

PB1.5. Vývoj mimetik insulínu (Jiráček, Jahn, Konvalinka)

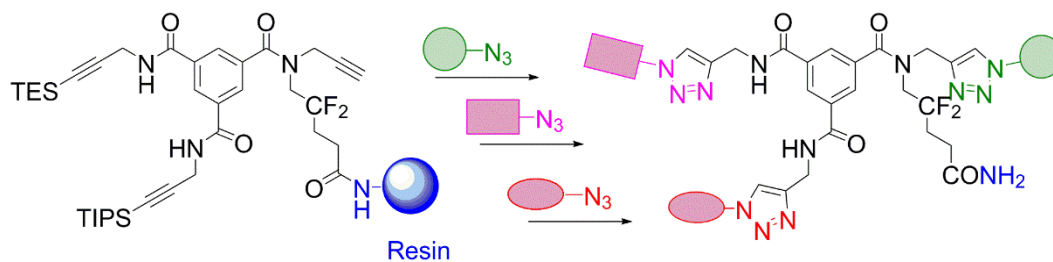
Cíle výzkumu

- Design a syntézu sérií azidů a derivátů polyfunkčních nepřírodných α -amino, β -amino, β,γ -diamino, α,β,γ -triaminokyselin a oxidativně modifikovaných aminokyselin.
- Vývoj rychlého, přesného, neradioaktivního a citlivého eseje pro určování K_d modulátorů interakce insulínu, IGF-1 a IGF-2 s jejich receptory.
- Design a validaci vysokokapacitní metody pro testování látek.
- Vývoj nových mimetik insulínu, která se budou efektivně vázat na receptor insulínu (IR) a vyvolávat nebo inhibovat biologické efekty insulínu.
- Vývoj nových mimetik IGF-1 či -2, která se budou efektivně vázat na receptor IGF-1 (IGF-1R) a vyvolávat nebo inhibovat biologické efekty IGF-1 či -2.

Výzkumný plán a metodologie

Chybějící informace o struktuře a molekulární interakci insulínu s jeho receptorem a zároveň dynamický charakter této interakce neumožňují plnohodnotné a přímočaré využití výpočetních technik za účelem predikce nových molekul, které by se efektivně vázaly na IR. My však využijeme naši detailní znalost 3D struktury insulínu a znalost aminokyselin v insulínu, které jsou klíčové pro interakci s IR (epitopů či hotspots). Věříme, že molekuly napodobující několik různých a nesousedících vazebných epitopů v insulínu mají větší šanci být potentními agonisty insulínu než molekuly napodobující pouze jeden epitop. Domníváme se také, že kombinatoriální způsob syntézy a testování tisíců látek je nejlepší strategie pro objev nových látek vážících IR, které mohou být dále optimalizovány molekulárním modelováním a dalšími změnami v jejich struktuře.

Za tímto účelem jsme již vyvinuli dvě varianty univerzálního třiramenného skeletu se selektivně chráněnými rameny, které mohou být specificky modifikovány různými azidy¹ (Obr. 2) či aldehydy². Takové modifikované skelety by mohly pokrýt několik oddělených „hotspots“ na receptoru insulínu a mimikovat tak účinek insulínu. Tyto skelety mohou být navíc připevněny na pevný nosič, což umožňuje jednoduchou syntézu knihoven látek založených na struktuře skeletu metodou na pevné fázi. Také jsme již optimalizovali syntézu skeletu modifikovaného relativně jednoduchými organickými azidy, ale také tripeptidy. Molekulární dynamika modelového skeletu prokázala, že látky takového typu jsou schopny zaujmout nataženou konformaci, přičemž vzdálenosti mezi uhlíkovými atomy na koncích ramen byly až 24 Å, což je přibližně rozměr molekuly insulínu (průměr molekuly je asi 20-25 Å).



Obr. 2. Nedávno vyvinutý třiramenný skelet^{1,2} pro syntézu mimetik insulínu metodou „click“ chemie na pevné fázi.

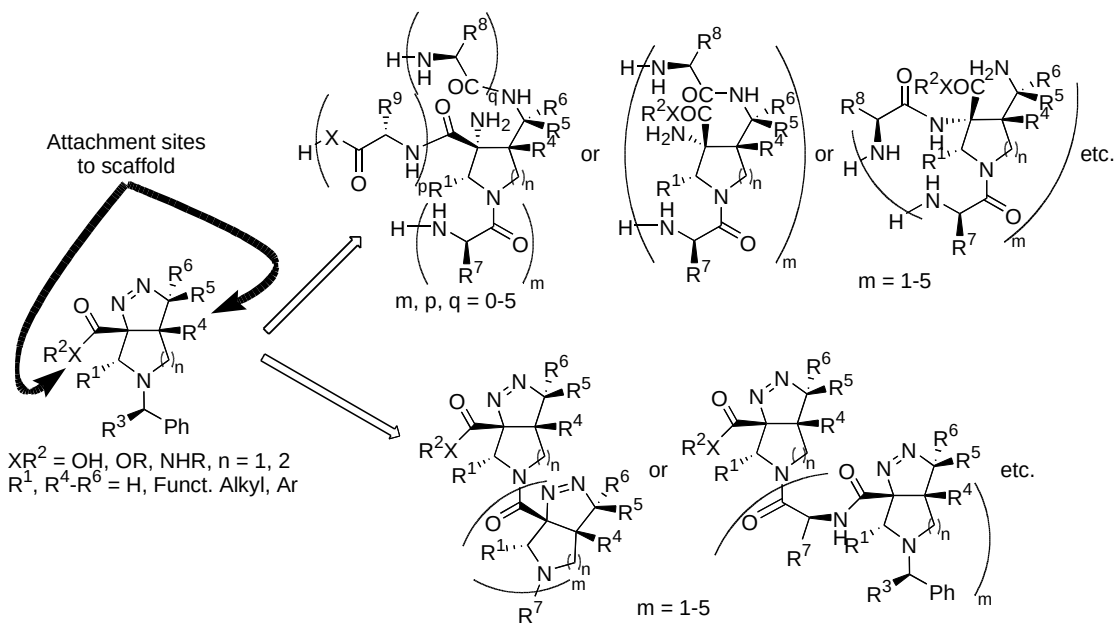
(i) Budeme syntetizovat široké spektrum azidů a knihovnu nových polyfunkčních derivátů α -amino, β -amino, β,γ -diamino, a α,β,γ -triaminokyselin (Obr. 3). Centrální bicycká část těchto derivátů aminokyselin je přístupná v jednom syntetickém kroku, přičemž každá z funkčních skupin je selektivně chráněná a je možné ji selektivně funkcionalizovat³. Množina konformací těchto výsledných derivátů aminokyselin je limitovaná („conformationally constrained“) a tak mohou tyto látky aktivně přispívat k formování stabilních sekundárních a dokonce i terciálních struktur peptidů do kterých budou zabudovány.

(ii) Budou určeny a charakterizovány supramolekulární struktury připravených oligopeptidů. Nejprve budou připraveny foldamery různých délek a jejich molekulární struktury budou zjišťovány pomocí pokročilých technik NMR a X-paprskové krystalografie. Tyto látky budou poté inkorporovány do peptidů různých sekvencí (Obr. 3). Očekáváme, že tyto peptidy, díky jejich specifickým vlastnostem, budou mít vysokou metabolickou stabilitu právě v důsledku přítomnosti nepřírodních aminokyselin a tak mohou být tyto látky vhodné pro studie *in vivo*.

(iii) Vybrané ligandy (peptidomimetika s funkčními azido skupinami) budou poté použity pro ukotvení na jednotlivá ramena trifunkčního skeletu (Obr. 2). Budou syntetizovány jak jednotlivé látky, tak knihovny látek kombinatoriální metodou „rozděl a smíchej“ při syntéze na pevné fázi.

V bodech (i-iii) budeme intenzivně využívat nově pořízený semipreparativní HPLC přístroj (skupina Jiráček) a přístroje pro „flash“ chromatografii (skupina Jahn) pro purifikace připravených azidů, peptidomimetik, nepřírodních oligopeptidů a jejich prekurzorů.

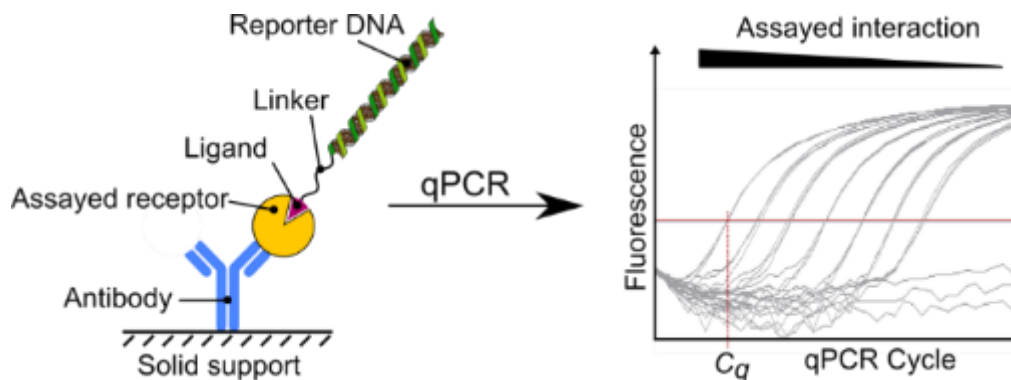
(iv) Mimetika insulinu budou testována za účelem zjištění jejich vazby na obě izoformy receptoru insulinu (IR-A a IR-B) a na receptor pro IGF-1 (IGF-1R) v membránách selektivně transfekovaných buněk. Budeme také studovat schopnost látek indukovat autofosforylaci tyrosin-kinázových domén receptorů a schopnost látek aktivovat specifické vnitrobuněčné substráty typické pro metabolické a mitogenní signalizační dráhy receptorů (např. proteiny IRS, ERK a Akt/PKB). Tyto experimenty by měly odhalit agonistické či antagonistické vlastnosti vybraných látek. Interakce látek s buněčnými membránovými receptory také budou studovány za pomoci nové a slibné techniky dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM), která je nezávisle vyvíjena skupinou J. Lazara (PB1.7.).



Obr. 3. Schéma ukazující specifický skelet odvozený od nepřírodních aminokyselin a způsob jeho inkorporace do peptidů.

(v) Také navrhujeme vyvinout vysokokapacitní „high-throughput screening“ metodu (HTS) pro testování molekul z kombinatoriálních knihoven popsanych výše. Připravíme esej na pevné fázi podobnou sendvičové ELISA, založené na imunoPCR. ImunoPCR je často používaná metoda pro ultracitlivé stanovení proteinů. Protein je nejprve zachycen na imobilizované protilátce a následně detekován druhou protilátkou označenou DNA. DNA je následně stanovena pomocí kvantitativní PCR (qPCR), (Obr. 4). Eсей na insulin/IGF receptory využívá široce používanou anti-FLAG M2 protilátku (Sigma); receptor bude zachycen z lyzátu buněk HEK293 transfekovaných celým receptorem označeným na C- konci FLAG sekvencí. Detekční sonda se bude skládat z ligandu (insulin, IGF-1 či IGF-2) kovalentně navázaného na 3' konec 55 bází dlouhého jednovláknového oligonukleotidu. Množství navázaného ligandu bude přesně změřeno qPCR. Po přípravě sondy změříme její afinitu k

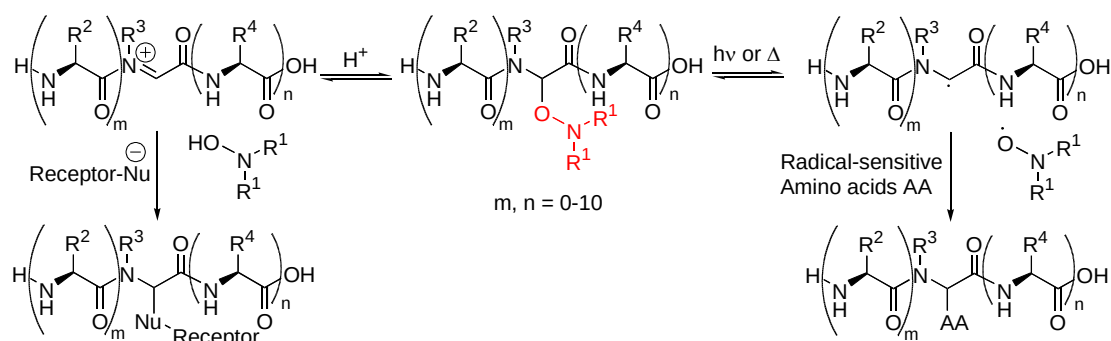
receptoru ve standardní esejí a použijeme ji pro vývoj nové esejí k testování modulátorů interakce receptor-ligand. Vyvinutá esejí bude adaptována na HTS automatizaci s použitím robotické linky navrhované v projektu. Otestujeme IOCB knihovnu látek a identifikované hity použijeme jako ligandy pro modifikace triorthogonálního skeletu, jak je navrženo v (iii).



Obr. 4. Princip esejí⁴ určené pro vysokokapacitní testování látek v tomto projektu.

(vi) V další fázi budou nově vyvíjené deriváty polyfunkčních aminokyselin nesoucí ortogonálně chráněné funkční skupiny modifikovány specifickými značkami, např. fluorescenčními, a poté inkorporovány do peptidů a skeletů. Takové látky budou velmi užitečné pro studování interakcí mimetik s IR a IGF-1R receptory.

(vii) V této další komplementární linii výzkumu budeme modifikovat trifunkční tříramenné skelety oxidativně modifikovanými peptidy (Obr. 5). V těchto látkách budou zabudovány dipeptidy nesoucí glycín či diketopiperazinové jednotky, které jsou snadno oxidativně modifikovatelné alkoxyamino skupinou. Tato modifikace zapříčiní následnou vysokou reaktivitu takových dipeptidových jednotek, která ale nebude bránit jejich inkorporaci do delších peptidových sekvencí. Očekáváme, že za normálních fyziologických podmínek budou tyto peptidy stálé. Dá se ovšem očekávat, že za sníženého pH budou tyto látky reagovat (kovalentně se síťovat) s nukleofilními skupinami postranních řetězců aminokyselin v cílených receptorech. Takovými aminokyselinami jsou cystein, lysin, aspartát, glutamát, serin či threonin. Tento koncept může být rozšířen na světlem aktivované oxidativně modifikované peptidy, které snadno podléhají radikálově řízenému kovalentnímu síťování. Tato metodologie by měla umožnit mapování vazebných míst mimetik ve struktuře receptorů.



Obr. 5. Oxidativně modifikované peptidy a možné způsoby jejich kovalentního sítování s receptory.

- [1] Vanek, V.; Picha, J.; Fabre, B.; Budesinsky, M.; Lepsik, M.; Jiracek, J., *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, (17), 3689-3701.
- [2] Fabre, B.; Picha, J.; Vanek, V.; Budesinsky, M.; Jiracek, J., *Molecules* **2015**, 20 (10), 19310-19329.
- [3] Kapras, V.; Pohl, R.; Cisarova, I.; Jahn, U., *Org. Lett.* **2014**, 16 (4), 1088-1091.
- [4] Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Wacker, R., *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (8), 1918-1930.

Časový plán

2018-2022

- Design a syntéza sérií azidů a polyfunkčních nepřírozených derivátů α -amino, β -amino, β,γ -diamino, α,β,γ -triaminokyselin a oxidativně modifikovaných aminokyselin.
- Design a syntéza peptidů a peptidomimetik.
- Strukturní charakterizace derivátů aminokyselin a peptidomimetik.
- Design a validace vysokokapacitní metody pro testování knihoven.
- Design a syntéza kombinatoriálních knihoven založených na struktuře trifunkčních skeletů metodou syntézy na pevné fázi.

2019-2022

- Testování biologických vlastností látek.
- Strukturní charakterizace aktivních látek.
- Molekulární modelování neaktivnějších látek do struktury insulinu vázané na receptor.
- Optimalizace aktivních struktur.

Mapování vazebných míst selektivně značených aktivních látek na receptorech.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	
2018	3	<i>Chemistry a European Journal</i>
2019	3	<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>
2020	4	<i>ACS Chemical Biology</i>
2021	5	<i>Journal of Biological Chemistry</i>
2022	5	<i>Biochemistry</i>
		<i>Bioconjugate Chemistry</i>
		<i>Bioorganic and Medicinal Chemistry</i>
		<i>Organic and Biomolecular Chemistry</i>
		<i>Journal of Organic Chemistry</i>
		<i>ChemBioChem</i>
		<i>PlosOne</i>
Celkem	20	

Patenty a patentové žádosti

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové žádosti (podané)	<i>Očekáváme patentové přihlášky v následujících oblastech: Vysokokapacitní metoda testování. Mimetika insulinu a IGF.</i>
2018	0	0	
2019	0	0	
2020	0	1	
2021	0	1	
2022	1	0	
Celkem	1	2	

Zahraniční spolupráce

- Dr. Andrzej M. Brzozowski ze Structural Biology Laboratory (YSBL) na University of York v U. K.,
- Tým Prof. Carol Robinson na University of Oxford v U. K