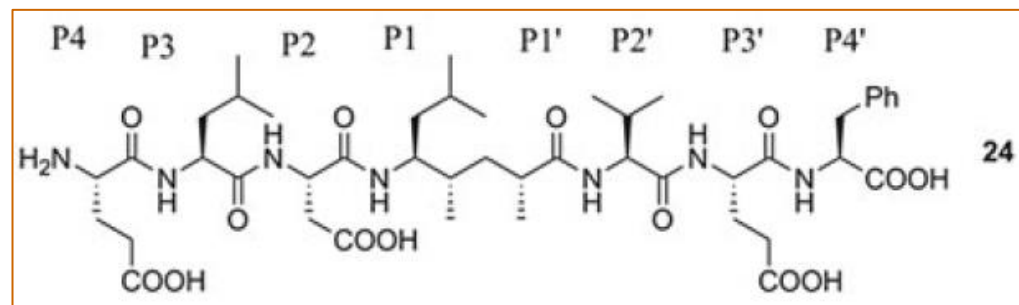
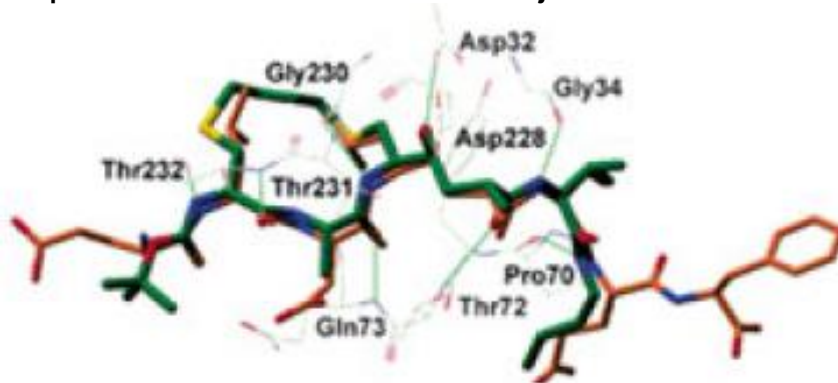
- Poznate su brojne vrste makrocikličkih peptidomimetika u kojima je peptidna okosnica spregnuta u specifičnu geometriju β -niti. Najčešće nastaju ciklizacijom bočni ogranak P1 \rightarrow bočni ogranak P3 te nešto rjeđe ciklizacijom bočni ogranak \rightarrow N-terminus. Važna je i veličina prstena; mali prstenovi značajno smanjuju konformacijsku fleksibilnost, ali manje učinkovito osiguravaju potrebnu geometriju β -niti. Osim toga, važna je i kemijska struktura prstena, s obzirom da se mora ostvariti komplementarnost s prepoznavajućom sekvencijom iz ciljne proteaze.



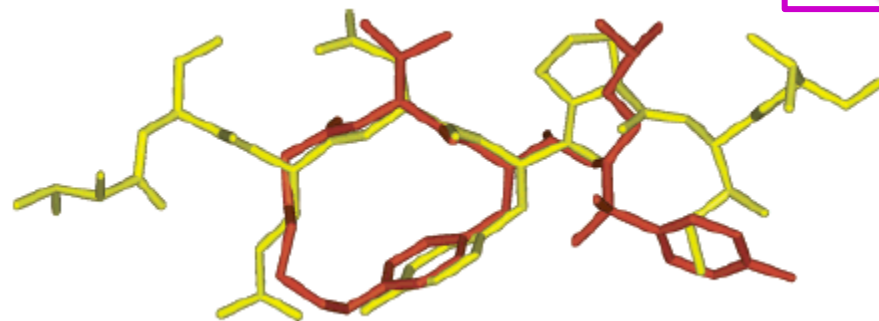
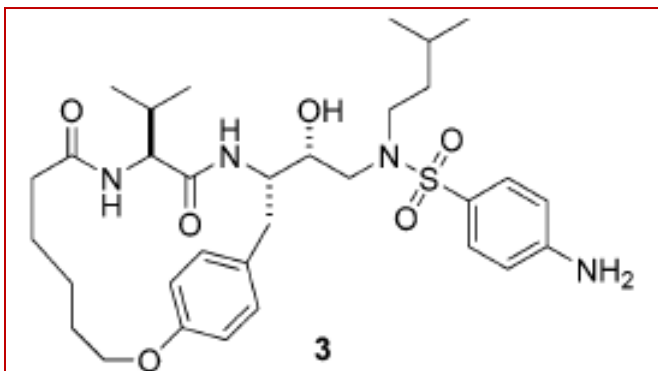
- P1→P3 povezani makrociklički peptidomimetik **25** pokazao se potentnim inhibitorom β -sekretaze koja pripada skupini aspartil-proteaza, i to s $IC_{50} = 156$ nM.



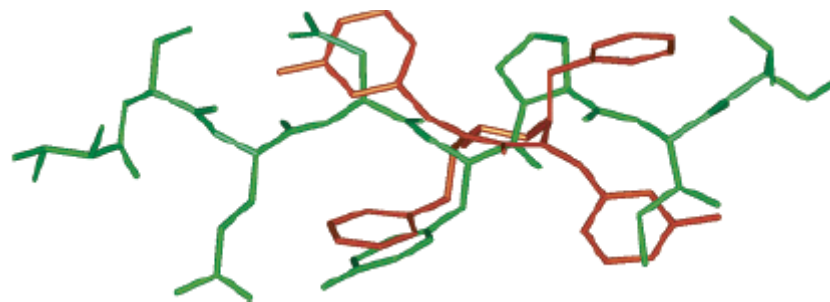
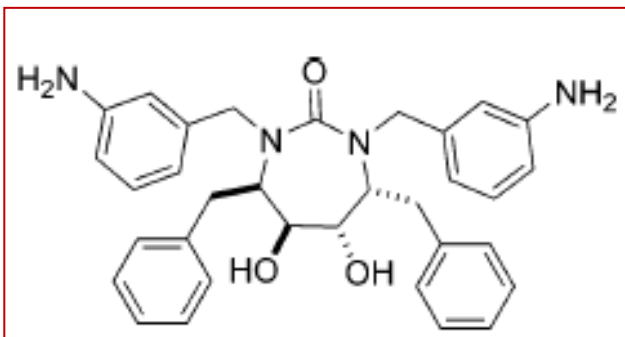
- Prikazane su preklopljenje kristalne strukture makrocikličkog inhibitora **25** i acikličkog inhibitora **24**. U aktivnom mjestu proteaze oba spoja zauzimaju istegnutu konformaciju β -niti. Ključne vodikove veze opažene u kompleksu **24**/proteaza (posebno s Gly³⁴, Pro⁷⁰, Thr⁷², Gln⁷³, Gly²³⁰ i Thr²³²) opažene su i u kompleksu **25**/proteaza. Prema tome, makrocikl **25** stabiliziran je u konformaciji β -niti za koju je poznato da favorizira vezanje s enzimskim aktivnim mjestom.



- Kondenzacijom bočnih ogranaka s okosnicom dobivaju se makrocikli s fiksiranom i istegnutom konformacijom koji predstavljaju visoko-spregnute strukturne mimetike tri- i tetrapeptidnih fragmenata iz peptidnih supstrata ili inhibitora. Takva strukturna rigidnost onemogućava tvorbu intramolekulskih vodikovih veza, što otvara mogućnost za tvorbu vodikovih veza između peptidomimetika i receptora.
- **Makrociklički mimetik 3** pokazao se potentnim i selektivnim inhibitorom **HIV-1 proteaze** zahvaljujući tvorbi vodikovih veza s **aktivnim mjestom enzima**.

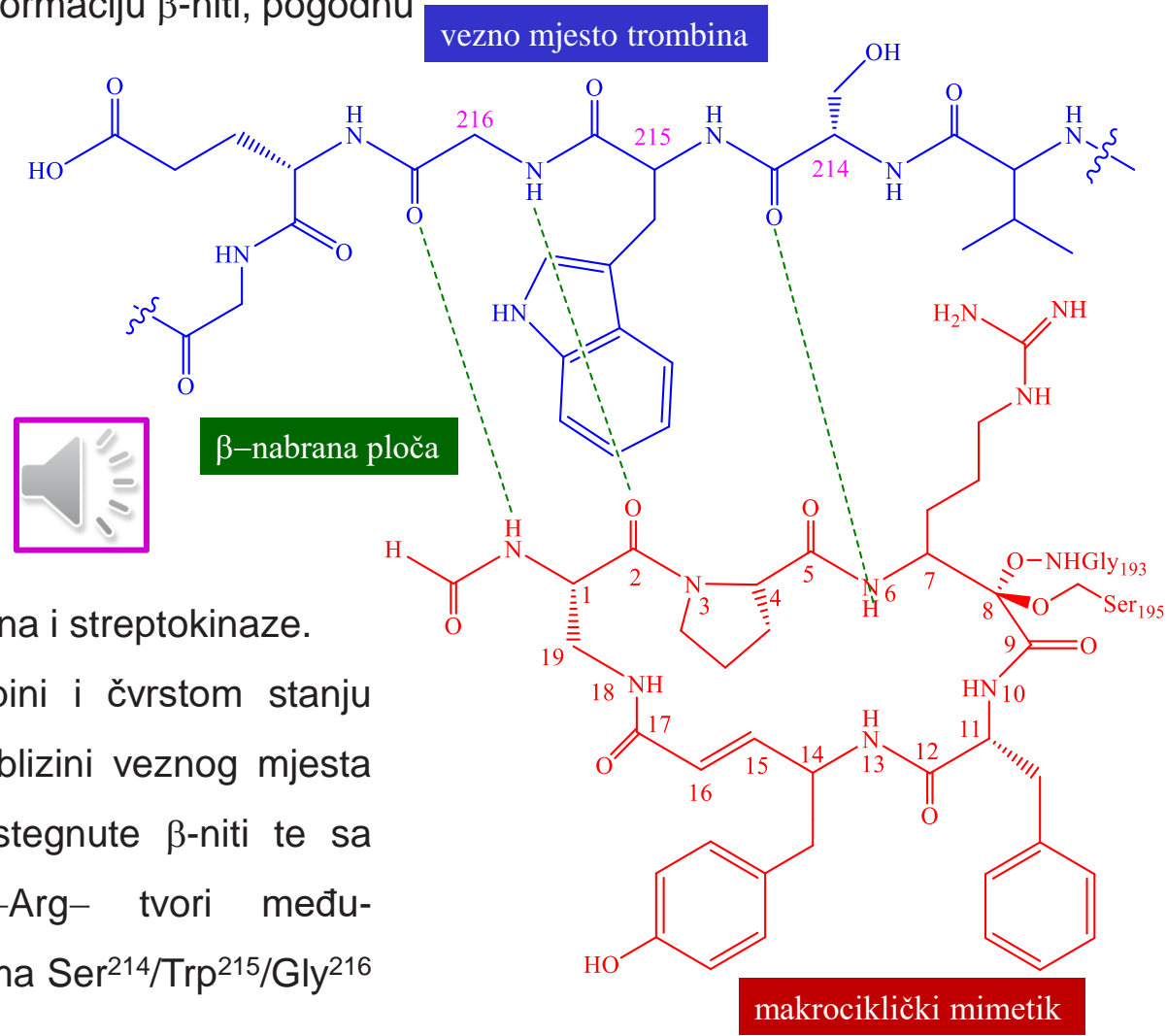


- Opisana je serija **cikličkih ureidnih inhibitora HIV-1 proteaze** u kojima su ureidni prstenovi različitih veličina korišteni kao kalupi za usmjeravanje **benzilnih hidrofobnih supstituenata** u **enzimske džepove**, odnosno u položaje potrebne za interakciju s enzimom.

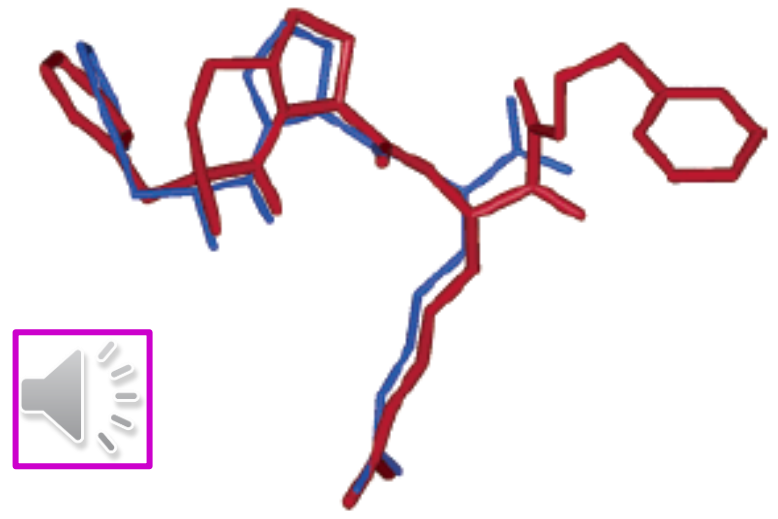
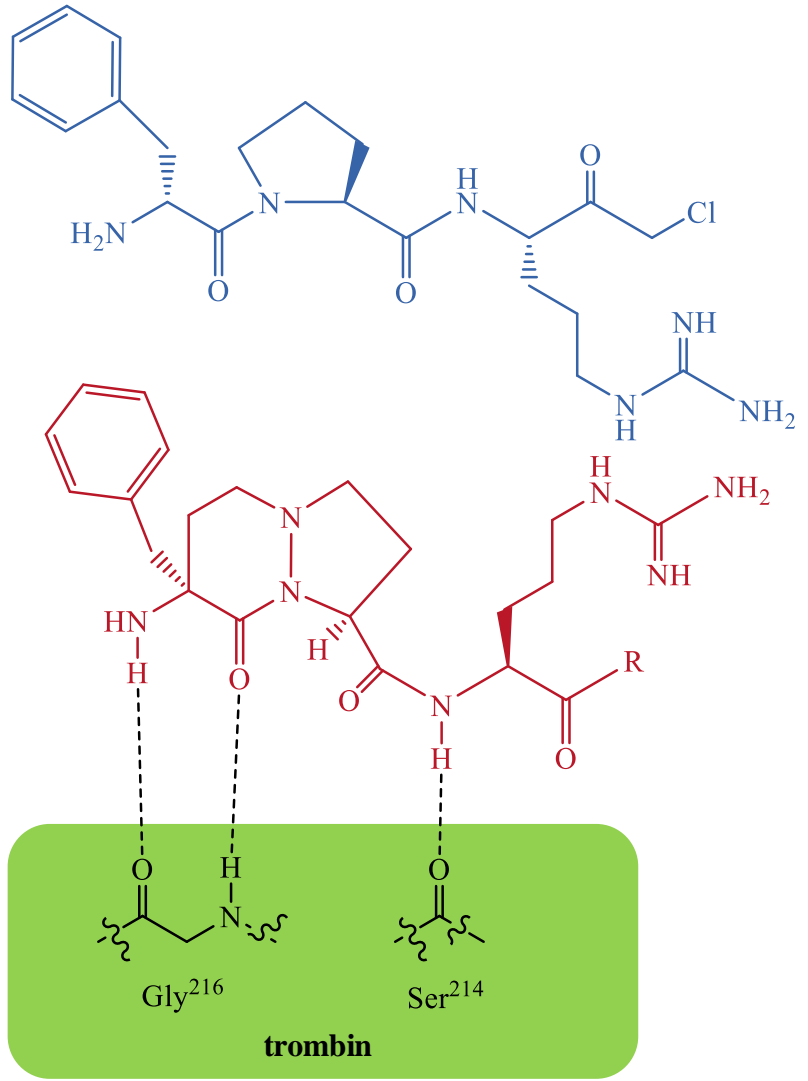


- **Makrocikli dobiveni kondenzacijom bočnih ogranaka s okosnicom** predstavljaju visokospregnute strukturne inhibitore linearnih peptidnih sekvencija. Neki od tih makrocikla sadrže dvije *trans*-amidne veze i *p*-supstituirane aromatske prstenove koji ometaju tvorbu intramolekulskih vodikovih veza uslijed čega makrocikli zauzimaju izduženu konformaciju β -niti, pogodnu za vezivanje s proteazama.

- Primjer kompleksa makrocikla i enzima u kojem **makrocikl oponaša β -nit** koja će s veznim mjestom enzima tvoriti β -ploču jest **19-člani makrociklički peptid cikloteonamid** izoliran iz morske spužve *Theonella sp.* koji se pokazao inhibitorom trombina, tripsina i streptokinaze. Konformacijskom analizom u otopini i čvrstom stanju ustanovilo se da cikloteonamid u blizini veznog mjesta proteaze zauzima konformaciju istegnute β -niti te sa fragmentom $\text{NH-CHR-C(O)-Pro-Arg-}$ tvori međumolekulske vodikove veze s ostacima $\text{Ser}^{214}/\text{Trp}^{215}/\text{Gly}^{216}$ iz veznog mjesta trombina.



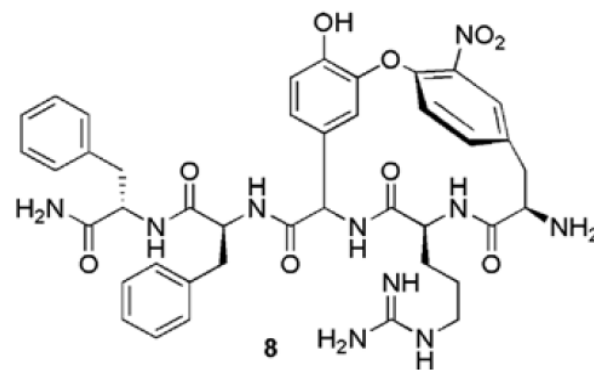
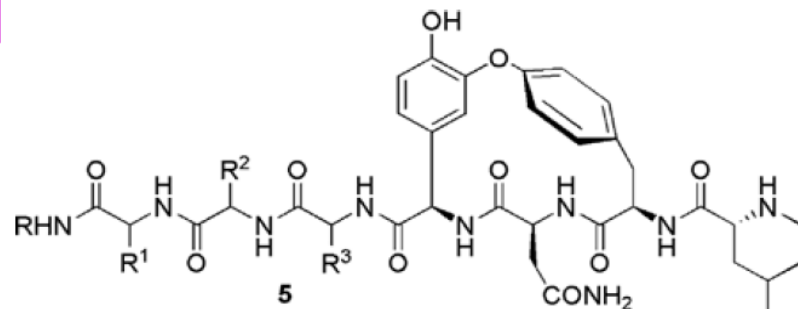
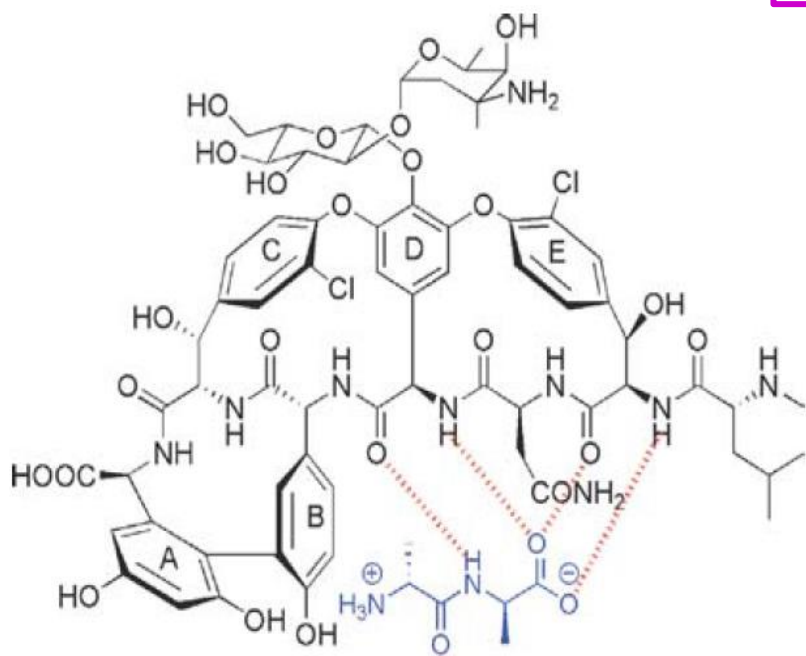
- **PPACK peptid** (D-phenylalanyl-prolyl-arginyl chloromethyl ketone) selektivno i ireverzibilno inhibira trombin (proteolitički enzim koji ima ulogu u zgrušavanju krvi). Iznimno potentni **inhibitori PPACK peptida** (mimetici!) dizajnirani su tako da oponašaju njegov D-Phe-Pro fragment.



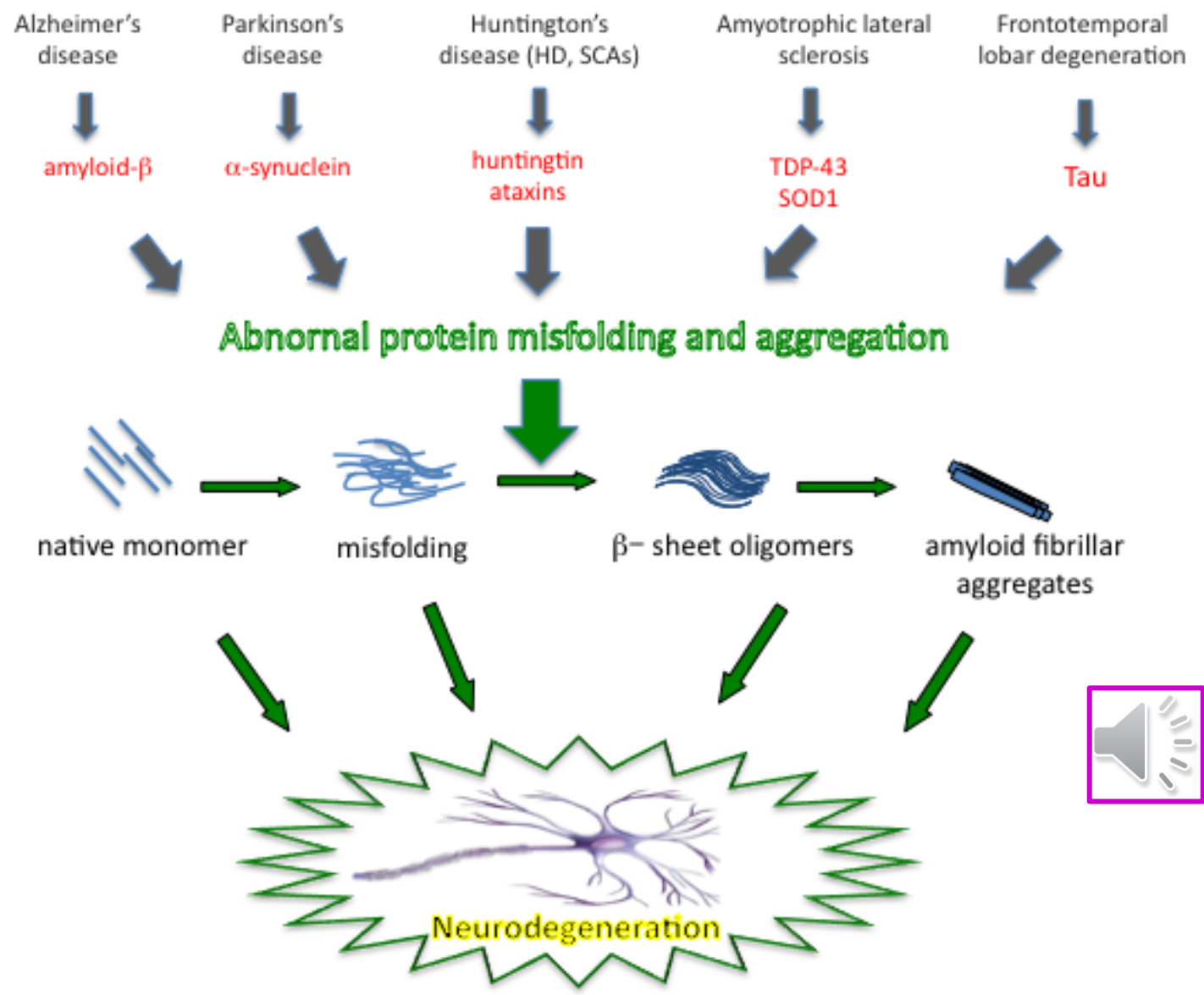
Usporedba bioaktivnih konformacija mimetika 147 i peptidnog inhibitora PPACK

- Kristalna struktura kompleksa tog **mimetika (inhibitora)** i **trombina** ukazuje na postojanje vodikovih veza između bicikličkog kalupa ugrađenog u mimetik i Ser²¹⁴ te Gly²¹⁶ ostataka iz trombina, koje dovode do tvorbe antiparalelne β-nabrane ploče.

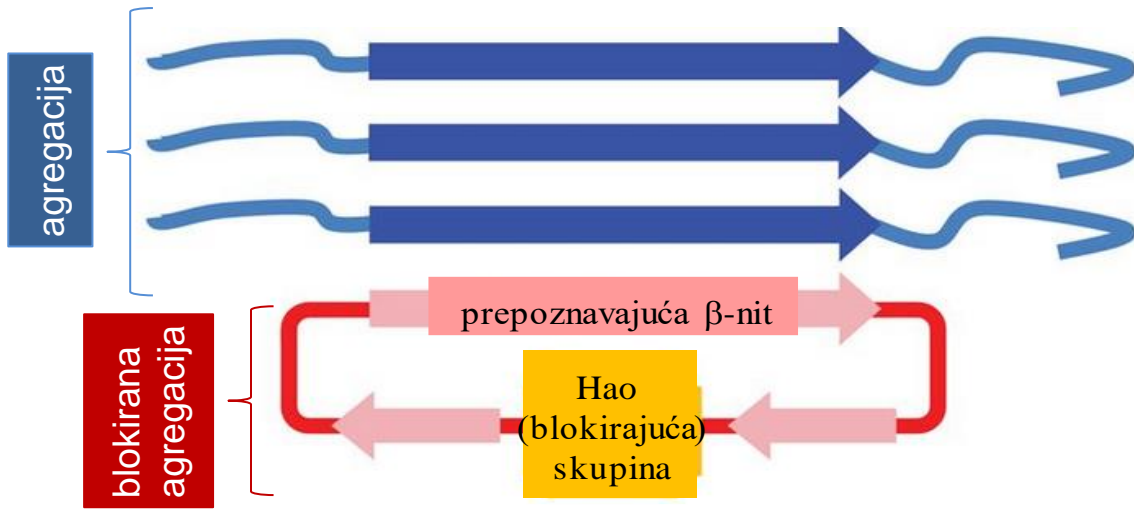
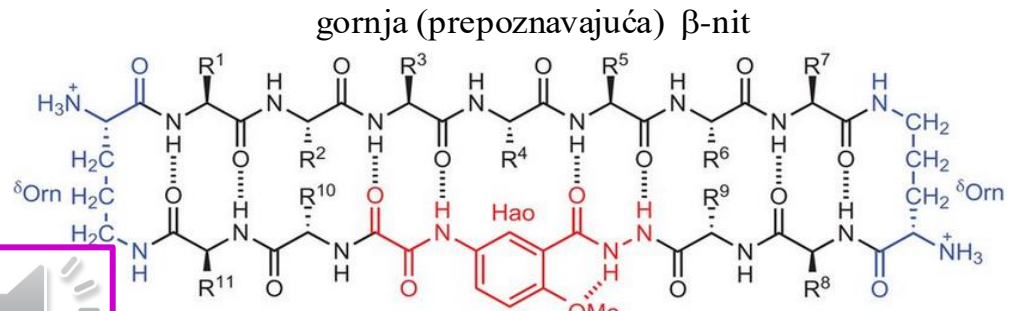
- Vankomicin je glikopeptidni antibiotik visokodjelotvoran prema Gram-pozitivnim bakterijama, uključujući i MRSA (meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*). Inhibira sintezu stanične stijenke stvaranjem vodikovih veza s D-Ala-D-Ala fragmentom iz prekursora stanične stijenke, pri čemu se formira motiv β -ploče. Mimetici vankomicina dizajnirani su tako da oponašaju bis-aril-eterski fragment D-E iz njegove strukture.



- Brojne bolesti posljedica su agregacije amiloidnih proteina pri čemu nastaju amiloidni fibrili u konformaciji β -niti iz β -nabrane ploče.

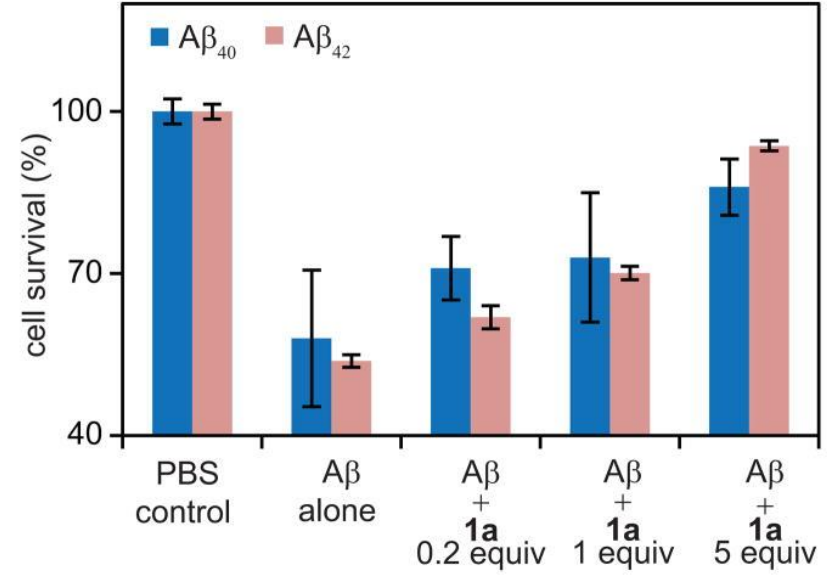
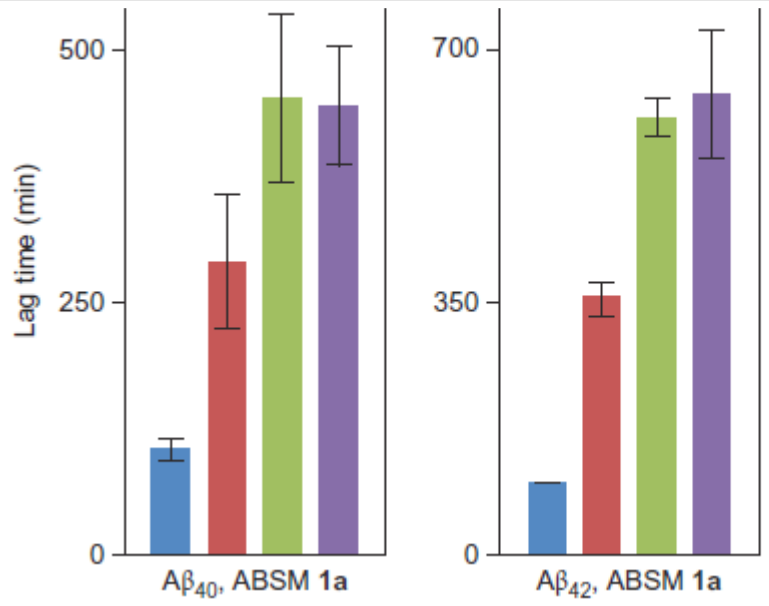
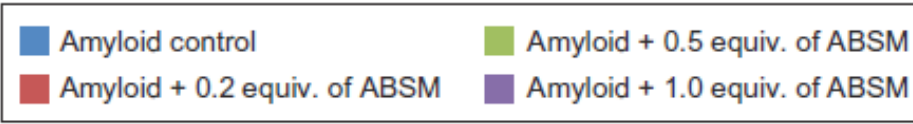


- Makrociklički mimetici amiloidne β -ploče ABSMs (engl. *macrocycles amyloid b-sheet mimics*), testirani su kao mogući inhibitori agregacije amiloidnih proteina. Riječ je o 54-članoj prstenastoj strukturi koja se sastoji iz heptapeptidne β -niti (gornji lanac), jedne Hao-skupine (5-hidrazino-2-metoksibenzojeva kiselina) kao tripeptidni mimetik β -niti te dviju ornitinskih skupina na mjestu okreta između gornje i donje niti. Hao-skupina služi kao kalup za stvaranje unutarmolekulskih vodikovih veza, te ujedno minimizira izloženost skupina s donjeg lanca intermolekulskim vodikovim vezama i time sprječava agregaciju ABSM u otopini. Inhibicija agregacije amiloidnih proteina u prisutnosti makrocikličkog mimetika amiloidne β -ploče ABSM ukazuje da ABSM s jednim lancem koji sudjeluje u vodikovim vezama te jednim lancem koji blokira vodikove veze



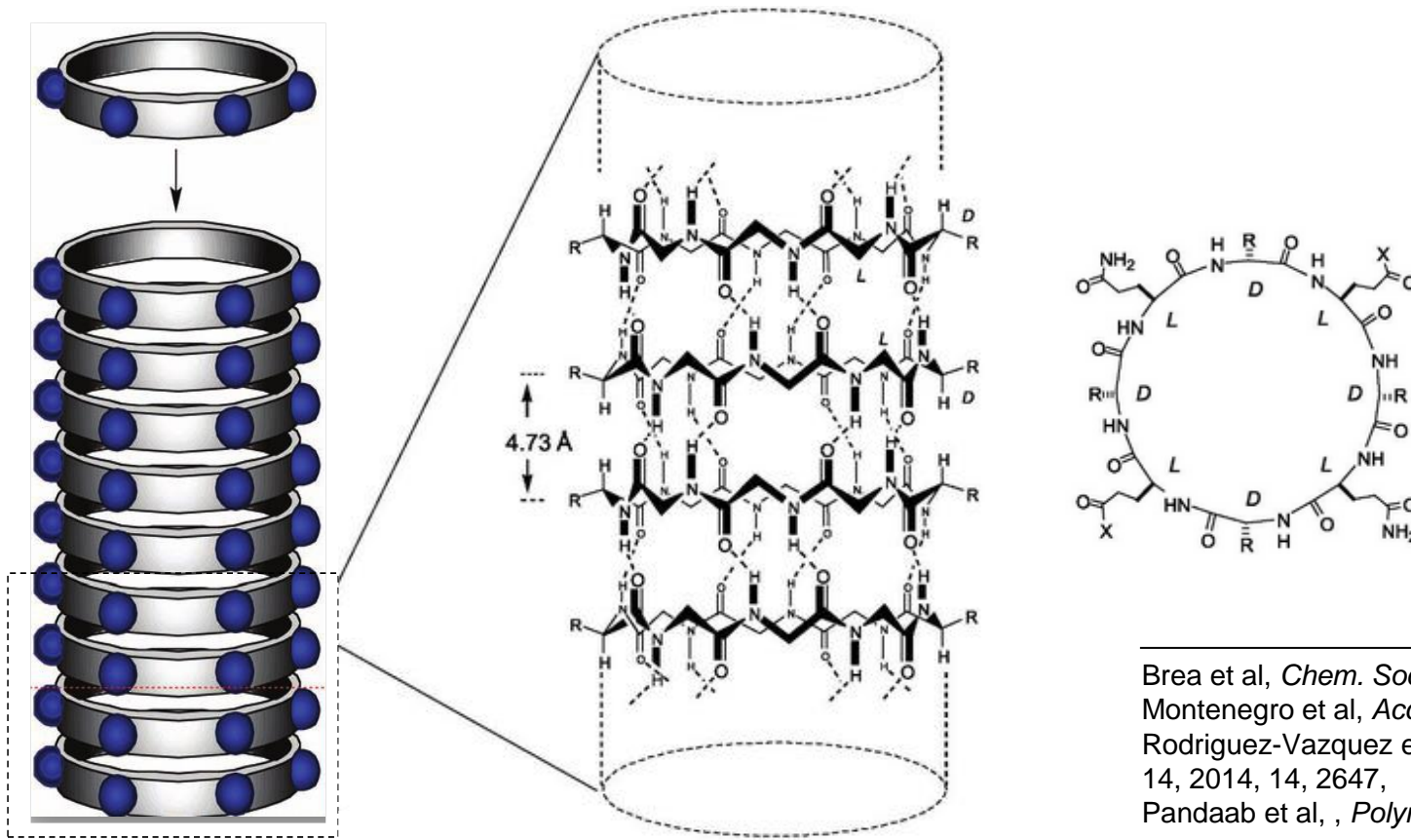
predstavlja učinkovit pristup u dizajnu inhibitora amiloidne agregacije. Sposobnost ABSMs da inhibiraju agregaciju i detoksificiraju amiloidne aggregate ukazuje na terapijski potencijal u liječenju bolesti izazvanih amiloidnom agregacijom.

- Inhibicija agregacije amiloidnih Alzheimerovih proteina $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ u prisutnosti makrocikličkog mimetika amiloidne β -ploče (ABSMS) ukazuje da ABSMS s jednim lancem koji sudjeluje u vodikovim vezama te jednim lancem koji blokira vodikove veze predstavljaju učinkovit pristup u dizajnu inhibitora amiloidne agregacije.
- ABSM reducira toksičnost Alzheimerovih proteina $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ u PC-12 stanicama. U odsutnosti ABSM Alzheimerovi proteini ubijaju 42-46% PC-12 stanica (u odnosu na kontrolu inkubiranu u PBS puferu), dok je u prisutnosti 5 eq ABSM stanična smrt reducirana na 14% i 6%.

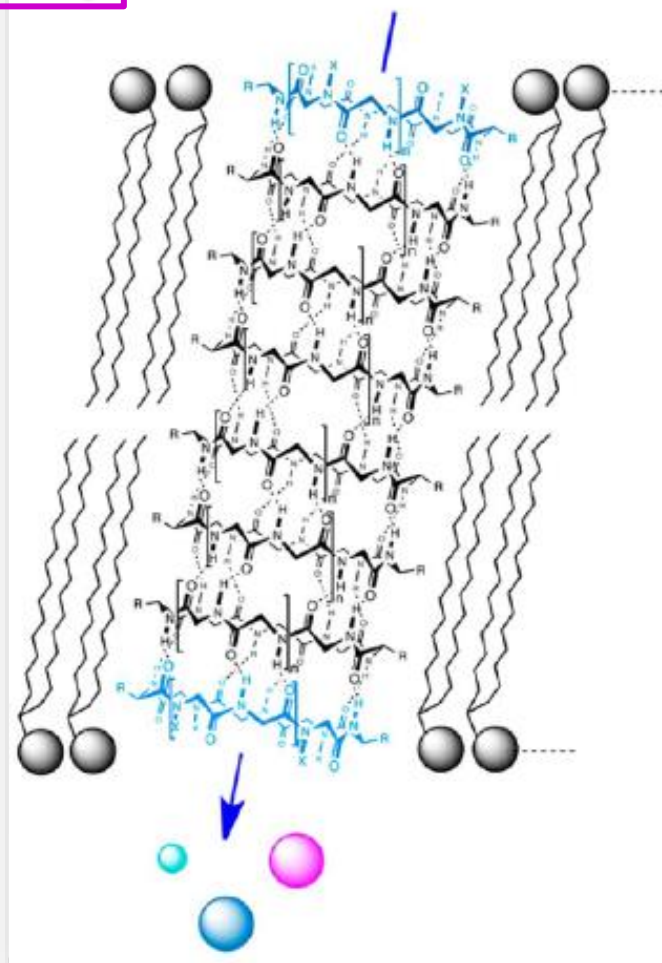
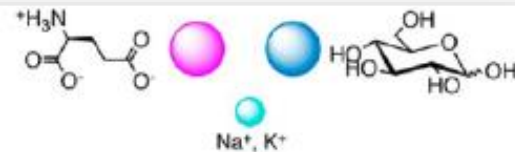
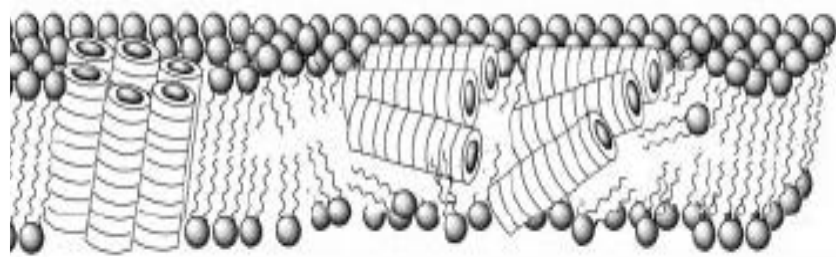


- Sposobnost ABSMS da inhibira agregaciju i detoksificira amiloidne agregate sugerira terapijski potencijal u liječenju bolesti izazvanih amiloidnom agregacijom.

- Ciklički peptidi građeni iz parnog broja alternirajućih D- i L-aminokiselina odlikuju se jedinstvenim strukturnim svojstvima. Njihove su amidne skupine iz okosnice orijentirane okomito prema bočnim ograncima i ravnini prstena što omogućava stvaranje vodikovih veza između susjednih prstenova, po uzoru na β -nabranu ploču. Prsteni se samoudruživanjem slažu jedan iznad drugog tvoreći šuplju, cjevastu strukturu nanodimenzija, odnosno nanocijev (engl. *nanotube*). Promjer nanocijevi može varirati, ovisno o veličini prstena cikličkog peptida. Prirodni ciklički peptid lanreotid, inhibitor hormona rasta, također podliježe samoudruživanju u uređene nanocijevi. Peptidne nanocijevi imaju vrlo široku primjenu (npr. antimikrobni agensi, doprema lijekova, biosenzori, katalizatori, itd.).



Brea et al, *Chem. Soc. Rev.* 39, 2010, 1448,
 Montenegro et al, *Acc. Chem. Res.* 46, 2013, 2955,
 Rodriguez-Vazquez et al, *Curr. Top. Med. Chem.*
 14, 2014, 14, 2647,
 Pandaab et al, , *Polym. Chem.* 5, 2014, 4418.



- Odgovarajuće dizajnirane nanocijevi ostvaruju vodiko-ve veze s proteinima iz bakterijske stanične membrane pri čemu dolazi do povećanja propusnosti, pada transmembranskog ionskog potencijala i smrti stanice.
- Sintetske peptidne nanocijevi čija je unutrašnjost hidrofилна, a karakter vanjske površine ovisi o prirodi bočnih ogranaka, mogu oponašati transmembranske kanale, selektivne s obzirom na veličinu molekula.
- Nanocijev nastala samozdruživanjem ciklo-[L-Gln-(D-Leu-L-Trp)₃-D-Leu-] u lipidnom dvosloju poslužila je za transport K⁺ and Na⁺ iona brzinom većom od 10⁷ iona/s.
- Oktapeptidna nanocijev s unutarnjim promjerom ~ 7Å ne provodi glukozu (za transport glukoze kroz membranu potrebni su kanali promjera većeg od 9 Å). Međutim, dekapeptid ciklo-[L-Gln-(D-Leu-L-Trp)₄-D-Leu-] s unutarnjim promjerom 10 Å vrlo učinkovito transportira glukozu i glutaminsku kiselinu.
- Ovi rezultati ukazuju na moguću ulogu peptidnih nanocijevi u dostavi farmakološki aktivnih agenasa u stanicu.

Peptidni mimetici i pseudopeptidi

Dizajn i primjeri biološki aktivnih peptidomimetika

Prof. dr. sc. Lidija Barišić

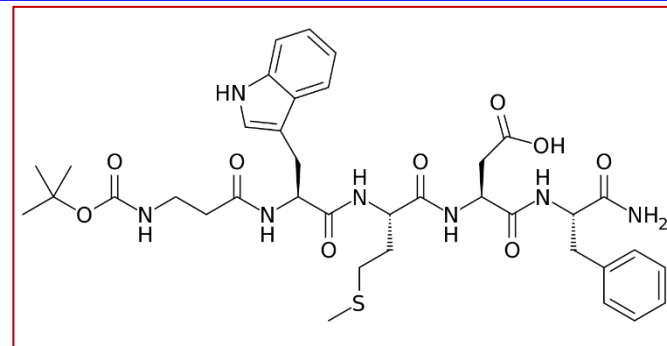
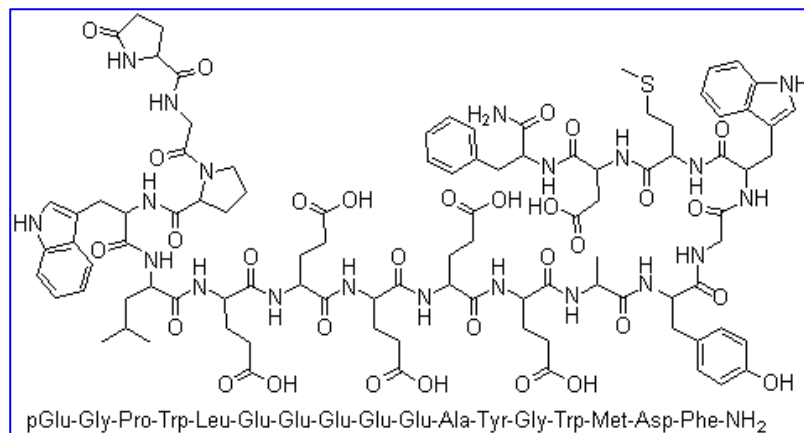
- Stara klasifikacija peptidomimetika, spojeva koji oponašaju 3D-prostor prirodnih peptida i pri tom zadržavaju sposobnost interakcije s biološkim metama dovodeći do jednakog biološkog učinka, provodila se na temelju njihove sličnosti s prirodnim supstratima:



- *Tip I:* strukturni mimetici - pokazuju striktnu analogiju s prirodnim peptidom; njihovi su interagirajući elementi u istom prostornom rasporedu kao i u prirodnom peptidu.
- *Tip II:* funkcijski mimetici - nemaju strukturnu sličnost s prirodnim peptidom, ali sposobni su oponašati njegovu funkciju ostvarujući slične interakcije s ciljanim receptorima ili enzimima.
- *Tip III:* funkcijsko-strukturni mimetici - imaju kostur značajno različit u odnosu na prirodne peptide, dok su interagirajući fragmenti u istom prostornom rasporedu.

- Nova klasifikacija peptidomimetika uključuje nove pristupe bazirane na visokomolekulskim foldamerima i peptoidima, a provodi se prema stupnju njihovog peptidnog karaktera:

- *Vrsta A:* mimetici su najbliži prirodnim peptidima (njihova okosnica i bočni ogranci usklađeni su s topografijom prirodnih peptida); sadrže ograničen broj lokalnih modifikacija u strukturi u cilju stabilizacije konformacije i sprječavanja proteolize. Primjer je lijek **pentagastrin** (Peptavlon) dobiven lokalnom modifikacijom **gastrina**, a odobren je za liječenje prekomjernog lučenja želučane kiseline. Uključuju mimetike tipa I.



○ *Vrsta B*: u velikoj se mjeri odlikuju peptidnim karakterom, ali sadrže više modifikacija u okosnici i bočnim ograncima poput neprirodnih aminokiselina, malih građevnih blokova kao i mimetika okosnice. U ovu skupinu ubrajaju se foldameri i peptoidi, čije su okosnice potpuno modificirane, s tim da je prostorni raspored bočnih ogranaka jednak kao i u prirodnim peptidima. Uključuju mimetike tipa II.

○ *Vrsta C*: peptidna okosnica zamijenjena je nepeptidnim kosturom, uslijed čega se mimetici odlikuju smanjenim peptidnim karakterom. Interagirajući elementi u istom su topološkom rasporedu kao i u prirodnim bioaktivnim konformacijama. Primjer su somatostatin i TRH-analozi. Uključuju mimetike tipa III.

○ *Vrsta D*: mimetici su najmanje slični prirodnim peptidima, a oponašaju njihov način djelovanja. Generiraju se iz knjižnice spojeva, a uključuju mimetike tipa II i tipa III.

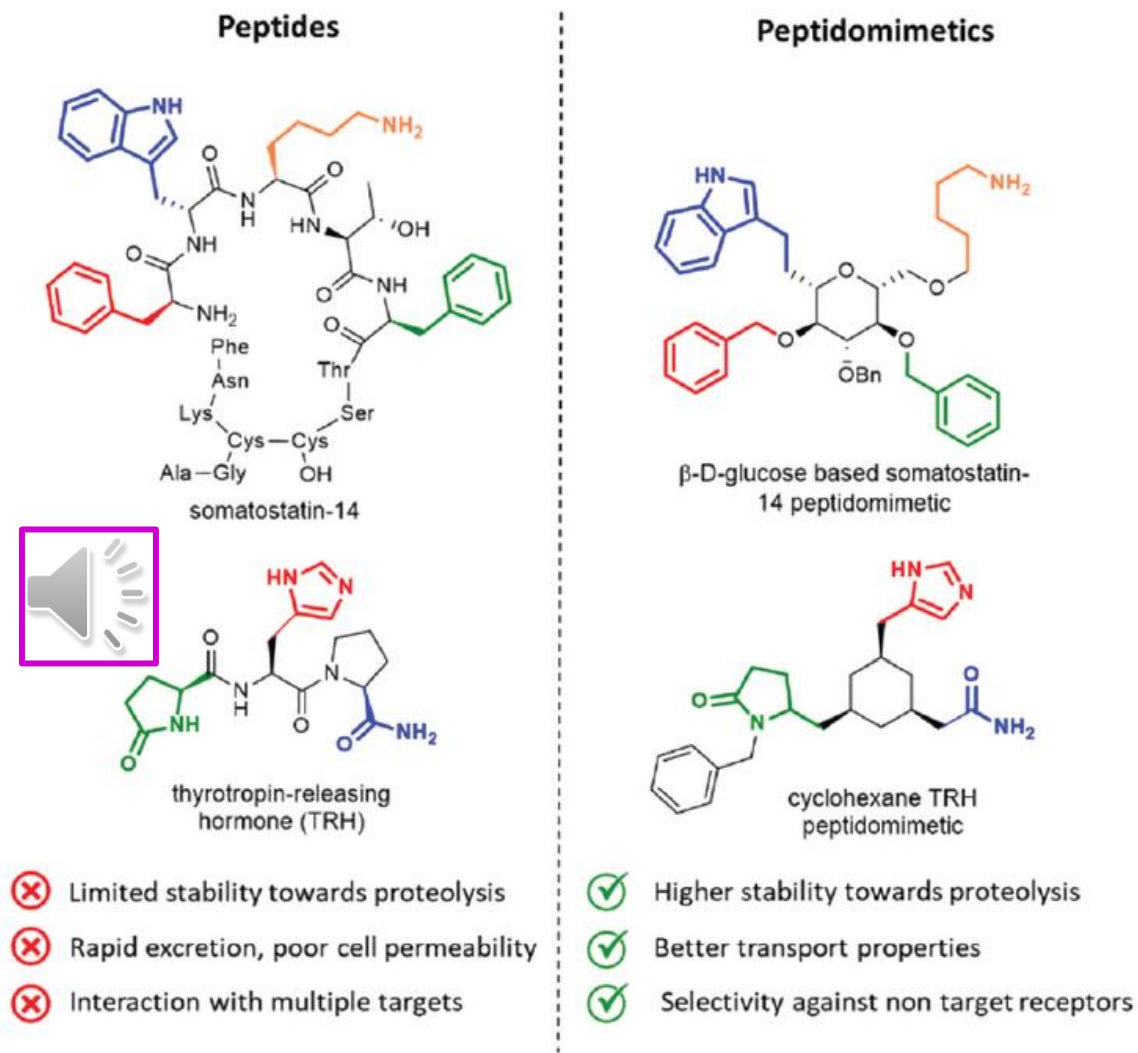
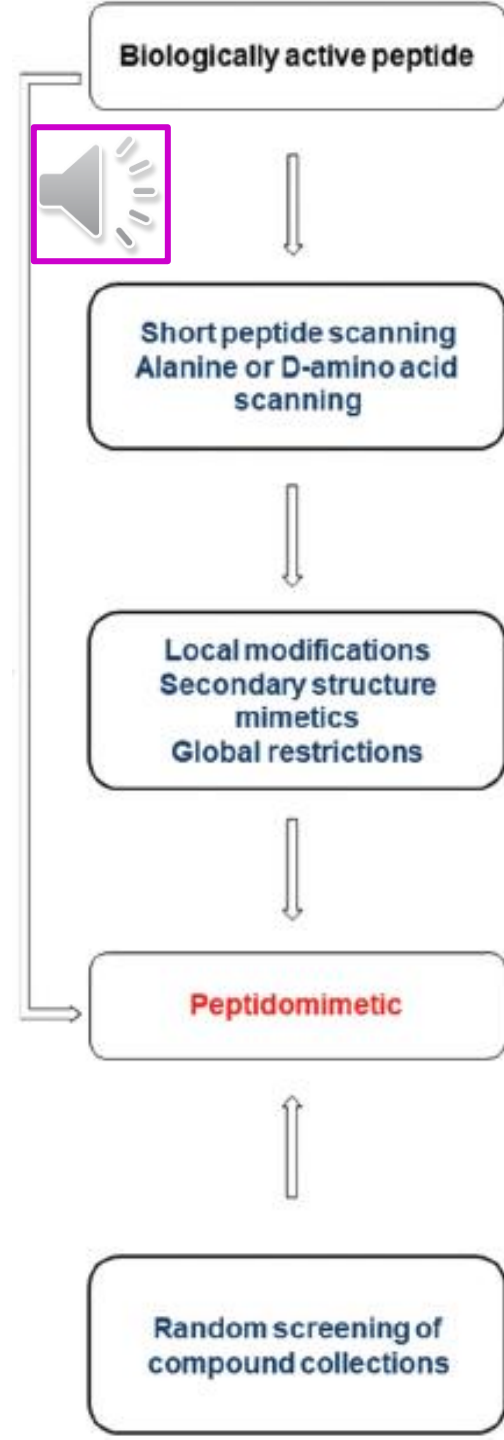


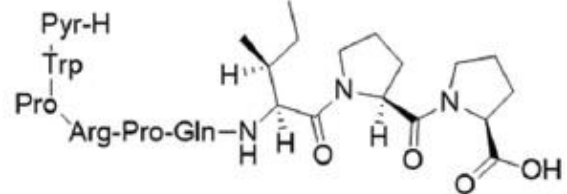
Fig. 1 Advantages of peptidomimetics over peptides.

- Nekoliko je konceptualno različitih pristupa u dizajnu peptidomimetika, a odabir strategije ovisi raspoloživim spoznajama o ciljnom proteinu (strukтури, sekvenciji, funkciji i svojstvima njegovog veznog mjesta).
- U slučaju kad je poznata sekvencija bioaktivnog peptida, za razvoj njegovih mimetika primjenjuje se hijerarhijski pristup koji se temelji na Ala-scanningu. Pri tom se sistematski sintetizira i biološki evaluira serija peptida u kojima je, u odnosu na prirodni peptid, samo jedna aminokiselina zamijenjena s Ala. Na taj se način u prirodnom bioaktivnom peptidu identificiraju ključne farmakoforne aminokiseline odgovorne za biološku aktivnost. Potom se različitim sintetskim pristupima (lokalna modifikacija, indukcija elemenata sekundarne strukture, globalne restrikcije)* optimiziraju „hit peptidomimetics” koji dalje otvaraju pristup oralno dostupnim kandidatima za lijekove.

* Lokalne modifikacije: sintetski alati korišteni za zamjenu peptidne veze, bočnog ogranka ili dipeptidnog fragmenta s konformacijski spregnutom i proteolitički stabilnom izosternom skupinom. Koristi se za razvoj inhibitora enzima i liganada za receptore. Mimeticima sekundarne strukture inducira se nabiranje u uzvojnice, okrete i β -ploče, a od ključnog su značaja za razvoj modulatora PPI. Globalnim ograničenjima peptidi se stabiliziraju u nabranoj sekundarnoj strukturi (npr. peptide stapling kojim se stabilizira uzvojnica ili ugradnja kovalentne premostnice kojom se stabilizira β -okret).

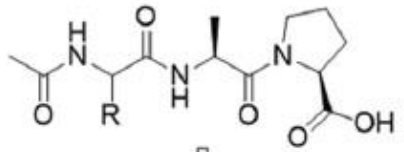


- Povijesni primjer opisanog pristupa u dizajnu peptidomimetika odnosi se na razvoj inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE) i to iz prirodnog bioaktivnog peptida teprotida.
- Ala-scanningom utvrđeno je da su farmakoforne skupine odgovorne za njegovu aktivnost dva prolinska ostatka na C-terminusu te karbonilna skupina vezana na drugi prolinski ostatak koja koordinira s katalitičkim Zn^{2+} kationom. Tako je početkom '80.-ih razvijen lijek Captopril kao jedan od najaktivnijih ACE-inhibitora.
- U cilju smanjivanja nuspojava koje je izazivao taj lijek, zamijenjena je tiolna skupina s karboksilatnom, a afinitet za S1-vezno mjesto enzima poboljšan je uvođenjem aromatske hidrofobne skupine što je dovelo do razvoja Enalaprilata i Lisinopрила, kao ACE-inhibitora druge generacije.

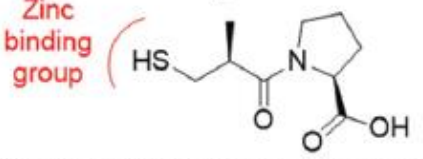


Teprotide, isolated from the venom of the brazilian viper *Bothrops jararaca*

short peptide scanning

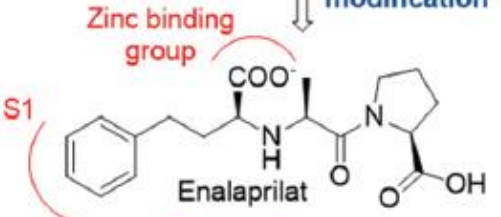


local modification



Captopril, first generation ACE inhibitor

local modification

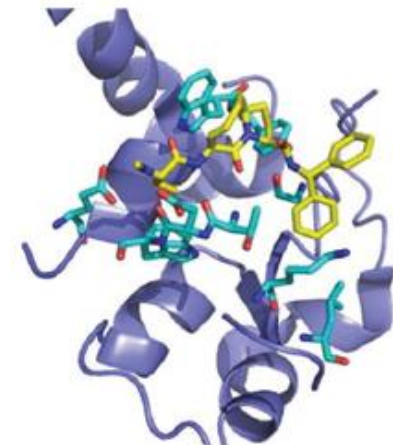
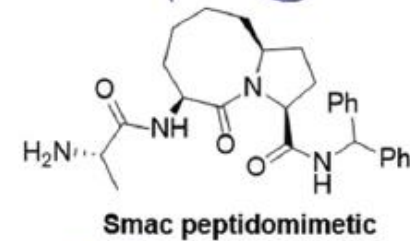
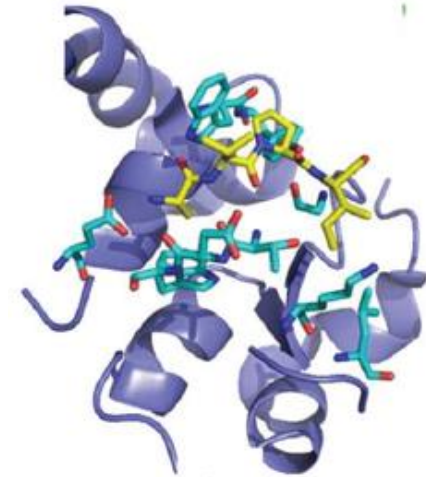
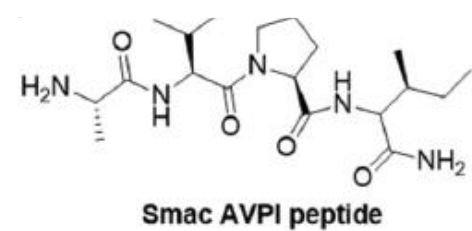


Enalaprilat



Lisinopril

Second generation ACE inhibitors

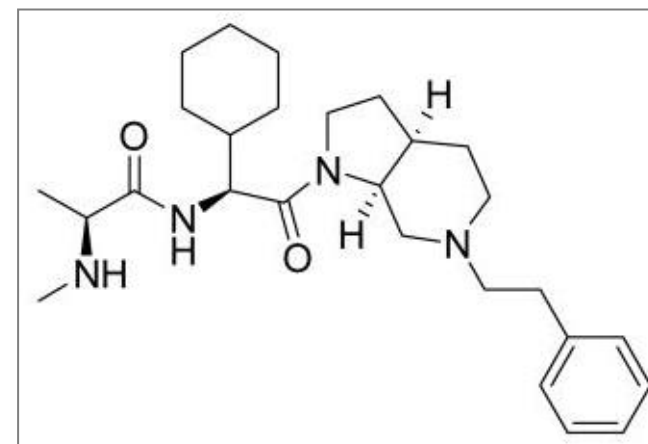
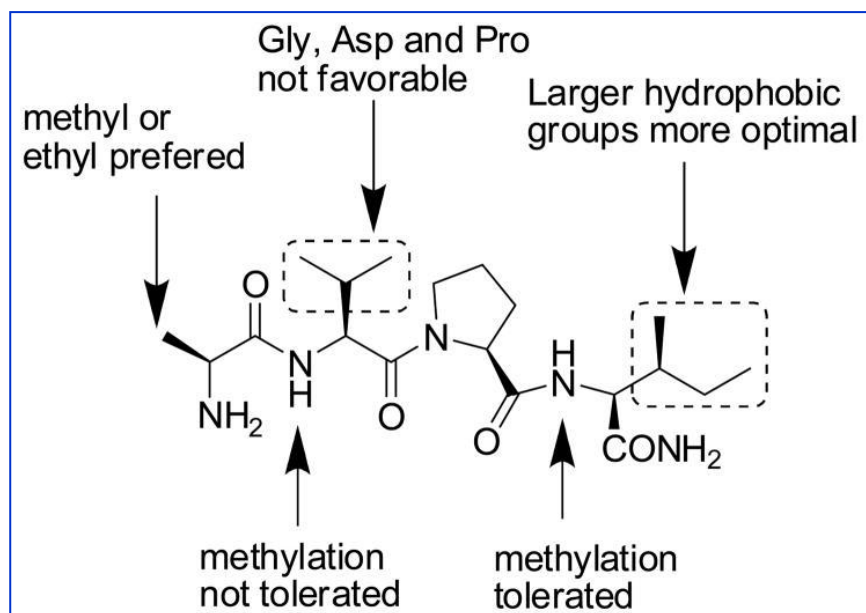


- Spomenuti koraci iz hijerarhijskog pristupa mogu se izbjeći samo pod uvjetom da je poznata 3D-struktura farmakoforne regije. U tom se slučaju racionalni dizajn peptidomimetika zasniva na interagirajućim elementima odgovornim za molekularno prepoznavanje.
- Primjer takvog pristupa je razvoj mimetika Smac-peptida AVPI koji inhibira XIAP-proteine, inhibitore apoptotskih proteina. Takvi su spojevi razvijeni na temelju kristalne strukture kompleksa Smac/XIAP, što je rezultiralo serijom konformacijski spregnutih bicikličkih mimetika Smac-peptida.
- S druge strane, ukoliko nije poznata 3D-struktura bioaktivnog peptida, jedini mogući pristup u dizajnu mimetika zasniva se na nasumičnom probiru iz velike biblioteke peptidomimetika.



Smac-peptidi

- Smac-peptidi (secund mitochondrial activator of caspases, sekundarni mitohondrijski proizveden aktivator kaspaze) imaju antagonistički učinak na proteine inhibitore apoptoze (IAPs).
- Smac ostvaruje interakciju s IAPs preko svoje **N-terminalne tetrapeptidne regije Ala-Val-Pro-Ile**.



- Mimetici koji su i do 23 puta efikasniji od prirodnih Smac-peptida mogu poslužiti kao moćno kemijsko i farmakološko oruđe za daljnje istraživanje uloge Smac-peptida u regulaciji apoptoze.

- Konformacijski spregnuti Smac mimetik (Novartis).

G. Wu et al, *Nature* 408 (2000) 1008.

R. A. Kipp et al, *Biochemistry* 41 (2002) 7344.

H. Sun et al, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 16686.

D. Vucic et al, *Biochem. J.* 385 (2005) 11.

K. Zobel et al, *Chem. Biol.* 1 (2006) 525.

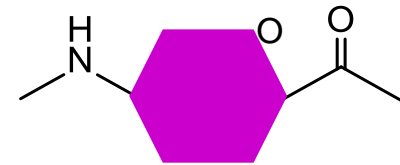
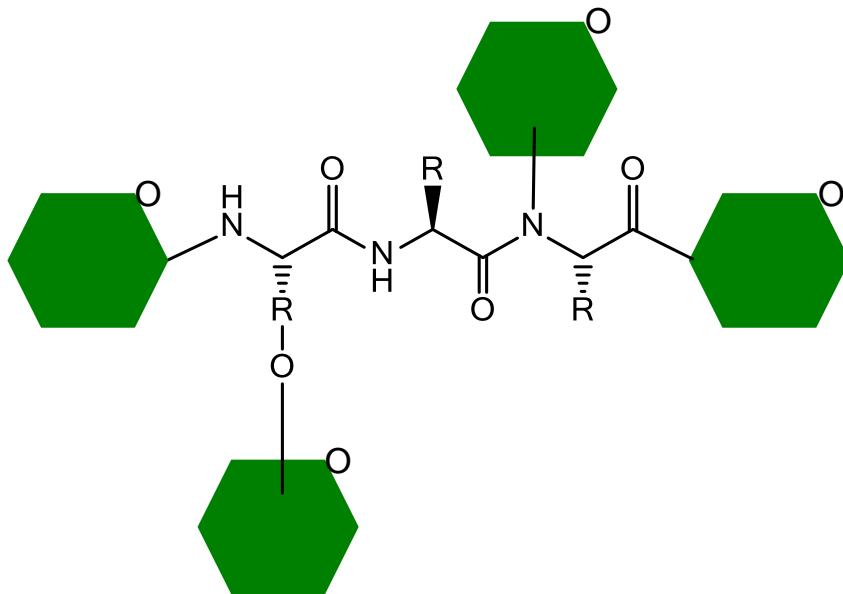
H. Sun et al, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 1264.

D. Chauhan et al, *Blood* 109 (2007) 1220.

A. Gaither et al, *Cancer Res.* 67 (2007) 11493.

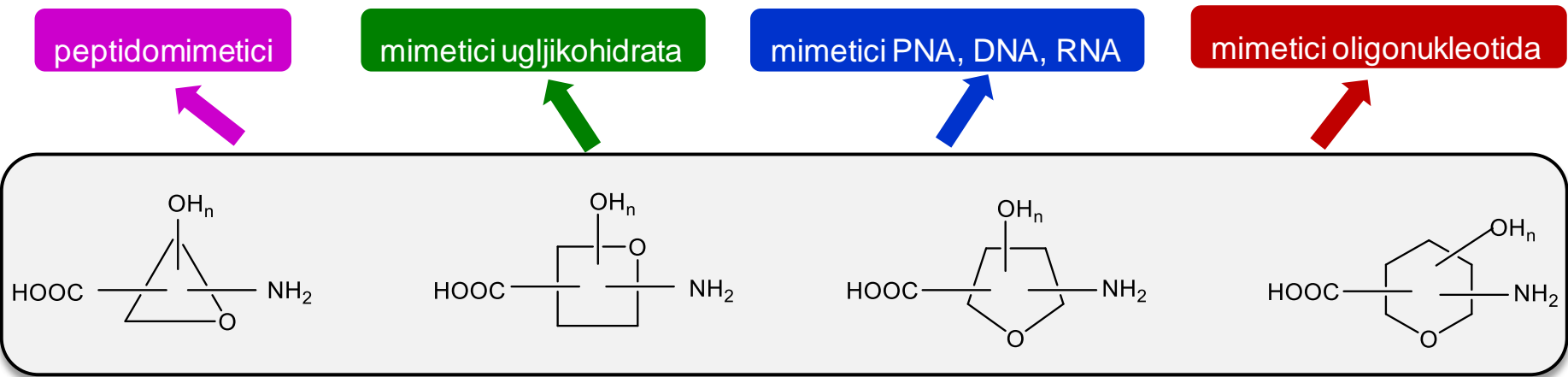
Šećerni peptidomimetici

- Umetanje šećernih “kalupa” izravno utječe na konformaciju, metaboličku stabilnost i hidrofilitnost/lipofilnost glikoziliranog peptida.
- Šećerna komponenta može biti integrirana kao *supstituent* ili kao *strukturni* element.



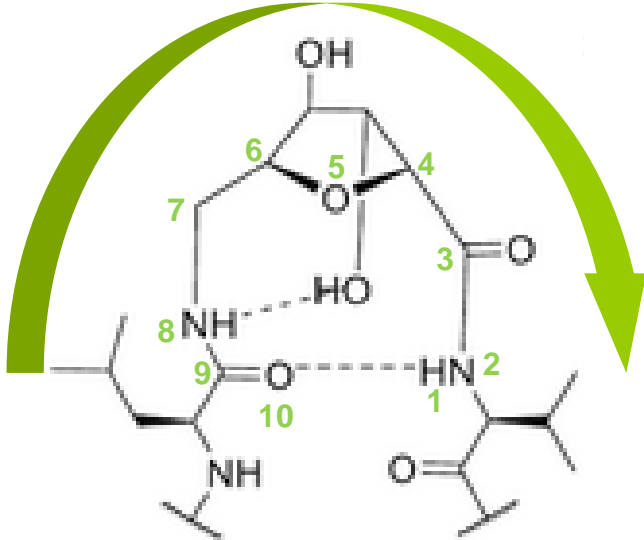
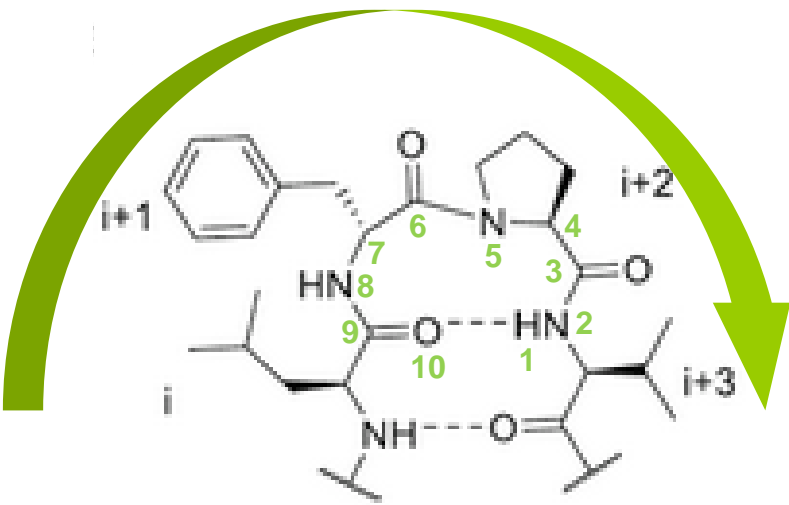
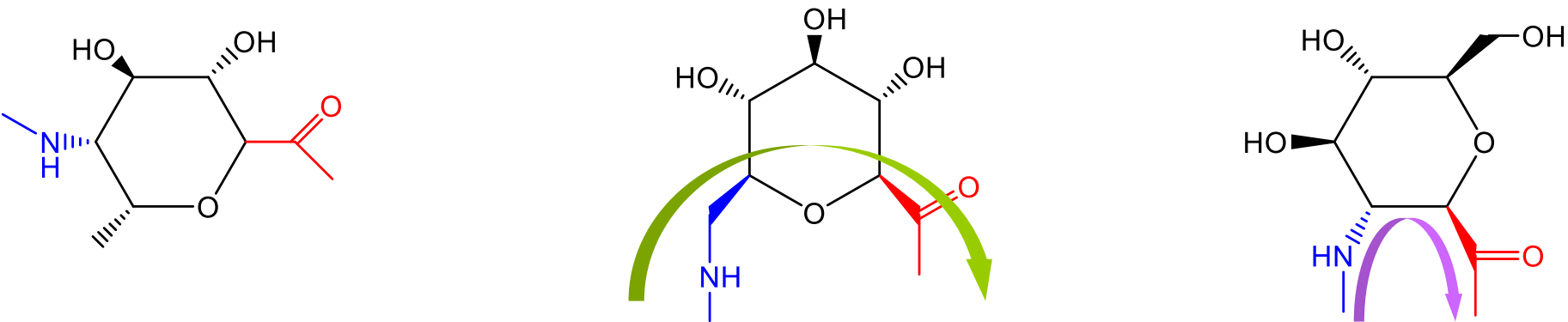
- Osim širokog izbora strukturno različitih ugljikohidrata, supstitucija dijela peptidne molekule šećernom komponentom omogućuje i izbor različitih mjesta vezanja u peptidnom lancu (rezultirajući *N*- ili *C*-terminalno vezani supstituenti utječu na njihovu otpornost prema djelovanju endopeptidaza) kao i različite tipove veza (čime se izravno utječe na biokemijska svojstva rezultirajućeg peptidomimetika).

- Šećerne aminokiseline (Sugar Amino Acids, SAA), strukturni su elementi mimetikâ peptida, oligonukleotida, ugljikohidrata, PNA, DNA i RNA. Njihovi piranozni ili furanozni prsteni sadrže najmanje jednu amino- odnosno karboksilnu skupinu.



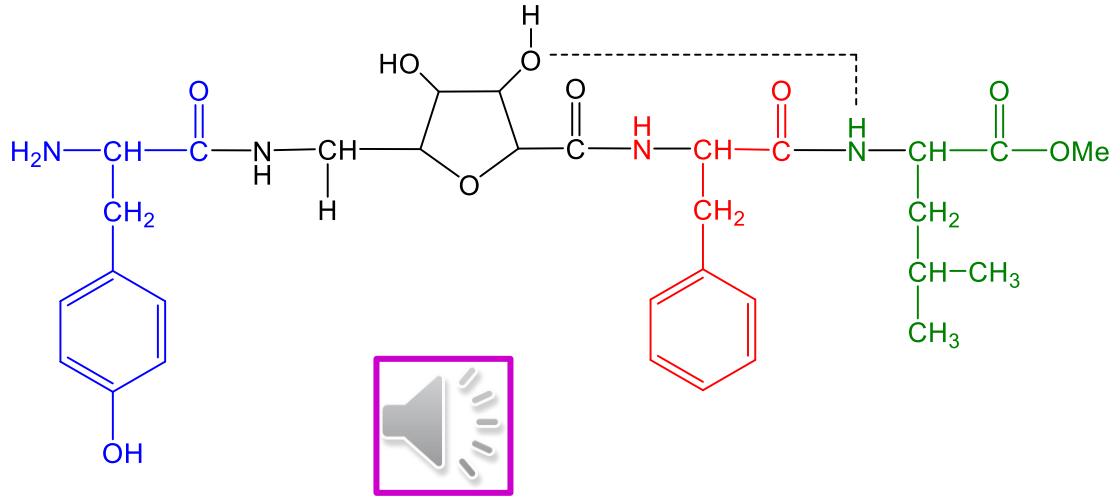
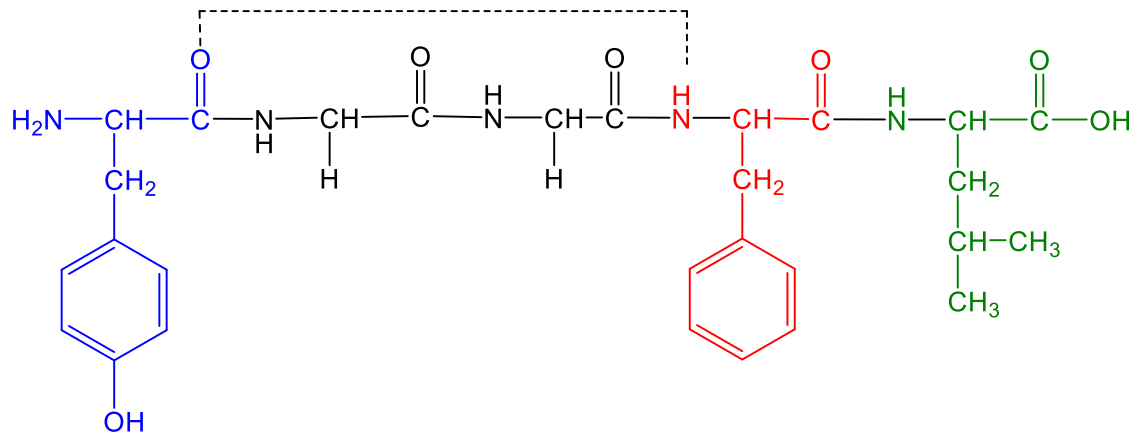
- Umetnute u peptide, šećerne aminokiseline predstavljaju male nepeptidne molekulske kalupe kao strukturne mimetike okreta u izvedenim peptidomimeticima. Pri tom rigidni šećerni kalupi zamjenjuju dio peptidne okosnice i zadržavaju sličnost s središnjom dipeptidnom sekvencijom $i+1$ i $i+2$, ali ne sadrže amidne veze što ih čini puno stabilnijima, a ujedno i konformacijski spregnutima. Sadrže amino- i karboksilnu skupinu na različitim položajima u kalupu koje su raspoložive za umetanje u peptid.
- Na hidrofobnost ili hidrofilnost ovih peptidomimetika može se utjecati zaštitom ili deprotekcijom njihovih hidroksilnih skupina.

- Ovisno o položaju funkcijskih skupina, moguće je dizajnirati šećerne aminokiseline koje na predvidljiv način utječu na konformacije i svojstva rezultirajućih peptidomimetika.
- 1,4-Disupstituirane SAA nakon umetanja u peptid ne utječu na na linearnu strukturu rezultirajućeg peptidomimetika, dok 1,5- i 1,2-disupstituirane SAA induciraju β -odn. γ -okret.

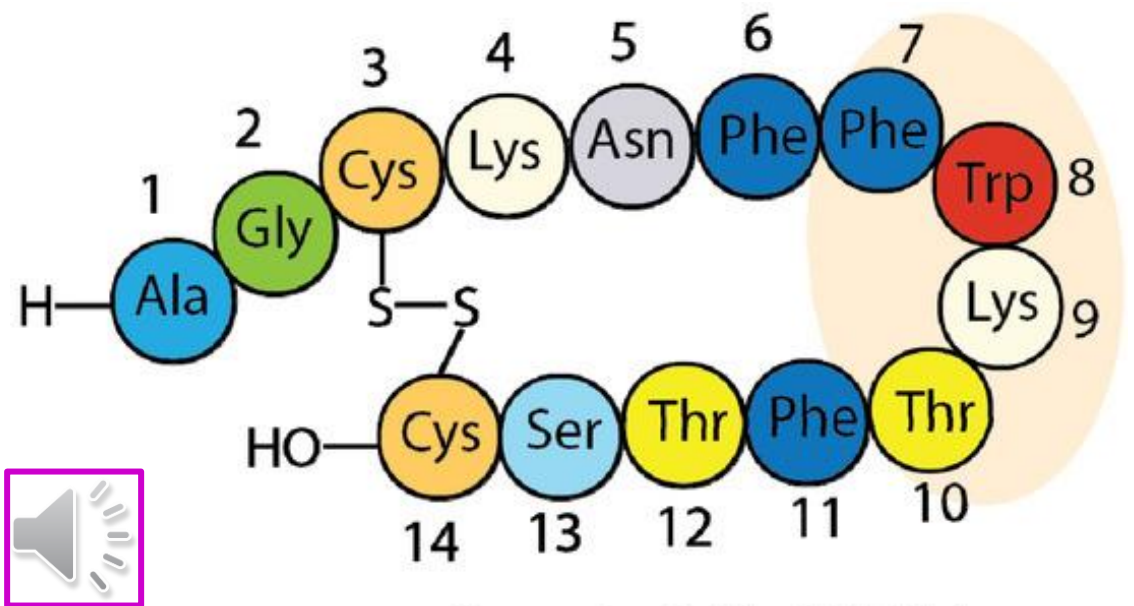


- Šećerne aminokiseline korištene su za pripravu mimetika Leu-enkefalina i somatostatina.
- Zamjenom Gly-Gly sekvencije iz Leu-enkefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu; farmakoforne skupine Tyr-ostatak i Phe-Leu dipeptid) s furanoznom SAA dobiven je analog Tyr-SAA-Phe-Leu čija bioaktivna konformacija odgovara Leu-enkefalinu.
- Slobodne hidroksilne skupine iz furanoznog prstena onemogućavaju tvorbu regularnog 10-članog prstena karakterističnog za β-okrete; hidroksilna skupina iz SAA ponaša se kao akceptor vodikove veze što rezultira 9-članim prstenom.

vodikova veza $NH_{Phe\ i+3} \cdots OC_{Tyr\ i}$ kojom se stabilizira β-okret

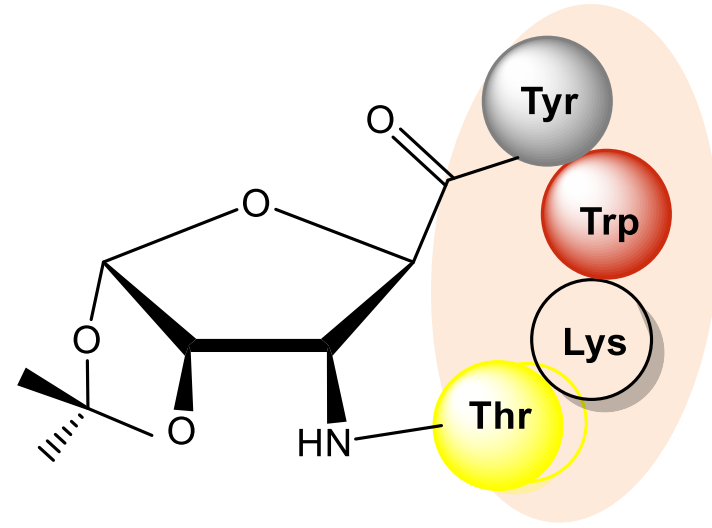


- Aminokiselinska sekvencija Phe-Trp-Lys-Thr nalazi se u regiji β -okreta (konformacija je dodatno stabilizirana disulfidnim mostom) te je stoga esencijalna za biološku aktivnost somatostatina.

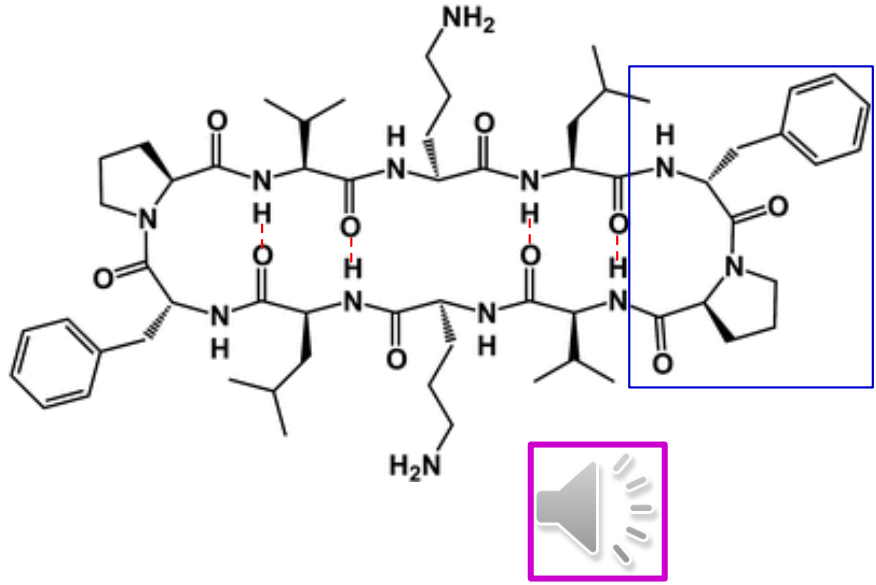


Somatostatin SRIF-14

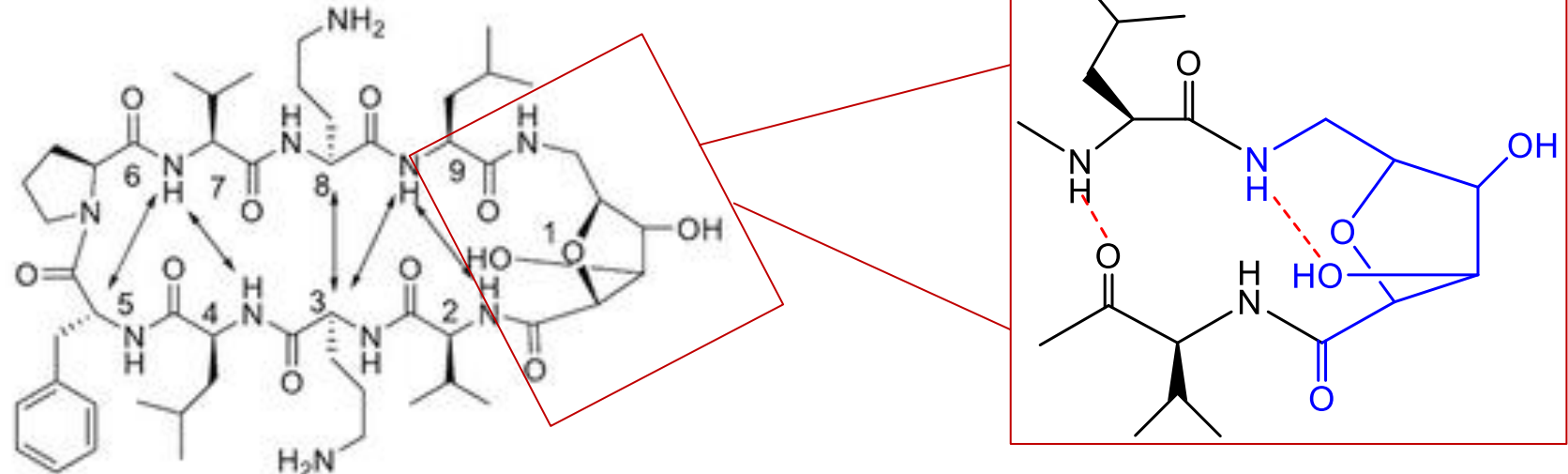
- Korištenjem furanozne SAA pripravljeni su analozi somatostatina koji su pokazali i antiproliferativni i apoptotski učinak prema stanicama karcinoma jetre. Među pripravljenim analogima, četiri su pokazali IC_{50} -vrijednosti (koncentracija lijeka potrebna za 50%-tnu inhibiciju *in vitro*) pri niskim μM koncentracijama što je preduvjet za moguću kemoterapijsku primjenu.



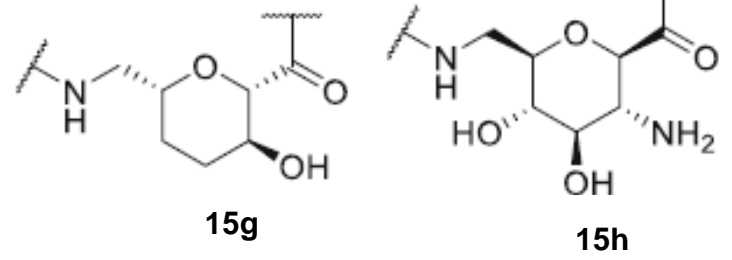
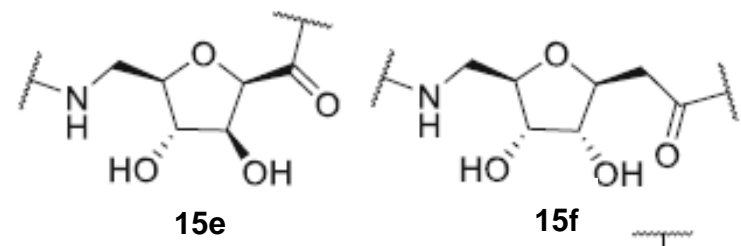
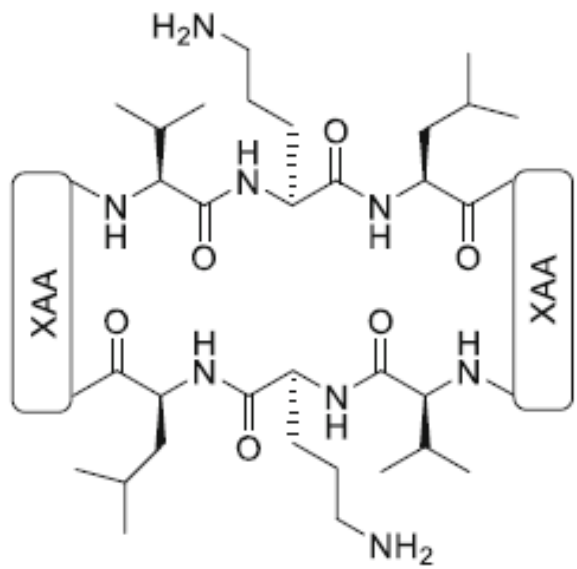
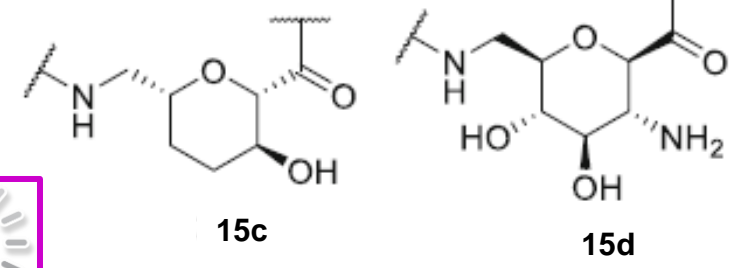
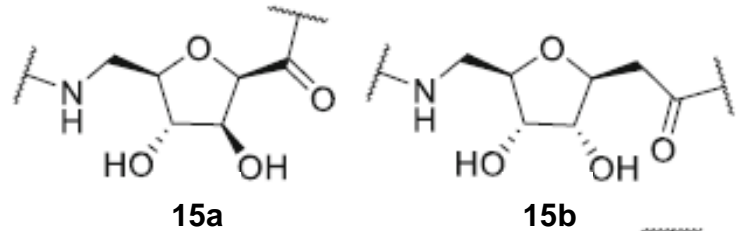
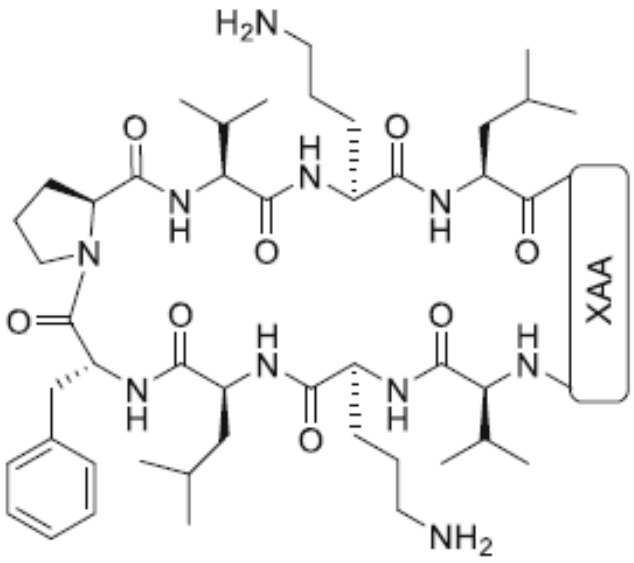
- Jedinstveno svojstvo furanoznih SAA da sudjeluju u intramolekulskim vodikovim vezama nakon umetanja u peptide iskorišteno je za pripravu mimetika gramicidina S (GS), ciklodekapeptidnog antibiotika sekvencije [ciklo(Pro-D-Phe-Leu-Orn-Val)₂] s pomoću dvaju dipeptida -Pro-D-Phe- zauzima strukturu β-okreta, dok su dva tripeptida -Leu-Orn-Val- istegnuta u konformaciju β-ploče.



- Opisani su njegovi analozi u kojima je D-Phe-Pro dipeptid zamijenjen furanoznim i piranoznim SAA čije se C₃-OH skupine i amidni protoni povezuju intramolekulskim vodikovim vezama i tako oponašaju β-okrete. NMR spektroskopskom analizom utvrđeno je da je β-ploča nađena u GS zadržana i u njegovim analozima s SAA.



- D-Phe-Pro sekvencija iz gramicidina S zamijenjena je sa SAA pri čemu su pripremljeni monosupstituirani mimetici **15a-d** te disupstituirani mimetici **15e-h**.



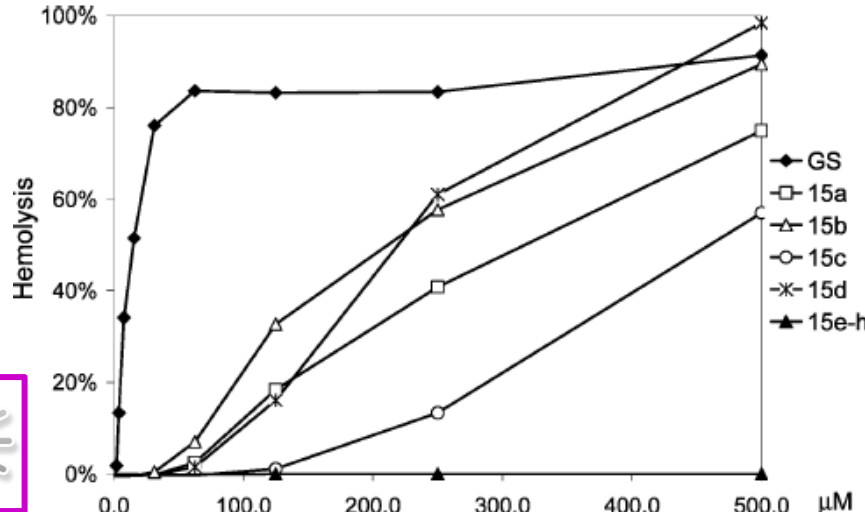
- Prema prikazanim rezultatima, zamjena D-Phe-Pro dipeptida iz regije β -okreta sa SAA rezultirala je gubitkom antibakterijske aktivnosti u monosupstituiranim mimeticima **15a-d**, s izuzetkom mimetika **15c**. Nadalje, disupstitucija u mimeticima **15e-h** rezultirala je potpunim gubitkom antibakterijske aktivnosti.

TABLE 1. Antimicrobial Activity (MIC in $\mu\text{g/mL}$)^e

peptide	<i>S. aureus</i> ^a		<i>S. epidermidis</i> ^a		<i>S. epidermidis</i> ^a		<i>B. cereus</i> ^a		<i>E. coli</i> ^b		<i>P. aeruginosa</i> ^b	
	25W ^c	MT ^d	25W ^c	MT ^d	25W ^c	MT ^d	25W ^c	MT ^d	25W ^c	MT ^d	25W ^c	MT ^d
GS	4	4	2	2	8	8	2	4	64->64	>64	>64	>64
15a	64	64	8-16	16-32	>64	>64	16	16-32	>64	>64	>64	>64
15b	>64	>64	32-64	32-64	>64	>64	32	64->64	>64	>64	>64	>64
15c	32	64	16	16	>64	>64	>64	16-32	>64	>64	>64	>64
15d	64	>64	16	16	>64	>64	16-32	64	>64	>64	>64	>64
15e	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15f	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15g	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
15h	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64

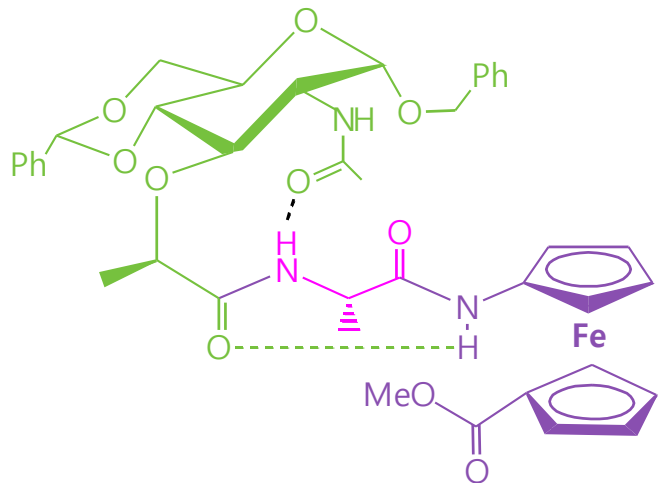
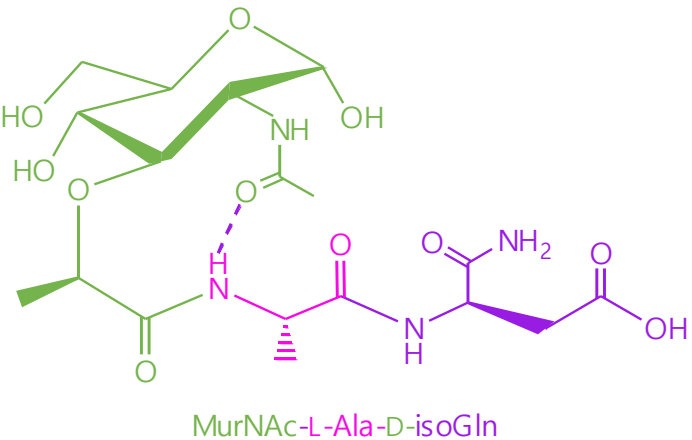
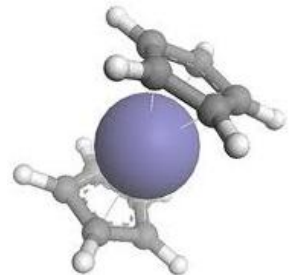
^a Gram-positive. ^b Gram-negative. ^c 3 mL/25 well plates. ^d 100 μL /96 microtiter plates. ^e Measurements were executed using standard agar 2-fold dilution techniques.

- Testovi hemolitičke aktivnosti protiv humanih eritrocita ukazuju na reducirani toksični profil monosupstituiranih mimetika **15a-d**; izraziti hemolitički učinak pokazuju tek pri 500 μM , dok isti učinak nativni gramicidin S pokazuje već pri 32 μM . Disupstitucijom (mimeticima **15e-h**) potpuno je reducirana hemolitička aktivnost. Iz dobivenih rezultata zaključuje se da je terapijska vrijednost ovih mimetika vrlo ograničena.



- Među prirodnim SAA posebno mjesto zauzima muraminska kiselina prisutna u staničnim stijenkama gotovo svih bakterija.
- Muropeptidi, konjugati muraminske i prirodnih aminokiselina imaju ulogu imunoadjuvanata. Najmanja strukturna komponenta potrebna za adjuvantsku aktivnost jest *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (MurNAc-L-Ala-D-izoGln, muramil-dipeptid, MDP).

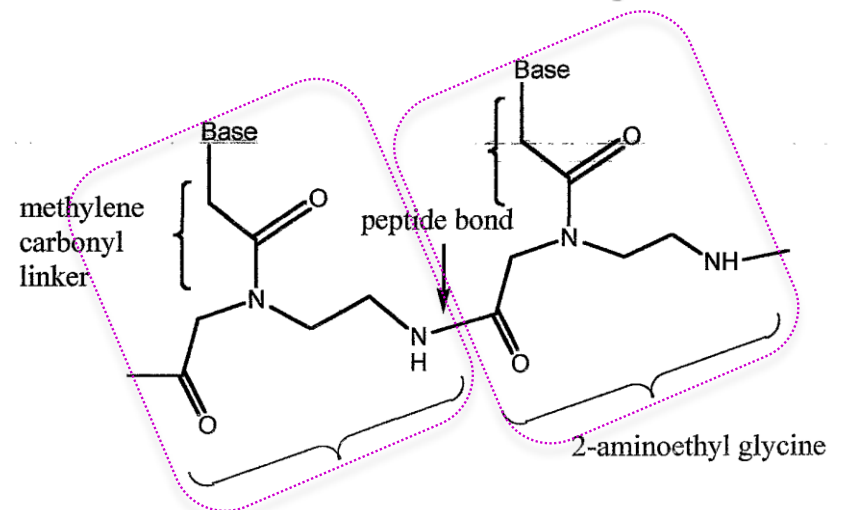
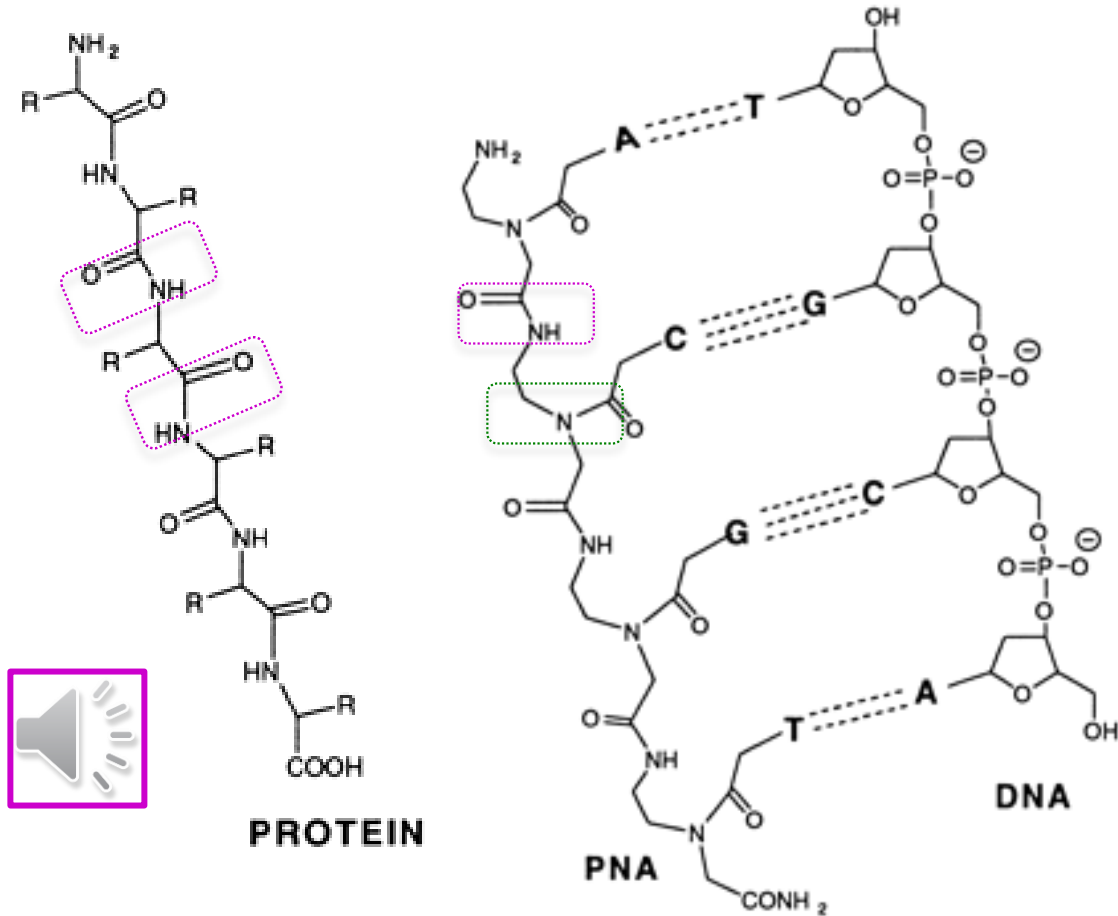
- Ferocenski analog muramildipeptida: zamjena D-izoGln podjedinice s Fca (ferocenskom aminokiselinom) dovodi do stvaranja dodatne intramolekulske veze $NH_{Fca} \cdots CO_{Lac}$, uz $NH_{Ala} \cdots CO_{NHAc}$ prisutnoj u nativnom MDP.



-
- I. Jerić, Kem. Ind. 53 (2004) 495.*
- B. G. Davis et al, Synlett (1999) 1495.*
- B. G. Davis, Chem. Rev. 102 (2002) 579.*
- S. A. W. Gruner et al, Chem. Rev. 102 (2002) 491.*
- E. Lohof et al. JAI Press, Stanford, 2002.*
- G. Baschang, Tetrahedron 45 (1989) 6331.*
- R. Schauer, Glycoconjugate J. 17 (2000) 485.*
- M. J. Kiefel et al, Chem. Rev. 102 (2002) 471.*
- S. Femandjian et al, Carbohydr. Res. 162 (1987) 23.*
- Y. Boulanger et al, Tetrahedron 48 (1992) 8855.*
- L. Barišić et al, Carbohydrate Research 346 (2011) 678.*

Peptidne nukleinske kiseline (PNA) kao mimetici DNA

- Peptidne nukleinske kiseline (PNA) su oligonukleotidni analozi DNA u kojima je negativno nabijena šećerno-fosfatna okosnica zamijenjena s neutralnim **pseudopeptidnim kosturom**. Sastavljene su iz ponavljajućih **N-(2-aminoetil)-glicinskih** podjedinica povezanih peptidnim vezama. Purinske i pirimidinske baze vezane su za pseudopeptidnu okosnicu metilensko- karbonilnim spojinicama.
- Za razliku od DNA, ne sadrže šećerne i fosfatne podjedinice, a ipak oponašaju DNA, nerijetko pokazujući i superiorna svojstva. Jedinstvena fizikalno-kemijska i biološka svojstva PNA otvaraju mogućnost za njihovu biološku, dijagnostičku i terapijsku primjenu.



- Vezuju se na komplementarnu DNA i RNA, stvarajući PNA-DNA i PNA-RNA hibride iznimne kemijske i biološke stabilnosti (kombiniraju sposobnost pohranjivanja informacija (DNA) s kemijskom i metaboličkom stabilnošću pseudopeptidne okosnice okosnice).
- Zahvaljujući neutralnoj okosnici i odgovarajućoj udaljenosti između baza, PNA se za komplementarne nukleinske kiseline vezuje s većim afinitetom i specifičnošću u odnosu na oligonukleotide. Izostanak elektrostatskih odbijanja između PNA i DNA čini njihovo vezivanje znatno jačim u odnosu na vezivanje DNA i DNA.
- PNA su otporne na enzimsku degradaciju (nukleaze i proteaze ne prepoznaju njihovu pseudopeptidnu okosnicu na koju su vezani purin i pirimidin). Osim biološke stabilnosti, PNA su stabilne prema različitim kemijskim agensima i pri širokom rasponu pH.
- PNA se mogu dizajnirati tako da prepoznaju i hibridiziraju s komplementarnim sekvencijama određenog gena i na taj se način upliću u transkripciju (antigenska strategija). Isto tako mogu se dizajnirati da prepoznaju i hibridiziraju s komplementarnim sekvencijama iz mRNA i tako inhibiraju translaciju.

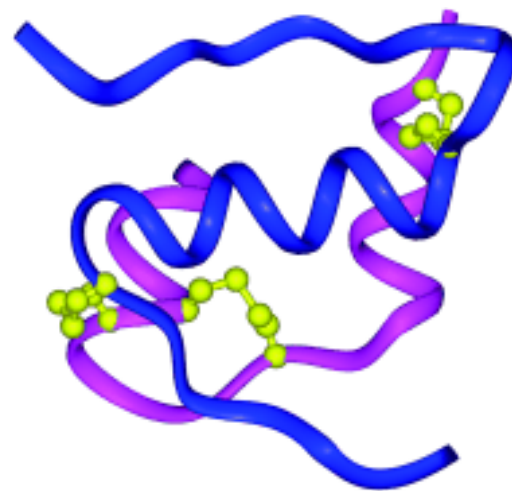
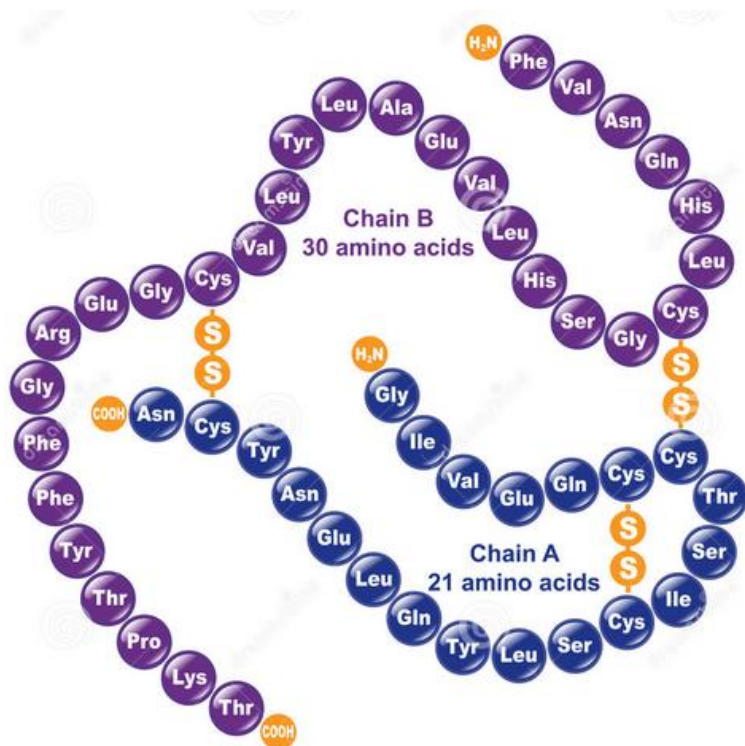


V. Menchise et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 12021.

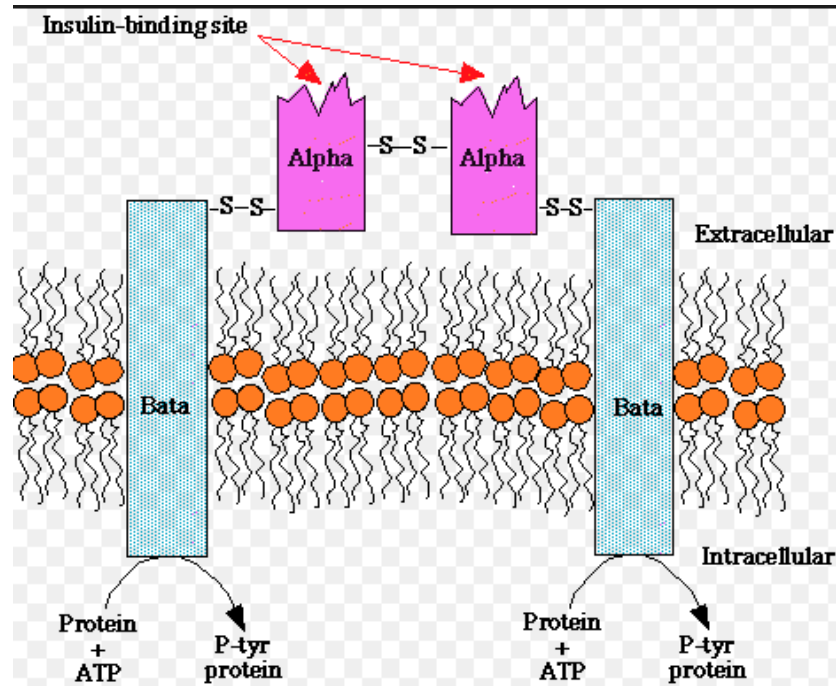
A. Ray et al, *The FASEB Journal* 14 (2000) 1041.

B. Armitage et al, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 715.

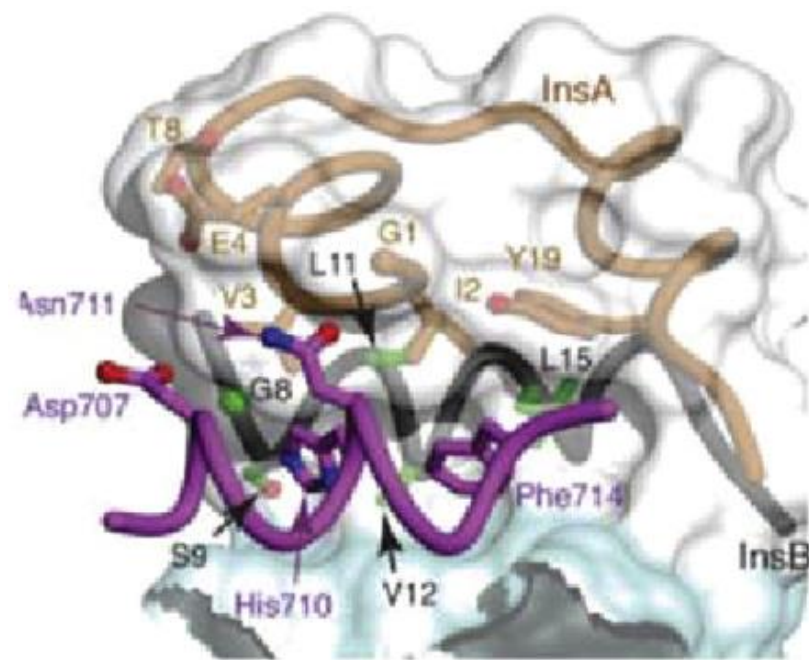
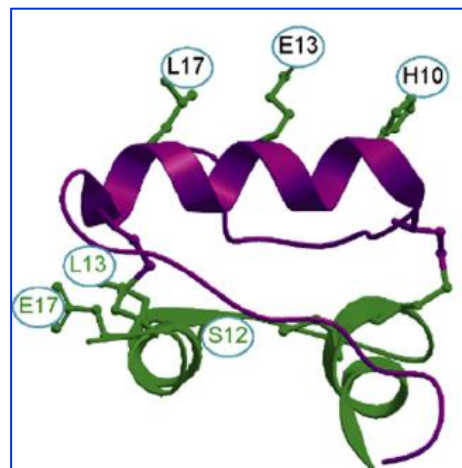
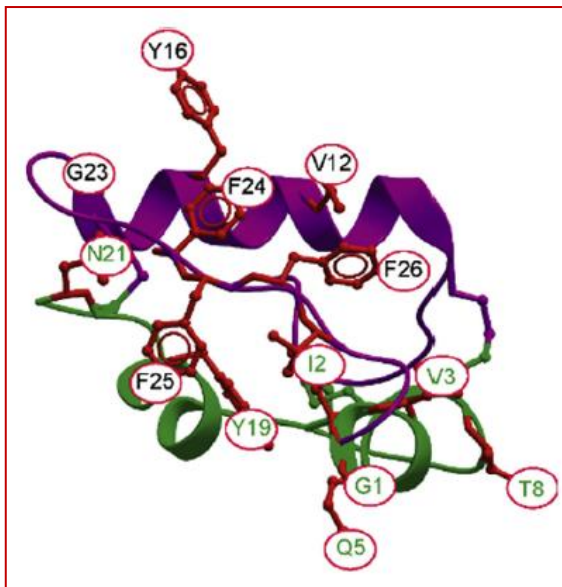
- Inzulin**, hormon koji izaziva cijeli spektar različitih bioloških odgovora nakon vezivanja na površinu receptora, sastoji se iz dvaju peptidnih lanaca [A (21 aminokiselina) i B (30 aminokiselina)] povezanih disulfidnim vezama.



- Inzulinski receptor (IR) je transmembranski protein kinaza, čija se struktura sastoji iz dvaju $\alpha\beta$ monomera. Ekstracelularne α -podjedinice vezuju se jedna s drugom, kao i na β -podjedinicu, disulfidnim vezama.



- Biokemijskom i strukturnom karakterizacijom identificirana su dva vezna mjesta u molekuli inzulina. **Primarno ili klasično vezno mjesto 1** uključuje 13 ostataka koji tvore površinu inzulinskog dimera. **Sekundarno vezno mjesto 2** sastoji se iz 6 ostataka koji tvore površinu inzulinskog heksamera. Prilikom vezivanja na inzulinski receptor (IR) dolazi do disocijacije inaktivnih dimera i heksamera u aktivne monomerne oblike.
- Na slici desno prikazana je dodirna međupovršina između receptorske α -CT (C-terminalne) domene (ljubičasto) i inzulinskih lanaca (A-lanac smeđe, B-lanac crno). Dva ključna ostataka iz α -CT segmenta (**His⁷¹⁰** i **Phe⁷¹⁴**) u interakciji su s inzulinskim ostacima; **His⁷¹⁰** ostvaruje interakciju s **Val^{A3}**, **Gly^{B8}**, **Ser^{B9}**, dok je **Phe⁷¹⁴** u interakciji s **Gly^{A1}**, **Ile^{A2}**, **Tyr^{A19}**, **Leu^{B11}**, **Val^{B12}** i **Leu^{B15}**.



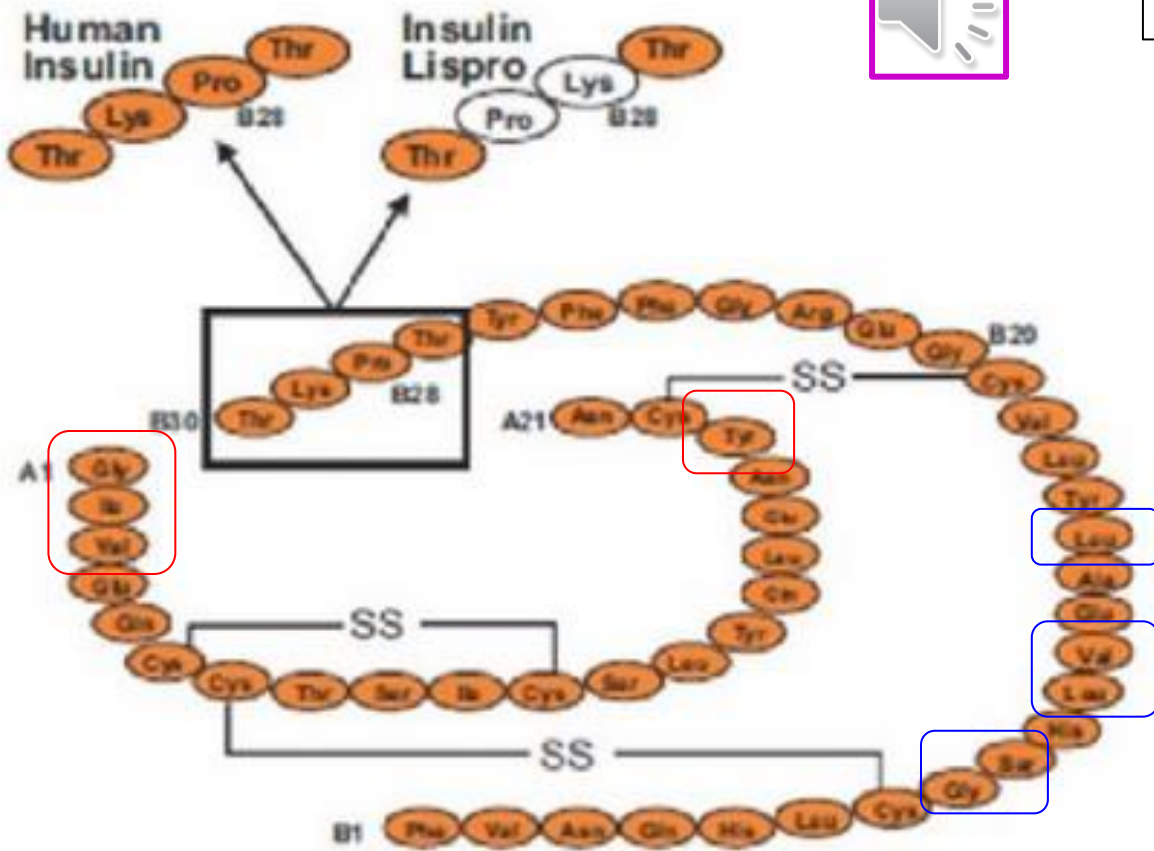
• Izrazito složena interakcija između inzulina i njegovog receptora otežava razvoj mimetika, jer svako skraćivanje ili minimiziranje strukture inzulina značajno utječe na biološka svojstva. Stoga su i do sada opisani i klinički primjenjivani mimetici inzulina građeni iz dvaju peptidnih lanaca, pri čemu su njihova farmakokinetička svojstva prilagođena određenim skupinama pacijenata.

- Humalog ili lispro-inzulin (Eli Lilly and Co.): mimetik baziran je na inverziji položaja **Pro^{B28}** i **Lys^{B29}** (HALMED 25-02-2013 odobreno).



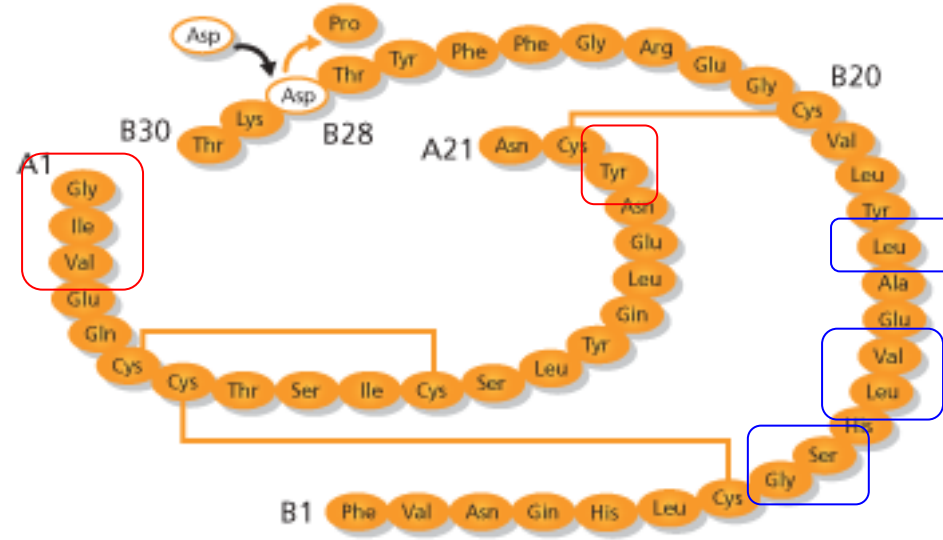
Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Tyr^{A19}
 Gly^{B8}, Ser^{B9}, Leu^{B11}, Val^{B12}, Leu^{B15}

Prepoznavajuća domena (ostatci koji sudjeluju u interakciji s inzulinskim receptorom)

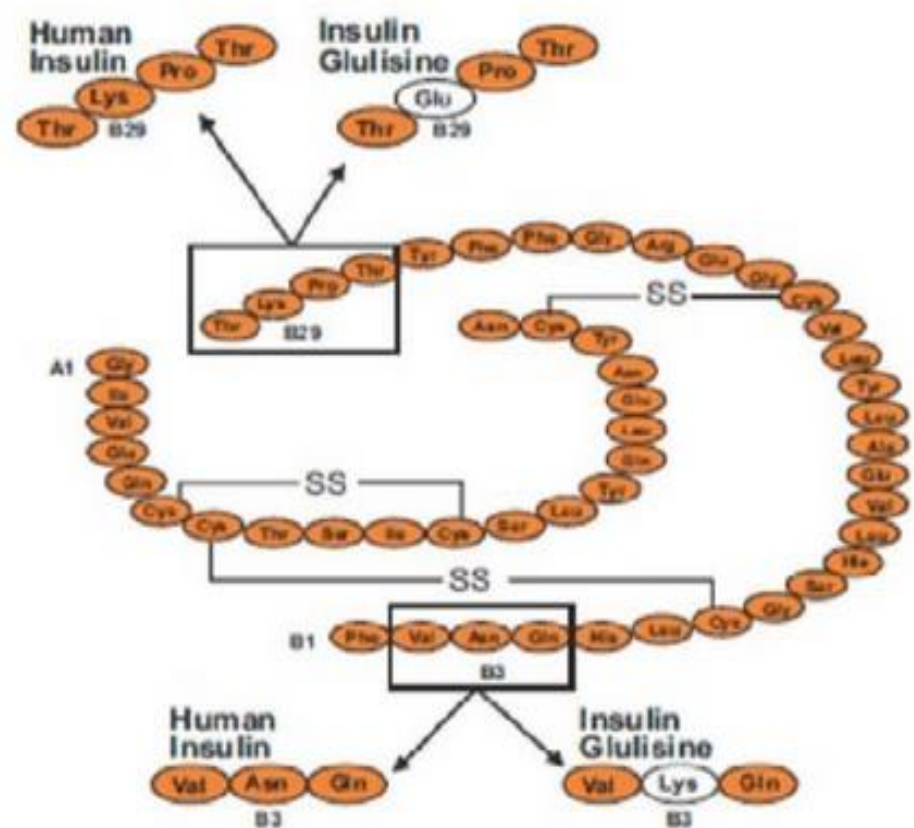


Novolog (Novo-Nordisk) mimetik baziran je na supstituciji **Asp s Pro** na položaju **B28**. Odlikuje se sličnim svojstvima kao i Humalog.

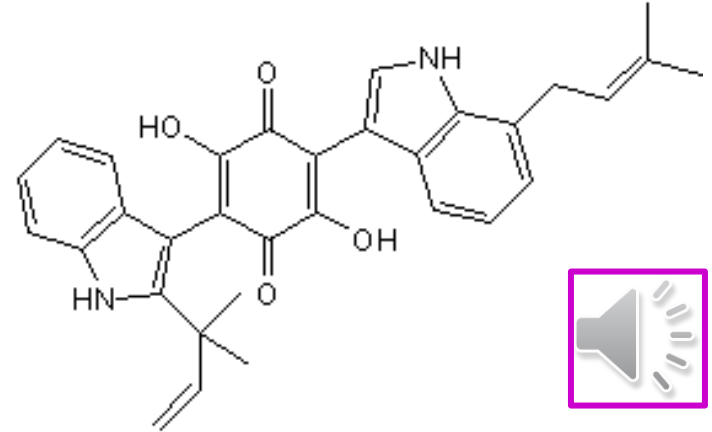
Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Tyr^{A19}
 Gly^{B8}, Ser^{B9}, Leu^{B11}, Val^{B12}, Leu^{B15}



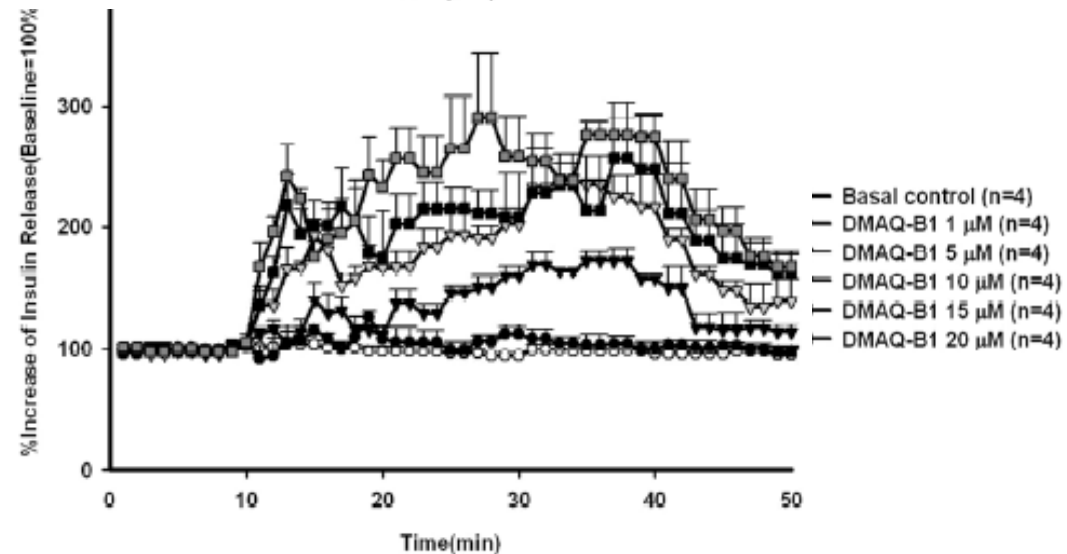
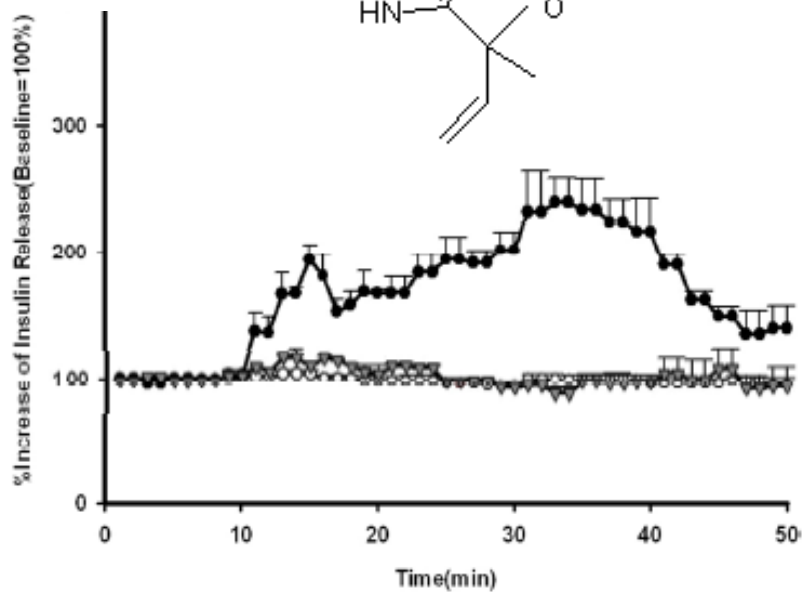
Apidra ili glulizin (Sanofi-Aventis): mimetik je baziran na supstituciji **Glu s Lys** na položaju **B29** te supstitucijom **Lys s Asn** na položaju **B3**. Po svojim farmakokinetičkim i farmakodinamskim svojstvima usporediv je s Humalogom. (HALMED 21-05-2013 odobreno).



- Nakon ekstenzivnog proučavanja preko 50000 uzoraka smjesa sintetskih spojeva i prirodnih produkata, 1999. identificiran je i iz fungalnog ekstrakta izoliran demetil-asterikinon B1 (DMAQ-B1) koji se pokazao aktivatorom inzulinskog receptora tirozin-kinaze *in vitro*.

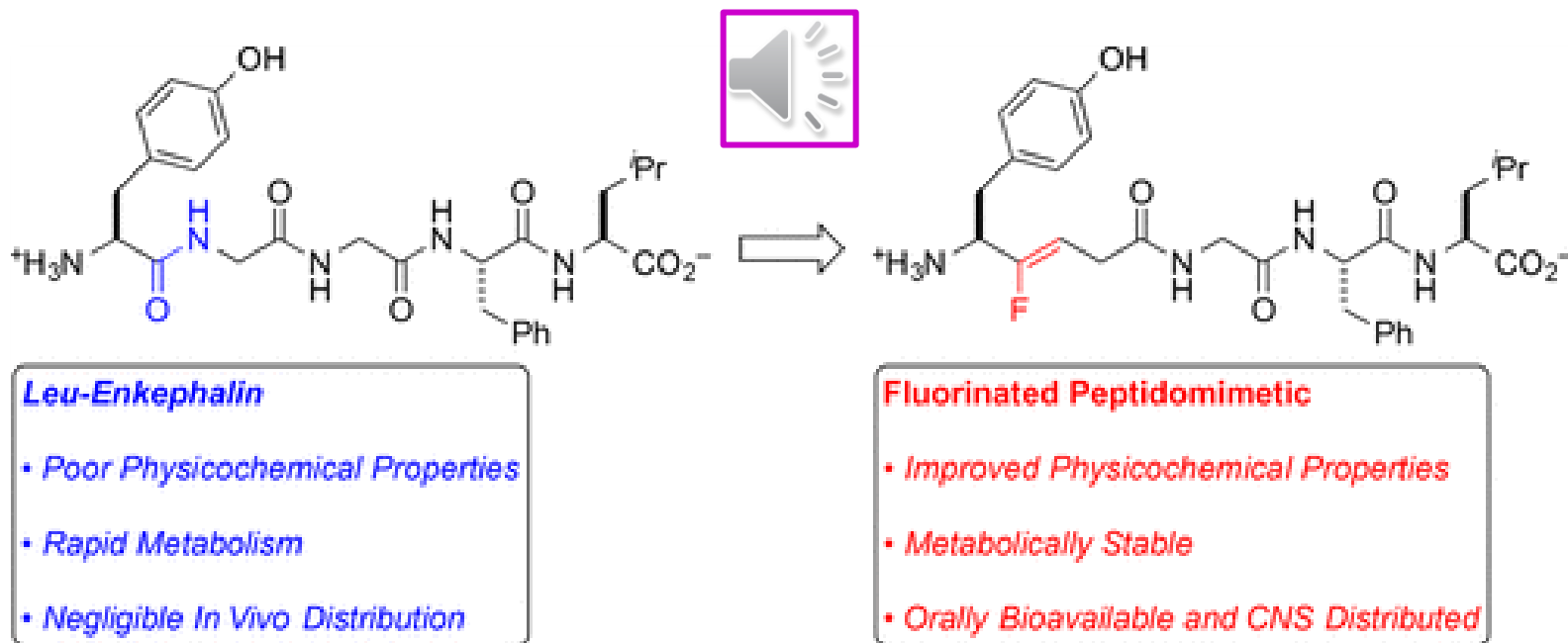


- Utvrđen je izravan učinak DMAQ-B1 na izlučivanje inzulina u gušterači štakora. Nakon tretiranja s 10 μ M DMAQ-B1, izmjereno je pojačano izlučivanje inzulina, s porastom od 240%. U sljedećem je testu mijenjana koncentracija DMAQ-B1 (1, 5, 10, 15 i 20 μ M), pri čemu je utvrđeno da izlučivanje inzulina ovisi o dozi DMAQ-B1; izmjerene koncentracije izlučenog inzulina bile su povećane za 126%, 172%, 256% odnosno 291% u odnosu na kontrolu.

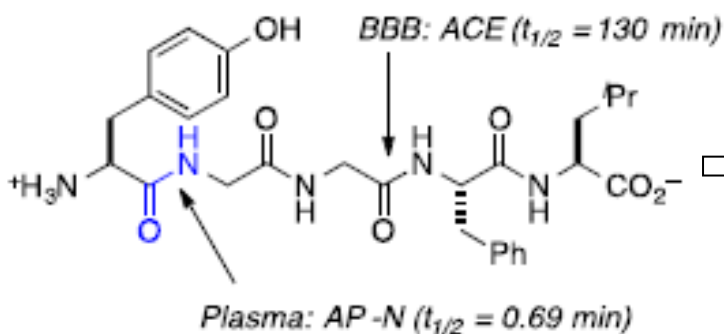


B. Zhang et al, Science 284 (1999) 974.
 M.-C. Lai et al, Journal of Diabetes Mellitus 3 (2013) 116

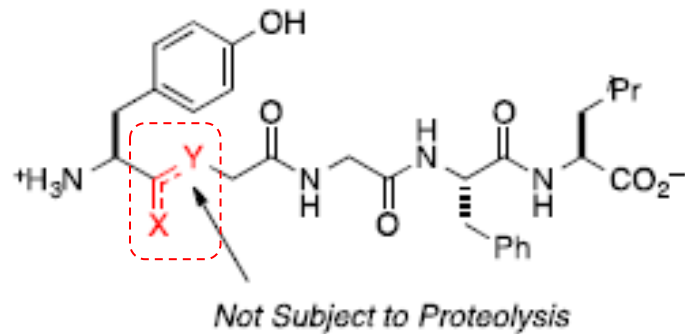
- Mimetik Leu-enkefalina:** opioidni peptidi imaju ulogu ključnih regulatora u različitim staničnim biološkim odgovorima, te bi se kao takvi mogli koristiti u terapiji različitih patoloških stanja. Nažalost, korištenje peptidnih agenasa čije su mete opioidni receptori ograničeno je njihovim lošim fizikalno-kemijskim i farmakokinetičkim svojstvima poput niske lipofilnosti (logD), velike topološke polarne površine (TPSA) te sudjelovanja u vodikovim interakcijama s vodom [kao donori (HBD) i akceptori (HBA) vodikove veze], što za posljedicu ima nisku oralnu biodostupnost kao i otežano svladavanje krvno-moždane barijere. Pored toga, podložnost proteolitičkoj degradaciji negativno utječe na terapijski relevantne koncentracije i distribuciju u tkivima. Stoga je za terapijsku primjenu malih peptida poput Leu-enkefalina nužno modificirati fizikalno-kemijska i farmakokinetička svojstva te olakšati ulazak u središnji živčani sustav, što je moguće postići primjenom njegovih fluoriranih peptidomimetika.



Leu-Enkephalin (1)



FMPs Analogs

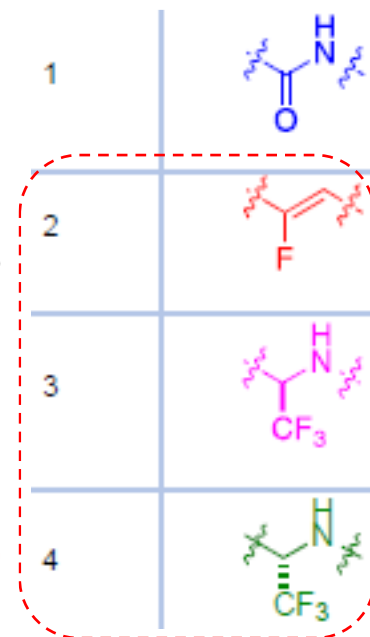


Problematic Physicochemical Properties

- logP/logD
- HBD/HBA
- TPSA
- Proteolytic Stability

Improved Properties

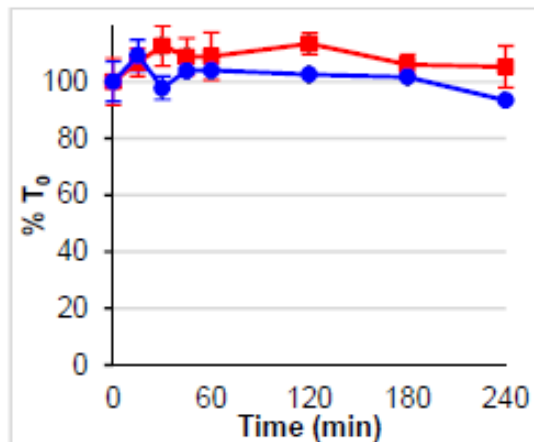
- logP/logD
- HBD/HBA
- TPSA
- Proteolytic Stability



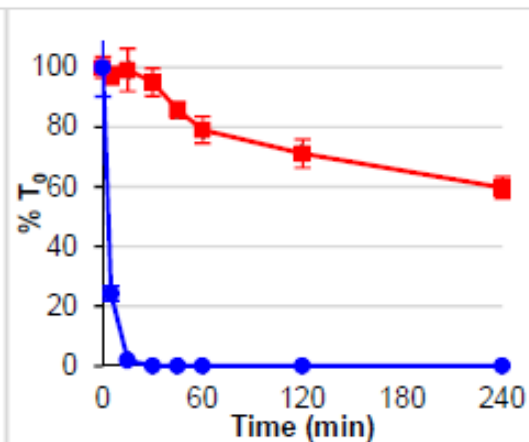
- U odnosu na [Leu-enkefalin](#), **fluoro-alkenski analog** pokazuje izvrsnu stabilnost u dvije različite vrste plazme, čime su dokazana unaprijeđena svojstva mimetika u odnosu na prirodni peptid.



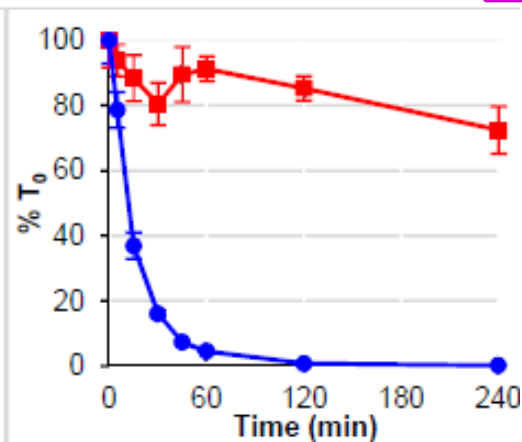
A) Mouse Plasma Stability



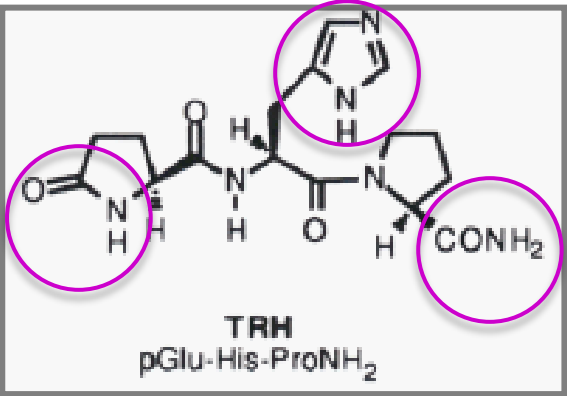
B) Rat Plasma Stability



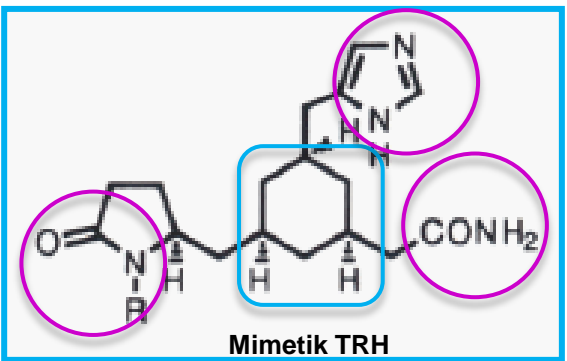
C) Human Plasma Stability



- **Tireotropin oslobađajući hormon (TRH):** regulira izlučivanje tireotropina (TSH) odgovornog za rad štitnjače.

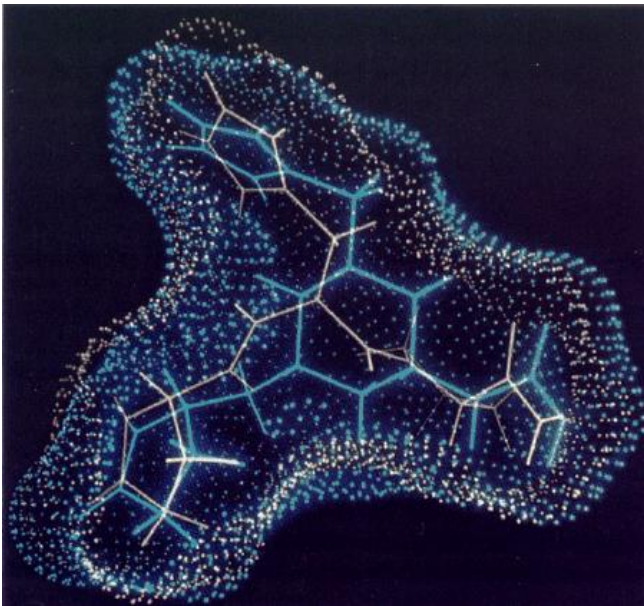


- Na temelju sudjelovanja u otpuštanju TSH i afinitetu za vezivanje na receptor, identificirane su **farmakoforne i bioaktivne regije** u TRH.



- Prostorna orijentacija farmakofornih skupina zadržava se **zamjenom peptidne okosnice s 1,3,5-trisupstituiranom cikloheksanom** koji pridonosi hidrofobnom karakteru rezultirajućega mimetika.

- Mimetik se, za razliku od TRH, odlikuje oralnom biodostupnošću.



G. L. Olson et al, J. Med. Chem. 36 (1993) 3039.

Antimikrobni peptidni mimetici aktivni prema oralnim patogenima



- Antimikrobni peptidi (AMP) su prirodni antibiotici širokog spektra djelovanja. Glavne zapreke u njihovoj primjeni (visoka cijena proizvodnje i proteolitička nestabilnost) prevladavaju se primjenom odgovarajućih mimetika.
- *Meta*-fenil-etin (*mPE*), dizajniran tako da oponaša amfipatsku strukturu magainina, ostvaruje antimikrobnu aktivnost prema uzročnicima oralnih infekcija pri nM koncentracijama.
- SAR-studije pokazuju da *mPE* inhibira bioaktivnost lipopolisaharida te se veže na DNA služeći istovremeno i kao membranski aktivna molekula i kao intracelularni antibiotik.

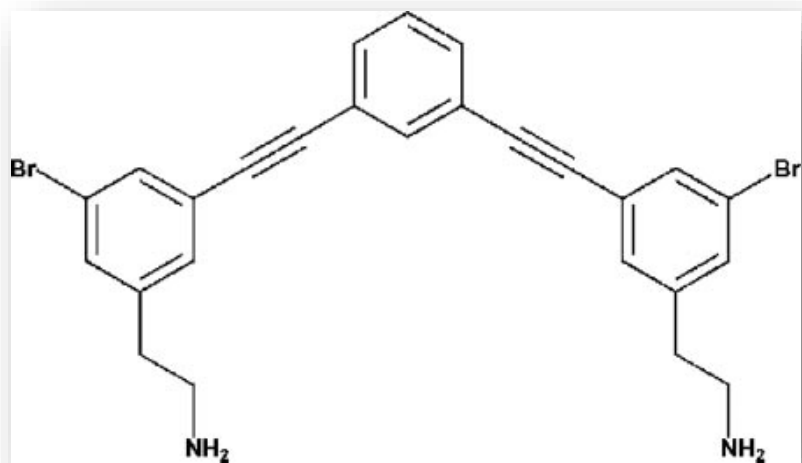
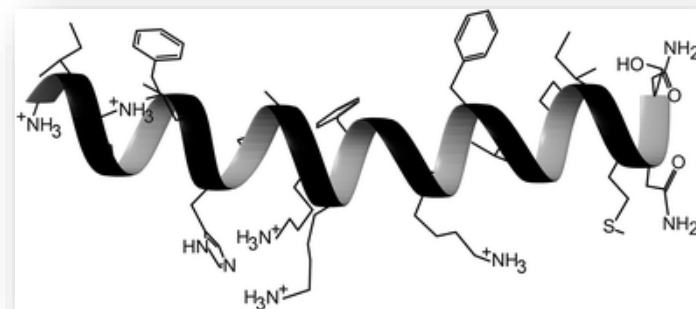
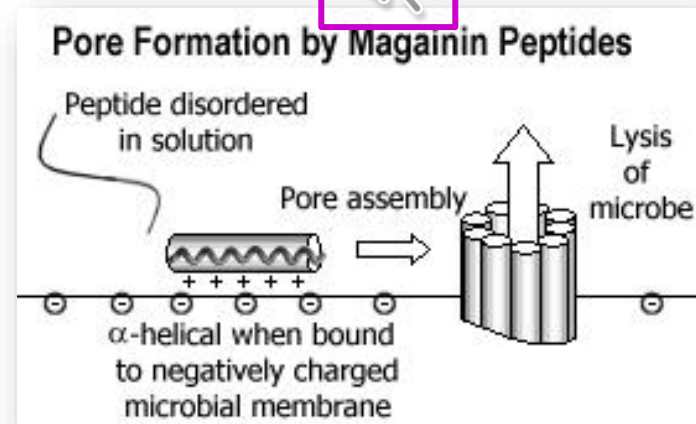


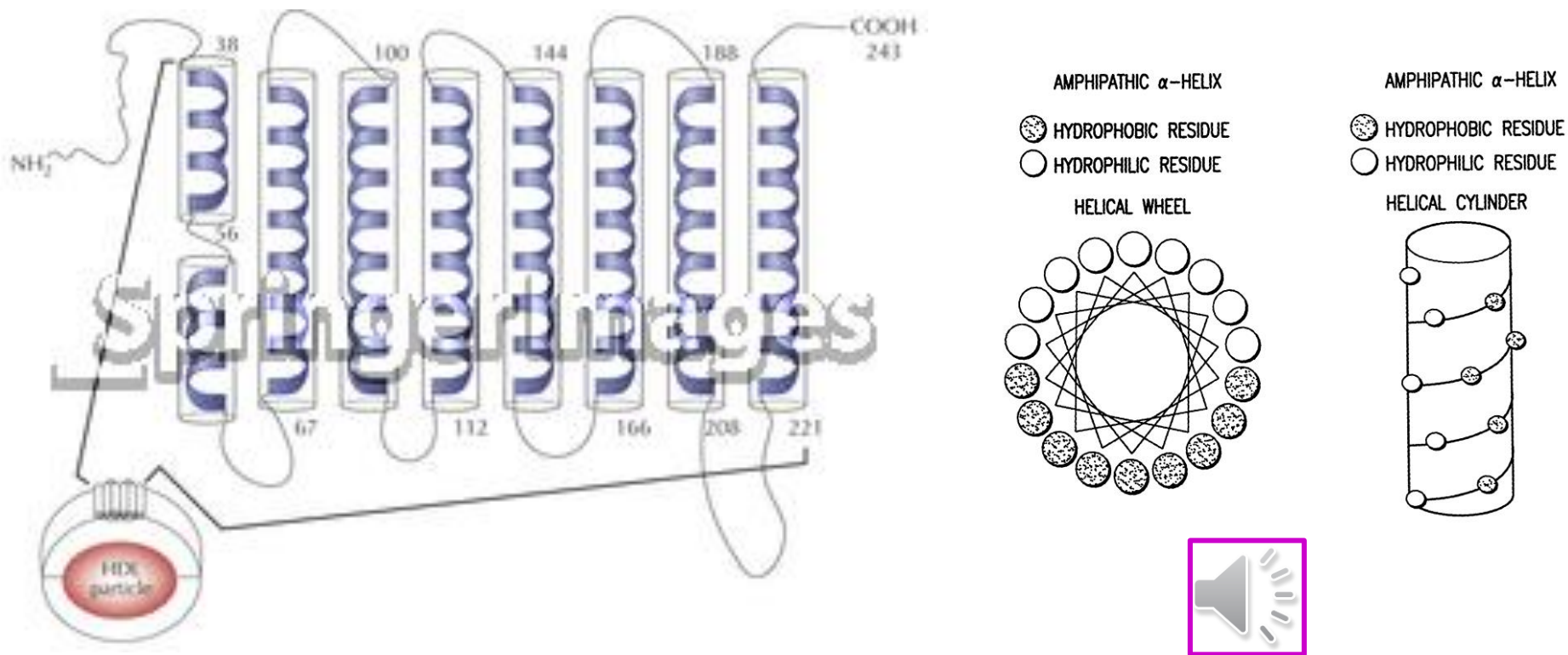
TABLE 2. MICs and MBCs of *mPE* against bacterial pathogens

Bacterium (strain)	MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)
<i>S. mutans</i> (ATCC 33402)	0.5–1	1.25
<i>S. mutans</i> (isolate N32)	0.5	1.25
<i>S. mutans</i> (isolate N43)	0.5	1.25
<i>S. aureus</i> (ATCC 27660)	0.25–0.5	0.8
<i>P. gingivalis</i> (ATCC 53978)	2.5	2.5
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (CU1000)	0.4	1.5
<i>A. viscosus</i>	0.8	1.5

MBC, minimum bactericidal concentrations

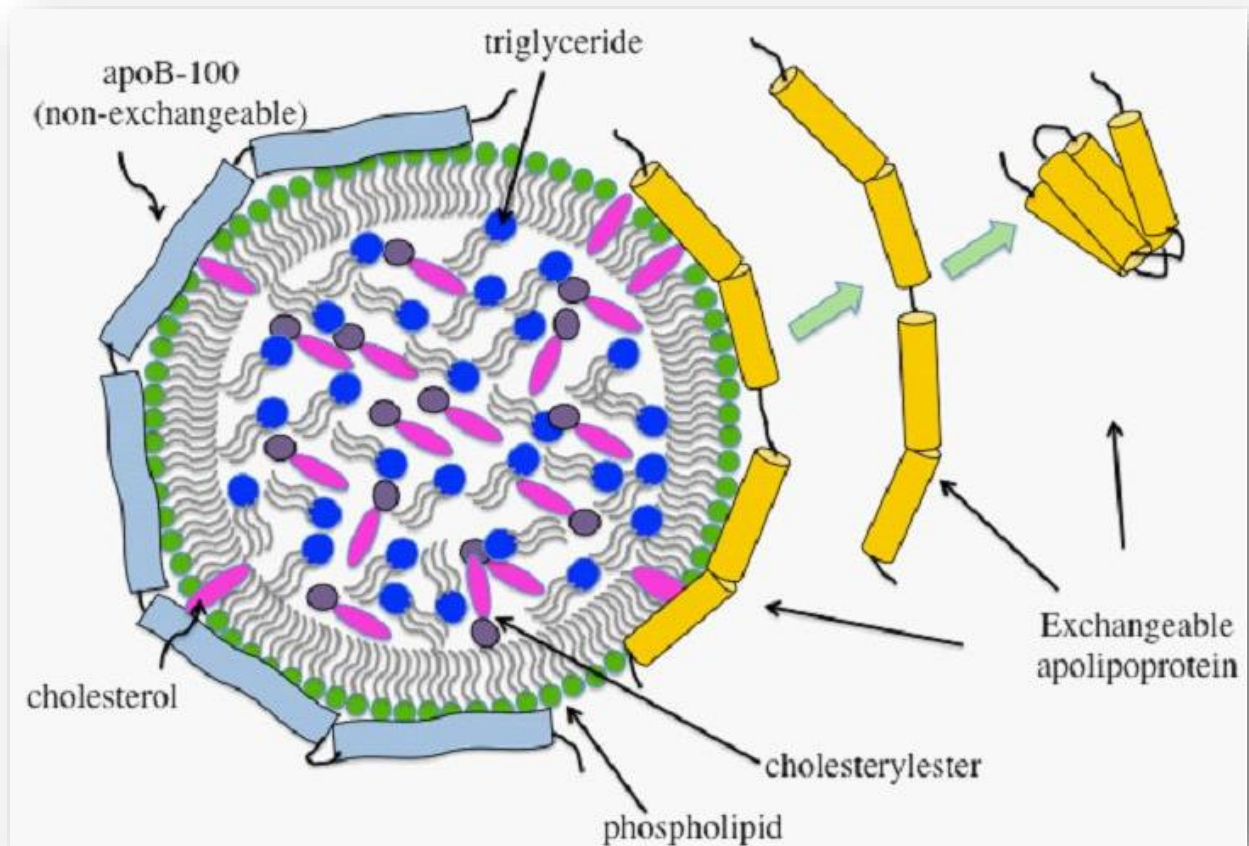
Peptidni mimetici apolipoproteina A-I (Apo-I) u prevenciji ateroskleroze

- Humani apolipoprotein Apo-I, izgrađen iz 243 aminokiseline, glavna je proteinska komponenta HDL-a (lipoprotein visoke gustoće, engl. *High Density Lipoprotein*; sakuplja višak kolesterola iz krvi i tkiva sprječavajući taloženje po stijenkama krvnih žila i razvoj kardiovaskularnih bolesti – dobri kolesterol).

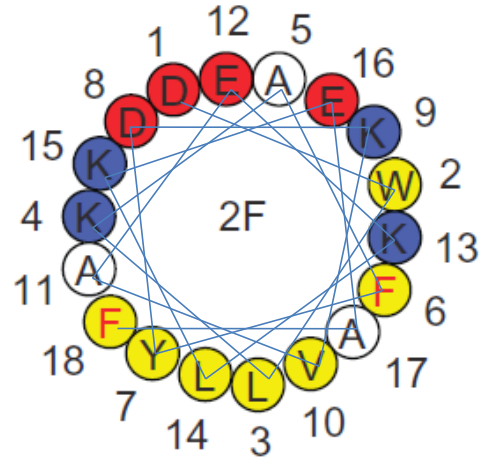
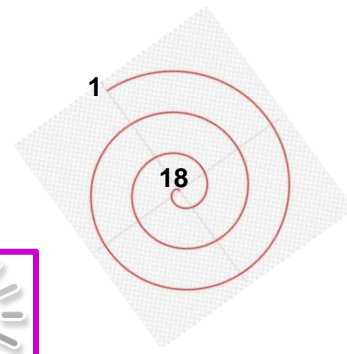


- Konstituirajući aminokiselinski ostatci tvore **serije od 10 ponavljajućih α -uzvojnica** (8 uzvojnica sadrži po 22, a 2 uzvojnice po 11 aminokiselina). Hidrofobni aminokiselinski ostatci pozicionirani su na jednoj strani uzvojnice, a neutralni i negativno nabijeni ostatci smješteni na suprotnoj, polarnoj strani uzvojnice.

- **Apo-I** sakuplja višak kolesterola iz krvi i tkiva sprječavajući njegovo taloženje po stijenkama krvnih žila i razvoj kardiovaskularnih bolesti. Povoljan učinak HDL-a na aterosklerozu pripisuje se lipid-vezujućim svojstvima **Apo-I**, koja su posljedica prisutnosti **ponavljajućih amfipatskih uzvojnica**. Vezani **kolesterol** prenosi se iz perifernih tkiva do jetre odakle se izlučuje ili kao slobodni kolesterol ili u obliku žučnih kamenaca.
- Kako je riječ o velikom proteinu čija je proizvodnja zahtjevna i skupa, oponašanjem njegove uređene sekundarne strukture moguće je pripremiti mimetike manje molekulske mase.

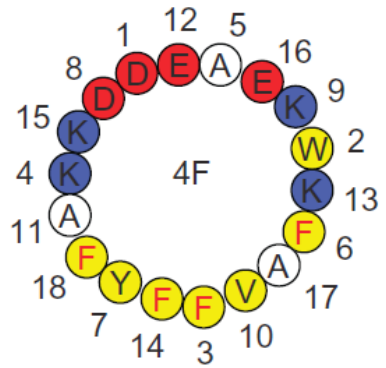
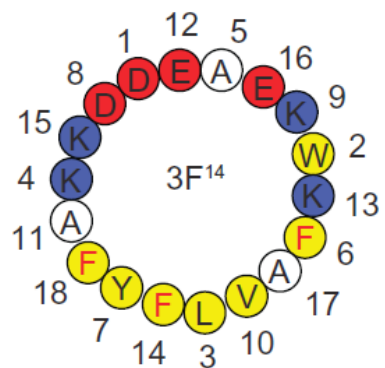
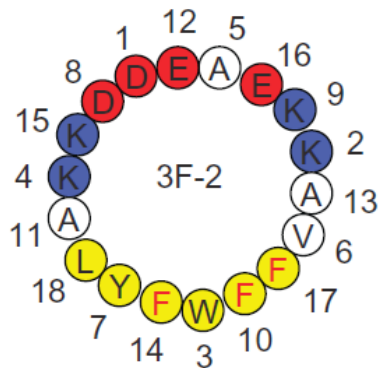
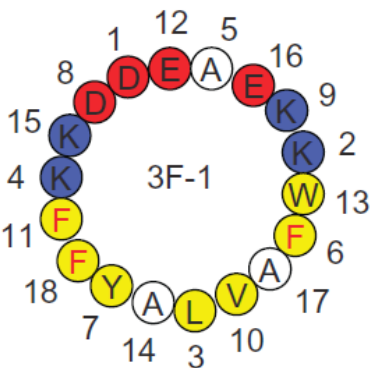


- Opisani su mimetici Apo-I koji sadrže samo 18 aminokiselinskih ostataka i odlikuju se svojstvima prosječnog amfipatskog heliksa, što je prikazano s pomoću heličnog kotača.



- Mimetik **2F** sadrži dva hidrofozna fenilalaninska ostatka (F).

- SAR-studije izomernih mimetika 3F-1, 3F-2 i 3F-14 ukazuju da pozicija Phe-ostataka utječe na njihova *in vivo* i *in vitro* svojstva.

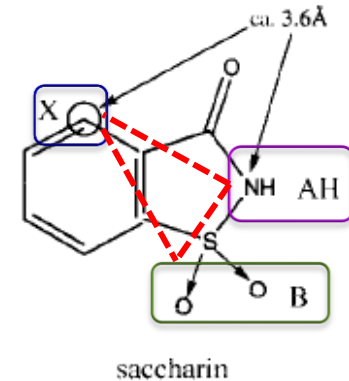
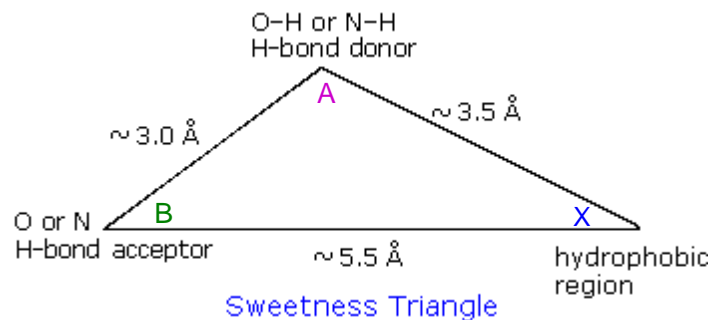


- Bioaktivni mimetik **4F** koji sadrži Phe na 4 od 8 mjesta na hidrofobnoj strani heliksa pokazao se učinkovitijim od **3F**: poboljšava izlučivanje kolesterola, ima visok afinitet za lipide, te pokazuje antiinflamatorno djelovanje.

	Anti-inflammatory activity in vitro	Attenuation of early atherosclerosis	Phospholipid solubilization
3F-1	++	nd	+
3F-2	++	++	++
3F ¹⁴	-	+	+++
4F	++	++	++

Peptidomimetiци kao sladila

- Smatra se da su za prijenos signala okusa odgovorni proteinski receptori na površini stanice. Iako struktura okusnih receptora nije identificirana,



jasno je da okusni ligandi moraju poprimiti specifičnu 3D-strukturu, tzv. bioaktivnu konformaciju.

- Različite molekule slatkog okusa **sadrže donora (AH)** i **akceptora (B)** vodikove veze (HB) na udaljenosti 2.5 - 4 Å. Donorske i akceptorske skupine tvore biokativni kompleks stvaranjem dviju intermolekulskih HB između okusnih liganada i receptora.

- “Slatke” molekule sadrže i **hidrofobno vezno mjesto (X)**; prosječna udaljenost između AH i X iznosi 3.5 Å, dok su B i X udaljeni oko 5 Å.

- Aromatske skupine iz **D-Phe**, **D-Tyr** i **D-Trp** idealni su kandidati za hidrofobnu X skupinu. AH/B model u aminokiselinama zastupljen je u obliku nabijenih amino- i karboksilnih skupina.

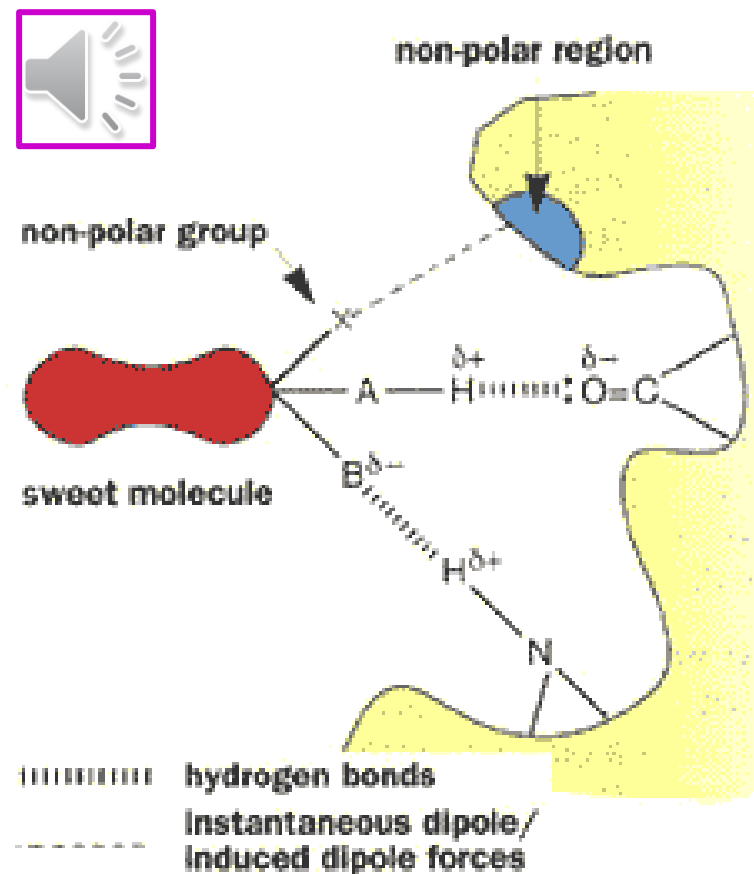

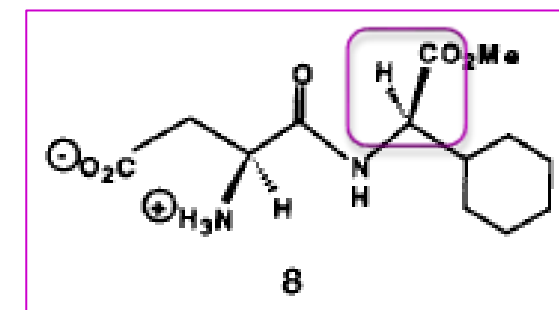
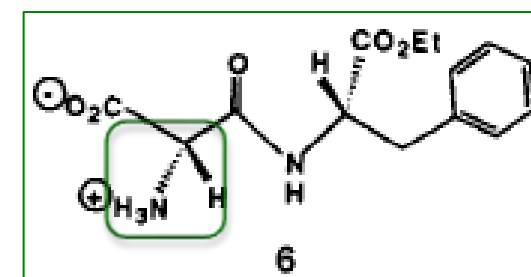
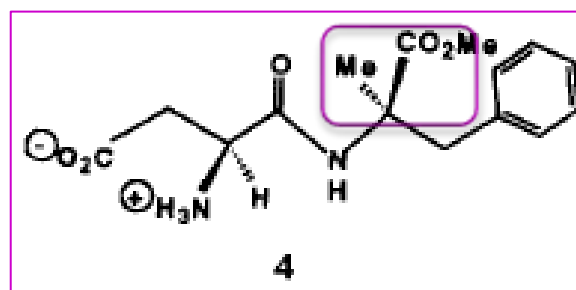
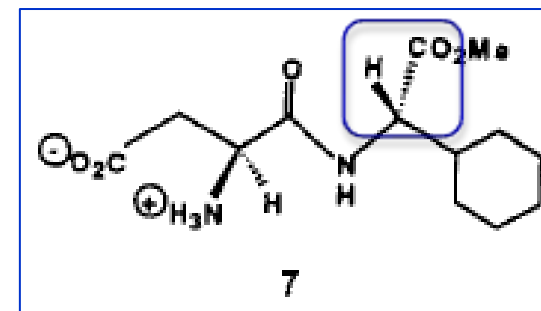
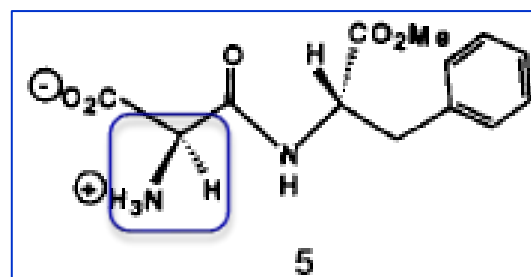
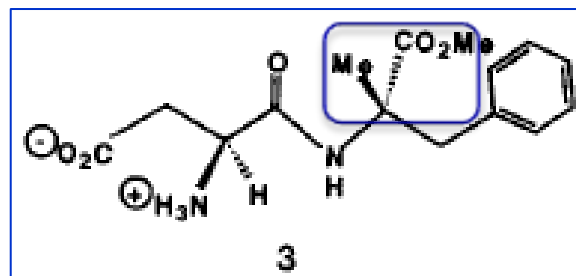


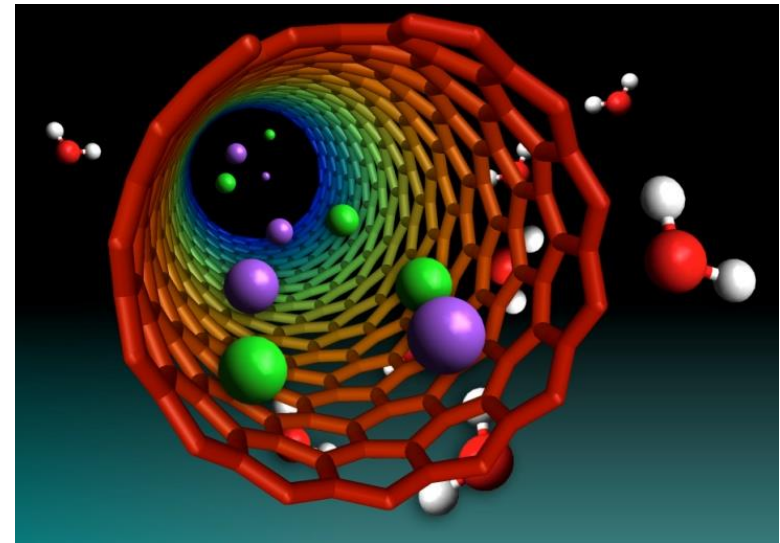
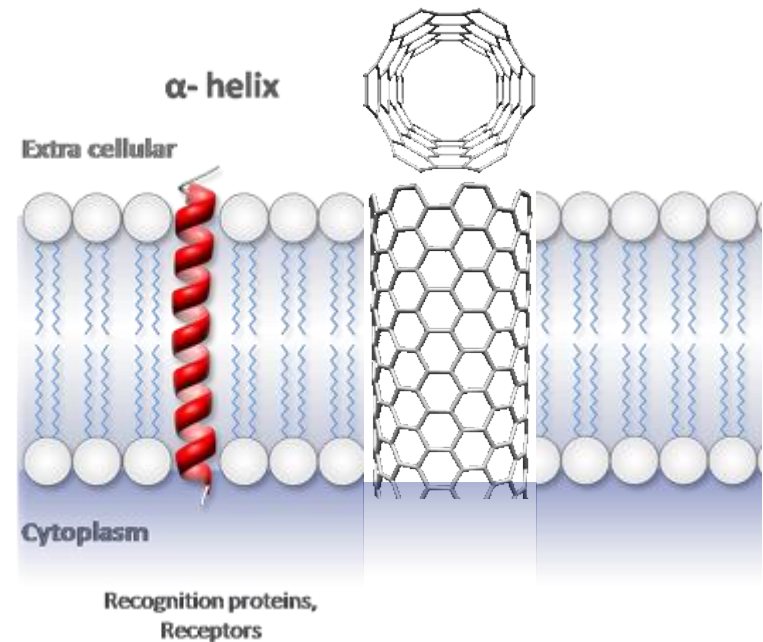
Table 1. Taste properties of peptide-based taste ligands.

Compound [a]		Shorthand Form	Taste [b]
Type A			
1 L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester		L-Asp-L-Phe-OMe	sweet
2 L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester hydrochloride		HCl-L-Asp-L-Phe-OMe	sweet
3 L-aspartyl-(α -methyl)-L-phenylalanine methyl ester		L-Asp-L-(α -Me)Phe-OMe	sweet
4 L-aspartyl-(α -methyl)-D-phenylalanine methyl ester		L-Asp-D-(α -Me)Phe-OMe	bitter
5 (<i>R</i>)-aminomalonyl-L-phenylalanine methyl ester		(R)-Ama-L-Phe-OMe	sweet
6 (<i>S</i>)-aminomalonyl-L-phenylalanine ethyl ester		(S)-Ama-L-Phe-OEt	tasteless
7 L-aspartyl-(<i>S</i>)-cyclohexylglycine methyl ester		L-Asp-(S)-Chg-OMe	sweet
8 L-aspartyl-(<i>R</i>)-cyclohexylglycine methyl ester		L-Asp-(R)-Chg-OMe	bitter

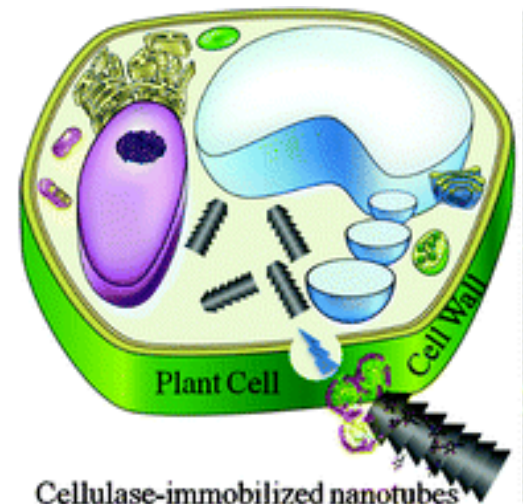
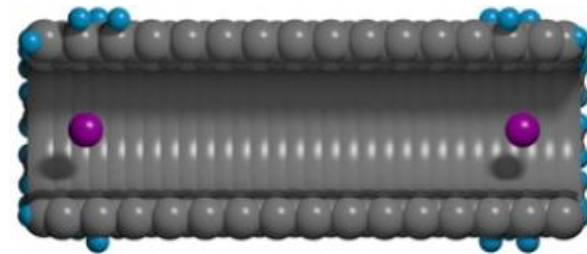
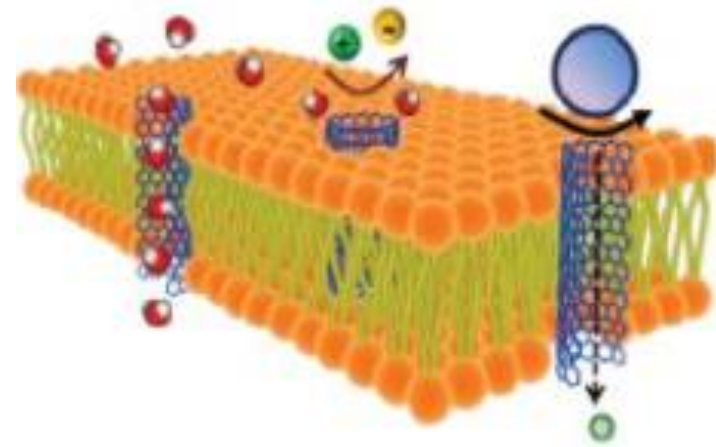


Ugljikove nanocijevi kao mimetici proteinskih kanala

- Biološki proteinski kanali, prirodne pumpe, omogućuju selektivnu difuziju potrebnih molekula kroz staničnu stijenku.
- Ugljikove nanocijevi (carbon nanotube, CNT) cjevaste su strukture načinjene iz ugljika čiji je promjer (1 nm) oko 10^4 puta manji od promjera ljudske vlasi.
- CNT - mimetici prirodnih proteinskih kanala, značajno povećavaju protok, kontroliraju prolazak molekula na ulazu u poru lipidnog dvosloja ("gatekeeper chemistry"), omogućuju elektroosmotski tok molekula kroz kemijski selektivne regije (u kojima bi došlo do usporavanja protoka).



- Uporabom CNT kao transmembranskih kanala izbjegavaju se skupi postupci separacije proteina.
- CNT-mimetici imaju široku primjenu: pročišćavanje vode, razdvajanje molekula (filtriranje ulja), prijenos lijekova, itd.
- Sintetizirana je CNT visokoselektivna prema jednovalentnim ionima; vezuje divalentne ione i odbija anione. U odsutnosti kalcija, provodi kalijeve ione šest puta brže nego gramicidin; dodatkom kalcijevih iona dolazi do njihova vezivanja u unutrašnjost nanocijevi čime se blokira protok kalija i do 85%.
- Intracelularni transport hidrofobnih ugljikovih nanocijevi kroz staničnu stijenku otežava celuloza; imobilizacijom celulaze na površini nanocijevi inducira se formiranje nanošupljina kroz koje CNT ulaze u stanicu.



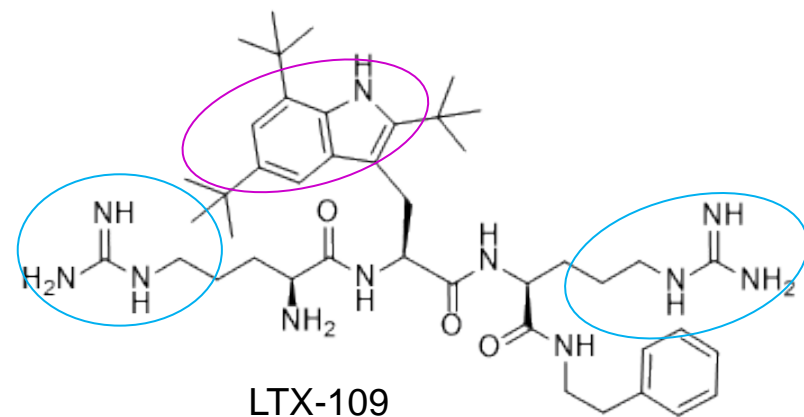
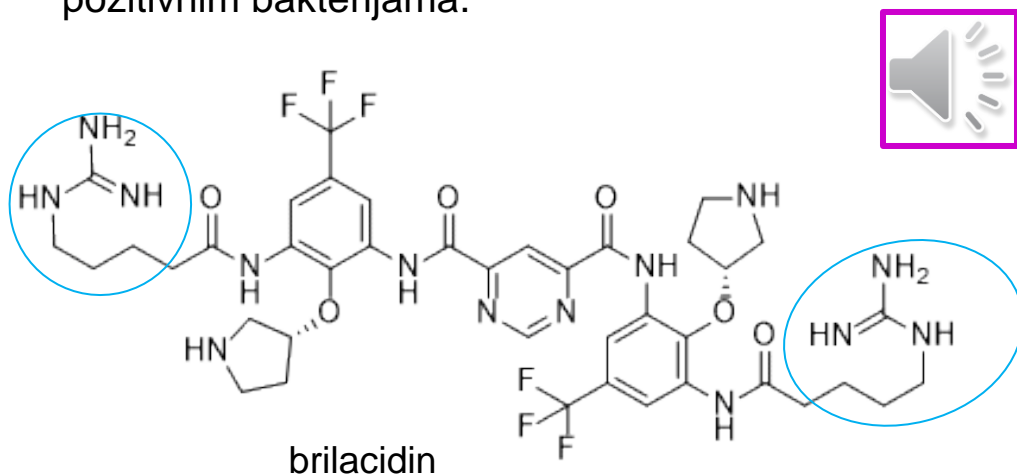
Cellulase-immobilized nanotubes

A. Tamsyn et al, *Chemical Physics Letters* 501 (2011) 423.

F. Maged et al, *RSC Adv.* 2 (2012) 398.

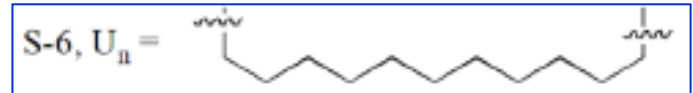
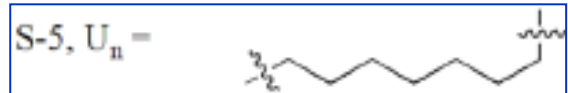
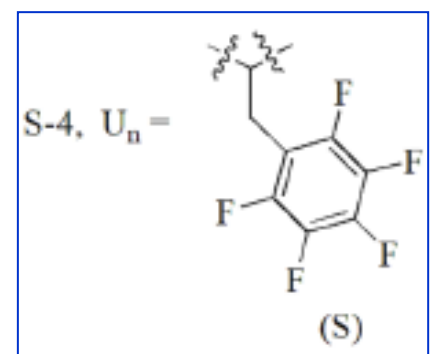
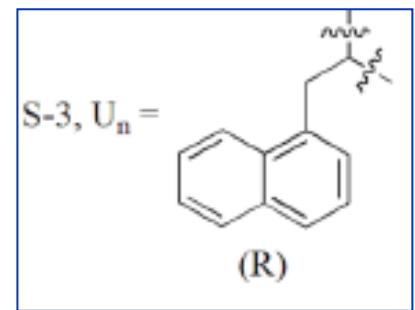
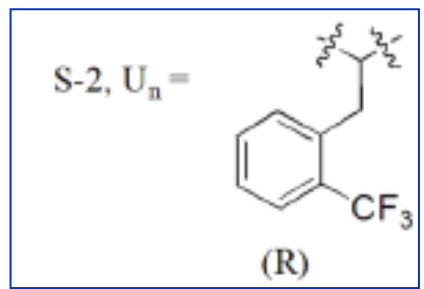
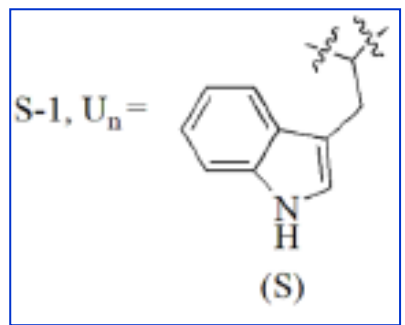
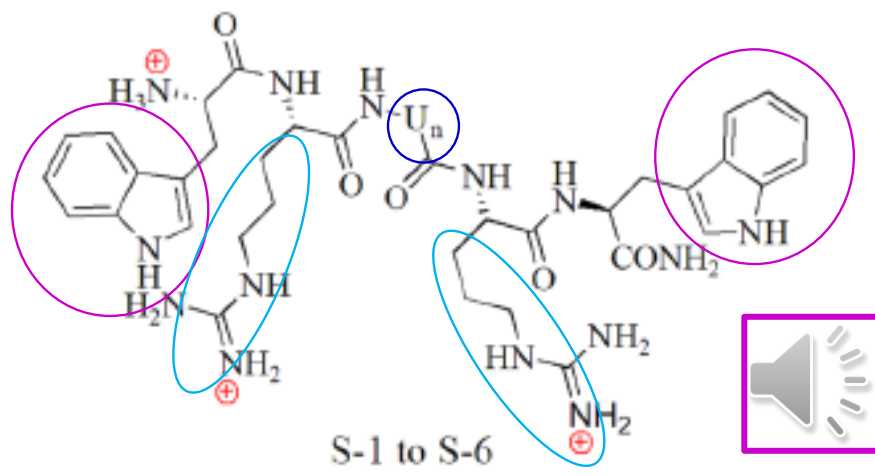
Minijaturni membranski aktivni lipopeptidomimetici

- 65-80% MRSA-infekcija povezano je s tvorbom vrlo otpornih bakterijskih biofilmova za čije je iskorjenjivanje potrebne visoke koncentracije antibiotika.
- Jedan od novijih pristupa u tretiranju MRSA-infekcija bazira se na korištenju kationskih antimikrobnih peptida (CAMPs) koji imaju sposobnost razaranja bakterijske membrane.
- S obzirom na njihovu podložnost proteolitičkoj razgradnji, visoku cijenu proizvodnje te inaktivnost u fiziološkim uvjetima, pripremaju se mimetici CAMPs. Trenutačno je nekoliko CAMPs-mimetika (brilacidin, LTX-109 i XF-73) u kliničkoj fazi ispitivanja za tretiranje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim bakterijama.

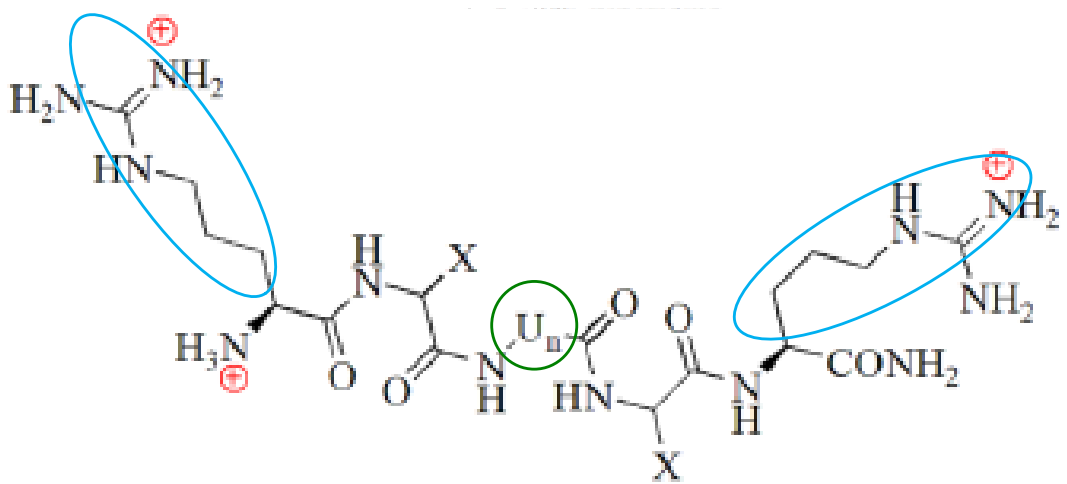


- Visoka učestalost Trp i Arg u prirodnim CAMPs kao i u njihovim mimeticima, usmjerila je dizajn novih mimetika prema templatima bogatim Trp i Arg. Jedan od takvih kalupa je pentapeptid Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-CONH₂ (**S-1**).

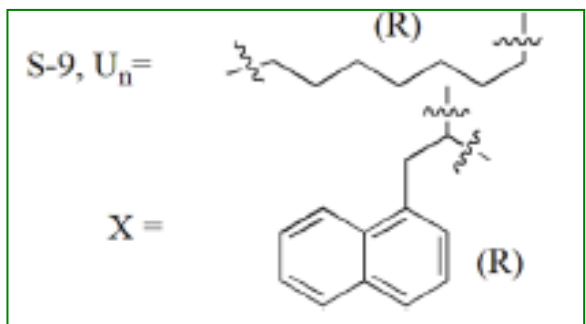
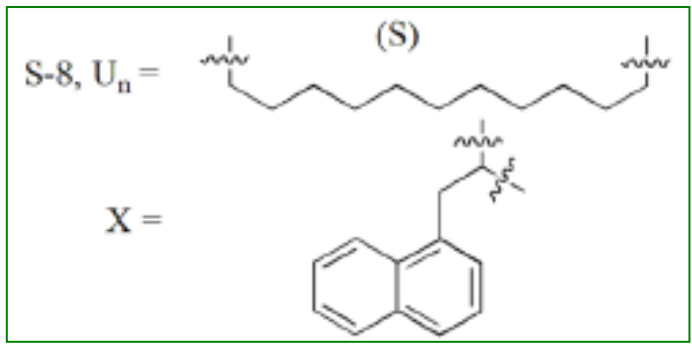
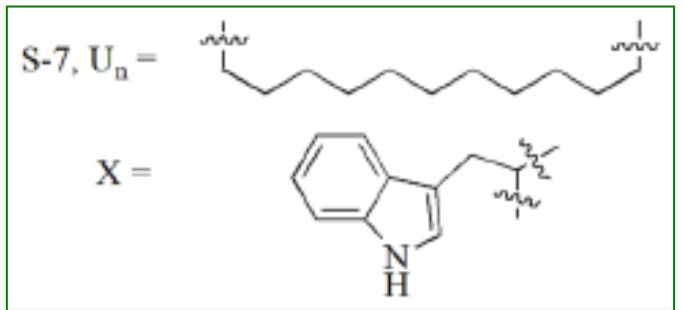
• SAR-studije ukazuju na potrebu za uspostavljanje ravnoteže između kationskog naboja (+2 do +9) i hidrofobnosti u CAMPs-mimeticima. U ovom je radu, uz državanje minimalnog naboja (+3), modificirana hidrofobnost templata (predložka) **Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-CONH₂** (**S-1**) u **Trp-Arg-U_n-Arg-Trp-CONH₂** (**S-2** do **S-6**) i to umetanjem različitih neprirodnih aromatskih ili alifatskih aminokiselina (U_n) u središte njegove sekvencije. U cilju poboljšanja proteolitičke stabilnosti i povećanja hidrofobnosti, kao U_n korišteni su **2-trifluorometil-D-Phe** u **S-2**, **3-(1-naftil)-D-Ala** u **S-3** te **2-amino-2-pentafluorofenilpropionska kiselina** u **S-4**. Iako *N*-terminalna lipidacija s dugolančanim masnim kiselinama (C¹⁴ i C¹⁶) osigurava izvrsnu lipofilnost, istovremeno se javlja problem toksičnosti. Stoga su ovdje kraće masne kiseline (C⁸ i C¹²) inkorporirane u središte **S-1** sekvencije u cilju povećanja hidrofobnosti, uz minimiziranje toksičnosti: **8-aminooktanska kiselina (8-AOA)** u **S-5** i **12-aminododekanska kiselina (12-ADO)** u **S-6**.



- SAR-studije ukazuju i na ulogu rasporeda aminokiselinskih ostataka uiz okosnice na hidrofobnost te antibakterijsku aktivnost i selektivnost peptidomimetika. Stoga je templat **Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-CONH₂** (**S-1**) preuređen u **Arg-X-U_n-X-Arg** (U_n= 12-ADO i X=Trp u **S-7** odnosno X=3-(1-naftil)-D-Ala u **S-8**). Pri tom se amfifilni **S-7** i **S-8** odlikuju hidrofobnom jezgrom i te kationskim Arg-ostacima na oba kraja što dodatno olakšava umetanje u lipidni dvosloj i ulazak takvih peptidomimetika u stanicu. U **S-9** središnji 12-ADO ostatak skraćen je u 8-AOA, dok je ostatak molekule u odnosu na **S-8** nepromijenjen.



S-7 to S-9



- Prema RP-HPLC retencijskim vremenima kao mjeri hidrofobnosti, **S-1**, **S-2** i **S-3** pokazuju sličnu hidrofobnost, dok je kod **S-4** hidrofobnost malo povećana. Umetanjem C⁸ i C¹² masnih kiselina u središte sekvencije (AOA = 8-aminooktanska kiselina, ADO = 12-aminododekanska kiselina), u cilju povećanja hidrofobnosti i smanjenja toksičnosti, pripremljeni su **S-5** koji se pokazao najmanje hidrofobnim te **S-6** čija je hidrofobnost povećana u odnosu na templat **S-1**.
- Pregradnjom templata **S-1** u Arg-X-U_n-X-Arg (**S-7**, **S-8** i **S-9**) povećana je hidrofobnost.



Name	Composition	Molecular mass [M + H] ⁺ (Da)		% purity ^a	Retention time ^b (min)
		Calculated	Observed		
S-1	Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-CONH ₂	888.4740	888.4759	97	23.1
S-2	Trp-Arg-(2-trifluoromethyl-D-Phe)-Arg-Trp-CONH ₂	917.4505	917.4537	90	23.6
S-3	Trp-Arg-(D-1-Nal)-Arg-Trp-CONH ₂	899.4787	899.4154	99	22.9
S-4	Trp-Arg-(F ₅ -Phe propionic acid)-Arg-Trp-CONH ₂	939.4160	939.4189	98	24.4 ←
S-5	Trp-Arg-(8-AOA)-Arg-Trp-CONH ₂	843.5100	843.5135	91	21.4
S-6	Trp-Arg-(12-ADO)-Arg-Trp-CONH ₂	899.5726	899.5748	95	26.0 ←
S-7	Arg-Trp-(12-ADO)-Trp-Arg-CONH ₂	899.5726	899.5743	96	24.6 ←
S-8	Arg-(D-1-Nal)-(12-ADO)-(D-1-Nal)-Arg-CONH ₂	921.5821	921.5842	96	28.5 ←
S-9	Arg-(D-1-Nal)-(8-AOA)-(D-1-Nal)-Arg-CONH ₂	865.5195	865.5238	94	25.4 ←

Table 1. Name, composition, molecular mass, % purity and retention time of designed peptidomimetics.

^a% Purity based on RP-HPLC area under the peak, ^bretention time in RP-HPLC run.

- Opisanim peptidomimeticima testirana je antimikrobna aktivnost protiv panela stafilokoknih sojeva.
- **S-1, S-2, S-3** i **S-5** pokazali su se inaktivnima čak i pri najvišim primijenjenim koncentracijama (45,4 $\mu\text{g/ml}$), dok je **S-4** pokazao umjerenu aktivnost. U usporedbi s templatom **S-1**, hidrofobniji **S-6** i **S-7** bili su aktivni (MIC=11,3 $\mu\text{g/ml}$) protiv svih sojeva, s izuzetkom *S. Aureus* ATCC25923. **S-8** pokazao je izvrsnu aktivnost (MIC=0,3 -1,4 $\mu\text{g/ml}$). Da bi se utvrdilo utječe li na njegov antimikrobni potencijal prisutnost 12-ADO ili 3-(1-naftil)-D-Ala, dizajniran je **S-9** u kojem je 12-ADO supstituiran s 8-AOA. Kako je došlo do smanjenja aktivnosti (povećani MIC), jasno je da 12-ADO ima ključni utjecaj na antimikrobnu aktivnost peptidomimetika **S-6, S-7** i **S-8**.



Name	Minimum inhibitory concentration, MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>S. aureus</i> (ISP479C)	<i>S. aureus</i> (ISP479R)	MRSA (ATCC 33591)	MRSA (ATCC 43300)	MRSE ^a (ATCC 35984)
S-1	>45.4	>45.4	ND	ND	>45.4	>45.4	>45.4
S-2	>45.4	>45.4	ND	ND	>45.4	ND	ND
S-3	>45.4	>45.4	ND	ND	>45.4	ND	ND
S-4	45.4	45.4	45.4	45.4	45.4	ND	ND
S-5	>45.4	>45.4	ND	ND	>45.4	ND	ND
S-6	11.3	22.7	11.3	11.3	11.3	11.3	11.3
S-7	11.3	22.7	11.3	11.3	11.3	11.3	11.3
S-8	0.7	1.4	0.3	0.7	1.4	1.4	1.4
S-9	22.7	22.7	45.4	45.4	22.7	>45.4	45.4
VAN	0.7	1.4	0.3	0.3	1.4	0.7	2.8
OXA	< 0.3	< 0.3	0.3	0.3	56.8	56.8	>45.4

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of designed peptidomimetics against staphylococcal strains. ^aMethicillin-resistant *S. epidermidis*; ND, not determined; VAN, vancomycin; OXA, oxacillin.

- Pod identičnim uvjetima testirana je aktivnost standardnih antibiotika oksacilina (OXA) i vankomicina (VAN). OXA je pokazao izvrsnu aktivnost protiv meticilin-osjetljivih *S. Aureus* sojeva te slabiju aktivnost protiv MRSA, dok se VAN pokazao potentnim protiv svih testiranih stafilokoka.
- Najaktivniji peptidomimetici **S-6**, **S-7** i **S-8** testirani su i protiv vankomicin-rezistentnih enterokoka (VRE) kao još jedne vrste klinički relevantnih patogena. Rezultati ukazuju na dobru aktivnost **S-6** (MIC=11,3 - 22,7 µg/ml) i **S-7** (MIC=5,6 – 22,7 µg/ml), dok je **S-8** pokazao izvrsnu aktivnost (MIC=1,4 – 5,6 µg/ml). VAN (MIC> 45,4 µg/ml) te OXA (MIC>45,4-232,7 µg/ml) nisu pokazali učinkovitost prema vankomicin-rezistentnim *E. faecium*.



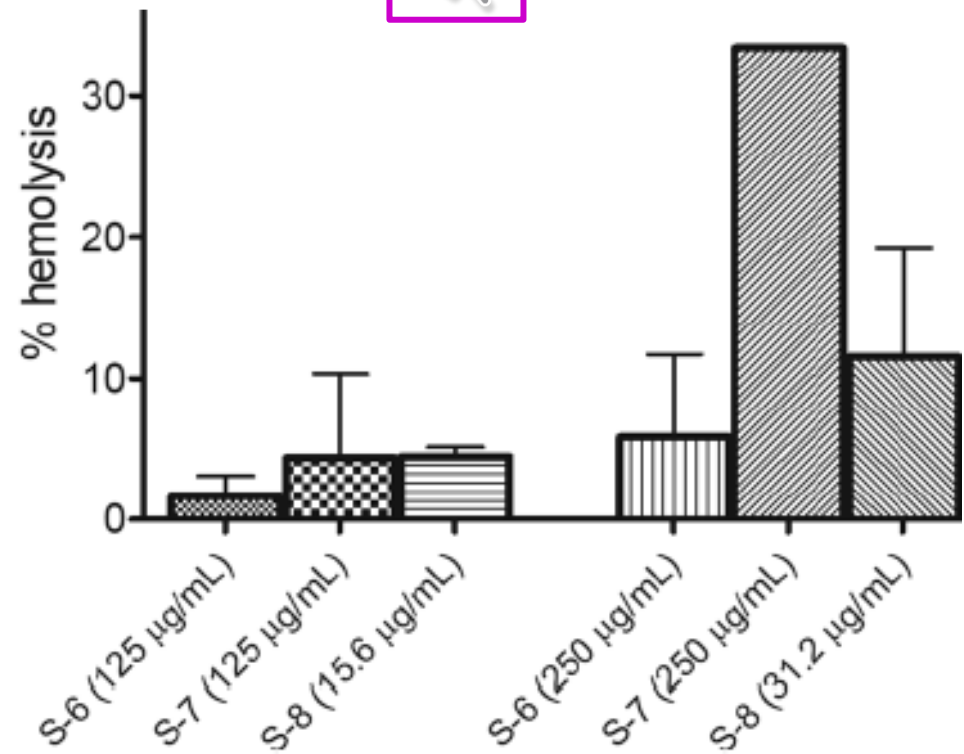
Name	Minimum inhibitory concentration, MIC (µg/mL)			
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>E. faecium</i> ^a (ATCC 700221)	<i>E. faecium</i> ^b (E-447)	<i>E. faecium</i> ^b (E-7846)
S-6	22.7	22.7	11.3	11.3
S-7	11.3	22.7	11.3	5.6
S-8	2.8–5.6	2.8	1.4–2.8	5.6
VAN	1.4	>45.4	>45.4	>45.4
OXA	5.6	>45.4	>232.7	>232.7

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of active peptidomimetics against enterococcal strains.

^aVancomycin-resistant *E. faecium*, ^bclinical isolates of vancomycin-resistant *E. faecium*.

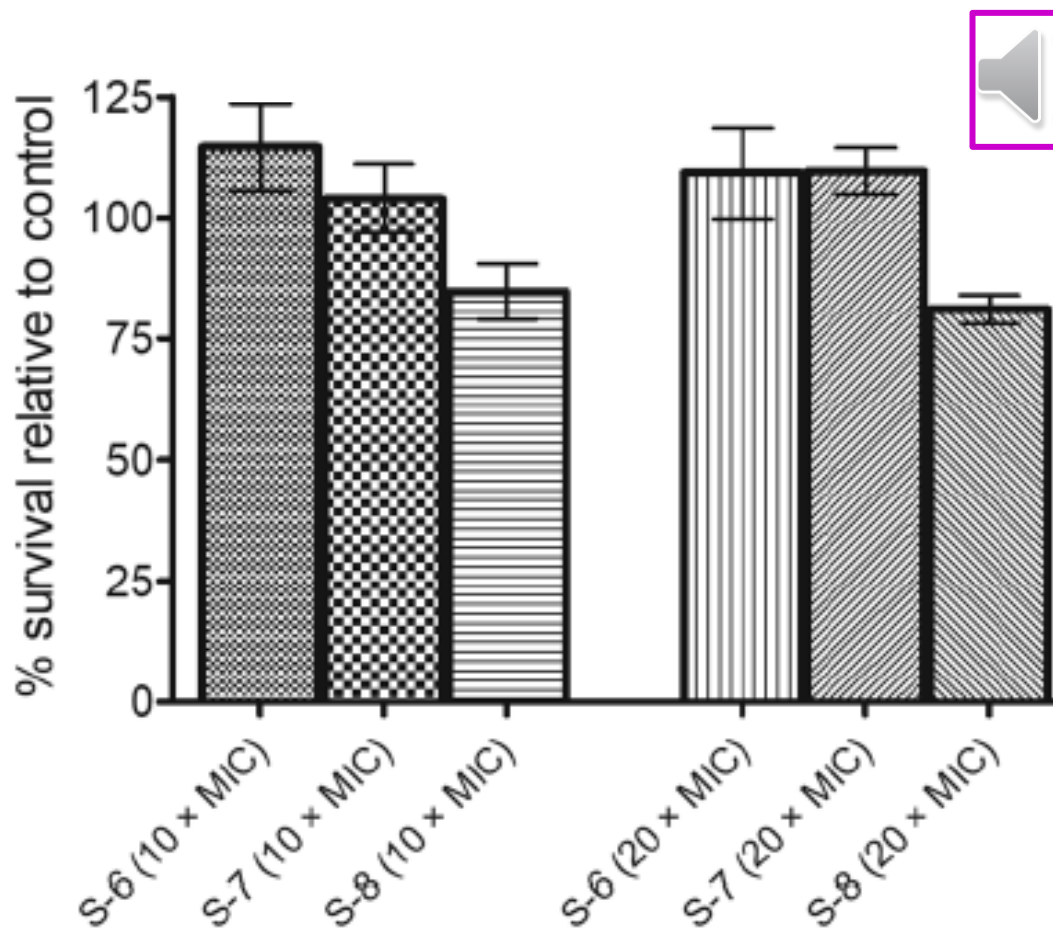


- U svrhu određivanja stanične specifičnosti izmjeren je % hemolize mišjih eritrocita (mouse red blood cells, RBCs) u prisutnosti opisanih peptidomimetika. **S-1**, **S-2**, **S-3**, **S-4**, **S-5** i **S-9** uzrokovali su <5% hemolize pri koncentracijama 250 $\mu\text{g/ml}$. Aktivnim peptidomimeticima **S-6**, **S-7** i **S-8** hemolitički učinak određivan je pri koncentracijama 10 \times odn. 20 \times višim u odnosu na MIC protiv MRSA ATCC 33591. Sva tri spoja uzrokovali su <10% hemolize pri koncentracijama \sim 10 \times MIC. Pri koncentracijama \sim 20 \times MIC, % hemolize iznose $5.8 \pm 5.8\%$ za **S-6** (pri 250 $\mu\text{g/mL}$), $33.4 \pm 0.0\%$ za **S-7** (pri 250 $\mu\text{g/mL}$) i $11.5 \pm 7.6\%$ za **S-8** (pri 31.2 $\mu\text{g/mL}$).



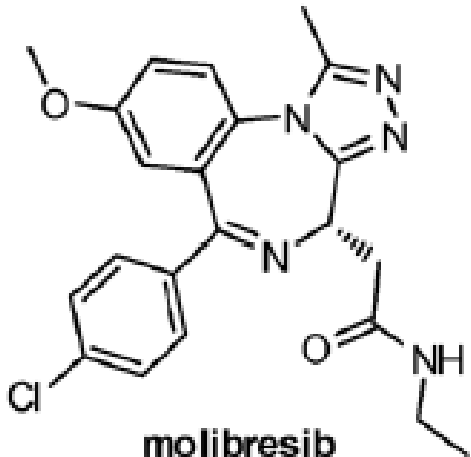
Hemolysis assay. The percentage hemolysis of mice RBC upon treatment with active peptidomimetics. For the experiment, 0.1% Triton X-100 was used as positive control. The experiments were performed in duplicate on two different days and each data point represents mean \pm S.D.

- Testovi citotoksičnosti pokazuju da tretiranje sa **S-6** i **S-7** pri koncentracijama 10× odn. 20× MIC nije rezultiralo štetnim posljedicama, s obzirom da nije opaženo smanjenje stanične vijabilnosti u odnosu na netretiranu kontrolu. Tretiranje s **S-8** pri 10× odn. 20× MIC rezultirao je s $84.8 \pm 5.6\%$ i $81.1 \pm 2.9\%$ stanične vijabilnosti.
- Dakle, dizajnirani peptidomimetici pokazuju malu ili nikakvu toksičnost protiv stanica sisavaca pri koncentracijama $> \text{MIC}$, uz iznimku **S-7** koji je uzrokovao 33.4% hemolize pri 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$



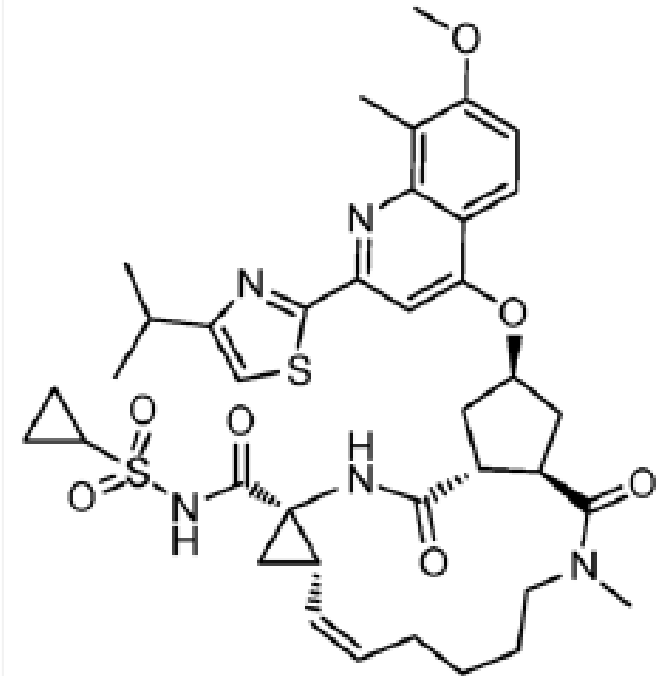
Cytotoxicity induced upon incubation of active peptidomimetics with 3T3 murine fibroblast cell line. The percentage viability of cells relative to untreated growth control was measured using MTT assay. The experiments were performed in triplicate on two different days and each data point represents mean \pm S.D. The MIC values for test peptidomimetics against MRSA ATCC 33591 were as follows: S-6 (11.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), S-7 (11.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and S-8 (1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Peptidomimetički terapeutici: trenutno stanje i perspektiva



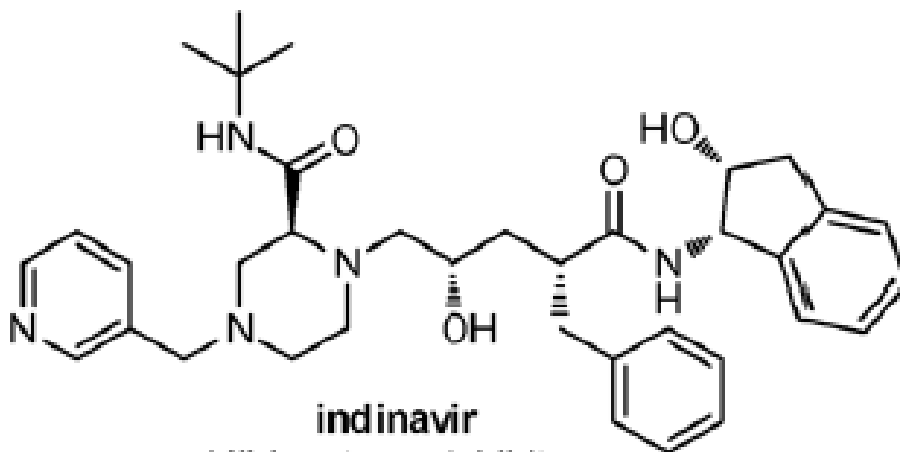
molibresib

BRD and BET inhibitor
under clinical investigation for the
treatment of NUT and breast carcinoma



simeprevir

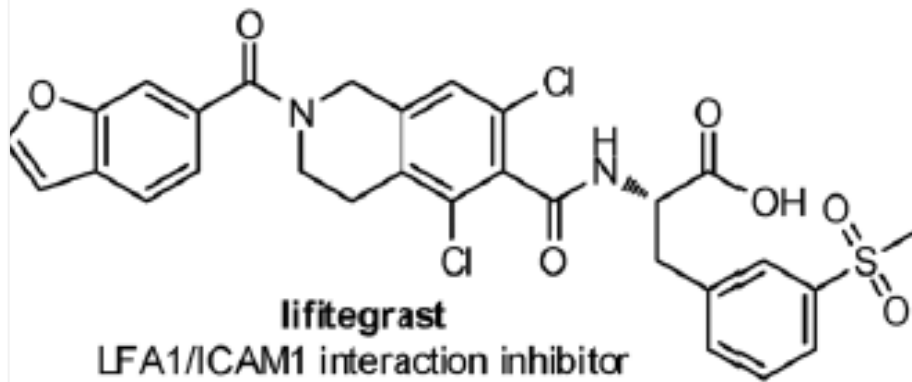
NS3/NS4A protease inhibitor
approved for the treatment of chronic
hepatitis C virus (HCV) infection



indinavir

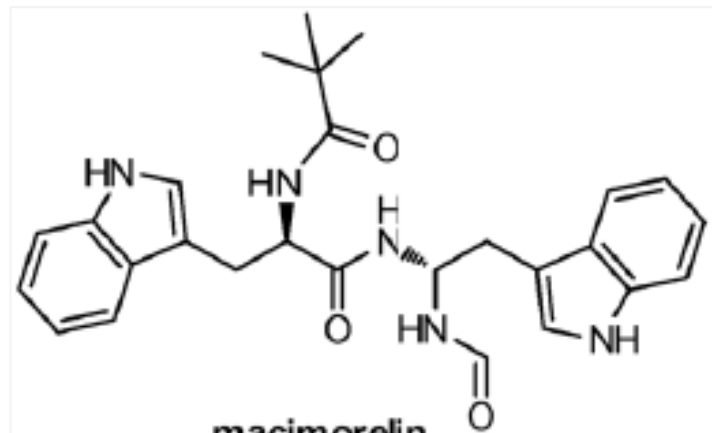
HIV protease inhibitor
approved for the treatment of HIV infection

Fig. 2 Representative examples of peptidomimetics compounds in late stage clinical trials or already approved as drugs.



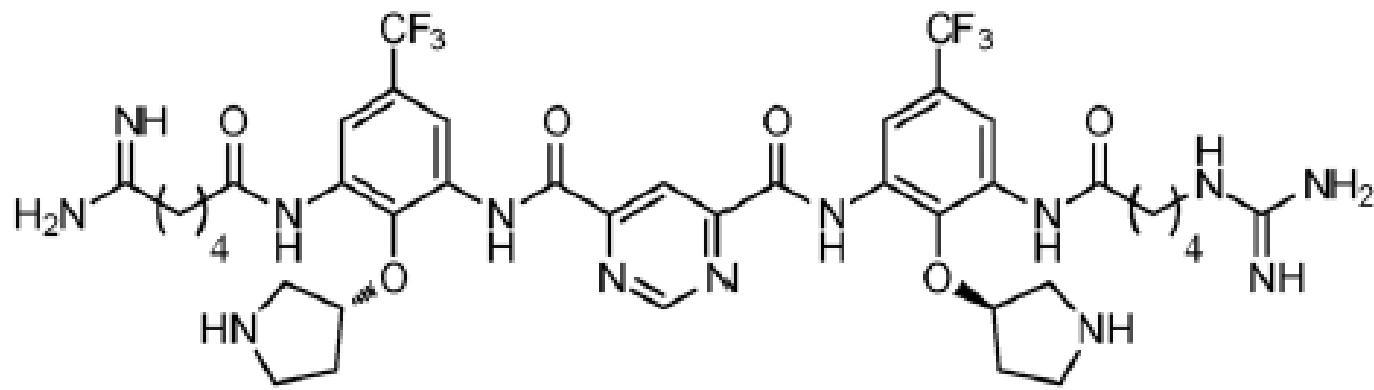
lifitegrast

LFA1/ICAM1 interaction inhibitor
 approved for the treatment of
 dry eye syndrome



macimorelin

ghrelin mimetic
 approved for the diagnosis of adult
 growth hormone deficiency (AGHD)



brilacidin

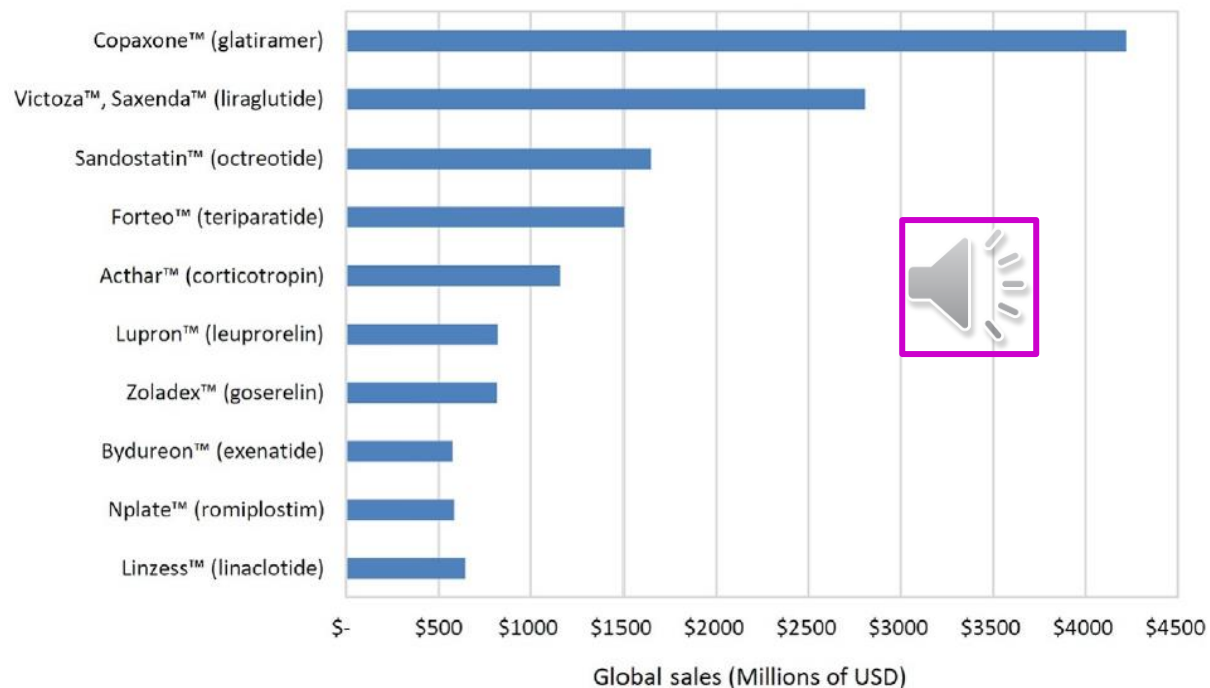
antimicrobial peptidomimetic of host defense proteins (HDPs)
 under clinical investigation for the supportive care of mucositis,
 stomatitis, mouth diseases, and head and neck neoplasms

- Ono što peptide čini nezamjenjivima u terapiji različitih bolesti jest njihova visoka specifičnost *in vivo*. Međutim, primjena peptida kao lijekova nailazi na brojne zapreke, poput metaboličke nestabilnosti, loše oralne biodostupnosti i slabe permeabilnosti kroz membrane. Linerni peptidi imaju vrlo kratko vrijeme poluživota od svega nekoliko minuta zbog čega je praktički nemoguće dopremiti peptidni lijek do ciljnog tkiva u potrebnoj koncentraciji. Oralno primijenjeni peptidni lijekovi podliježu brzom raspadu u probavnom sustavu, te se moraju primijeniti intravenozno što za pacijenta podrazumijeva odlazak k liječniku ili boravak u bolnici. Te se prepreke u korištenju peptida kao lijekova mogu prevladati primjenom njihovih mimetika.
- 2014. objavljena je knjiga indikativnog naslova *Peptidomimetici u organskoj i medicinskoj kemiji: umjetnost pretvaranja peptida u lijekove*, u kojoj je predstavljen koncept izgradnje bioaktivnih molekula koje oponašaju peptide i odlikuju se povećanom stabilnošću i unaprijeđenom biološkom aktivnošću, a čija je namjena pretežito terapijska. U toj je knjizi opisano nekoliko peptidomimetičkih lijekova odobrenih u Europi, SAD-u i Japanu, koji su pripremljeni različitim strategijama poput (i) zamjene L- s D-aminokiselinom, npr. zamjenom L-Arg iz vazopresina s D-Arg pripremljen je dezmpresin kao sintetska zamjena s višestruko povećanom antidiuretskom aktivnošću. Također je moguća (ii) ugradnja neprirodnih aminokiselina u peptidnu okosnicu, npr. zamjenom Leu s neprirodnom aminokiselinom metil-Tyr te disulfidne veze s tioeterskom pripremljen je karbetocin, mimetik prirodnog peptidnog hormona oksitocina, što je rezultiralo značajno unaprijeđenom metaboličkom stabilnošću. Ciklizacija (iii) korištena je prilikom pripreme peptidomimetičkog lijeka zikonotida, cikličkog polipeptida s tri disulfidne veze, koji inhibira otpuštanje neurokemikalija povezanih s osjetom boli te se primjenjuje kao analgetik.

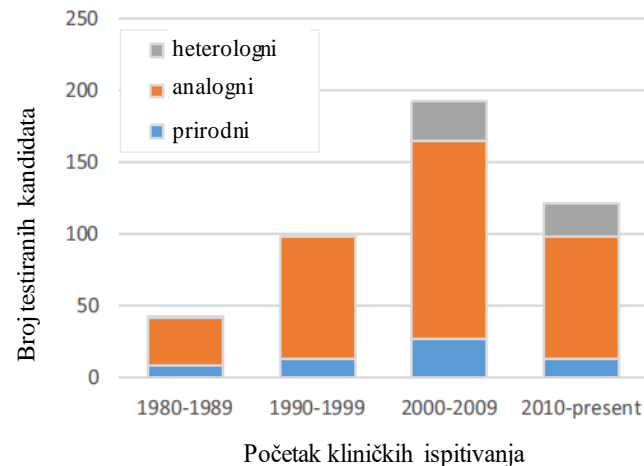


A. Guarna, A. Trabocchi (2014), *Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry: The Art of Transforming Peptides in Drugs*, 1. izd., Wiley; N. Qvit et al, *Drug Discov. Today*, 22, 2017, 454–462.

U 2015. godini najprodavaniji peptidomimetički lijek u svijetu bio je glatiramer koji se koristi u terapiji relapsno-remitentne multiple skleroze. Riječ je o polimeru sačinjenom iz Glu, Ala, Tyr i Lys, koji oponaša mijelinski osnovni protein. Slijede liraglutid i egzenatid, agonisti GLP-1 (peptid-1-sličan glukagonu), namijenjeni za terapiju dijabetesa tipa 2. Nakon njih, odobrena su još tri agonista GLP-1, od kojih se jedan primjenjuje svakodnevno, a druga dva jednom tjedno, što je značajno proširilo tržište za te lijekove. Agonisti somatostatina za liječenje akromegalije: oktreetid, lanreotid i pasireotid odobreni su 2012. godine te su do 2015. godine dospjeli na visoko 3. mjesto na listi najprodavanijih lijekova. Svi su ovi lijekovi dostupni hrvatskim pacijentima. Veliku skupinu agonista gonadotropin-otpuštajućeg hormona korištenih za liječenje karcinoma prostate predstavljaju leuprorelin-acetat i goserelin, s tim da se na tržištu nalazi još 10 agonista i antagonista ovog hormona. Teriparatid jedini je peptidomimetik odobren u 2015. godini za liječenje osteoporoze, s tim da je 2017. godine odobren i abaloparatid. Slijedi kortikotropin koji se primjenjuje za liječenje infantilnog spazma. Romiplostim, mimetik trombopoetina, primjenjuje se za liječenje trombocitopenije. Tržište peptidnih terapeutika u eksponencijalnom je porastu i njegova se vrijednost procjenjuje na 25,4 milijardi \$, što premašuje iznos državnog proračuna Republike Hrvatske.



- Na svjetskom farmaceutskom tržištu prisutno je oko 60 peptidnih lijekova. Dodatnih 150 peptidnih terapeutika u različitim je fazama kliničkih ispitivanja, dok ih je 260 u prekliničkoj fazi razvoja. Peptidni lijekovi, ovisno o njihovoj povezanosti s endogenim peptidima, dijele se u tri skupine: prirodni peptidi, analozi i heterolozi. Prirodni peptidni lijek ima istu sekvenciju kao i peptidni prirodni produkt. Iako su prvi prirodni peptidi, poput inzulina, izolirani iz tkiva sisavaca, danas se većina prirodnih peptidnih lijekova dobiva kemijskom sintezom ili rekombinantnom ekspresijom. Ograničenja i nepovoljna svojstva endogenih peptida motivirala su istraživače na pripravu analoga (mimetika) kao modificiranih ili supstituiranih verzija prirodnih peptida s unaprijeđenim svojstvima. Tako je, primjerice, pripremljen dezmopresin kao analog vazopresina, s produljenim vremenom poluživota i povećanom selektivnošću prema receptorima.
- Glavninu peptidnih lijekova čine mimetici (analozi), najčešće temeljeni na prirodnim hormonima. Razvoj peptidnih terapeutika ide ukorak sa znanstvenim inovacijama kao i novim i naprednim strategijama kemijske sinteze, a u cilju povećanja njihove molekulske raznolikosti i unapređenja njihovih farmakoloških svojstava. Vjeruje se da će endogeni ligandi za peptidne hormonske receptore i dalje predstavljati polaznu točku u istraživanju lijekova. Nadalje, očekivani napredak u probiru peptida i računalnoj biologiji doprinijet će daljnjem otkrivanju novih peptidnih lijekova. Bolje razumijevanje molekulske baze genetskih poremećaja generirat će nove potencijalne vodeće terapeutike. Također, otkrića novih puteva dopreme lijeka u stanicu kao i produljenje vremena njegovog poluživota dodatno će doprinijeti razvoju ove vrste lijekova.

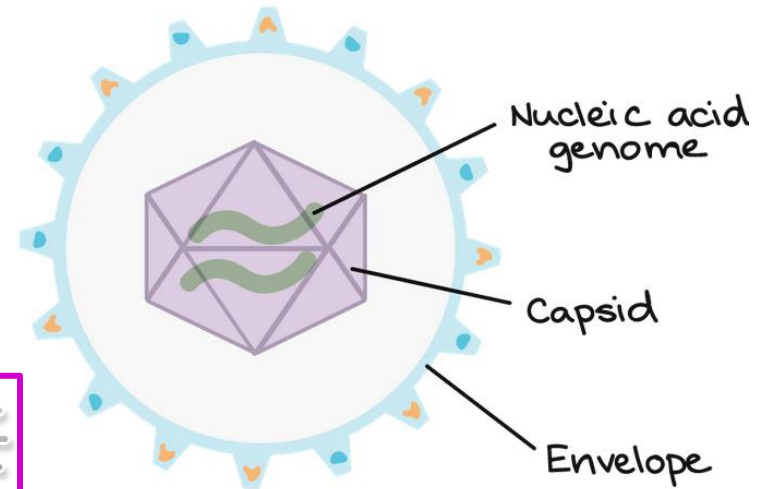


Peptidni mimetici i pseudopeptidi

Peptidomimetici kao inhibitori SARS-CoV-2

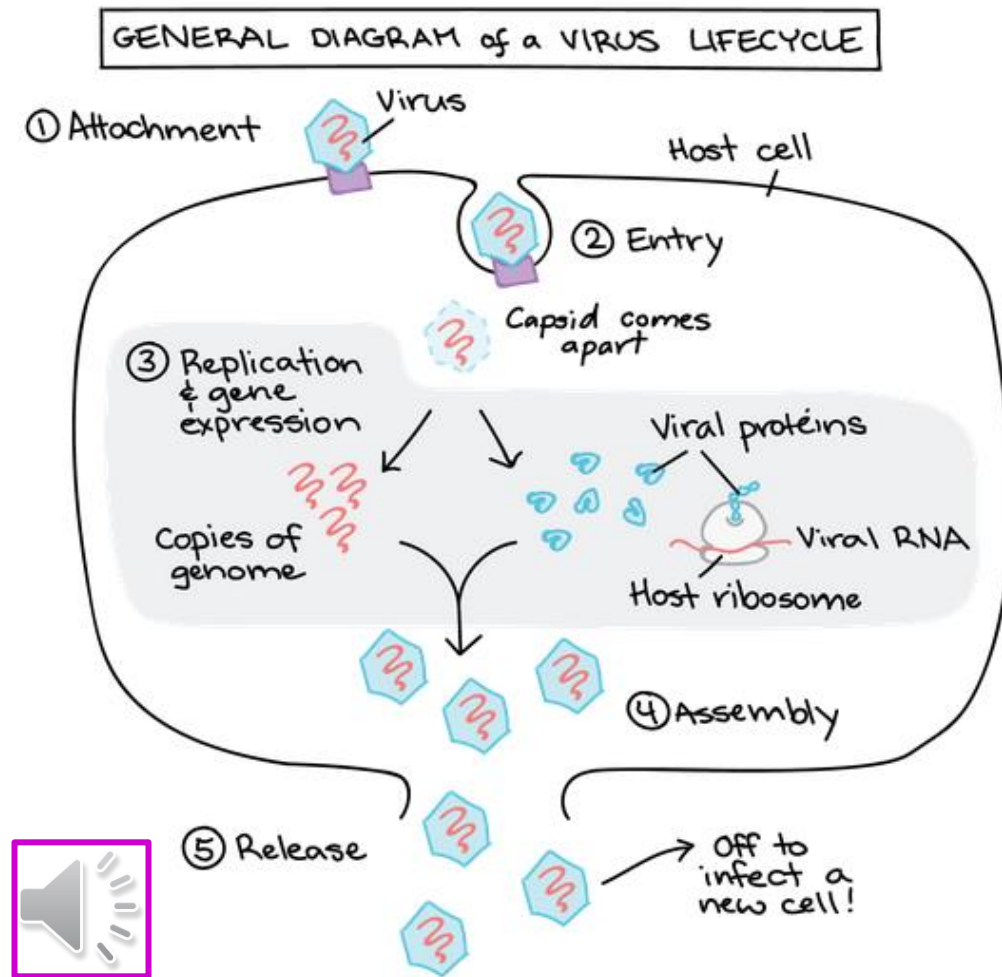
Prof. dr. sc. Lidija Barišić

- Virusi su čestice na granici između živog i neživog; ne sastoje se iz stanica, nemaju metabolizam, ne reagiraju na vanjske podražaje, ali mogu se razmnožavati za što koriste žive stanice domaćina (bakterija, biljaka, životinja i ljudi). Izvan žive stanice domaćina postoje u obliku čestica koje se nazivaju virioni, a građeni su iz nukleinske kiseline zaštićene proteinskim omotačem koji se naziva kapsida. Osim proteinske kapside, neki virusi koriste i proteinske membrane za interakciju s proteinskim receptorima na površini stanica domaćina (protein-protein interakcije!).



- Virus gripe se svojim H-proteinom (hemaglutinin) vezuje na neuraminsku kiselinu izraženu na epitelu respiratornog sustava, a nakon toga virus pomoću N-proteina (neurominidaza) iz svoje ovojnice enzimatski cijepa neuraminsku kiselinu i ulazi u stanicu (Tamiflu blokira enzim neuroaminidazu i tako sprječava ulazak virusa u stanicu i infekciju). Poznato je 16 izoformi H-proteina i 9 izoformi N-proteina, po čemu virusi gripe dobivaju svoja serotipska imena (npr. H1N1). Svaka od tih izoformi različito se prikazuje u našem imunom sustavu, zbog čega se cijepimo trovalentnim ili tetravalentnim cjepivima koja pokrivaju više virusnih izoformi.

- Kod koronavirusa, membranski S-protein ima visok afinitet za receptore na stanicama dišnog epitela, odn. molekule angiotenzin-II pretvorbenog enzima (ACE2), što omogućava sidrenje virusa na membranu ciljane stanice i prodor u stanicu. Stoga je jedan od terapijskih pristupa u borbi s koronavirusom usmjeren na sprječavanje ove interakcije.
- Koronavirusi za ulazak u stanicu osim ACE2-receptora koriste i membranske serinske proteaze. Nakon ulaska u stanicu, virusi raspakiravaju svoju kapsidu i oslobađaju jednolančanu RNA koja se kao glasnička RNA počinje prepisivati na ribosomima domaćina u veliki poli-protein i nekoliko virusnih proteaza koje ga cijepaju na virusne regulacijske proteine. Virus pomoću regulacijskih proteina preuzima i sebi prilagođava metabolizam stanice tako da stanične resurse koristi za proizvodnju novih virusa, što često rezultira smrću tako zaražene stanice. Među regulacijskim proteinima ističe se kimotripsinu slična proteaza (3CL^{pro}), čijom bi se inhibicijom mogla ograničiti replikacija virusa.



- Koronavirusi poznati su od 1960., a u novije vrijeme počeli su se pojavljivati novi koronavirusi koji sa životinja prelaze na ljude i potom se dalje šire što je u Kini 2002. dovelo do pojave SARS-a (teški akutni respiratorni sindrom, engl. *severe acute respiratory syndrome*, 774 umrla), te 2012. do MERS-a (bliskoistočni respiratorni sindrom, engl. *middle east respiratory syndrome*, 858 umrlih)]. Koronavirus uzročnik SARS-a nazvan je SARS-CoV, a o antivirusnim agensima usmjerenima protiv SARS-CoV do 2016. objavljeno je preko 3500 publikacija.
- S obzirom da je za virusnu replikaciju odgovoran njegov enzim glavna proteaza (*chymotrypsin-like protease*, 3CL^{pro} ili M^{pro}), **istraživanja antivirusnih terapeutika usmjerena su na inhibitore tog enzima**. Lijekovi dizajnirani za tretiranje SARS-CoV-3CL^{pro} dijele se na dvije skupine:

- peptidni inhibitori koji oponašaju prirodne peptidne supstrate,**
- inhibitori bazirani na malim molekulama, a koji se dobivaju modifikacijom postojećih inhibitora



proteaza, studijama molekuskog pristajanja baziranim na strukturi ili izolacijom iz prirodnih produkata. Pored navedenih, opisani su i inhibitori konjugirani s metalima.



T. Pillaiyar et al, **An Overview of Severe Acute Respiratory Syndrome–Coronavirus (SARS-CoV) 3CL Protease Inhibitors: Peptidomimetics and Small Molecule Chemotherapy.** *J. Med. Chem.* 2016, 59, 6595–6628.

- *Među malim molekulama kao inhibitorima proteina esencijalnih za patogenost virusa (SARS-CoV-2-S, 3CL^{pro}, PL^{pro} (*papain-like protease*, “Ahilova tetiva virusa”) i RdRp (*RNA dependent RNA polymerase*, enzim uključen u replikaciju i transkripciju SARS-CoV-2-genoma) valja istaknuti i prirodne produkte:”

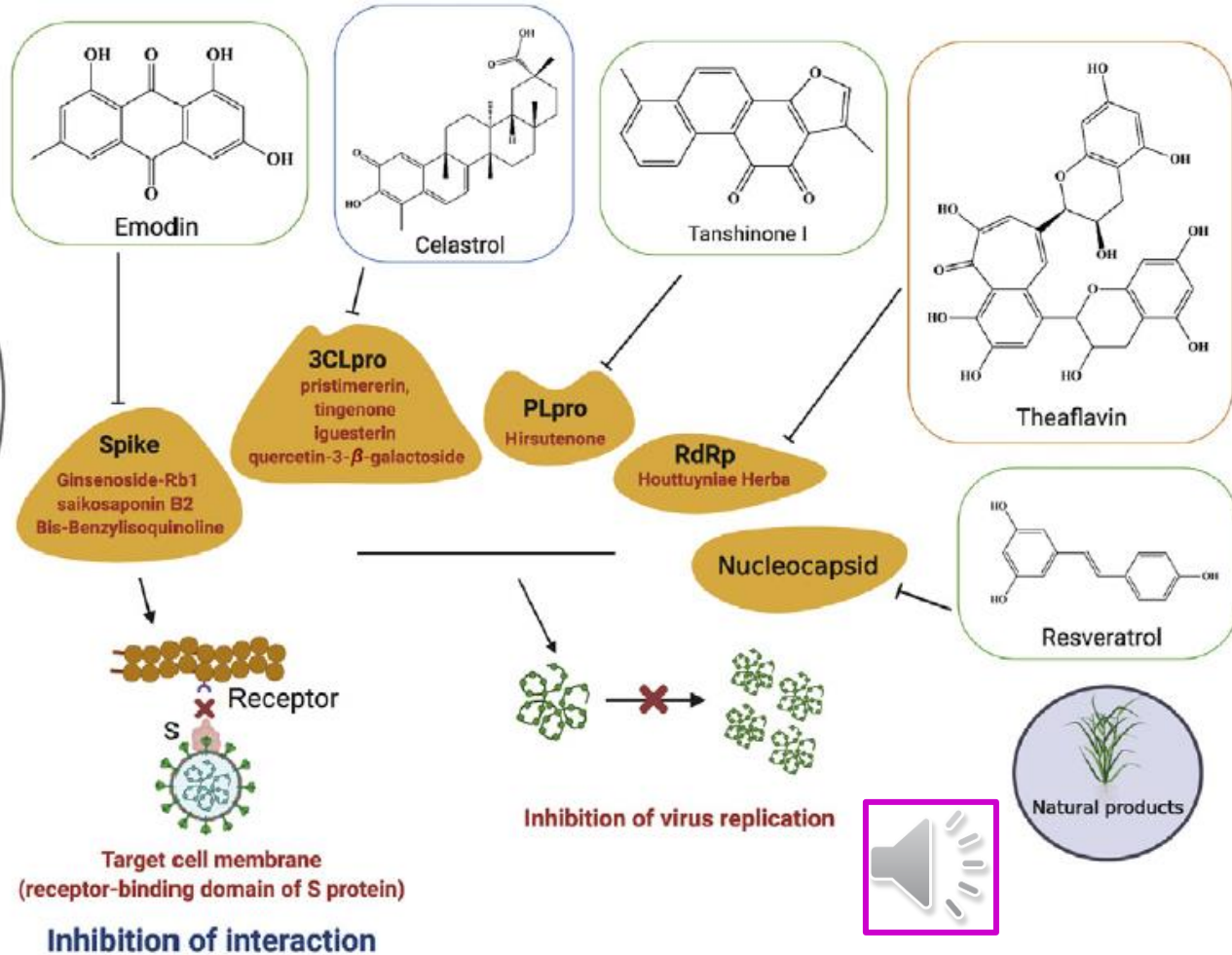
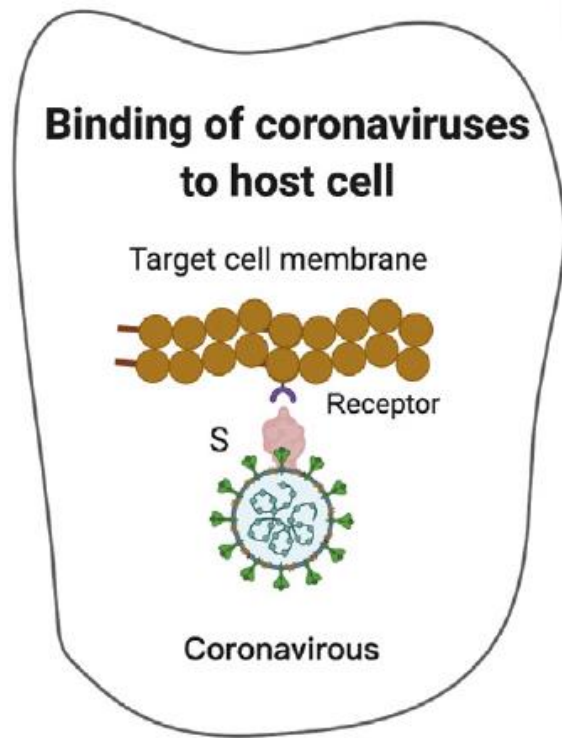
Table 1 Summary of the anti-CoVs effects of natural compounds and their possible action mechanisms.

Plant	Compound	Virus acting on	IC ₅₀ value	Reported antiviral mechanism
<i>Licorice root</i>	Glycyrrhizin	SARS-CoV	300 mg/L	Upregulates nitrous oxide synthase and nitrous oxide production
<i>Polygonum cuspidatum</i>	Resveratrol	MERS-CoV	—	—
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenoside-Rb1	SARS-CoV	100 μmol/L	Inhibits glycoprotein activity
<i>Rauvolfia serpentina</i>	Reserpine	SARS-CoV	6.0 μmol/L	—
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Aescin	SARS-CoV	3.4 μmol/L	—
<i>Boenninghausenia sessilicarpa</i>	Leptodactylone	SARS-CoV	100 μg/mL	—
<i>Lycoris radiata</i>	Lycorine	SARS-CoV	15.7 ± 1.2 nmol/L	—
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Dihydrotanshinone	MERS-CoV	1 μg/mL	—
<i>Bupleurum chinense</i>	Saikosaponin B ₂	HCoV-229E	1.7 ± 0.1 μmol/L	Interferes with events of early viral entry
<i>Stephania tetrandra</i>	Tetrandrine	HCoV-OC43	0.33 ± 0.03 μmol/L	Inhibits p38 MAPK pathway
<i>Stephania japonica</i>	Cepharanthine	SARS-CoV-2	0.98 μmol/L	ACE inhibitor
<i>Rheum palmatum</i>	Emodin	SARS-CoV	200 μmol/L	Blocks the binding of S protein to ACE2
<i>Triterygium regelii</i>	Celastrol	SARS-CoV	10.3 μmol/L	Inhibits SARS-CoV 3CL ^{pro}
<i>Triterygium regelii</i>	Pristimererin	SARS-CoV	5.5 μmol/L	Inhibits SARS-CoV 3CL ^{pro}
<i>Triterygium regelii</i>	Tingenone	SARS-CoV	9.9 μmol/L	Inhibits SARS-CoV 3CL ^{pro}
<i>Triterygium regelii</i>	Iguesterin	SARS-CoV	2.6 μmol/L	Inhibits SARS-CoV 3CL ^{pro}
<i>Ginkgo biloba</i>	Quercetin-3-β-galactoside	SARS-CoV	42.79 ± 4.97 μmol/L	Competitively inhibits SARS-CoV 3CL ^{pro}
<i>Salvia miltiorrhiz</i>	Tanshinones I–VII	SARS–CoV	0.7–30 μmol/L	Inhibits PL ^{pro} activity
<i>Alnus japonica</i>	Hirsutenone	SARS-CoV	4.1 μmol/L	Inhibits PL ^{pro} activity
Black tea	Theaflavin	SARS-CoV-2	—	Inhibits RdRp activity
<i>Myrica rubra</i>	Myricetin	SARS-CoV	2.71 ± 0.19 μmol/L	Inhibits ATPase activity
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Scutellarein	SARS-CoV	0.86 ± 0.48 μmol/L	Inhibits ATPase activity
<i>Angelica keiskei</i>	Chalcones I–IX	SARS–CoV	11.4–129.8 μmol/L	Competitively inhibits SARS-CoV 3CL ^{pro}

—IC₅₀ value or the mechanism of antiviral activity of these active compounds is not clear.



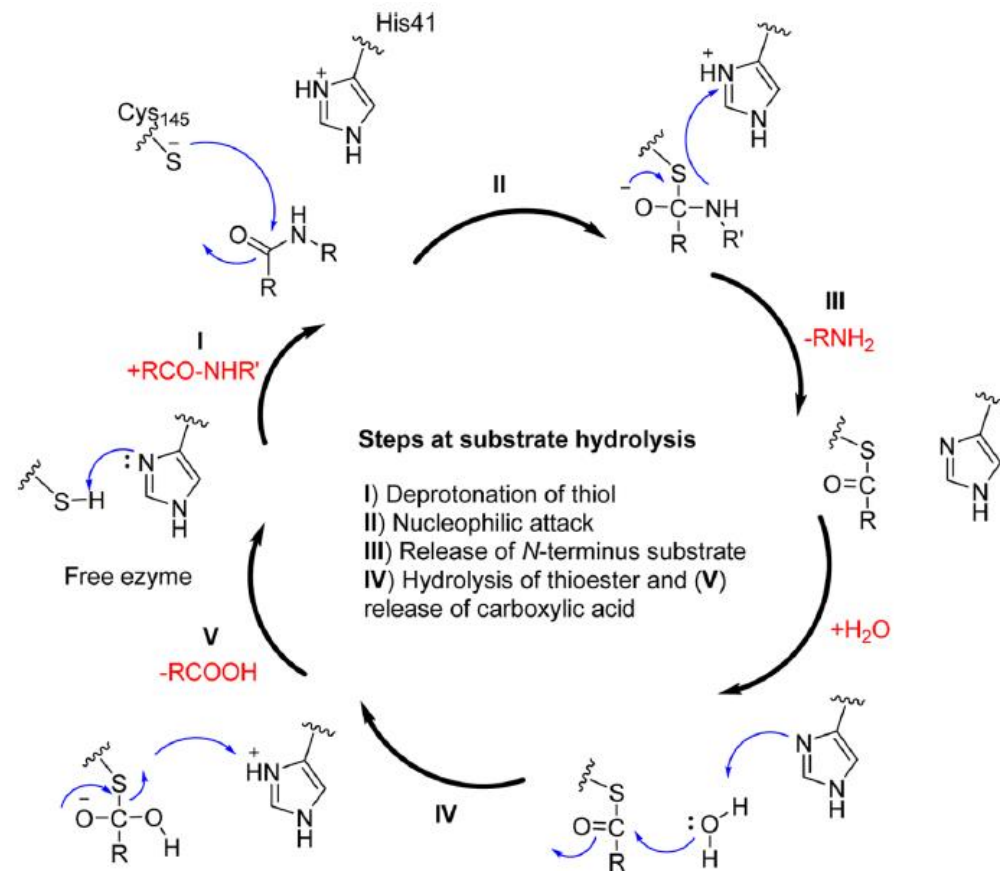
The possible action mechanisms of natural compounds against CoVs.



“Our present review provides an important update on a number of natural products that have shown promise as anti-CoV agents and potential for COVID-19 treatment. However, since many studies about the antiviral effects of the natural compounds and Chinese medicine in this domain are only preliminary, in-depth *in vivo* studies on appropriate animal models are needed to unravel the underlying cellular and molecular mechanisms. Pharmacokinetic studies on the promising natural compounds are few and far between, and should be conducted to obtain pharmacokinetic profile, including absorption, distribution, metabolism and excretion parameters. Moreover, clinical trials (phase I to III) are required to test their anti-CoV efficacy and safety on human subjects.”

- Nakon vezanja SARS-CoV-S-proteina s ACE2-receptorom na površini stanice domaćina, virus ulazi u stanicu nakon čega se njegova RNA veže na domaćinove ribosome omogućavajući translaciju odn. biosintezu dvaju poliproteina koji se u prisutnosti 3CL^{pro} i PL^{pro} cijepaju u komponente potrebne za sastavljanje novih viriona. 3CL^{pro} (glavna proteaza, M^{pro}) neophodna je za virusnu replikaciju i infekciju i stoga je idealna meta za antivirusnu terapiju. U aktivnom mjestu tog enzima nalaze se Cys¹⁴⁵ i His⁴¹, pri čemu Cys-tiolna skupina ima ulogu nukleofila u u reakciji hidrolize poliproteina na odsječku koji obuhvaća najmanje 11 ostataka, a koji obavezno uključuju sekvenciju Leu-Gln-Ser ili Leu-Gly-Ala. Mehanizam hidrolize peptidne veze:

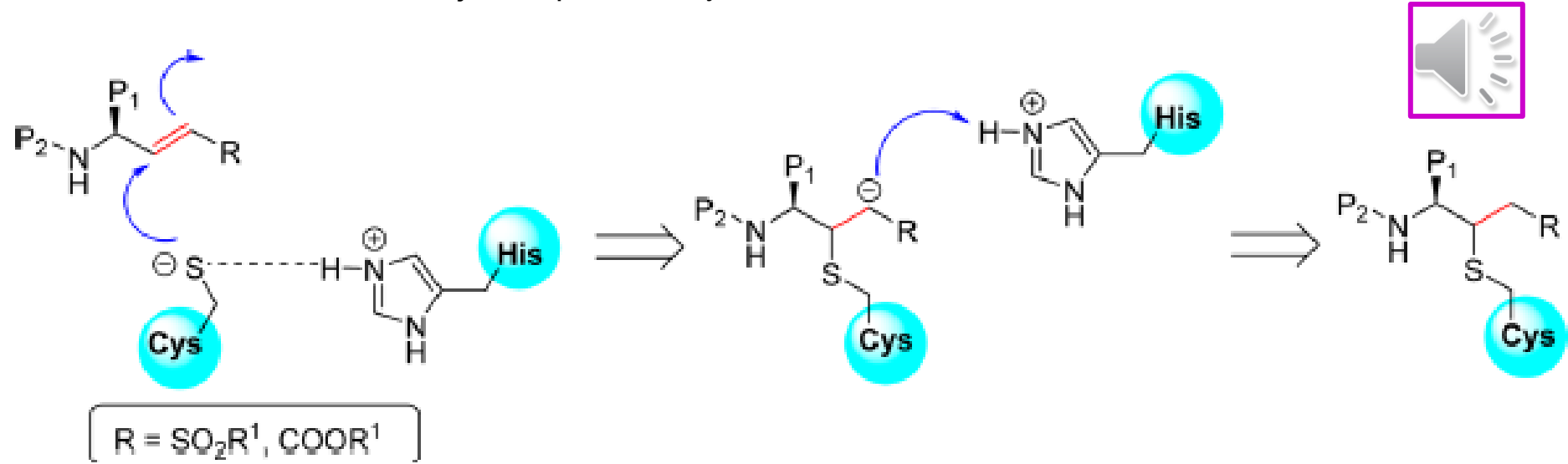
- Deprotoniranje Cys-tiolne skupine (pri čemu se N-atom iz imidazolnog His-ostatka protonira), a generira se nukleofilni sumporov anion.
- Nukleofilni napad sumporovog aniona na karbonilnu amidnu skupinu; u nastalom produktu cijepa se C-N veza pri čemu nastaje tioester, te se oslobađa slobodni amin uz deprotoniranje imidazolnog prstena.
- Slijedi hidroliza nastalog tioestera u karboksilnu kiselinu (voda stječe nukleofilni karakter deprotoniranjem u prisutnosti His-imidazolne skupine). Pri tom se regenerira Cys-tiolna odn. His-imidazolna skupina, odn. enzim se regenerira za sljedeći ciklus.



- Dobri inhibitori dizajniraju se tako da se dio sekvencije iz supstrata, koji se izravno veže na aktivno mjesto proteaze, zamjenjuje s kemijskim “streljivom” koje cilja katalitički mehanizam. Peptidomimetički inhibitori dizajnirani su ugradnjom kemijskog “streljiva” u peptid koji oponaša prirodni supstrat. Ulogu kemijskog streljiva imaju Michaelovi akceptori*, aldehidi, epoksi-ketoni, halometil-ketoni, itd. Spomenuti inhibitori djeluju kroz dvostupanjski proces: najprije peptidomimetički inhibitor tvori nekovalentni kompleks s enzimom tako da se kemijsko streljivo locira u neposrednu blizinu katalitičkih ostataka. Slijedi nukleofilni napad katalitičkog cisteina i tvorba kovalentne veze.

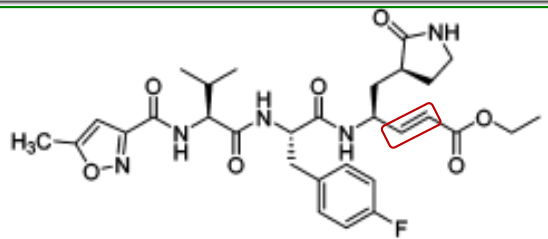
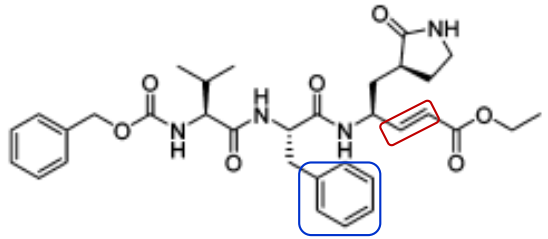
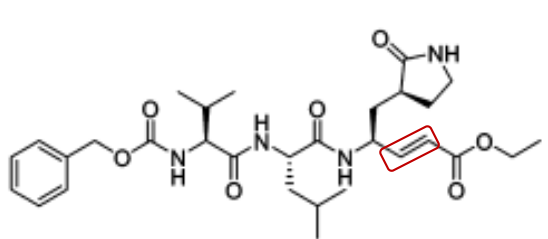
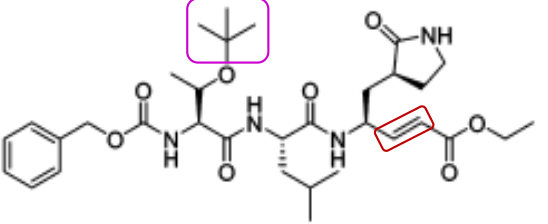
*Michaelovi akceptori su α,β -nezasićeni spojevi koji podliježu Michaelovoj adiciji (1,4-adicijskoj reakciji α,β -nezasićenih karbonilnih spojeva s rezonancijski stabiliziranim ugljikovim nukleofilom).

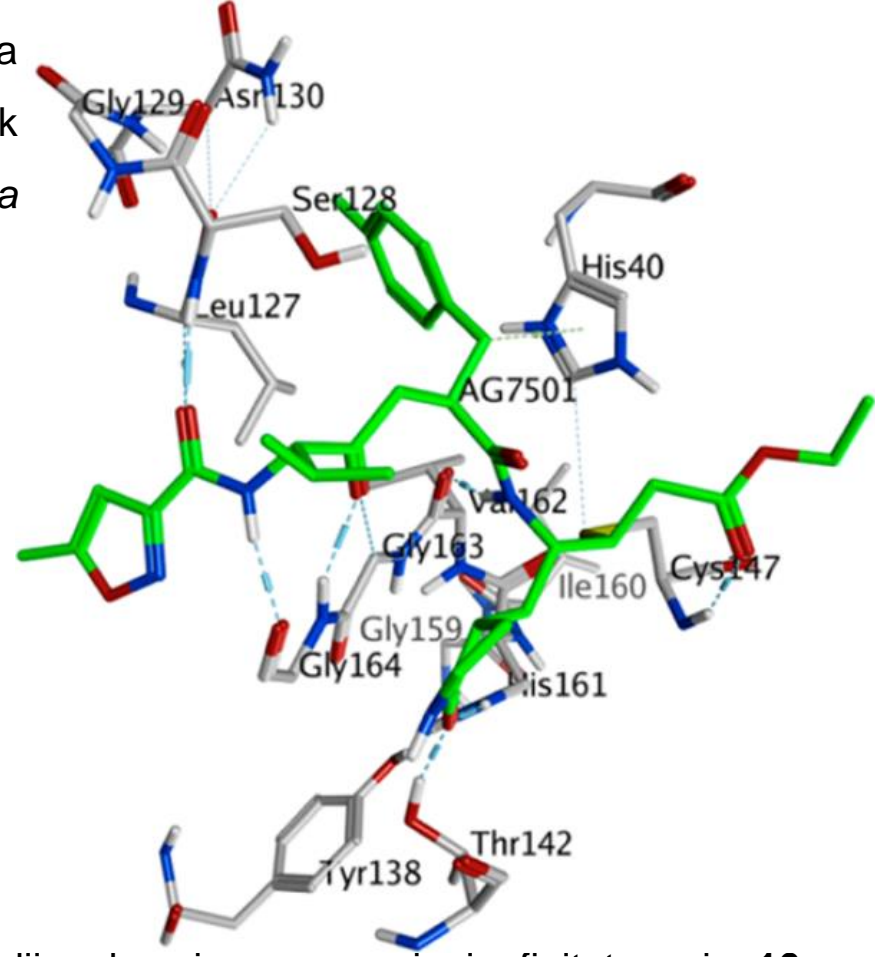
- Strategija u dizajnu inhibitora uključuje zamjenu amidne skupine iz supstrata s **Michaelovim akceptorom**. Potom cisteinski ostatak podliježe 1,4-adiciji s Michaelovim akceptorom iz inhibitora pri čemu se tvori α -karbanion čijim se protoniranjem ireverzibilno inhibira enzim.



- Kao modelni spoj za dizajn ovog tipa inhibitora poslužio je **rupintrivir (2)**, peptidomimetički lijek (inhibitor) koji se veže i na 3C-proteaze (sivo, slika desno).

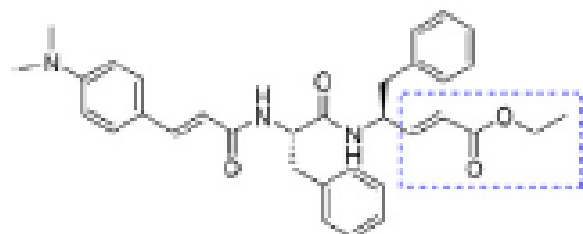
Peptidomimetics with a Michael Acceptor

Entry	Structure	SARS 3CL ^{pro} K _i (μM)
2		>10
16		2.26
17		0.66
18		0.05

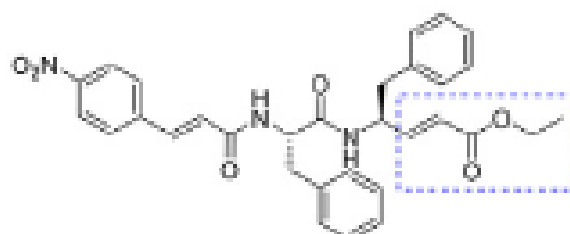


- SAR-studije ukazuju na smanjeni afinitet spoja **16** za vezni džep enzima u odnosu na **17**, što se pripisuje rigidnom i planarnom fenilnom prstenu. Nadalje, umetanje lipofilne t-butilne skupine u spoj **18** povećava vezni afinitet više od 10 puta u odnosu na **17**. Osim toga, zamjena metilizoksazolne skupine iz modelnog spoja **2** s benziloksi-skupinom u spoju **16** povećava vezni afinitet 4 puta.

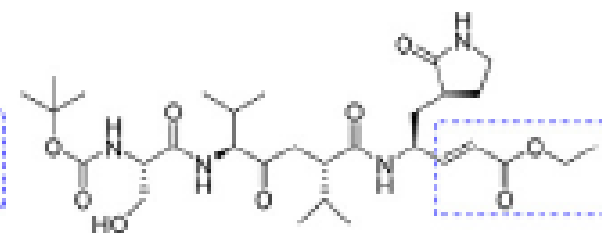
Michael acceptor peptidomimetics 3CL^{pro} inhibitors



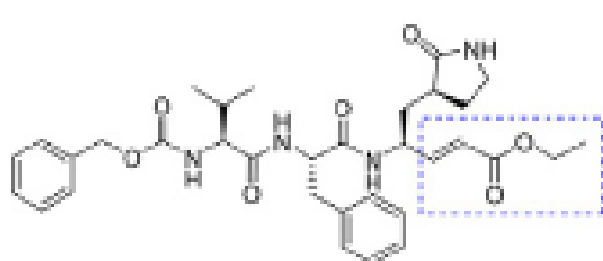
1 SARS-CoV 3CL^{pro}
 $IC_{50}=0.52 \mu\text{M}$



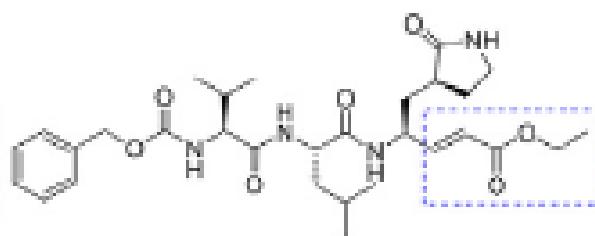
2 SARS-CoV 3CL^{pro}
 $IC_{50}=5 \mu\text{M}$



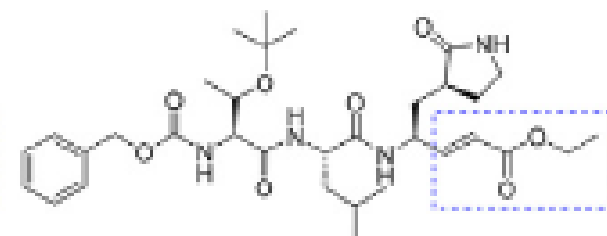
3 SARS-CoV 3CL^{pro}
 $IC_{50}=10 \mu\text{M}$



4 SARS-CoV 3CL^{pro}
 $K_i=2.26 \mu\text{M}$

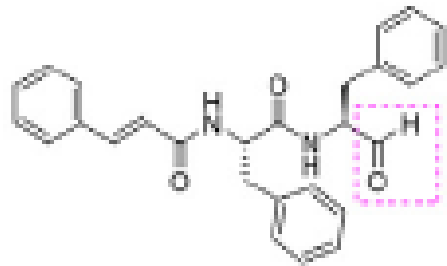


5 SARS-CoV 3CL^{pro}
 $K_i=0.66 \mu\text{M}$



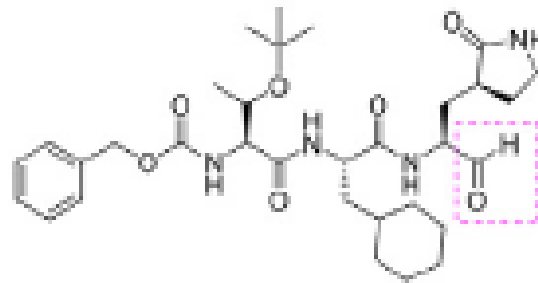
6 SARS-CoV 3CL^{pro}
 $K_i=0.05 \mu\text{M}$

Aldehyde peptidomimetics 3CL^{pro} inhibitors



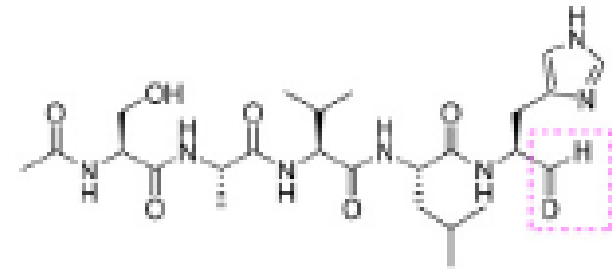
7 SARS-CoV 3CL^{pro}

$K_i = 2.24 \mu\text{M}$



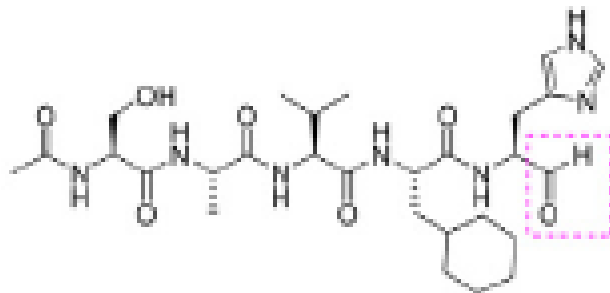
8 SARS-CoV 3CL^{pro}

$K_i = 53 \text{ nM}$



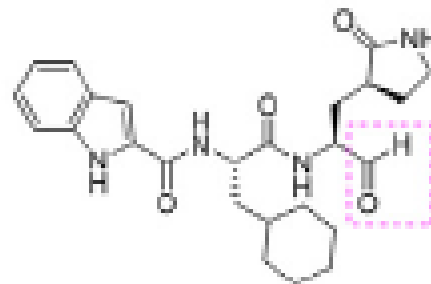
9 SARS-CoV 3CL^{pro}

$IC_{50} = 98 \text{ nM}$



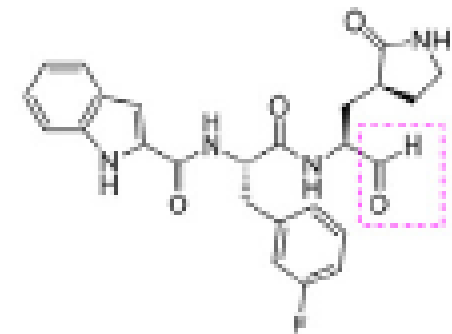
10 SARS-CoV 3CL^{pro}

$IC_{50} = 65 \text{ nM}$



11 SARS-CoV-2 3CL^{pro}

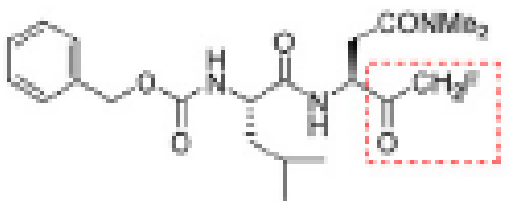
$IC_{50} = 0.053 \mu\text{M}$



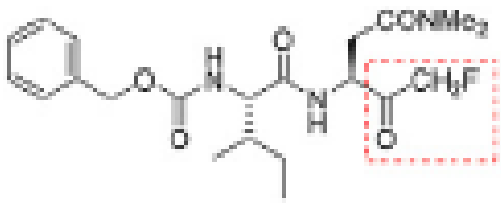
12 SARS-CoV-2 3CL^{pro}

$IC_{50} = 0.04 \mu\text{M}$

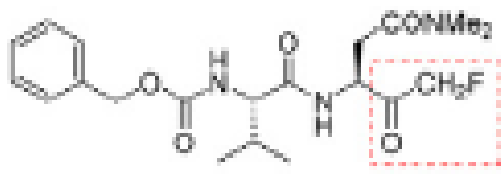
Fluoromethyl ketone peptidomimetics 3CL^{pro} inhibitors



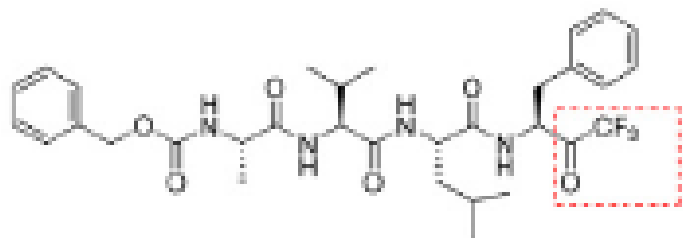
13 SARS-CoV 3CL^{pro}
EC₅₀=2.5 μM



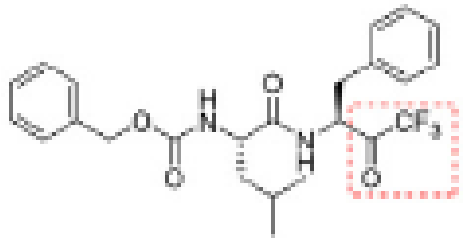
14 SARS-CoV 3CL^{pro}
EC₅₀=5.3 μM



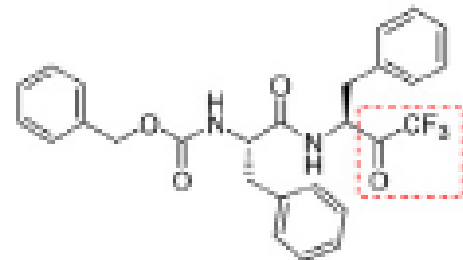
15 SARS-CoV 3CL^{pro}
EC₅₀=6.6 μM



16 SARS-CoV 3CL^{pro}
IC₅₀=10 μM

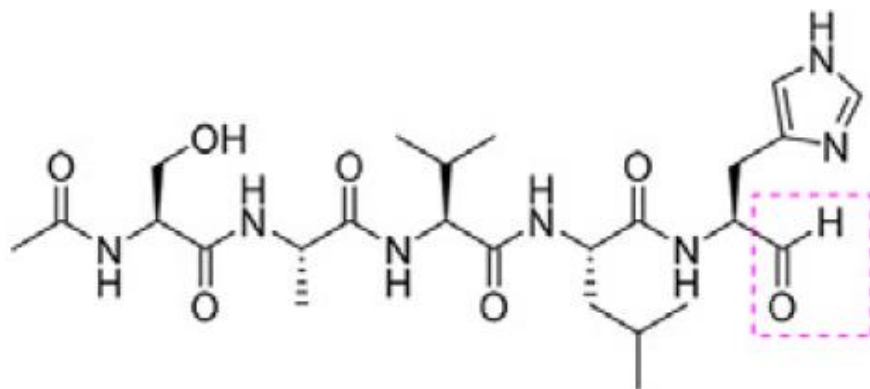


17 SARS-CoV 3CL^{pro}
IC₅₀=15 μM

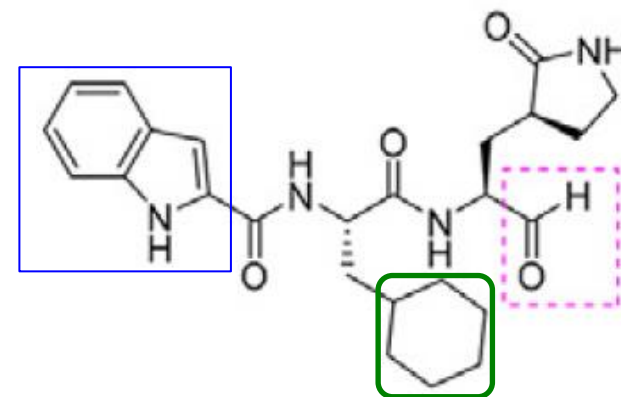


18 SARS-CoV 3CL^{pro}
IC₅₀=20 μM

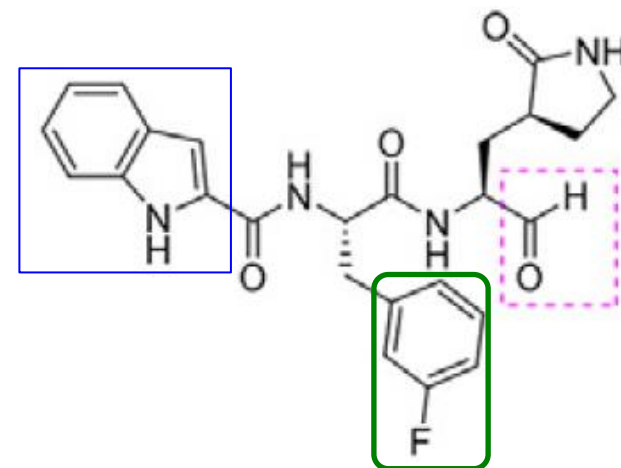
- Aldehydni peptidomimetici **11** i **12** pokazali su dobar inhibitorski učinak protiv SARS-CoV-2-3CL^{pro} [IC_{50} (**11**) = 0,053 μ M; IC_{50} (**12**) = 0,04 μ M]. Pokazuju i izraženu *in vitro* antivirusnu aktivnost (*anti-SARS-CoV-2 effect*) s EC_{50} -vrijednostima 0,53 μ M (**11**) i 0,72 μ M (**12**). *In vivo* pokazuju dobra farmakokinetička svojstva i prihvatljiv preliminarni sigurnosni profil što ih čini potencijalnim prekliničkim kandidatima.
- Usporedbom sa spojem **9**, jasno je da skraćenje peptidne okosnice i umetanje **indolne skupine** povećava inhibitorski učinak peptidomimetika **11** i **12**.



9 SARS-CoV 3CL^{pro}
 $IC_{50}=98 \text{ nM} = 0,098 \mu\text{M}$



11 SARS-CoV-2 3CL^{pro}
 $IC_{50}=0.053 \mu\text{M}$

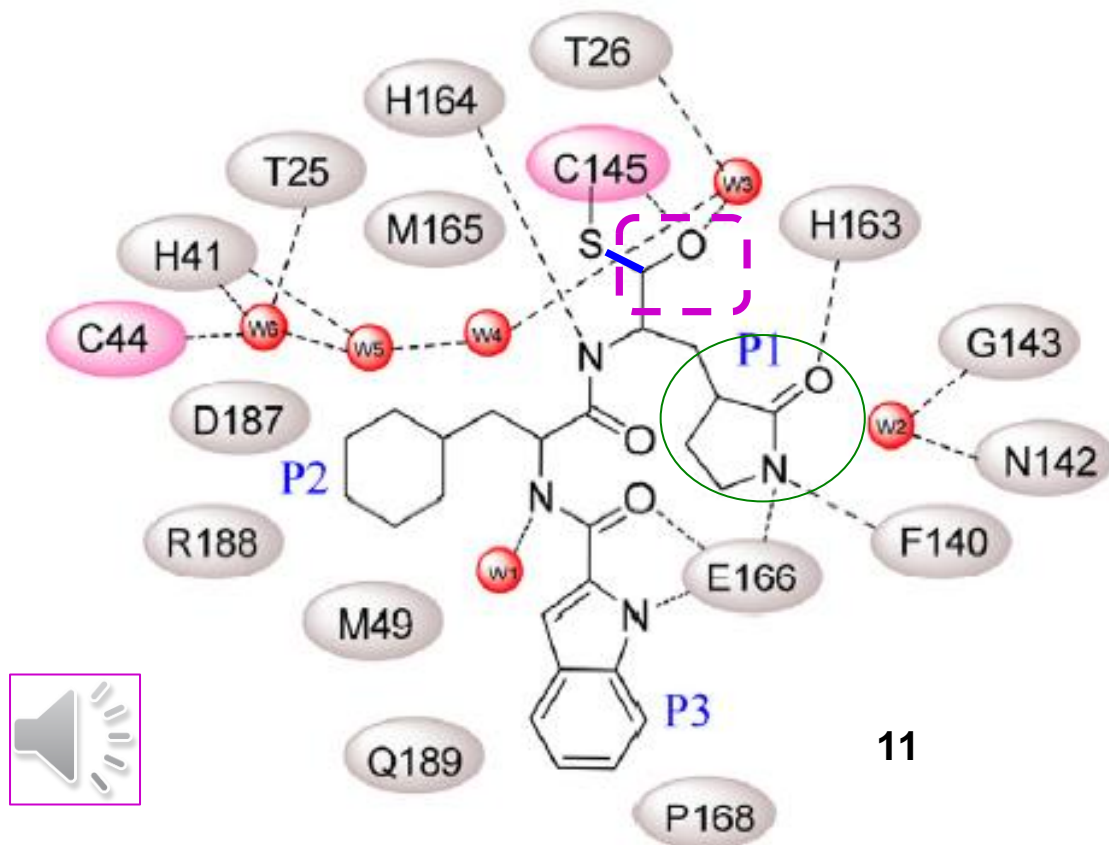


12 SARS-CoV-2 3CL^{pro}
 $IC_{50}=0.04 \mu\text{M}$

- Analizom kompleksa enzim-supstrat **aldehidna skupina** izdvaja se kao streljivo za tvorbu kovalentne veze s Cys iz veznog džepa SARS-CoV-2-3CL^{pro} (aldehidni karbonilni ugljikov atom tvori **kovalentnu vezu** s sumporovim atomom iz Cys¹⁴⁵). Aldehidni kisikov atom tvori vodikovu vezu s okosnicom Cys¹⁴⁵-ostatka, što je ključno za stabilizaciju vezne konformacije.

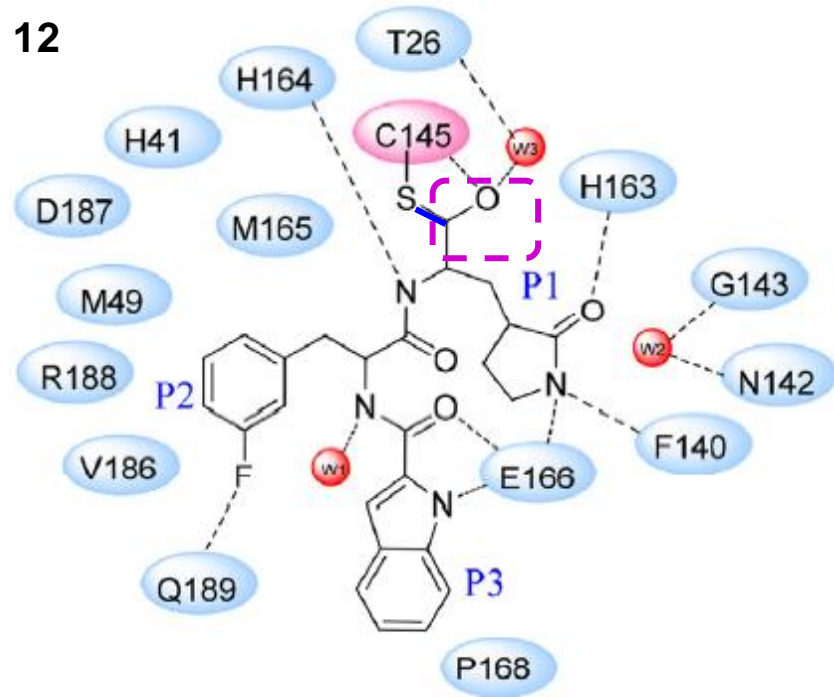
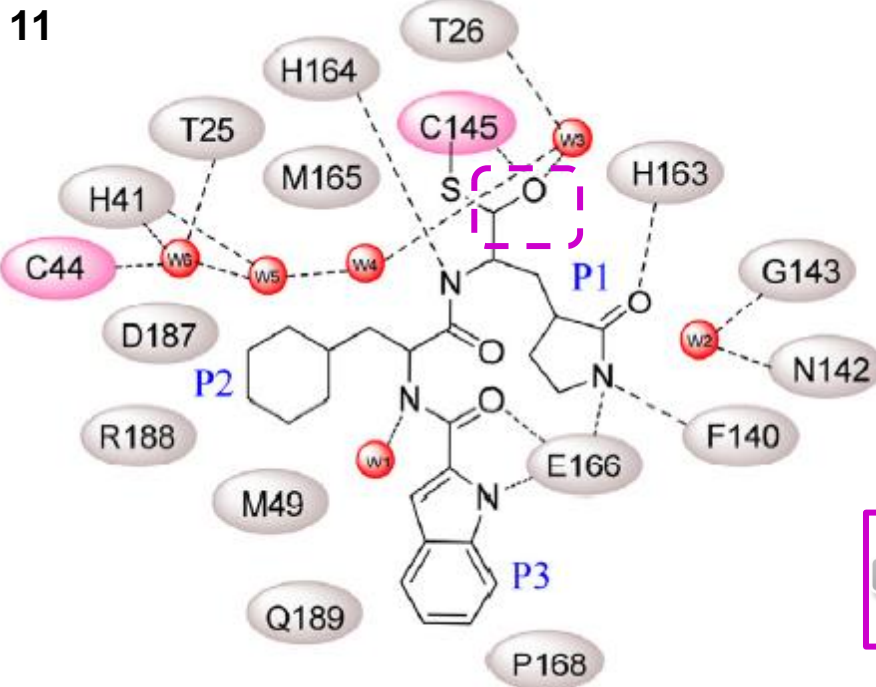
- (S)-γ-laktamski prsten** komplementaran je enzimskom veznom mjestu, što omogućava tvorbu vodikove veze između njegovog kisikovog atoma i bočnog ogranka iz His¹⁶³, te vodikovih veza između njegovog dušikovog atoma s glavnim lancem iz Phe¹⁴⁰ i bočnog ogranka iz Glu¹⁶⁶.

- Cikloheksilna skupina preklapa se s imidazolnim prstenom iz His⁴¹.



- Indolna skupina iz **11** izložena je otapalu i tvori vodikovu vezu s Glu¹⁶⁶. Šest molekula vode (W1-W6) igra važnu ulogu u vezivanju spoja **11** u vezno mjesto enzima: W1 tvori vodikovu vezu s amidnom skupinom iz **11**, dok W2-W6 tvore nekoliko vodikovih veza s aldehidnom skupinom iz **11** te s ostatcima Asn¹⁴², Gly¹⁴³, Thr²⁶, Thr²⁴, His⁴¹ i Cys⁴⁴ koje doprinose stabilizaciji spoja **11** u veznom džepu enzima.

- Vezujući obrazac spoja **12** sličan je motivu viđenom kod **11**. Razlike proizlaze iz prisutnosti 3-fluorfenilneskupine koja uspostavlja hidrofobne interakcije s bočnim ograncima iz His⁴¹, Met⁴⁹, Met¹⁶⁵, Val¹⁸⁶, Asp¹⁸⁷ i Arg¹⁸⁸. Uspostavlja se i vodikova veza između bočnog ogranka iz Gln¹⁸⁹ i atoma fluora.



“The warhead groups of peptidomimetic inhibitors mainly include aldehydes, ketones and different types of Michael receptors. These covalent irreversible inhibitors mainly utilize warhead functional groups to covalently bond with Cys¹⁴⁵ residues in the 3CLpro S1' pocket and thereby exert relatively durable inhibitory effects. Although the recent studies on peptidomimetic inhibitors are fewer than those that investigated nonpeptidic inhibitors, the aldehyde compounds **11** and **12** which are among the recently reported peptidomimetic 3CLpro inhibitors, exhibit excellent inhibitory activity against SARS-CoV-2. The toxicity studies of inhibitor **11** revealed that it might be a good candidate for further COVID-19 clinical research.”

- Krajem 2019. u Kini je otkriven novi koronavirus kojeg je Međunarodni odbor za taksonomiju virusa nazvao SARS-CoV-2, a bolest koju uzrokuje WHO je nazvao COVID-19 (Coronavirus disease-2019) te je 11.3.2020. proglasio pandemiju* te bolesti. Genomi SARS-CoV i novog koronavirusa SARS-CoV-2 vrlo su slični (dijele ~80% genoma), što sugerira i sličnost njihovih interakcija s domaćinom.

- * Prema Hrvatskoj enciklopediji, pandemija se odnosi na širenje neke bolesti na velika prostranstva (na više država, cijeli kontinent ili cijeli svijet. U prošlosti su poznate pandemije kuge u 6.-om stoljeću, kolere u 19.-om i 20.-om stoljeću te španjolske (H1N1, 1918., 50 milijuna umrlih) i svinjske gripe (2009., 18 tisuća umrlih)].

<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>



8.10.2020.



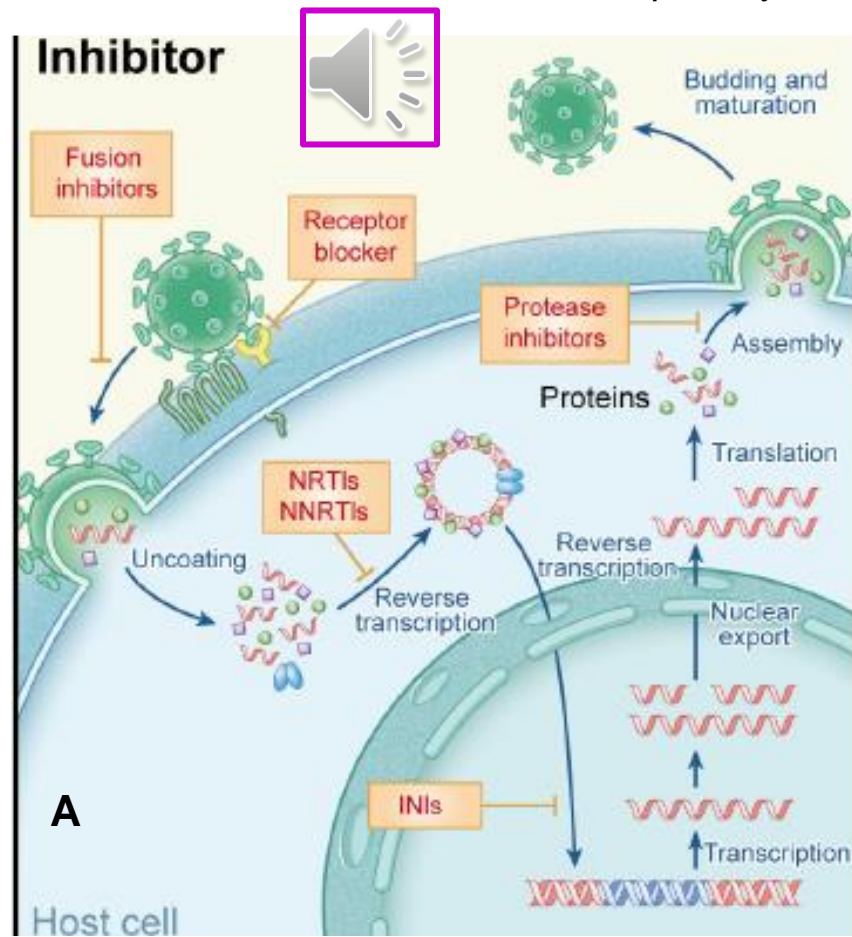
3.11.2020.



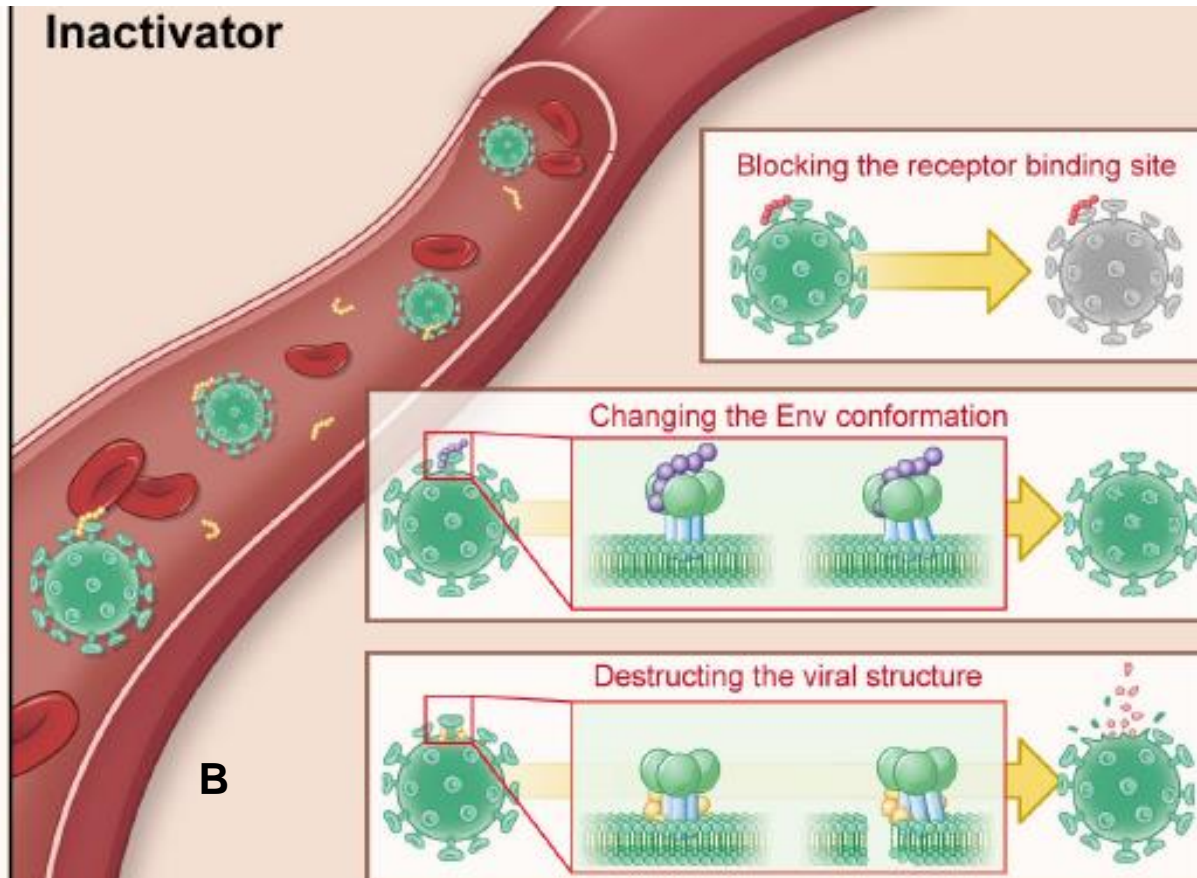
28.11.2020.



- Pojava infektivnih bolesti uzrokovanih visokopatogenim virusima s proteinskom ovojnicom (Env, *envelope*), nametnula je potrebu za sigurnim i učinkovitim antivirusnim lijekovima. Od otkrića prvog antivirusnog lijeka za liječenje HIV-a (1987.), od strane FDA odobreno je preko 80 antivirusnih lijekova namijenjenih za liječenje i prevenciju infekcija. Većina tih lijekova smatra se “pasivnom obranom” zato što moraju ući u zaraženu stanicu da bi inhibirali virusnu replikaciju u toj stanici. Stoga takvi lijekovi moraju imati sposobnost prolaska kroz staničnu membranu bez narušavanja normalne funkcije intracelularnih proteina. U suprotnom, glavina lijeka ostat će izvan stanice i neće inhibirati virusnu replikaciju.
- Za razliku od “pasivne obrane”, neki antivirusni agensi služe kao “čuvari ulaza” (*gate keepers*) koji se bore s virusom izvan stanice. Lijekovi koji čuvaju ulaz dijele se u tri skupine: (i) inhibitori koji blokiraju vezanje virusne čestice na stanicu (inaktivatori virusa), (ii) antagonisti receptora koji se vežu na receptore na površini stanice i tako blokiraju vezanje viriona za receptor te (iii) inhibitori fuzije koji blokiraju membransku fuziju (fuziju membrana virusa i napadnute stanice). Za razliku od inhibitora fuzije i antagonista receptora za čiju je aktivnost nužna prisutnost ciljnih stanica, inaktivatori virusa napadaju i inaktiviraju virusne čestice u krvotoku i to interakcijom s virusnim proteinima ovojnice.



- Mehanizmi inaktivacije virusa mogu biti različiti: (i) inaktivatori se vežu na receptorska vezna mjesta (RBS, *receptor-binding site*), (ii) inaktivatori induciraju konformacijske promjene Env-proteina uslijed čega virusne čestice gube sposobnost ulaska u stanicu, (iii) inaktivatori se vežu na virusnu lipidnu membranu uzrokujući tako razaranje membrane i curenje virusnog genetičkog materijala.
- Takvi PPVIs (*protein or peptide-based virus inactivators*) opisani su za HIV, gripu, ZIKV (zika virus), DENV (denga virus) i HSV (herpes virus)], a sigurniji su za *in vivo* primjenu na ljudima u odnosu na npr. deterdžente koji provode nespecifičnu lizu lipidnih membrana i virusa i stanica domaćina.





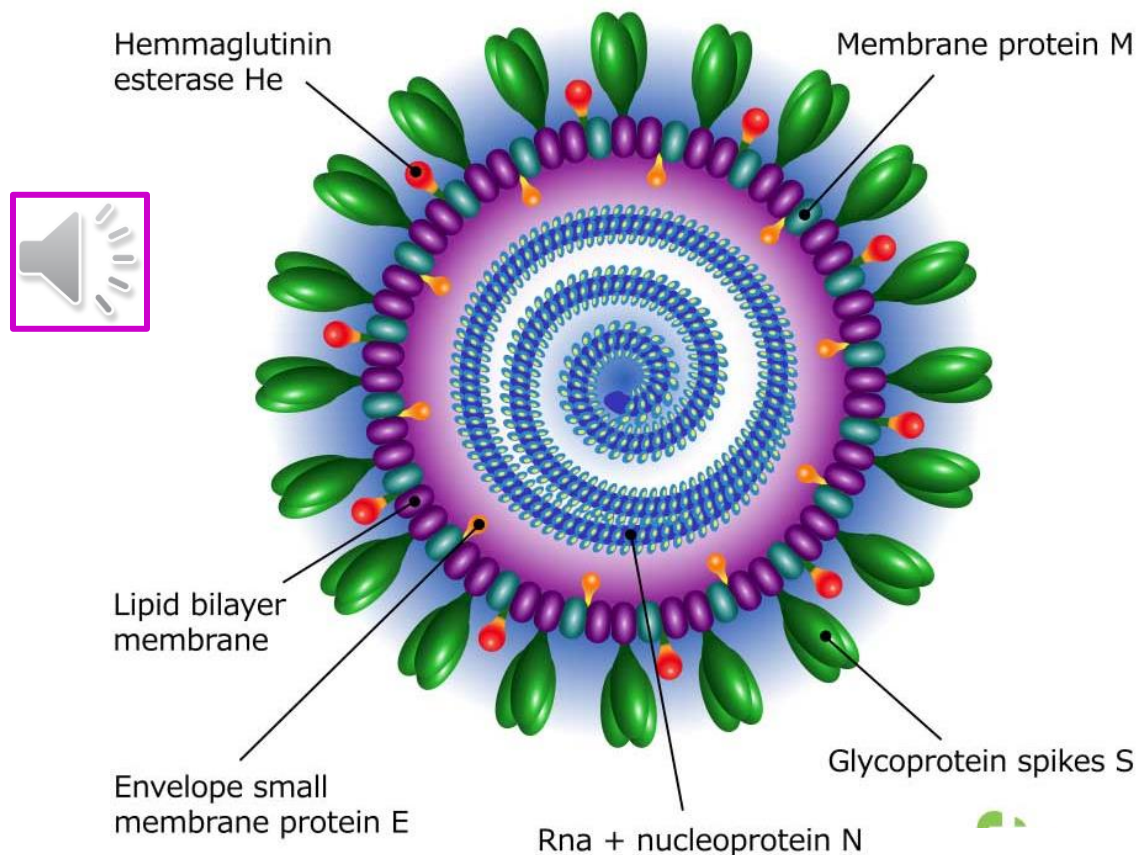
- Osim toga, peptidni i proteinski lijekovi zbog svoje veličine ne ulaze u stanicu i ne ometaju normalnu funkciju intracelularnih proteina te su stoga sigurniji od malih molekula kao kemijskih lijekova (*small-molecule chemical drugs*).
- Ipak, treba naglasiti da posljedice dugotrajne uporabe PPVIs, kao mimetika humanih proteina, na normalnu funkciju našeg organizma još uvijek nisu do kraja poznate (mnogi kandidati za lijekove još nisu stigli do kliničke faze ispitivanja). Drugi problem je moguća imunogenost PPVIs (mogu inducirati tvorbu protutijela koja će oslabiti njihovu inaktivacijsku aktivnost). Nadalje, imaju kratko poluvrijeme života i nisku oralnu biodostupnost što podrazumijeva često injektiranje. Nadalje, treba biti svjestan visokih troškova dugotrajnog liječenja kroničnih virusnih oboljenja pomoći PPVIs. Ipak, i pored svih spomenutih nedostataka PPVIs, oni su i dalje dobar izbor za hitno liječenje i prvu pomoć kod virusnih infekcija, do tvorbe zaštitnih protutijela koja se bore protiv virusa.
- Zaključno, liječenje virusnih bolesti pomoći PPVIs zasniva se na njihovoj kratkotrajnoj primjeni (1-3 tjedna) što značajno reducira troškove. Potrebno ih je primijeniti injektiranjem kako bi brže djelovali, a njihovo kratko poluvrijeme života može biti i prednost, zato što onemogućava akumulaciju u tijelu.
- *“Nowadays, a variety of protein and peptide drugs, including antibody drugs, have been approved for clinical use. Because of their advantages mentioned above, we believe that more and more PPVIs will be developed for treatment and prevention of viral infections, particularly useful for combating the pandemics or epidemics of newly emerging and re-emerging virus infections.”*

TABLE 1 | Summary of protein- and peptide-based virus inactivators.

Name	Sequence	Target	EC50* (virus tested)	Reference
HIV inactivators				
sCD4	Extracellular D1–D4 or D1D2 domain	gp120 CD4bs	153 and 297 nM (HIV-1 IIIb and Bal, respectively)	Deen et al., 1988; Trauneker et al., 1988; Daar et al., 1990; Orloff et al., 1993
2DLT	D1D2 domain-L35-T1144	gp120 CD4bs + gp41 PFI	17.3–78.6 nM (multiple HIV-1 strains)	Lu et al., 2012
2Dm2mv4Dm2m	2 or 4 mD1.22 with 2 m36.4	gp120 CD4bs + CoRbs	0.3–1.1 nM (HIV-1 IIIb)	Chen et al., 2014; Qi et al., 2017
Triazole KR13	Modified peptide derived from 12p1 (RINNIPWSEAMM)	gp120 CD4bs + CoRbs	0.5–25.6 μ M (multiple HIV-1 strains)	Bastian et al., 2011, 2013
DAVEI	CVN + gp41 MPER	gp120 glycan sites + gp41	28.3 nM (HIV-1 Bal.01 pseudovirus)	Parajuli et al., 2018
Influenza virus inactivators				
Urumin	IPLRGAFINGRWDSQCHRFSNGAIACA	H1 HA conserved stem	HNBD [#]	Holthausen et al., 2017
ZIKV inactivators				
DN59	E protein stem (aa 692–724): MAILDDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQ VFGAIY	DENV lipid membrane	4.8 μ M (DENV-2)	Schmidt et al., 2010a,b; Lok et al., 2012
Z2	E protein stem (aa 421–453): MAVLGDTAWDFGSGGALNSLGKGIH QIFGAAF	ZIKV lipid membrane	2.52 μ M	Yu et al., 2017
HSV inactivators				
gB94	gB ectodomain (aa 496–510): KTTSSIEFARLQFTY	HSV-1	125 μ M	Akkarawongsa et al., 2009
gB122	gB ectodomain (aa 636–650): GHRRYFTFGGGYVYF	HSV-1 and 2	118 μ M	Akkarawongsa et al., 2009
U-1	CRS on gB surface (aa 224–243): HRDDHETDMELKPANAATR	HSV-1 and 2	HNBD [#]	Cetina-Corona et al., 2016
U-2	CRS on gB surface (aa 413–432): CIGKDARDAMDRIFARRYNA	HSV-1 and 2	HNBD [#]	Cetina-Corona et al., 2016
CB-1	CRS on gH surface (aa 609–626): QATRSETPVEVLAQQTHG	HSV-1 and 2	HNBD [#]	Cetina-Corona et al., 2016
CB-2	CRS on gH surface (aa 646–664): PEASHRCGGQSANVEPRIL	HSV-1 and 2	HNBD [#]	Cetina-Corona et al., 2016)

*EC50, half maximal effective concentration causing virus inactivation. [#]HNBD, has not been defined. CD4bs, CD4-binding site; CoRbs, coreceptor-binding site.

- Koronavirusi često su prisutni kod sisavaca i ptica. Kao i ostali virusi, a za razliku od organizama, nemaju staničnu građu već su njihove čestice (promjera 120-160 nm) kompleksi makromolekula [RNA, proteinski omotač ili kapsida (kapsida i nukleinske kiseline čine nukleokapsidu) te vanjska lipidna ovojnica iz koje strše glikoproteinski izdanci].
- Jednolančana pozitivna RNA s oko 30000 nukleotidnih sekvenci čini virusni genom, a prisutna su i 4 glavna strukturna proteina: površinski šiljak protein ili protein šiljastih izdanaka (S, engl. *spike*), mali protein ovojnice (E, engl. *envelope*), membranski protein (M, engl. *membrane*) i nukleokapsidni protein (N, engl. *nucleocapsid*) protein. Površinski šiljak protein (S) izlazi iz virusne lipidne ovojnice zbog čega virus oblikom nalikuje na krunu (*lat. corona*).



[Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate WIV07, complete genome](#)

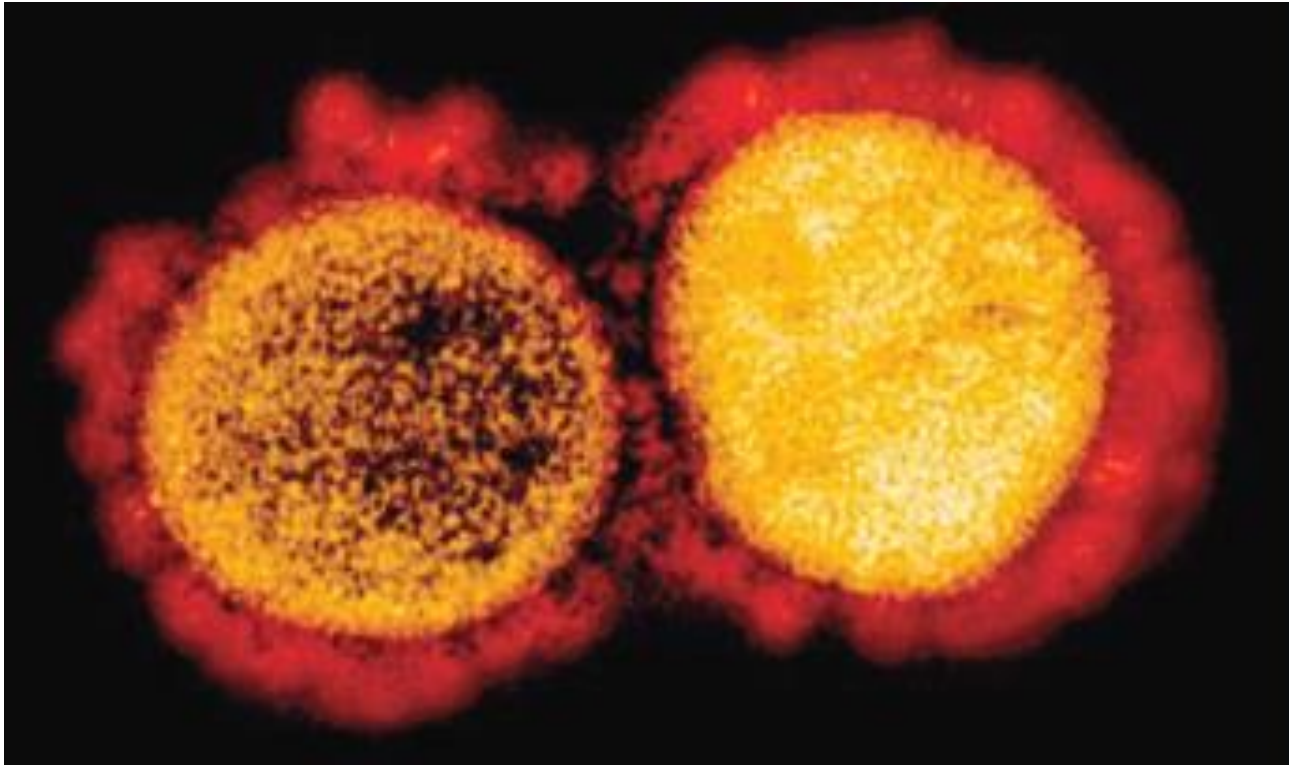


Figure 1. Transmission electron micrograph of SARS-CoV-2 virus particles, isolated from a patient. Image captured and color-enhanced at the NIAID IRF in Fort Detrick, Maryland. The spike protein (red) protrudes from the virions resulting in the namesake 'corona'.

Credit: NIAID-RML.

IRF: Integrated research facility.

Image used under creative commons license

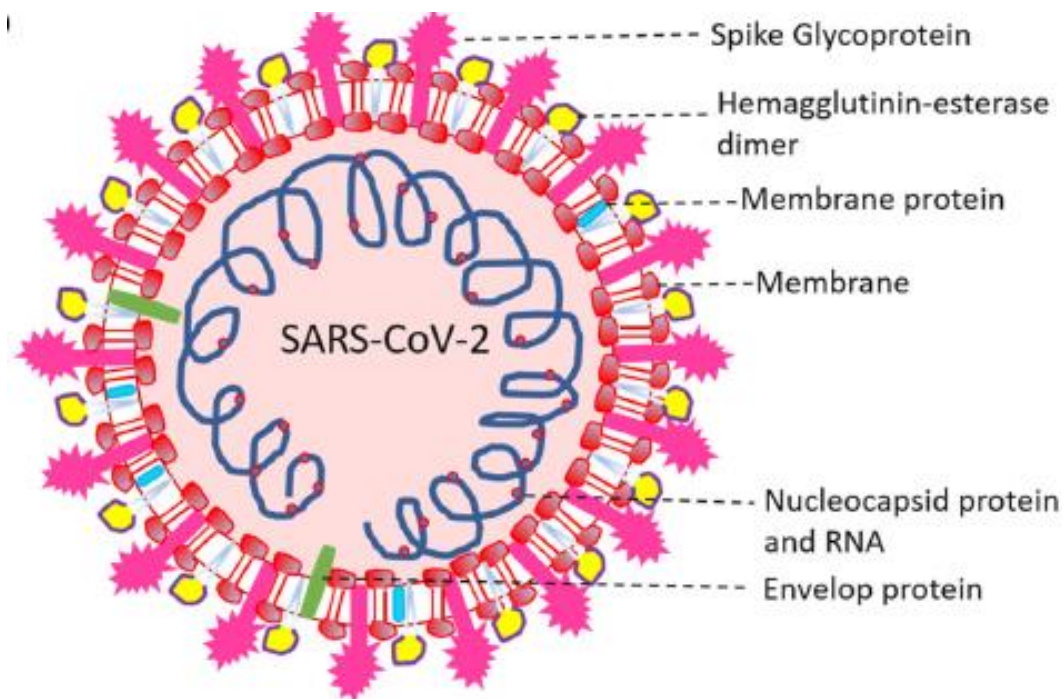
(<https://www.flickr.com/photos/niaid/49645402917/in/album-721577129>)



- Unutar proteinskog omotača (kapside) nalazi se nukleokapsida (N-protein) čiji se *N*-terminus vezuje za virusnu RNA, omogućujući virusnu replikaciju i transkripciju. Stoga se nameće potreba pronalaženja lijeka koji će spriječiti kontakt između *N*-terminusa N-proteina i virusne jednolančane pozitivne RNA.
- M-protein najzastupljeniji je na površini virusne čestice (sudjeluje u sastavljanju virusa) gdje se nalazi i S-protein koji upravlja interakcijom virusa s receptorima na površini stanice domaćina kao i fuzijom virusa i stanične membrane domaćina kako bi se olakšao ulazak virusa u stanicu domaćina.
- E-protein, mali membranski protein izgrađen od 76-109 aminokiselina, ključan je za sastavljanje virusa, permeabilnost membrane domaćina i interakciju virusa i domaćina.
- Lipidna ovojnica enkapsulira genetski materijal.



- Dimer hemaglutinin-esteraza (HE), lociran na površini virusa, važan je za inficiranje stanica domaćina. S-protein sadrži tri identična lanca građena iz 1273 aminokiseline, a sadrži i 2 dobro definirane domene S1 i S2 uključene u stanično prepoznavanje i fuziju virusa sa staničnom membranom domaćina pri čemu dolazi do još uvijek nerazjašnjenih konformacijskih promjena.

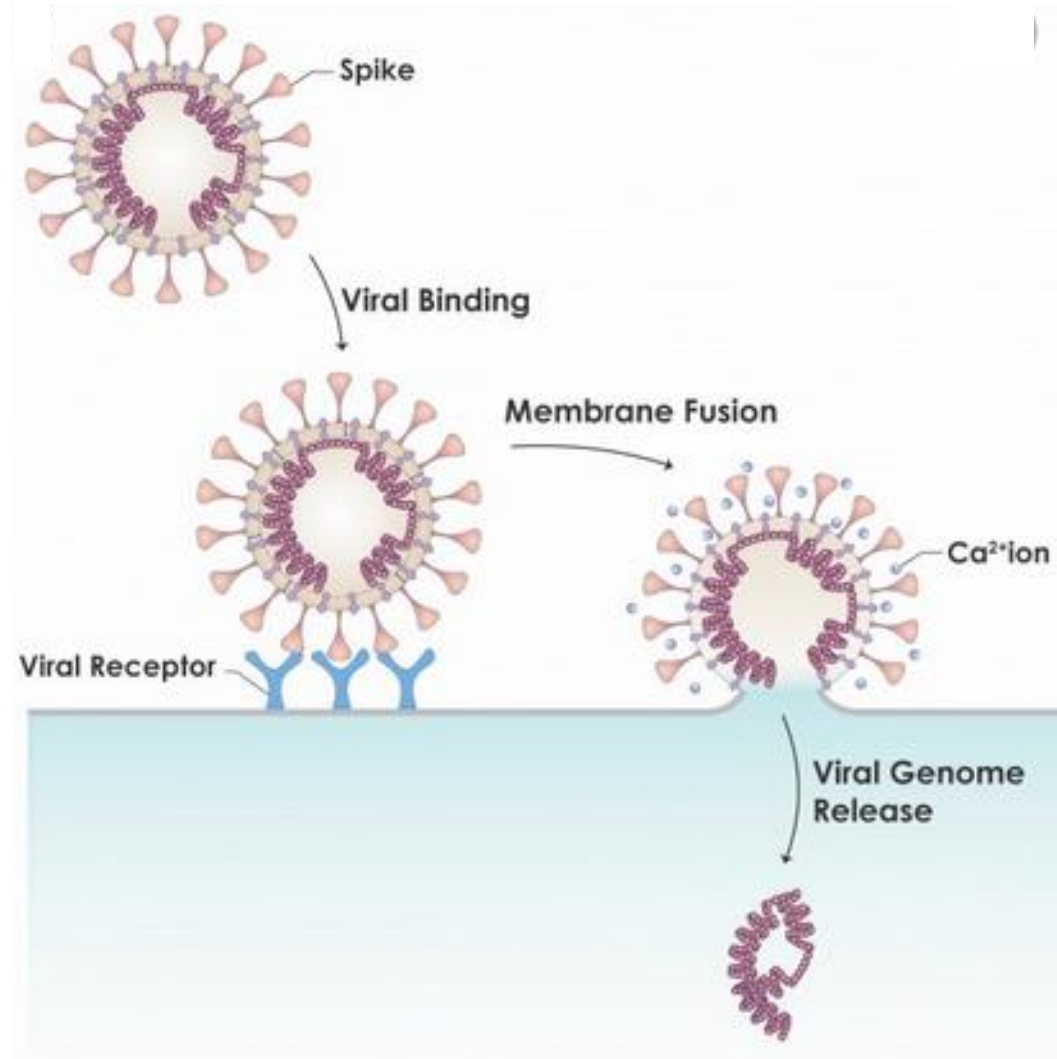


Overview of the name and functions of SARS-CoV-2 proteins. The four structural proteins and five of the most important Nsp are provided

Sr. No.	Name of Viral Protein	Function
Structural Proteins		
1	Nucleocapsid (N) protein	Houses the viral genome.
2	Envelope (E) protein	Encases nucleocapsid and makes complete viral envelope along with M protein.
3	Membrane (M) glycoprotein	M and E protein makes complete viral envelope.
4	Spike (S) glycoprotein	On the surface of envelope, characteristic spike proteins. Attachment of virus with receptor at receptor binding domain (RBD). Cellular serine protease (TMPRSS2/Cathepsin B) cleaves S protein this facilitates viral entry.
Non-structural proteins (Nsp)		
5	Mpro	Also called as 3-chymotrypsin-like protease (3Clpro) It cleaves viral polyproteins pp1a and pp1ab at 11 sites to yield Nsp4 to Nsp16.
6	PLpro	It cleaves viral polyprotein at N terminus to yield Nsp1 to Nsp3
7	Nsp12	RNA dependent RNA polymerase Replication of virus
8	Nsp13	Helicase activity facilitates RNA dependent RNA polymerase (RdRp) during viral RNA replication
9	Nsp1, Nsp3c, and open reading frame (ORF) 7a	Inhibiting host immune response



- Virusni S-protein (Spike) specifično prepoznaje angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE2, *Angiotensin-converting enzyme*), receptor prisutan na površini brojnih humanih stanica, uključujući i stanice pluća. Slijedi cijepanje S-proteina djelovanjem proteaza iz domaćina što je okidač za aktivaciju mehanizama membranske fuzije (krucijalni biološki proces stapanja dviju odvojenih lipidnih membrana u jednu). Fuzija membrana domaćina i virusa omogućava ulazak virusa u stanicu nakon čega dolazi do replikacije virusa u citoplazmi stanice i ispoljavanja njegovog citotoksičnog učinka.







- Domaćinov receptor ACE2 jest transmembranski glikoprotein, a djeluje kao enzim monokarboksi-peptidaza.
- Raspoloživi podaci ne podržavaju ideju o testiranju ACE2 supstrata, npr. angiotensina, kao kandidata za potencijalne SARS-terapeutike.
- S druge strane, terapijama usmjereni na ciljanje interakcija ACE2 i S-proteina zasada pokazuju obećavajuće rezultate.

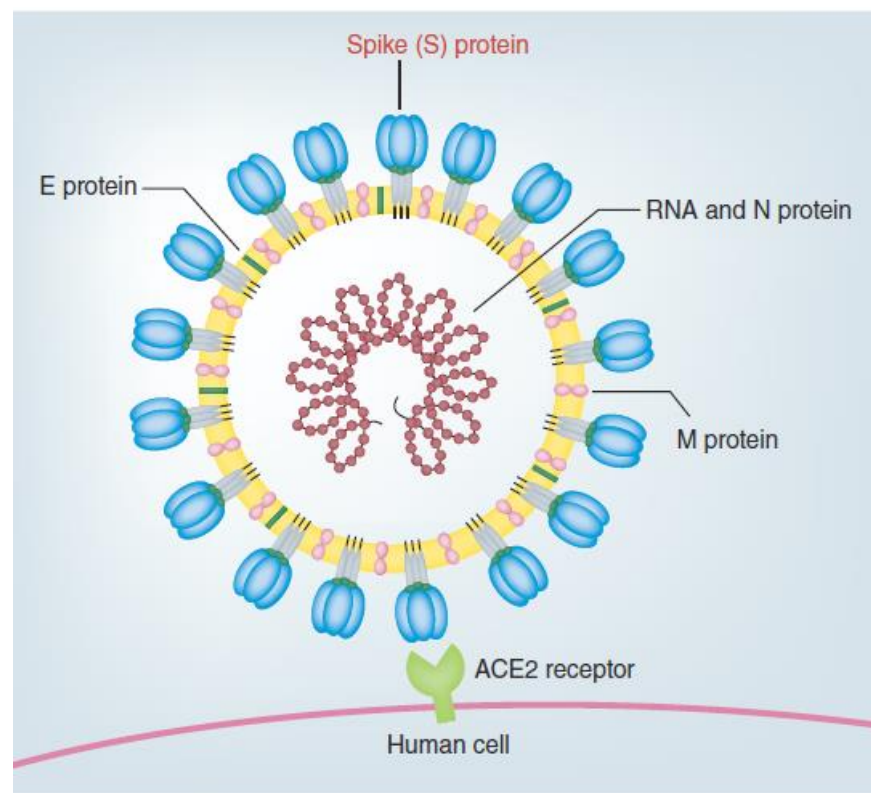


Figure 2. Representation of general structure of SARS-CoV's and host cell entry receptor ACE2. The major viral proteins and RNA strand are illustrated, these include the envelope (E) protein, nucleocapsid (N) protein, membrane (M) protein and spike (S) protein, along with the host entry receptor ACE2. The S protein-ACE2 interaction is a crucial mechanism of SARS-CoV entry into host cells.

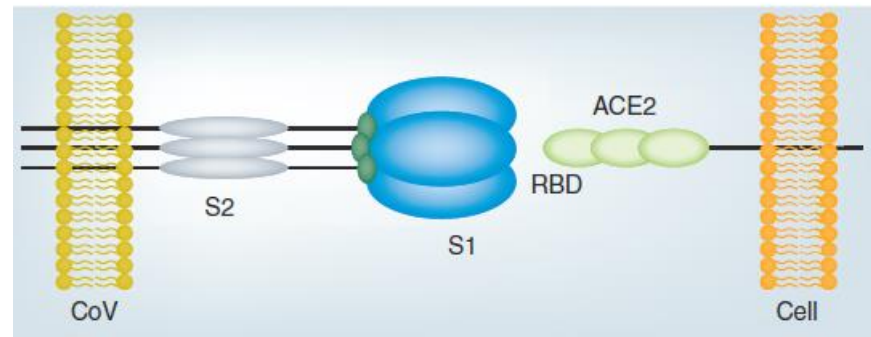


Figure 3. A close-up depiction of the S protein and host ACE2 receptor. The viral S protein (composed of S1 and S2 subunits) is a trimeric membrane-embedded glycoprotein. The RBD of the S1 region mediates initial binding with the host entry receptor ACE2, a transmembrane protein is represented in light green. The phospholipid bilayer of the viral particle is represented in yellow while host membrane phospholipid bilayer is represented in orange. RBD: Receptor-binding domain.

- U ovim okolnostima, uobičajeni dugotrajni postupci otkrića lijekova nisu opcija, a razumni alternativni pristupi odnose se na prenamjenu postojećih lijekova te cijepljenje i imunoterapiju (zadnja 2 pristupa baziraju se na ciljanju peptidnih meta). Prednosti peptidnih lijekova u odnosu na druge molekule su njihova specifičnost i afinitet za željene biološke mete te niska toksičnost zbog ograničene mogućnosti nakupljanja u organizmu. Njihovi nedostaci (niska biodostupnost i proteolitička nestabilnost u gastrointestinalnom traktu i serumu) prevladava se primjenom peptidomimetika.
- Od početka pandemije peptidomimetici se istražuju kao inhibitori interakcije RBD-domene iz S-proteina (RBD, *receptor binding domain*) i ACE2-receptora kao mehanizma ulaska virusa u stanicu putem membranske fuzije. Dakle, cilj je prekinuti inicijalno vezanje SARS-CoV-2-S-RBD s ACE2-receptorom s površine stanica domaćina.
- Pokazano je da se interakcija SARS-CoV-2-S-RBD s ACE2-receptorom ostvaruje preko ACE2-domene koja ima konformaciju α -uzvojnice. Stoga je sintetiziran peptid SBP1 (*Spike-binding Peptide 1*) sačinjen iz 23 proteinogene aminokiseline (IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS), kao mimetik ACE2 α -uzvojnice koji se čvrsto veže na SARS-CoV-2-S-RBD onemogućavajući tako njegovu interakciju s ACE2 odn. blokirajući ulazak virusa u stanicu.





Ile-Glu-Glu-Gln-Ala-Lys-Thr-
Phe-Leu-Asp-Lys-Phe-Asn-
His-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Phe-
Tyr-Gln-Ser-NH₂

Spike-binding Peptide 1 (SBP1)

Product Number: 732-20

\$125.00 - \$475.00

-	0	+	732-20 1mg	\$125.00
---	---	---	------------	----------

-	0	+	732-20 5mg	\$475.00
---	---	---	------------	----------

Molecular Weight: 2802.01

Salt Form: TFA

Purity: >97%

Sequence (3-letter): Ile-Glu-Glu-Gln-Ala-Lys-Thr-Phe-Leu-Asp-Lys-Phe-Asn-His-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Phe-Tyr-Gln-Ser-NH₂

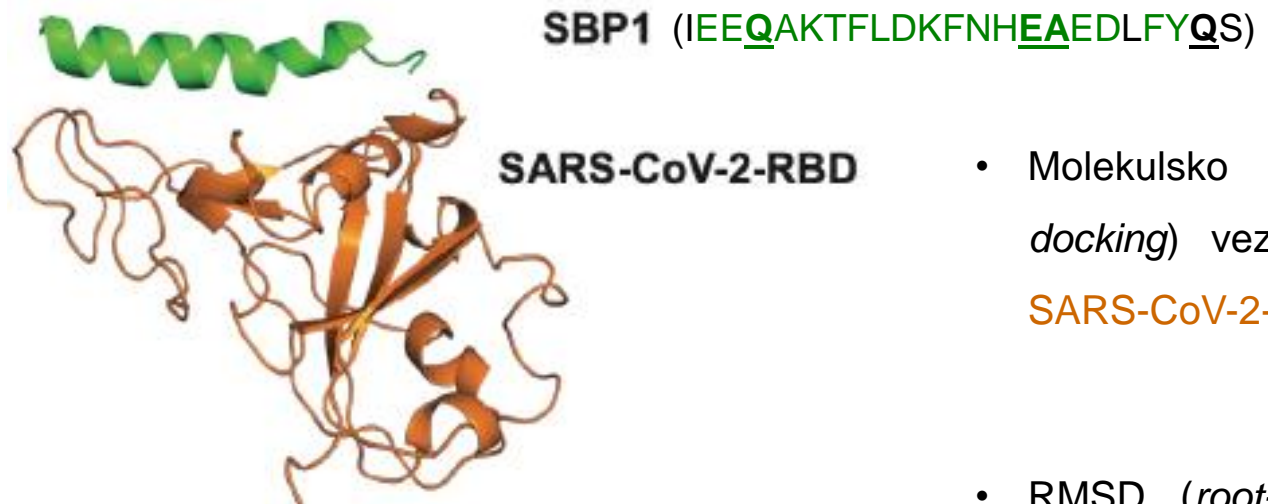
Sequence (1-letter): IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS

Storage: -20 °C or below

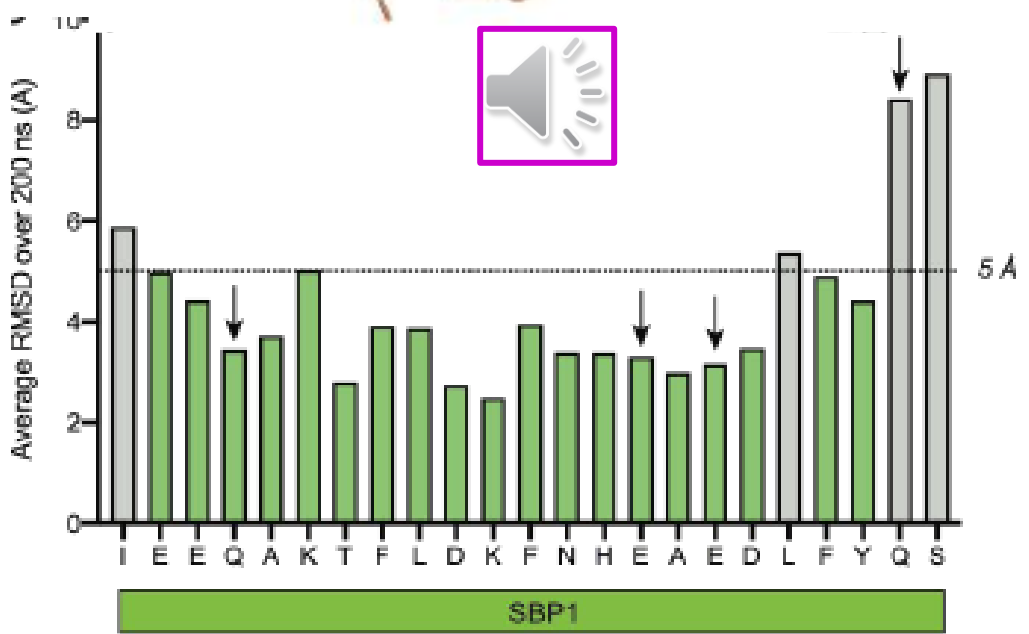
The novel coronavirus, SARS-CoV-2, enters cells through binding of the receptor binding domain (RBD) on its spike protein to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). Spike-binding Peptide 1 (SBP1) was derived from the ACE2 a1 helix and binds to SARS-Cov-2 RBD with low nanomolar affinity (K_d = 47 nM).

- SBP1 je potpuno humani, endogeni (Struna: koji je unutarnjega podrijetla ili uzroka, pripada, stvara se ili razvija u samome organizmu, tkivu ili stanici) peptid kojeg tolerira naš imunostav, a što je od iznimne važnosti za kasnije faze prekliničkih istraživanja. Problem njegove proteolitičke degradacije i brze eliminacije rješavat će se kemijskim modifikacijama sekvencije.

- Kemijska sinteza SBP1 (*spike-binding peptide 1*) provedena je metodom SPPS (35 coupling-reakcija), a utvrđeno je da se na površini receptor-prepoznavajuće domene S-proteina, uz zadovoljavajući afinitet, zadržava u stabilnoj konformaciji uzvojnice.



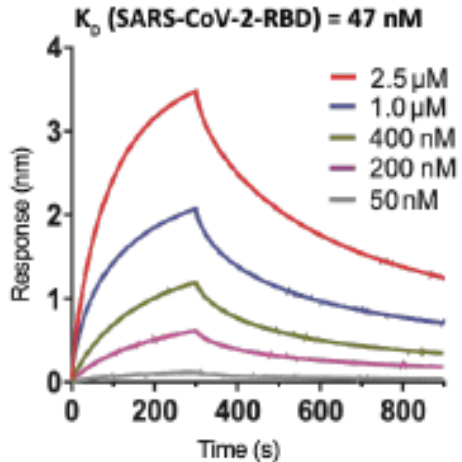
- Molekulsko pristajanje (*molecular docking*) vezne međupovršine SPB1 i SARS-CoV-2-RBD .



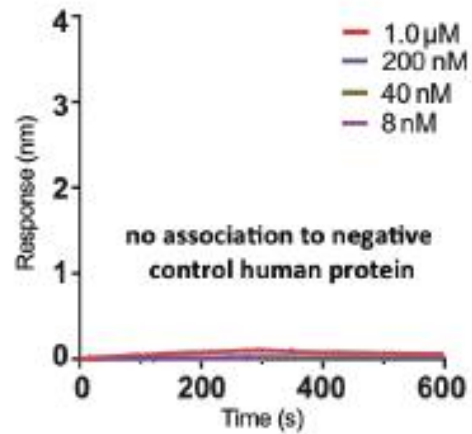
- RMSD (*root-mean-square deviation of atomic positions*) mjera je prosječne udaljenosti između atoma okosnice preklopljenih (superponiranih) proteina; ostaci s RMSD < 5 Å označeni su zeleno, dok su strjelicama označeni aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u ključnim vodikovim vezama (glutamin Q i glutaminska kiselina E).

- Nije opaženo vezanje SBP1 za negativnu kontrolu (humani protein menin); utvrđeno je specifično vezanje za SARS-CoV-2-RBD i to uz nisku konstantu disocijacije ($K_D = 47 \text{ nM}$, K_D opisuje koliko se čvrsto ligand vezuje za određeni protein; manja K_D upućuje na veći vezni afinitet).

SBP1 (from ACE2 α -helix 1)
 biotin-PEG₄-IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS-CONH₂



SBP1 (from ACE2 α -helix 1)
 Binding to negative control human protein



“In conclusion, a peptide sequence derived from human ACE2 was found to bind the SARS-CoV-2 spike protein RBD with low nanomolar affinity. We believe disruption of the SARS-CoV-2-RBD/ACE2 binding interface with high-affinity peptides represents a promising strategy for preventing virus entry in human cells and paves the way for new COVID-19 treatment and diagnostic modalities. Upon request, we will make available our peptide binder and all upcoming optimized variants to research facilities testing and developing potential COVID-19 treatments. Rapid discovery, synthesis, and testing of potential drug leads should help the global scientific and healthcare communities efficiently address the ongoing crisis.”

- Istraživanja peptidnih inhibitora interakcije proteina S i ACE2 usmjerena su i na membransku fuziju. S2-domena proteina S okidač je za membransku fuziju, a uključuje fuzijski peptid FP (*fusion peptide*), dvije ponavljajuće sedmeročlane regije HR1 i HR2 (*heptad region*), transmembransku TM (*transmembrane*) domenu i kratki citoplazmatski CP (*cytoplasmic*) rep.
- Uslijed vezanja za receptor dolazi do konformacijskih promjena S2-domene i tvorbe hidrofobne α -helične međupovršine kao rezultat vezanja HR1- i HR2-regija i započinje proces membranske fuzije i tvorba pora. Inhibicija membranske fuzije postiže se pomoću HR2-antagonista (mimetika HR2-regije). Takvi antagonisti su 2019-nCoV-HR1P i 2019-nCoV-HR2P.

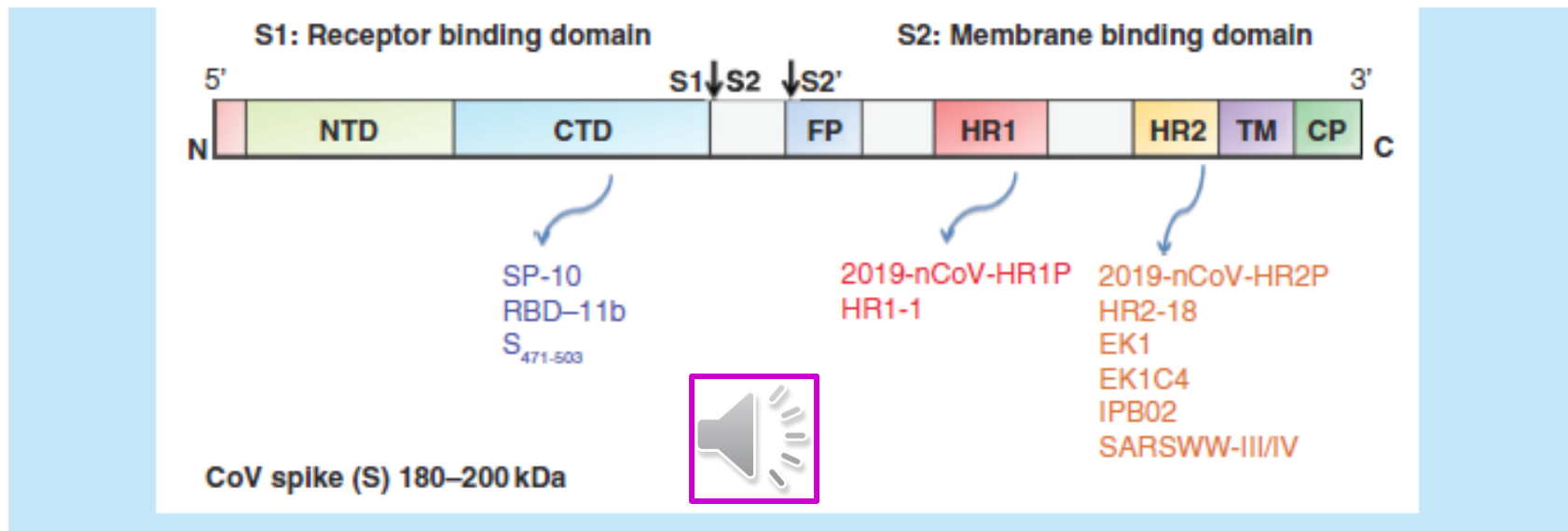


Figure 4. A 2D-representation of the major domains of the SARS-CoV S protein. The S protein is composed of the two subunits: S1 and S2. The S1 domain contains the NTD, the CTD, and is responsible for recognition and binding to the host cell receptor. The S2 domain, responsible for membrane fusion, contains the FP, the heptad repeat regions HR1 and HR2, the TM and CP tail. Two cleavage sites are indicated with arrows. The major peptide-based therapeutics, indicated below, are associated S protein regions.

CP: Cytoplasmic; CTD: C-terminal domain; FP: Fusion peptide; NTD: N-terminal domain; TM: Transmembrane domain.

- Peptidni inhibitori najčešće imaju kratko poluvrijeme života *in vivo*, što uvelike ograničava njihov terapijski potencijal. Međutim, konjugiranjem s lipidima dolazi do dramatičnog unapređenja antiviralnog potencijala i farmakokinetičkih svojstava. Primjerice, konjugiranje peptida EK1 s kolesterolom i polietilenglikolom povećalo je njegov antiviralni kapacitet preko 240 puta.

Table 1. Major peptide therapeutic candidates in development for SARS-CoV and SARS-CoV-2.

Potential peptide therapeutic	Target	Sequence/structure	Stage of development
SARS-CoV-2 (COVID-19)			
2019-nCoV-HR2P	HR1 domain of CoV S protein (MFM)	DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL	Preclinical <i>in vitro</i> models
EK1	HR1 domain of CoV S protein (MFM)	SLDQINVTFLDLEYEMKLEEAIKLEESYIDLKEL	Preclinical <i>in vitro</i> models
EK1C4 (lipopeptide)	HR1 domain of CoV S protein (MFM)	(N)EK1-GSGSG-PEG4-(Chol)	Preclinical <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> models
IPB02	HR1 domain of CoV S protein (MFM)	ISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELK(Chol)	Preclinical <i>in vitro</i> models
SBP1 (peptidase domain of ACE2)	S protein-RBD	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS	Preclinical <i>in vitro</i> models
Inhibitor 1-4	S protein-RBD	ACE2-based peptides	Proposed in theory

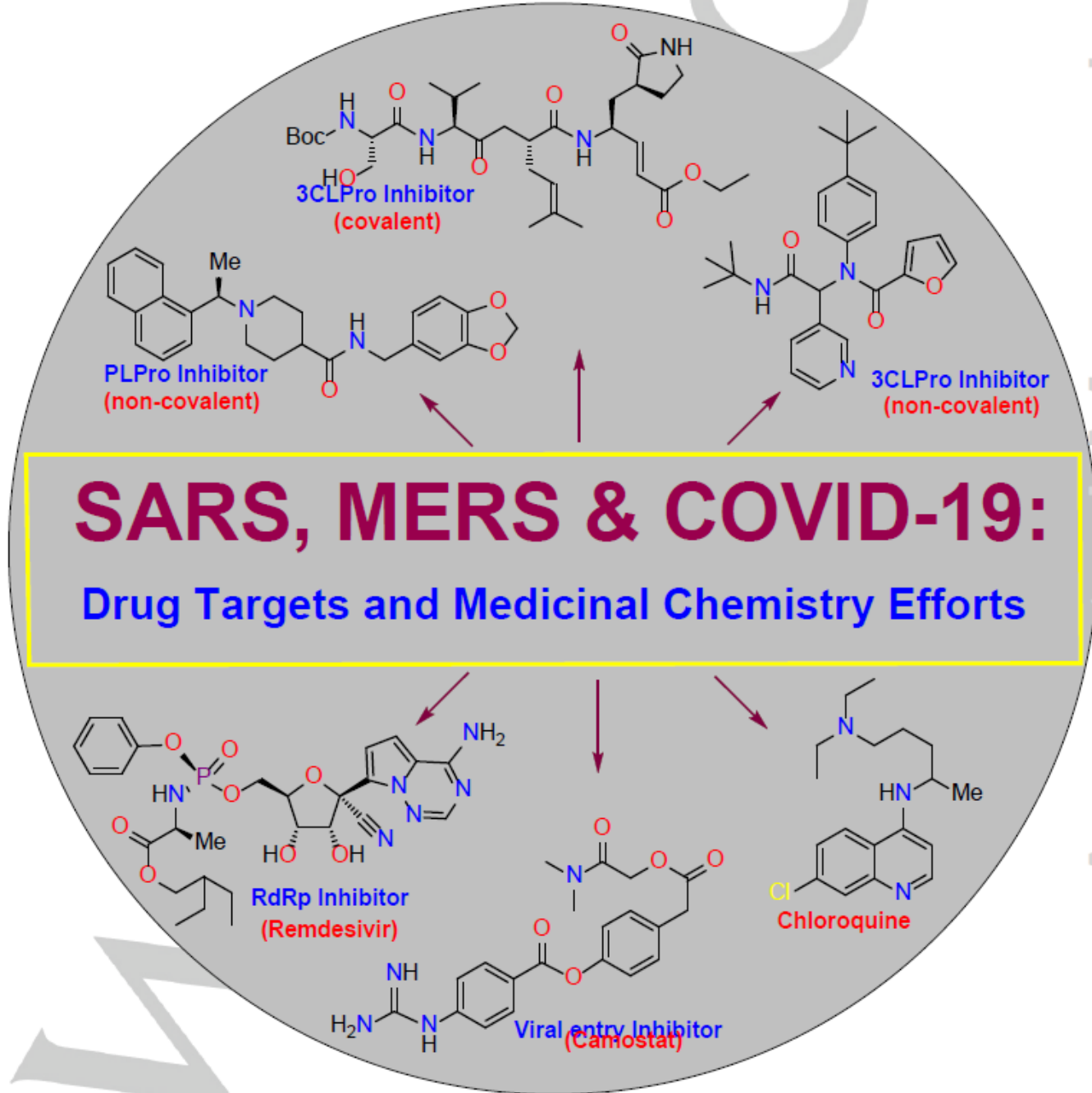


- “The field of peptidomimetics has opened a new door for the field of peptide-based therapeutics. The potential for equivalent or even enhanced biological efficacy, extended bioavailability, and highly efficient synthesis and screening mechanisms, positions these drug candidates as attractive options for development in disease outbreak situations. The COVID-19 pandemic has benefitted from much of the research knowledge gained during the previous 2003 SARS-CoV outbreak. Similarities and differences among these two related viruses (SARS-CoV and SARS-CoV-2) in specific biological interactions at the peptide level can be used to develop peptidomimetic-based drug candidates to target the viral spike (S) protein-host receptor (ACE2) interaction.”*

Peptidni mimetici i pseudopeptidi

Peptidomimetici kao inhibitori SARS-CoV-2

Prof. dr. sc. Lidija Barišić



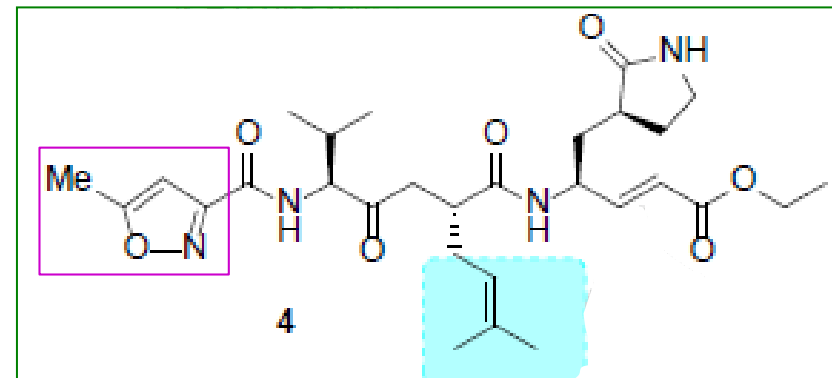
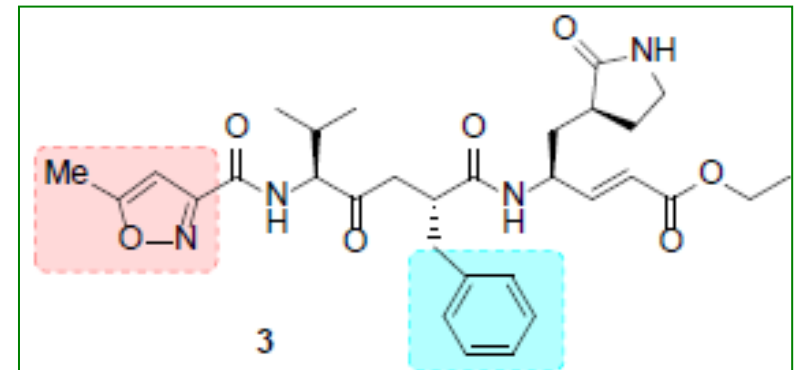
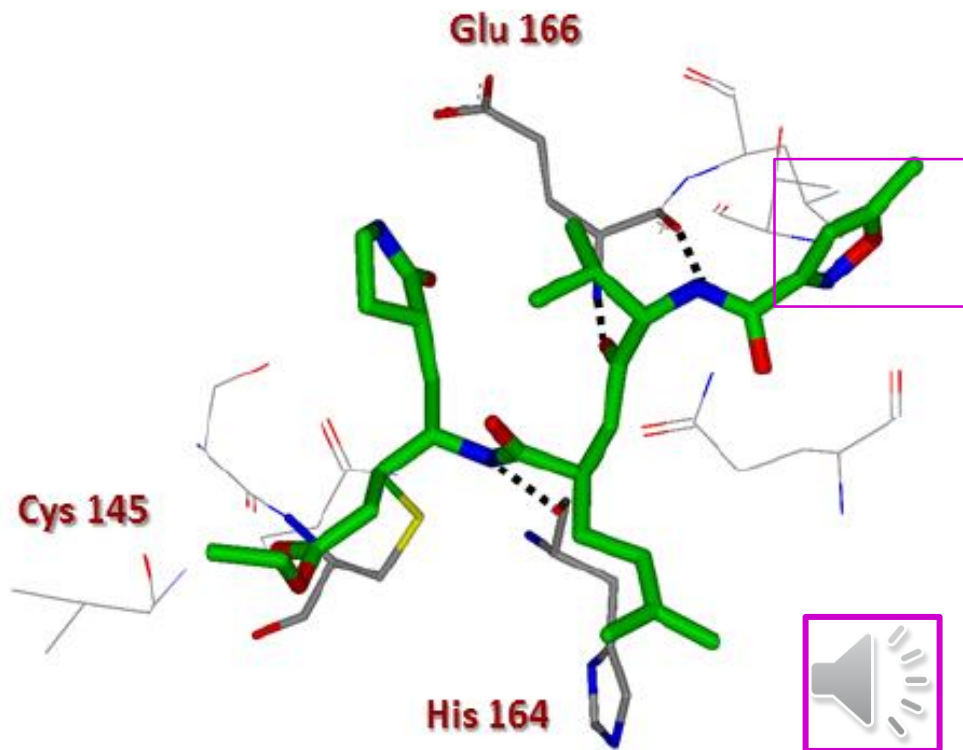
- Vežanjem virusnog S-proteina na ACE2-receptor na površini stanice domaćina omogućava se ulazak virusa u stanicu. Potom se virusna RNA veže na ribosome domaćina te se stvaraju dva poliproteina nužna za tvorbu novih zrelih viriona [potpuno infektivnih virusnih čestica s DNA ili RNA u jezgri i proteinskim omotačem (kapsidom)]. Koronavirus provodi proteolitičku razgradnju nastalih poliproteina pomoću glavne proteaze (*3-chymotrypsin-like protease*, 3CLpro) i papain-ske proteaze (*papain-like protease*, PLpro). Nadalje, svi koronavirusi sadrže i RdRp (*RNA-dependent RNA-polymerase*) odgovornu za replikaciju RNA-genoma. Svi spomenuti proteini (virusne proteaze) predstavljaju moguće mete u borbi s koronavirusom, pri čemu se ulažu golemi naponi usmjereni na razvoj antivirusnih lijekova koji mogu reducirati virusnu replikaciju i patogenost. Veliki dio medicinskih istraživanja usmjeren je na peptidomimetike i male molekule kao inhibitore 3CLpro i PLpro. Iako tek mali dio novorazvijenih spojeva pokazuje nM afinitet prema proteazama, ipak su dobra osnova za daljnju optimizaciju i moguće kombiniranje s drugim antivirusnim terapeutcima.



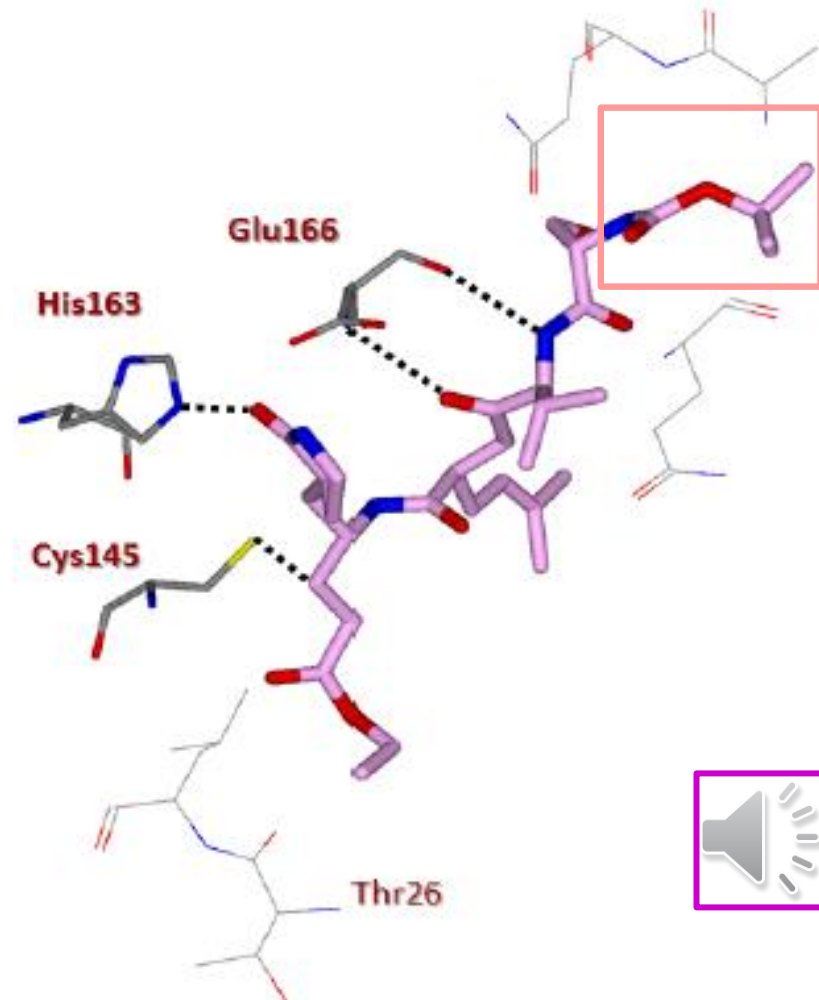
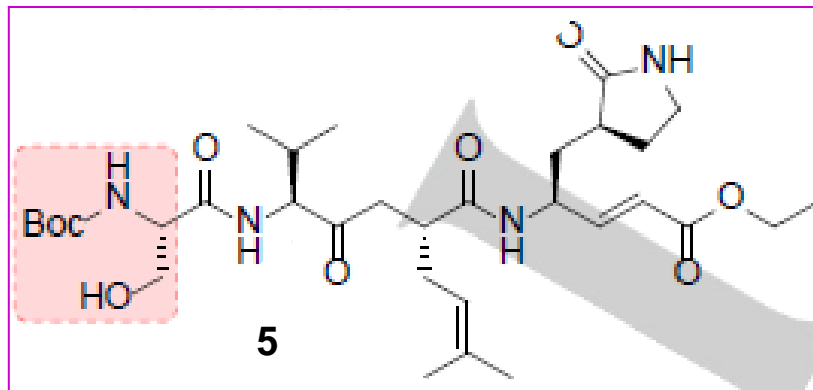
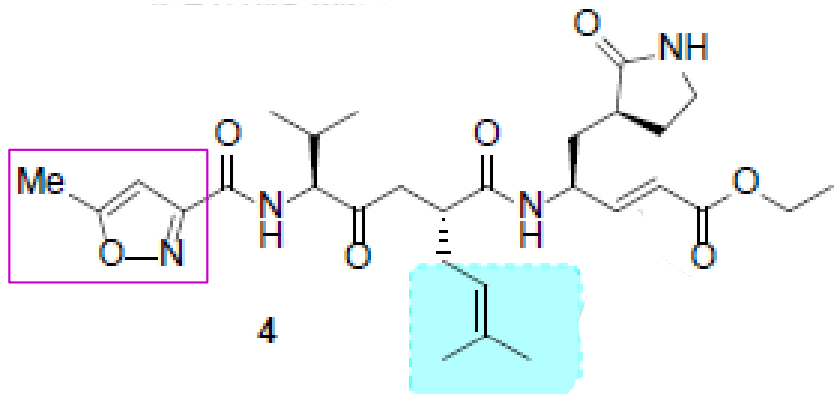
- “Professor Ivan Đikić, Director of the Institute of Biochemistry II at University Hospital Frankfurt and last author of the Nature paper, explains: “We used the compound GRL-0617, a non-covalent inhibitor of PLpro, and examined its mode of action very closely in terms of biochemistry, structure and function. We concluded that inhibiting PLpro is a very promising double-hit therapeutic strategy against COVID-19. The further development of PLpro-inhibiting substance classes for use in clinical trials is now a key challenge for this therapeutic approach.”

<https://aktuelles.uni-frankfurt.de/englisch/frankfurt-scientists-identify-possible-achilles-heel-of-sars-cov-2-virus/>

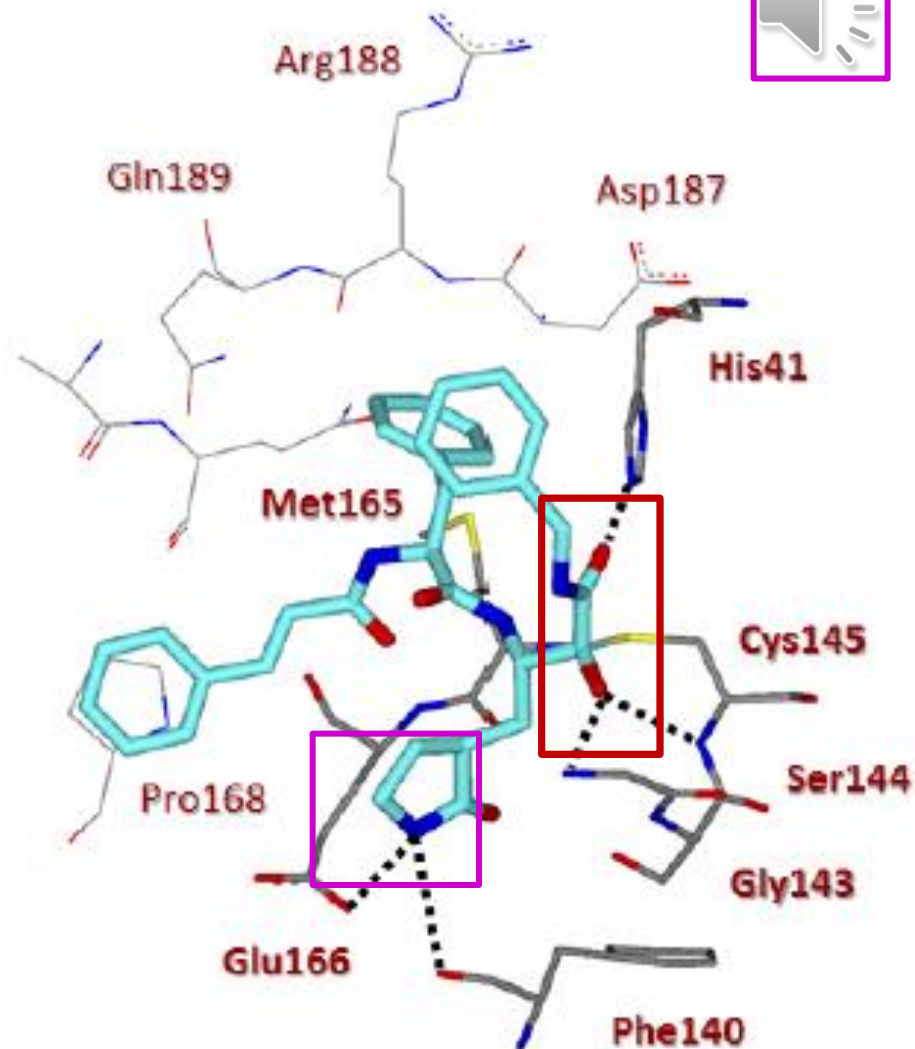
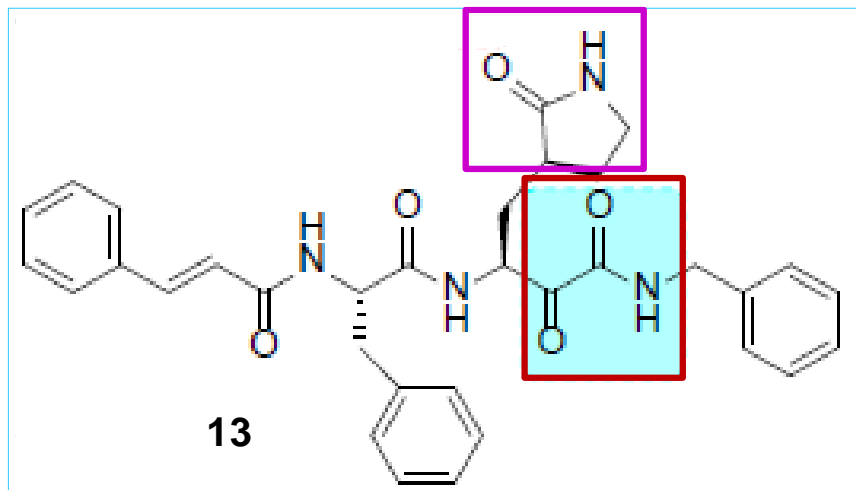
- Za razvoj učinkovitih inhibitora spomenutih proteaza bilo je potrebno provesti SAR-studije koje u slučaju 3CLpro ukazuju na prisutnost triju domena: **I** (ostaci 8-101), **II** (102-184) i **III** (201-301). Aktivno mjesto obuhvaća domene **I** i **II** koje su u konformaciji β -bačve, dok domena **III** zauzima konformaciju α -uzvojnice.
- Peptidomimetici **3** i **4** pokazali su se učinkovitim protiv SARS-CoV-3CLpro. Kristalografska analiza kompleksa spoja **4** i SARS-CoV-3CLpro ukazuje na ključne interakcije s enzimskim ostacima His¹⁶⁴ i Glu¹⁶⁶. Pri tom je vidljiva komplementarnost metil-oksazolne skupine s enzimskim hidrofobnim džepom.



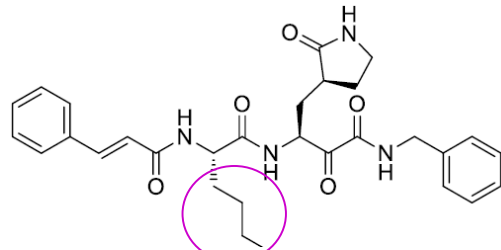
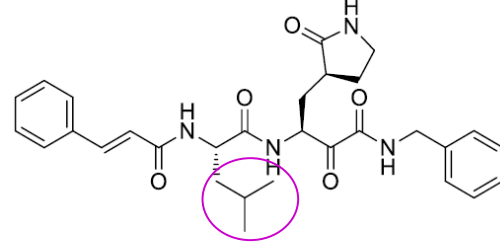
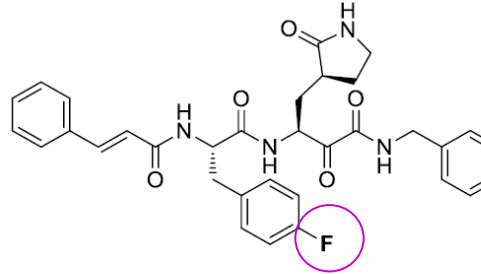
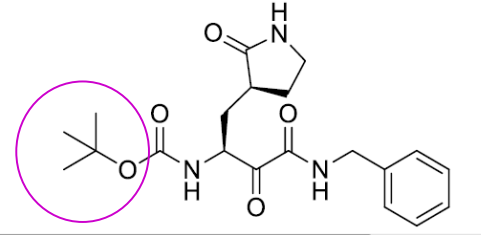
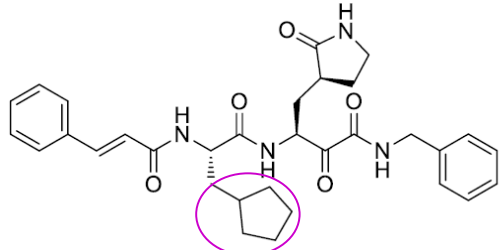
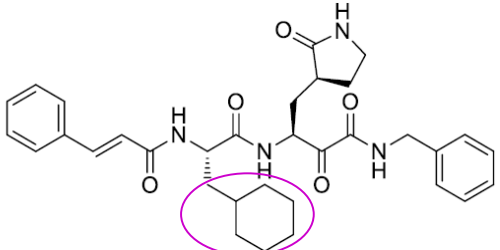
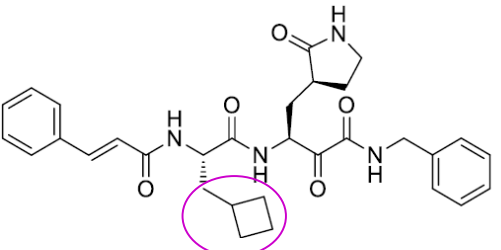
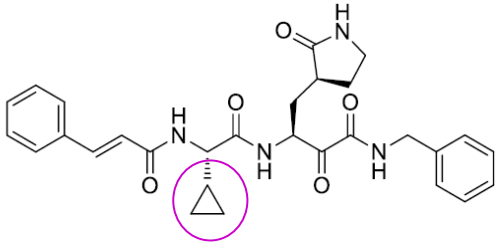
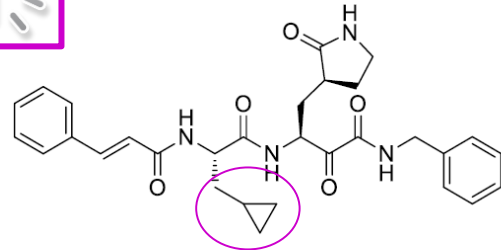
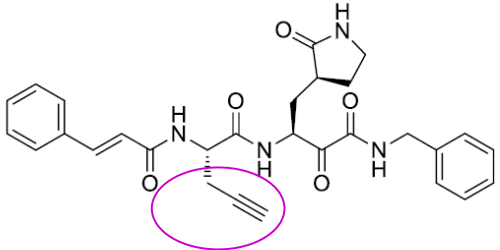
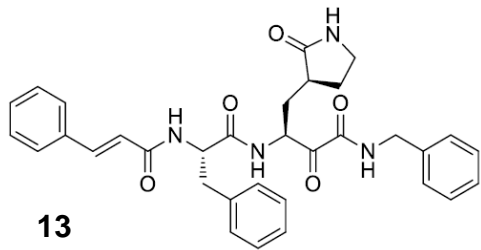
- U cilju omogućavanja dodatnih interakcija (vodikovih veza) u aktivnom mjestu proteaze 3CLpro, **oksazolna skupina** iz mimetika **4** zamijenjena je s **Boc-Ser**. Suprotno očekivanjima, inhibitorski potencijal derivata **5** nije se povećao, a nije unaprijeđena niti antivirusna aktivnost.
- Kristalografska analiza kompleksa **spoja 5** i SARS-CoV-3CLpro ukazuje na ključne interakcije s enzimskim ostacima **Cys¹⁴⁵**, **His¹⁶³** i **Glu¹⁶⁶**. Pri tom je vidljivo da **Boc-Ser** ne uspostavlja vodikove veze s enzimskim aktivnim mjestom.



- Peptidomimetik **13** dizajniran je tako da sadrži **ketoamidnu skupinu** koja je donor jedne i akceptor dviju vodikovih veza. Zahvaljujući svom antivirusnom djelovanju, proglašen je vodećim spojem (*lead compound*; Struna: “kemijski spoj koji se u farmakološkom probiranju pokaže najboljim kandidatom za razvoj u uspješan novi lijek ili primjenjivim u novoj terapijskoj indikaciji”).
- Kristalografska analiza pokazuje stabilizaciju kompleksa proteaze i **peptidomimetika 13** trima vodikovim vezama između ketoamidne skupine i **Hys⁴¹**, **Cys¹⁴⁵** i **Ser¹⁴⁴** te još dviju vodikovih veza koje **laktam** uspostavlja s **Glu¹⁶⁶** i **Phe¹⁴⁰**.



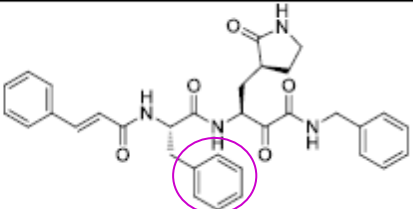
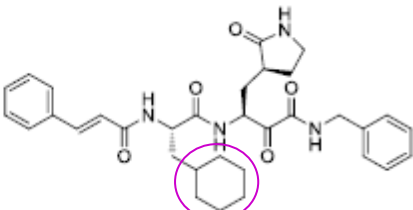
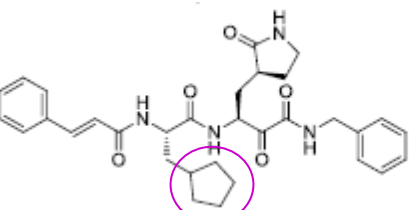
- Vodeći spoj **13** podvrgnut je brojnim studijama modifikacije veličine i fleksibilnosti, kako bi se postigla što veća komplementarnost s veznim džepom virusne proteaze.



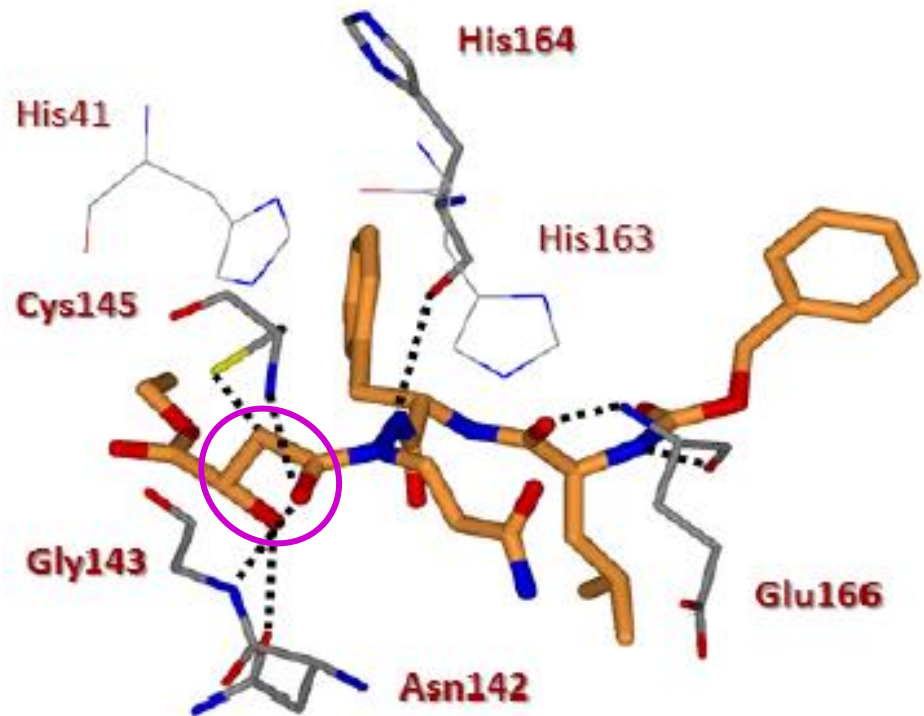
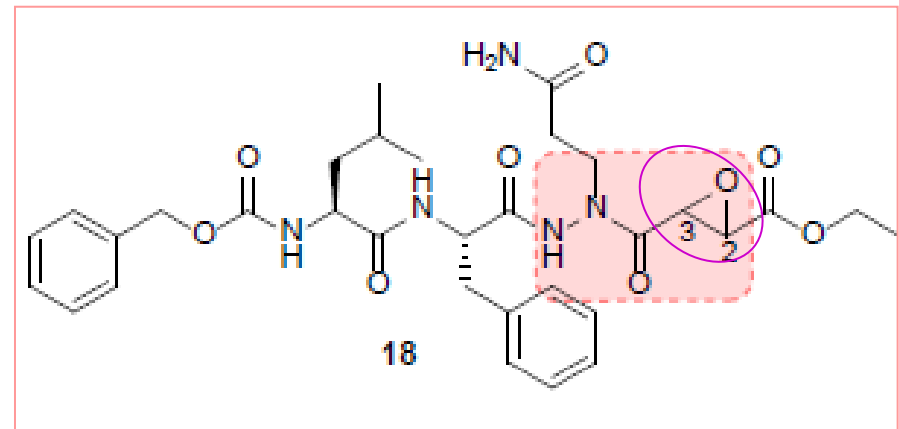


- Zamjenom benzilne skupine iz vodećeg spoja **13** s cikloheksilmetilnom ili ciklopentilmetilnom pripremljeni su derivati **14** i **15**.
- SAR-studije ukazuju na veliki utjecaj strukture na aktivnost. Pri tom je spoj **14** pokazao izvrsnu antivirusnu aktivnost, te služi za daljnju optimizaciju SARS-CoV-2 3CLpro inhibitora.

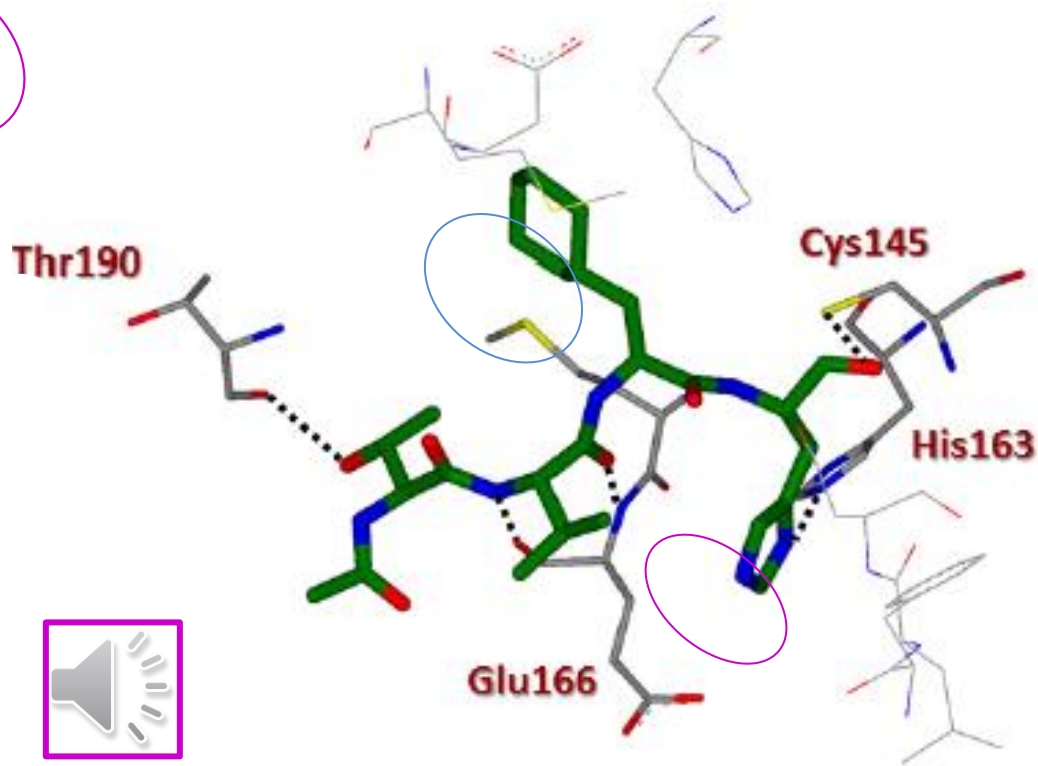
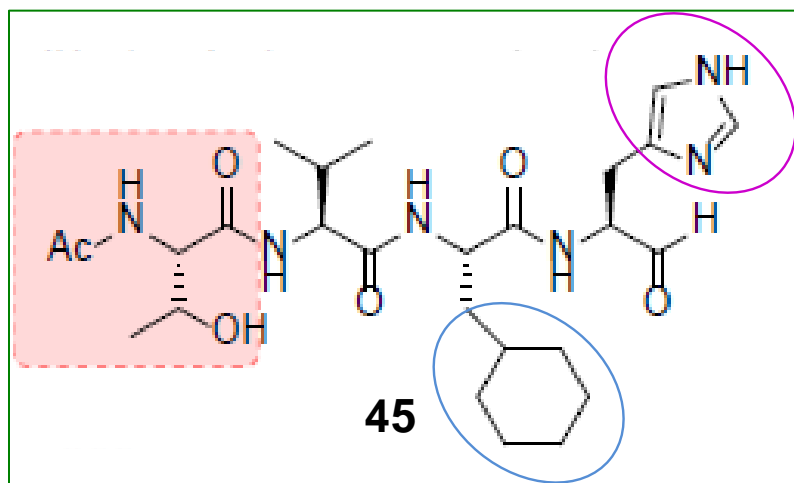
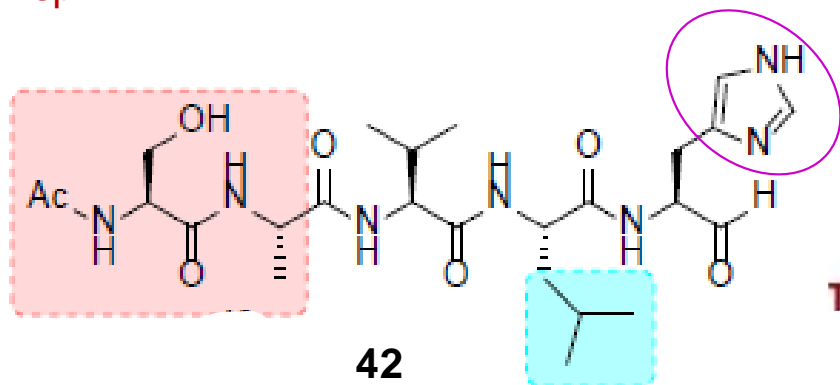
Table 1. Inhibition of Viral Proteases by α -Ketoamides (IC_{50} , μM)

Compound No.	Formula	EV-A71 3C ^{pro}	CVB3 3C ^{pro}	SARS-CoV M ^{pro}	HCoV-NL63 M ^{pro}
13		1.22 ± 0.12	6.56 ± 3.10	1.95 ± 0.24	>50
14		1.69 ± 0.47	0.95 ± 0.15	0.71 ± 0.36	12.27 ± 3.56
15		4.73 ± 0.94	1.93 ± 0.43	1.27 ± 0.34	5.41 ± 2.31

- Daljnjim strukturnim modifikacijama pripravljen je epoksid **18** koji se pokazao obećavajućim inhibitorom SARS-CoV 3CLpro.
- Kristalografska analiza njihovog kompleksa ukazuje na stabilizaciju kroz kovalentnu vezu između epoksidnog C³-atoma i cisteinskog sumporovog atoma, a za što je najpovoljnija (S,S)-konfiguracija. Stoga se među četiri testirana stereoizomera, (S,S)-dijastereomer pokazao najučinkovitijim.

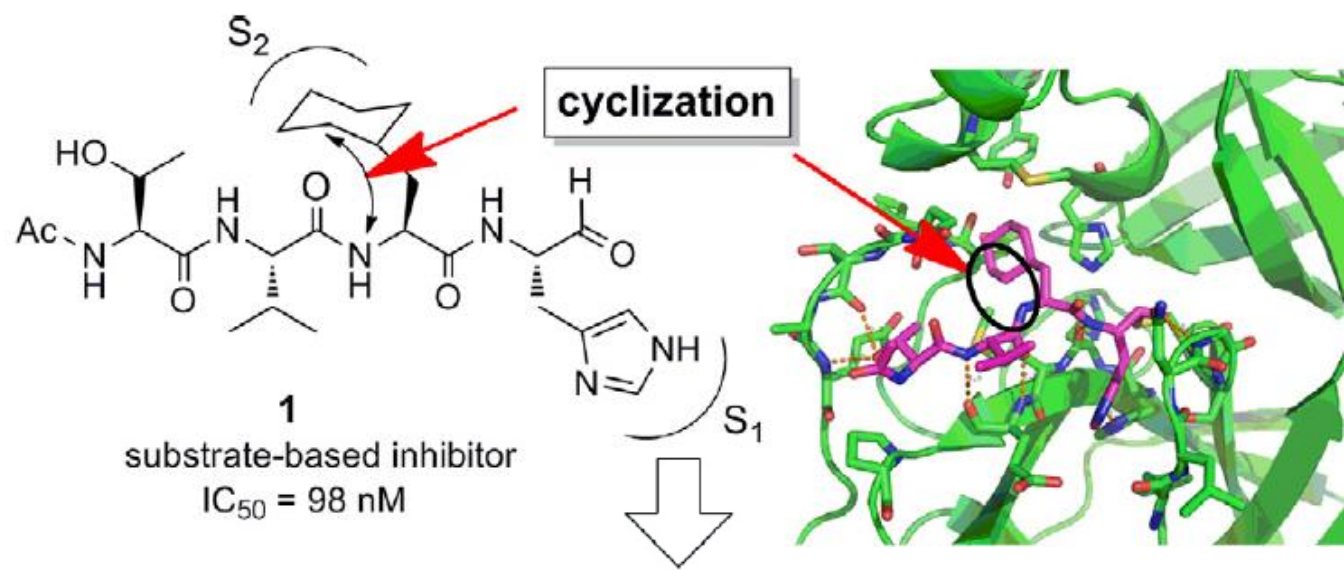


- 2011. razvijeni su SARS-3CLpro inhibitori s terminalnom aldehidnom skupinom.
- Vodeća sekvencija Ac-Ser-Ala-Val-Leu-His-H (42) korištena je za daljnju optimizaciju pri čemu je razvijen skraćeni, potentni inhibitor 45. Kristalografska analiza njegovog kompleksa s veznim mjestom virusne proteaze ukazuje na vodikovu vezu između imidazolnog dušikovog atoma s His¹⁶³ te na komplementarnost cikloheksilne skupine iz 45 sa džepom kojeg tvore ostaci His⁴¹, Met⁴⁹, Met¹⁶⁵ i Asp¹⁸⁷.



K. Akaji et al, **Structure-Based Design, Synthesis, and Evaluation of Peptide-Mimetic SARS 3CL Protease Inhibitors.** *J. Med. Chem.* 2011, 54, 7962-7973.

- Da bi se dodatno povećala komplementarnost sa spomenutim džepom u aktivnom mjestu virusne proteaze, isti su se autori fokusirali na cikloheksilni bočni ogranak iz inhibitora **45**. Pri tom su imali u cilju i smanjivanje peptidnih svojstava novog inhibitora, što pridonosi njegovoj proteolitičkoj stabilnosti. Odabrali su **dekahidroizokinolin** kao kalup za spajanje cikloheksilne skupine s N α -atomom iz glavnog lanca te su sintetizirali seriju spojeva kako bi proučili utjecaj stereokemijskih svojstava dekahidroizokinolina kao i različitih supstituenata benzamidne skupine R na inhibitory učinak..

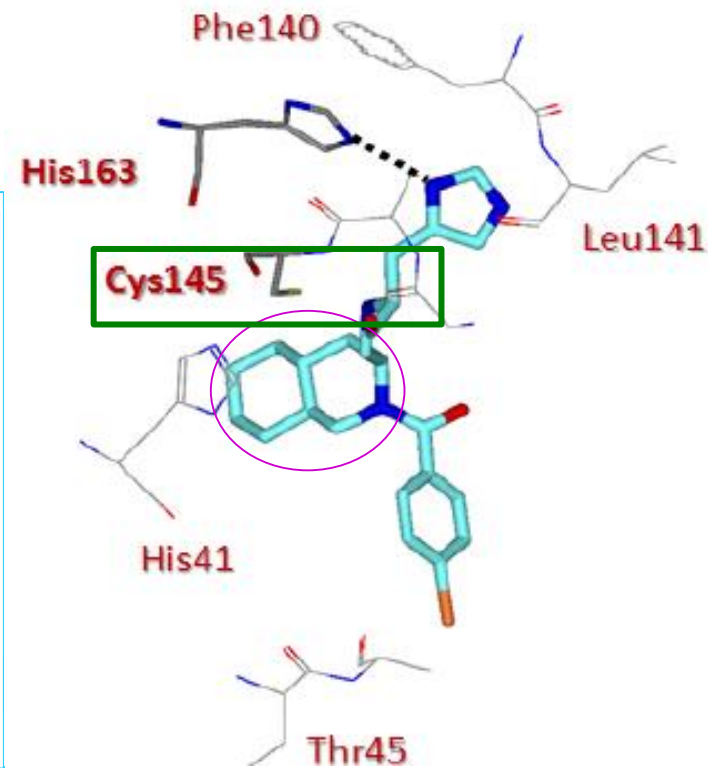
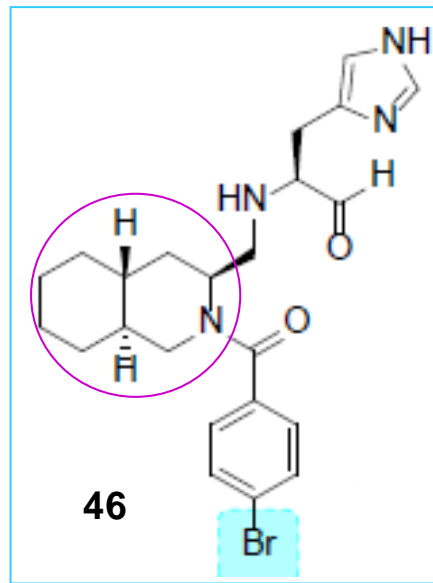


Y. Shimamoto et al. **Fused-ring structure of decahydroisoquinolin as a novel scaffold for SARS 3CL protease inhibitors.** *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 876–890



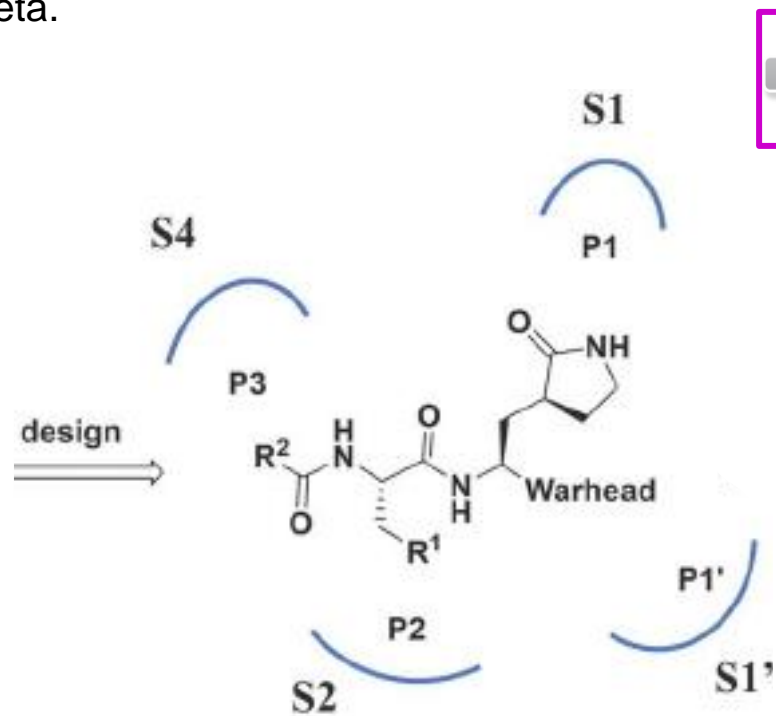
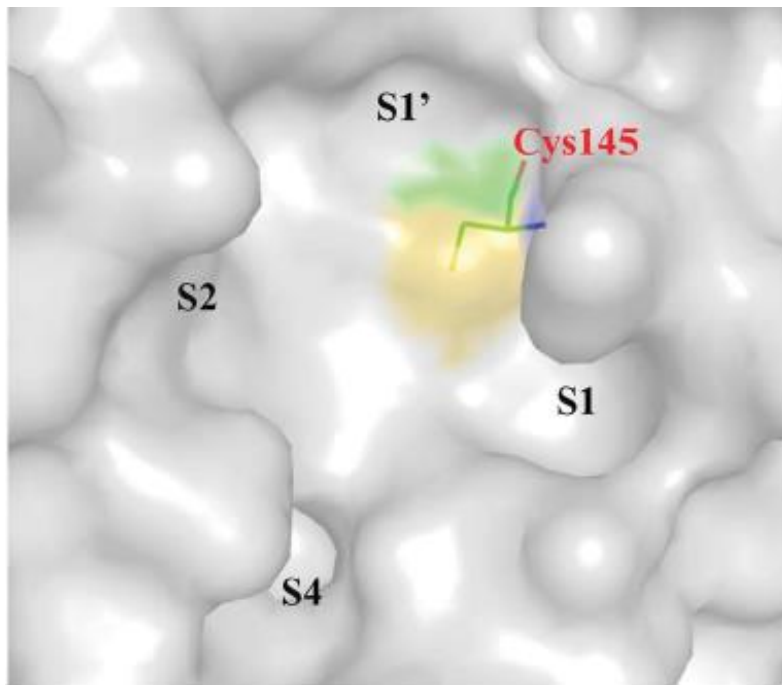


- Kristalogrfska analiza kompleksa pokazala je izvrsnu komplementarnost dekahidroizokinolinskog kalupa kao i imidazolnog prstena iz spoja 46 s veznim džepom virusne proteaze.
- Zahvaljući tim interakcijama, terminalna aldehydna skupina tijesno se pozicionira u aktivno mjesto, što dodatno stabilizira kompleks.



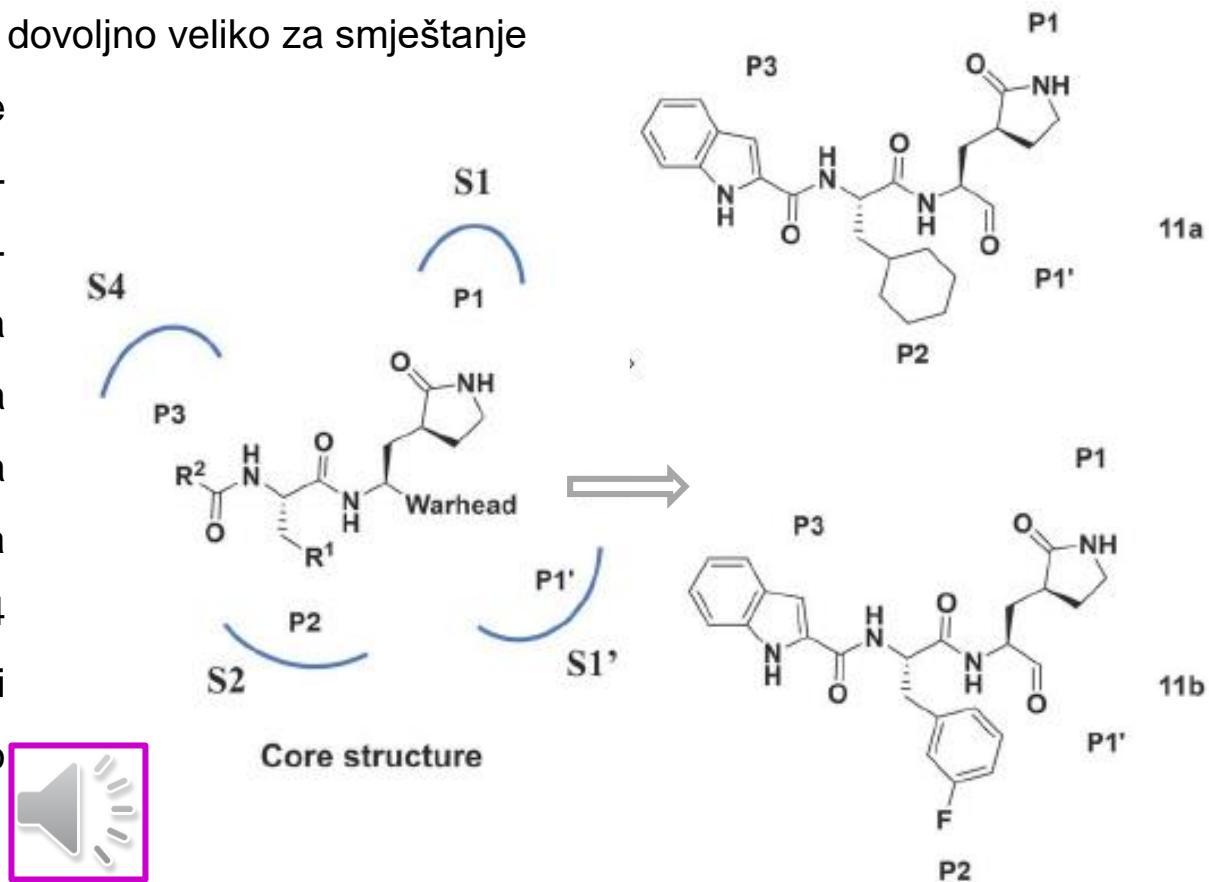
- *“In our current pandemic situation, effective antiviral treatment could have made a significant impact on reducing morbidity and mortality. Antivirals could also be used as cheap prophylaxis. Thus, it is essential to proceed with very serious efforts for the development of effective, broad-spectrum antivirals against COVID-19. Past and present research efforts on the coronavirus replication cycle provided a number of significant biochemical targets for drug development. Since the SARS-CoV-2 genome has over 80% similarity to SARS-CoV, previous work on the development of antivirals against SARS are very beneficial and timely. Much ground work has been laid in terms of small molecule lead generation, identification and limited medicinal chemistry optimization of lead structures. This review outlines various important protein targets for drug development. The review also highlights principles and strategies for drug design along with a host of small molecule lead structures.”*

- Životni ciklus koronavirusa ovisi o glavnoj proteazi (M^{pro} ili 3CL^{pro}). Riječ je o Cys-proteazi koja u veznom džepu sadrži vezna mjesta S1', S1, S2 i S4 na kojima se temelji dizajn i sinteza inhibitora tog enzima. Zajedničko svojstvo svih supstrata glavne proteaze jest da počevši od N- prema C-kraju sadrže pozicije -P4-P3-P2-P1↓P1'-P2'-P3'-, pri čemu je mjesto cijepanja između P1 i P1'. Kako M^{pro} nema humani homolog, idealna je antivirusna meta.

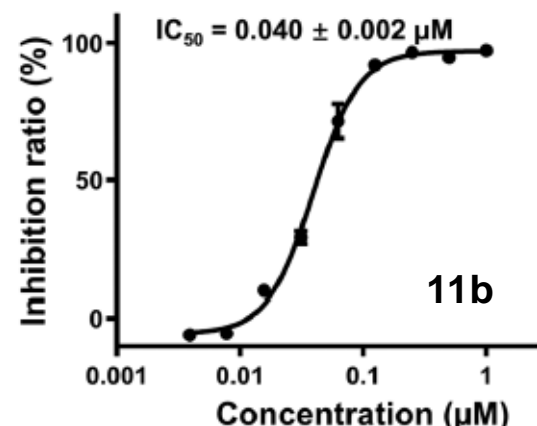
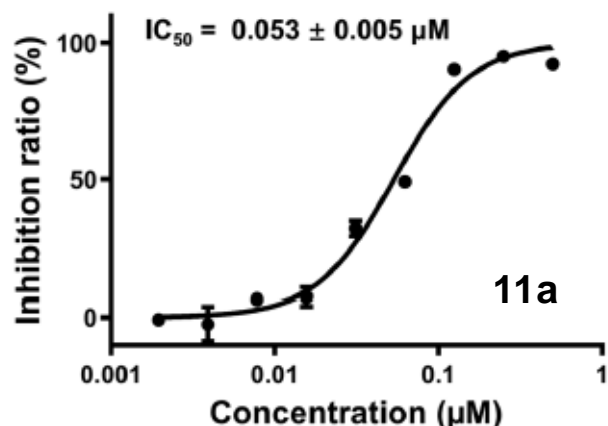


- Tiolna skupina cisteinskog ostatka u S1' mjestu učvršćuje inhibitor kovalentnom vezom čemu inhibitor duguje antivirusni učinak. Stoga je pri dizajnu inhibitora odabrana aldehidna skupina kao reaktivna skupina (*warhead*) u P1' mjestu inhibitora koja će se vezati kovalentnom vezom s Cys.

- SARS-CoV M^{pro} inhibitori često sadrže (S)- γ -laktamski prsten koji zauzima S1 mjesto glavne proteaze M^{pro}. Njezino S2 mjesto obično je dovoljno veliko za smještanje velikih P2-fragmenata. Da bi se ispitalo kako različiti prstenovi utječu na vezivanje, uvedene su cikloheksilna (**11a**) ili 3-fluorfenilna skupina (**11b**) na poziciju P2. Na poziciju P3 uvedena je indolna skupina kako bi se omogućila tvorba nove vodikove veze s S4 mjestom u veznom džepu enzima i time poboljšalo antivirusno djelovanje.



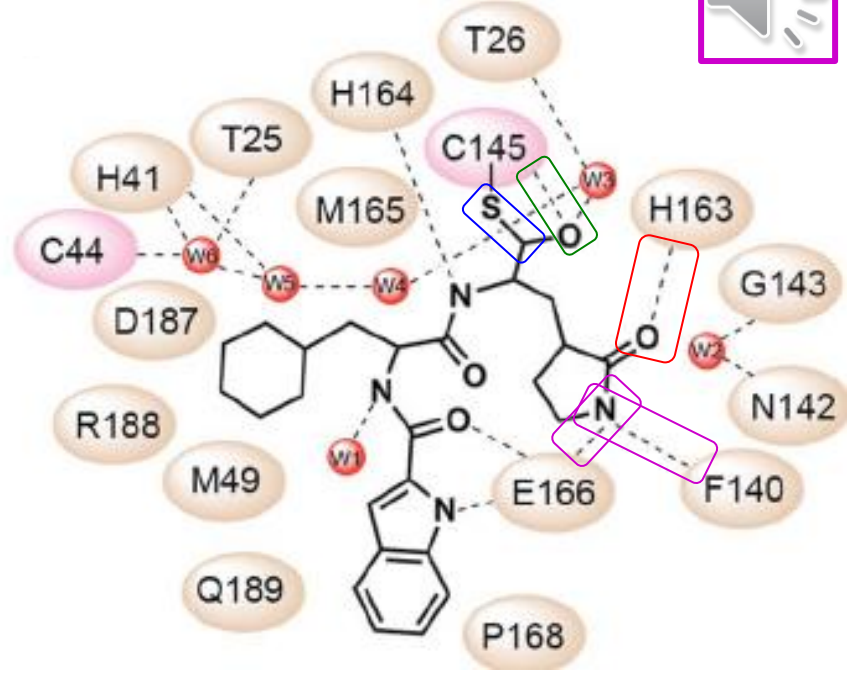
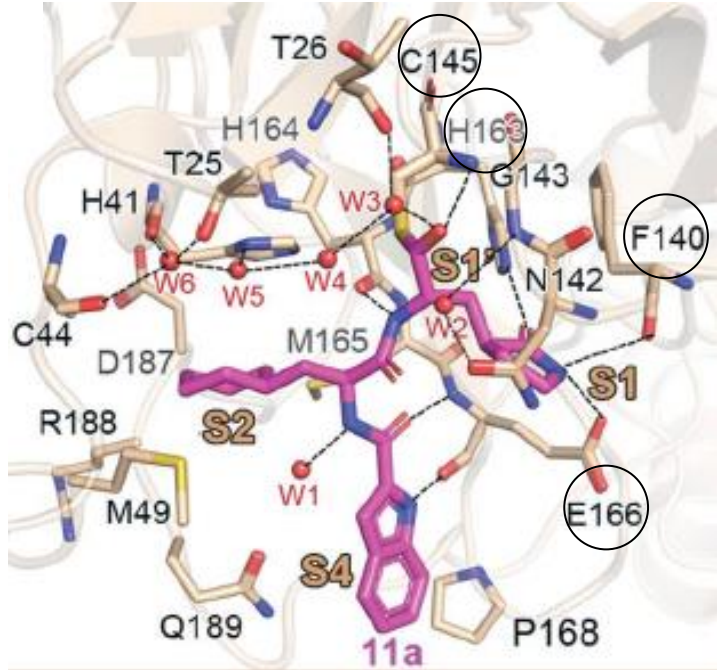
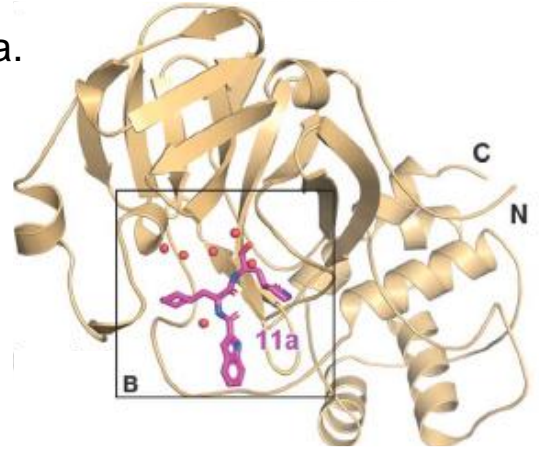
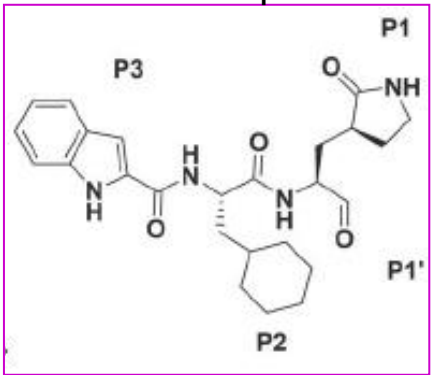
- Tako dizajnirani aldehidni peptidomimetici **11a** i **11b** pokazali su visoku inhibitornu aktivnost (100% odn. 96%) i izvrstan antivirusni potencijal s navedenim IC₅₀-vrijednostima.



• Mapa elektronske gustoće pokazuje **inhibitor 11a** u veznom džepu enzima.

• Vidljiva je **kovalentna veza** standardne duljine 1,8Å između aldehidnog C-atoma i katalitičkog mjesta Cys¹⁴⁵ (C) iz SARS-CoV-2 M^{pro}. Aldehidni O-atom igra krucijalnu ulogu u stabilizaciji konformacije inhibitora zahvaljujući

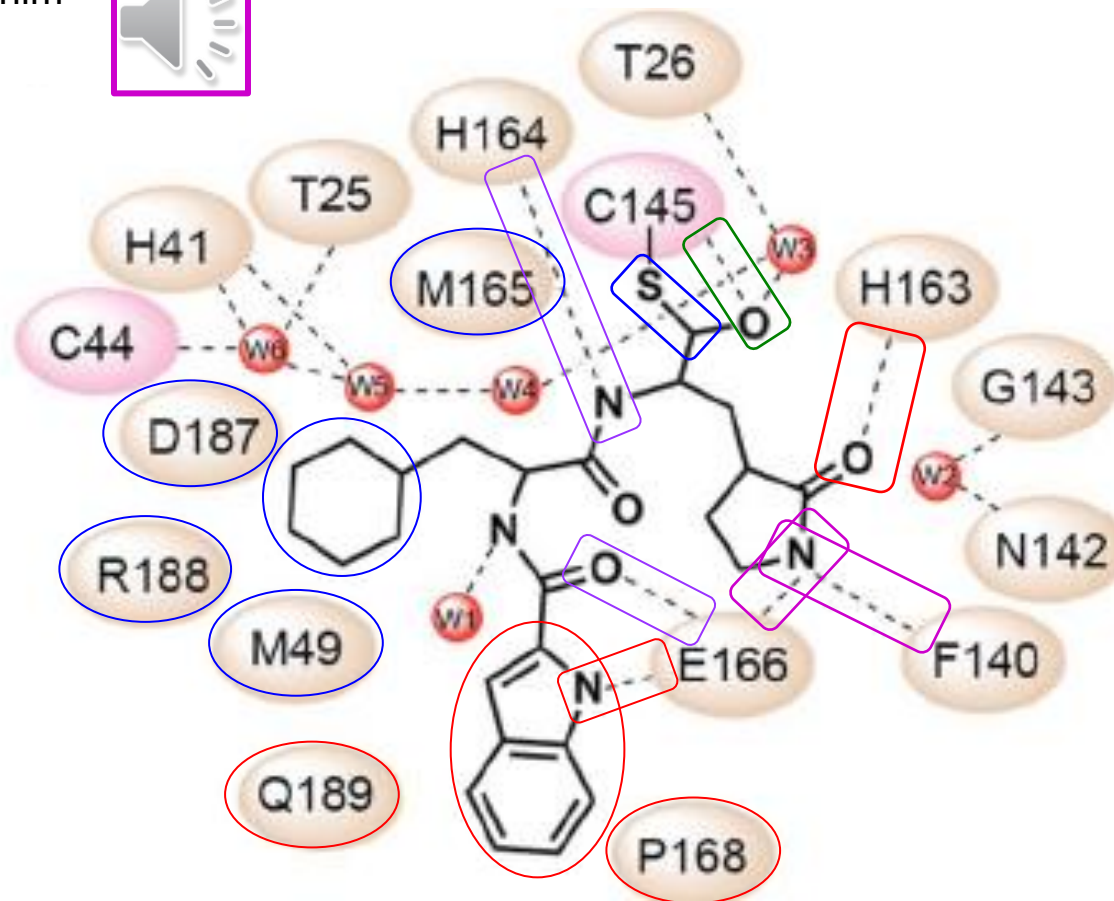
sudjelovanju u **vodikovoj vezi** s okosnicom iz ostatka Cys¹⁴⁵ u S1' mjestu. (S)-γ-laktamski prsten na poziciji P1 odgovara veznom mjestu S1, dok njegov O-atom tvori **vodikovu vezu** s His¹⁶³-bočnim ogrankom (H). Laktamski prsten dodatno je stabiliziran **dvjema H-vezama** koje njegova NH-skupina uspostavlja s Phe¹⁴⁰-okosnicom (F) i Glu¹⁶⁶-bočnim ogrankom (E).



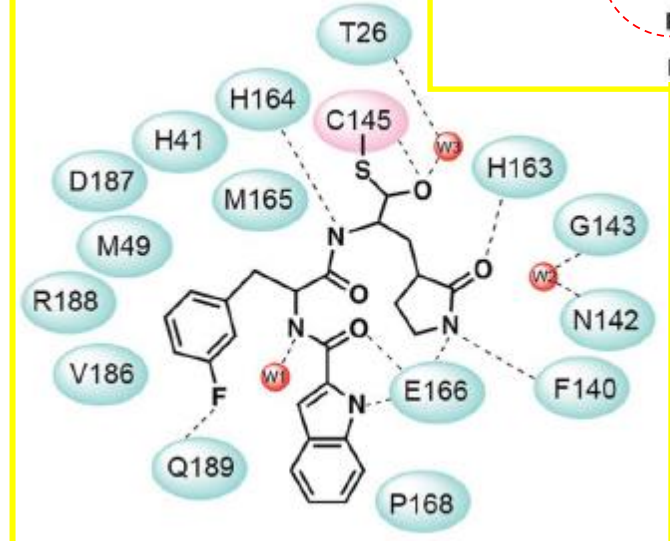
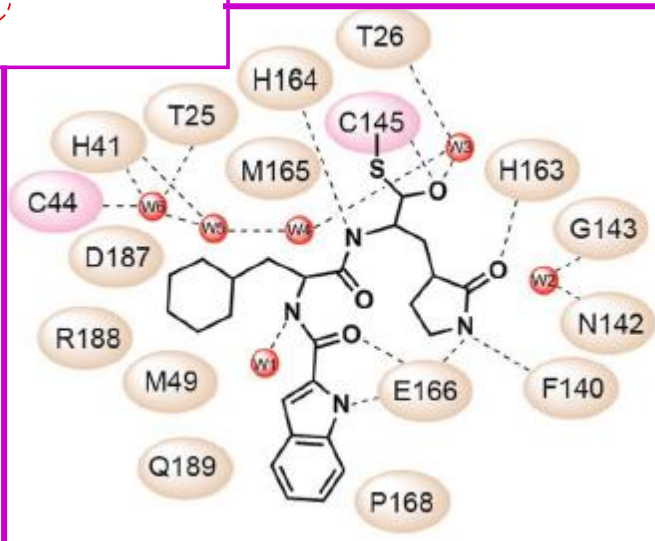
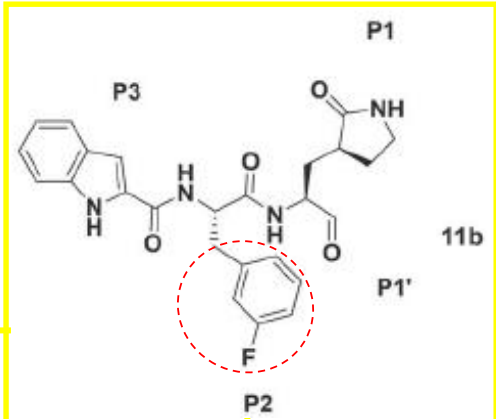
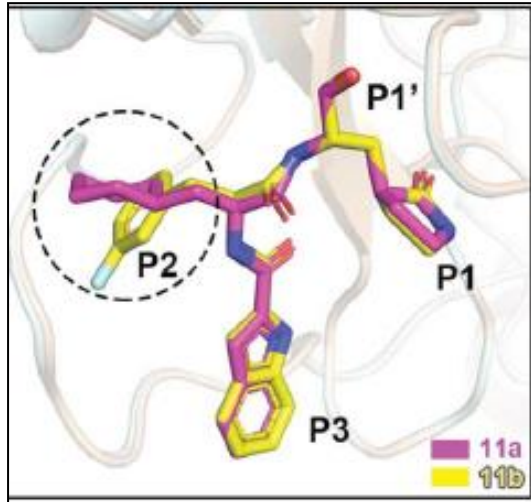
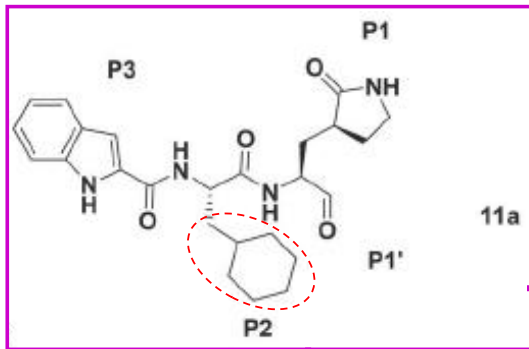
- Nadalje, amidne skupine iz okosnice peptidomimetika **11a** tvore H-veze s His¹⁶⁴- (H) i Glu¹⁶⁶-okosnicom (E). Njegova se cikloheksilna skupina s pozicije P2 smješta duboko u S2-vezno mjesto enzima, preklapajući se s His⁴¹-imidazolnim prstenom (H). Istovremeno, cikloheksilna skupina okružena je s bočnim ograncima iz Met⁴⁹ (M), Tyr⁵⁴ (Y), Met¹⁶⁵, Asp¹⁸⁷ (D) i Arg¹⁸⁸ (R) s kojima uspostavlja hidrofobne interakcije. Indolna skupina iz **11a** na P3-poziciji izložena je otapalu na S4-veznom mjestu i stabilizirana H-vezom koju uspostavlja s Glu¹⁶⁶ (E). Također, uspostavlja hidrofobne interakcije s bočnim ograncima iz Pro¹⁶⁸ (P) i Gln¹⁸⁹ (Q).



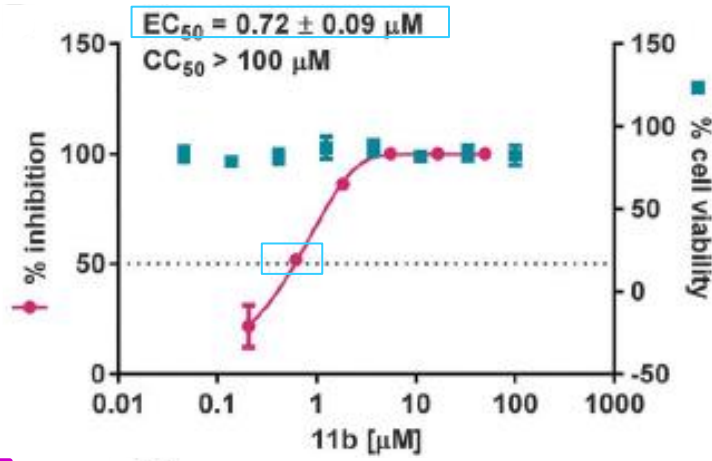
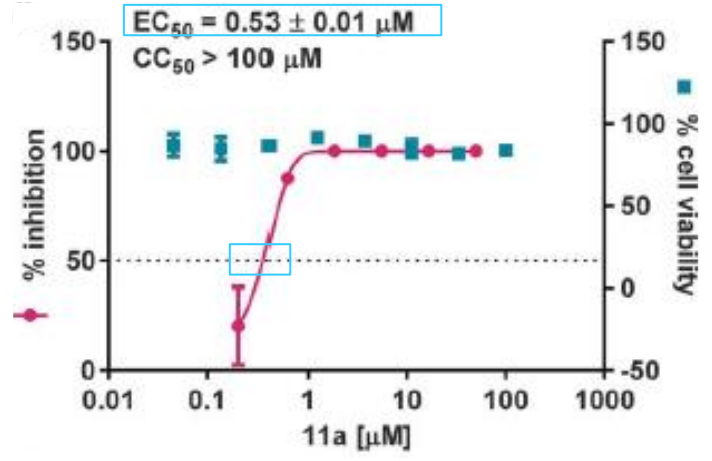
- Molekule vode W1-W6 imaju važnu ulogu u vezanju inhibitora **11a**. W1 uspostavlja H-vezu s amidnom skupinom iz okosnice **11a**, dok W2-W6 doprinose stabilizaciji inhibitora u veznom džepu enzima tvorbom brojnih H-veza s aldehydom skupinom iz **11a** te ostataka Asn¹⁴² (N), Gly¹⁴³ (G), Thr²⁶ (T), Thr²⁵, His⁴¹ (H) i Cys⁴⁴ (C).



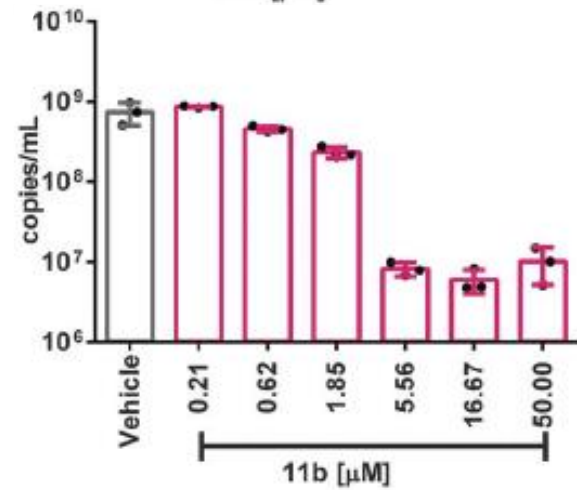
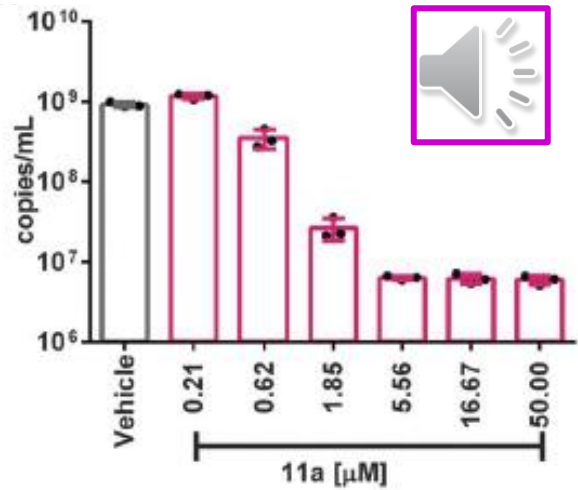
- Kristalna struktura kompleksa SARS-CoV-2 M^{pro} i peptidomimetika **11b** slična je kompleksu s **11a**. Razlika u vezivanju **11b** s veznim džepom enzima pripisuje se 3-fluorfenilnoj skupini na P2-mjestu.
- 3-Fluorfenilna skupina zarotirana je prema dolje što omogućava hidrofobne interakcije s His⁴¹ (H), Met⁴⁹ (M), Met¹⁶⁵, Val¹⁸⁶ (V), Asp¹⁸⁷ (D) i Arg¹⁸⁸ (R) te tvorbu H-veze s Gln¹⁸⁹ (Q). Prema tome, obje kristalne strukture ukazuju na sličan mehanizam inhibicije s obzirom da oba spoja zauzimaju vezni džep i tako blokiraju aktivnost enzima.



- Dobiveni rezultati koji induciraju mogući inhibicijski učinak spojeva **11a** i **11b** potkrijepljeni su evaluacijom sposobnosti tih spojeva da inhibiraju SARS-CoV-2 *in vitro*. Pri tom su Vero E6 stanice tretirane sa serijom koncentracija testiranih spojeva i inficirane sa SARS-CoV-2. Oba su spoja pokazala dobru anti-SARS-CoV-2 infektivnu aktivnost u staničnoj kulturi, s navedenim EC_{50} - (*effective concentration*, učinkovita koncentracija pri kojoj se postiže polovica maksimalnog odgovora) i CC_{50} -vrijednostima (*cytotoxic concentration*, 50%-tna citotoksična koncentracija odn. koncentracija spoja ($\mu\text{g/mL}$) potrebna za redukciju stanične vijabilnosti za 50%).




- Nadalje, povećanjem koncentracije testiranih spojeva dolazi i do smanjenja broja virusnih RNA-kopija u zaraženim stanicama.



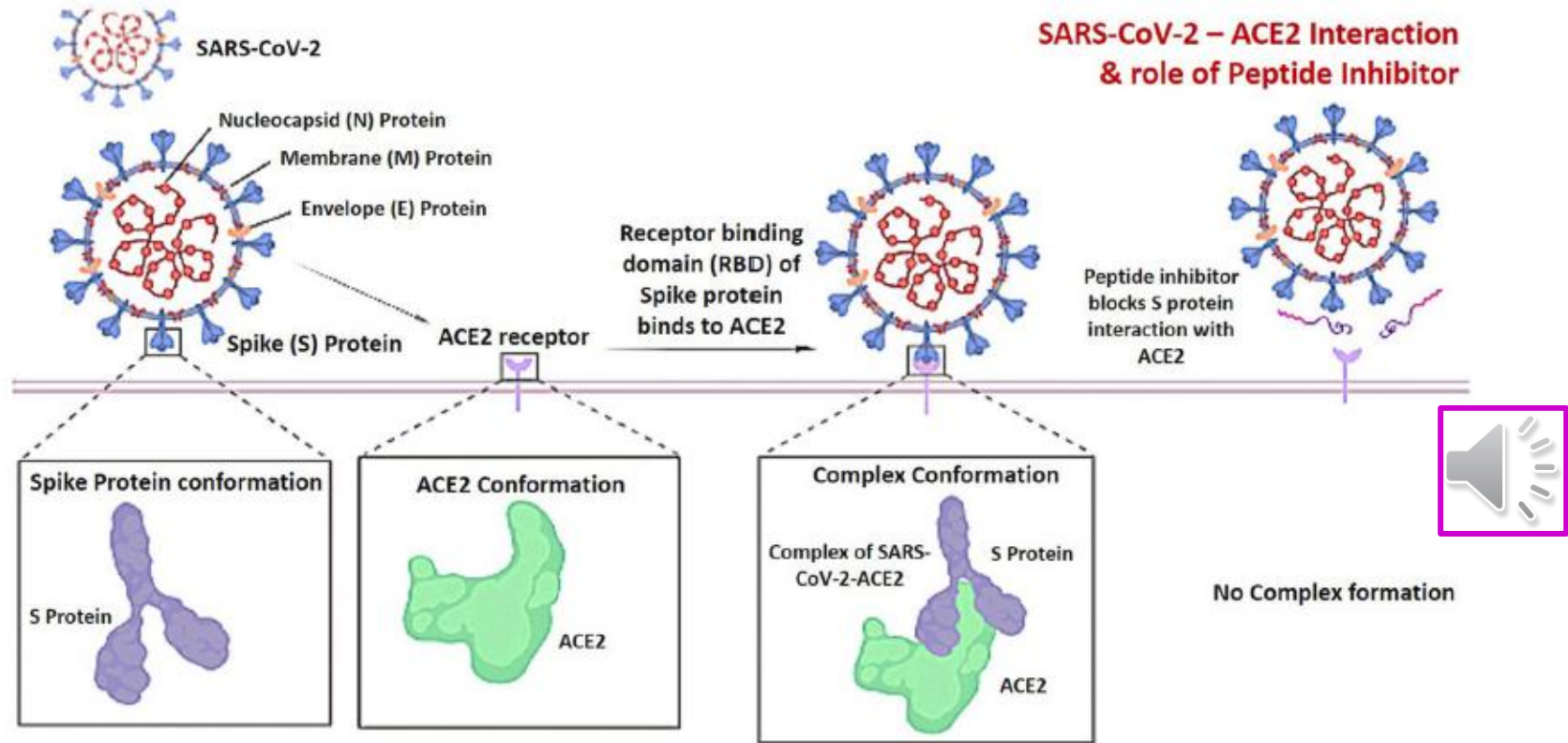
- Oba spoja podvrgnuta su farmakokinetičkim studijama. Primjenom na miševima intraperitonealno [injekcijom u trbušnu šupljinu, (5 mg/kg)] i intravenozno (5 mg/kg), spoj **11a** pokazao je kraće poluvrijeme života ($T_{1/2}$ ~4,3 sata) i nešto bolju biodostupnost (87,8%) nakon intravenozne primjene u odnosu na **11b**. Stoga je u nastavku istraživanja spoj **11a** intravenozno primijenjen na štakorima i psima, a dobiveni rezultati ohrabruju daljnja istraživanja.
- Toksičnost spoja **11a** testirana je na štakorima koji su preživjeli dozu od 40 mg/kg primljenu intravenozno. Povećanu dozu od 60 mg/kg nije preživjela jedna od četiri životinje. Rang toksične doze testiran je 7 dana i to davanjem doza od 2,6-18 mg/kg štakorima, odn. 10-40 mg/kg psima. Životinje su klinički praćene najmanje jednom dnevno pri čemu nije opažen toksični efekt. Svi opisani rezultati ukazuju da je spoj **11a** dobar kandidat za daljnje kliničke studije.



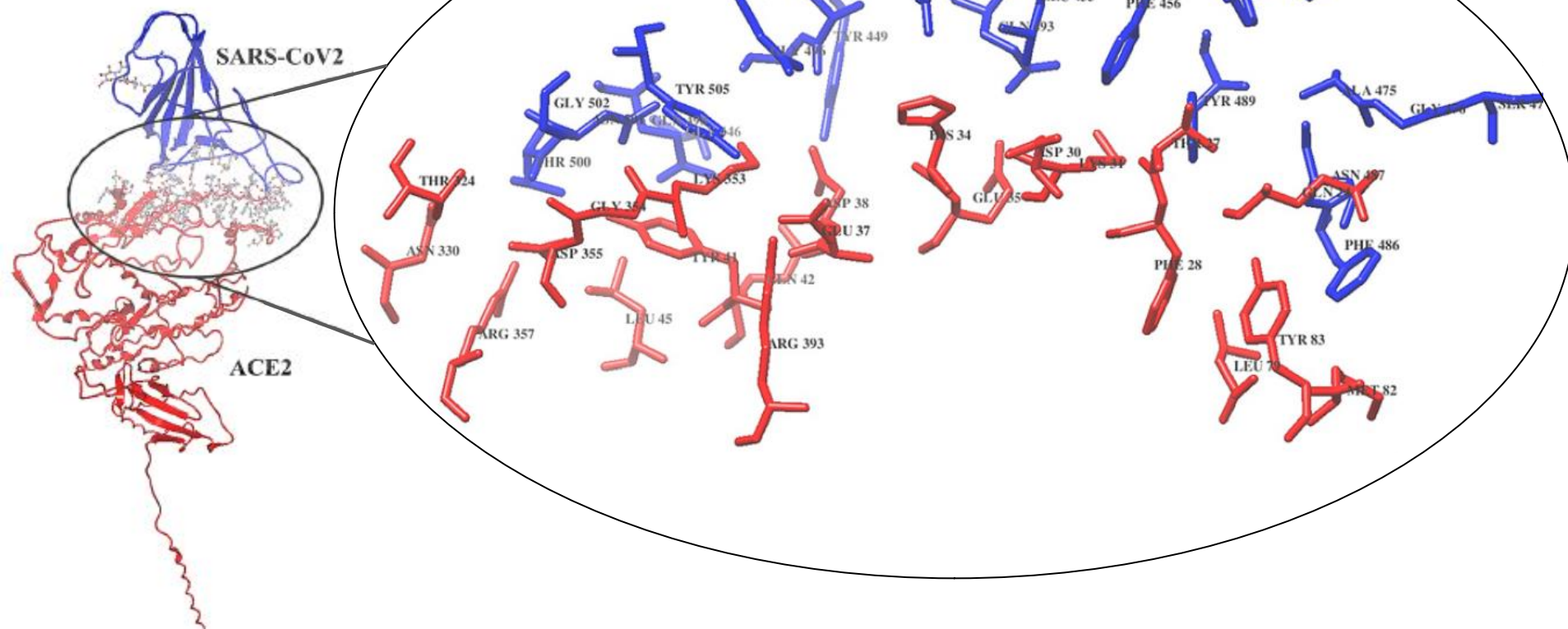
Table S4. In vivo toxicity study of 11a

Study	Acute toxicity	Dose range studies for one week	
Administration	intravenous drip (0.2 mL/min)	intravenous drip (1.5 mL/min)	intravenous drip (0.2 mL/min)
Species	SD rats	Beagle dogs	SD rats
Dosage (mg/kg)	24 mg/kg 40 mg/kg 60 mg/kg	10 mg/kg (the first day, four dogs) 15 mg/kg (the second day, four dogs) 20 mg/kg (the third day, four dogs) 25 mg/kg (the fourth day, four dogs) 25 mg/kg (the fifth to seventh days, randomly two dogs) 40 mg/kg (the fifth to seventh days, other two dogs)	2 mg/kg 6 mg/kg 18 mg/kg
Number of animals	One rat for 24 mg/kg Ten rats for 40 mg/kg Four rats for 60 mg/kg	Four dogs	Six rats for per group
Frequency	Single dose	Dose escalation	Repeat dose
 <p>Results</p>	No rats died after receiving 24, 40 mg/kg, and one rat died after receiving 60 mg/kg	<p>No obvious toxicity</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. When administered at a dosage of 25 mg/kg or more, the skin of the extremities (two of four dogs) developed allergic symptoms (lumpy, transient and recovery on the same day) during the administration period. 2. At the end of administration, there were no anomalies in hematology, blood biochemistry. 3. At the end of the administration, histological examination of the heart, lung, kidney, spleen and liver were conducted, and no anomalies were observed in each group. 	<p>No obvious toxicity</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. During the administration period, no anomalies of weight and general state were observed in each group. 2. At the end of administration, the rats in each group underwent hematological and biochemical examination, and no anomalies were observed. 3. At the end of the administration, histological examination of the heart, kidney and lung were conducted, and no anomalies were observed in each group

- ACE2 (angiotenzin-konvertirajući enzim) je transmembranska metalokarboksi-peptidaza uključena u tvorbu peptidnog hormona angiotenzina koji regulira vazokonstrikciju (sužavanje krvnih žila) i krvni tlak. Primarno je eksprimiran u alveolarnim stanicama, ali i u nekoliko ekstrapulmonalnih (vanplućnih) tkiva poput srca, bubrega i crijeva.
- Kritični korak u interakciji virusa sa stanicom domaćina jest vezanje SARS-CoV-2-S-glikoproteina s ACE2-receptorom na površini stanice domaćina. Stoga je inhibicija opisane interakcije pomoću blokirajućih peptida obećavajuća strategija u borbi protiv SARS-CoV-2 infekcije.

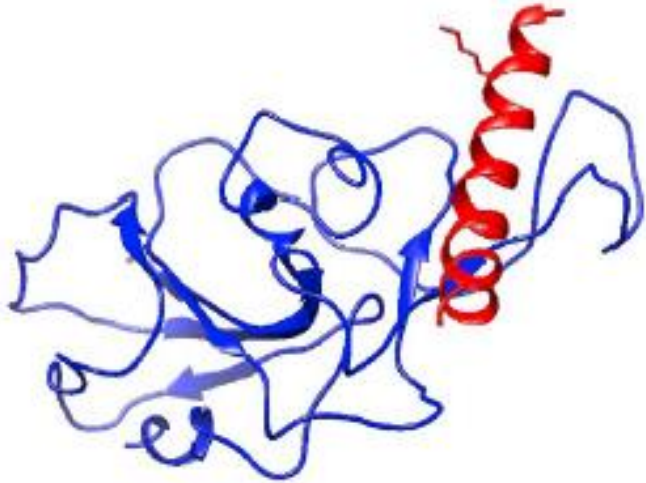


- Kristalna struktura kompleksa SARS-CoV-2-S-glikoproteina i ACE2-receptora ukazala je na ACE2-prepoznavaću domenu u kojoj je sekvencija od 23 aminokiseline [E23, Q24, A25, K26, T27, F28, L29, D30, K31, K32, N33, H34, E35, A36, E37, D38, L39, F40, Y41, Q42, S43, S44, L45 (**23aa peptide**)] pretežito uključena u interakciju.



- Sljedeći korak bio je istražiti može li se **23aa peptide** samostalno vezati za SARS-CoV-2-S-glikoprotein. Pokazano je da se veže na isto mjesto gdje i originalna ACE2-prepoznavaća domena, čime je indiciran visok inhibički potencijal.

At the interface of SARS-CoV-2 (blue) and the docked 23 aa peptide (red).

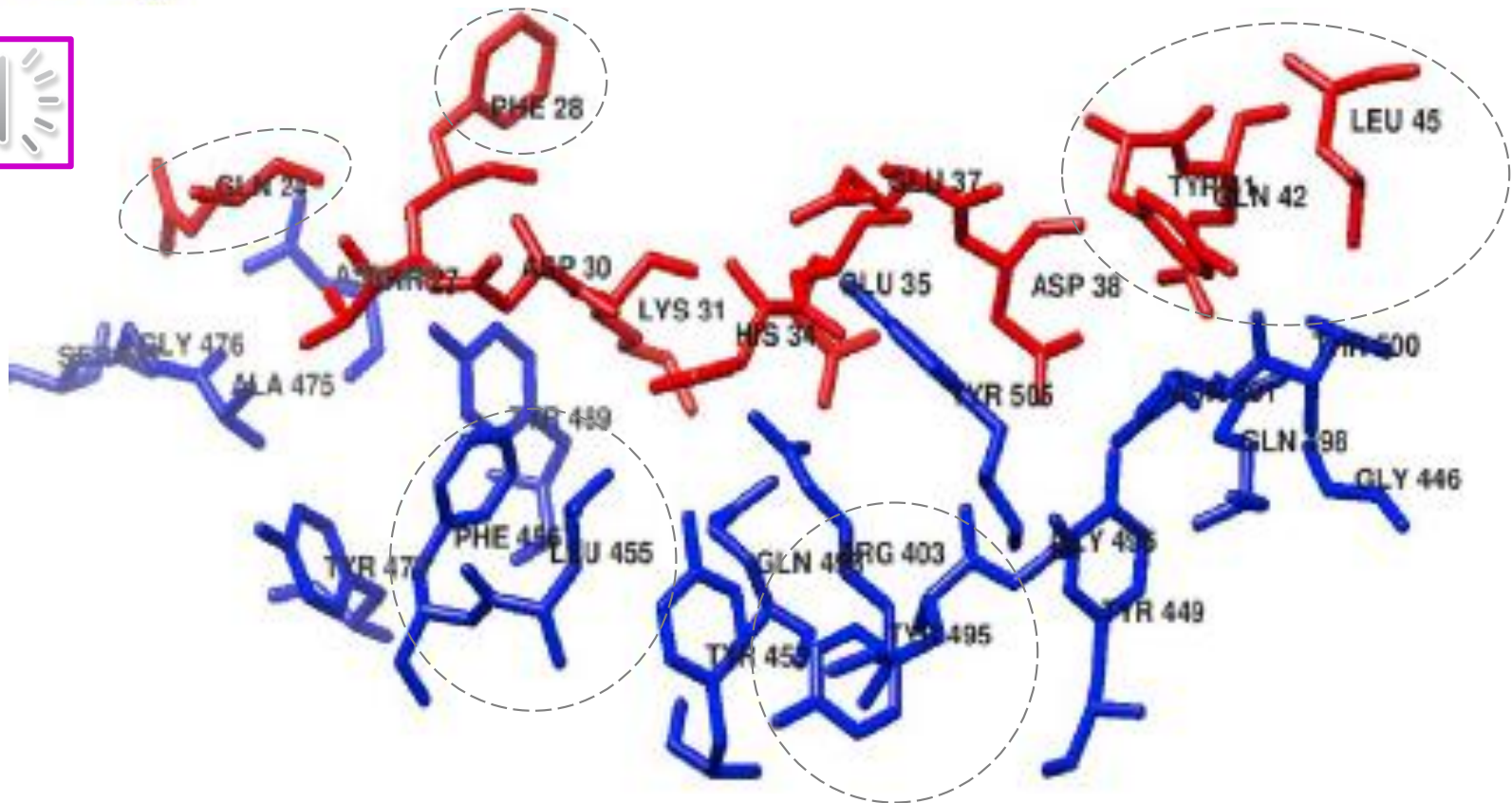


23aa peptide: Q24 T27 F28 D30 K31 H34 E35 E37 D38 Y41 Q42 L45

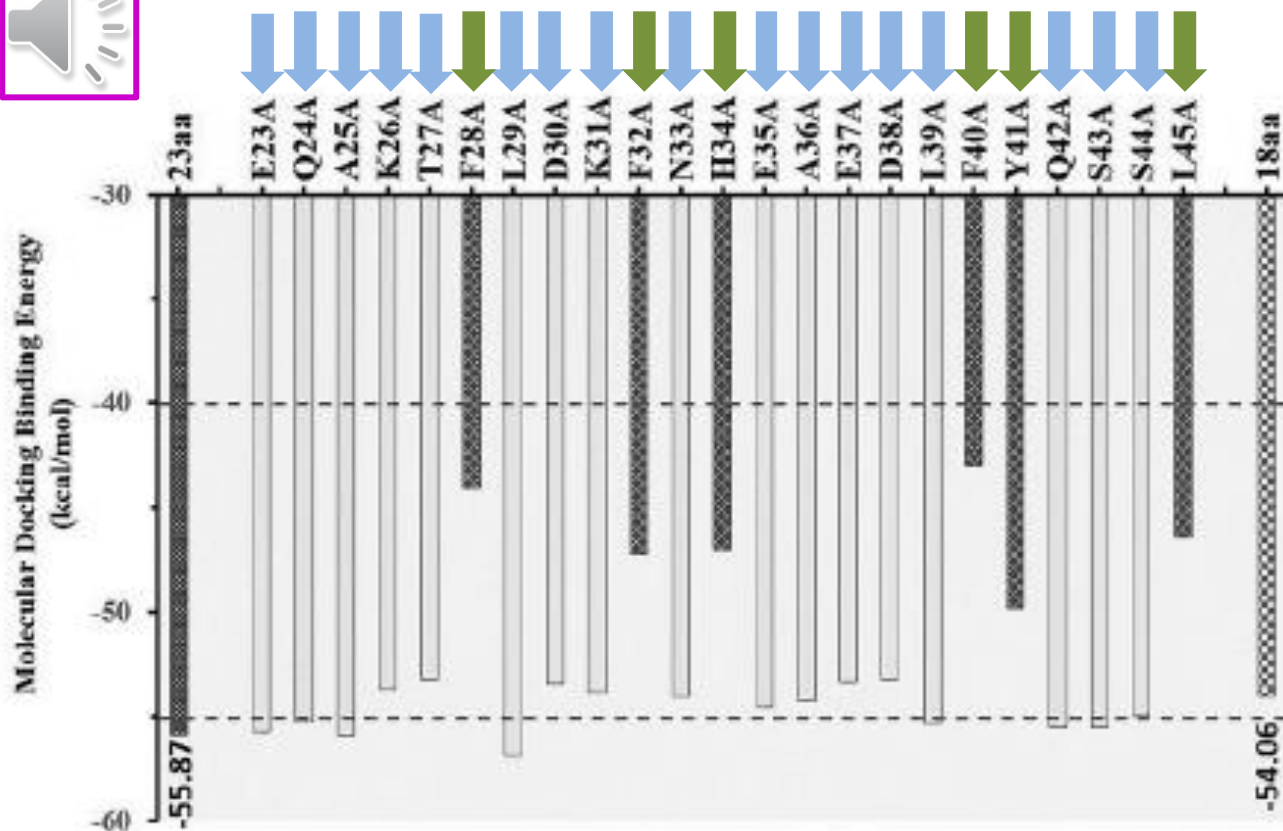
SARS-CoV-2: R403 G446 Y449 Y453 L455 F456 Y473 A475 G476

S477 N487 Y489 Q493 Y495 G496 Q498 T500 N501 Y505

- Podvučeni i istaknuti ostatci ostvaruju jake interakcije inhibitornog 23aa peptide s virusnim proteinom.



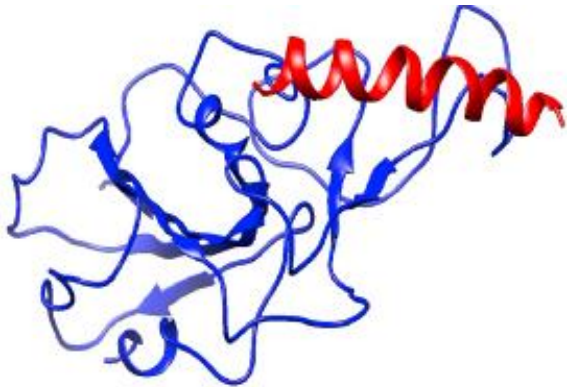
- Potom se Ala-scanom istražilo koje su među 23 aminokiseline iz inhibitornog **23aa peptide** nužne za interakciju s SARS-CoV-2-S. Svaka pojedina aminokiselina zamijenjena je s Ala, nakon čega su modelirani Ala-supstituirani peptidi (mutirani peptidi) te im je određena energija vezanja. Ukoliko uslijed supstitucije jednog ostatka s Ala dođe do značajnog pada ukupne slobodne energije vezanja zaključuje se da je taj ostatak krucijalan za vezanje s virusnim S-proteinom.
- Pokazalo se da je ukupna energija vezanja SARS-CoV-2-S i **23aa peptide** usporediva s energijom vezanja SARS-CoV-2-S i peptida čiji su plavo označeno ostatci zamijenjeni s Ala. S druge strane, ostatci **F28, F32, H34, F40, Y41 i L45** krucijalni su za vezanje i stabilizaciju kompleksa sa SARS-CoV-2-S. Zamjenom tih ostataka s Ala dolazi do promjene konformacije rezultirajućeg peptida uslijed čega se smanjuje njegova kompatibilnost sa SARS-CoV-S proteinom.



- Ala-scanom identificirani su i ostatci koji nisu bitni za vezanje s virusnim proteinom: E23, Q24, A25, K26 i T27. Izostavljanjem tih nevažnih ostataka došlo se do kraćeg potencijalnog inhibitora **18aa peptide** (F28, L29, D30, K31, F32, N33, H34, E35, A36, E37, D38, L39, F40, Y41, Q42, S43, S44, L45) koji je dodatno optimiziran i podvrgnut različitim metodama molekuskog pristajanja.



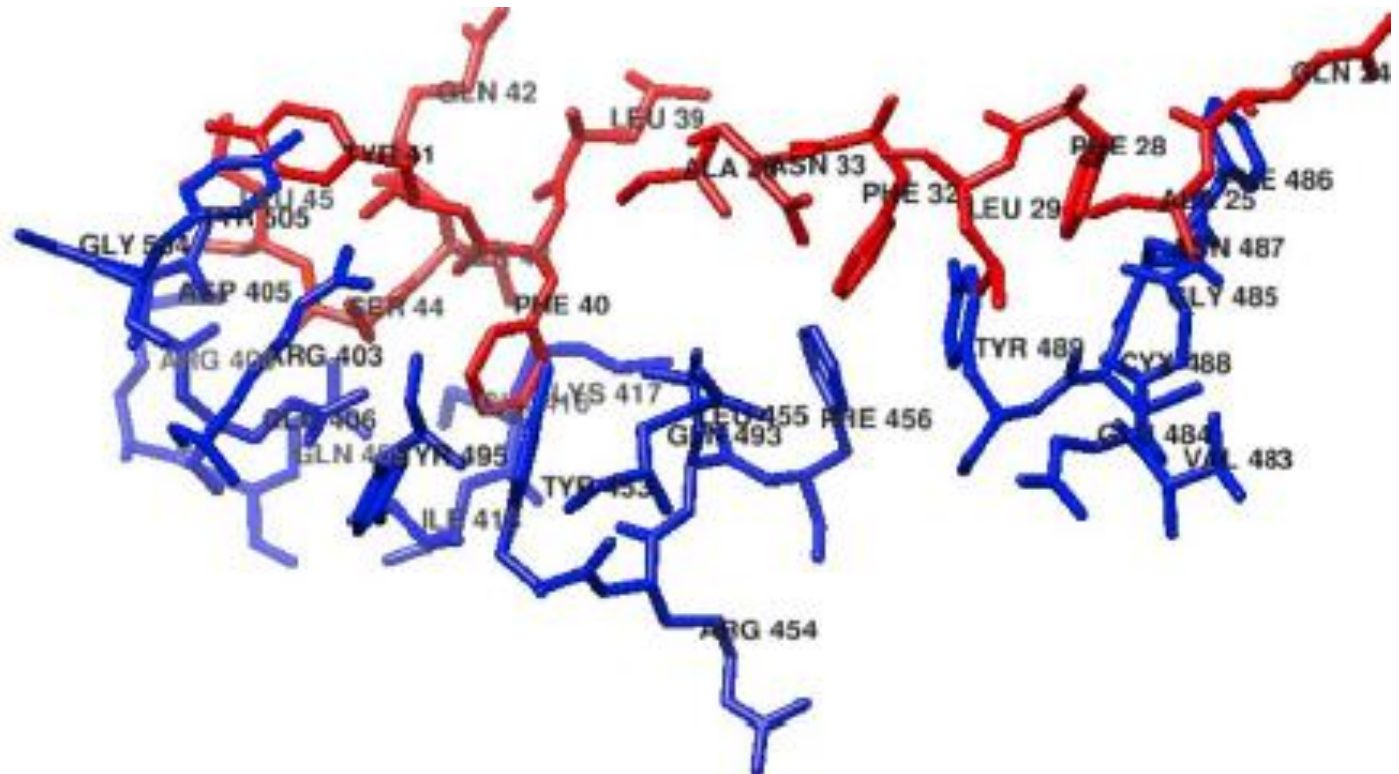
At the interface of SARS-CoV-2 (blue) and the docked 18 aa peptide (red).



18aa peptide: Q24 A25 F28 L29 F32 E33 A36 L39 F40 Y41 Q42 S43 S44 L45

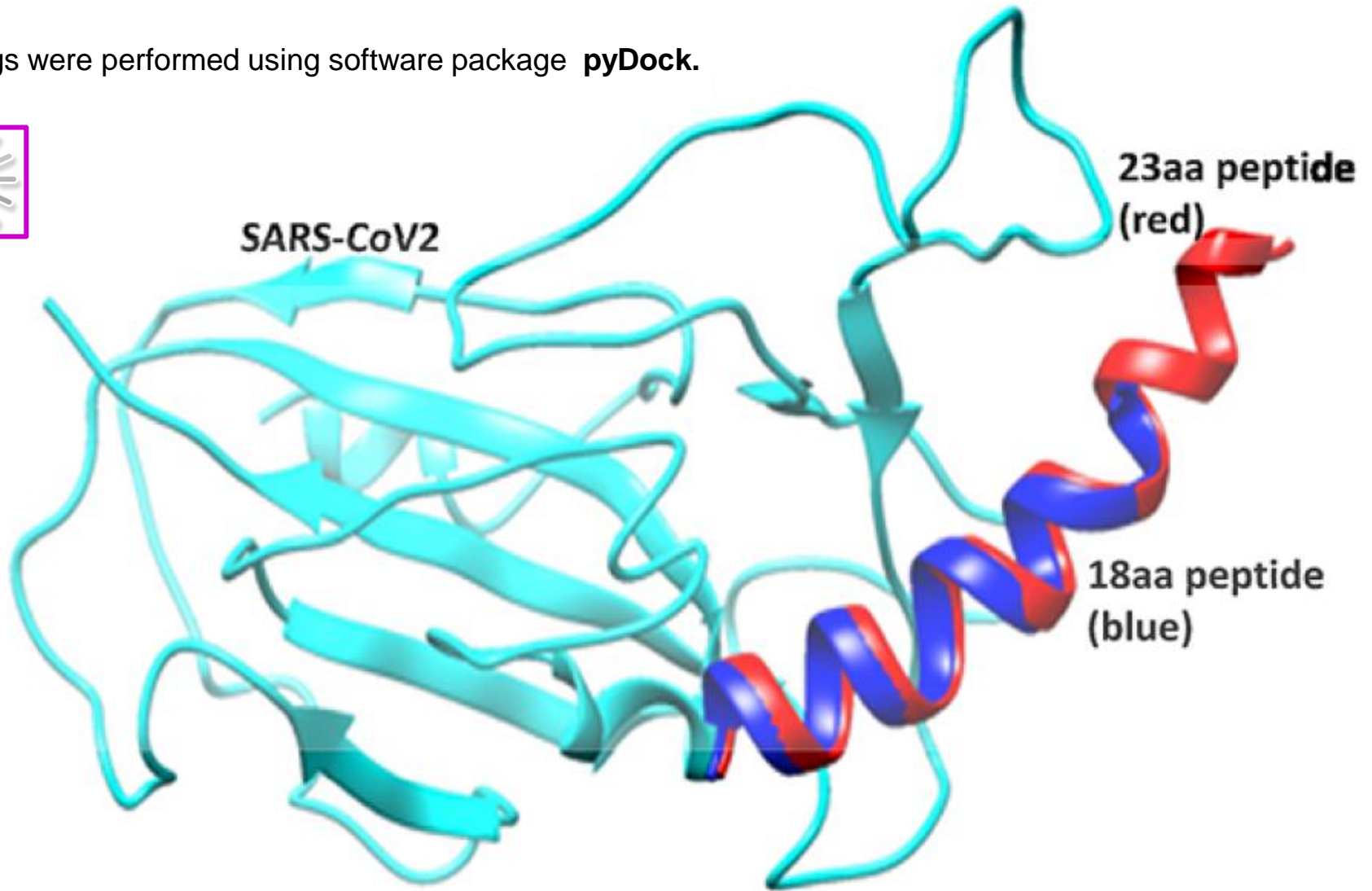
SARS-CoV-2: R403 D405 E406 R408 Q409 G416 K417 I418 Y453 R454 L455

F456 V483 E484 G485 F486 N487 C488 Y489 Q493 Y495 G504 Y505



- Pokazalo se da **18aa peptide** ostvaruje konformaciju vrlo sličnu konformaciji originalnog **23aa peptide**, što sugerira njegovu učinkovitost kao potencijalnog **SARS-CoV-2** inhibitora.

Dockings were performed using software package **pyDock**.

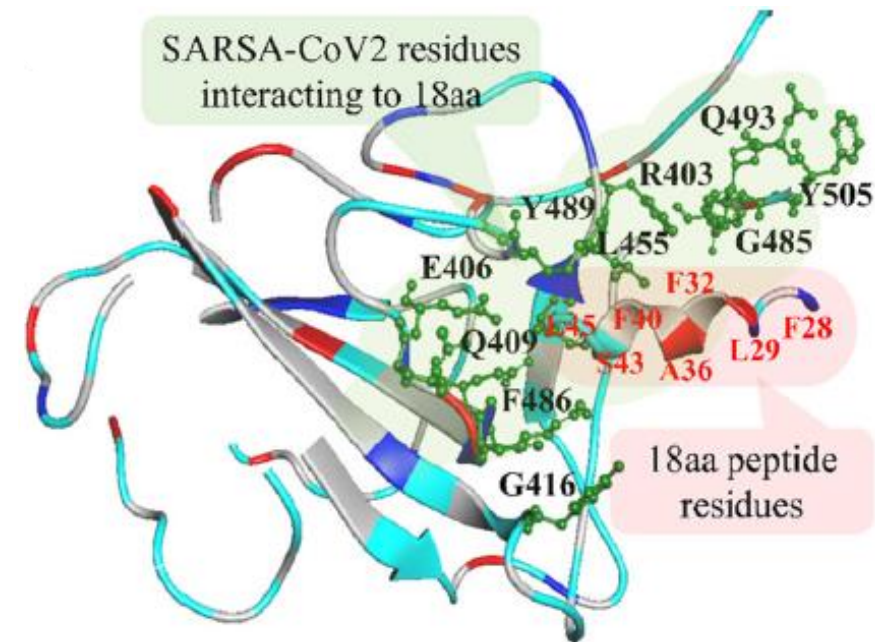
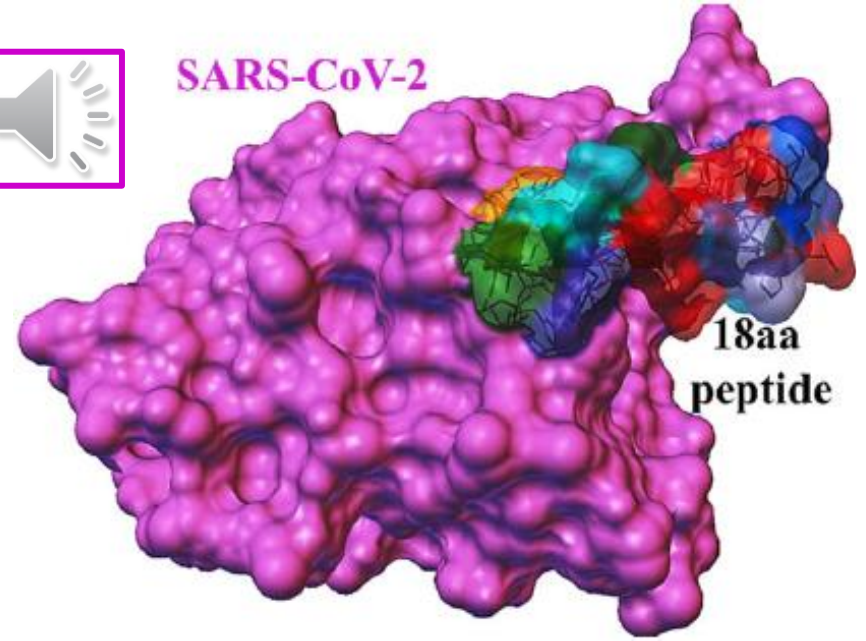


“The findings of this study suggest that a peptide of 18-amino acids could be considered as a selective therapeutic candidate for COVID-19.”

- U iščekivanju cjepiva, intenzivno se radi na razvoju potentnih terapijskih agenasa koji mogu obuzdati infekciju u samom začetku, a koji se temelje na nekoliko različitih pristupa (ACE2-proteini, antitijela iz seruma inficiranih pacijenata, prenamjena postojećih lijekova ili dizajn blokirajućih peptida).
- U citiranoj publikaciji opisan je dizajn i probir (*screening*) novih peptidomimetika, kao inhibitora interakcije ACE2 proteina sa SARS-CoV-2-S-glikoproteinom i tako spriječiti ulazak virusa u stanicu.
- Dizajn novih inhibitora zasniva se na ključnim ostacima **28F, 32F, 40F, 41Y, 43S, 44S i 45L iz 18aa peptide**; nakon obrade na pep:MMs: MIMIC serveru (web-alat koji na temelju 3D-strukture analiziranog peptida iz baze koja sadrži preko 17 milijuna konformera izračunatih za 3,9 milijuna komercijalno dostupnih spojeva generira njemu slične konformere) dobiveno je 200 mimetika njegove 3D-strukture.



SARS-CoV-2



- Knjižnica tako dobivenih 200 peptidomimetika baziranih na krucijalnim ostatcima **28F, 32F, 40F, 41Y, 43S, 44S** i **45L** iz inhibitora 18aa peptide, podvrgnuta je studijama molekuskog pristajanja s veznim mjestom SARS-CoV-2-S, što je dovelo do 4 peptidomimetika za daljnje DFT- i ADMET-studije.

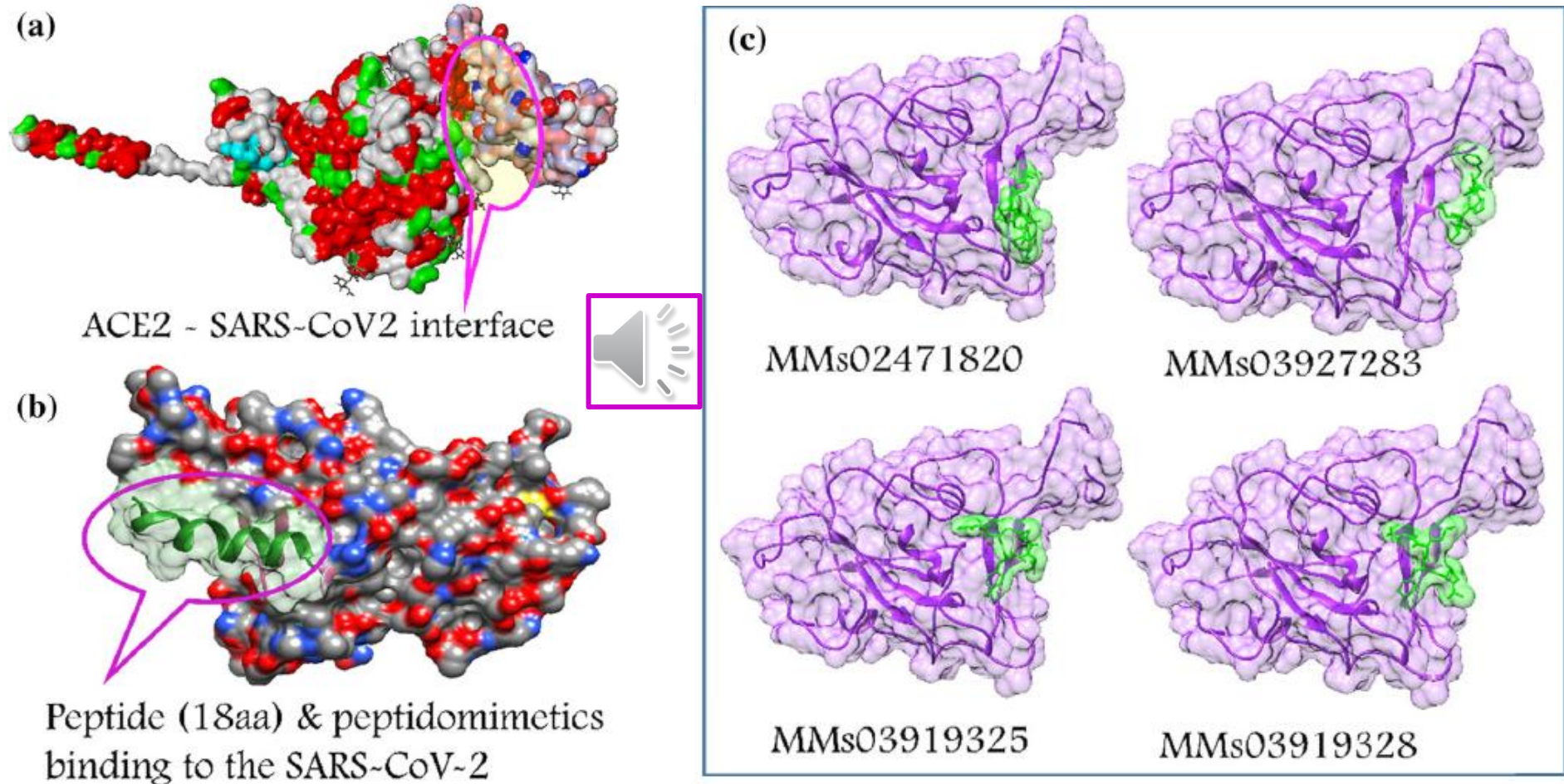
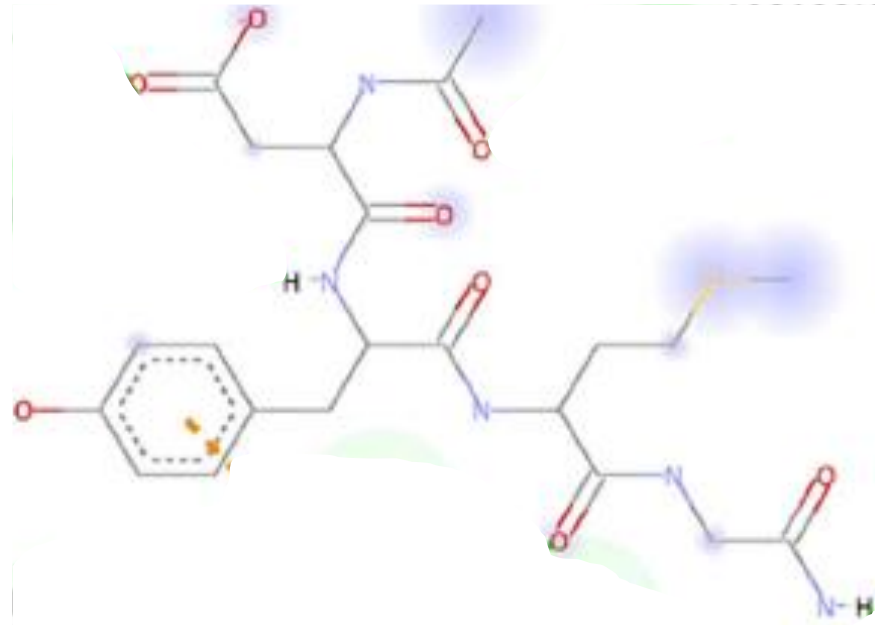
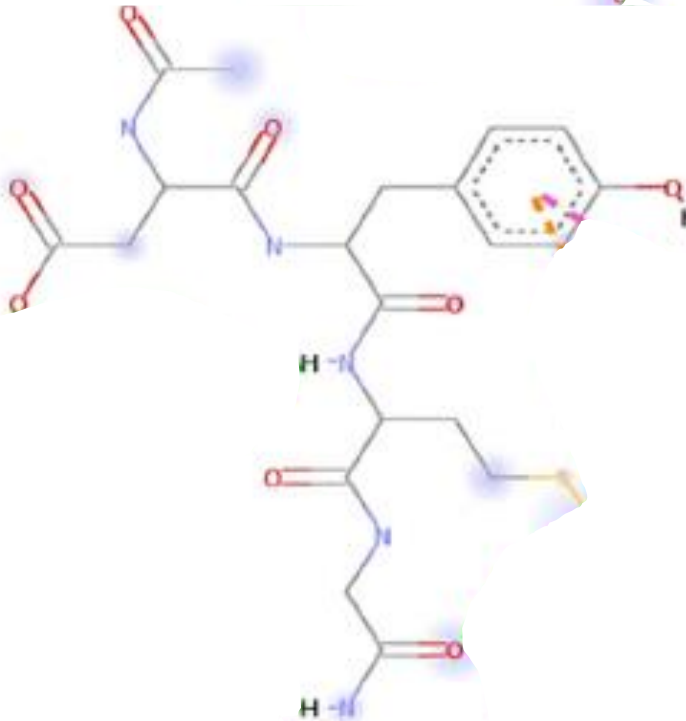
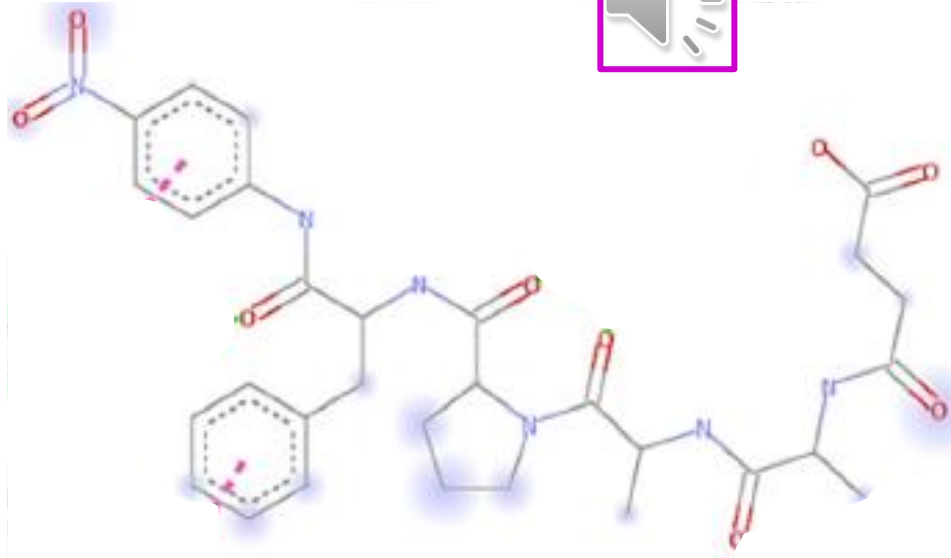
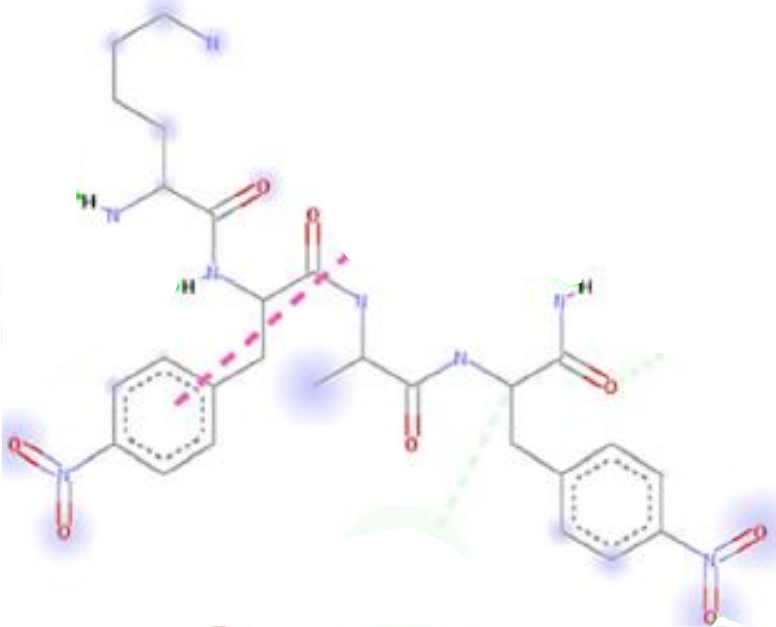
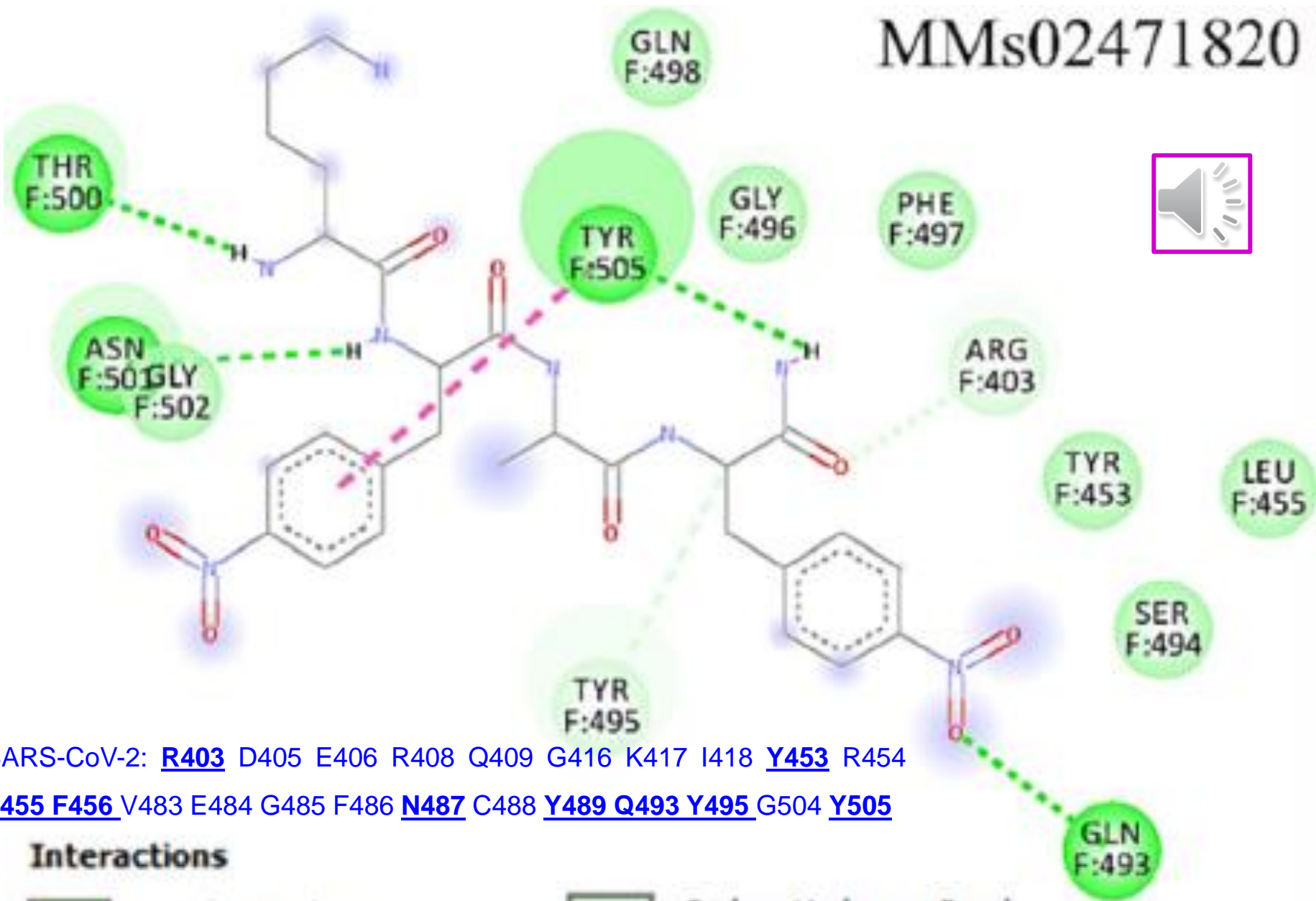


FIGURE 2. (a) Illustration of the binding interface of SARS-CoV-2 and ACE2; (b) 18aa blocks entry point of SARS-CoV-2 to ACE2; (c) Top 4 peptidomimetics docking pose blocking SARS-CoV-2 entry resembling 18aa peptide inhibitor binding mode.

- Analizirani su obrasci individualnih interakcija tih četiriju **peptidomimetika** s ključnim aminokiselinskim ostatcima iz SARS-CoV-2-S-proteina. Prema dobivenim rezultatima, gotovo svi peptidomimetici ostvaruju jake interakcije s aminokiselinskim ostatcima iz SARS-CoV-2-S-proteina: vodikove veze te π - π - i kation- π -interakcije.

28Phe, 32Phe, 40Phe, 41Tyr, 43Ser, 44Ser, 45Leu





SARS-CoV-2: [R403](#) D405 E406 R408 Q409 G416 K417 I418 [Y453](#) R454
[L455](#) [F456](#) V483 E484 G485 F486 [N487](#) C488 [Y489](#) [Q493](#) [Y495](#) G504 [Y505](#)

Interactions



van der Waals



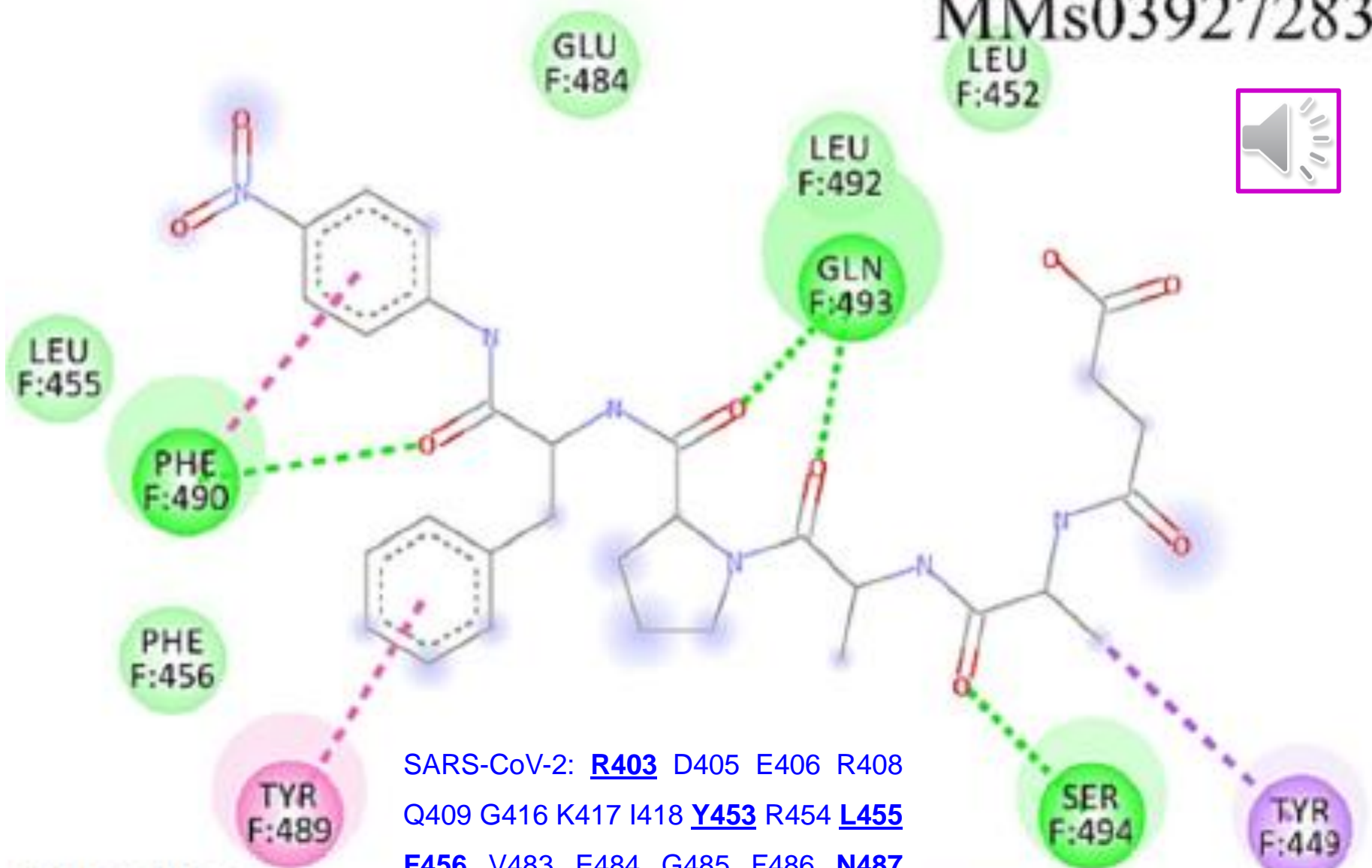
Carbon Hydrogen Bond



Conventional Hydrogen Bond



Pi-Pi Stacked



Interactions



van der Waals



Conventional Hydrogen Bond

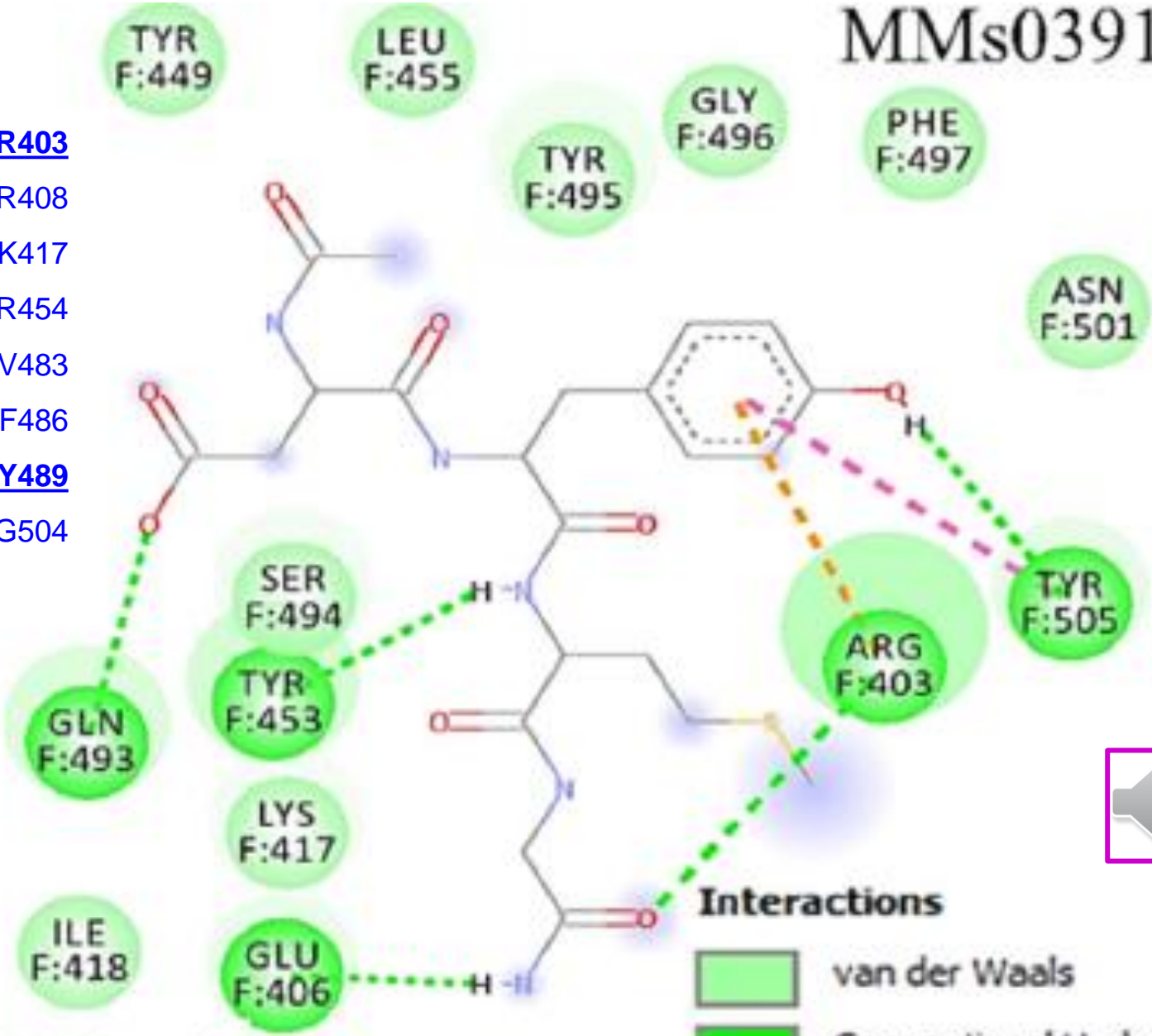


Pi-Sigma








Pi-Pi Stacked

SARS-CoV-2: [R403](#)
D405 E406 R408
Q409 G416 K417
I418 [Y453](#) R454
[L455](#) [F456](#) V483
E484 G485 F486
[N487](#) C488 [Y489](#)
[Q493](#) [Y495](#) G504
[Y505](#)



Interactions

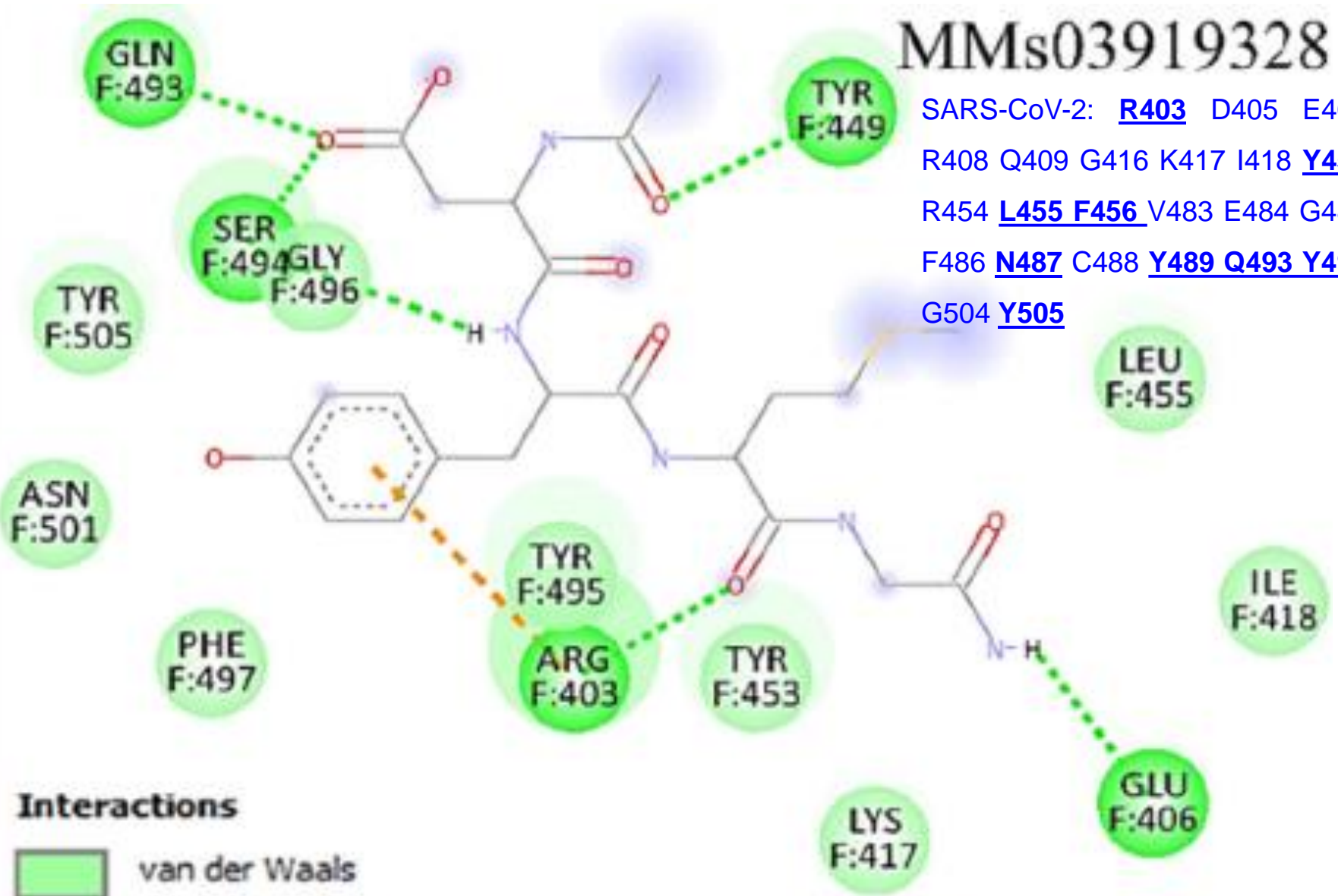
-  Pi-Pi T-shaped
-  Pi-Alkyl

-  van der Waals
-  Conventional Hydrogen Bond
-  Pi-Cation

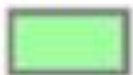


MMs03919328

SARS-CoV-2: [R403](#) D405 E406
R408 Q409 G416 K417 I418 [Y453](#)
R454 [L455 F456](#) V483 E484 G485
F486 [N487](#) C488 [Y489 Q493 Y495](#)
G504 [Y505](#)



Interactions



van der Waals



Conventional Hydrogen Bond



Pi-Cation



Pi-Pi T-shaped



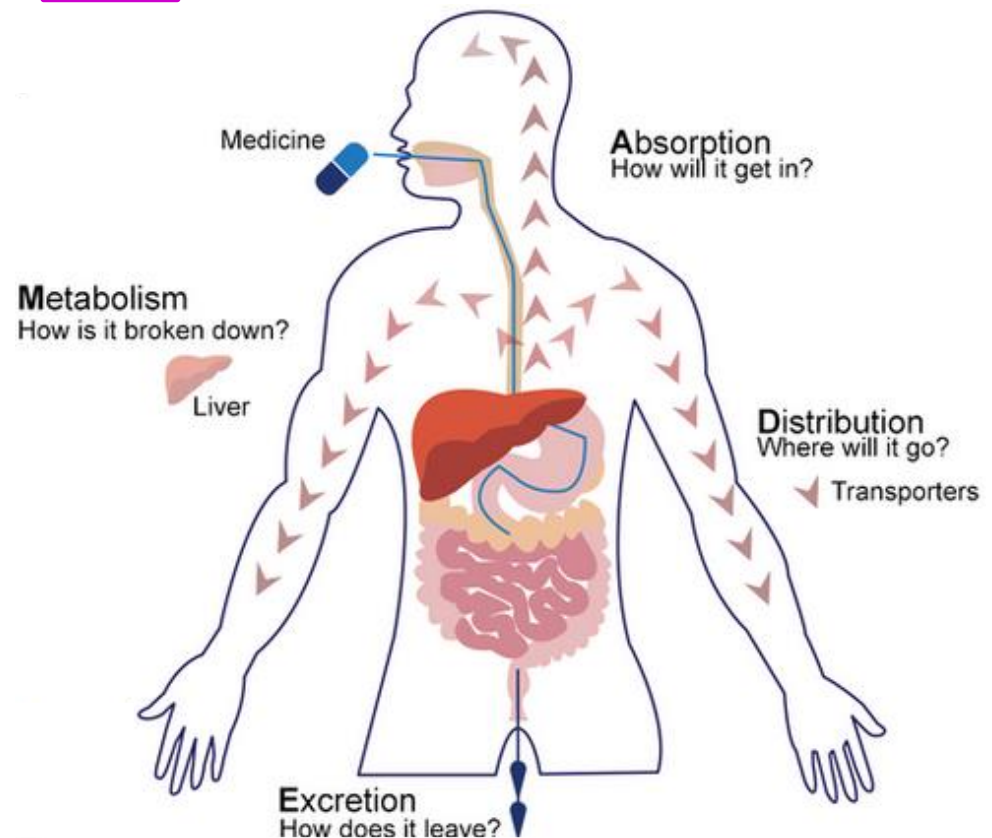
Pi-Alkyl

- Novi su peptidomimetici podvrgnuti ADMET-validaciji za predikciju ljekovitih svojstava što pomaže u filtriranju aktivnih spojeva i reducira eksperimentalne postupke u evaluaciji novih spojeva.
- ADMET*-validacija za predikciju ljekovitih svojstava provedena je upotrebom MedChem Designer, web-alata koji daje fizikalno-kemijski opis mogućih “drug-like” spojeva te se koristi za istraživanje ljekovite prirode testiranih spojeva koji zadovoljavaju Lipinskijevo pravilo 5 (uvjet za racionalni dizajn lijekova).



ADMET*:

- apsorpcija kemijskog spoja u krv (absorption),
- raspodjela po tjelesnim tekućinama i tkivima (distribution),
- metabolizam (metabolism),
- izlučivanje lijeka i njegovih metabolita (excretion),
- toksičnost (toxicity).



- Lipinskijeva pravila [omogućavaju predikciju oralne bioraspoloživosti (omjer koncentracije lijeka koji nepromijenjen dopijeva u krvotok nakon oralne primjene i koncentracije lijeka u krvi nakon intravenske primjene] koja mora zadovoljavati ljekovita tvar:
 - molekulska masa manja od 500 g mol^{-1} ,
 - visoka lipofilnost (izražena kao $\log P < 5$),
 - manje od 5 donora vodikove veze,
 - manje od 10 akceptora vodikove veze,
 - broj veza oko kojih je moguća slobodna rotacija manji od 10.
- “ToxinPred” server korišten je za analizu toksičnosti četiriju vodećih peptidomimetika (pokazalo se da nisu toksični).

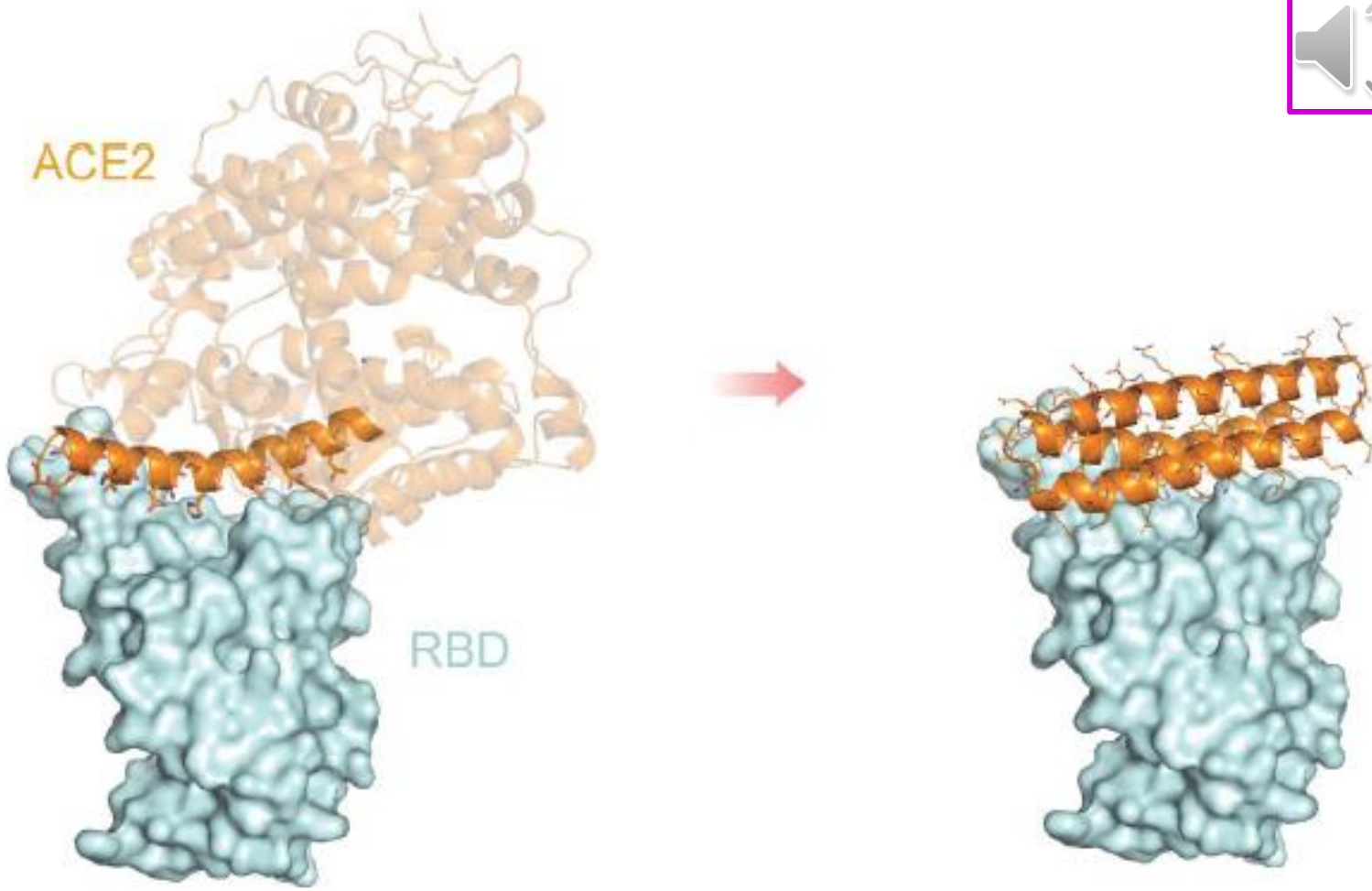


“Further, the 4 lead peptidomimetic compounds have been proposed for SARS-CoV-2 spike protein inhibition studies in cell-based assays.”

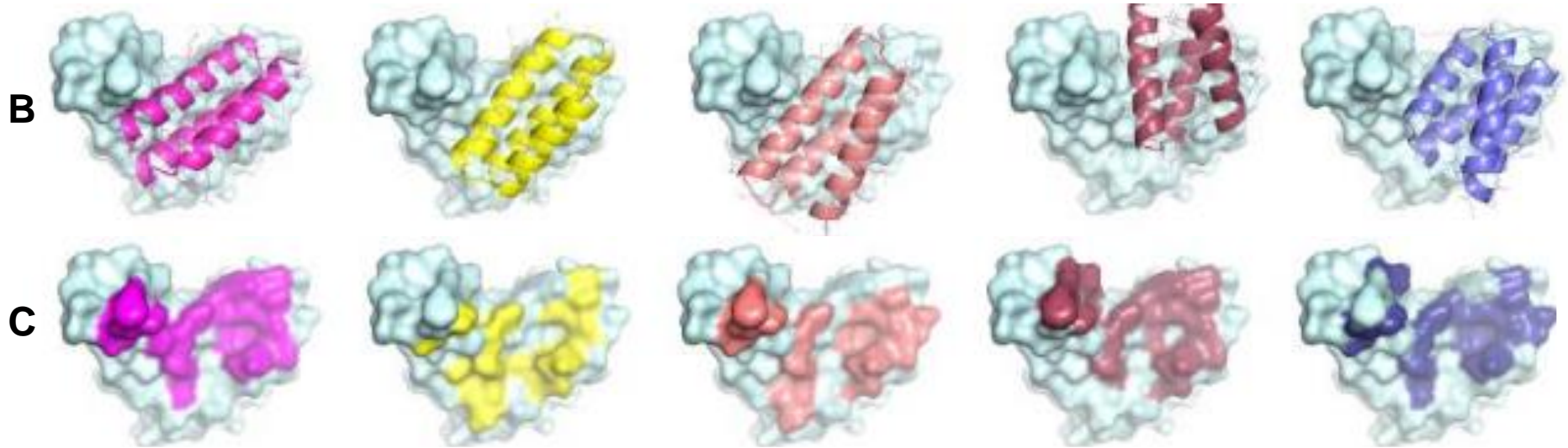
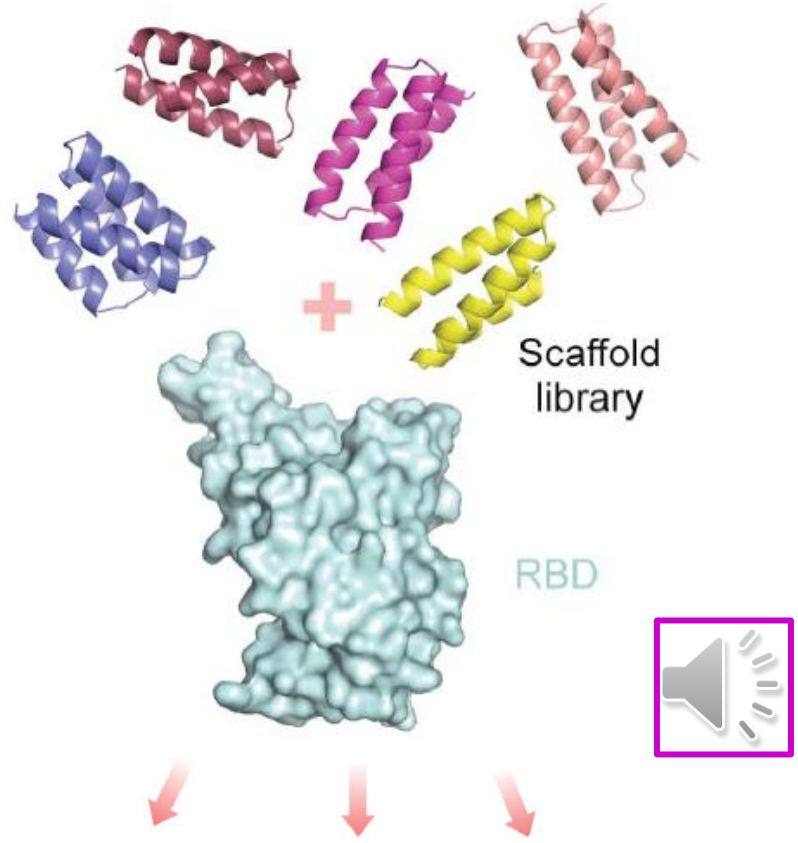
- SARS-CoV-2 infekcija uglavnom započinje u nazalnoj šupljini gdje se virus započinje replicirati i nakon nekoliko dana širi se u respiratorni trakt. Stoga bi visoka koncentracija virusnog inhibitora u nosu i respiratornom traktu djelovala ne samo kao profilaktička zaštita i/ili terapija za tretiranje infekcije u samom začetku što bi bilo od velike koristi za zdravstvene radnike kao i za sve one koji dolaze u česte kontakte s velikim brojem ljudi.
- Trenutno su u razvoju brojna monoklonska protutijela za tretiranje SARS-CoV-2 infekcije. Ipak, nisu pogodna za intranazalnu primjenu zato što su protutijela velike i često nedovoljno stabilne molekule, a i gustoća veznih mjesta vrlo je niska. Stoga se razvijaju inhibitori S-proteina koji imaju brojne prednosti u odnosu na protutijela; naime, ti inhibitori stvaraju stabilne komplekse s ACE2-receptorima i tako onemogućuju interakciju S-proteina s ACE2, a osim toga odlikuju se i manjom veličinom što povećava gustoću veznih domena. Navedene karakteristike omogućuju izravnu dostavu takvih inhibitora u respiratorni sustav nazalnim administriranjem, nebulizacijom (aerosolnom terapijom) ili primjenom suhog praškastog aerosola.
- U ovom je radu opisan dizajn visokoafinitetnih proteinskih miniveziva (*minibinders*) koji s ACE2 ulaze u kompeticiju za SARS-CoV-2-S-receptorske vezne domene (RBD, *receptor binding domain*).



- Pri tom su istražene dvije strategije:
 - I. α -uzvojnica iz ACE2, zadužena za glavnu interakciju s SARS-CoV-2-S-RBD, ugrađena je u male proteine kako bi se dodatno pojačale interakcije s RBD i osigurao veći afinitet. Za ovaj pristup korištena je platforma koja generira miniproteine u koje se ugrađuje ACE2-uzvojnica (ostatci 23 do 46).



II. Pristup zasniva se na dizajnu minibinders-a koji se ne oslanja na poznate RBD-vezne interakcije. Stoga se prednost ovog pristupa ogleda u velikom rasponu dizajnerskih mogućnosti što potencijalno dovodi do veće raznolikosti visokoafinitetnih veznih motiva. Ovdje je primijenjena *in silico* biblioteka miniproteina koji se mogu vezati na točno određene regije na RBD-površini koja okružuje ACE2-vezno mjesto (slika B. prikazuje komplekse minibinder-RBD, dok su na slici C. istaknuti ostatci iz RBD koji su na udaljenosti < 8 Å u odnosu na minibinders).



- Primjenom spomenutih pristupa iz modelne sekvencije (vezujuće uzvojnice iz ACE2-receptora) generirana je biblioteka od 19000 miniproteina (duljine 56 do 65 ostataka) iz koje se daljnjom optimizacijom došlo do 10 vezujućih miniproteina (AHB1, AHB2 te LCB1-8). Na slici su prikazani kompleksi tih miniproteina s RBD.

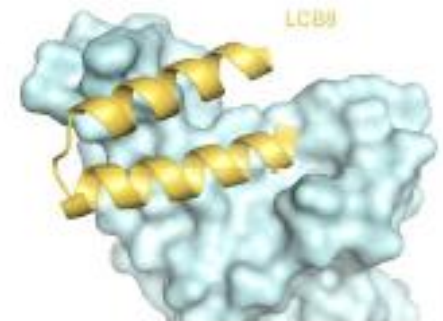
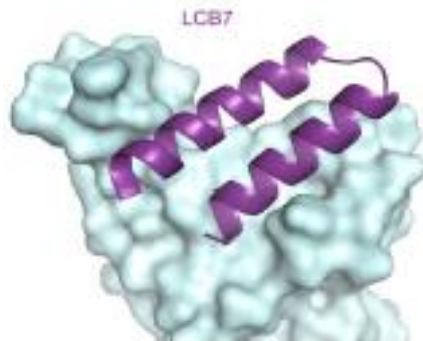
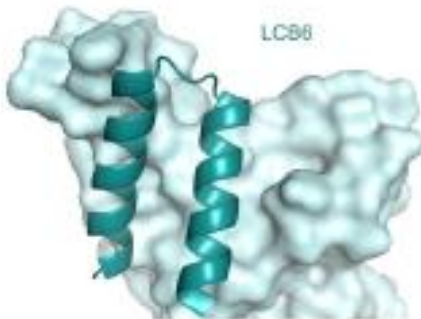
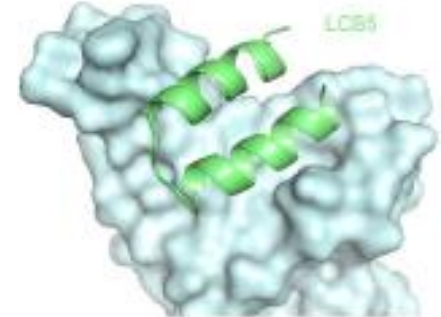
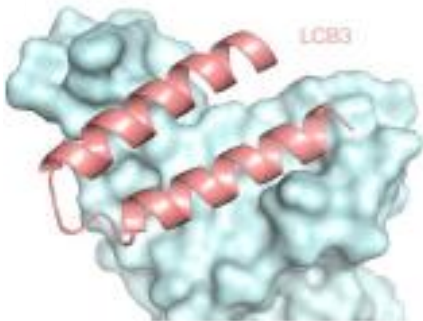
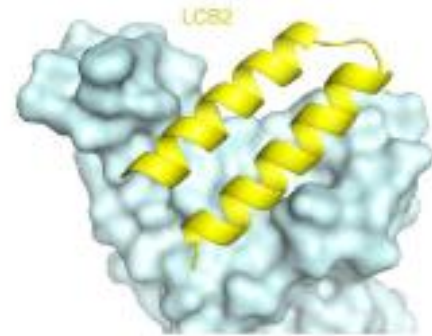
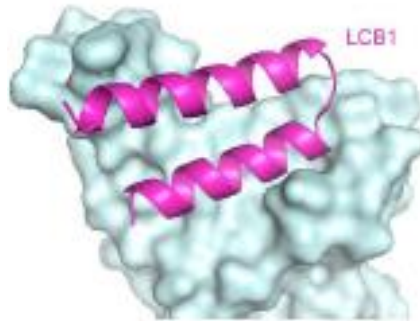
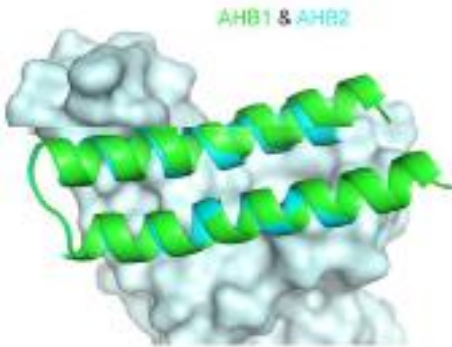


Table S2 The sequences of all biochemically characterized proteins.

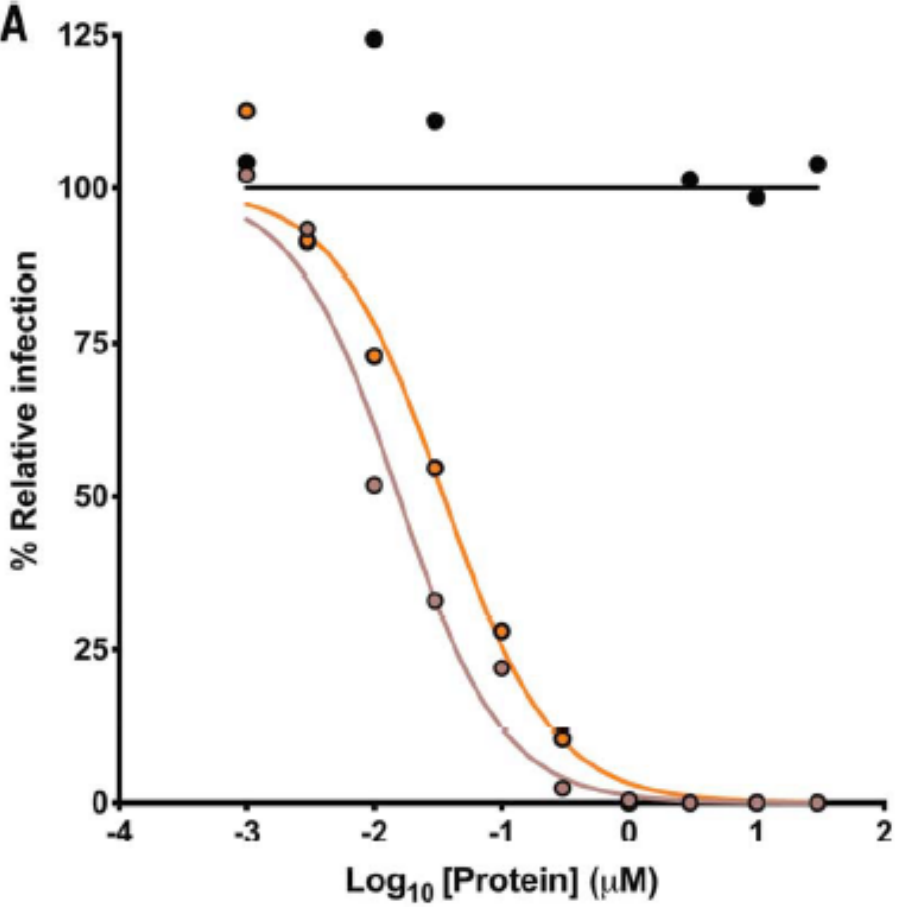
name	sequence
AHB1	DEDLEELERLYRKAEEVAKEAKDASRRGDDERAKEQMERAMRLFDQVFELAQELQEKQTDGNRQKATHLDKAVKE AADELYQRVR
AHB2	ELEEQVMHVLDQVSELAHELLHKLTGEELERAAYFNWWATEMMLELIKSDDEREIREIEEEEARRILEHLEELARK
LCB1	DKEWILQKIYEIMRLLEDLGHAEASMRVSDLIYEFMKKGDERLLEEAERLLEEVEER
LCB2	SDDEDSVRYLLYMAELRYEQGNPEKAKKILEMAEFIKRNNNEELERLVREVKKRL
LCB3	NDELHMLMTDLVYEALHFAKDEEIKKRVFQLFELADKAYKNNDRQKLEKVVEELKELLERLLS
LCB4	QREKRLKQLEMLLEYAIERNDPYLMFDVAVEMLR LAEENNDERIIERAKRILEEYE
LCB5	SLEELKEQVKELKKELSPEMRRLIEEALRFLEEGNPAMAMMVLSDLVYQLGDPRVIDLYMLVTKT
LCB6	DREQRLVRFLVRLASKFNLSPEQILQLFEVLEELLERGVSEEEIRKQLEEVAKELG
LCB7	DDDIRYLIYMAKLRLEQGNPEEAKEVLEMARFLAERLGMEELLKEVRELLRKIEELR
LCB8	PIIELLREAKEKNDEFAISDALYLVNELLQRTGDPRLEEVLVLIWRALKEKDPRLLDRAIELFER



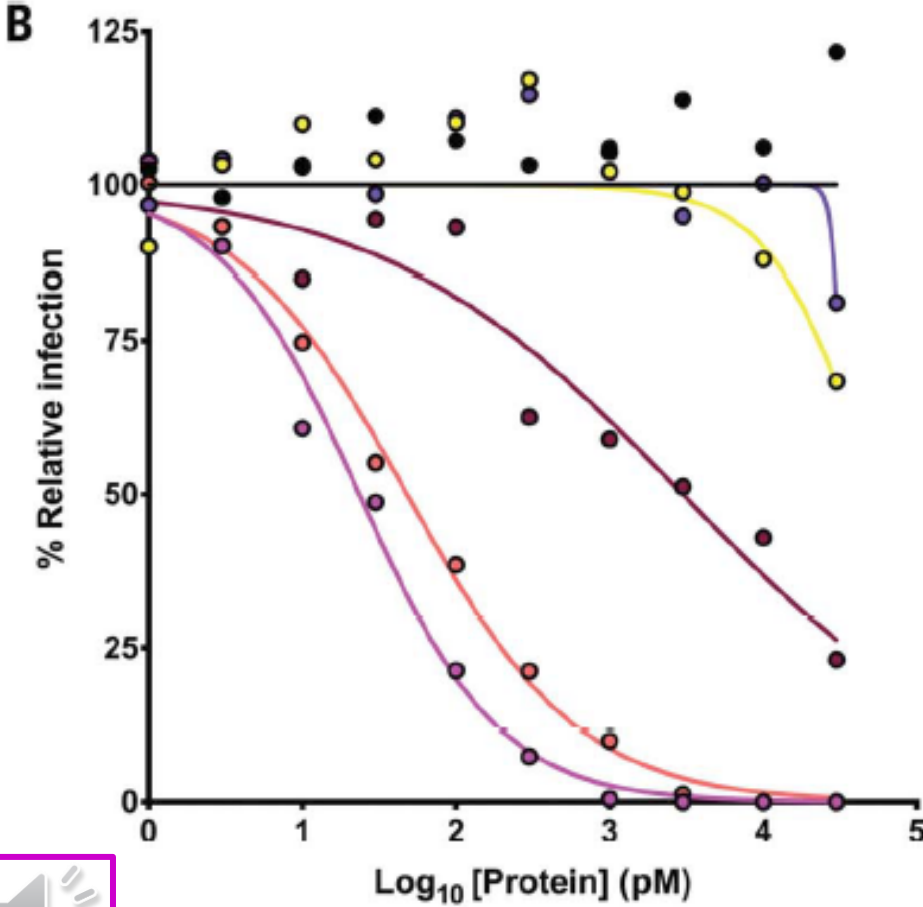
Table S1 Residues on RBD making contacts with ACE2 and the *de novo* binders (indices are according to PDB 6M0J). All the interaction residues that have a binding energy (Rosetta ΔG upon binding) smaller than zero are included.

name	Interface residues
ACE2	417K,421Y,445V,446G,449Y,453Y,455L,456F,473Y,474Q,475A,476G,484E,485G,486F,487N,488C,489Y,491P,492L,493Q,494S,497F,498Q,499P,500T,501N,502G,503V,505Y
AHB1	403R,406E,408R,409Q,415T,416G,417K,421Y,444K,445V,446G,447G,448N,449Y,453Y,454R,455L,456F,457R,460N,473Y,474Q,475A,476G,484E,486F,487N,488C,489Y,492L,493Q,494S,496G,498Q,500T,501N,502G,504G,505Y
AHB2	403R,408R,415T,416G,417K,419A,420D,421Y,446G,449Y,453Y,455L,456F,457R,458K,460N,473Y,475A,476G,478T,484E,486F,487N,489Y,490F,492L,493Q,494S,495Y,496G,497F,498Q,501N,502G,503V,504G,505Y
LCB1	402I,404G,408R,414Q,415T,416G,420D,445V,448N,454R,455L,459S,473Y,474Q,475A,476G,477S,483V,485G,486F,487N,488C,490F,492L,494S,495Y,496G,497F,499P,500T,501N,504G,505Y,506Q
LCB2	403R,405D,408R,409Q,416G,417K,418I,420D,421Y,446G,447G,453Y,455L,456F,458K,474Q,475A,476G,484E,487N,488C,489Y,490F,492L,493Q,494S,495Y,496G,497F,498Q,499P,500T,501N,502G,505Y
LCB3	402I,407V,408R,415T,416G,417K,418I,419A,420D,446G,448N,452L,453Y,454R,455L,456F,459S,472I,473Y,474Q,475A,476G,483V,485G,486F,487N,488C,489Y,492L,494S,495Y,496G,497F,500T,501N,504G,505Y,506Q
LCB4	403R,405D,406E,417K,444K,446G,447G,448N,449Y,453Y,455L,456F,483V,484E,485G,486F,487N,488C,489Y,492L,493Q,495Y,496G,497F,498Q,499P,500T,501N,502G,504G,505Y
LCB5	403R,408R,415T,416G,417K,418I,420D,421Y,446G,447G,449Y,453Y,455L,456F,460N,473Y,486F,487N,488C,489Y,490F,491P,492L,493Q,494S,495Y,496G,497F,498Q,501N,504G,505Y,506Q,507P
LCB6	403R,408R,409Q,415T,416G,417K,418I,419A,421Y,453Y,455L,456F,457R,458K,459S,473Y,474Q,475A,476G,477S,484E,486F,487N,488C,489Y,493Q,494S,496G,505Y
LCB7	403R,405D,406E,408R,416G,417K,418I,421Y,446G,447G,449Y,453Y,455L,456F,473Y,475A,476G,484E,485G,486F,487N,488C,489Y,493Q,495Y,496G,497F,498Q,500T,501N,502G,504G,505Y,506Q
LCB8	403R,405D,406E,416G,417K,421Y,447G,449Y,453Y,454R,455L,456F,457R,458K,460N,472I,473Y,475A,476G,477S,484E,485G,486F,487N,489Y,491P,492L,493Q,494S,495Y,496G,498Q,501N,502G,504G,505Y

- Među brojnim testovima, ispitan je kapacitet odabranih vezujućih miniproteina u sprječavanju infekcije VeroE6 stanica (izoliranih iz bubrežnog epitela) sa SARS-CoV-2. Kao kontrola korišten je minibinder virusa gripe. Pokazalo se da miniproteini AHB1 i AHB2 snažno neutraliziraju SARS-CoV-2 (IC₅₀-vrijednosti 35 i 15,5 μM). Još izraženiji neutralizicijski učinak zabilježen je s miniproteinima LCB1 i LCB3 (IC₅₀-vrijednosti 23,54 i 48,1 pM)!



● Influenza ● AHB1 ● AHB2



● LCB1 ● LCB3 ● LCB5
 ● LCB2 ● LCB4 ● Influenza





“The minibinders designed in this work have potential advantages over antibodies as potential therapeutics....The small size and high stability should also make them amenable to formulation in a gel for nasal application and to direct delivery into the respiratory system through nebulization or as a dry powder...We will be exploring alternative routes of delivery in the months ahead as we seek to translate the high-potency neutralizing proteins into SARS-Cov-2 therapeutics and prophylactics. Immunogenicity is a potential problem with any foreign molecule, but for previously characterized small de novo–designed proteins, little or no immune response has been observed...

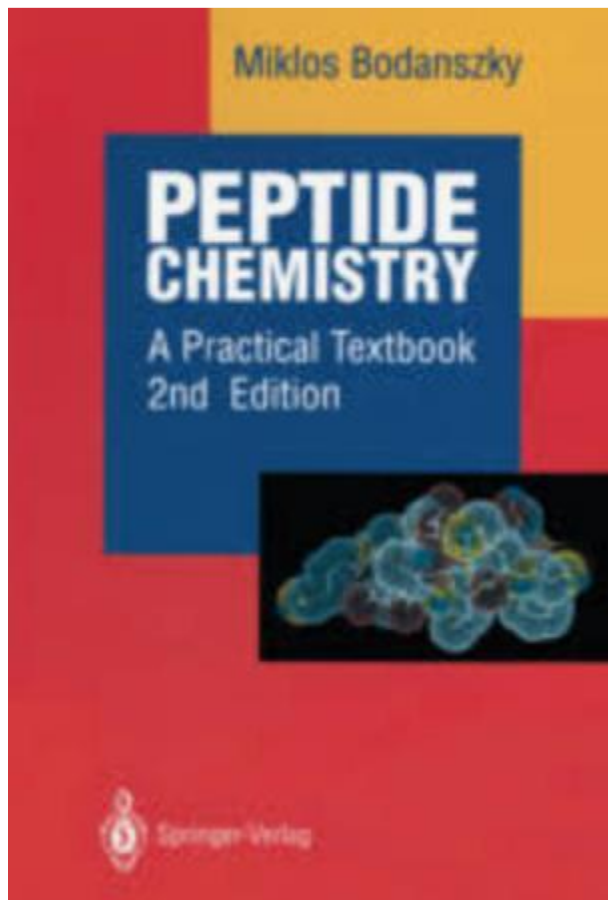
The large amount of data collected in protein-interface design experiments such as those described here should enable even faster in silico design of picomolar inhibitors such as LCB1 and LCB3. With continued methods development, we believe that it will become possible to generate ultrahigh-affinity, pathogen-neutralizing designs within weeks of obtaining a genome sequence. Preparing against unknown future pandemics is difficult, and such a capability could be an important component of a general response strategy.”

Peptidni mimetici i pseudopeptidi

Prof. dr. sc. Lidija Barišić



Strategija peptidne sinteze



Abstract

By the conventional methods of organic synthesis, preparation of peptides containing more than just a few amino acids is an arduous task. Introduction of blocking groups, coupling reactions and deprotection steps entail a large number of operations, such as washing the reaction mixtures neutral after coupling, precipitation or crystallization of intermediates, collecting solid products by filtration or centrifugation followed by drying, etc. Thus, synthesis of peptide chains containing dozens of residues requires an almost heroic effort and proteins, even small ones, can be made by tour de force but certainly not routinely.

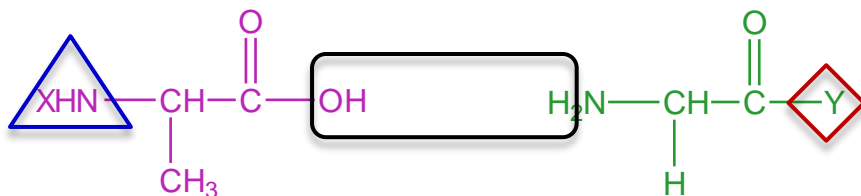
• Izazov u peptidnoj kemiji ne predstavlja samo stvaranje peptidne veze, već i povezivanje aminokiselina željenim slijedom!,

◦ nasumičnom tvorbom peptidne veze između npr. **Ala** i **Gly** moguće je dobiti 4 različita peptida:
Ala-Ala, **Ala-Gly**, **Gly-Ala** i **Gly-Gly**,

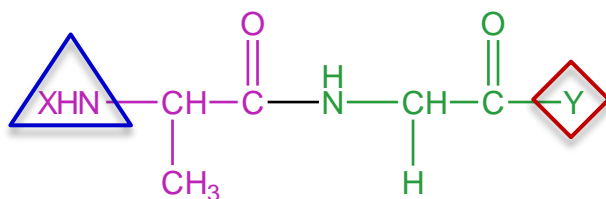


• kako dobiti željeni peptid **Ala-Gly** ($\text{H}_2\text{N-Ala-Gly-COOH}$)?

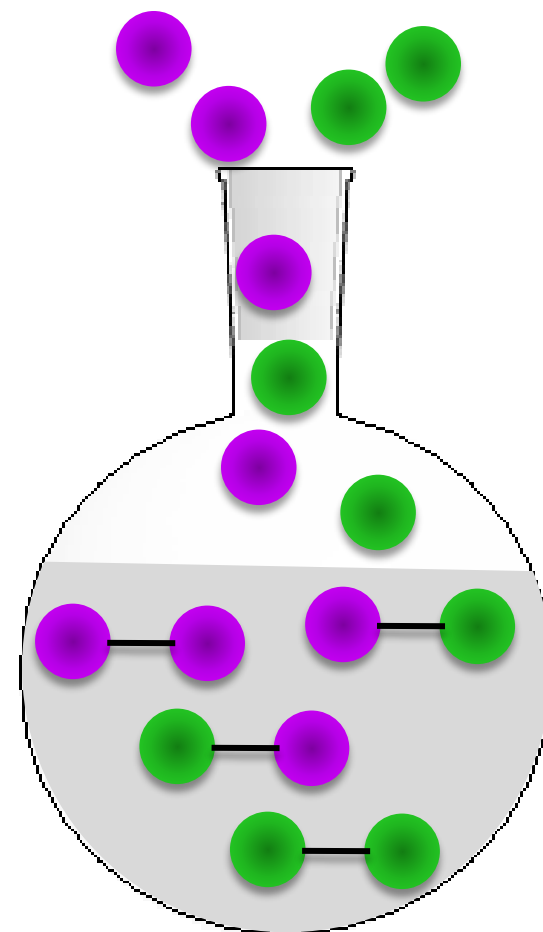
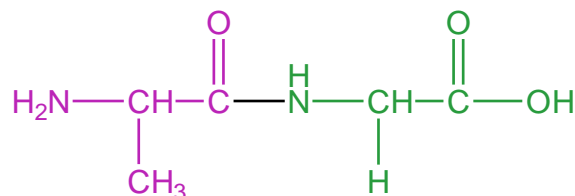
1. ograničiti broj mogućih kombinacija zaštićivanjem alaninske amino- (**N-Ala**) i glicinske karboksilne skupine (**C-Gly**)



2. kopulirati aminokiseline



3. deprotektirati N- i C-terminus dobivenog peptida

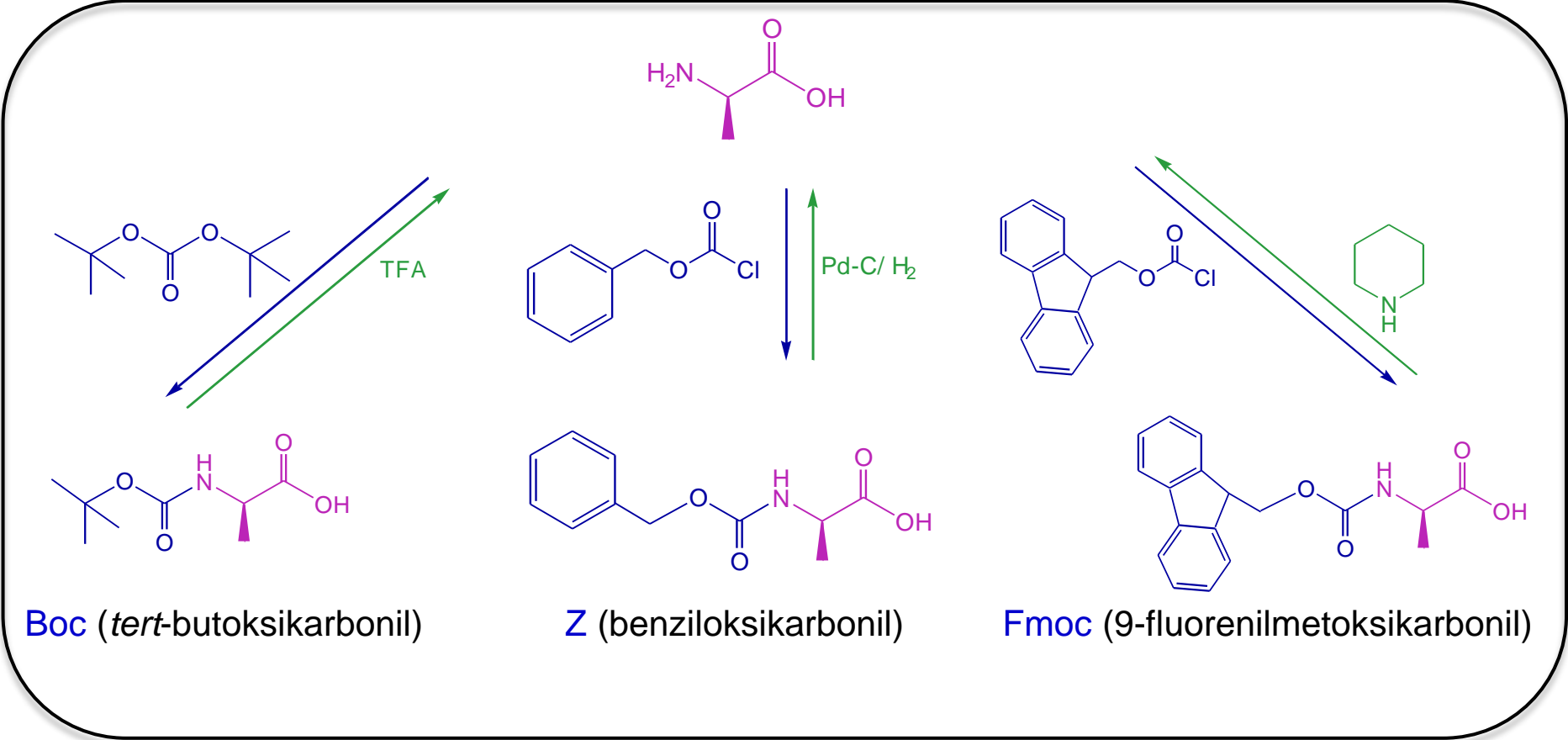
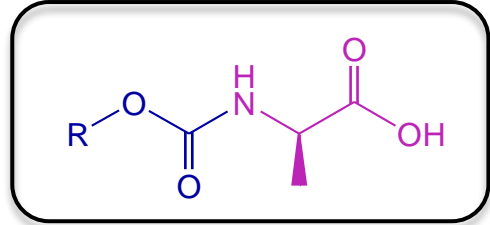


• kriteriji za odabir zaštitne skupine:

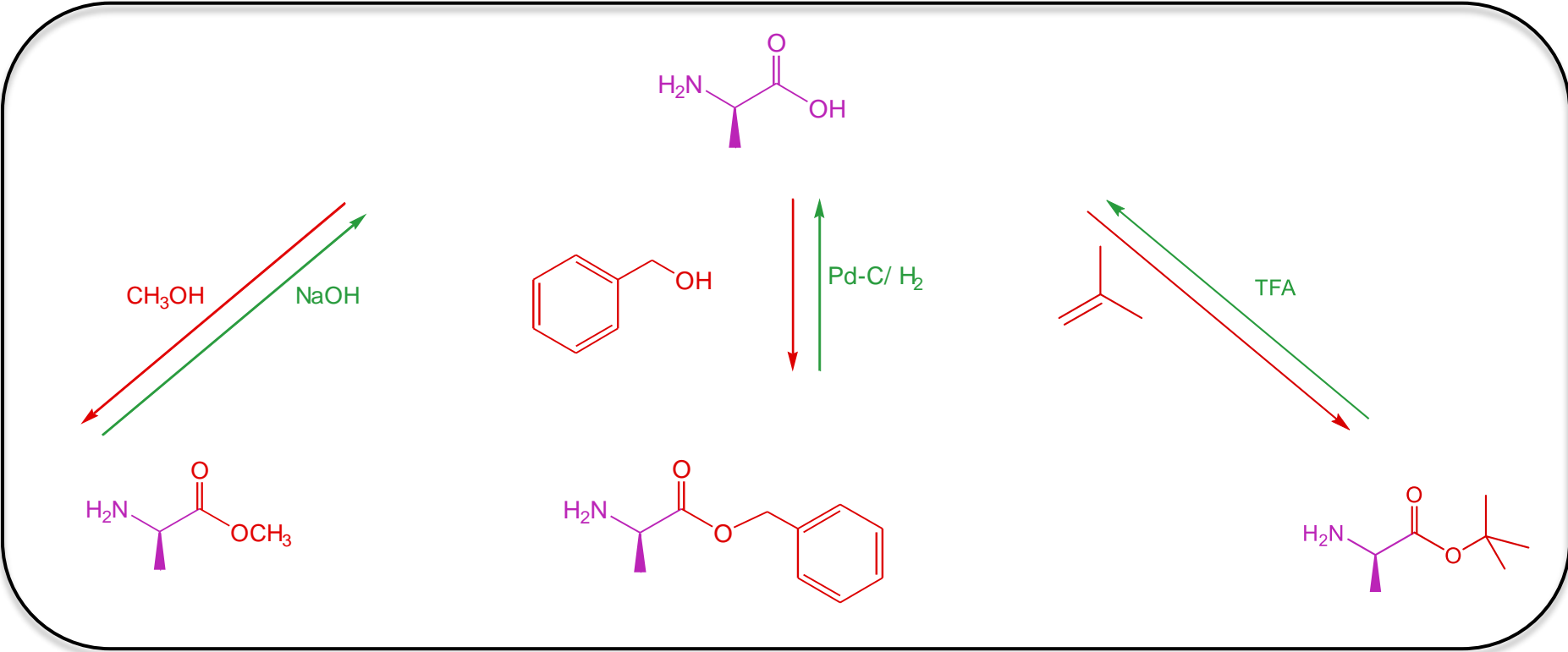
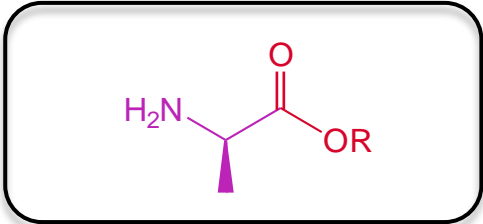
1. **uvode** se jednostavnim postupcima u visokim iskorištenjima,
2. stabilne su pri uvjetima sinteze peptida,
3. lako se i selektivno **uklanjaju**.



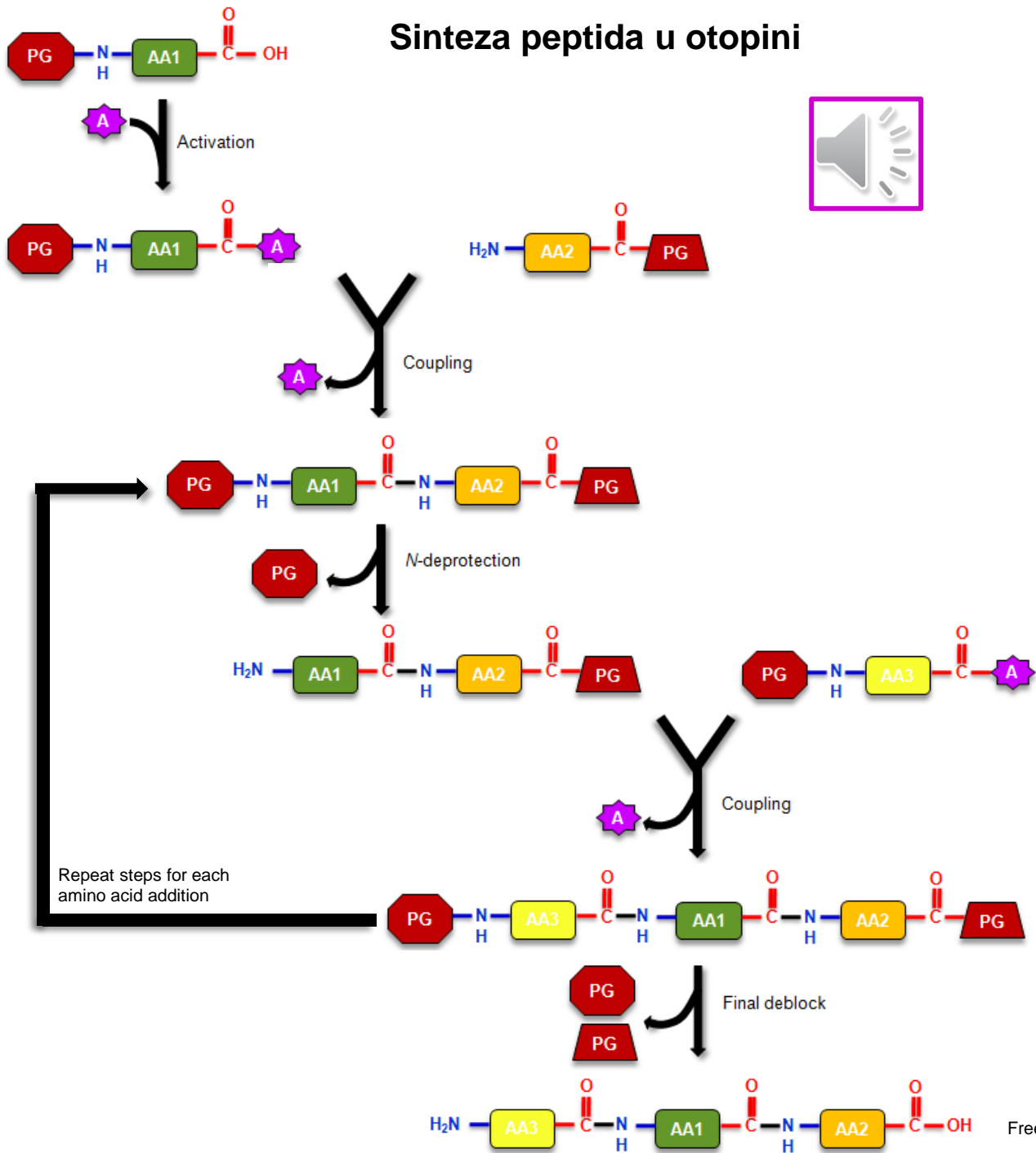
• zaštita amino-skupine provodi se prevođenjem u karbamate



- zaštita karboksilne skupine provodi se prevođenjem u estere



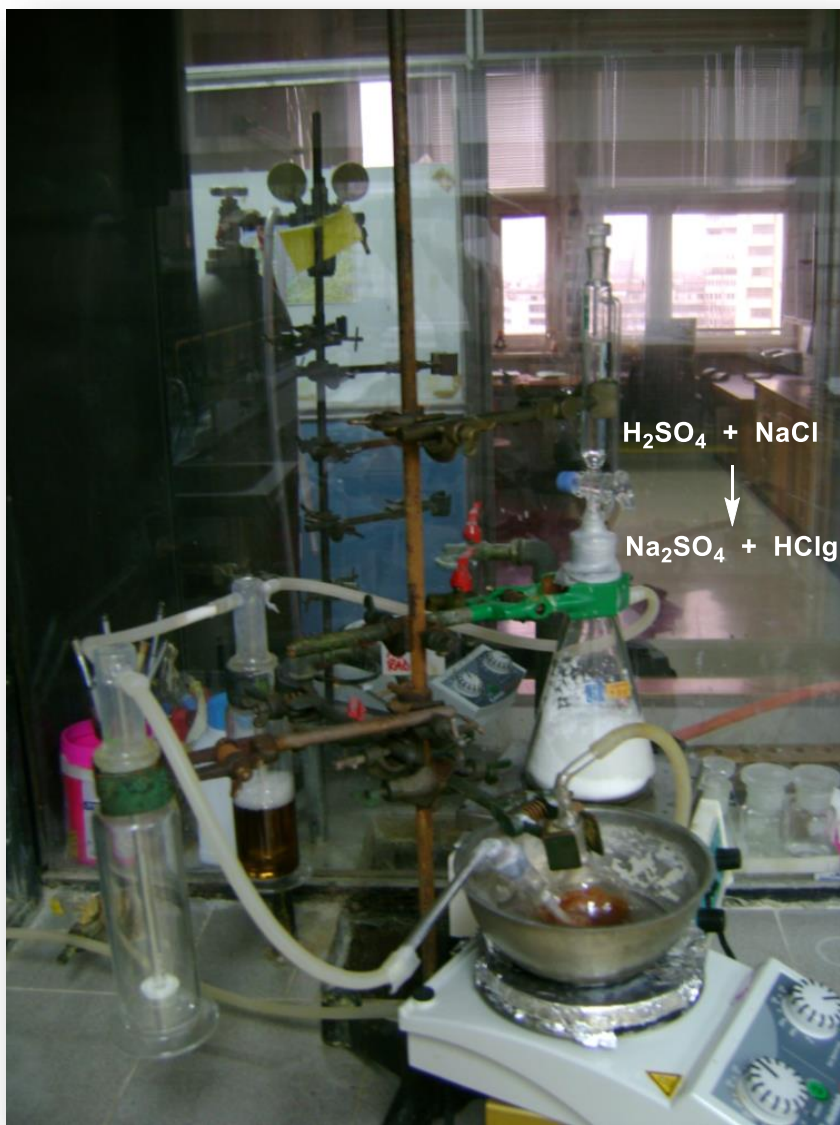
Sinteza peptida u otopini



- AA1 Amino acid 1
- AA2 Amino acid 2
- AA3 Amino acid 3
- PG N-protecting group
- PG C-protecting group
- A Activator

Repeat steps for each amino acid addition

Free peptide (Final Product)



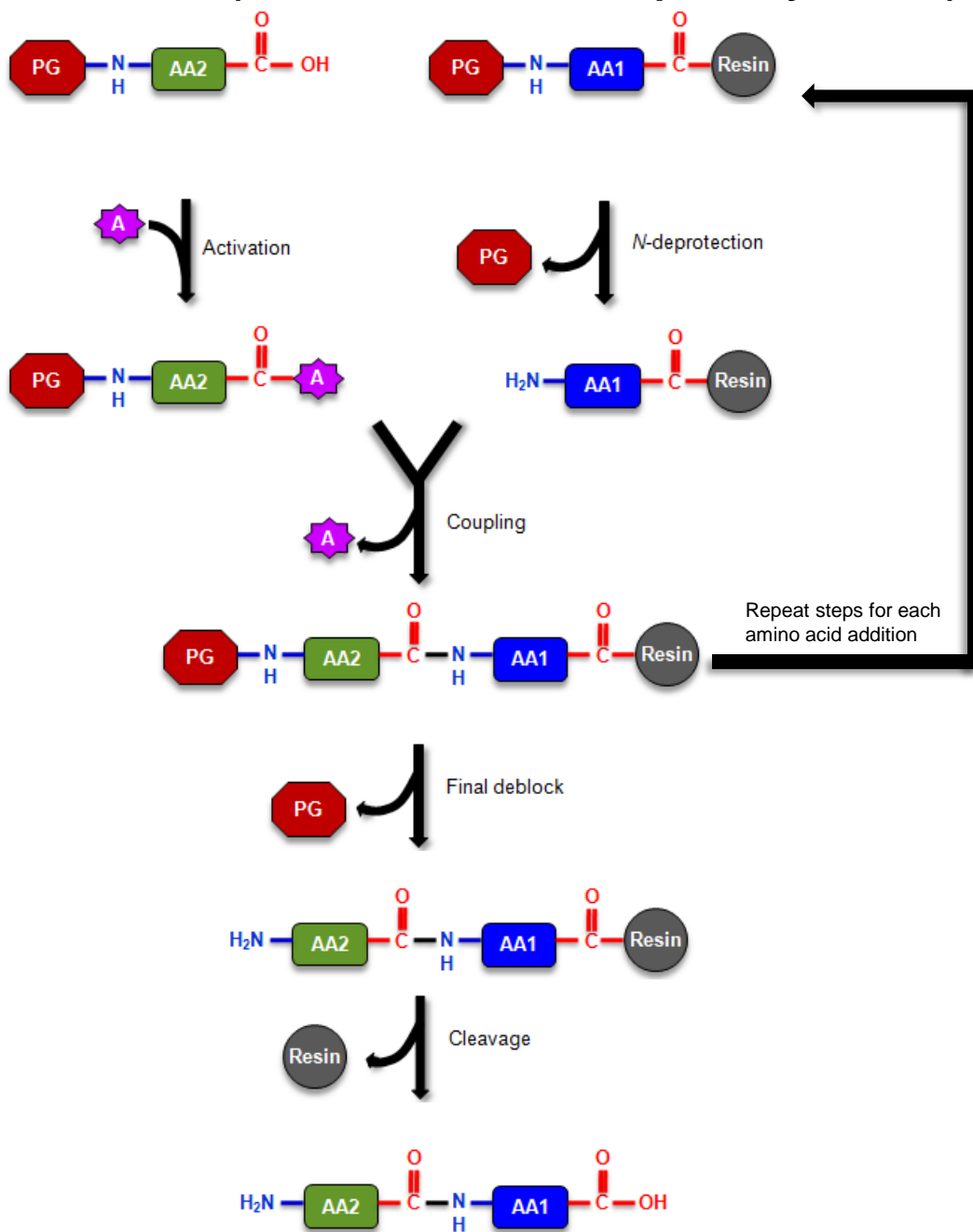
Aparatura za deprotekciju Boc-zaštitne skupine¹²⁶



Aparatura za sintezu peptida u otopini¹²⁶



Sinteza peptida na čvrstoj fazi (SPPS, Solid Phase Peptide Synthesis)



Sinteza peptida u otopini

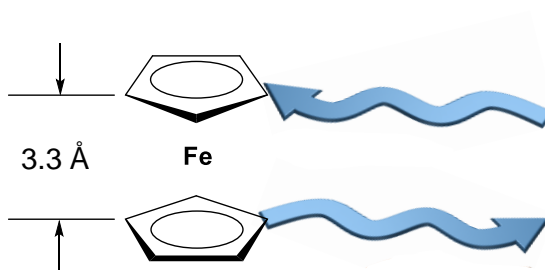
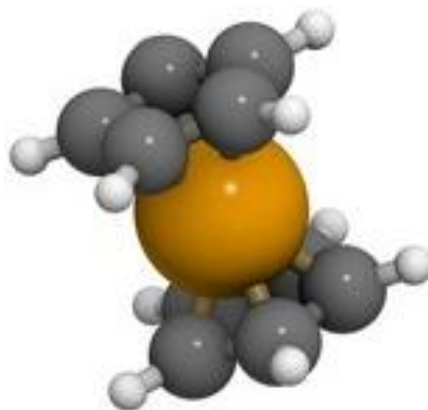
- sporo (pročišćavanje nakon svakog koraka)
- ručno
- 1 – 1,2 eq aminokiselina
i kopulacijskih reagenasa
- velika skala
- jeftino

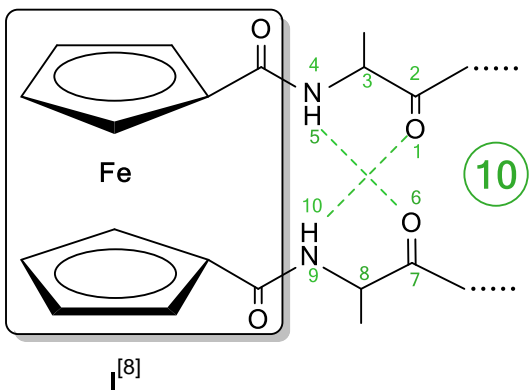
Sinteza peptida na čvrstoj fazi (SPPS)

- brzo (pročišćavanje na kraju)
- automatizirano (ili ručno)
- 3 – 10 eq aminokiselina
i kopulacijskih reagenasa
- mala skala
- skupo

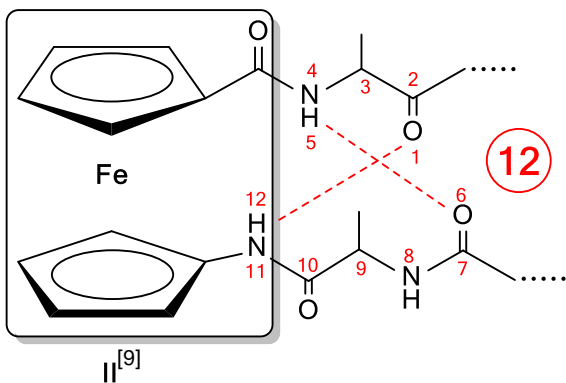


Konformacijska analiza i biološka evaluacija ferocenskih peptidomimetika

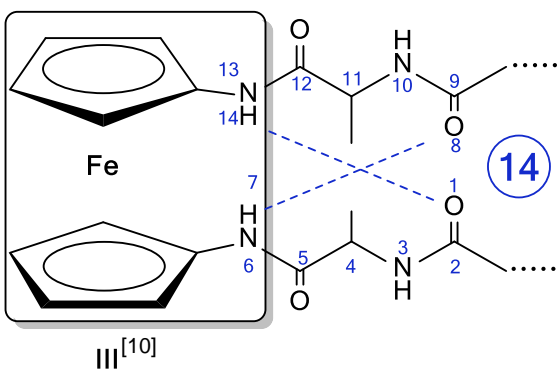




- [8] (a) T. Hirao et al, *Chem. Commun.*, 1998, 1963-1964.; (b) T. Hirao et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 68-75.; (c) T. Hirao et al, *Organometallics*, 2001, **20**, 1008-1013.; (d) T. Hirao et al, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 5265-5268.; (e) T. Hirao et al, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 31-34.; (f) T. Hirao et al, *J. Organomet. Chem.*, 2009, **694**, 806-811.; (g) T. Hirao et al, *Acc. Chem. Res.*, 2010, **43**, 1040-1051.



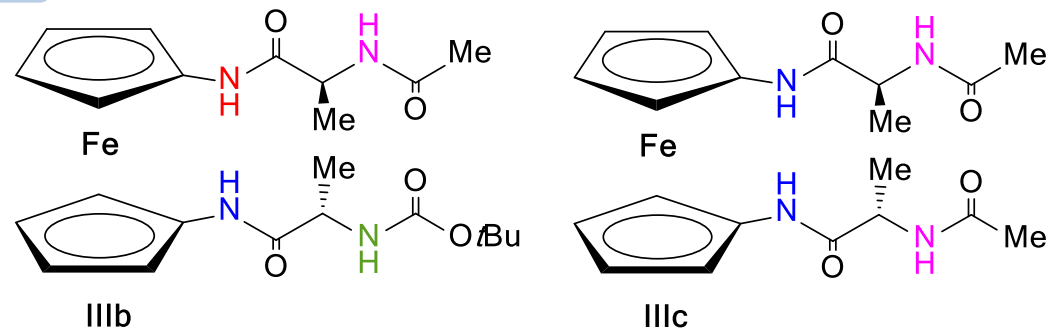
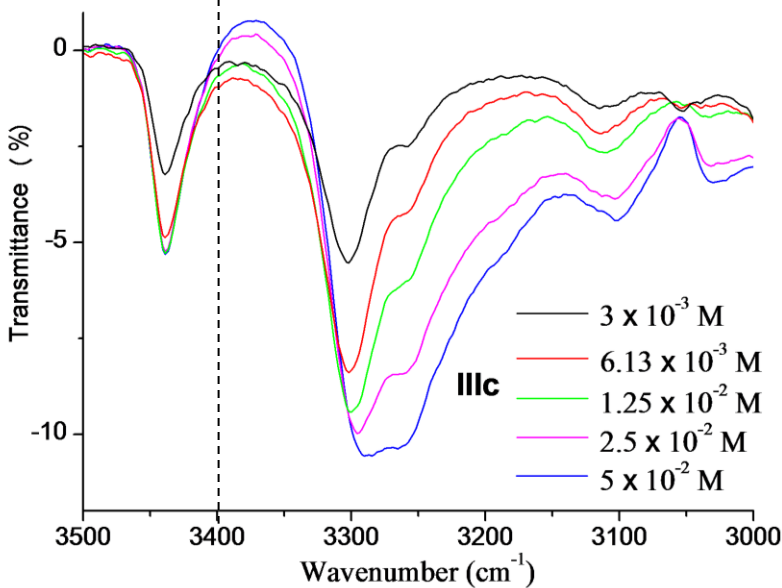
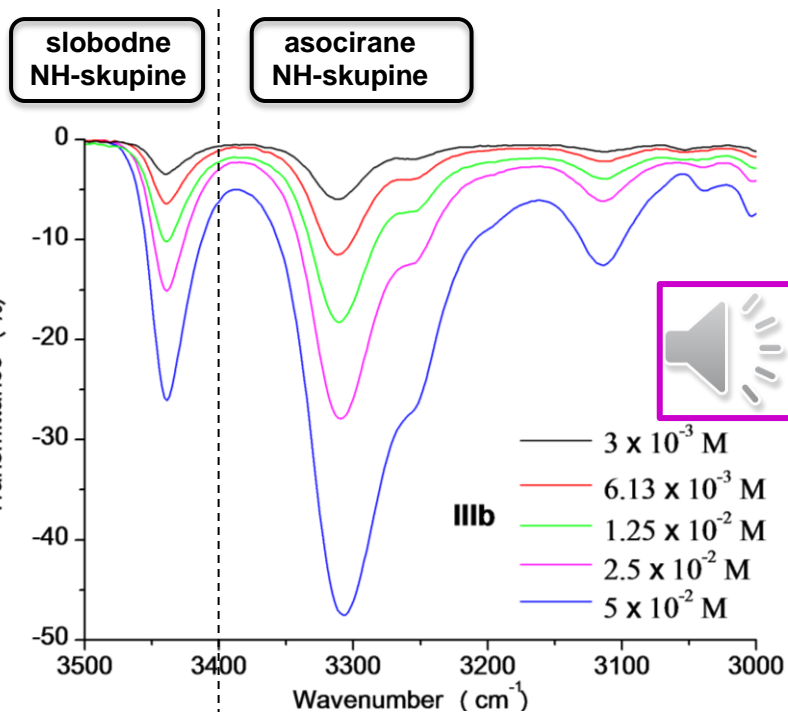
- [9] (a) L. Barišić et al, *Chem. Commun.*, 2004, 2004-2005.; (b) L. Barišić et al, *Chem. Eur. J.* 2006, **12**, 4965-4980.; (c) L. Barišić et al, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 4019-4021.; (d) V. Rapić et al, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, **14**, 2014-2024.; (e) V. Rapić et al, *Organometallics*, 2009, **28**, 2028-2037.; (f) V. Rapić et al, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, 1089-1097.; (g) L. Barišić et al, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2012, **11**, 1810-1822.; (h) L. Barišić et al, *Molecules*, 2014, **19**, 12852-12880.



- [10] (a) H.-B. Kraatz et al, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 3018-3023.; (b) L. Barišić et al, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 16405-16420.; (c) L. Barišić et al, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 1037-10395.



IR -spektroskopija



Nepromijenjen odnos intenziteta apsorpcijskih vrpce slobodnih i asociраних NH-skupina iz **IIIb** (1.8 : 1) nakon postupnog razrjeđivanja



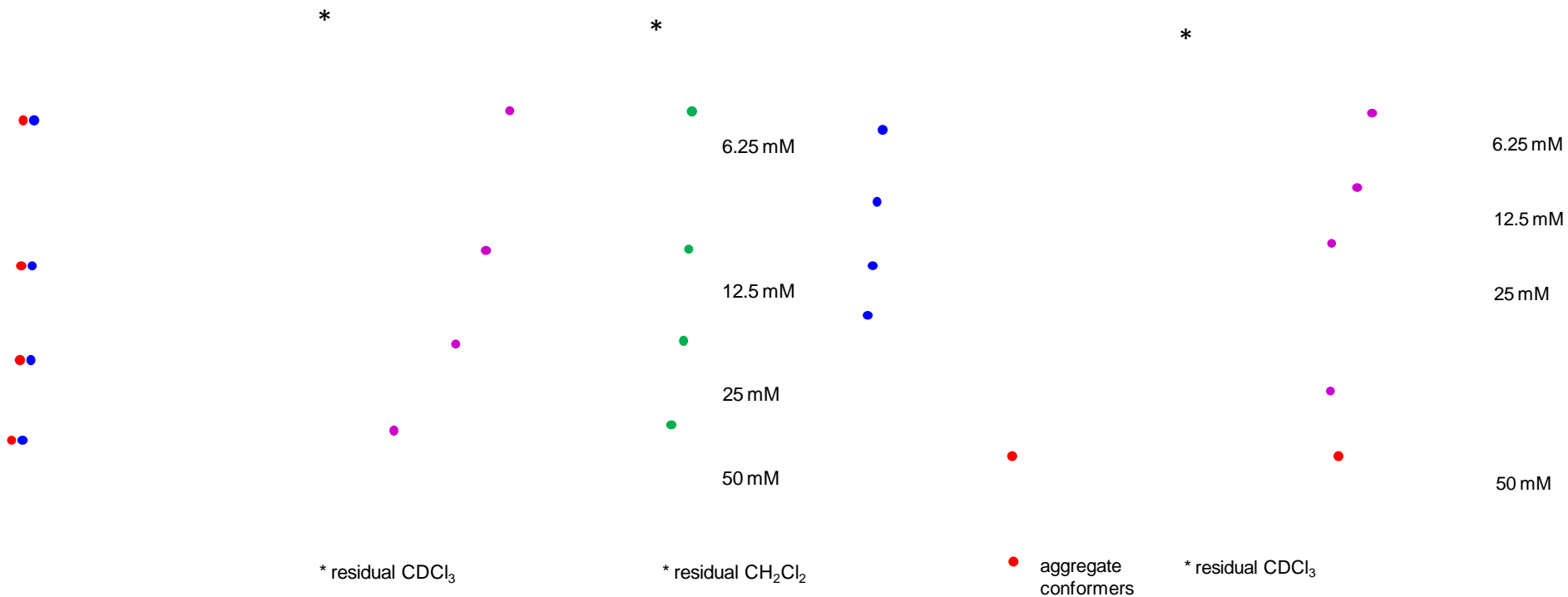
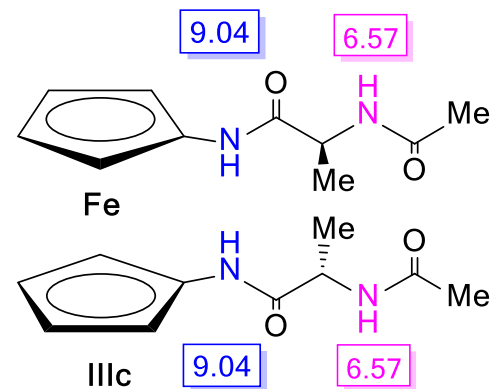
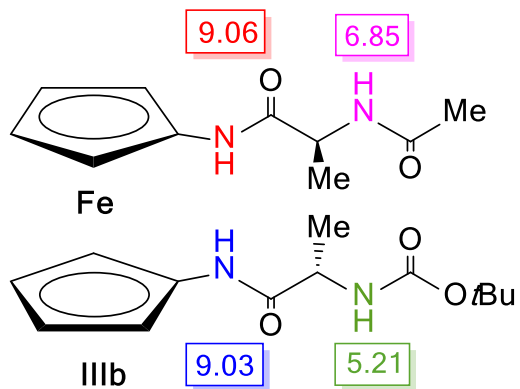
intramolekulske vodikove veze

Nepromijenjen intenzitet apsorpcijske vrpce slobodnih NH-skupina iz **IIIbc** nakon razrjeđenja od 5×10^{-2} M do 1.25×10^{-2} M, popraćen postupnim slabljenjem intenziteta apsorpcijskih vrpce asociраних NH-skupina



prisutnost intermolekulskih veza između susjednih molekula IIIc

NMR-spektroskopija



Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka NH-skupina u peptidima IIIb and IIIc



- Niske vrijednosti $\Delta\delta/\Delta T$ (-2.4 ± 0.5 ppb) odgovaraju i zaklonjenim i izloženim amidnim protonima

- Visoke temperaturne ovisnosti

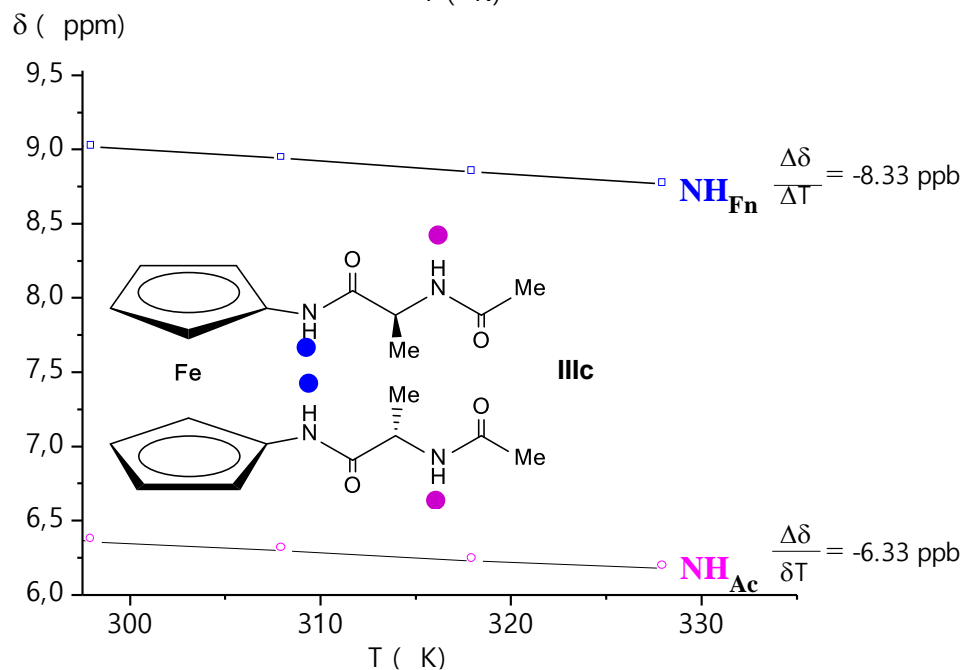
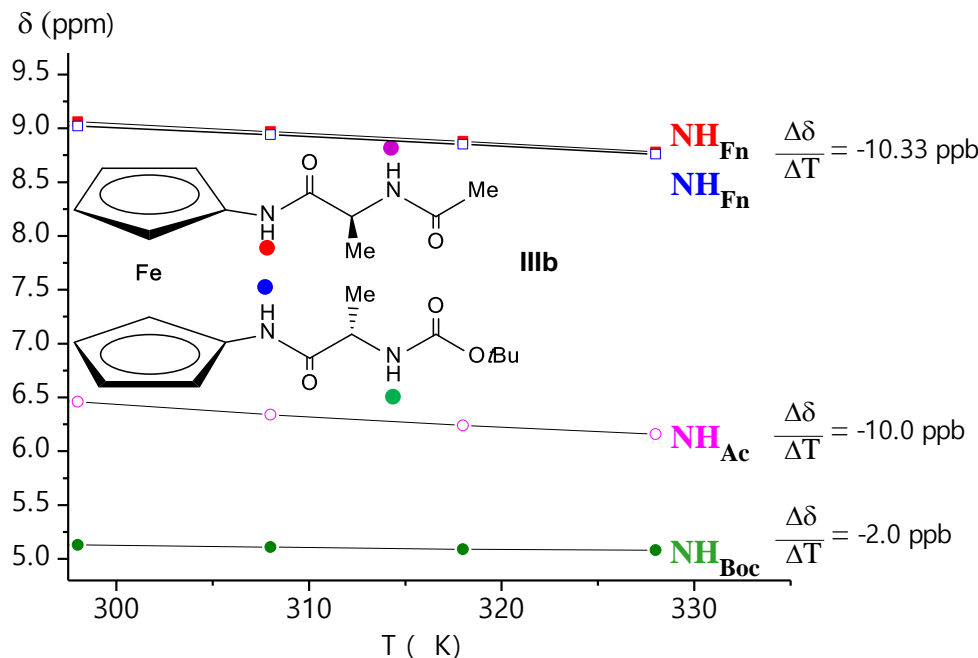


inicijalno zaklonjeni amidni protoni

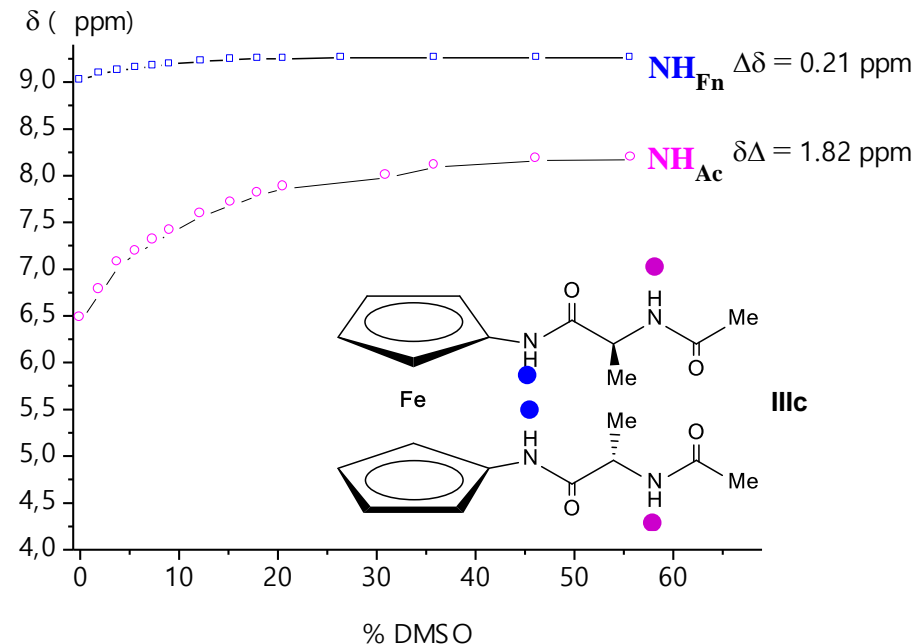
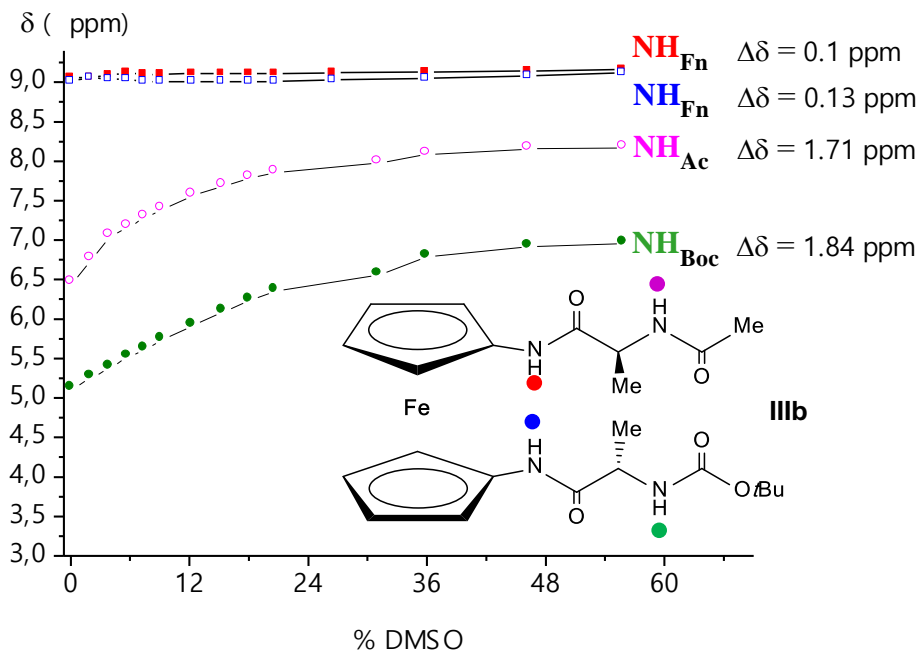


koji postaju izloženi otapalu nakon

- (i) disocijacije samo-asociranih agregata
- ili (ii) odmotavanja uređenih konformacija pri višim temperaturama

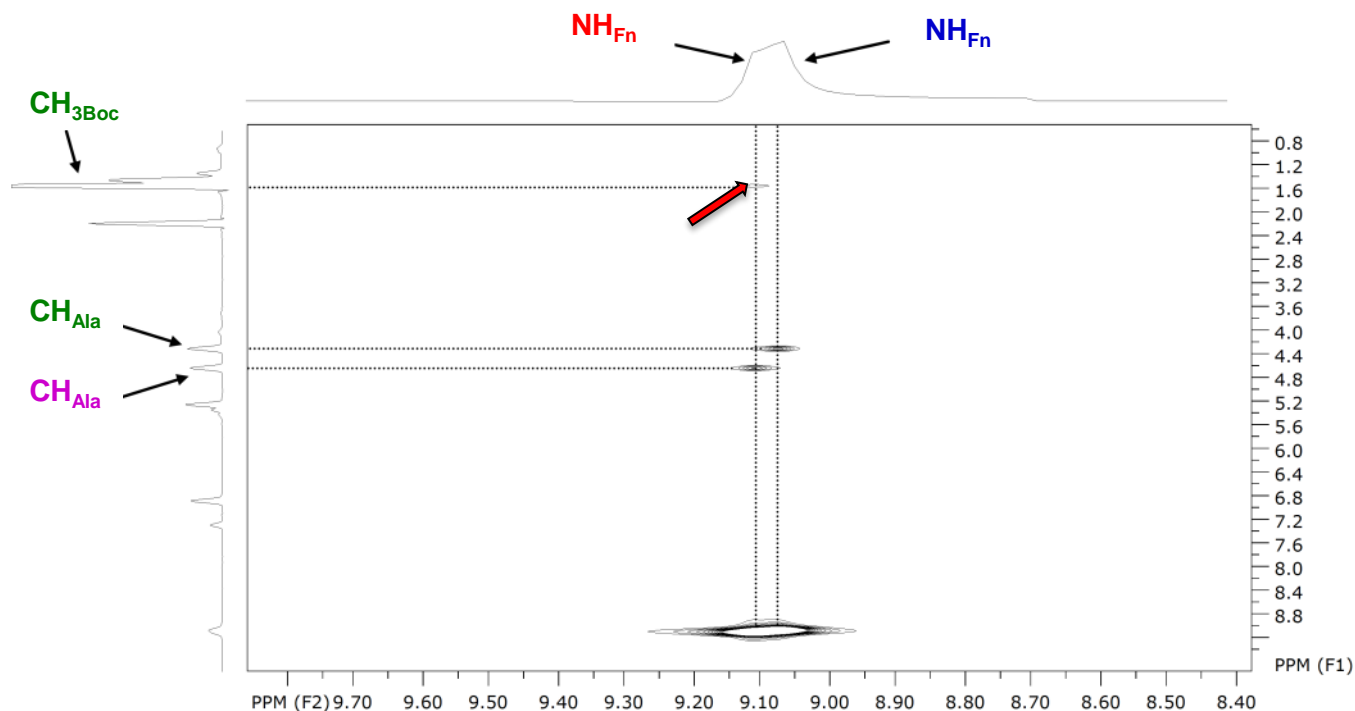
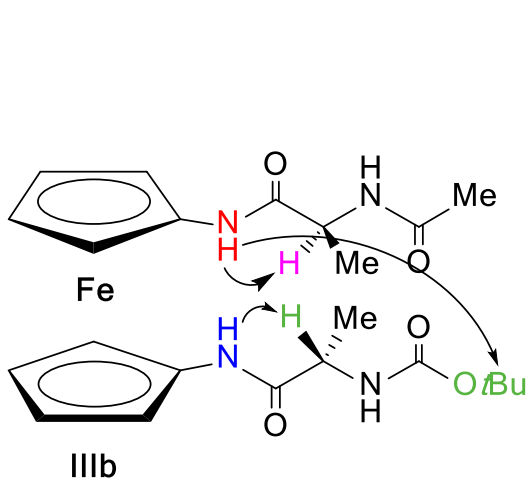
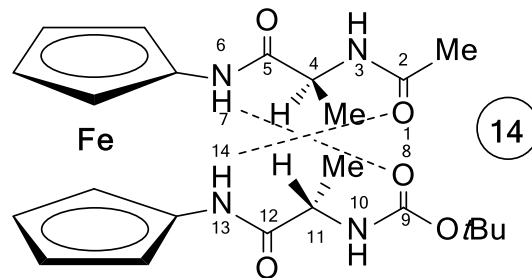


Ovisnost kemijskih pomaka NH-skupina u peptidima IIIb i IIIc o otapalu



- DMSO-neovisni kemijski pomaci amidnih protona $\text{NH}_{\text{Fn}}/\text{NH}_{\text{Fn}} \Rightarrow$ sudjelovanje u jakim intramolekulskim vodikovim vezama

- Značajna promjena kemijskih pomaka amidnih protona $\text{NH}_{\text{Boc}}/\text{NH}_{\text{Ac}} \Rightarrow$ slobodno stanje NH_{Boc} i sudjelovanje NH_{Ac} u slabim intermolekulskim vodikovim vezama

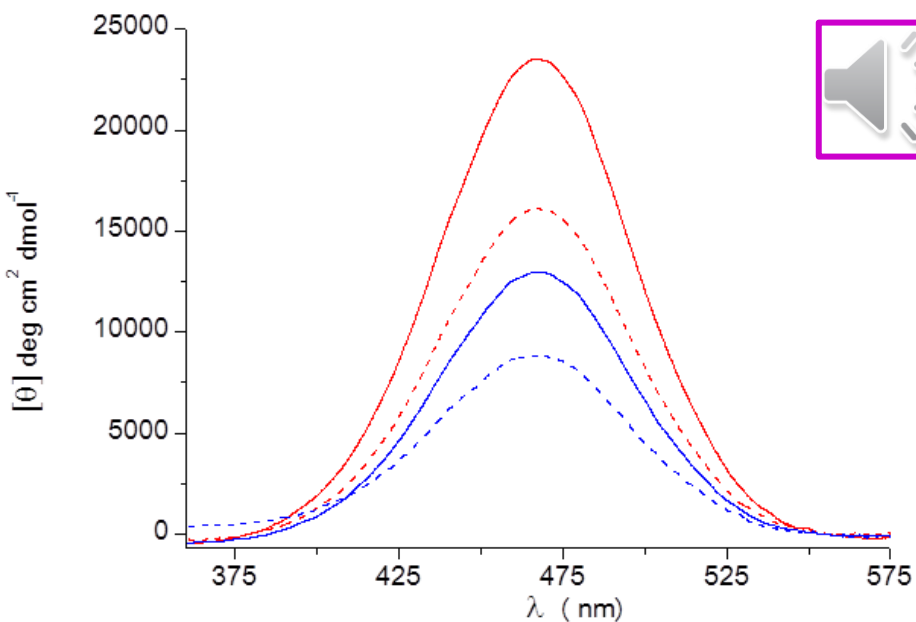
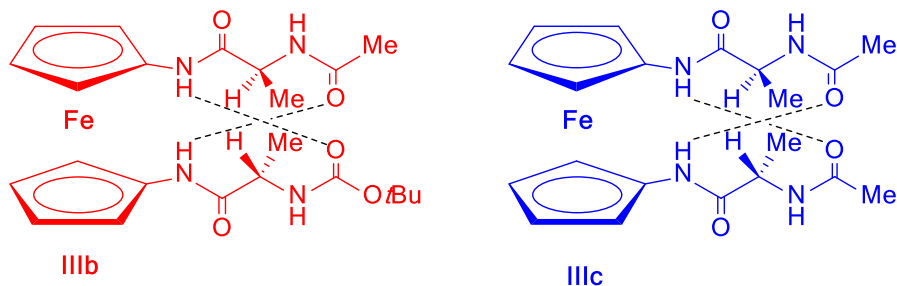


• **Jake intramolekulske vodikove veze** indicirane DMSO-neovisnim kemijskim pomacima amidnih protona $\text{NH}_{\text{Fn}}/\text{NH}_{\text{Fn}}$ + interlančani NOE kontakt između NH_{Fn} i tBu skupine



interlančana $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc/Ac}}$ vodikova veza

CD-spektroskopija



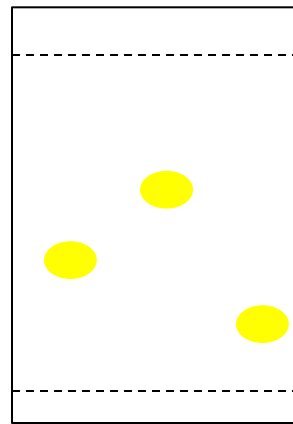
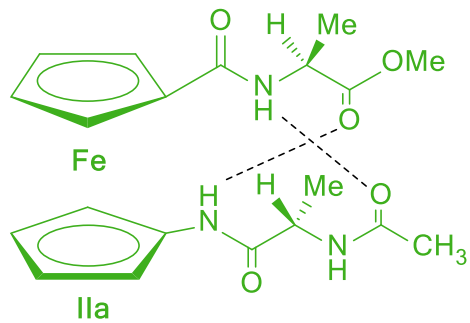
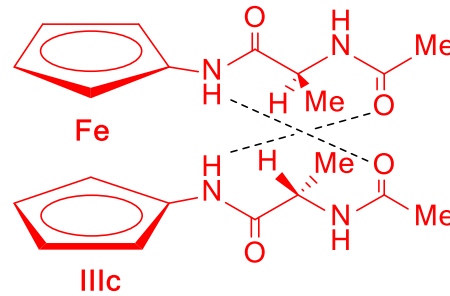
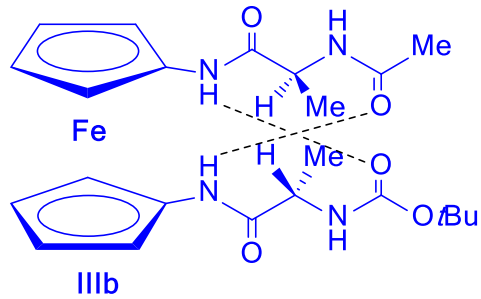
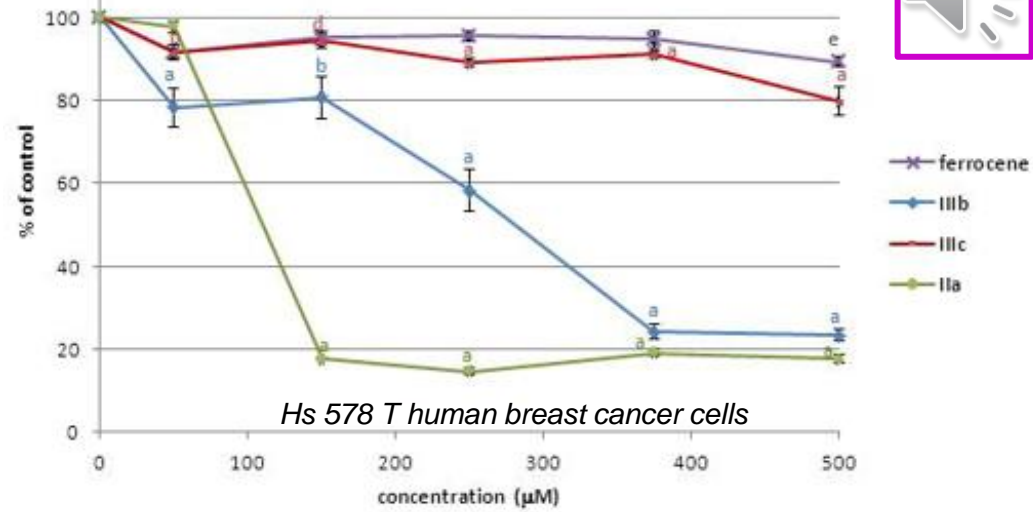
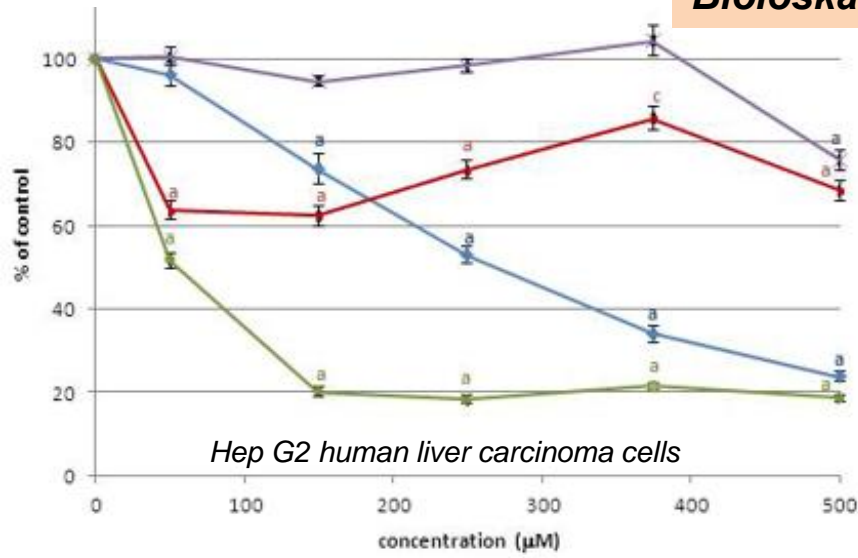
Cottonovi efekti u kiralno-organiziranim ferocenskim peptidima [CH_2Cl_2 ($c = 5 \times 10^{-3}$ M), (— IIIb, — IIIc)] i CH_2Cl_2 ($c = 5 \times 10^{-3}$ M) uz dodatak 20% DMSO (... IIIb, ... IIIc)]

- Opaženi jaki **Cottonovi efekti** u ferocenskom području, oko 470 nm
⇒ **visoko-organizirano kiralno uređenje oko ferocenske skupine inducirano intramolekulskim vodikovim vezama**

- Naglašena pozitivna CD-aktivnost peptida **IIIb and IIIc**
⇒ **dominacija P-heličnosti**

- Očuvanje ~70% CD-aktivnosti nakon dodatka DMSO
↓
prisutnost jakih intramolekulskih vodikovih veza

Biološka evaluacija



IIa IIIb IIIc

- Najvišu citotoksičnost pokazao je biokonjugat **IIa** stabiliziran 12-članim IHB-prstenom

- Povećana lipofilnost peptida **IIa** i **IIIb** u suporedbi s polarnijim peptidom **IIIc**
 ⇒ **poboljšana bioaktivnost.**