

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Vojtěch Mařík

Mimetika polypeptidových hormonů z rodiny insulinu
Mimetics of polypeptide hormones from the insulin family

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jiří Jiráček, CSc.

Praha, 2021

Poděkování:

Rád bych poděkoval za výborné vedení bakalářské práce, podnětné rady svému školiteli RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Dále bych rád poděkoval všem kolegyním a kolegům skupiny RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. za pomoc při laboratorní činnosti a také za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27.4.2021

Vojtěch Mařík

Abstrakt

Rodina lidských peptidových hormonů podobných insulinu zahrnuje insulin, insulinu podobné růstové faktory 1 a 2 (IGF-1 a 2), relaxiny 1-3 a polypeptidy INSL3-6. Tyto polypeptidové hormony sdílejí podobné 3D struktury se zachováním podobného motivu rozložení disulfidových můstků, a i více či menší podobnost primární sekvence. Předpokládá se, že se tyto hormony mohly vyvinout ze stejného hypotetického evolučního prekursoru pravděpodobně již před vznikem obratlovců. Tyto hormony vykazují rozdílné funkce od regulace vstupu glukózy do buněk a regulace bazální energetické rovnováhy organismu, přes vývoj plodu, růst a hojení organismu až po důležité funkce v reprodukci organismů. Mimo to mohou být tyto peptidy i zapojeny do vývoje onemocnění jako je *diabetes mellitus*, poruchy růstu ale i rakovina. Mimetika jsou látky napodobující strukturu přirozených molekul a agonizující či antagonistizující jejich biologické efekty. Jejich hlavní výhodou proti přirozeným hormonům může být jejich větší metabolická stálost, levnější výroba, snazší způsob podání do organismu, ale i pozměněná biologická aktivita. Mimetika hormonů se mohou proto uplatnit při léčbě řady onemocnění. V této rešeršní práci se zaměříme na známá mimetika hormonů rodiny insulinu, syntetické a strukturní strategie používané při jejich přípravě a známé aplikace těchto látek.

Klíčová slova: Mimetika insulinu, polypeptidy, peptidové hormony, rodina insulinových hormonů, peptidomimetika.

The family of human insulin-like peptide hormones includes insulin, insulin-like growth factors 1 and 2 (IGF-1 and 2), relaxins 1-3, and INSL3-6 polypeptides. These polypeptide hormones share similar 3D structures while retaining a similar disulfide bridge pattern and lower or higher primary sequence similarity. It is supposed that these hormones may have evolved from the same hypothetical evolutionary precursor probably already before evolution of vertebrates. These hormones have different functions from regulating glucose entry into cells and regulating the body's basal energy balance, through fetal development, growth and healing of the organism to important functions in reproduction of organisms. In addition, these peptides may be involved in the development of diseases such as *diabetes mellitus*, growth disorders but also cancer. Mimetics are compounds that mimic the structure of natural molecules and agonize or antagonize their biological effects. Their main advantage over natural peptide hormones may be in their greater metabolic stability, cheaper production or easier route of administration to the body, but also in altered biological activity. Hormone mimetics can therefore be used for treatment of many diseases. In this review we will focus on the known mimetics of the insulin family of hormones, synthetic and structural strategies used in their preparation and the known applications of these substances.

Keywords: Insulin mimetics, polypeptides, peptide hormones, insulin hormone family, peptidomimetics.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Rodina insulinových hormonů	2
2.1	Obecná charakteristika insulinové rodiny	2
2.2	Insulin.....	3
2.2.1	Insulinový receptor.....	3
2.3	IGF-1 a IGF-2.....	5
2.3.1	Aktivace receptorů hormonů IGF-1 a IGF-2.....	6
2.4	Relaxiny a INSL peptidy.....	6
2.4.1	Receptory relaxinové a INSL rodiny.....	7
3	Mimetika peptidů.....	8
3.1	Charakteristika peptidomimetik.....	8
3.2	Základní typy peptidomimetik.....	9
3.2.1	Speciální aminokyseliny	9
3.2.2	Nahrazení peptidové kostry.....	11
4	Známá mimetika rodiny insulinových hormonů	12
4.1	Mimetika insulinu a IGF-1	12
4.2	Mimetika relaxinů a INSL peptidů.....	16
4.2.1	Relaxin-2	16
4.2.2	Relaxin-3	17
4.2.3	INSL3	18
4.2.4	INSL5	18
5	Závěr a diskuze.....	18
6	Seznam zkratk a symbolů.....	20
7	Literatura.....	21

1 Úvod

Tato bakalářská práce má za cíl shrnout dosavadní poznatky v oblasti výzkumu mimetik insulinu a insulinu podobných hormonů. Zabývá se vývojem mimetik těchto hormonů a jejich aplikacemi v dalším výzkumu nebo klinické praxi. Peptidomimetika hormonů jsou látky, které svou strukturou více či méně napodobují struktury nativních hormonů, od kterých jsou odvozeny a stále si zachovávají biologickou aktivitu. Mají však odlišné chemické vlastnosti, čehož lze správným způsobem využít k například větší stabilitě v organismu, či způsobu podání. Při vývoji mimetik je velkou výhodou znát molekulární a strukturně biologické informace o molekulách či jejich receptorech, a ty proto také budou popsány v této práci.

Peptidomimetika insulinových hormonů mohou sloužit jednak ke studiu fyziologického působení původních hormonů a poskytnout poznatky o molekulárních mechanismech metabolických či růstových poruch související s chorobami jako jsou cukrovka či nemoci spojené s nedostatkem či přebytkem růstových hormonů, ale mohou dále i poskytnout reálné možnosti, jakým způsobem se s těmito problémy vypořádat efektivněji, příjemněji či levněji a mohou se tak stát i alternativou ke klasické léčbě založené na nativních hormonech.

Jako nejdůležitější metabolická porucha současnosti je považována cukrovka (*diabetes mellitus*), která i v době rapidního růstu vědeckého poznání stále více negativně ovlivňuje životní styl nemalého počtu lidí. Celosvětově je prevalence cukrovky asi 5-10 % populace, i když toto číslo se liší v závislosti na místě. Pokud zanedbáme změnu životního stylu, která může být účinná v počátcích onemocnění u pacientů trpících diabetem typu 2, je ve většině případů třeba pacienty intenzivně léčit po zbytek života a pro mnoho z nich (asi 20-30%) je podání insulinu (s.c.) zásadně důležité. Tyto metody léčby však pro celoživotní pacienty stále nejsou příjemné, a proto je výzkum léčby diabetu stále považován jako důležitý s hlavním cílem zlepšit pacientům kvalitu života.

Oblast mimetik peptidových hormonů z rodiny insulinu jsem se rozhodl probádat z důvodu aktuálnosti tématu léčby metabolických a růstových onemocnění a osobní vědecké motivace během působení v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR.

2 Rodina insulinových hormonů

2.1 Obecná charakteristika insulinové rodiny

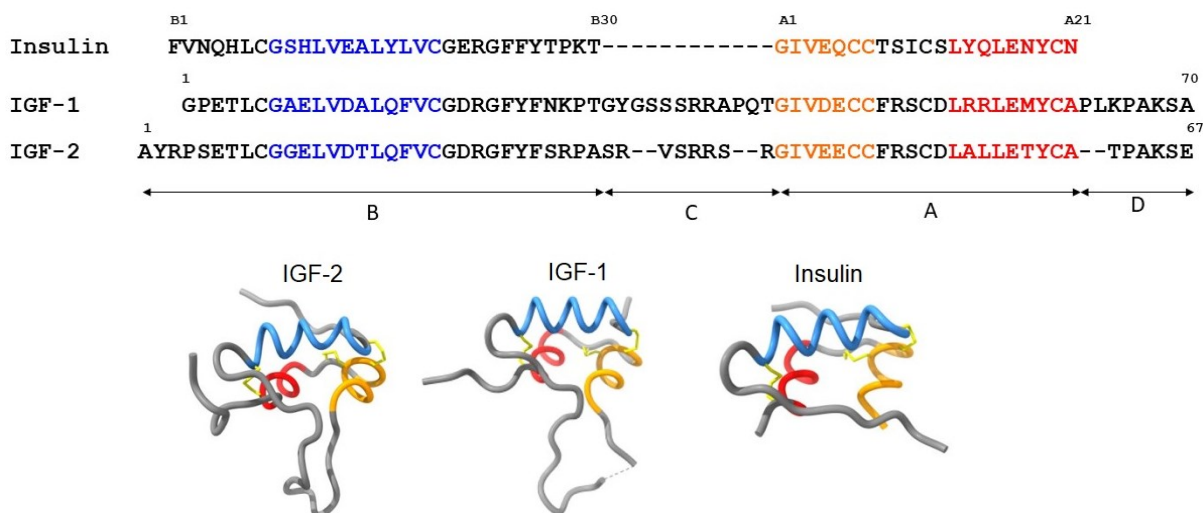
Proteiny z rodiny insulinu jsou evolučně příbuzné polypeptidy, sdílející podobnou 3D strukturu, které však mají odlišné funkce (1, 2). Do rodiny insulinu u člověka řadíme hormony insulin, insulinu podobné růstové faktory 1 a 2 (IGF-1 a IGF-2), relaxiny 1-3 a insulinu podobné peptidy 3-6 (INSL 3-6). O jednotlivých peptidech bude krátce pojednáno v dalších kapitolách.

Společná evoluční minulost hormonů insulinové rodiny byla popsána např. ve studii, která ukazuje na přítomnost molekuly homologní lidským molekulám insulinové peptidové rodiny u *Locusty migratoria* (sarančete stěhovavého) (3). Jako další příklad příbuznosti je možné uvést molekuly biologicky přirovnatelné k lidskému insulinu již u *protozoí* či *fungí*. Směs molekul extrahovaných z *Tetrahymeny* měla velmi podobné biologické účinky prasečímu insulinu. Navíc bylo možné materiál extrahovaný z těchto organismů neutralizovat protilátkami proti savčímu insulinu. Toto může být jeden z důkazů, že první molekuly funkčně podobné insulinu pochází evolučně již z jednobuněčných eukaryotických organismů (4). Tyto poznatky a řada dalších studií mohou nastolovat hypotézu, že jednotlivé insulinové peptidy pocházejí ze společného evolučního předka.

Homologie jednotlivých peptidů z rodiny insulinu se zpravidla liší v závislosti na délce evoluční divergence. Zároveň lze tvrdit, že některé peptidy mají bližší primární strukturu a jiné méně (Obrázek 1). Příkladem je asi 45% homologie lidského insulinu a IGF-1 nebo asi 50% homologie lidských IGF-1 a IGF-2 (2, 5). Opakem je relaxin-1, který má sekvenční homologii s insulinem a IGF výrazně nižší (2, 6). Některé části primární struktury všech insulinových hormonů jsou však velmi konzervované ať už jde o rozložení cysteinů, či glyciny nebo argininy v B řetězcích (2).

Díky metodám strukturní biologie již byla řada z těchto peptidů detailně probádána a jsou známy 3D struktury jednotlivých hormonů. Příkladem jsou vyřešené krystalové a NMR struktury insulinu (7, 8), IGF-1 (9, 10), IGF-2 (11) či relaxinu-2 (12). Tyto znalosti lze využít k modelování chování proteinů v roztocích, ale hlavně pro studium interakce hormonů s jejich receptory.

Navzdory řadě podobností ať v primární či vyšších strukturách peptidů, jsou ale i výrazné odlišnosti v rozdílných metabolických funkcích nebo různé expresi během ontogeneze nebo v rámci taxonů (13–17). Dále jsou velmi rozdílné signální kaskády vnitrobuněčných proteinů aktivovaných příslušnými receptory po vazbě hormonů. Příklady jsou insulinem a IGF-1 stimulované membránové receptory s tyrosin kinázovou intracelulární doménou (RTK) (18, 19) či relaxinem-1 stimulovaný receptor spřažený s G proteinem (20).



Obr. 1: Porovnání primárních sekvencí (horní část) a 3D struktur (spodní část) lidského insulinu (1MSO.pdb), IGF-1 (1GZR.pdb) a IGF-2 (1IGL.pdb). Modře, červeně či oranžově obarvené helikální struktury ve spodní části obrázku jsou tvořeny stejně zabarvenými aminokyselinami v horní části obrázku. Žlutě jsou vyznačeny disulfidické můstky. Převzato z (21).

2.2 Insulin

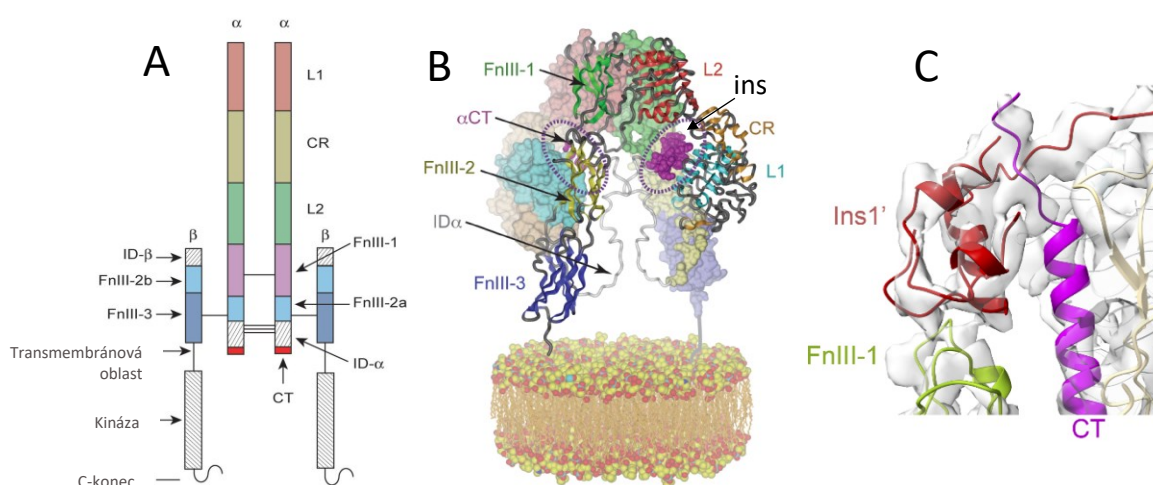
Insulin je proteinový hormon tvořený 51 aminokyselinami (22, 23). Vzniká jako preproinsulin, který je v β -buňkách Langerhansových ostrůvků díky signální sekvenci kotranslačně translokován do endoplasmatického retikula a následně je z něj odštěpena signální sekvence. Vzniklý proinsulin je v Golgiho cisternách přeměněn na insulin vyštěpením C peptidu (24–27). Vznikají tedy dva inzulinové řetězce (A s 21 aminokyselinami a B s 30 aminokyselinami) (Obr. 1) (28). Oba tyto řetězce jsou propojeny dvěma disulfidickými můstky (A7-B7 a A20-B19) a řetězec A obsahuje jen disulfidický můstek (A6-A11) (23).

Z hlediska sekundární struktury je lidský insulin tvořen třemi alfa helixy (A1-A8, A12-A18 a B9-B19) dvěma ohyby (A9-A11 a B20-B22) a jednou beta-strukturou (B23-B27) (7). U prasečího insulinu byla pomocí krystalografie zjištěna i kvartérní struktura, která se může vyskytovat v hexamerech. Nejprve jednotlivé protomery vytvoří dimery a poté se dimery v přítomnosti dvou molekul Zn^{2+} a díky jejich chelataci histidiny v polohách B10 seskupí v hexamer (8, 29).

2.2.1 Insulinový receptor

Samotný receptor je transmembránový glykoprotein tvořený dvěma podjednotkami alfa, které jsou zcela extracelulární a dvěma podjednotkami beta, které jsou z části extracelulární, transmembránové a z části i intracelulární. Receptor vytváří (alfa-beta)₂ ternární strukturu sestávající se z dvou alfa-beta heterodimerů spojených disulfidickými můstky. Receptor je tedy vlastně dimer dvou dimerů (Obrázky 2A a 2B), které jsou spojeny disulfidickými můstky (30). Alfa podjednotka tvořená pěti doménami (L1, CR, L2, FnIII-1, FnIII-2 a ID) (30) je extracelulární a je zodpovědná za vlastní vazbu insulinu (31). Beta

podjednotka, zprostředkovávající přenos signálu do buňky, se sestává z domén ID, FnIII-2, FnIII-3, transmembránové a juxtamembránové části a uvnitř buňky i intracelulární tyrosin kinázové domény s fosforylační aktivitou (32, 33). U receptoru insulinu (IR) jsou u člověka rozlišeny 2 izoformy vznikající alternativním sestřihem mRNA pro IR (34). IR-A izoforma se ve velké míře exprimuje například v příčně pruhovaném kosterním svalu, tukové tkáni, lymfatické tkáni, v mozku a embryu, kdežto IR-B izoforma v jaterních buňkách a v tukové a svalové tkáni (35–37). Obě isoformy se liší pouze tím, že IR-B na rozdíl od IR-A obsahuje 12 aminokyselin tzv. alfa CT-segmentu na C-konci alfa podjednotky (Obrázek 2A), která se nachází právě v místě vazby insulinu na receptor (Obrázek 2C) a to má za následek rozdílnou vazebnou afinitu pro oba IGF a implikace pro další funkční vlastnosti, kterých může být využito při designu nových léčiv selektivních právě pro jednotlivé isoformy (38, 39).

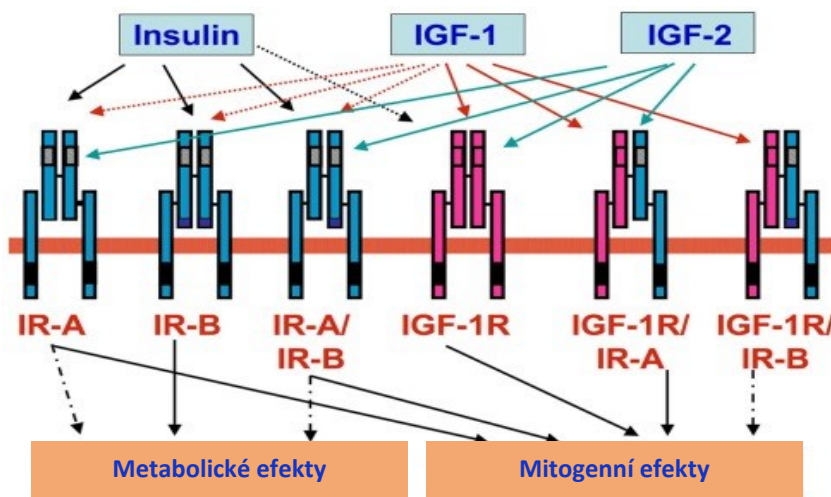


Obr. 2: Receptor insulinu a vazba insulinu na receptor. A. Schématické zobrazení doménové struktury receptoru insulinu. Červeně je vyznačený tzv. alfa-CT segment (CT), tj. sekvence 12 aminokyselin na C-konci alfa-podjednotky, které se vyskytují jen u isoformy receptoru IR-B. B. Zjednodušené zobrazení kvarterní struktury receptoru insulinu, kdy je jeden alfa-beta dimer (ve tvaru obráceného V) přeložen přes druhý. Jeden alfa-beta dimer je zobrazen pomocí peptidového řetězce a druhý jako elektronová hustota. Intracelulární část receptoru není zobrazena. Místo vazby insulinu na receptor je vyznačeno šipkou. Upraveno podle (40). C. Detail vazby insulinu na receptor. Insulin (Ins) je červený a leží na L1 doméně, která je zobrazena šedě. Insulin dále interaguje s FnIII-1 doménou (zelená) a alfa CT segmentem, který je fialový. Upraveno podle (41).

Vazba insulinu na receptor insulinu a jeho aktivace insulinem byla po desetiletí předmětem intenzivního bádání ať už za pomoci specifických analogů insulinu či mutantů receptoru a stále ještě není zcela do detailu prozkoumána (31, 42). Díky velkému pokroku v určení struktur komplexu insulinu s receptorem v posledních letech je k dispozici poměrně detailní obraz jak se insulin na receptor váže (Obr. 2C) (31, 41, 43–45). Vazba je zprostředkována interakcí L1 domény a tzv. alfa-CT-segmentem insulinového receptoru s některými aminokyselinovými zbytky v B řetězci inzulinu, zejména B9-B19. Důležitá je zároveň změna konformace části B řetězce insulinu (B22-B30) během vazby na vazebné místo v receptoru. C-konec A řetězce inzulinu je též klíčový pro interakci s aminokyselinami receptoru His710,

Phe714 a Asn711. Důležitá je i interakce N-konce řetězce A s alfa-CT-segmentem a FnIII-1 doménou receptoru (31).

Receptor pro IGF-1 (IGF-1R) je IR velmi podobný, ale obsahuje jen jednu, tu kratší, formu alfa-CT segmentu (46). Pro úplnost třeba dodat, že v přírodě existují i tzv. hybridní receptory tvořené alfa-beta párem jednoho receptoru (např. IR-A) a jiným alfa-beta párem z jiného receptoru (např. IGF-1R). Receptory pro insulin, IGF-1 i jejich hybridy se liší různou vazebnou afinitou pro insulin a oba IGF a i tkáňovým zastoupením, což obojí určuje fyziologické funkce receptorů (Obr. 3) (38, 47–50).



Obr. 3: Obrázek ukazuje vazebné afinity hormonů inzulinu, IGF-1, IGF-2 na izoformy a hybridy inzulínových a IGF-1 receptorů. Plná šipka od hormonů k receptorům značí vysokou vazebnou afinitu, zatímco přerušovaná nízkou vazebnou afinitu. Šipky dolů směřují na výsledný efekt, který aktivace příslušného receptoru nakonec vykoná. Jak je patrné, hybridy s alespoň polovinou receptoru IGF-1R mají převážně mitogenní působení, kdežto hybridy inzulínového receptoru spíše metabolické. Převzato a upraveno z (51). Zjednodušeně se dá shrnout, že insulin se váže na IR se subnanomolární afinitou a stejně tak IGF-1 na IGF-1R. IGF-2 se na oba receptory váže asi 10x slaběji. Insulin se váže na IGF-1R a IGF-1 na IR asi 1000x slaběji. Detaily jsou uvedeny v review Jiráčka a Žákové (52).

Interakce inzulinu s IR má za následek konformační změnu v receptoru, která vede k vzájemné autofosforylaci obou tyrosin kinasových domén intracelulární části beta-podjednotek receptoru (18), dále k fosforylaci intracelulárních proteinů, např. IRS-1, a tím k spuštění signální kaskády zahrnující adaptérové proteiny a signální dráhy jako AKT-PKB dráha a Ras dráha. To vše vyústí přesunem váčků s GLUT4 přenašečem do membrány buněk, což má za následek vstup glukózy do buněk tukové a svalové tkáně a syntézu glykogenu. Signál zároveň vede až do jádra buňky, kde dochází k aktivaci specifických transkripčních faktorů a expresi specifických proteinů (53–59).

2.3 IGF-1 a IGF-2

Na rozdíl od ostatních hormonů z rodiny inzulinů jsou IGF1 a IGF-2 jednořetězcové a jsou tvořeny doménami B, C, A a D (Obrázek 1) (9, 11).

IGF-1 a IGF-2 jsou důležité z hlediska velké řady fyziologických účinků v organismu počínaje buněčným růstem, diferenciací buněk a konče buněčnou migrací nebo adipogenezí (60–63). Jak IGF-1 tak IGF-2 jsou spojeny s embryonálním vývojem, ale mají i důležité funkce v dospělosti spočívající v stimulaci proliferace a diferenciaci buněk tkání (64, 65). V dospělosti hladina IGF-1 do značné míry klesá, zatímco hladina IGF-2 zůstává asi 3x vyšší než hladina IGF-1. Okolo funkce IGF-2 stále panuje mnoho otázek a v poslední době se zdá jisté, že hraje důležitou roli v mozku zejména při uchovávání paměti (66). V metabolismu IGF-1 a IGF-2 hrají důležitou roli IGFBP (IGF vazebné proteiny) ovlivňující dostupnost IGF-1 a IGF-2 k receptorům. Vyskytují se nejčastěji v buněčných membránách či volně v plasmě a blokují svou vazbou funkci hormonů, což je důležité pro správné načasování jejich působení (67). Patologie spojené s hladinou IGF-1 a -2 souvisí například s rakovinou, akromegalií, nebo nanismem (68–71).

2.3.1 Aktivace receptorů hormonů IGF-1 a IGF-2

Při diskuzi o hormonech insulínu, IGF-1 a IGF-2 se často hovoří jako o komplexním systému jelikož tyto hormony se vážou se znatelnou vazebnou afinitou k receptorům (IR, IGF-1R a hybridům těchto receptorů) (52), čímž se jejich funkce v organismu mohou překrývat (Obr. 3) (38, 72–74). Oba tyrosinkinázové receptory IR a IGF-1R jsou si velmi podobné z hlediska podjednotek a mají i značnou homologii primární struktury (75, 76) a spouští i podobné signální dráhy (PI3/PKB i MAP-kinázovou) (46, 77) ovšem s důležitými rozdíly v intenzitě aktivace jejich jednotlivých komponent, což má za následek rozdílné fyziologické působení hormonů (78, 79).

IGF-2 se váže rovněž na receptor IGF-2R, který je odlišný od předchozích zmíněných tyrosin kinázových receptorů svojí strukturou a schopností vázat mannozu-6-fosfát. Za jeho hlavní funkci se považuje redukce hladiny IGF-2 v cirkulaci jeho transportem pro degradaci v lysozomech (80–82). V posledních letech se ovšem objevily studie poukazující na velmi důležité role IGF-2R v mozku (83).

Vazba IGF-1 a IGF-2 na IGF-1R je velmi podobná vazbě insulínu na IR a byla podrobně zmapována až nedávno (84–86).

2.4 Relaxiny a INSL peptidy

Relaxiny 1-3 a insulínu podobné peptidy 3-6 (INSL3-6) tvoří podskupinu rodiny inzulinových peptidů. Rozdělení relaxinů a insulínu podobných peptidů do dvou skupin podle názvu je ustanoveno spíše z důvodů historických poznatků místo funkčních důvodů, a proto o nich budu psát v jedné společné podkapitole (například v některé literatuře se mluví o relaxinu 3 jako o INSL7). Nejvíce prozkoumány a možná nejdůležitější či nejzajímavější z hlediska fyziologie jsou relaxiny 2 a 3 a INSL3 a 5. Nevěnují se tedy peptidům relaxinu 1 a INSL4 a 6, které jsou evolučně novější, jejich fyziologický význam není dostatečně probádán a nemají známy příslušné receptory (87–89).

Peptidy z této podskupiny se vyskytují u řady obratlovců a vznikly z jednoho společného předka možná společného s insulinem a oběma IGF (90). Primární sekvence těchto hormonů jsou ukázány na Obrázku 4. Mimo řady konzervovaných sekvenčních homologií se u všech relaxinů vyskytuje tzv. vazebný motiv relaxinu, který je tvořen postranními řetězcům argininů v pozicích B13 a B17 a postranními řetězci isoleucinu či valinu v B20 (91).

Sekundární struktura peptidů je tvořena A a B řetězci spojenými disulfidickými můstky cysteinů ve stejných pozicích jako u inzulinu (92). Relaxiny a INSL vznikají jako preprohormony a jejich C peptid je vyštěpen podobně jako u inzulinu (87, 93–95).

Relaxiny se vyznačují funkcemi v organismu týkajícími se rozmnožovacího, nervového systému či kardiovaskulárního systému. Asi nejdůležitější funkce spadají do kategorie rozmnožovací, a to zejména u ženského reprodukčního cyklu. Podílí se na strukturálních změnách v děloze, udržení normálního těhotenství a významně pomáhají při porodu (96–99). Role INSL v organismu souvisí primárně se správným vývojem rozmnožovacího ústrojí, ale mohou mít vliv sekreci insulinu a příjem potravy či vznik osteoporózy (100–105).

řetězce A	
	A1 A21
Insulin	GIVEQCCTSI C SLYQLENYCN
Relaxin-1	RPYVALFEK C CLIGCTKRSLAKYC
Relaxin-2	ZLYSALANK C CHVGCTKRSLARFC
Relaxin-3	DVLAGLSS S CCKWGC S SKSEISSLC
INSL3	AAATNPARY C CLSGCTQQDLLTLC P Y
INSL4	RSGRHRFD P FCCEVICDDGTSVKLC
INSL5	QDLQTL C CTDGC S MTDLSALC
INSL6	GYSEK C CLTGCTKEELSIAC

řetězce B	
	B1 B30
Insulin	FVNQHLC G SHLVEALYLVCGERGFFYTP K KT
Relaxin-1	KWKDDVIK L CGRELVR A QIAICGMSTWS
Relaxin-2	DSWMEEVIK L CGRELVR A QIAICGMSTWS
Relaxin-3	RAAPYGVRL C GREFIRAVIFTCGGRW
INSL3	PTPEMREK L CGHHFVRALV R VC G GGPRV S TEA
INSL4	ZSLAAELRG C GRFGKHL L SYCPMPEK T FTTTP
INSL5	SKESVRL C GLEYIRTVI I YICASSRW
INSL6	SDISSARK L CGRYLVKEIEK L CGHANWSFR

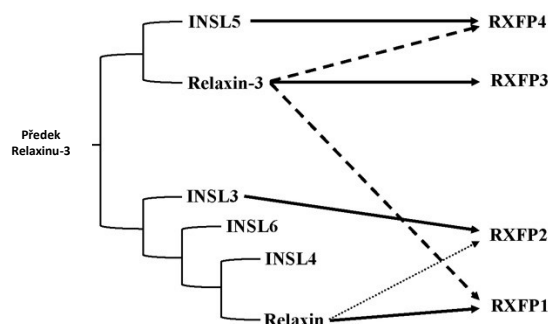
Obr. 4: Primární sekvence relaxinů 1-3 a INSL3-6 a jejich srovnání se sekvencí inzulinu. Žlutě jsou podbarveny invariantní cysteiny a zeleně invariantní glycin v řetězci B podílející se na tvorbě 3D struktury hormonů. Sekvence byly převzaty z databáze Uniprot.

2.4.1 Receptory relaxinové a INSL rodiny

Účinek těchto peptidů je zprostředkován vazbou na receptory, které nejsou tyrosin kinázového typu, ale patří do skupiny tzv. „G protein-coupled receptors“ (GPCR) (91). Mezi nejdůležitější receptory této rodiny patří RXFP1-4. Obecně se podle terciární struktury RXFP receptory rozlišují na dvě skupiny, RXFP1-2 a RXFP3-4 (106). Zatímco RXFP1 a 2 jsou transmembránové proteiny sedmkrát procházející membránou a zároveň obsahující velkou extracelulární lipoproteinovou doménou na které je „leucin-

rich“ motiv obsahující řadu leucinů za sebou. RXFP3 a 4 též sedmkrát procházejí membránou, ale lipoproteinovou doménu nemají, jsou menší a s první skupinou receptorů mají málo homologních úseků (20, 88, 107–110). Aktivace RXFP1 a 2 způsobuje primárně zvýšení hladiny cAMP nebo oxidu dusnatého v buňce, zatímco aktivace RXFP3 a 4 snižuje hladinu cAMP a aktivuje MAP kinázové kaskády (111–116).

Klíčové oblasti hormonů pro interakci s receptory jsou zejména aminokyselinová rezidua na B řetězci tvořena motivem vázajícím relaxin a důležité jsou i postranní řetězce některých argininů a fenylalaninů v B řetězci. Přestože na A řetězci není tolik aminokyselin zajišťujících vazbu a aktivaci receptoru, jejich přítomnost může ovlivňovat správné sbalení proteinu a selektivitu (91, 117–122). Interakce jednotlivých peptidů s receptory se může ve skupině překrývat jako je tomu v případě relaxinu-3, který může aktivovat více receptorů. INSL3 naproti tomu exkluzivně interaguje pouze se svým RXFP2 receptorem (Obr.5) (89, 123). Na tuto promiskuitu je potřeba dbát při designu peptidomimetik, kdy jsou vysoce selektivní látky základním cílem hlavně z důvodu zamezení vedlejších efektům.



Obr. 5: Zjednodušené schéma shrnující současné znalosti o vazbě relaxinu a INSL peptidů na jejich receptory. Hlavní vazby hormonů jsou vyznačeny plnými čarami, zatímco vedlejší, avšak stále farmakologicky důležité vazby jsou vyznačeny přerušovanými čarami. Převzato a upraveno z (89).

3 Mimetika peptidů

3.1 Charakteristika peptidomimetik

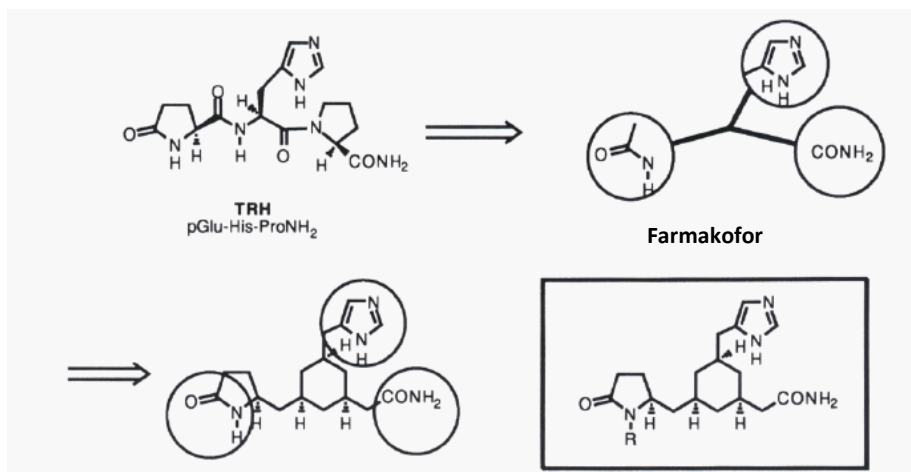
„Peptidomimetika jsou látky, které mají za účel napodobovat (mimikovat) nebo blokovat biologické účinky peptidů, a to na úrovni interakce s jejich receptory. Peptidomimetika původní peptidy strukturně či funkčně napodobují, ale zároveň jsou některými svými vlastnostmi odlišná“ (124). Takovéto látky mohou nahradit například léčiva bílkovinné či peptidové povahy, která mohou být náchylná vůči proteolýze či jiné degradaci. Zároveň peptidomimetika mohou být menší než původní peptid či mít takové vlastnosti, které umožní být lépe a jinou cestou vstřebány do těla či v něm působit (125–129). Například některé perorálně podávané látky agonizující účinek insulínu se mohou podílet na prevenci obezity (130).

Peptidomimetika obvykle mají podobnou sekundární strukturu podobnou jako původní peptid, nicméně jejich chemický charakter je odlišný. Výsledný biologický efekt takového mimetika je v zásadě

buď stejný jako u nativního peptidu (agonistické účinky), v opačném případě způsobuje inhibující efekt (antagonistické účinky) (125).

3.2 Základní typy peptidomimetik

Peptidomimetika mohou být rozdělena do několika skupin v závislosti na struktuře nebo funkci. Typ 1, strukturální mimetika, sdílí s původním peptidem strukturu a v zásadě jsou si velmi podobné. Obsahují funkční skupiny stejné jako v nativní peptidu a mají klasický peptidový řetězec. Typ 2, funkční mimetika, již nemají peptidový řetězec a do jisté míry si s původním peptidem ani nejsou tak podobné strukturou, důležitá je však správná interakce s kóženým receptorem nativního peptidu. Typ 3, funkčně strukturální mimetika obvykle obsahují nepeptidovou kostru („scaffold“), která však umožňuje navázané funkční skupiny nativního peptidu na „scaffoldu“ správně orientovat a umožnit biologickou funkčnost. Obrázek 6 ilustruje vývoj mimetika typu 3 na základě struktury hormonu TRH.



Obr. 6: Obrázek popisuje vývoj peptidomimetika typu 3, funkčně-strukturálního. Vlevo nahoře je hormon uvolňující tyreotropin (TRH), u kterého byly identifikovány klíčové „farmakofory“ (motivy či struktury zodpovědné za funkci molekuly), a z nějž bylo vytvořeno peptidomimetikum na bázi cyklohexanového „scaffoldu“. Převzato a upraveno z (131).

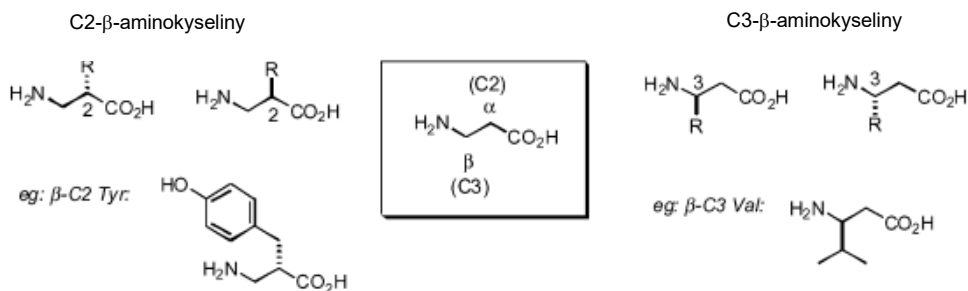
Předchozí odstavec popisoval peptidomimetika velmi obecně, dále však budu popisovat některé specifické možnosti, jak peptidomimetika navrhnout.

3.2.1 Speciální aminokyseliny

Záměna některých aminokyselin v původním peptidu nepřírodními aminokyselinami může být prvním krokem k přeměně nativního peptidu v peptidomimetikum. Nepřírodní aminokyseliny mohou redukovat počet izomerů, nebo jej naopak zvýšit, mohou ovlivnit flexibilitu a konformační možnosti peptidu a odolnost vůči degradaci enzymy.

Prvním ze zástupců nepřírodních aminokyselin využitelných při designu peptidomimetik jsou beta aminokyseliny. Hlavní rozdíl mezi alfa a beta aminokyselinou je přítomnost aminové funkční skupiny

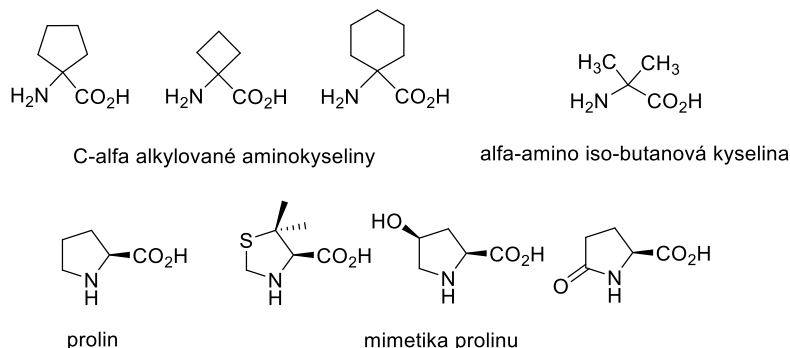
nikoli na alfa uhlíku, ale na beta uhlíku. Důležitost však leží spíše ve stereochemii (Obr. 7). Beta aminokyseliny (β -aminokyseliny) mohou tvořit více izomerů a mají tedy větší strukturní variabilitu (132). Další výhodou beta aminokyselin tkví ve větší odolnosti vůči proteázám (133–135). Jako příklad lze uvést analogy angiotensinu II, oxytocinu či RGD peptidů (133, 136, 137). Analog angiotensinu II způsoboval až o 50% kvalitativně vyšší efekt a který také trval o 2-3 hodiny déle než efekt původního hormonu.



Obr. 7: Uprostřed obrázku ve čtverci je znázorněna obecná β -aminokyselina. Po stranách vlevo a vpravo jsou vidět 2 enantiomery se stereogenními centry na C2 popř. C3 uhlíku. Vpravo a vlevo dole jsou vidět konkrétní β -aminokyseliny-vlevo β -C2 tyrosin, vpravo β -C3 valin. Převzato z (132).

Nelze nezmínit i D-alfa-aminokyseliny, které jsou chemicky totožné jako v přírodě více se vyskytující L-alfa-aminokyseliny, avšak stáčejí rovinu polarizovaného světla na opačnou stranu (138). I D-aminokyseliny mají zvýšenou biostabilitu při zachování velmi podobné chemické povahy (139). Zajímavé je třeba využití D-aminokyselin v léčbě onemocnění mozku vzhledem k potenciálu lepší transcytóze v oblasti hematoencefalické bariéry (140). V neposlední řadě je možnost za pomoci D-aminokyselin ovlivnit i již zmíněnou selektivitu vůči receptorům (141).

Obecně modifikované aminokyseliny jsou další možností, jak tvořit peptidomimetika. Jejich výhodou může být opět větší rezistence vůči proteázám, zvýšení rigidity polypeptidu, změna polaritě nebo navození určitých konformací a zamezení jiným (142). Jako příklad modifikovaných aminokyselin zde mohu uvést například C-alfa alkylované aminokyseliny nebo aminokyseliny se zacykleným C alfa a dusíkem aminoskupiny (Obrázek 8).



Obr. 8: Příklady achirálních C-alfa cyklizovaných aminokyselin (vlevo) a příklad C-alfa alkylované aminokyseliny, alfa-amino iso-butanové kyseliny (Aib). Příklady chirálních mimetik prolinu (dole). Převzato a upraveno z (143).

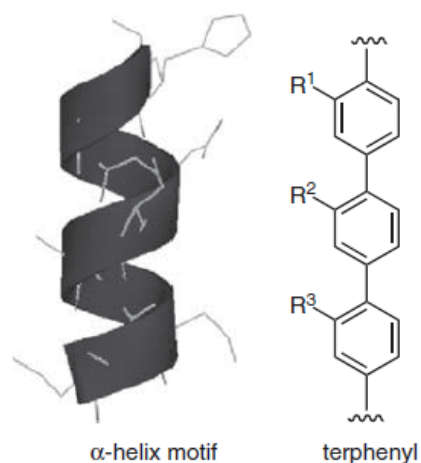
C-alfa alkylované aminokyseliny (Obrázek 8) mají mimo jiné výhody i zvláštní vlastnosti týkající se možných zaujímaných konformací. Alkylování alfa uhlíku redukuje možnost konformační volnosti dihedrálních úhlů ϕ a ψ (144–148). Postranní řetězec prolinu např. způsobuje omezenou konformační volnost oproti glycinu, který má spíše flexibilnější roli (144, 149). Podobně je to právě u alkylovaných aminokyselin, jejichž přítomnost dokáže ovlivnit konformační vlastnosti části polypeptidového řetězce (150). Např. C-alfa-methylované aminokyseliny (jako Aib na Obrázku 8) jsou využívány zejména díky jejich schopnosti dobře tvořit některé specifitější sekundární struktury jako jsou 3.10 helix nebo beta ohyb (147, 151–155). Jako příklad využití C-alfa alkylovaných aminokyselin je možno zmínit studii sledující změnu helicity apolipoproteinu A1 při inkorporaci různých C-alfa methylovaných aminokyselin (156).

Dalším důležitým typem alkylovaných aminokyselin jsou zacyklené aminokyseliny, které mají propojený C-alfa uhlík a dusík amidové vazby. Jako příklad je možno uvést pětičlenný pyrrolidinový cyklus, který je možno dále modifikovat (Obrázek 8). Rigidní pyrrolidinový řetězec, který se též vyskytuje v prolinu a proto se těmto peptidům říká „proline-like“ (prolinu podobný), má za následek některé zvláštnosti v polypeptidovém řetězci jako je asi 20° náklon v alfa helixu, nebo může lokálně měnit konformační flexibilitu řetězce (157–162).

3.2.2 Nahrazení peptidové kostry

Důležitou možností v designu peptidomimetik je nahrazení peptidové kostry organickou strukturou s větší či menší konformační variabilitou. Může se jednat o tzv. bioizostery, tzn. látky s chemickými modifikacemi v peptidové vazbě (-CO-NH-) velmi podobnými původní struktuře. Takovými bioisostery peptidové vazby mohou být například estery (-CO-O-), thioamidy (-CS-NH-), fosfonáty (-PO(OH)-O-), fosfináty (-PO(OH)-CH₂-) a další motivy. Dále je možné sem zařadit „scaffoldové“ struktury, obvykle cyklické povahy či aromatické sloučeniny nebo heterocykly (143). Jako scaffold mimikující alfa helix lze uvést např. terphenyl (Obrázek 9)(163). Centrální scaffold zde může být nositelem funkčních skupin, „farmakoforů“, nezbytných pro biologickou aktivitu.

Obr. 9: Peptidomimetika na bázi modifikovaných terphenylů napodobující helikální struktury peptidů. Převzato a upraveno z (143).



4 Známá mimetika rodiny insulinových hormonů

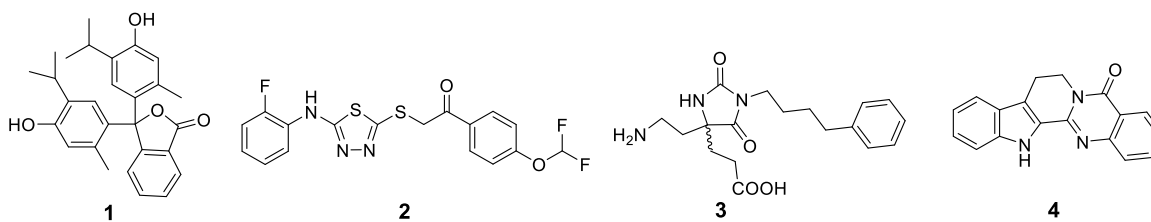
V této kapitole představím aktuální pohled na mimetika insulinových hormonů. Zaměřím se na jejich strukturní vlastnosti, mechanismus účinku a jejich potenciál na klinické léčení. Zajímat mě budou pouze mimetika vázající se na hlavní vazebné místo hormonů na receptorech na rozdíl od mimetik stimulující receptory jiným způsobem.

4.1 Mimetika inzulinu a IGF-1

Existují stovky publikací (např. popisujících rozdílně pozměněných insuliny s menšími či výraznějšími modifikacemi jeho struktury, ať už jde o záměny jedné či více pozic, či insuliny se zkrácenými řetězci atd. Takovým molekulám říkáme analogy insulínu (164) a šest takových analogů insulínu je v současné době používáno v klinické praxi pro léčbu diabetu (165). V této práci se jim ale nebudu věnovat, a naopak se zaměřím na látky strukturou výrazně odlišnou od lidského insulínu.

Zajímavou prací je studie Maslova et al. (Maslov et al., 2002), kteří použili aminokyseliny insulínu A20-A21 (CN) a aminokyseliny B19-B26 (CGERGFFY) pro konstrukci peptidomimetického peptidu CGERGFFYCN (mimetikum PM-1) propojeného intrachinárním disulfidickým můstkem. V mimetiku PM-2 dále nahradili aminokyseliny motivu FY za jejich D-varianty. Připravili i mimetikum PM-3 na bázi PM-1 ovšem s N-koncem acylovaným palmitoovou kyselinou. Všechna tři peptidomimetika stimulovala příjem glukózy buňkami i zvýšení syntézy DNA. Záměna D za L variantu aminokyselin nevedla k signifikantnímu rozdílu mezi efekty PM1 a PM2 a acylace u PM3 způsobila sice mírně menší účinnost, ale doba účinku byla prodloužena.

Jako jedno z potenciálních mimetik byla identifikována malá molekula thymolphtaleinu (Obr. 10, látka 1), která dokázala interagovat s IR a kompetitivně z něj vyvazovat insulin (K_d asi 10^{-6} M). Molekulární modelování naznačilo, že struktura thymolftaleinu by mohla mimikovat tři důležité aminokyseliny vazebného epitopu inzulinu tvořeného aminokyselinami ValB12, PheB23 a TyrB26. Ve studii byly vytipovány i další malé molekuly podobné fenolftaleinu nebo fenolové červeně. U vytipovaných molekul měly největší vazebnou afinitu molekuly s dvěma halogenovými prvky (nejlépe jodem) v ortho pozicích aromatického kruhu. Řada z těchto molekul, zejména erytrosin a jodofenolová modř, úspěšně vyvazoval radioaktivní insulin z receptoru v relativně nízkých koncentracích (166).



Obr. 10: Příklady mimetik insulinu na bázi „malých molekul“. Detaily jsou v textu. Převzato a upraveno z (167)

Další malá organická molekula připravená k vytěsnění radioaktivního insulinu z vazebného místa 2 na IR je NT23 (Obrázek 10, látka **2**). Její funkční skupiny mimikují hydrofobní aminokyseliny insulinu LeuA13, LeuB17 a aromatický kruh TyrA14. NT23 dokázala jen velmi slabě (v 10^{-4} M koncentraci) kompetovat s insulinem ve vazebném místě IR, ale naznačila další možnosti návrhu farmakoforů (168).

Dále byl vyvinut „scaffold“ na bázi hydantoinu s postranními řetězci mimikujícími aminokyselinová rezidua insulinu v pozicích TyrB16, GluB21 a ArgB22. Na základě molekulárního modelování byla sestavena řada molekul lišících se nejčastěji délkou alifatického řetězce a nejúspěšnější byla sloučenina **3** (Obrázek 10), která měla z těchto derivátů nejlepší vazebnou afinitu pro IR, nicméně velmi slabou (v 10^{-5} M koncentraci). Autoři se pokusili modelováním prokázat, že tato sloučenina interaguje s vazebným místem pro insulin (169).

Stejně jako předchozí mimetika i 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranosa (PGG), založená na pyranosovém „scaffoldu“, dokázala vytěsnit radioaktivní insulin z IR a způsobila jeho následnou fosforylaci, aktivaci příslušných signálních intracelulárních drah i transport GLUT4 na buněčnou membránu myších adipocytů. Právě experimenty *in vivo* na myších modelech potvrdily snížení glykémie. Další studie jsou však potřeba k určení přesného vazebného místa PGG na receptoru (170).

Dále uvádím rutaecarpine (Obrázek 10, látka **4**), který se váže na extracelulární doménu IR s vazebnou afinitou asi 10^{-6} M. Autoři předpokládali, že se tato látka váže do vazebného místa insulinu na alfa podjednotku IR. Látka způsobovala očekávanou fosforylaci beta podjednotek a mění i konformaci IR (171).

Pozoruhodných výsledků dosáhl tým vedený vědci z firmy Novo Nordisk A/S, který za pomoci exprese kombinatoriálních knihoven peptidů na povrchu fága a jejich testování na vazbu vůči receptorům insulinu či IGF-1 (tzv. technika „phage-display“) dokázal objevit peptidová mimetika, která neobsahovala žádný neptidový scaffold a byla složena z více či méně dlouhých polypeptidových řetězců. Tyto peptidy (nejkratší má 16 aminokyselin) mohou velmi dobře kompetovat o receptor s insulinem s vazebnou afinitou v koncentracích 10-100 nM (172). Tyto krátké peptidy navíc posloužily k objasnění a upřesnění způsobu aktivace insulinového receptoru. Po vygenerování velkého množství peptidů o délce 20-40 aminokyselin a selekci nejpotentnějších peptidů z peptidových knihoven byla provedena řada expe-

rimentů definujících vazebné motivy peptidů pro IR ale i pro IGF-1R. Peptidy byly rozřazeny do hlavních 3 skupin podle předpokládaných vazebných míst na insulinovém receptoru. Sekvence některých těchto peptidových mimetik insulinu a IGF-1 jsou uvedeny v Tabulce 1.

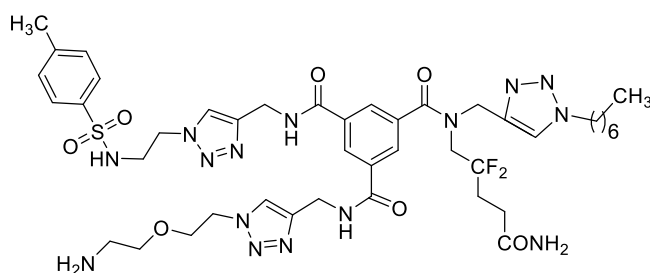
Tabulka 1. V levém sloupci jsou některé zajímavé sekvence peptidomimetik s vysokou vazebnou afinitou k IR a IGF-1R. Prostřední sloupec značí vazebné místo na receptoru IR, IGF-1R. Řádky začínající hvězdičkou se vztahují k IGF-1R. Hodnoty převzaty z (173).

Aminokyselinová sekvence peptidomimetika	Vazebné místo na IR či IGF-1R	Vazebná afinita (M)
QLEEEWAGVQCEVYGRECP	2	1.6×10^{-6}
GSLDESFYDWFERQ	1	8.1×10^{-8}
ESFYDWFERQL	1	9.5×10^{-8}
VDWLQRNANFYDWFVAELG	1	5.3×10^{-8}
GSLDESFYDWFERQL	1	8.1×10^{-8}
ESFYDWFERQLGGGG	1-2	5.2×10^{-10}
SLEEEWAQVECEVYGRGCP	1-2	6.2×10^{-11}
SGSGSGLLDES-FYHWFDRQLR		
SLEEEWAQVECEVYGRGCP	1-2	2×10^{-11}
SGSLDESFYDWFERQLG		
*GIISQSCPESFYDWPAGQVSDPWWCW	1	6×10^{-7}
*GVDEVRAWLWCQISGLGCES	2	8.4×10^{-7}
*GSLDESFYDWFERQLG	1	3.9×10^{-8}
*CWARPCGDAANFYDWFVQQAS	1	8.8×10^{-10}

V navazující studii byly obdobné peptidy spojeny krátkou aminokyselinovou sekvencí v homo či heterodimery a takto byly zkombinovány peptidy vázající se na místo 1 a místo 2 na IR. Ukázalo se, že některé tyto peptidy mají vazebnou afinitu jen 10-100x menší než insulin a mohly by tak sloužit jako potenciální léčiva nebo základ pro další výzkum (172, 174). Některé z těchto peptidů se dobře vázaly i na receptor pro IGF-1 (Tabulka 1) a můžeme je tak zařadit mezi jediná známá mimetika tohoto hormonu (173). Později se ale ukázalo, že tato peptidová mimetika aktivují po navázání na IR jiné signální dráhy než insulin, a proto nebyla využita k léčbě diabetu (175).

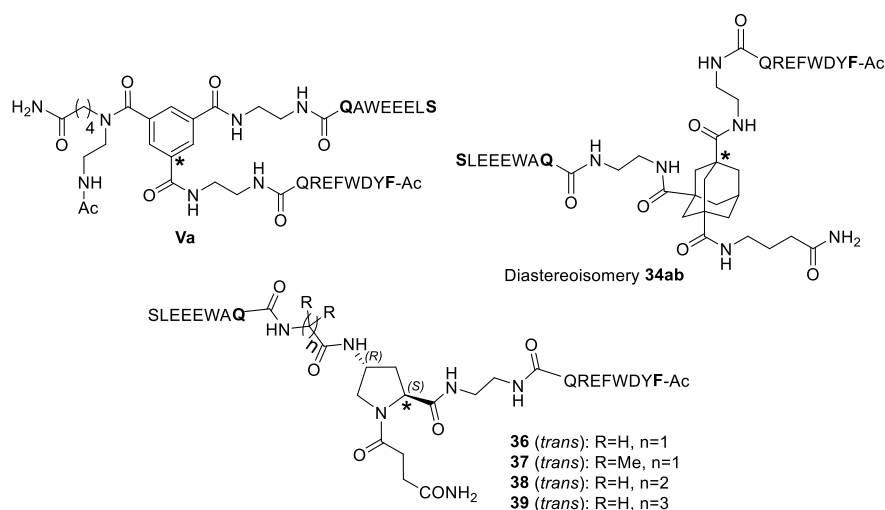
Skupina Dr. Jiráčka v ÚOCHB se již nějakou dobu pokouší vyvinout mimetika insulinu na bázi scaffoldů modifikovaných 2-3 různými substituenty, např. peptidy. Takové látky by mohly mít větší šanci interagovat s různými, i vzájemně vzdálenějšími, vazebnými epitopy v receptoru hormonu. Zároveň by se mohly dát jednotlivé substituenty optimalizovat pomocí kombinatoriální chemie. Prvním počinem bylo vyvinutí scaffoldu na bázi kyseliny trimesinové, který bylo možné modifikovat pomocí Cu(1+) katalyzované cykloadice azidů a alkynů třemi různými azidy během syntézy na pevné fázi (176). Tento scaffold byl použit pro přípravu kombinatoriální knihovny 1000 látek za použití 30 různých azidů.

Její testování s receptorem pro insulin a ovšem vyústilo v identifikaci jen pouze slabých agonistů IR (afinity zhruba 10^{-4} M) (177). Příklad takové látky je na Obrázku 11.



Obrázek 11. Příklad mimetika insulinu na bázi trimesinového scaffoldu identifikovaného v kombinatoriální knihovně asi 1000 látek (177).

Z výsledků bylo jasné, že je potřeba daleko větší diversita látek v knihovnách scaffoldů, a proto skupina Dr. Jiráčka vyvinula nové varianty scaffoldu na bázi trimesinové kyseliny, které ovšem umožňují syntézu až tří různých peptidů na jednom scaffoldu zároveň. Zároveň byla tato strategie dále rozvinuta pro vývoj podobných triorthogonálních scaffoldů na bázi adamantanu či a prolinu. Trimesinová kyselina má je planární a achirální. Adamantové molekuly mají objemnější strukturu, jsou rigidnější, chirální a nabízí možnost nasměrování substituentů do různých směrů prostoru. Prolinové scaffoldy jsou také chirální, spíše planární, menší, ale také mají potenciál k tvorbě mimetik zejména díky své stereochemii. Tyto scaffoldy byly použity pro syntézu modelových mimetik (Obrázek 12), kdy byla na dvě ramena scaffoldů umístěny sekvence SLEEEWAQ a Ac-FYDWFERQ převzatá z mimetik připravených firmou NOVO Nordisk A/S (Tabulka 1). Zejména mimetika na bázi adamantanu a trimesinové kyseliny vykazovala zajímavé výsledky při vytěšňování insulinu z jeho receptoru (vazebné afinity $0,5$ a $1,5 \times 10^{-6}$ M). Látky na bázi prolinového scaffoldu se na receptor vázaly asi 10-30 x slaběji. Lze tedy konstatovat, že na velikosti, chemickém charakteru a flexibilitě řetězců v podobných mimetických záleží. Tato mimetika mají i výrazně vyšší stabilitu v plasmě než samotný insulin (167). V současné době jsou v laboratoři Dr. Jiráčka vyvíjeny kombinatoriální knihovny založené na těchto scaffoldech a testovány s IR a IGF-1R.



Obrázek 12. Modelová mimetika insulinu založená na struktuře scaffoldu na bázi trimesinové kyseliny (**Va**), na bázi adamantanového (**34ab**) a prolinových scaffoldů (**36-39**) (167).

Z hlediska známých fyziologických účinků IGF-1 a 2 asi není urgentní potřeba vyvíjet peptidomimetika těchto hormonů s agonistickými účinky. Patologická stimulace IGF-1R v lidských tkáních může ovšem vést k řadě problémů, z nichž nejzávažnější a spojované s působením IGF-1 je rakovina zejména tlustého střeva, prostaty, prsu i vznik leukémie (178–183). Mimo terapie neutralizujícími protilátkami je tedy zajímavá i strategie použití malých molekul inhibujících zejména tyrozinkinázovou aktivitu IGF-1R či antagonistických vazbu IGF-1 na receptor (184–187).

4.2 Mimetika relaxinů a INSL peptidů

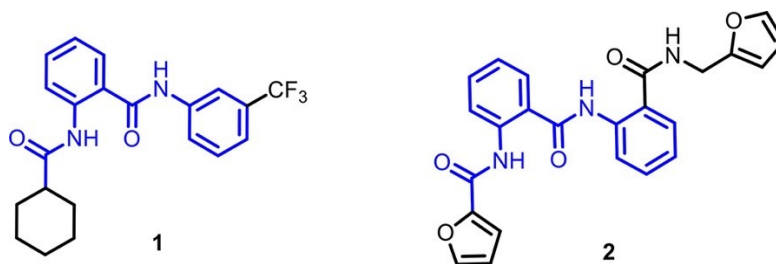
Klasických mimetik relaxinů a INSL peptidů není známé takové množství jako u mimetik insulinu. Většina z nich jsou zkrácené, nebo jinak pozměněné původní polypeptidy, zatímco malé molekuly interagující s receptory vytvořeny téměř nebyly. Výzkum těchto peptidomimetik vychází nejčastěji ze znalosti interakce hormon-receptor a z vývoje vhodně pozměněných peptidů a jejich následné experimentální funkční charakterizace.

4.2.1 Relaxin-2

První z uvedených mimetik jsou mimetika relaxinu 2. Při experimentech postupného zkracování N a C konců relaxinu-2 byla vytvořena série analogů, můžeme říci mimetik, s rozdílnými vazebnými afinitami. Právě derivát relaxinu složený z aminokyselin A4–A24 a B7–B24 byl identifikován jako nutný motiv pro stále ještě potentní vazbu na receptory RXFP1 a 2 patřící do rodiny GPCR receptorů. Tento zkrácený relaxin má sice asi 100x horší vazebnou afinitu vzhledem k nativnímu relaxinu, ale vykazuje výraznou selektivitu vůči RXFP1 oproti RXFP2. Takto zmenšené peptidy mohou být levněji a snadněji vytvořeny a navíc u nich nehrozí potenciální vedlejší efekty spojené s aktivací RXFP2 (188).

Nejúspěšnější jednořetězcové peptidomimetikum relaxinu 2 bylo vytvořeno jeho aminokyselinami B7-B33. Vazebná afinita této molekuly je značně horší než u relaxinu 2 zejména při detekci signální dráhy spřažené s cAMP, ale experimenty prokázaly jeho silný potenciál spouštět dráhu spojené s pERK. Tato dráha může v některých typech tkání napomáhat k produkci enzymu MMP-2 (matrix metaloproteináza-2). Vzhledem k funkční selektivitě pro tuto signalizační dráhu má i po experimentech na *in vitro* a *in vivo* modelech látka potenciál snižovat fibrózu například v plicích a srdci (189). V následných pokusech se pozitivní biologické účinky tohoto mimetika prokázaly *in vivo* na myších modelech v kontextu snížení chronických i akutních problémů se srdcem a vaskulární rezistence (190).

Byly identifikovány i dvě malé molekuly (Obrázek 13) mimikující relaxin 2 selektivně zaměřené na RXFP1 a jejich optimalizace pro lepší vazebné afinity i aktivaci signálních drah je v procesu. Tyto látky byly charakterizované z velkého množství testovaných sloučenin a mají poločas rozpadu v biologickém prostředí přes 100 minut a 100x větší afinitu vůči RXFP1 ve srovnání s afinitou proti RXFP2. S RXFP3 a RXFP4 neinteragují vůbec. Látky však přímo nekompetují s relaxinem o vazebné místo na receptoru RXFP1, ale pravděpodobně se vážou na blíže neidentifikované alosterické vazebné místo (191–194).



Obrázek 13. Struktura molekul **1** a **2** sdílí modře označenou centrální část, na kterou byly následně syntetizovány a optimalizovány další molekuly. Převzato z (192).

4.2.2 Relaxin-3

Jako mimetikum relaxinu-3 selektivní vůči jeho receptoru lze uvést chimérické peptidomimetikum vytvořené z B řetězce relaxinu-3 a z A řetězce INSL5 (tzv. mimetikum R3/I5). Chimérické molekuly s výraznou selektivitou mohou přispívat nejen k potenciálnímu klinickému využití, ale i k základnímu výzkumu pro charakterizaci peptidů insulinové rodiny a jejich receptorů. Řetězec A relaxinu je důležitý pro vazbu na receptor RXFP1 a jeho nahrazení vytvoří selektivnější mimetika vůči RXFP3 a 4 (195). Nejselektivnějším agonistickým peptidomimetikem je však chimerní látka podobná R3/I5 avšak navíc s aminokyselinovou záměnou v pozicích Gly23 a Ser24 v B řetězci relaxinu-3 (196). Jiný možný způsob vytvoření selektivity vůči RXFP3 a 4 je zkrácení N konce řetězce A relaxinu-3 o 10 aminokyselin a odstranění intramolekulárního disulfidického můstku v témže řetězci (197).

Byla vytvořena i jednořetězcová mimetika relaxinu-3 tvořená jeho pozměněným řetězcem jako např. B1-B22Arg s terminálním argininem na C konci či Ac-B10-27 s acetylovaným N koncem. Vysoce selektivní mimetikum B1-B22Arg má téměř stejnou vazebnou afinitu k RXFP3 jako nativní polypeptid a je dalším nástrojem pro výzkum vazebných vlastností relaxinu-3 i díky tomu, že NMR experimenty

ukázaly, že správná konformace proteinu pravděpodobně vzniká až při kontaktu s vazebným místem receptoru. Účinky byly navíc potvrzeny na krysích modelech při experimentech studujících příjem potravy (198, 199). V navazující studii byla díky inkorporaci aminokyseliny Aib do Ac-B10-27 stabilizována šroubovicová struktura mimetika a odhalena důležitá další aminokyselina účastnící se vazby na RXFP3 (200).

4.2.3 INSL3

Vygenerování řady chimérických molekul odvozených od INSL3, a i jeho zkrácení na kratší peptidy, částečně objasnilo aminokyseliny důležité pro navázání i aktivaci RXFP2. Navíc má zkrácené peptidomimetikum hormonu INSL3 složené z aminokyselin A5-26 a B7-27 téměř nativní vazebnou afinitu a vykazuje vysokou aktivaci následné intracelulární signalizace.

Mimetika INSL3 tvořená pozměněným i zkráceným řetězcem B sice vytěsňují radioaktivní relaxin z RXFP2, ale nejpotentnější mimetikum tohoto typu má až 1000x horší vazebnou afinitu než nativní INSL3 (201). Mimetik INSL3 zatím nebylo vytvořeno mnoho.

4.2.4 INSL5

Jako nejzajímavější peptidomimetikum hormonu INSL5 je molekula vytvořená zkrácením A řetězce INSL5 na sekvenci A8–21 a záměnou Thr15 za Lys15. Takové mimetikum vykazuje asi 10x vyšší vazebnou afinitu vůči RXFP4 než nativní hormon a stimuluje příslušné signální dráhy. Bez intrachainárního disulfidického můstku má toto mimetikum téměř stejnou vazebnou afinitou jako nativní peptid, přičemž je ale jeho chemická příprava výrazně jednodušší a rychlejší (202).

Jednořetězcová mimetika INSL5 již vytvořena byla, ale nemají téměř žádnou afinitu a jejich purifikace je obtížná (203).

5 Závěr a diskuze

V této bakalářské práci jsou shrnuty současné informace o mimetikách peptidů z rodiny insulinu. Tyto látky mají terapeutický potenciál pro léčbu řady chorob hlavně díky jejich vlastnostem odlišným od vlastností nativního polypeptidu jako je např. vyšší metabolická stabilita při aplikaci do organismu, lepší vazebné vlastnosti či levnější výroba.

První kapitola je věnována popisu peptidů z proteinové rodiny insulinu z hlediska účinků v lidském organismu, strukturních vlastností a interakce s receptory. Tyto peptidy spolu pravděpodobně sdílejí stejného evolučního předka, sekundární strukturu i rozložení disulfidických můstků, ale mohou se lišit zejména primárními sekvencemi a funkcemi v organismu.

Druhá kapitola představuje stručný pohled na tvorbu a možnosti návrhu peptidomimetik hlavně z chemického hlediska. Důraz byl kladen na způsob přípravy a funkční vlastnosti. Existuje velká variabilita ve způsobech přípravy těchto látek a záleží vždy na konkrétním případě, který přístup nebo kombinaci přístupů zvolit.

Ve třetí kapitole jsou podrobně rozebrána neúspěšnější peptidomimetika jednotlivých hormonů. Mezi vytvořenými peptidomimetiky je veliký rozdíl z hlediska strukturní rozmanitosti. Při napodobování insulínu byla vyzkoušeno mnoho přístupů od nejmenších molekul, přes sloučeniny založené na scaffoldech modifikovaných substituenty různé chemické povahy, až po zkrácené i různě pozměněné peptidy. Všechny možnosti mají výhody i nevýhody, ale stále se nepodařilo vyvinout mimetikum, které by mohlo plnohodnotně insulin nahradit a tak výzkum optimální náhrady tohoto hormonu není u konce. Peptidomimetika IGF-1 a IGF-2 téměř nebyla vytvořena a výzkum těchto hormonů se provádí za pomoci analogů s minimálními aminokyselinovými záměnami. Peptidomimetik hormonů z rodiny relaxinů a INSL není takové množství ani variabilita a jedná se převážně o zkrácené i upravené původní peptidy.

Informace shrnuté v této rešeršní práci jasně dokládají obtížnost vývoje mimetik peptidových hormonů z rodiny insulínu. Zejména vývoj „malých molekul“, které by mimikovaly akci hormonů je opravdovou výzvou a doposud se nepodařilo připravit mimetika, která by jak svou afinitou vůči receptorům tak i biologickým účinkem plnohodnotně napodobovala nativní hormony. Důvody jsou nasnadě. Polypeptidy z rodiny insulínu jsou poměrně velké molekuly s definovanou 3D strukturou a velikostí, která je již řadí mezi malé proteiny. Jejich interakce s receptory lze tedy klasifikovat jako interakce mezi proteiny, v angličtině „protein-protein interactions“ či PPIs, což je dnes v biochemii velmi používaný termín. Právě inhibice či mimikování PPIs patří k těm nejtěžším úkolům současné biochemie. Důvodem je, že interakční plochy proteinů jsou často rozsáhlé, mnohdy nepřiliš strukturně výrazné a často rozdělené na několik nesouvisejících ploch. Mimikovat takové interakce malými molekulami je nesmírně obtížný úkol. Naštěstí byl definován koncept tzv. „hot-spots“, což jsou místa v interakční ploše proteinů, která energeticky přispívají největší měrou do interakce mezi oběma proteiny. Identifikace takových míst a design molekul, které by se na ně vázaly, jsou cestou kudy se při vývoji mimetik ubírat. Zde může být nápomocná zejména výpočetní chemie a molekulární modelování.

Peptidomimetika hormonů mohou být v budoucnosti jednou z možností pro klinickou léčbu pacientů s řadou metabolických poruch, a to zejména diabetem či rakovinou. Jejich výhody a přednosti byly v práci popsány a výzkum se provádí v institucích po celém světě. Až čas ukáže, zda mimetika hormonů z rodiny insulínu nabydou významu v léčení onemocnění či ne.

6 Seznam zkratek a symbolů

Aib-alfa-amino iso-butanová kyselina

AKT-Proteinkináza B

cAMP-Cyklický adenosinmonofosfát

DNA-Deoxyribonukleová kyselina

GLUT-Transportér glukózy

GPCR-Receptor spřažený s G proteinem

IGF-Inzulinu podobný růstový faktor

IGFR-Receptor inzulinu podobného růstového faktoru

INSL-Insulinu podobný peptid

IR-A-Izoforma A insulinového receptoru

IR-B-Izoforma B insulinového receptoru

IR-Insulinový receptor

IRS-Substrát insulinového receptoru

LDL-Lipoprotein s nízkou hustotou

MAPK-mitogeny aktivovaná proteinkináza

PGG-1,2,3,4,6-Pentagalloylglukóza

PI3-Inositol-1,4,5-trifosfát

PM-Peptidomimetikum

RTK-Tyrosin kinázový receptor

RXFP-Receptor peptidu relaxinové rodiny

Pro aminokyseliny byly použity jednopísmenné a třípísmenné zkratky podle IUPAC-IUB(204).

7 Literatura

Sekundární citace označeny hvězdičkou.

1. *Chan, S. J., Nagamatsu, S., Cao, Q. P. a Steiner, D. F. Structure and evolution of insulin and insulin-like growth factors in chordates. *Prog. Brain Res.* **92**, 15–24 (1992).
2. *Blundell, T. L. a Humbel, R. E. Hormone families: Pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* **287**, 781–787 (1980).
3. Lageux, M., Laurence, L., Meister, M., Goltzené, F. a Hoffmann, J. A. cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur. J. Biochem.* **187**, 249–254 (1990).
4. Le Roith, D., Shiloach, J., Roth, J. a Lesniak, M. A. Evolutionary origins of vertebrate hormones: Substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6184–6188 (1980).
5. Rinderknecht, E. a Humbel, R. E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* **253**, 2769–2776 (1978).
6. Schwabe, C. a McDonald, J. K. Relaxin: A disulfide homolog of insulin. *Science* **197**, 914–915 (1977).
7. Adams, M. J., Blundell, T. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Vijayan, M., Baker, E. N., Harding, M. M., Hodgkin, D. C., Rimmer, B. a Sheat, S. Structure of rhombohedral 2 zinc insulin crystals. *Nature* **224**, 491–495 (1969).
8. Baker, E. N., Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. M., Hubbard, R. E., Isaacs, N. W. a Reynolds, C. D. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **319**, 369–456 (1988).
9. Cooke, R. M., Harvey, T. S. a Campbell, I. D. Solution Structure of Human Insulin-Like Growth Factor 1: A Nuclear Magnetic Resonance and Restrained Molecular Dynamics Study. *Biochemistry* **30**, 5484–5491 (1991).
10. Brzozowski, A. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Murshudov, G. N., Verma, C., Turkenburg, J. P., De Bree, F. M. a Dauter, Z. Structural origins of the functional divergence of human insulin-like growth factor-I and insulin. *Biochemistry* **41**, 9389–9397 (2002).
11. Terasawa, H., Kohda, D., Hatanaka, H., Nagata, K., Higashihashi, N., Fujiwara, H., Sakano, K. I. a Inagaki, F. Solution structure of human insulin-like growth factor II; Recognition sites for receptors and binding proteins. *EMBO J.* **13**, 5590–5597 (1994).
12. *Eigenbrot, C., Randal, M., Quan, C., Burnier, J., O'Connell, L., Rinderknecht, E. a Kossiakoff, A. A. X-ray structure of human relaxin at 1.5 Å. Comparison to insulin and implications for receptor binding determinants. *J. Mol. Biol.* **221**, 15–21 (1991).

13. Holthuizen, P. E., Cleutjens, C. B. J. M., Veenstra, G. J. C., van der Lee, F. M., Koonen-Reemst, A. M. C. B. a Sussenbach, J. S. Differential expression of the human, mouse and rat IGF-II genes. *Regul. Pept.* **48**, 77–89 (1993).
14. Stylianopoulou, F., Efstratiadis, A., Herbert, J. a Pintar, J. Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during rat embryogenesis. *Development* **103**, 497–506 (1988).
15. *Oberbauer, A. M. The regulation of IGF-1 gene transcription and splicing during development and aging. *Front. Endocrinol.* **4**, 1–9 (2013).
16. Lallemand, A. V., Ruocco, S. M., Joly, P. M. a Gaillard, D. A. In vivo localization of the insulin-like growth factors I and II (IGF I and IGF II) gene expression during human lung development. *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 529–537 (1995).
17. Lobb, D. K. a Porter, D. G. Rapid increase in relaxin gene expression in early pregnancy in the pig. *Mol. Cell. Endocrinol.* **89**, 10–13 (1992).
18. Kasuga, M., Karlsson, F. A. a Kahn, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* **215**, 185–187 (1982).
19. Cuatrecasas, P. Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 1264–1268 (1971).
20. Sheau, Y. H., Nakabayashi, K., Nishi, S., Kumagai, J., Kudo, M., Sherwood, O. D. a Hsueh, A. J. W. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* **295**, 671–674 (2002).
21. *Blyth, A. J., Kirk, N. S. a Forbes, B. E. Understanding IGF-II Action through Insights into Receptor Binding and Activation. *Cells* **9**, 1–13 (2020).
22. Sanger, F. Chemistry of insulin. *Science* **129**, 1340–1344 (1959).
23. Sanger, F. The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* **39**, 507–515 (1945).
24. Rubenstein, A. H., Clark, J. L., Melani, F. a Steiner, D. F. Secretion of proinsulin C-Peptide by pancreatic β cells and its circulation in blood. *Nature* **224**, 697–699 (1969).
25. Shu Jin Chan, Keim, P. a Steiner, D. F. Cell free synthesis of rat preproinsulins: Characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1964–1968 (1976).
26. Docherty, K., Hutton, J. C. a Steiner, D. F. Cathepsin B-related proteases in the insulin secretory granule. *J. Biol. Chem.* **259**, 6041–6044 (1984).
27. Docherty, K., Carroll, R. J. a Steiner, D. F. Conversion of proinsulin to insulin: involvement of a 31,500 molecular weight thiol protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 4613–4617 (1982).
28. Steiner, D. F., Cunningham, D., Spigelman, L. a Aten, B. Insulin biosynthesis: Evidence for a precursor. *Science* **157**, 697–700 (1967).
29. Goldman, J. a Carpenter, F. H. Zinc Binding, Circular Dichroism, and Equilibrium Sedimentation Studies on Insulin (Bovine) and Several of Its Derivatives. *Biochemistry* **13**, 4566–4574 (1974).
30. McKern, N. M. *et al.* Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over

- conformation. *Nature* **443**, 218–221 (2006).
31. *Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., Watson, C. J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., Weiss, M. A., Ward, C. W. a Lawrence, M. C. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature* **493**, 241–245 (2013).
 32. Schaefer, E. M., Siddle, K. a Ellis, L. Deletion analysis of the human insulin receptor ectodomain reveals independently folded soluble subdomains and insulin binding by a monomeric α -subunit. *J. Biol. Chem.* **265**, 13248–13253 (1990).
 33. *Lewis, R. E. a Czech, M. P. Molecular Biology of the Insulin Receptor. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 157–172 (1988).
 34. Seino, S., Seino, M., Nishi, S. a Bell, G. I. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 114–118 (1989).
 35. Mosthaf, L., Grako, K., Dull, T. J., Coussens, L., Ullrich, A. a McClain, D. A. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J.* **9**, 2409–2413 (1990).
 36. Moller, D. E., Yokota, A., Caro, J. F. a Flier, J. S. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol. Endocrinol.* **3**, 1263–1269 (1989).
 37. Seino, S. a Bell, G. I. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 312–316 (1989).
 38. Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I. D., Belfiore, A. a Vigneri, R. Insulin Receptor Isoform A, a Newly Recognized, High-Affinity Insulin-Like Growth Factor II Receptor in Fetal and Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3278–3288 (1999).
 39. Blanquart, C., Achi, J. a Issad, T. Characterization of IRA/IRB hybrid insulin receptors using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 873–883 (2008).
 40. *De Meyts, P. Insulin and its receptor: Structure, function and evolution. *BioEssays* **26**, 1351–1362 (2004).
 41. Gutmann, T., Schäfer, I. B., Poojari, C., Brankatschk, B., Vattulainen, I., Strauss, M. a Coskun, Ü. Cryo-EM structure of the complete and ligand-saturated insulin receptor ectodomain. *J. Cell Biol.* **219**, (2020).
 42. Whittaker, J. a Whittaker, L. Characterization of the functional insulin binding epitopes of the full-length insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **280**, 20932–20936 (2005).
 43. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Kochoyan, M. a Weiss, M. A. Receptor binding redefined by a structural switch in a mutant human insulin. *Nature* **354**, 238–241 (1991).
 44. Weis, F., Menting, J. G., Margetts, M. B., Chan, S. J., Xu, Y., Tennagels, N., Wohlfart, P., Langer, T., Müller, C. W., Dreyer, M. K. a Lawrence, M. C. The signalling conformation of the insulin receptor ectodomain. *Nat. Commun.* **9**, 1–10 (2018).

45. Uchikawa, E., Choi, E., Shang, G., Yu, H. a Xiao-Chen, B. Activation mechanism of the insulin receptor revealed by cryo-EM structure of the fully liganded receptor-ligand complex. *Elife* **8**, 1–23 (2019).
46. Abbott, A. M., Bueno, R., Pedrini, M. T., Murray, J. M. a Smith, R. J. Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J. Biol. Chem.* **267**, 10759–10763 (1992).
47. *Belfiore, A., Malaguarnera, R., Vella, V., Lawrence, M. C., Sciacca, L., Frasca, F., Morrione, A. a Vigneri, R. Insulin receptor isoforms in physiology and disease: An updated view. *Endocr. Rev.* **38**, 1–84 (2017).
48. Mosthaf, L., Vogt, B., Häring, H. U. a Ullrich, A. Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4728–4730 (1991).
49. Yamaguchi, Y., Flier, J. S., Yokota, A., Benecke, H., Backer, J. M. a Moller, D. E. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* **129**, 2058–2066 (1991).
50. Moxham, C. P., Duronio, V. a Jacobs, S. Insulin-like growth factor I receptor β -subunit heterogeneity. *J. Biol. Chem.* **264**, 13238–13244 (1989).
51. *Sciacca, L., Le Moli, R. a Vigneri, R. Insulin analogs and cancer. *Front. Endocrinol.* **3**, (2012).
52. *Jiráček, J. a Žáková, L. Structural perspectives of insulin receptor isoform-selective insulin analogs. *Front. Endocrinol.* **8**, 1–8 (2017).
53. Jhun, B. H., Rampal, A. L., Liu, H., Lachaal, M. a Jung, C. Y. Effects of insulin on steady state kinetics of GLUT4 subcellular distribution in rat adipocytes. Evidence of constitutive GLUT4 recycling. *J. Biol. Chem.* **267**, 17710–17715 (1992).
54. Czech, M. P. a Buxton, J. M. Insulin action on the internalization of the GLUT4 glucose transporter in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **268**, 9187–9190 (1993).
55. Shepherd, P. R., Nave, B. T. a Siddle, K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: Evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-56 kinase. *Biochem. J.* **305**, 25–28 (1995).
56. *Pessin, J. E., Thurmond, D. C., Elmendorf, J. S., Coker, K. J. a Okada, S. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. *J. Biol. Chem.* **274**, 2593–2596 (1999).
57. Skolnik, E. Y., Batzer, A., Li, N., Lee, C. H., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B. a Schlessinger, J. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* **260**, 1953–1955 (1993).
58. Holgado-Madruga, M., Emllet, D. R., Moscatello, D. K., Godwin, A. K. a Wong, A. J. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* **379**, 560–564 (1996).

59. Scott, P. H., Brunn, G. J., Kohn, A. D., Roth, R. A. a Lawrence, J. C. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7772–7777 (1998).
60. Gockerman, A., Prevette, T., Jones, J. I. a Clemmons, D. R. Insulin-like growth factor (igf)-binding proteins inhibit the smooth muscle cell migration responses to igf-I and igf-II. *Endocrinology* roč. 136 <https://academic.oup.com/endo/article/136/10/4168/3036340> (1995).
61. Engert, J. C., Berglund, E. B. a Rosenthal, N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J. Cell Biol.* **135**, 431–440 (1996).
62. *Wabitsch, M., Hauner, H., Heinze, E. a Teller, W. M. The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism* **44**, 45–49 (1995).
63. Mairet-Coello, G., Tury, A. a DiCicco-Bloom, E. Insulin-like growth factor-1 promotes G1/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. *J. Neurosci.* **29**, 775–788 (2009).
64. Louvi, A., Accili, D. a Efstratiadis, A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev. Biol.* **189**, 33–48 (1997).
65. *Fowden, A. L. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* **24**, 803–812 (2003).
66. *Alberini, C. M. a Chen, D. Y. Memory enhancement: Consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. *Trends Neurosci.* **35**, 274–283 (2012).
67. *Bach, L. A., Headey, S. J. a Norton, R. S. IGF-binding proteins - The pieces are falling into place. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 228–234 (2005).
68. *Livingstone, C. IGF2 and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **20**, 321–339 (2013).
69. *Peacey, S. R. a Shalet, S. M. Insulin-like growth factor 1 measurement in diagnosis and management of acromegaly. *Ann. Clin. Biochem.* **38**, 297–303 (2001).
70. Subbarayan, S. K., Fleseriu, M., Gordon, M. B., Brzana, J. A., Kennedy, L., Faiman, C., Hatipoglu, B. A., Prayson, R. A., Delashaw, J. B., Weil, R. J. a Hamrahian, A. H. Serum IGF-1 in the diagnosis of acromegaly and the profile of patients with elevated igf-1 but normal glucose-suppressed growth hormone. *Endocr. Pract.* **18**, 817–825 (2012).
71. Meyer, S., Ipek, M., Keth, A., Minnemann, T., von Mach, M. A., Weise, A., Ittner, J. R., Nawroth, P. P., Plöckinger, U., Stalla, G. K., Tuschy, U., Weber, M. M. a Kann, P. H. Short stature and decreased insulin-like growth factor I (IGF-I)/growth hormone (GH)-ratio in an adult GH-deficient patient pointing to additional partial GH insensitivity due to a R179C mutation of the growth hormone receptor. *Growth Horm. IGF Res.* **17**, 307–314 (2007).
72. Schumacher, R., Mosthaf, L., Schlessinger, J., Brandenburg, D. a Ullrich, A. Insulin and insulin-like growth factor-1 binding specificity is determined by distinct regions of their cognate receptors. *J. Biol. Chem.* **266**, 19288–19295 (1991).

73. Entingh-Pearsall, A. a Kahn, C. R. Differential roles of the insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in response to insulin and IGF-I. *J. Biol. Chem.* **279**, 38016–38024 (2004).
74. *Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C. a Forbes, B. E. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 421–439 (2005).
75. Ullrich, A., Bell, J. R., Chen, E. Y., Herrera, R., Petruzzelli, L. M., Dull, T. J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y. C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P. H., Grunfeld, C., Rosen, O. M. a Ramachandran, J. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* **313**, 756–761 (1985).
76. Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S. a Chen, E. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* **5**, 2503–2512 (1986).
77. Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P. J. a Ward, C. W. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1050–1093 (2000).
78. *Saltiel, A. R. Insulin signaling in health and disease. *J. Clin. Invest.* **131**, (2021).
79. *Siddle, K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: Neglected corners and recent advances. *Front. Endocrinol.* **3**, 1–24 (2012).
80. Brown, J., Delaine, C., Zaccheo, O. J., Siebold, C., Gilbert, R. J., Van Boxel, G., Denley, A., Wallace, J. C., Hassan, A. B., Forbes, B. E. a Jones, E. Y. Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF2R interaction. *EMBO J.* **27**, 265–276 (2008).
81. Souza, A. T. D., Hankins, G. R., Washington, M. K., Orton, T. C. a Jirtle, R. L. M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat. Genet.* **11**, 447–449 (1995).
82. Oka, Y., Waterland, R. A., Killian, J. K., Nolan, C. M., Jang, H. S., Tohara, K., Sakaguchi, S., Yao, T., Iwashita, A., Yata, Y., Takahara, T., Sato, S. I., Suzuki, K., Masuda, T. a Jirtle, R. L. M6P/IGF2R tumor suppressor gene mutated in hepatocellular carcinomas in Japan. *Hepatology* **35**, 1153–1163 (2002).
83. Yu, X. W., Pandey, K., Katzman, A. C. a Alberini, C. M. A role for CIM6P/IGF2 receptor in memory consolidation and enhancement. *Elife* **9**, 1–25 (2020).
84. Li, J., Choi, E., Yu, H. a Bai, X. chen. Structural basis of the activation of type 1 insulin-like growth factor receptor. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
85. Xu, Y., Kong, G. K. W., Menting, J. G., Margetts, M. B., Delaine, C. A., Jenkin, L. M., Kiselyov, V. V., De Meyts, P., Forbes, B. E. a Lawrence, M. C. How ligand binds to the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
86. Xu, Y., Kirk, N. S., Venugopal, H., Margetts, M. B., Croll, T. I., Sandow, J. J., Webb, A. I., Delaine, C. A., Forbes, B. E. a Lawrence, M. C. How IGF-II Binds to the Human Type 1

- Insulin-like Growth Factor Receptor. *Structure* **28**, 786-798.e6 (2020).
87. Wilkinson, T. N., Speed, T. P., Tregear, G. W. a Bathgate, R. A. D. Evolution of the relaxin-like peptide family. *BMC Evol. Biol.* **5**, 1–17 (2005).
 88. *Halls, M. L., Van Der Westhuizen, E. T., Bathgate, R. A. D. a Summers, R. J. Relaxin family peptide receptors - Former orphans reunite with their parent ligands to activate multiple signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 677–691 (2007).
 89. *Kong, R. C. K., Shilling, P. J., Lobb, D. K., Gooley, P. R. a Bathgate, R. A. D. Membrane receptors: Structure and function of the relaxin family peptide receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **320**, 1–15 (2010).
 90. Yegorov, S. a Good, S. Using paleogenomics to study the evolution of gene families: Origin and duplication history of the relaxin family hormones and their receptors. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
 91. Büllsbach, E. E. a Schwabe, C. The relaxin receptor-binding site geometry suggests a novel gripping mode of interaction. *J. Biol. Chem.* **275**, 35276–35280 (2000).
 92. Haugaard-Kedstro M., L. M., Hossain, M. A., Daly, N. L., Bathgate, R. A. D., Rinderknecht, E., Wade, J. D., Craik, D. J. a Rosengren, K. J. Solution structure, aggregation behavior, and flexibility of human relaxin-2. *ACS Chem. Biol.* **10**, 891–900 (2015).
 93. Hudson, P., Haley, J., Cronk, M., Shine, J. a Niall, H. Molecular cloning and characterization of cDNA sequences coding for rat relaxin. *Nature* **291**, 127–131 (1981).
 94. Hudson, P., Haley, J., John, M., Cronk, M., Crawford, R., Haralambidis, J., Tregear, G., Shine, J. a Niall, H. Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature* **301**, 628–631 (1983).
 95. Adham, I. M., Burkhardt, E., Benahmed, M. a Engel, W. Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 26668–26672 (1993).
 96. *Weiss, G. a Goldsmith, L. T. Relaxin and the cervix. *Front. Horm. Res.* **27**, 105–112 (2001).
 97. *Aragón-Herrera, A. A Summary about Relaxin and Its Reproductive Function. *Endocrinol. Int. J.* **4**, 114–116 (2017).
 98. *Jeyabalan, A. a Conrad, K. P. Renal function during normal pregnancy and preeclampsia. *Front. Biosci.* **12**, 2425–2437 (2007).
 99. Tanaka, M., Iijima, N., Miyamoto, Y., Fukusumi, S., Itoh, Y., Ozawa, H. a Ibata, Y. Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 1659–1670 (2005).
 100. Burnicka-Turek, O., Mohamed, B. A., Shirneshan, K., Thanasupawat, T., Hombach-Klonisch, S., Klonisch, T. a Adham, I. M. INSL5-deficient mice display an alteration in glucose homeostasis and an impaired fertility. *Endocrinology* **153**, 4655–4665 (2012).
 101. Yuan, L., Wang, H., Wang, Q., Li, C. a Yang, D. INSL-3 protein expression in normal and cryptorchid testes of Ziwuling black goats. *Reprod. Domest. Anim.* 1–11 (2021)

doi:10.1111/rda.13911.

102. Grosse, J. *et al.* Insulin-like peptide 5 is an orexigenic gastrointestinal hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 11133–11138 (2014).
103. Nef, S. a Parada, L. F. Cryptorchidism in mice mutant for Insl3. *Nat. Genet.* **22**, 295–299 (1999).
104. Ferlin, A., Pepe, A., Gianesello, L., Garolla, A., Feng, S., Giannini, S., Zaccolo, M., Faccioli, A., Morello, R., Agoulnik, A. I. a Foresta, C. Mutations in the insulin-like factor 3 receptor are associated with osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* **23**, 683–693 (2008).
105. Ferlin, A., Perilli, L., Gianesello, L., Tagliavero, G. a Foresta, C. Profiling insulin like factor 3 (INSL3) signaling in human osteoblasts. *PLoS One* **6**, (2011).
106. *Bathgate, R. A., Ivell, R., Sanborn, B. M., Sherwood, O. D. a Summers, R. J. International union of pharmacology LVII: Recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. *Pharmacol. Rev.* **58**, 7–31 (2006).
107. Hopkins, E. J., Layfield, S., Ferraro, T., Bathgate, R. A. D. a Gooley, P. R. The NMR solution structure of the relaxin (RXFP1) receptor lipoprotein receptor class A module and identification of key residues in the N-terminal region of the module that mediate receptor activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 4172–4184 (2007).
108. Kumagai, J., Hsu, S. Y., Matsumi, H., Roh, J. S., Fu, P., Wade, J. D., Bathgate, R. A. D. a Hsueh, A. J. W. INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J. Biol. Chem.* **277**, 31283–31286 (2002).
109. *Ascoli, M., Fanelli, F. a Segaloff, D. L. The lutropin/choriogonadotropin receptor, A 2002 perspective. *Endocr. Rev.* **23**, 141–174 (2002).
110. Shea Yu Hsu, Kudo, M., Chen, T., Nakabayashi, K., Bhalla, A., Van der Spek, P. J., Van Duin, M. a Hsueh, A. J. W. The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): Identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1257–1271 (2000).
111. Braddon, S. A. Relaxin-dependent adenosine 3', 5'-monophosphate concentration changes in the mouse pubic symphysis. *Endocrinology* **102**, 1292–1299 (1978).
112. Cheah, S. H. a Sherwood, O. D. Target tissues for relaxin in the rat: Tissue distribution of injected 125I-labeled relaxin and tissue changes in adenosine 3', 5'-Monophosphate Levels after in Vitro Relaxin Incubation. *Endocrinology* **106**, 1203–1209 (1980).
113. Bani, D., Baccari, M. C., Nistri, S., Calamai, F., Bigazzi, M. a Sacchi, T. B. Relaxin up-regulates the nitric oxide biosynthetic pathway in the mouse uterus: In the inhibition of myometrial contractility. *Endocrinology* **140**, 4434–4441 (1999).
114. Liu, C., Eriste, E., Sutton, S., Chen, J., Roland, B., Kuei, C., Farmer, N., Jörnvall, H., Sillard, R. a Lovenberg, T. W. Identification of Relaxin-3/INSL7 as an Endogenous Ligand for the Orphan G-protein-coupled Receptor GPCR135. *J. Biol. Chem.* **278**, 50754–50764 (2003).

115. Ang, S. Y., Hutchinson, D. S., Patil, N., Evans, B. A., Bathgate, R. A. D., Halls, M. L., Hossain, M. A., Summers, R. J. a Kocan, M. Signal transduction pathways activated by insulin-like peptide 5 at the relaxin family peptide RXFP4 receptor. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 1077–1089 (2017).
116. Ang, S. Y., Hutchinson, D. S., Evans, B. A., Hossain, M. A., Patil, N., Bathgate, R. A. D., Kocan, M. a Summers, R. J. The actions of relaxin family peptides on signal transduction pathways activated by the relaxin family peptide receptor RXFP4. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **390**, 105–111 (2017).
117. Chan, L. J., Rosengren, K. J., Layfield, S. L., Bathgate, R. A. D., Separovic, F., Samuel, C. S., Hossain, M. A. a Wade, J. D. Identification of key residues essential for the structural fold and receptor selectivity within the A-chain of human gene-2 (H2) relaxin. *J. Biol. Chem.* **287**, 41152–41164 (2012).
118. Hossain, M. A., Rosengren, K. J., Haugaard-Jönsson, L. M., Zhang, S., Layfield, S., Ferraro, T., Daly, N. L., Tregear, G. W., Wade, J. D. a Bathgate, R. A. D. The A-chain of human relaxin family peptides has distinct roles in the binding and activation of the different relaxin family peptide receptors. *J. Biol. Chem.* **283**, 17287–17297 (2008).
119. Büllsbach, E. E. a Schwabe, C. The trap-like relaxin-binding site of the leucine-rich G-protein-coupled receptor 7. *J. Biol. Chem.* **280**, 14051–14056 (2005).
120. Büllsbach, E. E. a Schwabe, C. Tryptophan B27 in the relaxin-like factor (RLF) is crucial for RLF receptor-binding. *Biochemistry* **38**, 3073–3078 (1999).
121. Kuei, C., Sutton, S., Bonaventure, P., Pudiak, C., Shelton, J., Zhu, J., Nepomuceno, D., Wu, J., Chen, J., Kamme, F., Seierstad, M., Hack, M. D., Bathgate, R. A. D., Hossain, M. A., Wade, J. D., Atack, J., Lovenberg, T. W. a Liu, C. R3(BΔ23-27)R/I5 chimeric peptide, a selective antagonist for GPCR135 and GPCR142 over relaxin receptor LGR7. *J. Biol. Chem.* **282**, 25425–25435 (2007).
122. Rosengren, K. J., Zhang, S., Lin, F., Daly, N. L., Scott, D. J., Hughes, R. A., Bathgate, R. A. D., Craik, D. J. a Wade, J. D. Solution structure and characterization of the LGR8 receptor binding surface of insulin-like peptide. *J. Biol. Chem.* **281**, 28287–28295 (2006).
123. Scott, D. J., Johan Rosengren, K. a Bathgate, R. A. D. The different ligand-binding modes of relaxin family peptide receptors RXFP1 and RXFP2. *Mol. Endocrinol.* **26**, 1896–1906 (2012).
124. *Giannis, A. a Kolter, T. Peptidomimetics for Receptor Ligands—Discovery, Development, and Medical Perspectives. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **32**, 1244–1267 (1993).
125. *Trabocchi, A. a Guarna, A. The Basics of Peptidomimetics. in *Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry* 1–17 (John Wiley & Sons, Ltd, 2014).
doi:10.1002/9781118683033.ch1.
126. *Vagner, J., Qu, H. a Hruby, V. J. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 292–296 (2008).

127. *Ngo, H. X. a Garneau-Tsodikova, S. What are the drugs of the future? *Medchemcomm* **9**, 757–758 (2018).
128. Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J. a Marchetti, J. M. *Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **123**, 345–363 (2014).
129. *Adang, A. E. P., Hermkens, P. H. H., Linders, J. T. M., Ottenheijm, H. C. J. a van Staveren, C. J. Case histories of peptidomimetics: Progression from peptides to drugs. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **113**, 63–78 (1994).
130. Air, E. L., Strowski, M. Z., Benoit, S. C., Conarello, S. L., Salituro, G. M., Guan, X. M., Liu, K., Woods, S. C. a Zhang, B. B. Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat. Med.* **8**, 179–183 (2002).
131. *Olson, G. L., Bolin, D. R., Bonner, M. P., Bös, M., Cook, C. M., Fry, D. C., Graves, B. J., Hatada, M., Hill, D. E., Kahn, M., Madison, V. S., Rusiecki, V. K., Sarabu, R., Sepinwall, J., Vincent, G. P. a Voss, M. E. Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics. *J. Med. Chem.* **36**, 3039–3049 (1993).
132. *Aguilar, M. I., Purcell, A. W., Devi, R., Lew, R., Rossjohn, J., Smith, A. I. a Perlmutter, P. β -Amino acid-containing hybrid peptides - New opportunities in peptidomimetics. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 2884–2890 (2007).
133. Schwyzer, R. Synthetische Analoge des Hypertensins. I. Einleitung. *Helv. Chim. Acta* **44**, 667–674 (1961).
134. Gopi, H. N., Ravindra, G., Pal, P. P., Pattanaik, P., Balaram, H., Balaram, P. a Eklund, H. Proteolytic stability of β -peptide bonds probed using quenched fluorescent substrates incorporating a hemoglobin cleavage site. *FEBS Lett.* **535**, 175–178 (2003).
135. Steer, D., Lew, R., Perlmutter, P., Smith, A. a Aguilar, M.-I. Beta-Amino Acids: Versatile Peptidomimetics. *Curr. Med. Chem.* **9**, 811–822 (2005).
136. Manning, M. a du Vigneaud, V. 4- β -Alanine-oxytocin: An Oxytocin Analog Containing a Twenty-one-membered Disulfide Ring. *Biochemistry* **4**, 1884–1888 (1965).
137. Müller, A., Schumann, F., Kokschi, M. a Sewald, N. Synthesis of cyclic RGD-peptides containing β -amino acids. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **4**, 275–281 (1997).
138. *Feng, Z. a Xu, B. Inspiration from the mirror: D-amino acid containing peptides in biomedical approaches. *Biomol. Concepts* **7**, 179–187 (2016).
139. Liang, G., Yang, Z., Zhang, R., Li, L., Fan, Y., Kuang, Y., Gao, Y., Wang, T., Lu, W. W. a Xu, B. Supramolecular hydrogel of a D-amino acid dipeptide for controlled drug release in vivo. *Langmuir* **25**, 8419–8422 (2009).
140. Wei, X., Zhan, C., Shen, Q., Fu, W., Xie, C., Gao, J., Peng, C., Zheng, P. a Lu, W. A D-Peptide Ligand of Nicotine Acetylcholine Receptors for Brain-Targeted Drug Delivery. *Angew. Chemie* **127**, 3066–3070 (2015).

141. Li, J., Kuang, Y., Gao, Y., Du, X., Shi, J. a Xu, B. D -amino acids boost the selectivity and confer supramolecular hydrogels of a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 542–545 (2013).
142. *Gentilucci, L., De Marco, R. a Cerisoli, L. Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3185–3203 (2010).
143. *Trabocchi, A. a Guarna, A. Synthetic Approaches towards Peptidomimetic Design. in *Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry* roč. 9781119950 19–36 (John Wiley & Sons, Ltd, 2014).
144. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. a Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95–99 (1963).
145. *Ramachandran, G. N. a Sasisekharan, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283–437 (1968).
146. Huang, Z., He, Y. B., Raynor, K., Tallent, M., Reisine, T. a Goodman, M. Main Chain and Side Chain Chiral Methylated Somatostatin Analogs: Syntheses and Conformational Analyses. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9390–9401 (1992).
147. Crisma, M., Moretto, A., De Zotti, M., Formaggio, F., Kaptein, B., Broxterman, Q. B. a Toniolo, C. Turn stabilization in short peptides by α -methylated α -amino acids. *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **80**, 279–293 (2005).
148. *Ramakrishnan, C. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations - Part I. Evaluation of helical parameters. *Proc. Indian Acad. Sci. - Sect. A* **59**, 327–343 (1964).
149. Yan, B. X. a Sun Qing, Y. Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *J. Biol. Chem.* **272**, 3190–3194 (1997).
150. *Lenci, E. a Trabocchi, A. Peptidomimetic toolbox for drug discovery. *Chem. Soc. Rev.* **49**, 3262–3277 (2020).
151. *Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. a Peggion, C. Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect. *Biopolymers* **60**, 396–419 (2001).
152. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F., Valle, C., Cavicchioni, G., Precigoux, G., Aubry, A. a Kamphuis, J. Structures of peptides from α -amino acids methylated at the α -carbon. *Biopolymers* **33**, 1061–1072 (1993).
153. Altmann, E., Altmann, K., Nebel, K. a Mutter, M. Conformational studies on host-guest peptides containing chiral α -methyl- α -amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **32**, 344–351 (1988).
154. Pengo, P., Pasquato, L., Moro, S., Brigo, A., Fogolari, F., Broxterman, Q., Kaptein, B. a Scrimin, P. Quantitative Correlation of Solvent Polarity with the α -310-Helix Equilibrium: A Heptapeptide Behaves as a Solvent-Driven Molecular Spring. *Angew. Chemie* **115**, 3510–3514 (2003).

155. Formaggio, F., Moretto, V., Crisma, M., Toniolo, C., Kaptein, B. a Broxterman, Q. B. New tools for the control of peptide conformation: The helicogenic C α -methyl, C α -cyclohexylglycine. *J. Pept. Res.* **63**, 161–170 (2004).
156. Islam, R., Sviridov, D. O., Drake, S. K., Tunyi, J., Abdoulaeva, G., Freeman, L. A., Pastor, R. W. a Remaley, A. T. Incorporation of α -methylated amino acids into Apolipoprotein A-I mimetic peptides improves their helicity and cholesterol efflux potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **526**, 349–354 (2020).
157. MacArthur, M. W. a Thornton, J. M. Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* **218**, 397–412 (1991).
158. *Barlow, D. J. a Thornton, J. M. Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.* **201**, 601–619 (1988).
159. Grathwohl, C. a Wüthrich, K. The X-Pro peptide bond as an nmr probe for conformational studies of flexible linear peptides. *Biopolymers* **15**, 2025–2041 (1976).
160. *Yaron, A., Naider, F. a Scharpe, S. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 31–81 (1993).
161. Brandts, J. F., Halvorson, H. R. a Brennan, M. Consideration of the Possibility That the Slow Step in Protein Denaturation Reactions is Due to Cis-Trans Isomerism of Proline Residues. *Biochemistry* **14**, 4953–4963 (1975).
162. *Madison, V. Flexibility of the pyrrolidine ring in proline peptides. *Biopolymers* **16**, 2671–2692 (1977).
163. Orner, B. P., Ernst, J. T. a Hamilton, A. D. Toward proteomimetics: Terphenyl derivatives as structural and functional mimics of extended regions of an α -helix. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5382–5383 (2001).
164. Frutos, S., Rodriguez-Mias, R. A., Madurga, S., Collinet, B., Reboud-Ravaux, M., Ludevid, D. a Giralt, E. Disruption of the HIV-1 protease dimer with interface peptides: structural studies using NMR spectroscopy combined with [2-(13)C]-Trp selective labeling. *Biopolymers* **88**, 164–173 (2007).
165. *Zaykov, A. N., Mayer, J. P. a Dimarchi, R. D. Pursuit of a perfect insulin. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 425–439 (2016).
166. Schlein, M., Ludvigsen, S., Olsen, H. B., Andersen, A. S., Danielsen, G. M. a Kaarsholm, N. C. Properties of small molecules affecting insulin receptor function. *Biochemistry* **40**, 13520–13528 (2001).
167. Hajduch, J., Fabre, B., Klopp, B., Pohl, R., Buděšínský, M., Šolínová, V., Kašička, V., Köprülüoğlu, C., Eyrilmez, S. M., Lepšík, M., Hobza, P., Mitrová, K., Lubos, M., Hernández, M. S. G. a Jiráček, J. Multipodal insulin mimetics built on adamantane or proline scaffolds. *Bioorg. Chem.* **107**, (2021).
168. Nakamura, T., Takahashi, H., Takahashi, M., Shimba, N., Suzuki, E. I. a Shimada, I. Direct

- determination of the insulin - insulin receptor interface using transferred cross-saturation experiments. *J. Med. Chem.* **53**, 1917–1922 (2010).
169. Tan, C., Wei, L., Ottensmeyer, F. P., Goldfine, I., Maddux, B. A., Yip, C. C., Batey, R. A. a Kotra, L. P. Structure-based de novo design of ligands using a three-dimensional model of the insulin receptor. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **14**, 1407–1410 (2004).
170. Li, Y., Kim, J., Li, J., Liu, F., Liu, X., Himmeldirk, K., Ren, Y., Wagner, T. E. a Chen, X. Natural anti-diabetic compound 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose binds to insulin receptor and activates insulin-mediated glucose transport signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 430–437 (2005).
171. Xie, J., Wang, S., Ma, P., Ma, F., Li, J., Wang, W., Lu, F., Xiong, H., Gu, Y., Zhang, S., Xu, H., Yang, G. a Lerner, R. A. Selection of Small Molecules that Bind to and Activate the Insulin Receptor from a DNA-Encoded Library of Natural Products. *iScience* **23**, 101197 (2020).
172. Pillutla, R. C., Hsiao, K. C., Beasley, J. R., Brandt, J., Østergaard, S., Hansen, P. H., Spetzler, J. C., Danielsen, G. M., Andersen, A. S., Brissette, R. E., Lennick, M., Fletcher, P. W., Blume, A. J., Schäffer, L. a Goldstein, N. I. Peptides identify the critical hotspots involved in the biological activation of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 22590–22594 (2002).
173. Pillutla, R. C., Brissette, R. E., Blume, A. J., Schäffer, L., Brandt, J., Goldstein, N. I., Spetzler, J. C., Østergaard, S. a Hansen, P. H. Insulin and igf-1 receptor agonists and antagonists. 1–189 (2011).
174. Schäffer, L., Brissette, R. E., Spetzler, J. C., Pillutla, R. C., Østergaard, S., Lennick, M., Brandt, J., Fletcher, P. W., Danielsen, G. M., Hsiao, K. C., Andersen, A. S., Dedova, O., Ribbel, U., Hoeg-Jensen, T., Hansen, P. H., Blume, A. J., Markussen, J. a Goldstein, N. I. Assembly of high-affinity insulin receptor agonists and antagonists from peptide building blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4435–4439 (2003).
175. Jensen, M., Hansen, B., De Meyts, P., Schäffer, L. a Ursø, B. Activation of the insulin receptor by insulin and a synthetic peptide leads to divergent metabolic and mitogenic signaling and responses. *J. Biol. Chem.* **282**, 35179–35186 (2007).
176. Vaněk, V., Pícha, J., Fabre, B., Buděšínský, M., Lepšík, M. a Jiráček, J. The development of a versatile trifunctional scaffold for biological applications. *European J. Org. Chem.* **2015**, 3689–3701 (2015).
177. Fabre, B., Pícha, J., Vaněk, V., Selicharová, I., Chrudinová, M., Collinsová, M., Žáková, L., Buděšínský, M. a Jiráček, J. Synthesis and Evaluation of a Library of Trifunctional Scaffold-Derived Compounds as Modulators of the Insulin Receptor. *ACS Comb. Sci.* **18**, 710–722 (2016).
178. LeBedis, C., Chen, K., Fallavollita, L., Boutros, T. a Brodt, P. Peripheral lymph node stromal cells can promote growth and tumorigenicity of breast carcinoma cells through the release of IGF-I and EGF. *Int. J. Cancer* **100**, 2–8 (2002).

179. Wolk, A., Mantzoros, C. S., Andersson, S. O., Bergström, R., Signorello, L. B., Lagiou, P., Adami, H. O. & Trichopoulos, D. Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: A population-based, case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 911–915 (1998).
180. Wilker, E., Bol, D., Kiguchi, K., Rupp, T., Beltrán, L. & DiGiovanni, J. Enhancement of susceptibility to diverse skin tumor promoters by activation of the insulin-like growth factor-1 receptor in the epidermis of transgenic mice. *Mol. Carcinog.* **25**, 122–131 (1999).
181. *Pollak, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 915–928 (2008).
182. Chapuis, N., Tamburini, J., Cornillet-Lefebvre, P., Gillot, L., Bardet, V., Willems, L., Park, S., Green, A. S., Ifrah, N., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C. & Bouscary, D. Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: Therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody. *Haematologica* **95**, 415–423 (2010).
183. Kaleko, M., Rutter, W. J. & Miller, A. D. Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 464–473 (1990).
184. Carboni, J. M. *et al.* BMS-754807, a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 3341–3349 (2009).
185. Cohen, B. D., Baker, D. A., Soderstrom, C., Tkalcevic, G., Rossi, A. M., Miller, P. E., Tengowski, M. W., Wang, F., Gualberto, A., Beebe, J. S. & Moyer, J. D. Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2063–2073 (2005).
186. *R. King, E. & Wong, K.-K. Insulin-like Growth Factor: Current Concepts and New Developments in Cancer Therapy. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **7**, 14–30 (2011).
187. Beltran, P. J., Mitchell, P., Chung, Y. A., Cajulis, E., Lu, J., Belmontes, B., Ho, J., Mei, M. T., Zhu, M., Vonderfecht, S., Baserga, R., Kendall, R., Radinsky, R. & Calzone, F. J. AMG 479, a fully human anti-insulin-like growth factor receptor type I monoclonal antibody, inhibits the growth and survival of pancreatic carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 1095–1105 (2009).
188. Hossain, M. A., Rosengren, K. J., Samuel, C. S., Shabanpoor, F., Chan, L. J., Bathgate, R. A. D. & Wade, J. D. The minimal active structure of human relaxin-2. *J. Biol. Chem.* **286**, 37555–37565 (2011).
189. Hossain, M. A., Kocan, M., Yao, S. T., Royce, S. G., Nair, V. B., Siwek, C., Patil, N. A., Harrison, I. P., Rosengren, K. J., Selemidis, S., Summers, R. J., Wade, J. D., Bathgate, R. A. D. & Samuel, C. S. A single-chain derivative of the relaxin hormone is a functionally selective agonist of the G protein-coupled receptor, RXFP1. *Chem. Sci.* **7**, 3805–3819 (2016).
190. Marshall, S. A., O’Sullivan, K., Ng, H. H. H., Bathgate, R. A. D., Parry, L. J., Hossain, M. A. & Leo, C. H. B7-33 replicates the vasoprotective functions of human relaxin-2 (serelaxin). *Eur. J.*

- Pharmacol.* **807**, 190–197 (2017).
191. Chen, C. Z., Southall, N., Xiao, J., Marugan, J. J., Ferrer, M., Hu, X., Jones, R. E., Feng, S., Agoulnik, I. U., Zheng, W. a Agoulnik, A. I. Identification of small-molecule agonists of human relaxin family receptor 1 (RXFP1) by using a homogenous cell-based cAMP assay. *J. Biomol. Screen.* **18**, 670–677 (2013).
192. Xiao, J., Huang, Z., Chen, C. Z., Agoulnik, I. U., Southall, N., Hu, X., Jones, R. E., Ferrer, M., Zheng, W., Agoulnik, A. I. a Marugan, J. J. Identification and optimization of small-molecule agonists of the human relaxin hormone receptor RXFP1. *Nat. Commun.* **4**, 1–7 (2013).
193. McBride, A., Hoy, A. M., Bamford, M. J., Mossakowska, D. E., Ruediger, M. P., Griggs, J., Desai, S., Simpson, K., Caballero-Hernandez, I., Iredale, J. P., Pell, T., Aucott, R. L., Holmes, D. S., Webster, S. P. a Fallowfield, J. A. In search of a small molecule agonist of the relaxin receptor RXFP1 for the treatment of liver fibrosis. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
194. Hu, X., Myhr, C., Huang, Z., Xiao, J., Barnaeva, E., Ho, B. A., Agoulnik, I. U., Ferrer, M., Marugan, J. J., Southall, N. a Agoulnik, A. I. Structural Insights into the Activation of Human Relaxin Family Peptide Receptor 1 by Small-Molecule Agonists. *Biochemistry* **55**, 1772–1783 (2016).
195. Liu, C., Chen, J., Kuei, C., Sutton, S., Nepomuceno, D., Bonaventure, P. a Lovenberg, T. W. Relaxin-3/insulin-like peptide 5 chimeric peptide, a selective ligand for G protein-coupled receptor (GPCR)135 and GPCR142 over leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 7. *Mol. Pharmacol.* **67**, 231–240 (2005).
196. Wei, Di., Hu, M. J., Shao, X. X., Wang, J. H., Nie, W. H., Liu, Y. L., Xu, Z. G. a Guo, Z. Y. Development of a selective agonist for relaxin family peptide receptor. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
197. Shabanpoor, F., Akhter Hossain, M., Ryan, P. J., Belgi, A., Layfield, S., Kocan, M., Zhang, S., Samuel, C. S., Gundlach, A. L., Bathgate, R. A. D., Separovic, F. a Wade, J. D. Minimization of human relaxin-3 leading to high-affinity analogues with increased selectivity for relaxin-family peptide 3 receptor (RXFP3) over RXFP1. *J. Med. Chem.* **55**, 1671–1681 (2012).
198. Haugaard-Kedström, L. M., Shabanpoor, F., Hossain, M. A., Clark, R. J., Ryan, P. J., Craik, D. J., Gundlach, A. L., Wade, J. D., Bathgate, R. A. D. a Rosengren, K. J. Design, synthesis, and characterization of a single-chain peptide antagonist for the relaxin-3 receptor RXFP3. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4965–4974 (2011).
199. Hojo, K., Hossain, M. A., Tailhades, J., Shabanpoor, F., Wong, L. L. L., Ong-Pålsson, E. E. K., Kastman, H. E., Ma, S., Gundlach, A. L., Rosengren, K. J., Wade, J. D. a Bathgate, R. A. D. Development of a single-chain peptide agonist of the relaxin-3 receptor using hydrocarbon stapling. *J. Med. Chem.* **59**, 7445–7456 (2016).
200. Lee, H. S., Wang, S. H., Daniel, J. T., Hossain, M. A., Clark, R. J., Bathgate, R. A. D. a Rosengren, K. J. Exploring the use of helicogenic amino acids for optimising single chain relaxin-3 peptide agonists. *Biomedicines* **8**, 1–16 (2020).

201. Shabanpoor, F., Bathgate, R. A. D., Hossain, M. A., Giannakis, E., Wade, J. D. a Hughes, R. A. Design, synthesis and pharmacological evaluation of cyclic mimetics of the insulin-like peptide 3 (INSL3) B-chain. *J. Pept. Sci.* **13**, 113–120 (2007).
202. Patil, N. A., Hughes, R. A., Rosengren, K. J., Kocan, M., Ang, S. Y., Tailhades, J., Separovic, F., Summers, R. J., Grosse, J., Wade, J. D., Bathgate, R. A. D. a Hossain, M. A. Engineering of a Novel Simplified Human Insulin-Like Peptide 5 Agonist. *J. Med. Chem.* **59**, 2118–2125 (2016).
203. Belgi, A., Bathgate, R. A. D., Kocan, M., Patil, N., Zhang, S., Tregear, G. W., Wade, J. D. a Hossain, M. A. Minimum active structure of insulin-like peptide 5. *J. Med. Chem.* **56**, 9509–9516 (2013).
204. Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides: Recommendations 1983. *Eur. J. Biochem.* **138**, 9–37 (1984).