



Fmoc-Tyr(OBu<sup>t</sup>)-OH

Fmoc-Ser(OBu<sup>t</sup>)-OH

Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

# Mimeticci sekundarnih struktura proteina

E.Lenci, A. Trabocchi, *Chem. Soc. Rev.* **49** (2020) 3262-3277.

**Barbara Bogović**

**Kemijski seminar 1**

Poslijediplomski (doktorski) sveučilišni studij Kemije

Organska Kemija

18. svibnja 2022., Zagreb

# UVOD

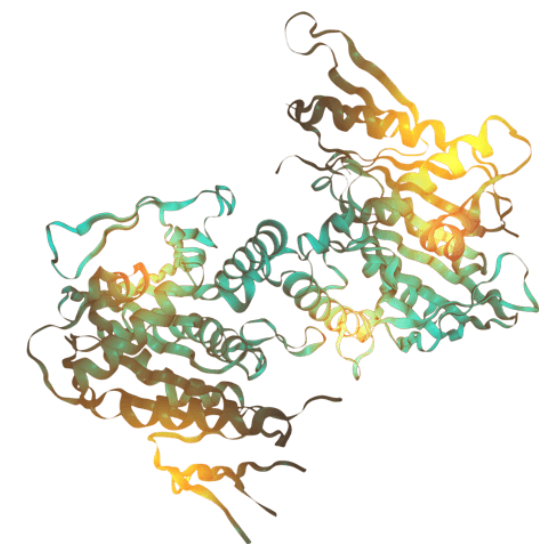
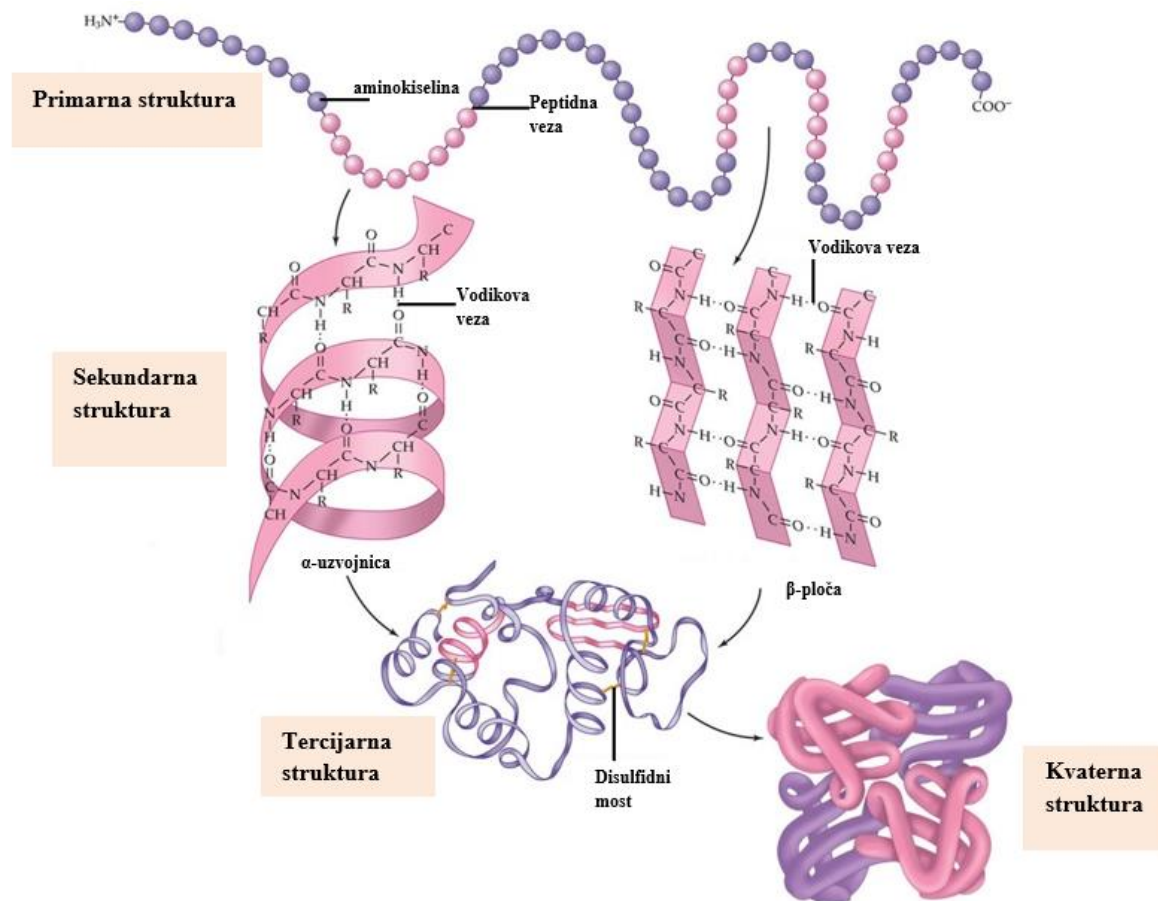
## Peptidi i proteini

Djeluju kao neurotransmiteri, neuromodulatori, hormoni, antigeni, antibiotici

Građeni su od aminokiselina

Proteinogene aminokiseline  
Neproteinogene aminokiseline

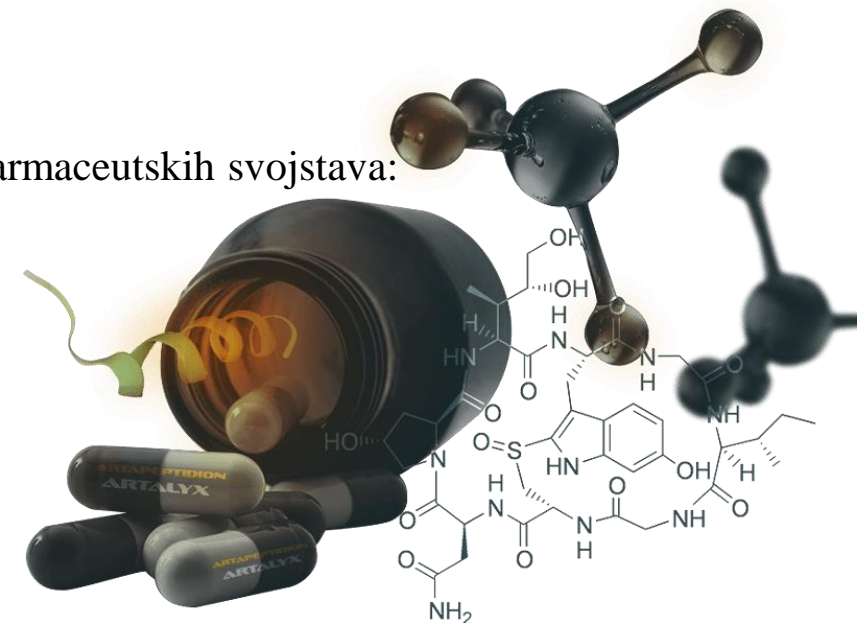
Četiri strukturne razine



# Peptidi kao terapeutici?

Ograničena primjena zbog nepovoljnih farmaceutskih i biofarmaceutskih svojstava:

- konformacijska fleksibilnost
- proteolitička nestabilnost
- niska biodostupnost



Zahtjev za modificiranim peptidima s unaprijeđenim farmakodinamičkim i farmakokinetičkim svojstvima:

- povećana djelotvornost, selektivnost, metabolička stabilnost i bioraspoloživost
- smanjenja toksičnost

## Razvoj Peptidomimetike!

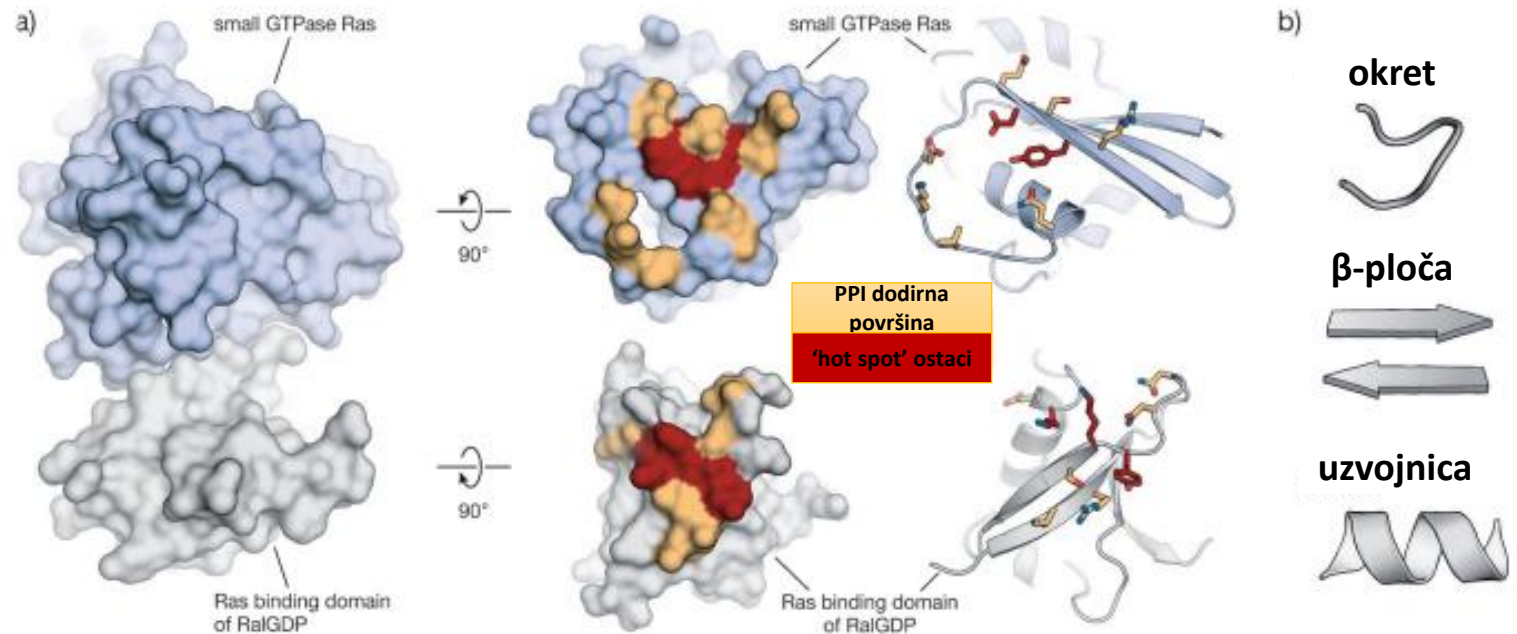
Peptidomimetik je 'spoj' čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D strukturu prirodnog peptida ili proteina te zadržavaju njegovu sposobnost interakcije s biološkim ciljanim sustavima pri čemu zadržavaju jednak biološki učinak



# Mimetici sekundarnih struktura

Protein-protein interakcije!

Jedno od najvažnijih područja primjene mimetika sekundarnih struktura je inhibicija protein-protein interakcija



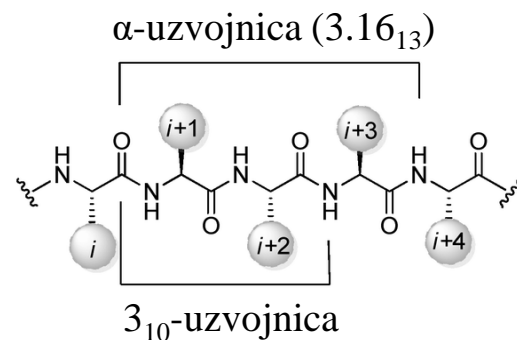
(a) Kristalna struktura, kompleks između Ras (svijetlo plavo) i Ras vezne domene RaIGDPa (sivo).

(b) Shematski prikaz sekundarnih struktura peptida.

Osnovni preduvjet za postizanje biološkog odgovora strukturalna komplementarnost liganda i receptora te njihovo međusobno povezivanje

Potreba za izgradnjom bioaktivnih molekula koje oponašaju peptide i odlikuju se povećanom stabilnošću i unaprijeđenom biološkom aktivnošću

# Mimetici uzvojnica



Klasifikacija:

- ovisno o broju ostataka koji sudjeluju u jednom zavoju
- i broju atoma između karbonilne skupine aminokiseline na položaju  $i$  te amidnog protona na položaju  $i + n$

Najraširenije uzvojnica u globularnim proteinima

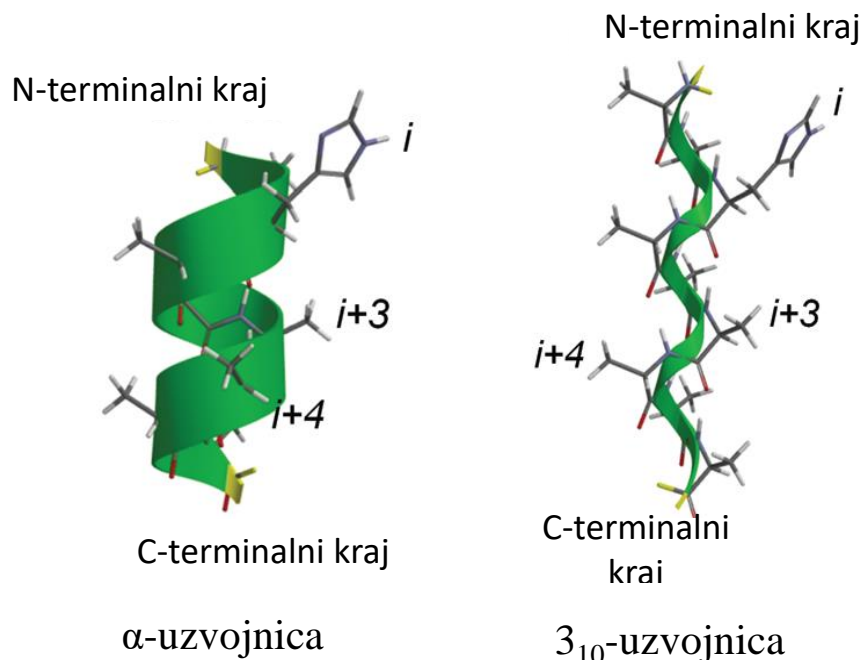
~ 90%  $3.16_{13}$ -uzvojnica,  $\alpha$ -uzvojnica

10%  $3_{10}$ -uzvojnice

Manje česte:

14-uzvojnica ( $3_{14}$ -uzvojnica)

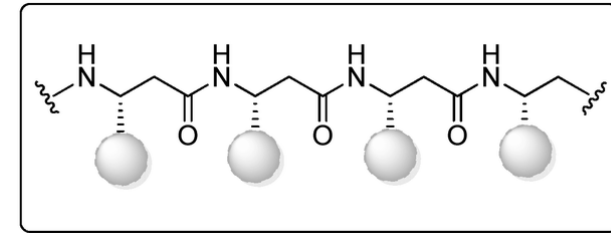
12-uzvojnica ( $2.15_{12}$ -uzvojnica)



## Mimetici $\alpha$ -uzvojnice

- blago derivatizirani prirodni peptidi
- male molekule koje mogu poprimiti helične strukture

# Foldameri



Neprirodne kompaktne oligomerne strukture koje karakterizira dobro definirana prostorna organizacija

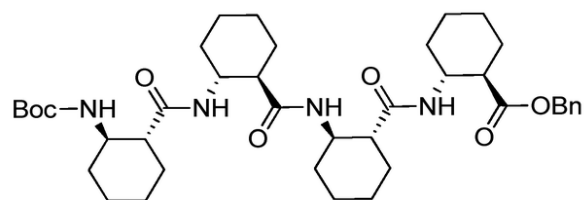
## Podjela foldamera:

- Homogeni i heterogeni (hibridni)
- Mimetici  $\alpha$ -,  $\beta$ -  $\gamma$ -,  $\delta$ -uzvojnice (najznačajniji)

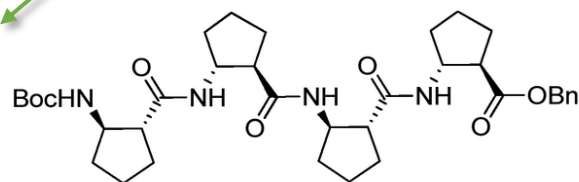
## Najviše su proučavani foldameri $\beta$ -peptida

Sintetiziraju se:

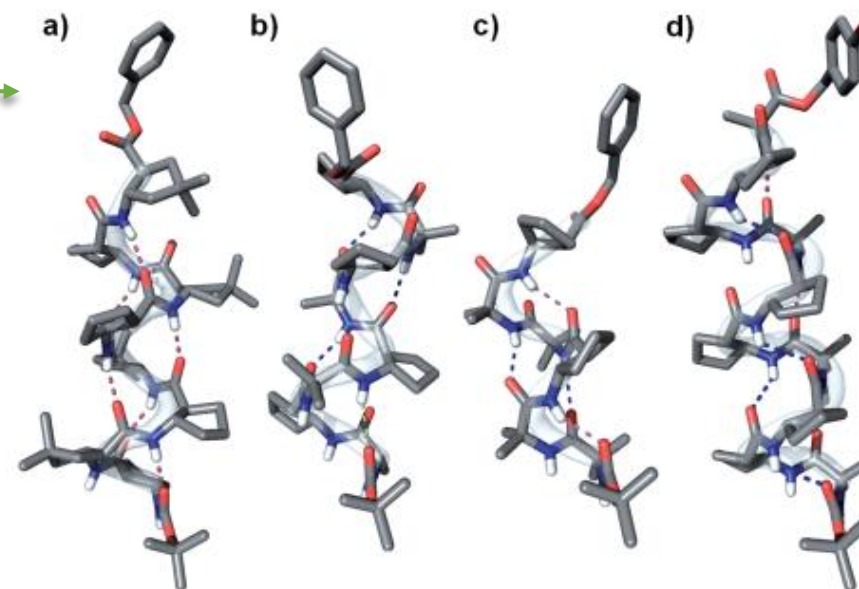
- uzastopnom kondenzacijom  $\beta^2$ -,  $\beta^3$ -aminokiselina ili  $\beta^{2,3}$ -aminokiselina.
- kondenzacijom cikličkih derivata, kao što su *trans*-aminociklopentan karboksilna kiselina (ACPC) i *trans*-aminocikloheksan karboksilna kiselina (ACHC)



(*trans*-ACHC)<sub>6</sub> kao mimetik 14-uzvojnice

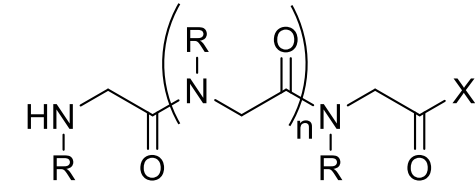


(*trans*-ACHC)<sub>6</sub> kao mimetik 12-uzvojnice



# Peptoidi

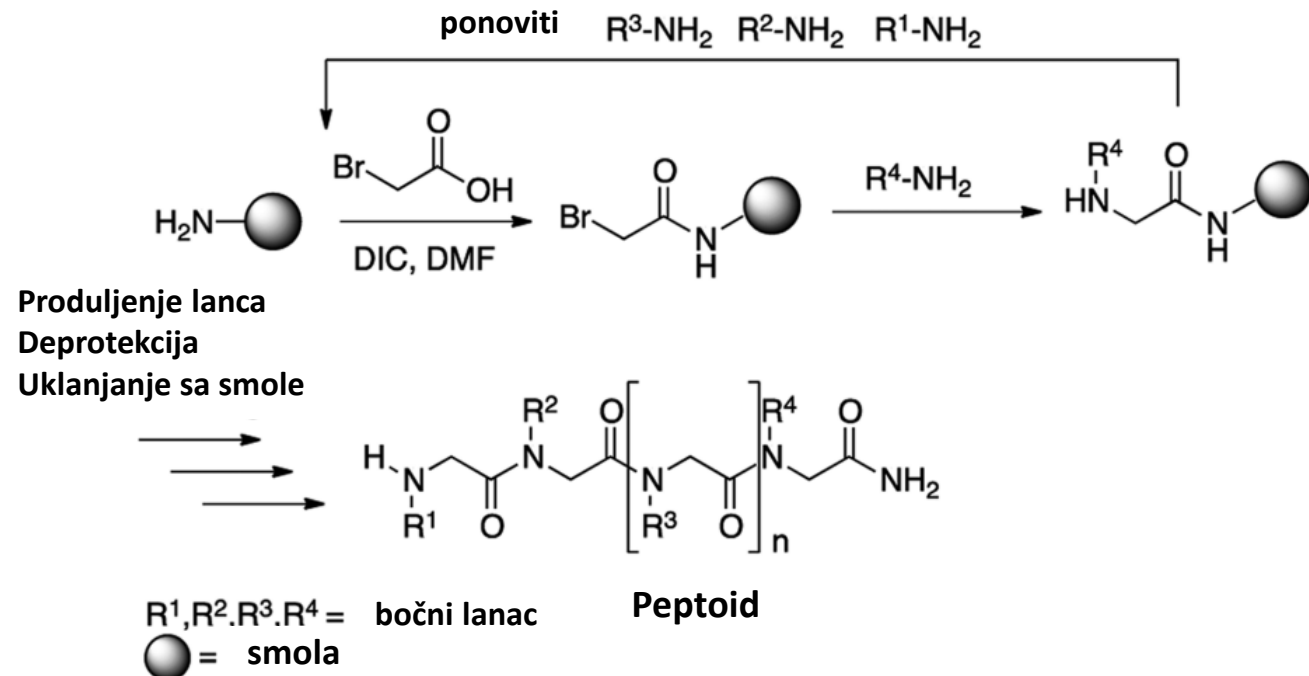
Peptoidi se mogu opisati kao  $\alpha$ -peptidni mimetici, u kojima su bočni lanci s  $\alpha$  ugljikovih atoma premješteni na dušikove atome amidne veze



R=bočni lanac  
X=NH<sub>2</sub>, OH

## Prednosti peptoida:

- povećana otpornost prema enzimskoj hidrolizi
- bolja permeabilnost kroz staničnu membranu
- povećana biološka aktivnost

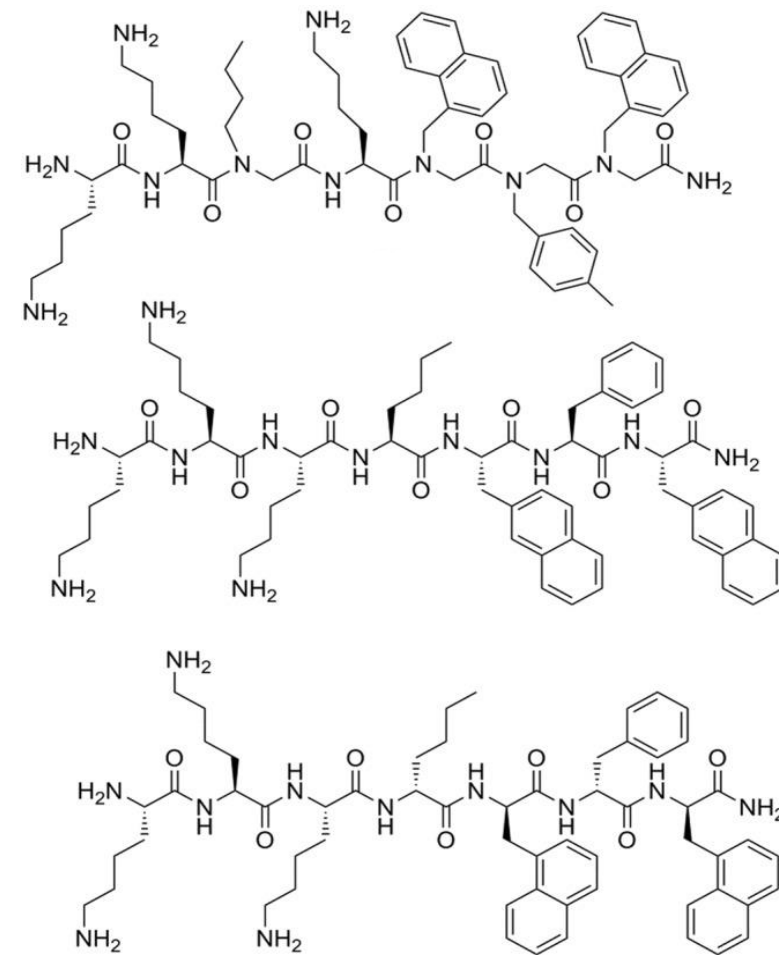
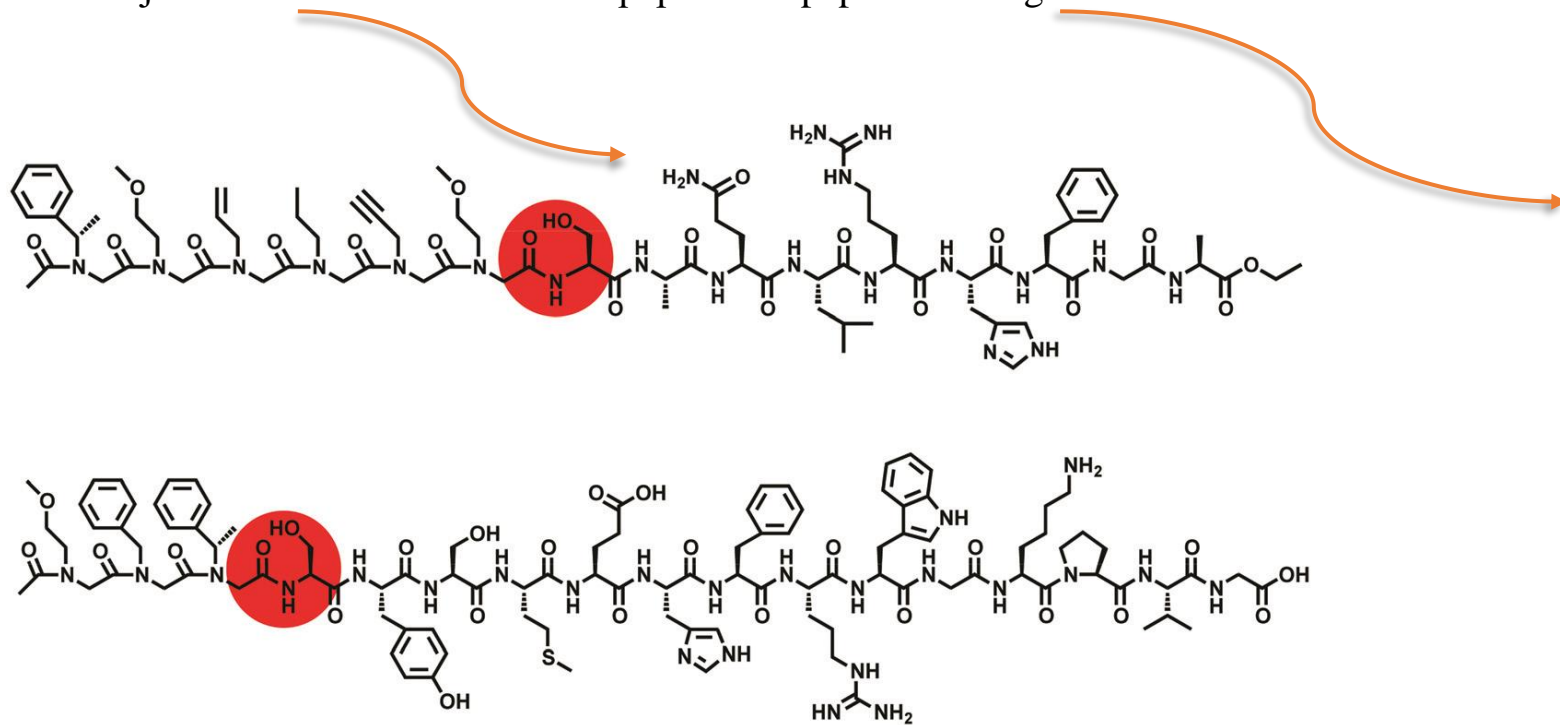


Sinteza oligomera građenih od N-supstituiranih glicina submonomernom metodom na čvrstom nosaču

## Nedostaci:

- cis/trans izomerizacija (smjesa konformera)

Dizajn hibridnih struktura između peptidnih i peptoidnih oligomera



- hibrid pokazuje poboljšanu biološku aktivnost
- biološka aktivnost posljedica stvaranja amfipatske uzvojnice

Peptoidi se istražuju kao potencijalni terapeutici u području plućnih surfaktanata, antibiotika, medicinske dijagnostike te kao antikancerogeni agensi



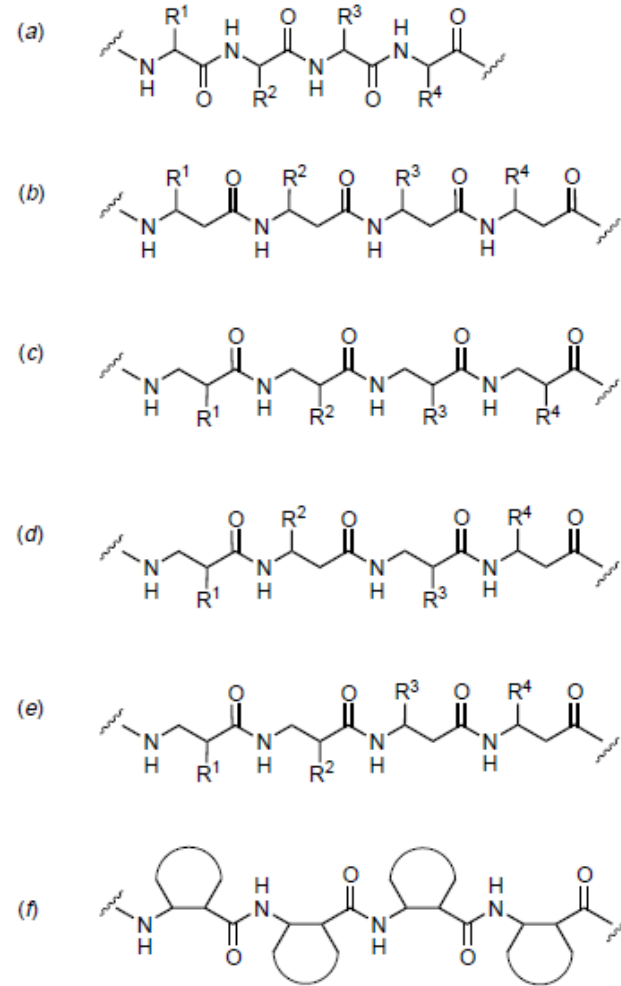
# $\beta$ -peptidi

## Prednosti:

- povećana metabolička, strukturna i proteolitička stabilnost

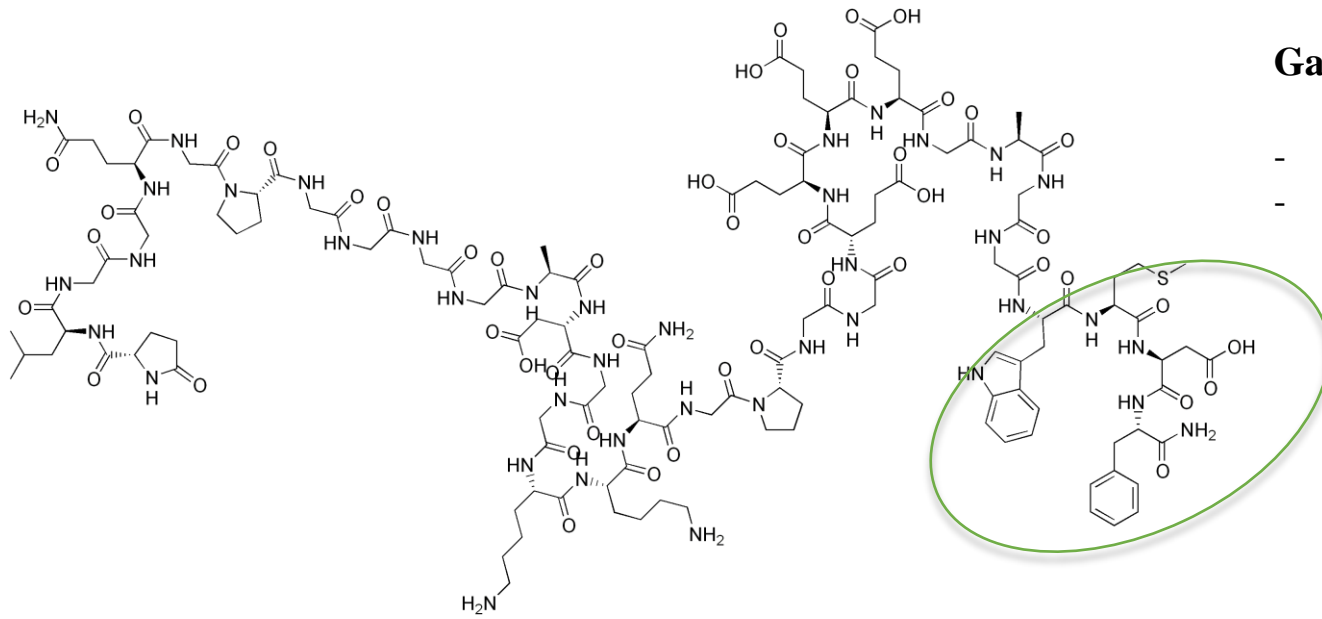
## Peptidomimetici nalaze primjenu:

- istraživanjima inhibitora proteaza
- dizajn peptidnih cjepiva
- dizajn antimikrobnih peptida



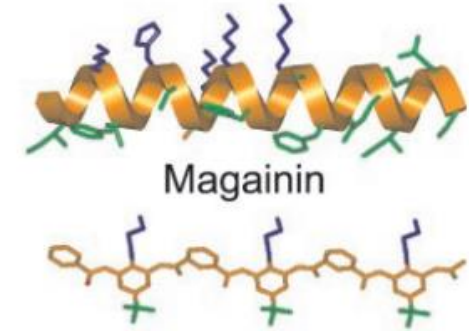
(a)  $\alpha$ -peptidi, (b)  $\beta^3$ -peptid (sadrži  $\beta$ -supstituirane  $\beta$ -aminokiseline), (c)  $\beta^2$ -peptid (sadrži  $\alpha$ -supstituirane  $\beta$ -aminokiseline), (d)  $\beta$ -peptid sadrži naizmjenično  $\beta^2$ -aminokiseline i  $\beta^3$ -aminokiseline, (e)  $\beta$ -peptid sadrži  $\beta^2$ -aminokiseline i  $\beta^3$ -aminokiseline, (f)  $\beta$ -peptid sadrži aminocikloalkan karboksilne kiseline

$\alpha$ -AA / $\alpha$ -PE	$\beta$ -AA / $\beta$ -PE
<p>3 supstitucijska položaja 2 moguće konformacije</p> <p>(R) (S)</p>	<p>5 supstitucijska položaja 8 mogućih konformacija</p> <p>(2R) (R,R) (2S) (R,S) (3R) (S,R) (3S) (S,S)</p>



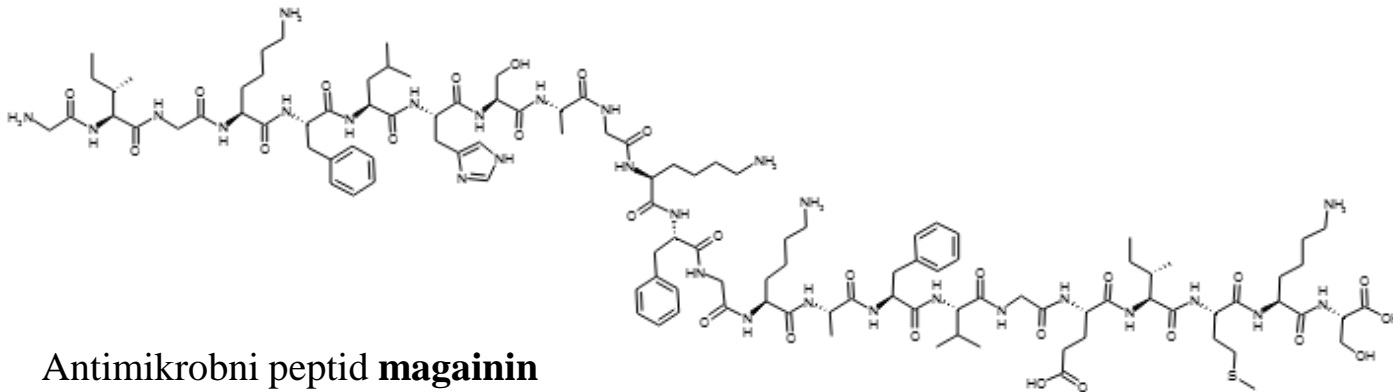
## Gastrin

- Boc-Trp-Leu-Asp-Phe-OH agonist gastrina
- ugradnjom  $\beta$ -Leu ili  $\beta$ -Asp dobiveni su peptidomimeticima s antagonističkim djelovanjem, što je važno za dizajn inhibitora gastrina

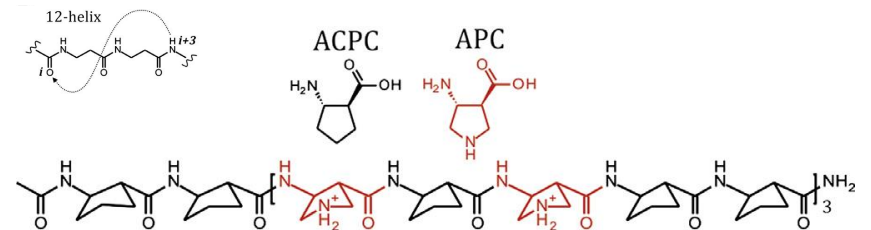


Magainin

Amfipatska uzvojnica u molekuli antimikrobnog peptida magainina

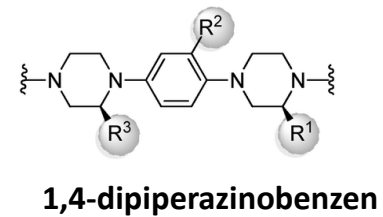
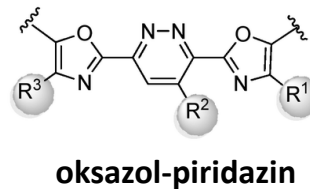
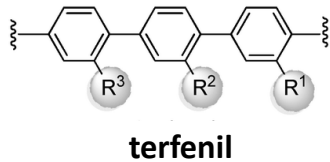
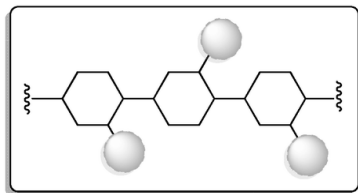


Antimikrobni peptid **magainin**



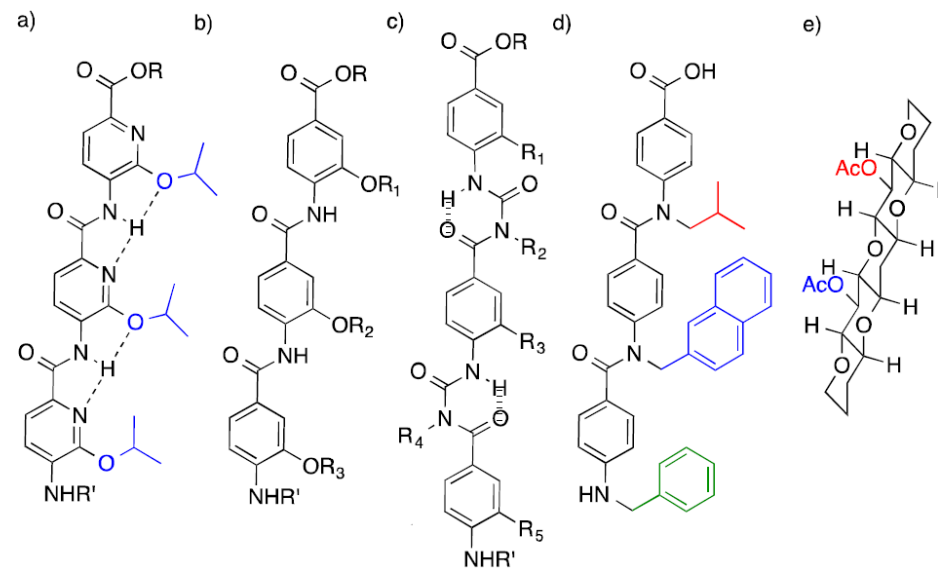
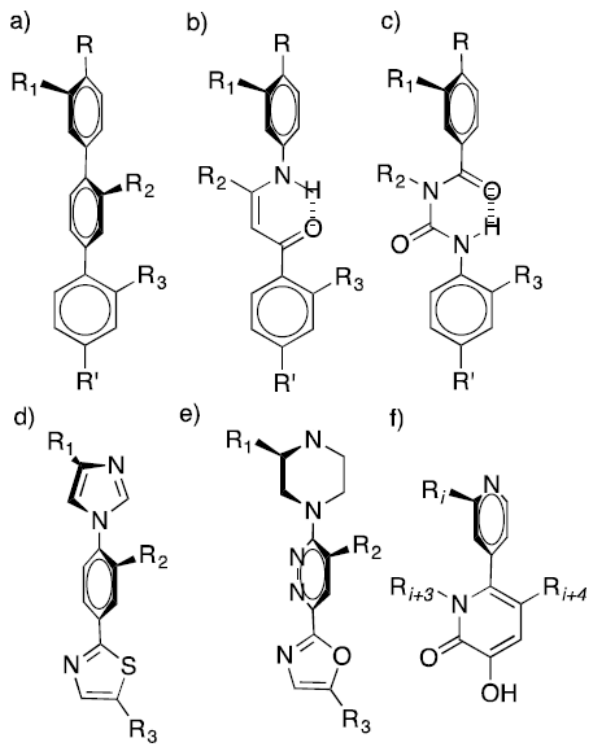
Struktura peptida  $\beta$ -17 kao mimitika uzvojnice iz magainina

# Foldameri s aromatskim i heteroaromatskim okosnicama



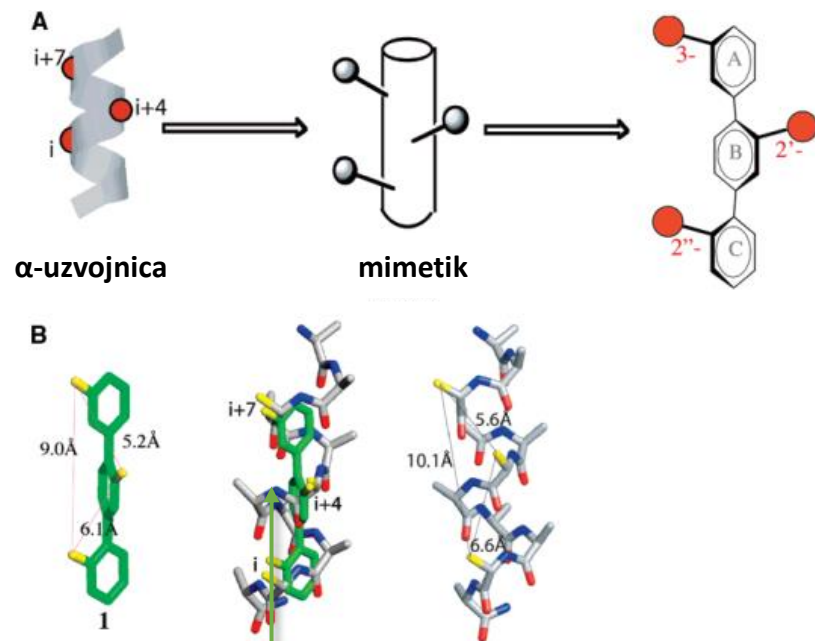
Oligofenilni skeleti i njegovi derivati kao mimetici uzvojnice

Oligobenzamidni skeleti i njegovi derivati kao mimetici uzvojnice



# Oligofenilni skeleti i njegovi derivati kao mimetici uzvojnice

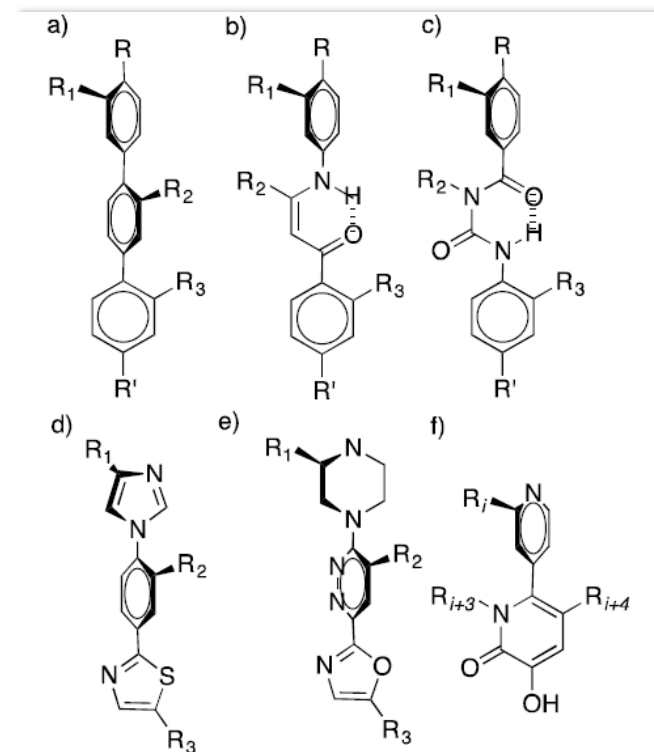
Inhibitori i antagonisti PPI!



(A) terfenilni skelet kao mimetik  $\alpha$ -uzvojnice

(B) polialaninska  $\alpha$ -uzvojnica (lijevo) i 3,2',2''-trimetilterfenilen (desno)

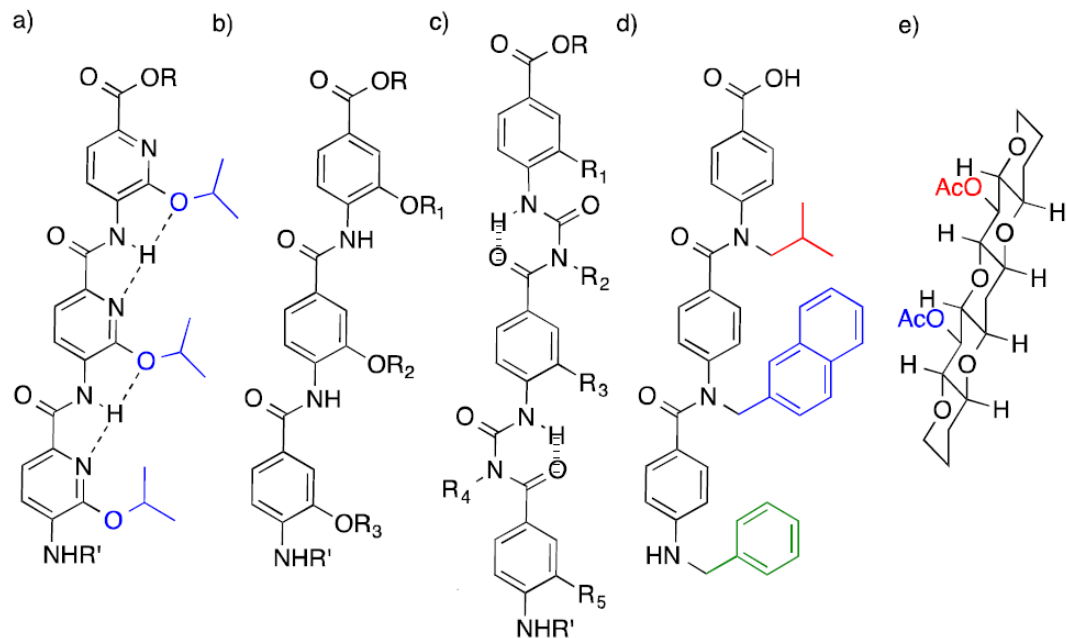
Udaljenost između dvaju supstituenata koji su smješteni na susjednim fenilnim podjedinicama iznosi 5 – 6 Å, što odgovara udaljenosti između aminokiselinskih ostataka  $i$ ,  $i+4$ ,  $i+7$   $\alpha$ -uzvojnice



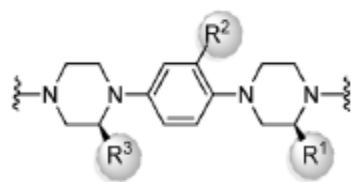
**Problem!**

hidrofoban karakter te dugotrajan i složen način pripreve terfenilnih spojeva

# Oligobenzamidni skeleti i njegovi derivati kao mimetici uzvojnice



- (a) derivati oligo-p-aminopikolinske kiseline  
(b-d) trisbenzamidni derivati  
(e) policiklički eteri kao skeletne okosnice



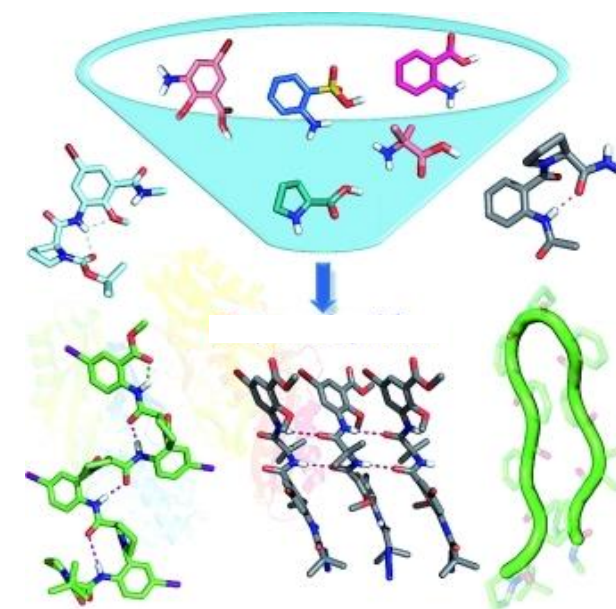
1,4-dipiperazinobenzen

1,4-dipiperazinobenzenski oligomeri

- dobra permeabilnost kroz staničnu membranu
- visok inhibicijski potencijal

## Nedostatak:

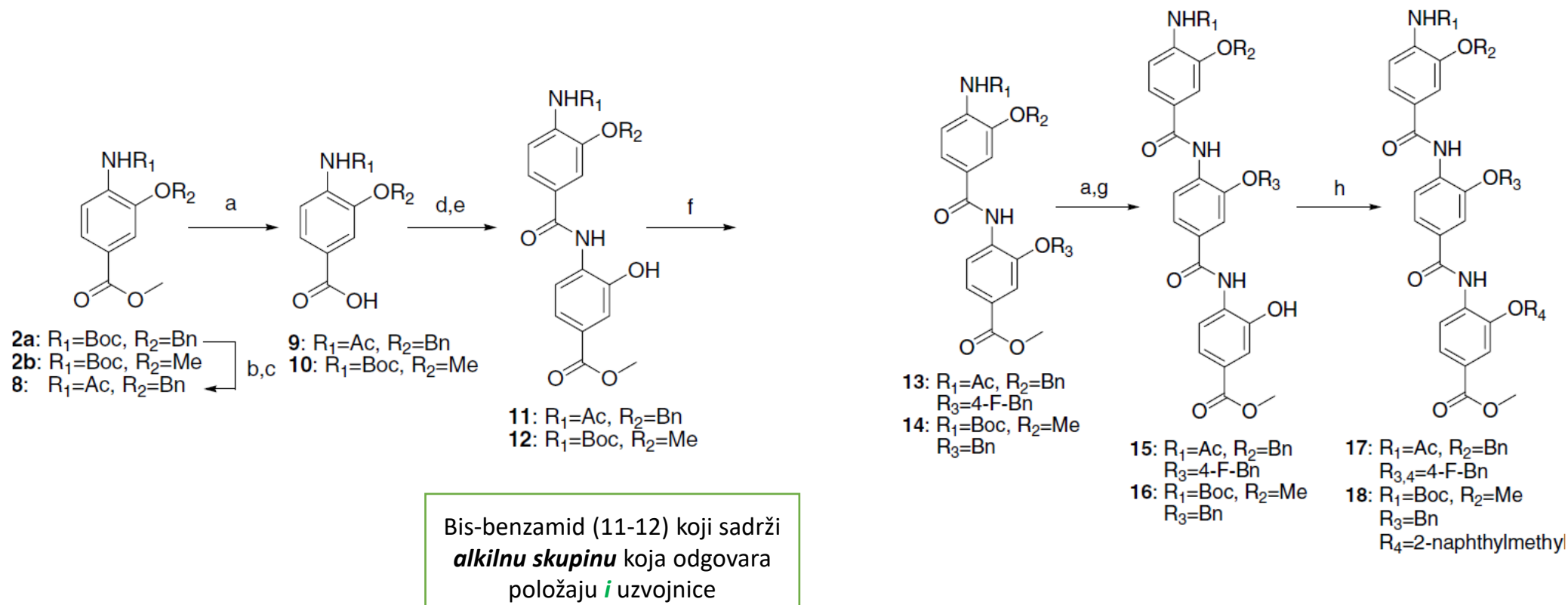
pokazuju smanjenu aktivnost  
kao inhibitori PPI



## Prednost:

Jednostavnija sinteza!

## Shematski prikaz priprave dva tris-benzamida kao mimetika $\alpha$ -uzvojnice iz glukagona



### Sintetski put za pripremu dva tris-benzamida kao mimetika $\alpha$ -uzvojnice iz glukagona

Reagensi i reakcijski uvjeti: **(a)** NaOH/MeOH/THF, 60 °C, 2 h; **(b)** 20% TFA/DCM, st, 2 h; **(c)** Ac<sub>2</sub>O, DMAP, st, 12 h, 97% preko 2 koraka (b, c); **(d)** SOCl<sub>2</sub>, THF, DMF (kat), 60 °C, 2 h; **(e)** metil 4-amino-3-hidroksibenzoat (5), DIPEA, DCM/THF, 0 °C → st, 2 h, 82% (11) i 77% (12) preko 3 koraka (a, d, e); **(f)** R<sub>3</sub>X, NaH, DMF, st, 2 h, 77% (13) i 80% (14); **(g)** 5, BOP, DIPEA, DCM, st, 2 h, 74% (15) i 77% (16) preko 2 koraka (a, g); **(h)** R<sub>4</sub>X, NaH, DMF, st, 2 h, 61% (17) i 86% (18).

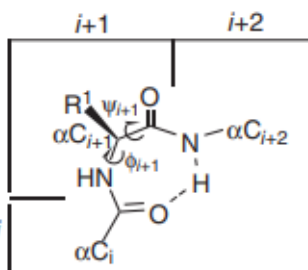
# Mimetici $\beta$ -okreta

Okreti su strukturni motivi, odnosno mjesta na kojima polipeptidni/proteinski lanac mijenja svoj smjer uslijed tvorbe intralančanih vodikovih veza u kojima najčešće sudjeluju Asn, Gly i Pro

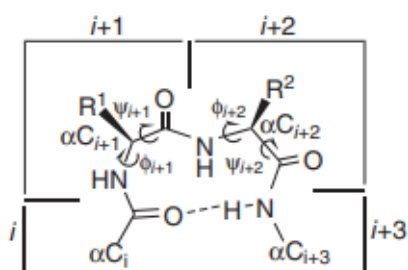
U proteinima su najrašireniji  $\beta$ -okreti

Mogu se klasificirati na  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -okrete

$\gamma$ - i  $\beta$ -okreti, koji opisuju okret tri, odnosno četiri uzastopna ostatka

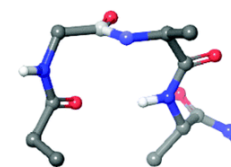
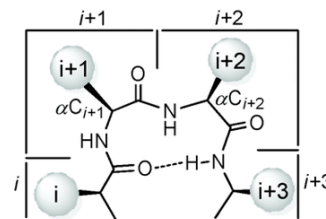


$\gamma$ -okret

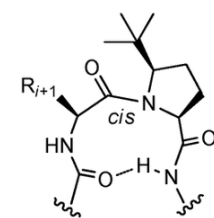
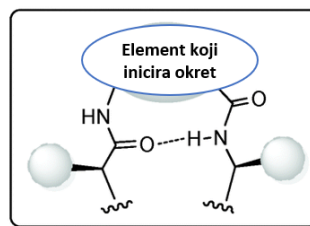


$\beta$ -okret

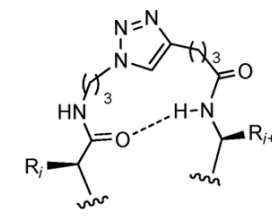
$\gamma$ -okreti, C=O (i) ... NH (i+2); čine ga 3 aminokiseline i vodikovom vezom stabiliziran 7-člani prsten  
 $\beta$ -okret, C=O (i) ... NH (i+3); čine ga 4 aminokiseline i vodikovom vezom stabiliziran 10-člani prsten



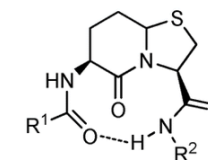
Element koji inicira okret



t-butilprolin kao inicijator  $\beta$ -okreta tip VI

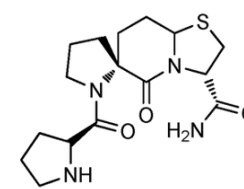
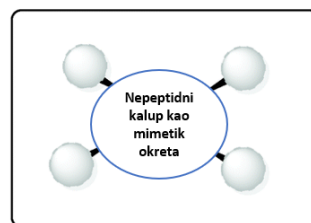


triazolni prsten (i trietilenki motiv) kao Pro-Gly izoster i inicijator okreta

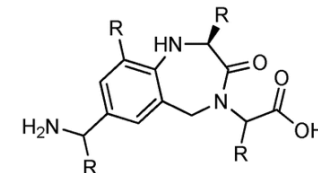


thiazolidino-2-piperazinon kao D-Ala-L-Pro izoster i inicijator  $\beta$ -okreta tip II' iz Gramidicina S

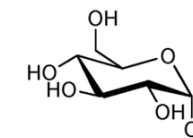
Nepeptidni kalup kao mimitik okreta



[5.6.5]spiro-biciklički laktam kao Pro-Leu-Gly i mimitik  $\beta$ -okreta

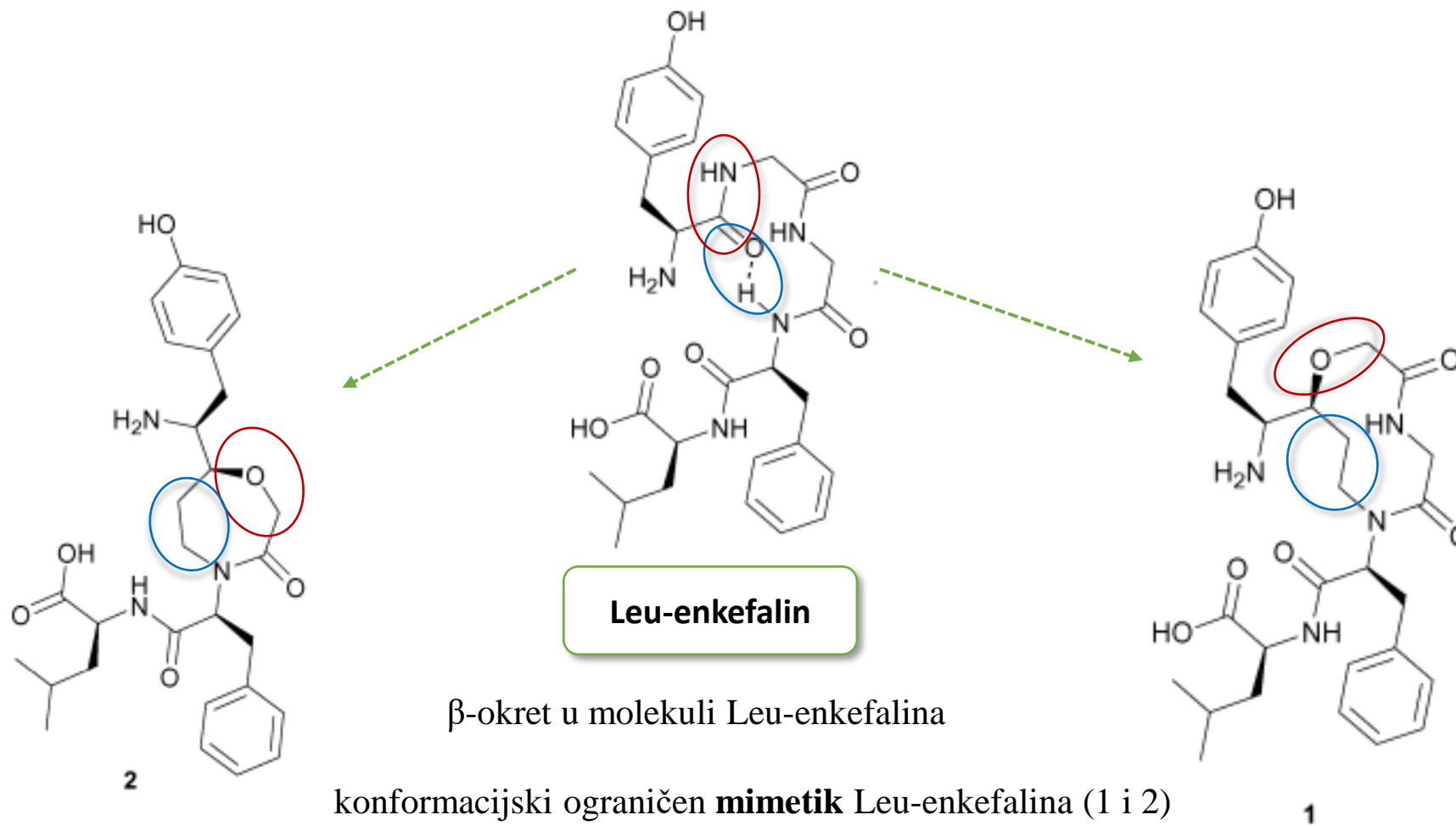


benzodiazepinski kalup kao mimitik  $\beta$ -okreta



B-D-glukozni kalup kao mimitik  $\beta$ -okreta

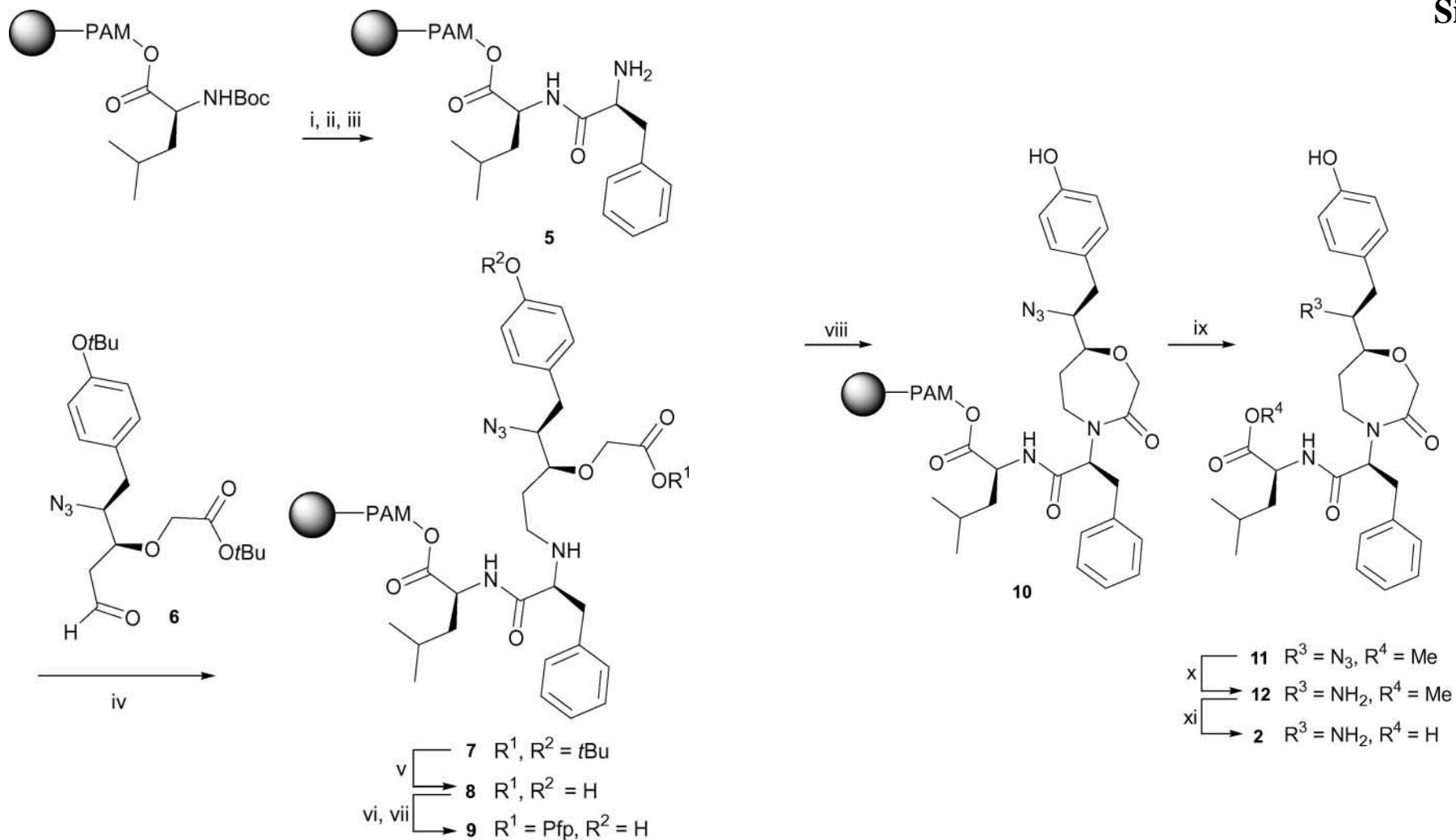
$\beta$ -okreti mogu podijeliti na 9 podskupina ( $\beta$ -okret tipa I, I', II, II'', VI<sub>a1</sub>, VI<sub>a2</sub>, VI<sub>b</sub>, VIII i IV)



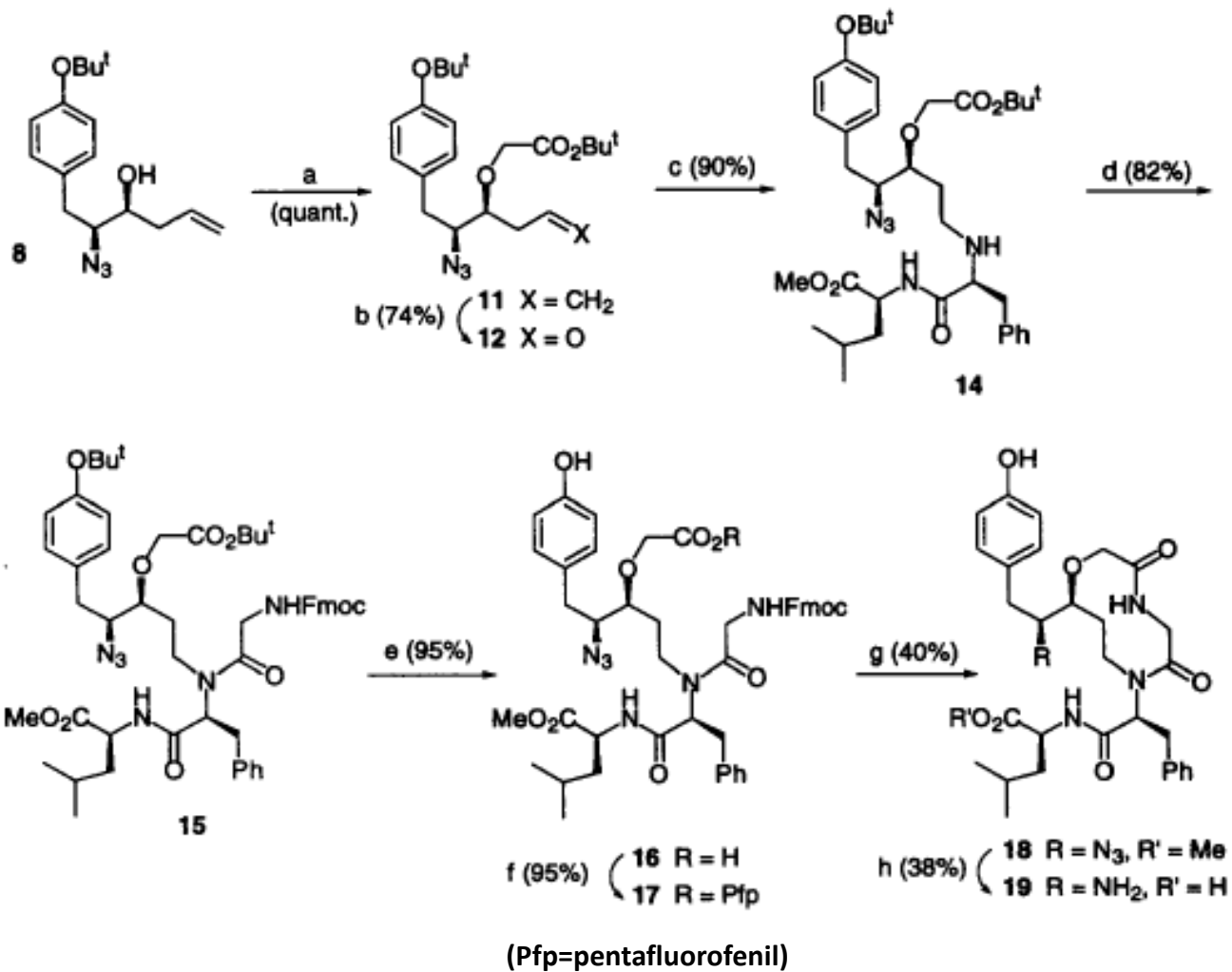
etilenski most zamjenjuje intramolekulsku vodikovu vezu između ostataka  $i$  te  $i + 3$   $\beta$ -okreta Leu-enkefalina

eterska izosterna skupina zamjenjuje amidnu skupinu između ostataka  $i$  te  $i + 1$



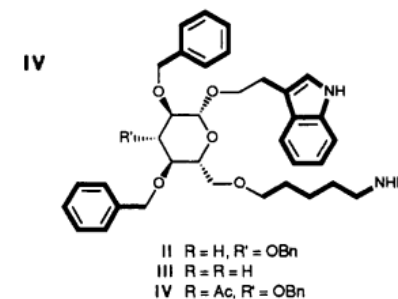
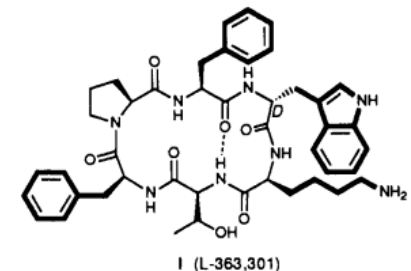
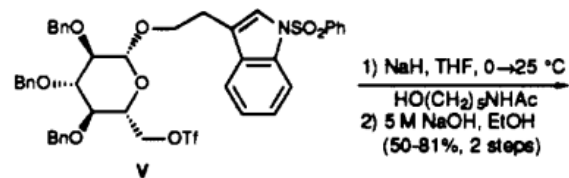
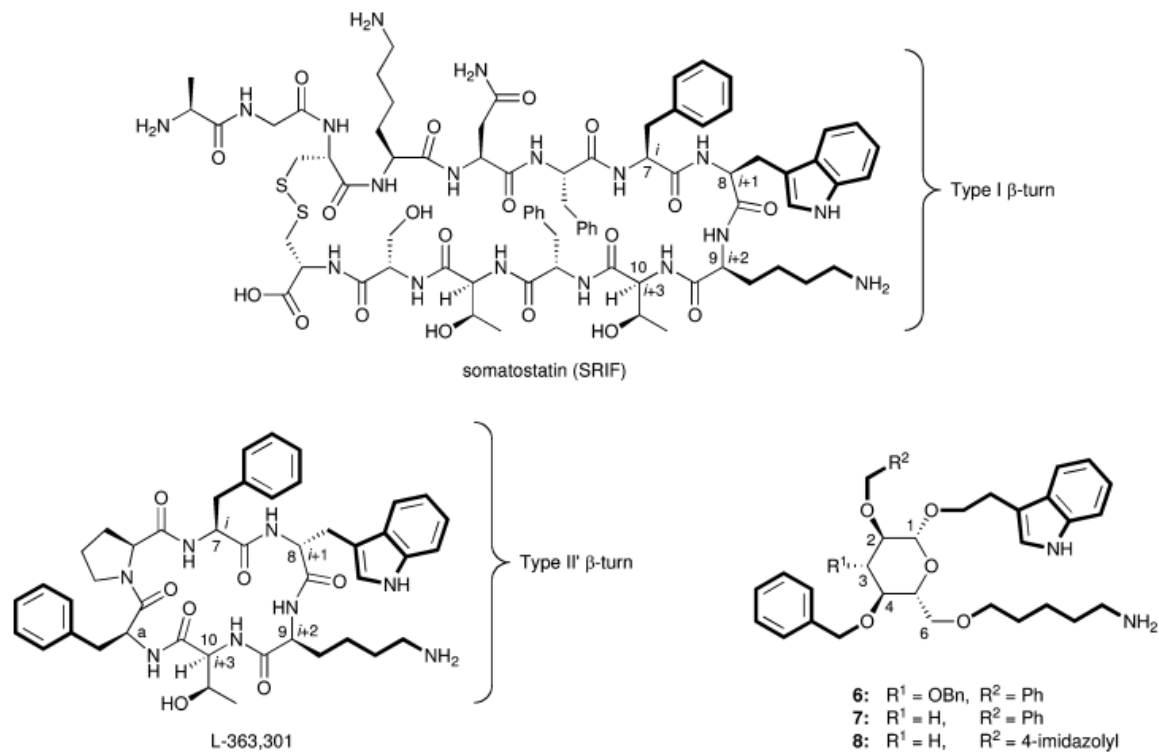


Reakcijski uvjeti: i) TFA (30%) in  $CH_2Cl_2$  ii) HOBt, DIC, otopina bromfenol plavo, Fmoc-Phe-OH, DMF; iii) piperidin (20%) in DMF; iv) **5**,  $Na(OAc)_3BH$ ,  $NEt_3$ ,  $CH_2ClCH_2Cl$ ; v) TFA (30%) in  $CH_2Cl_2$ ; vi) HCl (1 M) u 1,4-dioksan; vii) PfpOH, DIC, EtOAc; viii)  $NEt_3$ , 1,4-dioksan, reflux; ix) Na (0.22 M) in MeOH, 25% (sinteza na čvrstom nosaču); x)  $SnCl_2$ , PhSH, TEA, THF; xi) LiOH (0.1 M), THF, 56% (**11**).



Reakcijski uvjeti: a) BrCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu, Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, aq. 50% NaOH/C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> (1:1), st., 1 h. b) OsO<sub>4</sub> (kat.), NMO, THF/aceton/H<sub>2</sub>O (1:1:1), st., 2 h, zatim Pb(OAc)<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, benzene, 0 °C → st., 3 h; c) H-Phe-Leu-OMe (15), NaBH(OAc)<sub>3</sub>, NEt<sub>3</sub>, 1,2-dikloretan, st., 30 min; d) Fmoc-Gly-OH, DIC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → st., 16 h; e) HCO<sub>2</sub>H, st., 16 h; f) PfpOH, DCC, EtOAc, 0 °C, 2 h; g) DBU, dioksan, 100 °C, 4.5 h; h) aq. 1 M LiOH, dioksan, 10 °C → st., 2 h zatim H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 48 h.

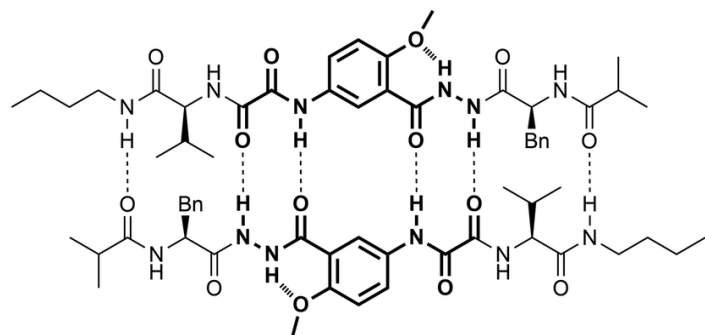
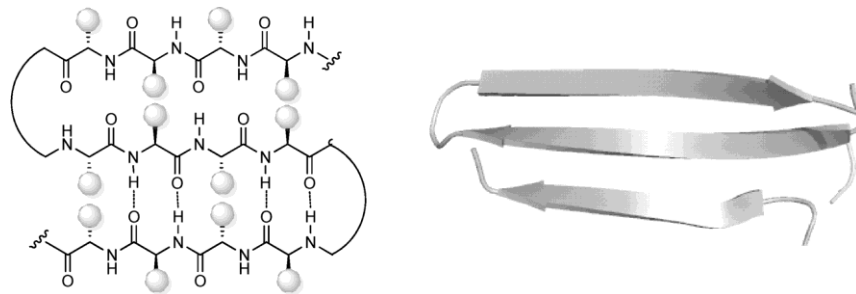
$\beta$ -D-glukoza pokazala se pogodnim skeletnim kalupom za smještanje aminokiselinskih ostataka prisutnih u regiji  $\beta$ -okreta somatostatina



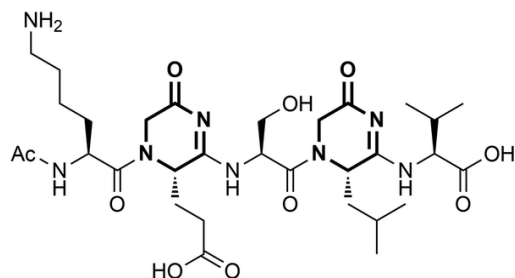
Mimetik somatostatina s glukopiranoznim kalupom koji ograničava konformacijsku fleksibilnost  
 Somatostatin (SRIF); L-363,301 (potencijalni agonist)  
 Monosaharidni peptidomimetik

Ta dva ciklička peptida sadrže jednak motiv  $\beta$ -okreta kojeg čini tetrapeptidna sekvenca Phe-Trp-Lys-Thr (D-Trp u slučaju L-343,301), u kojem su triptofanski i lizinski ostatak na položajima  $i+1$  te  $i+2$  ključni za vezivanje

# Mimetici $\beta$ -ploča



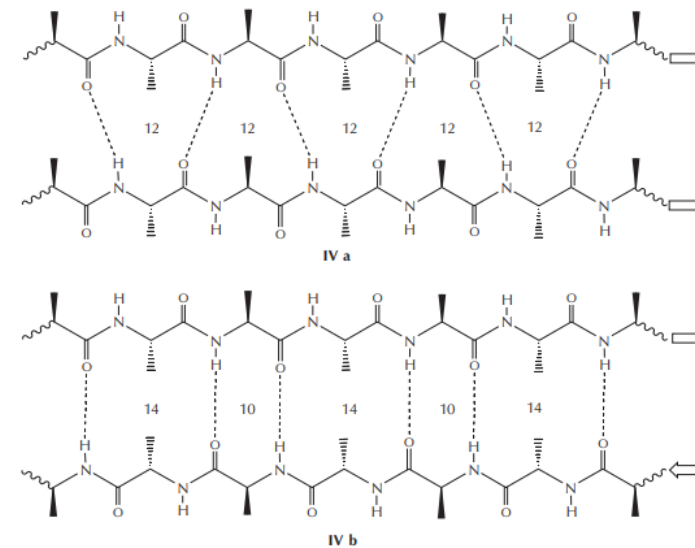
dimer  $\beta$ -ploče peptida i-Pr-Phe-Hao-Val-Bu



4,5-dihidro-2(3H)-pirazinon u peptidomimetiku; koji inhibira PPI između  $\alpha$ -1-sintropina s nNOS

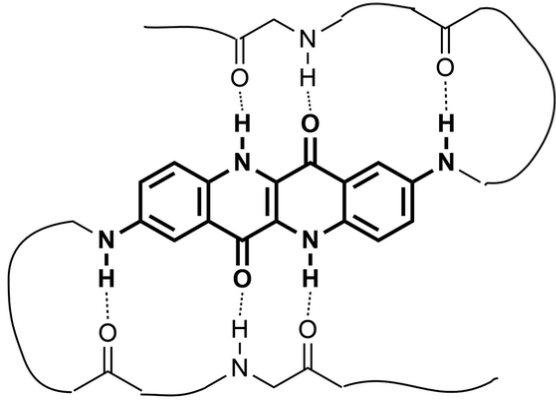
Hao; 5-hidrazino-2-metoksibenzojeva kiselina (sekvenca Phe-Hao-Val) predstavlja tripeptidni mimetik  $\beta$ -niti

Druge često korištene kiseline kojima se stvara preduvjet za formiranje izdužene konformacije svojstvene  $\beta$ -niti su 1,6-dihidro-3(2H)-piridinon (Ach), D-Pro-DADME (1,2-diamino-1,1-dimetiletan) i 4,5-dihidro-2(3H)-pirazinonski dio

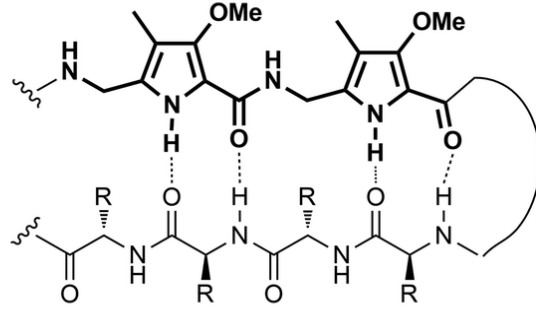


U paralelnim  $\beta$ -pločama (IVa) dijelovi lanca orijentirani su u istom smjeru s obzirom na N- i C-terminalni kraj, a vodikove veze između peptidnih skupina u tim segmentima ravnomjerno su pomaknute i zatvaraju određeni kut u odnosu na drugi lanac te tvore 12-člane prstenove. Kod antiparalelnih  $\beta$ -ploča (IVb) izmjenjuju se 10- i 14-člani prstenovi, a vodikove su veze gotovo okomite na susjedni segment

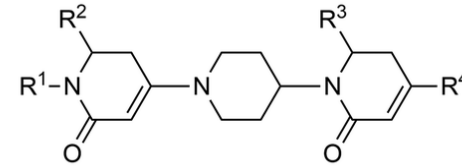
Zamjenom jednog segmenta peptidne okosnice aromatskim okvirom poput epindolidiona ili aminokiselinska sekvence koje uključuju metoksirole, stvaraju se preduvjeti za zauzimanje izdužene konformacije svojstvene  $\beta$ -niti; na taj način dizajniran je  $\beta$ -lanac kao inicijator  $\beta$ -ploče



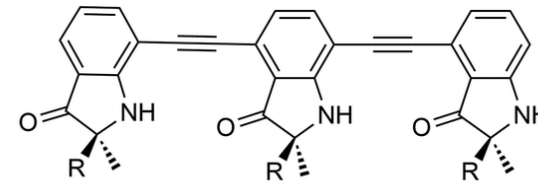
epindolidion kao mimetik  $\beta$ -ploče



metoksirolni oligomeri kao mimetici  $\beta$ -ploče

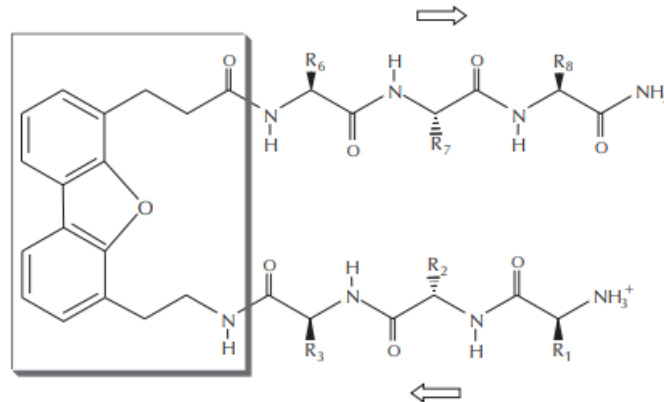
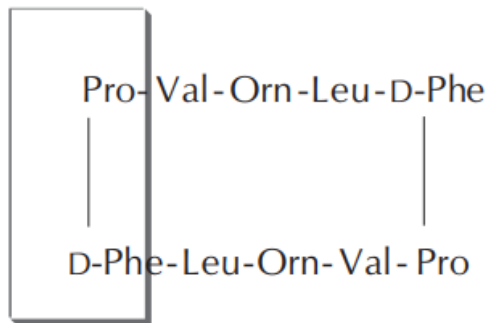


oligomer piperidin-piperidona kao mimetik  $\beta$ -ploče



oligomer 2,2-disupstuiranog-indolin-3-ona kao mimetik  $\beta$ -ploče

Oligomeri sastavljeni od 2,2-disupstuiranih-indolin-3-ona i piperidin-piperidinona, koji posjeduju ograničenu slobodu rotacije, mogu se koristiti kao mimetici  $\beta$ -niti



Zamjenom Pro-D-Phe kao inicijatora  $\beta$ -okreta u antibiotiku gramicidinu S s rigidnim heterocikličkim kalupom, dok je drugi segment Pro-D-Phe uklonjen

# ZAKLJUČAK

Područje peptidomimetike započelo je modifikacijama u strukturi malih peptida, što je uglavnom rezultiralo promjenom lokalne konformacije, ali često nije bilo dovoljno za promjenu biokemijskih obilježja ishodnog peptida

Želja za razumijevanjem, kontrolom, kao i mogućnošću oponašanja prirodnih peptida rezultirala je sve većim interesom za razvojem (sintezom) spojeva koji mogu oponašati sekundarne strukture

*Prikazan je koncept izgradnje biološki aktivnih molekula koje mogu oponašaju peptide/proteine te se odlikuju povećanom stabilnošću i unaprijeđenom biološkom aktivnošću*

Pored toga potreba za globalnim konformacijskim promjenama ostaje glavni pokretač u potrazi za strukturnim elementima koji mogu potaknuti stvaranje određene sekundarne i tercijarne strukture

## Sinteza u otopini

Aktivacija  
karboksilnog kraja  
aminokiseline



Izolacija  
međuprodukta



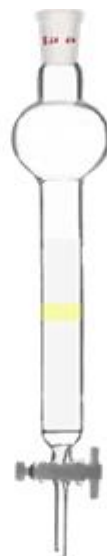
Reakcija  
kondenzacije  
(„coupling”)



Izolacija  
produkta

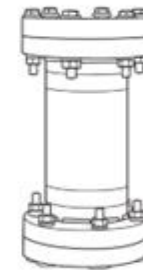


Čišćenje produkta



→ ... →  
Uzastopno  
ponavljanje  
reakcije  
kondenzacije i  
deprotekcije  
(produljenje  
peptidnog  
lanca)

Čišćenje  
produkta



Analiza  
primjenom  
analitičkih  
metoda

## Sinteza na čvrstom nosaču

Reakcije  
kondenzacije  
(„coupling”)

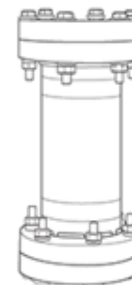


→ ... →  
Uzastopno ponavljanje  
reakcije kondenzacije i  
deprotekcije  
(produljenje peptidnog  
lanca)

‘Skidanje’  
produkta sa smole  
(čvrstog nosača)



Čišćenje  
produkta



Analiza  
primjenom  
analitičkih  
metoda

*Zahvaljujem na pažnji 😊*