

Foldamer-based antibody mimetics for recognition of undruggable targets

OTKA-K-83882, Dr. Martinek Tamás

Zárójelentés

A projekt átfogó célkitűzése volt, hogy az antitestek protein felszín-felismerő tulajdonságát foldamer-alapú molekulákkal utánozzuk, és ennek a megközelítésnek az alapelveit és módszertanát megalapozzuk. A munka három fő területre fókuszált: (i) biomimetikus foldamer hélixek tervezése és szintézise, (ii) protein felszín felismerése foldamer-hélixköteggel, (iii) foldamer β -redők tervezése és szintézise.

1. Biomimetikus foldamer hélixek tervezése és szintézise

Proteinek felismeréséhez kapcsolódóan új biomimetikus hélixeket terveztünk és jellemeztünk kísérletesen. Az általunk felismert sztereokémiai mintázatok módszerével két új hélix típust hoztunk létre: $\alpha\beta$ -H16/18 és az $\alpha\alpha\beta\beta$ -H9/12/9/10 hélixek. Ezek felszínén a proteinogén oldalláncok nagy sűrűségben és kézenfekvő módon prezentálhatók úgy, hogy a foldamerek természetes peptidekkel szembeni előnyeiket megtartjuk. Ezt az eredményt „magas impaktú folyóiratban közzétettük (Berlicki, L.; Pilsl, L.; Weber, E.; Mandity, I. M.; Cabrele, C.; Martinek, T. A.;* Fulop, F.; Reiser, O.* Unique α,β - and $\alpha,\alpha,\beta,\beta$ -peptide foldamers based on cis- β -aminocyclopentanecarboxylic acid *Angewandte Chemie-International Edition* 2012, **51**, 2208-2212). Tovább vittük az oldalláncok sztérikus taszításával való hélix-tervezés módszerét is. Így sikeresen állítottuk elő a β -H18 hélixet, ami a közlés pillanatában a legnagyobb átmérőjű alifás foldamer hélix. Ez a szerkezet a Royal Chemical Society Foldamerekkel foglalkozó tematikus kiadványában jelent meg (Szolnoki, E.; Hetenyi, A.; Martinek, T.* A.; Szakonyi, Z.; Fulop, F. Self-association-driven transition of the beta-peptidic H12 helix to the H18 helix *Organic & Biomolecular Chemistry* 2012, **10**, 255-259. A cikk grafikája a füzet címlapjára került.

Míg a foldamerek másodlagos szerkezetei alaposan tanulmányozottak, a magasabb rendű önszerveződésük kevésbé vizsgált terület. Foldamer hélixek esetén több nagyatmérőljű hélix ismert amelyek elméletileg képesek lehetnek axiális kapcsolódással önrendeződni. Ezt a jelenséget az előző munkaszakaszban leírtuk a β -H18 hélixszel kapcsolatosan. Ebben az időszakban felfedeztünk egy újabb nagy átmérőljű β -peptid hélixet, amely alternáló sztereokémiával valósítottunk meg. Leírtuk a β -H18/20 hélix lánchossz- és oldószerfüggő képződését, valamint a hélixek axiális (fej-láb) önrendeződését. Ez a hélix típus jelenleg a

legnagyobb átmérőjű peptidomimetikus foldamer hélix a szakirodalomban. Az eredmények Eur. J. Org. Chem. 2013-as foldamerekkel foglalkozó tematikus füzetben jelentek meg (Szolnoki E, Hetényi A, Mándity IM, Fülöp F, Martinek TA*, Foldameric β -H18/20P mixed helix stabilized by head-to-tail contacts: a way to higher-order structures" *Eur. J. Org. Chem.* 2013, **17**, 3555-3559). A peptid foldamerek területén 2006 óta született legfontosabb eredményeket egy kritikai összefoglaló közleményben tekintettük át (Martinek, T. A.; Fulop, F. *Chemical Society Reviews* 2012, **41**, 687-702).

2. Protein felszín felismerése foldamer-hélixköteggel

Rövid foldamer szekvenciákat terveztünk és szintetizáltunk, amelyek képesek lehetnek a toxikus A β oligomerek felszínének felismerésére. A kiindulási koncepció azt követte, hogy az A β 1-42 KLVFFAED β -redős szakasza a szakirodalom szerint valószínűen a hidrofílebb oldalával oldószernek kitett. Ezért olyan β - és α,β -peptid foldamer hélixeket szintetizáltunk, melyek közepén hidrofób oldalláncokat tartalmaznak és egy oldalra képesek ionizálható oldalláncokat irányítani zwitterionos elrendezésben. STD NMR spektroszkópiával teszteltük a vegyületeket, és néhány esetben felismertük a kötődést, egy vegyületnél pedig különösen intenzív jeleket kaptunk. A kezdeti szerkezet-affinitás összefüggés elemzés kimutatta, hogy a kölcsönhatáshoz a legjobb geometria a H14 hélix. Az ikerionos oldalláncok szerinekkel való helyettesítése, illetve relatív helyzetük megváltoztatása megszüntette a kötődést. Kidolgoztuk a foldamerek dendrimer templáthoz való ligálását és ITC, ELISA, Dot Bot és NMR segítségével kimutattuk, hogy a multivalencia jelentősen javítja a ligandumok affinitását. Megvizsgáltuk, hogy az anyagok képesek-e kivédeni az A β oligomerek memóriarögzülést (LTP) gátló hatását. Kooperációban *ex vivo* egér agyszeleten végzett mátrix elektrofiziológiai kísérletekkel mutattuk ki, hogy a tetraavalens foldamer ligandumunk kivédi az A β oligomerek LTP gátló hatását szubmikromoláris koncentrációban. A védőhatás A β -függő módon jelentkezett, az anyagok önmagukban nem okoztak LTP növekedést. A divalens ligandum nem mutatott biológiai hatást ebben a kísérletben. Ezeket az eredményeket a ligandum tervezésével és a ligandum-A β kölcsönhatás biofizikai/biokémiai jellemzésével együtt közöltük (Fülöp L, Mándity IM, Juhász G, Szegedi V, Hetényi A, Wéber E, Bozsó Z, Simon D, Benkő M, Király Z, Martinek TA*, A Foldamer-Dendrimer Conjugate Neutralizes Synaptotoxic β -Amyloid Oligomers *PLOS ONE* 2012, **7**, e39485). Meghívott előadásban két konferencián mutattuk be eredményeinket:

Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Olaszország, Catania, 2011. június 29 – július 2.

Tamás A. Martinek: *Foldamers neutralizing synaptotoxic β -amyloid oligomers, KL9, meghívott keynote előadás*

COST Action CM0803 Workshop "Foldamers: From Synthesis and Folding, to Function"
Leeds University, UK, September 7-9th 2011
Tamás A. Martinek: *Foldamers neutralizing synaptotoxic β -amyloid oligomers, meghívott keynote előadás*

Tekintettel arra, hogy az A β oligomerek biomarkerként való kimutatása nagy érdeklődésre tart számot, az egyik foldamer-származékot továbbfejlesztettük, hogy képes legyen egy szendvics ELISA-típusú kísérleti elrendezésben szubnanomoláris koncentrációban detektálni az A β oligomereket. Optimalizáltuk a felületre kötés geometriáját, a templátot, a detektáló szekvencia specifikus A β antitestet, és a vizualizációs módszert. Az így kapott kísérleti eredményekre alapozva pályázatot nyújtottunk be a „Richter Témapályázat 2013” kiírásra és a „Foldamer-based diagnostic assay to detect toxic A β oligomers in human body fluids” című projektjavaslatunk támogatást nyert a 2013. szept. – 2016 szept. időszakra. A támogató által kikötött szellemi tulajdonjogok miatt a foldamer-konjugátumokkal kapcsolatos eredményeket csak a hasznosíthatósági vizsgálatok és esetleges szabadalmaztatás után közölhetjük.

Ebben a részfeladatban a Galektin-1 fehérjére tervezett foldamer hélix ligandum sajnos nem bizonyult sikeres megközelítésnek. Mind a kötődés kimutatására tervezett kísérletekben, mind pedig a Gal-1 gátlására irányuló biológiai tesztekben aspecifikus, Gal-1-független is kölcsönhatásokat mutatott. A munkatervtől eltérve ezt a részfeladatot felfüggesztettük. Párhuzamos részfeladatban a Gal-1 egyik ismert ligandumját, az anti-angiogenikus hatású 33-mer peptidet használtuk kiindulópontként (ld 3. pont).

3. Foldamer β -redők tervezése és szintézise.

A foldamer szendvics mimetikumok kialakítására a fentről-lefelé (top-down) tervezési módszert alkalmaztuk. Ilyenkor ismert szerkezetű α -peptid szekvencia szolgál mintául, amelyben β -aminosav helyettesítésekkel vizsgáljuk a szerkezet megtarthatóságát. Kiindulópontként a 33-mer peptid anginex-et választottuk, ami megfelelő körülmények között hármasszálú β -redőt alakít ki. Ez a szekvencia anti-angiogenikus hatású és erős kötődést mutat a Gal-1-hez. Az anginex β -redős magjában szisztematikus nyíltláncú β^3 -aminosavhelyettesítéseket végeztünk és megvizsgáltuk, ez milyen hatással van a harmadlagos szerkezetre, a Gal-1-gyel való kölcsönhatásra és a bioaktivitásra. Megállapítottuk, hogy a helyettesítések csökkentették ugyan a β -szendvics stabilitását, de a harmadlagos szerkezet képzési hajlam megmaradt. A helyettesítési mintázatok hatásának elemzésével valószínűsíthető, hogy ez a hatás az oldalláncok szoros hidrofób illeszkedésének megbontása miatt jelenkezik. Ez a trend ellentétes a hélixeknél tapasztalt, a β^3 -aminosavhelyettesítés esetén jelenkező extra stabilizáló hatással. A harmadlagos szerkezettel összhangban ezek az anyagok nagyságrendileg hasonló gátlást

okoztak az endotél sejtek szaporodásában. Az eredményeket az egyik legrangosabb kémiai szaklapban közzétük (Hegedus Z, Weber E, Kriston-Pal E, Makra I, Czibula A, Monostori E, Martinek TA Foldameric alpha/beta-Peptide Analogs of the beta-Sheet-Forming Antiangiogenic Anginex: Structure and Bioactivity. *Journal of the American Chemical Society* 2013, **135**, 16578-16584).

4. Közlemények

A projekt eredményeiből 6 bírált közlemény jelent meg nemzetközileg elismert folyóiratokban, amelyek kumulatív impakt faktora 59.945.

1. Szolnoki E, Hetényi A, Mándity IM, Fülöp F, Martinek TA
Foldameric β -H18/20P mixed helix stabilized by head-to-tail contacts: A way to higher-order structures
EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY (17) pp. 3555-3559. (2013)
2. Hegedus Z, Weber E, Kriston-Pal E, Makra I, Czibula A, Monostori E, Martinek TA
Foldameric alpha/beta-Peptide Analogs of the beta-Sheet-Forming Antiangiogenic Anginex: Structure and Bioactivity.
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 135:(44) pp. 16578-16584. (2013)
3. Szolnoki E, Hetenyi A, Martinek TA, Szakonyi Z, Fulop F
Self-association-driven transition of the beta-peptidic H12 helix to the H18 helix
ORGANIC AND BIOMOLECULAR CHEMISTRY 10:(2) pp. 255-259. (2012)
4. Martinek TA, Fulop F
Peptidic foldamers: ramping up diversity
CHEMICAL SOCIETY REVIEWS 41:(2) pp. 687-702. (2012)
5. Fülöp L, Mándity IM, Juhász G, Szegedi V, Hetényi A, Wéber E, Bozsó Z, Simon D, Benkő M, Király Z, Martinek TA
A Foldamer-Dendrimer Conjugate Neutralizes Synaptotoxic β -Amyloid Oligomers
PLOS ONE 7:(7) p. e39485. 17 p. (2012)
6. Berlicki Ł, Pilsł L, Wéber E, Mándity I M, Cabrele C, Martinek T A, Fülöp F, Reiser O
Unique α , β - and α , α , β , β -peptide foldamers based on cis- β -aminocyclopentanecarboxylic acid
ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION 51:(9) pp. 2208-2212. (2012)