

Biológiailag aktív peptidek módosított származékainak előállítása és vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

Rákosi Kinga

Témavezető:

Dr. Tóth Gábor

intézetvezető egyetemi tanár

Kémia Doktori Iskola



Orvosi Vegytani Intézet
SZTE TTIK

Szeged, 2011

1. Bevezetés

A biomolekuláris kémiai kutatások a humán genom feltérképezése után a proteomika irányába fordultak. A fehérjeállomány feltérképezése nagy erővel zajlik napjainkban is. A detektált és biológiai hatással ellátott fehérjék működésének megértését, szervezetben betöltött funkciójuk teljesebb megismerését segíti a fehérjék modellezése kisebb peptidekkel. A szerkezet-hatás összefüggések feldolgozásával, értékelésével megismerhetővé válnak a fehérjék aktivitásához szükséges szerkezeti elemek. A modellpeptidek, fehérjeszakaszok, biológiailag aktív peptidek, peptidomimetikumok kémiai kutatásának egyik legfőbb preparatív eszköze a szilárd fázisú peptidkémia. A szilárdfázisú peptidszintézis bevezetése óta jelentős fejlődésen ment keresztül, ugyanakkor vannak olyan szekvenciák, amelyek előállítása rutin módszerekkel sok nehézségbe ütközik, különösen a poszttranszlációs módosítást tartalmazó biológiailag aktív peptidek esetén.

Doktori munkám során olyan – többnyire módosított – szintetikus peptidek előállítását tűztem ki célul, amelyekkel molekuláris szinten befolyásolhatók bizonyos biológiai folyamatok, valamint a fehérjék konformációs változásai tanulmányozhatóvá válnak.

2. Célkitűzések

Doktori munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- A stresszválasz szabályozásában hatékonyan résztvevő urokortin 3 (Ucn 3) neuropeptid, valamint ezen peptid célzott rövidítésével kapott fragmenseinek előállítása a molekula antidepresszáns és szorongáscsökkentő hatásáért felelős aktív centrumának lokalizálása céljából és ezen fragmensek tesztelése hatástani vizsgálatokban.
- Az Ucn 3 hatásáért felelős aktív centrum alapján olyan analógok tervezése és szintézise, amelyek megőrzik, esetlegesen javítják a hosszabb szekvencia antidepresszáns és szorongáscsökkentő hatását, valamint farmakokinetikai szempontból előnyösebb tulajdonságokkal rendelkeznek, vagyis potenciális farmakonokként szerepelhetnek depresszió és szorongás kezelésében.
- Az orexin A neuropeptid szintézisének optimalizálása, valamint vizsgálata a vízanyagcserére és a vazopresszin kiválasztásra patkányban.
- A természetes és adaptív immunrendszer jelátviteli folyamataiban szelektíven ható szintetikus peptidek előállítása, amelyek különböző immunológiai betegségekre ható gyógyszerkészítmények fejlesztésének alapját képezhetik:
 - A Mexikóban honos *Anuroctonus phaiodactylus*-ból izolált anuroctoxin, illetve a Brazíliában honos *Tityus cambridgei*-ből izolált Tc32 skorpiótoxinok natív szekvenciáinak előállítása, amelyek potenciális Kv1.3 ioncsatorna gátló szerek.
 - A szintetizált natív szekvenciák alapján pontmutációkkal olyan Kv1.3 ioncsatorna gátló szerek szintézise és vizsgálata, amelyek nagyobb szelektivitásúak és hatékony immunszuppresszív hatású gyógyszerkészítmények alapjául szolgálhatnak.

o A C3a eredetű C3a9 szimmetrikus dimer előállítására annak a feltételezésnek az igazolására, hogy az allergiás reakciók kialakulásának gátlásáért a C3a9 peptid intermolekuláris diszulfid hidakkal stabilizált dimer formája a felelős.

o Gab1 eredetű foszfopeptidek, illetve ezen peptidek módosított szekvenciáinak előállítása, biotinizálása, valamint sejtpemeabilis peptidhez való kapcsolása, majd a B-sejtek jelátviteli folyamataiban betöltött szerepének vizsgálata.

• β -modellpeptidek (SETE-peptidek) és minifehérjék (Betanova, Tc5b) szintézise és konformációs egyensúlyi vizsgálata.

3. Alkalmazott módszerek

A peptidek és származékaik előállítására általános szerves kémiai szintetikus módszereket, manuális és mikrohullámú szilárd fázisú peptidszintézist alkalmaztam. A termékek szerkezetigazolását tömegspektrometriás vizsgálatokkal végeztem, többnyire elektropray ionizációt (ESI) használva. A tisztításhoz és analitikához fordított fázisú nagyhatékonyságú kromatográfiát (RP-HPLC) használtam. A termékek biológiai vizsgálatára *in vivo* és *in vitro* kísérleteket egyaránt alkalmaztunk. A konformációs analízisek NMR- és CD-spektrumok felvételével történtek.

4. Eredmények

4.1. A stressz mechanizmus aktiválásában a kortikotropin felszabadító faktor (CRF) fontos szerepet játszik. Korábbi kutatómunkánk során azt találtuk, hogy a CRF családba tartozó urokortin 3 – egy 38 aminosavas peptid – alkalmas lehet arra, hogy megkíséreljünk belőle antidepresszáns és anxiolitikus hatású anyagokat fejleszteni.

Előállítottam az urokortin 3 (Ucn 3) neuropeptidet, valamint fragmenseit. Ezen fragmenseket emelt keresztlabirintus (EPM) és módosított erőltetett

úszás (FST) tesztekben vizsgáltuk. A molekula antidepresszáns és anxiolitikus hatásáért felelős aktív centrumának az Ucn 3 C-terminálisán elhelyezkedő Ala-Gln-Ile-NH₂ tripeptidet találtuk.

Az Ucn 3 (36-38) szekvencia alapján annak több mint 20, nagyobb részben peptidomimetikum származékát terveztem és állítottam elő. Ezen analógok biológiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy némelyik orális adagolásra is alkalmas.

Az Ucn 3 fragmenseinek és analógjainak előállítására és terápiás felhasználhatóságára depresszió és szorongás kezelésében szabadalmi védelem alatt áll.

4.2. Az orexin A szintéziséhez optimalizáltam az „oxidatív folding” körülményeit és egy szilárd hordozóhoz kötött oxidálószerrel – a Clear-oxTM gyantát – használva mintegy két óra alatt izolálható volt a natív izomer mint a fő reakciótermék. Megállapítottuk, hogy az orexin A-t közvetlenül agykamrába adva fokozódik a patkányok táplálék- és vízfelvétele és nő a vizeletürítésük. Az eredmények alapján feltételezhetően a polidipszia ill. a poliuria a vazopresszin rendszertől függetlenül jön létre. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei felvetik azt a lehetőséget, hogy a vazopresszin kiválasztást növelő anyagok (állapotok) hatásának orexin okozta mérséklődése szerepet játszhat a polidipszia, poliuria kifejlődésében.

4.3. A természetes és adaptív immunrendszer közötti jelátviteli folyamatokban szelektíven ható szintetikus peptideket állítottam elő, amelyek különböző immunológiai betegségekre ható gyógyszerkészítmények fejlesztésének alapját képezhetik:

4.3.1. Ma már számos kísérlet bizonyítja, hogy a T-sejt aktivációhoz szükséges Ca²⁺ jel létrehozásában kulcsszerepet betöltő K⁺ csatornák gátlásán keresztül a T-sejtek proliferációja *in vitro* és *in vivo* is gátolható.

Munkám során anuroctoxin és Tc32 skorpió peptid toxinokat állítottam elő, amelyek nagy affinitással kötődnek egyes csatornákhöz.

4.3.1.1. Az anuroctoxin (AnTx) esetében kiváló szelektivitással állítottam elő a natív izomert és optimalizáltam az oxidáció körülményeit. Biológiai mérésekkel igazoltuk, hogy a lineáris peptid legnagyobb része már egy óra után a helyes konformációs formában található, valamint, hogy a szintetikus és natív toxin elektrofiziológiai tulajdonságai teljesen megegyeznek. Az AnTx már 730 pM-os koncentrációban gátolja a Kv1.3 csatornát, ennek ellenére nem elég szelektív, hiszen kisebb affinitással ugyan, de gátolja a Kv1.2 csatornát is.

Előállítottam az AnTx több analógját a Kv1.3 ioncsatorna korábbiaknál szelektívebb gátlása céljából. Az egyszeres és kétszeres pontmutációkat tartalmazó peptidek biológiai eredményei azt mutatják, hogy mindhárom toxin (AnTx F32T, AnTx F32T K16D, AnTx F32T N17A) szelektivitása nagy mértékben javult a vad-típusúhoz képest, ugyanakkor a Kv1.3 iránti affinitásuk kis mértékben csökkent. A legjobb tulajdonságú toxin (AnTx F32T N17A) 1 nM-os koncentrációban a Kv1.3 csatornák mintegy 50%-át gátolta, míg a Kv1.2 csatornákon még 100 nM-os koncentrációban sem volt mérhető hatása. A továbbiakban az általunk először előállított mutáns toxinokat vizsgálata a cél, hiszen a tripla ill. többszörös mutánsok remélhetőleg mind affinitásban, mind szelektivitásban felülmúlják a natív toxint, így újabb potenciális terápiás felhasználás lehetőségét kínálják autoimmun betegségek kezelésében.

4.3.1.2. A Tc32 peptid toxin „oxidatív folding” és konvergens szintézissel végzett előállítása nem a megfelelő diszulfid híd mintázattal rendelkező izomert eredményezte. A lépésenkénti regio szelektív cisztein párosítások módszere sem hozta a kellő szelektivitást, mert a választott védőcsoportok egyike nem teljesítette az ortogonalitás feltételeit. A S*t*Bu

csoport hasítását szilárd fázison az irodalomból ismert módszerekkel nem sikerült megvalósítani, így a későbbiekben az oldat fázisban szabad tiol csoportokkal végrehajtott hasítás a diszulfid hidak keveredését eredményezhette. A különböző szintézisek főterméke mindig egyazon izomert eredményezte, mely nem azonos a natív izomerrel, ezen eredmények alapján felmerül a diszulfid hidak helyének meghatározási pontossága. A továbbiakban tervezzük újabb ortogonális védőcsoport kombináció kipróbálását a lépésenkénti regioszelektív cisztein párosítások módszerével a fenti feltételezésünk igazolására.

4.3.2. A C3a elnevezésű peptid gátolja az ún. mukóza típusú hízósejtek aktiválódását és granulumaik tartalmának a környezetbe ürítését, következésképpen az allergiás reakciót előidéző anyagok (köztük például a hisztamin) felszabadulását.

Előállítottam rendkívül jó hozammal, lépésenkénti regioszelektív cisztein párosítások módszerével a C3a9 szekvencia szimmetrikus dimerjét annak a feltételezésnek az igazolására, hogy az allergiás reakciók gátlásáért a C3a9 peptid intermolekuláris diszulfid hidakkal stabilizált dimer formája a felelős. A dimer tesztelése biológiai rendszerekben folyamatban van.

4.3.3. Előállítottam a Gab1 adapter fehérje eredetű GDLDpe (621-633) szekvenciáját, valamint ennek rövidebb foszfopeptid fragmentumait és módosított változatait. A foszfatáz aktivitás méréshez ill. a különböző jelátviteli molekulákhoz való kötődési vizsgálatokhoz biotinnal jelöltem a peptideket. A kiválasztott Gab1-peptidek sejtbe juttatásához *N*-terminálisan oktanoil-R8C peptidet kapcsoltam egy hosszabb szénláncot tartalmazó távolságtartón keresztül. Az eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a sejtpermeábilis foszfopeptidek gátolni képesek a Gab1/SHP-2 és Gab1/PI3-K fehérje kölcsönhatások kialakulását és ezáltal módosíthatják a proliferációs, apoptotikus és túlélési szignálokat.

4.4. β -modellpeptideket (SETE-peptidek) és minifehérjéket (Betanova, Tc5b foszfo- és glikoanalógjai) is előállítottam és vizsgáltuk ezek konformációs egyensúlyát. Megállapítható, hogy ezen peptidek belső mozgékonyasága még mindig jelentős, tehát szükség van további módosításokra egy még stabilabb szerkezet eléréséhez. A vizsgált modellpeptidek nem rendelkeznek egyetlen, helyesen jellemezhető téralkattal, azonban sikerült leszűkíteni a lehetséges szerkezetek számát a SETE-S3E modellpeptid esetében. Ez a peptid a továbbiakban hasznos modellként szolgálhat β -hairpin rendszerek tanulmányozására.

Az eredmények azt mutatják, hogy a körültekintően kiválasztott szintézismódszerek segítségével sikerült olyan módosított biológiailag aktív peptideket előállítani, amelyek növelt szelektivitással rendelkeznek, ill. általuk fokozható a natív szekvenciák biológiai hatása. Piackutatási tanulmányok adatai szerint az elmúlt években újra fokozott érdeklődés mutatkozik a peptidalapú hatóanyagok iránt, tehát a módosított biológiailag aktív peptidek jó eséllyel vetélytársai a szintetikus gyógyszerjelölt kismolekuláknak.

Az értekezés alapjául szolgáló saját publikációk jegyzéke:

I. **Kádár Kinga**, Tóth Gábor K., Telegdy Gyula, Tanaka Masaru: Urocortin 3 fragmensek és analógok, előállításuk és alkalmazásuk depresszió és szorongás kezelésében. *P0800527sz. magyar szabadalom* (2008); Urocortin 3 fragments and analogues, their preparation and use as antidepressive and anxiolytic agents. *WO 2010/020825 sz. nemzetközi szabadalom* (2010), (IF = 1).

II. **Rákosi Kinga**, Szolomájer-Csikós Orsolya, Kalmár László, Szurmai Zoltán, Kerékgyártó János, Tóth Gábor K.: Synthesis of *N*-glycopeptides applying glycoamino acid building blocks with a combined Fmoc/Boc strategy. *Protein & Peptide Letters* (2011), **18**(7), (IF = 1,755), (nyomdában).

III. Telegdy Gyula, **Kádár Kinga**, Tóth Gábor K.: Anxiolytic action of urocortin 3 fragments in mice, *Behavioural Brain Research* (2011), (IF = 3,220), (nyomdában), DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.047.

IV. Tanaka Masaru, **Kádár Kinga**, Tóth Gábor K., Telegdy Gyula: Antidepressant-like effects of urocortin 3 fragments. *Brain Research Bulletin* (2011), **84**, 414-418, (IF = 2.184).

V. Panyi György, Varga Zoltán, **Rákosi Kinga**, Tóth Gábor K.: Kv1.3 ioncsatorna gátló szerek fejlesztése immunológiai betegségek kezelésére, *szabadalmi bejelentés előirat készítés folyamatban*.

Össz impakt faktor: 8,159

Poszterek, konferencia kiadványok:

1. **Kádár Kinga**, Panyi György, Varga Zoltán, Tóth Gábor K.: Synthesis of cysteine-rich peptides, *Proceedings of the 30th European Peptide Symposium*, Helsinki, Finland, Aug.31- Sept. 5., 2008,146-147.
2. Tóth Gábor K., **Kádár Kinga**, Hegyi Orsolya, Szolomájer-Csikós Orsolya, Kalmár László, Kerékgyártó János: Glycopeptides - a synthetic challenge, *Proceedings of the 30th European Peptide Symposium*, Helsinki, Finland, Aug.31- Sept. 5., 2008,148-149.
3. **Kádár Kinga**, Panyi György, Varga Zoltán, Tóth Gábor K.: Cisztein gazdag peptidek szintézise, XIV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, Románia, Nov. 13-15, 2008.
4. **Kádár Kinga**, Szolomájer-Csikós Orsolya, Hegyi Orsolya, Váradi Györgyi, Kalmár László, Kerékgyártó János, Tóth Gábor K.: Glikopeptidek szintézise – egy szintetikus kihívás, Kolozsvár, Románia, Nov. 13-15, 2008.
5. **Rákosi Kinga**, Szolomájer-Csikós Orsolya, Hegyi Orsolya, Kovács Anita, Váradi György, Kalmár László, Kerékgyártó János, Tóth Gábor K.: O-glikopeptidek szintézisének lehetőségei, XV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Marosvásárhely, Románia, Nov. 12-15, 2009.
6. **Rákosi Kinga**, Tanaka Masaru, Telegdy Gyula, Tóth Gábor K.: Antidepressive action of human urocortin III fragments and analogues, *Proceedings of the 31st European Peptide Symposium*, Copenhagen, Denmark, Sept.5-9, 2010.
7. Szolomájer-Csikós Orsolya, **Rákosi Kinga**, Hegyi Orsolya, Kalmár László, Kerékgyártó János Tóth Gábor K.: The application of the new

tin(IV) chloride deprotection for the preparation of glycosylated peptides, *Proceedings of the 31st European Peptide Symposium*, Copenhagen, Denmark, Sept.5-9, 2010.

8. Kis-Karcsú Gyöngyi, Gálfi Márta, Radács Mariann, **Kádár Kinga**, Molnár Zita, Molnár Andor H., László Ferenc, Varga Csaba, László Ferenc A.: Effects of orexin-monoaminergic interactions on vasopressin secretion in rat neurophyseal cell cultures, *Endocrine Abstracts*, Rotterdam, The Netherlands, Apr. 30-May 04, 2011.