

Gyógyszerrel konjugált peptidok adatbázisa és sejtmembrán-penetráló peptidok molekuladinamikai szimulációi

Doktori értekezés

Dr. Ivánczi Márton

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Gyógyszertudományok tagozat



Témavezető: Dr. Mándity István egyetemi docens

Konzulens: Dr. Balogh Balázs egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Mirzahosseini Arash

Dr. Hetényi Csaba

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Zelkó Romána egyetemi tanár

Tagok: Dr. Mucsi Zoltán

Dr. Gáspári Zoltán

Budapest
2024

1. Bevezetés

A sejtmembrán penetráló peptidek (cell-penetrating peptides, CPP) oligopeptidek és rövid polipeptidek, amelyek képesek behatolni a sejtekbe, akár sejszervecskébe is a membrán végzetes károsítása nélkül, ezáltal alkalmasak gyógyszerek célba juttatására. Az elsőként azonosított CPP a HIV-Tat, a következő pedig a penetratin. Kutatásuk az elmúlt húsz évben fölfutott, 2012-ben publikálták az első CPP adatbázist, majd 2016-ban a továbbfejlesztett változatát.

Legtöbbjük nyílt főláncú, de ciklusos peptidek is előfordulnak. Eredetük természetes vagy szintetikus is lehet. Többségük természetes aminosavakból épül föl, de más konfigurációjú és konstitúciójú monomerek is előfordulhatnak.

Általában (akár egyszerre) amfifil karakterűek vagy kationosak, a pozitív töltésű és az aromás aminosavaknak a penetráció legtöbb lehetséges mechanizmusában szerepe van.

Mechanizmusuk nem tisztázott teljes mértékben, sok az egyedi eltérés, a körülményektől is függ. Történhet a sejt aktív közreműködésével vagy anélkül is. Aktív mechanizmusként lehetséges az endocitózis minden gyakoribb típusa. Passzív mechanizmus a direkt transzlokáció, a membrán vékonyodás, a pórusképződés, az inverz micella és a szőnyegmodell.

Vizsgálataink tárgyát három lineáris CPP: penetratin, 6,14-Phe-penetratin, dodeka-penetratin; és három ciklusos CPP: Kalata B1, SFTI-1, MCo-TI-II.

A penetratin az *ecetmuslica antennapedia* homeoproteinjének egy 16 aminosavból álló szakasza, a 6,14-Phe-penetratin és a dodeka-penetratin ennek felszintetikus analógjai. konformációjuk helikális, fizikokémiai tulajdonságaikat bázikus és aromás aminosavak határozzák meg.

A vizsgált három ciklusos CPP növényi eredetű. Többségében hidrofób aminosavakból állnak, fajlagos töltésük alacsony. Konformációjukat a makrociklust hurkokra osztó diszulfidhidak rendkívül merevvé teszik.

Gyógyszermolekulák peptidekhez való kapcsolása számos farmakokinetikai jellemzőn javíthat. A szimulációink tárgyát képző három hatóanyag: doxorubicin, razagilin, zidovudin konjugátumát is előállították és vizsgálták már. Különösen alkalmasak konjugált hatóanyagok szállítására a CPP-k, ha a célpont eléréséhez be kell hatolni a sejtekbe vagy keresztül kell rajtuk haladni. Kis molekulákat mindig kovalens kötással kapcsolnak a peptidekhez.

A molekuladinamika (MD) a molekuláris folyamatok időbeli lefolyásának modellezése molekulamechanikai eszközökkel, tehát

klasszikus fizikát alkalmazva molekuláris szinten. Az egyik gyakran használt erőtermodell az OPLS, mely egyaránt alkalmas paraméterekkel rendelkező kis szerves molekulák és biopolimerek modellezésére. A vizsgált egységet explicit (molekulánként fölépített) vagy implicit (csak fizikai tulajdonságokkal jellemzett) oldószermodell veszi körül. Több speciális MD módszert is kifejlesztettek, a legfontosabbak a metadinamika, az umbrella sampling, a replica exchange és a durva szemcsés (coarse-grained) modellezés.

Számos referenciát publikáltak CPP-k MD modellezésére, de különböző szerkezetű peptidek gyógyszermolekulákkal képzett konjugátumait még nem hasonlították össze.

2. Célkitűzések

A ConjuPepDB projektjét azért kezdtük el, mert korábban nem állt rendelkezésre átfogó adatbázis peptidek konjugátumairól. Azokat a szakirodalomban közzétett szerkezeteket gyűjtöttük össze, melyek egy peptidből és egy hozzá kovalensen kapcsolódó kisebb szerves molekulából állnak.

Mivel különböző szerkezetű peptidek gyógyszermolekulákkal képzett konjugátumainak MD modellezéssel való összehasonlítására nem találtunk példát, ezért kiválasztottunk három hatóanyagot, mely szerepel (nem feltétlenül CPP-vel) a ConjuPepDB-ben: doxorubicin, razagilin és zidovudin. Mindhárom gyógyszer membránokon kell áthatoljon a hatás kifejtéséhez, szerkezetük és hatásuk azonban teljesen különböző.

MD szimulációkat futtattunk, hogy meghatározzuk, mi a hasonlóság és a különbség a penetratin analógok és a ciklusos peptidek között vízben és membránban, valamint hogyan változik ezen peptidek és konjugátumot konformációja a membrán felszínének közelében és a membrán belsejében. A modellezés célja volt azt is kideríteni, milyen hatással van a peptid viselkedésére gyógyszermolekulák kovalens konjugációja, mindazonáltal lehetséges-e ezzel a módszerrel modellezni a membránon keresztüli penetrációt.

3. Módszerek

3.1 Konjugátum adatbázis

A ConjuPepDB (<https://conjupepdb.ttk.hu/>) peptidből és gyógyszermolekulából álló kovalensen kapcsolt konjugátumokat tartalmaz. Minden szerkezetek cikkben publikáltak, melyre a CAS (Chemical Abstracts) adatbázisban kerestünk.

Az adatbázis tartalmazza minden konjugátum CAS azonosítóját teljes 2D szerkezetét, a peptid szekvenciáját, valamint a kis molekula nevét, szerkezeti képletét és CAS azonosítóját. Ezen túl rendszerbe soroltuk a konjugátumokat a kapcsolás módja és a gyógyszer hatástani csoportja szerint.

Az adatbázist Apache HTTPS server 2.4 és MySQL server 5.7 működteti.

Az adatbázisban való szerkezetalapú keresést JavaScript Molecular Editor teszi lehetővé, mely támogatja a keresést pontos egyezésre, töredékre vagy hasonlóság alapján is.

3.2 MD szimulációk

A modellezés teljes munkafolyamatához a Schrödinger molekulamodellező programcsomagot használtuk, melynek grafikus felülete a Maestro. Innen indítottuk a többi alkalmazást (1. ábra).

A peptidek szerkezetét az RCSB adatbázisból töltöttük le a PDB azonosítójuk alapján. Mivel mindegyik NMR spektroszkópiával került meghatározásra, csak minimális előkészítésre szorultak a molekuladinamikához.

A gyógyszermolekulákat a 2D szerkesztő alkalmazással berajzoltuk és a molekulamechanikai módszerrel optimalizáltuk a konformációjukat. Ezután a megfelelő linker beépítésével kapcsoltuk a peptidekhez.

A System Builder alkalmazással OPLS3e erőteret használva állítottuk össze a rendszert a molekuladinamikához, mely explicit víz- és membránmodellt tartalmaz. Minden konjugátumot három különböző közegbe helyeztünk: vízdobozba, POPC (lecitin) membránmodell belsejébe és POPC membránmodell felszínére, utóbbi esetben párhuzamos helyzetben.

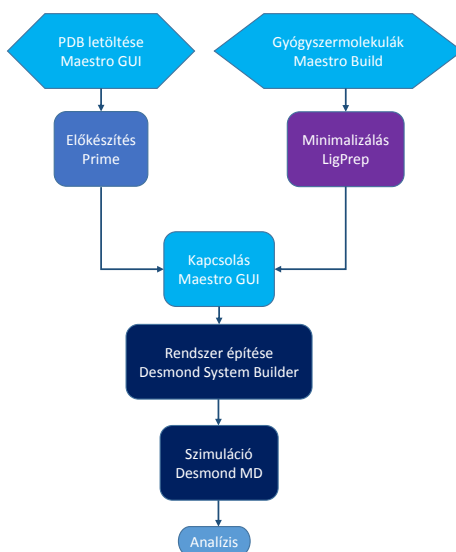
A peptid protonálódásból vagy deprotonálódásból adódó töltését nátrium- vagy kloridionok egyenlítik ki, hogy a rendszer eredő töltése nulla legyen. A vizes közeg további nátrium- és kloridionokat tartalmaz izotóniás koncentrációban.

A Desmond molekuladinamikai szimulációkat Linux alatt, grafikus magon kell futtatni. Ehhez Nvidia GeForce GTX1070 Ti 1683 MHz x2432 videokártyát használtunk.

A program a beépített protokollnak megfelelő beállításokkal relaxálta a rendszert. Az MD szimuláció ezután izoterm, izobár zárt rendszerben futott, mindig 300 K hőmérsékleten és 1,01325 bar nyomáson.

A membrán nélküli és a membrán belsejéből indított szimulációk időtartama 100 ns volt 100 ps trajektória felbontással, a membrán felszínéről indított szimulációk időtartama pedig 1000 ns volt 1000 ps trajektória felbontással.

A szimulációk kiértékelésében kulcsfontosságú adat az α szénatomok átlagos négyzetes elmozdulása az idő függvényében, az intramolekuláris hidrogénkötések száma az idő függvényében és a Ramachandran grafikon kezdeti- és végállapotban.



1. ábra. A modellezési projekt vázlatos munkafolyamata

4. Eredmények

4.1 Konjugátum adatbázis

A ConjuPepDB 1645 peptidből (nem csak CPP-k) és kisebb molekulából képzett konjugátum alapvető adatait tartalmazza 238 szakirodalmi publikációból összegyűjtve és minden esetben szerkezeti információkkal ellátva.

A legnagyobb számban képviselt hatástani csoport a rákellenes gyógyszereké, melyek jelentős része toxikus és gyakran a farmakokinetikai jellemzőik is rosszak, ezért biztonságosabbá és eredményesebbé tehető a felhasználásuk, ha specifikus peptidek vezetnek a célponthoz.

A kórokozók (köztük baktériumok, vírusok, gombák és paraziták) elleni hatóanyagok is gyakran szerepelnek az adatbázisban, mert a peptidek segíthetik a mikrobákba vagy vírussal fertőzött sejtekbe való behatolást az egészséges szövetek megkímélése mellett.

Gyulladáscsökkentő hatóanyagok peptidhez kapcsolásakor a megfelelő szövetek szelektív célzása kap szerepet.

Szintén fejlesztettek ki konjugátumokat a központi idegrendszer kezelésére is.

Mindazonáltal az adatbázisba gyűjtött konjugátumok közel fele egyéb, ritkábban előforduló hatástani csoportba tartozik, vagy nem is fejt ki farmakológiai hatást. Előfordulnak diagnosztikumok és más, elsősorban kutatásban használt jelzőmolekulák, biotechnológiai funkciójú konjugátumok, továbbá egyéb speciális célokra egyedileg kifejlesztett molekulák is.

4.2 MD szimulációk

A vízdobozból és a membrán belsejéből indított szimulációk során a natív penetratin és a 6,14-Phe-penetratin 100 ns alatt megőrizte a helikális konformációját, miközben a dodeka-penetratin rendezetlenné vált. A konjugáció egyik peptide sem gyakorolt szignifikáns hatást.

Ugyanezen körülmények között mindhárom ciklusos CPP és a konjugátumaik várakozásunknak megfelelően nagyfokú konformációs stabilitást mutattak.

A natív penetratin a POPC modell belsejéből indítva 1000 ns alatt párhuzamos helyzetből merőlegesbe fordult.

A membrán felszínéről indítva 1000 ns alatt a konjugátatlan penetratin konformációja teljesen átalakult: a hélix letekeredett és két β -redős szakasz alakult ki közte egy β -kanyarral; ebben a helyzetben kötődött a membrán felszínéhez ionos kötésekkel, hidrogénhidakkal és π -kation kölcsönhatásokkal.

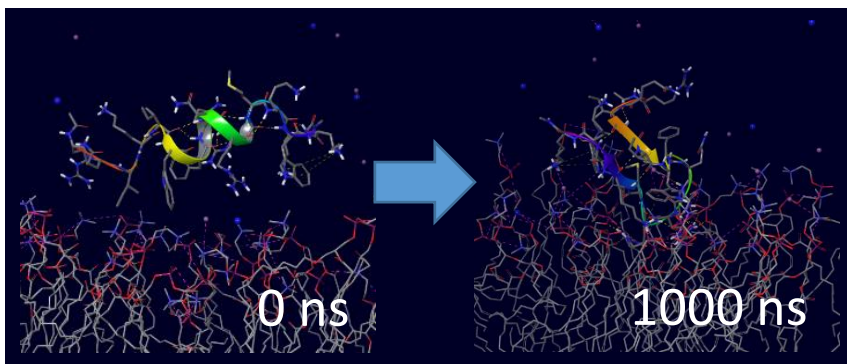
A 6,14-Phe-penetratin és a dodeka-penetratin helikális maradt, *N*-terminálisukkal kötődtek a membrán felszínéhez. A kisebb érintkező felület ellenére számos nemkovalens kölcsönhatást figyeltünk meg.

A penetratin konjugátumai minden esetben helikálisak maradtak, és általában merőlegesen érintkeztek a membránnal. A penetratin-doxorubicin eltávolodott a membrántól, a 6,14-Phe-penetratin-doxorubicin a konjugált hatóanyaggal fűródott a membránba, a dodeka-penetratin-doxorubicin pedig a *C*-terminálisával kötődött. A razagilin mindhárom penetratin analóghoz kötve mélyen belesüllyedt a membránba. A zidovudin mutatta a membránhoz a legkisebb affinitást, dodeka-penetratin konjugátuma eltávolodott a membrántól.

A konjugálatlan ciklusos peptidok 1000 ns alatt belesüllyedtek a membránba, miközben az oldalláncaik sok hidrogénhidat létesítettek a POPC molekulák poláris csoportjaival.

A konjugáció egyik ciklusos peptid konformációjára sem gyakorolt hatást, és a pozíciójukban is csak kismértékű eltérést okozott. A doxorubicin mindhárom esetben mélyen a membránba merült. A razagilin és a zidovudin csak az MCoTI-II konjugátumaként hatolt mélyen a membránba, másik két peptidhez kötve a felszín közelében maradt.

Spontán penetráció egyszer sem következett be.



2. ábra. Natív penetratin POPC membránmodell felszínén

5. Következtetések

A ConjuPepDB tartalmazza az alapvető információkat a konjugátumokról, például szerkezeti képlet, CAS azonosító, kis molekula neve, peptid szekvenciája. Minden esetben föl van tüntetve az orvosi felhasználás célja is. 1645 bejegyzést tartalmaz 238 cikkből összegyűjtve.

Az adatbázishoz felhasználóbarát weboldal biztosít hozzáférést, mely számítógépen, tableten vagy okostelefonon is megnyitható. A felület több kritérium alapján történő lekérdezéseket is lehetővé tesz.

Sejtmembrán penetráló peptidek kis molekulákkal végzett kovalens konjugátumainak molekuladinamikai modellezését korábban nem publikálták.

Spontán penetráció az általunk végzett szimulációk során nem történt, de az esetek többségében a peptid (konjugátum) kötődött a membránhoz. Megfigyeléseink alapján a konjugált molekulák az esetek egy részében befolyásolták a peptidek mozgását.

A penetratin jelentős konformáció-változás során lépett kölcsönhatásba a membránnal, analógjai viszont megtartották a helikális konformációt.

A penetratin és analógok konjugátumai különbözőképpen viselkedtek, amit a gyógyszermolekula polaritása határozott meg. A razagilin elősegítette a behatolást a membránba, a zidovudin gátolta, a doxorubicin hatása esetenként változott.

A ciklusos peptidek konformációja kifejezetten stabilnak bizonyult a szimulációk alatt, ezeknél a kapcsolt molekula kevésbé gyakorolt hatást a pozicionálódásra.

A szimulációk eredményei alapján a hatékonyság-növelés szempontjából ígéretes lehet a razagilin konjugációja penetratinnal és annak két analógiával, valamint Kalata B1-gyel és MCoTI-II-vel, továbbá a doxorubicin konjugációja Kalata B1-gyel és MCoTI-II-vel, valamint a zidovudin konjugációja MCoTI-II-vel.

A natív penetratin térszerkezeti változása és kötődése a membrán felszínéhez a penetráció bármely mechanizmusának első lépése lehet.

A penetráció modellezéséhez összetettebb membránmodellre, több peptidet tartalmazó rendszerre vagy hosszabb szimulációs időre lehet szükség.

6. Saját publikációk jegyzéke

Balázs Balogh, Márton Ivánczi, Bilal Nizami, Tamás Beke-Somfai, István M. Mándity:

ConjuPepDB: a database of peptide-drug conjugates.

Nucleic Acids Res. **2021.** 49(D1): D1102-D1112. IF: 19,16

Márton Ivánczi, Balázs Balogh, Loretta Kis, István M. Mándity:
Molecular Dynamics Simulations of Drug-Conjugated Cell-Penetrating Peptides.

Pharmaceuticals **2023.** 16(9).

IF: 4,6