

ÖZET

VAMP2 PROTEİNİNİN KIRPILMIŞ İZOFORMUNUN NÖROLOJİK HASTALIKLARIN/BOZUKLUKLARIN TEDAVİSİNDE VE NÖROMODÜLASYON UYGULAMALARINDA KULLANIMI

5

Buluş, nöromüsküler blokaj ve sinaptik modülasyonunu sağlayan, Çözünür N-etilmaleimid Duyarlı Faktör Bağlayıcı Protein Reseptörü (SNARE) kompleksinin oluşumunu düzenleyen ve nörotransmitter salımını kontrol eden etki mekanizmasına
10 sahip vezikül ilişkili membran proteini 2'nin (VAMP2) kırpılmış izoformunun nörolojik hastalıkların/bozuklukların tedavisinde kullanımı ile ilgilidir. Buluşa konu VAMP2 kırpılmış izoformu, SNARE kompleksi oluşumunu ve VAMP2 dimerleşmesini inhibe ederek nörotransmitter salımını modüle etmekte, ileti süreçlerini hassas ve seçici bir şekilde kontrol etme olanağı sağlamaktadır.

İSTEMLER

1. Nörolojik ve nöropsikiyatrik hastalıkların/bozuklukların, ağrının, sinir iletimi veya kas aktivitesini azaltmayı amaçlayan durumların tedavisinde kullanmak için vezikül ilişkili membran proteini 2 (VAMP2) dimerizasyonunu ve/veya Çözünür N-etilmaleimid Duyarlı Faktör Bağlayıcı Protein Reseptörü (SNARE) kompleksinin oluşumu inhibe ederek nörotransmitter salımını modüle eden DİZİ NO:1 dizilimine sahip vezikül ilişkili membran proteini 2 (VAMP2) kırılmış izoformu ve bu izoformun DİZİ NO:3 dizilimine sahip cDNA sekansı.
2. Nörolojik hastalıkların/bozuklukların tedavisinde kullanmak için nörotransmitter salımını geri dönüşümlü olarak engelleyerek, sinaptik iletim inhibisyonu ve/veya nöromüsküler blokaj sağlayan İstem 1'e göre VAMP2 kırılmış izoformu.
3. Nörolojik hastalıkların/bozuklukların ve nöropsikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanmak için İstem 1'e göre VAMP2 kırılmış izoformu olup özelliği, bahsi geçen nörolojik hastalıkların/bozuklukların epilepsi, Parkinson hastalığı, nöromüsküler blokaj gerektiren hastalıklar, multipl skleroz, serebral palsi, kas spastisitesi, strabismus, aşırı aktif mesane, düzensiz sinaptik iletimle karakterize edilen bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, travmatik beyin hasarı (TBI), felç, inme, nörorehabilitasyon gerektiren durumlar, fibromiyalji veya nöropatik ağrı olmasıdır.
4. Nörolojik hastalıkların/bozuklukların ve nöropsikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanmak için İstem 1'e göre VAMP2 kırılmış izoformu olup özelliği, bahsi geçen nöropsikiyatrik bozuklukların uyku bozuklukları, şizofreni, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB), kaygı bozukluğu, yeme bozuklukları, bipolar bozukluk ve düzensiz sinaptik iletimle ve nörotransmitter salımındaki değişikliklerle karakterize edilen bozukluklar olmasıdır.
5. Estetik operasyonlarda, sinir iletimini veya kas aktivitesini azaltmak amaçlı durumların tedavisinde kullanmak için nörotransmitter salımını geri dönüşümlü

olarak engelleyerek, sinaptik iletim inhibisyonu ve/veya nöromüsküler blokaj sağlayan VAMP2 kısaltılmış izoformu (DİZİ NO:1).

- 5 6. Estetik operasyonlarda, sinir iletimini veya kas aktivitesini azaltmak amaçlı durumların tedavisinde kullanmak için İstem 5'e göre VAMP2 kısaltılmış izoformu olup özelliği, bahsi geçen durumların kırışıklık, glabella (kaş ortası) çizgileri, yüz şekillendirme, gummy smile (diş eti gülüşü), hiperhidroz (aşırı terleme), migren, bruksizm (diş sıkma), servikal distoni (boyun kas spazmları), blefarospazm (göz çevresi kas spazmları) veya aşırı tükürük salgısı (sialore) olmasıdır.

- 10 7. Nörolojik hastalıkların/bozuklukların ve nöropsikiyatrik bozuklukların tanısında, genetik hedefleme ve işaretleme stratejileri amacıyla kullanmak için vezikül ilişkili membran proteini 2 (VAMP2) dimerizasyonunu ve/veya Çözünür N-etilmaleimid Duyarlı Faktör Bağlayıcı Protein Reseptörü (SNARE) kompleksinin oluşumu inhibe eden DİZİ NO:1 dizilimine sahip vezikül ilişkili membran proteini 2 (VAMP2) 15 kırpılmış izoformu ve bu izoformun DİZİ NO:3 dizilimine sahip cDNA sekansı.

TARİFNAME

VAMP2 PROTEİNİNİN KIRPILMIŞ İZOFORMUNUN NÖROLOJİK HASTALIKLARIN/BOZUKLUKLARIN TEDAVİSİNDE VE NÖROMODÜLASYON UYGULAMALARINDA KULLANIMI

Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan

Buluş, nöromüsküler blokaj ve sinaptik modülasyonunu sağlayan, Çözünür N-etilmaleimid Duyarlı Faktör Bağlayıcı Protein Reseptörü (SNARE) kompleksinin oluşumunu düzenleyen ve nörotransmitter salımını kontrol eden etki mekanizmasına sahip vezikül ilişkili membran proteini 2'nin (VAMP2) kırpılmış izoformunun nörolojik hastalıkların/bozuklukların tedavisinde ve nöromodülasyon uygulamalarında kullanımı ile ilgilidir. Buluşa konu VAMP2 kırpılmış izoformu sinaptik ileti süreçlerini hassas bir şekilde kontrol etme olanağı sağlamaktadır.

Tekniğin Bilinen Durumu

Sinaptik iletim, bir nöronun diğerine ya da bir nöronun hedef hücreye (örneğin kas hücresi ya da bez hücresi) bilgi aktarımını sağlar [1]. Bu süreç, vücudun hareket etmesi ve hissetmesi gibi temel işlevler için hayati önem taşımaktadır. Sinaptik iletim ve nörotransmitter salımı, merkezi sinir sisteminin sağlıklı işleyişi için hayati bir öneme sahiptir. Bu süreçlerin temelinde, Çözünür N-etilmaleimid Duyarlı Faktör Bağlayıcı Protein Reseptörü (SNARE) kompleksleri ve vezikül ilişkili membran proteini 2 (VAMP2) gibi proteinlerin işlevleri yer almaktadır [2]. Bu süreçlerdeki dengesizlikler veya aşırı aktiviteler birçok nörolojik ve fiziksel bozukluğun temelinde yer alan önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır [3,4,5]. Fibromiyalji ve nöropatik ağrı gibi kronik ağrı sendromlarında, sinir uçlarından aşırı miktarda nörotransmitter salımı ağrı algısını artırmakta ve tedaviyi zorlaştırmaktadır [4]. Multipl skleroz ve serebral palsi gibi durumlarda, nöromüsküler sinyallerin kontrolsüz bir şekilde iletilmesi kasların sürekli kasılmasına (spastisite) neden olmaktadır [5]. Epilepsi, Parkinson hastalığı gibi hastalıklarda, düzensiz nörotransmitter salımı sinaptik iletimde anormalliklere yol açmakta ve hastalıkların ilerlemesini tetiklemektedir [3,5]. Nörotransmitter salımına bağlı aşırı terleme ve yüz kaslarının kontrolsüz aktivitesi, estetik ve yaşam kalitesini düşüren sorunlara yol açmaktadır [5].

SNARE proteinleri (VAMP2, Sintaksin, SNAP25) nörotransmitter dolu veziküllerin sinaptik membrana füzyonunu sağlamaktadır [2,6]. Bu füzyonun kontrolsüz olması, nörotransmitterlerin aşırı veya eksik salımına neden olur. Günümüzde kullanılan farmakolojik veya cerrahi tedaviler (örneğin; Botulinum toksini), nörotransmitter salımını geçici olarak baskılayabilmektedir.

Botulinum toksini enjeksiyonu, nöromüsküler blokaj elde etmek için tanımlanmış bir yöntemdir ve çeşitli nörolojik bozukluklarda belgelenmiş uygulamaları bulunmaktadır [7]. Botulinum toksininin etkinliği, esas olarak VAMP2 kesilerek SNARE kompleksi oluşumunu inhibe etme yeteneğine dayanmaktadır [7]. Ancak, bu yaklaşımın önemli bir sınırlaması bu etkinin geçici olması ve bu sebeple terapötik sonuçları sürdürebilmek için tekrar eden enjeksiyonların gerekliliğidir. Ayrıca bu enjeksiyonlarda, yetersiz spesifiklik nedeniyle sadece hedef bölge değil, çevre dokular da etkilenebilmektedir. Bu sebeple, nörotransmitter salımının hedeflenmiş modülasyonuna yönelik kritik bir ihtiyaç bulunmaktadır.

Tekniğin bilinen durumunda botulinum toksininin nöromüsküler ve nörolojik tedavilerdeki uygulamaların ve mekanizmaların incelendiği birçok patent/patent başvurusu bulunmakta olup, bunlardan bazıları US10064921B2, JP6955491B2, US9238061B2, US8747865B2, US9422344B2, US8420105B2, US20220154160A1, US7811587B2'dir. Bu patentlerde açıklanan gelişmelere rağmen, uzun süreli ve daha etkili tedavilere duyulan ihtiyaç hala devam etmektedir. Bu sebeple, sürdürülebilir nöromüsküler blokaj sağlayabilen ve sık müdahalelere olan gereksinimi azaltabilen daha etkili tedaviler geliştirilmesi gereklidir. Ayrıca, minimal invaziv tıp alanında, estetik tedaviler (örneğin; kırışıklıkların giderilmesi) veya aşırı terleme (hiperhidroz) gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan nöromüsküler blokaj yöntemleri de genellikle sınırlı etkinlik süresi, spesifiklik eksikliği ve yan etkiler gibi problemlerle karşı karşıyadır.

Mevcut teknikte, nörotransmitter salımından bağımsız olarak çeşitli terapötik amaçlarla kullanılmak üzere farklı *de novo* peptitler de geliştirilmiştir (örneğin, TR2022/016617 ve TR2023/016596). Bunun yanı sıra, farklı kullanım alanlarına yönelik melez peptitler de tasarlanmıştır (TR2024/000662 ve TWI751157B). Ayrıca, botulinum toksin türevleri üretilmiştir (US7887810B2).

Mevcut tekniklerdeki çözümlerin sınırlı etkinlik süresi, spesifiklik eksikliği, sadece hedef bölgenin değil çevre dokuların da etkilenebilmesi, etkin protein sekanslarının genellikle

bilinmemesi, genetik terapilerde uygun olmama, terapötik sonuçları sürdürebilmek için tekrar eden enjeksiyonların gerekliliği, ilgili sinaptik mekanizmaların genellikle düşük bilinirlikte olması, sınırlı geniş çapta uygulanabilirlik ve olumsuz yan etkiler gibi sebepler dolayısıyla bu alanda bir geliştirme yapılması gerekli kılınmıştır.

5

Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları

Buluştta, vezikül ilişkili membran proteini 2 (VAMP2) proteininin kırpılmış izoformu (DİZİ NO:1) ile nörotransmitter salımının seçici bir şekilde inhibe edilmesiyle nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanımı açıklanmaktadır. Buluştta konu izoform, VAMP2 proteini (DİZİ NO:2) dimerizasyonunu ve Çözünür N-etilmaleimid Duyarlı Faktör Bağlayıcı Protein Reseptörü (SNARE) kompleksinin oluşumunu düzenlemektedir. Buluşt ile, sinaptik iletişim bozuklukları ve nörotransmitter salımındaki düzensizlikler ile ortaya çıkan nörolojik ve nöromüsküler hastalıkların/bozuklukların tedavisi ve yönetimi sağlanmaktadır.

15 Bu kırpılmış izoform (DİZİ NO:1), kanonik (doğal) forma göre N-ucunda (protein sekansı başlangıcı) 45 amino asit eksik, C-ucunda (protein sekansı bitişi) ise 3 amino asit eksiktir (5 delesyon, 2 insersiyon). Kırpılmış izoformlar kanonik proteinin (VAMP2) yapısından kısa olup tüm proteinin tam fonksiyonunu taşımazlar. Ancak kanonik proteinlerle etkileşime girmesini sağlayan amino asit kalıntılarına sahiplerse onların
20 doğal oligomerleşmesini heteromerizasyon yoluyla engelleyebilirler [8,9].

Buluştun bir amacı, SNARE kompleksinin VAMP2 bileşenini hedeflenerek sinaptik modülasyon ile nörolojik tedavilerde hassas düzenlemeler yapılması ve mevcut nöro-inhibitör ilaçların neden olduğu yan etkilerin azaltılmasıdır. Yan etkilerin azalmasının nedenleri arasında, kullanılan sekansın doğal olarak var olması, *de novo* bir peptit
25 olmaması, immün bir molekül olmaması (monoklonal antikorlar gibi) ve moleküler düzeyde simüle edilmiş etkili etkileşimlerin sağlanması yer almaktadır. Buluştta konu VAMP2 proteinin kırpılmış izoformu ile, mevcut teknikteki tedavilere kıyasla daha sürdürülebilir terapötik etki elde edilmekte, nöromüsküler blokaj tedavilerini iyileştirilerek daha iyi bir nörotransmitter salımı kontrolü sağlanmaktadır.

30 Buluştun bir diğere amacı, nörotransmitter salımının daha hassas ve seçici bir şekilde kontrolünü sağlamaktır. Buluştta konu VAMP2 kırpılmış izoformu, SNARE kompleksi oluşumundaki tetramer etkileşimlerini (VAMP2 - Sintaksin 1A - SNAP25 - SNAP25)

VAMP2 etkileşim noktalarına bağlanarak inhibe eder. Bu mekanizma nörotransmitter salımını hassas ve seçici bir şekilde düzenlemektedir. Böylece buluşa konu VAMP2 proteinin kırılmış izoformu ile sinaptik iletimin etkili olduğu nörolojik durumlar için yeni bir terapötik yaklaşım sunulmakta ve belirli sinaptik yolları hedefleyen tedavilere zemin hazırlanmaktadır.

Buluşun bir diğer amacı, uzun süreli ağrı yönetiminin sağlanmasıdır. Buluşa konu VAMP2 proteinin kırılmış izoformu ile ağrı yollarında rol oynayan nörotransmitter salımı azaltılması yoluyla SNARE kompleksi inhibisyonuna bağlı olarak etkili bir ağrı tedavisi sağlanmaktadır. Kırılmış izoformun genetik terapi veya proteini ekspresse eden hücre hatları kullanımıyla sürekli salımı, uzun süreli ağrı kontrolünde (kronik ağrı sendromları gibi) çok daha olumlu sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir. SNARE ilişkili asetilkolin salınımını önleyerek nöromüsküler kavşakta blokaj sağlar ve kas gevşemesine yol açar.

Buluşun bir diğer amacı, sinaptik iletimin aşırı veya yetersiz olduğu nörolojik durumlarda, sinaptik modülasyon için hedefe yönelik tedavi sağlamaktır. Buluşa konu VAMP2 kırılmış izoformu SNARE kompleksini inhibe ederek sinaptik veziküllerin sinaptik boşluğa açılmasını engeller. Bu veziküller çeşitli hastalıklarda etkili nörotransmitterleri taşıyabilir. Bu GABA gibi inhibitör (baskılayıcı) bir nörotransmitter ise izoformun sinaptik vezikül işlevini engellemesi sonucunda inhibitör fonksiyon azalır. Glutamat gibi uyarıcı bir nörotransmitter ise bloklama sonucu uyarıcı etkinlik azalır. Birçok antipsikotik ilaç, sinaptik vezikül yapılarının işlevinde dengesizliğe yol açan yapıları hedefler [3]. SNARE kompleksindeki anormalliklerin şizofreniyle ilişkili olduğu düşünülen dopaminerjik ve glutamaterjik nörotransmisyonun işlev bozukluklarının temelinde yattığı öne sürülmektedir [3]. Aynı zamanda, SNARE ilişkili nörotransmitter salımındaki mekanizmaların depresif bozukluklara katkıda bulunduğu ve bu nedenle SNARE kompleksinin antidepresan tedavi için hedef alınabileceği düşünülmektedir [8].

Kırılmış izoformların genetik sekanslarının ve transkript (cDNA) sekanslarının (DİZİ NO:3) doğal olarak organizmalarda bulunması, terapötik uygulamalarda biyolojik uyumluluk ve hedeflenmiş yaklaşımlar açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır [9]. Kesilmiş izoformlar, organizma tarafından doğal olarak tanındıkları için bağışıklık sisteminde beklenmedik reaksiyonlara yol açma riskleri düşüktür. Reaksiyon riskinin

azalmasında nedenleri arasında immün bir molekül olmaması (monoklonal antikorlar gibi) ve moleküler düzeyde simüle edilmiş etkili etkileşimlerin var olması da sayılabilir. Ayrıca, sentetik veya tamamen yeni bir proteinden (*de novo*) farklı olarak, kesilmiş izoformlar biyolojik sistemlerde daha kolay üretilebilir ve genetik terapi üretimini kolaylaştırır. Buluşa konu protein de VAMP2 kırpılmış izoformu olduğundan bağışıklık sisteminde beklenmedik reaksiyonlara yol açma riski düşük olup, organizma tarafından doğal olarak tanınmakta ve biyolojik sistemlerde kolaylıkla üretilebilmektedir.

Şekillerin Açıklaması

10 **Şekil 1.** P63027 (VAMP2) ve K7ENK9 (kırpılmış izoform) sekans hizalaması (Bu hizalama, 116 amino asit kalıntısını kapsar, P63027 referans sekansı olarak gösterilirken, K7ENK9 ise altta gösterilmiştir. Tireler (-), K7ENK9 sekansındaki boşlukları veya eksik kalıntıları gösterir. Hizalama, K7ENK9'un P63027'nin kırpılmış bir versiyonu olduğunu, ilk 45 N-terminal kalıntısını ve 3 C-terminal kalıntısını kaybettiğini, 15 ancak hizalanan bölgelerde yüksek sekans benzerliği paylaştığını ortaya koymaktadır.)

Şekil 2. VAMP2 molekülünün dimerizasyonunun buluşa konu VAMP2 kırpılmış izoformu ile inhibisyonu (Sol panelde, iki VAMP2 molekülünün fonksiyonel bir dimer oluşturmak üzere etkileşime girdiği kanonik VAMP2 homodimer yapısı 20 gösterilmektedir. Sağ panelde ise kırpılmış VAMP2 izoformunun VAMP2 dimerleşmesini nasıl engellediği, tam uzunlukta VAMP2'ye (bağlanarak inhibe olmuş bir dimer yapısı oluşturması gösterilmektedir. Paneller arasındaki ok, normal homodimerleşmeden inhibe olmuş duruma geçişi belirtmektedir. Protein yapıları, her bileşen gri metin kutuları ile etiketlenerek gösterilmiştir.)

25 **Şekil 3.** SNARE kompleksinin (PDB ID: 3HD7) [6] oluşumunun buluşa konu VAMP2 kırpılmış izoformu ile inhibisyonu (Sol panelde, SNAP25 (C ve D zincirleri), VAMP2 (A zinciri) ve STX1A (B zinciri) içeren tam formda SNARE kompleksi gösterilmektedir. Sağ panelde ise, VAMP2 izoformunun (K7ENK9) SNARE kompleksi oluşumu 30 üzerindeki inhibe edici etkisi açıklanmaktadır. VAMP2 izoformu, kompleks bileşenleri arasındaki doğru etkileşimi engelleyerek SNARE kompleksinin oluşumunu engellemektedir.)

Şekil 4. VAMP2 ve SNARE kompleksinin farklı durumlarını gösteren yapısal modeller; (a) VAMP2-Kırpılmış İzofom Heterodimeri (VAMP2 ve izoformu K7ENK9 arasındaki heterodimer, kırılmanın neden olduğu yapısal farkları ve bunun VAMP2 fonksiyonunu nasıl engelleyebileceğini vurgulamaktadır.), (b) VAMP2 Homodimeri (İki VAMP2 molekülünün homodimer oluşumu, izofom olmadan gerçekleşen kanonik protein dimerleşmesini göstermektedir.), (c) SNARE Kompleksi (VAMP2 (A zinciri), STX1A (B zinciri) ve iki zincir SNAP25'ten (C ve D zincirleri) oluşan SNARE kompleksinin tam birleşimi gösterilmektedir, bu da veziküler füzyon için gerekli olan düzenli yapıyı belirtmektedir.)

10

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Buluş, vezikül ilişkili membran proteini 2 (VAMP2) proteininin kırpılmış bir izoformunun nörotransmitter salımının seçici bir şekilde inhibe edilmesiyle nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanımı ile ilgilidir. Buluş ile VAMP2 dimerleşmesi inhibe edilerek nörotransmitter salımı modüle edilmektedir. Ayrıca buluşa konu izofom Çözünür N-etilmaleimid Duyarlı Faktör Bağlayıcı Protein Reseptörü (SNARE) kompleksinin oluşumunu düzenlemektedir. Buluş sayesinde mevcut nörolojik tedavilere kıyasla daha az yan etki ile sürdürülebilir terapötik etki sağlanmaktadır.

20 Buluşa konu izofom, kanonik (doğal) VAMP2 (DİZİ NO:2) ile yüksek bağlanma afinitesi gösteren, 68 amino asitten oluşan ve DİZİ NO:1 dizilimine sahip VAMP2 kırpılmış izoformudur (UniProt ID: K7ENK9). Bu kırpılmış izofom, hücrelerin mRNA düzenleme sırasında kullandığı bir süreç olan alternatif ekleme (splicing) mekanizmasıyla oluşur. Alternatif ekleme, bir genin farklı bölümlerini (eksonlar ve intronlar) birleştirerek mRNA'nın farklı kombinasyonlarda düzenlenmesini sağlar. Bu mekanizma sayesinde aynı gen, farklı protein izoformları üretebilir. Bu kırpılmış izoform transkriptinin pre-mRNA'sı 4 ekson ve 3 introndan oluşur, ancak kanonik (doğal) proteini üreten mRNA'da (kanonik mRNA) yer alan 1. ekson (Ensembl No: ENSE00001888549) ve 4. eksonun (Ensembl No: ENSE00001483806) büyük bir bölümü izoform mRNA'sında yer almaz. Kanonik mRNA'da yer alan bu eksonlar alternatif ekleme sonucu üretilen izoform mRNA'sında bulunmazlar. 2126 baz çiftlik uzunluğa sahip kanonik transkripte kıyasla, kırpılmış izoformun 1479 baz çifti uzunluğundaki transkriptinde (DİZİ NO:3) bulunan 4 eksonundan 2'si ise protein kodlar

(coding exon) ve 68 amino asitlik izoform proteinini (DİZİ NO:1) üretir. Kırpılmış izoform proteini, kanonik forma göre N-ucunda (protein sekansı başlangıcı) 45 amino asit eksik, C-ucunda (protein sekansı bitişi) ise 3 amino asit eksiktir (5 delesyon, 2 insersiyon).

5

Buluş için VAMP2'nin çeşitli izoformları, hesaplamalı biyoinformatik yaklaşımlarla kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. Buluşa konu izoform, DİZİ NO:2 dizilimine sahip kanonik (doğal) VAMP2'nin (UniProt ID: P63027) hesaplamalı olarak haritalanmış izoformlarının kapsamlı bir analizinden seçilmiştir. Gen-merkezli analize göre *Homo sapiens*'te VAMP2 proteinin 5 izoformu bulunmaktadır. Bu süreç, hesaplamalı yapı tahmini ve ardından haritalanmış izoformların bağlanma afinitelerini belirlemek için serbest enerji analizini içermektedir. Yapısı tahmin edilen izoform-VAMP2 komplekslerinin topoloji oryantasyonu ve uyumluluğu incelenmiştir. Topoloji oryantasyonu, molekülün (örneğin bir kanonik protein ve/veya izoform) uzaydaki yönelimini veya yerleşimini ifade eder. Proteinin veya izoformun bağlanma bölgesi, diğer moleküllerle (örneğin SNARE kompleksleri veya VAMP2 dimerleri) hangi açıdan veya doğrultuda bir etkileşim kurduğu ve bu yerleşiminin hücre zarındaki yerleşimine uygun olup olmadığı önemlidir. "Topolojiye uyumlu" modeller, şu kurallar sağlandığında tanımlanır: i) Kompleksteki her proteinin oryantasyonu, tipik bir VAMP2 oryantasyonu ile tutarlıdır; ii) Her proteinin transmembran bölgelerinin konumu, temelde mekansal olarak uyumludur [8]. Yapısal analizlerde diğer izoformların topoloji oryantasyonu uyumlu olmayanları elenmiş, kalan izoformların bağlanma afiniteleri, enerji bazlı analizler ve moleküler modelleme kullanılarak tespit edilmiştir. Bu da en uygun izoformun hızlı ve güvenilir bir şekilde seçilmesini sağlamıştır. Topoloji uyumlu modellerde kanonik (doğal) dimer için ön-test bağlanma afinitesi ortalama -40 (kcal/mol) iken, seçilmiş kırpılmış izoformda ortalama -60 (kcal/mol)'dır. En düşük bağlanma enerjisine sahip izoform, yani en yüksek afiniteyi gösteren izoform, daha ileri değerlendirme için seçilmiştir. Hesaplamalı analizde seçilen izoformun VAMP2 proteini ile bağlanma eğilimi teorik modellerle belirlenmiştir. Ancak bu bağlanma eğiliminin, gerçek biyolojik koşullarda sistemin stabilitesi ve dinamik özelliklerini etkileyip etkilemediğini anlamak için moleküler dinamik (MD) simülasyonları kullanılmıştır. Bu etkileşimleri doğrulamak amacıyla, 50 nanosaniye MD simülasyonları yapılmıştır. MD simülasyonları, izoform ile VAMP2 arasındaki bağlanma bölgesini ve moleküller

arasındaki hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri gibi kuvvetlerin zaman içerisindeki değişimini analiz etmektedir. Bu yöntem ile, izoform ile VAMP2 arasında oluşan dimerin stabilitesi ve dinamiği doğrulanmıştır. Simülasyonlar sırasında yapılan RMSF (Kök-Ortalama-Kare Fluktuasyonu) ve gyrasyon yarıçapı ölçümleri, izoform ile VAMP2 dimerinin dinamik stabilitesini ve kompaktlığını değerlendirmek için önemli veriler sağlamıştır. RMSF değerlerinin 3 Å'nin altında olması, molekülün belirli bölgelerinin özellikle bağlanma bölgesinin zaman içinde stabil ve az hareketli olduğunu göstermektedir. Bu durum, izoform ile VAMP2 arasındaki bağlanma bölgesinin dinamik kararlılığını desteklemektedir. Aynı şekilde, gyrasyon yarıçapının düşük değerlerde kalması, molekülün simülasyon boyunca yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve oluşan dimerin kompakt bir yapıda olduğunu ifade etmektedir. Bu bulgular, dimerin kararlı bir etkileşim sergilediğini ve moleküler düzeyde etkili bir bağlanma sağladığını göstermektedir. Simülasyonlar sırasında bağlanma afinitesi sürekli olarak yeniden hesaplanarak, izoformun etkinliği ve doğruluğu gösterilmiştir. Yeniden hesaplanan afiniteler, kanonik (doğal) VAMP2 dimeri ve SNARE kompleksinin afinitesiyle karşılaştırılmış ve nörotransmitter salımının etkili bir şekilde modüle edilmesi potansiyeli belirlenmiştir. Sekans verileri UniProt veri bankası ile elde edilebilir (UniProt, protein dizisi ve fonksiyonel bilgilerini içeren, kapsamlı ve ücretsiz erişilebilir bir veri tabanıdır; birçok girdi, genom dizileme projelerinden elde edilmiştir. SNARE proteinin X-ray kırını yapısı Protein Veri Bankaları (PDB) kullanılarak elde edilebilir. Bu veriler, üye organizasyonların (PDBe, PDBj ve RCSB) web siteleri aracılığıyla internet üzerinden ücretsiz olarak erişilebilir durumdadır.)

Buluşa konu izoform (DİZİ NO:1), VAMP2'nin (DİZİ NO:2) bağlanma cebine yerleşmiş ve VAMP2'nin konformasyonunda lokal değişikliklere neden olmuştur. Bu değişiklikler, VAMP2'nin diğer SNARE proteinleriyle etkileşim için uygun bir yapı oluşturmasını engellemiştir. Bu izoform, hedeflenmiş enjeksiyonlar, ileri düzey ilaç dağıtım sistemleri veya izoformu ifade etmek için genetik olarak modifiye edilmiş hücreler dahil olmak üzere çeşitli dağıtım yöntemleriyle etkilerini gösterebilir. Bu etkileşim, sadece VAMP2 dimerleşmesini inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda diğer SNARE proteinleriyle etkileşime girmesini de engeller ve nihayetinde nörotransmitter salımını bozar. Uygulama sonrasında, izoform (DİZİ NO:1), VAMP2'ye (DİZİ NO:2) bağlanarak SNARE kompleksinin oluşumu için gerekli olan heterooligomerlerin oluşumunu da engellemektedir.

Buluşa konu rekombinant DNA teknolojisinin kırılmış VAMP2 proteini büyük miktarlarda üretim için uygundur. Bu da kapsamlı araştırmalar ve terapötik kullanım için olanak tanır, klinik uygulamalar için tutarlı ve güvenilir üretim yöntemlerini garanti eder. Ayrıca, buluşa konu izoform (DİZİ NO:1) ve izoform transkripti (DİZİ NO:3), CRISPR-Cas9 gibi ileri düzey genetik mühendislik tekniklerini destekler, bu da kırılmış VAMP2 izoformunu (DİZİ NO:1, DİZİ NO:3) ifade eden hayvan modelleri ve hücre hatlarının oluşturulmasına imkan tanır. Bu modeller, biyolojik etkilerini araştırmak ve potansiyel terapötik uygulamaları keşfetmek için önemli bir rol oynamaktadır. SNARE kompleksi oluşumunu inhibe etmesi sayesinde buluş, nörotransmitter salımı üzerinde daha uzun süreli etkiler sağlayabilir ve botulinum toksinine kıyasla gerekli müdahalelerin sıklığını önemli ölçüde azaltır. Botulinum toksininin kısa etkili olmasının temel nedeni, proteinin doğası ve hücresel metabolizmadır. Botulinum toksini, sinaptik veziküllerin hücre membranına kaynaşmasında rol oynayan SNARE proteinlerini hedef alarak nörotransmitter salımını engeller [7]. Ancak toksinin etkisi zamanla azalır. Botulinum toksini, hücre içine alındıktan sonra VAMP2'yi keser. [7]. Ancak bu toksin, organizmada kalıcı değildir. Organizmada bulunan içindeki proteazlar ve diğer savunma mekanizmaları, toksini zamanla yıkar ve etkisini azaltır [10]. Aynı zamanda, hücreler, SNARE proteinlerini sürekli olarak sentezler. Botulinum toksini eski SNARE proteinlerini parçalayarak çalışsa da yeni SNARE proteinleri sentezlenip membranlara yerleştğinde nörotransmitter salımı geri döner. Buna karşılık, kırılmış izoform SNARE kompleksinin bileşenleriyle bağlanır, ancak tam kompleks oluşumuna izin vermediği için nörotransmitter salımı uzun süre inhibe edilebilir. Bunun nedeni, izoformların SNARE kompleksinin bir parçası gibi davranıp, negatif bir etki yaratmasıdır. İnsan genetik yapısında bu kırılmış izoformu kodlayan gen mevcut olduğu için izoformun üretimi hücresel gereksinimlere göre sürekli devam edebilir. Bu, dışarıdan verilen bir toksin veya ilacın zamanla metabolize edilerek etkisini kaybetmesine kıyasla daha uzun süreli bir etki sağlar. Bunun yanında kesilmiş izoformları kodlayan mRNA'lar, hedef hücrelere taşınabilir ve burada protein sentezi sağlanabilir.

30

Söz konusu izoform (DİZİ NO:1), SNARE kompleksi oluşumunu ve/veya VAMP2 dimerizasyonunu inhibe ederek nörotransmitter salımını modüle ederek;

- multipl skleroz ve serebral palsi gibi nörolojik durumlarla ilişkili kas spastisitesini hafifletir,
- fibromiyalji ve nöropatik ağrı gibi kronik ağrı sendromlarının sinyal yollarında rol oynayan nörotransmitter salımını azaltır,
- 5 - epilepsi ve Parkinson hastalığı gibi nörolojik bozuklukların yönetimi için hedeflenmiş nörotransmitter salımını modüle eder,
- aşırı terleme ve yüz estetik müdahaleleri gibi nöromüsküler blokaj gerektiren durumlar için kalıcı nöromüsküler blokaj sağlar,
- nörotransmitter salımında yer alan sinaptik yolları hedefleyerek ağrı yönetimi 10 sağlar,
- düzensiz sinaptik iletimle karakterize edilen bozukluklara karşı mevcut tedavilerinin sınırlamalarını giderir,
- araştırma ve terapötik çalışmalar için kırılmış VAMP2 izoformunu (DİZİ NO:1) kalıcı olarak ifade eden genetiği değiştirilmiş hücre hatlarının geliştirilmesini 15 kolaylaştırır,
- belirli sinaptik yolları hedefleyen yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasına olanak tanıyarak araştırma için yeni fırsatlar sunar.

20 Söz konusu izoform (DİZİ NO:1) kullanılarak terapötik etkilerin kalıcı hale getirilir ve böylece migren veya kronik ağrı sendromları gibi sürekli tedavi gerektiren kronik hastalıklarda, yüz gençleştirme ve uzun süreli kırışıklık giderme gibi estetik müdahalelerde tedavi etkinliği sağlanır, sürekli müdahaleye gerek kalmaz. Ayrıca buluşa konu izoform (DİZİ NO:1) hasta uyumunu artırarak çeşitli durumlarda tedavi 25 sonuçlarını da iyileştirmeye katkıda bulunmaktadır.

VAMP2 kırılmış izoformu (DİZİ NO:1) hedefli uygulanması yoluyla nörotransmitter salımının geri dönüşümlü olarak inhibe etmekte, bu da sinaptik aktivitenin kontrollü modülasyonuna olanak sağlamaktadır. Böylece,

- 30 - hasta özelinde doz ayarlamaları yapılarak optimal sonuçlar elde edilmekte,
- epilepsi gibi durumlarda akut nöbetler sırasında nörotransmitter salımının geçici modülasyonu sağlanmakta,
- akut ağrı epizotlarını yönetmek için geçici nörotransmitter dinamiklerinin kontrol edilmesini sağlanmaktadır.

Terapötik ve araştırma uygulamaları için kırılmış VAMP2 izoformunu (DİZİ NO:1) sürekli ifade eden genetiği değiştirilmiş hücre hatları biyolojik sistemlerde kolayca üretilir. Bu sayede,

- 5
 - çeşitli hastalık modellerinde bu izoformun nörotransmitter dinamikleri üzerindeki biyolojik etkilerini araştırmak için bu hücre hatları kullanılabilir,
 - nörotransmitter salım mekanizmalarını hedefleyen yeni terapötik bileşiklerin taranması ve ilaç geliştirme süreçlerine katkı olması için bir platform sağlanabilir,
- 10
 - ağrı yönetimi ve nöromüsküler bozukluklar için bu izoformu içeren tedavi seçenekleri üretmek üzere bu hücre hatlarının kullanılabilir,
 - sinaptik plastisite ve sinir onarım mekanizmaları üzerinde bu izoformun etkisini incelemek için bu hücre hatlarının kullanılabilir.
- 15 VAMP2 kırılmış izoformu (DİZİ NO:1) özelliklerinden yararlanarak geleneksel nöroinhibitör tedavilerle ilişkili yan etkileri en aza indirerek tedavi etkinliğini artırılmaktadır. Tedavi etkinliğinin artırılması sayesinde;
 - anksiyete bozuklukları, depresyon ve diğer ilişkili durumların yönetimi sağlanmakta,
- 20
 - nörodejeneratif hastalıklarda, örneğin Alzheimer ve Huntington hastalıklarında, nörotransmitter salımı stabilize edilerek tedavide iyileştirme sağlanmakta,
 - daha düşük ilaç dozlarının kullanılması mümkün olmakta, bu da kronik durumlara sahip hastalarda yan etki riskini azaltmaktadır.
- 25 Nörorehabilitasyon stratejilerinde VAMP2 kırılmış izoformu (DİZİ NO:1) kullanılarak nörotransmitter salımının modülasyonu ile nörolojik bozuklukların da iyileşmesini desteklemektedir. Dolayısıyla buluş ile nörotransmitter salımının modülasyonu sayesinde;
 - etkilenen beyin bölgelerinde sinaptik plastisite ve iyileşme sonuçlarını artırarak
- 30
 - bilişsel işlev ve motor becerileri geliştirmekte,
 - felç hastalarında nöral rejenerasyon ve onarımı destekleyerek iyileşme sürecini kolaylaştırmakta,
 - travmatik beyin hasarından (TBI) iyileşen hastalarda rehabilitasyon sonuçlarını iyileştirmektedir.

Sinaptik disfonksiyonla ilişkili durumlar için hedeflenmiş tedaviler geliştirmek amacıyla VAMP2 kırılmış izoformu (DİZİ NO:1) kullanılabilir. VAMP2 kırılmış izoformu (DİZİ NO:1) kullanımı;

- 5
 - anksiyete bozuklukları olan hastalar için nörotransmitter salımını seçici olarak modüle ederek tedavi sonuçlarını iyileştirmekte,
 - nörodejeneratif hastalıklarda sinaptik aşırı aktiviteyi azaltarak Alzheimer hastalarına semptomatik rahatlama sağlamaktadır.
- 10 Nörotransmitter salımında yer alan belirli protein-protein etkileşimlerini inhibe etmek için VAMP2 kırılmış izoformuna (DİZİ NO:1) dayalı farmakolojik ajanlar elde edilebilir. Buna bağlı olarak;
 - SNARE kompleksi oluşumunu hedef alan farmakolojik ajanlar geliştirilebilir ve kronik ağrı koşullarının tedavisinde yeni bir yaklaşım sunulabilir,
- 15
 - VAMP2 dimer oluşumunu hedef alan farmakolojik ajanlar geliştirilebilir ve kronik ağrı koşullarının tedavisinde yeni bir yaklaşım sunulabilir,
 - sinaptik iletimin düzensiz olduğu durumlarda nörotransmitter dinamiklerini modüle eden farmakolojik ajanlar geliştirilebilir.
- 20 Belirli nöronal yollarda nörotransmitter salımını seçici olarak inhibe etmek için VAMP2 kırılmış izoformundan (DİZİ NO:1) türetilmiş terapötik peptitler geliştirilebilir ve bu terapötik peptitler;
 - multipl skleroz ile ilişkili spastisite müdahalelerinde kullanılabilir,
 - sinaptik aktiviteyi modüle ederek nöromusküler bozuklukların iyileşmesini
- 25 desteklemek için kullanılabilir.

VAMP2 kırılmış izoformu (DİZİ NO:1) ve izoform transkripti (DİZİ NO:3) nörotransmitter salımını kalıcı olarak modüle etmek için gen tedavisi uygulamalarında da kullanılabilir. Bu gen tedavisi yaklaşımı;

- 30
 - epilepsi gibi durumlar için uzun vadeli bir çözüm sunarak nöbet sıklığını ve şiddetini azaltabilir,

- beyin yaralanmalarından iyileşmeyi destekleyerek stabil nörotransmitter sinyalini teşvik edebilir.

REFERANSLAR

- 5 [1] Teleanu, R. I., Niculescu, A. G., Roza, E., Vladâcenco, O., Grumezescu, A. M., & Teleanu, D. M. (2022). Neurotransmitters—key factors in neurological and neurodegenerative disorders of the central nervous system. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 5954.
- [2] Rizo, J., 2022. Molecular mechanisms underlying neurotransmitter release. *Annual Review of Biophysics*, 51(1), pp.377-408.
- 10 [3] Chen, F., Chen, H., Chen, Y., Wei, W., Sun, Y., Zhang, L., ... & Wang, Y. (2021). Dysfunction of the SNARE complex in neurological and psychiatric disorders. *Pharmacological Research*, 165, 105469.
- [4] Alonge, P., Brighina, F., Maccora, S., Pilati, L., Di Marco, S., Ventimiglia, D., ... & Torrente, A. (2024). Beyond Pain: The Effects of OnabotulinumtoxinA Therapy on Sensitization and Interictal Symptoms in Chronic Migraine. *Toxins*, 16(5), 203.
- 15 [5] Melland, H., Arvell, E. H., & Gordon, S. L. (2021). Disorders of synaptic vesicle fusion machinery. *Journal of neurochemistry*, 157(2), 130-164.
- [6] Stein, A., Weber, G., Wahl, M. C., & Jahn, R. (2009). Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature*, 460(7254), 525-528.
- 20 [7] Corsalini, M., Inchingolo, F., Dipalma, G., Wegierska, A. E., Charitos, I. A., Potenza, M. A., ... & Santacroce, L. (2021). Botulinum neurotoxins (BoNTs) and their biological, pharmacological, and toxicological issues: A scoping review. *Applied Sciences*, 11(19), 8849.
- [8] Li, M., Qing, R., Tao, F., Xu, P., & Zhang, S. (2024). Inhibitory effect of truncated isoforms on GPCR dimerization predicted by combinatorial computational strategy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 23, 278-286.
- 25 [9] Karagöl, A., Karagöl, T., Li, M., & Zhang, S. (2024). Inhibitory Potential of the Truncated Isoforms on Glutamate Transporter Oligomerization Identified by Computational Analysis of Gene-Centric Isoform Maps. *Pharmaceutical research*, 41(11), 2173–2187.

- [10]** Rossetto, O., Pirazzini, M., & Montecucco, C. (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 12(8), 535-549.