

Eredmények a pályázati munkatervben megadott ütemezés szerint

Első év

1.A CART hatásának vizsgálata karragén indukált hiperalgéria modellben

A CART(55-102) peptidet tartják a CART peptidcsalád egyik biológiailag is aktív tagjának. A peptid intratekális beadást követően karragénnel kiváltott hiperalgéria modellünkben jelentős motoros abnormalitásokat idéz elő. Ismertek olyan irodalmi adatok, amelyek a fájdalommodellektől függetlenül leírják, hogy a CART(55-102) az agykamrákba vagy különböző agyterületekre történő beadást követően dóziszfüggően jelentős motoros zavarokat idéz elő. Feltételeztük, hogy a motoros perturbációk létrejöttéért a peptid három diszulfid híddal stabilizált „globuláris” régiója tehető felelőssé. Így megnéztük, hogyan viselkedik a CART(55-76) globuláris régió nélküli peptid, valamint az N-terminusán elhelyezkedő Ile-Pro-Ile tripeptidtől és a globuláris régiótól is megfosztott CART(62-76) fragmentum. A méréseket karragénnel kiváltott gyulladásszerű modellben a mechanikai hiperalgériás küszöb meghatározásával végeztük. Vizsgáltuk a dózis-hatás és idő-hatás görbéket. A dózis-hatás vizsgálatok azt mutatták, hogy: (1) A CART(55-102) a legkisebb vizsgált 0,1 nM-os koncentrációban is jelentősebb antihiperalgériás hatást váltott ki, mint a másik két peptidfragmentum, viszont 0,3 nM-os koncentrációnál mérsékelt, nagyobb koncentrációknál pedig a méréssel jelentősen interferáló tremor jelent meg, ami ezekben az esetekben a kiértékelést megbízhatatlanná tette. (2) Mind a CART(55-76), mind a CART(62-76) peptidek antihiperalgériás hatást mutattak, az ED50 értékek között az eltérés szignifikáns, egy nagyságrendnyi volt. Mozgási abnormalitások egyetlen koncentrációnál sem jelentkeztek. Az idő-hatás görbék elemzése szerint: (1) a CART(55-102) mindhárom dózisban (0,1-0,3-1,0 nM) és minden időpontban szignifikánsan mérsékelt a mechanikai hiperalgériát; (2) a CART(55-76) mindhárom alkalmazott koncentrációban (0,1-0,3-1,0 nM) 15 és 30 percnél szignifikánsan csökkentette a mechanikai hiperalgériát. A két nagyobb dózis hatása már 5 percnél, a legnagyobb dózis hatása pedig még 60 percnél is szignifikáns volt. (3) A CART(62-76) különböző (1,0-3,0-10,0 nM) koncentrációi esetén a két nagyobb dózis hatása minden időpontban, míg a legkisebb dózis 15 és 30 perc után tér el a kontroll állatokhoz képest. A legnagyobb dózis esetén mind az ipszi-, mind a kontralaterális oldalon szignifikáns változás mutatkozott a kontroll állatok kezeletlen (kontralaterális) oldalához viszonyítottnak. Korábban bizonyítást nyert, hogy az Ile-Pro-Ile tripeptid jelentős antihiperalgériás hatással rendelkezik a fent említett modellben, és ez a hatás mind általános opioid receptor antagonistával naltrexonnal, mind endomorphin-2 (EM2) antiszérummal blokkolható volt. A μ -opioid receptor (**MOR**) érzékenysége bizonyítására a vizsgálatot specifikus μ -opioid receptor antagonistá CTAP jelenlétében is elvégeztük, amely meggátolta az antihiperalgériás hatás kialakulását. Naltrexonnal és EM2 antiszérummal a CART(55-76) peptid antihiperalgériás hatása is kivédhető volt.

Farmakológiai eredményeink arra utalnak, hogy a CART(55-102) molekulán belül az Ile-Pro-Ile terminus, a 62-76 szakasz, valamint a 77-102 globuláris régió más-más mechanizmusokat aktiválhat, amelyek külön-külön is, de akár együttesen is lejátszódhatnak dóziszfüggő módon. Az Ile-Pro-Ile peptidszakasz önmagában és a CART peptiden belül is μ -receptor aktivációt idéz elő, amelyben az EM2 is érintett.

2.Az EM2 szintézisben szerepet játszó peptidek morfológiai vizsgálata.

Többes (négyes) immunfluoreszcens festéseink és kvantitatív analíziseink a P anyag (SP), EM2, CART(55-102) és NPY peptidek együttes előfordulását bizonyították és számszerűsítették a gerincvelő hátsó szarvában. A vizsgált EM2 tartalmú axonterminálisok 79,6, ill. 52,1 százaléka (lamina I, ill.

lamina II) tartalmazott egyidejűleg CART peptidet. Az EM2-t expresszáló boutonok 65,9, ill 70,3 százaléka (lamina I és II) SP-re is immunreaktívnek bizonyult. Az EM2-t, CART-ot és SP-t koexpresszáló végződések (az EM2-pozitív terminálisok 54,2%, ill. 31,2% a lamina I-ben, ill. II-en) túlnyomó többségénél (92,6-93,5% mind a lamina I-ben, mind a lamina II-ben) az NPY is megfigyelhető volt: leginkább NPY-tartalmú végződések feküdtek hozzá az EM2/CART/SP-pozitív terminálisokhoz, ritkábban a négy peptid egyazon terminálisban expresszálódott. Morfológiai eredményeink azt bizonyították, hogy a pályázatban vázolt hipotézisnek megfelelően a DPP4 enzim szubsztrátjait szolgáltató neuropeptidek együttesen jelen vannak a gerincvelő hátsó szarvában.

3. Az EM2 membránkötöttségének vizsgálata normál és fenntartott gyulladásoz körülmények között. Elektronmikroszkópos vizsgálatainkban az EM2-t ezüsttel intenzifikált, arannyal jelölt antitestek segítségével mutattuk ki a gerincvelő hátsó szarvában. A korábbi leírásokkal ellentétben EM2-immunreaktivásra utaló aranyszemcsét soha nem találtunk dens core vesiculákban, csak a vezikula membrájához kívülről kapcsolódva, illetve az axon membránjához nagyon közeli pozícióban.

A három vizsgálatcsoport eredményei azt mutatják, hogy mind az Ile-Pro-Ile tripeptid önmagában, mind az Ile-Pro-Ile szekvenciát tartalmazó teljes CART és a CART(55-76) peptid EM2 kapcsolt mu-receptor aktiváción keresztül antihiperalgéziás hatást vált ki a karragénnel indukált hiperalgézia modellben. Ez a hatás létrejöhet a pályázatban leírt hipotézisnek megfelelően, azaz az EM2 de novo szintézisével, illetve az EM2 csökkent bontásával, amit a DPP4 enzim gátlása eredményez. Megvan a lehetősége annak, hogy ezek a folyamatok külön-külön, de akár együttesen is lejátszódnak megfelelő körülmények között.

Második év

1. A CART peptidek és a DPP4 inhibitorok antihiperalgéziás hatásának kialakításában szerepet játszó opioid receptorok vizsgálata

Annak meghatározására, hogy a CART(55-76), CART(62-76) valamint a DPP4 inhibitor IPI és vildagliptin antihiperalgéziás hatását pontosan milyen opioid-receptorok mediálják, a peptidek hatását szelektív μ - (CTAP), δ - (TIPP Ψ) és κ - (GNTI) antagonisták jelenlétében vizsgáltuk a karragén-indukált hiperalgézia modellünkben. A 3nM CART(55-76) és 30nM IPI antihiperalgéziás hatását teljes egészében (96,21% \pm 2,82 és 92,59% \pm 2,53) eliminálta a (200 pM) CTAP, ami arra utal, hogy ezen peptidek hatása μ -receptor mediált. Ezzel szemben a 10nM CART(62-76) hatását 30,74% \pm 4,64-ban a CTAP és 89,78% \pm 3,11-ban a (10nM) GNTI szüntette meg, sugallva, hogy ebben a folyamatban elsődlegesen a κ -receptor érintett, de a μ -receptor közreműködése sem elhanyagolható. A vildagliptin antihiperalgéziás hatását 32,79% \pm 5,87-ban a CTAP, 45,40% \pm 6,01-ban a GNTI és emellett 91,49% \pm 1,71-ban a TIPP Ψ (1 nM) eliminálta, ami mindhárom klasszikus opioid-receptor szerepét bizonyítja. (Az értékek átlag % \pm standard hiba formában vannak megadva!)

Opioid receptor assay - egér vas deferens (μ -, δ -) és tengerimalac ileum (κ -receptor) - azt mutatta, hogy míg a CART(55-76) nem aktivál közvetlenül egyetlen opioid-receptort sem, addig a CART(62-76) aktiválja a κ -receptorokat.

2. CART fragmentumok kimutatása a gerincvelőben.

Mivel a rendelkezésünkre álló antitestek nem tudják elkülöníteni, a CART(55-102) és CART(62-102) természetes peptideket, ezért eddig nem volt ismert, hogy mindkét fragmens, vagy csak az egyik

található-e meg a gerincvelőben. Western blot analízissel kimutattuk, hogy mindkét peptid jelen van a gerincvelőben.

3. CART peptidek és DPP4 inhibitorok hatása akut nociceptív teszten

Akut nociceptív „tail flick” tesztekben sem a CART peptid fragmentumok, sem a DPP4 inhibitorok nem mutattak hatást.

4. DPP4 enzim immunhisztokémiai kimutatása patkány és egér gerincvelőben

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a DPP4 enzim ténylegesen megtalálható-e a gerincvelő hátsó szarvában és upregulálódik-e gyulladáshoz vezető körülmények között, immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk patkány és egér gerincvelőben. Az enzim jelenléte kimutatható volt a gerincvelőben patkányban és egérben is, elsődlegesen a nociceptívban érintett hátsó szarvban. Az enzim upregulációja volt megfigyelhető az L5-ös szegmentum mediális részén, azon a területen, ahol a talp bőrének nociceptív afferensei végződnek mindkét állatfajban.

A CART peptidek jelentős antihyperalgiás hatást mutattak, ezért elindítottunk egy erre a tényre alapuló szabadalmi eljárást 2013-ban. A Semmelweis Egyetem befogadta és támogatta ezt a szabadalmat, amelyre vonatkozó igazolásokat csatoltam a részjelentésekhez. Amíg a szabadalmi eljárás folyamatban volt, a Szabadalmi Hivatal kérésére a CART peptidekkel és a DPP4 enzimmel kapcsolatos eredményeink nem kerülhettek publikálásra.

4.A gerincvelői neuroncsoportok aktivitásának tanulmányozása akut nociceptívban és karragén-indukált hiperalgiában modellben

A gerincvelő hátsó szarvában elhelyezkedő különböző neurokémiai neuroncsoportok c-fos és pERK aktivitását vizsgáltuk akut nociceptív ingerek (hő, kémiai, mechanikai) és karragénnel kiváltott gyulladáshoz vezető körülmények között, az inger követő különböző időpontokban. Számos neuron csoport mutatott aktivitást mindkét marker esetén, azonban a rapiden bekövetkező és hosszan megmaradó aktivitás az időbeli felbontás elemzését nem tette lehetővé.

5.A különböző MOR agonisták és DPP4 inhibitorok hatásának leírása akut nociceptívban és fenntartott gyulladáshoz vezető körülmények között.

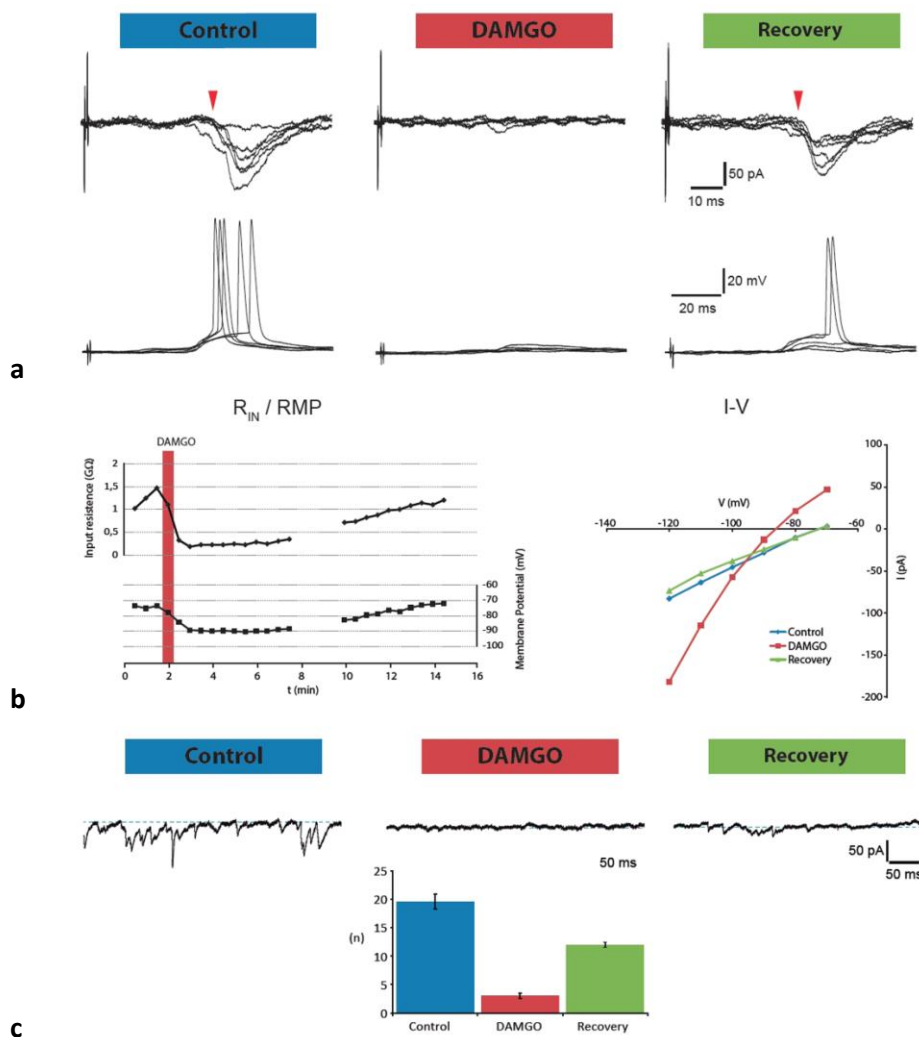
A pályázatban vállaltaknak megfelelően az egyes agonisták dózis-hatás görbéjét vizsgáltuk akut hőinger (tail-flick teszt) és karragén indukált gyulladáshoz vezető körülményekben. EM2 ED50 értékek - gyulladás: 0,27nM (0,199-0,377), akut fájdalom: 10,68 nM (5,1-22,37). DAMGO ED50 értékek - gyulladás: 0,9 pM (0,74-1,26), akut fájdalom: 5 pM (3,4-10,55). Vildagliptin ED50 értékek - gyulladás: 0,455 nM (0,335-0,617), akut fájdalom: 30 nM-ban sem hatott. Az értékek átlag (95% KI) formában vannak megadva! A teljes agonista DAMGO esetén kisebb különbség mutatkozott a két modellben, mint a parciális agonista EM2 esetén. Ez arra utal, hogy a gyulladáshoz vezető körülményekben vagy nagyobb az elérhető receptor készlet vagy a receptoraktiváció fokozottabb.

Harmadik-negyedik év

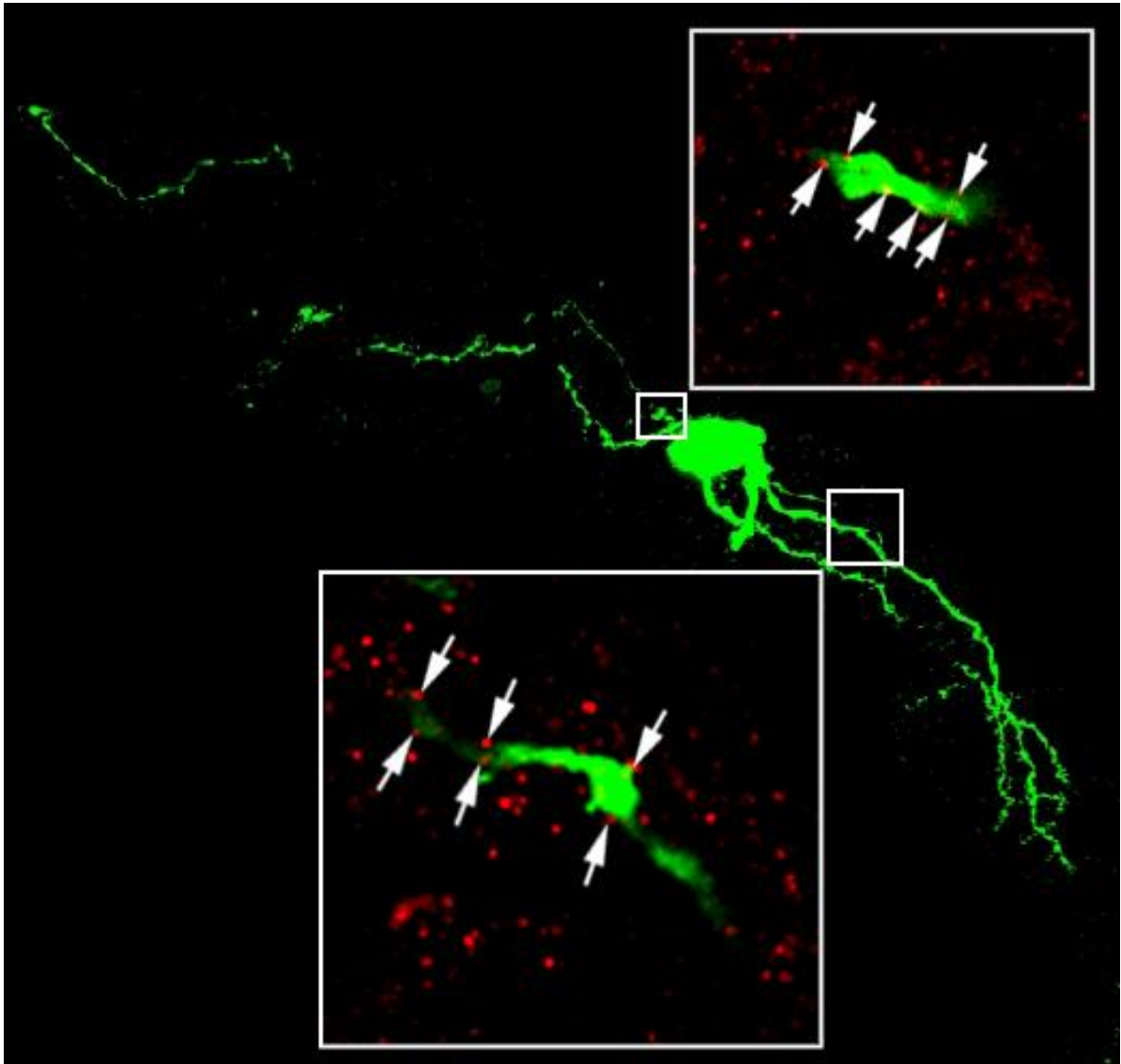
1.A MOR agonistákra válaszoló lamina I és II neuronok fiziológiai és morfológiai karakterizálása, kapcsolatrendszerük feltérképezése

Kísérleteinkben, P14-21 napos Wistar patkányok gerincvelői hátsó szarvában, az I-es laminában végeztünk whole-cell patch-clamp méréseket. A mérésekhez intakt lumbális gerincvelőszakaszt használtunk in vitro, az L4-es vagy L5-ös szegmentumhoz tartozó megtartott hátsó gyökérrel együtt. A fenti kísérleti felállásban megvizsgáltuk, hogy a MOR agonista DAMGO ($1\mu\text{M}$) milyen hatással van: I) az elvezetett I-es lamina neuron passzív membránparamétereire; II) a primer afferensek stimulációjával kiváltott mono- és polyszinaptikus C- és $A\delta$ rostok kiváltotta EPSCkre; III) és a mért sejten észlelhető spontán EPSC-k és IPSC-k frekvenciájára.

Előzetes eredményeink alapján a MOR megtalálható I-es lamina sejtek membránjában. Ennek megfelelően a DAMGO-ra érzékeny sejtek (6/36 sejt, 16%) bemeneti ellenállása jelentősen csökkent és a sejt ezzel egyidőben hyperpolarizálódott (**1.b ábra**). Ez a megfigyelés megfelel a korábban a II-es laminában tapasztalt DAMGO érzékeny sejteken tapasztaltaknak (Santos és mtsai, 2004), azaz valószínűsíthetően hasonló mechanizmus a GIRK csatornák közreműködése a felelős a jelenségért. Fontos megjegyezni, hogy míg a II-es lamina sejtjeinek kb. 10%-a reagált a DAMGO-ra, addig a mi kisebb számú mintánkban ez az arány valamivel magasabbnak mutatkozott.



1. ábra



2. ábra: A képen egy DAMGO-ra reagáló, biocytinnel (zöld) feltöltött lamina I sejt (Cell ID 2015.09.18_E481) konfokális mikroszkóppal, több sík egybevetítésével készített képe látható. Az inzertek proximális dendritszakaszokat mutatnak egyetlen optikai síkban. A piros pontszerű képletekre mutató nyilak a dendriteken elhelyezkedő MOR receptorokat jelzik.

A C- és Adelta primér afferensek kiváltotta EPSC-k DAMGO hatására az elvezetett sejtek közel felében (14/29 sejt, 48%) szinte teljesen eltűntek a DAMGO applikáció időtartama alatt (**1.a ábra**). A DAMGO kimosását követően az EPSC-k bár kisebb amplitúdával de visszatértek. Current clamp elvezetések során a primér afferens ingerlés DAMGO applikáció alatt és annak kimosását követően küszöb felettinek bizonyult, míg a MOR aktiváció során a primér afferens ingerlés nem volt képes tüzelésre bírni az I-es lamina neuronokat. A primér afferenseken kiváltott hatás finomabb vizsgálatát nem végeztük el, mivel a pályázattal egyidőben Sandkühler és munkatársai megállapították, hogy a primér afferens terminálisokból történő transzmitterfelszabadulás MOR dependens blokkjában a K-csatornák helyett elsősorban különböző típusú Ca-csatornák játszanak szerepet ([Heinke és mtsai, 2011](#)). A DAMGO érzékeny primer afferensek aránya esetünkben hasonlóan bizonyult mint amit közleményünkben bemutattak ami jó validációja a kísérleti felállásunknak.

A DAMGO alkalmazása során a primér afferens aktivációtól független, spontán hálózati aktivitásra utaló, és az intakt preparátumunkban -ahol nagyobb számú lokális szinaptikus kapcsolat megtartott-

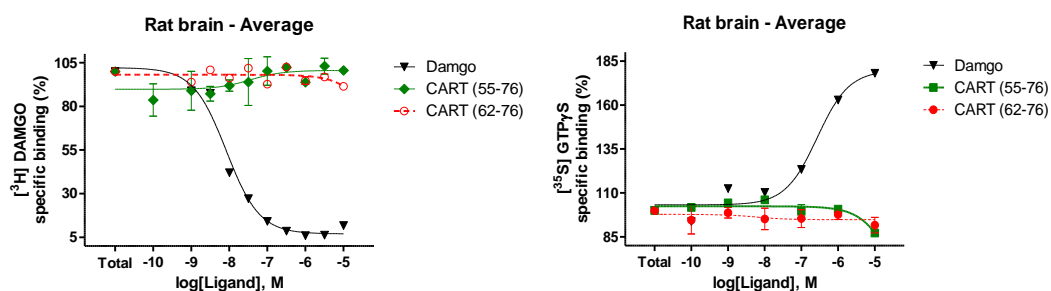
jobban tettenérhető spontán EPSC-k és IPSC-k számát is jelentősen lecsökkentette (**1.c ábra**). Ez arra utal, hogy a korábban már megfigyelt (REF) nem primér afferenshez köthető axonális MOR valószínűleg lokális gerincvelői neuronokon található Ezen neuronok közé tartozhatnak pl. azon I-es lamina interneuronok melyek gazdag axonkollaterális rendszere sűrűn behálózza a felszínes laminákat (Szücs és mtsai, 2013) és amelyek membránjában a morfológiai és fiziológia iméréseink alapján előfordulhat a MOR. Ezen sejtek a DAMGO okozta hyperpolarizáció miatt „elhallgatnak”, ami az általuk innervált sejteken a serkentő és gátló bemenetek számának csökkenését eredményezi. A fiziológiailag karakterizált és biocytinnel feltöltött sejteken MOR ellenes immunreakciót (**2. ábra**) végeztünk annak bizonyítására, hogy a MOR nem csak a lamina II sejtjein és primer afferens/interneuron terminálisokon fejeződik ki. A fiziológiai eredményekkel összhangban MOR-t tudtunk kimutatni a vizsgált sejteken, azoknak leginkább a dendritjein. Annak ellenére, hogy a receptor denzitás jóval kisebbnek mutatkozott, mint a lamina II „MOR” sejteken, a receptorok hatékonysága a lamina I sejteken legalább annyira jónak bizonyult.

2. MOR agonisták és DPP4 inhibitorok különböző neurotranszmitterek felszabadulására gyakorolt hatásának vizsgálata

A projekt ezen kísérletei elkezdődtek. Az EM2 és CGRP felszabadulásra vonatkozó mérések folyamatban vannak.

3. A CART (55-76) és a CART(62-76) opioid receptorokhoz való kötődésének vizsgálata

Egyik peptid sem aktív opioid receptor kötési tesztben, sem pedig G-fehérje aktivációs tesztben, patkány agyi membránpreparátumokon mérve. A DAMGO mint pozitív kontrollt volt jelen a vizsgálatokban. A CART (62-76) peptid igen gyenge inverz agonizmust mutat egy koncentrációban. Ezek az eredmények összhangban vannak a vas defferens-en és az ileumon történt vizsgálatokkal. Azaz bizonyítja, hogy sem a CART (55-102), sem a CART(55-76) nem kötődik direkten opioid receptorokhoz, míg a CART(62-76) nagyon gyenge inverz agonistaként működhethet. Ez utóbbi állítás még további vizsgálatokat igényel.



4. DPP4 inhibitorok hatása neuropatikus körülmények között

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a DPP4 enzim csak a gyulladós folyamatok esetén játszik szerepet a hyperalgesia kialakításában, vagy általánosabb ez a mechanizmus, farmakológiai vizsgálatainkat részleges idegkötéses neuropátia (Seltzer) modellben is elvégeztük. Jól ismert, hogy ebben a neuropátia modellben mechanikai hyperalgesia, mechanikai allodynia és hideg allodynia is megjelenik. Ezért a két DPP4 inhibitor IPI (30 nmol/állat) és Vildagliptin (30 nmol/állat) hatását ebben a modellben is megnéztük Randall-Selitto teszttel, DPA-val (dynamic plantar aesthesiometry) és hideg allodynia teszttel. Hasonlóan a gyulladós körülményekhez a DPP4 inhibitorok szignifikáns

antihyperalgesiás hatást mutattak (IPI: $37,9 \pm 12,4\%$, Vildagliptin: $41,8 \pm 10,4\%$), azonban sem a mechanikai, sem a hideg allodynaiát nem befolyásolták. A gyulladós modellekben tapasztaltakkal szemben, az általános opioid antagonistá naltrexon (s.c. 0,5 mg/ttkg) nem befolyásolta az inhibitorok antihyperalgesiás hatását. Ezen eredményeink azt mutatták, hogy a DPP4 enzim szerepet játszik a mechanikai hyperalgesia kialakításában, de míg a gyulladós folyamatokban ez opioid függő folyamat, neuropatikus körülmények között nem.

5. A DPP4 enzim mRNS expressziójának vizsgálata normál, gyulladós és neuropatikus patkány modellekben

Immunitokémiai vizsgálataink szerint a DPP4 enzim jelen van a gerincvelőben és kifejeződése fokozódik karragénal kiváltott gyulladásban. Részben az immunitokémiai eredmények alátámasztására, részben a transzkripció-transzláció folyamatainak vizsgálatára akut gyulladásban és neuropatikus körülmények között, qPCR és in-situ hybridizációs vizsgálatokat végeztünk. A qPCR vizsgálat eredményei szerint a DPP4 enzim mRNS-e jelen van a gerincvelőben, de nincs szignifikáns különbség a kontroll, a gyulladós és neuropatikus állatokból kivett minták között (RQ): 1.00 ± 0.16 vs. 0.70 ± 0.09 vs. 1.26 ± 0.29 , One-Way ANOVA $P=0.301$). Az in situ hybridizációs vizsgálat az mRNS alacsony szintjét mutatta, ami nem változott szignifikánsan sem gyulladásban sem neuropatikus körülmények között (Kontroll: $N=9$, 1.2 ± 0.2 ; gyulladás: $N=9$, 1.1 ± 0.1 ; neuropátia: $N=9$, 1.0 ± 0.1 ; One way ANOVA, $p=0,21$). A szenz próba által kapott jel egyenlő volt a háttérrel, míg az antiszenz használata szignifikáns különbséget mutatott ehhez képest (antiszenz: $N=27$, median=110.4, 25% at 80.7, 75% at 135.5; szenz: $N=19$, median=0, 25% at 0, 75% at 21.7; Mann-Whitney Rank Sum Test $p<0,001$)

6. DPP4 protein kifejeződése normál és patológiás körülmények között.

Western-blottal történő vizsgálataink szerint a DPP4 protein szintje (aktinra normalizált értékekkel: Kontroll: $0,168 \pm 0,0495$ Gyulladás: $0,547 \pm 0,0597$ Neuropátia: $0,333 \pm 0,0649$ ANOVA Holm-Sidac method $p=0,023$) és a gerincvelői hátsószarv mediális kétharmadának DPP4 immunreaktivitás denzitása (K: $3,416 \pm 0,376$, Gy: $5,656 \pm 0,7990$ S: $3,178 \pm 0,4380$ ANOVA Student-Newman Keuls method $p=0,016$) szignifikánsan megemelkedik gyulladásban mind a kontroll, mind a neuropatikus körülményekhez képest. Ugyanakkor sem az immunreaktivitás, sem a protein szint változása nem szignifikáns neuropátiában a kontrollhoz és a gyulladós állapothoz képest. Eredményeink szerint krónikus fájdalomállapotokban létrejövő DPP4 enzim expressziójának emelkedése nem a transzkripció, hanem a transzláció fokozódásában jelenik meg.

7. DPP4 enzim expressziójának vizsgálata neuronokban és glia sejtekben.

Immunhisztokémiai elemzéseink kontroll állatokon azt mutatták, hogy a DPP4 enzim kifejeződik neuronok sejttestén és axonterminálisokban. A synaptophysinnel jelölt és vglut-2 -re pozitív serkentő ill. vglut immunreaktív gátló axonterminálisok egyaránt kifejezik az enzimet. Primer afferens eredetű, CGRP tartalmú boutonokon úgyszintén megtaláltuk a DPP4-et. Map-2-vel jelölt dendriteken azonban csak synaptophysinnel együtt mutatkozott a jelölés sugallva, hogy a DPP4 a dendrithez mindig preszinaptikus elhelyezkedésű, azaz dendritek nem expresszálják. A neuronok mellett DPP4 immunjelölés asztrocitákon és mikroglia sejteken is látható volt. Kontroll körülmények között a DPP4 denzitás az asztrocitákon szignifikánsan nagyobb volt mint a mikroglia és a neuronokon. Ez utóbbi két sejtcsoport között nem volt szignifikáns különbség. (asztrocita: $N=42$, median=0.333, 25% at 0.25, 75% at 0.46; mikroglia: $N=50$, median=0.148, 25% at 0.083, 75% at 0.02; neuron: $N=37$

median=0.093, 25% at 0.023, 75% at 0.143; Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks, Dunn's method at $P<0.001$). Karragénnel kiváltott gyulladásban a DPP4 denzitás szignifikánsan megnőtt mindkét gliasejtben, de nem a neuronokban. Neuropátiás körülmények között DPP4 expresszió fokozódás szignifikáns mértékben csak a mikroglia sejtekben jelent meg. (asztrocita kontroll: $N=51$, 0.35 ± 0.02 , gyulladás: $N=51$, 0.45 ± 0.01 , Seltzer: $N=48$, 0.3 ± 0.01 , one way ANOVA, Student-Newman-Keuls method, $P<0.001$; microglia kontroll: $N=50$, median=0.148, 25% at 0.083, 75% at 0.2, gyulladás: $N=36$, median=0.25, 25% at 0.127, 75% at 0.353, Seltzer: $N=40$, median=0.22, 25% at 0.138, 75% at 0.257, Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks, Dunn's Method $P<0.001$; neuron kontroll: $N=46$, median=0.093, 25% at 0.023, 75% at 0.143, gyulladás: $N=49$, median=0.092, 25% at 0.042, 75% at 0.203, Seltzer: $N=42$ median=0.102, 25% at 0.01, 75% at 0.133, Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks, $P=0.149$)

8. Idegnyújtáshoz kapcsolódó fájdalommintázatok és morfológiai változások vizsgálata egy klinikailag releváns végtaghosszabbítás modellben

Amiatt, hogy a projekt eredményei a szabadalmi eljárás miatt nem voltak publikálhatók, egy olyan klinikailag releváns modell vizsgálatába kezdtünk, amelyről úgy gondoljuk, hogy alkalmas lehet mind a CART peptidek, mind a DPP4 inhibitorok gyógyászati célú felhasználásának vizsgálatára. Ismert, hogy a születési rendellenességként megjelenő vagy szerzett végtaghossz különbségek nagyon komoly mentális és fizikai problémákat okoznak azoknak a gyermekeknek, akik ilyen deformitásokkal kell, hogy megküzdjenek. A callus distrakción alapuló végtaghosszabbítás egy olyan eljárás, amellyel korrigálni lehet az ilyen végtag deformitásokat. Sajnos a folyamat igen jelentős fájdalommal jár, ami miatt sokszor le kell állítani a beavatkozást, majd a csont teljes gyógyulását követően lehet újratekinteni. A fájdalom feltételezhetően a callus distractioval együttjáró idegnyúlás-idegsérülés következménye. Munkánk során osteotomizált (OG), lassú distractio-jú (SDG, osteotomizált és 1 mm/nap nyújtás 14 napig) és gyors distractio-jú (FDG, osteotomizált és 3x1mm/nap nyújtás 8 napig) nyulakat vizsgáltunk. Az állatok végtagterhelését, ami arányos volt a diszkomfort érzettel, grammokban mértük (Incapacitance Tester), az osteotomiát követő 7. naptól, amikor a callus már kialakult és a nyújtás elkezdődött, a nyújtás befejezéséig, vagyis a 18. (FDG esetén) és 24. (SDG esetén) napig. A distraktorok elhelyezkedését és a callus alakulását az operáció napján, az azt követő 10. napon és a nyújtás befejeztével röntgenfelvételeken ellenőriztük. A perfúziós fixálást követően az ideg sérülését, esetleges becsípődését ellenőriztük. Az inkapacitancia fokozatosan nőtt a 10. postoperatív napig mindhárom csoportban. A csak osteotomizált csoportban ezt követően elkezdett csökkenni. Statisztikailag szignifikáns különbség az osteotomizált és nyújtott csoportok között a 15-21. nap között jelent meg és nyújtás befejezésével tűnt el. Az inkapacitancia legnagyobb mértékben az FDG csoportban nőtt meg. Ezek az adatok nagyon jól korrelálnak a gyerekek fájdalom állapotainak lefolyásával végtaghosszabbítás alatt és után, ami a modell használhatóságát bizonyítja. Hátsógyöki ganglionok méret és P anyag (nociceptív neurotransmisszió egyik kulcs peptidje) immunreaktivitását vizsgálva azt kaptuk, hogy kontroll állatok S1 ganglionjában a SP pozitív sejtek aránya $26,6\pm 2,9\%$ volt az összes sejthez viszonyítva. A SP immunreaktív sejtek $19,7\pm 3,5\%$ -ka tartozott a kis méretűek csoportjába, míg $6,9\pm 2,8\%$ a nagy méretű sejtek közé tartozott. Az OG csoportban $28,0\pm 1,0\%$ -ka a neuronoknak volt SP pozitív, ami nem volt statisztikailag eltérő a kontroll csoporttól ($p=0,2903$). A nyújtott csoportokban az összsejtszám nem különbözött a kontroll csoporttól, de a SP pozitív sejtek aránya megváltozott. A SP immunreaktivitás szignifikánsan csökkent mind a naiv, mind az OG csoporthoz képest (SDG: $18,0\pm 1,8\%$, FDG: $15,9\pm 2,5\%$, z -test $p<0.05$). A SP pozitív nagy és kis sejtek aránya szintén megváltozott. A SP pozitív kis sejtek aránya szignifikánsan

csökkent (SDG: $11,5 \pm 0,9\%$, FDG: $7,9 \pm 1,9\%$) a nagy sejtek aránya nem változott (SDG: $6,7 \pm 1,5\%$ $p=0,81$, FDG: $7,9 \pm 2,4\%$ $p=0,21$) a nyújtott csoportokban a kontroll állatokhoz képest. A gyorsabb nyújtás szignifikánsan nagyobb csökkenést eredményezett a lassabb nyújtáshoz képest. Az OG csoportban az SP kis sejtek aránya nem változott szignifikánsan ($17,1 \pm 2,7\%$ $p=0,11$), míg a nagy sejtek aránya szignifikánsan megnőtt ($11,1 \pm 3,5\%$). A vizsgált S1 hátsógyöki ganglionban sem a satellita sejtek, sem a kisméretű sejtek nem mutattak morfológiai változásokat szemben néhány nagyméretű sejtrel. Ezekben a SP immunreaktivitást nem mutató neuronokban a nucleus eccentricusan helyezkedett el és a citoplazmában nagy vakoumók jelentek meg (OG: 3-4, SDG:15, FDG:13-17 sejt/ganglion).

Eredményeink szerint a 10. napig fokozódó postoperatív fájdalom a sebészi beavatkozásból származik, amit a nyújtás tovább növel. A gyorsabb és nagyobb mértékű nyújtás nagyobb fájdalomválaszt eredményez. A nyújtás sebessége és mértéke jól korrelál a kis sejtekben a SP immunreaktivitás csökkenésével. A nagy sejtek vacoualizációja feltehetően egy pathológiás válasz az idegsérülésre. Korábbi vizsgálatok a nagy sejtekben megjelenő SP expresszió fokozódást az allodynia kialakulásával hozták összefüggésbe. A mi eredményeink pedig inkább e folyamat regenerációban betöltött szerepét valószínűsítik.

Eredmények publikálása

A CART peptidekre vonatkozó USA-beli (US 62/209,452) és a magyar (P1500387) szabadalmi bejelentés benyújtása 2015. 08. 25-én megtörtént, ahogy a csatolt átvételi elismervények bizonyítják.

Inventors/Feltalálók: Zita Puskár

Márk Kozsurek

Kornél Király

Csaba Fekete

Applicants/Tulajdnosok: Semmelweis Egyetem, Budapest

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézete

Title/Cím: Peptides for use as DPP4 inhibitors and anti-hyperalgesic agents

A pályázat által támogatott, megjelent közlemény:

Nerve stretch injury induced pain pattern and changes in sensory ganglia in a clinically relevant model of limb-lengthening in rabbits.

Pap K, Berta Á, Szőke G, Dunay M, Németh T, Hornok K, Marosfői L, Réthelyi M, Kozsurek M, **Puskár Z**
Physiol Res. 2015;64(4):571-81. Epub 2014 Dec 3.

Írás, szerkesztés és bírálat alatt lévő közlemények:

The antihyperalgesic and acute antinociceptive effects of intrathecally injected DAMGO, endomorphin 2, Diprotin A and vildagliptin in rats

Apolka Szentirmay, Kornél Király, Márk Kozsurek, Judit Szalai, Pál Riba, Csaba Fekete, István Barna, András Z. Rónai, **Zita Puskár**

Contribution of the moonlighting protein dipeptidyl peptidase 4 to the development and maintenance of hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain states in rats

Kornél Király, Márk Kozsurek, Erika Lukácsi, Benjamin Barta, Alán Alpár, Tamás Balázs, Csaba Fekete, Szabon Judit, Zsuzsanna Helyes, Kata Bölcskei, Valéria Tékus, Zsuzsa Tóth, Károly Pap, Gábor Gerber, **Zita Puskár**

CART (55-102) peptide as a natural inhibitor of the DPP4 enzyme has antihyperalgesic effect in inflammatory and neuropathic pain models in rats

Márk Kozsurek, Kornél Király, Erika Lukácsi, Csaba Fekete, Balázs Gereben, Mohácsik Petra, Zsuzsanna Helyes, Kata Bölcskei, Valéria Tékus, Károly Pap, Gábor Gerber, **Zita Puskár**

A közleményekben szereplő eredmények és ábrák:

Intrathecal injected Ile-Pro-Ile and the non-peptide DPP4 inhibitor vildagliptin exerted potent, endomorphin 2- and opioid receptor-mediated antihyperalgesic effect in the rat Randall-Selitto test (**Fig. 1.**) whereas they had no antinociceptive action (at 30 nmol/rat) in the tail-flick test. nmol/rat).

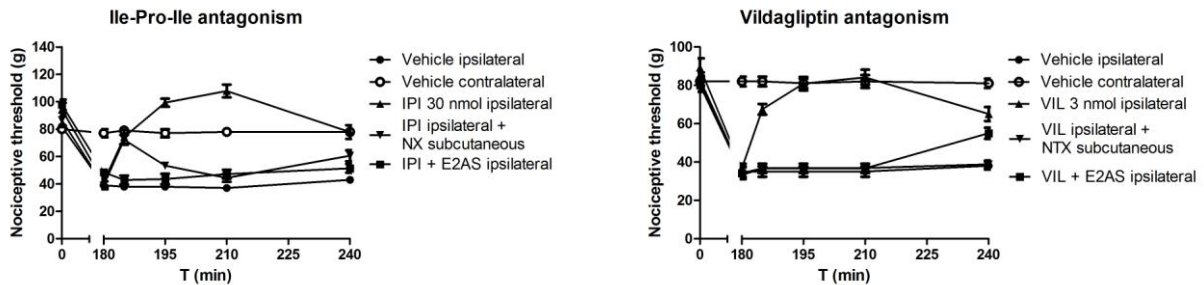
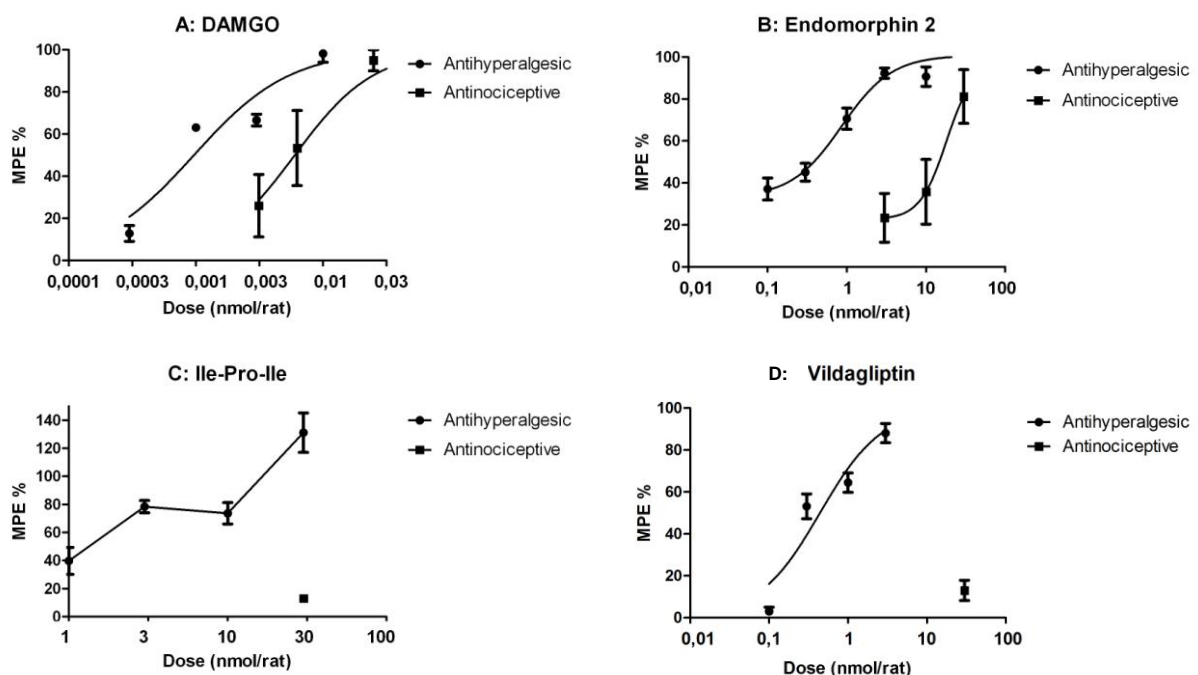


Figure 1. The antihyperalgesic effect of intrathecally injected Ile-Pro-Ile and vildagliptin and the antagonism by endomorphin 2 antiserum and subcutaneous naloxone / naltrexone. Nociceptive thresholds to pressure were determined by the Randall-Selitto method. Control values were measured immediately before intraplantar carrageenan injection (time "0") on the paws ipsi- (filled symbols) and contralateral (open circles) to carrageenan injection. After the full development of hyperalgesia on the ipsilateral side (at 180 min) test substances or vehicle were injected intrathecally (i.t.), and the measurements were repeated at 5, 15, 30 and 60 min after i.t. injection, both on ipsi- and contralateral paws. Subcutaneous (s.c.) treatment was given 10 (naloxone) or 15 (naltrexone) min before i.t. injection. Abbreviations: E2-AS: endomorphin 2 antiserum; IPI: Ile-Pro-Ile; VIL: vildagliptin; NTX: naltrexone; NX: naloxone. Symbols: circles: vehicle (open:contralateral, filled: ipsilateral); upright filled triangles: DPP4 inhibitors IPI, VIL), ipsilateral measurement; inverted filled triangles: DPP4 inhibitor-endomorphin 2 antiserum combination, ipsilateral measurement; filled diamonds: DPP4 inhibitor-s.c. opioid antagonist combination, ipsilateral measurement.

We compared the antihyperalgesic and acute antinociceptive potencies of intrathecally injected DAMGO, endomorphin 2, Ile-Pro-Ile and vildagliptin. The potency ratios (in the same order) were 6.1 (5.9 pmol/rat ED_{50} in acute antinociception vs 0.96 pmol/rat antihyperalgesic ED_{50}), 15.5 (13.3 nmol/rat vs 0.86 nmol/rat) whereas the ratios for Ile-Pro-Ile and vildagliptin were well over 20 (antihyperalgesic ED_{50} s below 1.5 nmol/rat, no acute antinociception at 30 nmol/rat).



↑ **Figure 2. The antihyperalgesic and antinociceptive dose-response curves of intrathecally injected DAMGO (A), endomorphin 2 (B), Ile-Pro-Ile (C) and vildagliptin (D).** The "maximum possible effects" (MPEs) were calculated from the peak effects of respective agents. The equation for the calculation of antihyperalgesic MPE: $(\text{ipsilateral threshold} - \text{hyperalgesic baseline}) / (\text{contralateral threshold at time-matching point} - \text{hyperalgesic baseline}) \times 100$, where "hyperalgesic baseline" is the nociceptive threshold to pressure determined in the carrageenan-injected ("ipsilateral") paw 180 min after intraplantar carrageenan injection. Acute antinociceptive MPE: $= (\text{actual latency} - \text{basal latency}) / (\text{cutoff time} - \text{basal latency}) \times 100$. Symbols: filled circles: antihyperalgesic actions; filled squares: acute antinociceptive actions.

In our experiments intrathecal (i.t.) CART(55-102) significantly decreased the mechanical hyperalgesia in 0.1-0.3 nmol/rat concentrations in carrageenan-induced subacute inflammation measured by the Randall-Selitto method (**Fig. 3**). CART(55-102) above concentrations of 0.3 nmol/rat caused abnormal motor perturbances that arrested precise measurements.

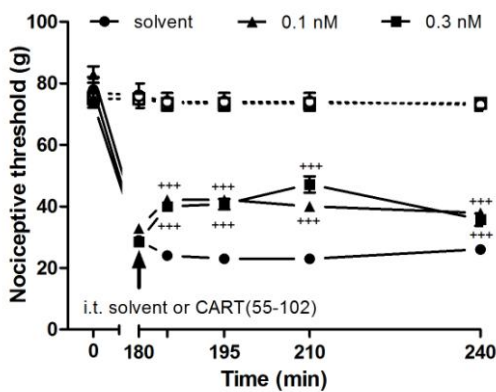


Figure 3. Antihyperalgesic effect of CART(55-102) in carrageenan-induced inflammation determined by the Randall-Selitto method. I.t. CART(55-102) has a significant antihyperalgesic effect in 0.1-0.3 nmol/rat concentrations (two-way ANOVA, Bonferoni *post hoc* test. ***: $p < 0.001$), but higher doses result in an ascending substantial tremor making the evaluation of the test unreliable. CART(55-102) never altered the nociceptive threshold of the contralateral hindpaw significantly. Filled symbols: side of inflammation; open symbols with dashed lines: contralateral side. Data on each curves are given as mean and SEM.

Considering *in vivo* activity of different CART peptide fragments (Dylag, Kotlinska et al. 2006), we hypothesized that the globular region of the peptide may be responsible for the motor disturbance, so CART(55-76) lacking this globular motif was used in the next experiments (**Fig. 2**). I.t. 10 nmol/rat CART(55-76) had no effect in acute nociceptive tail-flick test (**Fig. 3**), but showed significant antihyperalgesic effect in i.t. 0.1-3.0 nmol/rat concentrations without any motor abnormalities in carrageenan-induced inflammation.

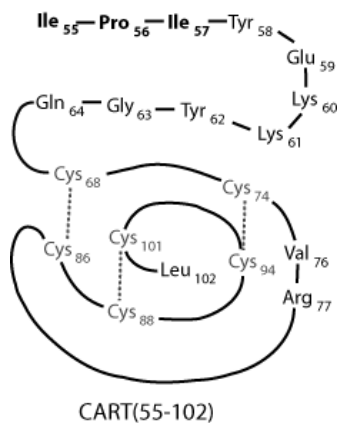


Figure 4. Schematic drawing of the "full" CART(55-102) peptide from which shorter fragments are derived.

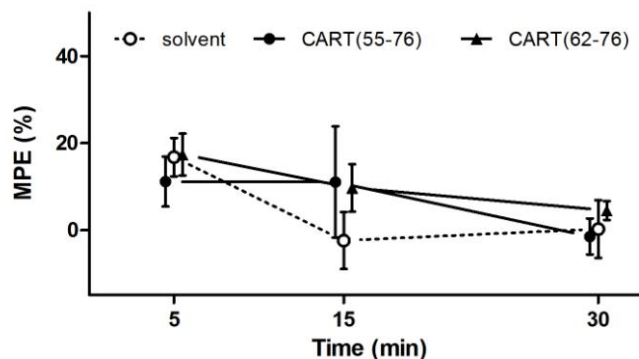


Figure 5. Effects of CART fragments on tail-flick latency. Neither the CART(55-76) nor the CART(62-76) altered the acute nociceptive thresholds significantly applied in 10 nmol/rat concentrations (two-way repeated measures ANOVA with Bonferoni *post hoc* test, $p > 0.05$). Data are given as mean and SEM.

The antihyperalgesic action of CART(55-76) was fully blocked by the non-specific opioid receptor antagonist naltrexone (NTX) and the selective MOR antagonist CTAP (Fig. 6.)

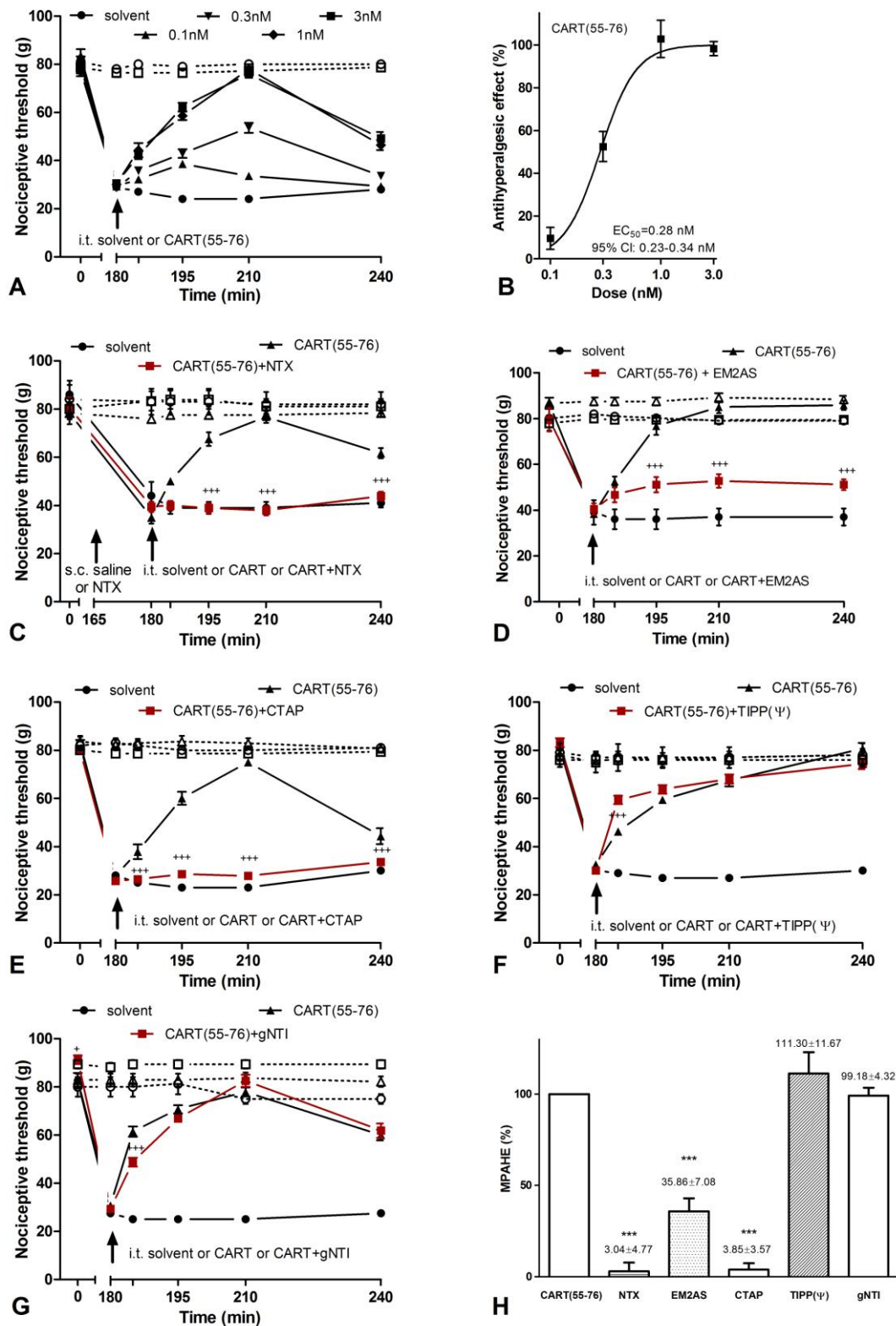


Figure 6. Antihyperalgesic effect of CART(55-76) peptide in the carrageenan-induced hyperalgesia model measured by the Randall-Selitto method. A) I.t. CART(55-76) has a dose-dependent antihyperalgesic effect without causing motor abnormalities. B) A sigmoidal dose-response curve of the CART(55-76) has been plotted onto data obtained from the nociceptive threshold values recorded at 210 min. Antihyperalgesic ED₅₀ value of CART(55-76) was calculated as 0.28 (0.23-0.34) nmol/rat, given as mean and 95% confidence interval. C)

Antihyperalgesic effect of CART(55-76) was completely abolished by the non-selective opioid antagonist NTX and E) the μ -selective opioid antagonist CTAP, but D) EM2AS also significantly decreased the CART(55-76)-induced antihyperalgesia. F) Neither the δ -antagonist TIPP(Ψ) nor G) the κ -selective antagonist gNTI had an influence on the antihyperalgesic effect of CART(55-76). CART(55-76) never altered the nociceptive threshold of the contralateral hindpaw significantly and none of the antagonists tested had significant effect when were injected alone (not shown). H) Inhibitory effects of opioid antagonists on the CART(55-76) related antihyperalgesia is summarized on the bar graph created from values measured at 210 min after i.t. drug administration (MPAHE %: maximal possible antihyperalgesic effects in percentage). Comparisons were made with two-way ANOVA, Bonferoni *post hoc* test; +++: $p < 0.001$ (C-G) and one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. ***: $p < 0.001$ (H). Crosses always indicate significant difference between the time-matching points of CART(55-76) and CART(55-76)+antagonist curves. Filled symbols: side of inflammation; open symbols with dashed lines: contralateral side. Data on each curves and bars are given as mean \pm SEM.

Application of CART(55-102) and CART(55-76) on isolated mouse *vas deferens* expressing MOR, δ - (DOR) and κ - (KOR) opioid receptors (Hughes, Kosterlitz et al. 1975, Lord, Waterfield et al. 1977, Kosterlitz, Lord et al. 1980, Wuster, Schulz et al. 1980, Erspamer and Severini 1992) resulted in no effect at all (not shown) suggesting that none of the CART peptides activate MOR, DOR and KOR directly, which is consistent with earlier suggestions (Vicentic, Lakatos et al. 2006).

Endogenous opioids such as enkephalins, dynorphins and endomorphins are present in the spinal cord (Simantov, Kuhar et al. 1977, Botticelli, Cox et al. 1981, Zadina, Hackler et al. 1997, Martin-Schild, Gerall et al. 1998) and can activate MOR with different potency (Quirion and Pert 1981, Vaught, Rothman et al. 1982). To test the possibility that endogenous opioids, especially the most potent endomorphin-2 tetrapeptide (EM2; Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) are involved in the opioid mediated effect of CART, EM2 antiserum (EM2AS) was co-injected with i.t. CART(55-76) in the carrageenan-induced hyperalgesia model, in which EM2AS dramatically reduced the antihyperalgesic effect of CART(55-76) peptide (**Fig. 6.**). EM2 is found mainly in peptidergic primary afferents in the spinal cord (Sanderson Nydahl, Skinner et al. 2004, Hui, Wang et al. 2010) and can be released under specific conditions (Williams, Wu et al. 1999, Scanlin, Carroll et al. 2008, Chakrabarti, Liu et al. 2012). Unbound EM2 is degraded very quickly by membrane-bound dipeptidil-peptidase-4 (DPP4) a serine exopeptidase that cleaves the tetrapeptide into Tyr-Pro and Phe-Phe-NH₂ (the latter one is further cleaved into phenylalanine and Phe-NH₂ by aminopeptidases) (Mentlein 1999, Sakurada, Sakurada et al. 2003). One of the most striking features of the endomorphins is that neither their genomic code nor precursors have been found since their discovery in 1997 (Terskiy, Wannemacher et al. 2007, Wolfe, Hao et al. 2007), so their biosynthetic route is still unknown. András Rónai proposed the theory of an activity dependent *de novo* synthesis of EM2 (Kiraly, Szalay et al. 2009, Ronai, Kiraly et al. 2009, Kiraly, Lambeir et al. 2011): DPP4 inhibitors such as the Ile-Pro-Ile tripeptide or the non-peptide vildagliptin can switch the enzyme from hydrolase to synthetase mode in an activity dependent manner (e.g. sustained membrane depolarization in subacute/chronic pain states). Under these special circumstances degradation of EM2 might be reverted and EM2 can be synthesized *de novo* extracellularly from Tyr-Pro and Phe-Phe-Gly/Phe-Phe-NH₂ precursors (**Fig. 7.**).

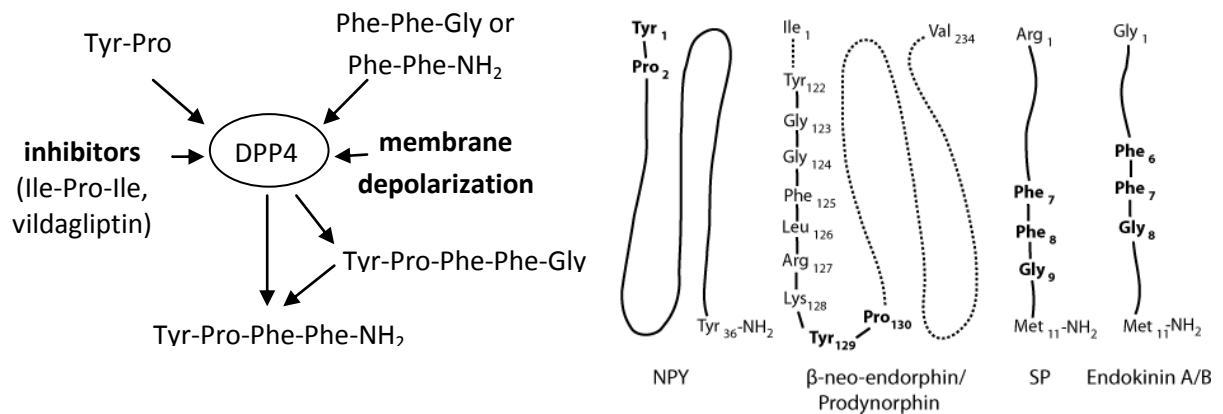
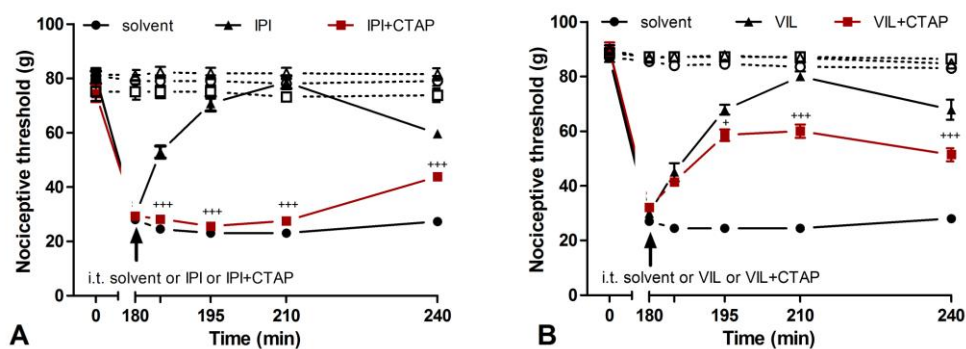


Figure 7. Theory of András Rónai concerning extracellular *de novo* EM2 biosynthesis. (Gly at the C-terminus of the putative pentapeptide synthesized first is required for amidation.). Calculating only with those peptides known to be present in the spinal dorsal horn, the source of Tyr-Pro can be NPY and prodynorphin or its shorter derivatives including dynorphin(1-17) and β -neo-endorphin, while Phe-Phe-Gly might be derived from Substance P or endokinins.

Antihyperalgesic effect of DPP4 inhibitors (Ile-Pro-Ile and vildagliptin) in carrageenan-induced hyperalgesia was demonstrated and that was blocked by either the non-selective opioid antagonist naloxon or EM2AS (Kiraly, Szalay et al. 2009, Kiraly, Lambeir et al. 2011), but no endogenous DPP4 inhibitors have been reported to date. DPP4 inhibitor Ile-Pro-Ile equals the N-terminus tripeptide motif of CART(55-102) and CART(55-76) fragments, which raises the possibility, that both of these CART peptides may act as **natural inhibitors of DPP4**. This theory is also supported by the similar pharmacological properties of Ile-Pro-Ile and CART(55-76): (1) both of them have antihyperalgesic effect in carrageenan-induced inflammation, which might be completely abolished by s.c. naltrexone, a non-selective opioid-receptor antagonist, and (2) their antihyperalgesic effect is δ - and κ -receptor independent, but is completely inhibited by i.t. administration of the μ -antagonist CTAP (Fig. 5 and 8.). Must be noted that, inhibitory effect of CART peptide on DPP4 activity may not only contribute to putative *de novo* EM2 biosynthesis but can also alter degradation of endogenous MOR1 agonists, like EM2 and prolong the half-life of these molecules. The other reference DPP4 antagonist, the non-peptide inhibitor vildagliptin had slightly different pharmacological properties: it had no antihyperalgesic effect when was co-injected with the δ -receptor antagonist TIPP(Ψ), but the μ - and κ -antagonist CTAP and gNTI partially but significantly reduced vildagliptin-related antihyperalgesia. (Fig.8.).



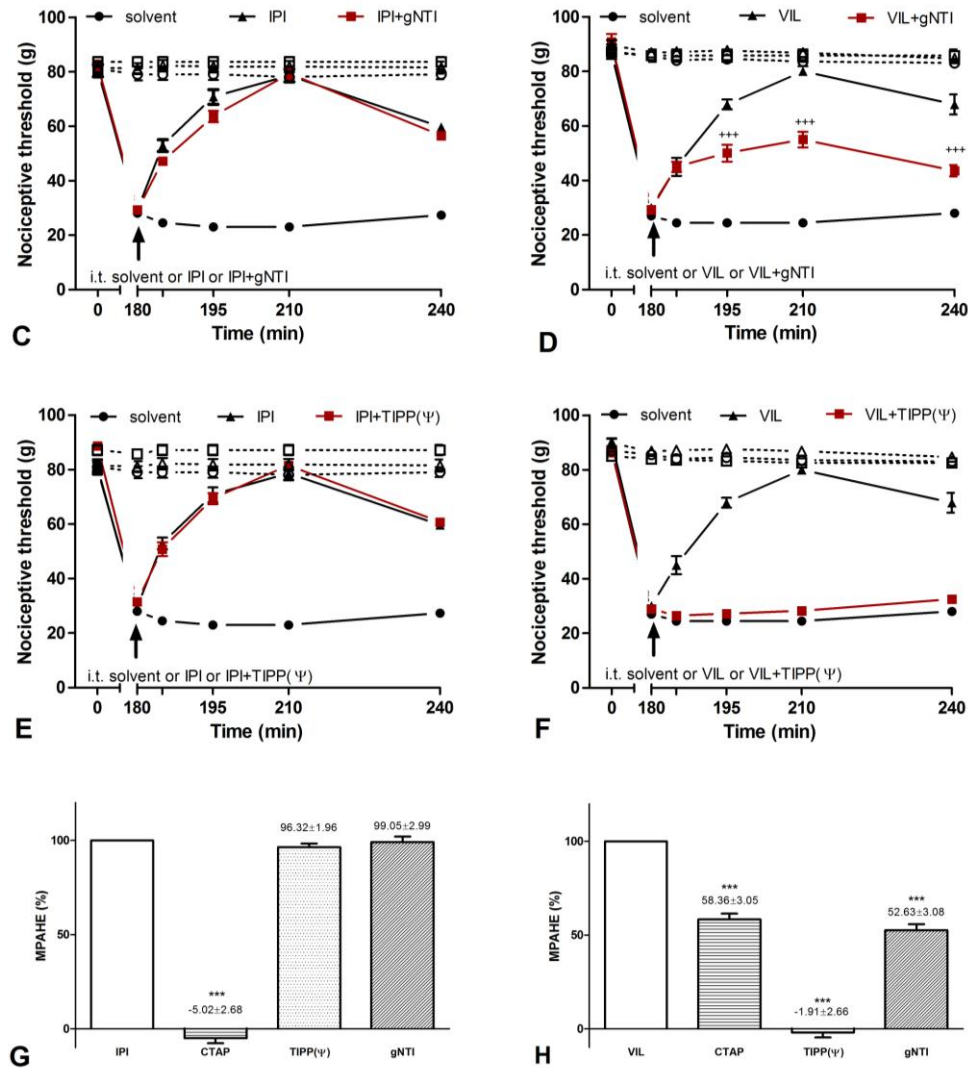


Figure 8. Antihyperalgesic effect of the DPP4 inhibitor Ile-Pro-Ile and vildagliptin in carrageenan-induced inflammation. (A) Antihyperalgesic effect of i.t. Ile-Pro-Ile has been completely abolished by co-administration of CTAP, but (C) neither gNTI nor (E) TIPP(Ψ) altered Ile-Pro-Ile-evoked antihyperalgesia. (B) Antihyperalgesic effect of vildagliptin has been significantly reduced by CTAP and (D) gNTI, (F) but was completely eliminated when TIPP(Ψ) was coinjected. Inhibitory effects of opioid antagonists on Ile-Pro-Ile and vildagliptin related antihyperalgesia is summarized on bar graphs G) and H) constructed from data recorded 210 min after i.t. drug application. Comparisons were made with two-way ANOVA, Bonferroni *post hoc* test; +: $p < 0.05$; +++; $p < 0.001$ (A-F) and one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. ***: $p < 0.001$ (G and H). Crosses always indicate significant difference between the time-matching points of DPP4 inhibitor and DPP4 inhibitor+opioid antagonist curves. Filled symbols: side of inflammation; open symbols with dashed lines: contralateral side. Data on each curves and bars are given as mean and SEM.

To further test if CART(55-76) may act as an endogenous DPP4 inhibitor, its shorter fragment, the CART(62-76) lacking the Ile-Pro-Ile sequence at the N-terminus was administered i.t. in the acute nociceptive tail-flick test and in the carrageenan-induced hyperalgesia model. CART(62-76) did not show any effect in acute nociceptive test (Fig. 5.), but produced antihyperalgesic effect in subacute inflammation. As the dose-response curves demonstrate, antihyperalgesic effect of CART(62-76) appeared in much higher concentration than in the case of CART(55-76) (Fig. 9.). Although naltrexon fully blocked, the μ -antagonist CTAP only slightly decreased this action. Selective δ -antagonist TIPP(Ψ) did not affect, but the κ -selective antagonist gNTI completely blocked the antihyperalgesic effect of CART(62-

76). CART(62-76) had no action on mouse vas deferens but had effect on guinea pig ileum suggesting that this peptide fragment may be an endogenous ligands of κ -receptor (data not shown).

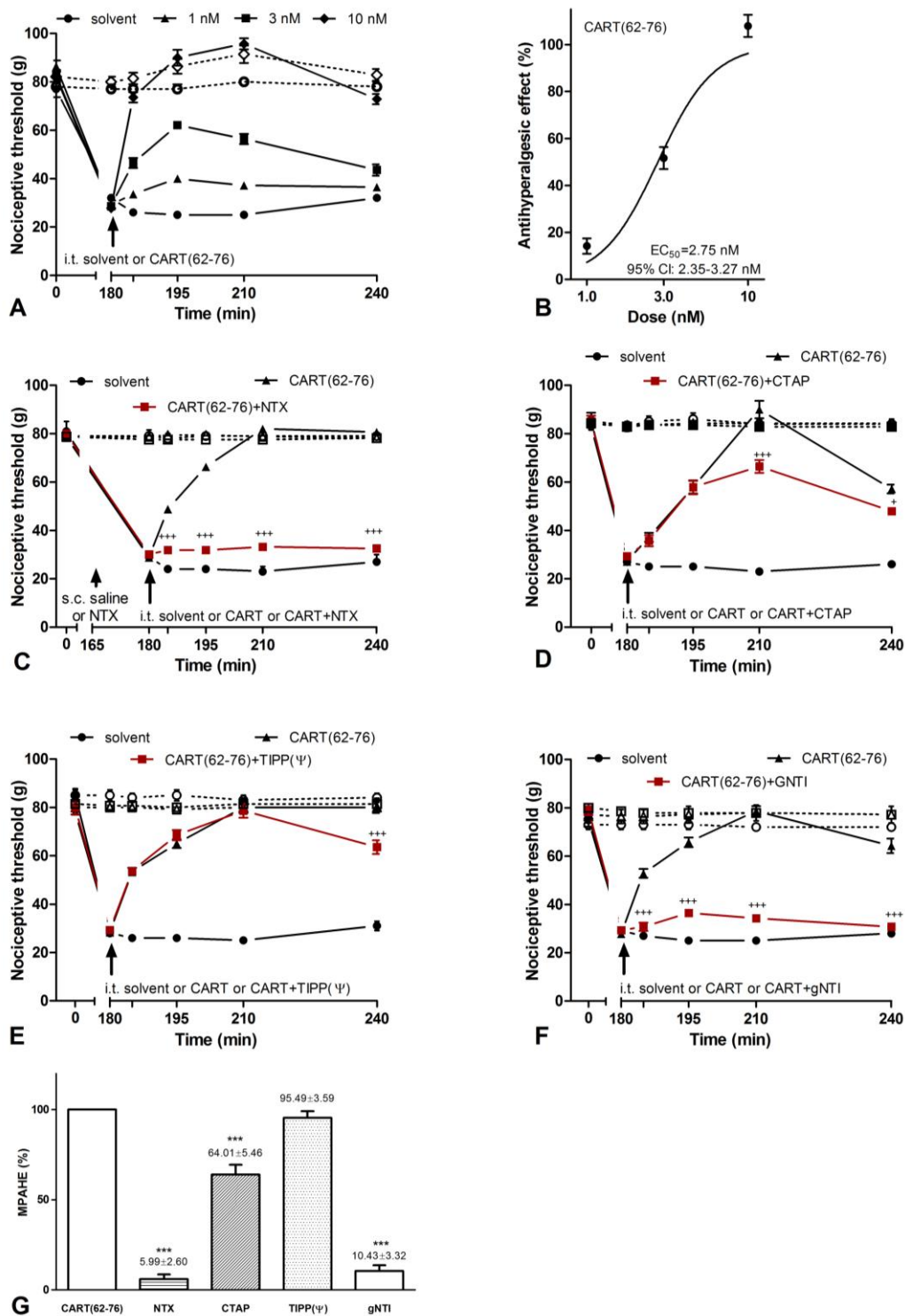
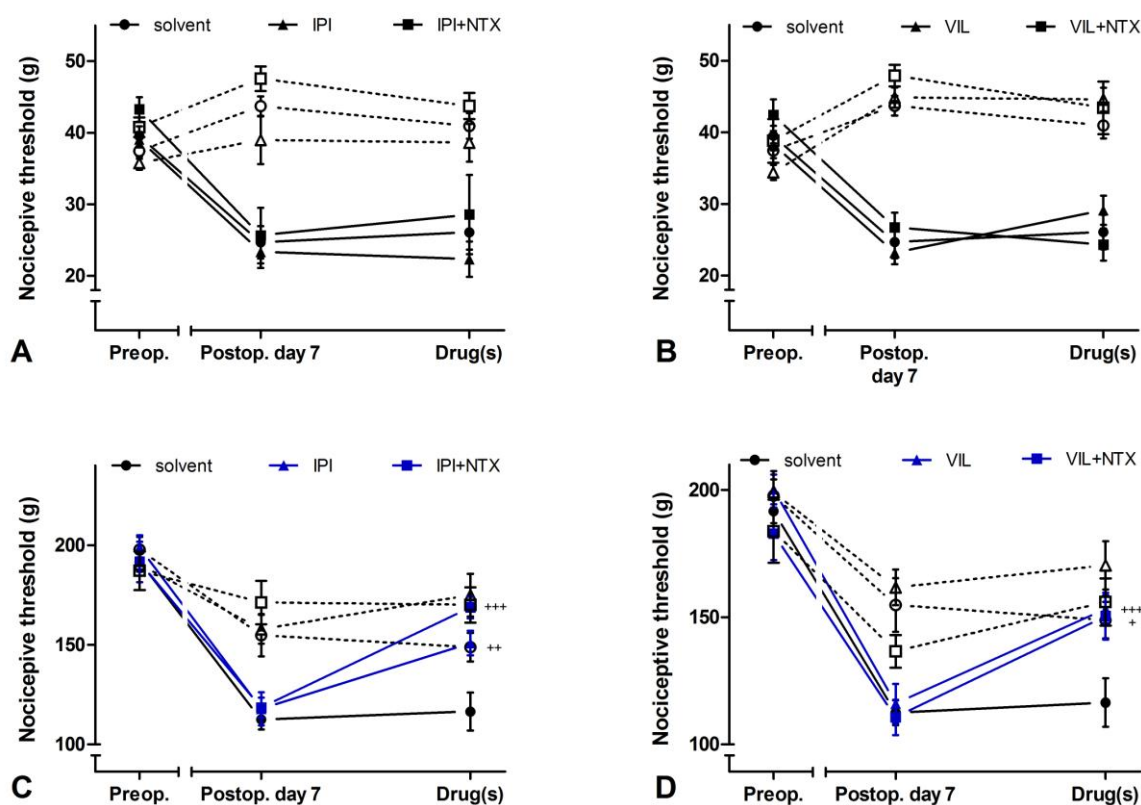


Figure 9. Antihyperalgesic effect of CART(62-76) peptide in carrageenan-induced subacute inflammation. I.t. CART(62-76) has significant antihyperalgesic effect in 3-10 nmol/rat concentrations without any signs of motor disfunctions (A). Dose-response curve was constructed from nociceptive threshold values recorded at 210 min. Antihyperalgesic ED₅₀ value of CART(62-76) was calculated as 2.75 (2.32-3.27) nmol/rat given as mean and 95% confidence interval (B). S.c. pretreatment with the non-selective opioid-receptor antagonist NTX

completely eliminated the antihyperalgesic effect of CART(62-76) (C) The μ -receptor selective antagonist CTAP (200 pmol/rat) slightly reduced the antihyperalgesic effect of CART(62-76) (D). δ -opioid selective antagonist TIPP(Ψ) in 1nmol/rat concentration did not alter the antihyperalgesic effect of CART(62-76) (E). κ -selective antagonist GNTI co-injected i.t. in 10 nmol/rat concentration completely abolished the antihyperalgesic effect of CART(62-76) (F). Apart from only one set of experiments CART(62-76) never altered the nociceptive threshold of the contralateral hindpaw significantly and none of the antagonists tested had significant effect when were injected alone. Bar graph summarizes inhibitory effects of opioid antagonists on the CART(62-76) related antihyperalgesia (G). Comparisons were made with two-way ANOVA, Bonferoni *post hoc* test; +: $p < 0.05$; +++: $p < 0.001$ (C-F) and one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. ***: $p < 0.001$ (G). Crosses always indicate significant difference between the time-matching points of CART(62-76) and CART(62-76)+antagonist curves. Filled symbols: side of inflammation; open symbols with dashed lines: contralateral side. Data on each curves and bars are given as mean and SEM.

Antihyperalgesic and antiallodynic effect of CART(55-102) peptide was reported to be opioid independent in neuropathic pain of mice (Damaj, Zheng et al. 2006). During neuropathic states the expression and release of different peptides normally being present in primary afferents dramatically decrease, and conditions are no further ideal for EM2 synthesis. Role of reference and putative DPP4 inhibitors such as IPI, vildagliptin, CART(55-76) and involvement of different opioidergic systems have also been tested in chronic pain states related to partial sciatic nerve injury (Seltzer model). Nociceptive thresholds were determined with three different methods including dynamic plantar aesthesiometry (mechanical allodynia), Randall-Selitto test (mechanical hyperalgesia) and noxious cold stimulation (cold allodynia). All the DPP4 inhibitors tested had only antihyperalgesic effect and did alter neither mechanical nor cold allodynia developed after partial sciatic nerve ligation. Antihyperalgesic effect of DPP4 inhibitors was found to be non-opioid dependent, suggesting that these agents activate different mechanisms in inflammatory and neuropathic conditions (Fig. 10-11.).



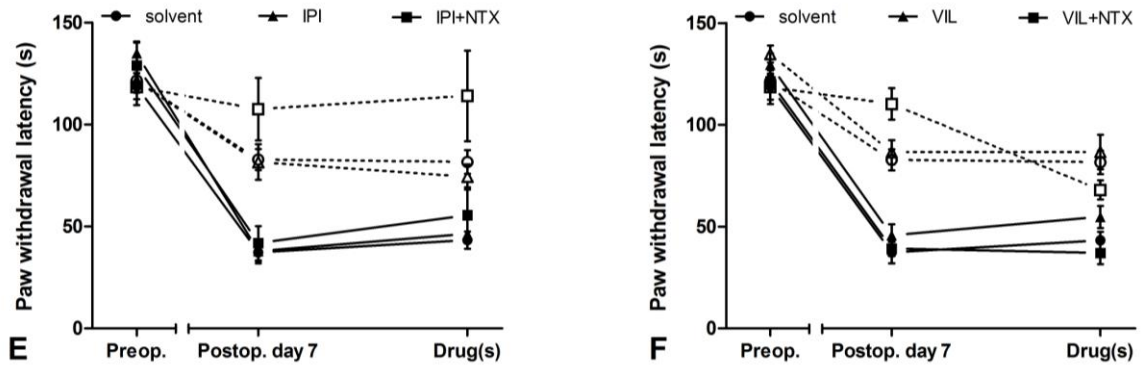
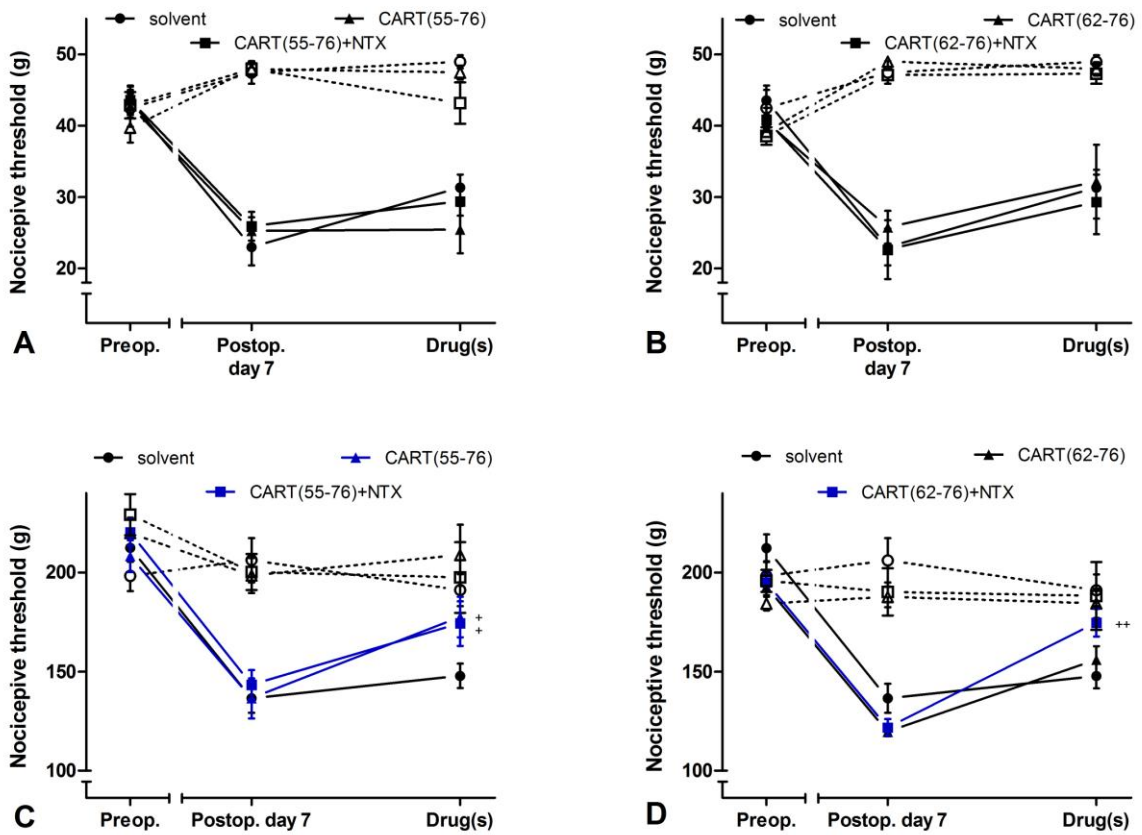


Figure 10. Antinociceptive effects of the DPP4 inhibitor Ile-Pro-Ile (IPI) and vildagliptin (VIL) in chronic neuropathic condition induced by partial sciatic nerve ligation. DPP4 inhibitors were ineffective in dynamic plantar aesthesiometer (A-B) and noxious cold sensitivity (E-F) tests. In Randall-Selitto test both IPI and VIL had antihyperalgesic effect which was not antagonized by NTX (C-D). Comparisons were made with two-way ANOVA, Bonferoni *post hoc* test; +: $p < 0.05$; ++: $p < 0.01$; +++: $p < 0.001$. Crosses indicate significant difference between the time-matching points of *DPP4 inhibitor* and *DPP4 inhibitor+NTX* curves. Filled symbols: side of ligation; open symbols with dashed lines: contralateral side. Data on each curves and bars are given as mean and SEM.



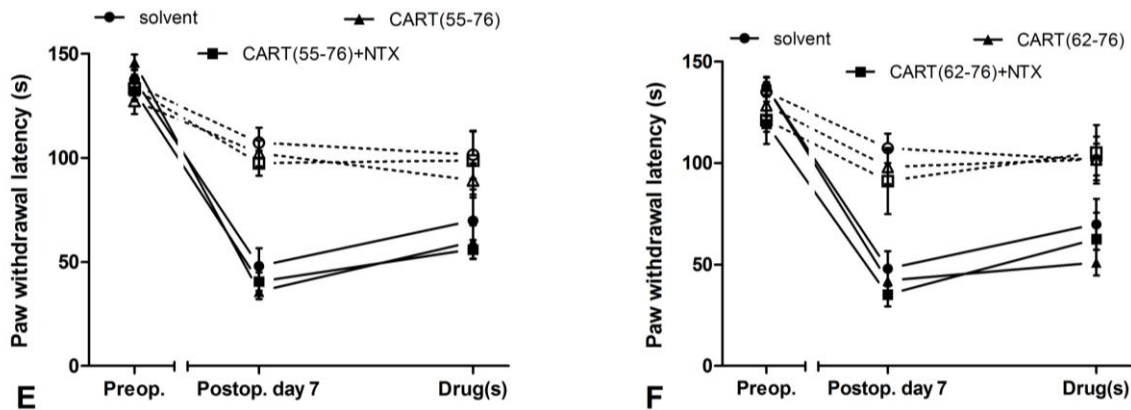


Figure 11. Antinociceptive effects of CART(55-76) and CART(62-76) fragments chronic neuropathic pain related to partial sciatic nerve injury. DPP4 inhibitors were ineffective in dynamic plantar aesthesiometer (A-B) and noxious cold sensitivity (E-F) tests. In Randall-Selitto test CART(55-76) was found to be antihyperalgesic and this effect was not antagonized by NTX (C). Surprisingly, CART(62-76) was ineffective alone but when was co-administered with NTX, an antihyperalgesic effect was observed. Comparisons were made with two-way ANOVA, Bonferoni *post hoc* test; +: $p < 0.05$; ++: $p < 0.01$. Crosses indicate significant difference between the time-matching points of *CART fragments* and *CART peptides+NTX* curves. Filled symbols: side of ligature; open symbols with dashed lines: contralateral side. Data on each curves and bars are given as mean and SEM.

Using Western blot analysis we have shown that both CART(55-102) and CART(62-102) are present in the spinal cord (**Fig. 12.**), and theoretically Val₇₆ – Arg₇₇ amino acids may serve as cleavage sites for different endopeptidases, but there is no evidence that CART(55-76) and CART(62-76) exist as natural fragments in the CNS.

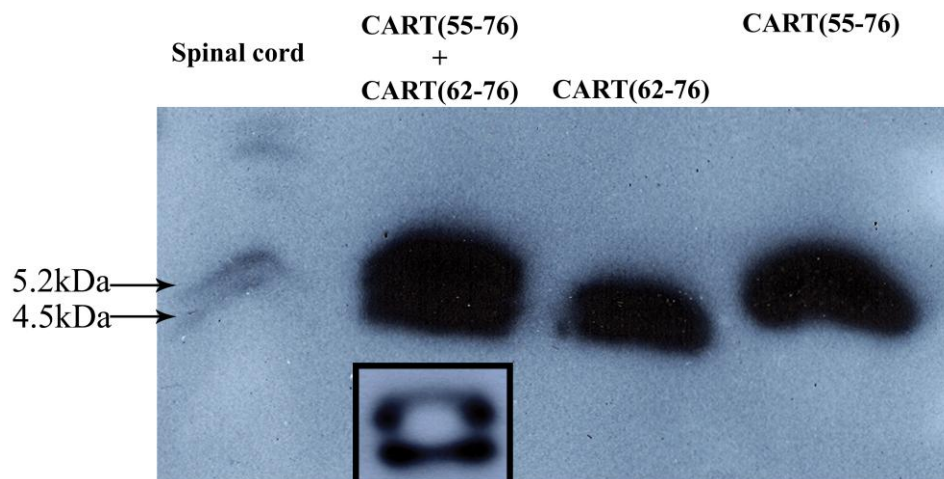
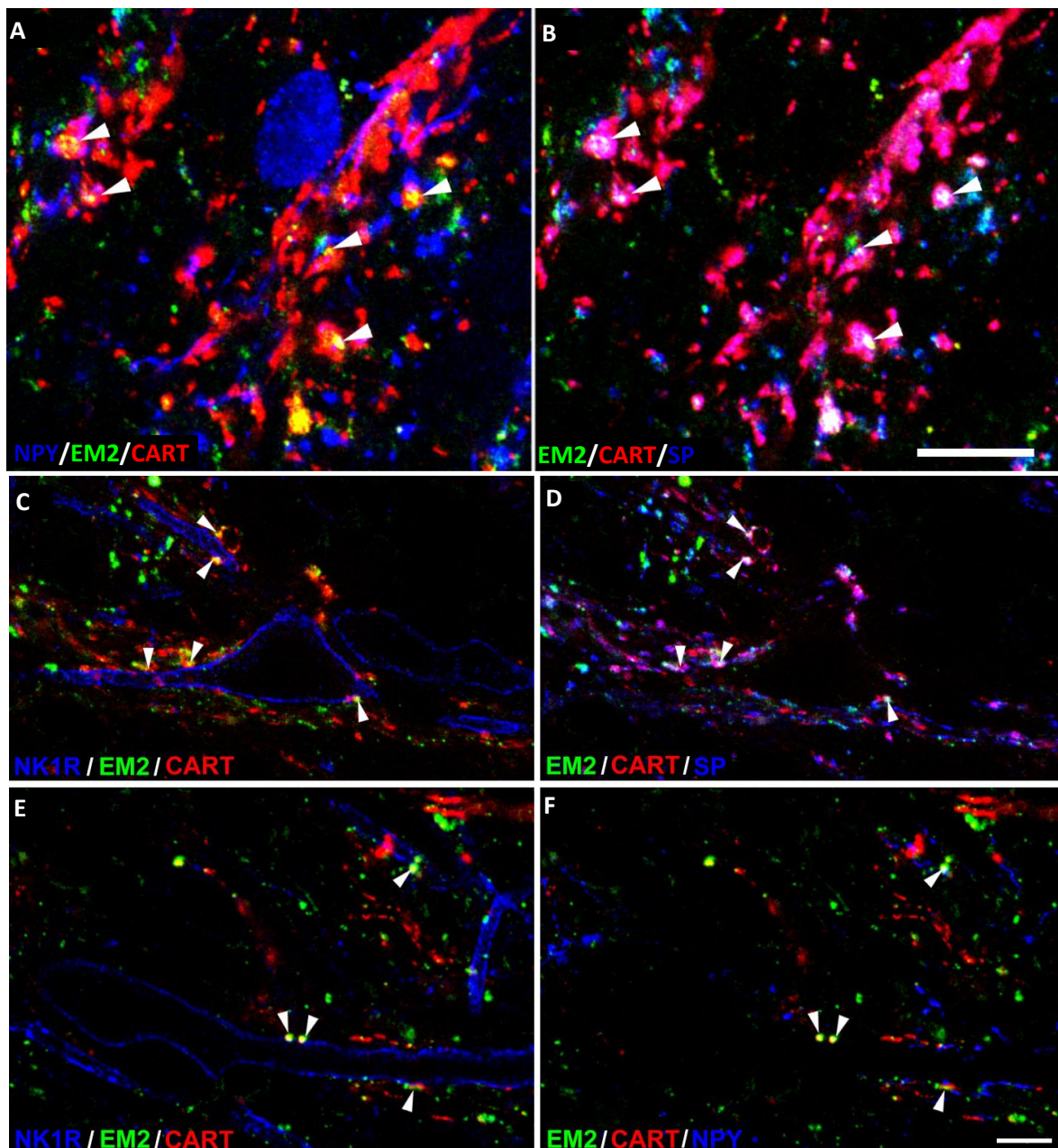


Figure 12. Western blot analysis of CART peptide fragments in the rat spinal cord. Both CART(55-102) and CART(62-102) peptide fragments could be detected in the rat spinal cord. Separation was performed with Tricine-SDS-PAGE applying 80 μ g of protein extract on the gel. 0.2ng of CART peptides were used as controls. Inset represents the doublet of the CART(55-102) + CART(62-102) lane from a separate run with short exposure.

DPP4 is expressed in most cell types and cleaves many but not all N-terminus X-proline dipeptides (Mentlein 1999). Beside EM2 other nociceptive peptides such as the neuropeptide Y (NPY) and SP are the natural substrates of the enzyme (Turner, Hryszko et al. 1987, Sakurada, Watanabe et al. 1999). Taking András Rónai's hypothesis into consideration di/tripeptides derived from the degradation of NPY and SP in the presence of the putative

DPP4 inhibitor CART(55-76) or CART(55-102) may contribute to *de novo* EM2 synthesis (Fig. 7.). To find further data supporting this theory quadruple immunofluorescent stainings and confocal microscopic analyses were carried out. EM2-immunostaining appeared as a delicate grainy labelling within and out of SP labelled axon terminals. Quantitative analysis demonstrated that 79.6 ± 1.44 % and 52.1 ± 4.16 % of the EM2-immunoreactive terminals contained CART peptide in lamina I and II, respectively, while SP was detectable in 65.9 ± 2.07 % and 70.3 ± 5.51 % of EM2-ergic endings in lamina I and II, respectively. Co-existence of CART and SP in EM2-immunopositive boutons was 54.2 ± 2.94 % and 31.2 ± 0.66 % in lamina I and II, respectively. (All data are given as mean \pm SEM.) Altogether 92.8% and 94.2% of the EM2/CART/SP triple-labelled boutons formed close appositions with NPY-immunoreactive terminals in lamina I and II, respectively (Fig. 13.). Many of these axonal compositions were found on NK1R-immunoreactive neuronal somata or dendrites in the rat spinal cord. It has to be emphasized that the two precursors may also originate from other peptides, but the close vicinity of the CART, SP and NPY supports the possibility that they might be involved in *de novo* EM2 synthesis.



↑ **Figure 13. Quadruple immunofluorescent stainings and single confocal optical sections of the rat spinal dorsal horn.** A-B) NPY-containing boutons form close appositions with SP, CART and EM2 co-expressing terminals; C-D) EM2/CART/SP co-expressing boutons terminate on NK1R-immunopositive lamina I neurons. E-F) EM2/CART-containing terminals are in close contact both with NPY-positive endings and NK1R-immunoreactive lamina I neurons. Terminals of interests are labelled with arrowheads. A) Immunofluorescent staining with antibodies against NPY (blue), EM2 (green) and CART (red). B) Image of the same optical section as A), but EM2 (green) CART (red) and SP (blue) immunoreactivities are demonstrated. C) Immunofluorescent labelling with NK1R (blue), EM2 (green) and CART (red) antisera. D) Image of the same optical section as C), but EM2 (green) CART (red) and SP (blue) immunofluorescence is shown. E) NK1R (blue), EM2 (green), CART (red) immunoreactivities. F) EM2 (green), CART (red), NPY (blue) immunostainings in the same optical plane as E). A-B) are transverse, while C-F) are horizontal sections. Scale bars: 10 μm for each image.

Our electron microscopic observations also support the theory of extracellular, membrane-related synthesis of EM2. Immunogold-labelled EM2 was found in the membranes of axon terminal regions being far from the synaptic specialization or EM2-related gold particles were grouped inside the boutons close to the synapse but always in extrasynaptic position. This offers two possibilities: (1) EM2 is synthesised in the extracellular space, transported through the membrane and stored in the axon terminal, or (2) the extracellularly synthesised EM2 binds to the MOR, is internalized by endocytosis and then stored in the boutons (**Fig. 14.**)

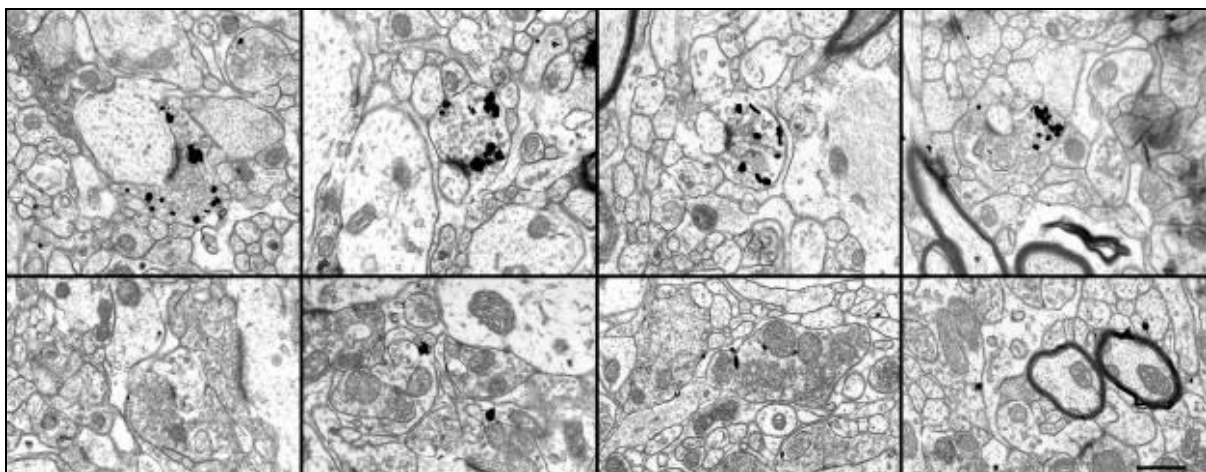
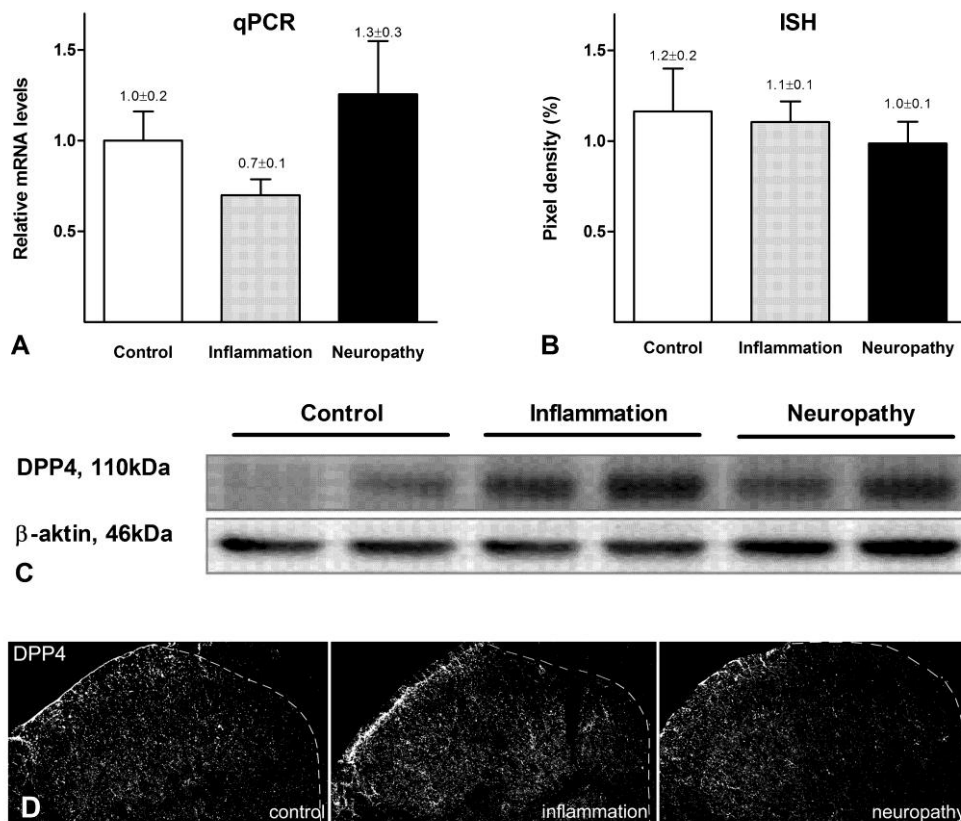


Figure 14. Localization of DPP4 immunoreactive structures in the spinal dorsal horn of naive rats. Scalebar: 500nm

Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) is a moonlighting protein that is expressed on many different cell types but appears also in plasma and other body fluids including cerebrospinal fluid ([Boonacker and Van Noorden 2003](#)). It is a serine protease enzyme, a receptor and a costimulatory protein. DPP4 is implicated in adhesion, apoptosis, but its major role is in immune response. Although only one type of DPP4 mRNA was detected ([Hong, Petell et al. 1989](#)), broad molecular heterogeneity of the enzyme was demonstrated that is due to posttranslational modifications ([Kahne, Kroning et al. 1996](#)). DPP4 cleaves dipeptides from peptides and proteins containing proline/alanine in the penultimate position with typical length of <30 amino acids. DPP4 specifically processes regulatory peptides such as neuropeptides, hormones, cytokines and chemokines leading to their biological activation and inactivation. It has been suggested that certain isoforms of the enzyme cleaves certain peptides (e.g. glucagon is cleaved in the kidney but not in the circulation). Some possible substrates of DPP4: bradykinin, glucagon like peptide-1 and -2 (GLP-1 and GLP-2), insulin-

like growth factor, substance P, neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), and tumour necrosis factor α .

Taqman qPCR detected DPP4 mRNA in the dorsal horn of L5 spinal segments taken from control, inflamed and neuropathic rats. Neither carrageenan treatment nor neuropathic condition caused significant alteration in the DPP4 mRNA levels (control vs. carrageenan-induced inflammation vs. neuropathy (RQ): 1.00 ± 0.16 vs. 0.70 ± 0.09 vs. 1.26 ± 0.29 , One-Way ANOVA $P=0.301$, **Fig. 15.A**) DPP4 mRNA showed a low expression by *in situ* hybridization in the spinal dorsal horn of L4-L6 segments. While the grain density observed in sections hybridized using the sense probe was equal to the background, a significant signal was detected with the antisense probe (antisense: $N=27$, median=110.4, 25% at 80.7, 75% at 135.5; sense: $N=19$, median=0, 25% at 0, 75% at 21.7; Mann-Whitney Rank Sum Test $p < 0.001$). DPP4 mRNA was distributed evenly within the dorsal horn, and no significant difference among the experimental groups has been detected (control: $N=9$, 1.2 ± 0.2 ; inflamed: $N=9$, 1.1 ± 0.1 ; neuropathic: $N=9$, 1.0 ± 0.1 ; One way ANOVA, $p=0.21$ **Fig. 15.B**). Western-blot analysis demonstrated elevated protein level in inflamed and neuropathic spinal cord compared to the naïve one, but the increased protein level was significantly different only in inflammatory states compared to naïve and neuropathic animals (control: $N=4$, 0.168 ± 0.05 ; inflamed: $N=5$, 0.547 ± 0.06 ; neuropathic: $N=9$, 0.333 ± 0.06 ; one way ANOVA, Holm Sidak method $p=0.023$) (**Fig. 15.C, E**). DPP4 immunoreactivity in the spinal cord appeared in naïve, inflamed and also in neuropathic animals. Immunostaining for the enzyme was weaker in the superficial laminae than in the deeper laminae in control and neuropathic conditions but increased significantly in the medial two third of the dorsal horn during inflammation (**Fig. 15.D**). Densitometry of the DPP4 immunolabelling showed a significant increase in inflamed spinal cord in those areas corresponding to the inflamed hind paw compared to naïve and neuropathic conditions (control: $N=7$, 3.416 ± 0.376 ; inflamed: $N=10$, 5.656 ± 0.799 ; neuropathic: $N=8$, 3.178 ± 0.438 ; one way ANOVA $p=0.016$, **Fig. 15.F**).



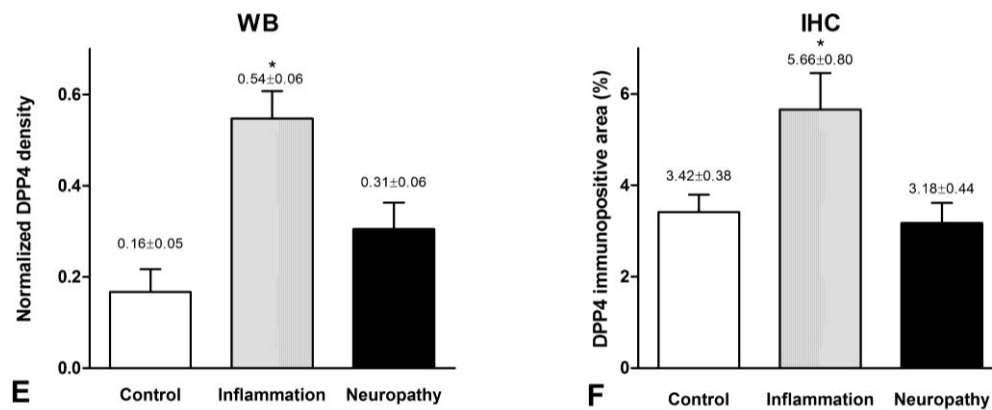


Figure 15. DPP4 mRNA and protein expression in the dorsal horn of control, carrageenan treated and neuropathic rats. DPP4 mRNA expression in the dorsal horn of the spinal cord assessed by qPCR (A) and *in situ* hybridization (B) did not show significant difference among the three experimental groups (mean±SEM, n=6-9, one-way ANOVA, p=0.30 and p=0.21 for qPCR and ISH, respectively). C: Western blot detection of DPP4 in the spinal dorsal horn samples taken from naive, inflamed and neuropathic animals. D: representative confocal images of transverse spinal dorsal horn sections obtained from rats of the three experimental groups and stained by DPP4 antibody. Significantly increased DPP4 protein levels were detected in carrageenan-induced inflammation measured both by Western-blotting (C, E) and quantitative immunohistochemistry (D, F). (Mean±SEM, n=7-10, one-way ANOVA followed by Holm-Sidak *post hoc* test: p=0.023 for Western blot experiment and one-way ANOVA with Student-Neuman-Keuls *post hoc* test: p=0.016 for densitometry).

Punctate-like immunostaining was detected in neuronal cell bodies (**Fig. 16.A**) and also in axon terminals in naive animals. Puncta representing DPP4 were embedded in synaptophysin stained elements suggesting the close relationship between synaptic and DPP4 activity in many cases (**Fig.16.B,C**). The enzyme appeared in both vesicular GABA transporter (VGAT) positive inhibitory (**Fig.16.E**), vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT-2) immunolabelled excitatory axon terminals (**Fig.16.D**), as well as CGRP stained primary afferent boutons (**Fig.16.C**). DPP4 immunopositive dots that appeared on MAP-2 labelled dendrites were always associated with synaptophysin positivity (**Fig.16.A,B**) suggesting that dendrites did not express the enzyme but received synapses from DPP4 containing boutons. DPP4 labelling also occurred in GFAP positive astrocytes and IBA1 stained microglia cells (**Fig.16.F,G**). Glial cells expressed MOR-1 receptors too (**Fig. 16. F,G**). In naive rats, the density of the enzyme staining was the highest in astrocytes and differed significantly from that in other cell types. DPP4 density was higher in microglia than in neurons but the difference was not significant (astrocyte: N=42, median=0.333, 25% at 0.25, 75% at 0.46; microglia: N=50, median=0.148, 25% at 0.083, 75% at 0.02; neuron: N=37 median=0.093, 25% at 0.023, 75% at 0.143; Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks, Dunn's method at P<0.001). During inflammation, DPP4 expression increased significantly both in astrocytes and microglia but not in neurons. Significant increase in the DPP4 immunoreactivity appeared only in microglia in the Seltzer model (astrocyte control: N= 51, 0.35±0.02, infl.: N= 51, 0.45±0.01, Seltzer: N= 48, 0.3±0.01, one way ANOVA, Student-Newman-Keuls method, P<0.001; microglia control: N=50, median=0.148, 25% at 0.083, 75% at 0.2, infl.: N= 36, median=0.25, 25% at 0.127, 75% at 0.353, Seltzer: N=40, median=0.22, 25% at 0.138, 75% at 0.257, Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks, Dunn's Method P<0.001; neuron control: N=46, median=0.093, 25% at 0.023, 75% at 0.143, infl.: N=49, median=0.092, 25% at 0.042, 75% at 0.203, Seltzer: N=42 median=0.102, 25% at 0.01, 75% at 0.133, Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks, P=0.149) It should be noted that DPP4 immunolabelling existed not only in the membranes of the different cell types but also in intracellular compartments (**Fig. 16.H-J**).

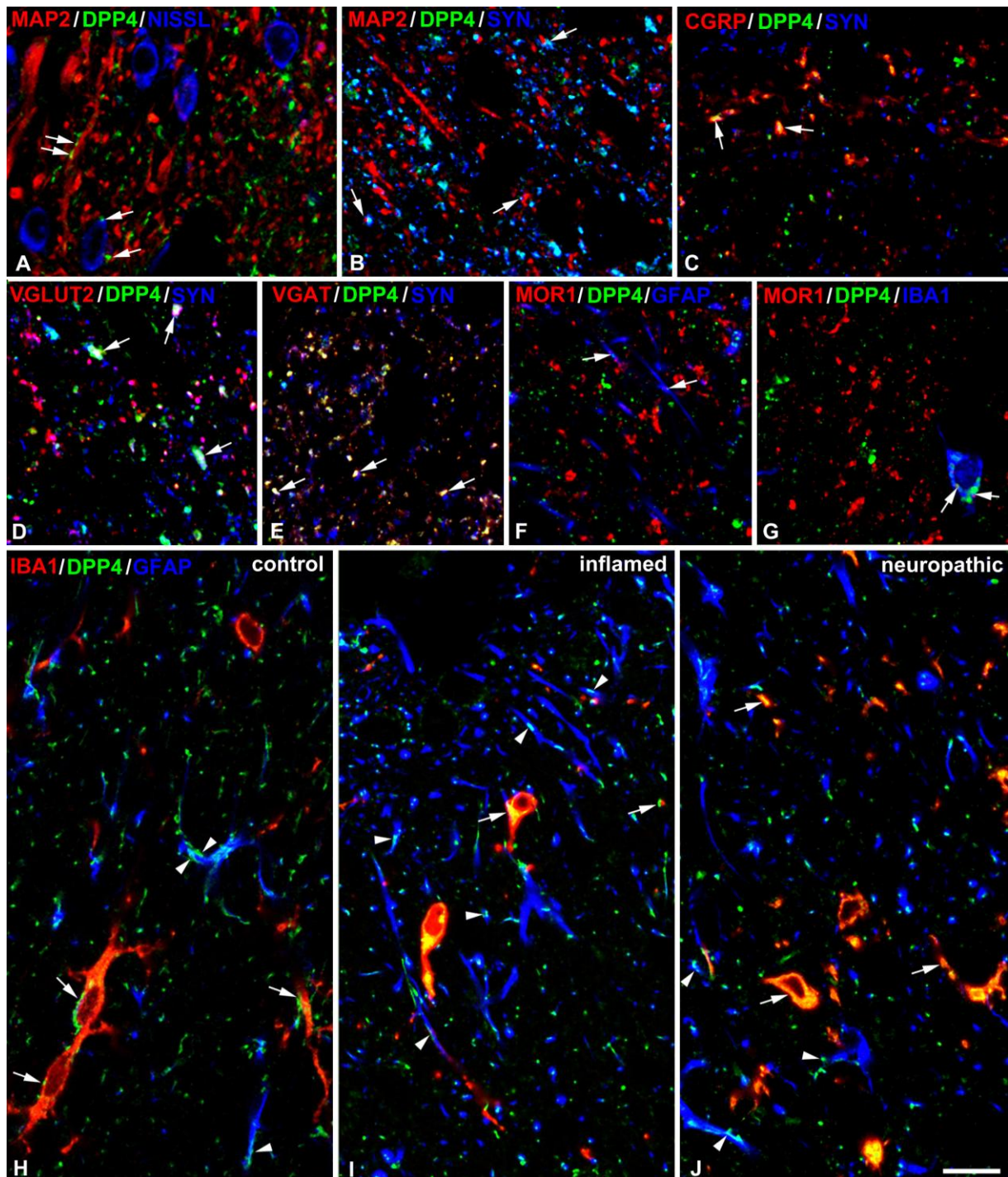


Figure 16. DPP4 immunoreactive puncta (green) are frequently found on the surface of MAP2-labelled dendrites and fluorescent Nissl stained neuronal somata (A). The biggest proportion of DPP4 immunolabelling on dendritic surfaces belongs to synaptic terminals as it is indicated by colocalization with SYN (B). DPP4 is expressed by the majority of peptidergic (CGRP-containing) C primary afferent terminals (C). Coexpression of DPP4 with SYN and VGLUT2 (D) or VGAT (E) suggests that DPP4 is present both in excitatory and inhibitory nerve endings. MOR1 receptors are found on the surface of GFAP-immunoreactive astrocytes (F) and IBA1-labelled microglial cells (G) in close apposition to DPP4-positive puncta. Representative images of the spinal dorsal horn obtained from control (H), inflamed (I) and neuropathic (J) animals demonstrate that DPP4 is expressed predominantly by glial cells and its expression is significantly increased in subacute inflammation. All the images are single optical planes and the scale bar is 10µm on each.

To challenge the involved opioid receptor types, selective opioid receptor antagonists were applied spinally together with two different DPP4 inhibitors in carrageenan-induced subacute inflammation. I.t. application of 30 nmol/rat IPI and 3 nmol/rat vildagliptin eliminated $93.8 \pm 1.2\%$ and $88.3 \pm 1.6\%$ of mechanical hyperalgesia measured by the Randall-Selitto test in intraplantar carrageenan-induced inflammation. Co-administration of the μ -selective inhibitor CTAP reduced the antihyperalgesic effect of IPI to $-5.0 \pm 4.5\%$, while following co-application of κ -receptor antagonist gNTI and the δ -opioid antagonist TIPP[Ψ] the antihyperalgesic effect of IPI remained at $92.2 \pm 2.4\%$ and $90.1 \pm 3.0\%$, respectively. Following co-administration of μ - and κ -antagonists, antihyperalgesic effect of vildagliptin was $51.0 \pm 4.4\%$ and $45.8 \pm 4.2\%$, respectively, while the δ -antagonist TIPP[Ψ] completely blocked the antihyperalgesic effect of vildagliptin by reducing its antihyperalgesic effect to $-1.4 \pm 2.1\%$ (**Fig. 8.**). Different modalities of hyperalgesia and allodynia appear not only in inflammatory conditions but also in neuropathic pain states. None of the tested DPP4 inhibitors had significant effect on mechanical and cold allodynia, while both i.t. IPI and vildagliptin had an obvious mechanical antihyperalgesic effect measured with the Randall-Selitto test one week after partial sciatic nerve ligation with MPE values of $37.9 \pm 12.4\%$ and $41.8 \pm 10.4\%$, respectively. In contrast to inflammatory states, NTX did not affect the antihyperalgesic action of the DPP4 inhibitors significantly in neuropathic conditions suggesting completely different actions of the enzyme on hyperalgesia in the two pain states. (**Fig. 10.**)

We have demonstrated that CART (55-76) and Diprotin A (Ile-Pro-Ile), the well-known DPP4 inhibitor, have very similar mu opioid receptor mediated antihyperalgesic effect in inflammatory conditions. Vildagliptin, the other type of DPP4 inhibitor, is also antihyperalgesic, but this effect is mediated by all three types of opioid receptors. These data suggest that while vildagliptin may be an inhibitory ligand of the active site of DPP4 blocking the degradation of all substrates of the enzyme including all endogenous opioids, IPI and CART (55-76) block specific substrate access to the active site or induce EM2 synthesis. All three types of DPP4 inhibitors also have antihyperalgesic effect in neuropathic conditions but that is not opioid mediated. We can conclude that CART(55-76) is a natural inhibitor of DPP4 which can have substrate specific effect in the periphery and also in the CNS. Since CART (55-76) possibly pass through the blood brain barrier, an intranasal analgesic, or DPP4 inhibitor can be constructed from it.

References and Notes

- Abbas, T., E. Faivre and C. Holscher (2009). "Impairment of synaptic plasticity and memory formation in GLP-1 receptor KO mice: Interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease." Behav Brain Res **205**(1): 265-271.
- Adams, J. C. (1992). "Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains." J Histochem Cytochem **40**(10): 1457-1463.
- Baggio, L. L. and D. J. Drucker (2006). "Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes." Annu Rev Med **57**: 265-281.
- Baggio, L. L. and D. J. Drucker (2007). "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." Gastroenterology **132**(6): 2131-2157.
- Ban, K., M. H. Noyan-Ashraf, J. Hoefler, S. S. Bolz, D. J. Drucker and M. Husain (2008). "Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways." Circulation **117**(18): 2340-2350.
- Belsham, D. D., L. J. Fick, P. S. Dalvi, M. L. Centeno, J. A. Chalmers, P. K. Lee, Y. Wang, D. J. Drucker and M. M. Koletar (2009). "Ciliary neurotrophic factor recruitment of glucagon-like peptide-1 mediates neurogenesis, allowing immortalization of adult murine hypothalamic neurons." FASEB J **23**(12): 4256-4265.
- Bertilsson, G., C. Patrone, O. Zachrisson, A. Andersson, K. Dannaeus, J. Heidrich, J. Kortessmaa, A. Mercer, E. Nielsen, H. Ronnholm and L. Wikstrom (2008). "Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease." J Neurosci Res **86**(2): 326-338.
- Blechova, M., V. Nagelova, L. Zakova, Z. Demianova, B. Zelezna and L. Maletinska (2013). "New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: the importance of individual disulfide bridges." Peptides **39**: 138-144.
- Boonacker, E. and C. J. Van Noorden (2003). "The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV." Eur J Cell Biol **82**(2): 53-73.
- Botticelli, L. J., B. M. Cox and A. Goldstein (1981). "Immunoreactive dynorphin in mammalian spinal cord and dorsal root ganglia." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7783-7786.
- Cabou, C., G. Campistron, N. Marsollier, C. Leloup, C. Cruciani-Guglielmacci, L. Penicaud, D. J. Drucker, C. Magnan and R. Burcelin (2008). "Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity." Diabetes **57**(10): 2577-2587.
- Ceriello, A., A. Novials, E. Ortega, S. Canivell, L. La Sala, G. Pujadas, K. Esposito, D. Giugliano and S. Genovese (2013). "Glucagon-like peptide 1 reduces endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress induced by both hyperglycemia and hypoglycemia in type 1 diabetes." Diabetes Care **36**(8): 2346-2350.
- Chakrabarti, S., N. J. Liu, J. E. Zadina, T. Sharma and A. R. Gintzler (2012). "Pleiotropic opioid regulation of spinal endomorphin 2 release and its adaptations to opioid withdrawal are sexually dimorphic." J Pharmacol Exp Ther **340**(1): 56-63.
- Chinda, K., S. Palee, S. Surinkaew, M. Phornphutkul, S. Chattipakorn and N. Chattipakorn (2013). "Cardioprotective effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor during ischemia-reperfusion injury." Int J Cardiol **167**(2): 451-457.
- Chiu, H. Y., H. H. Lin and C. C. Lai (2009). "Potentiation of spinal NMDA-mediated nociception by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide via PKA and PKC signaling pathways in rats." Regul Pept **158**(1-3): 77-85.
- Craft, S. (2007). "Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment." Curr Alzheimer Res **4**(2): 147-152.

- Craft, S. and G. S. Watson (2004). "Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms." Lancet Neurol **3**(3): 169-178.
- D'Amico, M., C. Di Filippo, R. Marfella, A. M. Abbatecola, F. Ferraraccio, F. Rossi and G. Paolisso (2010). "Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase-4 in Alzheimer's prone mice." Exp Gerontol **45**(3): 202-207.
- Damaj, M. I., R. G. Hunter, B. R. Martin and M. J. Kuhar (2004). "Intrathecal CART (55-102) enhances the spinal analgesic actions of morphine in mice." Brain Res **1024**(1-2): 146-149.
- Damaj, M. I., J. Zheng, B. R. Martin and M. J. Kuhar (2006). "Intrathecal CART (55-102) attenuates hyperalgesia and allodynia in a mouse model of neuropathic but not inflammatory pain." Peptides **27**(8): 2019-2023.
- Drucker, D. J. and M. A. Nauck (2006). "The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes." Lancet **368**(9548): 1696-1705.
- Dunphy, J. L., R. G. Taylor and P. J. Fuller (1998). "Tissue distribution of rat glucagon receptor and GLP-1 receptor gene expression." Mol Cell Endocrinol **141**(1-2): 179-186.
- During, M. J., L. Cao, D. S. Zuzga, J. S. Francis, H. L. Fitzsimons, X. Jiao, R. J. Bland, M. Klugmann, W. A. Banks, D. J. Drucker and C. N. Haile (2003). "Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection." Nat Med **9**(9): 1173-1179.
- Dylag, T., J. Kotlinska, P. Rafalski, A. Pachuta and J. Silberring (2006). "The activity of CART peptide fragments." Peptides **27**(8): 1926-1933.
- Erspamer, G. F. and C. Severini (1992). "Guinea-pig ileum (GPI) and mouse vas deferens (MVD) preparations in the discovery, discrimination and parallel bioassay of opioid peptides." Pharmacol Res **26**(2): 109-121.
- Gault, V. A. and C. Holscher (2008). "GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid." Eur J Pharmacol **587**(1-3): 112-117.
- Gong, N., H. Fan, A. N. Ma, Q. Xiao and Y. X. Wang (2014). "Geniposide and its iridoid analogs exhibit antinociception by acting at the spinal GLP-1 receptors." Neuropharmacology **84**: 31-45.
- Hatano, R., K. Ohnuma, J. Yamamoto, N. H. Dang and C. Morimoto (2013). "CD26-mediated co-stimulation in human CD8(+) T cells provokes effector function via pro-inflammatory cytokine production." Immunology **138**(2): 165-172.
- Heinke B, Gingl E, Sandkuhler J (2011) Multiple targets of μ -opioid receptor mediated presynaptic inhibition at primary afferent A $_1$ - and C-fibers. J Neurosci **31**:1313–1322
- Holst, J. J. (2007). "The physiology of glucagon-like peptide 1." Physiol Rev **87**(4): 1409-1439.
- Hong, W. J., J. K. Petell, D. Swank, J. Sanford, D. C. Hixson and D. Doyle (1989). "Expression of dipeptidyl peptidase IV in rat tissues is mainly regulated at the mRNA levels." Exp Cell Res **182**(1): 256-266.
- Hughes, J., H. W. Kosterlitz and F. M. Leslie (1975). "Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics." Br J Pharmacol **53**(3): 371-381.
- Hui, R., W. Wang, T. Chen, B. C. Lu, H. Li, T. Zhang, S. X. Wu and Y. Q. Li (2010). "Origins of endomorphin-2 immunopositive fibers and terminals in the spinal dorsal horn of the rat." Neuroscience **169**(1): 422-430.
- Itou, M., T. Kawaguchi, E. Taniguchi and M. Sata (2013). "Dipeptidyl peptidase-4: a key player in chronic liver disease." World J Gastroenterol **19**(15): 2298-2306.
- Javidroozi, M., S. Zucker and W. T. Chen (2012). "Plasma seprase and DPP4 levels as markers of disease and prognosis in cancer." Dis Markers **32**(5): 309-320.

- Kahne, T., H. Kroning, U. Thiel, A. J. Ulmer, H. D. Flad and S. Ansorge (1996). "Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation." Cell Immunol **170**(1): 63-70.
- Khasabov, S. G., S. D. Rogers, J. R. Ghilardi, C. M. Peters, P. W. Mantyh and D. A. Simone (2002). "Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization." J Neurosci **22**(20): 9086-9098.
- Kim, M., M. J. Platt, T. Shibasaki, S. E. Quaggin, P. H. Backx, S. Seino, J. A. Simpson and D. J. Drucker (2013). "GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure." Nat Med **19**(5): 567-575.
- Kiraly, K., A. M. Lambeir, J. Szalai, A. Szentirmay, W. Luyten, I. Barna, Z. Puskar, M. Kozsurek and A. Z. Ronai (2011). "The dipeptidyl peptidase IV (CD26, EC 3.4.14.5) inhibitor vildagliptin is a potent antihyperalgesic in rats by promoting endomorphin-2 generation in the spinal cord." Eur J Pharmacol **650**(1): 195-199.
- Kiraly, K., B. Szalay, J. Szalai, I. Barna, K. Gyires, M. Verbeken and A. Z. Ronai (2009). "Intrathecal injected Ile-Pro-Ile, an inhibitor of membrane ectoenzyme dipeptidyl peptidase IV, is antihyperalgesic in rats by switching the enzyme from hydrolase to synthase functional mode to generate endomorphin 2." Eur J Pharmacol **620**(1-3): 21-26.
- Kosterlitz, H. W., J. A. Lord, S. J. Paterson and A. A. Waterfield (1980). "Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with mu- and delta-receptors." Br J Pharmacol **68**(2): 333-342.
- Koylu, E. O., P. R. Couceyro, P. D. Lambert, N. C. Ling, E. B. DeSouza and M. J. Kuhar (1997). "Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland." J Neuroendocrinol **9**(11): 823-833.
- Kozsurek, M., E. Lukacsi, C. Fekete and Z. Puskar (2009). "Nonselective innervation of lamina I projection neurons by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART)-immunoreactive fibres in the rat spinal dorsal horn." Eur J Neurosci **29**(12): 2375-2387.
- Kozsurek, M., E. Lukacsi, C. Fekete, G. Wittmann, M. Rethelyi and Z. Puskar (2007). "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) is present in peptidergic C primary afferents and axons of excitatory interneurons with a possible role in nociception in the superficial laminae of the rat spinal cord." Eur J Neurosci **26**(6): 1624-1631.
- Larsen, P. J., M. Tang-Christensen, J. J. Holst and C. Orskov (1997). "Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem." Neuroscience **77**(1): 257-270.
- Li, Y., T. Perry, M. S. Kindy, B. K. Harvey, D. Tweedie, H. W. Holloway, K. Powers, H. Shen, J. M. Egan, K. Sambamurti, A. Brossi, D. K. Lahiri, M. P. Mattson, B. J. Hoffer, Y. Wang and N. H. Greig (2009). "GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(4): 1285-1290.
- Li, Y., D. Tweedie, M. P. Mattson, H. W. Holloway and N. H. Greig (2010). "Enhancing the GLP-1 receptor signaling pathway leads to proliferation and neuroprotection in human neuroblastoma cells." J Neurochem **113**(6): 1621-1631.
- Lord, J. A., A. A. Waterfield, J. Hughes and H. W. Kosterlitz (1977). "Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors." Nature **267**(5611): 495-499.
- Lovshin, J. A. and D. J. Drucker (2009). "Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus." Nat Rev Endocrinol **5**(5): 262-269.
- Lu, G., Y. Hu, Q. Wang, J. Qi, F. Gao, Y. Li, Y. Zhang, W. Zhang, Y. Yuan, J. Bao, B. Zhang, Y. Shi, J. Yan and G. F. Gao (2013). "Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26." Nature **500**(7461): 227-231.

- Maixnerova, J., J. Hlavacek, D. Blokesova, W. Kowalczyk, T. Elbert, M. Sanda, M. Blechova, B. Zelezna, J. Slaninova and L. Maletinska (2007). "Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments." Peptides **28**(10): 1945-1953.
- Maletinska, L., J. Maixnerova, R. Matyskova, R. Haugvicova, E. Sloncova, T. Elbert, J. Slaninova and B. Zelezna (2007). "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12." Eur J Pharmacol **559**(2-3): 109-114.
- Marney, A., S. Kunchakarra, L. Byrne and N. J. Brown (2010). "Interactive hemodynamic effects of dipeptidyl peptidase-IV inhibition and angiotensin-converting enzyme inhibition in humans." Hypertension **56**(4): 728-733.
- Martin-Schild, S., A. A. Gerall, A. J. Kastin and J. E. Zadina (1998). "Endomorphin-2 is an endogenous opioid in primary sensory afferent fibers." Peptides **19**(10): 1783-1789.
- McClellan, P. L., V. A. Gault, P. Harriott and C. Holscher (2010). "Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: a link between diabetes and Alzheimer's disease." Eur J Pharmacol **630**(1-3): 158-162.
- McNay, E. C. and A. K. Recknagel (2011). "Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes." Neurobiol Learn Mem **96**(3): 432-442.
- Mentlein, R. (1999). "Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides." Regul Pept **85**(1): 9-24.
- Mestre, C., T. Pelissier, J. Fialip, G. Wilcox and A. Eschalier (1994). "A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats." J Pharmacol Toxicol Methods **32**(4): 197-200.
- Nichols, M. L., B. J. Allen, S. D. Rogers, J. R. Ghilardi, P. Honore, N. M. Luger, M. P. Finke, J. Li, D. A. Lappi, D. A. Simone and P. W. Mantyh (1999). "Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor." Science **286**(5444): 1558-1561.
- Ohnuma, K., N. H. Dang and C. Morimoto (2008). "Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function." Trends Immunol **29**(6): 295-301.
- Ou, X., H. O'Leary and H. E. Broxmeyer (2013). "Implications of DPP4 modification of proteins that regulate stem/progenitor and more mature cell types." Blood.
- Perry, T., H. W. Holloway, A. Weerasuriya, P. R. Mouton, K. Duffy, J. A. Mattison and N. H. Greig (2007). "Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy." Exp Neurol **203**(2): 293-301.
- Pipatpiboon, N., H. Pintana, W. Prachayasakul, N. Chattipakorn and S. C. Chattipakorn (2013). "DPP4-inhibitor improves neuronal insulin receptor function, brain mitochondrial function and cognitive function in rats with insulin resistance induced by high-fat diet consumption." Eur J Neurosci **37**(5): 839-849.
- Polgar, E., T. Furuta, T. Kaneko and A. Todd (2006). "Characterization of neurons that express preprotachykinin B in the dorsal horn of the rat spinal cord." Neuroscience **139**(2): 687-697.
- Quirion, R. and C. B. Pert (1981). "Dynorphins: similar relative potencies on mu, delta- and kappa-opiate receptors." Eur J Pharmacol **76**(4): 467-468.
- Ramos, L. S., J. H. Zippin, M. Kamenetsky, J. Buck and L. R. Levin (2008). "Glucose and GLP-1 stimulate cAMP production via distinct adenylyl cyclases in INS-1E insulinoma cells." J Gen Physiol **132**(3): 329-338.
- Randall, L. O. and J. J. Selitto (1957). "A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue." Arch Int Pharmacodyn Ther **111**(4): 409-419.
- Roger, B., J. Papin, P. Vacher, M. Raoux, A. Mulot, M. Dubois, J. Kerr-Conte, B. H. Voy, F. Pattou, G. Charpentier, J. C. Jonas, N. Moustaid-Moussa and J. Lang (2011). "Adenylyl cyclase 8 is central to glucagon-like peptide 1 signalling and effects of chronically elevated glucose in rat and human pancreatic beta cells." Diabetologia **54**(2): 390-402.

- Rohnert, P., W. Schmidt, P. Emmerlich, A. Gohl, S. Wrenger, U. Bank, K. Nordhoff, M. Tager, S. Ansoerge, D. Reinhold and F. Striggow (2012). "Dipeptidyl peptidase IV, aminopeptidase N and DPPIV/APN-like proteases in cerebral ischemia." J Neuroinflammation **9**: 44.
- Ronai, A. Z., K. Kiraly, A. Szebeni, E. Szemenyei, Z. Prohaszka, Z. Darula, G. Toth, I. Till, B. Szalay, E. Kato and I. Barna (2009). "Immunoreactive endomorphin 2 is generated extracellularly in rat isolated L4,5 dorsal root ganglia by DPP-IV." Regul Pept **157**(1-3): 1-2.
- Sakurada, C., S. Sakurada, T. Hayashi, S. Katsuyama, K. Tan-No and T. Sakurada (2003). "Degradation of endomorphin-2 at the supraspinal level in mice is initiated by dipeptidyl peptidase IV: an in vitro and in vivo study." Biochem Pharmacol **66**(4): 653-661.
- Sakurada, C., C. Watanabe, S. Sakurada, K. Tan-No and T. Sakurada (1999). "Major metabolites of substance P degraded by spinal synaptic membranes antagonize the behavioral response to substance P in rats." J Pharm Sci **88**(11): 1127-1132.
- Salcedo, I., D. Tweedie, Y. Li and N. H. Greig (2012). "Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders." Br J Pharmacol **166**(5): 1586-1599.
- Sanderson Nydahl, K., K. Skinner, D. Julius and A. I. Basbaum (2004). "Co-localization of endomorphin-2 and substance P in primary afferent nociceptors and effects of injury: a light and electron microscopic study in the rat." Eur J Neurosci **19**(7): 1789-1799.
- Sandkuhler, J. and D. Gruber-Schoffnegger (2012). "Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): an update." Curr Opin Pharmacol **12**(1): 18-27.
- Santos SF1, Melnick IV, Safronov BV. (2004) Selective postsynaptic inhibition of tonic-firing neurons in substantia gelatinosa by mu-opioid agonist. *Anesthesiology*. 2004 Nov;101(5):1177-83.
- Sauve, M., K. Ban, M. A. Momen, Y. Q. Zhou, R. M. Henkelman, M. Husain and D. J. Drucker (2010). "Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice." Diabetes **59**(4): 1063-1073.
- Scanlin, H. L., E. A. Carroll, V. K. Jenkins and A. Balkowiec (2008). "Endomorphin-2 is released from newborn rat primary sensory neurons in a frequency- and calcium-dependent manner." Eur J Neurosci **27**(10): 2629-2642.
- Schagger, H. (2006). "Tricine-SDS-PAGE." Nat Protoc **1**(1): 16-22.
- Seltzer, Z., R. Dubner and Y. Shir (1990). "A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury." Pain **43**(2): 205-218.
- Simantov, R., M. J. Kuhar, G. R. Uhl and S. H. Snyder (1977). "Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(5): 2167-2171.
- Szemenyei, E., I. Barna, Z. Mergl, A. Keresztes, Z. Darula, E. Kato, G. Toth and A. Z. Ronai (2008). "Detection of a novel immunoreactive endomorphin 2-like peptide in rat brain extracts." Regul Pept **148**(1-3): 54-61.
- Szentirmay, A. K., K. P. Kiraly, N. Lenkey, E. Lacko, M. Al-Khrasani, T. Friedmann, J. Timar, S. Gyarmati, G. Toth, S. Furst and P. Riba (2013). "Spinal interaction between the highly selective mu agonist DAMGO and several delta opioid receptor ligands in naive and morphine-tolerant mice." Brain Res Bull **90**: 66-71.
- Szucs P1, Luz LL, Pinho R, Aguiar P, Antal Z, Tiong SY, Todd AJ, Safronov BV.: Axon diversity of lamina I local-circuit neurons in the lumbar spinal cord. *J Comp Neurol*. 2013 Aug 15;521(12):2719-41. doi: 10.1002/cne.23311.
- Terskiy, A., K. M. Wannemacher, P. N. Yadav, M. Tsai, B. Tian and R. D. Howells (2007). "Search of the human proteome for endomorphin-1 and endomorphin-2 precursor proteins." Life Sci **81**(23-24): 1593-1601.

- Turi, G. F., Z. Liposits, S. M. Moenter, C. Fekete and E. Hrabovszky (2003). "Origin of neuropeptide Y-containing afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice." Endocrinology **144**(11): 4967-4974.
- Turner, A. J., J. Hryszko, N. M. Hooper and M. J. Dowdall (1987). "Purification and characterization of a peptidyl dipeptidase resembling angiotensin converting enzyme from the electric organ of *Torpedo marmorata*." J Neurochem **48**(3): 910-916.
- van den Pol, A. N. (1986). "Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons throughout the hypothalamus receive glutamate decarboxylase immunoreactive synapses: a double pre-embedding immunocytochemical study with particulate silver and HRP." J Neurosci **6**(3): 877-891.
- Vaught, J. L., R. B. Rothman and T. C. Westfall (1982). "Mu and delta receptors: their role in analgesia in the differential effects of opioid peptides on analgesia." Life Sci **30**(17): 1443-1455.
- Vicentic, A., A. Lakatos and D. Jones (2006). "The CART receptors: background and recent advances." Peptides **27**(8): 1934-1937.
- Vicentic, A., A. Lakatos and M. J. Kuhar (2005). "CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells." Eur J Pharmacol **528**(1-3): 188-189.
- Williams, C. A., S. Y. Wu, S. L. Dun, E. H. Kwok and N. J. Dun (1999). "Release of endomorphin-2 like substances from the rat spinal cord." Neurosci Lett **273**(1): 25-28.
- Wittmann, G., Z. Liposits, R. M. Lechan and C. Fekete (2002). "Medullary adrenergic neurons contribute to the neuropeptide Y-ergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat." Neurosci Lett **324**(1): 69-73.
- Wolfe, D., S. Hao, J. Hu, R. Srinivasan, J. Goss, M. Mata, D. J. Fink and J. C. Glorioso (2007). "Engineering an endomorphin-2 gene for use in neuropathic pain therapy." Pain **133**(1-3): 29-38.
- Wuster, M., R. Schulz and A. Herz (1980). "Highly specific opiate receptors for dynorphin-(1-13) in the mouse vas deferens." Eur J Pharmacol **62**(2-3): 235-236.
- Yamamoto, H., C. E. Lee, J. N. Marcus, T. D. Williams, J. M. Overton, M. E. Lopez, A. N. Hollenberg, L. Baggio, C. B. Saper, D. J. Drucker and J. K. Elmquist (2002). "Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons." J Clin Invest **110**(1): 43-52.
- Zadina, J. E., L. Hackler, L. J. Ge and A. J. Kastin (1997). "A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor." Nature **386**(6624): 499-502.



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1459
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NUMBER	FILING or 371(e) DATE	GRP ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY. DOCKET NO	TOT CLAIMS	IND CLAIMS
62/209,452	08/25/2015		130	114303US		

DANUBIA Patent and Law Office LLC.

Adam Svingor

Bajcsy-Zsilins: 8 206/5

Budapest, 105 Aktaszám: 114303US-9401 B

HUNGARY Feladó: 15444-H Patent Office/US

Felelős: SG

2015 SZEPT 18.

DANUBIA
Patent és Jogi Iroda Kft.

CONFIRMATION NO. 1003
FILING RECEIPT



000000007383784

Date Mailed: 09/10/2015

Receipt is acknowledged of this provisional patent application. It will not be examined for patentability and will become abandoned not later than twelve months after its filing date. Any correspondence concerning the application must include the following identification information: the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. **If an error is noted on this Filing Receipt, please submit a written request for a Filing Receipt Correction. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections**

Inventor(s)

Zita Puskár, Budaors, HUNGARY;
Márk Kozsurek, Budapest, HUNGARY;
Kornél Király, Budapest, HUNGARY;
Csaba Fekete, Budapest, HUNGARY;

Applicant(s)

Semmelweis Egyetem, Budapest, HUNGARY;
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet, Budapest, HUNGARY;

Power of Attorney: None

Permission to Access - A proper **Authorization to Permit Access to Application by Participating Offices** (PTO/SB/39 or its equivalent) has been received by the USPTO.

If Required, Foreign Filing License Granted: 09/10/2015

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is **US 62/209,452**

Projected Publication Date: None, application is not eligible for pre-grant publication

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

** SMALL ENTITY **

Title

PEPTIDES FOR USE AS DPP4 INHIBITORS AND ANTI-HYPERALGESIC AGENTS

Statement under 37 CFR 1.55 or 1.78 for AIA (First Inventor to File) Transition Applications: No

PROTECTING YOUR INVENTION OUTSIDE THE UNITED STATES

Since the rights granted by a U.S. patent extend only throughout the territory of the United States and have no effect in a foreign country, an inventor who wishes patent protection in another country must apply for a patent in a specific country or in regional patent offices. Applicants may wish to consider the filing of an international application under the Patent Cooperation Treaty (PCT). An international (PCT) application generally has the same effect as a regular national patent application in each PCT-member country. The PCT process **simplifies** the filing of patent applications on the same invention in member countries, but **does not result** in a grant of "an international patent" and does not eliminate the need of applicants to file additional documents and fees in countries where patent protection is desired.

Almost every country has its own patent law, and a person desiring a patent in a particular country must make an application for patent in that country in accordance with its particular laws. Since the laws of many countries differ in various respects from the patent law of the United States, applicants are advised to seek guidance from specific foreign countries to ensure that patent rights are not lost prematurely.

Applicants also are advised that in the case of inventions made in the United States, the Director of the USPTO must issue a license before applicants can apply for a patent in a foreign country. The filing of a U.S. patent application serves as a request for a foreign filing license. The application's filing receipt contains further information and guidance as to the status of applicant's license for foreign filing.

Applicants may wish to consult the USPTO booklet, "General Information Concerning Patents" (specifically, the section entitled "Treaties and Foreign Patents") for more information on timeframes and deadlines for filing foreign patent applications. The guide is available either by contacting the USPTO Contact Center at 800-786-9199, or it can be viewed on the USPTO website at <http://www.uspto.gov/web/offices/pac/doc/general/index.html>.

For information on preventing theft of your intellectual property (patents, trademarks and copyrights), you may wish to consult the U.S. Government website, <http://www.stopfakes.gov>. Part of a Department of Commerce initiative, this website includes self-help "toolkits" giving innovators guidance on how to protect intellectual property in specific countries such as China, Korea and Mexico. For questions regarding patent enforcement issues, applicants may call the U.S. Government hotline at 1-866-999-HALT (1-866-999-4258).

LICENSE FOR FOREIGN FILING UNDER

Title 35, United States Code, Section 184

Title 37, Code of Federal Regulations, 5.11 & 5.15

GRANTED

The applicant has been granted a license under 35 U.S.C. 184, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" followed by a date appears on this form. Such licenses are issued in all applications where the conditions for issuance of a license have been met, regardless of whether or not a license may be required as set forth in 37 CFR 5.15. The scope and limitations of this license are set forth in 37 CFR 5.15(a) unless an earlier license has been issued under 37 CFR 5.15(b). The license is subject to revocation upon written notification. The date indicated is the effective date of the license, unless an earlier license of similar scope has been granted under 37 CFR 5.13 or 5.14.

This license is to be retained by the licensee and may be used at any time on or after the effective date thereof unless it is revoked. This license is automatically transferred to any related applications(s) filed under 37 CFR 1.53(d). This license is not retroactive.

The grant of a license does not in any way lessen the responsibility of a licensee for the security of the subject matter as imposed by any Government contract or the provisions of existing laws relating to espionage and the national security or the export of technical data. Licensees should apprise themselves of current regulations especially with respect to certain countries, of other agencies, particularly the Office of Defense Trade Controls, Department of State (with respect to Arms, Munitions and Implements of War (22 CFR 121-128)); the Bureau of Industry and Security, Department of Commerce (15 CFR parts 730-774); the Office of Foreign AssetsControl, Department of Treasury (31 CFR Parts 500+) and the Department of Energy.

NOT GRANTED

No license under 35 U.S.C. 184 has been granted at this time, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" DOES NOT appear on this form. Applicant may still petition for a license under 37 CFR 5.12, if a license is desired before the expiration of 6 months from the filing date of the application. If 6 months has lapsed from the filing date of this application and the licensee has not received any indication of a secrecy order under 35 U.S.C. 181, the licensee may foreign file the application pursuant to 37 CFR 5.15(b).

SelectUSA

The United States represents the largest, most dynamic marketplace in the world and is an unparalleled location for business investment, innovation, and commercialization of new technologies. The U.S. offers tremendous resources and advantages for those who invest and manufacture goods here. Through SelectUSA, our nation works to promote and facilitate business investment. SelectUSA provides information assistance to the international investor community; serves as an ombudsman for existing and potential investors; advocates on behalf of U.S. cities, states, and regions competing for global investment; and counsels U.S. economic development organizations on investment attraction best practices. To learn more about why the United States is the best country in the world to develop technology, manufacture products, deliver services, and grow your business, visit <http://www.SelectUSA.gov> or call +1-202-482-6800.



SZELLEMI TULAJDON
NEMZETI HIVATALA

Budapest V., Garibaldi utca 2.
Postacím: 1374 Budapest, Pf. 552.
Telefon: 312-4400

Iktatás

Érkeztető szám	Érkezés időpontja	Érkeztette
SZTNH_ÜT-20150825- 1847-000533	2015.08.25	Hágelmann Attila

Érkezés módja: Terminálon érkezett

Iktatószám	Iktatás időpontja	Iktatta
1526833	2015.08.28	Hágelmann Attila

Szabadalom / Bejelentés*

Ügyszám: **P1500387** Lajstromszám:

Ügyiratszám: **P1500387/1**

Ügyintéző:

Benyújtó: Danubia Szabadalmiroda

Idegen azonosító:

Bejelentő: SEMMELWEIS EGYETEM ÉS TÁRSAI

Tárgy: CART PEPTIDEK

Benvújtott iratok:	Old./Mell. sz.	Péld. sz.
B. mentési kérelem		1
Idegen nyelvű leírás		1
Igéypont		1
Kivonat		1
Rajz	9	1

