

**Aliciklikus  $\beta$ -aminosavakat tartalmazó  
endomorfinszármazékok: konformáció és farmakológiai  
aktivitás**

**Keresztes Attila**

**doktori értekezésének tézisei**

**Témavezetők:**

**Dr. Tóth Géza**

**Dr. Szűcs Mária**

**Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ**

**Biokémiai Intézet**

**Szeged**

**2008**

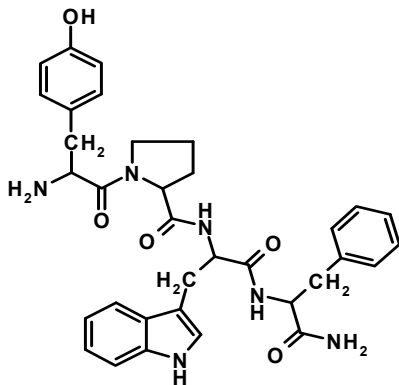
## Bevezetés:

A opioid receptorok ( $\mu$ ,  $\delta$  és  $\kappa$ , valamint azok feltételezett altípusai) hét transzmembrán régióval rendelkező, heterotrimer G-fehérje kapcsolt membránfehérjék, melyek endogén, illetve exogén ligandumaikkal együtt kulcsfontosságú szerepet töltenek be a fájdalomérzet molekuláris szintű szabályozásában. A nagyszámú természetes és szintetikus eredetű ligandumnak, valamint a receptor-klónozási, tisztítási, farmakológiai mérési technikáknak, illetve a "knock-out" állattörzsek fejlődésének köszönhetően óriási mennyiségű információ halmozódott fel a fájdalomérzet szabályozásával, illetve a tartós opioid adminisztrációt kísérő kedvezőtlen mellékhatások, a tolerancia és dependencia molekuláris jelenségeivel kapcsolatban.

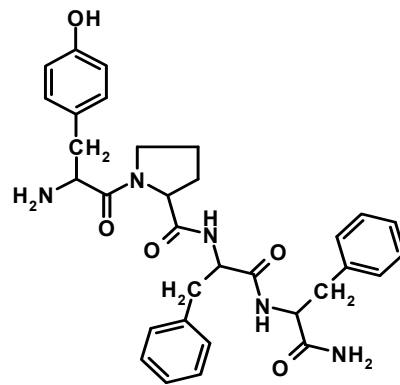
A hetvenes évektől kezdődően az intenzív kutatásoknak köszönhetően egymás után izolálták és azonosították az opioid receptorok természetes ligandumait (endorfin, dermorfin -  $\mu$ , enkefalin, deltorfin -  $\delta$ , dinorfin -  $\kappa$ ). A molekuláris biológiai és farmakológiai technikák fejlődésének eredményeként az opioid receptorokat kódoló géneket egymás után azonosították, a receptor fehérjéket klónozták, mutálták, valamint endogén ligandumaik prekursor fehérjéit azonosították. Habár az enkefalinok és dermorfinok  $\mu$ -receptor specifikusnak bizonyultak, egészen a múlt század végéig nem találtak kellően nagy affinitású és szelektivitású endogén,  $\mu$ -opioid specifikus ligandumot. A kilencvenes évek elején Zadina és munkatársai a Tyr-W-MIF (H-Tyr-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>) kombinatorikus szerkezetmódosítása során két olyan tetrapeptidet azonosítottak, melyek nagy affinitást és szelektivitást mutattak a  $\mu$ -opioid receptorokhoz. Négy évvel később, 1997-ben mindkét peptidet izolálták előbb marha, majd azt követően humán agymintákból és endomorfín-1-nek (H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>), valamint endomorphin-2-nek (H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) nevezték el őket  $\mu$ -receptor preferenciájuk és morfinszerű analgetikus hatásuk eredményeként. Annak ellenére, hogy az endomorfínokat számos fajból izolálták, *in vivo* keletkezésük mindmáig ismeretlen és vitatott. Minthogy, az endomorfínok figyelemre méltó farmakológiai és szerkezeti sajátosságokkal rendelkeztek gyorsan az új generációs, kevés mellékhatással rendelkező fájdalomcsillapító tervezés célpontjaivá váltak, mint potenciális "lead" vegyületek. Az elmúlt évtizedben több száz/ezer endomorfín analógot szintetizáltak – többet mint bármely más peptid-típusú opioid ligandumból – jelezvén e tetrapeptidek farmakológiai relevanciáját. E nagyszámú szintetikus és farmakológiai méréseken alapuló kutatómunka az endomorfínok alábbiakban leírt kedvező és kedvezőtlen tulajdonságaira vezethető vissza:

- Kémiai és szintetikus szempontból, rövid, természetes aminosavakat tartalmazó tetrapeptidek melyek származékait jóval könnyebben és gyorsabban lehet előállítani a hagyományos szilárd-fázisú peptidszintetikus módszerekkel, mint bármely más, hosszabb láncú opioid peptideket (pl. dinorfin, nociceptin), peptidszármazékokat.
- Gazdag, aromás aminosav- (Tyr, Phe), illetve prolintartalmuknak köszönhetően dehalogénezéses, valamint telítéssel reagáló reakciók segítségével könnyen juthatunk, nagy fajlagos aktivitású, nyomjelzett (<sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I) származékaikhoz.
- Prolintartalmuk és szokatlan aminosavszekvenciájuk eredményeként *in vivo* fél-élettartamuk a leghosszabb az összes eddig ismert endogén opioid peptidek között.

- Affinitásuk nanomólos,  $\mu$ -opioid receptor szelektivitásuk többszörösen nagyobb mint az eddig ismert más  $\mu$ - receptor ligandumoké.
- Funkcionális biokémiai kísérletekben, valamint GPI (guinea pig ileum) és MVD (mouse vas deferens) tesztekben agonistaként viselkednek csakúgy mint a legrégebben alkalmazott fájdalomcsillapítószer, a morfin.
- *I.c.v.* (Intracerebroventrikuláris), illetve *i.t.* (intratekális) injektálást követően hosszan-tartó supraspinális, illetve spinális eredetű analgéziát idéznek elő.
- Kismértékű vér-agy-gát permeabilitás
- Kedvezőtlen abszorpciós sajátosságok
- Krónikus kezelések hatására megjelenő tolerancia illetve dependencia



Endomorfín-1  
(H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>)



Endomorfín-2  
(H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>)

A fentiek alapján az endomorfínok szerkezetmódosításai a következő okokra vezethetők vissza: Egyrészt, a különböző szerkezettel rendelkező ligandumok százainak elméleti és gyakorlati kísérletekben kapott eredményeinek összehasonlításával további információkat kaphatunk a  $\mu$ -opioid receptor-ligandum kölcsönhatások természetére vonatkozóan – a  $\mu$ -receptor ligandumok képezik a klinikai gyakorlatban alkalmazott fájdalomcsillapítók legnagyobb részét – másrészt, lehetővé teszik specifikus jelátviteli utak, receptor-receptor kölcsönhatások feltérképezését, melyek új utakat nyithatnak a tolerancia és dependencia kialakulásával kapcsolatos ismeretekhez.

## Célkitűzés:

Vizsgálatainkat a fenti valamint a következőkben felsorolt megfontolások alapján végeztük:

- Célul tűztük ki, hogy aliciklikus  $\beta$ -amino savak és/vagy metilcsoporttal diszubsztituált tirozinszármazék beépítésével növeljük az endomorfínok félélettartamát úgy, hogy az ne járjon a  $\mu$ -receptorral szembeni affinitás és szelektivitás csökkenéssel.
- Racém, aliciklikus  $\beta$ -amino savakból szintetizált peptiddiasztereomerek (16 db) elméleti (számítógépes modellezés) és gyakorlati (receptorkötéses technikák,  $^1\text{H-NMR}$  mérések) kísérletes vizsgálatával receptor-ligandum valamint szerkezet-hatás összefüggéseket keresni az endomorfínok lehetséges "bioaktív" konformációira vonatkozóan, figyelembe véve az eddig ismert irodalmi adatokat.
- Receptor specifikus radioligandumok ( $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ ,  $[^3\text{H}]\text{Ile}^{5,6}$ -deltorfín-2) és kompetitív leszorítási kísérletek alkalmazásával megvizsgálni azt, hogy az aliciklikus  $\beta$ -aminosavak kiralitásának, valamint az általuk generált konformációknak milyen hatása van a peptid analógok receptor affinitási és szelektivitási tulajdonságaira.
- Funkcionális  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  mérésekkel meghatározni az előzetes kísérletek alapján ígéretesnek bizonyuló ligandumok "efficacy" profilját, mely információt szolgáltat a ligandumok agonista/antagonista természetére nézve.
- *In vitro* proteolitikus stabilitást vizsgálni néhány, a receptorkötéses vizsgálatok alapján ígéretesnek bizonyuló ligandumon.
- A fenti *in vitro* receptorkötési mérések és stabilitás vizsgálatok alapján ígéretesnek bizonyuló ligandumok közül kiválasztani kettőt tríciumos nyomjelzés céljából.
- A triciált endomorfín származékok közül egynek a teljes farmakológiai profiljának feltérképezését, *in vitro* radioligand kötési kísérletek alkalmazásával (asszociációs, disszociációs, telítési és kompetíciós kísérletek), valamint a radioligand kereskedelmi terméké fejlesztését.

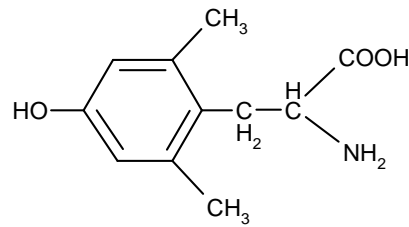
## Alkalmazott Kísérleti Módszerek:

- Szilárd fázisú peptidszintézis
- Fordított fázisú, UV/látható és radiodetektoros HPLC-s technikák
- Vékonyréteg kromatográfia
- Folyadék scintillációs mérési technika
- Tömegspektrometria
- Telítési és dehalogénezési nyomjelzési módszerek
- Receptorkötési technikák

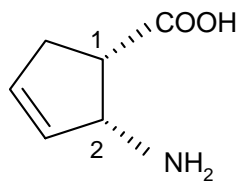
## Eredmények:

- A farmakológiai vizsgálatokhoz szükséges peptideket hagyományos, szilárdfázisú peptidszintézissel, Boc-stratégiával állítottuk elő. A racém aliciklikus  $\beta$ -aminosavak keverékéből kiinduló peptidszintézisek során nyert diasztereomer párokat fordított fázisú HPLC segítségével elválasztottuk, a beépített aliciklikus  $\beta$ -aminosavak konfigurációit meghatároztuk. A szintézis során használt nemtermészetes aminosavak kémiai szerkezetét az 1. ábra mutatja.
- Patkányagyhomogenizátumon végzett stabilitásvizsgálatok azt mutatták, hogy mind a kiválasztott monoszubsztituált Dmt-t (H-Dmt-Pro-Trp/Phe-Phe-NH<sub>2</sub>,  $t_{1/2}$  = 0.5-2 h), illetve aliciklikus  $\beta$ -aminosavakat (ACPC/ACHC) tartalmazó endomorfinszármazékok (H-Tyr-ACPC/ACHC-Trp/Phe-Phe-NH<sub>2</sub>,  $t_{1/2}$  > 12 h,) felezési ideje jelentős mértékben megnövekedett a natív peptidek félélettartamához képest.
- A tizenhat ACPC/ACHC-t tartalmazó diasztereomer peptidszármazék receptorkötéses, molekula modellezéses és <sup>1</sup>H-NMR-es vizsgálata azt mutatta, hogy a hosszabb peptidlánccal rendelkező, konformációsán gátolt analógok számos lehetséges konformáció felvételére képesek, habár a hajlított, kompaktabb szerkezeti struktúrával rendelkező peptidek mutattak nagyobb biológiai aktivitást a  $\mu$ -opioid receptorokon. Kimutattuk, hogy az aliciklikus  $\beta$ -aminosavakkal szubsztituált származékokban a kiralitásnak nagyobb szerepe van a biológiai aktivitásra nézve, mint a beépített aminosavszármazékok (ACPC/ACHC) gyűrűméretének.
- A leszorításos receptorkötési kísérletek alapján trícíálásra kiválasztott ACPC/ACHC-t tartalmazó származékok (<sup>3</sup>H][*(1S,2R)*ACPC]endomorfín-2, [<sup>3</sup>H][*(1S,2R)*ACPC]endomorfín-2 ) nagy fajlagos aktivitású (38 Ci/mmol, 1,4 TBq/mmol, 64 Ci/mmol, 2.4 TBq/mmol) és az autoradiolízissel szemben meglehetősen ellenálló radioligandumokat eredményeztek.
- A radioligandum hideg  $\mu$ -,  $\delta$ - és  $\kappa$ -ligandumok jelenétében történő részletes farmakológiai karakterizálása megerősítette a hideg ligandumokkal végrehajtott kísérletekből származó affinitásra és szelektivitásra vonatkozó kísérleti adatokat, vagyis az ACPC/ACHC-vel szubsztituált származékok, az aminosavszármazékok kiralitásától függően megőrzik vagy elvesztik  $\mu$ -receptor affinitásukat, általában jelentős mértékű szelektivitásvesztés mellett.
- A leszorításos kötésvizsgálatok alapján kiválasztott endomorfinszármazékok funkcionális ligand-stimulált [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S mérései azt mutatták, hogy az aminosavszubsztitúcióknak nincs jelentős hatása az agonista/antagonista sajátságokra, vagyis a vizsgált ligandumok többsége megtartotta parciális agonista tulajdonságát.

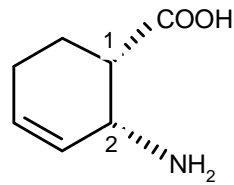
### 2,6-dimetiltirozin (Dmt)



### 2-aminociklopentén/hexénkarbonsav ( $\Delta$ ACPC/ $\Delta$ ACHC)

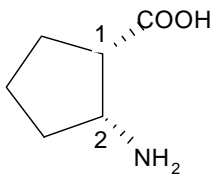


*cis*-(1*S*,2*R*)-

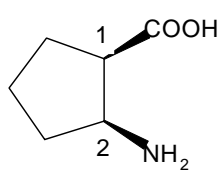


*cis*-(1*S*,2*R*)-

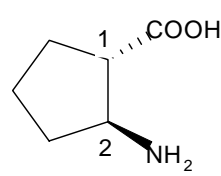
### 2-aminociklopentánkarbonsav (ACPC)



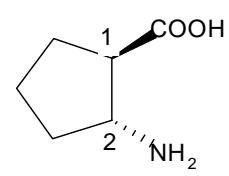
*cis*-(1*S*,2*R*)-



*cis*-(1*R*,2*S*)-

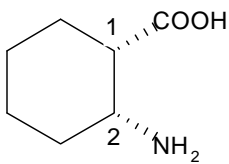


*trans*-(1*S*,2*S*)-

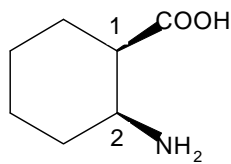


*trans*-(1*R*,2*R*)-

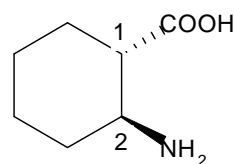
### 2-aminociklohexánkarbonsav (ACHC)



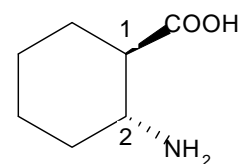
*cis*-(1*S*,2*R*)-



*cis*-(1*R*,2*S*)-



*trans*-(1*S*,2*S*)-



*trans*-(1*R*,2*R*)-

1. ábra. Az endomorfinszármazékok szintéziséhez használt nemtermészetes aminosavak kémiai szerkezete.

## Publikációs Lista:

### Az értekezés alapját képező közlemények

1. Tóth, G., **Keresztes, A.**, Tömböly, Cs., Péter, A., Fülöp, F., Tourwé, D., Navratilova, E., Varga, É., Roeske, W.R., Yamamura, H.I., Szűcs, M., Borsodi, A. (2004) New endomorphin analogs with  $\mu$ -agonist and  $\delta$ -antagonist properties. *Pure Appl Chem* **76**:951-957 (IF: 1.71)
2. **Keresztes, A.**, Tóth, G., Fülöp, F., Szűcs, M. (2006) Synthesis, radiolabeling and receptor binding of [ $^3\text{H}$ ][*(1S,2R)*ACPC $^2$ ]endomorphin-2. *Peptides* **27**:3315-3321 (IF: 2.23)
3. **Keresztes, A.**, Szűcs, M., Borics, A., Kövér, R. K., Forró, E., Fülöp, F., Tömböly, Cs., Péter, A., Páhi, A., Fábrián, G., Murányi, M., Tóth, G. (2008) New endomorphin analogs containing alicyclic  $\beta$ -amino acids: influence on bioactive conformation and pharmacological profile. *J Med Chem* **51**:4270-4279 (IF: 4.89)
4. **Keresztes, A.**, Páhi, A., Birkas, E., Tóth, G., Szűcs, M. Synthesis, radiolabeling and receptor binding of [ $^3\text{H}$ ][*(1S,2R)*ACHC $^2$ ]endomorphin-2 (manuscript in preparation)

### Egyéb közlemények

1. Knütter, I., Hartrodt, B., Tóth, G., **Keresztes, A.**, Kottra, G., Mrestani-Klaus, C., Born, I., Daniel, H., Neubert, K., Brandsch, M. (2007) Synthesis and characterization of a new and radiolabeled high-affinity substrate for H $^+$ /peptide cotransporters. *FEBS J.* **22**:5905-14 (IF: 3.39)
2. Szemenyei, E., Barna, I., Mergl, Z., **Keresztes, A.**, Darula, Z., Kató, E., Tóth, G., Rónai, A.Z. (2008) Detection of a novel immunoreactive endomorphin 2-like peptide in rat brain extract. *Regul Pept.* **148**(1-3):54-61 (IF: 2.42)

### Legfontosabb konferenciák és poszterek

1. **Keresztes, A.**, Szűcs, M., Fülöp, F., Tóth, G. "Influence of *trans*-2-aminocyclopentane/-aminocyclohexane carboxylic acid substitutions on the pharmacological profile of endomorphins." European Opioid Conference, Ferrara, Italy, 2008, p76
2. **Keresztes, A.**, Szűcs, M., Borics, A., Fülöp, F., Tóth, G. "Endomorphin analogues with alicyclic  $\beta$ -amino acids: Influence of conformational characteristics on pharmacological profile." Polish Peptide Symposium, Pultusk, Poland, 2007, p86

3. Tóth, G., **Keresztes, A.** Szűcs, M., Forró, E. and Fülöp, F. "Endomorphin analogs with alicyclic  $\beta$ -amino acids." 5<sup>th</sup> Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Ed. D. Kikelj, Medimond International Proceedings, Portoroz, Slovenia, June 17-21, 2007, p47-50
4. **Keresztes, A.** Szűcs, M., Fülöp, F., Tóth, G. "Synthesis, radiolabeling and receptorial characterization of  $^3\text{H}$ -Tyr-(1*S*,2*R*)ACPC-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>." European Opioid Conference, Salamanca, Spain, 2006, p26
5. Tóth, G., Szemenyei, E., **Keresztes, A.** and Fülöp, F. "Tritium labelling of novel endomorphin analogues containing unnatural  $\alpha$  and  $\beta$  amino acids." 5th International Conference on Isotopes, Brussels, Belgium, April 25-29, 2005, p295-299
6. **Keresztes, A.** Páhi, A., Szűcs, M., Fülöp, F., Tóth, G. "New Endomorphin-2 derivatives containing tritium labeled 2-aminocyclopentane carboxylic acid and 2-aminocyclohexane carboxylic acid." Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Vienna, Austria, 2005, PO-154 (S212)

### **Legfontosabb előadások**

1. **Keresztes, A.** "Synthesis, radiolabeling and receptorial characterization of a new endomorphin-2 derivative, [ $^3\text{H}$ ][(1*S*,2*R*)ACPC<sup>2</sup>]endomorphin-2." Chemical strategies for the development of novel opioid peptide mimetics, Flemish-Hungarian Workshop at Free University, Brussels, Belgium, 2006
2. **Keresztes, A.** Tóth, G., Szűcs, M. "Egy  $\mu$ -szelektivitással és nagy affinitással rendelkező új endomorphin-2 származék szintézise, nyomjelzése valamint receptorális vizsgálata." Őszi Radiokémiai Napok, Siófok, 2006
3. **Keresztes, A.** Tóth, G., Fülöp, F., Szűcs, M. "Tyr- [ $^3\text{H}$ ](1*S*,2*R*)ACPC-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> jellemzése receptor kötési tesztben." Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonszemes, 2006
4. **Keresztes, A.** Szűcs, M., Fülöp, F., Tóth, G. "Egy új 2-aminociklopentán-karbonsavat tartalmazó endomorphin származék szintézise, radioaktív jelölése és jellemzése radioligand kötési tesztben." Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonszemes, 2005
5. **Keresztes, A.** "Synthesis and purification of bombesin and neurotensin derivatives." Free University, Brussels, Belgium, 2005
6. **Keresztes, A.** Tóth, G. "Új endomorphin analógok szintézise és radioaktív jelölése." Őszi Radiokémiai Napok, Gyula, 2002