

Fluoreszcens jelzővegyületek alkalmazása G-fehérje kapcsolt receptorok vizsgálatára

SZABÓ Renáta^{a,b,c}, EGYED Attila^{a,b,c}, ÁBRÁNYI-BALOGH Péter^{a,b,c}, KISS Dóra Judit^{a,c},
VOLK Balázs^d, KESERŰ György Miklós^{a,b,c,*}

^aHUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, Gyógyszerkémiai Kutatócsoport, Magyar Tudósok körútja 2.,
1117 Budapest, Magyarország

^bBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar,
Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

^cNemzeti Gyógyszerkutató és Fejlesztési Laboratórium, Magyar Tudósok körútja 2., 1117 Budapest, Magyarország

^dEgis Gyógyszergyár Zrt., Hatóanyagfejlesztési igazgatóság, Keresztúri út 30-38., 1106 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR-ok) a plazmamembrán receptorok legnagyobb és legváltozatosabb családját képviselik.¹ Ezek a receptorok kiemelkedő szerepet játszanak a sejtek működésének szabályozásában és a külvilág ingereinek észlelésében. Jelentőségüket az is alátámasztja, hogy az FDA által jóváhagyott gyógyszerek mintegy 34%-a ezeknek a receptoroknak a célzásával fejti ki a hatását.² A GPCR-ok fehérje-fehérje kölcsönhatások révén vesznek részt a sejtek működésének szabályozásában. Az összetett jelátviteli folyamatok megértése és a befolyásolási lehetőségek felderítése fontos feltétele a receptorokat célzó gyógyszerkutató programok sikerének.

A gyógyszerek kötődésének vizsgálatára leggyakrabban alkalmazott módszer az antitest alapú immunjelölés,³ valamint a radioligand alapú autoradiográfia.⁴ Az immunjelölés hátránya, hogy nem mindig áll rendelkezésre érzékeny és specifikus antitest, valamint ezek nagy méretük miatt nehezen jutnak el a célfehérjéhez. A radioligand-alapú autoradiográfia térbeli felbontása korlátozott, és nehezebben integrálható más vizsgálati módszerekkel. Ezért ezek a módszerek csak speciális esetekben teszik lehetővé a gyógyszermolekulák hatásmechanizmusának feltárását. A hagyományos módszerek korlátai miatt egyre nagyobb figyelem irányul a fluoreszcens vegyületek alkalmazására a receptor–ligandum kölcsönhatások vizsgálata során. A biolumineszcens rezonancia energiaátvitel (BRET) és a fluoreszcens rezonancia energiaátvitel (FRET) lehetővé teszi ezen kölcsönhatások kinetikájának valós idejű, radioaktív anyagok használata nélküli elemzését.⁵ E technikák révén pontosan meghatározhatók a ligandumok kötődési paraméterei, és nagy érzékenységgüknek köszönhetően sejttípus-specifikus kölcsönhatások is vizsgálhatók. A fluoreszcens jelzővegyületek szuperfelbontású képalkotó eljárásokkal – mint például a sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (STORM) vagy a stimulált emisszió kioltás (STED) elven működő fluoreszcens mikroszkópia – való kombinálása pedig új lehetőségeket teremt a fehérjék működésének feltárására, mivel ezek segítségével részlete-

sen feltérképezhető a receptorok anatómiai elhelyezkedése és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli mechanizmusok.^{6,7}

Ebben az összefoglalóban bemutatjuk a fluoreszcens jelzővegyületek tervezésének főbb lépéseit, valamint három különböző GPCR típusú receptorhoz – a D₃ dopamin-, a CB₁ kannabinoid- és az M₂ muszkarin receptorhoz – kapcsolódó specifikus ligandumok tervezését, szintézisét és kötődési jellemzőinek vizsgálatát.^{8,9} A fluoreszcens próbák farmakológiai és mikroszkópos alkalmazását az eredeti publikációk tárgyalják.

2. Eredmények

2.1. Fluoreszcens jelzővegyületek tervezése

Az évek során számos tanulmány foglalkozott a fluoreszcens ligandumok hatékony tervezésével, azonban még mindig nem létezik olyan egységes módszer, amely minden szempontot figyelembe véve biztosítaná egy sikeres fluoreszcens jelzőmolekula fejlesztését.¹⁰⁻¹² Ennek hátterében az áll, hogy a különböző fluorofórok ligandumokhoz való kapcsolása olyan szerkezeti változásokat okozhat, amelyek megnehezítik a farmakológiai tulajdonságok (mint például a kötési affinitás vagy a szelektivitás), valamint a lipofilitás és a fotofizikai jellemzők pontos előrejelzését. Egy fluoreszcens festékkel jelölt ligandum leggyakrabban három fő komponensből épül fel: a *farmakofór* felelős a receptorral való interakcióért, a *fluorofór* biztosítja a fluoreszcens jelet, míg a két egységet összekötő *linker* garantálja az optimális térszerkezetet.

Egy új fluoreszcens jelzővegyület tervezésének első lépése a vizsgálandó fehérje iránti nagy kötődési affinitással és megfelelő szelektivitással rendelkező ligandum kiválasztása, mivel a fluoreszcens csoport beépítése gyakran csökkenti a kötődési affinitást.^{13,14} A kiválasztott ligandum típusát az alkalmazás célja határozza meg: agonisták és antagonisták egyaránt alkalmazhatóak, de receptoraktiváció és internalizáció vizsgálatához agonisták szükségesek.¹⁵ Ezt követő-

* Tel.: +36 1 382 6911; e-mail: keseru.gyorgy@ttk.hu

en a ligandum módosítási lehetőségeit a szerkezet-aktivitás (SAR) elemzés és –amennyiben rendelkezésre áll – a receptor-ligandum komplex kísérletes úton meghatározott térszerkezete alapján kell meghatározni, figyelembe véve a ligandum kötőmódját és a receptorral való kölcsönhatásait.¹⁶ Ha nem áll rendelkezésre kísérleti térszerkezet, a számítási kémiai modellezés segíthet előrejelezni a ligandum kötőmódját és az optimális módosítási pozíciókat, bár még a megbízható modellek sem garantálják a hatékony jelzővegyület kifejlesztésének sikerét.

A fluoreszcens jelzővegyület tervezésének következő kulcsfontosságú lépése a megfelelő fluorofór kiválasztása. A kereskedelmi forgalomban széles választékban elérhető fluorofórok lehetővé teszik a kutatók számára, hogy az adott kutatási célokhoz leginkább illeszkedő fluoreszcens festéket válasszanak. A leggyakrabban alkalmazott fluorofórok közé tartozik a fluoreszcein, a rodamin, a BODIPY, a kumarin és a cianin.¹⁷ Az utóbbi években közeli infravörös fluorofórokat is fejlesztettek, amelyek különösen hasznosak tumorképződésben és képvezérelt műtétek során.¹⁸ A ligandum kiválasztása és módosítási pontjainak meghatározása, valamint a festék kiválasztása után következik a fluorofór és a ligandum összekapcsolása. A legtöbb esetben a fluorofórok nem képesek közvetlenül illeszkedni a kötősebbe, ezért linker alkalmazására van szükség a receptor és a festék közötti kedvezőtlen kölcsönhatások elkerülése érdekében.¹⁹ A hidrofób kötősebekkel rendelkező receptorok gyakran előnyben részesítik az alkil-linkereket a hidrofíli linkerekkel szemben, mint például a polietilén-glikol (PEG).²⁰ A PEG-szerű linkerek növelhetik a fluoreszcens ligandum hidrofilitását, ami potenciálisan javíthatja a képződési tulajdonságokat azáltal, hogy csökkenti a nem specifikus, membránhoz való kötődést.²¹

Összességében elmondható, hogy nincs egyetlen, minden helyzetre alkalmazható módszer a sikeres fluoreszcens jelzővegyületek tervezésére. Érdemes áttekinteni a szakirodalomban már ismert jelzővegyületeket, mivel ezek hasznos kiindulópontot adhatnak. A rendelkezésre álló szerkezeti információk alapos elemzése, a részletes farmakológiai profilalkotás és a SAR adatok segíthetnek a megfelelő ligandumok kiválasztásában, valamint a módosítási pontok tervezésében. Az *in silico* dokkolási kísérletek támogatják a linker tervezését és a kiválasztott festék beépítésének módját. A legtöbb esetben azonban különböző linker-festék kombinációkkal kísérleteznek, hogy megtalálják a kívánt tulajdonságokkal rendelkező fluoreszcens jelzővegyületet.

2.2. D₃ dopamin receptorhoz kötődő fluoreszcens jelzővegyület számítógépes modellezése

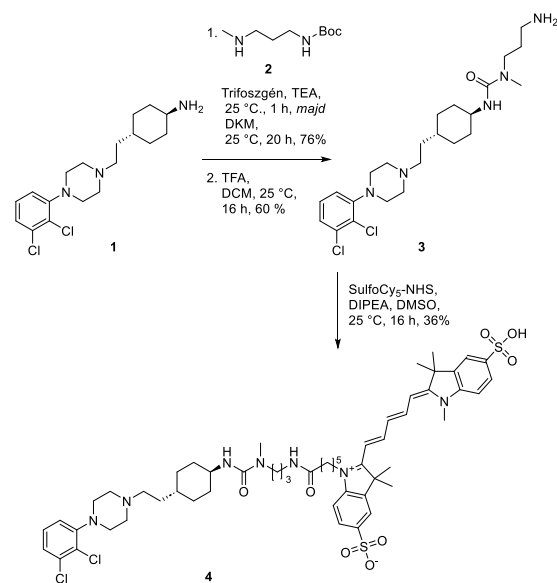
A számítógépes modellezést a D₃ dopamin receptorhoz kötődő fluoreszcens kariprazinszármazék példáján keresztül mutatjuk be, míg a CB₁ és M₂ receptorok esetében az *in silico* tervezés részletei a hivatkozott publikációkban találhatók meg.^{8,9}

A fluoreszcens kariprazinszármazék tervezésénél elsőként elkészítettük a D₃ dopamin receptor térszerkezeti modelljét annak érdekében,⁸ hogy azonosítsuk a molekula olyan módosítható részeit, amelyek változtatása nem befolyásolja jelentősen a receptorhoz való affinitást. A szerkezetből hiányzó, koordinátákkal nem rendelkező aminosavmaradékokat a *MODELLER* program segítségével egészítettük ki, míg a sztérikus ütközéseket tartalmazó régiókat a *Schrödinger Prime* programmal korrigáltuk. A szerkezet további finomítása során a hiányzó hidrogéneket pótoltuk, a hibás térszerkezetű oldalláncokat javítottuk, illetve szükség szerint módosítottuk a protonáltsági állapotokat a *Schrödinger Protein Preparation Wizard* alkalmazásával. A ligandumok előkészítése a *Schrödinger LigPrep* eszközzel történt, stabil konformerek előállítására céljából. Ezt követően a *Glide* program segítségével dokkoltuk a ligandumokat a receptor kötőhelyére, single precision (SP) protokollt alkalmazva, 61×61×61 Å méretű külső és 25×25×25 Å méretű belső rácsdoboz beállításával. A dokkolás során külön figyelmet fordítottunk a konzervált Asp110^{3,32} aminosavval kialakuló hidrogénkötésre, és minden generált póz esetében dokkolás utáni energiainimalizálást végeztünk.

2.3. Fluoreszcens jelzővegyületek szintézise

2.3.1. A D₃ dopamin receptorhoz kötődő fluoreszcens kariprazinszármazék szintézise

A szintézis kiindulási pontját képező piperazinszármazék (1) előállítása a Richter Gedeon Nyrt. szabadalma alapján történt (1. ábra).²² Ezt követően az 1 amint trifoszfén alkalmazásával kapcsoltuk össze a 2 védett diaminnal, így kialakítva a karbamátot jó hozam mellett. A reakció után a Boc-védőcsoportot trifluoecetsavval (TFA) távolítottuk el. Az így kapott, szabad aminocsoportot tartalmazó vegyületet (3) a Sulfo-Cy5-NHS fluoreszcens festékkel *N*-acileztük, amelynek eredményeként létrejött a kívánt fluoreszcens jelzővegyület (4).

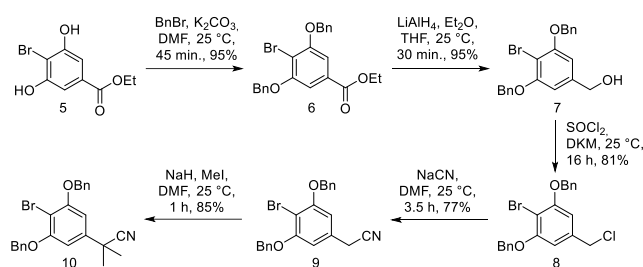


1. ábra. A fluoreszcens kariprazinszármazék (4) előállítása

2.3.2. A CB₁ kannabinoid receptorhoz kötődő fluoreszcens jelzővegyület szintézise

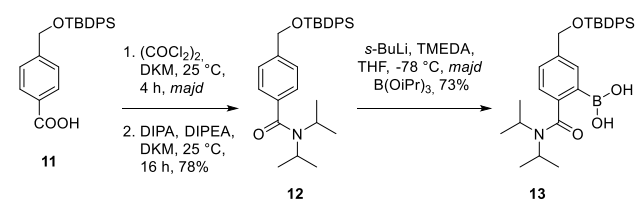
A szintézis egyik kulcsfontosságú intermediere, a **10** aril-bromid származék előállítása öt lépésben történt (2. ábra).

Az első lépésben az etil-4-brom-dihidroxibenzoát (**5**) két fenolos hidroxilcsoportját benzil védőcsoportokkal láttuk el, aminek eredményeként a **6** észtert 95%-os hozammal nyertük ki. A védett származékot (**6**) ezt követően lítium-alumínium-hidriddel alkohollá (**7**) redukáltuk. Ezután kétlépéses nitrilképzést végeztünk: először tionil-kloriddal a hidroxilcsoportot klórrá alakítottuk (**8**), majd ezt nátrium-cianidval reagáltatva jutottunk a **9** nitrilhez. Végül a nitrilcsoporthoz kapcsolódó szénatomra két metilcsoportot vittünk be nátrium-hidrid és metil-jodid segítségével, így kiváló hozammal állítottuk elő a **10** intermediert.



2. ábra. A **10** aril-bromid előállítása

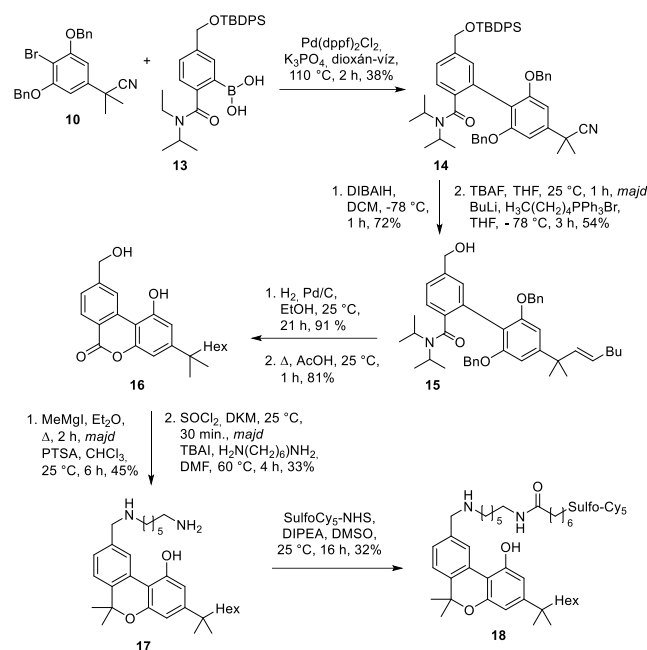
A szintézis másik fontos intermediert, a **13** boronsavat három lépésben állítottuk elő (3. ábra). Kiindulásként *tert*-butil-difenilszilil (TBDPS) védőcsoporttal ellátott hidroximetilbenzoesav származékot (**11**) használtuk, amelyből oxalil-kloriddal savkloridot képeztünk. Ezt a reaktív intermediert diizopropil-amin (DIPA) segítségével amiddá (**12**) alakítottuk. A következő lépésben a **12** amidot *s*-BuLi-mal lítiáltuk TMEDA jelenlétében, majd triizopropil-borát hozzáadásával előállítottuk a kívánt **13** boronsavat.



3. ábra. A **13** boronsav előállítása

A **10** aril-bromidot és a **13** boronsavat Suzuki-reakcióval kapcsoltuk össze Pd(dppf)₂Cl₂ jelenlétében. A reakció eredményeként mérsékelt hozammal kaptuk meg a **14** bifenil származékot (4. ábra). A nitrilcsoportot DIBAL-H segítségével a megfelelő aldehiddé (**15**) redukáltuk, majd a TBDPS védőcsoportot tetrabutylammónium-fluoriddal távolítottuk el. Ezt követően Wittig-reakcióval kettős kötést hoztunk létre, amelyet katalitikus hidrogénezéssel, *Selcat* Q₆ (Pd/C) katalizátor jelenlétében telítettünk, miközben a benzil védőcsoportokat is eltávolítottuk. A triciklusos váz-

elem kialakítása intramolekuláris acilezéssel történt, amelyet metilmagnézium-jodiddal (MeMgI) végzett gyűrűnyitás követett.

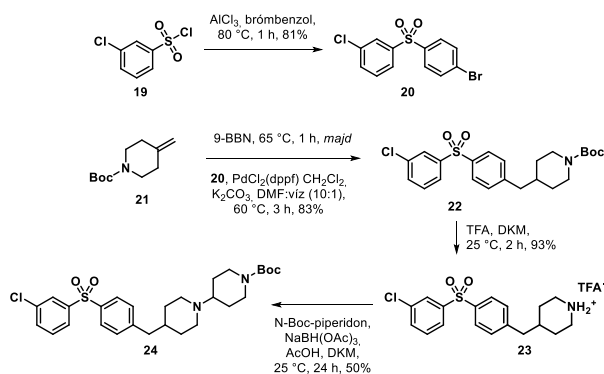


4. ábra. A CB₁ receptorhoz kötődő fluoreszcens jelzővegyület (**18**) előállítása

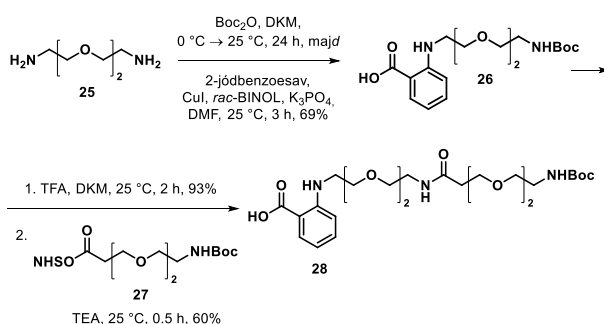
A középső gyűrű visszazárása 4-toluolszulfonsavval történt, a ciklizáció után 2-hidroxikannabinol származékot kaptunk. A benzil-alkohol funkciós csoportot tionil-kloriddal klórra cseréltük, amellyel *N*-alkileztük a hexán-1,6-diamin linkert. Végül a linker szabad aminocsoportját (**17**) *N*-acilezéssel reagáltattuk a Sulfo-Cy₅-NHS észterrel, így kialakítva a fluoreszcens jelzővegyületet (**18**).

2.3.3. Az M₂ muszkarin receptorhoz kötődő fluoreszcens jelzővegyület szintézise

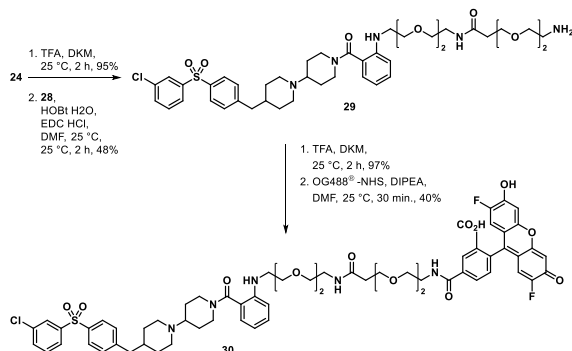
Az M₂ muszkarin receptorhoz kötődő, Oregon Green 488® festékkel jelölt ligandum szintézisének kiindulási anyagát, a **20** szulfont egy hatékony, oldószer- és kromatográfiamentes eljárással állítottuk elő (5. ábra). A brómbenzolt sikeresen vittük *Friedel–Crafts*-acilezésbe 3-klórbenzol-szulfonil-kloriddal (**19**) alumínium(III)-klorid jelenlétében. Ezt követően az irodalmi eljárást követve szintetizáltuk a **24** intermediert.²³ A **21** metilidén-piperidint 9-BBN-nel kezelve borán intermediert képeztünk, amelyet palládium-katalizált reakcióban kapcsolunk össze a **20** szulfonnal. A Boc védőcsoport eltávolítása után a keletkező amin TFA sóját (**23**) redukív aminálással alakítottuk tovább NaBH₃CN jelenlétében *N*-Boc-piperidonnal és megkaptuk a **24** *N*-Boc védett származékot.

5. ábra. A **24** szulfon előállítása

A linker szerepét betöltő PEG-származékot (**28**) meglévő irodalmi módszerek alapján szintetizáltuk (6. ábra).^{24,25} Elsőként a kereskedelmi forgalomban kapható **25** vegyület egyik aminocsoportját Boc védőcsoporttal láttuk el. Az így kapott Boc-védett amint pedig egy rézkatalizált keresztkapcsolási reakcióban 2-jód-benzoesavval reagáltattuk. A következő lépésben eltávolítottuk a Boc védőcsoportot, majd a keletkezett származékot *N*-hidroxiszukcinimid-észterrel (**27**) *N*-acileztük, így jutottunk a **28** PEG-származékhoz.

6. ábra. A **28** PEG-származék előállítása

A **24** szulfon-származék Boc védőcsoportjának eltávolítása után a kapott piperidint összekapcsoltuk a **28** antranilsavval, majd a Boc védőcsoportot TFA-val eltávolítottuk (7. ábra). Végül az amint a kereskedelembe elérhető OG488® NHS-észterrel *N*-acileztük, így kialakítva a fluoreszcens jelzővegyületet (**30**).

7. ábra. A **30** fluoreszcens jelzővegyület előállítása

2.4. A fluoreszcens jelzővegyületek kötődési affinitásának meghatározása

2.4.1. A D₃ és CB₁ receptorokhoz kötődő fluoreszcens származékok affinitásának vizsgálata

A fluoreszcens származékok kötődési affinitását radioligand-alapú kötődési vizsgálatokkal határoztuk meg. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze, ahol mindhárom származék (**4**, **18**, **30**) kötődési paramétereit (K_i) bemutatjuk.

1. táblázat: A **4**, **18**, **30** jelzővegyületek kötődési affinitás vizsgálata⁸⁻⁹

	Jelző-vegyület	Receptor	Radioligand	K_i [nM]
1.	4	D ₃	[³ H]spiperon	1,31
2.		D _{2L}	[³ H]spiperon	7,05
3.		5-HT _{1A}	[³ H]8-OH-DPAT	27,3
4.		5-HT _{2A}	[³ H]ketanserine	2660
5.		5-HT ₆	[³ H]LSD	530
6.		5-HT ₇	[³ H]LSD	5,08
7.	18	CB ₁	[³ H]CP 55940	3,5
8.	30	M ₁	[³ H]szkopolamin	38@10 μM
9.		M ₂		2,4
10.		M ₃		55592
11.		M ₄		54,1
12.		M ₅		182

A fluoreszcens karpiprazin származék (**4**) affinitását meghatároztuk a releváns dopamin, illetve szerotonin (5-hidroxitriptamin) G-fehérje kapcsolt receptorokon, beleértve a D₃, D_{2L}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆ és az 5-HT₇ receptorokat. A jelzővegyület (**4**) a karpiprazinhoz hasonlóan megtartotta nagy affinitását és szelektivitását a D₃ dopamin receptorhoz (K_i = 1,31 nM; 1. táblázat). Az általunk előállított fluoreszcens kannabinoid-származékot (**18**) kizárólag a CB₁ kannabinoid receptoron vizsgáltuk, ahol kiváló affinitást mutatott (K_i = 3,5 nM; 1. táblázat). Az M₂ muszkarin receptorhoz kötődő fluoreszcens jelzővegyület (**30**) esetében a fluoreszcens festék beépítése növelte a ligandum M₂ receptorok felé mutatott szelektivitását. Az általunk kifejlesztett új fluoreszcens ligandum szelektivitása az M₂ receptorral szemben kedvezőbb, mint a szakirodalomban korábban közölt dibenzodiazepinon alapú jelzőmolekuláké.^{26,27} Különösen kiemelkedő az M₁ és M₃ receptorok iránti szelektivitása, míg az M₄ és M₅ receptorok esetében a szelektivitás mértéke hasonló a korábban publikált vegyületekéhez.

3. Összefoglalás

A fluoreszcens jelzővegyületek kulcsszerepet töltenek be a modern farmakológiai kutatásokban, hiszen lehetővé teszi a receptor–ligandum kölcsönhatások valós idejű, nagy

érzékenységű vizsgálatát. Ezen túlmenően a fejlett képal-
kotási technikákkal – különösen a szuperfelbontású mik-
roszkópiával – kombinálva páratlan lehetőséget kínálnak a
molekuláris célpontok térbeli és időbeli eloszlásának feltér-
képezésére *in vitro* és *in vivo* rendszerekben. A fluoreszcens
ligandumok fejlesztése hozzájárul a különböző gyógyszer-
rek hatásmechanizmusának mélyebb megértéséhez, előse-
gítve új terápiás stratégiák kialakítását.

Kutatócsoportunkban három jelentős G-fehérje kapcsolt re-
ceptor – a D₃, a CB₁ és az M₂ receptorok – célzására fejleszt-
tünk ki sikeresen fluoreszcens jelzővegyületeket. Ezek
a receptorok kulcsszerepet töltenek be különböző neuroló-
giai és pszichiátriai kórképek (pl. skizofrénia, depresszió,
Alzheimer-kór), valamint fájdalom és gyulladásos folyama-
tok szabályozásában. A fluoreszcens jelzővegyületek terve-
zését *in silico* dokkolás segítségével végeztük. A szintetizált
vegyületek kötődési affinitását radioligand-alapú vizsgálá-
tokkal határoztuk meg. A PharmacStorm technológia
alkalmazásával részletes térbeli információkat nyertünk a
kariprazin eloszlásáról. Katona István (KOKI) munkacso-
portjával együttműködésben végzett *in vivo* vizsgálataink
igazolták, hogy a kariprazin preferenciálisan a D₃ recepto-
rokat célozza meg a *Calleja*-szigeteken granulás neuronja-
inak axonjaiban, miközben megkíméli a dopaminerg ter-
minálisokat. Ez a mechanizmus hozzájárulhat a kariprazin
célzott és mellékhatás-szegény terápiás hatásához.

4. Kísérleti rész

A szintetikus munkához preparatív szerves kémiai módsze-
reket alkalmaztunk. A reakciók előrehaladását vékonyréteg
kromatográfia, HPLC-MS és GC-MS segítségével követ-
tük. Az anyagok tisztítására normál és fordított fázisú flash
oszlopkromatográfiát, valamint fordított fázisú preparatív
oszlopkromatográfiát használtunk. Az előállított vegyü-
leteket olvadáspont, ¹H és ¹³C NMR, valamint HRMS segít-
ségével jellemeztük.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönettel tartoznak a Nemzeti Kutatási,
Fejlesztési és Innovációs Hivatal (PharmaLab, RRF-2.3.1-
21-2022-00015, 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2020-00039), vala-
mint a Magyar Tudományos Akadémia (NAP 1.0; 2.0; 3.0) tá-
mogatásáért. A KDP-IKT-2023-900-11-00000957/0000003
számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium
Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs alapról nyújtott
támogatásával, a KDP-2023 Pályázati Program finanszíro-
zásában valósult meg.

Hivatkozások

- Nieto Gutierrez, A.; McDonald, P. H. *Cell. Signal.* **2018**, *41*, 65–74.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.09.005>
- Zhang, M.; Chen, T.; Lu, X.; Lan, X.; Chen, Z.; Lu, S. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 1–43.
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01803-6>
- Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien R. Y. *Science* **2006**, *312*, 217–224.
<https://doi.org/10.1126/science.1124618>
- Griem-Krey, N.; Klein, A. B.; Herth, M.; Wellendorph, P. J. *Vis. Exp.* **2019**, *145*, e58879.
- Stoddart, L. A.; White, C. W.; Nguyen, K.; Hill, S. J.; Pflieger K. D. G. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 3028–3037.
<https://doi.org/10.1111/bph.13316>
- Guthrie, D. A.; Klein Herenbrink, C.; Lycas, M. D.; Ku, T.; Bonifazi, A.; DeVree, B. T.; Mathiasen, S.; Javitch, J. A.; Grimm, J. B.; Lavis, L.; Gether, U.; Newman, A. H. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 3288–3300.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00397>
- Jeong, S.; Widengren, J.; Lee, J. C. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 21.
<https://doi.org/10.3390/nano12010021>
- Prokop, S.; Abrányi-Balogh, P.; Barti, B.; Vámosi, M.; Zöldi, M.; Barna, L.; Urbán, M. G.; Tóth, D. A.; Dudok, B.; Egyed, A.; Deng, H.; Leggio, G. M.; Hunyady, L.; van der Stelt, M.; Keserü, M. G.; Katona, I. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6505.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26757-z>
- Szabó, R.; Szepesi Kovács, D.; Kiss, J. D.; Yazdi, Z. N.; Tóth, D. A.; Brea, J.; Loza, M. I.; Meszéna, D.; Wittner, L.; Ulbert, I.; Volk, B.; Hunyady, L.; Keserü, G. M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2025**, *16*, 552–559.
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.4c00592>
- Iliopoulos-Tsoutsouvas, C.; Kulkarni, R. N.; Makriyannis, A.; Nikas, S. P. *Expert Opin. Drug Discov.* **2018**, *13*, 933–947.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1518975>
- Conner, J. W.; Poole, D. P.; Jörg, M.; Veldhuis, N. A. *Future Med. Chem.* **2020**, *13*, 63–90.
<https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0327>
- Szabó, R.; Hornyánszky, Á.; Kiss, D. J.; Keserü, G. M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2025**, *209*, 107074.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107074>
- Casella, B. M.; Farmer, P. J.; Nesheva, N. D.; Williams, H. E. L.; Charlton, S. J.; Holliday, N. D.; Laughton, C. A.; Mistry, S. N. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 12911–12930.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00849>
- Heering, J.; Hernandez-Olmos, V.; Ildefeld, N.; Liu, L.; Kaiser, A.; Naeem, Z.; Frömel, T.; Fleming, I.; Steinhilber, D.; Proschak, E. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 2023–2034.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01589>
- De Paus, L. V.; Janssen, A. P. A.; Halimi, A.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Haitman, L. H.; van der Stelt, M. *Synlett* **2024**, *35*, 1239–1246.
- Dekkers, S.; Comez, D.; Karsai, N.; Arimont-Segura, M.; Canals, M.; Caspar, B.; de Graaf, C.; Kilpatrick, E. L.; Leurs, R.; Kellam, B.; Hill, S. J.; Briddon, S. J.; Stocks, M. J. *ACS Med. Chem. Lett.* **2024**, *15*, 143–148.
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.3c00469>
- Fu, Y.; Finney, N. S. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 29051–29061.
<https://doi.org/10.1039/C8RA02297F>
- Qiu, Y.; Yuan, B.; Cao, Y.; He, X.; Udochukwu Akakuru, O.; Lu, L.; Chen, N.; Xu, M.; Wu, A.; Li, J.; *WIREs Nanomed. Nanobio.* **2023**, *15*, e1910.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1910>

19. Verhoeven, M.; Handula, M.; van den Brink, L.; de Ridder, C. M. A.; Stuurman, D. C.; Seimbille, Y.; Dalm, S. U. *Cancers* **2023**, *15*, 2161. <https://doi.org/10.3390/cancers15072161>
20. Bresinsky, M.; Shahraki, A.; Kolb, P.; Pockes, S.; Sxhahada, H. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 15025–15041. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01707>
21. Cooper, G. A.; Oyagawa, C. R. M.; Manning, J. J.; Singh, S.; Hook, S.; Grimsey, N. L.; Glass, M.; Tyndall, J. D. A.; Vernall, A. *J. Med. Chem. Commun.* **2018**, *9*, 2055–2067. <https://doi.org/10.1039/C8MD00448J>
22. Czibula, L. et al. WO2010/70369 (2010).
23. Clader, J. W.; Billard, W.; Binch, H.; Chen, L. Y.; Crosby, G.; Duffy, R. A.; Ford, J.; Kozłowski, J. A.; Lachowicz, J. E.; Li, S.; Liu, C.; McCombie, S. W.; Vice, S.; Zhou, G.; Greenlee, W. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.11.005>
24. Zeng, L.; Fu, H.; Qiao, R.; Jiang, Y.; Zhao, Y. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1671–1676. <https://doi.org/10.1002/adsc.200900065>
25. Suzuki, T.; Hisakawa, S.; Itoh, Y.; Suzuki, N.; Takahashi, K.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K.; Nakagawa, H.; Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4208–4212. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.040>
26. Gruber, C. G.; Pegoli, A.; Müller, C.; Grätz, L.; She, X.; Keller, M. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11*, 823–832. <https://doi.org/10.1039/D0MD00137F>
27. She, X.; Pegoli, A.; Gruber, C. G.; Wifling, D.; Carpenter, J.; Hübner, H.; Chen, M.; Wan, J.; Bernhardt, G.; Gmeiner, P.; Holliday, N. D.; Keller, M. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 4133–4154. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02172>

Application of Fluorescent Probes in the Investigation of G Protein-Coupled Receptors

G protein-coupled receptors (GPCRs) are pivotal regulators of numerous physiological processes and constitute a major class of drug targets, with over 500 approved therapeutics acting on a subset of these receptors. Despite their pharmacological relevance, many GPCRs, particularly orphan receptors, remain poorly understood, underscoring the need for advanced molecular tools to probe their function. Fluorescent ligands have emerged as indispensable assets in modern pharmacological research, providing high-sensitivity, real-time insights into receptor–ligand interactions through a variety of binding assays. When combined with advanced imaging platforms, especially super-resolution microscopy, these probes enable unparalleled spatial and temporal resolution of receptor localization, trafficking, and engagement in both *in vitro* and *in vivo* systems. Beyond mere detection, the rational design and application of fluorescent ligands facilitate a deeper mechanistic understanding of drug–target interactions and support the development of more selective and effective therapeutic strategies.

The design of effective fluorescent GPCR ligands, however, lacks a standardized protocol. Instead, successful probe development typically relies on iterative strategies informed by prior literature. Critical steps include a comprehensive assessment of available structural data, detailed pharmacological characterization, and structure–activity relationship (SAR) analyses and the available experimental 3D structures of the receptor–ligand complexes to guide ligand selection and identify modifiable positions. *In silico* docking studies further facilitate the rational design of linkers and the selection of appropriate fluorophore conjugation strate-

gies. Nonetheless, empirical testing of multiple linker–dye configurations is often necessary to optimize the photophysical and pharmacological properties of the resulting probe.

Our research team successfully designed and developed fluorescent molecular probes selectively targeting three pharmacologically relevant G protein-coupled receptors (GPCRs): the dopamine D₃ receptor (D₃R), the cannabinoid CB₁ receptor (CB₁R), and the muscarinic M₂ receptor (M₂R). These GPCRs are critically implicated in the pathophysiology and therapeutic modulation of numerous neurological and psychiatric disorders, including schizophrenia, major depressive disorder, and Alzheimer’s disease, as well as in pain signaling and inflammatory responses. Probe design was guided by structure-based *in silico* molecular docking to ensure optimal ligand–receptor interactions and suitable sites for fluorophore conjugation. The binding affinities of the synthesized compounds were quantitatively assessed through radioligand displacement assays.

Furthermore, the application of the super-resolution imaging technique *PharmacostORM* enabled nanoscale spatial localization of cariprazine, a clinically approved D₃-preferring antipsychotics. *In vivo* imaging revealed a highly selective accumulation of cariprazine at D₃ receptor-expressing granule cell axons in the islands of Calleja, while dopaminergic terminals remained largely unaffected. These findings underscore the potential of fluorescent ligands not only as tools for advanced receptor imaging but also for elucidating receptor-specific binding kinetics and supporting the development of more effective therapeutics.