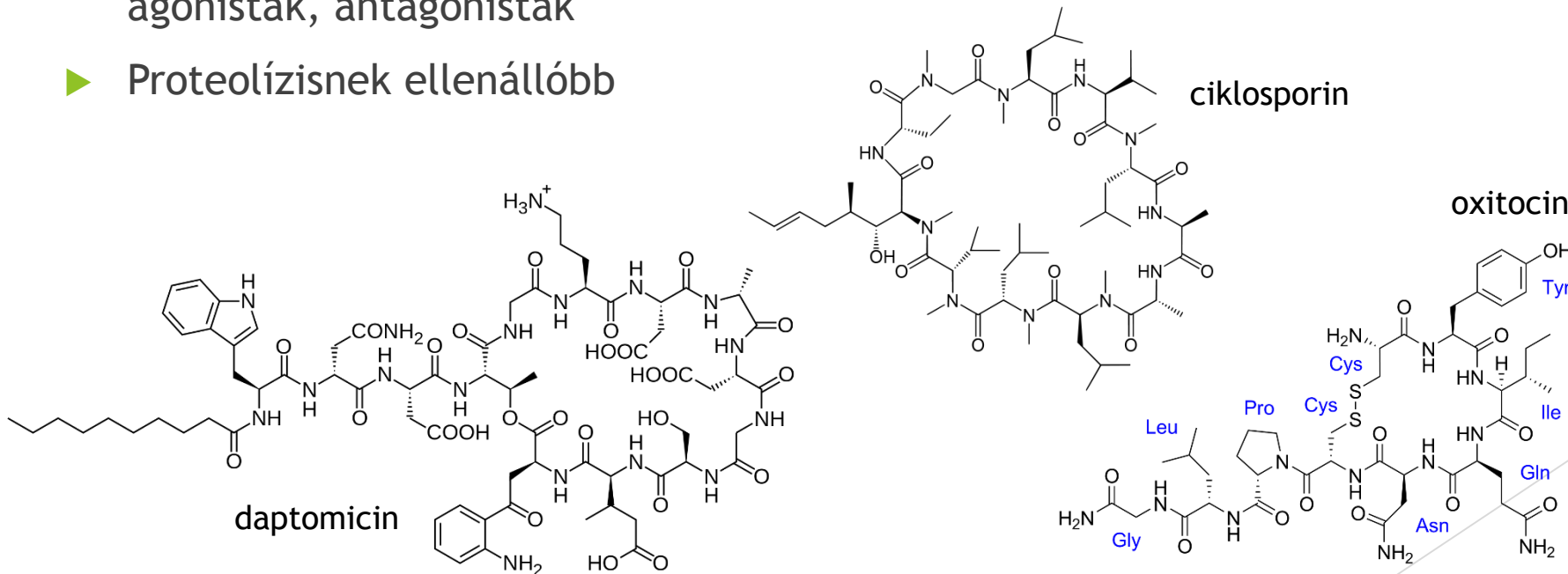


Iminoboronate-Based Peptide Cyclization That Responds to pH, Oxidation, and Small Molecule Modulators

Anupam Bandyopadhyay and Jianmin Gao

Ciklikus peptidek - a természetben

- ▶ Konformációs entrópia csökken → merevebb szerkezet
- ▶ Funkciós csoportok jobban orientáltak → specifikus kötődés célmolekulához
- ▶ Nagy számban megtalálhatók a természetben: pl. hormonok, receptor agonisták, antagonisták
- ▶ Proteolízisnek ellenállóbb

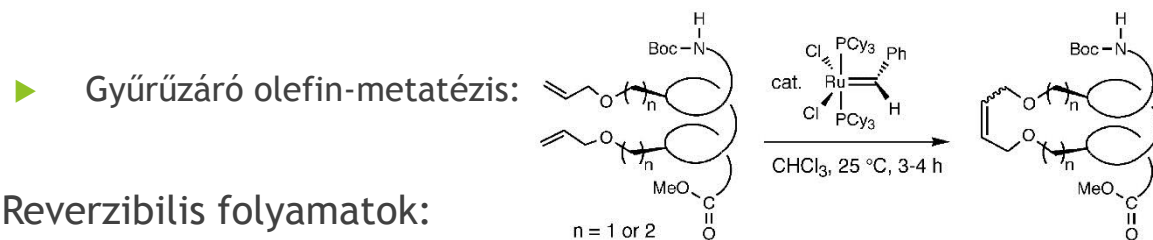
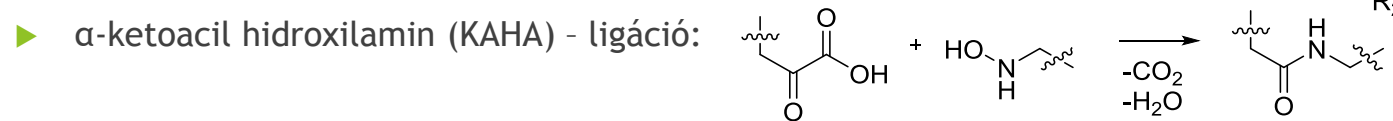
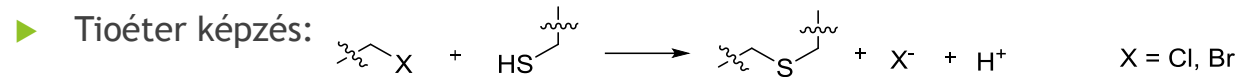


Ciklikus peptidek felhasználása

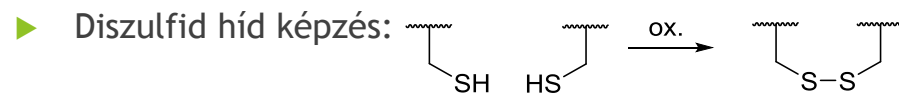
- ▶ Jelzővegyületek
- ▶ Epitóp-analógok
- ▶ Gyógyszerek:
 - ▶ Pl. antibiotikus hatás, rákellenes szerek, immunszuppresszánsok
 - ▶ Előnyök: lassabban emésztődnek → szájon át bevehető némelyik, nem akkumulálódik, kevésbé mérgező, specifikusabb
 - ▶ Hátrány: sejtekbe nehezebben jutnak be

Ciklikus peptidek - mesterséges előállítás

▶ Irreverzibilis folyamatok:



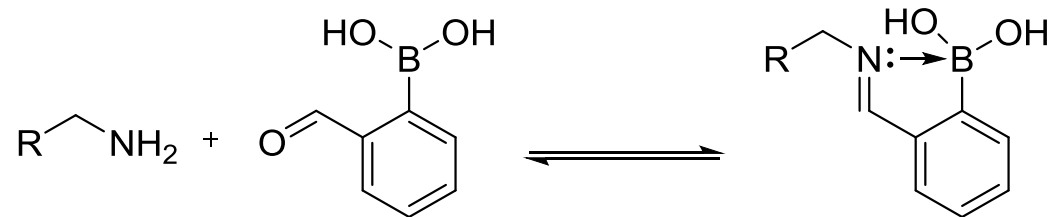
▶ Reverzibilis folyamatok:



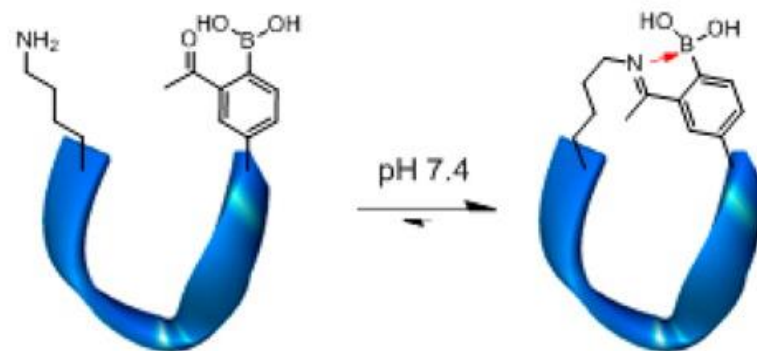
▶ Iminoboronát képzés

Iminoboronát képződése

- ▶ Iminoboronát: imin nitrogén datív kötést alakít ki a szomszédos boronsav bór atomjával → termodinamikailag stabil
- ▶ Intermolekuláris reakció:
 - ▶ Reverzibilis fiziológias körülmények között
 - ▶ $K_d \sim 10^{-3}$ (egyensúly az iminoboronát képződése felé tolva)

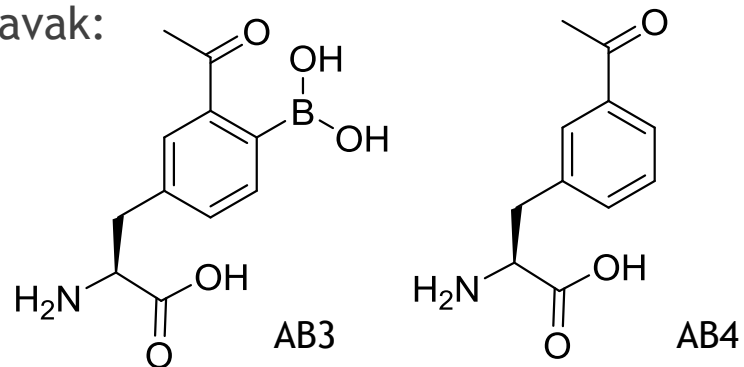


- ▶ Intramolekuláris reakció:
 - ▶ Spontán, gyors



Modellpeptidek

- ▶ A kísérletekhez használt mesterséges aminosavak:

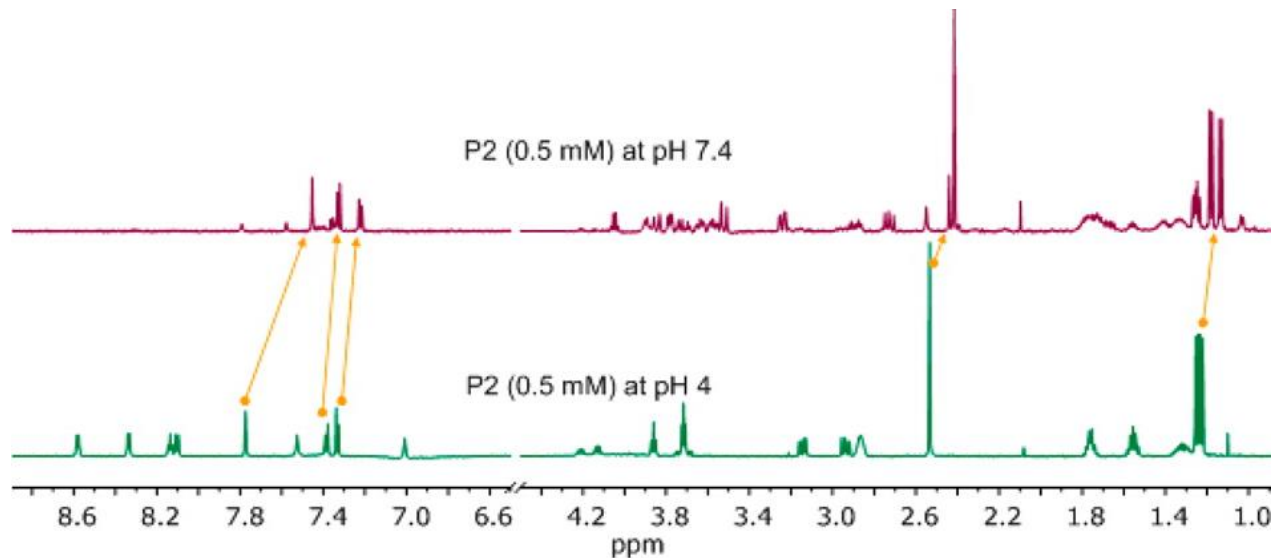
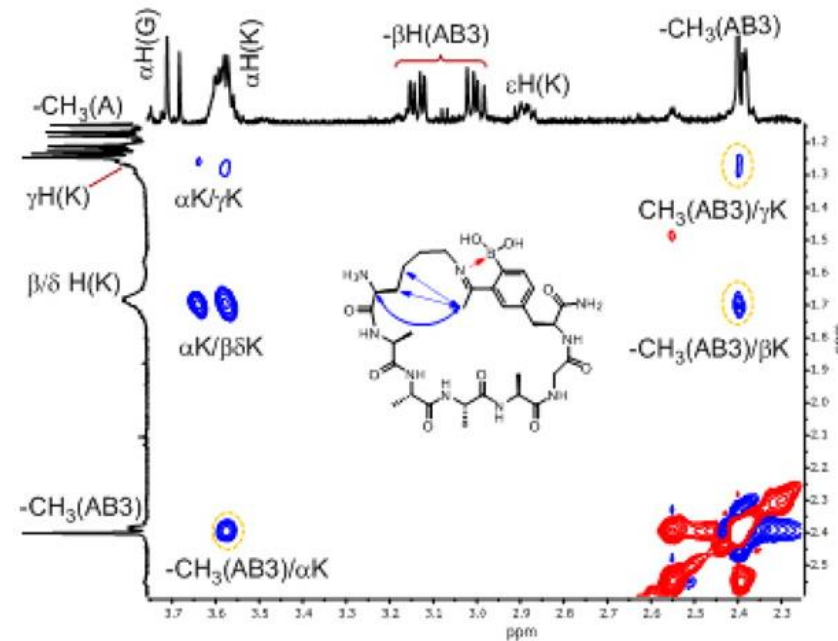


- ▶ Ha a Lys és az AB3 között:
 - ▶ 2-5 apoláris aminosav: ciklizáció jó termeléssel
 - ▶ 3-4 poláris aminosav: ciklizáció jó termeléssel
 - ▶ 9 aminosav: ciklizáció termelése romlik
 - ▶ 1 aminosav: nincs ciklizáció
- ▶ Kontrollpeptid: AB3 helyett AB4 → nincs ciklizáció

Peptides		Cyclization
KAG(AB3)	P1	85 %
KAAG(AB3)	P2	86 %
KAAAG(AB3)	P3	86 %
KAAAAG(AB3)	P4	85 %
(AB3)AAAAGK	P5	85 %
KAAAADAAADG (AB3)	P6	53 %
KTNHS(AB3)	P7	86 %
CKRGD(AB3)	P8	86 %
C(AB3)RGDfK	P9	85 %
KG(AB3)AAA	P10	0 %
KAAAAG(AB4)	P11	0 %

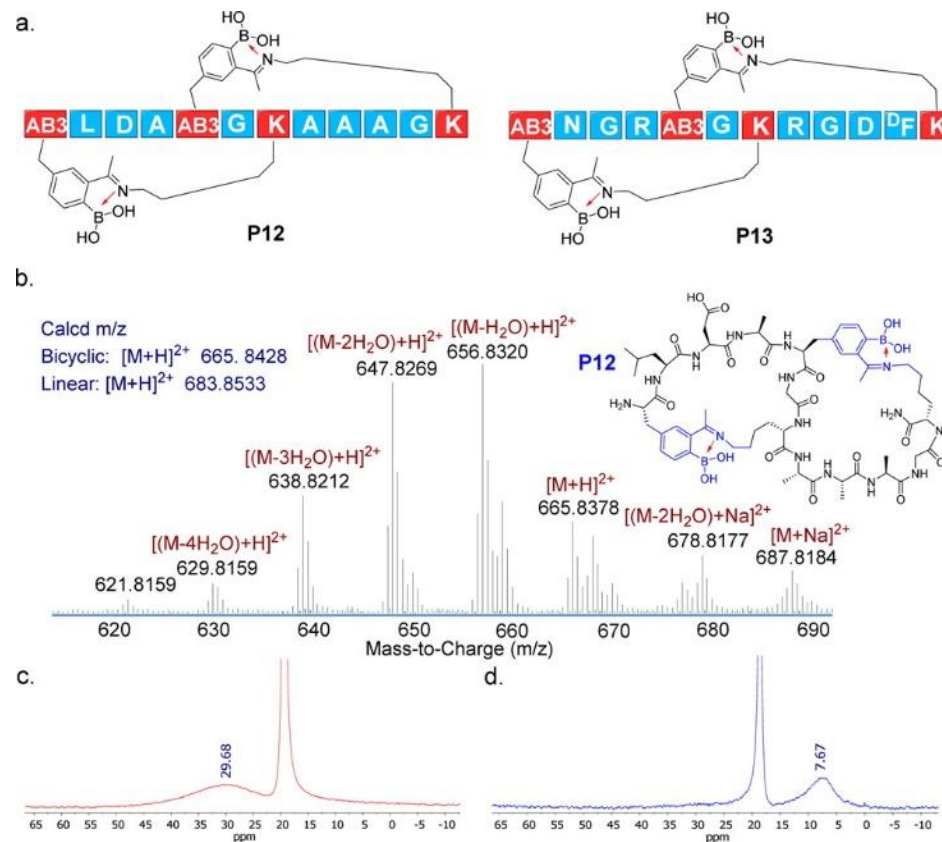
A ciklizáció követése

- ▶ Tömegspektrometria
- ▶ ^1H -NMR:
 - ▶ Acetilcsoport metil-protonjainak jele eltolódik, és 2 szingulett lesz ciklizációval
 - ▶ Aromás jelek közelebb egymáshoz ciklikus peptid esetén
 - ▶ ROESY: Ac-CH₃ és Lys α / β -protonjainak keresztcsúcsa



Biciklusos peptidek

- ▶ Két AB3-Lys pár
- ▶ Egyik AB3-t és egyik Lys-t egymástól 1 aminosav választja el → csak egyféle regioizomer keletkezik
- ▶ Vizsgálat:
 - ▶ Tömegspektrometria
 - ▶ ^{11}B -NMR: bór az iminoboronátban parciálisan negatív töltésű → kisebb kémiai eltolódás

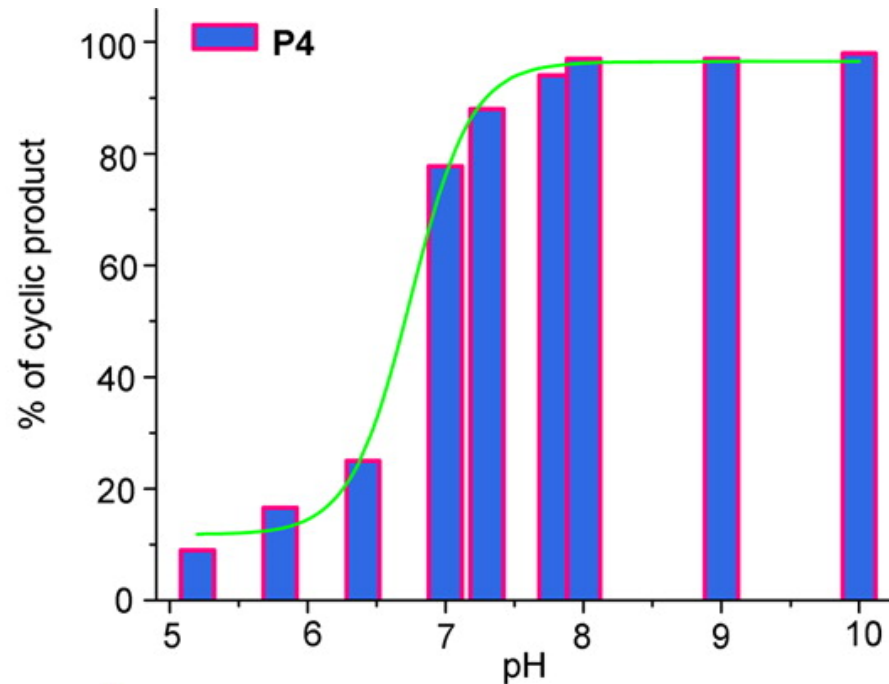


Az iminoboronát stabilitása

- ▶ Fiziológiás körülmények között stabil
- ▶ Kis természetes molekulák (lizin, glükóz, glutation) nem befolyásolják a ciklikus peptidet
- ▶ Modellfehérjék, vészérum nincsenek hatással a ciklizációra
- ▶ Stabilitás oka: iminoboronát képződése termodinamikailag kedvező folyamat

Ciklizáció befolyásolása pH-val

- ▶ Magasabb pH-n az egyensúly az iminoboronát képződése felé van tolva
↔ alacsonyabb pH-n a lineáris forma van jelen nagyobb arányban
- ▶ Titrálási görbe ($^1\text{H-NMR}$):
 - ▶ Sigmoid alak
 - ▶ Inflexiós pont: $\text{pH} = 6,8$
- ▶ Rákdiagnosztikai felhasználás alapja: rákos sejtek citoplazmája a gyorsabb metabolizmus miatt savasabb → ciklizáció visszaszorul



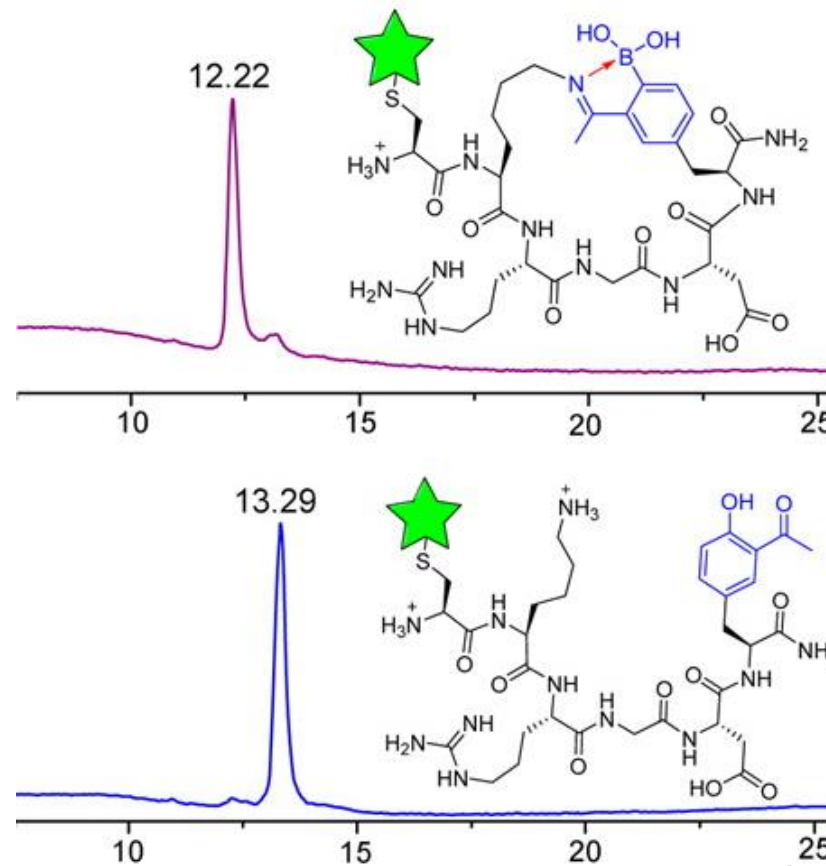
Ciklizáció befolyásolása oxidációval

▶ Boronsav oxidációjára alkalmas:

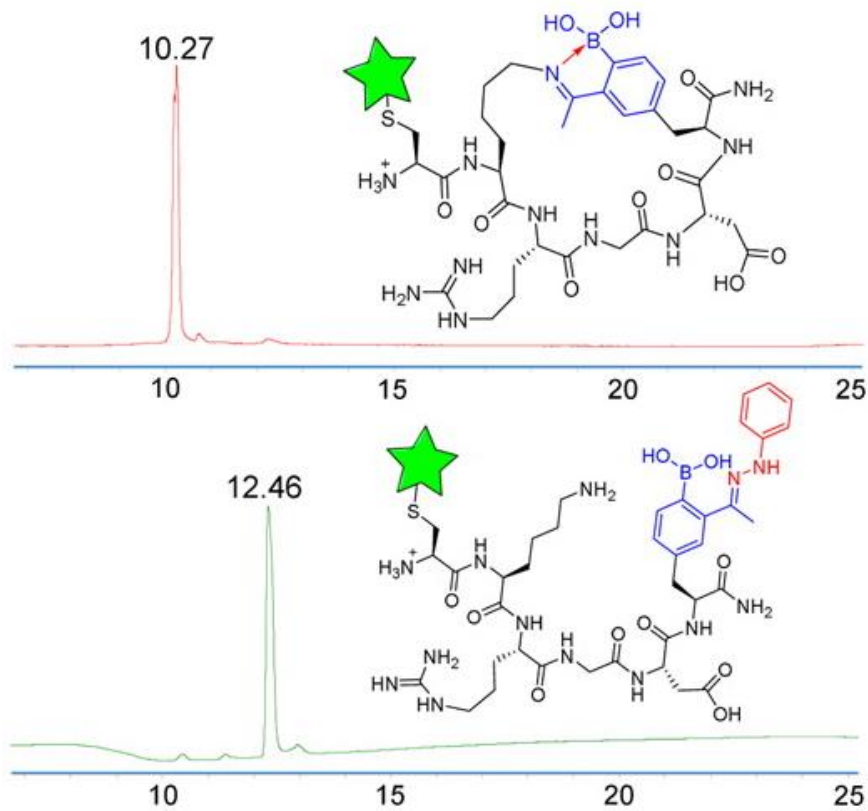
- ▶ $\text{O}=\text{NOO}^-$
- ▶ O_2
- ▶ H_2O_2

▶ Modellpeptid: AF488-P8

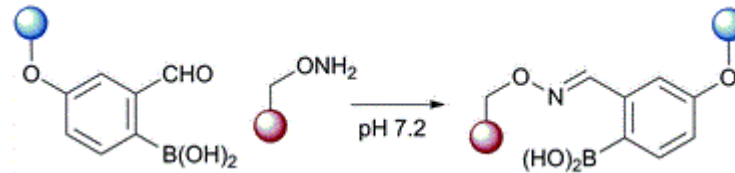
- ▶ AF488: 488 nm-en gerjeszhető, zölden fluoreszkáló fluorofór
- ▶ Hidrogén-peroxiddal nem oxidálható 24 óra alatt sem
- ▶ Peroxinitrit 10 perc alatt fenollá oxidálja a fenilboronsavat (követés: LC-MS)



α -nukleofilek hatása a ciklikus peptidre



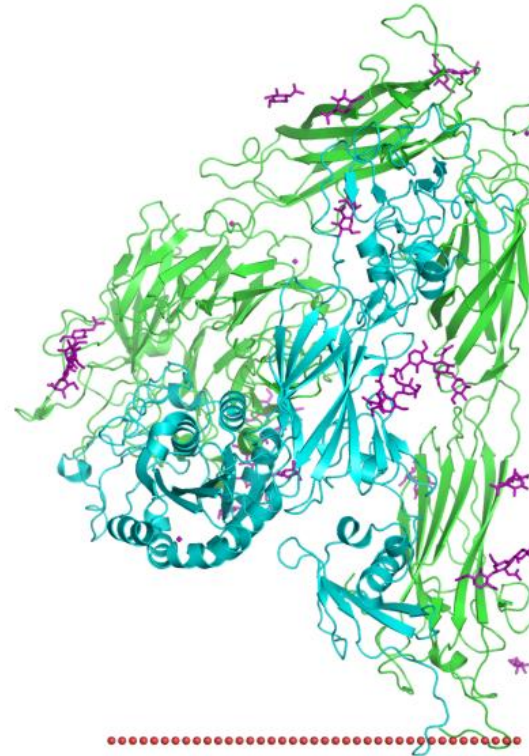
- ▶ α -nukleofil: a nukleofil szomszédságában nemkötő elektronpár található \rightarrow nukleofilicitás nő (pl. hidrazin, hidroxilamin)
- ▶ 2-acetilfenilboronsavval reagálnak α -nukleofilek: oxim, hidrazon keletkezik



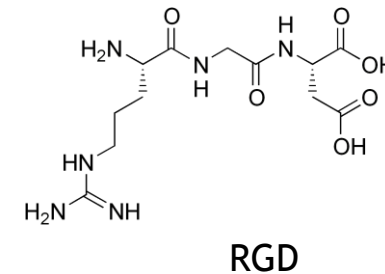
- ▶ Fenilhidrazinnal az AF488-P7 peptid 10 perc alatt teljesen linearizálódott (LC-MS-sel követve)

Sejtjelölés

- ▶ Jelölt sejtek: SKOV3 ($\alpha\beta3$ integrint túltermel)
- ▶ Jelöléshez használt peptid: AF488-P9
→ RGDf részletet tartalmaz (sejtfelismerésben fontos): hatékonyan és szelektíven köt $\alpha\beta3$ integrinhez, ha ciklikus vázban stabilizálva van
- ▶ P9 peptid semleges pH-n 85 %-ban ciklikus formában, pH = 4-en csak lineáris formában fordul elő
- ▶ Ciklizáció pH-val és kismolekulákkal is kontrollálható
- ▶ Kontrollpeptid: AF488-P14 (ciklo-(RGDfC))

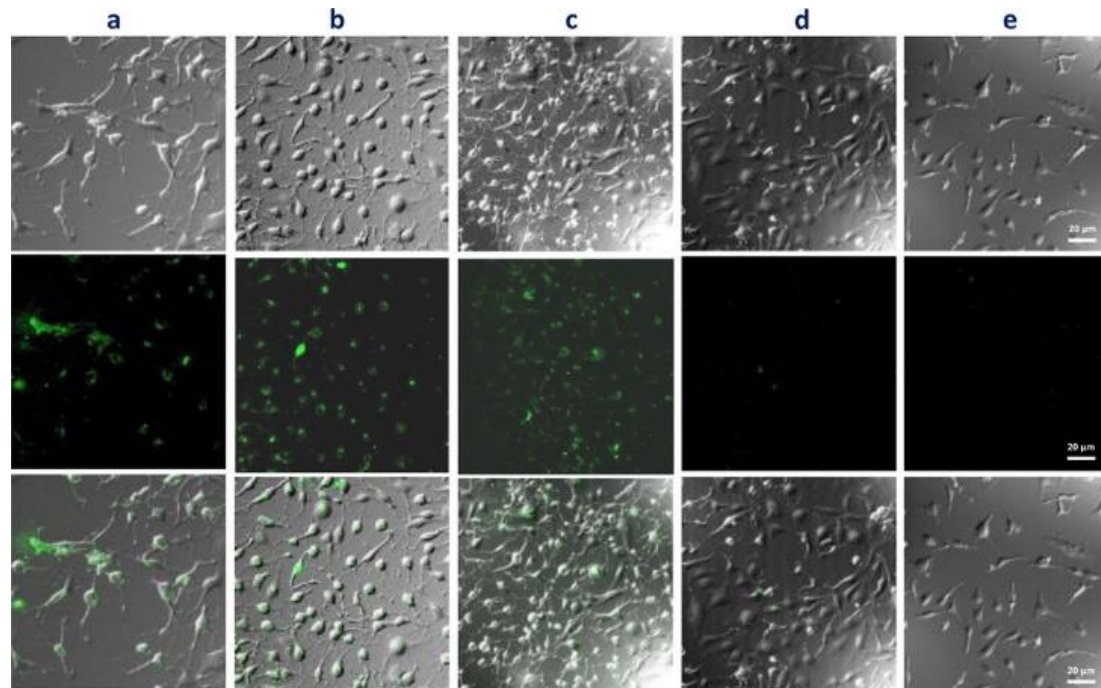


$\alpha\beta3$ integrin

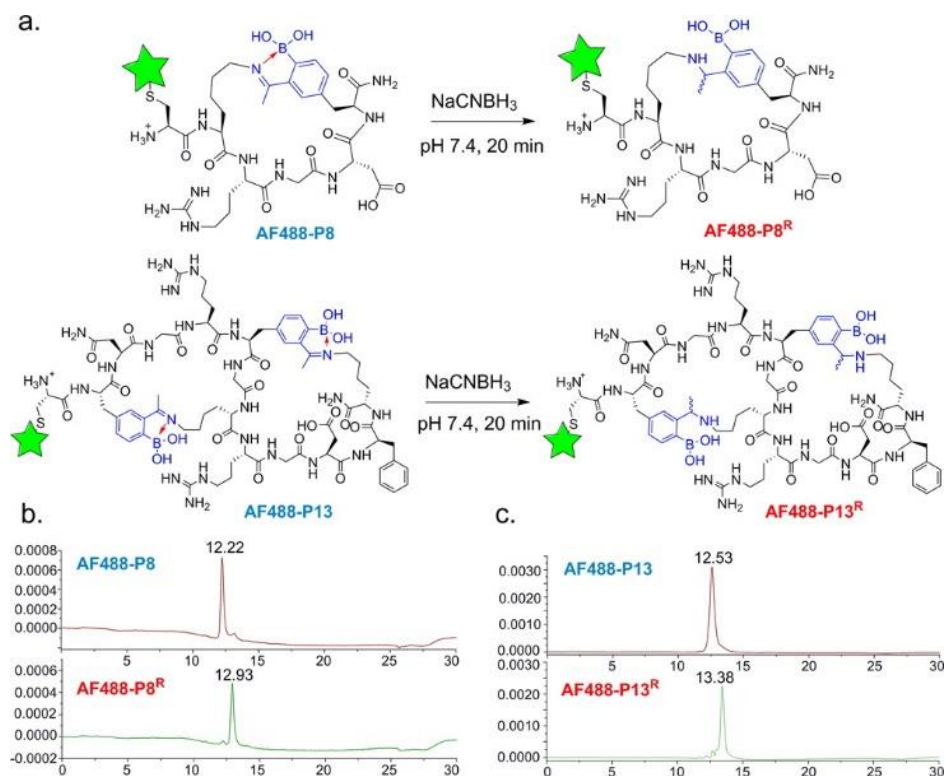


Sejtjelölés II

- ▶ pH = 7,4-en: vizsgált P9 peptid és kontrollpeptid esetén a sejtek fluoreszcenciája közel azonos erősségű (a, b) → iminoboronát-ciklizált peptid erősen köt integrinhez
- ▶ pH = 6,0-n a P9 peptid alig festi meg a sejteket (d), ellentétben a kontrollpeptiddel (c) → főleg lineáris formában van jelen P9
- ▶ Hozzáadott fenilhidrazin hatására szintén nincs fluoreszcens jel P9 esetén (e)



Iminoboronát redukciója - ciklikus szerkezet állandósítása



- ▶ AF488-P8-at nátrium-cianoborohidriddel (NaCNBH₃) kezelték → 20 perc alatt >95 % redukálódott
- ▶ követés: LC-MS; ¹H-NMR: Ac-CH₃ drasztikusan eltolódik, megkettőződött protonjelek (két konformációs izomer létezik)
- ▶ Biciklusos peptidek esetében mindkét iminoboronát részlet redukálódik

Összefoglalás

- ▶ Iminoboronát kémia hatékonyan felhasználható peptidciklizációra
- ▶ Sikeresen előállítottak egy boronsav részt tartalmazó nemtermészetes aminosavat, ami peptidbe építve lizinnel reakcióba lép és ciklikus, illetve biciklusos terméket eredményez
- ▶ Fiziológiás pH-n az iminoboronát kiemelkedően stabil a gyakori biomolekulákkal szemben
- ▶ Ugyanakkor a pH változtatásával, oxidációval és exogén kismolekulákkal a ciklizáció jól befolyásolható
- ▶ A módszer a sokoldalú befolyásolhatóságának köszönhetően várhatóan alkalmazásokra talál a biotechnológiában

Köszönöm a figyelmet!