

**BIOLÓGIAILAG AKTÍV PEPTIDEK, VALAMINT
PEPTID- ÉS FEHÉRJE-FRAGMENTUMOK
SZINTÉZISE ÉS RADIOAKTÍV JELÖLÉSE**

Ph.D. értekezés tézisei

Szemenyei Erzsébet

Témavezető: Dr. Tóth Géza

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézet

Szeged

2008

„Az élet igazi,
nagy vállalkozásai legtöbbször nem hőstettek,
hanem türelemjátékok.”

- Márai Sándor -

BEVEZETÉS

1913-ban a bécsi egyetemen Hevesy György Fritz Panethtel először alkalmazta a radioaktív kémiai nyomjelzést ólom vegyületeken. A radioaktív nyomjelzés alapja az, hogy kémiai és biológiai folyamatokban egy elem inaktív és radioaktív módosulatai azonos módon viselkednek. Ha egy anyagba vagy szövetbe egy kémiai elem sugárzó változatát juttatjuk be, akkor a sugárzás segítségével az adott elem útját nyomon követhetjük.

A radioaktív nyomjelzők alkalmazása széleskörű az élettudományok területén. Egyes biokémiai vizsgálatokhoz, úgymint az autoradiográfia vagy az immunoassay, nélkülözhetetlenek a jelzett vegyületek. Ugyanakkor napjainkban a radionuklidok másik jelentős felhasználója az orvostudomány. A nukleáris medicina a diagnosztikában és a terápiában egyaránt alkalmazza a radioaktív izotópokat nyomjelzőként vagy terápiás eszközöként.

A kutatási munka során opioid peptidek és analógjaik, valamint peptid- és fehérje-fragmentumok szintézisét és nyomjelzését végeztük el különböző radioizotópok (^3H , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$) alkalmazásával. Ennek megfelelően a kutatási munka az alábbi három fő részre tagolható:

1. Egy endomorfín-2 analóg, a Dmt-endomorfín-2, valamint egy zebrahalból izolált enkefalin típusú heptapeptid, a Met-Enkefalin-Gly-Tyr (MEGY) és analógjainak szintézise, radioaktív jelölése.

a.) Az endomorfínok, endomorfín-1 ($\text{H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH}_2$) és endomorfín-2 ($\text{H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH}_2$) nagy affinitással és szelektivitással rendelkeznek a μ -opioid receptorra vonatkozóan. A nagyobb biológiai aktivitás és enzinstabilitás elérése érdekében az endomorfín-2 esetében 2',6'-dimetil-tirozint építettünk be az egyes helyzetű tirozin helyett. A megfelelő prekursor peptidekből kiindulva, tríciumot építettünk be az első (Dmt) és a második (Pro) pozícióba, majd ezen újonnan előállított eszközök segítségével vizsgáltuk meg a Dmt-endomorfín-2

stabilitását a radioreceptor-kötési körülmények (patkánygy homogenizátum) között.

b.) A zebrahal jó modellszervezetként ismert nemcsak a gerincesek biológiai folyamatainak vizsgálatához, hanem számos toxikus anyag, drog hatásának tanulmányozásához is. A zebrahal öt opioid prekursor génje homológ az emlős opioid propeptid génekkel, és közülük az egyik (a zebrahal-proenkefalin gén) kódol egy új heptapeptidet, a Met-Enkefalin-Gly-Tyr-t (MEGY-t). A farmakológiai tulajdonságok vizsgálatához ennek az új heptapeptidnek a szintézisét végeztük el, majd ezt követően megjelöltük tríciummal. Ezenkívül a MEGY két további analogját is elkészítettünk, amelyek a (D-Ala²)-MEGY és a (D-Ala²,Val⁵)-MEGY.

2. Egy lehetséges bioszintetikus út vizsgálata: az endomorfinek in vivo szintézise patkány agykamrába injektált ³H-Tyr-Pro dipeptidből.

Az endomorfín-1 (H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) és endomorfín-2 (H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) μ -opioid receptor agonista tetrapeptidek. Míg más opioid peptidek bioszintetikus képződési útja régóta tisztázott, addig az 1997-ben izolált tetrapeptidek bioszintetikus eredetét homály fedi. Alapulvéve azt a hipotézist, mely szerint egy oligopeptid enzimatisz uton is képződhet fragmentjeiből, megpróbáltuk nyomon követni, vajon tríciummal jelzett Tyr-Pro dipeptid patkány agykamrába történő injektálását követően izolálhatók-e radioaktív endomorfinek, illetve endomorfínhoz hasonló peptidek.

A továbbiakban radioimmunoesszé dolgoztunk ki endomorfín-2-re. Antitesteket termeltettünk nyulakban endomorfín-2-hemocianin konjugátum ellen, majd az antiszérum validálása, szelektivitásának körvonalazása után ¹²⁵I-jelzett endomorfín-2 alkalmazásával patkánygy kivonatok RP-HPLC frakcióit vizsgáltuk.

3. Egy annexin-V fragmentum és módosított származékainak szintézise és radioaktív jelölése.

A programozott sejthalál (apoptózis) folyamatának megértése és nyomonkövetése a radiógyógyszer-kémia, az onkológia és a kardiológia egyik legérdekesebb kérdése.

Jól ismert, hogy az apoptotikus sejtek felszínén a foszfatidil-szerin mennyisége statisztikusan megnő, és ehhez a foszfolipidhez specifikusan kötődhet az annexin-V, amely egy 320 aminosavból felépülő fehérje. Ez lehetőséget ad arra, hogy kifejlesszünk egy ^{99m}Tc -jelzett nyomjelző molekulát. Az eddigi vizsgálatok azt mutatták, hogy maga az annexin-V fehérje túlságosan nagyméretű ahhoz, hogy megfelelő eszköz lehessen a mindennapi klinikai alkalmazásban. Ugyanakkor az irodalomban leírt eddigi eredmények alapján az annexin családba tartozó fehérjék esetében valószínűsíthető az N-terminális szekvenciaszakasz biospecifitása. Ezt figyelembevéve elvégeztük az annexin-V 13 aminosavból álló N-terminális fragmentjének (Anx-13) szintézisét, ezt követően pedig, mivel az újfajta ^{99m}Tc -jelzési módszerekhez további funkciós csoportok bevitele szükséges, a 13 aminosavból álló annexin-V fragmentum mellett készítettünk hisztidinnel, ciszteinnel, két ciszteinnel és hidrazino-nikotinsavval (HYNIC) módosított fragmentumokat is. Az Anx-13-at az izonitril 4+1 ^{99m}Tc -jelzési módszerhez, a His-Anx-13-at a trikarbonil, a HYNIC-Anx-13-at a HYNIC, míg a Cys-Anx-13-at és a Cys-Cys-Anx-13-at a nitrido jelzési módszerhez terveztük.

LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK

1. • a.) A trícium beépítése a Dmt¹-endomorfín-2 első (Dmt) és második (Pro) aminosav pozíciójába elegendően nagy fajlagos aktivitást eredményezett. A [$^3\text{H}_2$]-Dmt¹-EM2 esetében 2.88 TBq/mmol (77.8 Ci/mmol), míg a [$^3\text{H}_2$]-Pro-Dmt¹-EM2 esetében 1.95 TBq/mmol (52.8 Ci/mmol) volt. A megjelölt aminosavak mindkét esetben több mint 90 %-ban tartalmazták a jelet. A Dmt¹-EM2 ($t_{1/2}$: 33,64 min) több mint hatszor stabilabbnak bizonyult a peptidázokkal szemben az eredeti EM2-höz ($t_{1/2}$: 5.88 min) képest patkánygyomorfiumban (fehérje tartalom: 5,92

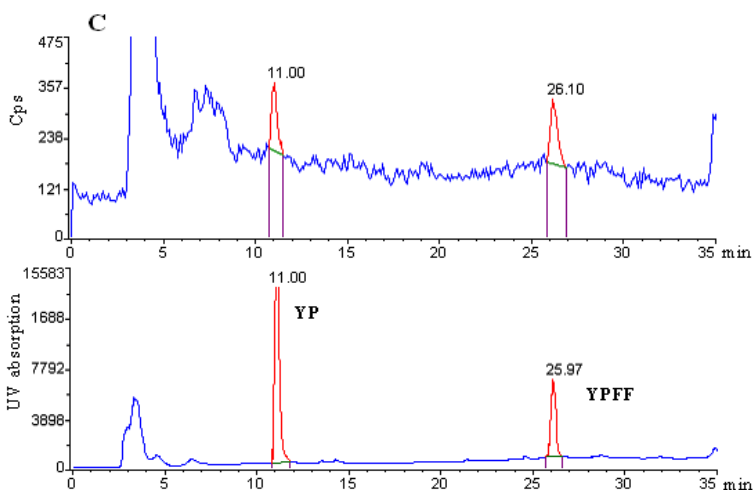
mg/cm³). A radio-receptor kötési körülmények között (fehérje tartalom: 0,3 mg/cm³) mért, [³H₂]Pro²-Dmt¹-EM2-re megállapított degradációs felezési idő (515 min) elegendően nagy ahhoz, hogy megállapíthassuk, a jelzett ligandum jelentős mennyisége megtartja stabilitását a kötési vizsgálat ideje alatt (60 min).

- b.) A tríciummal jelölt Met-Enkefalin-Gly-Tyr-t (MEGY-t) összaktivitása 3,51 GBq (95 mCi) volt. A 0,74 TBq/mmol (20 Ci/mmol) fajlagos aktivitás megfelelőnek bizonyult a további receptorkötési vizsgálatokhoz. A telítési vizsgálatokból azt mutatták, hogy a MEGY nagy affinitással kötődik a zebrahal- és patkánygyi opioid receptorokhoz, a kötés pedig reverzibilisen blokkolható naloxonnal. [³H]MEGY hasonló telítési görbét mutatott zebrahal- és patkánygyi homogenizátumban.

Kompetíciós kötési vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy a MEGY két vagy több különböző zebrahal receptoron is hathat, különböző affinitással. Korábban ugyancsak R. E. Rodriguez csoportja publikálta, hogy a MEGY valószínűleg δ -receptorhoz is kapcsolódhat. A szerkezeti változtatásoknak a kötési tulajdonságokra gyakorolt hatásának vizsgálatára ³H-MEGY ligandum alkalmazásával kompetíciós kötési tesztek történtek. Patkánygyi vizsgálatok azt mutatták, hogy a (D-Ala²)-MEGY esetében a Gly cseréje D-Ala-ra nem változtatott jelentősen a ligandum kötési képességén, ugyanakkor a (D-Ala², Val⁵)-MEGY esetében a magasabb K_i érték azt mutatta, hogy romlott a kötési affinitás, tehát a metionin szerepe az 5. pozícióban fontos lehet. Összeségében tehát a MEGY egy zebrahal opioid receptor specifikus endogén ligandumnak tekinthető, amely ugyancsak nagy affinitással kötődik a megfelelő emlős opioid receptorokhoz is.

2. • A kísérletekhez Tyr-Pro és 3',5'I₂-Tyr-Prodipeptidek szintézisét, majd a kromatográfiás vizsgálatokhoz további tri- és tetrapeptidek szintézisét végeztük el szilárdfázisú peptidszintézissel. A 3',5'I₂-Tyr-Pro dipeptidet prekurzorként alkalmaztuk a trícíálási reakció során. A tiszta ³H-Tyr-Pro peptid fajlagos aktivitása (49,9 Ci/mmol) megfelelőnek mutatkozott a tervezett nyomjelzési vizsgálatokhoz.

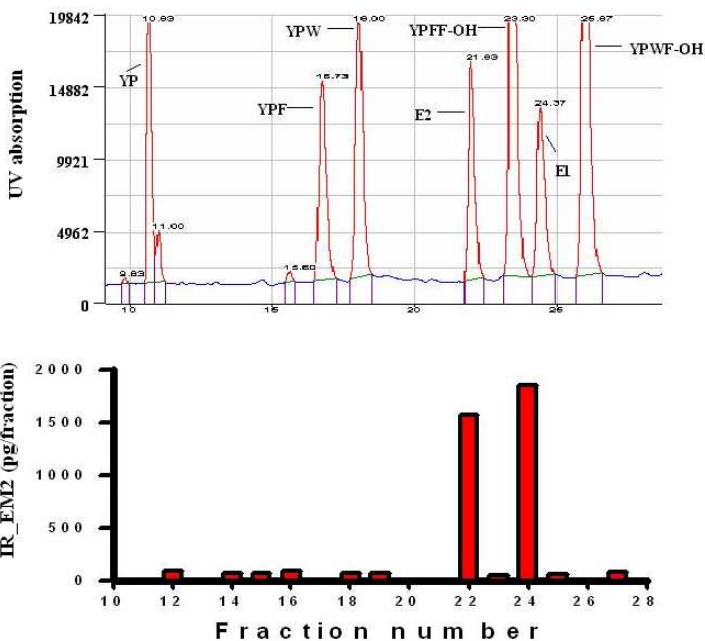
Két sorozatban a 0,74 TBq/mmol és 7,4 TBq/mmol (20 és 200 μ Ci) ^3H -Tyr-Pro agykamrába történő injektálását követően, 30 perc elteltével a dekapitált patkányokból származó agymintákat extrakciós eljárásnak vetettük alá. Az előállított extraktumokból radiodetektálással kombinált HPLC technikával, belső standard minták együttes injektálásával, azok retenciós idejével összehasonlítva radioaktív tri- és tetrapeptideket detektáltunk. A tetrapeptid retenciós idő-régióiban észlelt radioaktív csúcsokat endomorfín 2 és endomorfín 2-OH- szabad karboxil végű - peptidekként véltük azonosítani.



- Radioimmunoesszé protokolt dolgoztunk ki endomorfín-2-re. Hemocianinhoz kapcsolt endomorfín 2-vel nyulakat immunizáltunk, majd a kapott antiszérumokkal (R1 és R4) és az általunk elkészített ^{125}I -jelzett endomorfín-2 (radiotrézser) alkalmazásával patkányanyag kivonatok HPLC frakcióit vizsgáltuk. Szintetikus endomorfín-1 és -2 peptidekkel validálva az antiszérumokat megállapítottuk, hogy az R1 antiszérum felismeri az endomorfín-2-t, az R4 antiszérum pedig az endomorfín-2 mellett az endomorfín-1-et is. Az R1 antiszérum viszont nem ismeri fel az endomorfín-1-et, Ugyanakkor egyik antiszérum sem ismerte fel az N-terminális endomorfín di- és tripeptid fragmenseket és a szabad C-terminálissal rendelkező endomorfínokat (endomorfín-1-OH, endomorfín-2-OH). Vizsgáltuk

továbbá szintetikus Met⁵- és Leu⁵-enkefalint, Met⁵-enkefalin-Arg⁶-Phe⁷, β-endorfin és D-Ala²-dinorfin A (1-17) opioid peptideket, amelyeket szintén nem ismert fel egyik antiszérum sem.

Alkalmazva az antiszérumokat RP-HPLC gradiens által szeparált patkányagy kivonatokra, endomorfín-2 szerű immunoreaktivitásokat találtunk a standard endomorfín-2 és endomorfín-2-OH-nak megfelelő retenciós idő frakciójában, bár a standard endomorfín-2-OH nem mutatott immunoreaktivitást. Tehát az endomorfín-s szerű immunoreaktivitást mutató anyag nem lehet sem endomorfín-2 sem endomorfín-2-OH. Ezen eredmények összhangban vannak a korábbi észleléseinkkel melyszerint radioaktív csúcsokat észleltünk endomorfín-2 és endomorfín-2-OH retenciós idő-régiókban.



3. • Az Anx-13-at és módosított származékait stabilitás-vizsgálatnak vetettük alá, az eredeti peptidet 12 hónapon keresztül, míg a származékokat 3 hónapon keresztül

+5 °C-on tároltuk és meghatározott időközönként a mintákat HPLC-vel ellenőriztük. A peptidek stabilitása majdnem minden esetben jónak volt mondható (90% feletti tisztaság), kivéve a két ciszteint tartalmazó Anx-13 származékot, ahol a ciszteinek oxidációja miatt nagyobb volt a változás. A Cys-Cys-Anx-13 esetében hővel szembeni stabilitási vizsgálatot végeztünk, hogy meghatározzuk, stabil marad-e a peptid a jelzési körülmények között. 60 perc főzés után a Cys-Cys-Anx-13 10%-a veszített egy ciszteint.

Aszimmetrikus és szimmetrikus ^{99m}Tc jelölést hajtottuk végre nitrido módszerrel a Cys-Cys-Anx-13 esetében (a saját és indiai partnerünk laboratóriumában) és aszimmetrikus jelölést a Cys-Anx-13 esetében, minden alkalommal ^{99m}Tc -nitrido kötőterméken ($[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]$) keresztül. A termékek radiokémiai tisztaságát HPLC és TLC módszerekkel ellenőriztük, melyek azt mutatták, hogy a szimmetrikusan jelzett $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]\text{Cys-Cys-Anx-13}$ komplex több mint 95%-os kitermeléssel képződött. Az aszimmetrikusan jelzett $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]\text{-PCN-Cys-Cys-Anx-13}$ komplex is jó kitermeléssel képződött. Az aszimmetrikusan jelzett $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]\text{-PNP-Cys-Anx-13}$ komplex több mint 95%-ban képződött, de a HPLC analízis két módosulatot is kimutatott.

A $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]\text{Cys-Cys-Anx-13}$ komplex számottevő rezisztenciát mutatott ciszteines oldattal végzett transzkelációs vizsgálatban. Ugyanakkor specifikus kötődést mutatott *in vitro* apoptotikus sejtekben, *in vivo* kísérletekben, apoptotikus tumor sejtek esetében pedig specifikus adszorpciót. Noha a vesékben jelentősebb visszatartás volt megfigyelhető, érdemes lehet megvizsgálni néhány szintetikusán módosított származékot a vesékben való felhalmozódás elkerülése végett.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. **Erzsébet. Szemenyei**^a, Istán Barna^a, Zsuzsa Mergl, Attila Keresztes, Zsuzsanna Darula, Erzsébet Kató, Géza. Tóth, András Z. Rónai; Detection of a novel immunoreactive endomorphin 2-like peptide in rat brain extracts. *Regulatory Peptides*, article in press (2008). IF: 2,442
2. **Erzsébet. Szemenyei**, Géza. Tóth; Tritium labelling and degradation studies of Dmt¹-endomorphin-2. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **50**: 1148–1152, (2007). IF: 0,746
3. András. Z. Rónai, **Erzsébet Szemenyei**, Erzsébet Kató, László Kocsis, György Orosz, Mahmoud Al-Khrasani, Géza. Tóth; Endomorphin synthesis in rat brain from intracerebroventricularly injected [³H]-Tyr-Pro: A possible biosynthetic route for endomorphins. *Regulatory Peptides*, **134** (1): 54-60, (2006). IF: 2,442
4. Archana Mukherjee, Kanchan Kothari, Géza Tóth, **Erzsébet. Szemenyei**, Hal Dhar Sarma, József Környei, Meera Venkatesh; ^{99m}Tc-labeled annexin V fragments: a potential SPECT radiopharmaceutical for imaging cell death. *Nuclear Medicine and Biology*, **33** (5): 635-643, (2006). IF: 2,121
5. Veronica Gonzalez-Nuñez, Gemma Arsequell, **Erzsébet Szemenyei**, Géza Tóth, Gregorio Valencia, Raquel E. Rodriguez; Binding profile of the endogenous novel heptapeptide Met-Enkephalin-Gly-Tyr in zebrafish and rat brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **314**: 862-867, (2005). IF: 4,098

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

1. Aneta Lukaszuk, Heidi Demaegdt, **Erzsébet Szemenyei**, Géza Tóth, Dagmara Tymecka, Aleksandra Misicka, Philippe Karoyan, Patrick Vanderheyden, Georges Vauquelin, Dirk [Tourwé](#); Beta-homo-amino acid scan of angiotensin IV. *Journal of Medicinal Chemistry*, **51** (7): 2291-2296, (2008). IF.: 5,115
2. Heidi Demaegdt, Liesbet Smits, Jean-Paul De Backer, Minh Tam Le, Matthias Bauwens, **Erzsebet Szemenyei**, Geza Tóth, Yvette Michotte, Patrick Vanderheyden, Georges Vauquelin; Translocation of the Insulin Regulated Aminopeptidase to the cell surface: detection by radioligand binding. *British Journal of Pharmacology*, article in press (2008). IF: 3,825
3. Géza Tóth, **Erzsébet Szemenyei**, Attila Keresztes, Ferenc Fülöp; Tritium labelling of novel endomorphin analogues containing unnatural α - and β -amino acids, Konferencia Proceedings, 5th International Conference on Isotopes, (ICI) Brussels, 2005 (295-299).
4. Géza Tóth, **Erzsébet Szemenyei**, Éva Varga, Henry I. Yamamura, Edward J. Bilsky; Novel endomorphin analogues with μ -opioid agonist and δ -antagonist properties using dimethyl-tyrosine and alicyclic β -amino acids, Konferencia Proceedings, 3rd International and 28th European Peptide Symposium, (EPS), Prága, 2004, (Peptides 2004, 956-957).

Legfontosabb konferenciák

1. **Erzsébet Szemenyei**, András Z. Rónai, Erzsébet Kató, Mahmoud Al-Khrasani, Géza Tóth; Detection of tritiated, endomorphin-related products in rat brain extracts after [³H]Tyr-Pro treatment, (poster), 31st FEBS Congress, Istanbul, 2006.

2. Géza Tóth, Attila Keresztes, **Erzsébet Szemenyei**, Erzsébet Kató, András Z. Rónai, Ferenc Fülöp; Synthesis and radiolabelling of new endomorphin analogues containing unnatural α - and β -amino acids, (poster), 29th European Peptide Symposium (EPS), Gdansk, 2006.
3. Aneta Lukaszuk, Heidi Demaegdt, **Erzsébet Szemenyei**, Géza Tóth, Dagmara Tymecka, Aleksandra Misicka, Georges Vauquelin, Dirk [Tourwé](#); β -homo-amino acid scan of angiotensin IV, (poster), 29th European Peptide Symposium (EPS), Gdansk, 2006.
4. Géza Tóth, **Erzsébet Szemenyei**, Sándor Benyhe, Anna Borsodi; Tritium labeling and radioreceptor binding characterization of Dmt¹-endomorphin-2, (poster), European Opioid Conference (EOC), Salamanca, 2006.
5. **Erzsébet Szemenyei**, Fanni Tóth, Éva Varga, Janelle Jambrosic, E Navratilova, Henry I. Yamamura, Anna Borsodi, Géza Tóth; New endomorphin analogues with 2',6'-dimethyl-Tyr and e- β -MePhe substitutions, (poster), Joint Meeting on Medicinal Chemistry (JMMC), Béc, 2005.
6. Fanni Tóth, **Erzsébet Szemenyei**, Géza Tóth, Éva Varga, Janelle Jambrosic, Henry I. Yamamura, Edward Bilsky, Sándor Benyhe, Anna Borsodi; Structurally modified novel endomorphin analogues with 2',6'-dimethyl-tyrosine and e- β -MePhe substitutions, (poster), XV. European Neuropeptides Club Meeting, Riga, 2005.
7. Éva Szabó, **Erzsébet Szemenyei**, Raquel E. Rodriguez, Géza Tóth; Zebrafish peptide analogues synthesis and radioactive labelling, (poszter), European Opioid Conference (EOC), Visegrád, 2004.
8. Veronica Gonzalez-Nuñez, Gemma Arsequell, **Erzsébet Szemenyei**, Géza Tóth, Gregorio Valencia, Raquel E. Rodriguez; Binding profile of the heptapeptide Met-Enkephalin-Gly-Tyr in zebrafish brain, (poster), European Opioid Conference (EOC), Visegrád, 2004.

9. Géza Tóth, **Erzsébet Szemenyei**, Éva Varga, Henry I. Yamamura, Edward J. Bilsky; Novel endomorphin analogues with μ -opioid agonist and δ -antagonist properties using dimethyl-tyrosine and alicyclic β -amino acids, (poster), 3rd International and 28th European Peptide Symposium, (EPS), Prága, 2004.

Előadások

1. **Szemenyei Erzsébet**, Tóth Géza, „Biológiailag aktív peptidek, peptid- és fehérje-fragmentumok szintézise, radioaktív jelölése.” Őszi Radiokémiai Napok, Sopron, 2007.
2. **Szemenyei Erzsébet**, Barna István, Keresztes Attila, Kató Erzsébet, Tóth Géza, Rónai Z. András, „Egy új immunoreaktív endomorfín szerű peptid detektálása patkányagy homogenizátumban.” Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonszemes, 2007.
3. **Szemenyei Erzsébet**, Tóth Géza, Kanchan Kothari, Környei József, „Az apoptózis *in vivo* diagnosztikáját célzó peptid előállítás és jelzése ^{99m}Tc-radionukliddal.” Hevesy György Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság (MONT) XV. Kongresszusa, Szeged, 2007.
4. **Szemenyei Erzsébet**, Rónai Z. András, Tóth Géza, „Endomorfín szintézis patkány-agykamrába injektált 3H-Tyr-Pro-ból; egy lehetséges bioszintetikus út vizsgálata.” Őszi Radiokémiai Napok, Siófok, 2006.
5. **Szemenyei Erzsébet**, Tóth Géza, Dirk Tourwé, „Angiotenzin IV analógok szintézise és tisztítása.” Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonszemes, 2006.
6. **Szemenyei Erzsébet**, Környei József, Tóth Géza, „Nyomjelzési módszerek és azok használata neuropeptidek, fehérje-fragmentumok kutatásában.” Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonszemes, 2005.

7. **Szemenyei Erzsébet**, Tóth Fanni, Varga Éva, Edward Bilsky, Tóth Géza, „ Új nem természetes aminosavakat tartalmazó endomorfín analógok szintézise és biológiai jellemzése.” Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok 5. Tudományos Előadói Ülése, Szeged, 2005.
8. **Szemenyei Erzsébet**, Tóth Géza, Környei József, „Egy, a "programozott sejthalál" (apoptózis) *in vivo* kimutatását célzó peptid előállítására és jelzése ^{99m}Tc -radionukliddal.” Őszi Radiokémiai Napok, Eger, 2004