



# **A KANNABINOID ÉS MU OPIOID RECEPTOROKON HATÓ HETERODIMERIZÁLT ÉS ALLOSZTÉRIKUS LIGANDUMOK**

című Ph.D. értekezés téziseinek összefoglalója

**Dvorácskó Szabolcs**

Témavezető: Dr. Tömböly Csaba

Kémiai Biológia Csoport  
Biokémiai Intézet  
Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola  
Általános Orvostudományi Kar  
Szegedi Tudományegyetem

Szeged  
**2019**



## BEVEZETÉS

A mu opioid receptor (MOR) agonisták a klinikumban leggyakrabban használt gyógyszerek a súlyos fájdalom enyhítésére. Azonban a dózis-függő káros mellékhatásaik miatt új fájdalomcsillapítók fejlesztésére van szükség. A kannabinoid (CB) receptor agonisták befolyásolhatják a hiperalgéziát és hatékony terápiás hatást mutatnak a gyulladáso és krónikus fájdalom kezelésében, beleértve a neuropátiás fájdalmat. Kimutatták, hogy a MOR és a CB receptor agonisták együttes alkalmazása fokozza az antinociceptív hatást, csökkent opiát-függő mellékhatások mellett. Az opioid és kannabinoid ligandumok szinergizmusát egerekben, patkányokban, rhesus majmokban széles körben tanulmányozták, valamint alkalmazott kísérleti fájdalom modellben is önkéntes tesztalanyokon. Az opioid és kannabinoid receptorok lehetséges receptor dimerizációs kölcsönhatásából kiindulva bivalens vegyületekkel, azaz távtartókkal összekapcsolt farmakofórokkal az opioid mellékhatásokat csökkenthetők. A MOR agonista fentanil és a CB1 antagonist / inverz agonista rimonabant konjugálása MOR-CB antagonistákat eredményezett. Egy enkefalin-származék peptid és a rimonabant összekapcsolása a fájdalomcsillapító hatások elvesztéséhez vezetett a „hot plate” (forró lap) és „tail flick” (farokvisszahúzás) tesztekben. Ezzel szemben az MOR

agonista  $\alpha$ -oximorfaminból és a rimonabant analógból előállított bivalens vegyületek fájdalomcsillapító hatást mutattak „tail flick” tesztben, 24 órán belüli tolerancia kialakulása nélkül. A kombinációs kezelések másik fontos célja az opioidok hatásos dózisének csökkentése, különösen súlyos krónikus fájdalmak kezelésében. Ez potenciálisan az opioid agonisták és a kannabinoid agonisták kombinációjával érhető el.

Annak érdekében, hogy a MOR és a CB-receptorokat egyetlen vegyülettel lehessen célozni, bivalens ligandumokat állítottunk elő, amelyek MOR és CB-agonistából álltak. Az egyik csoportban a súlyos fájdalom kezelésében széles körben alkalmazott MOR agonista oxikodont alkalmaztuk. A másik csoport az enkefalin analóg Tyr-D-Ala-Gly-Phe tetrapeptidet tartalmazza, mint opioid-farmakofórt. Mindkét opioid agonistát a teljes CB-agonista naftalen-1-il-(1-pentil-1*H*-indol-3-il)-metanonnal (JWH-018) kombináltuk. Ez az indol típusú kannabimimetikum mind a CB1, mind a CB2 receptorokhoz alacsony nanomoláris affinitással kötődik, és *in vivo* kannabinoid farmakológiai hatásokat mutat.

A nemrégiben felfedezett  $\alpha$ -hemoglobinból származó hemopresszinekről megállapították, hogy endogén negatív alloszterikus modulátorai és agonista / inverz agonista ligandumai a CB1 receptoroknak. Ezen peptidekről *in vitro* és *in vivo* körülmények között is kimutatták, hogy a prototipikus endogén és

szintetikus kannabinoid ligandumokhoz hasonló farmakológiai hatással rendelkeznek, azonban kevesebb mellékhatást mutatnak. Ennek megfelelően a hemopresszinek kiváló vezérvegyületeknek tűnnek az endokannabinoid rendszer vizsgálatára szolgáló peptid típusú kutatási eszközök kifejlesztéséhez.

Ezen kedvező tulajdonságok és az a tény, hogy a csonkított Hp(1–7) peptid *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban ugyanolyan hatásosnak bizonyult, mint a Hp(1–9), a Hp(1–7) heptapeptidet kiválasztottuk radioaktív jelölésre. A kapott új radioligandumot különböző radioligandum kötődési vizsgálatokban vizsgáltuk a Hp(1-7) és a CB receptorok kölcsönhatásának jellemzése céljából.

## CÉLKITŰZÉSEK

A MOR agonisták a leggyakrabban használt fájdalomcsillapítók súlyos fájdalmak enyhítésére. Ugyanakkor a dózis-függő mellékhatásaik, mint a légzési depresszió, szedáció, székrekedés, tolerancia és a függőség korlátozzák a használatukat, ezért az új fájdalomcsillapítók fejlesztése szükséges. A kombinációs terápia bizonyítottan hatékony a fájdalomcsillapító hatások javítására a mellékhatások additív emelkedése nélkül. A MOR és a CB receptor agonisták együttes adagolásánál fokozott antinociceptív hatást mutattak ki, csökkent ópium mellékhatás profil mellett, és az opioid és a kannabinoid ligandumok szinergizmusát széles körben tanulmányozták az antinociceptív hatás növelésének céljából.

Kutatásaink során a következő célokat tűztük ki:

- Két különböző típusú bivalens ligandum sorozat tervezése és előállítás, melyek kölcsönhatásba lépnek mind a MOR, mind a CB receptorokkal.
- A bivalens ligandumok kannabinoid farmakofórijának (JWH-018) és a csonkított hemopresszin heptapeptidnek (Hp1-7) tríciummal való jelölése direkt *in vitro* receptorkötődésük jellemzésére patkány és egér agy membrán homogenizátumon.

- A klasszikus CB ligandumok és a hemopresszinek kötési helyeinek összehasonlítása kompetíciós kötési vizsgálatokban [<sup>3</sup>H]JWH-018 és [<sup>3</sup>H]Hp(1-7) alkalmazásával.
- Az előállított bivalens ligandumok és a hemopresszinek receptorokhoz való affinitásának és szelektivitásának tanulmányozása kötési vizsgálatokban.
- A bivalens vegyületek és hemopresszinek agonista / antagonist tulajdonságainak és MOR, CB1 / CB2 által közvetített jelátviteli folyamatainak tanulmányozása ligand stimulált [<sup>35</sup>S]GTPyS funkcionális mérésekkel.
- Kiválasztott bivalens vegyületek vér-agy gáton történő diffúziójának vizsgálata *in vitro* körülmények között.
- Az *in vitro* mérések alapján leghatékonyabb bivalens ligandumok *in vivo* antinociceptív hatásainak vizsgálata.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### **Monomer- és bivalens vegyületek előállítás**

Az oxikodon - JWH-018 (10-12) és a peptid-JWH-018 (18-21) bivalens vegyületeket konvergens módon állítottuk elő, és az opioid és kannabinoid farmakofórok konjugálását különböző hosszúságú és polaritású távtartókkal (2-13 atom) valósítottuk meg. Az 1-25 vegyületek előállításának és analitikai jellemzésének részletei a Ph.D. értekezés mellékletében található.

### **Hemopresszinek előállítása szilárd hordozón**

A Hp(1-7),  $\Delta\text{Pro}^1\text{-Hp}(1-7)$ , Hp(1-9) és az RVD-Hp(1-9) peptideket szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő Boc / Bzl vagy Fmoc / *t*-Bu kémia alkalmazásával.

### **JWH-018 és hemopresszin(1-7) radioaktív jelölése**

A JWH-018-at és a  $\Delta\text{Pro}^1\text{-Hp}(1-7)$  prekursor peptidet tríciummal jelöltük heterogén katalitikus körülmények között.

### **Az új CB receptor radioligandumok [ $^3\text{H}$ ]JWH-018 és [ $^3\text{H}$ ]hemopresszin(1-7) jellemzése**

A [ $^3\text{H}$ ]JWH-018 és [ $^3\text{H}$ ]hemopresszin(1-7) radioligandumokat kompetíciós vizsgálatokban való alkalmazásuk előtt különböző *in vitro* receptor kötési kísérletekben jellemeztük. Asszociációs és disszociációs kinetikai kísérleteket végeztünk patkány agy homogenizátumon a [ $^3\text{H}$ ]JWH-018 és a [ $^3\text{H}$ ]hemopresszin(1-7)



membrán receptorokkal való kölcsönhatásának jellemzésére. Ezután telítési kísérleteket végeztünk patkány és CB1 KO egér agy homogenizátumon a disszociációs egyensúlyi állandó ( $K_d$ ) és receptor sűrűség ( $B_{max}$ ) értékek meghatározásához.

### **Radioligand kötési tesztek**

A monomer- és bivalens vegyületek szerkezeti változásainak a biológiai aktivitásra gyakorolt hatását radioligand kötési tesztekben vizsgáltuk és értékeltük az új szintetikus vegyületek receptor affinitását és szelektivitását.

### **Radioligand kompetíciós kötési tesztek**

A szintetikus vegyületek opioid receptorokhoz való affinitását MOR ( $[^3H]$ DAMGO), DOR ( $[^3H]$ Ile<sup>5,6</sup>-deltorphin-2) és KOR ( $[^3H]$ HS-665) szelektív radioligandumokkal szemben vizsgáltuk, illetve a CB receptorokhoz való affinitásuk meghatározásához a  $[^3H]$ JWH-018 és  $[^3H]$ WIN-55,212-2 specifikus kötéseinek változását vizsgáltuk patkány- vagy tengerimalac agy membrán homogenizátumon. Ezután a klasszikus CB receptor ligandumok és hemopresszinek (Hp(1-7), Hp(1-9), RVD-Hp(1-9)) affinitását vizsgáltuk  $[^3H]$ Hp(1-7) radioligandummal szemben patkány és CB1 KO egér agy membrán homogenizátumon.

### **Ligand stimulált $[^{35}S]$ GTP $\gamma$ S funkcionális kötési teszt**

A bivalens vegyületek és hemopresszinek jelátviteli tulajdonságait ligandum-stimulált  $[^{35}S]$ GTP $\gamma$ S funkcionális kötési tesztekben

vizsgáltuk patkány és CB1 KO egér agy membrán homogenizátumon.

A **11** és **19** vegyületek által aktivált MOR és/vagy CB1/CB2 receptorok által közvetített jelátvitel meghatározása céljából a G-fehérje aktivációt antagonisták jelenléte nélkül vagy jelenlétében vizsgáltuk (10  $\mu$ M naloxon, 10  $\mu$ M rimonabant vagy 10  $\mu$ M AM 630) patkány agy membrán homogenizátumon.

## EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS KONKLÚZIÓ

- ✓ Két különböző típusú opioid (oxikodon vagy Tyr-D-Ala-Gly-Phe)-kannabinoid (JWH-018) bivalens ligandum sorozatot terveztünk, szintetizáltunk és *in vitro* radioligandum kötési vizsgálatokban jellemeztünk, majd funkcionális [<sup>35</sup>S]GTPγS kötés tesztekben és *in vivo* antinociceptív tesztben vizsgáltunk.
- ✓ Két új CB radioligandumot, [<sup>3</sup>H]JWH-018 és [<sup>3</sup>H]Hp(1-7) állítottunk elő és validáltunk.
- ✓ Azt tapasztaltuk, hogy a [<sup>3</sup>H]JWH-018 nagy affinitással ( $K_d = 6,5$  nM) és gyors kinetikával kötődött a CB receptor kötőhelyhez, és magas receptor-sűrűséget mutatott ( $B_{max} = 1120 \pm 89$  fmol / mg protein). A leszorításos receptorkötési vizsgálatokban a [<sup>3</sup>H]JWH-018 versengett a klasszikus ortosztérikus CB receptor ligandumokkal a kötőhelyért, viszont a hemopresszinek és opioid ligandumok esetében nem volt megfigyelhető ez a kompetíció.
- ✓ [<sup>3</sup>H]Hp(1-7) telítési kötődést mutatott patkány- és CB1 KO egér agy membrán homogenizátumon is. A receptorhoz kötődött [<sup>3</sup>H]Hp(1-7)-t nem tudta egyik kannabinoid ligandum (JWH-018, rimonabant, AM251) sem leszorítani a kötőhelyéről.
- ✓ Az oxikodon C-6 szubsztitúciója nem befolyásolta szignifikánsan a MOR kötődést és a MOR szelektivitást, de a KOR affinitás elvesztéséhez vezetett. A növekvő hosszúságú és polaritású

távtartók bevezetése kissé csökkentette a MOR affinitást és szelektivitást.

- ✓ A terminális karboxil, amino és acilamido funkciós csoportok beépítése a JWH-018 pentil-láncához 73-szoros, 55-szeres és 43-szoros CB-receptor affinitásvesztést eredményezett.
- ✓ A funkcionális kötési vizsgálatok azt mutatták, hogy az oxikodon C-6 szubsztitúciója és a távtartók konjugálása az említett pozícióba csökkentette a G-fehérje aktiválás hatékonyságát, és gyenge részleges agonistákhoz vezetett.
- ✓ A teljes agonista JWH-018 karboxil, amino vagy acilamido csoporttal történő módosítása inverz agonista vagy antagonistá ligandumokat eredményezett.
- ✓ Leszorításos receptorkötési vizsgálatokban a **10** és **12** bivalens vegyületek MOR affinitása és szelektivitása kismértékben csökkent, a CB receptor affinitásuk alacsonyabb volt.
- ✓ A **18**, **20**, **21** bivalens vegyületek MOR affinitása és szelektivitása csökkent, és ugyanígy a CB receptor affinitása is.
- ✓ A funkcionális kötési vizsgálatokban a **10** és **12** bivalens vegyületeket antagonistáknak találtuk, míg a **18**, **20** és **21** részleges agonistaként működtek.
- ✓ A kompetíciós mérések alapján a **11** ( $K_i$  (MOR)= 34 nM;  $K_i$  (CB)= 34 nM) és a **19** ( $K_i$  (MOR)= 2.1 nM;  $K_i$  (CB) = 251 nM)

vegyületek mutatták a legnagyobb affinitást mind a MOR, mind a CB receptorokhoz.

- ✓ Funkcionális kötési vizsgálatokban azt találtuk, hogy az **11**-es agonista bivalens vegyület a G-fehérje aktiválódását a MOR és CB2 receptorokon keresztül fejtette ki, míg az **19**-es agonista bivalens vegyület a G-fehérje aktivációját a MOR és CB1 receptorokon keresztül fejtette ki.
- ✓ Két agonista dimerizációja *in vivo* aktív agonista bivalens vegyületet (**11** és **19**) eredményezett antiallodiniás hatással.
- ✓ Spinális szinten patkány krónikus osteoarthritis fájdalom modellben a bivalens **11** és **19** vegyület 20 µg dózisban a kiindulási hatóanyagokkal azonos hatékonyságúnak bizonyult.
- ✓ Mivel a MOR és a CB receptor agonisták hatékonyan alkalmazhatók a krónikus fájdalom kezelésében, beleértve a neuropátiás fájdalmat, ezek az eredmények segíthetnek többcélpontú fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésében.
- ✓ A jövőben a hemopresszin peptid családot bivalens molekulákban alkalmazhatjuk CB receptort célzó molekuláreszként, valószínűleg kannabinoid mellékhatások nélkül.

## PUBLIKÁCIÓK

### *Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:*

I. Dvorácskó, Sz., Keresztes, A., Mollica, A., Stefanucci, A., Macedonio, G., Pieretti, S., Zádor, F., Walter, F., Deli, M., Kékesi, G., Bánki, L., Tuboly, G., Horváth, Gy., Tömböly, Cs. **Preparation of bivalent agonists for targeting the mu opioid and cannabinoid receptors** *Eur. J. Med. Chem.* submitted (2019).

II. Dvorácskó, Sz., Tömböly, Cs., Berkecz, R., Keresztes, A. **Investigation of the receptor binding and functional characteristics of hemopressin(1-7).** *Neuropeptides* **58**, 15-22 (2016). **IF: 2,915**

III. Dvorácskó, Sz., Stefanucci, A., Novellino, E., Mollica, A. **Design of multi target ligands for chronic and neuropathic pain.** *Future Med. Chem.* **7**, 2469-83 (2015). **IF: 3,969**

### **További közlemények:**

1. Mollica, A., Mirzaie, S., Costante, R., Carradori, S., Macedonio, G., Stefanucci, A., Dvorácskó, Sz., Novellino, E. Exploring the biological consequences of conformational changes in aspartame models containing constrained analogues of phenylalanine. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31**, 953-63 (2016). **IF: 3,638**

2. Monti, L., Stefanucci, A., Pieretti, S., Marzoli, F., Fidanza, L., Mollica, A., Mirzaie, S., Carradori, S., De Petrocellis, L., Schiano, M. A., Benyhe, S., Zádor, F., Szűcs, E., Ötvös, F., Erdei, A., Samavati, R., Dvorácskó, Sz., Tömböly, Cs., Novellino, E. Evaluation of the analgesic effect of 4-anilidopiperidine scaffold containing ureas and carbamates. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **31**, 1638-47 (2016). **IF: 3,638**

3. Stefanucci, A., Costante, R., Macedonio, G., Dvorácskó, Sz., Mollica, A. Cysteine-, methionine- and seleno-cysteine-proline chimeras: Synthesis and their use in peptidomimetics design. *Curr. Bioact. Comp.* **12**, 200-206 (2016). **IF: 0**
4. Szűcs, E., Dvorácskó, Sz., Tömböly, Cs., Büki, A., Kékesi, G., Horváth, Gy., Benyhe, S. Decreased CB receptor binding and cannabinoid signaling in three brain regions of a rat model of schizophrenia. *Neurosci. Lett.* **633**, 87-93 (2016). **IF: 2,159**
5. Mollica, A., Pelliccia, S., Famigliani, V., Stefanucci, A., Macedonio, G., Chiavaroli, A., Orlando, G., Brunetti, L., Ferrante, C., Pieretti, S., Novellino, E., Benyhe, S., Zádor, F., Erdei, A., Szűcs, E., Samavati, R., Dvorácskó, Sz., Tömböly, Cs., Ragno, R., Patsilinakos, A., Silvestri, R. Exploring the first Rimonabant analog-opioid peptide hybrid compound, as bivalent ligand for CB1 and opioid receptors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 444-451 (2017). **IF: 3,638**
6. Nagy-Grócz, G., Zádor, F., Dvorácskó, Sz., Bohár, Zs., Benyhe, S., Tömböly, Cs., Párdutz, Á., Vécsei, L. Interactions between the Kynurenine and the Endocannabinoid System with Special Emphasis on Migraine. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, e1617 (2017). **IF: 3,687**
7. Adamska-Bartłomiejczyk, A., Borics, A., Tömböly, Cs., Dvorácskó, Sz., Lisowski, M., Kluczyk, A., Wołczański, G., Piekielna-Ciesielska, J., Janecka, A. Synthesis, receptor binding studies, optical spectroscopic and in silico structural characterization of morphiceptin analogs with cis-4-amino-L-proline residues. *J. Pept. Sci.* **23**, 864-870 (2017). **IF: 1,969**
8. Leone, S., Recinella, L., Chiavaroli, A., Martinotti, S., Ferrante, C., Mollica, A., Macedonio, G., Stefanucci, A., Dvorácskó, Sz.,

Tömböly, Cs., De Petrocellis, L., Vacca, M., Brunetti, L., Orlando, G. Emotional disorders induced by Hemopressin and RVD-hemopressin( $\alpha$ ) administration in rats. *Pharmacol. Rep.* **69**, 1247-1253 (2017). **IF: 2,787**

9. Ferrante, C., Recinella, L., Leone, S., Chiavaroli, A., Di Nisio, C., Martinotti, S., Mollica, A., Macedonio, G., Stefanucci, A., Dvorácskó, Sz., Tömböly, Cs., De Petrocellis, L., Vacca, M., Brunetti, L., Orlando, G. Anorexigenic effects induced by RVD-hemopressin( $\alpha$ ) administration. *Pharmacol. Rep.* **69**, 1402-1407. (2017). **IF: 2,787**

10. Stefanucci, A., Novellino, E., Macedonio, G., Dimmito, M. P., Mirzaie, S., Cardoso, F. C., Lewis, R., Zádor, F., Erdei, A., Dvorácskó, Sz., Tömböly, Cs., Benyhe, S., Pieretti, S., Minosi, P., Mollica, A. Design, synthesis and biological profile of mixed opioid agonist/N-VGCC blocker peptides. *New J. Chem.* **42**, 5656-5659 (2018). **IF: 3,201**

11. Recinella, L., Chiavaroli, A., Ferrante, C., Mollica, A., Macedonio, G., Stefanucci, A., Dimmito, M. P., Dvorácskó, Sz., Tömböly, Cs., Brunetti, L., Orlando, G., Leone, S. Effects of central RVD-hemopressin( $\alpha$ ) administration on anxiety, feeding behavior and hypothalamic neuromodulators in the rat. *Pharmacol. Rep.* **70**, 650-657 (2018). **IF: 2,787**

12. Stefanucci, A., Macedonio, G., Dvorácskó, Sz., Tömböly, Cs., Mollica, A. Novel Fubinaca/Rimonabant hybrids as endocannabinoid system modulators. *Amino Acids.* **50**, 1595-1605 (2018). **IF: 2,906**

13. Leone, S., Ferrante, C., Recinella, L., Chiavaroli, A., Mollica, A., Tömböly, Cs., Stefanucci, A., Dimmito, M. P., Dvorácskó, Sz., Verratti, V., De Petrocellis, L., Orlando, G., Brunetti, L. Effects of



RVD-hemopressin ( $\alpha$ ) on feeding and body weight after standard or cafeteria diet in rats. *Neuropeptides*. **72**, 38-46 (2018). **IF: 2,915**

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Tömböly Csabának szeretném megköszönni, hogy lehetőséget adott arra, hogy ezt a munkát elvégezzem a Kémiai Biológia Laboratóriumában, és minden kedves támogatást, javaslatot és útmutatást az egész tanulmányom során.

Nagyon hálás vagyok Dr. Keresztes Attilának az önzetlen támogatásért és felügyeletért, valamint az *in vitro* technikák tanításáért.

Szeretném megköszönni Dr. Adriano Mollicának, hogy lehetővé tette, hogy kísérleteket végezzenek a laboratóriumában és a sikeres együttműködésért.

Nagyon köszönöm a Kémiai Biológiai Laboratórium tagjainak a segítségüket és kedvességüket.

Hálás vagyok Dr. Zádor Ferencnek és Dr. Benyhe Sándornak a segítségért.

Szeretném megköszönni Dr. Horváth Gyöngyinek és munkatársainak az új ligandumok *in vivo* és Dr. Deli Máriának és csoportjának az *in vitro* vér-agy-gát méréseket.

Köszönöm Prof. Dr. Jancsó Gábornak a motivációt és a hasznos tanácsokat.

Szeretném megköszönni a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézetének, hogy 3 éves ösztöndíjat adott nekem e tanulmányok elvégzéséhez.

Szeretném megköszönni Dr. Tóth Anitának és Varga Tibornak a Nemzeti Szakértői és Kutató Központban való segítséget a szintetikus kannabinoid kutatások terén.

Végül külön köszönet a családomnak és a feleségemnek türelmükért és minden támogatásért.