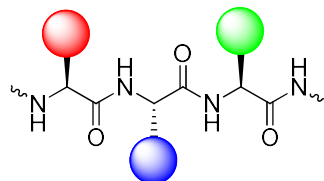


Podstawy projektowania leków wykład 6

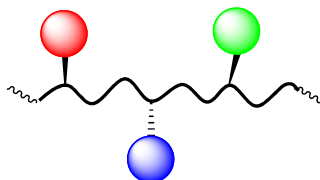
Łukasz Berlicki

Peptydy i peptydomimetyki

- ▶ **Peptydy** – oligomery zbudowane z aminokwasów połączonych wiązaniem amidowym.

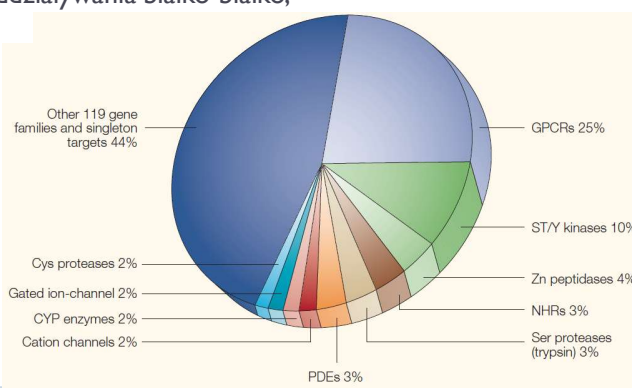


- ▶ **Peptydomimetyki** – cząsteczki naśladowujące strukturę i funkcje peptydów



Cele molekularne

- ▶ Wiele celów molekularnych oddziałuje z peptydami i ich analogami, w szczególności są one:
 - ▶ Ligandami receptorów,
 - ▶ Inhibitorami oddziaływania białko-białko,
 - ▶ Inhibitorami enzymów.



Peptydy i analogi jako leki

- ▶ Ok. 200 substancji aktywnych (wśród komercyjnych leków) jest peptydami lub ich analogami.



Wielkość peptydów obecnych na rynku (liczba reszt aminokwasowych)

Bioaktywne peptydy

- ▶ Peptydy mogą wykazywać bardzo szerokie spektrum aktywności biologicznych i być stosowane w leczeniu:
 - ▶ infekcji bakteryjnych,
 - ▶ chorób wirusowych (w tym HIV),
 - ▶ chorób układu krążenia,
 - ▶ cukrzycy,
 - ▶ osteoporozy,
 - ▶ nowotworów.
 - ▶ ...
-
- ▶

Peptydy jako leki

- ▶ **Zalety:**
 - ▶ Wysoka aktywność i selektywność
 - ▶ Szeroki zakres celów molekularnych
 - ▶ Potencjalnie mniejsza toksyczność w porównaniu do związków niskocząsteczkowych
 - ▶ Niska akumulacja w tkankach
 - ▶ Wysokie zróżnicowanie chemiczne i biologiczne
 - ▶ Możliwe do odkrycia na poziomie genów
 - ▶ Łatwa synteza analogów
-
- ▶

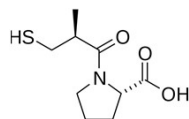
Peptydy jako leki

▶ **Wady:**

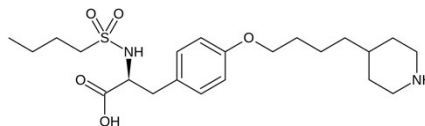
- ▶ Niska stabilność metaboliczna
- ▶ Niska przepuszczalność przez błony biologiczne
- ▶ Słaba biodostępność przy podawaniu doustnym
- ▶ Wysokie koszty produkcji
- ▶ Szybko usuwane z organizmu
- ▶ Czasami problemy z rozpuszczalnością



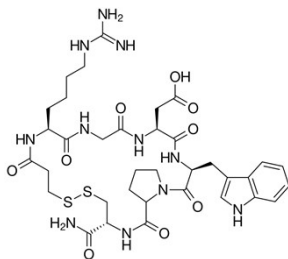
Przykłady leków peptydowych



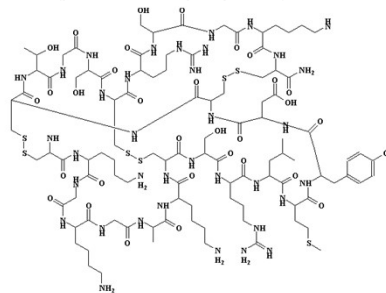
Kaptopril (nadciśnienie, 1982)



Tirofiban (przeciwzakrzepowy, 1998)



Epifibatyd (przeciwzakrzepowy, 1998)

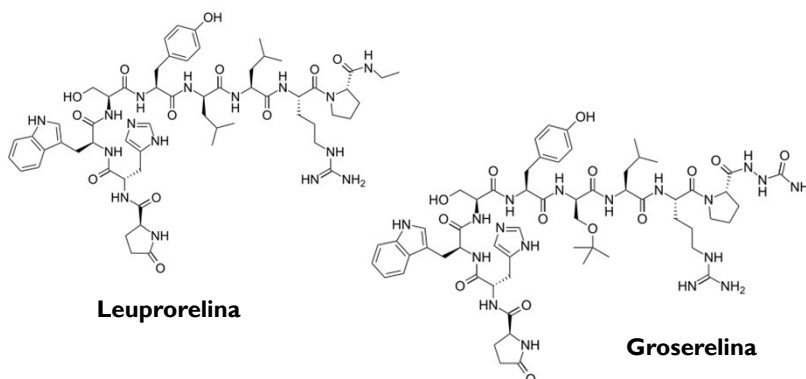


Zikontyna (przeciwbólowy, 2004)



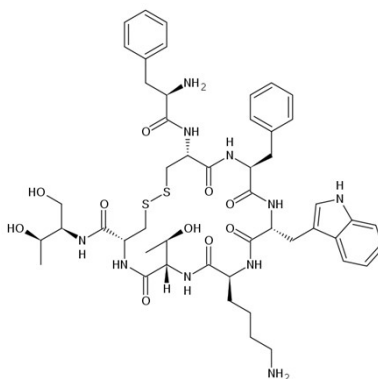
Przykłady peptydowych block busters

- ▶ **Leuprorelina, goserelina** – antagoniści receptora gonadotropowego (1.5 mld USD i 1.1 mld USD), działanie przeciwnowotworowe.



Przykłady peptydowych block busters

- ▶ **Oktreotyd** (1.3 mld USD) – analog somatostatyny, przeciwnowotworowy.



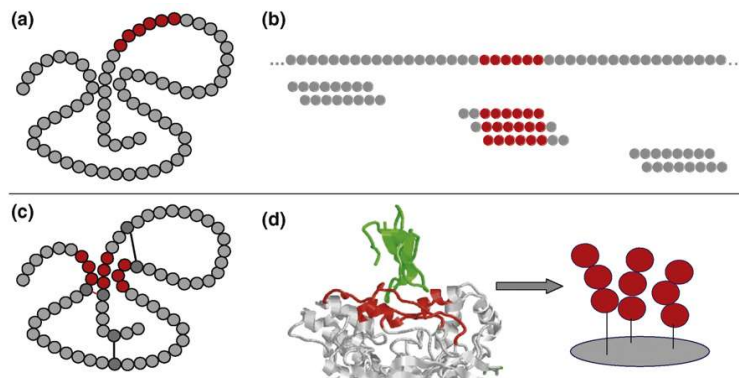
Źródła bioaktywnych peptydów

- ▶ Naturalne peptydy produkowane przez rośliny, zwierzęta i człowieka (hormony peptydowe lub fragmenty białek)
- ▶ Peptydy wyizolowane z bibliotek genetycznych
- ▶ Biblioteki chemiczne (chemia kombinatoryczna)



Poszukiwanie aktywnych peptydów

- ▶ Często aktywność białka jest związana tylko z fragmentem (epitopem).



Metody optymalizacji peptydów

Truncation

H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 ...
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 ...
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 ...

Deletion

H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N---XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-X-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XX-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXX-XXXXXXXXXX-CO₂H
 ...
 H₂N----XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-X----XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XX----XXX XXX-CO₂H
 H₂N-XXX----XX XXX-CO₂H
 ...
 .

Combinatorial Deletion

H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N----XXXX XXXX-CO₂H
 H₂N--X-XXX XXXX-CO₂H
 H₂N---XX--XX XXXX-CO₂H
 H₂N---XXX-X XXXX-CO₂H
 H₂N---XXXX-- XXXX-CO₂H
 ...
 H₂N-X----XXXX XXXX-CO₂H
 H₂N-X-X-XXXXXX-CO₂H
 H₂N-X-XX-XXXXXX-CO₂H
 H₂N-X-XXX-XXXXXX-CO₂H
 ...



Metody optymalizacji peptydów

Ala-scan

H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-**A**XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-X**A**XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XX**A**XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXX**A**XXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXX**A**XXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXX**A**XXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXX**A**XXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXX**A**XX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXX**A**X-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXX**A**-CO₂H

D-scan

H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-**x**XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-X**x**XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XX**x**XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXX**x**XXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXX**x**XXXXXX-CO₂H
 H₂N-XXXXX**x**XXX-CO₂H
 H₂N-XXXXXX**x**XX-CO₂H
 H₂N-XXXXXXX**x**X-CO₂H
 H₂N-XXXXXXXX**x**-CO₂H

Disulfide-bond cyclization scan

H₂N-XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-**C**XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-**CX**CXXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-**CXX**CXXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-**CXXX**CXXXXX-CO₂H
 H₂N-**CXXXX**CXXXXX-CO₂H
 ...
 H₂N-X**CC**XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-X**CXC**XXXXXXXXXX-CO₂H
 H₂N-X**CXX**CXXXXX-CO₂H
 H₂N-X**CXXX**CXXXXX-CO₂H
 ...



Synteza peptydów

- ▶ Peptydy otrzymuje się typowo metodą z użyciem stałego nośnika
- ▶ Synteza na stałym podłożu (solid phase peptide synthesis, SPPS) została wynaleziona przez R. Bruce'a Merrifielda, 1964.
- ▶ Bruce Merrifield otrzymał nagrodę Nobla w 1984.



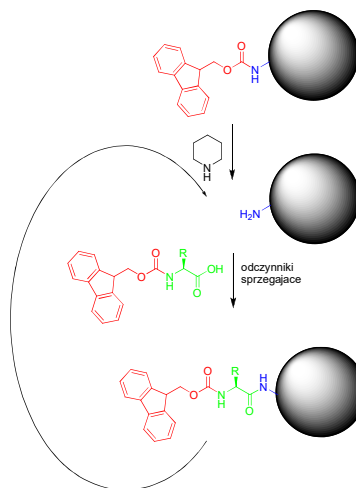
Synteza peptydów

- ▶ Peptydy otrzymuje się typowo metodą z użyciem stałego nośnika
- ▶ Synteza na stałym podłożu (solid phase peptide synthesis, SPPS) została wynaleziona przez R. Bruce'a Merrifielda, 1964.
- ▶ Bruce Merrifield otrzymał nagrodę Nobla w 1984.



Synteza peptydów

- ▶ Synteza peptydów na podłożu stałym polega na wielokrotnym powtarzaniu reakcji deprotekcji grupy aminowej i sprzęgania z kolejnym aminokwasem.
- ▶ Ze względu na możliwość zastosowania dużego nadmiaru reagentów reakcje przebiegają z bardzo wysoką wydajnością.



Automatyczna synteza peptydów



Niska stabilność metaboliczna

► Leki peptydowe nie mogą być stosowane doustnie.

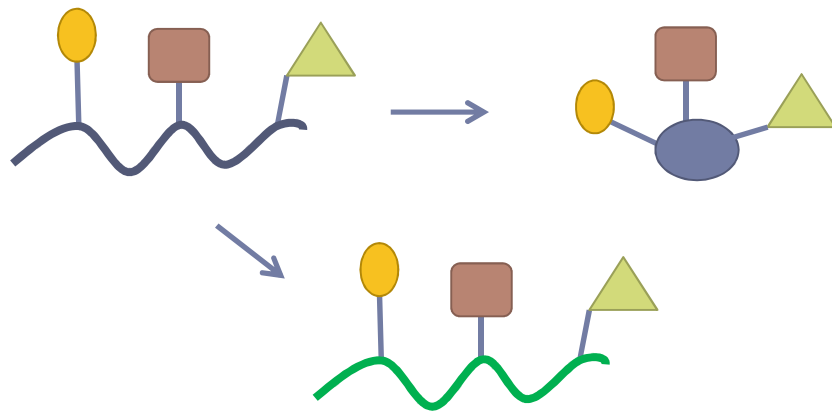
Enzymes	E.C. number	Cleavage sites
Endopeptidases		
Serine proteases <i>E.C. 3.4.21</i>		
α-Chymotrypsin	<i>E.C. 3.4.21.1</i>	Tyr- -Xaa, Trp- -Xaa, Phe- -Xaa, and also Leu- -Xaa and Met- -Xaa
Trypsin	<i>E.C. 3.4.21.4</i>	Arg- -Xaa and Lys- -Xaa
Thrombin	<i>E.C. 3.4.21.5</i>	Arg- -Gly
Plasmin	<i>E.C. 3.4.21.7</i>	Lys- -Xaa > Arg- -Xaa
Prolyl oligopeptidase, or prolyl endopeptidase ³	<i>E.C. 3.4.21.26</i>	Pro- -Xaa >> Ala- -Xaa
Plasma kallikrein	<i>E.C. 3.4.21.34</i>	Arg- -Xaa and Lys- -Xaa, including Lys- -Arg and Arg- -Ser
Pancreatic elastase	<i>E.C. 3.4.21.36</i>	Ala- -Xaa, and also Gly- -Xaa, Val- -Xaa and Ser- -Xaa
Leukocyte elastase, or neutrophil elastase, or lysosomal elastase	<i>E.C. 3.4.21.37</i>	Val- -Xaa and Ala- -Xaa
Cysteine proteases <i>E.C. 3.4.22</i>		
Cathepsin B	<i>E.C. 3.4.22.1</i>	Arg-Arg- -Xaa, and also Leu- -Xaa, Ala- -Xaa, Phe- -Xaa and Trp- -Xaa
Clostripain, or endoproteinase Arg-C	<i>E.C. 3.4.22.8</i>	Arg- -Xaa including Arg- -Pro, but not Lys- -Xaa
Calpain-1, or μ-calpain	<i>E.C. 3.4.22.52</i>	Met- -Xaa, Tyr- -Xaa and Arg- -Xaa (with Leu or Val as the P2 residue)
Aspartic acid proteases <i>E.C. 3.4.23</i>		
Pepsin	<i>E.C. 3.4.23.1</i>	Preferentially Phe- -Xaa, Tyr- -Xaa and also Leu- -Xaa and Trp- -Xaa, ideally with Xaa = Phe, Trp, or Tyr
Cathepsin D	<i>E.C. 3.4.23.5</i>	Preferentially Phe- -Xaa, Tyr- -Xaa and Leu- -Xaa, ideally with Xaa ≠ Ala or Val
Metalloproteases <i>E.C. 3.4.24</i>		
Nepilysin, or enkephalinase, or neutral endopeptidase ³	<i>E.C. 3.4.24.11</i>	Xaa- -Tyr, Xaa- -Phe, Xaa- -Trp and Xaa- -Leu
Thimet oligopeptidase, or endo-oligopeptidase A, or endopeptidase 24.15, or pz-peptidase ³	<i>E.C. 3.4.24.15</i>	Xaa- -Arg, Xaa- -Ser, Xaa- -Ile, Xaa- -Ala, Xaa- -Gly

Niska stabilność metaboliczna

► Leki peptydowe nie mogą być stosowane doustnie.

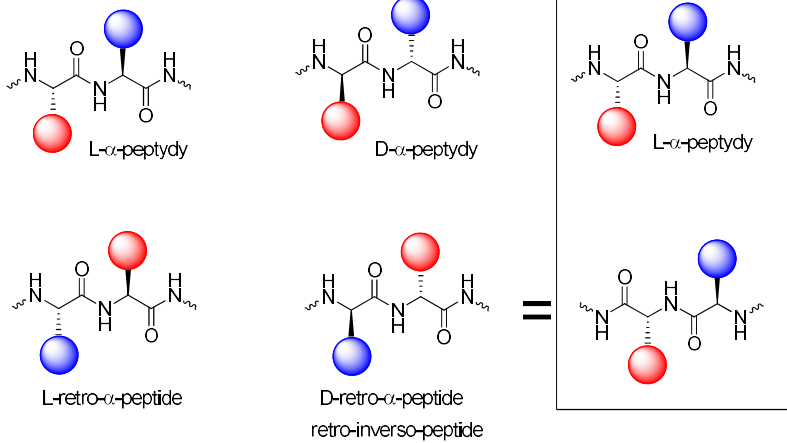
Exopeptidases		
Amino-peptidases <i>E.C. 3.4.11</i> <i>N-term</i>		
Leucyl-aminopeptidase	<i>E.C. 3.4.11.1</i>	Preferentially Leu- -Xaa, but not Arg- -Xaa and Lys- -Xaa
Amino-peptidase M or N, or alanyl-aminopeptidase, or membrane alanine amino-peptidase ³	<i>E.C. 3.4.11.2</i>	Preferentially Ala- -Xaa and Tyr- -Xaa, if Yaa-Pro- -Xaa in N-term with Yaa = Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr or Trp then the dipeptide Yaa-Pro could be released
Amino-peptidase A, or angiotensinase, or glutamyl-amino-peptidase ³	<i>E.C. 3.4.11.7</i>	Glu- -Xaa >> Asp- -Xaa
Dipeptidyl-peptidases and tripeptidyl-peptidases <i>E.C. 3.4.14</i> <i>N-term (di- and tripeptides)</i>		
Dipeptidyl-peptidase I, or cathepsin C or J	<i>E.C. 3.4.14.1</i>	Xaa-Yaa- -Zaa, if Xaa ≠ Arg or Lys, or Yaa ≠ Pro, or Zaa ≠ Pro
Dipeptidyl-peptidase IV ³	<i>E.C. 3.4.14.5</i>	Preferentially Xaa-Pro- -Yaa- (but also Xaa-Ala- -Yaa-) with Yaa ≠ Pro or Hyp
Prolyl tripeptidyl-peptidase	<i>E.C. 3.4.14.12</i>	Xaa-Yaa-Pro- -Zaa if Zaa ≠ Pro
Peptidyl-dipeptidases <i>E.C. 3.4.15</i> <i>C-term</i>		
Peptidyl-dipeptidase A, or angiotensin-converting enzyme ³	<i>E.C. 3.4.15.1</i>	Xaa- -Yaa-Zaa, if Yaa ≠ Pro, or Zaa ≠ Asp or Glu
Metallo-carboxypeptidases <i>E.C. 3.4.17</i> <i>C-term</i>		
Carboxypeptidase A	<i>E.C. 3.4.17.1</i>	Xaa- -Yaa if Yaa ≠ Asp, Glu, Arg, Lys or Pro
Carboxypeptidase B, or protaminase	<i>E.C. 3.4.17.2</i>	Xaa- -Arg and Xaa- -Lys
Carboxypeptidase N, or lysine(arginine) carboxypeptidase, or kininase I ³	<i>E.C. 3.4.17.3</i>	Xaa- -Lys >> Xaa- -Arg
Carboxypeptidase U or R	<i>E.C. 3.4.17.20</i>	Xaa- -Arg and Xaa- -Lys
Glutamate carboxypeptidase II, or folate hydrolase	<i>E.C. 3.4.17.21</i>	Xaa- -Glu, preferentially with Xaa = Asp or Glu

Scaffold hopping - peptydomimetyki

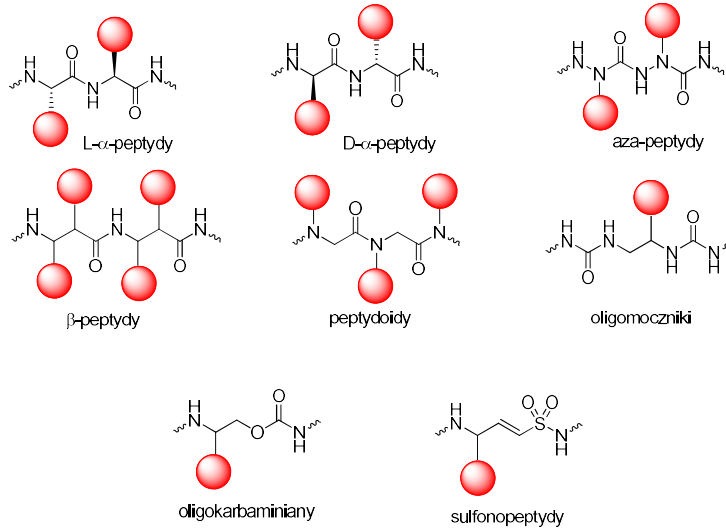


Typy analogów

Peptydy retro-inverso

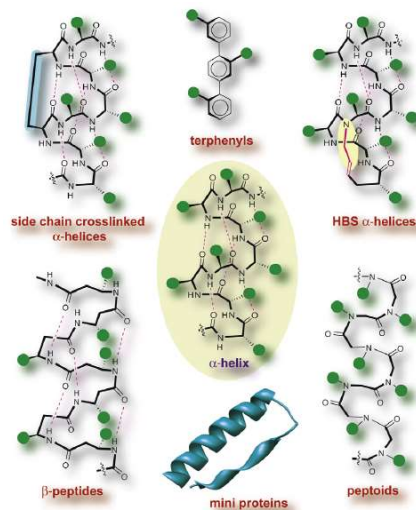


Typy analogów



Analogi o strukturze helisy

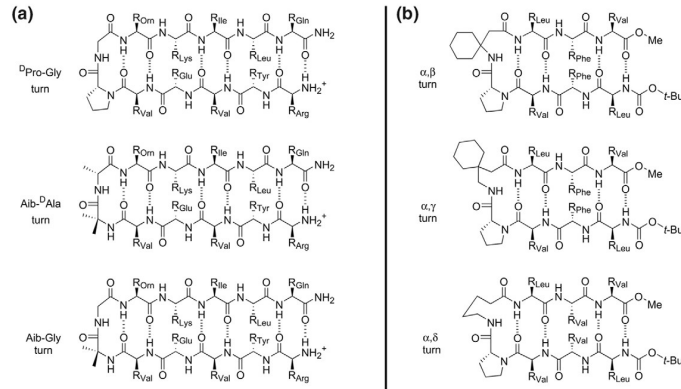
- ▶ Helisy są jednym z kluczowych elementów strukturalnych bioaktywnych peptydów.
- ▶ Stabilizowanie krótkich fragmentów oligomerów w konformacji helikalnej powoduje zwiększenie aktywności.



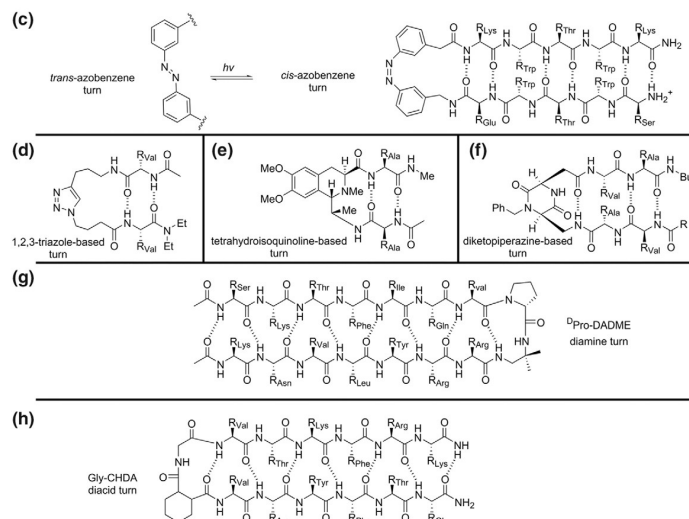
Analogi β -zgięć i β -kartek

- ▶ Wstawienie reszt D-aminokwasowych lub aminokwasowych

β, γ, δ -

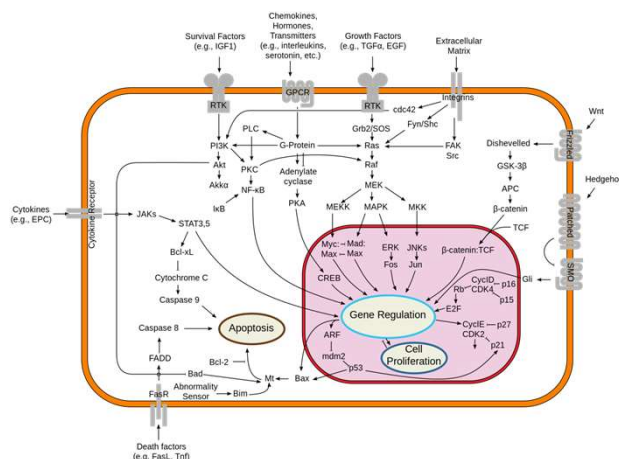


Analogi β -zgięć i β -kartek



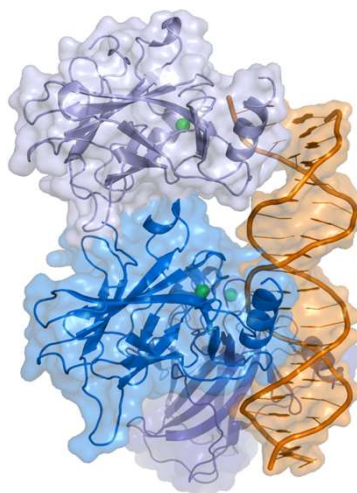
p53-MDM2

- ▶ Zahamowanie oddziaływania białek p53-MDM2 jest jedną z bardziej obiecujących strategii przeciwnowotworowych.



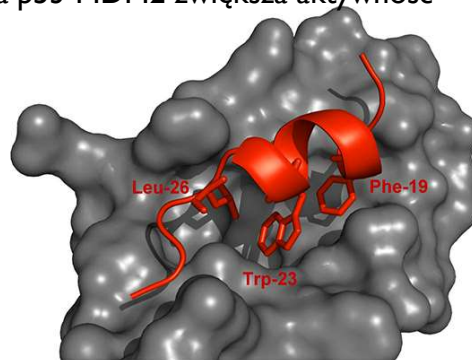
p53-MDM2

- ▶ Białko p53 ma funkcję supresora nowotworowego. Reguluje cykl komórkowy i jest zaangażowane w naprawę DNA i indukcję apoptozy w odpowiedzi na uszkodzone DNA.
- ▶ Białko p53 może być aktywowane poprzez bardzo dużą liczbę różnych warunków stresowych.



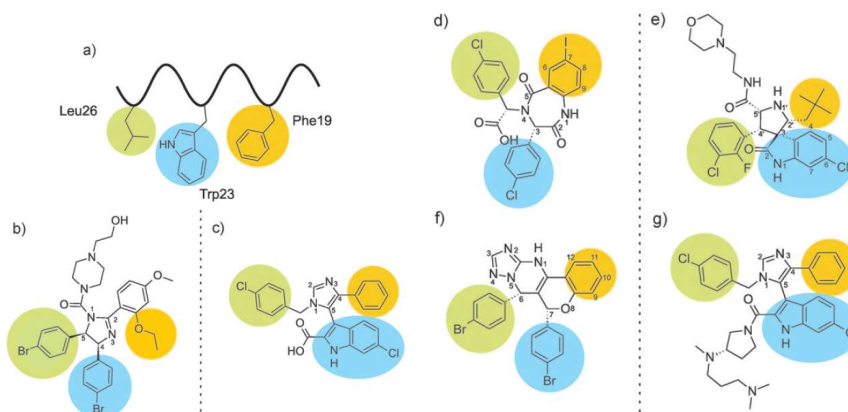
p53-MDM2

- ▶ Białko MDM2 jest negatywnym regulatorem p53.
- ▶ Białko MDM2 ma aktywność ligazy ubikwityny do p53, co prowadzi do degradacji p53.
- ▶ Zahamowanie oddziaływania p53-MDM2 zwiększa aktywność p53 i hamuje rozwój nowotworów.
- ▶ Motyw strukturalny Leu, Trp, Phe jest odpowiedzialny za wiązanie p53 do MDM2



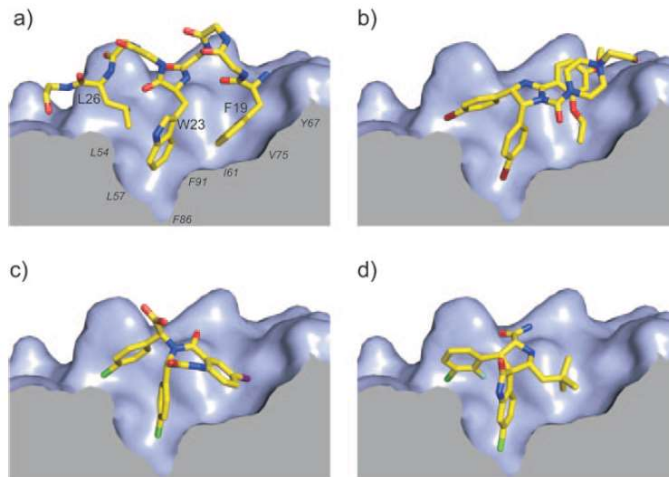
p53-MDM2

- ▶ Zaprojektowano znaczącą liczbę niepeptydowych analogów fragmentu Leu, Trp, Phe.



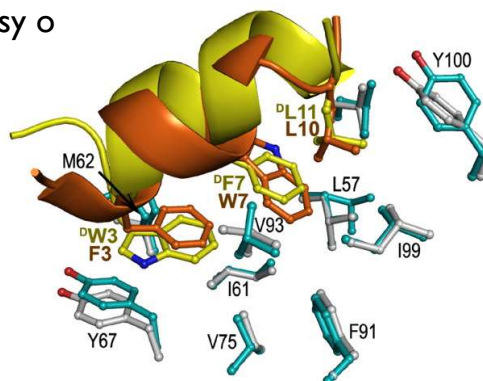
p53-MDM2

- ▶ Struktury krystaliczne wykazały podobny sposób wiązania.



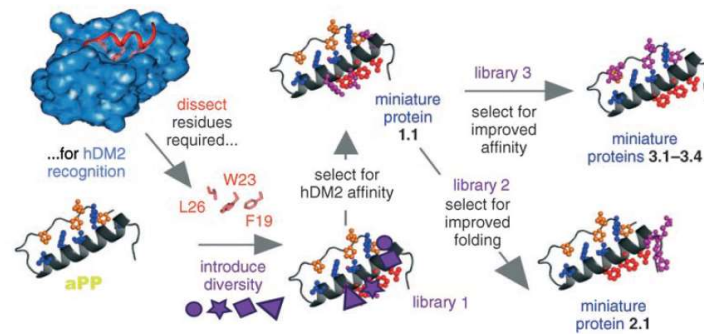
p53-MDM2 D-peptydy

- ▶ D-peptydy są znacząco bardziej odporne na peptydazy
- ▶ D-peptydy tworzą helisy o przeciwnym skręcie.



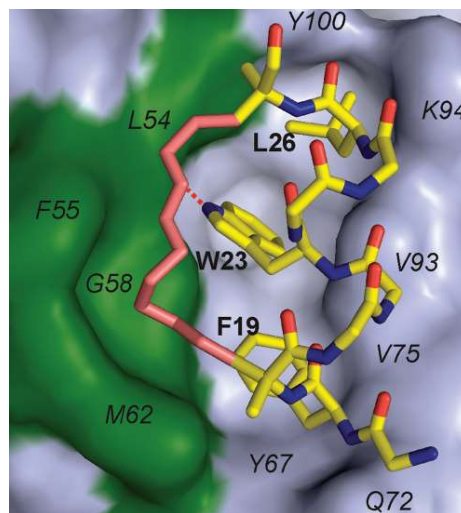
p53-MDM2, minibiałka

- ▶ Minibiałka są α -peptydami o ustalonej konformacji dzięki występowaniu sieci wiązań disiarczkowych.
- ▶ Możliwy jest duży zakres modyfikacji sekwencji bez zmiany konformacji cząsteczki.



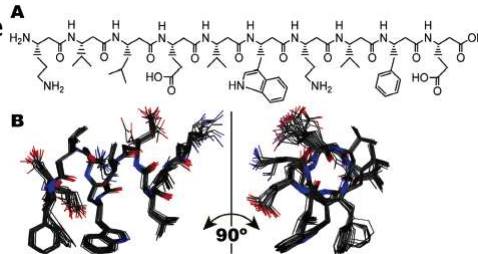
p53-MDM, stapled peptide

- ▶ Staple – zszywka
- ▶ ‘stapled peptides’ – peptydy o ustalonej konformacji (najczęściej helikalnej) poprzez połączenie reszt aminokwasowych znajdujących się blisko przestrzennie.

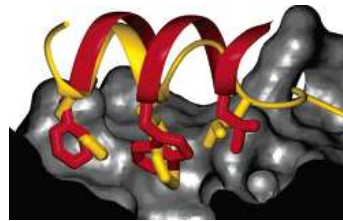


p53-MDM, beta-peptydy

- ▶ β -peptydy tworzą stabilne struktury drugorzędowe nawet dla krótkich sekwencji!
- ▶ β -peptydy są całkowicie odporne na hydrolizę enzymatyczną.
- ▶ Metody syntezy są analogiczne do peptydów.

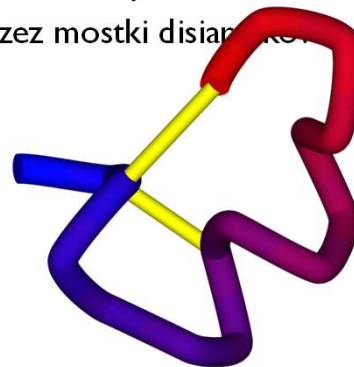


α -



Konotoksyny

- ▶ Neurotoksyczne peptydy izolowane z jadu ślimaków morskich (rybożerne stożki, *Conus* spp.)
- ▶ Składają się z 10-30 reszt aminokwasowych
- ▶ Struktura stabilizowana jest przez mostki disiarczkowe
- ▶ Najczęściej wiążą się do kanałów jonowych.



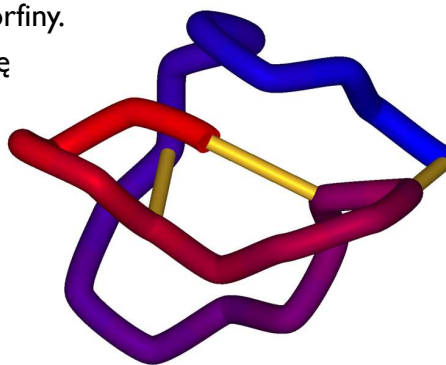
Konotoksyny

- ▶ Jest 500-700 gatunków ślimaków z rodziny *Conus*.
- ▶ Produkują one ok. 50 000 – 140 000 peptydów.
- ▶ α -konotoksyny hamują receptory acetylocholininy
- ▶ δ -konotoksyny – kanały sodowe
- ▶ ω -konotoksyny – kanały wapniowe.



Konotoksyny

- ▶ ω -konotoksyna M VII a blokuje kanały wapniowe (sterowane potencjałem) i przez to wykazuje właściwości przeciwbólowe.
- ▶ Efekt tego peptydu jest ok. 1000 razy większy niż w przypadku morfiny.
- ▶ ω -konotoksyna ma strukturę węzła.



Konotoksyny jako leki

Clinical application	Conopeptide	Sequence	Target	Clinical status
Pain	ω -M VIIA (Ziconitide, Prialt®)	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKC*	Ca ²⁺ channel (Ca _v 2.2)	FDA approved
Pain	ω -CVID (AM336)	CKSKGAKCSKLMYDCCSGSCSGTVGRC*	Ca ²⁺ channel (Ca _v 2.2)	Phase I
Pain	Contulakin-G (CGX-1160)	ZSEEGGSNATKKPYIL	Neurotensin receptor	Phase I
Pain	α -Vc1.1 (ACV1)	GCCSDPRCNYDHPEIC*	nAChR (α 9 α 10)	Phase I
Pain	χ -MriA (Xen2174)	NGVCCGYKLCHOC	Norepinephrine transporter	Phase I
Pain/Neuro- protection	Conantokin-G (CGX-1007)	GE γ tQ γ NQ γ IR γ KSN*	NMDA receptor (NR2B)	Preclinical
Epilepsy	Conantokin-G (CGX-1007)	GE γ tQ γ NQ γ IR γ KSN*	NMDA receptor (NR2B)	Phase I
Pain	μ -conotoxins	Various	Na ⁺ channels	Preclinical
Myocardial infarction	κ -PVIIA (CGX-1051)	CRIONGKCFGHLDCCSRKCNRFNKCV	K ⁺ channel (K _v 1)	Preclinical

Zikonotyna

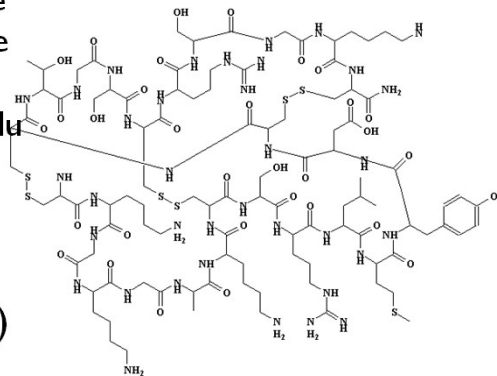
- ▶ Peptyd składający się z 25 reszt aminokwasowych i 3 mostków disiarczkowych
- ▶ Wyizolowany z *Conus magnus* (filipińskie rafy koralowe)
- ▶ Stosowany w leczeniu przewlekłego bólu związanego z chorobą nowotworową.



Zikonotyna

- ▶ Zikonotyna bardzo silnie blokuje kanały wapniowe uniemożliwiając przesyłanie sygnałów bólu do mózgu.

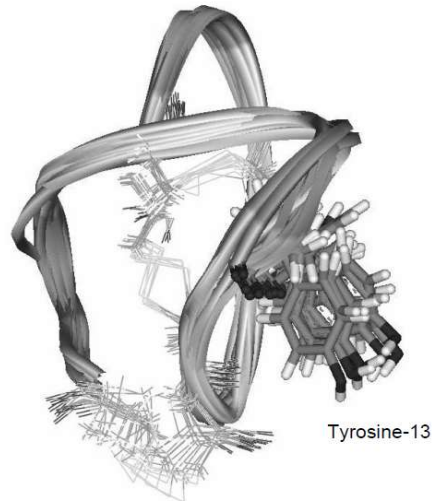
- ▶ $K_i = 1.1 \text{ pM} (10^{-12}\text{M})$



Zikonotyna

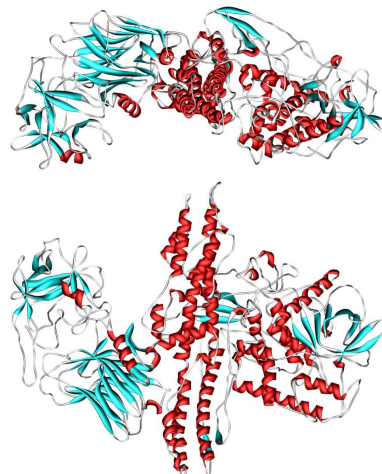
- ▶ Zikonotyna bardzo silnie blokuje kanały wapniowe uniemożliwiając przesyłanie sygnałów bólu do mózgu.

- ▶ $K_i = 1.1 \text{ pM} (10^{-12}\text{M})$



Toksyna botulinowa

- ▶ Białko wytwarzane przez beztlenowe bakterie *Clostridium botulinum*.
- ▶ Jest jedną z najbardziej toksycznych substancji:
- ▶ $LD_{50} = 1.3-2 \text{ ng/kg}$
- ▶ Białko składa się z dwóch łańcuchów połączonych mostkiem disiarczkowym (masa cz. 147 kDa)



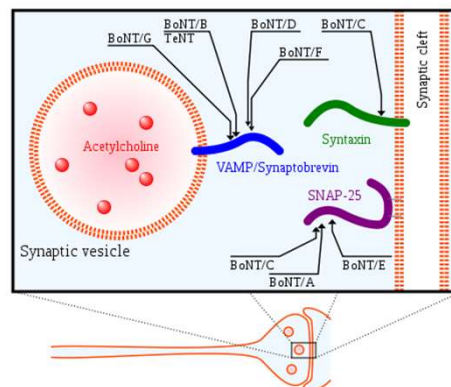
Toksyna botulinowa

- ▶ Jest nazywana jadem kiełbasianym ze względu na występowanie w zepsutym mięsie (1897).
- ▶ Pierwszy raz użyta do usuwania zmarszczek w 1992 (małżeństwo dermatologów Carruthers, Kanada)
- ▶ Obecnie rynek botoksu jest wart ok. 2 mld USD.



Toksyna botulinowa

- ▶ Toksyna botulinowa powoduje paraliż przez zablokowanie wydzielania acetylocholiny
- ▶ Łańcuch lekki ma aktywność proteazową
- ▶ Botulina A powoduje degradację białka SNAP-25 odpowiedzialnego za wydzielanie neurotransmiterów z końców aksonów.



Podsumowanie

- ▶ Peptydy są bardzo dobrymi kandydatami na leki o bardzo szerokim możliwym spektrum aktywności biologicznych.
- ▶ Ze względu na szybki metabolizm peptydów niezbędny jest odpowiednio sposób podawania lub/i opracowanie analogów.

