

ZÁRÓJELENTÉS: Szakmai beszámoló

Célkitűzések

A doktori iskolát átfogó pályázati projekt 6 kutatási irányt foglal össze:

1/ A neurodegeneratív betegségek közös pathomechanizmusának kutatása; racionális gyógyszertervezés

1.1. β -szekretáz és kalpain inhibitorok tervezése és szintézise.

1.2. β -amiloid (A β) peptidek aggregációja. β -szerkezetrombolók (BSB) tervezése és szintézise.

1.3. A β peptid aggregátumok kölcsönhatása membránfehérjékkel; az Alzheimer-kór pathomechanizmusa. Funkcionális A β -antagonisták tervezése és szintézise.

2/ A sejtmembránon áthaladó peptid vektorok szintézise, tervezése.

3/ A galektin-1 alkalmazása új immunoterápiában.

4/ Az allergiás betegségek molekuláris háttere.

5/ Új opioid peptidek tervezése, szintézise és radiojelzése.

6/ Peptid nukleinsavak szintézise és biológiai hatásának vizsgálata.

Mivel a 3 éves kutatási időszak alatt a szakirodalomban több új felfedezésről publikáltak más kutatócsoportok, az eredeti terveket néhány ponton módosítanunk kellett. Ezekre a változtatásokra mindig utaltunk a beszámoló szövegében.

Részletes szakmai beszámoló

1.1. Enzim inhibitorok tervezése és szintézise

Az amiloid proteinből (APP) β - és γ -szekretáz enzimek hatására keletkezik a neurotoxikus $A\beta$ 1-42. Mindkét enzim aszpartil-proteáz és inhibitoraik az Alzheimer-kór potenciális gyógyszerei. A β -szekretáz (BACE) inhibitorokat laboratóriumunkban számítógépes szimulációval terveztük (a BACE 3D szerkezete Rtg-diffrakciós analízisekből ismert). Négy új vegyületet állítottunk elő, ezek biológiai tesztelését a Richter Gedeon Rt. kutatói végezték el. A BACE-gátlók további tervezését és szintézisét lezártuk, a meglévő inhibitorok biológiai vizsgálatát végigvittük. Az új vegyületek közül nem találtunk kiemelkedően jó hatású enzimgátlót, így ezt a kutatási irányt lezártuk.

1.2. β -amiloid ($A\beta$) peptidek aggregációja. β -szerkezetrombolók

Az a konszenzus alakult ki a szakirodalomban, hogy a β -amiloid legtoxikusabb aggregációs formája a mozgékony, diffúzibilis oligomer, és kevésbé a fibrillum. A β -amiloid aggregációja oligomer \rightarrow protofibrillum \rightarrow fibrillum irányban egy hosszú, koncentrációtól függő folyamat. A következő vizsgálati módszereket alkalmaztuk: dinamikus fényszórási vizsgálatok (QLS), CD és FT-IR, Thioflavin-T adszorpciójának spektrofluorometriás mérése, NMR vizsgálatok és transzmissziós elektronmikroszkópia. Valamennyi vizsgálat azt igazolta, hogy az $A\beta$ 1-42 vizes oldatban 1-10 mikromólos koncentrációban szobahőn igen gyorsan aggregál. Az $A\beta$ 1-42 kizárólag tiszta trifluorecetsavban van monomer állapotban, még a trifluoretanol, hexafluor-izopropanol és a DMSO oldatában is tartalmaz oligomereket. Ha a szerves oldószeres $A\beta$ 1-42 oldathoz vizet adunk, azonnal megindul a protofibrillumok és fibrillumok képzése, ez a β -szerkezetek növekvő arányával kimutatható.

A β -amiloid kutatások legnagyobb problémája az $A\beta$ -oligomerek előállításának és egyértelmű jellemzése (molekulatömeg, konformáció, stb.). Sikerült Kiso és Sohma publikációja alapján egy olyan $A\beta$ 1-42 peptidet előállítanunk, amelyik a 26. helyen egy Ser-észterkötést tartalmaz és csak a pH bázikussá tételével (pH 7.0 fölött) O \rightarrow N acilezéssel alakul át a normális, peptidkötést

tartalmazó A β 1-42 monomerré. Így az A β 42 aggregációs folyamata jól kézben tartható és az oligomer aggregáció mindig meghatározható.

Sikerült olyan β -amiloid mintát előállítanunk, mely jelentős mennyiségű A β (1-42) oligomert tartalmaz. Az előállított oligomer-minták aggregációját szobahőmérsékleten 20 órás folyamatos méréssel követtük. Megvizsgáltuk, hogy az oligomer-mintához LPFFD-OH pentapeptidet 1:5 molarányban adagolva változik-e az aggregáció kinetikája. A DLS-, illetve TEM-mérések szerint az oligomerek aggregációját nem befolyásolja a hozzáadott pentapeptid; mindkét esetben hasonló méretű és morfológiájú aggregátumok keletkeznek: 4-7 nm átmérőjű és 30-100 nm hosszúságú protofibrillumok, illetve protofibrillumgombolyagok. A pentapeptid hozzáadása meggyorsította az A β 1-42 aggregációját. Az LPFFD OH és származékai tehát hatásukat tekintve nem β -szerkezetrombolók (BSB-k). A fiziológiás pH-hoz képest a savas pH csökkenti az oldhatóságot, míg a lúgos pH kedvez az oldódásnak. Annak ellenére, hogy az un. BSB-hatást nem sikerült igazolnunk, új peptidomimetikumokat terveztünk a neurotoxikus aggregátumok hatásának kivédésére. Összesen 75 peptidet és peptidomimetikumot terveztünk és szintetizáltunk a neurotoxikus peptid aggregátumok (elsősorban az A β 1-42) hatásának kivédésére. Ezek a vegyületek potenciális gyógyszerek, ezért az összes eddigi vegyületünkre szabadalmi védelmet kértünk.

Igazoltuk, hogy az un. vezérvegyület (lead) mellett 3 új peptidomimetikum is kiválóan véd az A β 1-42 neurotoxikus hatásai ellen. Ezek a vegyületek az Alzheimer-kór potenciális gyógyszerei. Ezek a vegyületek megkötődnek az A β 1-42 aggregátumok felszínén és beépülnek a fibrillumokba, ez által meggátolják a kölcsönhatást a membránfehérjékkel. Ezek gyógyszerre történő fejlesztése (ADME és toxicitás vizsgálatok, safety pharmacology) folyamatban van.

1.3. A β peptid aggregátumok kölcsönhatása membránfehérjékkel; az Alzheimer-kór pathomechanizmusa. Funkcionális A β -antagonisták tervezése és szintézise.

a/ Megvizsgáltuk a β -amiloid 1-42 (A β 1-42) aggregátumok neurotoxikus hatásának időgörbét, differenciált neuroblasztóma (SH-SY5Y sejtek) tenyészetén és patkány agy primer neuron kultúrában. Mindkét kísérlet sorozat azt bizonyította, hogy az A β 1-42 aggregátumok, nagy erővel kötődnek a sejtmembránokhoz. 20 perc után a neurotoxikus hatások irreverzibilissé

válnak. Specifikus antitestek alkalmazásával igazoltuk, hogy ennyi idő alatt az A β 1-42 aktiválja a GSK-3 β enzimet és megindul a tau-fehérje hiperfoszforilációja, ez a változás már irreverzibilis.

b/ Hipotézisünk szerint a jövőben azok a cink-kelátorok lehetnek az Alzheimer-kór jó gyógyszerei, amelyek normalizálják az agyban a Zn²⁺ koncentrációt. A vezikuláris cink (együtt ürülve a glutaminsavval) neuromodulátor szerepet tölt be. A cink metabolizmusának zavara, a nem megfelelő Zn²⁺ szint az agy adott területein a neurodegeneratív betegségek iniciálásának egyik rizikó faktora lehet. Mértük a hippokampális Zn²⁺ ürítés kinetikáját 96-lyukú fluoro-plate-readerrel. Az excitátoros aminosavak, pl. glutamát tartósan megnövelték a Zn²⁺ szintet a neuron citoplazmájában. Találtunk olyan Zn²⁺ kelátorokat, amelyek normalizálták a Zn²⁺ -szintet mind a citoplazmában, mind az extracelluláris térben, ezek az utóbbiak az Alzheimer-kór potenciális gyógyszerei. (A Zn²⁺ ionok túl magas koncentrációja az idegsejtek közötti résben veszélyes lehet, mivel igen gyorsan aggregálja és kicsapja az A β 1-42-t. Ennek ellensúlyozására szolgálnak a Zn-kelátoraink).

c/ *Funkcionális A β -antagonisták tervezése proteomikai adatok alapján.*

A fehérjék szelektív kölcsönhatása természetes reagáló partnereikkel a fehérjék megfelelő feltekeredtségének (folding) köszönhető. Az, hogy a fehérjék nem képesek megfelelő feltekeredtségi állapotba jutni, ill. abban maradni, számos patológiás állapotot eredményez. Az ún. „konformációs betegségek”-et bizonyos asszociátumokat képző, β -redőzött réteg szerkezetű (oligomer, ill. fibrillum), rosszul feltekeredett, ún. amiloid-típusú fehérjék felhalmozódása okozza. Az Alzheimer betegség is ebbe a patológiás csoportba tartozik, melynek során az A β (1-42) peptid képez fibrillumokat, ill. plakkokat, míg a Parkinson-kór esetében az α -synuclein, a II. Típusú diabetes esetében az amylin fehérje kóros konformációja a betegség feltételezett oka. Munkánk során azokat a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat kívántuk tanulmányozni, melyek a már kóros állapotban lévő fehérjék és agyi membrán-fehérjék között kialakulhatnak. Munkánk célja néhány amiloid-típusú fehérjével (a fibrilláris A β (1-42), a NAC (α -synuclein fragmentum), és az amylin) kölcsönhatásba lépő membránfehérjék azonosítása volt. Mind a három amiloid-típusú fehérje esetében hasonló vizsgálati módszert alkalmaztunk: először a fehérjéket „öregítéssel” fibrilláris állapotba hoztuk, majd membránfehérjékben dúsított agyi szimptoszóma –

preparátummal inkubáltuk. Megfelelő idő elteltével a fibrilláris fehérje-precipitátumhoz nem kötődött anyagokat eltávolítottuk, majd a koprecipitált fehérjéket proteomikai módszerrel azonosítottuk. Ennek során a fehérjéket redukció és alkilezés után tripszinnel emésztettük és a képződött peptidkeveréket LC/MS/MS-sel analizáltuk. A kapott adatokból a kötődött fehérjéket bioinformatikai eszközökkel határoztuk meg.

A fibrilláris A β (1-42) felszínéről 88 fehérjét azonosítottunk, melyek közül 40 mutatott specifikus kötődést. Ezek közül 20 bizonyult membránfehérjének. A specifikusan kötődött fehérjéket 6 csoportba soroltuk:

- 1, az Alzheimer kórral már kapcsolatba hozott fehérjék,
- 2, a citoskeletáris szerveződésben résztvevő fehérjék,
- 3, idegsejt adhéziós molekulák,
- 4, más neuronális membránfehérjék,
- 5, neuronspecifikus fehérjék,
6. mitokondriális fehérjék.

További kísérleteinkben széleskörűen vizsgáltuk a specifikusan kötődő gliceraldehid-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) kölcsönhatásait A β (1-42)-vel.

Az amylin és a szinaptoszóma membrán-preparátumok kölcsönhatásában 26 specifikusan kötődő fehérjét, míg a NAC esetében 15 specifikusan koprecipitált fehérjét tudunk azonosítani.

Az amiloid fibrillumokhoz kötődő fehérjék azonosítása lehetővé teszi az ún. „konformációs betegségek” mechanizmusának jobb megértését, valamint új terápiák kidolgozását is.

Eredményeinket felhasználva munkánk folytatásában az amiloid betegséggel szembeni új neuroprotektív vegyületek előállítását céloztuk meg. Korábbi adatok alapján bizonyos kis molekulájú peptidok az A β (1-42)-höz kapcsolódva megakadályozzák a fibrillumok képződését (beta-sheet-breaker peptidok). Feltételezésünk szerint a proteomikai módszerekkel azonosított, amiloid fibrillumokhoz kötődő fehérjékben lehetnek olyan közös, ill. hasonló peptidszekvenciák, amelyek a kötés kialakításáért felelősek. Ha léteznek ilyen közös szekvenciák, akkor ezek a kis peptidok nagy valószínűséggel jól kötődnek az amiloid fehérjékhez, s meg tudják akadályozni azok aggregációját. A közös szekvenciák felderítésére az SzTE Mesterséges Intelligencia

tanszékének két munkatársával számítógépes programot fejlesztettünk ki (PeptideSearch). A szoftver az algoritmikus megközelítést (successive approximation) alkalmazva meghatározta az Ab(1-42)-höz specifikusan kötődő 20 membránfehérjében azokat a rész-szekvenciákat (pentapeptidek), melyekben az egyes aminosavak előfordulási gyakorisága a legnagyobb:

Pozíció	1		2		3		4		5	
	AA	Gyakoriság %	AA	Gyakoriság %	AA	Gyakoriság %	AA	Gyakoriság %	AA	Gyakoriság %
Kontroll		35.6		25.3		19.7		28.9		23.7
	L	7.9	S	10.2	S	10.6	S	9.2	S	12
	S	7	E	8	A	8.3	L	9.1	A	8.6
	T	6.5	T	6.9	L	7.7	V	6.8	L	7.4
	R	5.8	L	6.4	T	7.3	A	5.8	V	6.1
	Q	4.9	R	6.2	V	6.6	G	5	E	5.3
A β -kötő		40		90		50		100		20
	E	10	K	5	A	15	A	0	V	20
	K	10	S	5	E	10	R	0	A	15
	T	10	A	0	R	5	N	0	Q	15
	A	5	R	0	G	5	D	0	S	10
	N	5	N	0	L	5	C	0	R	5

(Az eljárást, ill. a peptideket szabadalmaztatni akarjuk, ezért takartuk el a legnagyobb gyakoriságú aminosavakat.)

Ezen előfordulási gyakoriságok alapján pentapeptideket terveztünk, ezeket szilárdfázisú peptidszintézissel állítottuk elő, majd HPLC-vel megtisztítottuk. Az előállított 6 peptid közül kettő nagyon hatékonynak bizonyult: MTT-tesztben, kivédte az A β (1-42) által okozott sejtkárosodást. A két új neuroprotektív peptid fEPSP tesztben (*in vitro*), valamint *in vivo* elektrofiziológiai tesztben (NMDA által kiváltott maximális válasz) is hatékonynak bizonyultak. A két vegyületre alapozva megkezdtük különféle módosított származékok, illetve peptidomimetikumok tervezését és szintézisét. Eddig 20 vegyületet szintetizáltunk és 6 pentapeptidet terveztünk és elkezdtük az új vegyületcsoport szabadalmaztatását.

Több kutatócsoport összehangolt munkájával egy olyan új peptid-tevezési eljárást dolgoztunk ki, mely alkalmas lehet fehérjékhez történő „ragadós” szekvenciák kifejlesztésére.

2/ A sejtmembránon áthaladó peptid vektorok szintézise, tervezése.

A sejtmembránon áthaladó penetratin származékokat állítottunk elő és vizsgáltunk. Bizonyítottuk, hogy a peptid-konformáció (alfa-helix vagy β -redőzött réteg) nem játszik döntő szerepet a peptidek membránon történő penetrációjában. Több analógot szintetizáltunk és

vizsgáltunk, a 12-aminosavat tartalmazó analóg éppen olyan jó membránpenetrációs tulajdonságokkal rendelkezik, mint az eredeti 16 aminosavas penetratin. Maga a penetratin is rendelkezik önálló élettani hatásokkal és mint nukleáris lokalizációs szignál szerepel. A penetratin és a hozzá kapcsolt NF-kappaB oligopeptid biológiai-élettani kísérletekben (patkánykísérletek) jól védett a kolecisztokinin-indukálta hasnyálmirigy-gyulladás ellen, így egy új gyógyszerfejlesztés alapjául szolgálhat.

Azonosítottuk a kationos sejtpenetráló peptidek sejtbefutását segítő sejt felszíni molekulát. Kifejlesztettünk olyan antivirális peptideket, melyek a már említett sejt felszíni molekulához specifikusan kötődve gátolják a szintén kationos sejtkötő doménnel rendelkező vírusok (HCV, HIV stb.) sejtbefutását. A daganatos sejtek membránfehérjéinek összetételében bekövetkező specifikus elváltozásokat kihasználva olyan sejtpenetráló peptideket állítottunk elő, melyek képesek bizonyos daganatos sejteket szelektíven megcélozni.

Sikeresen lezártuk a kationos sejtpenetráló peptidek (SPP-k) sejtbe jutásának vizsgálatát. Az SPP-k proteoglikánokkal kialakított sejt felszíni kölcsönhatásaira utaló egyre növekvő számú saját és irodalmi adat figyelembe vételével kutatócsoportunk azt kezdte el vizsgálni, hogy mi a proteoglikánok szerepe az SPP celluláris internalizációjában. Kutatócsoportunk így talált rá a heparán szulfát proteoglikánok egy konzervált családjának képviselőjére, a syndecan-4-re, mely változatos térszerkezetű, polianionos PG oldalláncaival nagyszámú ligand receptorául szolgál. Kísérleteink megmutatták, hogy a syndecan-4, megkötve az SPP-ket, egy PKC- α által mediált endocitikus folyamat során internalizálódik, a sejtbe transzportálva az extracelluláris doménjéhez kötődő SPP-ket. A sejtbe jutott syndecan 4 a hozzákötött ligandokkal végül a sejtmagba jut és a sejtmag elkülönült részein feldúsul. A syndecan-4 transzporter tulajdonságait potenciális terápiás beavatkozásokra történő felhasználásra a kutatócsoport az „**Intracellular Targeting of Molecules**” címen, 2007. július 12-én benyújtott nemzetközi szabadalmi bejelentéssel védte le. A **PCT/IB2007/052787** számon bejegyzett nemzetközi szabadalmi bejelentés 2008. január 24-én vált publikussá, és a *World Intellectual Property Organization* honlapjáról elérhető:

http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?LANGUAGE=ENG&KEY=08/010162&ELEMENT_SET=F.

A szabadalmi bejelentés által lefedett kísérleti munka mellett kutatócsoportunk tovább folytatta a peptidek lehetséges terápiás vegyületeként történő *in vivo* felhasználását, az erre vonatkozó adatokat egy cikkben publikálta.

3/ A galektin-1 alkalmazása új immunoterápiában.

A galektin család (emberi β -galaktozid-kötő lektinek) tagjai közül a legmarkánsabb immunszabályozó funkcióval az egyik legkorábban megismert családtag, a galektin-1 (Gal-1), rendelkezik. Rendkívül hatásosan gátolja a gyulladásos és autoimmun betegségek klinikai és histopatológiai tüneteinek kialakulását, ezáltal egy új immunszuppresszív stratégiát szolgáltat a fenti immunkórképek gyógyításában. A Gal-1 a tumor metasztatikus hajlamának és agresszivitásának is kiváló diagnosztikus markere. A Gal-1 funkciója a malignus sejtekben részben az adhéziós tulajdonságok megváltoztatásának, részben és talán ez a fontosabb, a Gal-1 termelő rákos sejtek immunprivilegiumának, és így a tumorelles immunválasz gátlásának tulajdonítható.

Jelen ismereteink szerint a Gal-1 immunreguláló hatása az aktivált T-sejtek apoptózisának indukcióján alapul.

Vizsgáltuk a Gal-1 T limfocitákra gyakorolt apoptotikus hatásának molekuláris mechanizmusát, ennek eredményeit publikáltuk

Vizsgálataink során felvetődött a Gal-1 funkcionális fehérje szakaszainak azonosítása és annak lehetősége, hogy a Gal-1 funkciójával rendelkező szintetikus peptideket készítsünk.

A következő Gal-1 szekvenciából származó oligopeptideket készítettük el:

1. **N terminális, a dimerizációban szerepet játszó 15-mer peptidet: ACGLVASNLNLKPGE**
2. **Az N terminálishoz közeleső, de a dimerizációban szerepet nem játszó 19-mer peptidet: CLRVRGEVAPDAKSFVLNL**
3. **Az utóbbival átfedő rövid 8-mer peptidet: AKSFVLNL**

A szintetikus peptidek teljes Gal-1 szekvenciában elfoglalt helyét mutatja az alábbi ábra:

ACGLVASNLNLKPGECLRVRGEVAPDAKSFVLNLGKDSNNLCLHFNPRFNAHGDANTIV
CNSKDGGAWGTEQREAVFPFQPGSVAEVCITFDQANLTVKLPDGYEFKFPNRLNLEAIN
YMAADGDFKIKCVAFD

A peptidek vizsgálatakor kapott eredmények összefoglalva a következők:

1. Mindhárom peptid kötődik Jurkat sejtekhez, a kötő-receptor (a Gal-1 esetében is) ismeretlen.
2. Az AKNL peptid teljes mértékben, az ACGE peptid részben leszorítható teljes Gal-1 molekulával a sejtek felszínéről.

3. A CLNL peptid a sejtekhez való kötődés után internalizálódik (hasonlóan a teljes Gal-1 molekulához). (*R Fajka-Boja, A Blaskó, F Kovács-Sólyom, G J. Szabeni, GK Tóth, É Monostori. Endocytosis of galectin-1: a journey to Golgi apparatus mediated by GM1 containing vesicles. Submitted for publication*)
4. A peptidek biológiai hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a peptidek egyike sem okoz önmagában apoptózist, de Gal-1-gyel együtt alkalmazva módosítja a Gal-1 citotoxikus hatását: Az AKNL növeli, míg a CLNL és ACGE peptidek csökkentik a Gal-1 T sejtekre gyakorolt apoptotikus hatását. (*Légrádi Ádám: Regulation of t cell signaling by galectin-1 and lysophosphatidylcholine. Ph.D thesis*)

További új eredményeink:

- A CLNL peptiddel reagáló monoklonális ellenanyagot (MoAb) készítettünk, az immunizáláshoz **KLH-CLRVRGEVAPDAKSFVLNL** konjugátumot használtunk. A specifikus ellenanyagot termelő hibridóma klónokat ELISA tesztben választottuk ki a CLNL peptid és a teljes gal-1 fehérje felismerés alapján. A CLNL MoAb gátolja a gal-1 apoptotikus hatását, ami arra utal, hogy az ellenanyag a gal-1 és specifikus receptora közötti kölcsönhatást akadályozza.
- Affinitás mátrix készítése és alkalmazása. Az ACGE és CLNL oligopeptideket szilárd hordozóra, PEGA gyöngyökre szintetizáltuk és a gal-1 fehérjét Sepharose 4B mátrixhoz kapcsoltuk. Az affinitás hordozókkal Jurkat sejtek lizátumából izoláltuk a peptidhez és gal-1-hez kötődő fehérjéket. Az ACGE és CLNL peptidekhez, valamint a teljes gal-1 molekulához 46,5 kDa és 11,3-15,8 kDa körüli fehérjék kötődtek. Egy 55,8 kDa-os fehérje csak a CLNL- és gal-1-gyöngyökhöz kapcsolódott. A gal-1 affinitás mátrix a felsoroltakon kívül más polipeptidekhez is kötődött.

4/ Az allergiás betegségek molekuláris hátterének vizsgálata, hízósejt aktivációt gátló peptidomimetikumok tesztelése, hatásvizsgálata

Kimutattuk, hogy a komplement rendszerből származó C3a peptid gátolja a mukóza-típusú hízósejtek IgE-közvetített aktivációját, degranulációját. A gátló hatás létrejöttében az 56-64-es szekvencia szerepe döntő. Célul tűztük ki az aktív centrumnak tekinthető Asp-Cys-Cys-Asn-Tyr-Ile-Thr-Glu-Leu-Arg további térképezését. Az előállított vegyületek az Asp beta-karboxilja és egy ciklikus beta-aminosav segítségével képződő nyolctagú gyűrűs szerkezetet tartalmaznak. A biológiai vizsgálatok szerint a ciklohexán-karbonsav részt tartalmazó egyik izomer aktívabb a eredeti peptidszekvenciánál.

Célul tűztük ki a korábbi vizsgálataink szerint az aktív centrumnak tekinthető Asp-Cys-Cys-Asn-Tyr-Ile-Thr-Glu-Leu-Arg aktív konformációjának rögzítésével ill. a metabolizmus utak gátlásával olyan, konformációsán gátolt peptideknek illetőleg peptidomimetikumoknak a tervezését és szintézisét, amelyek képesek patológiás folyamatok gátlására. A 2006-ban előállított vegyületek bonyolult heterociklusos szerkezettel jellemezhetők.

A módosított peptidek tervezése és szintézise a következő eredményekre vezetett. A nyolctagú gyűrű kedvező téralkatának feltérképezéséhez elkészítettük a béta alaninból és L-aszparaginsavból álló oktaciklust tartalmazó analógot, a 2-amino ciklooktánkarbonsav két különböző izomerjével acilezett származékokat valamint az amino oxanorbornán karbonsavat és aszparaginsavat tartalmazó származékokat. Ez utóbbi alkalmas lehet retro Diels-Alder reakció után a korábbiakhoz hasonló, de a megfelelő helyen merev kettőskötést tartalmazó (dehidro béta alanin tartalmú) analóg előállítására.

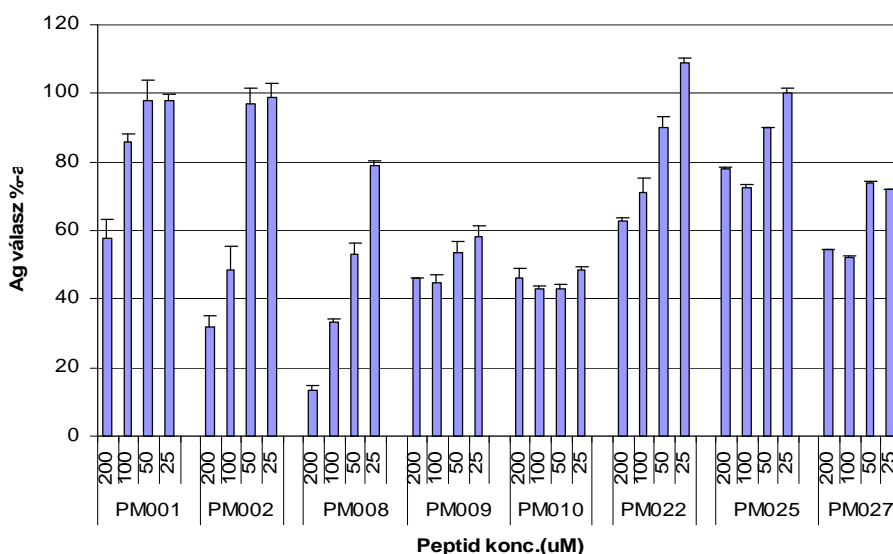
A biológiai vizsgálatokhoz a következő anyagokat, módszereket használtuk:

- RBL-2H3 patkány hízósejtvonalon végzett β -hexózáminidáz assay,
- Bazofil sejteken végzett citofluorimetriás mérés,
- Passive Systemic Anaphylaxis (PSA) vizsgálata egereken

A biológiai vizsgálatok eredményei a következők:

RBL-2H3 sejtek FcεRI-mediált aktivációjának gátlása peptidekkel

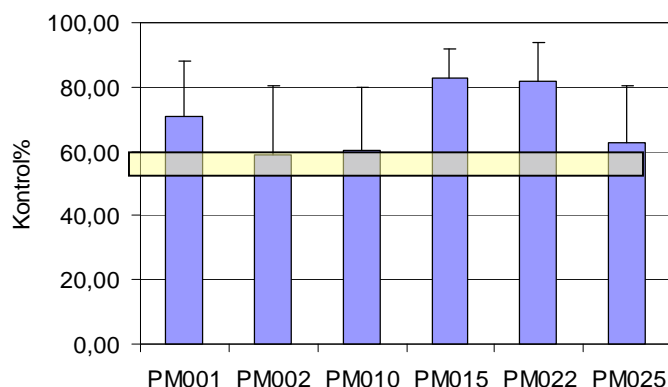
A vizsgált peptidek egy része viszonylag erőteljes gátlást gyakorol a sejtek aktiválhatóságára és a hatása koncentráció függő.



1.1. ábra Peptidek és peptidomimetikumok hatása IgE-vel szenibilizált RBL-2H3 sejtek antigénre adott válaszára

Humán bazofil leukociták FcεRI-mediált aktivációjának gátlása peptidekkel

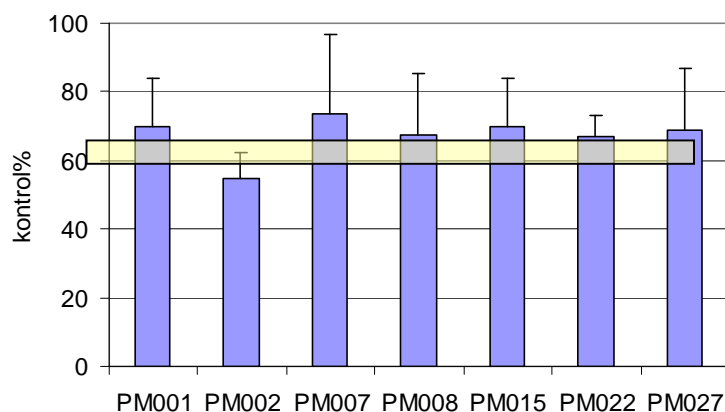
Vizsgáltuk a peptidek illetve peptidomimetikumok hatását egészséges donorok véréből származó bazofil sejtek *in vitro* anti-FcεRI-gyel történő aktiválása során is. Az ábrán azokat a peptideket illetve peptidomimetikumokat tüntettük fel, amelyek hatásosnak bizonyultak a bazofil sejtek aktivációjának gátlása során.



1.2. ábra Különböző peptidekkel és peptidomimetikumokkal való *in vitro* előkezelés hatása a vizsgált donorok anti-FcεRI-gyel stimulált bazofil sejtjeinek aktivációjára;

A peptidek hatásának vizsgálata in vivo modellrendszerben, PSA módszerrel

Az egereken végzett kísérletek során anti-DNP IgE-vel szenzibilizált Balb/c egerekben DNP-HSA-val kiváltott vér-hisztamin koncentráció-változását mértünk. A peptidekkel illetve peptidomimetikummal történő előkezelés több esetben hatékonyan gátolta az allergiás reakció kialakulását.



1.3. ábra A különböző peptidek illetve peptidomimetikumok hatása *in vivo* rendszerben

A három különböző rendszer vizsgálata során nem pontosan ugyanazok a peptidek illetve peptidomimetikumok bizonyultak hatásosnak, ami a vizsgált rendszerek nagyfokú különbözőségével magyarázható (három vizsgált faj, *in vitro-in vivo* mérések), mindazonáltal találtunk olyan peptideket, amely mindhárom vagy legalább két rendszerben gátló hatásúnak bizonyultak.

Korábbi adatainkra támaszkodva (J.Immunol., 2005, 175: 2801-2806), melyek szerint a PLC γ -2 foszforilációját is csökkenti bizonyos peptidekkel való előkezelés, megvizsgáltuk, hogy a különböző citokinek expressziójára hogyan hat a leghatékonyabb gátló szekvencia. Eredményeink szerint a **DCCNYITR** peptid egyaránt gátolja az IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 és a TNF- α szintézisét.

A vizsgált és hatékonyan talált peptidek a következők: Aoc-DNYITR DCCNYITR (diszulfidhíd a vicinális ciszteinek között) *cisz*-Acpc-DNYITR, *transz*-Achc-DNYITR (RR) *transz*-Achc-DNYITR (SS)

5/ Új opioid peptidek tervezése, szintézise és radiojelzése.

Az endomorfinok (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂ és Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) 16 új, Pro² helyett aliciklikus β-aminosavakat (*cisz/transz*-2-aminociklopentán, ACPC ill. ciklohexán karbonsav, ACHC) tartalmazó származékát állítottuk elő SPSS-sel. A β-aminosav konfigurációját a peptidekben savas hidrolízist követően az aminosav keverékből tetra O-acetil glükopiranozil-izotiocianát reagenssel való derivatizálással, majd analitikai HPLC-vel királis aliciklusos β-aminosav standardokkal való összehasonlítással határoztuk meg. A *cisz*-ACPC//ACHC-t tartalmazó endomorfinok konformációját NMR és molekulamodellelési módszerekkel is vizsgáltuk. A vegyületek biológiai aktivitását radioligand kötési és G-fehérje aktivációs kísérletekkel vizsgáltuk patkány agy homogenátumban. Megállapítottuk, hogy a *cisz*-(1*S*,2*R*)-konfigurációjú származékok az alapvegyületekhez hasonló, vagy kismértékben megnövekedett affinitással kötődő μ-opioid receptor agonisták, amelyek emellett extrém proteolitikus stabilitással rendelkeznek, ezért mind *in vivo* vizsgálatokhoz, mind a μ-receptorok bioaktív konformációjának vizsgálatára kiváló eszközök lehetnek. Az 1*R*, 2*S* konfigurációjú származékok nagyságrendekkel kisebb affinitásúak. A *transz*-(1*S*,2*S*)ACPC/ACHC-t tartalmazó endomorfinok affinitása jelentősen lecsökkent. [³⁵S]GTPγS funkcionális kísérletek a kiválasztott vegyületek agonista/parciális agonista természetét igazolták. Vizsgálatainkból azt a következtetést vontuk le, hogy a konformáció illetve kiralitás meghatározó az endomorfinok biológiai aktivitása szempontjából.

A biológiai vizsgálatokat követően kiválasztottuk a legjelentősebb és proteolitikus enzimekkel szemben ellenálló analógokat és azokat radioaktív formában is előállítottuk. A [³H]Tyr-(1*S*,2*R*)ACPC-Phe-Phe-NH₂ és a [³H]Tyr-(1*S*,2*R*)ACHC-Phe-Phe-NH₂ kötődésének részletes kinetikai, telítési és kompetíciós mérésével megállapítottuk, hogy mindkét új radioligand nagy affinitással és szelektivitással jelöli a patkány agyi μ-opioid receptorokat. A két új radioligand kiváló eszköz lehet a μ-receptorok bioaktív konformációs vizsgálatában.

Új tríciummal jelzett δ-opioid antagonistákat (³H-Tyr-Tic-(2*S*,3*R*)βPhe-Phe, Dmt-Tic-(2*S*,3*R*)βPhe-Phe) és nem peptid természetű μ-opioid agonistát (metoximetopon) is előállítottunk. Biokémiai tesztekkel patkány- és egér agyi membránokban részletesen jellemeztünk a [³H]Tyr-Tic-(2*S*,3*R*)βMePhe-Phe-OH radioligandot. Receptorkötési kísérletekkel megállapítottuk, hogy az új ligand az alapvegyületnél nagyobb affinitást mutató enzimrezisztens δ-opioid peptid antagonist.

Receptor autoradiográfiás kísérletekkel feltérképeztük az új ligand kötőhelyeit, amely megfelel a δ -receptorok ismert regionális megoszlásának patkány és egér agyban. Specifitását azzal is igazoltuk, hogy δ -receptor knock-out egér agyban nem találtunk kötődést. Fájdalomtesztekben az új ligand a hipotetikus δ -1 opioid receptor altípusra specifikusnak bizonyult, amelyet [^{35}S]GTP γ S funkcionális és kötési tesztekkel rekombináns receptorokat expresszáló sejtvonalak segítségével vizsgálunk. A radioaktív ligandjaink közül néhány (Dmt-Pro-Phe-Phe-NH₂, Tyr-(1S,2R)ACPC/ACHC-Phe-Phe-NH₂ és metoximetopon) kereskedelmi terméké fejlesztettünk.

6/ Peptid nukleinsavak szintézise és biológiai hatásának vizsgálata.

1/ Regioszelektív szintézist dolgoztunk ki alkil-(guanin-9-il)acetátok előállítására guanozinból kiindulva. A szintézisek során keletkező alkil-(guaninil)acetátok 7-es és 9-es regioizomerjei jellemzésre a korábban általunk kidolgozott ¹³C NMR ill. ¹⁵N NMR módszerek mellett egy új, tömegspektrometriás eljárást közöltünk, ami az egyes izemerek eltérő ionizációs képességén alapszik. Eljárást dolgoztunk ki diszulfidhíddal összekötött oligonukleotid-peptid konjugátumok előállítására.

2/ Új, konformációsán gátolt, királis azetidín-nukleinsavak (ANS) előállítására végzett vizsgálataink keretében királis biciklusos izoxazolidinét állítottunk elő. Sikerült olyan reakciókörülményeket találnunk, amelyben a lehetséges négy diasztereomerből csak egyetlen képződik a *D-gliko* ill. a *D-galakto* sorban. Egyetlen 8-benziloximetil-3,4,5-tribenzoiloxi-9-oxa-1-azabicyclo[4.2.1]nonán diasztereoizomert nyertünk 2-(benziloxi)acetaldehid és egy metil-alfa-D-glükopiranozidból származó omega-telítetlen hidroxilamin segítségével 1,3-dipoláris cikloaddíción. Az analóg reakció metil-D-galaktopiranozidból és metil-glioxiláttól 3 : 1 arányban szolgáltatott két diasztereomert. Egy másik megközelítésben konformációsán gátolt alfa, beta-diaminosavakat állítottunk elő ugyancsak nitronok cikloaddícións reakciója segítségével. Egy védett szerinálból képzett nitron cikloaddícións reakcióját vizsgáltuk metil-akriláttal. A keletkezett diasztereomer elegyet elválasztottuk, további funkcióscsoport-átalakításokkal pirrolidinil-glicinét készítettünk, amelyeket további PNS-analógok előállítására kívánunk felhasználni.

3/ Eljárást dolgoztunk ki diszulfidhíddal összekötött oligonukleotid-peptid konjugátumok előállítására.

4/ 3- és 5-szubsztituált 6-aminouracilok és natív nukleobázisok duplex és triplex szerkezetekben lehetséges hidrogénhid-kötéseit vizsgáltuk elméleti módszerek segítségével. Öt potenciális duplexet és öt triplexet találtunk, hét dimerben elágazó hidrogénhid-kötéseket észleltünk, amelyek további stabilizációt okoznak.

5/ Egy másik megközelítésben konformációsán gátolt α,β -diaminosavakat állítottunk elő ugyancsak nitronok cikloaddíciós reakciója segítségével. Egy védett szerinálból képzett nitron cikloaddíciós reakcióját vizsgáltuk metil-akriláttal a Zaragozai Egyetemmel folytatott együttműködésünk keretében. A keletkezett diaszteromer elegyet elválasztottuk, a domináns izoxazolidin diasztereomerből pedig további funkcióscsoport-átalakításokkal pirrolidinil-glicineket készítettünk, amelyeket további PNS-analógok előállítására kívánunk felhasználni.

6/ Peptidek kapilláris elektroforézissel kombinált tömegspektrometriás vizsgálatát megkönnyítő eljárást dolgoztunk ki, amelyben bróm-tartalmú tiazólium- és piridínium-sókkal jelöltük meg a peptidek tiol- és aminocsoportjait és a keletkező ionos vegyületek fragmentációs képének a vizsgálatával aminosav-sorrendet tudunk megállapítani.

7/ Savérzékeny foszforamiditek pontos molekulatömegmérésére új eljárást dolgoztunk ki, amelyben a foszforamiditek lítium-kloriddal, poli(etilén-glikol)lal és más polimer standardokkal képzett komplexeit használtunk fel.

8/ Eredményeinket 8 hazai ill. nemzetközi konferencián ismertettük és 10 publikációnk jelent meg 2005-2008-ban.