

Σύγχρονες Προσεγγίσεις στο Σχεδιασμό και Σύνθεση Αναλόγων του RGD ως Αντιθρομβωτικών και Αντικαρκινικών Φαρμάκων

Κ. Μπελεκούκας¹, Γ. Σαρηγιάννης¹, Γ. Σταυρόπουλος¹, Τ. Μαυρομούστακος²

¹Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 265 00, Πάτρα

²Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Βασ. Κωνσταντίνου 48, 116 38, Αθήνα

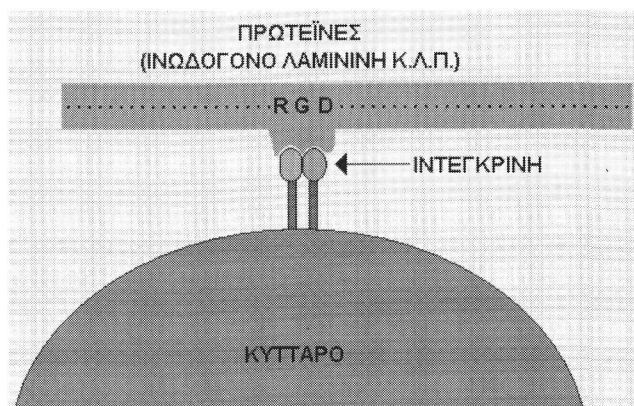
Περίληψη □ Στο δηλητήριο ορισμένων φιδιών εμπεριέχονται πεπτιδικές ουσίες που περιέχουν την δομή RGD ή παρόμοιά της που δρουν στους υποδοχείς των ιντεγκρινών. Η δράση των ουσιών αυτών οφείλεται στην παρεμπόδιση συγκόλλησης των αιμοπεταλίων. Η ιδιότητα αυτή των πεπτιδικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε στον σχεδιασμό συνθέσεως αντιθρομβωτικών φαρμάκων. Τα συντιθέμενα πεπτίδια έδειξαν ότι επιπρόσθετα παρουσιάζουν αντιαγγειογενετικές ιδιότητες και επομένως μπορούσαν να χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του καρκίνου. Το άρθρο επισκόπησης αυτό περιέχει πληροφορίες για τους βιολογικούς φορείς που εμπλέκονται στην δράση των πεπτιδικών αναλόγων του RGD. Επίσης συζητώνται οι μέθοδοι στιγμής ερευνητικές δραστηριότητες καθώς και οι προοπτικές που αναπτύσσονται στο ερευνητικό αυτό πεδίο.

1. Εισαγωγή

1.1 Το τριπεπτίδιο RGD

Το τριπεπτίδιο RGD (Arg-Gly-Asp) απαντάται σε αρκετές πρωτεΐνες που βρίσκονται μεταξύ των κυττάρων και οι οποίες παράγονται από αυτά (εξωκυττάρια ουσίες). Μερικές από αυτές είναι το ινωδογόνο, η ιννοσυνδετίνη, η λαμινίνη και η βιτρονεκτίνη (vitronectin). Αυτές με τη σειρά τους προσδένονται σε διάφορες πρωτεΐνες με την γενική ονομασία ιντεγκρίνες για να εξασκήσουν την βιολογική τους δράση (Σχήμα 1).

Η βιολογική σπουδαιότητα του RGD έγκειται στο ότι αλλάζει την διαμόρφωση της ιντεγκρίνης. Εκτός από το RGD στις ιντεγκρίνες προσδένονται και πρωτεϊνικά πεπτίδια με αλληλουχίες KGD ή παρόμοιες.



Σχήμα 1. Σύνδεση κυττάρου - πρωτεϊνών μέσω ιντεγκρινών

1.2 Εξωκυττάρια ουσίες

Οι εξωκυττάρια ουσίες περιλαμβάνουν 3 είδη πρωτεϊνών¹: α) δομικές πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη, β) συγκολλητικές πρωτεΐνες (ή πρωτεΐνες σύνδεσμοι), όπως η ιννοσυνδετίνη, η λαμινίνη, το ινωδογόνο και η βιτρονεκτίνη, και γ) πρωτεογλυκάνες.

Μία από τις ιδιότητες των εξωκυττάρια ουσιών είναι η συμπλοκοποίησή τους η οποία γίνεται στην επιφάνεια του κυττάρου μέσω των συγκολλητικών πρωτεϊνών (ινωδογόνο, ιννοσυνδετίνη κ.τ.λ.^{1,2}). Η σύνδεση μεταξύ δομικών πρωτεϊνών, πρωτεογλυκανών και πρωτεϊνών συνδέσμων επιφέρει την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Αρχικά (δεκαετία του 1980) ο ρόλος των εξωκυττάρια ουσιών περιοριζόταν στη μηχανική στήριξη του κυττάρου. Όμως στην τελευταία δεκαετία έγινε κατανοητό ότι ρυθμίζουν επιπρόσθετες λειτουργίες, όπως τη μετανάστευση των κυττάρων, την κινητικότητά τους, τη δυνατότητα προσκόλλησης στο κύτταρο εξωκυττάρια παραγόντων, τη διαφο-

ροποίηση κυττάρων και την εμβρυική ανάπτυξη. Επίσης ερευνητικά αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτές εμπλέκονται στην αναπαραγωγή των κυττάρων, στην απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), στην αγγειογένεση και στην ρύθμιση ενζύμων, όπως οι πρωτεάσες και σχεδόν σε οποιαδήποτε κυτταρική διεργασία.

1.3 Ιντεγκρίνες

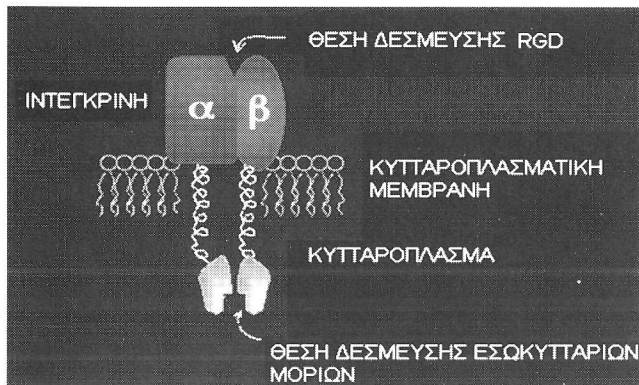
Οι ιντεγκρίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο και οι οποίες απαρτίζονται από δύο διαφορετικές υπομονάδες:

Την α-υπομονάδα και μια μικρότερη β-υπομονάδα οι οποίες προβάλλουν εκτός του κυττάρου (Σχήμα 2)³. Και οι δύο υπομονάδες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό δεσμού με τον υποκαταστάτη τους. Κατά το σχηματισμό δεσμού στις διαθέσιμες θέσεις της υπομονάδας α- πρέπει να δεσμευτούν κατιόντα.

Οι ιντεγκρίνες είναι ένα μέρος μιας μεγάλης οικογένειας πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας. Μέχρι σήμερα είναι γνωστές 16 α- και 8 β- υπομονάδες ιντεγκρινών στο ζωικό βασίλειο με τους ακόλουθους 22 συνδυασμούς (Πίνακας 1). Ο συνδυασμός των υπομονάδων αυτών καθορίζει την εκλεκτικότητά τους έναντι διαφόρων μορίων. Το τελικό τμήμα της ιντεγκρίνης που βρίσκεται μέσα στο κύτταρο έχει θέσεις δέσμευσης διαφόρων μορίων και δρα σαν μεταγωγέας σήματος⁴.

Οι ιντεγκρίνες διαφέρουν από άλλους υποδοχείς που υπάρχουν στην επιφάνεια του κυττάρου στο ότι δεσμεύουν τον υποκαταστάτη τους με χαμηλή χημική συγγένεια (10^6 - 10^9 l/mol). Επίσης είναι πολλαπλάσιες στον αριθμό (10-100 φορές) σε σύγκριση με άλλους υποδοχείς. Δεσμεύουν τον υποκαταστάτη τους όταν υπερβούν τοπικά έναν κρίσιμο αριθμό και δεχτούν ένα ερέθισμα το οποίο συσσωματώνει την τυχαία κατανομή τους στο κύτταρο.

Η βιολογική δράση των ιντεγκρινών οφείλεται στη χαμηλή χημική συγγένειά με τον υποκαταστάτη. Αν υπήρχε ισχυρός δεσμός μεταξύ ιντεγκρίνης και ενός υποκαταστάτη, τότε αυτός θα απέτρεπε το κύτταρο να δεσμευτεί με άλλους υποκαταστάτες και θα περιοριζόταν στο να εκτελέσει μόνο την λειτουργία που του υπαγορεύει ο συγκεκριμένος δεσμευμένος υποκαταστάτης με την ιντεγκρίνη.



Σχήμα 2. Δομή των ιντεγκρινών

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ ΤΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΤΟΥΣ

$\alpha \backslash \beta$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$
$\alpha 1$	✓	=	=	=	=	=	=	=
$\alpha 2$	✓	=	=	=	=	=	=	=
$\alpha 3$	✓	=	=	=	=	=	=	=
$\alpha 4$	✓	=	=	=	=	✓	=	=
$\alpha 5$	✓	=	=	=	=	=	=	=
$\alpha 6$	✓	=	=	✓	=	=	=	=
$\alpha 7$	✓	=	=	=	=	=	=	=
$\alpha 8$	✓	=	=	=	=	=	=	=
$\alpha 9$	✓	=	=	=	=	=	=	=
αb	=	✓	=	=	=	=	=	=
αd	=	✓	=	=	=	=	=	=
αe	=	✓	=	=	=	=	=	=
αv	✓	=	✓	=	✓	✓	=	✓
αx	=	✓	=	=	=	=	=	=
αIIb	=	=	✓	=	=	=	=	=
$\alpha IELb$	=	=	=	=	=	✓	=	=

1.4 Δομή των ιντεγκρινών

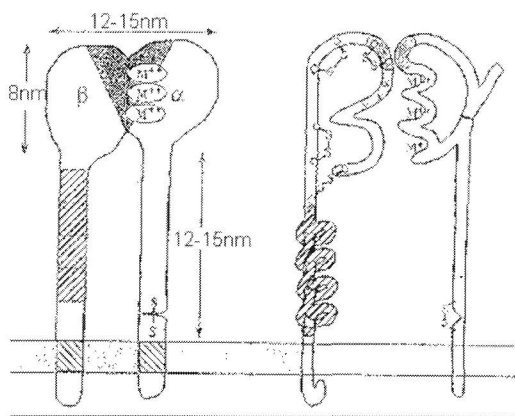
Το τμήμα των ιντεγκρινών που βρίσκεται εκτός κυτταρικής μεμβράνης είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό που βρίσκεται μέσα στο κύτταρο (Σχήμα 2). Ενδοκυτταρικά οι ιντεγκρίνες περιέχουν μέχρι 60 αμινοξέα (εξαιρέση αποτελεί η β4 υπομονάδα η οποία περιέχει περίπου 1.000 αμινοξέα)³.

Η δομή των α- υπομονάδων είναι πολύ παρόμοια. Όλες περιέχουν 7 ομόλογες επαναλήψεις των 30-40 αμινοξέων στην εξωκυττάρια δομή διακοπτόμενες από σειρές των 20-30 αμινοξέων. Στον εξωκυττάριο χώρο υπάρχουν 3 ή 4 επαναλήψεις που περιέχουν αλληλουχίες με ικανότητα δέσμευσης κατιόντων (Σχήμα 3).

Επίσης όλες οι α- υπομονάδες έχουν την ίδια αλληλουχία 5 αμινοξέων (GFFKR) μέσα στο κυτταρόπλασμα ακριβώς κάτω από την περιοχή που διαπερνούν την μεμβράνη. Ο ακριβής ρόλος τους δεν είναι αποσαφηνισμένος.

Εκφράζεται η άποψη ότι πιθανά να βοηθούν στην συγκρότηση του διμερούς της ιντεγκρίνης. Οι α- υπομονάδες χωρίζονται σε δύο ομάδες βάσει ορισμένων δομικών διαφορών τους. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τις $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 1$, αM και αX .

Η δομική ομοιότητά τους έγκειται στην κοινή παρουσία μιας περιοχής 180 αμινοξέων (I-περιοχή) μεταξύ της δεύτερης και τρίτης επανάληψης αμινοξέων η οποία μάλλον εμπλέκεται στην δέσμευση του υποκαταστάτη. Η δεύτερη



Σχήμα 3. Οι εξωκυττάρειες υπομονάδες α και β των ιντεγκρινών. Με M^+ παριστάνονται οι θέσεις δέσμησης των κατιόντων

ομάδα αποτελείται από τις α_3 , α_5 , α_6 , α_7 , α_8 , α_{IIb} , α_v και α_{IELb} . Αυτές αποτελούνται από δύο αλυσίδες, μια ελαφριά που βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα, στην μεμβράνη και λίγο στην εξωκυττάρια περιοχή (περίπου 25kD) και μια βαριά που καταλαμβάνει την υπόλοιπη εξωκυττάρια περιοχή (περίπου 120 kD). Συναντώνται σε πολλούς ιστούς, όπως στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, στα αιμοπετάλια, στα μακροφάγα, στα λευκά αιμοσφαίρια, στους οστεοκλάστες (κύτταρα υπεύθυνα για την αποδόμηση των οστών) κ.τ.λ. (Πίνακας 2).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΙΣΤΟΙ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΑ ΟΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΟΙ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ

	ΚΥΤΤΑΡΑ
ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ	ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ
ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ	Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ
ΘΥΜΟΚΥΤΤΑΡΑ	ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ
ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΚΑΙ	ΜΝΗΜΟΝΙΚΑ
ΚΑΡΔΙΑΚΟΥΣ ΜΥΕΣ	Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ
ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ	ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΑ
ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΑ	SCHWANN ΚΥΤΤΑΡΑ
Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΛΕΙΑ ΜΥΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΗΠΑΤΩΜΑΤΑ	ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ

2. Σχεδιασμός RGD αναλόγων στην ανάπτυξη αντιθρομβωτικών και αντικαρκινικών φαρμάκων

2.1 Ανακάλυψη πεπτιδικών αναλόγων RGD

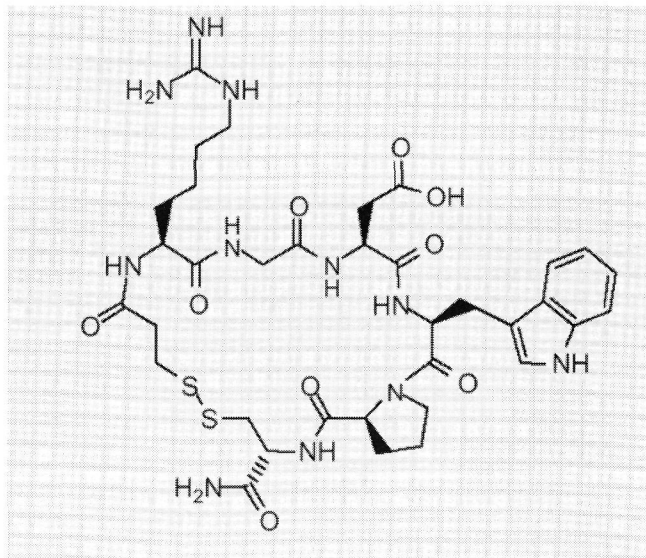
Για πολλά χρόνια ήταν γνωστό ότι το δηλητήριο ορισμέ-

νων φιδιών δημιουργούσε ακατάσχετη αιμορραγία καθώς περιείχε πεπτιδικές ουσίες που απέτρεπαν την συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Στη δεκαετία του '80 βρέθηκε ότι ο στόχος αυτών των πεπτιδίων ήταν οι υποδοχείς των $\alpha_{IIb}\beta_3$ ιντεγκρινών. Οι πεπτιδικές αυτές ουσίες περιείχαν την τυπική δομή RGD ή παράγωγά της στην θέση πρόσδεσης. Η ιδιότητα αυτή των πεπτιδίων του δηλητηρίου των φιδιών θα μπορούσε να χρησιμεύσει σε μελλοντική προοπτική συνθέσεως αντιθρομβωτικών φαρμάκων. Η σύνθεση τέτοιων πεπτιδίων έδειξε ότι επιπρόσθετα είχαν και αντιαγγειογενετικές ιδιότητες, δηλαδή σταματούσαν τη σύνθεση των λείων μυϊκών κυττάρων απαραίτητων για την ανάπτυξη του καρκίνου και των μεταστάσεών του (συνεπώς θα συμβάλλουν στην καταπολέμηση του καρκίνου)⁵.

2.2 Σχεδιασμός παραγώνων RGD

Το επόμενο βήμα ήταν να συντεθούν μικρά πεπτίδια που να περιέχουν την αλληλουχία αυτή και να μελετηθεί η δράση τους σε μια προσπάθεια βελτίωσης της βιοδραστικότητάς τους. Από τα συντιθέμενα πεπτίδια τα κυκλικά παράγωγα αποδείχτηκαν τα περισσότερο βιοδραστικά. Τα συντιθέμενα όμως πεπτίδια στερούνταν εκλεκτικότητας γιατί είχαν την τάση να ενώνονται και με άλλες ιντεγκρίνες με διαφορετικούς βαθμούς δίνοντας έτσι ανεπιθύμητες πλευρικές αντιδράσεις.

Δοκιμάστηκαν επίσης διάφορες αλληλουχίες με μερικώς τροποποιημένο το αρχικό RGD πεπτίδιο (π.χ., αλλαγή ενός -KGD- ή δύο αμινοξέων, προσθήκη και άλλων αμινοξέων, προσθήκη πλευρικών ή και προστατευτικών ομάδων). Με το σκεπτικό αυτό παρασκευάστηκε η Ιντεγκριλίνη (Integrilin) η οποία είναι ένα επταπεπτίδιο που περιέχει την τριάδα των αμινοξέων KGD (Σχήμα 4). Η Ιντεγκριλίνη είναι ένα φαρμακευτικό προϊόν το οποίο έγινε αποδεκτό από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Φαρμάκων (Federal Drug Association-FDA) το 1998.



Σχήμα 4. Το επταπεπτίδιο ιντεγκριλίνη

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΜΕΡΙΚΑ ΚΥΚΛΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ RGD

		$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_{IIb}\beta_3$
	Πεπτιδίο	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
1.	Αρχικό GRGDSPK	0.21	1.7
2.	cyclo(RGDfV), TFA	0.0025	1.7
3.	cyclo(N(Me)RGDfV)	0.0055	5.2
4.	cyclo(R-Sar-DfV)	0.045	>10
5.	cyclo(RG-N(Me)D-fV)	0.56	>10
6.	cyclo(RGD-N(Me)f-V)	1.4	>10
7.	cyclo(RGDf-N(Me)V-)	0.00058	0.86

Η Ιντεγκριλίνη δεν μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα (per os) γιατί καταστρέφεται από τα γαστρικά υγρά. Έτσι η χορήγησή της γίνεται ενδοφλέβια^{6,7}.

2.3 N-Μεθυλίωση αμινοξέων

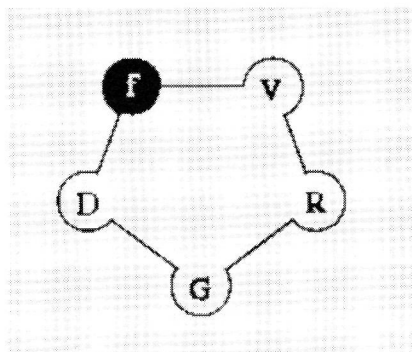
Η N-μεθυλίωση των συνθετικών πεπτιδίων κατέστη ένα χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης. Έχει μάλιστα οδηγήσει σε ανάλογα (αγωνιστές ή ανταγωνιστές) με καλύτερη βιοδραστικότητα, αυξημένο χρόνο ημιζωής καθώς και αυξημένη σταθερότητα (Πίνακας 3).

Παρατηρείται στον πίνακα 3 ότι εκτός των κυκλικών παραγώγων 5 και 6 όλα τα υπόλοιπα δείχνουν αυξημένη δράση έναντι του αρχικού πεπτιδίου που είχε απομονωθεί (GRGDSPK) στην $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνη.

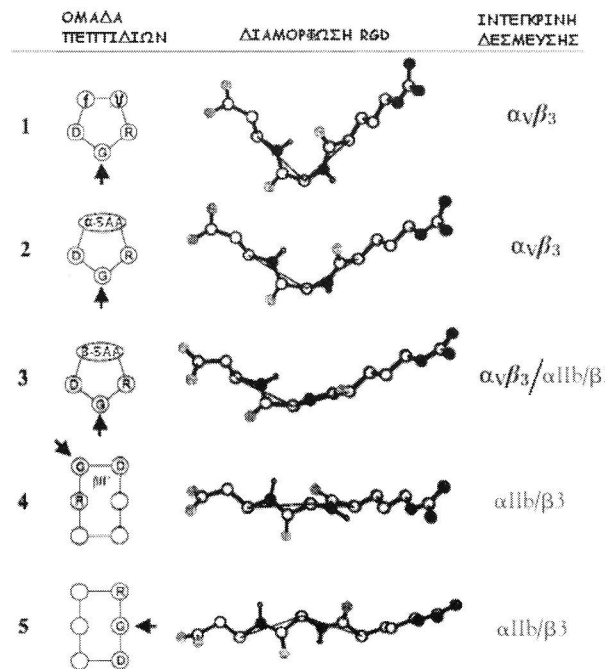
Η σειρά μειούμενης δραστικότητας είναι $7 > 2 > 3 > 4 > 1$. Ειδικά το cyclo(RGDf-N(Me)V) βρίσκεται σε στάδιο κλινικών δοκιμών για την ευεργετική του δράση (φάση II) σε διάφορα είδη σαρκώματος, καρκίνου του εγκεφάλου και στατικών καρκίνων⁸.

Αναφορικά με τα πεπτιδικά ανάλογα που έχουν μέχρι σήμερα συντεθεί μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα:

Τα τρία αμινοξέα που αποτελούν το τριπεπτίδιο RGD σχηματίζουν γωνία η οποία εξαρτάται από τη διαμόρφωσή τους την οποία λαμβάνουν όταν επιπρόσθετα αμινοξέα

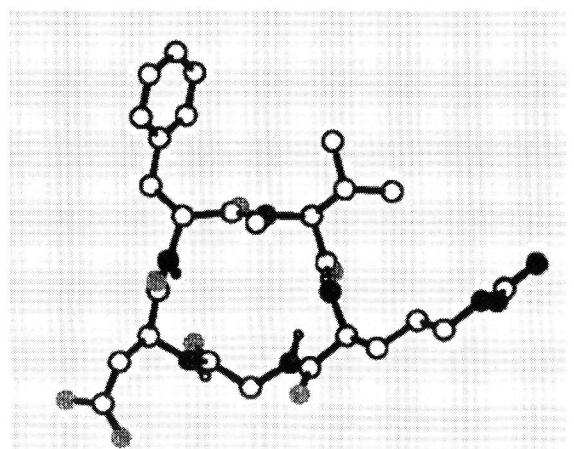


Σχήμα 5. Τυπική δομή του πεπτιδίου (RGDfV)

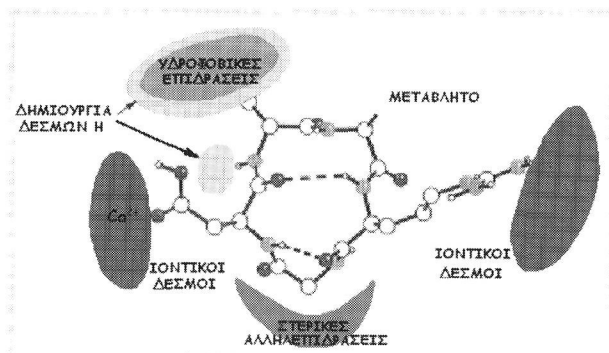


Σχήμα 6. Σχέση διαμόρφωσης πεπτιδίου και ανάλογης δέσμευσης ιντεγκρίνης

σχηματίζουν ένα κυκλικό πεπτίδιο (Σχήματα 5 και 6). Στην πρωτεΐνη Decorsin (μια πρωτεΐνη βδέλλας) η οποία περιέχει το τριπεπτίδιο RGD, τα αμινοξέα Asp και Arg εμφανίζονται με τις πλευρικές αλυσίδες τους σχεδόν αντίθετες⁹. Τα κυκλικά πεπτιδικά cyclo(RGDfV) και cyclo(RGDf-N(Me)V) (Σχήμα 7) παρουσιάζουν μείωση της αγγειογένεσης που προκαλεί ο καρκίνος στο μοντέλο της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης εμβρύου κοτόπουλου και αυξημένη δράση αντίστοιχα (Πίνακας 3). Οι απαιτήσεις για βιοδραστικότητα σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα μελέτες απεικονίζονται στο Σχήμα 8. Σ' αυτό δείχνεται η κατανομή υδροφοβικών επιδράσεων στο μόριο καθώς και η θέση των ιοντικών και υδρογονικών δεσμών. Στερεικά



Σχήμα 7. Προσομοίωση της τρισδιάστατης δομής του cyclo(RGDf-N(Me)V)



Σχήμα 8. Το γενικό μοτίβο

φαινόμενα εμφανίζονται στην θέση της γλυκίνης γι' αυτό και όπως αναφέρθηκε αντικατάστασή της από άλλο αμινοξύ οδηγεί σε απώλεια δράσης του μορίου¹⁰.

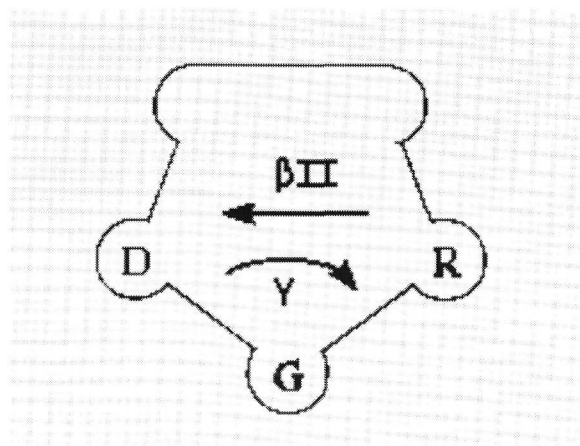
Με τη βοήθεια Υπολογιστικής Χημείας και Μοριακών Γραφικών τα κυκλικά πεπτίδια που περιέχουν RGD αλληλουχία έχει βρεθεί ότι έχουν την διαμόρφωση βII/γ-στροφής (Σχήμα 9)^{8,9}.

2.4 Αντικατάσταση αμινοξέων

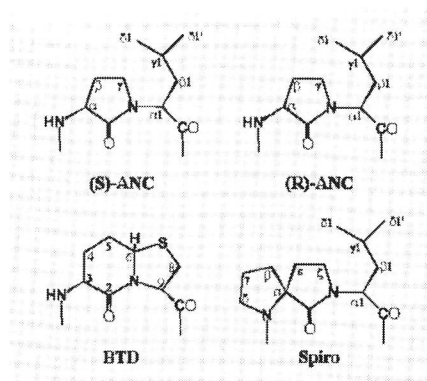
Μια άλλη προσέγγιση για την κατανόηση της διαμόρφωσης των πεπτιδίων αυτών ήταν η αντικατάσταση των αμινοξέων f, V με ορισμένα οργανικά μόρια που μιμούνται τη βII/γ στροφή. Το RGD είναι πολύ ευαίσθητο στις αλλαγές αμινοξέων. Για παράδειγμα αντικατάσταση της Gly με D-Ala, όπως φαίνεται στο μόριο 6 του πίνακα 4, επιφέρει σημαντική μείωση της δραστηριότητας. Στις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν τα μόρια του σχήματος 10 και λήφθηκαν τα αποτελέσματα του πίνακα 4. Παρατηρούμε διαφορά στην δραστηριότητα των (R)- και (S)-ANC καθώς επίσης και έλλειψη βιοδραστηριότητας στο μόριο 4⁸.

2.5 Τεχνικές φιλτραρίσματος

Οι τεχνικές φιλτραρίσματος υψηλών αποδόσεων στην σύνθεση των πεπτιδίων έχουν επίσης βοηθήσει στην μελέτη πολλών διαμορφώσεων διαφόρων πεπτιδίων και έχει υπολογιστεί ότι η θέση πρόσδεσης του RGD στην ιντεγκρίνη είναι μια σχισμή βάθους τουλάχιστον 11Å.



Σχήμα 9. Το πρότυπο της βII/γ στροφής



Σχήμα 10. Οργανικά μόρια που μιμούνται τη βII/γ στροφή

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται ανάλογα του RGD τα οποία περιέχουν μη φυσικά D- και φυσικά L- αμινοξέα (μικρά και κεφαλαία γράμματα αντίστοιχα) τα οποία παρεμποδίζουν την ιντεγκρίνη αIIbβ3.

Παρατηρείται ότι είναι λιγότερο βιοδραστικά από το πεπτίδιο αναφοράς (GRGDSPK). Εξαιρεση αποτελεί το YRGDV-NH₂. Κοινό χαρακτηριστικό των πεπτιδίων τα οποία απαρτίζουν τον πίνακα 5 είναι ότι περιέχουν τα αμινοξέα K, Y στο αμινο-τελικό άκρο. Τα υπόλοιπα που προστίθενται είναι D- ή L- αμινοξέα. Στις παρενθέσεις παρίστανται οι τιμές IC₅₀ (μM) για τα ίδια πεπτίδια χωρίς τα τελικά K και Y αμινοξέα. Παρατηρείται ότι η παρου-

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΚΥΚΛΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ RGD ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΜΙΜΗΤΕΣ ΣΤΡΟΦΗΣ

		I. C. ₅₀ (μM)	I. C. ₅₀ (μM)
		αIIbβ3	ανβ3
	GRGDSPK	1,66	0,36
	c(RGDfV)	0,83	0,0022
1	c(RGD"S-ANC")	2,8	0,04
2	c(RGD"R-ANC")	0,0085	0,00085
3	c(RGD"BTD")	4,8	0,28
4	c(RGD"spiro")	-	-
5	c(RGD"BTDV")	0,55	0,043
6	c(RaD"BTDV")	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΠΑΡΑΓΩΓΑ RGD ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑΤΟΣ

	Αλληλουχία	IC ₅₀ (μM)
1	YRGDV-NH ₂	1
2	YRRDV-NH ₂	28
3	YKRDV-NH ₂	79
4	YFRDV-NH ₂	130
5	YWRDV-NH ₂	250
6	RGDFVKY-NH ₂	6
7	RGDFPKY-NH ₂	6
8	RGDWAKY-NH ₂	6
9	RGDFWKY-NH ₂	25
10	FKKFLKY-NH ₂	320
11	pyIGkKY-NH ₂	14(100)
12	pylrpKY-NH ₂	35(125)
13	pylqqKY-NH ₂	140
14	pylqkKY-NH ₂	56
15	pylwtKY-NH ₂	320
16	pylssKY-NH ₂	100
17	pymGaKY-NH ₂	79(125)
18	pflmnKY-NH ₂	50(110)
19	pflppKY-NH ₂	45(315)
20	pfmnvKY-NH ₂	250(320)
21	pfiwGKY-NH ₂	270
22	pflvpKY-NH ₂	220
23	pflpIKY-NH ₂	110

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΙΑΜΟΡΦΩΜΕΡΩΝ ΤΟΥ RGDF5

		I.C. ₅₀ (μM)	I.C. ₅₀ (μM)
		α _v β ₃	α _{IIb} β ₃
1	S,S	0,6	280
2	R,R	24	>10 ⁶
3	R,S	60	120
4	S,R	1,7	>10 ⁶

σία των K και Y αμινοξέων ενισχύει την αναστολή της α_{IIb}β₃ ιντεγκρίνης αν και τα πεπτίδια δεν περιέχουν την κλασική τριάδα RGD ή KGD. Σε αντίθεση στα πεπτίδια 11-23 παρατηρείται διαφορά στις τιμές IC₅₀ (μM) αυτών που περιέχουν RGD συγκριτικά με αυτά που δεν περιέχουν¹¹.

Συμπεράσματα:

A. Τα παράγωγα που συντέθηκαν στον πίνακα 5 αποδεικνύουν ότι η ύπαρξη του τριπεπτιδίου RGD δίνει τις πιο βιοδραστικές ουσίες (ίde 1-10 ενώσεις).

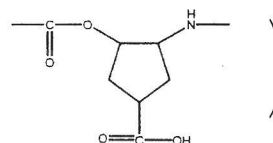
B. Τα πεπτίδια 11-23 περιέχουν τα μη φυσικά αμινοξέα p(f/y)l. Τα αμινοξέα αυτά αποτελούν ένα νέο τρόπο προσέγγισης ο οποίος μιμείται τα φυσικά αμινοξέα RGD (η δομική ομοιότητα της καινοτόμου αυτής προσέγγισης μπορεί να κατανοηθεί από το Σχήμα 11). Τα πεπτίδια 11-23 ποικίλουν σε βιολογική δράση (κυμαίνεται κατά 23 φορές). Τα επιπρόσθετα αμινοξέα εκτός της τριάδας p(f/y)l δεν έδωσαν δραστικότερα πεπτίδια συγκριτικά με το πεπτίδιο αναφοράς GRGDSPK.

Γ. Το δραστικότερο από τα πεπτίδια (11) που περιέχουν μη φυσικά αμινοξέα παρουσιάζει εξειδίκευση γιατί αντίστοιχα πεπτίδια με ίδια σύνθεση αλλά αντιστρεμμένη την αλληλουχία αμινοξέων απέτυχαν να παρεμποδίσουν τη δέσμευση σε συγκεντρώσεις μέχρι 1mM.

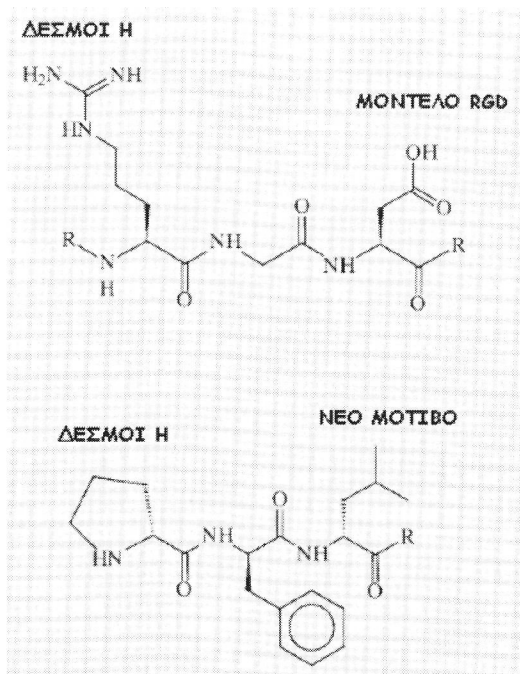
2.6 Ασύμμετρη κατάλυση

Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη παρασκευή αναλόγων και έδωσε ενδιαφέροντα αποτελέσματα ήταν η ασύμμετρη κατάλυση. Σαν στόχος της έρευνας αυτής ήταν η διερεύνηση της σχέσης στερεοχημικής δομής - δραστικότητας. Το πεπτίδιο που επιλέχθηκε ήταν το RGDF5

(όπου 5=



και μελετήθηκαν οι δομές (S,S), (R,R), (R,S), (S,R).

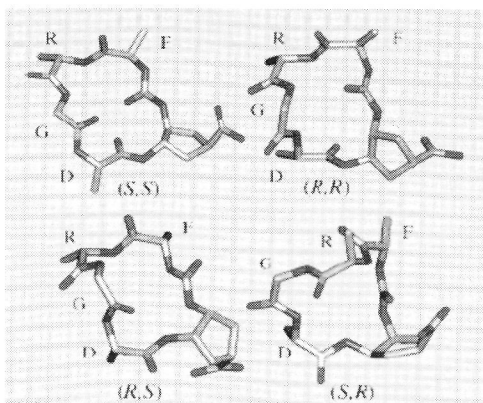


Σχήμα 11. Παράγωγα του πίνακα 5 βασίζονται στο μοντέλο RGD (άνω) ή δομικά όμοιων καινοτόμων μορφών που δεν περιέχουν την αλληλουχία RGD

Οι δομές (R,S), (S,R) έχουν την τυπική γ-στροφή στο αμινοξύ της γλυκίνης αν και διαφέρουν ως προς τον προσανατολισμό των πλευρικών μονάδων των αμινοξέων της Arg και Asp. Το παράγωγο (S,S) δείχνει μια επίπεδη δομή και μια βII-στροφή, ενώ το (R,R) παράγωγο δείχνει μια βI-στροφή και το RGD παρουσιάζει καμπή στο αμινοξύ της γλυκίνης (Σχήμα 12). Όπως φαίνεται και στον πίνακα 6 όλα τα παράγωγα έδειξαν υψηλή συγγένεια με την α_vβ₃ ιντεγκρίνη. Μια άλλη παρατήρηση που αξίζει να αναφερθεί είναι ότι η στερεοχημεία των τεσσάρων διαμορφωμένων του πεπτιδίου RGDf5 καθορίζει την εκλεκτικότητα μεταξύ των α_vβ₃ και α_{IIb}β₃ ιντεγκρινών¹².

2.7 C-, N- γλυκοζυλίωση

Επίσης έχουν συντεθεί και αποτιμηθεί C- και N-γλυκοζυλιωμένα RGD πεπτίδια τα οποία έχουν δείξει βιολογική δράση (Σχήμα 13). Στις πρώτες προσπάθειες η τροποποι-



Σχήμα 12. Τα 4 διαμορφωμένη του πεπτιδίου RGDf5

ηση των κυκλικών RGD πεπτιδίων με υδατάνθρακες είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μορφών με ελαττωμένη βιολογική δράση.

Έτσι σύμφωνα με τους στερεοχημικούς περιορισμούς συντέθηκε ένα τροποποιημένο σάκχαρο (Σχήμα 14) με σκοπό να αντικαταστήσει τα δύο αμινοξέα

D-Phe-Val στην αλληλουχία cyclo (RGDfV). Το σάκχαρο αυτό εκλέχθηκε γιατί μπορούσε να εισάγει την βII-γ

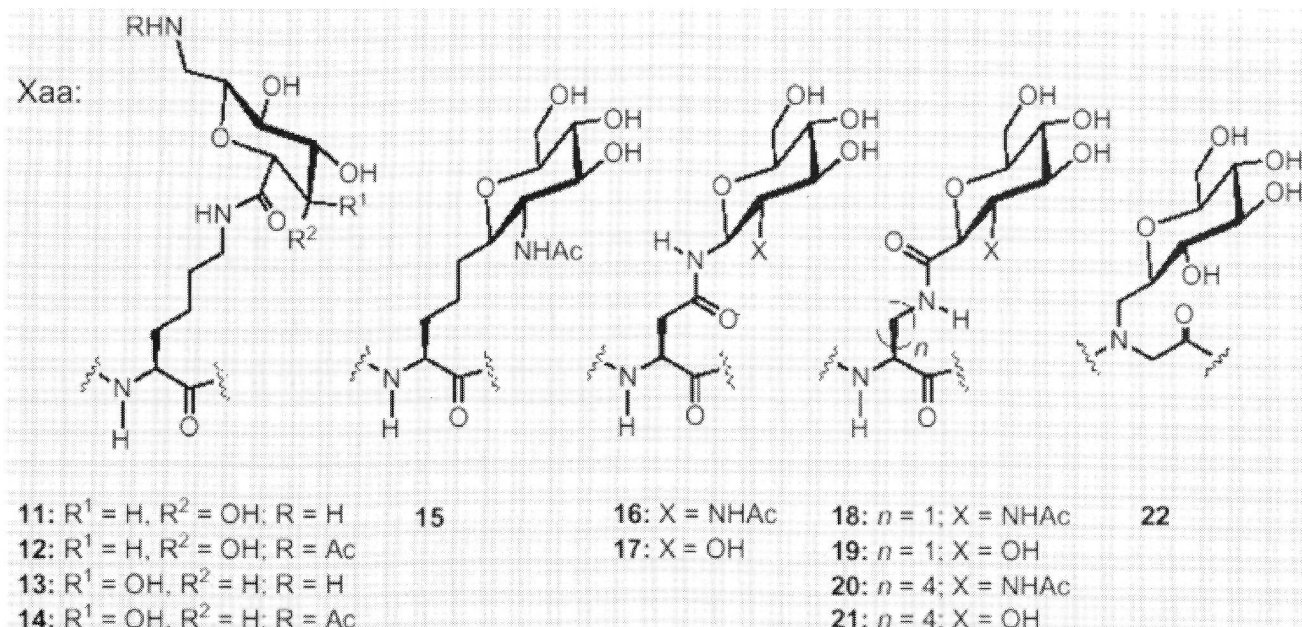
ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

	I.C. ₅₀ (nM)	I.C. ₅₀ (nM)	I.C. ₅₀ (nM)
	α _v β ₃	α _{IIb} β ₃	α _v β ₅
GRGDSPK	210	1700	>10000
c(RGDfV)	2,5	8000	320
1	150	720	935
2	25	13,4	>10000
11	55	>10000	2750
12	0,8	1910	24,7
13	15	450	>10000
14	21	5000	970
15	30	>10000	1000
16	5,9	>10000	4000
17	6,9	6000	6000
18	2,7	6000	480
19	15	>10000	6000
20	1,4	>10000	>10000
21	1	>10000	610
22	1,8	7300	260

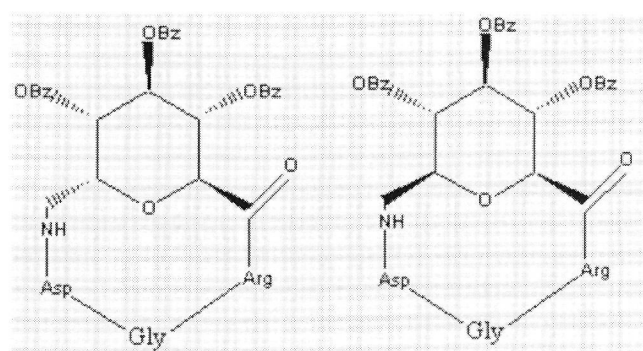
στροφή στο κυκλικό πεπτίδιο.

Παρατηρούμε στον πίνακα 7 ότι το πεπτίδιο 1 δείχνει μεγάλη εκλεκτικότητα όσον αφορά την ιντεγκρίνη α_vβ₃, συγκριτικά με το πεπτίδιο 2. Με την βοήθεια του μοριακού σχεδιασμού προσομοιώθηκαν οι δομές των δύο σακχάρων (Σχήμα 15) και βρέθηκε ότι συμφωνούν με το γενικό σχήμα των κυκλικών πεπτιδίων. Έτσι το πεπτίδιο 1 (α-SAA Sugar Amino Acid) κατατάσσεται στην ομάδα 2 (βλέπε Σχήμα 6) που με την διαμόρφωση αυτή έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την α_vβ₃ ιντεγκρίνη. Το πεπτίδιο 2 (β-SAA) παρουσιάζει γραμμικότητα στην τριάδα αμινοξέων RGD και όχι κάμψη όπως το πεπτίδιο 1 (ανήκει στην ομάδα 3). Δηλαδή έχει μια ενδιάμεση διαμόρφωση που ευνοεί και την α_vβ₃ και την α_{IIb}β₃ ιντεγκρίνη.

Με την σύνθεση γλυκοζυλιωμένων πεπτιδίων έγινε προσπάθεια εξειδίκευσης της δράσης των πεπτιδίων αυτών



Σχήμα 13. Τα C- και N- γλυκοσυλιωμένα RGD πεπτίδια *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Xaa-)* 11-14 και *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Xaa-)* 15-22



Σχήμα 14. Το σάκχαρο - αμινοξύ

σε συγκεκριμένες ιντεγκρίνες. Ένας άλλος βασικός λόγος σύνθεσης των γλυκοσυλιωμένων πεπτιδίων είναι και η βελτίωση της φαρμακοκινητικής. Όπως φαίνεται στο σχήμα 14 και στον πίνακα 6 διαφοροποιώντας την γλυκοσυτική αλυσίδα επηρεάζεται η δράση και η εκλεκτικότητα του πεπτιδίου. Όλα τα πεπτίδια έδειξαν υψηλή συγγένεια για την $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνη και υπάρχουν και πεπτίδια με καλύτερη δράση από τα GRGDSPK και *cyclo(RGDfV)* όπως το 12 και το 21 (για την ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$). Αξιοσημείωτη επίσης είναι η εκλεκτικότητα του παραγώγου 20. Συγκριτικά με μη γλυκοσυλιωμένα παράγωγα –όσον αφορά την φαρμακοκινητική– τα παράγωγα αυτά έδειξαν μικρότερη απορρόφηση από το ήπαρ, διπλασιασμό της αρχικής συγκέντρωσης στο αίμα και αύξηση της συγκέντρωσης στην περιοχή του καρκίνου¹³.

2.8 Χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων

Μια άλλη προσέγγιση, όσον αφορά την καταπολέμηση θρομβωτικών επεισοδίων, είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα για την ιντεγκρίνη

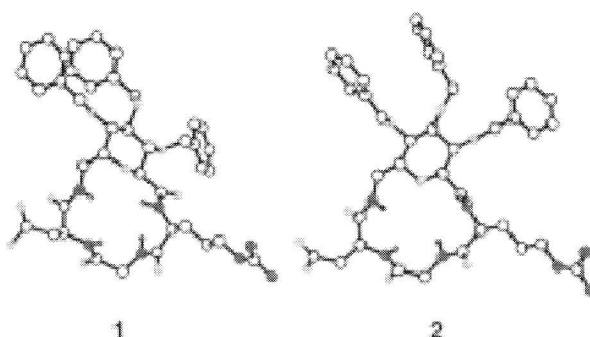
$\alpha_{IIb}\beta_3$ που έχει εγκριθεί για χρήση είναι το ReoPro (ABKIEIMABH). Το μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν τα ίδια μειονεκτήματα με τα πεπτίδια και αναγκαστικά χορηγούνται ενδοφλέβια¹⁴.

3. Προοπτικές - Σύγχρονες προσεγγίσεις

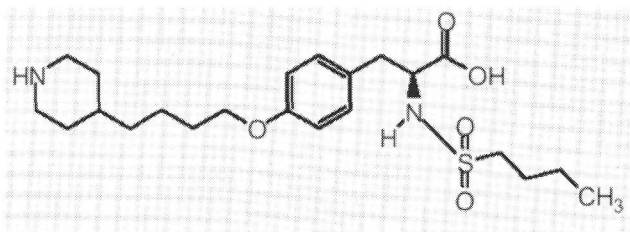
3.1 Μη πεπτιδικά ανάλογα

Για τους παραπάνω λόγους η σύγχρονη έρευνα στράφηκε στη σύνθεση σταθερών οργανικών μορίων τα οποία μιμούνται την δομή των πεπτιδίων (μη πεπτιδικούς μιμητές) χρησιμοποιώντας σύγχρονες τεχνολογίες, όπως ο μοριακός σχεδιασμός, ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός κ.τ.λ.

Ένα από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του πεπτιδίου RGD (ή KGD) που έπρεπε να διατηρηθεί κατά το σχεδιασμό καινοτόμων μορίων είναι ο zwitterion χαρακτήρας του. Δηλαδή θα έπρεπε να διατηρείται η απόσταση μεταξύ θετικού φορτίου (Arg ή Lys) και αρνητικού (Asp) στα-



Σχήμα 15. Προσομοίωση των δομών των δυο σακχάρων



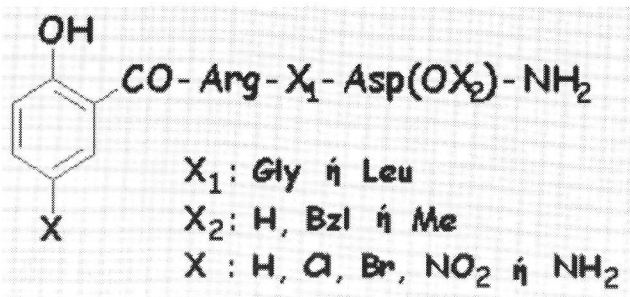
Σχήμα 16. Το αντιθρομβωτικό Aggrastat

θερή. Λαμβάνοντας όμως υπόψη ότι τα φορτισμένα φάρμακα δεν έχουν καλή απορρόφηση από τον οργανισμό, επισημειώνονται συνέθεσαν προφάρμακα τα οποία περιέχουν στη δομή τους πρόσθετες υδρόφοβες ομάδες συζευγμένες με τις φορτισμένες ομάδες. Αυτές έχουν την ιδιότητα να διασπώνται στον οργανισμό από ένζυμα του πεπτικού σωλήνα. Έχει αποτιμηθεί βιολογικά πληθώρα φαρμακευτικών μορίων χωρίς να υπάρχει πλήρης επιτυχία στις επιθυμητές ιδιότητες¹⁵. Τα φαρμακευτικά αυτά μόρια προκαλούν επιπλοκές ή παράπλευρες αντιδράσεις. Επίσης δεν υπάρχει προβλεπόμενη συμπεριφορά στην δόση και στο αναμενόμενο βιολογικό αποτέλεσμα.

Ένα φαρμακευτικό μόριο που χρησιμοποιείται ως αντιθρομβωτικό είναι το Aggrastat. Είναι ένα μη πεπτιδικής φύσης παράγωγο της L-τυροσίνης (Σχήμα 16) και χορηγείται σε ενέσιμη μορφή. Έχουν επίσης μελετηθεί διαμορφώσεις αναλόγων μορίων με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με το ότι η γουανιδινομάδα της αργινίνης και η καρβοξυλομάδα του ασπαργινικού παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην δραστηριότητα των συντεθειμένων μορίων, όπως ακριβώς και στο RGD και στα κυκλικά του ανάλογα.

3.2 Παράγωγα σαλικυλικού οξέος

Μια άλλη προσέγγιση σύνθεσης αντιθρομβωτικών φαρμακευτικών προϊόντων είναι η δημιουργία υβριδικών πεπτιδίων που περιέχουν το τριπεπτίδιο RGD και το σαλικυλικό ή ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη) (Σχήμα 17). Είναι γνωστό ότι το σαλικυλικό ή ακετυλοσαλικυλικό οξύ παρεμποδίζει στα πρώτα βήματα τη βιοσύνθεση στα αιμοπετάλια της προσταγλανδίνης G2 από αραχιδονικό οξύ με ακετυλίωση του αντίστοιχου ενζύμου κυκλοοξυγενάση. Έχει δείχτεί σε προηγούμενες μελέτες μας¹⁶⁻¹⁹ ότι ο συνδυασμός στο ίδιο μόριο διπεπτιδίων και τριπεπτιδίων, που



Σχήμα 17. Παράγωγα σαλικυλικών με πεπτίδια

αποτελούν τμήματα της αλληλουχίας RGD με το σαλικυλικό ή το ακετυλοσαλικυλικό οξύ στο N-τελικό άκρο παρουσιάζουν ανασταλτική δράση της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων. Επιπρόσθετα παράγωγα με πιθανή βελτιωμένη φαρμακολογική δράση είναι υπό σύνθεση στο εργαστήριό μας.

Design and Synthesis of RGD Analogs as Antithrombotic and Anticancer Agents

K. Belekoukias¹, J. Sarigiannis¹,
G. Stavropoulos¹, T. Mavromoustakos²

¹Chemistry Department, University of Patras,
265 00, Patra, Greece

²Institute of Organic and Pharmaceutical
Chemistry,
National Hellenic Research Foundation, Vas.
Constantinou 48, 116 35, Athens, Greece

Summary □ In some snake's venoms are contained peptidic substances with RGD derivatives amino acid sequence which act on receptors of integrins. The biological action of those substances is owed on their blocking of platelet aggregation. This property of peptides was used in the design and synthesis of new antithrombotic drugs. The synthetic peptides showed that these peptides have antigenetic properties and thus they could be utilized as anticancer agents.

This review article contains information on the biological vectors involved in the biological action of RGD or its analogs and the research synthetic efforts for developing new antithrombotic or antigenetic drugs. New perspectives in this research field are also discussed.

Βιβλιογραφία

1. <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/extracellularmatrix.html>
2. <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/9629/ecm.htm>
3. <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/9629/integrin.htm>
4. Bernard Payrastre, Karine Missy, Catherine Trumel, Stephane Bodin, Monique Plantavid and Hugues Chap, The Integrin αIIb/β3 in Human Platelet Signal Transduction. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 60, pp. 1069-1074, 2000.

5. Tzong-Ming Wu, Ming-Liang Li and Tz-Chong Chou, Inhibitory Effect of Hexapeptide (RGRHGD) on Platelet Aggregation. *Thrombosis Research* 97 (2000) 191-199.
6. <http://www.fda.gov/cder/consumerinfo/druginfo/INTEGRIL.HTM>
7. <http://www.rxlist.com/cgi/generic/eptifibatide.htm>
8. Michael A. Dechantsreiter, Eckart Planker, Barbara Matha, Elisabeth Lohof, Gunter Holzemann, Alfred Jonczyk, Simon L. Goodman, and Horst Kessler, N-Methylated Cyclic RGD Peptides as Highly Active and Selective $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonists. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 3033-3040.
9. Roland Haubner, Wolfgang Schmitt, Gunter Holzemann, Simon L. Goodman, Alfred Jonczyk, and Horst Kessler, Cyclic RGD Peptides Containing α -Turn Mimetics. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7881-7891.
10. Roland Haubner, Rainer Gratias, Beate Diefenbach, Simon L. Goodman, Alfred Jonczyk, and Horst Kessler, Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7461-7472.
11. David S. Thorpe, Helen Yeoman, A. W. Edith Chan, Viktor Krchnak, Michal Lebl, and Stephen Felder, Combinatorial Chemistry Reveals a New Motif That Binds the Platelet Fibrinogen Receptor, gpIIb/IIIa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256, 537-541 (1999).
12. D. Allen Annis, Olivier Helluin, and Eric N. Jacobsen, Stereochemistry as a Diversity Element: Solid-Phase Synthesis of Cyclic RGD Peptide Derivatives by Asymmetric Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, No. 13/14.
13. Elisabeth Lohof, Eckart Planker, Christian Mang, Fred Burkhart, Michael A. Dechantsreiter, Roland Haubner, Hans-Jurgen Wester, Markus Schwaiger, Gunther Holzemann, Simon L. Goodman, and Horst Kessler, Carbohydrate Derivatives for Use in Drug Design: Cyclic α_v -Selective RGD Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, No. 15.
14. <http://www.rxlist.com/cgi/generic/tiro.htm>
15. F.D. Suvire, A.M. Rodriguez, M.L. Mak, J.Gy. Papp, R.D. Enriz, Binding mechanism of RGD and its mimetics to receptor GPIIb/IIIa. A theoretical study. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 540 (2001) 257-270.
16. Liakopoulou-Kyriakides M. and Stavropoulos G. (1992) *Biochem Int* 26, 249-255
17. Stavropoulos G., Magafa V., Liakopoulou-Kyriakides M., Sinakos Z and Aaberg A. (1997) *Amino Acids* 13, 171-181
18. Stavropoulos G., Magafa V., Sarigiannis Y. and Liakopoulou-Kyriakides M Peptides (1998), *Proceedings of 25th EPS*, 860-861
19. Sarigiannis Y., Stavropoulos G., Magafa V., Liakopoulou-Kyriakides M., and Garypidou G., Peptides: (Proceedings of the 26th EPS), Montpellier, France, 2000