

# Peptidni mimetici: zašto i kako?

KUI 26/2004

Prispjelo 24. rujna, 2003.

Prihvaćeno 15. siječnja, 2004.

I. Jerić

Institut "Ruđer Bošković", P.P. 180, 10002 Zagreb

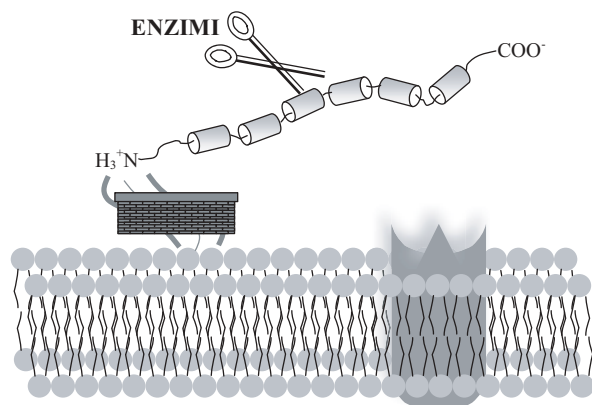
Peptidi i proteini su aktivni sudionici bioloških procesa, a poremećaji u njihovoj funkciji mogu dovesti do niza kroničnih ili infektivnih oboljenja. Međutim, peptidi kao terapeutici imaju vrlo ograničenu primjenu zbog svojih brojnih nepovoljnih svojstava. Nastojanja da se prevladaju ti nedostaci dovela su do razvoja heterogene skupine spojeva, koje ne povezuju identične ili srodne strukturne značajke, već zajednički "cilj", a to je oponašanje svojstava i funkcije peptida. Cilj je ovog rada dati okvirni pregled područja peptidomimetika, s naglaskom na temeljne principe i pristup dizajnu peptidomimetika. On uključuje jednostavne modifikacije aminokiselina i peptidne veze, ciklizacijske reakcije i na kraju daje primjere trenutačno aktualnih peptidomimetika s ugljikohidratnim strukturama i  $\beta$ -aminokiselinama.

Cljučne riječi: *Modificirani peptidi, peptidomimetici*

## Uvod: što nedostaje peptidima?

Peptidi i proteini su spojevi od velike važnosti za čitav niz imunoloških i neuroloških procesa. Djeluju kao neurotransmiteri, neuromodulatori, hormoni, antigeni, antibiotici, a poremećaji u njihovoj funkciji mogu dovesti do razvoja kroničnih ili infektivnih oboljenja. Prionske bolesti rezultat su promijenjene konformacije proteina, čime se mijenja njegova funkcija i on postaje infektivan poput virusa ili bakterije. Nadalje, razvoj Alzheimerove bolesti povezan je s formiranjem netopljivih fibrilnih nakupina  $\beta$ -amiloidnog peptida, koji je kod zdravih osoba prisutan u topljivom obliku. Kod autoimunih bolesti, kao što su multipla skleroza i reumatoidni artritis, dolazi do poremećaja u procesu prepoznavanja vlastitih proteina, koje onda imuni sustav napada kao strane molekule.

Unatoč aktivnom djelovanju u biološkim procesima, peptidi nisu pogodni za primjenu u terapijske svrhe. Razlog tome leži u čitavom spektru nepovoljnih farmaceutskih i biofarmaceutskih osobina peptida, kao što je shematski prikazano na slici 1. Zbog polarnog karaktera peptidi ne



Slika 1 – Problemi s kojima se susreću peptidi na putu do svog odredišta

Fig. 1 – Problems that peptides are faced with on a way to their destination

mogu prijeći staničnu membranu, pa time ni krvno-moždanu barijeru i brzo se uklanjaju iz organizma. Vrlo često peptidi ne stignu do svojih konačnih odredišta zbog djelovanja proteolitičkih enzima. Peptidi su vrlo fleksibilne molekule koje mogu zauzeti mnoštvo konformacija, što otežava njihovo vezanje na odgovarajuće receptore smještene na membrani stanica, koji zahtijevaju točno definiranu, tzv. "bioaktivnu konformaciju" peptida.

Svi ovi čimbenici utječu na prijenos peptida i u konačnosti na njegovu dostupnost u organizmu. Stoga se ulažu ogromni naponi u istraživanja koja bi trebala pronaći rješenje za sve gore navedene nedostatke peptida. Rezultati tih istraživanja doveli su do razvoja peptidomimetika, heterogene skupine spojeva kojima je zajedničko obilježje oponašanje fizikalnih i biokemijskih svojstva peptida.

## Čimbenici koji utječu na dostupnost peptida u organizmu

Poznavanje strukturnih karakteristika koje utječu na topljivost peptida, njegovu konformaciju, stabilnost i prijenos preko bioloških membrana prvi su korak u dizajnu peptidnih mimetika.<sup>1</sup> Čimbenici koji utječu na topljivost i stabilnost uglavnom su dobro izučeni. Za prijenos peptidnog lijeka potrebna je topljivost u vodi, što je u izravnoj vezi s njegovom polarnošću. Drugim riječima, loša topljivost peptida može se riješiti uvođenjem polarnih skupina i onih koje lako disociraju.

Mala stabilnost peptida rezultat je djelovanja peptidaza koje hidroliziraju peptidnu vezu na različitim mjestima u peptidnom lancu. Razlikujemo egzo-peptidaze koje hidroliziraju peptide počevši od amino ili karboksilnog kraja i endo-peptidaze koje hidroliziraju amidnu vezu unutar peptidnog lanca. Zaštita terminalnih amino i karboksilnih skupina može očuvati peptid od djelovanja egzo-peptidaza. Zaštita od endo-peptidaza može se postići modifikacijom određenih peptidnih veza ili uvođenjem D-aminokiselina. Međutim, treba imati na umu i mogućnost da takva modifikacija naruši primarnu funkciju peptida.

Vežanje peptida na receptor zahtijeva određenu konformaciju, koja je najčešće samo jedna od stotina koje peptid može zauzeti. Uvođenje strukturnih elemenata koji mogu ograničiti fleksibilnost peptida i "zarobiti" ga u biološki aktivnoj konformaciji put je prema povećanoj aktivnosti i selektivnosti za određeni tip receptora.

Faktori koji utječu na prijenos peptida preko bioloških membrana bitno su složeniji. Za peptidne lijekove postoje dvije osnovne prepreke; intestinalna barijera koja ograničava oralnu uporabu lijekova i krvno-moždana barijera koja sprječava prolaz u središnji živčani sustav. Te dvije barijere su biokemijske i fizičke prirode. Lučenje hidrolitičkih enzima prva je zapreka prolazu peptida, što čini biokemijsku barijeru, a fizička barijera proizlazi iz strukturnih karakteristika membrane. Transcelularni prijenos tvari preko membrana može se odvijati: (a) pasivnom difuzijom, (b) difuzijom potpomognutom P-glikoproteinima ili (c) prijenosom pomoću molekula prenosioaca. Za peptide je najkarakterističnija pasivna difuzija (za spojeve s odgovarajućim fizikalno-kemijskim značajkama, kao što su veličina, naboj, lipofilnost, sposobnost stvaranja vodikovih veza) i aktivni prijenos (za spojeve koje prepoznaju molekule prenosioci). Jasno je dakle, u kojem smjeru treba ići modifikacija peptida; prilagoditi svojstava za pasivnu difuziju ili prilagoditi strukturu za aktivni prijenos.

## Dizajn peptidomimetika

### Uvod

Razvoj peptidnih mimetika je brzo rastuće i vrlo aktivno područje kemije, za koje ne postoji jedinstven pristup kao ni odgovarajuća podjela spojeva. Mogu se razmatrati modifikacije koje imaju cilj utjecati na jedan od čimbenika važnih za bolju dostupnost peptida; međutim, u pravilu jedna modifikacija utječe na više čimbenika istodobno. U ovom pregledu odabran je, uvjetno rečeno, "kemijski pristup" koji obrađuje pojedine srodne skupine spojeva. On pokriva relativno jednostavne modifikacije aminokiselina ili peptidne veze, preko ciklizacija i drugih zahvata u konformaciju peptida, pa do mimetika koji sadrže nepeptidne strukturne elemente. U ovom je trenutku bitno naglasiti razliku između modificiranih peptida i peptidomimetika.

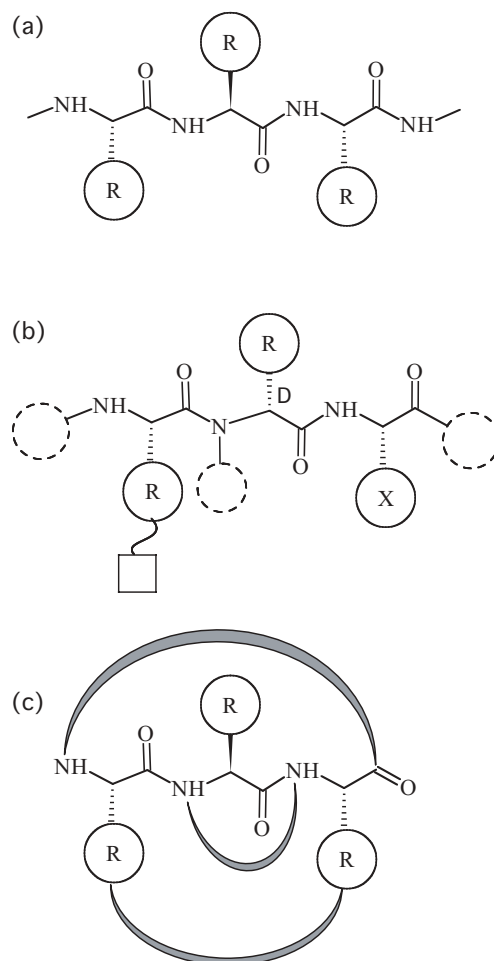
**Modificirani peptidi** definiraju se kao peptidi kojima je u osnovi aminokiselinski slijed ostao sačuvan, ali peptid sadrži npr. neprirodne aminokiseline, modificirane cisteinske ostatke ili fosforilirane aminokiseline.<sup>2</sup> **Peptidomimetici** su pak spojevi koji imitiraju strukturu i/ili biološki učinak peptida neovisno o kemijskoj strukturi. Jasno je da u modificiranim peptidima treba tražiti početke peptidne mimetike, pa će shodno tome u ovom pregledu biti navedeni i primjeri modifikacije peptida.

### Jednostavne modifikacije peptida

Fizikalna i kemijska svojstva peptida i proteina određena su prirodom aminokiselina, njihovih bočnih ogranaka kao i samim poliamidnim peptidnim lancem. Dvadeset primarnih aminokiselina mogu se općenito podijeliti u hidrofobne i hidrofilne, po prirodi njihovih bočnih lanaca. Hidrofilne

aminokiseline mogu nadalje biti s neutralnim polarnim bočnim lancem, pozitivno ili negativno nabijenim. Neke aminokiseline se enzimski modificiraju nakon ugradnje u proteine, pa nastaju nove aminokiseline; *trans*-4-hidroksiprolin (Hyp), koju nalazimo u kolagenu i  $\gamma$ -karboksiglutaminska kiselina (Gla), koju nalazimo u proteinima uključenim u koagulaciju. Nadalje, hidroksilne skupine tirozina, serina i treonina mogu biti reverzibilno fosforilirane djelovanjem kinaza i fosfataza, čime se regulira biološka aktivnost proteina.<sup>3</sup> Dvije aminokiseline, cistein i prolin imaju specifične strukturne karakteristike, što utječe na formiranje sekundarne strukture peptida i proteina. Uvid u karakteristike osnovnih aminokiselina i načine na koje se priroda poigrava s njihovom strukturom bili su putokaz prema prvim peptidnim modifikacijama.

Najjednostavniji način da se utječe na svojstva peptida je supstitucija funkcionalnih skupina u bočnim lancima aminokiselina, zamjena osnovne nekom neprirodnom aminokiselinom ili promjena kiralnosti na jednom centru ugradnjom D-aminokiseline, (slika 2b). Time se utječe na hidrofilnost/lipofilnost peptida, a ugradnja D-aminokiseline može povećati i stabilnost peptida. Zaštita od egzopeptidaza može se postići uvođenjem maskirajućih skupina na



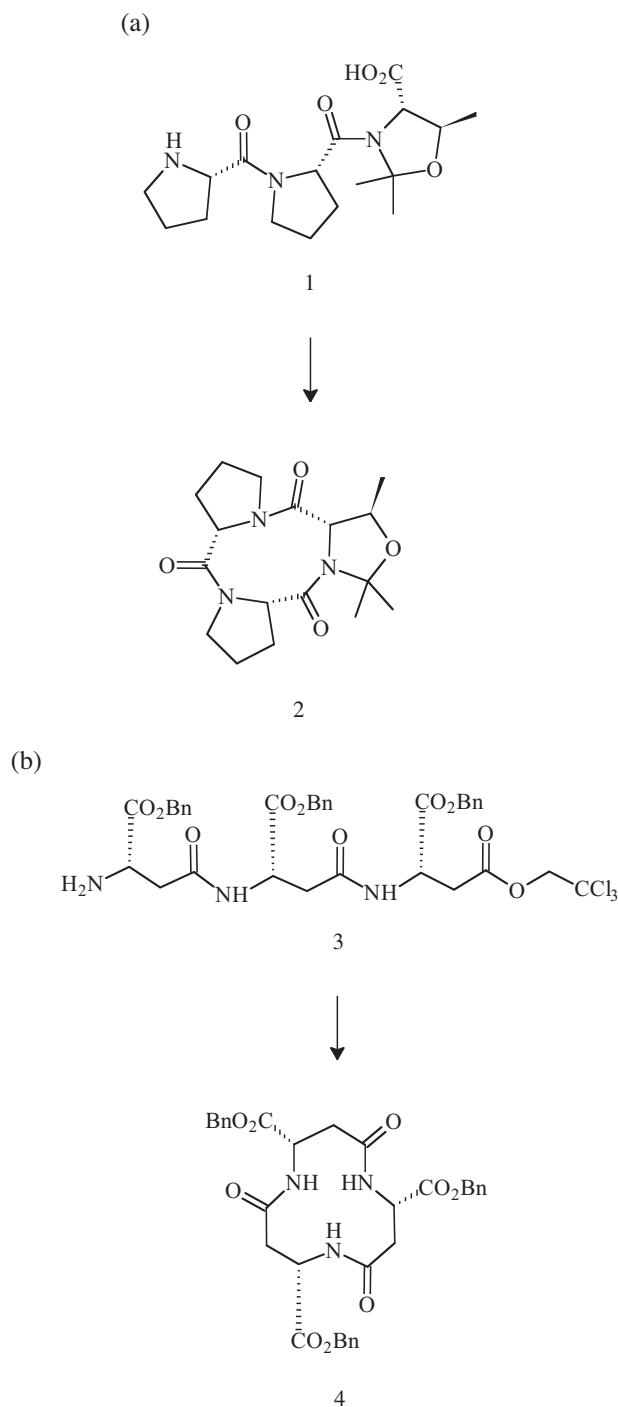
Slika 2 – (a) Struktura peptida; (b) modifikacije aminokiselina; (c) ciklizacije peptida

Fig. 2 – (a) Peptide structure; (b) amino acid modifications; (c) peptide cyclization

amino, odnosno karboksilni kraj peptida, čime se također utječe na njegovu polarnost. Supstitucijom amidnog vodika nekom alkilnom skupinom gubi se donor vodikove veze i na taj način utječe na konformaciju peptida. Nadalje, *N*-alkilacija može značiti povećanu stabilnost prema proteolitičkim enzimima i utječe na polarnost molekule.

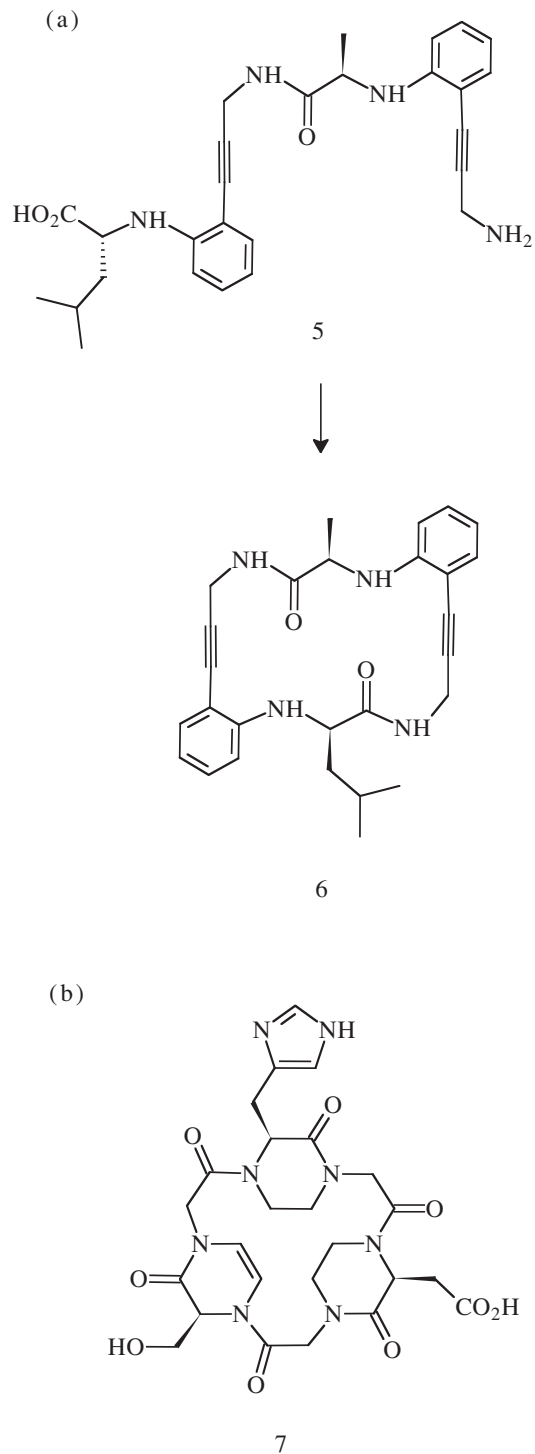
### Ciklički derivati peptida i peptidomimetika

Ciklički peptidi predstavljaju interesantno područje kako za sintetske kemičare tako i za biologe. Cikličke peptide



Slika 3 – Primjeri ciklizacije peptida i peptidomimetika  
Fig. 3 – Examples of peptide and peptidomimetic cyclization

nalazimo u nizu prirodnih bioaktivnih metabolita i obično su *in vivo* mnogo stabilniji nego njihovi linearni analozi, pa ciklički analozi peptida, (slika 2c), predstavljaju potencijalne terapeutike.<sup>4</sup> Ciklizacija peptida vrlo je često neželjena sporedna reakcija u sintezi linearnih peptida. Diketopiperazini (DKP), produkti “glava → rep” ciklizacije predstavljaju upravo su takav primjer. Međutim, unatoč



Slika 4 – (a) Primjer mimetika  $\beta$ -ploče; (b) mimetik aktivnog mjesta enzima

Fig. 4 – (a) Example of  $\beta$ -sheet mimetic; (b) enzyme active-site - mimetic

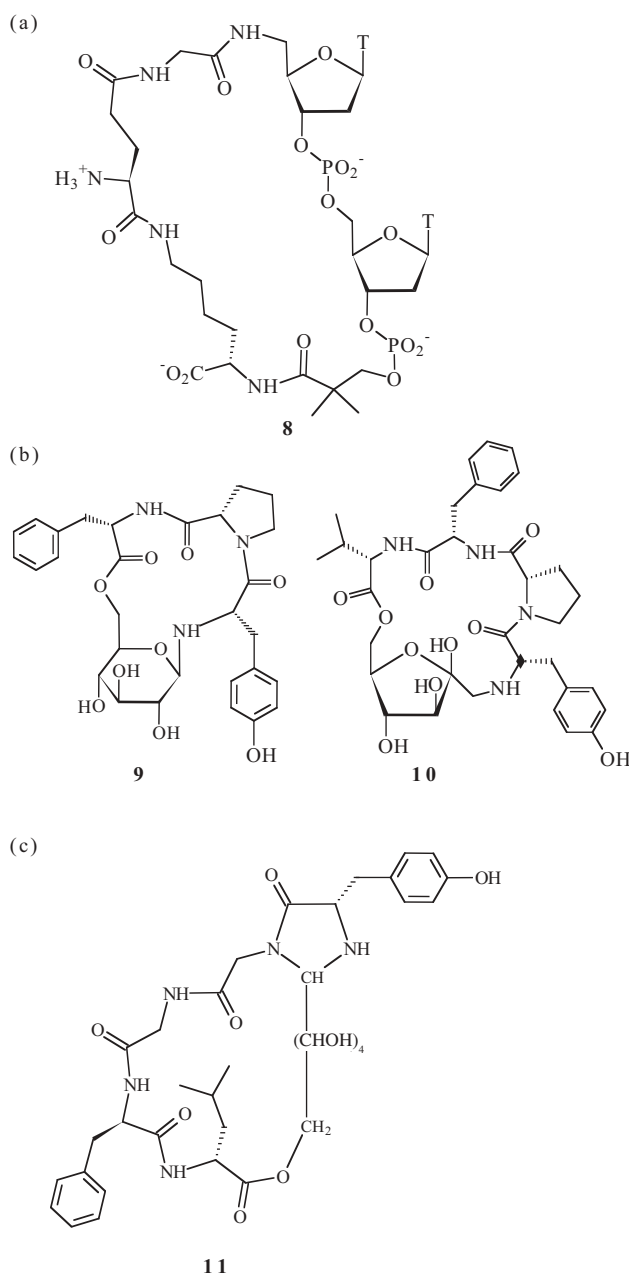
tome DKP su izborili vrlo važno mjesto kao gradivni blokovi u kombinatornom pristupu sintezi potencijalnih terapeutika i za sintezu konformacijski ukrućenih biološki aktivnih cikličkih spojeva. Povezivanje amino i karboksilnog kraja peptida važno je i za formiranje makrocikličkih prstenova. Prilično impresivan primjer prikazan je na slici 3a; dobivanje cikličkog analoga **2** iz modificiranog tripeptida **1**, koji sadrži pseudoprolinski ostatak.<sup>5</sup> Nadalje, vrlo interesantna je i ciklizacija  $\beta$ -peptidnih mimetika (o kojima će biti riječi dalje u tekstu), takav primjer je prikazan na slici 3b.

Ciklički analozi peptida i peptidomimetika služe i kao modeli za različite proteinske strukturne motive. "Glava  $\rightarrow$  rep" ciklizacija peptidomimetika **5** daje spoj **6** koji oponaša strukturu  $\beta$ -ploče, (slika 4a).<sup>6</sup> Ostale metode za stabilizaciju proteinskih struktura uključuju korištenje steroidnih derivata koji potiču formiranje  $\beta$ - i  $\gamma$ -petlje,<sup>7</sup> korištenje mostova među bočnim lancima za stabilizaciju  $\alpha$ -uzvojnice<sup>8</sup> ili tricikličkih peptidomimetika za HLH (eng. *helix-loop-helix*) motiv.<sup>9</sup> Ovo područje je posebno važno za izučavanje funkcije enzima. Tako ciklički peptidomimetici koji sadrže piperazin-2-on strukturu (**7**), (slika 4b), oponašaju aktivno mjesto lipaza i ubrzavaju hidrolizu 4-nitrofenilacetata.<sup>10</sup>

Ciklizacija peptida ili peptidomimetika koja uključuje molekulu šećera prilično je nov, ali obećavajući pristup na ovom području. Razvoj peptidnih nukleinskih kiselina<sup>11</sup> (PNA; eng. *peptide nucleic acid*) kao oligonukleotidnih analoga doveo je do saznanja da se određene PNA mogu vrlo uspješno ciklizirati. Jedan od takvih primjera je ciklički adukt **8**, (slika 5a), gdje je moguće mijenjati broj nukleotida kao i aminokiselinskih jedinica. Dokazano je da peptidni dio molekule pridonosi stabilnosti makrocikličkog prstena; djelovanjem nukleaze S1 i fosfodiesteraze iz zmijskog otrova ne dolazi do nukleolitičkog cijepanja.<sup>12</sup>

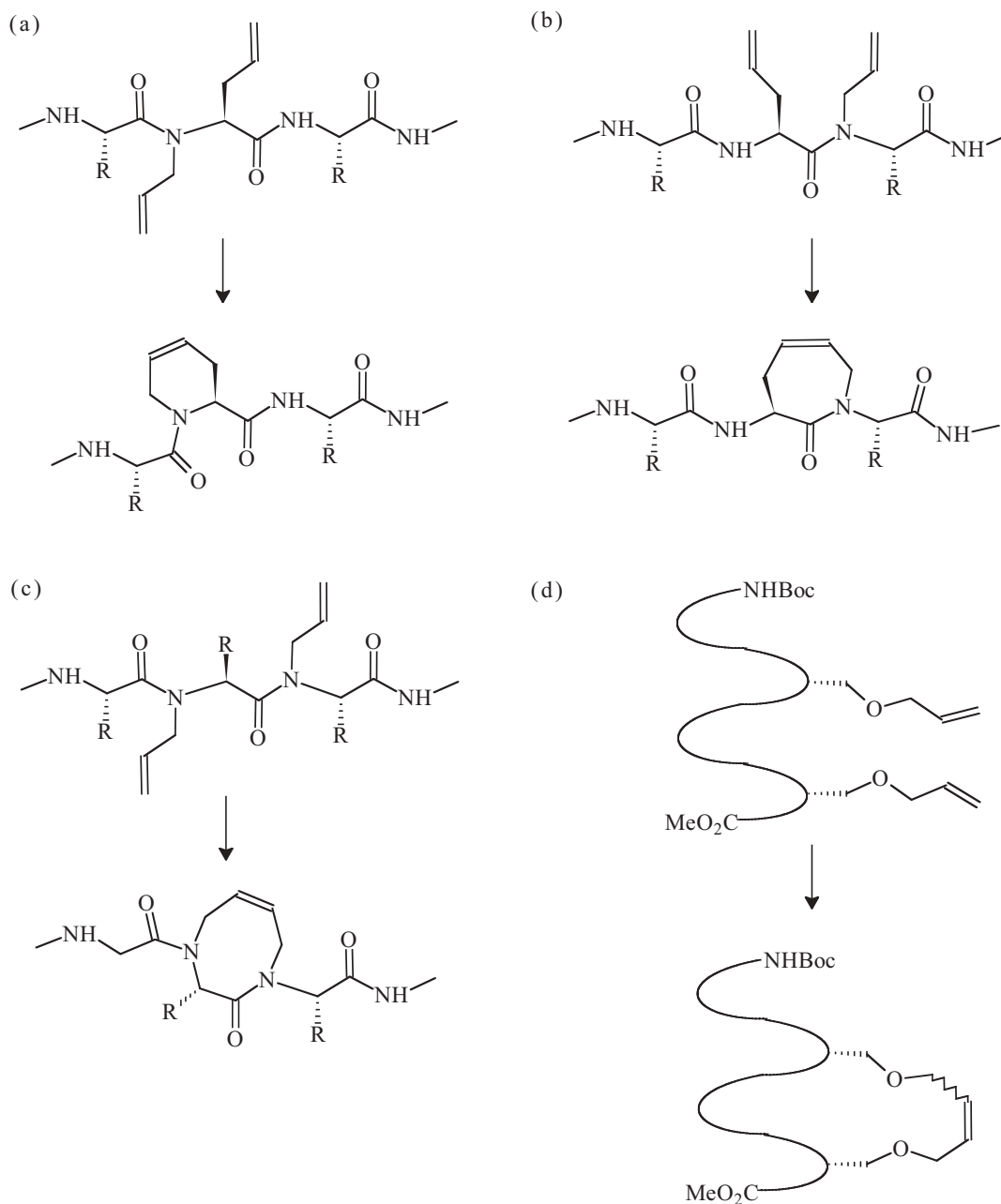
Interesantan primjer cikličkih šećer-peptid adukata prikazan je na slici 5b, gdje molekula D-glukoze (u spoju **9**), odnosno D-fruktoze (u spoju **10**) služi kao most koji povezuje amino i karboksilni kraj peptidnog dijela molekule.<sup>13</sup> Osnovno svojstvo takvih spojeva je triciklička struktura koja pridonosi nekim interesantnim konformacijskim značajkama.<sup>14</sup> Također inovativan pristup pripravi cikličkih šećer-peptid adukata je onaj koji uključuje imidazolidinonsku strukturu. Spoj **11** na slici 5c dobiven je intramolekulskom ciklizacijom šećer-peptid estera, a imidazolidinonski prsten uključuje C1 atom šećera i četiri atoma iz N-terminalnog dijela peptidnog lanca.<sup>15</sup>

Metateza olefina je specifična reakcija u kojoj se nezasićena C–C veza pregrađuje uz odgovarajući katalizator.<sup>16</sup> Reakcija se može odvijati intramolekulski uz otvaranje ili zatvaranje prstena i intermolekulski. Metateza zatvaranja prstena, (RCM; engl. *ring-closing metathesis*) pokazala se kao pogodna metoda za pripremu konformacijski (pre)definiranih cikličkih analoga peptida, što je od velike važnosti ako se ima na umu da je sekundarna struktura vrlo važna za aktivnost i selektivnost liganda. Osim toga, metabolička stabilnost C–C veze čini RCM dodatno atraktivnom metodom. RCM je uspješno primjenjena za pripremu prstenova različite veličine, što ovisi ponajprije o mjestu uvođenja alilne skupine, (slika 6). Alilne skupine smještene na amidni i C $\alpha$  atom jedne aminokiseline daju 6-članu cikličku strukturu, (slika 6a), dok smještene na atome susjednih aminokiseline daju 7-članu prsten, (slika 6b).<sup>17</sup> Pristup koji uključuje samo N-alkilaciju, bez zadiranja u kiralne centre otvara mogućnost pripreme peptidomimetika različite veličine prstena, (slika 6c).<sup>18</sup> Interesantan je i primjer shematski prikazan na slici 6d; derivatizacija bočnih lanaca serina i homoserina u O-alilne etere primijenjena je za (i, i+4) ciklizaciju u 21-, odnosno 23-članu makrociklički prsten, koji pridonosi stabilizaciji peptidomimetika u strukturi uzvojnice.<sup>19</sup>



Slika 5 – Primjeri cikličkih derivata: (a) peptida i nukleinskih kiselina; (b, c) peptida i šećera

Fig. 5 – Examples of cyclic derivatives of: (a) peptide and nucleic acids; (b, c) peptide and sugar



Slika 6 – Priprava cikličkih peptidomimetika uporabom RCM

Fig. 6 – Synthesis of cyclic peptidomimetics using RCM

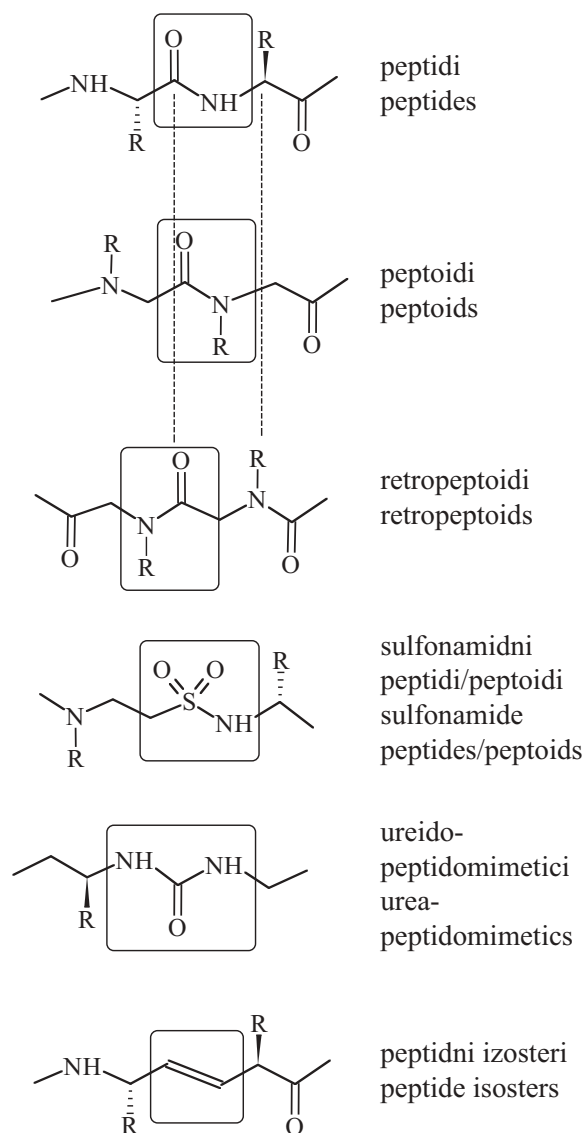
### Modifikacije peptidne veze

Hidroliza peptidne veze jedan je od ključnih nedostataka peptida. Istraživanja provedena radi prevladavanja tog problema rezultirala su nizom peptidomimetika koji pokazuju znatno poboljšana svojstva u odnosu na peptide.

Ako se bočni lanci aminokiselina "pomaknu" s C $\alpha$  atoma na amidne dušikove atome peptidnih veza, dobivaju se peptoidi,<sup>20</sup> koji su zapravo polimeri građeni od *N*-alkiliranih glicinskih monomera, (slika 7). Ako se pritom još zamijene mjesta karbonilne skupine i amidnog dušika u peptidnoj vezi, tj. okrene smjer peptida C-terminus  $\rightarrow$  N-terminus, dobivaju se retropeptoidi (slika 7).<sup>21</sup>

Promjene u fizikalnim i kemijskim svojstvima ovih peptidomimetika relativno je lako predvidjeti. Gubitak amidnog vodika, koji često sudjeluje u vodikovim vezama, ima za posljedicu smanjenu topljivost u polarnim otapalima. Nadalje, tercijarna amidna veza podložna je *cis/trans* izomerizaciji, pa otopine ovih peptidomimetika sadrže smjesu konformera. Biološku aktivnost, međutim, mnogo je teže predvidjeti. Istraživanja su pokazala da brojni peptidomimetici ovog tipa pokazuju povećanu aktivnost,<sup>22</sup> što vjerojatno proizlazi iz povećane otpornosti prema proteolitičkom cijepanju, kao rezultat prisustva tercijarne amidne veze i gubitka kiralnih centara u molekuli. Nadalje, veća aktivnost retropeptoida u usporedbi s peptoidima je naj-





Slika 7 – Primjeri peptidomimetika s promijenjenom amidnom vezom

Fig. 7 – Examples of peptidomimetics with modified amide bond

vjerojatnije posljedica relativne orijentacije karbonilne skupine i bočnog lanca aminokiseline koja je identična onoj u peptidima, ali je narušena u peptoidima, (slika 7).

Analozi prijelaznog stanja hidrolize amidne veze od izuzetne su važnosti u sintezi inhibitora enzima<sup>23</sup> i razvoju katalitičkih antitijela.<sup>24</sup> Sulfonamidna skupina zbog svojih steričkih i elektronskih svojstava prilično uspješno oponaša prijelazno stanje hidrolize peptidne veze,<sup>25</sup> pa je primijenjena u sintezi peptidomimetika.<sup>26</sup> Dokazano je da zamjena amidne veze sulfonamidnom skupinom povećava stabilnost peptida prema proteazama, a također utječe i na stabilnost susjedne amidne veze.<sup>27</sup>

Uvođenje ureido-skupine kao zamjene za amidnu vezu rezultira brojnim prednostima ureido-peptidomimetika.<sup>28</sup> Kao i kod ostalih primjera, ovakvi peptidomimetici bitno su manje osjetljivi na djelovanje proteolitičkih enzima. Nadalje, svaki monomer u lancu ima jedan ugljikov atom više

nego odgovarajuća aminokiselina (zbog lakše sinteze), što povećava lipofilnost molekule i može olakšati transport preko bioloških membrana. Istodobno, ureido-spojevi imaju sposobnost stvaranja vodikovih veza, što je bitno za topljivost u vodi i može poboljšati interakciju s receptorima.

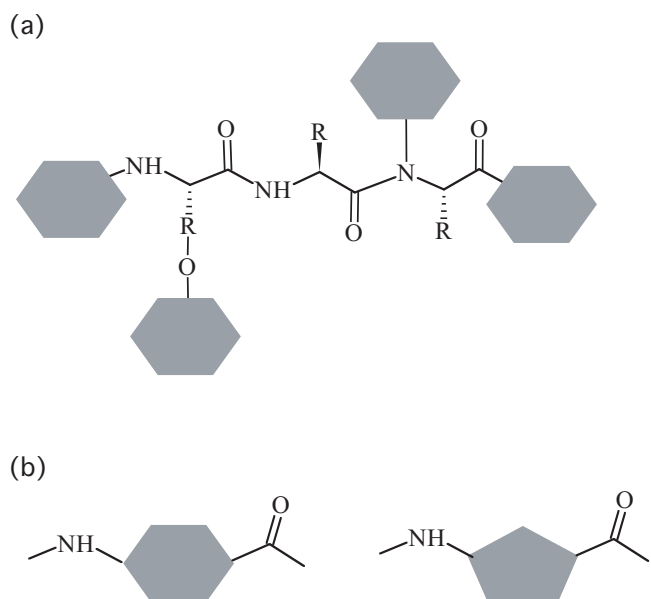
*Trans*-alkenska skupina je dobar nadomjestak za amidnu vezu jer su ukrućenost, duljina veza i kutevi među njima u priličnom skladu s onima u peptidnoj vezi.<sup>29</sup> Osim toga, takva veza također nije podložna djelovanju proteaza.

## Peptidomimetici s ugljikohidratnim aminokiselinama

Postojanje ugljikohidratnih struktura u biomolekulama ima velik utjecaj na njihova fizikalna, kemijska i biološka svojstva. Raširenost glikoproteina u prirodi odraz je utjecaja ugljikohidrata kao determinante koja određuje međustaničnu komunikaciju. Nadalje, poznato je da glikozilacija utječe na termičku i proteolitičku stabilnost proteina te na formiranje bioaktivne trodimenzionalne strukture. Raznovrsnost ugljikohidrata u prirodi neusporedivo je veća od bilo koje druge skupine spojeva, što se može na zanimljiv način usporediti s abecedom. Četiri baze u molekulama DNA ili dvadeset aminokiselina u proteinima daje bitno manje kombinacija od heksoza u saharidima, posebno kad se uzme u obzir anomerna stereokemija, veličina prstena, supstitucija hidroksilnih skupina i priroda veze između dvije ugljikohidratne molekule.<sup>30</sup>

Uključenje ugljikohidratne molekule u peptidnu strukturu ima nekoliko potencijalnih prednosti. Naime, šećerne skupine mogu utjecati na konformaciju peptida, a time i na njegovu receptorsku aktivnost i/ili selektivnost. Također je moguće utjecati na metaboličku stabilnost, kao i na hidrofilitnost/lipofilnost molekule. Kod prirodnih glikoproteina molekula ugljikohidrata je determinanta koja utječe na interstanično prepoznavanje, pa je moguće očekivati da kod peptidomimetika pospješuje usmjeravanje molekule na odredišta gdje može iskazati svoju biološku aktivnost.

Ugrađivanje ugljikohidratnih molekula kao supstituenata pruža niz mogućnosti u odabiru šećerne komponente, mjestu vezanja u peptidnom lancu, kao i tipu veze. Kao što je shematski prikazano na slici 8a, ugljikohidratne molekule moguće je uvesti kao *N*- ili *C*-terminalne supstituente, što se može odraziti, između ostalog, na otpornost prema djelovanju endopeptidaza. Dokazano je da tip veze između peptida i šećerne komponente, kao i struktura ugljikohidratne komponente bitno utječe na biokemijska svojstva ishodnog peptida.<sup>31–33</sup> Po uzoru na prirodne glikoproteine, peptid je moguće modificirati uvođenjem šećerne molekule na bočne lance aminokiselina koje nose pogodnu funkcionalnu skupinu, kao što je lizin, arginin, serin ili treonin. Nadalje, supstitucijom amidnog vodika molekulom ugljikohidrata moguće je utvrditi utjecaj *N*-glikacije na konformaciju, aktivnost i stabilnost peptida.<sup>34</sup> Uvođenje ugljikohidratne molekule može smanjiti lipofilnost peptida, ali i istovremeno povećati prijenos preko bioloških membrana. Pretpostavlja se da se prijenos takvih analoga odvija aktivnim prijenosom, tj. pomoću odgovarajućih prenosioca, kao što se npr. i glukoza prenosi preko membrana.<sup>35</sup>



Slika 8 – Ugljikohidratne molekule kao (a) peptidni supstituenti i (b) strukturni elementi

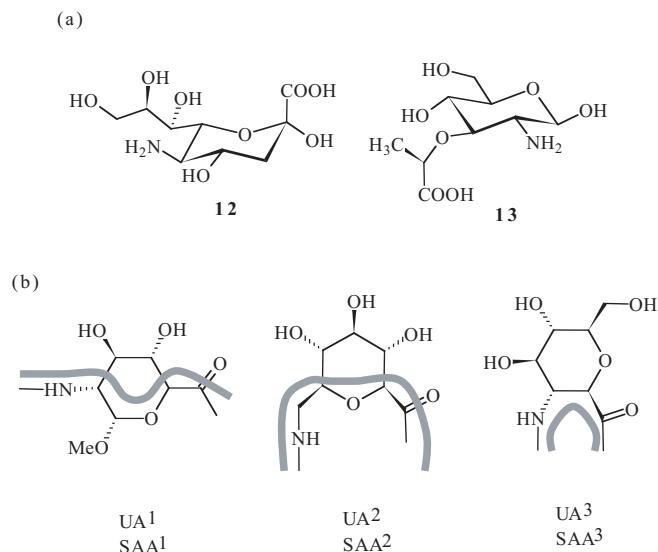
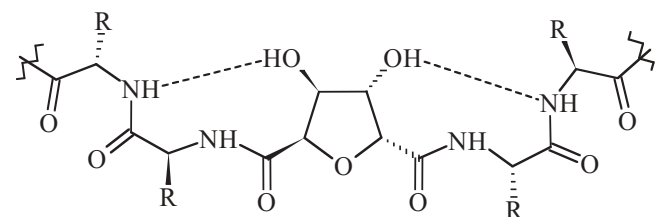
Fig. 8 – Carbohydrate moieties as (a) peptide substitutes and (b) structural elements

Prednost ugljikohidratnih molekula kao strukturnih elemenata, (slika 8b), u dizajnu peptidomimetika temelji se poglavito na dobro definiranoj strukturi piranoznog ili furanoznog prstena s hidroksilnim skupinama koje se mogu relativno lako supstituirati. U prirodi nailazimo na niz primjera tzv. ugljikohidratnih aminokiselina, UA (engl. *sugar amino acid*, SAA), koje sadrže amino i karboksilnu skupinu na piranoznom prstenu i koje je moguće uključiti u peptidni lanac. Prirodne UA su npr. neuraminska kiselina (**12**), koja je sastavni dio oligosaharida i muraminska kiselina (**13**), koju nalazimo u staničnoj stijenci bakterija, (slika 9a).

Ovisno o razmještanju funkcionalnih skupina na šestoročlanom prstenu moguće je dobiti UA koje će na specifičan (i predvidljiv) način utjecati na konformaciju peptidomimetika u koji su ugrađene, (slika 9b). Tako se može očekivati da UA<sup>1</sup> neće mijenjati linearnu strukturu peptidomimetika, UA<sup>2</sup> bi mogla utjecati na  $\beta$ -okret, a UA<sup>3</sup> na konformaciju  $\gamma$ -okreta peptidomimetika.<sup>36</sup> Nadalje, preostale hidroksilne skupine moguće je pogodno supstituirati i tako utjecati na lipofilnost molekule.

Pripravljani su brojni peptidomimetiци s UA i testirana njihova biokemijska i farmakološka svojstva u usporedbi s ishodnim peptidima. UA su uključene u RGD-peptide, analoge somatostatina i nekih hormona, te opioidne peptide.<sup>36</sup> Uočeno je da svojstva peptidomimetika uvelike ovise o strukturi UA, supstituentima na OH skupinama i mjestu ugradnje u peptid.

Osim UA piranoznog tipa, primijenjeni su i derivati UA furanoznog tipa i to poglavito za formiranje strukture paralelne  $\beta$ -ploče u peptidomimeticima. Jedan od takvih primjera prikazan je na slici 10, s dikiselinom 2,5-anhidrošećera kao UA.<sup>37</sup> Vežanjem identičnih peptidnih nizova na dvije karboksilne kiseline dobiva se molekula peptidomimetika s C<sub>2</sub> simetrijom, vrlo uređene strukture s dvije intramo-

Slika 9 – (a) Neuraminska (**12**) i muraminska kiselina (**13**); (b) primjeri UA i njihov utjecaj na sekundarnu strukturu peptidomimetikaFig. 9 – (a) Neuraminic (**12**) and muramic acid (**13**); (b) examples of SAA and their influence on secondary structure of peptidomimetics

Slika 10 – Peptidomimetik s UA furanoznog tipa

Fig. 10 – Peptidomimetic with furanose SAA

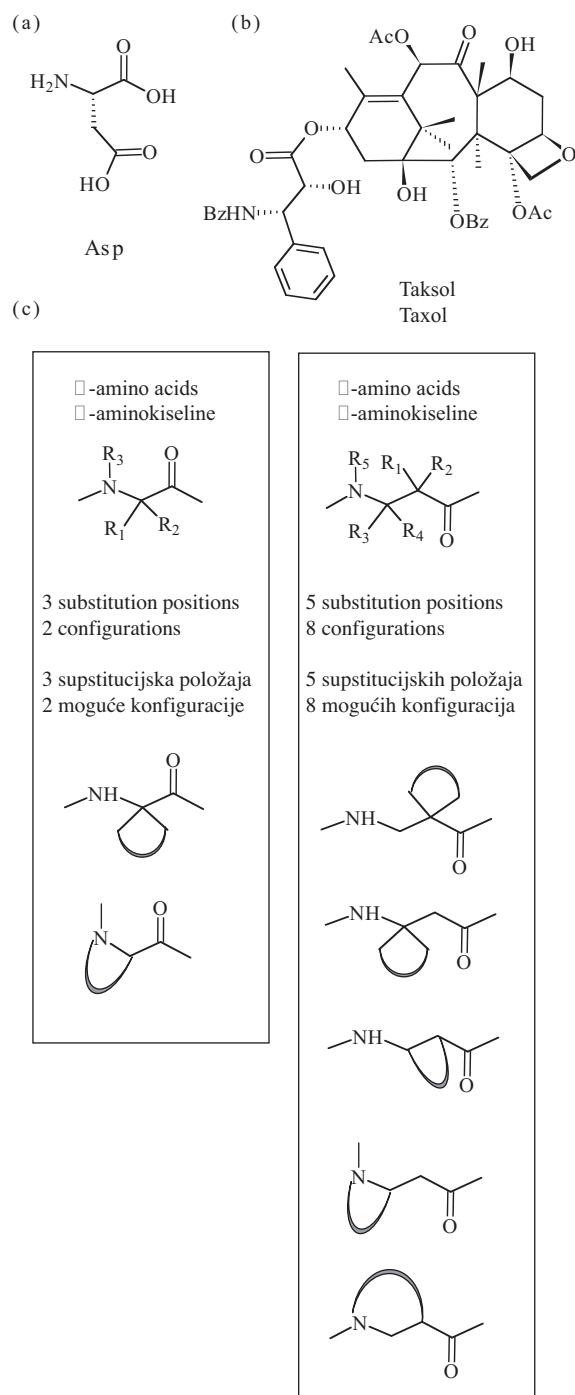
lekulske vodikove veze između hidroksilnih skupina šećera i amidnog dušikovog atoma peptida.

## Peptidomimetiци s $\beta$ -aminokiselinama

Razvoj peptidnih mimetika otvorio je područje mimetika biopolimera općenito. Dobro je poznato da je odgovarajuća konformacija nužna za katalitičke funkcije i prijenos informacije u svijetu proteina, međutim i molekule RNA mogu poprimiti karakteristične sekundarne i tercijarne strukture, što je u izravnoj vezi s njihovom funkcijom. Stoga je razumljiva potraga za strukturama i strukturnim elementima sposobnim potaknuti stvaranje određene sekundarne i/ili tercijarne konformacije.

$\beta$ -Aminokiseline su spojevi s amino i karboksilnom funkcionalnom skupinom, koje dijele dva ugljikova atoma. Iako se  $\beta$ -aminokiseline razmatraju kao neprirodne, postoje primjeri peptida izoliranih iz prirodnih izvora koji u svojoj strukturi sadrže  $\beta$ -aminokiselinu(e). Uostalom, asparaginsku kiselinu možemo razmatrati kao prirodnu  $\beta$ -aminokiselinu, (slika 11a).  $\beta$ -Glicin je najzastupljenija  $\beta$ -aminokiselina u biološki aktivnim peptidima, kao što je kritoficin, izoliran

iz modrozelenih algi, s visokom selektivnošću za tumore.<sup>38</sup> Karnozin,  $\beta$ -Gly-His je raširen u mišićima sisavaca i pokazuje vrlo izražena antioksidativna svojstva.<sup>39</sup> Nadalje, taksol je antitumorski lijek koji u svojoj strukturi sadrži  $\alpha$ -hidroksi- $\beta$ -aminokiselinu, (slika 11b).



Slika 11 — (a) Struktura prirodne  $\beta$ -aminokiseline; (b) struktura taksola; (c) razlike u supstitucijskim mogućnostima i konfiguraciji  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokiselina

Fig. 11 — (a) Structure of natural  $\beta$ -amino acid; (b) structure of taxol; (c) differences in substitution positions and configurations between  $\alpha$ - and  $\beta$ -amino acids

Ako se uspoređi struktura  $\alpha$ - i  $\beta$ -aminokiselina, (slika 11c), jasno je da  $\beta$ -aminokiseline daju mnogo prostora za intervenciju i utjecaj na konformaciju.<sup>40,41</sup>  $\beta$ -Aminokiseline imaju dva prokiralna ugljikova atoma, što zajedno s dušikovim atomom daje pet potencijalnih mjesta supstitucije i osam mogućih konfiguracija (2*S*, 2*R*, 3*R*, 3*S*, *R,R*, *S,S*, *R,S* i *S,R*), što ih čini mnogo "bogatijim" gradivnim blokovima od  $\alpha$ -aminokiselina. Također, moguće je dobiti mnogo širi spektar cikličkih analoga.

Jedna od osnovnih karakteristika peptidomimetika građenih od  $\beta$ -aminokiselina sklonost je formiranju dobro definiranih sekundarnih struktura, ponajprije konformacija uzvojnica, ali i  $\beta$ -ploča te savijenih konformacija.<sup>41</sup> Ugradnjom  $\beta$ -aminokiselina moguće je dobiti biološki aktivne peptidomimete, koji pokazuju i povećanu proteolitičku stabilnost. Izučavanjem gastrina koji potiče lučenje želučane kiseline, došlo se do saznanja da je Boc-Trp-Leu-Asp-Phe-OH agonist gastrina; međutim ugradnjom  $\beta$ -Leu ili  $\beta$ -Asp dobiveni su peptidomimeti s antagonističkim djelovanjem, što je važno za dizajn inhibitora gastrina. Istraživanja provedena na sandostatinu, antagonistima bombesina i peptidima s opioidnim djelovanjem pokazala su da  $\beta$ -peptidi mogu uspješno stupati u interakciju s proteinima i oponašati  $\alpha$ -peptide u vezanju na odgovarajuće receptore.<sup>41</sup> Zbog stabilnosti u prisustvu proteolitičkih enzima, peptidomimeti s  $\beta$ -aminokiselinama upotrebljavaju se u istraživanjima inhibitora proteaza, kao i u dizajnu peptidnih cjepiva koja bi se mogla primijeniti kod autoimunih bolesti. Sposobnost  $\beta$ -peptida da tvore stabilnu strukturu uzvojnice primjenjuje se u dizajnu antimikrobnih  $\beta$ -peptida, gdje je struktura uzvojnice prijeko potrebna za interakciju sa staničnom membranom.

### Što možemo očekivati u budućnosti?

Posljednjih nekoliko godina žarišta interesa i istraživanja u biomedicinskim znanostima pomiče se s nukleinskih kiselina na proteine i peptide. Područje peptidomimetika započelo je sa sitnim intervencijama u strukturu malih peptida, što je uglavnom dovelo do promjene lokalne konformacije, ali je često bilo dovoljno za promjenu biokemijskih obilježja ishodnog peptida. Znanje koje je skupljeno na jednostavnijim primjerima polako se prenosi na složenije strukture i može se očekivati daljnje napredovanje u tom smjeru. Napredak analitičkih tehnika i metoda paralelno prati i olakšava kretanja na području biomedicinskih znanosti, pa tako i području biomimetike. Budući da su proteinski konjugati uključeni u sve biološke procese, možemo očekivati sve više mimetika i na području gliko-, lipo-, fosfo- i nukleoproteina. Osim toga, potreba za globalnim konformacijskim promjenama ostaje glavni pokretač u potrazi za strukturnim elementima koji mogu potaknuti stvaranje određene sekundarne i tercijarne strukture. Tome uvelike pridonose gotovo svakodnevna nova saznanja o važnosti trodimenzionalne strukture za funkciju biomolekula. Odgovori na pitanje zašto i kako to djeluje u "stvarnom svijetu", uvelike će pomoći u pronalaženju odgovora kako to postići u svijetu mimetika.



**Popis simbola****List of symbols**

- DKP - diketopiperazin  
- diketopiperazine
- HLH - motiv uzvojnica-petlja-uzvojnica  
- helix-loop-helix
- PNA - peptidna nukleinska kiselina  
- peptide nucleic acid
- RCM - metateza zatvaranja prstena  
- ring-closing metathesis
- UA - ugljikohidratna aminokiselina  
- sugar amino acid

**Literatura****References**

1. W. Wang, J. Jiang, C. E. Ballard, B. Wang, *Curr. Pharm. Design* **5** (1999) 265.
2. R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33** (1994) 305.
3. M. L. Moore, Peptide Design Consideration, u G. A. Grant (Uredn.), *Synthetic Peptides*, Oxford University Press, 1992, str. 11-75.
4. J. N. Lambert, J. P. Mitchell, K. D. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (2001) 471.
5. T. Ruckle, P. De Lavallaz, M. Keller, P. Dumy, M. Mutter, *Tetrahedron* **55** (1999) 11281.
6. N. Pitt, D. Gani, *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 3811.
7. D. Albert, M. Feigel, *Helv. Chim. Acta* **80** (1997) 2168.
8. C. Yu, J. W. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **7** (1999) 161.
9. J. M. Travins, F. A. Etzkorn, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 8387.
10. H. Uchida, T. Kato, K. Achiwa, *Chem. Pharm. Bull.* **45** (1997) 1228.
11. P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **254** (1991) 1497.
12. C. F. Bleczynski, C. Richert, *Org. Lett.* **2** (2000) 1697.
13. I. Jerić, Š. Horvat, *Eur. J. Org. Chem.* (2001) 1533.
14. I. Jerić, P. Novak, M. Vinković, Š. Horvat, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* (2001) 1944.
15. Š. Horvat, L. Varga-Defterdarović, M. Roščić, J. Horvat, *Chem. Commun.* (1998) 1663.
16. R. H. Grubbs, S. H. Pine, u B. M. Trost, I. Fleming, L. A. Paquette (Uredn.), *Comprehensive Organic Synthesis*, Pergamon, New York, 1991, Vol. 5.
17. S. J. Miller, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5855.
18. J. F. Reichwein, B. Wels, J. A. W. Kruijter, C. Versluis, R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 3684.
19. H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **37** (1998) 3281.
20. H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32** (1993) 543.
21. J. A. W. Kruijter, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **36** (1995) 6969.
22. S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, W. H. Moos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22** (1994) 2657.
23. D. H. Rich, J. Green, M. V. Toth, G. R. Marshall, S. B. H. Kent, *J. Med. Chem.* **33** (1990) 1285.
24. B. L. Iverson, R. A. Lerner, *Science* **243** (1989) 1184.
25. W. J. Moree, L. C. van Gent, G. A. van der Marel, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron* **49** (1993) 1133.
26. (a) W. J. Moree, G. A. van der Marel, R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.* **60** (1995) 5157; (b) C. Gennari, M. Gude, D. Potenza, U. Piarrulli, *Chem. Eur. J.* **4** (1998) 1924.
27. D. B. A. de Bont, K. M. Sliedregt-Bol, L. J. F. Hofmeyer, R. M. J. Liskamp, *Bioorg. Med. Chem.* **7** (1999) 1043.
28. (a) K. Burgess, D. S. Linthicum, H. Shin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34** (1995) 907; (b) J. A. W. Kruijter, D. J. Lefeber, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **36** (1995) 2583.
29. K. M. Bol, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron* **48** (1992) 6425.
30. B. G. Davis, J. B. Jones, *Synlett.* (1999) 1495.
31. Š. Horvat, L. Varga, J. Horvat, *Helv. Chim. Acta* **74** (1991) 951.
32. Š. Horvat, L. Varga-Defterdarović, J. Horvat, S. Modrić-Žganjar, N. N. Chung, P. W. Schiller, *Lett. Pept. Sci.* **2** (1995) 363.
33. R. E. Rodriguez, F. D. Rodriguez, M. P. Sacristian, J. L. Torres, F. Reig, J. M. Garcia-Anton, G. Valencia, *Psychopharmacology* **101** (1990) 222.
34. M. Čudić, J. Horvat, M. Elofsson, K.-E. Bergquist, J. Kihlberg, Š. Horvat, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1998) 1789.
35. R. Polt, F. Porreca, L. Z. Szabo, E. J. Bilsky, P. Davis, T. J. Abbruscato, T. P. Davis, R. Horvath, H. I. Yamamura, V. J. Hruby, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 7114.
36. E. Lohof, F. Burkhardt, M. A. Born, E. Planker, H. Kessler, Sugar Amino Acids and Carbohydrates as Scaffolds and Peptidomimetics, u A. Abell (Uredn.), *Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics*, Vol. 2, str. 263.
37. T. K. Chakraborty, A. Gnosh, R. Nagaraj, A. R. Sankar, A. C. Kunwar, *Tetrahedron* **57** (2001) 9169.
38. C. L. Shih, S. Gossett, J. M. Gruber, C. S. Grossman, S. L. Andis, R. M. Schultz, J. F. Worzalla, T. H. Corbett, J. T. Metz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9** (1999) 69.
39. P. J. Quinn, A. A. Boldyrev, V. E. Formazuyk, *Mol. Aspects Med.* **13** (1992) 379.
40. D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* (1997) 2015.
41. R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **101** (2001) 3219.
42. D. L. Steer, R. A. Lew, P. Perlmutter, A. I. Smith, M.-I. Aguilar, *Curr. Med. Chem.* **9** (2002) 811.

## SUMMARY

## Peptide Mimetics: Why and How?

I. Jerić

Peptides and proteins are of key importance in many chronic and infectious disorders. Prion diseases are result of conformational changes of a protein, while development of Alzheimer disease is associated with deposition of  $\beta$ -amyloid peptides in insoluble form. Autoimmune diseases are characterized by recognition dysfunction, self-peptides being attacked by immune system as foreign molecules. At the same time, peptides as therapeutic agents are of very limited use. Peptides are highly flexible molecules, easily degraded by proteases and usually too polar to pass membranes that separate them from their targets in the cells (Fig. 1). Considerable efforts have been put in designing the compounds with improved bioavailability and capability to mimic peptide functions, resulting in heterogeneous class of compounds known as peptidomimetics.

The very first steps in peptidomimetic design were based on simple *N*- or *C*-terminus modifications, single amino acid replacement or chiral changes (Fig. 2). Next, cyclization reactions are very useful in peptidomimetic synthesis. "Head→tail" cyclizations result in many impressive structures with promising conformational features (Figs. 3 and 4). There are also interesting examples of cyclic peptides and peptidomimetics comprising sugar moiety (Fig. 5). Ring-closing metathesis is another useful method for the preparation of both small and macrocyclic rings (Fig. 6). Peptide bond modifications brought a number of compound classes, like peptoids, retropeptoids, urea-peptidomimetics and sulfonamide peptides/peptoids (Fig. 7).

Sugar amino acids offer many possibilities in preparation of peptidomimetics with predictable conformational characteristics (Figs. 9 and 10). On the other hand,  $\beta$ -amino acid based peptidomimetics proved to be highly proteases-resistant, conformationally well-defined and potentially attractive inhibitors, peptide-like vaccines and antimicrobial agents.

*Ruđer Bošković Institute*  
*PO Box 180, 10002 Zagreb*  
*Croatia*

*Received September 24, 2003*  
*Accepted January 15, 2004*