

Szakmai zárójelentés a 46514 számú "Neuropeptidek radioaktív jelölése " című OTKA pályázathoz

Pályázatunkban neuropeptidek radioaktív jelölését irányoztuk elő. A radioaktív neuropeptidek mint nyomjelzők fontos kísérleti eszközök lehetnek a neuropeptid receptorok és azok ligandumjainak kölcsönhatás vizsgálatánál. A jelöléstechnikáknál, ha receptor vizsgálatokat végzünk, a ^3H és ^{125}I radionuklidok a legjelentősebbek, mivel ezekkel a radionuklidokkal jelzett vegyületek nagy fajlagos aktivitásúak, így a receptorok kis koncentrációban előfordulva is mérhetőek. Éppen ezért mi is elsősorban ezeket a radioizotópokat alkalmaztuk *in vitro* jelöléseknél. Pályázatunkban kettős célt tűztünk ki. Olyan jelölési módszereket fejlesztünk ki, ahol a jel stabilis lesz a biológiai körülmények között, a jelölés során lehetőleg küszöböljük ki a mellékreakciókat vagy oldjuk meg a tisztítást, amit természetesen a tárolás során időről időre meg is kell ismételni. Fontos szempont a prekursorok szintézise és ehhez bizonyos nem természetes aminosavak előállítására is alapvető. A másik cél az volt, hogy az előállított modell vegyületek lehetőleg mint kutatási eszközök is hasznosak legyenek a peptid-receptor rendszerek vizsgálatánál.

A jelöléstechnika alapvetően fontos része a prekursor vegyületek előállítása. A prekursor peptideknek általában tartalmazniuk kell kettőskötést vagy halogént az aminosavakban. Ezeket az aminosavakat több esetben saját magunk állítottuk elő (**2-aminociklopentán-1-karbonsav, 2-amino-ciklohexan-1-karbonsav, β -metil-ciklohexilalanin és ezen aminosavak telitetlen analógjai**) vagy akár a kész peptidek derivatizálásával a tirozin jódozásával készült el a prekursor. A speciális aminosavak természetesen a projekt elején készültek el. Néhány esetben a prekursorok ciszteint vagy penicilamint tartalmaztak, ezekből az alanin vagy a valin készült el a tríciummal jelzés során, amikor is az SH csoport kilépett az oldalláncokból.

A terveknek megfelelően új tríciummal jelzett neuropeptideket állítottunk elő. Az alábbiakban ezeket a radioaktív molekulákat mutatom be.

Spanyol együttműködésünk tette lehetővé, hogy egy zebrahal agyból izolált természetes peptidet megismerjünk. A **Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Gly-Tyr** hexapeptid az enkefalin rokon peptidjének tekinthető.

A trícium jelet a tirozinon helyeztük el, ez a radioligand jó eszköz a zebrahal agyának membránpreparátumon való kötődés vizsgálatára. Ezekről a vizsgálatokról a **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**-ben és a **Peptides**-ban (2005) számoltunk be.

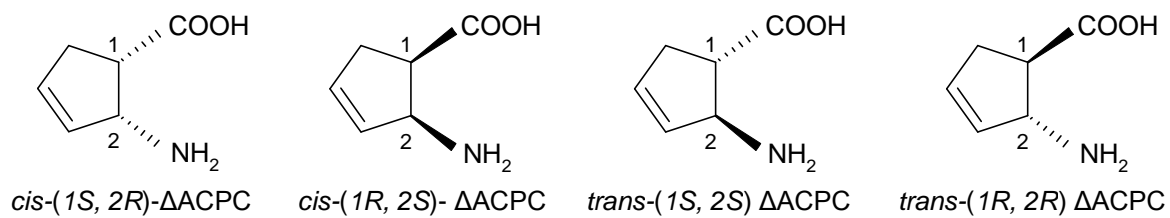
A **Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂** és annak egy új változatát a **D-Arg-Dmt-Phe-Lys-NH₂** trícíálásához két prekursor peptidet állítottunk elő, ahol a Dmt (dimetiltirozin)-ban két jódot építettünk be, majd a peptideket trícium gázzal dehalogéneztük. Az első peptid egy nagy affinitású és szelektivitású μ -opioid receptor ligand, amelyet **kereskedelmi termék**é is fejlesztettünk az Izotóp Intézet forgalmazásával. Mindkét peptid átmehet a sejtfalon a peptidek hidrofil karaktere miatt, így a sejten belül a radioaktivitást mérve követhetjük a peptid útját. Mindkét peptid antioxidáns tulajdonsággal bír, ami a dimetiltirozin jelenléte miatt valószínűsíthető. Ezt az eredményt amerikai és kanadai kutatók azóta megerősítették, felhasználva ezeket a radioaktív peptideket munkájukhoz.

Előállítottunk trícíált **Substance-P-(1-7)** (**Arg-³HPro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-OH**) peptidet, úgy, hogy a prolin helyett dehidro-Pro-t építettünk be, majd annak trícium gázzal való telítésével jutottunk a radioaktív ligandumhoz. Svéd együttműködéssel bizonyítottuk, hogy a Substance-P (1-7) saját kötőhellyel rendelkezik emlős agyban, és érdekessége ennek a kötőhelynek, hogy az endogén endomorfinek közül az endomorfín-2 (**Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂**) nagy affinitással kötődik, ehhez a kötőhelyhez. Erről az eredményről a **Peptides** (2006)-ban számoltunk be.

Előkísérleteket végeztünk egy DPDPE (**Tyr-c(D-Pen-Gly-Phe-D-Pen)-OH**) analóg előállítására, ami prekuzorként és modelként szolgál a diszulfid kötést tartalmazó peptidek jelöléséhez. Ez a munka még folyamatban van. Sikeresen oldottuk meg viszont az Arg-vazopresszin **c(Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys)-Pro -Arg-Gly-NH₂**) tríciummal való jelölését.

A trícíálást megelőzően a trícium jelet a Pro-Arg-Gly-NH₂ tripeptidbe vittük be úgy, hogy dehidroprolint építettünk be a prolin helyett, a kettőskötést telítettük trícium gázzal, majd a tripeptidet kapcsoltuk Boc- Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-OH –val, végül a védőcsoportot TFA-val távolítottuk el. A jelölésről és a trícíált Arg-vazopresszin felhasználásáról a **Regulatory Peptides** (2007)-ban számoltunk be.

Endomorfín-2 származékokat is állítottunk elő radioaktív formában. A jelöléshez prekursor peptideket állítottunk elő. Az endomorfín-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) új analógjai közül a Tyr-Acpc-Phe-Phe-NH₂ és a Dmt-Pro-Phe-Phe-NH₂-t (Dmt 2'6'-dimetil-tirozin, Acpc, 2-amino ciklopentán 1-karbonsav) választottuk ki a trícium jelöléshez. Az okot a választásra az adta, hogy mindkét peptid nagy affinitással és szelektivitással kötődött μ -opioid receptorokhoz, azon túlmenően proteolitikus enzimekkel szemben stabilabbak voltak mint az endogén endomorfínok. Prekuzorként olyan peptideket szintetizáltunk szilárd fázisú peptidszintézissel, ahol kettős kötést tartalmazó aminosavakat (dehidro-Acpc vagy dehidro-prolin) építettünk be a 2-es helyzetbe a prolin helyett (Tyr- Δ Acpc-Phe-Phe-NH₂ és Dmt- Δ Pro-Phe-Phe-NH₂). A peptidekben a kettőskötést trícium gázzal Pd/BaSO₄ jelenlétében telítettük. A nyers peptideket HPLC-vel tisztítottuk, a fajlagos aktivitásukat standard peptidek felhasználásával határoztuk meg (1,41 TBq-mmol (**Tyr-Acpc-Phe-Phe-NH₂**), 2,87 TBq-mmol (**Dmt-Pro-Phe-Phe-NH₂**)). Mindkét radioaktív peptidet patkánygyi membrán homogenizátumban karakterizáltuk, és bizonyítottuk azok nagy affinitását és szelektivitását μ -opioid receptorokhoz. Ezekről a trícíált peptidekről a **Peptides**-ban (2006) és a **J. Labelled Compd. Radiopharm** (2007)-ban publikáltunk és **mindkét peptidet kereskedelmi terméké fejlesztettük ki 2007-ben.**



^{125}I jelzett endomorfín-2-t állítottunk klóramin-T módszerrel és RIA módszer kifejlesztésére alkalmaztuk. Az endomorfín-2 RIA fontos eszköz lett az endomorfínok bioszintézisének vizsgálatára, ugyan úgy mint a 3H -Tyr-Pro-OH (ezt a trícíált dipeptidet is laboratóriumunkban állítottuk elő) ami prekursora lehet az endomorfínoknak az agyban. Ezekről a vizsgálatokról a **Regulatory Peptides** (2006)-ban számoltunk be.

Az általunk felfedezett xendomorfín B1 peptidet (**Tyr-Gly-Gly-Phe-Ile-Arg-Lys-Pro-Asp-Lys-Tyr-Lys-Phe-Leu-Asn-Ala-OH**) radioaktív formában is előállítottuk. A prekursorba 3',5' 3H -Tyr-t építettünk be és a tríciumot katalitikus dehalogénezéssel Pd/BaSO₄ és trietilamin jelenlétében vittük be. A fajlagos aktivitás: 1.1TBq/mmol (29,4 Ci/mmol). Eredményeinket nemzetközi és hazai konferenciákon ismertettük.

Flamand kutatókkal együttműködve vizsgáljuk a renin angiotenzin rendszert. Ezek a vizsgálatok újak, még a OTKA pályázat megírásakor nem szerepelt a tervben, de mint már említettem, fenntartottam a jogot új radioaktív peptidok előállítására. Az angiotenzin IV (**Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-OH**) kötődik a AT₄ receptorokhoz, ugyanakkor ennek a peptidnek számos biológiai hatása még nem világos. Éppen ezért az angiotenzin-IV trícíált formája, mint kutatási eszköz alapvető ezekhez a kutatásokhoz. Előállítottunk dehidroprolint tartalmazó prekuzort, és ennek trícium gázzal való telítésével jutottunk e jelzett peptidhez (fajlagos aktivitás: 1.13 TBq/mmol (38.5 Ci/mmol)). Az angiotenzin-IV specifikusan inhibiálja az inzulin koncentrációját szabályzó aminoszintetázot. A sejtfelszíni IRAP enzimet detektálni lehet az 3H -angiotenzin-IV kötődésének mérésével. A flamand kutatók ezzel a módszerrel egy gyors módszert fejlesztettek ki az enzim detektálására.

A módszert a British Journal of Pharmacology-ban elfogadták, jelenleg megjelenés alatt van (Demaegdts H., Smits L., De Backer, J., Le M.T., Bauwens M., Szemenyei E., Toth G., Michotte Y, Vanderheyden, P. Vauquelin G.: Translocation of the insulin regulated aminopeptidase to the cell surface: detection by radioligand binding, **British Journal of Pharmacology**, 2008).

Összefoglalás

Új jelölési módszereket fejlesztettünk ki neuropeptidok tríciummal való jelölésére. A módszerekhez új aminosavak és új neuropeptid prekursorokra volt szükségünk. Aliciklikus β -aminosavakat és ezek telítetlen analógjait szintetizáltunk vagy vásároltunk, racém vagy optikailag aktív formában. Az új aminosavakat felhasználtuk prekursor peptidok szintéziséhez. A diasztereomer peptidok elválasztása radioaktív vagy nem radioaktív formában HPLC-vel történt. A radiojelölés általában trícium gázzal kettős kötés telítésével vagy dehalogénezéssel történt Pd katalizátorok jelenlétében. Az új módszerek között van a diszulfid kötést tartalmazó peptidok előállítása, valamint alaninban és valinban történő jelölés. Az aliciklikus β -aminosavak radioaktív jelölése az első alkalommal valósult meg a jelöléstechnikában így ez a módszerünk úttörőnek tekinthető. Az így nyert radioaktív peptidok sokkal stabilabbak mint a természetes peptidok a biológiai rendszerekben. A 13 új radioaktív peptidunk (opioid peptidok, Substance P (1-7), Arg-vasopresszin) közül 3 peptidunk (Try-³H-ACPC-Phe-Phe-NH₂, Dmt-³H-Pro-Phe-Phe-NH₂, ³HDmt-DArg-Phe-Lys-NH₂) kereskedelmi termék lett, ezen túlmenően radioaktív peptidjeink nemzetközi kutatási együttműködések és nemzetközi pályázatot is eredményezett.