

OTKA nyilvántartási szám: T 043576

ZÁRÓJELENTÉS

Témavezető neve: Dr. Hudecz Ferenc

A téma címe: Epitópok, illetve antimikrobiális hatású peptidek, peptidszármazékok célzott bevitele makrofág típusú sejtekbe.

A kutatás időtartama: 2003 - 2006 (4 év)

1. Kismolekulák, makromolekulák, biokonjugátumok szintézise:

1.1. Kismolekulák szintézise:

A kismolekulák három csoportját állítottuk elő. Szintetizáltunk potenciális kemotaktikus peptideket, B- illetve T-sejt epitópot tartalmazó lineáris illetve ciklusos peptideket, ezek optimalizált változatait, valamint szerkezetileg módosított hatóanyag molekulákat. Elkészítettük e vegyületek – amennyiben biológiai aktivitást mutattak – olyan származékait is, amelyek alkalmasak lehetnek biokonjugátumok létrehozására.

Előállítottunk olyan a citokinekben és receptoraikban található (W)SXWS, motívumot reprezentáló, az X-pozícióban glutaminsavat, tirozint, lizint, leucint és alanint tartalmazó karboxil C-terminálisú tetra- és pentapeptideket, valamint az X aminosavtól függően egysejtű rendszerben kemotaktikus vegyületek közül három N-terminálison Cys-t tartalmazó származékát.

Szintetizáltunk a *M. tuberculosis* 38 kDa illetve 16 kDa fehérjéből származó T-sejt epitópot tartalmazó peptideket, valamint a béta amiloid(4-10) epitóp peptidet illetve ezek N- illetve C-terminálison „lebegő régióval” vagy Cys-nel meghosszabbított származékait. Az epitóp-konjugátumokhoz előállítottunk olyan kismolekulák származékait, amelyekben a C- vagy N-terminálison pentaglicin egység kapcsolódik, illetve a B- és T sejt epitóp között Cys-Acp spacer szerepel. Szintetizáltunk olyan epitóptartalmú kismolekulákat, amelyekben az epitóp peptid N- és/vagy C-terminálisán 1-3 D-aminosav szerepel. Előállítottunk olyan ciklusos peptid epitópot tartalmazó vegyületeket, amelyekben a gyűrűt tioéter, diszulfid vagy amidkötéssel alakítottuk ki.

Szintetizáltunk *cis*-akonitilsav anhidriddel illetve négyszögsavval módosított antraciklin származékokat.

1.2. Makromolekulák, hordozók szintézise

Előállítottunk új, maleinsavanhidriddel módosított amfoter (EAK) elágazó láncu szintetikus polipeptidet. Módszert dolgoztunk ki és szintetizáltunk 5-(6-) carboxifluoreszcinnel jelzett polikationos, amfoter és polianionos polipeptidszármazékokat. Előállítottunk kemotaktikus hatást mutató tri-pentapeptid szekvenciákat oldalláncban illetve gerincben tartalmazó variánsokat. Előállítottuk a fluorofór tartalmú származékokat is. Meghatároztuk azt a minimális szubsztitúció fokot, amely már alkalmassá teszi e vegyületeket fluoreszcencia spektroszkópiai, áramlási citofluorimetriás és mikroszkópos vizsgálatok számára.

1.3. Konjugátumok szintézise

Módszert dolgoztunk tioéter kötést tartalmazó epitóp peptid-konjugátumaik szintézisére polikationos (SAK) illetve amfoter (EAK) elágazó láncu szintetikus polipeptid gerincet tartalmazó polipeptidekkel, valamint szekvenciális polipeptidekkel.

Előállítottunk és kémiaiailag jellemeztük olyan konjugátumokat, amelyekben elágazó láncu szintetikus polipeptidhez a) tioéter kötéssel B-sejt epitóp, T-sejt epitóp illetve Cys-Acp spacert tartalmazó B- és T sejt epitóp kiméra peptid vagy b) kemotaktikus sajátságú fMLF peptid kapcsolódik.

OTKA nyilvántartási szám: T 043576

Szintetizáltunk továbbá olyan konjugátumokat, amelyekben szekvenciális polipeptid hordozó (K-[TKPKG]4-amid) és négyszeres moláris arányban kemotaktikus oligopeptid (fMLF vagy fNleLF) van jelen. Elkészült egy olyan prototípus konjugátum is, amelyben egy katepszin érzékeny szekvenciát tartalmazó tetrapeptiden keresztül parazita (*Leishmania donovani*) ellenes hatású methotrexátot kapcsolódik a hordozóhoz. Tandem szintézissel előállítottunk olyan konjugátumot is, amelyben antibakteriális peptidhez célbajuttató oligopeptid kapcsolódik.

Szintetizáltunk továbbá olyan konjugátumokat, amelyekben a *M. tuberculosis* 38 kDa fehérjéből származó lineáris T-sejt epitóp peptid C-terminálison Cys-nel meghosszabbított származékát kapcsoltuk elágazó láncú, dendritikus illetve szekvenciális polipeptid hordozóhoz.

Előállítottunk olyan konjugátumokat, amelyekben oligoarginin célbajuttató peptidhez kapcsolunk metotrexátot illetve módszert dolgoztunk ki antraciklin antibiotikumok négyszógsav segítségével történő peptidkonjugálására.

Módszert dolgoztunk ki olyan konjugátumok szintézisére, amelyekben T-sejt epitóp peptidhez antituberculoikum kapcsolódik.

Módszert dolgoztunk több, szénhidrátszármazékot tartalmazó konjugátum előállítására vonatkozóan: szintetizáltunk muramyl-dipeptidet és amfoter elágazó láncú polipeptidet tartalmazó konjugátumot, valamint e vegyület biotinnal jelzett változatát.

2. A kismolekulák és konjugátumok analízise, szerkezetvizsgálat, hatás modelmembránokra:

A kismolekulák, oligopeptidek illetve konjugátumok kromatográfias tulajdonságainak jellemzésére RP-HPLC-t alkalmaztunk.

A vegyületek összetételét tömegspektrometriával (ESI és/vagy MALDI-FT-ICR) illetve aminosavanalízissel jellemeztük. Megvizsgáltuk, hogy a mátrix összetétele milyen hatást gyakorol a MALDI spektrum minőségére. Megállapítottuk, hogy a mátrixalkotó vegyületek mineműsége jelentősen befolyásolja a vizsgálandó peptidkeverékek komponenseinek azonosíthatóságát.

RP-HPLC módszert dolgoztunk ki a fluorofort tartalmazó polikationos, amfoter és polianionos polimer polipeptid konjugátumok kromatográfias jellemzésére. A módszer alkalmas volt a nem kovalensek kötött fluorofor-származék kimutatására is.

A herpes simplex D glikoproteinből származó epitóp peptid, valamint epitóp peptid-konjugátumok térszerkezetét NMR spektroszkópiával határoztuk meg. A béta-amiloid epitóp peptidet tartalmazó konjugátumok oldatbeli térszerkezetét CD spektroszkópiás módszerrel jellemeztük. Megállapítottuk, hogy a hordozó makromolekula térszerkezete alapvetően meghatározza a konjugátum CD spektrumait.

A fluorofor tartalmú konjugátumok összetételét, tulajdonságait spektroszkópiás módszerekkel részletesen jellemeztük.

Tanulmányoztuk különböző töltésű polipeptidek hatását eltérő DPPC/PG összetételű foszfolipid liposzómák fluiditására. Megállapítottuk, hogy a rövid oldalláncú amfoter vegyület kivételével a polipeptidek nem mutatnak kettős foszfolipid membrán destabilizáló hatást.

A *cis*-akonitilsav anhidriddel illetve négyszógsavval módosított antraciklin származékok kémiai stabilitásának pH-, hőmérséklet- és időfüggését vizsgáltuk.

3. A hordozó polipeptidek és konjugátumok funkcionális vizsgálata:

3.1. Kemotaxis, fagocitózis és "uptake" vizsgálatok

Jellemeztük az elágazó láncú szintetikus polipeptidek *in vitro* citotoxikus hatását J774 makrofág típusu sejtekre (koncentráció, kezelési idő függvényében). Megállapítottuk, hogy 1 órás inkubálás után a két erősen polikationos oldalláncú polimer - magas koncentrációban – volt toxikus.

Jellemeztük a W(SXWS) oligopeptidek, valamint a polipeptidek kemotaktikus viselkedését. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a vizsgált szintetikus polipeptidek egyike sem mutatott szignifikáns kemoattraktáns hatást. Repellensként egy (polikationos) vegyület viselkedett a vizsgált legtöményebb koncentrációban. A J774 sejteken FACS segítségével végzett „uptake” vizsgálatok

OTKA nyilvántartási szám: T 043576

szerint a jelzett elágazó láncu szintetikus polipeptidek többségét csak a legtöményebb (20 µg/ml) koncentrációban vették fel a sejtek számot tevő mértékben. Kivételt képeznek a vizsgált polikationos rövid oldalláncú vegyületek. A mikroszkópos felvételek szerint a vegyületet tartalmazó vezikulák már a kezelés utáni első percben megjelennek citoplazmában a sejt felszín közelében, 30 perc után pedig a citoplazma egész területén megtalálhatóak.

Jellemeztük az fMLF, valamint fNleLF oligopeptideket tartalmazó konjugátumok kemotaktikus viselkedését *Tetrahymena pyriformis* GL eukaryota modell rendszerben, valamint THP-1 monocitákon. Megállapítottuk, hogy a kemotaxis szempontjából neutrális makromolekulák az fMLF oligopeptid konjugálásra révén szignifikáns mértékű kemoattraktáns hatást mutatnak

Egészséges és knock out egerek segítségével tanulmányoztuk a scavenger receptorok szerepét elágazóláncú polipeptidek makrofágokba történő bejutásában. Bizonyítottuk, hogy az anionos illetve amfoter elágazó láncú polipeptidek egércsontvelő eredetű makrofágokba az A típusú scavenger receptoron keresztül jutnak be, a nagyobb negatív töltéssűrűségű makromolekulák felvétele kedvezményezett.

3.2. Epitóp prezentáció és immunválasz vizsgálata

Jellemeztük a B-sejt epitóp peptidet, valamint a B-sejt és T-sejt epitóp peptideket egyidejűleg tartalmazó konjugátumok kötődését epitóp-specifikus monoklonális ellenanyaghoz. Megállapítottuk, hogy a makromolekula kémiai tulajdonságai, valamint az epitóp orientációja jelentős mértékben befolyásolja az epitóp felismerését.

A D-aminosav tartalmú, valamint a ciklusos epitóppeptidek enzimatiszta stabilitását humán szérumban, valamint patkány máj lizoszóma preparátumban tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy a beépített D-aminosavak száma és pozíciója, valamint a ciklus kialakításához alkalmazott kötés típusa jelentősen befolyásolja a vegyületek lebomlását biológiai mátrixokban.

Jellemeztük a T-sejt epitóp peptidet tartalmazó konjugátumok hatását T sejtek proliferációjára illetve interferon gamma termelésére. Megállapítottuk, hogy a konjugált peptidek hatása - *in vitro* körülmények között - jelentősen megnő a szabad peptid hatásához képest. Megfigyeltük, hogy a konjugált peptidek hatását a hordozó szerkezete befolyásolja.

3.3. Antituberculotikus hatás vizsgálata

Több antibakteriális oligopeptid *M. tuberculosis* ellenes hatását vizsgáltuk *in vitro* H37Ra baktériumtörzs felhasználásával.

Ugyancsak tanulmányoztuk az *M. tuberculosis* 16 kDa fehérjéből származó epitóp peptid – konjugátum antituberculotikus, valamint T-sejt választ kiváltó képességét.. Meghatároztuk új izoniazid--konjugátumok MIC értékét (legkisebb koncentráció, amely az adott H₃₇RV baktérium törzs növekedését gátolja) A konjugátumok és a hordozók hatását (0,02- 0,32mg/l közötti koncentrációkban) vizsgáltuk Sula táptalajon.

Összegzés

A kutatás során számos olyan új vegyület készült el, amelyek segítségével tisztázni lehet epitóp peptidek és hatóanyagok célsejtbe (makrofágba) juttatásának szerkezeti illetve funkcionális feltételeit. Vizsgálataink fontos eredménye olyan biokonjugátumok előállítás volt, amelyekben az alkotórészek a kémiai kötés kialakítása után is megtartották biológiai funkciójukat (pl. T-sejt válasz indukció, ellenanyagfelismerés, antituberculotikus hatás). A nagyrészt nívós nemzetközi folyóiratokban közölt eredmények közül kiemelkedik annak a jelenségnek a leírása és sokoldalú bizonyítása, amely szerint a makrofágok polianionos szintetikus makromolekulák felvételére scavenger A receptort „használnak”. Kimutattuk, hogy efféle molekulához kovalensen kapcsolt riporter egység (fluorofor) bekerül a sejtbe. Ez a megfigyelés, valamint a kemotaxis alapú célbajuttatás jelenségének leírása lényegesek lehetnek makromolekulára alapozott célbajuttató rendszerek kifejlesztésében (makromolekula kiválasztás, intracelluláris kötés stabilitás stb.) és segíthetik új gyógyszerek kifejlesztését.