

PEPTYDOWE ZWIĄZKI MAKROCYKLICZNE: NOWE PERSPEKTYWY W DIAGNOSTYCE I TERAPII CHORÓB

PEPTIDE MACROCYCLIC COMPOUNDS: NEW PERSPECTIVES IN DIAGNOSTIC AND DISEASE TREATMENT

**Magdalena Wądrzyk^{1#}, Julia Miśkiewicz^{1#},
Paulina Kasperkiewicz^{1,*}**

¹*Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, Wydział Chemiczny
Politechniki Wrocławskiej, ul. Na Grobli 15, 50-421 Wrocław*
autorzy wnieśli równy wkład do publikacji
**e-mail: paulina.kasperkiewicz@pwr.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Korzyści i wyzwania związane z zastosowaniem peptydowych związków makrocyklicznych
 - 1.1. Zalety stosowania związków makrocyklicznych
 - 1.1.1. Biodostępność związków makrocyklicznych
 - 1.1.2. Odporność na degradację
 - 1.1.3. Wpływ cyklizacji na selektywność związków peptydowych
 - 1.1.4. Wpływ cyklizacji na selektywność związków peptydowych
 - 1.1.5. Inne czynniki wpływające na stabilność związków makrocyklicznych
 - 1.2. Trudności związane z badaniami nad związkami makrocyklicznymi
 - 1.2.1. Synteza makrocyklicznych związków peptydowych
 - 1.2.2. Immunogenność związków makrocyklicznych
 2. Zastosowanie związków makrocyklicznych w medycynie
 - 2.1. Makrocykliczne leki przeciwdrobnoustrojowe
 - 2.2. Makrocykliczne leki przeciwnowotworowe
 - 2.3. Makrocykliczne leki hormonalne – analogi insuliny i somatostatyny
 3. Makrocykliczne związki w diagnostyce chorób cywilizacyjnych
 - 3.1. Makrocykliczne związki radioizotopowe
 - 3.2. Makrocykliczne sondy chemiczne
 4. Perspektywy
- Uwagi końcowe
Podziękowania
Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Magdalena Wądrzyk, absolwentka Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej, gdzie uzyskała tytuł zawodowy magistra w 2021 roku. Obecnie doktorantka w Szkole Doktorskiej Politechniki Wrocławskiej w dyscyplinie nauki chemiczne. W Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania prowadzi szeroko zakrojone badania naukowe dotyczące heterogeniczności neutrofilii zależnej od proteaz serynowych. W swojej pracy skupia się nie tylko na monitorowaniu poziomu ekspresji enzymów, ale przede wszystkim ich aktywności. Do tego celu używa zaprojektowanych w zespole i uzyskanych substratowych sond chemicznych. Zdefiniowała nowe dotąd nieznanie populacje najliczniejszych komórek układu immunologicznego – neutrofilii.



<https://orcid.org/0000-0002-9880-3375>

Mgr inż. Julia Miśkiewicz ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, na specjalności Biotechnologia molekularna i Biokataliza. W 2024 roku uzyskała stopień magistra i podjęła studia w szkole doktorskiej Politechniki Wrocławskiej w dyscyplinie Nauki Chemiczne. W ramach realizacji pracy doktorskiej zajmie się syntezą biblioteki makrocyclicznych związków peptydowych, które posłużą do poszukiwania narzędzi chemicznych do badań transmembranowych proteaz serynowych. W trakcie studiów magisterskich określiła rolę neutrofilowej serynowej proteazy 4 w procesie hydrolyzy histonów, ważnym etapie śmierci komórkowej neutrofilii.



<https://orcid.org/0009-0007-2332-5122>

Dr hab. inż. Paulina Kasperkiewicz-Wasilewska, prof. PWR, absolwentka Biotechnologii Farmaceutycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. W 2014 roku obroniła z wyróżnieniem doktorat z nauk chemicznych na tej samej uczelni. W latach 2015-2017 odbyła dwuletni staż podoktorski w wiodącym instytucie SBP Medical Discovery Institute, USA, gdzie pracowała pod kierunkiem wybitnego naukowca, prof. Guya Salvesena. Po powrocie do Polski założyła pierwsze laboratorium BSL2 na Politechnice Wrocławskiej. W trakcie pracy doktorskiej, wraz z prof. Marcinem Porębą pod opieką prof. Marcina Drąga, opracowała innowacyjną hybrydową bibliotekę kombinatorycznych substratów HyCoSuL, która stała się cennym narzędziem w badaniach proteaz. Dzięki temu podejściu udało jej się uzyskać zestaw markerów chemicznych, umożliwiających równoległe obrazowanie neutrofilowych proteaz serynowych (NSPs) w komórkach. Jednym z jej najważniejszych osiągnięć naukowych jest wykazanie, wspólnie z prof. Guyem Salvesenem, heterogeniczności neutrofilii zależnej od aktywności NSPs. Odkryła także, że granulki w tych komórkach są nierównomiernie upakowane NSPs, otwierając nowe perspektywy badań nad funkcjonowaniem układu immunologicznego.

Jest laureatką wielu prestiżowych nagród za osiągnięcia naukowe, w tym dwukrotną stypendystką programu START Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, stypendium MNiSW dla wybitnych młodych naukowców oraz stypendium L'Oréal dla Kobiet i Nauki. W 2021 roku została odznaczona Srebrnym Krzyżem Zasługi. W 2023 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego, a niedługo później tytuł profesora uczelni. Jej praca habilitacyjna została uhonorowana nagrodą Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Kierowała licznymi projektami badawczymi finansowanymi przez Narodowe Centrum Nauki oraz Fundację na Rzecz Nauki Polskiej. Wyniki swoich badań regularnie publikuje w renomowanych międzynarodowych czasopismach naukowych, takich jak PNAS, JACS, Nature Communications, J. Med. Chem. Obecnie jej zainteresowania badawcze koncentrują się na funkcjach aktywnych enzymów proteolitycznych w komórkach układu immunologicznego oraz na poszukiwaniu nowych metod badania tych enzymów, w tym strategii opartych na makrocyclicznych związkach peptydowych.



<https://orcid.org/0000-0002-1291-047X>

ABSTRACT

In recent years macrocyclic peptides have drawn much interest due to their beneficial physiochemical properties and potential medical applications. The goal of this review is to summarize the advantages and drawbacks of macrocyclic peptides and provide examples of their use as therapeutic agents.

Macrocyclic peptides are characterized by better stability, selectivity and resistance to degradation than their linear counterparts, but on the other hand, macrocyclic peptide synthesis has low efficiency due to possible side reactions and difficulties with solubility of linear precursors. Macrocyclic peptides might also be more immunogenic than their linear counterparts.

Macrocyclic peptides have been found as a promising group of molecules for innovative medicine and, to date, they are used as antimicrobial drugs which are effective against both bacteria and fungi. As macrocyclic peptides are highly selective, they also serve a role in cancer therapies and diagnostics. Patented macrocyclic peptides act as a scaffold for the search and optimization of specific inhibitors of cell signaling pathways used by cancer cells to avoid cell death. The presence of peptide rings in the structure of macrocyclic peptides makes them analogs of hormones, such as somatostatin and insulin. As a result, macrocyclic peptides could prove to be a good basis for the development of hormonal drugs with extended duration of action. Aside from their role in medicine macrocyclic peptides might also be used in the field of chemical biology as selective and specific chemical probes which would allow for the visualization and imaging of various molecular targets.

Keywords: macrocyclic peptide, protease, target therapies, antibiotics, synthetic hormones

Słowa kluczowe: peptydy makrocykliczne, proteazy, terapie celowane, antybiotyki, syntetyczne hormony

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

MCPs	– (ang. macrocyclic peptides), makrocykliczne związki peptydowe
PPIs	– (ang. protein–protein interactions), oddziaływania białko-białko
CPPs	– (ang. cell penetrating peptides), peptydy penetrujące komórkę
RO5	– (ang. Rule of Five), reguła pięciu Lipińskiego
CSA	– cyklosporyna A
ADAs	– (ang. anti-drug antibodies) przeciwciała skierowane przeciwko lekowi
MHC II	– (ang. major histocompatibility complex class II), główny układ zgodności tkankowej klasy II
Gram (+)	– bakterie Gram-dodatnie
Gram(-)	– bakterie Gram-ujemne
PD-1	– (ang. programmed death receptor 1), receptor programowanej śmierci 1
PDL-1	- (ang. programmed death ligand 1), ligand receptora programowanej śmierci
XIAP	– (ang. X-linked inhibitor of apoptosis), inhibitor apoptozy związany z chromosomem X
HSCs	– (ang. hematopoietic stem cells), hematopoetyczne komórki macierzyste
TET	– (ang. ten-eleven translocation enzymes), grupa enzymów translokacji dziesięć-jedenaście
PET	– (ang. positron emission tomograph), pozytonowa tomografia emisyjna
NIR	– (ang. near infrared), w zakresie bliskiej podczerwieni
FRET	– (ang. fluorescence resonance energy transfer), rezonansowy transfer energii fluorescencji
CXCR4	- (ang. CXC motif chemokine receptor type 4), receptor chemokiny CXCR4

WPROWADZENIE

W ostatnich latach zainteresowanie budzą peptydowe związki makrocykliczne (ang. *Macrocyclic peptides, MCPs*), których struktura chemiczna głównie oparta jest o zamknięte w pierścieniu reszty aminokwasowe. W związku z dynamicznym rozwojem nowych metod syntezy MCPs, ich otrzymywanie stało się dostępne, a tym samym umożliwiło intensywne poszukiwanie inhibitorów, antybiotyków, a także sond chemicznych posiadających cykliczne elementy budowy. Związki te, ze względu na swoją charakterystyczną budowę chemiczną, wykazują szereg zalet w tym, między innymi, ograniczoną konformację, czy wysoką stabilność chemiczną, co zwiększa ich potencjał w zastosowaniach diagnostycznych oraz jako cząsteczki terapeutyczne. MCPs posiadają jednak wady, w tym właściwości immunogenne, które stanowią wyzwanie dla zastosowań tych cząsteczek jako leki. Niniejszy przegląd literaturowy ma na celu wskazanie korzyści płynących z zastosowania związków cyklicznych w chemii biologicznej z jednoczesnym wskazaniem wyzwań związanych z zastosowaniem tych związków chemicznych. Ponadto omówione zostały makrocykliczne leki przeciwnowotworowe, hormonalne i przeciwdrobnoustrojowe z uwzględnieniem stosowanych modyfikacji oraz rozwiązań prowadzących do optymalizacji cząsteczek o znaczeniu terapeutycznym oraz diagnostycznym.

1. KORZYŚCI I WYZWANIA ZWIĄZANE Z ZASTOSOWANIEM PEPTYDOWYCH ZWIĄZKÓW MAKROCYKLICZNYCH

Peptydy stanowią ważną klasę związków terapeutycznych stosowanych w medycynie. Często cechują się one większą selektywnością od małych cząsteczek terapeutycznych, m.in. ze względu na ich rozmiar oraz elastyczny szkielet, umożliwiające im lepsze oddziaływanie ze strukturami biologicznymi, a w tym z powierzchnią białek, co sprawia że są one dobrymi inhibitorami oddziaływań białko-białko (ang. *protein-protein interactions, PPIs*). Dodatkowo, krótkie peptydy terapeutyczne wykazują mniejszą immunogenność i są tańsze w produkcji od leków biologicznych, takich jak przeciwciała [1]–[3]. Z ich wykorzystaniem wiąże się jednak szereg ograniczeń, wśród których wyróżnić można klasyczne, takie jak niska biodostępność i stabilność *in vivo* dla liniowych związków peptydowych. Jest to związane z obecnością w organizmie proteaz, czyli enzymów hydrolizujących wiązania amidowe pomiędzy resztami aminokwasów budującymi peptydy. Co więcej, transport peptydów przez błony biologiczne do potencjalnych celów terapeutycznych może być utrudniony w zależności od ich wielkości i polarności reszt aminokwasowych wchodzących w ich skład. Ograniczenia utrudniające zastosowanie tych związków w medycynie mogą zostać pokonane poprzez szereg modyfikacji łańcucha peptydowego, w tym zastosowanie makrocyklizacji lub przyłą-

czenie peptydów penetrujących komórkę (ang. *cell penetrating peptides*, CPP) [1],[2],[4].

Cyklizacja peptydów jest stosunkowo nową strategią zyskującą na popularności, gdyż stabilizuje ona łańcuch peptydowy i ogranicza możliwość zmian konformacyjnych peptydów. Sprawia to, że peptydowe związki makrocykliczne mają lepsze właściwości farmakokinetyczne, takie jak selektywność, stabilność, a także zwiększoną odporność na degradację, od ich liniowych odpowiedników [2],[3],[5],[6]. Cyklizacji związków peptydowych można dokonać na wiele sposobów, a wśród technik najczęściej stosowane są cyklizacja **(1)** „głowa-do-ogona”, polegająca na wytworzeniu wiązania amidowego pomiędzy N-końcową grupą aminową (pierwszego aminokwasu) i C-końcową grupą karboksylową (ostatniego aminokwasu) peptydu, **(2)** „ogon-do-łańcucha bocznego”, i **(3)** „łańcuch boczny-do-głowy”, czyli cyklizację jednego z końców peptydów z łańcuchem bocznym jednego z aminokwasów, **(4)** „łańcuch boczny-do-łańcucha bocznego”, czyli cyklizację z wykorzystaniem łańcuchów bocznych oddalonych od siebie reszt aminokwasowych peptydu (Rys. 1) [7],[8]. Pomimo wielu zalet, stosowanie techniki makrocyklizacji peptydów wiąże się z nowymi wyzwaniem, m.in. w zakresie syntezy tych związków oraz ich immunogenności, nad których rozwiązaniem trwają liczne badania naukowe, aby peptydowe związki makrocykliczne ze względu na swoje zalety mogły być jeszcze częściej stosowane w medycynie [6],[7].



Rysunek 1. Schemat przedstawiający najczęściej stosowane metody cyklizacji peptydów. Przygotowane przy pomocy Biorender oraz PowerPoint.

Figure 1. Schem representing the most common methods of peptide cyclization. Created with Biorender and PowerPoint.

1.1. ZALETY STOSOWANIA ZWIĄZKÓW MAKROCYKLICZNYCH

1.1.1. Biodostępność związków makrocyklicznych

Biodostępność związków chemicznych, w tym makrocyklicznych peptydów, to inaczej stopień i szybkość, z jaką te związki są wchłaniane do krwiobiegu po aplikacji oraz/lub stają się dostępne w miejscu działania w organizmie. Innymi słowy, jest to miara efektywności, z jaką podana dawka związku makrocyklicznego dociera do celu biologicznego, gdzie ma za zadanie działać w określony sposób.

Biodostępność peptydów jest ściśle związana z ich odpornością na degradację, wynikającą zarówno z denaturacji w trudnych warunkach panujących w organizmie człowieka, jak i hydrolizy powodowanej przez enzymy proteolityczne. Kluczowym czynnikiem wpływającym na biodostępność związków peptydowych jest także ich zdolność do przenikania przez błony biologiczne. Wśród różnych dróg podania leków, najbardziej pożądana jest droga doustna, ze względu na jej prostotę, łatwość dostosowania dawki oraz preferencje pacjentów. Aby peptyd podany doustnie był skuteczny, musi wykazywać odporność na niskie pH żołądka oraz unikać hydrolizy przez enzymy trawienne. Ponadto, konieczne jest, aby związek ten zdołał przekroczyć barierę komórek nabłonka jelita cienkiego, co pozwoli mu na dotarcie do krwiobiegu [6].

Liniowe związki peptydowe charakteryzują się ograniczoną biodostępnością, m.in. ze względu na trudności napotymane przez te związki podczas przenikania przez błony komórkowe [2],[6]. Większość syntetycznych związków peptydowych nie spełnia kryteriów tzw. reguły pięciu Lipińskiego (ang. *Rule of Five*, RO5), pomagającej w określeniu szans czy dana cząsteczka jest w stanie dyfundować przez błony biologiczne. Pomimo niewątpliwie dużej przydatności tej reguły, jedynie 50% nowych biodostępnych związków ją spełnia. Do czynników zgodnych z RO5 zalicza się: **(1)** masa cząsteczkowa związku nie powinna przekraczać 500 Da; **(2)** liczba donorów wiązań wodorowych (grup -OH i -NH) powinna być mniejsza lub równa 5; **(3)** liczba akceptorów wiązań wodorowych (grup atomów tlenu i azotu) powinna być mniejsza lub równa 10; **(4)** LogP powinien być mniejszy niż 5 [9]. Spełnienie tej reguły przez związki peptydowe jest trudne głównie ze względu na masę cząsteczkową oraz ilość akceptorów i donorów wiązań wodorowych, których, ze względu na obecność różnorodnych łańcuchów bocznych w sekwencji, związki te zawierają zbyt dużo. Co ciekawe, wśród peptydów zaobserwowano grupę związków, które z powodzeniem pokonują bariery błon biologicznych, pomimo tego, że są niezgodne z RO5, których przykładem jest cyklosporyna A, opisana poniżej [6],[10].

Mimo tego, że opinia środowiska naukowego na ten temat jest podzielona, na podstawie dostępnych danych literaturowych możemy stwierdzić, że makrocykli-

zacja z dużym prawdopodobieństwem poprawia zdolność związków peptydowych do przenikania błon komórkowych [10,11]. Ciekawym przypadkiem makrocyklicznego peptydu, wykorzystującego mechanizm biernej dyfuzji przez błony jest cyklosporyna A (CSA). CSA jest makrocyklicznym peptydem zbudowanym z jedenastu reszt aminokwasowych, zarówno naturalnych jak i modyfikowanych (N-metylacja) i stosowanym jako lek immunosupresyjny, który może być podawany drogą doustną. Siedem reszt aminokwasowych CSA jest N-metylowanych, co zmniejsza potencjalną liczbę grup będących donorami lub akceptorami wiązań wodorowych. Co więcej, CSA charakteryzuje się pewną swobodą konformacyjną, wynikającą ze zmiennego układu wiązań wodorowych. W rozpuszczalnikach polarnych CSA przyjmuje konformację „otwartą”, a grupy będące donorami lub akceptorami wiązań wodorowych mogą oddziaływać z powierzchnią celu molekularnego peptydu. Gdy CSA znajdzie się w środowisku niepolarnym, na przykład dwuwarstwy lipidowej budującej błonę komórkową, następuje zmiana układu wiązań wodorowych na wiązania wewnątrzcząsteczkowe, co nadaje związkowi konformację „zamkniętą”, o zmniejszonej polarności powierzchni. Właściwości te sprawiają, że CSA, podobnie jak małe cząsteczki, może swobodnie dyfundować przez błony komórkowe [6],[10],[11]. W badaniach porównujących właściwości trzech związków: liniowego CSA, cyklicznego analogu CSA zawierającego dziesięć reszt aminokwasowych oraz jego liniowego prekursora, zaobserwowano, że pomimo podobnych właściwości tych związków, takich jak polarność, liniowy peptyd wykazał znacznie niższą zdolność do przenikania przez błony komórkowe od związków cyklicznych. Ponieważ związek liniowy posiada większą liczbę możliwych konformacji w rozpuszczalnikach polarnych, przyjęcie konformacji optymalnej do przenikania przez błony jest utrudnione. Co ważne, liniowy peptyd ma również mniejszą możliwość tworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych od jego cyklicznych odpowiedników. Na tej podstawie można stwierdzić, że makrocyklizacja ma pozytywny wpływ na zdolność przenikania związków peptydowych przez błony komórkowe, ponieważ ułatwia peptydom przyjęcie odpowiedniej konformacji i umożliwia jej stabilizację dzięki powstaniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych [11],[12].

1.1.2. Odporność na degradację

Liniowe peptydy, pomimo swoich licznych zalet są stosunkowo podatne na degradację w wyniku hydrolizy enzymatycznej lub denaturacji. *In vivo* związki te są narażone na działanie wielu enzymów proteolitycznych, degradujących wiązania amidowe, będących przyczyną niskiej stabilności metabolicznej liniowych peptydów [6],[13]. Ludzki genom zawiera ponad 550 genów kodujących proteazy [6]. Enzymy proteolityczne mogą zostać podzielone na dwie grupy: endoproteazy, hydrolizujące

wiązania amidowe wewnątrz sekwencji peptydu lub białka oraz egzoproteazy, hydrolizujące wiązania pomiędzy końcowymi resztami aminokwasowymi w substratach, zarówno od N-końca (aminopeptydazy), jak i C-końca (karboksypeptydazy). Po podaniu, lek peptydowy jest narażony na degradację przez proteazy nie tylko w żołądku oraz jelicie cienkim, ale również w osoczu krwi i komórkach m.in. układu odpornościowego, bogatych w proteazy. Przeszkody w postaci enzymów proteolitycznych muszą zostać pokonane/ominięte, aby lek makrocykliczny mógł dostać się do swojego celu molekularnego [13]. W rezultacie biologiczny czas półtrwania liniowych peptydów zbudowanych z aminokwasów białkowych zazwyczaj jest bardzo krótki [6], co skłoniło naukowców do poszukiwania nowych sposobów zapobiegania degradacji związków peptydowych.

Szybkość hydrolizy enzymatycznej *in vivo* peptydów może zostać zredukowana poprzez zastosowanie szeregu różnorodnych strategii, wśród których jedną z najbardziej obiecujących jest makrocyklizacja [6],[13]–[15]. Zmniejszona elastyczność makrocyklicznych peptydów i przeszkody steryczne wynikające z obecności pierścienia sprawiają, że wiązanie makrocyklicznych substratów z miejscem aktywnym proteaz jest utrudnione. Dodatkowo cyklizacja typu „głowa-do-ogona” efektywnie chroni makrocykliczne związki peptydowe przed działaniem egzopeptydaz [15]. Przykład skutecznego zastosowania makrocyklizacji do zwiększenia odporności peptydów na hydrolizę został przedstawiony w pracy opisującej właściwości biblioteki makrocyklicznych analogów liniowego peptydu będącego agonistą receptora melanokortyny 4. W badaniach tych związki peptydowe zostały poddane inkubacji z pęcherzykami wyizolowanymi z obwódki szczołeczkowej komórek nabłonka, zawierającymi enzymy proteolityczne. Po 40 minutach inkubacji zaobserwowano, że aż 40% liniowego peptydu uległo degradacji. Cykliczne analogi przejawiały zdecydowanie większą odporność na hydrolizę enzymatyczną i dopiero po 90 minutach inkubacji ich stężenie zmniejszyło się o zaledwie 5% [16].

Makrocyklizacja związków peptydowych może również zwiększać ich odporność na denaturację związaną z niekorzystnymi warunkami środowiska, na przykład pH lub wysokiej temperatury [17],[18]. Dowodzą tego badania porównujące stabilność liniowego peptydu o sekwencji Arg-Gly-Asp-Phe, zawierającego resztę kwasu asparaginowego, podatną na degradację chemiczną, z jego cyklicznym odpowiednikiem. Związki peptydowe były poddawane inkubacji w 50 °C w zakresie pH 2-12, a powstające produkty degradacji analizowano przez zastosowanie spektrometrii mas. W badaniach stwierdzono, że cykliczny związek peptydowy wykazywał większą odporność na degradację od związku liniowego w przedziale pH 3-5, a jego odporność w przedziale pH 6-7 była znacząco większa. Czynnikiem

odpowiedzialnym za lepsze właściwości związku cyklicznego była zmniejszona zdolność do zmian konformacyjnych, wynikająca z obecności pierścienia [18].

Podsumowując, makrocyklizacja zwiększa odporność peptydów na hydrolizę poprzez zwiększenie usztywnienia łańcucha peptydowego, a tym samym utrudnienie zmian konformacji, co utrudnia dopasowanie tych związków w centrach katalitycznych enzymów innych niż docelowe, a tym samym chroni wiązania amidowe przed degradacją. Z powodu utarty elastyczności łańcucha wiązanie makrocyklicznych związków z miejscami aktywnymi enzymów proteolitycznych jest utrudnione, a cyklizacja „głowa-do-ogona” skutecznie chroni ich końce przed aktywnością egzoproteaz [15],[18].

1.1.3. Wpływ cyklizacji na selektywność związków peptydowych

Makrocykliczne związki peptydowe charakteryzują się lepszą selektywnością i powinowactwem wiązania od swoich liniowych odpowiedników. Podobnie jak w przypadku odporności na degradację, wynika to z faktu, że są one sztywniejsze i mają mniejszą możliwość zmian konformacyjnych od peptydów liniowych. Ogranicza to możliwość ich niespecyficznego wiązania się. Dodatkowo, wiązanie makrocyklicznego peptydu z wybranym celem molekularnym jest korzystniejsze energetycznie pod względem entropii i ułatwione przez większe prawdopodobieństwo, że ze względu na niższą liczbę możliwych konformacji, związek makrocykliczny przyjmie tą optymalną do wiązania [15].

Oddziaływania PPI odgrywają ważną rolę w wielu procesach biologicznych, co sprawia, że peptydy zdolne do wchodzenia w interakcję z powierzchnią białek są obiecującymi potencjalnymi terapeutykami, które mogłyby hamować niekorzystne oddziaływania pomiędzy białkami. Makrocyklizacja związków peptydowych umożliwia im przyjęcie struktur drugorzędowych: α -helis oraz β -nici. Struktury drugorzędowe umożliwiają makrocyklicznym peptydom naśladowanie powierzchni białek wchodzących w interakcję PPI, przez co mogą się wiązać z celem molekularnym w miejscu oddziaływania z innymi białkami lub ligandami [19],[20].

Makrocykliczne związki peptydowe naśladujące β -kartki są szczególnie efektywnymi i selektywnymi inhibitorami enzymów proteolitycznych, które często wiążą tę strukturę drugorzędową w swoim miejscu aktywnym. Przykładowo, makrocyklizacja powodująca przyjęcie struktury β -nici przez inhibitor lub substrat proteazy HIV-1, należącej do proteaz aspartylowych, wielokrotnie zwiększyła powinowactwo ich wiązania w porównaniu z liniowymi odpowiednikami [21]. Selektywne makrocykliczne inhibitory zostały opracowane również dla innych proteaz aspartylowych, proteaz serynowych i cysteinowych oraz metaloproteaz. Zgodnie z przypuszczeniami w wyniku krystalizacji kompleksów makrocyklicznych

inhibitorów o strukturze β -nici z proteazami zaobserwowano, że podczas gdy łańcuchy boczne reszt aminokwasowych oddziałują z kieszeniami wiążącymi enzymu, makrocykliczna część inhibitora znajduje się w jego miejscu aktywnym [22].

Makrocykliczne peptydy przyjmujące drugorzędowe struktury α -helis są nazywane „usztynionymi” peptydami (ang. *stapled peptides*), ze względu na mostki tworzone pomiędzy łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych znajdującymi się na powierzchni helisy. W białkach α -helisy stanowią aż 40 % wszystkich struktur drugorzędowych i często wchodzi w skład powierzchni zaangażowanych w PPI [23]. Usztynione peptydy zaprojektowane na bazie ligandu pozwalają na specyficzną inhibicję oddziaływań PPI [6],[22].

Zwiększona selektywność makrocyklicznych związków peptydowych, poza zastosowaniem odpowiednich aminokwasów, rozpoznawanych w kieszeniach wiążących badanego enzymu, wynika także ze sztywności oraz stabilności konformacyjnej tych związków, ograniczających niespecyficzne oddziaływania. Wiązanie makrocyklicznych peptydów do celu molekularnego jest też bardziej korzystne energetycznie niż w przypadku liniowych odpowiedników. Dodatkowo mogą przyjmować one struktury drugorzędowe, pozwalające na oddziaływanie nie tylko z miejscami aktywnymi enzymów, ale również powierzchniami zaangażowanymi w interakcje białko-białko lub białko-ligand [15],[19],[20].

1.1.4. Wpływ cyklizacji na stabilność związków peptydowych

Jak już zostało to wcześniej opisane, makrocyklizacja związków peptydowych przyczynia się do zwiększenia ich odporności na hydrolizę enzymatyczną oraz denaturację w niesprzyjających warunkach środowiskowych. Wynika to ze stabilizacji konformacyjnej i utraty elastyczności łańcucha, co utrudnia dostęp czynnikom degradującym do wiązań amidowych pomiędzy resztami aminokwasowymi w sekwencji peptydu. Dodatkowo, jeśli cyklizacja peptydu dotyczy jego końcowych reszt aminokwasowych, staje się on znacznie odporniejszy na hydrolizę przez egzoproteazy. W rezultacie stabilność makrocyklicznych związków peptydowych, a w szczególności ich stabilność metaboliczna, jest lepsza od tradycyjnych liniowych peptydów [6],[15],[18].

Stabilność makrocyklicznych peptydów może być też zwiększona poprzez zastąpienie występujących w nich mostków disiarczkowych, tworzonych pomiędzy dwoma resztami cysteiny i podatnych na redukcję, przez inne, silniejsze oddziaływania, wykorzystując do cyklizacji na przykład reszty selenocysteiny lub tellurocysteiny [24]

1.1.5. Inne czynniki wpływające na stabilność związków makrocyklicznych

Stabilność makrocyklicznych związków peptydowych może być także zwiększona poprzez wykorzystanie nienaturalnych lub modyfikowanych reszt aminokwasowych. Modyfikowane reszty w sekwencji mogą zostać nierozpoznane przez enzymy proteolityczne i efektywnie hamować hydrolizę. Co więcej, wykorzystanie reszt o rozbudowanych łańcuchach bocznych utrudnia niektórym proteazom dostęp do wiązania amidowego [6],[24]. Zastosowanie nienaturalnych aminokwasów skutkuje lepszym dopasowaniem peptydu do miejsca aktywnego docelowego enzymu i w większości badanych przypadków znacznym ograniczeniem hydrolizy wiązań peptydowych przez inne enzymy. Dlatego też uważa się, że makrocyklizacja peptydów zawierających nienaturalne aminokwasy może być kluczowa w projektowaniu leków peptydowych [6],[24].

Jednym z przykładów jest CSA, która oprócz dużej zdolności do przenikania przez błony komórkowe, wykazuje również wysoką stabilność, ze względu na obecność w jej strukturze siedmiu N-metylowanych reszt, zapobiegających jej hydrolizie przez enzymy. Odnotowany czas biologicznego półtrwania CSA w osoczu krwi wynosi aż sześć godzin [6]. N-metylacja makrocyklicznych peptydów jest skuteczną metodą zwiększania ich stabilności jak wykazano na przykładzie N-metylacji heksapeptydu stworzonego na podstawie endotelin, będących bicyklicznymi peptydami, która zwiększyła jego odporność na działanie proteaz około pięćdziesięciokrotnie. Na podstawie analizy NMR stwierdzono, że N-metylacja utrudnia rotację wokół wiązania amidowego i sprawia, że peptydy przyjmują konformację *cis*, w której grupa karboksylowa wchodząca w skład wiązania jest niedostępna dla karboksypeptydaz [25].

1.2. TRUDNOŚCI ZWIĄZANE Z BADANAMI NAD ZWIĄZKAMI MAKROCYKLICZNYMI

Pomimo wielu obiecujących właściwości i licznych zalet, które czynią związki makrocykliczne interesującymi kandydatami w różnych dziedzinach nauki i technologii, szczególnie w poszukiwaniu nowych leków, badania nad tymi związkami wiążą się z wieloma wyzwaniem. Praca ze związkami makrocyklicznymi, od ich projektu do syntezy, a następnie zastosowania, stawia przed naukowcami szereg trudności, które muszą być pokonane za pomocą zaawansowanych metod i narzędzi.

1.2.1. Synteza makrocyklicznych związków peptydowych

W najprostszym ujęciu proces makrocyklizacji zachodzi dzięki reakcji dwóch reaktywnych grup na drodze kondensacji, laktamizacji, laktonizacji, tiolaktonizacji lub utworzenia mostka disarczkowego. Makrocyklizacja może dotyczyć końcowych grup aminowych i karboksylowych peptydów, a także grupy aminowej łańcucha bocznego reszty lizyny, grup karboksylowych łańcuchów bocznych reszt kwasu glutaminowego i asparaginowego, grup hydroksylowych reszt seryny i treoniny lub grupy sulfhydrylowej reszty cystein. Podczas klasycznego procesu makrocyklizacji związków peptydowych trzeba zmierzyć się z szeregiem wyzwań. Przykładowo, jeśli na C-końcu peptydu poddawanego makrocyklizacji znajdują się reszty inne niż glicyna lub prolina może dojść do jego niepożądanego epimeryzacji [26]. Co więcej, podczas makrocyklizacji może dojść do powstawania niechcianych produktów ubocznych na skutek zajścia niekontrolowanych wewnątrzcząsteczkowych reakcji. Makrocyklizacja jest również utrudniona, jeśli w liniowym prekursorze nie występuje żaden element powodujący jego skręt, a C- i N-końce peptydu są zbyt oddalone od siebie. Dodatkowo makrocykliczne związki peptydowe mogą mieć ograniczoną rozpuszczalność w rozpuszczalnikach używanych do reakcji [7].

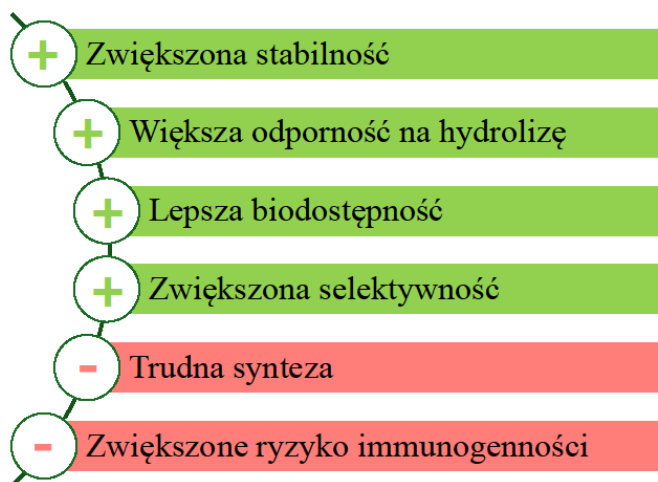
Konwencjonalne podejście do makrocyklizacji wymaga otrzymania liniowego prekursora, w którym jedynymi wolnymi grupami są grupy ulegające cyklizacji. Podczas syntezy używa się więc peptydów, których reaktywne grupy łańcuchów bocznych są zablokowane chemicznie. Takie podejście ma jednak swoje wady, skutkujące niską efektywnością syntezy, zależącą w dużej mierze od sekwencji danego produktu. Aby uniknąć powstawania oligomerycznych produktów ubocznych reakcja musi być prowadzona w dużym rozcieńczeniu. Aktywowana C-końcowa grupa karboksylowa jest podatna na epimeryzację, co sprawia, że w wyniku reakcji powstaje para epimerów. Dodatkowo, jeżeli liniowy prekursor nie jest rozpuszczalny w wybranym do makrocyklizacji rozpuszczalniku, reakcja ta nie zajdzie. Część z tych problemów może być rozwiązana poprzez zastosowanie procesu cyklizacji na podłożu stałym. Immobilizacja liniowego prekursora zmniejsza prawdopodobieństwo zachodzenia wewnątrzcząsteczkowych reakcji ubocznych. Wykorzystanie podłoża stałego do cyklizacji nie eliminuje jednak problemu z epimeryzacją C-końcowej grupy karboksylowej. Opisane problemy związane z konwencjonalną makrocyklizacją związków peptydowych mogą zostać rozwiązane poprzez zastosowanie nowoczesnych metod chemoselektywnej ligacji lub ligacji wspomagananej enzymatycznie, lecz te metody również wiążą się z pewnymi ograniczeniami [7].

1.2.2. Immunogenność związków makrocyklicznych

Immunogenność jest zjawiskiem, w którym na skutek podania leku dochodzi do produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko lekowi (ang. *anti-drug antibodies*, ADAs), mogących wchodzić w interakcję z terapeutycznym lub neutralizować jego działanie. ADAs są produkowane przez limfocyty B na skutek aktywacji zależnej lub niezależnej od limfocytów T. Ścieżka niezależna od limfocytów T wymaga wystąpienia w terapeutyku sygnałów strukturalnych, takich jak polimeryczne powtórzenia, mogących aktywować limfocyty B. Ścieżka zależna od limfocytów T rozpoczyna się od związania peptydowych epitopów przez zespół białek głównego układu zgodności tkankowej klasy II - MHC II (ang. *major histocompatibility complex class II*) na powierzchni komórek prezentujących antygeny. Kompleks ten jest następnie rozpoznawany przez limfocyty T, uwalniające cytokiny aktywujące limfocyty B [27]. Immunogenność ma wpływ nie tylko na możliwą efektywność podanego leku, ale może powodować pewne reakcje organizmu, stanowiące zagrożenie dla pacjenta. Obecność ADAs może skutkować wystąpieniem anafilaksji, czyli ciężkiej reakcji alergicznej, zespołu uwolnienia cytokin powodującego rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego organizmu lub szeregu niekorzystnych reakcji na infuzję [28]. Ryzyko wystąpienia immunogenności zależy od czynników związanych z lekiem, takich jak jego pochodzenie, struktura oraz rozmiar, a również czynników związanych z pacjentem, na przykład historii reakcji alergicznych oraz uwarunkowania genetycznego [28],[29].

Związki peptydowe są w stanie wywołać immunogenność, niezależnie od tego czy są liniowe czy cykliczne. Makrocykliczne związki peptydowe mogą mieć również negatywny wpływ na stan wątroby pacjenta, jeśli ulegają one hydrolizie przez enzymy zawarte w tym narządzie, podczas gdy liniowe peptydy są rzadko przez nią metabolizowane. Dodatkowo, makrocykliczne peptydy mogą nieoczekiwanie oddziaływać z niektórymi transporterami oraz enzymami cytochromu P450 [29].

Zgodnie z rekomendacją FDA (ang. *Food and Drug Administration*) w celu ograniczenia immunogenności związków peptydowych, a w tym makrocyklicznych związków peptydowych, długość ich sekwencji nie powinna przekraczać ośmiu reszt aminokwasowych [29].



Rysunek 2. Schemat przedstawiający zalety oraz trudności związane z badaniami nad związkami makrocyklicznymi. Przygotowane przy pomocy PowerPoint.

Figure 2. Scheme presenting benefits and drawbacks associated with macrocyclic compounds studies. Created with PowerPoint.

2. ZASTOSOWANIE ZWIĄZKÓW MAKROCYKLICZNYCH W MEDYCYNIE

2.1. MAKROCYKLICZNE LEKI PRZECIWDROBNOUSTROJOWE

W związku z rozwijającą się lekoopornością drobnoustrojów znacznie wzrosło zainteresowanie opracowywaniem nowych MCPs, szczególnie w oparciu o związki pochodzenia naturalnego. Tylko w 2023 roku FDA zatwierdziła trzy związki MCPs w tym rezafunginę, należącą do grupy echinokandyn, które są inhibitorami syntazy 1,3- β -glukanu wykorzystywanej przez grzyby do tworzenia ściany komórkowej, a więc niezbędnego elementu umożliwiającego utworzenie w pełni funkcjonalnej komórki. Rezafungina jest półsyntetycznym lekiem lipopeptydowym, który w strukturze chemicznej posiada pierścień oraz N-acylolipidowy łańcuch boczny, kluczowy dla właściwości przeciugrzybiczych. Częsteczką tą jest stosowana w przypadku kandydemii oraz inwazyjnej kandydozy. Ponadto prowadzone są badania kliniczne III fazy, w zakresie prewencyjnego stosowania tego leku wobec grzybów *Candida sp.*, *Aspergillus sp.* oraz *Pneumocystis sp.* u osób poddawanych transfuzjom krwi oraz transplantacji szpiku kostnego. Podobnie jak rezafungina do grupy echinokandyn należy kaspofungina, w której cyklizacja nastąpiła poprzez utworzenie wiązania amidowego pomiędzy łańcuchem bocznym pierwszej N-końcowej reszty Lys oraz C-końcem łańcucha peptydowego [30]. Takie wiązanie chemiczne znajduje

się m.in.: w mykafuginie, anidulafuginie oraz jej analogach echinokandynie D oraz echinokandynie B. Podstawowa różnica w budowie tych związków chemicznych wynika z różnego podstawienia fragmentu lipofilowego, a także modyfikacji grup hydroksylowych [31]–[34].

Zastosowanie w strukturze chemicznej pierścienia depsiptydowego, a więc z co najmniej jedną substytucją wiązania peptydowego na wiązanie estrowe jest powszechnie występującą modyfikacją w związkach makrocyklicznych. Taką koncepcję tworzenia związków makrocyklicznych można zaobserwować w antybiotykach, których przykładami są daptomycyna, a także streptograminy takie jak chinuprystyna oraz prystynamycyna IA. Cechą wspólną tych trzech cząsteczek jest również zastosowanie nienaturalnych reszt aminokwasowych, które pozytywnie wpływają na parametry farmakokinetyczne, poprzez zwiększenie odporności na proteolizę [35]. Streptograminy wykazują synergistyczne działanie poprzez jednoczesne zastosowanie dwóch grup tych związków tj. wielonienasyconych makrolaktamów oraz cyklicznych heksadepsiptydów. Streptograminy są wykorzystywane jako bakteriostatyki oraz związki o właściwościach bakteriobójczych kierowane na bakterie Gram-dodatnie (Gram (+)) [36]. Wiązanie depsiptydowe występuje również w enniatynach, które są mykotoksynami stanowiących antybiotyki jonoforowe, a dokładniej jonofory naturalne [37].

Ważną grupą antybiotyków z punktu widzenia przeciwdziałania lekooporności bakterii Gram (+) są antybiotyki należące do glikopeptydów. Najlepiej poznanym i od lat stosowanym antybiotykiem z tej grupy jest heptapeptyd – wankomycyna. W strukturze chemicznej tego peptydu znajdują się liczne aromatyczne łańcuchy boczne, które nadają mu charakterystyczne właściwości chemiczne i umożliwiają stworzenie systemu trzech pierścieni makrocyklicznych. Dodatkowo do związku chemicznego poprzez wiązanie *O*-glikozydowe jest przyłączony disacharyd [38]. W grupie antybiotyków glikopeptydowych znajduje się również teikoplanina. Antybiotyk ten jest pod względem struktury chemicznej podobny do wankomycyny, jednak charakteryzuje się czterema systemami makrocyklicznymi, a także zamiast disacharydu posiada mannozę oraz *N*-acetyloglukozaminę [39]. Lek ten jest wykorzystywany w postaci mieszaniny analogów różniących się długością oraz ilością rozgałęzień łańcucha alifatycznego [40]. W najnowszych badaniach nad nowymi strukturami, mającymi potencjalne zastosowanie jako antybiotyki, poszukuje się analogów wankomycyny oraz teikoplaniny. W 2015 roku do użytku został zatwierdzony półsyntetyczny antybiotyk o nazwie orytawancyna, która podobnie do wankomycyny zawiera trzy makrocykle, jednak posiada dodatkowe wiązanie *O*-glikozydowe, a także zmodyfikowany disacharyd [41]. Ponadto, w projektowaniu antybiotyków makrocyklicznych wykorzystuje się cząsteczki będące heterodimerycznymi koniugatami, których przykładem jest cefilawancyna, złożona

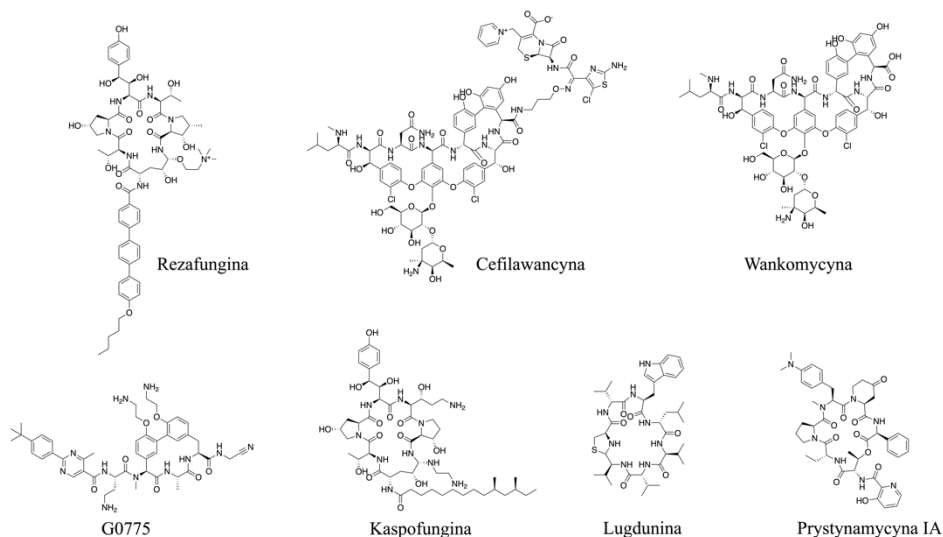
z cefalosporyny oraz glikopeptydu [42]. Obecnie wykorzystywanym analogiem teikoplaniny jest dalbawancyna, zawierająca długi lipofilowy łańcuch boczny, który m.in. wzmacnia wiązanie cząsteczki do błony komórkowej bakterii, a także posiada amidowaną grupę karboksylową łańcucha bocznego, która zwiększa aktywność związku przeciwko bakteriom *Staphylococcus sp.* [43],[44].

W poszukiwaniach nowych antybiotyków skierowanych przeciwko bakteriom Gram-ujemnym (Gram(-)) podjęto próbę optymalizacji struktury chemicznej arylomycyn, które są inhibitorami bakteryjnej peptydazy sygnałowej. W chemicznej budowie tych antybiotyków można wyróżnić makrocykliczny peptyd złożony z trzech reszt aminokwasowych, a ich struktura wykazuje podobieństwo do antybiotyków glikopeptydowych dzięki obecności strukturalnego motywu biarylowego w makrocyklu. [45]. Smith P.A wraz z zespołem opracowali syntetyczny analog arylomycyny o nazwie G0775, który charakteryzuje silne działanie przeciwko niektórym wielolekoopornym bakteriom Gram-ujemnym. Optymalizacja struktury chemicznej związku polegała na wprowadzeniu dodatkowej reszty 2-aminoacetonitrylu, która stanowi elektrofilowy element reagujący z katalityczną resztą seryny celu terapeutycznego. Zmiana ta zwiększyła aktywność cząsteczki względem m.in. *Escherichia coli*. Wzrost aktywności osiągnięto również poprzez modyfikacje grup fenolowych w pierścieniu makrocyklicznym. Ponadto modyfikacji został poddany *N*-końcowy fragment lipopeptydowy [46]. W 2024 roku zaproponowano nowy analog związku G0775, który charakteryzuje szersze spektrum działania względem bakterii Gram (-) oraz lepsze właściwości farmakokinetyczne. W zaprojektowanej cząsteczce wprowadzono wiązanie disiarczkowe na *N*-końcowym fragmencie lipopeptydowym, w porównaniu do G0775 [47].

Innym niedawno odkrytym naturalnym antybiotykiem interesującym pod względem poszukiwania nowych cząsteczek przeciwdrobnoustrojowych jest lugdunina. Cząsteczka ta wykazuje aktywność przeciwko szczepom *Staphylococcus aureus* opornym na metycylinę. Legdunina jest cyklopeptydem tiazolidynowym, w którym naprzemienne występowanie D- oraz L-aminokwasów, obecność tryptofanu i leucyny, a także niepodstawiony pierścień tiazolidyny są niezbędne dla utrzymania aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Optymalizacja struktury chemicznej poprzez substytucję D-waliny w pozycji szóstej na D-tryptofan, umożliwiła otrzymanie cząsteczki chemicznej o dwukrotnie wyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej kierowanej na *Staphylococcus aureus* [48].

Związki makrocykliczne stanowią obiecującą grupę antybiotyków, które dzięki swojej złożonej strukturze, jak wskazano w powyższych przykładach, precyzyjnie oddziałują z celami bakteryjnymi. Makrocykliczne antybiotyki charakteryzują się dużą skutecznością wobec bakterii zarówno Gram (+) jak i Gram (-), a także wobec bakterii opornych na tradycyjne antybiotyki, co czyni tę grupę związków wartości-

wym narzędziem w walce z trudnymi do leczenia infekcjami poprzez blokowanie kluczowych funkcji bakteryjnych. Do makrocyklicznych antybiotyków zaliczamy zarówno naturalne związki, jak i półsyntetyczne pochodne, które są obecnie intensywnie badane i rozwijane przez zespoły badawcze na całym świecie.



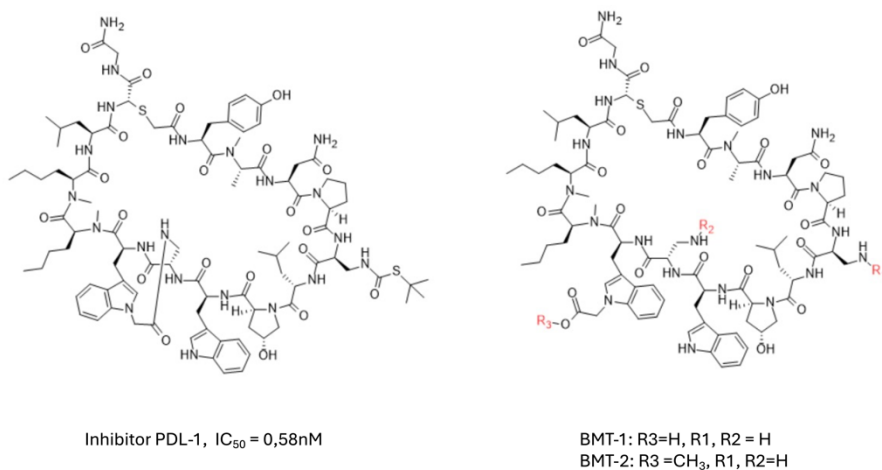
Rysunek 3. Przykłady makrocyklicznych peptydowych antybiotyków. Przygotowane w programie ChemDraw na podstawie struktur SMILES z PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Figure 3. Examples of macrocycle peptide antibiotics. Created with ChemDraw based on SMILES structures from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2. MAKROCYKLICZNE LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Związki makrocykliczne znalazły również zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe. Jednym z powszechnie wykorzystywanych celów terapeutycznych w immunoterapii nowotworów jest szlak sygnalizacyjny PD1/PDL-1 (receptor programowanej śmierci 1, ang. *programmed death receptor 1*, PD-1). Oddziaływanie liganda z receptorem jest punktem kontrolnym układu odpornościowego. PDL-1 nadekspresjonowany przez komórki nowotworowe oddziałuje z receptorem PD1 znajdującym się na komórkach układu odpornościowego, prowadząc do wyciszenia odpowiedzi immunologicznej, a tym samym do progresji nowotworu [49]. W kontekście hamowania tej sygnalizacji rozwijane jest podejście tworzenia antagonistów oddziaływania PD1/PDL-1. W tym celu został stworzony panel MCPs, które wiążą się do liganda PDL-1. Projektowanie inhibitorów zaburzających oddziaływanie PD1/PDL-1 wykorzystuje wiązania ties-

trów do tworzenia MCPs, a dodatkowo w strukturze chemicznej tych związków stosowane są liczne modyfikacje polegające np.: na *N*-alkilowaniu reszt aminokwasowych, włączaniu rozbudowanych cyklicznych cząsteczek chemicznych, a także przyłączaniu długich alifatycznych kwasów karboksylowych [50]. Zostało wyróżnionych i opatentowanych kilka ogólnych struktur chemicznych MCPs jako inhibitorów oddziaływania PD1/PDL-1. Jednym z przykładów jest grupa związków oparta na cząsteczce BMT-1, a drugim grupa bazująca na związku chemicznym BMT-2. Pierwsza cząsteczka posiada w pozycji R3 atom wodoru, tworząc grupę kwasu karboksylowego, natomiast druga w tej samej pozycji zawiera grupę metylową tworząc ester metylowy (Rys. 4). Dodatkowo w strukturze tych związków modyfikowane były pozycje R1 i R2 poprzez wprowadzanie fragmentów alifatycznych lub aromatycznych. Przebadano również panel związków, w których pomiędzy pozycjami R1 oraz R2 wytworzone zostało wiązanie peptydowe, a modyfikacjom została poddana pozycja R1. W wyniku szeregu optymalizacji struktury chemicznej tych związków otrzymano związek chemiczny charakteryzujący się bardzo dobrym oddziaływaniem na poziomie nanomolarnym (IC_{50} wynoszącym 0,58 nM) (Rys. 4) [51].



Rysunek 4. Struktury chemiczne cząsteczek opatentowanych przez firmę Bristol Myers Squibb (BMT-1, BMT-2) oraz zoptymalizowana struktura chemiczna potencjalnego inhibitora PDL-1. Przygotowane w programie ChemDraw na podstawie [51].

Figure 4. Patented molecule chemical structures by Bristol Myers Squibb (BMT-1, BMT-2) and optimized chemical structure of PDL-1 inhibitor. Created with ChemDraw based on [51].

Kolejna opatentowana struktura ogólna MCP o właściwościach przeciwnowotworowych zawiera w makrocyklu łącznik N'-acylohydrazydowy, ale modyfikacjom poddawano również łańcuchy boczne reszt aminokwasowych. Najlepsze uzyskane cząsteczki chemiczne charakteryzowały się wartością IC50 wynoszącą od 1nM do 10nM [51]. Obecnie MCPs objęte ochroną patentową stanowią główny punkt wyjścia w poszukiwaniu silniejszych inhibitorów oddziaływania PD1/PDL-1. Przykładowo, Miao Q. wraz z zespołem podjęli próbę optymalizacji struktury chemicznej opatentowanej przez firmę Bristol Myers Squibb, wykorzystując techniki modelowania molekularnego. W wyniku przeprowadzonych symulacji uzyskali cząsteczkę chemiczną, która wykazała aktywność przeciwnowotworową *in vivo* w mysim modelu nowotworu jelita grubego [52].

Komórki nowotworowe wykształciły także inne mechanizmy unikania śmierci komórkowej, takie jak zwiększona ekspresja inhibitora apoptozy związanego z chromosomem X (ang. *X-linked inhibitor of apoptosis*, XIAP). W 2015 roku opracowano cząsteczkę będącą antagonistą XIAP o strukturze makrocyklicznej. Ta cząsteczka chemiczna charakteryzuje się występowaniem dimerycznych makrocykli, które zostały utworzone przez dwa łączniki triazolowe. Związek ten wykazywał właściwości przeciwnowotworowe w badaniach z wykorzystaniem ksenograftów nowotworu piersi oraz czerniaka [53].

W projektowaniu leków przeciwnowotworowych często jako cele terapeutyczne wybierane są receptory zaangażowane w wiązanie białek chemoatrakcyjnych. Przykładem takiego leku jest motixafortide, inhibitor przeciwnowotworowy działający na receptor chemokiny CXCR4, który występuje pod komercyjną nazwą APHEXDA™ (Rys. 5). Jest to lek syntetyczny, w którego skład wchodzi czternaście reszt aminokwasowych, a cyklizacja została uzyskana poprzez wprowadzenie wiązania disiarczkowego. Lek został dopuszczony do użytku u pacjentów, u których rozwinął się szpiczak mnogi. Inhibicja receptora chemokiny CXCR4 prowadzi do uwalniania chematopoetycznych komórek macierzystych (ang. *chematopoietic stem cells*, HSCs) ze szpiku kostnego do krwi, która następnie jest autologicznie przeszczepiana pacjentom z nowotworem. Badania będące w trzeciej fazie badań klinicznych wykazały, że poza niewątpliwą aktywnością przeciwnowotworową stosowane łącznie motixafortid (Rys. 5) wraz z ludzkim czynnikiem wzrostu granulocytów są bezpieczne oraz dobrze tolerowane przez pacjentów [54]. Skuteczność oraz bezpieczeństwo stosowania motixafortidu są weryfikowane również w przypadku innych chorób takich jak nowotwór przełyku, trzustki, żołądka, a także nowotwory krwi [55]. Poza wymienionymi związkami, selektywnym antagonistą receptora CXCR4 jest również LY2510924 (Rys. 5), który stanowi małą cząsteczkę cyklooktapeptydową, z nienaturalnymi resztami aminokwasowymi, o strukturze cyclo[Phe-Tyr-Lys(iPr)-D-Arg-2-Nal-Gly-D-Glu]-Lys(iPr)-NH₂.

Wykazano, że ten związek chemiczny posiada potencjał do inhibicji przerzutów w eksperymentalnym modelu raka piersi, a obecnie jest również oceniany pod kątem zastosowania w leczeniu nowotworów hematologicznych, raka płuc oraz przerzutowych guzów nowotworowych do nerek [46–49].

Innym przykładem jest praca zespołu Menhaji-Klotz, w której przedstawili racjonalne podejście do projektowania MCPs ukierunkowanego na receptor chemokiny CXCR7, który odgrywa rolę w transmigracji komórek nowotworowych przez śródbłonek. Zaproponowana przez autorów cząsteczka chemiczna, to peptydo-peptoid. Wprowadzenie modyfikacji, które doprowadziło do uzyskania peptydomimetyku, znacząco przyczyniło się do zwiększenia stabilności metabolicznej oraz przepuszczalności przez błony biologiczne [60].

Innym celem terapeutycznym, będącym przedmiotem zainteresowania w kontekście projektowania makrocyklicznych inhibitorów o właściwościach przeciwnowotworowych jest grupa enzymów translokacji dziesięć- jedenastej (ang. *ten-eleven translocation enzymes*, TET), biorących udział w modyfikacji kwasu deoksyrybonukleinowego. Enzymy te są brane pod uwagę szczególnie w przypadku badań nad nowotworami hematologicznymi [61]. W jednym z badań zaproponowano makrocykliczny związek o właściwościach przeciwnowotworowych, mający na celu oddziaływanie z TET1, w którym cyklizacja zachodzi poprzez wiązanie tioestrowe [62].

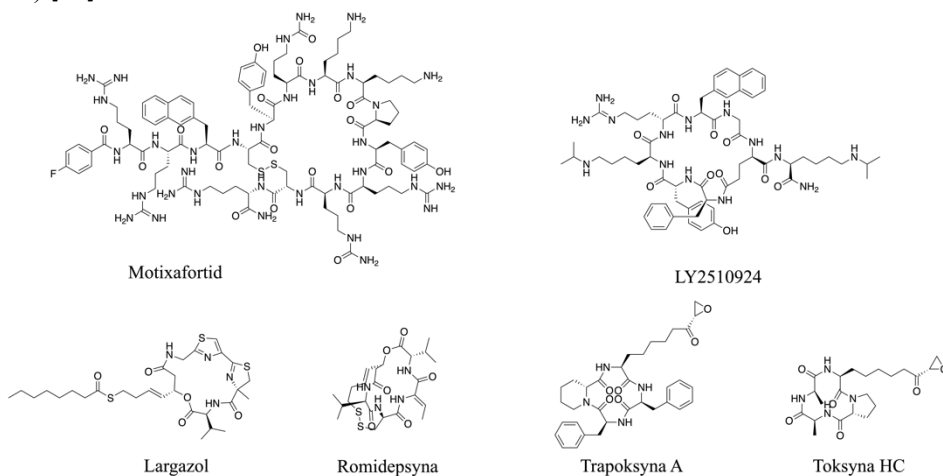
Makrocykliczne peptydy mają również potencjał do pełnienia roli proleków zdolnych do pokonywania bariery krew-mózg, co otwiera nowe możliwości w leczeniu trudnych do terapii schorzeń, takich jak nowotwory mózgu czy choroby neurodegeneracyjne. Ich zdolność do przenikania do ośrodkowego układu nerwowego może znacząco zwiększyć skuteczność terapii, umożliwiając dotarcie leków do miejsc, które dotychczas były trudne do osiągnięcia przy użyciu konwencjonalnych metod leczenia. Dzięki temu makrocykliczne peptydy stanowią obiecujący kierunek badań nad nowymi strategiami terapeutycznymi.

Przykładem cząsteczki chemicznej o wskazanych właściwościach jest largazol (Rys. 5), którego aktywność była badana w glejaku wielopostaciowym. W strukturze chemicznej largazolu znajduje się wiązanie tioestrowe, które jest hydrolizowane prowadząc do utworzenia tiolu largazolu, który jest najsilniejszym naturalnym i selektywnym inhibitorem I klasy deacetylazy histonów. Largazol jest depsiptydowym prolekiem o działaniu antyproliferacyjnym, które zostało potwierdzone na wielu liniach komórek nowotworowych, w tym na liniach raka piersi [63]. Biorąc pod uwagę obiecujące właściwości largazolu, rozpoczęto poszukiwania jego analogów, które mogłyby stać się skutecznymi lekami przeciwnowotworowymi. Jedne z pierwszych modyfikacji wprowadzanych w strukturze chemicznej largazolu obejmowały wymianę fragmentu reaktywnego

odpowiedzialnego za tworzenie wiązania kowalencyjnego z docelową deacetylazą histonów. Co więcej, w celu optymalizacji struktury cząsteczki podejmowano również próby wymiany reszty waliny w rdzeniu makrocyklicznym na inne reszty aminokwasowe, a także modyfikowano fragment tiazolowo-tiazolinowy [64]. Podczas innych badań nad optymalizacją tego związku chemicznego zaproponowano podejście obejmujące wykorzystanie largazolu jako donora tlenu azotu, gdyż aktywacja hydrolityczna analogów largazolu z przyłączonymi grupami nitrowymi prowadzi do uwolnienia tiolu largazolu oraz tlenu azotu. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na liniach komórkowych U-2OS, Caco-2 oraz IRM-32 wykazano synergistyczne działanie przeciwnowotworowe nowych analogów proleku zawierających jedną lub dwie grupy nitrowe w porównaniu do niezmodyfikowanego largazolu [65]. Dane literaturowe sugerują, że modyfikacje fragmentu tiazolowo-tiazolinowego w makrocyklicznej strukturze largazolu mogą potencjalnie prowadzić do uzyskania silnych i selektywnych inhibitorów o działaniu przeciwnowotworowym [64]. Obecnie w badaniach klinicznych znajduje się analog largazolu OKI-179, w którym zmodyfikowano pierścieniowy fragment makrocykliczny largazolu, a także wprowadzono optymalizację umożliwiającą otrzymywanie tego analogu w postaci soli, ułatwiając wchłanianie proleku przy podaniu doustnym [66]. Oprócz largazolu inhibitorem depsiptydowym deacetylaz histonów są tetrapeptydy takie jak trapoksyna A oraz HC Toxin, a także pentapeptyd romidepsyna (Rys. 5), stosowana w leczeniu skórnoego chłoniaka T-komórkowego. Narzędzia modelowania molekularnego wskazują również, że projektowanie inhibitorów dla deacetylazy histonów 6 może być oparte o strukturę makrocyklicznych oktapeptydów. Ich potencjalne zastosowanie wynika z oddziaływania mimikującego wiązanie substratów białkowych przez enzym [67].

Warto również zaznaczyć, że istotną grupą związków makrocyklicznych o potencjale przeciwnowotworowym są cyklotydy, będące minibiałkami pochodzenia roślinnego. Wyróżniono trzy rodziny tych związków: **1)** Moebius, w których w strukturze występuje *cis* prolina, **2)** bransoletkowe (ang. bracelet), w których wszystkie reszty aminokwasowe są w konformacji *trans*, **3)** cykliczne inhibitory trypsyny, które występują w *Mamordica spp.* [68]. W strukturze chemicznej cyklotydy znajduje się około trzydzieści reszt aminokwasowych, a cyklizacja następuje w wyniku utworzenia wiązania amidowego między N-końcową grupą aminową i C-końcową grupą karboksylową peptydu. Ponadto cyklotydy zawierają motyw cyklicznego węzła cystynowego (ang. cyclic cystine knot, CCK), który tworzy pętle peptydowe za pomocą trzech wiązań disiarczkowych (Cys1-Cys4, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6) (Rys. 6)[69]. Wysoce zdefiniowana struktura trzeciorzędowa cyklotydy wpływa na ich unikatową aktywność biologiczną, a także stabilność. Jednym z najwcześniej odkrytych cyklotydy jest kalata B1 (cyclo-

(GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN)), która między innymi hamuje wzrost oraz rozwój larw *Helicoverpa punctigera*, co wskazuje na jej działanie owadobójcze [70]. Niemniej jednak znajdujący się motyw cystynowy w kalacie B1, a także cyklicznych inhibitorach trypsyny są stosowane jako rdzeń dla epitopów peptydowych o potencjalnym zastosowaniu w terapiach przeciwnowotworowych (Rys. 6) [71].

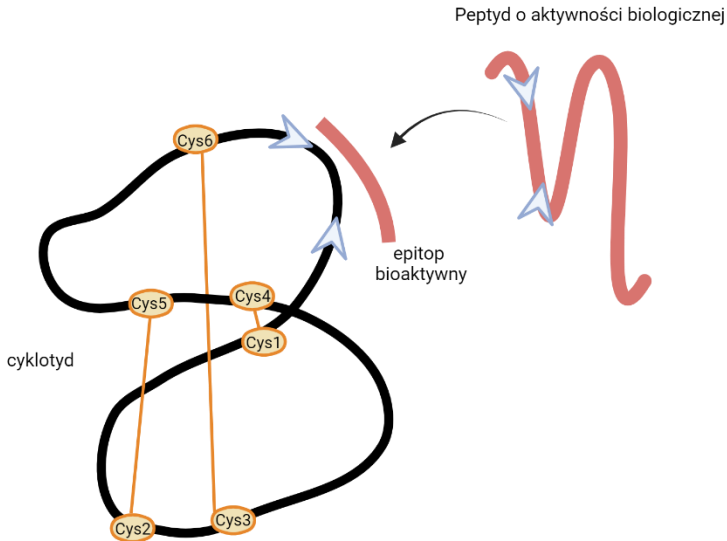


Rysunek 5. Przykłady makrocyklicznych peptydowych cząsteczek o potencjale przeciwnowotworowym. Przygotowane w programie ChemDraw na podstawie struktur SMILES z PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Figure 5. Examples of macrocycle peptide compounds with potential anticancer activity. Created with ChemDraw based on SMILES structures from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Wykorzystanie tego podejścia poprawia przepuszczalność przez błony komórkowe aktywnych peptydów oraz epitopów wprowadzonych do pętli tworzonych przez motyw CCK, a także chroni przed proteolizą wewnątrzkomórkową, przyczyniając się do większej biodostępności. Takie podejście było stosowane między innymi w przypadku tworzenia cząsteczek hamujących angiogenezę guzów nowotworowych poprzez wprowadzenie do CCK sekwencji bogatej w argininę [72]. Potencjał przeciwnowotworowy cyklodydów był również badany pod względem ich aktywności immunomodulującej. Przykładem jest caripe 8 (cyclo-GVIPGESC VFIPCI-TAAIGC SCKKKVCYRN) izolowany z *Carapichea ipecacuanha*, który zwiększa aktywność cytotoksyczną dla komórek naturalnych zabójców (NK, ang. natural killer) układu odpornościowego. Inkubacja cyklotydu z komórkami NK powodowała ich większą degranulację, a także podwyższoną ekspresję interferonu-*gamma*. Ponadto, caripe 8 wykazuje bezpośrednie działanie toksyczne na komórki nowotworowe w badaniach *in vitro*. Należy również zwrócić uwagę, że w izolowanych ekstraktach roślinnych, oprócz carpie 8, zidentyfikowano kilka związków homologicznych, różniących się sekwencją reszt aminokwasowych

w pętach wewnątrzczystynowych, co w znacznym stopniu definiowało ich aktywność biologiczną [73]. Cyklotydy pochodzące między innymi z *Oldenlandia affinis*, charakteryzują się odpornością na proteolizę *in vitro*, wysoką temperaturę oraz niskie pH środowiska, dając nowe możliwości tworzenia terapii przeciwnowotworowych [71].



Rysunek 6. Schemat przedstawia ideę projektowania leków przeciwnowotworowych z wykorzystaniem motywu węzła cystynowego. Na schemacie wyróżniono konserwatywne reszty cysteinowe uczestniczące w tworzeniu wiązań disiarczkowych. Przygotowano na podstawie [72] w programie BioRender.

Figure 6. Scheme presents the idea of the anticancer drug design based on cyclic cysteine knot. There are marked conserved cysteine residues, that crate disulfide bonds. Created with BioRender based on [72].

2.3. MAKROCYKLICZNE LEKI HORMONALNE – ANALOGI INSULINY I SOMATOSTATYNY

Peptydy makrocykliczne odgrywają coraz większą rolę w rozwoju leków hormonalnych, głównie ze względu na opisaną wcześniej odporność na enzymatyczną degradację. Dzięki temu peptydy makrocykliczne mogą dłużej utrzymywać się w organizmie, co jest kluczowe w terapii hormonalnej. Ich zdolność do precyzyjnego wiązania się z receptorami hormonalnymi umożliwia skuteczną regulację procesów biologicznych, takich jak kontrola poziomu glukozy we krwi czy modulacja funkcji układu rozrodczego. W literaturze opisanych jest wiele makrocyklicznych związków będących lekami hormonalnymi lub kandydatami na leki. Przykładem takiego zastosowania jest somatostatyna (Rys. 7), która jest naturalnym cyklicznym hormonem, który występuje w dwóch biologicznie aktyw-

nych formach, jako somatostatyna-14, zbudowana z czternastu reszt aminokwasowych, oraz somatostatyna-28 złożona z 28 reszt aminokwasowych. Jej rolą biologiczną jest kontrola uwalniania hormonu wzrostu, enzymów trzustkowych, a także regulacja wydzielania hormonów tarczycy. Receptory oddziałujące z somatostatyną są istotnym celem terapeutycznym ze względu na szeroki zakres działania biologicznego tego hormonu [74].

Aby zaprojektować makrocykliczne cząsteczki będące analogami hormonów do zastosowań klinicznych, kluczowe było zmniejszenie rozmiaru tych cząsteczek, wydłużenie ich czasu półtrwania w organizmie oraz poprawa selektywności oddziaływania z receptorami. [75]. Liczne badania doprowadziły do uzyskania obiecujących cząsteczek i obecnie w klinicznym użyciu znajdują się dwa syntetyczne analogi somatostatyny: oktreotydy oraz lanreotydy, które są ukierunkowane na pojedynczy receptor (ang. *single-receptor-targeted somatostatin analogs*), a także analog drugiej generacji o szerszym spektrum działania – pasyreotydy. [76]. Oktreotydy (Rys. 7) to oktapeptydy powstały przez wiązanie disiarczkowe. Kluczowym aminokwasem wpływającym na aktywność tego analogu jest D-tyrozyna, natomiast C-końcowy aminoalkohol ma znaczenie dla zwiększenia odporności na degradację metaboliczną cząsteczki chemicznej [75]. Lanreotydy, podobnie jak oktreotydy, jest cyklicznym oktapeptydem z tym, że posiada w strukturze substytucję D-fenylalaniny na nienaturalną 2-naftylo-D-alaninę. Z kolei pasyreotydy jest zbudowany z sześciu reszt aminokwasowych i, w przeciwieństwie do makrocyklicznych leków pierwszej generacji, nie posiada w strukturze mostka disiarczkowego. Zastosowano w nim natomiast cyklizację „głowa-do-głowy” [77].

Projektowanie analogów somatostatyny wiązało się z dużym wyzwaniem, jakim było uzyskanie związków o wydłużonym czasie półtrwania. Po wielu badaniach udało się jednak wprowadzić na rynek farmaceutyczny nowe formułacje oktreotydy i lanreotydy, które umożliwiają stopniowe i długotrwałe uwalnianie leku, co znacząco poprawia skuteczność terapii [78]. Jednym z przykładów udanych optymalizacji jest kompleks oktreotydy, który w połączeniu z mikrosferami karboksymetylocelulozowymi podawany jest domięśniowo lub w formie roztworu lipidowego. Do innych rozwiązań, jakie obecnie są proponowane, a także intensywnie badane, zaliczana jest enkapsulacja analogów somatostatyny w celu doustnej aplikacji leku, a także stosowanie preparatów hydrożelowych, które stanowiłyby implanty podskórne o ograniczonym uwalnianiu związków [79].

W odpowiedzi na zapotrzebowanie na lek o mniejszym działaniu supresyjnym na aktywność insuliny w innych badaniach zaproponowano analog somatoprim, który, podobnie jak oktreotydy, może być dodatkowo stosowany w leczeniu akromegalii [80]. Mając na celu zoptymalizowanie terapii na tę chorobę opracowana została nowa klasa chimerycznych cząsteczek zwanych dopastatynami, które łączą

analogi somatostatyny oraz agonistów dopaminy. Stosowanie takich koniugatów znacząco wzmocniło efekt hamowania wydzielania hormonu wzrostu [81]. Dodatkowo badania z wykorzystaniem dopastatyny TBR-760 wskazały na obkurczanie komórek nowotworowych tworzących nieaktywne gruczolaki przysadki mózgowej [82]. Niemiej jednak TBR-760 został wycofany z badań klinicznych ze względu na prawdopodobne tworzenie metabolitu, który uniemożliwiał chimerycznej cząsteczce oddziaływanie z docelowym receptorem po ponownym podaniu leku. Dlatego też obecnie poszukiwane są nowe analogi dopastatyn, a jednym z obiecujących związków jest analog TBR-065 będący już w II fazie badań klinicznych [83].

Analogi insuliny można podzielić na dwie główne grupy w zależności od ich sposobu działania. Pierwszą grupę stanowią szybko działające analogi, do której należą między innymi: insulina lizpro, aspart oraz glulizynowa. W celu uzyskania tej klasy insulin modyfikacji poddawane są głównie reszty aminokwasowe w łańcuchu *beta* tj. prolina 28 (P28) oraz lizyna w pozycji 29 (K29). I tak, insulina lizpro była pierwszym szybko działającym lekiem wprowadzonym na rynek farmaceutyczny. W tym przypadku modyfikacja w łańcuchu *beta* insuliny polegała na zamianie kolejności reszt aminokwasowych P28 i K29. Wprowadzenie tej optymalizacji w strukturze chemicznej insuliny lizpro spowodowało jej destabilizację prowadząc do zwiększenia szybkości wchłaniania po podaniu [84]. Z kolei tworzenie mniej stabilnej cząsteczki insuliny aspart zostało uzyskane poprzez substytucję P28 łańcucha *beta* na kwas asparaginowy. Natomiast w insulynie glulizynowej zastąpiono resztę asparaginy w pozycji 3 resztą lizyny, a resztę lizyny w pozycji 29 resztą kwasu glutaminowego [85].

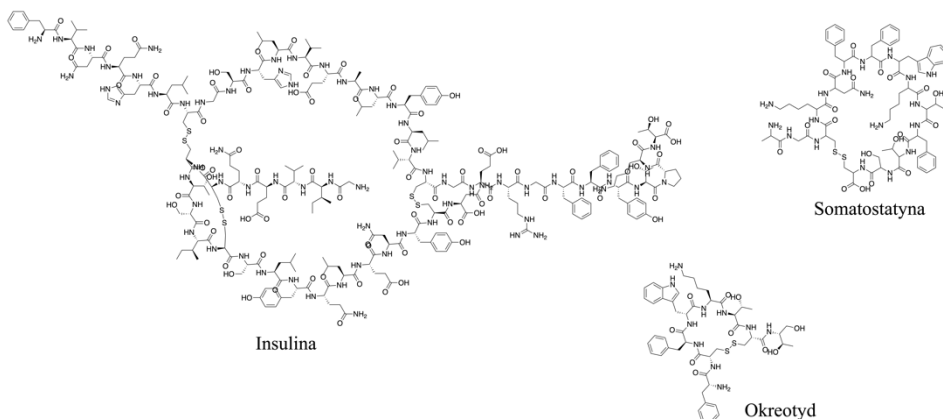
W ostatnich latach widoczny jest przyrost ultraszybko działających pochodnych insuliny, a jest to osiągnięte przez modyfikacje formulacji znanych już analogów tego hormonu. W 2020 roku została wprowadzona insulina lizpro-aabc o komercyjnej nazwie Lyumjev, o zwiększonej absorpcji, uzyskanej przez zastosowanie treprostynilu podwyższającego ciśnienie krwi, a także cytrynianu wpływającego na przepuszczalność naczyń krwionośnych [86]. Kolejnym przykładem jest wprowadzony w 2017 roku pod nazwą Fiasp analog insuliny zawierający insulinę aspart oraz niacynamid, którego zadaniem jest zwiększenie początkowej zawartości monomerów insuliny aspart oraz jej transportu. Ponadto wpływa on na lokalne rozszerzenie naczyń krwionośnych [87].

Oprócz analogów insuliny o zwiększonej szybkości działania, często konieczne jest zastosowanie analogu o odmiennych właściwościach, który jest określany jako insulina o opóźnionym działaniu lub insulina bazalna lub długodziałająca. Jest ona stosowana w celu utrzymania stabilnego poziomu glukozy we krwi przez dłuższy okres, zazwyczaj przez całą dobę. Jej głównym celem jest naśladowanie naturalnego,

podstawowego wydzielania insuliny przez trzustkę, które odbywa się w małych ilościach przez cały dzień, niezależnie od posiłków. Dlatego też naukowcy stworzyli analogi insuliny o opóźnionym działaniu [88]. W tym przypadku modyfikacje insuliny obejmują podstawienie lub przyłączenie dodatkowych reszt aminokwasowych, a także przyłączenie kwasów tłuszczowych. Jednym z przykładów jest insulina glargine, w której dokonano substytucji reszty asparaginy w pozycji 20 na resztę glicyny oraz przyłączono dwie cząsteczki argininy. W innym przypadku (insulina detemir) wydłużenie czasu półtrwania insuliny uzyskano poprzez przyłączenie mirystoilowego kwasu tłuszczowego do lizyny 29, a także delecję troniny w pozycji 30 *beta* łańcucha. Natomiast koniugacja 16-węglowego kwasu tłuszczowego poprzez kwas glutaminowy do lizyny w pozycji 29, a także delecja treoniny w pozycji 30 *beta* łańcucha pozwoliły na uzyskanie insuliny degludec [89].

Obecnie poszukuje się nowych insulin o wydłużonym czasie działania, a w projektowaniu nowych analogów insuliny dąży się m.in.: do ich wydłużonego wchłaniania, czy wzrostu czasu półtrwania, a można to osiągnąć np.: poprzez stosowanie glikolu polietylenowego oraz jego mimetyków, a także poprzez tworzenie białek fuzyjnych [88].

W 2024 roku została zaakceptowana w Kanadzie oraz Unii Europejskiej nowa ultrawolnodziałająca insulina icodec opracowana przez firmę Novo Nordisk. Zaletą opracowanego analogu insuliny jest możliwość stosowania leku raz w tygodniu [90]. Insulina icodec została zoptymalizowana na podstawie analogu doustnej insuliny OI338. Modyfikacje obejmowały wprowadzenie 1,20-kwasueikozanodiowego, a także substytucję trzech aminokwasów: reszty alaniny 14 oraz dwóch reszt tyrozyny 16 i 25. Zastosowane zmiany wpłynęły odpowiednio na lepszą zdolność wiązania albuminy w osoczu, a także zmniejszone oddziaływanie z receptorem inuliny [91]. W przyszłości peptydy makrocykliczne mogą stać się podstawą nowych terapii hormonalnych, oferując bardziej efektywne i bezpieczne alternatywy dla tradycyjnych leków.



Rysunek 7. Przykłady makrocyklicznych hormonów. Przygotowane w programie ChemDraw na podstawie struktur SMILES z PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Figure 7. Examples of macrocycle hormones. Created with ChemDraw based on SMILES structures from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

3. MAKROCYKLICZNE ZWIĄZKI W DIAGNOSTYCE CHOROÓB CYWILIZACYJNYCH

3.1. MAKROCYKLICZNE ZWIĄZKI RADIOIZOTOPOWE

Makrocykliczne związki peptydowe, dzięki swoim unikalnym właściwościom strukturalnym, zdobywają coraz większe uznanie w medycynie nie tylko jako leki w terapii chorób cywilizacyjnych, ale także w ich precyzyjnej diagnostyce. Ze względu na to, że makrocykliczne związki peptydowe charakteryzują się wysoką stabilnością, specyficnością wiązania oraz możliwością modyfikacji chemicznych, są one idealnymi narzędziami w diagnostyce.

W ostatnich latach przeprowadzono liczne badania nad zastosowaniem makrocyklicznych związków peptydowych zarówno w leczeniu jak i w diagnostyce chorób cywilizacyjnych, w tym w obrazowaniu nowotworów oraz detekcji chorób naczyniowo-sercowych. Wprowadzenie makrocyklicznych cząsteczek o strukturze peptydowej do radioterapii stanowi obiecujący kierunek w rozwoju tej dziedziny. Dzięki precyzyjnemu celowaniu na określone enzymy lub białka, te makrocykliczne peptydowe związki chemiczne mogą znacząco zwiększyć precyzję i skuteczność leczenia i diagnostyki, a także wpłynąć na zmniejszenie skutków ubocznych radioterapii, czy mało dokładną diagnozę. Niepożądane oddziaływanie na zdrowe komórki jest ograniczone dzięki celowaniu w konkretny czynnik biologiczny i ograniczeniu interakcji z otaczającymi go komórkami, a diagnoza bardziej precyzyjna przez detekcję charakterystycznych białek dla danej jednostki chorobowej. Dokładna diagnostyka umożliwia ukierunkowaną terapię co prowadzi do większej efektywności.

Zaproponowane oraz opatentowane przez firmę Bristol Myers Squibb MPCs są cały czas badane i ulepszone nie tylko jako struktury wiodące inhibitorów oddziaływania PDL-1/ PD-1, ale również w kontekście tworzenia sond chemicznych do diagnostyki onkologicznej. Na przykład, ze względu na obecność wolnej grupy aminowej, cząsteczka BMS78 (cyklo(AcPhe-^mPhe-^mNle-Gly-Asp-Val-^mPhe-Tyr-^mGly-Trp-Tyr-Leu-Cys)-Gly-NH₂) została zmodyfikowana poprzez przyłączenie powszechnie stosowanego chelatora DOTA. Dzięki tej modyfikacji możliwe jest znakowanie cząsteczki metalami radioaktywnymi, które są wykorzystywane w obrazowaniu metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET). Jednak projektowanie tego typu związków nadal pozostaje wyzwaniem, ponieważ wprowadzenie chelatora do struktury makrocyklicznej obniża powinowactwo cząsteczki chemicznej do PD-L1 [92].

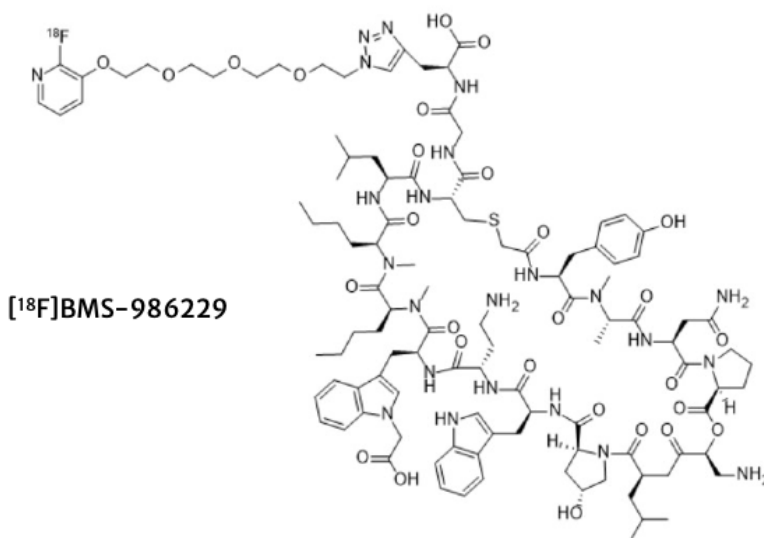
Pomimo tego inny makrocykliczny peptyd znakowany radioizotopami, ⁶⁸Ga-NOTA-WL12, wykazuje obiecujące wyniki *in vitro* oraz *in vivo*. Cząsteczka zawierająca makrocykliczny peptydomimetyk (WL12, cyclo(AcTyr-^mAla-Asn-Pro-His-Leu-Hyp-Trp-Ser-Trp(Me)-^mNle-^mNle-Orn(DOTAGA)-Cys)-Gly-NH₂) jest już w badaniach klinicznych z udziałem pacjentów cierpiących na raka płuc. W cząsteczce WL12 znajduje się czternaście reszt aminokwasowych, a cyklizacja została dokonana powszechnie wykorzystywanym wiązaniem tioeterowym. Zastosowanie sondy chemicznej ⁶⁸Ga-NOTA-WL12 umożliwiło zlokalizowanie PDL-1 w guzach nowotworowych wskazując na użyteczność tej cząsteczki w diagnostyce nowotworów [93]. Ponadto cząsteczkę WL12 zmodyfikowano przy użyciu innego radioizotopu (⁶⁴Cu), co również umożliwiło obrazowanie nowotworów, wskazując na uniwersalność peptydu WL12 w wiązaniu do PDL-1 [94].

Innym przykładem radiologicznego makrocyklicznego peptydowego markera, który stanowi potencjalne narzędzie do oceny ekspresji PDL-1 jest ¹⁸F-BMS-986229 (Rys. 8). Został on przebadany na pacjentach z nowotworem żołądka oraz przełyku, gdzie nie wykazywał skutków ubocznych, a dodatkowo wskazywał na heterogeniczną ekspresję PDL-1 przez komórki nowotworowe, co w przyszłości może zostać wykorzystane do tworzenia terapii personalizowanej [95].

W związku z nadekspresją glipikanu-3 (GPC3) u pacjentów z nowotworami prowadzone są badania i rozwijane są terapie radiofarmaceutyczne wykorzystujące to białko jako cel terapeutyczny i diagnostyczny [96]. Jednym z przykładów jest cząsteczka RAYZ-8009 (DOTA-RYZ-GPC3) składająca się linkera, chelatora radioizotopów, a także MCP stanowiącego element oddziałujący z docelowym białkiem. Niestety, struktura chemicznej elementu makrocyklicznego nie została ujawniona [97].

Innym celem terapeutycznym, dla którego zaprojektowano związki makrocykliczne znakowane izotopami jest receptor CXCR4. Antagonista tego receptora, LY2510924 (cyclo[Phe-tyr-Lys(iPr)-*D*-Arg-2-Nal-Gly-*D*-Glu]-Lys(iPr)-NH₂), w ostatnim czasie został zmodyfikowany z wykorzystaniem izotopów ⁶⁸Ga, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, a chelator metalu przyłączono przez resztę cysteiny. W tym przypadku wprowadzenie C-końcowej modyfikacji nie zmieniło w znaczący sposób powinowactwa do wiązania receptora CXCR4 [98]. W innych badaniach cząsteczka tego inhibitora była modyfikowana za pomocą hydrofilowych linkerów oraz grupy trifluoroboranowej [85] służącej do znakowania promieniotwórczego ¹⁸F [99]. Opracowano także analog LY2510924 z przyłączonym kompleksem metal - chelator (⁶⁴Cu-NOTA) poprzez łącznik butano-1,4-diaminowy [100]. Co ciekawe inny zespół badawczy jako łącznik chelatora radioizotopów (DOTA) zastosował resztę lizyny, co poprawiło wiązanie analogów LY2510924 do receptora [101]. Mając na względzie powyższe przykłady można wywnioskować, że cząsteczka LY2510924 może znaleźć potencjalne zastosowanie również do obrazowania fluorescencyjnego, do rezonansu magnetycznego, a także może stanowić podstawę do projektowania leków cytotoksycznych [98].

Analogi somatostatyny również są poddawane przekształceniom w znaczniki radioizotopowe oraz radiofarmaceutyki. W tym przypadku obserwuje się tendencję do modyfikowania istniejących już cząsteczek radioizotopowych poprzez jednoczesną wymianę izotopów metali oraz ich chelatorów, a także do wprowadzania zmian w resztach aminokwasowych makrocyklicznego peptydu. Koncepcja ta została zastosowana podczas projektowania m.in.: ¹⁸F-FET-βAG-TOCA. Niemniej jednak modyfikacje te mogą być wprowadzane oddzielnie np.: poprzez wymianę reszt aminokwasowych z zachowaniem fragmentu chelatującego jon metalu, wpływając na oddziaływanie z docelowym receptorem. W projektowaniu cząsteczek radioizotopowych w przypadku analogów somatostatyny podejmuje się próby wymiany izotopu ⁶⁸Ga na izotop ¹⁸F, w związku z czym prowadzone są badania porównawcze tych cząsteczek o potencjalnych zastosowaniach klinicznych, jak w przypadku porównania F-AIF-NOTA-OC z GaGa-DOTA-TATE [102].



Rysunek 8. Przykład makrocyklicznej cząsteczki jako radioizotopowej sondy chemicznej. Przygotowane w programie ChemDraw na podstawie [95]

Figure 8. Example of macrocycle molecule as a radioisotope chemical probe. Created with ChemDraw based on [95].

3.2. MAKROCYKLICZNE SONDY CHEMICZNE

Makrocykliczne związki fluorescencyjne stanowią wyjątkową grupę sond chemicznych, które są szeroko stosowane w diagnostyce ze względu na swoją zdolność do emitowania fluorescencji po wzbudzeniu. Związki fluorescencyjne charakteryzują się względną uniwersalnością, gdyż mogą być wykrywane przez większości sprzętów dostępnych w laboratoriach biologii komórki. Natomiast makrocykliczne związki fluorescencyjne, dzięki zamkniętej strukturze pierścieniowej, są nie tylko bardziej stabilne, ale także wykazują większą selektywność w wiązaniu się z konkretnymi biomarkerami umożliwiając precyzyjne obrazowanie procesów biologicznych na poziomie komórkowym. Najczęściej sondy takie są projektowane do wykrywania i monitorowania nowotworów. Przykładowo, opracowana została sonda chemiczna do obrazowania fluorescencyjnego integrzyn nadeksprymowanych m.in.: w nowotworach płuc oraz jajnika w zakresie bliskiej podczerwieni (ang. *near infrared*, NIR), która zawiera w swojej strukturze cykliczny peptyd arginino-glicyno-asparaginianowy (cRGDfK) selektywnie oddziałujący z integrzynami. Niewątpliwie pozytywną cechą znaczników fluorescencji NIR jest głęboka penetracja tkanek światłem w bliskiej podczerwieni, a także nie pokrywanie się z autofluorescencją komórek. Jednak często wyzwaniem w ich stosowaniu jest

duży rozmiar oraz ładunek polianionowy negatywnie wpływający na farmakokinetykę projektowanych sond chemicznych oraz ich wydajne oddziaływanie z celem molekularnym. Ponadto występowanie dużej powierzchni hydrofobowej, jak w przypadku fluorescencyjnego znacznika Cy7, może prowadzić do agregacji, a także nieselektywnego oddziaływania w układach biologicznych. W związku z licznymi ograniczeniami znaczników NIR fluorofory te cały czas są poddawane chemicznym modyfikacjom, które umożliwiają otrzymywanie nowych cząsteczek o lepszych właściwościach fizykochemicznych. Dodatkowo osłabienie selektywnego znakowania docelowych białek może wynikać m.in.: z oddziaływania sond chemicznych z albuminą. Dlatego też istotne jest, aby projektowana sonda chemiczna wykazywała się wyższym powinowactwem do biomarkera niż do białek osocza krwi [103],[104]. Rananjaya S. z zespołem podjęli próbę opracowania trzech sond chemicznych NIR, różniących się jedynie łącznikami (amidowym, triazolowym, tiolowym) znajdującymi się między cyjaninowym znacznikiem fluorescencyjnym NIR, a peptydem cRGDfK. Cząsteczki te umożliwiły skuteczne obrazowanie komórek guzów nowotworowych. Co ciekawe, w badaniach tych zaobserwowano także, że różnica w budowie chemicznej sond przyczynia się do zmienionej biodystrybucji. Sondy z łącznikiem triazolowym oraz tiolowym wykazywały mniejszą selektywność do nowotworu. Ponadto sonda z łącznikiem triazolowym była akumulowana w nerkach, co potencjalnie może powodować skutki uboczne jej stosowania w obrazowaniu. Wyznaczono stałe asocjacji sond molekularnych do albuminy surowicy bydlęcej (BSA), które wynosiły odpowiednio dla sondy chemicznej z łącznikiem amidowym 7000 M^{-1} , triazolowym 4000 M^{-1} , tiolowym 5000 M^{-1} , jednak wykazywały one mniejsze powinowactwo do BSA niż selektywny cyklopeptyd do integryn. W związku z tym oddziaływanie BSA z sondami chemicznymi nie powinno wpływać na osłabienie ich powinowactwa do biomarkera. Omówione sondy chemiczne mogą znaleźć zastosowanie w obrazowaniu guzów nowotworowych oraz kontroli fluorescencyjne w chirurgii onkologicznej [103]

Inna praca pokazuje niekonwencjonalne podejście do projektowania sond chemicznych z wykorzystaniem chemii supramolekularnej i niekowalencyjnie somoorganizujących cząsteczek, wśród których znajdują się elementy oddziałujące z biomarkerem oraz umożliwiające detekcję. Cząsteczka ta tworzy kompleks znacznika fluorescencyjnego - bis(hydroksy)fenyloskwarainy przewleczonego przez makrocykl z przyłączonym cRGDfK. Ugrupowanie to charakteryzuje się stałą asocjacji w wodzie wynoszącą 10^8 M^{-1} i jest stabilizowane przez cztery wiązania wodorowe utworzone przez atomy tlenu znacznika fluorescencyjnego oraz reszty NH związku makrocyklicznego. Ponadto w kompleksie występuje oddziaływanie

hydrofobowe wynikające z obecności licznych reszt aromatycznych w obu cząsteczkach [105].

Makrocykliczne fluorescencyjne sondy chemiczne NIR zostały zaproponowane do obrazowania naczyń krwionośnych nowotworów, dając wgląd w proces angiogenezy zmian nowotworowych. W tym przypadku zastosowano specyficzny ligand śródbłonna naczyń nowotworów - CX1 skoniugowany ze znacznikiem cyjaninowym przez wiązanie peptydowe [106].

W literaturze pojawiają się również doniesienia na temat badań nad fluorescencyjnymi cząsteczkami, których struktura jest oparta na analogach somatostatyny. Przykładem jest okreotyd znakowany fluoresceiną, który został użyty w biosensorze do obrazowania komórek nowotworowych. Mechanizm działania tego biosensora jest oparty o absorpcję sondy chemicznej do tlenku grafenu, co prowadzi do wygaszenia fluorescencji. Detekcja sygnału następuje po kompetycyjnym wyparciu sondy chemicznej z powierzchni tlenku grafenu przez przeciwciało anty-okreotyd [107]. Innym przykładem jest makrocykliczny peptyd tioeterowy znakowany fluoresceiną, który wykazuje powinowactwo do wiązania się z białkiem c-Met i umożliwia jego detekcję [108]. c-Met jest celem terapeutycznym, wykorzystywanym w medycynie personalizowanej, który reguluje liczne procesy komórkowe nowotworów żołądka, jajników, czy tarczycy [109]. W ostatnich latach podjęto również próbę stworzenia makrocyklicznej sondy peptydowej do detekcji keratyny typu I nadeksprymowanej w nowotworach piersi. W tym celu makrocykliczny peptyd skoniugowano z fluoroforem: redBODIPY lub BODIPY-TR. Obie sondy umożliwiały detekcję komórek nowotworowych, jednak makrocykliczny peptyd zawierający BODIPY-TR charakteryzował się zwiększoną ilością sygnału w porównaniu do tła (ang. *signal to noise ratio*) i posłużył do wydajnego obrazowania komórek nowotworu piersi MDA-MB-231 [110]. Kolejnym przykładem nowatorskiego podejścia było utworzenie pary sond chemicznych, których fluorescencja zależała od generowanego rezonansowego transferu energii fluorescencji (FRET), do badania sygnalizacji AKT. Pierwsza sonda wiązała się z białkiem AKT, a druga specyficznie rozpoznawała fosforyzowaną resztę seryny 474 (pS474) tego białka. Po przyłączeniu dwóch znakowanych fluorescencyjnie cząsteczek do tego samego białka następowało FRET, które umożliwiało detekcję sygnału pochodzącego jedynie od sondy chemicznej specyficznej dla pS474 [111]. Badania nad opracowaniem oraz zastosowaniem makrocyklicznych związków fluorescencyjnych, szczególnie w kontekście wykrywania nowotworów, z roku na rok otwierają nowe możliwości do badań chorób nowotworowych w sposób precyzyjny i łatwy w detekcji.

4. PERSPEKTYWY

Stale rozwijające się choroby cywilizacyjne wymagają nowych precyzyjnych, czułych i szybkich rozwiązań terapeutycznych oraz diagnostycznych. Szansy w pokonywaniu trudności medycznych dotyczących chorób cywilizacyjnych, takich jak nowotwory, cukrzyca, a także lekooporność patogenów poszukuje się w makrocyklicznych związkach peptydowych. Na rozwój chemii biologicznej w tym kierunku istotny wpływ ma m.in. rozszerzona w ostatnich latach wiedza na temat oddziaływań tych związków z celami terapeutycznymi, dynamiczny postęp w metodach syntezy i skringu selektywnych makrocyklicznych peptydów (MCPs), jak również rosnąca świadomość korzyści płynących z ich przewagi nad liniowymi peptydami. Przeprowadzony przegląd literatury pozwala na wskazanie kształtujących się trendów w zakresie diagnostyki i terapii chorób, które wynikają z omawianych zagadnień.

Jednym z powszechnych problemem dotykających medycynę jest występująca lekooporność drobnoustrojów, w związku z czym konieczne jest poszukiwanie nowych antybiotyków. Do grupy jednych z bardziej obiecujących należą makrocykliczne peptydowe pochodne, które wielokrotnie wykazały się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Proponowanym rozwiązaniem jest projektowanie cząsteczek heterodimerycznych, które łączą cechy różnych klas antybiotyków. Inną strategią jest poszukiwanie analogów antybiotyków glikopeptydowych oraz cząsteczek z motywem biarylowym, co wynika z dobrze poznanych zależności struktura chemiczna – aktywność związków naturalnych. Ponadto stosowane są formułacje leków oparte o różne analogi antybiotyków, wykazujące zróżnicowaną siłę oddziaływania na bakterie. Pomimo licznych sukcesów konieczne jest dalsze poszukiwanie nowych mechanizmów bakteriobójczych oraz bakteriostatycznych i nowych związków przeciwdrobnoustrojowych w odpowiedzi na rosnący problem antybiotykooporności.

Związki makrocykliczne znalazły zastosowanie nie tylko jako antybiotyki, ale także w terapii i diagnostyce nowotworów. Obecnie leczenie nowotworów opiera się na kilku filarach, do których należą m.in. radioterapia, chemioterapia, a także immunoterapia i chirurgia onkologiczna. Ze względu na wysoce heterogeniczną naturę nowotworów, co raz częściej zwraca się uwagę na medycynę personalizowaną oraz na leczenie, które łączy różne strategie terapii nowotworowych. W tym przypadku związki makrocykliczne także znalazły zastosowanie. Nowe metody syntezy chemicznej MCPs ułatwiają wprowadzanie modyfikacji peptydomimetycznych do dostępnych struktur wiodących celowanych m.in.: na szlak sygnalizacyjny PD-1/PDL-1, a tym samym przyczyniają się do uzyskiwania większej ilości analogów w krótszym czasie. Dodatkowo, stosowanie strategii peptydomime-

tycznej, ma duży wpływ na projektowanie cząsteczek chemicznych o satysfakcjonujących parametrach farmakokinetycznych. W związku z tym wydaje się, że w najbliższych latach nadal będzie widoczny trend wzrostowy w badaniach w tym obszarze. Kładziony jest również nacisk na poszukiwanie inhibitorów receptorów chemokin, które uczestniczą w procesach chemoatrakcyjnych. Ponadto właściwości niektórych MCPs umożliwiają pokonywanie bariery krew-mózg, co potencjalnie wpłynie na poszukiwanie nowych celów terapeutycznych oraz leków m.in. w nowotworach mózgu, czy chorobach neurodegeneracyjnych. Alternatywą dla tych podejść jest również strategia tworzenia cyklotydów, często stanowiących naturalny mechanizm obronny roślin przed drobnoustrojami, jednak biorąc pod uwagę ich aktywność przeciwnowotworową otwiera to nową ścieżkę rozwoju tej grupy leków. Możliwość przeprowadzania licznych substytucji w pętłach cyklotydów, wynikająca z tolerancji motywu węzła cystynowego na wprowadzane modyfikacje, wydaje się obiecującym narzędziem projektowania nowych leków peptydowych podawanych doustnie.

Peptydowe związki makrocykliczne są analogami hormonów, dlatego też wykorzystuje je się także w hormonoterapii zastępczej. Dużymi wyzwaniem w projektowaniu leków hormonalnych są m.in.: stabilność otrzymywanych związków makrocyklicznych, czas półtrwania oraz droga ich podania, głównie poprzez iniekcję. Obecnie trwają badania skupiające się nad optymalizacją formulacji leków przez aplikację technologii nośników hydrożelowych, czy roztworów lipidowych. Coraz bardziej powszechne, w przypadku terapii cukrzycy, staje się stosowanie analogów insuliny z innymi związkami aktywnymi biologicznie. Ciekawą gałęzią badań związków makrocyklicznych jako hormonów mogłyby być badania nad modyfikacjami oksytocyny, celem zwiększenia jej skuteczności w wywoływaniu porodów. W kilkuletniej perspektywie rozwój MCPs może wpłynąć na otwarcie nowej drogi otrzymywania leków hormonalnych o pożądanej skuteczności i polepszonych właściwościach farmakokinetycznych.

Rozwój diagnostyki, a także chirurgii onkologicznej z wykorzystaniem kontroli fluorescencyjnej *in vivo* nie byłyby możliwe bez zastosowania sond chemicznych oznaczających docelowe receptory oraz enzymy. Obrazowanie z wykorzystaniem sond chemicznych jest bezinwazyjną metodą, umożliwiającą m.in.: monitorowanie stanu zdrowia osób z nowotworami, precyzyjną ekstrakcję guza, dobieranie terapii, a także poznawanie mechanizmów rozwoju chorób cywilizacyjnych. Obecnie istnieje ograniczona liczba doniesień dotyczących MCPs znakowanych fluorescencyjnie, które mogłyby być wykorzystywane w badaniach *in vitro*. Nadzieje na rozwój obrazowania fluorescencyjnego z zastosowaniem MCPs daje opublikowana ostatnio praca dotycząca potencjalnego zastosowania cyklicznych analogów AE105. Przypuszczalnie zastosowanie ich w połączeniu z hydrofilowym linkerem może

zostać wykorzystane do tworzenia sond ukierunkowanych na receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazy, którego ekspresja jest podwyższona w chorobach nowotworowych [112]. Ze względu na dynamiczny rozwój metody otrzymywania MCPs prawdopodobnie w kolejnych latach będzie widoczny wzrost projektowania fluorescencyjnych sond chemicznych, a może to się przekładać, na poszukiwanie nowych celów terapeutycznych, a także projektowaniu cząsteczek terapeutycznych.

UWAGI KOŃCOWE

W związku z ich korzystnymi właściwościami farmakokinetycznymi i potencjałem stosowania w medycynie zainteresowanie makrocyklicznymi związkami peptydowymi stale rośnie. Cyklizacja peptydów stabilizuje ich łańcuch oraz zmniejsza swobodę konformacyjną, co zapewnia przewagę wielu właściwości związków makrocyklicznych nad ich liniowymi odpowiednikami. MCPs przejawiają m.in. większą odporność na hydrolizę enzymatyczną oraz denaturację, a także selektywność. Ze względu na sztywność łańcucha wiązania amidowe są chronione przed czynnikami denaturującymi oraz enzymami proteolitycznymi, a stabilność konformacyjna MCPs sprawia, że wiązanie się z określonym celem molekularnym jest korzystniejsze energetycznie niż z innymi enzymami. Wykorzystanie nienaturalnych reszt aminokwasów jest jedną ze strategii stosowaną zarówno w liniowych peptydach jak i w strukturach MCPs i pozwala na dodatkową optymalizację oddziaływań tych związków z miejscami aktywnymi enzymów zwiększając ich specyficzność i ochronę ich przed hydrolizą.

Dane literaturowe sugerują, że z dużym prawdopodobieństwem makrocyklizacja zwiększa również zdolność peptydów do przenikania przez błony komórkowe, co ma pozytywny wpływ na ich biodostępność. Ciekawym przykładem makrocyklicznego peptydu charakteryzującego się wysoką stabilnością oraz dużą zdolnością do przenikania błon jest cyklosporyna A, która ulega dyfuzji przez dwuwarstwę lipidową błon komórkowych [10].

Pomimo wielu zalet makrocyklizacji z procesem tym wiążą się również duże wyzwania. Głównym problemem związanym z cyklizacją związków peptydowych jest proces ich syntezy, a dokładniej cyklizacji, gdyż konwencjonalna metoda charakteryzuje się niską efektywnością wynikającą m.in. z powstawania produktów ubocznych oraz niskiej rozpuszczalności prekursorów, co z kolei znacząco utrudnia proces oczyszczania związków MCPs. Ze względu na wzrost zainteresowania MCPs prowadzone są nowe badania nad optymalizacją metod ich syntezy, które umożliwiłyby otrzymywanie czystych produktów z dużą wydajnością. Nowoczesne metody chemoselektywnej ligacji oraz ligacji wspomaganiej enzymatycznie są obiecującym kierunkiem rozwoju, lecz w dalszym ciągu wymagają udoskonalenia.

Tak jak w przypadku ich liniowych odpowiedników, stosowanie MCPs *in vivo* wiąże się również z ryzykiem wystąpienia immunogenności. Według rekomendacji FDA, aby uniknąć immunogenności, związki peptydowe powinny zawierać zaledwie osiem reszt

w swojej sekwencji. Jak można zaobserwować na przedstawionych w pracy przykładach, reguła ta nie zawsze jest jednak zasadna, a MCPs zbudowane z dużo większej ilości aminokwasów znajdują zastosowanie w medycynie.

Zważywszy na ich korzystne właściwości, MCPs znalazły szereg zastosowań w medycynie. Leki przeciwdrobnoustrojowe, których struktury oparte są o makrocykliczne związki peptydowe, wykazują aktywność nie tylko wobec bakterii Gram (+) oraz Gram (-), ale również innych patogenów. Przykładowo, zatwierdzona przez FDA w 2023 roku rezafungina (Rys. 3), z grupy echinokandyn, okazała się skutecznym inhibitorem enzymu, którego działanie jest niezbędne do powstania ściany komórkowej grzybów. Poszukiwanie i optymalizacja skutecznych antybiotyków zawierających w swojej budowie MCPs jest niezwykle ważne, ze względu na stale narastający problem lekooporności bakterii. Wśród leków bakteriobójczych oraz bakteriostatycznych o pierścieniowej budowie możemy wyróżnić dwie ważne grupy preparatów: **1)** zawierające pierścień depsipeptydowy, w którym co najmniej jedno wiązanie peptydowe zostało zastąpione przez estrowe, oraz **2)** glikopeptydy.

Przez ich wysoką selektywność i specyficzność oddziaływania makrocykliczne związki peptydowe mogą zostać wykorzystane również w leczeniu chorób nowotworowych oraz diagnostyce onkologicznej. MCPs z powodzeniem zostały użyte jako antagoniści mechanizmów pozwalających komórkom nowotworowym uniknąć proces programowanej śmierci, apoptozy. Opatentowane makrocykliczne związki peptydowe będące inhibitorami oddziaływań PD1/PDL-1 stanowią podstawę do opracowania silniejszych i selektywnych leków wpływających na ten szlak sygnalizacyjny. Dodatkowo, struktury te są używane do poszukiwań sond chemicznych znakowanych radioizotopami o wysokim powinowactwie oddziaływania do PDL-1, które umożliwiłyby obrazowanie zmian nowotworowych z użyciem PET.

Ze względu na swoją cykliczną strukturę MCPs są stosowane jako analogii m.in. somastatyny oraz insuliny (Rys. 7). Poprawa ich skuteczności w terapii hormonalnej wymaga jednak optymalizacji ich czasu półtrwania oraz opracowania korzystniejszego sposobu podania, które pozwoliłyby na opracowanie leków o wydłużonym czasie działania.

Oprócz medycyny makrocykliczne związki peptydowe mogą znaleźć zastosowanie również w dziedzinie chemii biologicznej, jako fluorescencyjne sondy chemiczne, umożliwiające obrazowanie komórek oraz guzów nowotworowych poprzez specyficzne oddziaływanie z wybranymi enzymami, ale na chwilę obecną temat ten pozostaje słabo rozwinięty i wymaga dalszych badań. Powyższe wskazuje na szerokie zastosowanie związków MCPs i na ich olbrzymi potencjał zarówno w leczeniu chorób cywilizacyjnych, jak również w ich diagnostyce i terapiach celowanych.

PODZIĘKOWANIA

Badania prowadzone przez PK i MW są finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w Polsce SONATA BIS 10; 2020/38/E/NZ3/00507. Badania prowadzone przez PK i JM są finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w Polsce Preludium BIS 10; 2023/50/O/NZ7/00414.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. L. Lau and M. K. Dunn, *Bioorg Med Chem*, 2018, **26**, 2700.
- [2] L. Wang, N. Wang, W. Zhang, X. Cheng, Z. Yan, G. Shao, X. Wang, R. Wang and C. Fu, *Sig Transduct Target Ther*, 2022, **7**, 1.
- [3] T. A. F. Cardote and A. Ciulli, *Chem Med. Chem*, 2016, **11**, 787.
- [4] M. Miliński, P. Najgebauer, R. Balwierz, U. Skotnicka-Graca and M. A. Staś, *Farm Pol*, 2022, **78**, 326.
- [5] M. Muttenthaler, G. F. King, D. J. Adams and P. F. Alewood, *Nat Rev Drug Discov*, 2021, **20**, 309
- [6] A. A. Vinogradov, Y. Yin and H. Suga, *J Am Chem Soc*, 2019, **141**, 4167.
- [7] H. Y. Chow, Y. Zhang, E. Matheson and X. Li, *Chem Rev*, 2019, **119**, 9971.
- [8] H. C. Hayes, L. Y. P. Luk and Y. H. Tsai, *Org Biomol Chem*, 2021, **19**, 3983.
- [9] C. A. Lipinski, B. W. Dominy and P. J. Feeney, *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **46**, 3.
- [10] P. G. Dougherty, A. Sahni and D. Pei, *Chem Rev*, 2019, **119**, 10241.
- [11] S. Liras and K. F. McClure, *ACS Med Chem Lett*, 2019, **10**, 1026.
- [12] D. A. Price, H. Eng, K. A. Farley, G. H. Goetz, Y. Huang, Z. Jiao, A. S. Kalgutar, N. M. Kablaoui, B. Khunte, S. Liras, C. Limberakis, A. M. Mathiowetz, R. B. Ruggeri, J. M. Quan and Z. Yang, *Org Biomol Chem*, 2017, **15**, 2501.
- [13] L. Gentilucci, R. De Marco and L. Cerisoli, *Curr Pharm Des*, 2010, **16**, 3185.
- [14] B. Khatri, V. R. Nuthakki and J. Chatterjee, *Methods Mol Biol*, 2019, **2001**, 17.
- [15] X. Ji, A. L. Nielsen and C. Heinis, *Angew Chem Int Ed*, 2024, **63**, 8251.
- [16] S. Hess, Y. Linde, O. Ovadia, E. Safrai, D. E. Shalev, A. Swed, E. Halbfinger, T. Lapidot, I. Winkler, Y. Gabinet, A. Faier, D. Yarden, Z. Xiang, F. P. Portillo, C. Haskell-Luevano, C. Gilon and A. Hoffman, *J Med Chem*, 2008, **51**, 1026.
- [17] G. Bhardwaj, V. Khipple Mulligan, C. D. Bahl, J. M. Gilmore, P. J. Harvey, O. Cheneval, G. W. Buchko, S. V S R K Pulavarti, Q. Kaas, A. Eletsky, P.-S. Huang, W. A. Johnsen, P. Jr Greisen, G. J. Rocklin, Y. Song, T. W. Linsky, A. Watkins, S. A. Rettie, X. Xu, L. P. Carter, R. Bonneau, J. M. Olson, E. Coutisias, C. E. Correnti, T. Szyperski, D. J. Craik and D. Baker, *Nature*, 2016, **538**, 329.
- [18] S. J. Bogdanowich-Knipp, S. Chakrabarti, T. D. Williams, R. K. Dillman and T. J. Siahaan, *J Pept Res*, 1999, **53**, 530.
- [19] L. K. Buckton, M. N. Rahimi and S. R. McAlpine, *Chem-Eur J*, 2021, **27**, 1487.
- [20] J. Yang, Q. Zhu, Y. Wu, X. Qu, H. Liu, B. Jiang, D. Ge and X. Song, *Front. Oncol.*, 2022, **12**, 2171. [21] D. P. Fairlie, J. D. A. Tyndall, R. C. Reid, A. K. Wong, G. Abbenante, M. J. Scanlon, D. R. March, D. A. Bergman, C. L. L. Chai and B. A. Burkett, *J Med Chem*, 2000, **43**, 1271.
- [22] T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness and D. P. Fairlie, *Angew Chem Int Ed*, 2014, **53**, 13020.
- [23] A. L. Jochim and P. S. Arora, *ACS Chem Biol*, 2010, **5**, 919.
- [24] M. A. T. Blaskovich, *J Med Chem*, 2016, **59**, 10807.
- [25] B. Khatri, V. R. Nuthakki and J. Chatterjee, *Methods Mol Biol*, 2019, **2001**, 17.
- [26] D. S. Kemp and J. Rebek, *J Am Chem Soc*, 1970, **92**, 5792.
- [27] A. S. De Groot and D. W. Scott, *Trends Immunol*, 2007, **28**, 482.
- [28] Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, FDA, CDER, CBER, 2014, [online]Clinical/Medical, [dostęp:12.09.2024].
Dostępny w internecie: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-assessment-therapeutic-protein-productsFda,Cderandpritzlaffo>, .
- [29] Clinical Pharmacology Considerations for Peptide Drug Products, FDA, CDER, 2023, [online], *Clinical Pharmacology*, [dostęp dnia: 12.09.2024]. Dostępny online:

- <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-pharmacology-considerations-peptide-drug-products>
- [30] H. Zhang and S. Chen, *RSC Chem Biol*, 2022, **3**, 18.
- [31] Y. Y. Syed, *Drugs*, 2023, **83**, 833.
- [32] M. Hoenigl, R. Sprute, M. Egger, Amir Arastehfar, Oliver, A. Cornely, R. Krause, C. Lass-Flörl, J. Prattes, A. Spec, George, R. Thompson, N. Wiederhold, Jeffrey and D. Jenks, *Drugs*, 2021, **81**, 1703
- [33] M. Szymański, S. Chmielewska, U. Czyżewska, M. Malinowska and A. Tylicki, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022, **37**, 876.
- [34] G. Pirri, A. Giuliani, S. F. Nicoletto, L. Pizzuto and A. C. Rinaldi, *Cent Eur J Biol*, 2009, **4**, 258.
- [35] M. A. T. Blaskovich, *J Med Chem*, 2016, **59**, 10807.
- [36] Y. Mast and W. Wohlleben *Int J Med Microbiol*, 2014, **304**, 44.
- [37] A. A. Sy-Cordero, C. J. Pearce and N. H. Oberlies, *J. Antibiot*, 2012, **65**, 541.
- [38] A. J. Flint and A. P. Davis, *Org Biomol Chem*, 2022, **20**, 7694.
- [39] P. Kumar Reddy Kalluru Kalluru, S. Gundakaram, M. Mamilla, S. Goutham Reddy Yartha, S. Dabbara, S. Teja Lingam, K. Naik Gugulothu, M. Gangannapalle and P. Kumar Thada, *Ann Med Surg (Lond)*, 2024, **86**, 4575.
- [40] O. Yushchuk, B. Ostash, A. W. Truman, F. Marinelli and V. Fedorenko, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, **104**, 3279.
- [41] S. Biondi, E. Chugunova and M. Panunzio, in *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V., 2016, **50**, 249.
- [42] A. Luther, C. Bisang and D. Obrecht, *Bioorg Med Chem*, 2018, **26**, 2850.
- [43] J. Barberán, A. de la Cuerda and L. C. Barberán, *Rev Espa Quimioter*, 2021, **34**, 26.
- [44] A. Y. Chen, M. J. Zervos and J. A. Vazquez, *Int J Clin Pract*, 2007, **61**, 853.
- [45] H. Aldemir, S. Shu, F. Schaefers, H. Hong, R. Richarz, S. Harteis, M. Einsiedler, T. M. Milzarek, S. Schneider and T. A. M. Gulder, *Chemistry*, 2022, **28**, 3389.
- [46] P. A. Smith, M. F. T. Koehler, H. S. Girgis, D. Yan, Y. Chen, Y. Chen, J. J. Crawford, M. R. Durk, R. I. Higuchi, J. Kang, J. Murray, P. Paraselli, S. Park, W. Phung, J. G. Quinn, T. C. Roberts, L. Rougé, J. B. Schwarz, E. Skippington, J. Wai, M. Xu, Z. Yu, H. Zhang, M.-W. Tan and C. E. Heise, *Nature*, 2018, **561**, 189.
- [47] Y. Zhang, D. Zhang, W. Zhao, H. Li, Z. Lu, B. Guo, X. Meng, X. Zhou and Y. Yang, *J Med Chem*, 2024, **67**, 6585.
- [48] N. A. Schilling, A. Berscheid, J. Schumacher, J. S. Saur, M. C. Konnerth, S. N. Wirtz, J. M. Beltrán-Belaña, A. Zipperer, B. Krismer, A. Peschel, H. Kalbacher, H. Brötz-Oesterhelt, C. Steinem and S. Grond, *Angewandte Chemie*, 2019, **58**, 9234.
- [49] S. Roa, L. Avalle, H. Zhang, Y. Zhang, L. Wang, Q. Lei, D. Wang and K. Sun, *Front. Cell Dev Biol*, 2020, **8**, 672.
- [50] S. Shaabani, H. P. S. Huizinga, R. Butera, A. Kouchi, K. Guzik, K. Magiera-Mularz, T. A. Holak and A. Dömling, *Expert Opin Ther Pat*, 2018, **28**, 665.
- [51] W. Uzar, B. Kaminska, H. Rybka, L. Skalniak, K. Magiera-Mularz and R. Kitel, *Expert Opin Ther Pat*, 2024, **34**, 627.
- [52] Q. Miao, W. Zhang, K. Zhang, H. Li, J. Zhu and S. Jiang, *RSC Adv*, 2021, **11**, 23270.
- [53] B. A. Seigal, W. H. Connors, A. Fraley, R. M. Borzilleri, P. H. Carter, S. L. Emanuel, J. Fargnoli, K. Kim, M. Lei, J. G. Naglich, M. E. Pokross, S. L. Posy, H. Shen, N. Surti, R. Talbott, Y. Zhang and N. K. Terrett, *J Med Chem*, 2015, **58**, 2855.
- [54] Z. D. Crees, M. P. Rettig, R. G. Jayasinghe, K. Stockerl-Goldstein, S. M. Larson, I. Arpad, G. A. Milone, M. Martino, P. Stiff, D. Sborov, D. Pereira, I. Micallef, G. Moreno-Jiménez, G. Mikala, M. Liz Paciello Coronel, U. Holtick, J. Hiemenz, M. H. Qazilbash, N. Hardy, T. Latif, I. García-Cadenas, A. Vainstein-Haras, E. Sorani, I. Gliko-Kabir, I. Goldstein, D. Ickowicz, L. Shemesh-Darvish, S. Kadosh, F. Gao, M. A. Schroeder, R. Vij and J. F. DiPersio, *Nat Med*, 2023, **29**, 869.
- [55] S. M. Hoy, *Drugs*, 2023, **83**, 1635.
- [56] J. D. Hainsworth, J. A. Reeves, J. R. Mace, E. J. Crane, O. Hamid, J. R. Stille, A. Flynt, S. Roberson, J. Polzer and E. R. Arrowsmith, *Target Oncol*, 2016, **11**, 643.
- [57] R. Salgia, R. W. Weaver, M. McCleod, J. R. Stille, S. B. Yan, S. Roberson, J. Polzer, A. Flynt, E. Raddad, V. L. Peek, S. R. Wijayawardana, S. L. Um, S. Gross, M. C. Connelly, C. Morano, M. Repollet, R. Sanders, K. Baeten, D. D'Haese and D. R. Spiegel, *Invest New Drugs*, 2017, **35**, 334.

- [58] B. S. Cho, Z. Zeng, H. Mu, Z. Wang, S. Konoplev, T. McQueen, M. Protopopova, J. Cortes, J. R. Marszalek, S. Bin Peng, W. Ma, R. E. Davis, D. E. Thornton, M. Andreeff and M. Konopleva, *Blood*, 2015, **126**, 222.
- [59] S.-B. Peng, X. Zhang, D. Paul, L. M. Kays, W. Gough, J. Stewart, M. T. Uhlik, Q. Chen, Y.-H. Hui, M. J. Zamek-Gliszczynski, J. A. Wijsman, K. M. Credille and L. Zeng Yan, *Mol Cancer Ther*, 2017, **8**, 94619.
- [60] M. Boehm, K. Beaumont, R. Jones, A. S. Kalgutkar, L. Zhang, K. Atkinson, G. Bai, J. A. Brown, H. Eng, G. H. Goetz, B. R. Holder, B. Khunte, S. Lazzaro, C. Limberakis, S. Ryu, M. J. Shapiro, L. Tylaska, J. Yan, R. Turner, S. S. F. Leung, M. Ramaseshan, D. A. Price, S. Liras, M. P. Jacobson, D. J. Earp, J. R. Scott Lokey, A. M. Mathiowetz and E. Menhaji-Klotz, *J Med Chem*, 2017, **60**, 9653.
- [61] K. D. Rasmussen and K. Helin, *Genes Dev*, 2016, **30**, 733.
- [62] K. Šimelis, H. Saraç, E. Salah, K. Nishio, T. E. McAllister, T. P. Corner, A. Tumber, R. Belle, C. J. Schofield, H. Suga and A. Kawamura, *Bioorg Med Chem*, 2024, **99**, 117597.
- [63] F. H. Al-Awadhi, L. A. Salvador-Reyes, L. A. Elsadek, R. Ratnayake, Q. Y. Chen and H. Luesch, *ACS Chem Neurosci*, 2020, **11**, 1937.
- [64] G. Poli, R. Di Fabio, L. Ferrante, V. Summa and M. Botta, *Chem Med Chem*, 2017, **12**, 1917.
- [65] M. Borgini, C. Zamperini, F. Poggialini, L. Ferrante, V. Summa, M. Botta and R. Di Fabio, *ACS Med Chem Lett*, 2020, **11**, 846.
- [66] J. R. Diamond, T. M. Pitts, D. Ungermannova, C. G. Nasveschuk, G. Zhang, A. J. Phillips, S. M. Bagby, J. Pafford, B. W. Yacob, T. P. Newton, J. J. Tentler, B. Gittleman, S. J. Hartman, J. A. Demattei, J. D. Winkler, M. K. Wendt, W. P. Schiemann, S. G. Eckhardt, X. Liu and A. D. Piscopio, *Mol Cancer Ther*, 2022, **21**, 397.
- [67] P. R. Watson, S. Gupta, P. Hosseinzadeh, B. P. Brown, D. Baker and D. W. Christianson, *ACS Chem Biol*, 2023, **18**, 959.
- [68] J. Koehbach and D. J. Craik, *Trends Pharmacol Sci*, 2019, **40**, 517.
- [69] N. L. Daly and D. J. Craik, *Curr Opin Chem Biol*, 2011, **15**, 362.
- [70] C. Jennings, J. West, C. Waive, D. Craik and M. Anderson, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**, 10614-9.
- [71] A. G. Poth, Y. H. Huang, T. T. Le, M. W. Kan and D. J. Craik, *Int J Pharm*, 2019, **565**, 437.
- [72] L. Mehta, R. Dhankhar, P. Gulati, R. K. Kapoor, A. Mohanty and S. Kumar, *J Pept Sci*, 2020, **26**, e3246.
- [73] J. List, J. Gattringer, S. Huszarek, S. Marinovic, H. A. Neubauer, P. Kudweis, E. M. Putz, R. Hellinger and D. Gotthardt, *Biomed pharmacother*, 2024, **177**, 117057.
- [74] A. Stengel and Y. Taché, *Ann N Y Acad Sci*, 2019, **1455**, 98.
- [75] P. Marbach, W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, T. Petcher, *J. Pless Hormone Res*, 1988, **29**, 54.
- [76] M. Theodoropoulou and G. K. Stalla, *Front Neuroendocrinol*, 2013, **34**, 228.
- [77] M. Bolanowski, M. Kałużny, · Przemysław Witek and · Aleksandra Jawiarczyk-Przybyłowska, *Rev Endocr Metab Disord*, 2022, **23**, 601.
- [78] M. Bolanowski, M. Kałużny, · Przemysław Witek and · Aleksandra Jawiarczyk-Przybyłowska, *Rev Endocr Metab Disord*, 2022, **23**, 601.
- [62] B. Astruc, P. Marbach, H. Bouterfa, C. Denot, M. Safari, A. Vitaliti and M. Sheppard, *J. Clin. Pharmacol*, 2005, **45**, 836
- [79] R. M. Paragliola and R. Salvatori, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, **9**, 00078.
- [80] U. Plöckinger, U. Hoffmann, M. Geese, A. Lupp, M. Buchfelder, J. Flitsch, P. Vajkoczy, W. Jakob, W. Saeger, S. Schulz and C. Dohrmann, *Eur J Endocrinol*, 2012, **166**, 223.
- [81] W. M. I. De Boon, M. J. Van Esdonk, F. E. Stuurman, N. R. Biermasz, L. Pons, I. Paty and J. Burggraaf, *J Clin endocrinol Metab*, 2018, **104**, 883.
- [82] H. A. Halem, U. Hochgeschwender, J. K. Rih, R. Nelson, G. A. Johnson, A. Thiagalingam and M. D. Culler, *Endocrinology*, 2020, **161**, 101.
- [83] T. Cuny, T. Graillon, · Célines Defilles, · Rakesh Datta, S. Zhang, D. Figarella-Branger, · Henry Dufour, G. Mougél, · Thierry Brue, T. Landsman, H. A. Halem, · Michael, D. Culler, A. Barlier and A. Saveanu, *Pituitary*, 2021, **24**, 351.
- [84] B. L. Furman, *Lispro insulin in: xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2007.
- [85] G. B. Bolli, F. Porcellati, P. Lucidi, C. G. Fanelli and D. R. Owens, *Metabolism*, 2022, **126**, 154935.

- [86] J. Leohr, C. Kazda, R. Liu, S. Reddy, M.A. Dellva, M. Matzopoulos, M.T. Loh, T. Hardy, O. Klein, C. Kapitza, *Diabetes Obes Metab*, 2022, **24**, 187.
- [87] J. Kildegaard, S. T. Buckley, R. H. Nielsen, G. K. Povlsen, T. Seested, U. Ribel, H. B. Olsen, S. Ludvigsen, C. B. Jeppesen, H. H. F. Refsgaard, K. M. Bendtsen, N. R. Kristensen, S. Hostrup and J. Sturis, *Pharm Res*, 2019, **36**, 2578.
- [88] J. J. Rosenstock and S. Del Prato, *Metabolism*, 2022, **126**, 4924.
- [89] K. K. Niloy and T. L. Lowe, *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, **203**, 115121.
- [90] H. A. Blair, *BioDrugs*, 2024, **38**, 717.
- [91] T. B. Kjeldsen, F. Ek Hubálek, C. U. Hjørringgaard, T. M. Tagmose, E. Nishimura, C. E. Stidsen, T. Porsgaard, C. Fledelius, H. H. F. Refsgaard, S. Gram-Nielsen, H. Naver, L. Pridal, T. Hoeg-Jensen, C. B. Jeppesen, V. Manfè, S. Ludvigsen, I. Lautrup-Larsen and P. Madsen, *J Med Chem*, 2021, **64**, 00257.
- [92] N. Jouini, J. Cardinale and T. L. Mindt, *Chem Med Chem*, 2022, **17**, 00091.
- [93] X. Zhou, J. Jiang, X. Yang, T. Liu, J. Ding, S. Nimmagadda, M. G. Pomper, H. Zhu, J. Zhao, Z. Yang and N. Li, *J Nucl Med.*, 2022, **63**, 536.
- [94] D. Kumar, A. Lisok, E. Dahmane, M. McCoy, S. Shelake, S. Chatterjee, V. Allaj, P. Sysa-Shah, B. Wharram, W. G. Lesniak, E. Tully, E. Gabrielson, E. M. Jaffee, J. T. Poirier, C. M. Rudin, J. V. S. Gobburu, M. G. Pomper and S. Nimmagadda, *J Clin Invest*, 2019, **129**, 616.
- [95] S. L. Cytryn, N. Pandit-Taskar, M. A. Lumish, S. B. Maron, P. Gu, G. Y. Ku, J. F. Chou, M. Capanu, A. Antoine, D. Loegel, L. Feder, S. Philemond, S. K. Lyashchenko, J. S. Lewis, V. Paroder, A. Srivastava, L. H. Tang, H. Schoder and Y. Y. Janjigian, *J Nucl Med*, 2024, **65**, 722.
- [96] Y. Shimizu, T. Suzuki, T. Yoshikawa, I. Endo and T. Nakatsura, *Front Oncol*, 2019, **9**, 00248.
- [97] F. Lin, R. Clift, T. Ehara, H. Yanagida, S. Horton, A. Noncovich, M. Guest, D. Kim, K. Salvador, S. Richardson, T. Miller, G. Han, A. Bhat, K. Song and G. Li, *J Nucl Med.*, 2024, **65**, 586.
- [98] K. Suzuki, T. Ui, A. Nagano, A. Hino and Y. Arano, *Sci Rep*, 2019, **9**, 15284.
- [99] D. Kwon, J. Lozada, Z. Zhang, J. Zeisler, R. Poon, C. Zhang, Á. Roxin, K. S. Lin, D. Perrin and F. Benard, *Mol Pharm*, 2021, **18**, 187.
- [100] T. Peng, X. Wang, Z. Li, L. Bi, J. Gao, M. Yang, Y. Wang, X. Yao, H. Shan and H. Jin, *Mol Pharm*, 2021, **18**, 3638.
- [101] J. Lau, D. Kwon, E. Rousseau, Z. Zhang, J. Zeisler, C. F. Uribe, H. T. Kuo, C. Zhang, K. S. Lin and F. Bénard, *Mol Pharm*, 2019, **16**, 4688.
- [102] H. Leupe, S. Ahenkorah, J. Dekervel, M. Unterrainer, E. Van Cutsem, C. Verslype, F. Cleeren and C. M. Deroose, *J Nucl Med*, 2023, **64**, 835.
- [103] R. S. Gamage, D. H. Li, C. L. Schreiber and B. D. Smith, *ACS Omega*, 2021, **6**, 30130.
- [104] L. Yuan, W. Lin, Y. Yang and H. Chen, *J Am Chem Soc*, 2012, **134**, 1200.
- [105] S. K. Shaw, W. Liu, C. F. A. Gómez Durán, C. L. Schreiber, M. de L. Betancourt Mendiola, C. Zhai, F. M. Roland, S. J. Padanilam and B. D. Smith, *Chem - Euro JI*, 2018, **24**, 13821.
- [106] K. Chen, L.-P. Yap, R. Park, X. Hui, K. Wu, D. Fan, X. Chen and P. S. Conti, *Amino Acids*, 2012, **42**, 1329.
- [107] F. Bianying, G. Linjie, W. Lihua, L. Fan, L. Jianxin, G. Jimin, F. Chunhai and H. Qing, *Anal Chem*, 2013, **85**, 7732.
- [108] D. W. Hwang, N. Bahng, K. Ito, S. Ha, M. Y. Kim, E. Lee, H. Suga and D. S. Lee, *Cancer Lett*, 2017, **385**, 144.
- [109] J. R. Sierra and M. S. Tsao, *Ther Adv Med Oncol*, 2011, **3**, S21.
- [110] R. Subiros-Funosas, V. Cheuk, L. Ho, N. D. Barth, L. Mendive-Tapia, M. Pappalardo, X. Barril, R. Ma, C.-B. Zhang, B.-Z. Qian, M. Sintes, O. Ghashghaei, R. Lavilla and M. Vendrell, *Chem Sci*, 2019, **11**, 1368.
- [111] S. Shao, Z. Li, H. Cheng, S. Wang, N. G. Perkins, P. Sarkar, W. Wei and M. Xue, *J Am Chem Soc*, 2018, **140**, 13586.
- [112] J. M. Leth, E. A. Newcombe, A. L. Grønnemose, J. T. Jørgensen, K. Qvist, A. S. Clausen, L. Bruhn, S. Knudsen, A. Kjaer, B. B. Kragelund, T. Jørgen, D. Jørgensen and M. Ploug, *Sci Rep*, 2023, **13**, 17248.

