

2/ A kutatás során elért eredmények ismertetése (elméletek, módszerek, eljárások)

a/ β -amiloid antagonist peptidek előállítása

Szilárdfázisú peptid szintézis módszert és Boc-stratégiát alkalmaztunk az új, feltételezhetően neuroprotektív peptidek előállítására. A nyers termékeket RP-HPLC-vel megtisztítottuk, majd igazoltuk a szerkezetüket és tisztaságukat analitikai RP-HPLC-vel, aminosav analízissel és ESI-MS mérésekkel.

Előállítottuk:

- 1) a korábban neuroprotektív hatást mutató vegyületünk, a propionil-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu-NH₂ *pentapeptid* szabad N-terminálisú, valamint a következő acilezett származékait: CH₃-(CH₂)₃-CO-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu-NH₂, CH₃-(CH₂)₆-CO-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu-NH₂, CH₃-(CH₂)₈-CO-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu-NH₂, CH₃-(CH₂)₁₂-CO-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu-NH₂,
- 2) a következő *tetrapeptideket*, amelyek az A β (16-18) fragmensének Arg-nel és különböző lánchosszúságú zsírsavakkal acilezett származékait: CH₃-CO-Arg-Lys-Leu-Val-NH₂, CH₃-CH₂-CO-Arg-Lys-Leu-Val-NH₂, CH₃-(CH₂)₄-CO-Arg-Lys-Leu-Val-NH₂, CH₃-(CH₂)₆-CO-Arg-Lys-Leu-Val-NH₂, CH₃-(CH₂)₈-CO-Arg-Lys-Leu-Val-NH₂, CH₃-(CH₂)₁₀-CO-Arg-Lys-Leu-Val-NH₂, CH₃-(CH₂)₁₂-CO-Arg-Lys-Leu-Val-NH₂, CH₃-(CH₂)₁₄-CO-Arg-Lys-Leu-Val-NH₂ és
- 3) az irodalomban BSB hatásának leírt Leu-Pro-Phe-Phe-Asp *pentapeptid* analógjait: H-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-NH₂, H-Leu-Pro-Phe-Tyr-Asp-NH₂, H-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Asp-NH₂, H-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-OH, H-Leu-Pro-Phe-Tyr-Asp-NH₂.

Az alábbi két peptid bizonyult a leghatásosabbnak: H-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu-NH₂ (RIIGL, H-RZM6) és H-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-NH₂ (LPYFD).

4) A fenti két hatásos peptid legrövidebb, még hatásos szekvenciájának megállapítása céljából az alábbi *tripeptideket* és ezek analógjait állítottuk elő:

a) Karboxamid C-terminálissal és szabad N-terminálissal: RLV, OLV, KLV, RLL, KVV, RVV, KPV, RPV, OPV, KVL, RVL, RII, RHD, YFY, EFE, RFR, GVV, GAI, GLM, GLV, KLV;

b) Karboxil C-terminálissal: YFY és

c) Acilezett N-terminálissal: *Hex*-RII (Hex= hexanoil).

A peptidlánc további rövidítésével előállítottuk az alábbi *dipeptideket* is:

Ac-Leu-Val-NH₂, *Cit*-Leu-Val-NH₂, *Upr*-Leu-Val-NH₂ (Cit=citrullin, Upr=ureidopropionil).

A tri- és dipeptidek a neuroprotektív hatása nem érte el sem a H-RZM6, sem az LPYFD hatását.

Mivel a programtervnek megfelelően korábban előállított peptidek közül csak két pentapeptid (H-RZM6 és LPYFD) mutatott jelentős neuroprotektív hatást, ezeknek új analógjait terveztük és állítottuk elő. A peptidekbe D-konfigurációjú, valamint néhány nem természetes aminosavat is beépítettünk az enzimrezisztencia fokozása céljából. (A kis betűvel jelölt aminosavak minden esetben D-aminosavat jelentenek.).

5) H-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu-NH₂ (RIIGL, H-RZM6) analógok:

a) Szabad N-terminálisú és karboxamid C-terminálisú peptidek: DIIGL, KIIGL, Riigl, Igiir (retro), Gaba-IIGL, RIPL, rIPL, RII(NMe)GL, RVVGV, RGGGG

b) Acilezett N-terminálisú és karboxamid C-terminálisú peptidek: Ac-RIIGL, Pr-RIIGL, Oct-RIIGL, Pal-RIIGL, Kyn-RIIGL, Nic-RIIGL, iVa-RIIGL, Pr-RIPL, Pr-rIPL, Kyn-rIPL, Hex-rIPL, Pal-rIPL, Kyn-rIaPL, Hex-rIaPL, Pal-rIaPL, Kyn-rIaGL, Hex-rIaGL, Pal-rIaGL (Kyn = kinurenin, Nic = nikotinil, iVa = izovaleril)

6) H-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-NH₂ (LPYFD) analógok:

a) a pentapeptidek ill. pentapeptid analógok szabad N- és karboxamid C-terminálissal készültek, a néhány kivételnél jelöltük az eltérést: LPYFD, PYYD, DFYPL, APYFD, VPYFD, IPYFD, lpyfd, dfypl, dfypl (a C-terminálison szabad karboxil), LSarYFD

(Sar=sarcosin), LPYFA, LPYFA (a C-terminálison szabad karboxil), LPYFβA (a C-terminálison β-Ala szabad karboxillal), LPYA-PEA (PEA = β-feniletilamin).

b) az LPYFD tetrapeptid analógjainak biológiai tesztelése során kiderült, hogy a C-terminális Asp a neuroprotektív hatás csökkenése nélkül elhagyható az LPYFD szekvenciából. Összesen 75 új tetrapeptid és peptidomimetikum származékot állítottunk elő. Ezek a származékok az entimrezisztencia növelése céljából D-aminosavakat, nem természetes aminosavakat, aminokat és karbonsav származékokat tartalmaznak. Mivel voltak közöttük egészen kiemelkedő neuroprotektív hatású vegyületek, a 75 új tetrapeptid és peptidomimetikum származékra a Biogal-TEVA gyárral közös „preliminary” szabadalmat jelentettünk be (Penke, B., Zarándi, M., Datki Z., Fülöp, L., Szegedi, V., Penke, Z.: Compositions and methods for the treatment of neurodegenerative diseases. USA szabadalmi bejelentés: 2005, július 22. Serial No. 60/701,759.).

A neuroprotektív hatások figyelembevételével még néhány újabb peptidomimetikumot terveztünk. Ezek előállítására és biológiai tesztelése után a végleges szabadalmi bejelentést 2006-ban tesszük meg és a tetrapeptideket és mimetikumokat csak ezután tudjuk majd publikálni.

b/ Aβ[1-42] előállítása

Szilárdfázisú peptid szintézis módszerrel, Boc- és Fmoc-stratégia alkalmazásával előállítottuk az Aβ[1-42] peptidet. A szintézis optimalizálására az eddig alkalmazott oldószerek mellett kipróbáltuk a dimetilszulfoxidot (DMSO) is, amely közismerten dezaggregáló tulajdonságú oldószer, valamint anizol alkalmazását diklórmetán oldószerben. Összehasonlítottuk a különböző módszerekkel kapott nyers peptid tisztaságát és a termeléseket. Megállapítottuk, hogy Fmoc-stratégia alkalmazása esetén diklórmetánban 10 % (v/v) anizol alkalmazásával elkerülhető szintézis közben a növekvő peptidláncnak a gyantán történő aggregálódása, így nagyobb termeléssel, tisztább Aβ[1-42] nyers termék nyerhető a

szintézis során. Az A β [1-42] racionális szintézisének kidolgozásával lehetővé vált, hogy nagy mennyiségű A β [1-42]-t állítsunk elő a biológiai vizsgálatok számára. Ennek a módszernek és eredményeinknek az összefoglalását a J. Peptide Science folyóiratba küldtük el publikálásra.

c/ β -amiloid antagonist peptidek neuroprotektív hatásának vizsgálata.

Humán neuroblasztóma sejt tenyészetben (SH-SY5Y) MTT-teszttel vizsgáltuk meg, hogy az előállított új peptidek milyen mértékben védik ki a β A[1-42] neurotoxikus hatását. Az MTT-teszt egy tetrazol-színezék formazán-származékká történő redukcióján alapul. Az ép sejtekben a redukált koenzimek képesek a tetrazol redukációjára és a képződő formazánt a sejt aktív transzporttal (ATP-igény) kiűzi. Ezzel az egyszerű spektrofotometriás módszerrel mennyiségileg jól jellemezhető a sejtek mitokondriumainak állapota és a sejt energiatermelő folyamatai, a sejt általános állapota. Az eredeti MTT módszert néhány ponton lényegesen módosítottuk, hogy egyaránt mérhető legyen az A β antagonisták és a β -szerkezetrombolók (BSB) neuroprotektív hatása. Eredményeink a következőképpen összegezhetők:

- 1) SH-SY5Y sejtenyészetben néhány A β antagonist és BSB-peptidünk a β -amiloiddal (A β (1-42)) együtt adva 5-szörös feleslegben kivédi az A β (1-42) neurotoxikus hatását.
- 2) Mivel a korábbi vizsgálatok során az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejteknél éppen csak elkezdődött a differenciálódás és a tenyészetben a vizsgálat alatt is állandóan változott a sejtszám, az MTT-teszttel kapott eredményeket folyamatosan korrigálni kellett. Ezért új módszert dolgoztunk ki az amiloidok neurotoxicitás vizsgálatára, differenciált neuroblasztóma sejteken. Azt találtuk, hogy 10 μ M transz-retinsav és 0,5 % DMSO jelenlétében az SH-SY5Y sejtek 1 hét alatt teljesen differenciálódnak és arborizálódnak: bonyolult neurit-hálózatot alakítanak ki. Ha ezeken a sejteken mérjük az MTT-teszttel az amiloidok neurotoxicitását és a β -szerkezetrombolók védő hatását, sokkal pontosabb eredményeket kapunk.

3) Megvizsgáltuk az amiloid aggregátumok neurotoxikus hatásának időbeli lefutását, differenciált SH-SY5Y sejtenyészeten, fluoreszcenciás mikroszkópos módszerekkel. A toxikus aggregátumok hozzákötődnek a sejtmembránokhoz és rövid idő alatt dezarborizációt, vezikularizációt, a neuritok elhalását, a sejt legömbölyödését idézik elő. A folyamat morfometriával kvantitativ is értékelhető. Méréseink szerint a differenciált SH-SY5Y neuroblasztóma tenyészeten kb. 5 perc alatt az A β aggregátumok toxikus hatása irreverzibilissé válik. Ha ennél tovább érintkezik az A β aggregátum a sejtmembránnal, már hiába bármilyen lemosás, a sejtek rövid idő alatt elpusztulnak. *In vivo* morfológiai vizsgálatok azt bizonyították, hogy különösen az axonok és szinapszisok érzékenyek az A β aggregátumokra.

4) A β -amiloidok neurotoxicitásának vizsgálatára az előzőleg említett differenciált neuroblasztóma-tenyészeten (SH-SY5Y) kívül primer sejt kultúrát is alkalmaztunk, amely a neuronok mellett glia sejteket is tartalmazott. Bebizonyítottuk, hogy az *in vitro* teszteknel is nélkülözhetetlen olyan sejt kultúrák alkalmazása, amelyekben az idegsejtek közötti kapcsolatok már kiépülnek. A β -amiloidok fő támadási helye éppen a szinapszis és az axon. A szintetikus munkánk során olyan penta- és tetrapeptideket találtunk, amelyek a fenti sejt kultúrákat és MTT-tesztet alkalmazva teljesen kivédtek az A β (1-42) aggregátumok neurotoxikus hatását.

5) Mikrofluoreszcenciás imaging technikával SH-SY5Y human neuroblasztóma sejtvonalon Fura-2 festéket alkalmazva megvizsgáltuk a leghatásosabb új peptidjeinket és azt tapasztaltuk, hogy kivédtek a β A(1-42) intracelluláris Ca²⁺ növelő hatását.

6) A leghatásosabb új peptidek hatását megkíséreltük *in vivo* tesztekben mikrodialízis alkalmazásával is megvizsgálni patkányokon, de a rendkívül hidrofób és gyorsan aggregálódó A β (1-42) peptidből nem sikerült a kísérlethez szükséges mennyiséget vízben feloldani. Az 50000 Da-nál elválasztó szűrő alkalmazásával pedig csak maximum hexamerek kerülnek be az agyba és

ezek nem eléggé neurotoxikusak. Így ez a módszer nem vált be a neuroprotektív hatások vizsgálatára.

7) Az *in vitro* leghatásosabb peptideket elektrofiziológiai módszerrel *in vivo* körülmények között is megvizsgáltuk. Ezeknél a vizsgálatoknál altatott patkányokat használtunk, a neurotoxikus A β (1-42) peptidet, illetve a neuroprotektív anyagokat mikro-iontoforézissel (multibarrel elektród) juttattuk be a patkány agyba. NMDA-val ingereltünk, néztük a neuron-neuron kapcsolatok alakulását. A β (1-42) adására az ingerelhetőség hirtelen megnő és magas szinten marad. Az LPYF tetrapeptid származékai, a P29 és P59 kódszámú vegyületek teljesen kivédtek az A β (1-42) neurotoxikus hatását.

8) Hím, Wistar patkányokon is megvizsgáltuk az A β (1-42) és a protektív peptidek hatását. A peptideket mikroinjekcióval, sztereotaxiás készülék segítségével juttattuk be a 3. agykamrába. Az open field, T-maze, radial-maze és Morris water-maze kísérletek egyértelműen azt bizonyították, hogy az A β (1-42) növeli a hibák számát, megnöveli a tanulási időt, csökkenti az explorációs képességet, míg az említett neuroprotektív vegyületek kétszeres mólfeleslegben alkalmazva kivédtek az A β (1-42) neurotoxikus hatásait.