

„Peptid-út”: a Trefort-kerttől Lágymányosig

HUDE CZ Ferenc ^{a,b*}

^aELTE Szerves Kémiai Tanszék, Pázmány Péter sétány 1A, H-1117 Budapest, Magyarország

^bMTA – ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Természettudományi Kar, Kémiai Intézet, Pázmány Péter sétány 1A, H-1117 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A székfoglaló előadás – rendhagyó módon – egy sajátos utazás egyes állomásait villantja fel. Ez az utazás az ELTE TTK Trefort-kertben, tudományos diákköri hallgatóként a Szerves Kémiai Tanszéken kezdődött (1975) és a Kar költözésével (1989) már az ELTE lágymányosi kampuszán folytatódott/folytatódik. A „peptid-út” egyes állomásait jelzik a MTA-ELTE Peptidkémiai kutatócsoportban, a Szerves Kémiai Tanszéken és külföldi laboratóriumokban (Prága 1978, Philadelphia 1983-84, Nottingham 1988-89, majd Kumamoto 1991-92, Kalkutta 1995, London 1997, Konstanz 1999 és Osaka 1999-00) elért eredményeket bemutató a tudományos közlemények (<http://vm.mmt.hu>), a tudományos fokozatok (1980, 1986, 1993). Mindezek kiváló mesterek, elkötelezett munkatársak, diákok és kutató partnerek hatékony, multidiszciplináris együttműködését dicsérik.

A peptidkémiai tárgyú kutatások ma már egyre inkább lehetővé teszik, hogy e vegyületek segítségével megérthessük egyes fehérjék működését, e molekulák és sejtek közötti kölcsönhatások természetét, szerkezeti feltételeit. E felismerések alapján lehetőség nyílik arra, hogy az orvosi - terápiás és/vagy diagnosztikai – gyakorlatban is alkalmazható vegyületek (biológikumok) megjelenjenek a gyógyászatban. A következőkben a kutatócsoport két területen elért eredményeit tekintem át – a teljesség igénye nélkül.

A fehérjék immunválasz kiváltásáért felelős szakaszainak (antigéndeterminánsok, epitópok) azonosítása jelentős mértékben segíti a mesterséges vakcinák, illetve az immunrendszerben működő felismerésen (pl. ellenanyag – antigén, sejt – antigén) alapuló szintetikus diagnosztikumok kutatását.^{1,2,3} A fehérjék antigén-szerkezetének ismertetésében felvetődik az elméleti probléma: hogyan lehet olyan kémiai struktúrákat megtervezni és létrehozni, amelyeket az immunrendszer akár természetesnél is „kedvezőbb” módon ismer fel. A kutatás során olyan molekulákat, peptideket és peptid-konjugátumokat kívánunk kialakítani, amelyek alkalmasak lehetnek biztonságos és hatékony vakcinaként működni, megfelelő erősségű és specificitású immunválaszt indukálnak, és védelmet alakíthatnak ki például bizonyos tumoros megbetegedések, vírus- vagy parazita fertőzéssel szemben. E peptid-származékok – szerkezetüktől függően – alkalmasak lehetnek egyes betegségek (például herpesz simplex vírus, tumor, autoimmun betegségek, allergia) korai kimutatására, és/vagy a kezelés hatékonyságának monitorozására.^{4,5,6}

A kutatás másik iránya azt vizsgálja, milyen feltételek teljesülése szükséges ahhoz, hogy egy hatóanyag (pl.

gyógyszer) molekula az érintett (cél)sejtbe jusson úgy, hogy egyidejűleg ne veszélyeztesse az egészséges sejteket. A molekulaszervezet és a „célbajuttató” sajátság közötti összefüggések feltárása során egyfelől meg kell ismerni a célsejt (pl. tumorsejt, vagy fertőzött sejt) és az egészséges sejtek közötti szerkezeti, működésbeli különbségeket. Másfelől olyan új molekulákat kell tervezni, szintetizálni, amelyek jellemzően a célsejtekben fejtik ki hatásukat. Ilyenek lehetnek azok a biokonjugátumok, amelyek – egyszerű esetben – két alkotórészből állnak: az egyik komponens olyan peptid vagy fehérje, amely képes kötődni a „célsejt” felszínén elhelyezkedő, membránba ágyazódott, kizárólag vagy döntő mértékben a célsejtre jellemző struktúrákhoz. A másik alkotórész a sejt elpusztítására – kis mennyiségben is – képes hatóanyag. A kutatás célja e két alkotórész „megtalálása”, kiválasztása és annak kikísérletezése, hogy az egymáshoz kapcsolás (konjugálás) során mely molekularészt lehet a másikhoz úgy kapcsolni, hogy egyik partner se veszítse el funkcióját (célfelismerés vs sejtpusztítás).^{7,8,9}

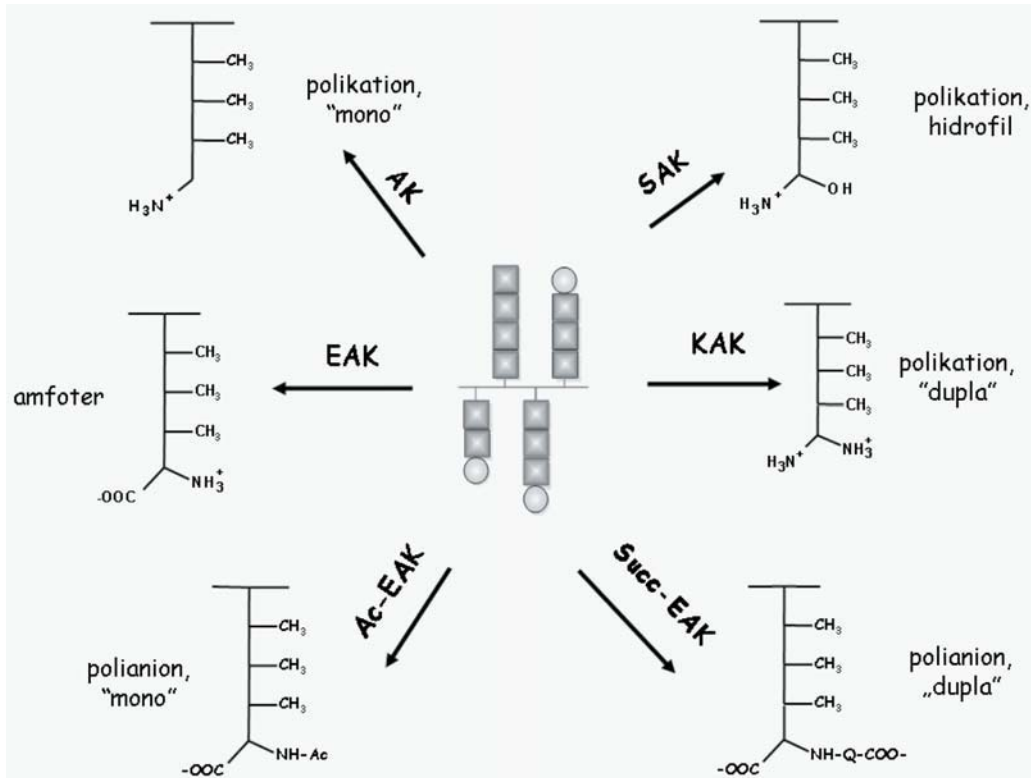
2. Elágazó láncú polipeptidok

A kutatás első szakaszában egy olyan polipeptid molekula család kialakítására törekedtünk, amelynek segítségével egyrészt tanulmányozni lehet a primer struktúra (aminosav sorrend, aminosav összetétel) és a térbeli elrendeződés (oldatbeli konformáció) közötti összefüggéseket, másrészt a kémiai szerkezet befolyásoló hatását funkcionális, releváns biológiai sajátságokra.

Az általunk választott, polimer típusú polipeptidekben a polilizin gerinchez különböző felépítésű, rövid peptid-oldalláncok kapcsolódnak (1. ábra). Az oldalláncvégi aminosavak megválasztásával létre lehetett hozni, olyan vegyületeket, amelyek – monomerenként – egy vagy két pozitív töltést (AK vagy KAK), egy pozitív és egy negatív töltést (EAK), egy vagy két negatív töltést (Ac-EAK vagy Succ-EAK) hordoznak és ennek megfelelően rendre polikationként, amfoter vegyületként illetve polianionként viselkednek vizes közegben.^{10,11,12}

Ezen új vegyületcsalád szintézisét, kémiai jellemzését követően bizonyítottuk az enzimatisz lebonthatóságot. CD spektroszkópiai vizsgálatok alapján észrevételeztük, hogy a láncvégi aminosavak mineműsége – a töltés mellett – meghatározó az oldatbeli térszerkezetre nézve: alifás, aromás oldalláncú aminosavak (pl. Leu, Phe) jelenléte a terminálison rendezett polypeptid konformációt hoz létre, míg az amfoter Glu azonos pozícióban rendezetlen térszerkezetet eredményez – azonos körülmények között (2. ábra). Az oldalláncvégi aminosav mineműsége

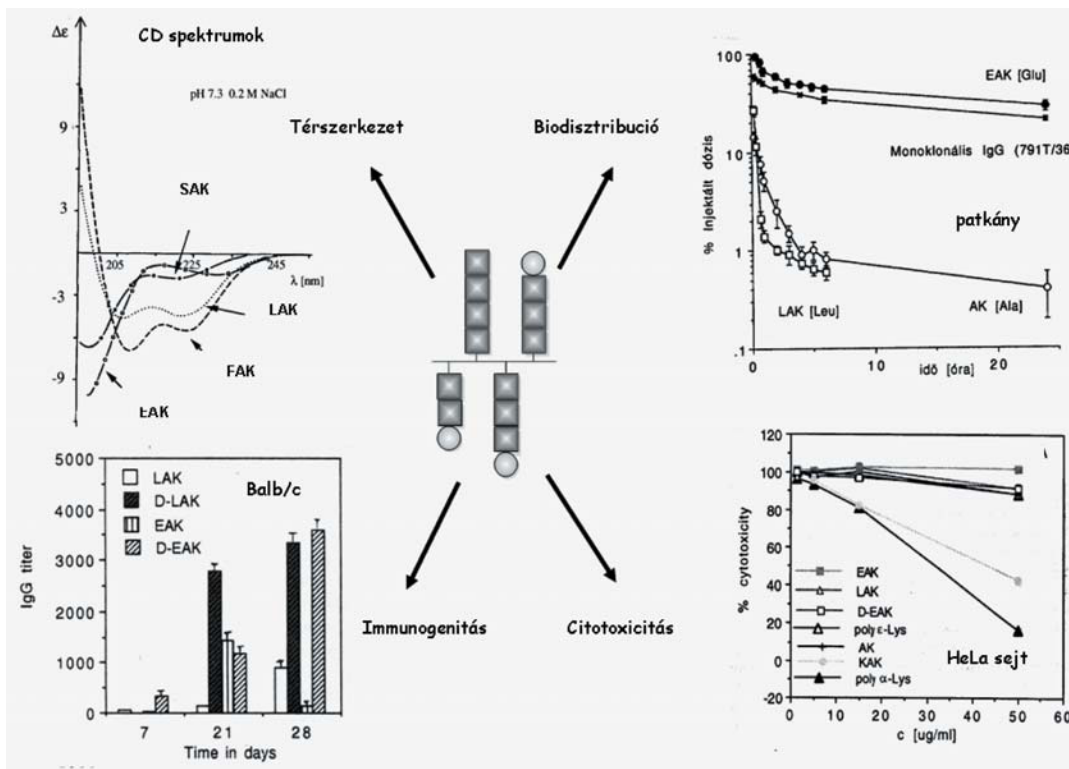
*A dolgozat Hudecz Ferenc az MTA levelező tagja 2011. szeptember 21.-én tartott akadémiai székfoglaló előadásának alapján összeállítva.



1. Ábra. Elágazó lánccú, polilizín gerincű polipeptidok sematikus szerkezete, ahol A = Ala, K = Lys, E = Glu, S = Ser.

(pl. hidrofobicitása) és a molekula töltésviszonyai meghatározóak a polipeptid foszfolipid modelmembránon kifejtett aktivitásában, az átjárhatóságban. Egereken végzett kísérletek bizonyították a töltés kiemelt szerepét a

keringésben töltött időre illetve biodisztribúcióra nézve. A lánccvégi aminosavak konfigurációja ugyancsak jelentősen befolyásolja a vegyület immunválaszt kiváltó képességét. Ugyanakkor ezen polipeptid család tagjai nem mutattak citotoxikus hatást in vitro.^{13, 14, 16}



2. Ábra. Elágazó lánccú, polilizín gerincű polipeptidok tulajdonságai, a primer szerkezet és az oldatbeli térszerkezet (CD spectrum), az biodisztribúció (jelenlét a vérkeringésben), az in vitro citotoxicitás HeLa sejteken és az immunogenitás Balb/c egereken közötti összefüggés. A = Ala, K = Lys, E = Glu, S = Ser, F = Phe, L = Leu.

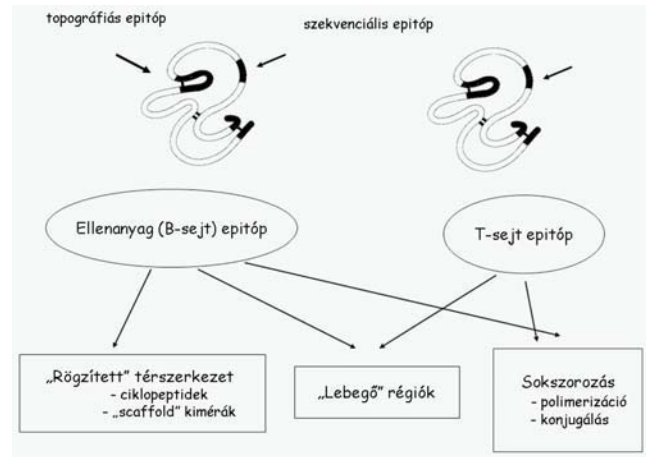
Funkcionális (biológiai) szempontból e szakaszok (epitópok, antigéndeterminánsok) kétféleképpen lehetnek: az egyik csoportban tartoznak azok a 8-13 aminosavból álló fehérjerészletek, amelyeket a T-sejtek ismernek fel, mégpedig a fehérje enzimatisz feldarabolódását követően (T-sejt epitópok). A másik csoportba sorolhatók azok a fehérjeszégmensek, amelyek az ellenanyag molekulához kötődnek (ellenanyag- vagy B-sejt epitópok). Szerkezeti szempontból az epitópok, lehetnek "szekvenciális" (egymásutáni aminosavrészek által meghatározott) illetve topográfias (térben egymáshoz közeli aminosavrészek által meghatározott) antigéndeterminánsok. Érdeemes megjegyezni, hogy a T-sejt epitópok az előbbi csoportba tartoznak, míg a B-sejt epitópok lehetnek ilyenek és olyanok is. Munkánk során az „átfedő” és/vagy „csökkenő hosszúságú” peptid-stratégia együttes alkalmazásával, és az általunk kidolgozott „kombinatorikus kémiai” megközelítés segítségével^{20,21} (4. ábra) az elmúlt évtizedek során hozzájárultunk a herpesz szimplex vírus egyik burokfehérje,²² a tumoros elváltozás kimutatásában fontos szerepet játszó mucin-1²³ és mucin-2²⁴ fehérjék, illetve a *M. tuberculosis* baktérium egyes proteinjeinek antigénszerkezetének meghatározásához.²⁵

4. Epitóp peptid, szintetikus immunogének, antigének

Az előzőekben leírt elméleti-predikciós stratégia és kísérletes megközelítések segítségével azonosított fehérjeszakaszok (epitópok) szekvenciája alapján – elsősorban szilárd fázisú szintézissel – oligopeptideket, ezek származékait és konjugátumait állítottunk elő.

Ezekkel a szisztematikusan módosított szerkezetű peptid epitóp vegyületekkel (pl. gyűrűbe zárt, sokszorozott, vagy a lebegő szakaszokkal átalakított) tisztázni kívántuk, hogy az immunfelismerés hatékonyságának (ellenanyag-kötődés, MHC- illetve T-sejt receptor kötődés illetve immunválasz kiváltása) megőrzése /javítása mellett, milyen lehetőség nyílik más, releváns tulajdonságok (pl. védelem a gyors enzimatisz lebomlás ellen) kialakítására. E kísérletekhez topográfias vagy szekvenciális ellenanyag (B – sejt) illetve

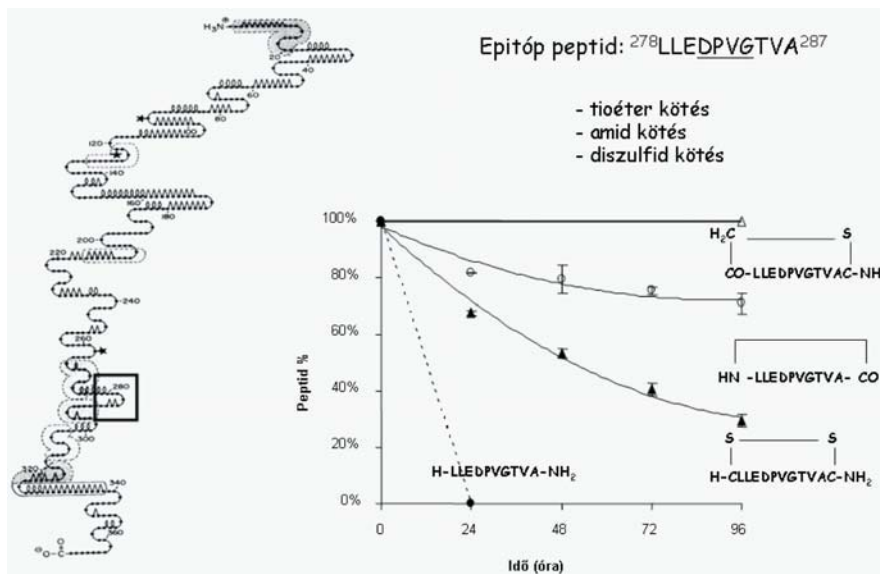
szekvenciális T-sejt epitóp peptideket választottunk (5. ábra).



5. Ábra. Szekvenciális és topográfias ellenanyag (B-sejt), valamint T-sejt epitópot tartalmazó peptidok szerkezetének módosításának lehetőségei.

A herpesz szimplex (1-es típus) D glikoprotein fehérje (HSV gD-1) N-terminális szakaszán lokalizált ⁹LKMADPNRFRGKDL²² szakasz B-sejt epitópként viselkedik és – röntgen kristallográfiai adatok alapján – béta-kanyar másodlagos szerkezetet vesz fel receptor kötődése során. Ezen megfigyelések alapján elkészítettük e szekvenciának megfelelő peptidet, valamint a 11-es és 20-as pozícióban szereplő aminosavak megfelelő cseréjével kialakított, kétféle ciklusba zárt változatát. A lineáris peptidhez képest a ciklusos peptidok ellenanyagkötődése három nagyságrenddel csökkent.²⁶

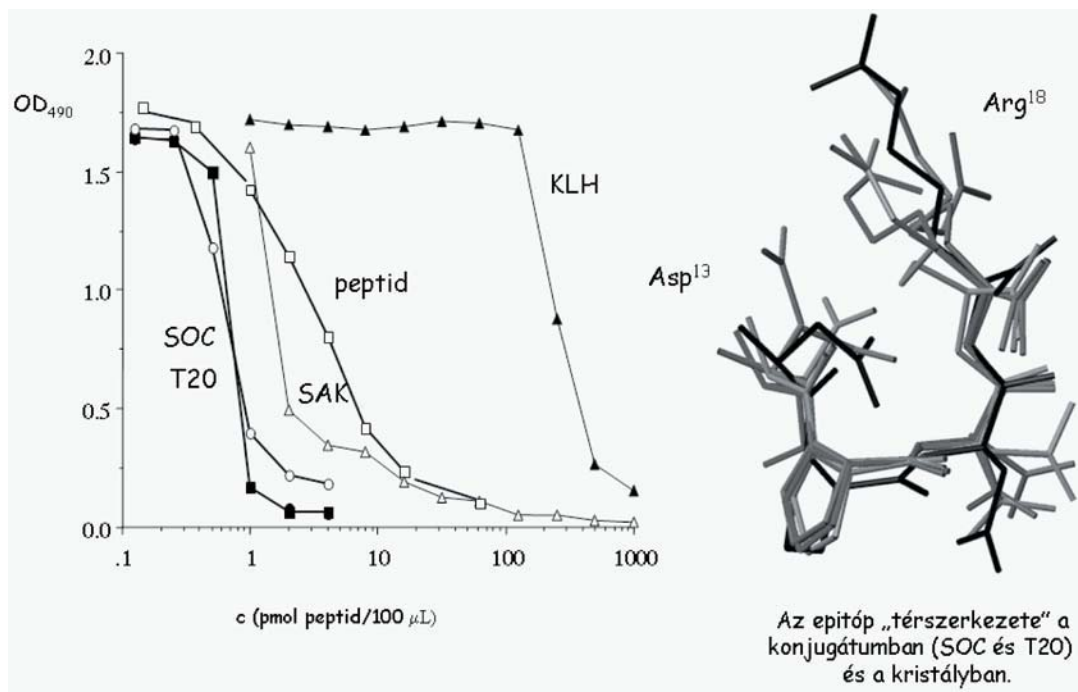
Ugyanakkor ciklusos szerkezet létrehozásával kedvezően lehetett befolyásolni az epitóp peptid enzimatisz lebomlását lizoszóma preparátumban. A fenti fehérje egy másik részén azonosított epitóp szakaszt tartalmazó peptid (²⁷⁸LLED²⁸⁷PVGTVA²⁸⁷) ciklusos származékai a ciklust létrehozó kovalens kötés mineműségétől függően jóval nagyobb stabilitást mutattak, mint a lineáris változat: tioéter > amid > diszulfid kötés (6. ábra).²⁷



6. Ábra. A HSV gD-1 fehérjén azonosított epitóp szakaszt tartalmazó peptid (²⁷⁸LLED²⁸⁷PVGTVA²⁸⁷) tioéter, amid vagy diszulfid kötésű ciklusos származékai. A lineáris és a ciklusos származékok stabilitása patkány lizoszóma preparátumban.

A lineáris B-sejt epitóp peptidok illetve a T-sejt epitópot tartalmazó peptidok sokszorozása előnyösen befolyásolhatja az ellenanyag^{28,29} illetve T-sejt³⁰ felismerést. A HSV gD-1 fehérje epitópot tartalmazó ⁹LKMADPNRFRGKDL²² peptid és makromolekuláris hordozóhoz kapcsolt származékai (konjugátumok) ellenanyagkötődése jelentősen

eltért egymástól. A hordozó szerkezetétől függően - azonos szubsztitúció fok mellett - a kötődés mértéke egy nagyságrenddel javult (pl. szekvenciális oligopeptid vagy elágazó láncú Leu tartalmú polipeptid alkalmazásakor) vagy akár két nagyságrenddel csökkent (pl. KLH fehérje hordozó esetén).^{28,29}



7. Ábra. A HSV gD-1 fehérjén azonosított epitóp szakaszt tartalmazó peptid (²⁷⁸LLEDVPGTVA²⁸⁷) tioéter, amid vagy diszulfid kötésű ciklusos származékai. A lineáris és a ciklusos származékok stabilitása patkány lizoszóma preparátumban.

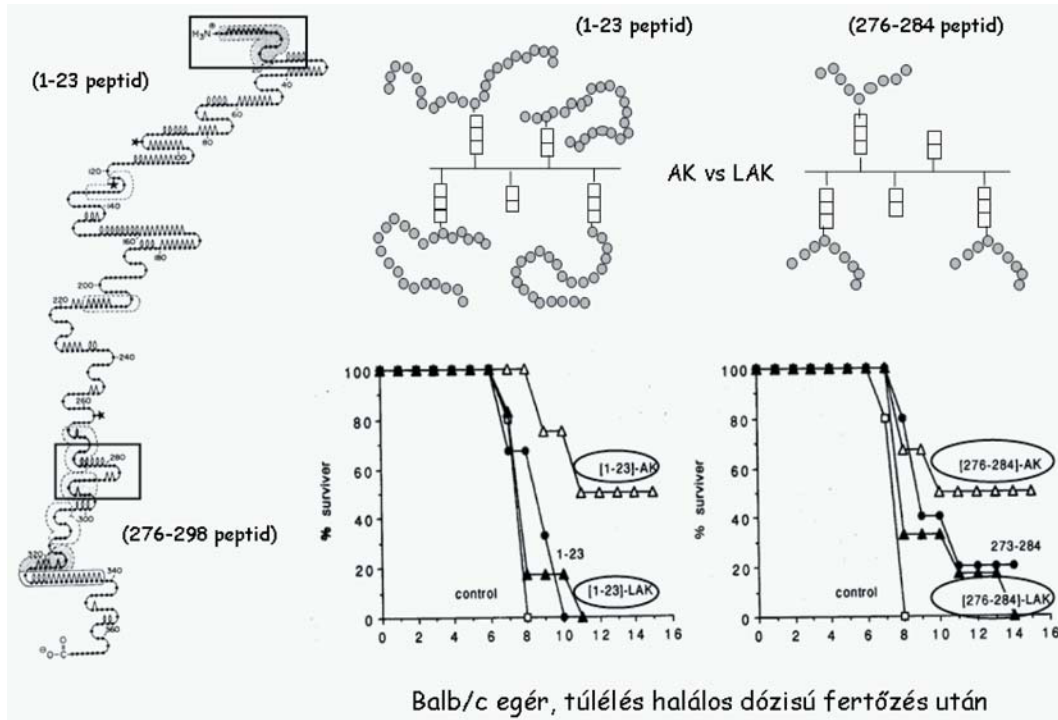
A M. tuberculosis fertőzés/érintettség kimutatására használt PPD proteinekverékhez hasonlóan a baktérium 38 kDa illetve 16 kDa fehérje is tartalmaz több T-sejt epitóp régiót. Ha az általunk tanulmányozott szakaszoknak megfelelő epitóp peptideket (rendre ³⁵⁰DQVHFQPLPPAVVKLSDALI³⁶⁹ illetve ⁹¹SEFAYGSFVRTVSLPVGAD^{E110}) ugyanazzal a polipeptiddel konjugáljuk és PPD+ személyek limfocitáinak T-sejt választát tanulmányozzuk, azt vehetjük észre, hogy a „szabad” peptiddel szemben a konjugált vegyület jelentős immunválaszt vált ki és ezáltal jelzi az érintettséget.³¹

Az azonos epitóp peptidok számának („kópiaszám”) növelése egy vegyületen belül a specifikus immunválasz hatékonyságát is eredményezheti. Halálos dózisu HSV vírussal fertőzött egerek túlélése jelentősen nőtt attól függően, hogy az előzetes immunizáláshoz szabad vagy konjugált epitóp peptidet illetve a konjugáláshoz milyen hordozót választottunk (7. ábra). A vakcináció az AK elágazó láncú polipeptiddel konjugált epitóp – akár az egyik (⁹LKMADPNRFRGKDL²²), akár a másik (²⁷⁸LLEDVPGTVA²⁸⁷) peptid esetében – az állatok 50 %-át megmentette a pusztulástól.^{5,32}

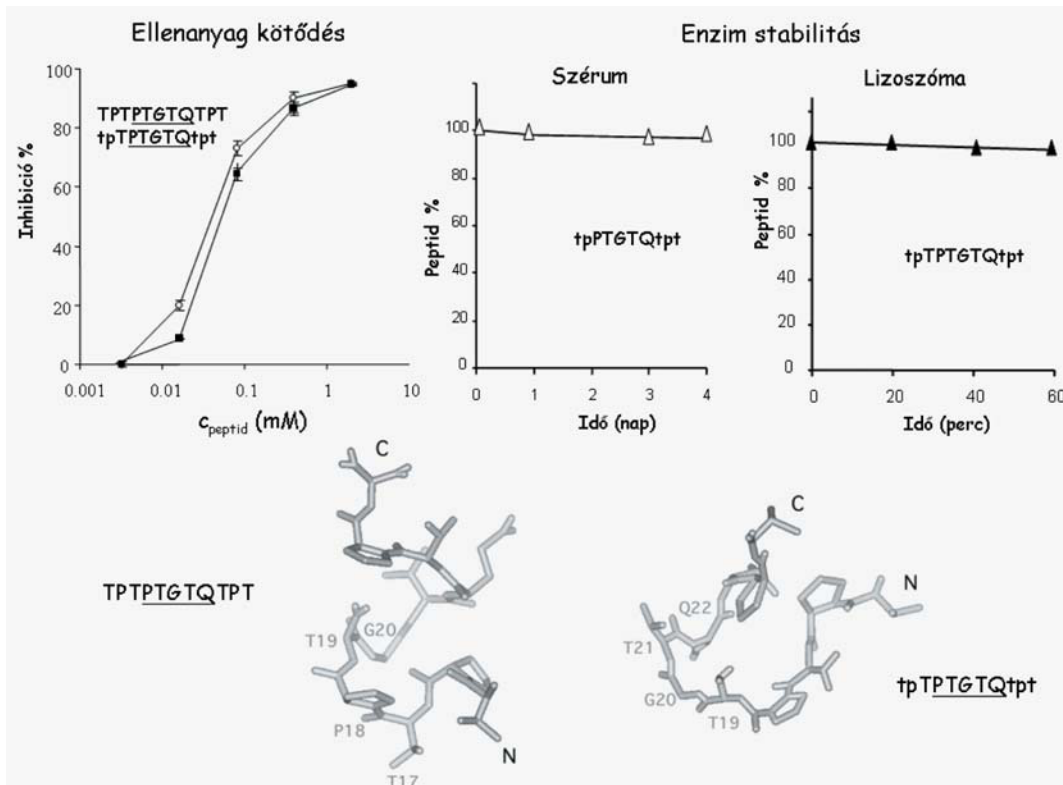
Az epitóp peptidok szerkezetét ciklizálás és sokszorozás mellett az epitóp sajátosságért (specifikus kötődés) felelős epitóp „mag” N- és C-terminálisán elhelyezkedő „lebegő” régiók kicserélésével szintén át lehet alakítani. Ezzel a „mag” szakasz ellenanyag kötődése B-sejt epitóp esetében (vagy MHC- illetve T-sejt receptor kötődése a T-sejt epitóp esetében) megváltoztatható.³³ Kísérleteink bizonyították,

hogy a „lebegő szakaszok” úgy is kialakíthatóak, hogy az optimális kötődés megtartása mellett a peptid epitóp rezisztens legyen mind a szérumban, mind pedig a lizoszomális enzimek hidrolízist segítő katalitikus aktivitásával szemben. Ha például a mucin-2 glikoprotein egyik B-sejt epitópját tartalmazó peptidben (TPTPTGTQTPT) a „magot” (PTGTQ) körülvevő L-aminosavak egy részét D-konfigurációjú izomere cseréljük (tpTPTGTQtp), ahol a kisbetű a D-izomert jelenti, akkor olyan analóg peptidhez jutunk, amely megtartotta teljes ellenanyag kötődését és nem bomlik le testfolyadékokban (8. ábra).³⁴ Az értelmezést segíti a két peptid (oldatbeli) szerkezetének összevetése NMR spektroszkópiával.³⁵

Az illusztrációként bemutatott példák jelzik, hogy a peptid epitópok szerkezetének módosításával (pl. gyűrűbe zárás, sokszorozás, a lebegő szakaszok átalakítása) növelni lehet az immunfelismerés hatékonyságát, valamint az immunválasz kiváltó képességet. Ezzel egyidejűleg ki lehet alakítani olyan sajátosságokat, amelyek alkalmassá tehetik e peptideket, peptid-biokonjugátumokat tumoros (emlő, vastagbél karcinoma), fertőző (herpesz simplex vírus, M. tuberculosis), valamint autoimmun (rheumatoid arthritis, Crohn szindróma) betegségek korai kimutatására, a kezelés eredményességének monitorozására és esetenként vakcinációval történő megelőzésére. Kutatásaink az „érdeklődés-vezérelt” alap kutatások csoportjába tartoznak. Adataink azonban – reményeink szerint is – hozzájárulhatnak a korszerű diagnosztika és/vagy terápia eszköztárának bővítéséhez.



8. Ábra. A lineáris B-sejt epitóp peptidok sokszorozása előnyösen befolyásolhatja az immunválasz kiváltó képességet. Halálos dózisú HSV vírussal fertőzött egerek túlélése szabad vagy konjugált epitóp peptiddel (9 LKMADPNRFRGKDL²² vagy 276 LLEDVPGTVA²⁸⁷) történt immunizálás után: az elágazó láncú polipeptid hordozó hatása. A = Ala, K = Lys, L = Leu.



9. Ábra. A mucin-2 glikoproteinen azonosított epitóp szakaszt tartalmazó peptid (TPTPTGTQTPT) szerkezetének módosítása, az NMR szerkezetek összeváltása: az epitóp „magot” (PTGTQ) körülvevő L-aminosavak egy részének D-konfigurációjú izomerre cserélése a teljes ellenanyag kötődés megmaradása mellett enzim rezisztens analóg eredményezett.

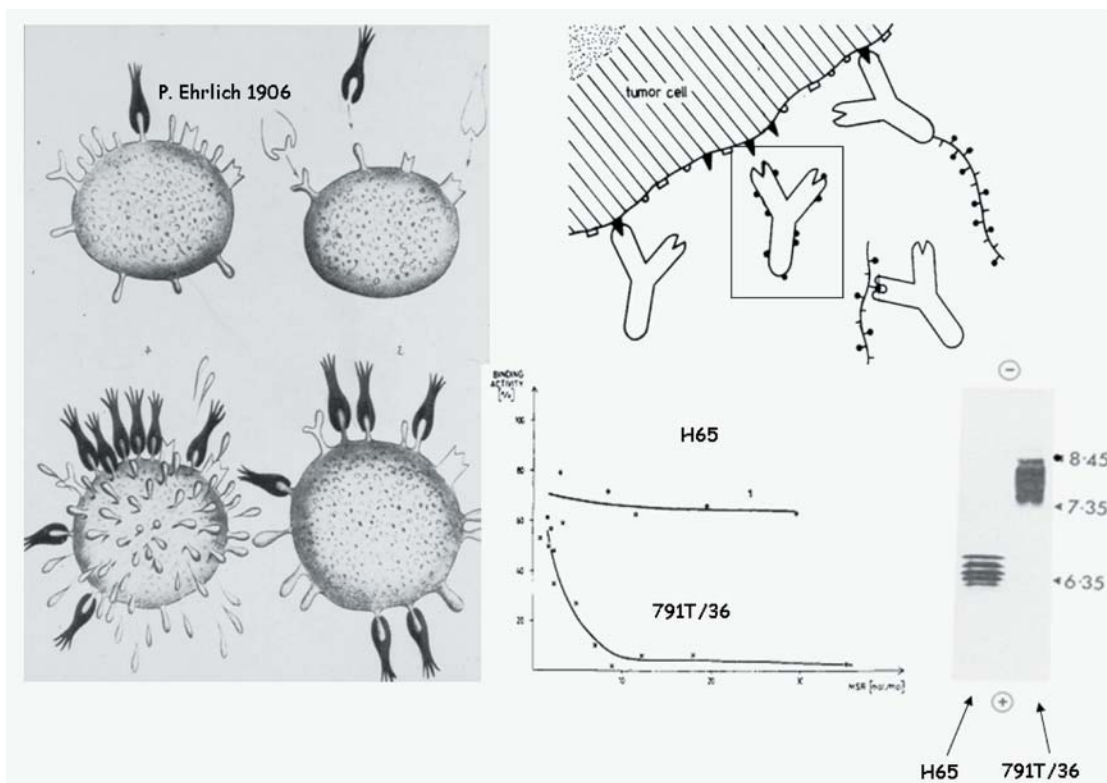
5. Célbajuttatás fehérje- vagy peptid-konjugátumokkal

Hatóanyagok „célsejte juttatásának” koncepcióját Paul Ehrlich fogalmazta meg (Nobel díj, 1908).³⁶ A kifejezést

(„Zauberkegeln”, „mágikus golyó”) Carl Maria von Weber („A bűvös vadász”, „Der Freischütz”) című operájából kölcsönözte. Napjainkra ezen elv a gyógyszerkutatás egyik stratégiai fontosságú irányává vált. Amennyiben

a kiválasztott vegyület csak a „beteg” sejtbe jut, csökkenthetővé válik a mellékhatások súlyossága, mértéke és kisebb lehet a terápiás dózis, valamint javítható a terápiás

hatékonyság. Ehrlich rajzai mai is relevánsak, holott keletkezésük idején semmilyen olyan kísérleti adat nem állt rendelkezésre, amely megalapozta volna az ábrázolt receptor-ligandum kölcsönhatást (10. ábra).



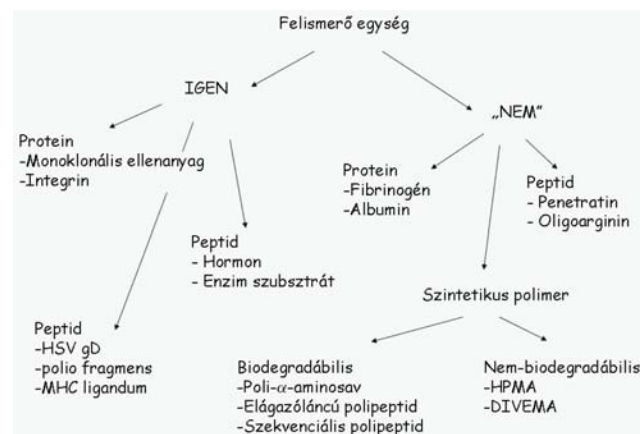
10. Ábra. P. Ehrlich elképzelése sejtfelszíni receptorhoz való kötődésről. Tumorspecifikus monoklonális ellenanyagok (H65, 79IT/36) izoelektromos pontja, daunomicin konjugátumaik specifikus kötődése tumorsejt felszíni strukturához: a szubsztitúció mértékének hatása.

A fehérjék illetve peptidek, amelyekhez kovalens kötéssel kapcsolódik hatóanyag és/vagy riporter (pl. fluorófor, radioaktív ligandum) molekula két csoportba oszthatók: az egyikben a hordozó (pl. monoklonális ellenanyag, hormon, MHC ligandum/T-sejt epitóp) rendelkezik a célsejt felismerő szerkezettel. Ez alkalmassá teszi arra, hogy sejtfelszíni strukturákhoz (pl. hormon receptor, ligandum akceptor, enzim kötőhely) specifikusan kötődjön. A másik hordozói csoportba tartoznak azok a fehérjék és peptidek, amelyek nem rendelkeznek sejtfelismerő szerkezeti egységgel (vagy ez még nem ismert), de sejtbe történő felvételük – valamilyen oknál fogva – egyes sejttípusok részéről kedvezményezett, s így a hozzájuk kapcsolt molekula („cargo”) e sejtekben nagyobb koncentrációban lehet jelen (11. ábra).

Kutatásaink (szintézis, szerkezeti és funkcionális jellemzés) párhuzamosan folytak/folynak fehérje (mono- és poliklonális ellenanyag), oligopeptid (pl. sejtpenetráló peptidek, MHC ligandum/T-sejt epitóp), valamint polipeptid (elágazó láncú és szekvenciális polipeptid) hordozókkal. Közös sajátása ezen kísérleteknek, hogy a „cargo” jellemzően tumorellenes (antraciklin, folsav-antagonista, hormon – antagonista³⁷, vinka alkaloid, ferrocén származék) vagy antimikrobiális (izoniazid³⁸, metotrexát) hatású szer illetve riporter molekula (fluorescein, oxazolón származék³⁹, kelátor⁴⁰) sajátosságú vegyület.^{13,16, 41}

A daunomicin (Dau) kovalens kapcsolása sejtfelszíni strukturákat szelektíven felismerő monoklonális

ellenanyaghoz (H65, 79IT/36) javíthatja a konjugátum tumorellenes hatását (10. ábra). A fehérjék Lys oldalláncain az amino-csoportokhoz konjugált Dau molekulák számának növelése – ami előnyös lehetne a hatás szempontjából – ronthatja a sejtfelszíni strukturákhoz történő kötődés mértékét (lásd 79IT/36 ellenanyag, 10. ábra), a konjugátum szelektivitása csökken.



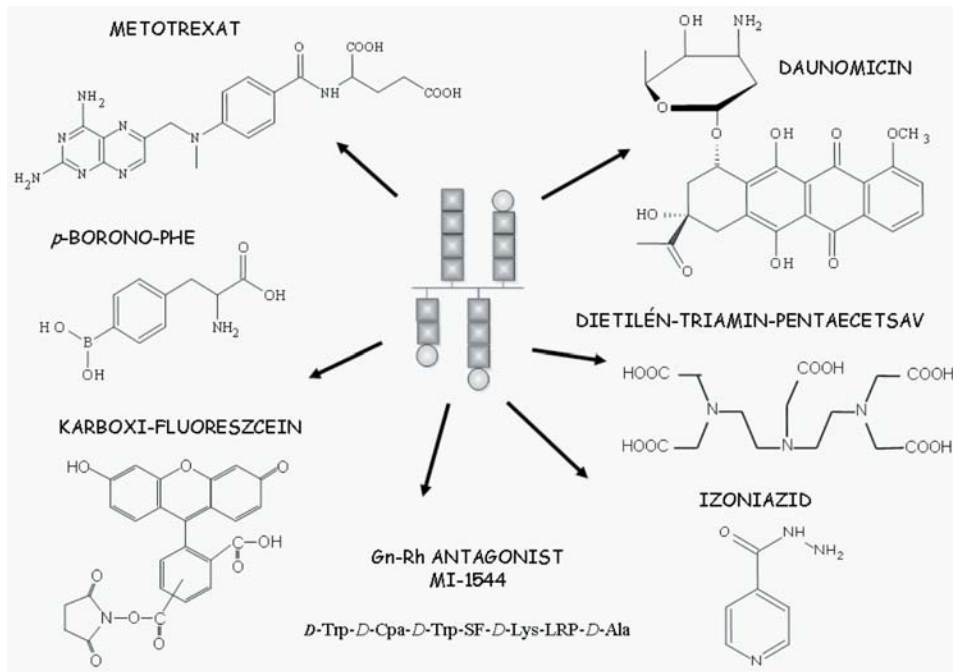
11. Ábra. Fehérje, peptid illetve polimer hordozók csoportjai a „célfelisérés” alapján.

Ez a jelenség azonban jelentősen függ az ellenanyag fehérje kémiai sajátosságaitól (pl. a Lys aminosavrészek szekvenciális pozíciójától, számától, az izoelektromos pont nagyságától). Például a H65 ellenanyaghoz nagyobb számban lehetett

– azonos kötással – daunomicint konjugálni anélkül, hogy jelentősen csökkent volna a konjugátum tumorsejthez való kötődése (lásd 10. ábra).⁴²

Az elágazó lánccú polimer polipeptid hordozók csoportját (1. ábra) úgy terveztük, hogy az egyes vegyületek egymástól meghatározott tulajdonságok (pl. töltés,

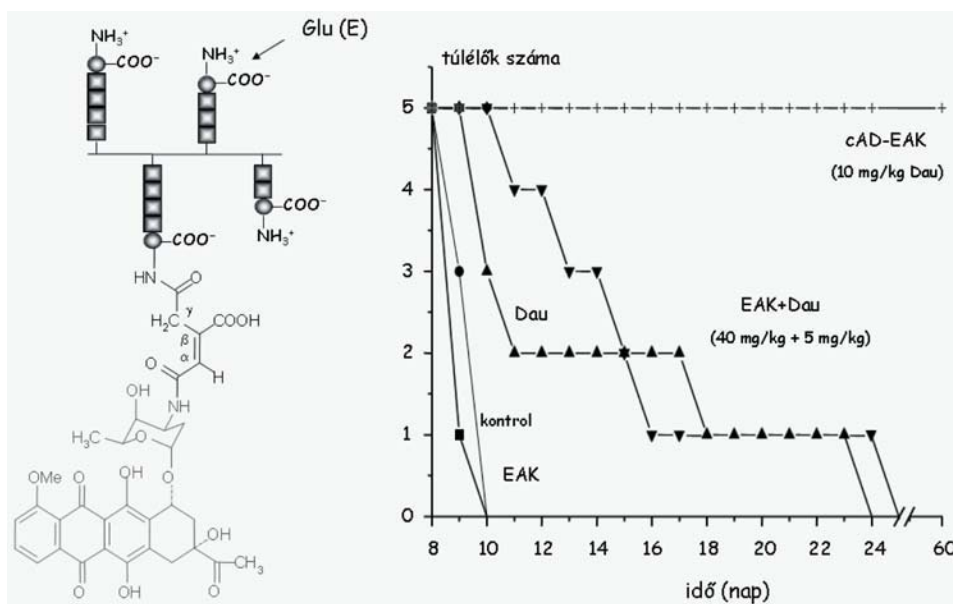
oldatbeli térszerkezet) vonatkozásában térjenek el. Ez a szisztematikusan megválasztott molekulákból álló hordozó-csoport lehetőséget adott annak tanulmányozására, hogy a hordozó hogyan befolyásolja a hozzá kovalensen kapcsolt „cargó” tulajdonságaira? E program keretében szintetizáltunk többféle hatóanyagot, riporter molekulát tartalmazó konjugátumokat (13. ábra).



12. Ábra. Néhány, elágazó lánccú, polilizin gerincű polipeptidekkel konjugált hatóanyag (daunomicin, metotrexát, GnRH hormon analóg, izoniazid, p-borono-Phe) és riporter molekula (karboxi-fluoreszcein, dietilén-triamin-pentaecetsav).

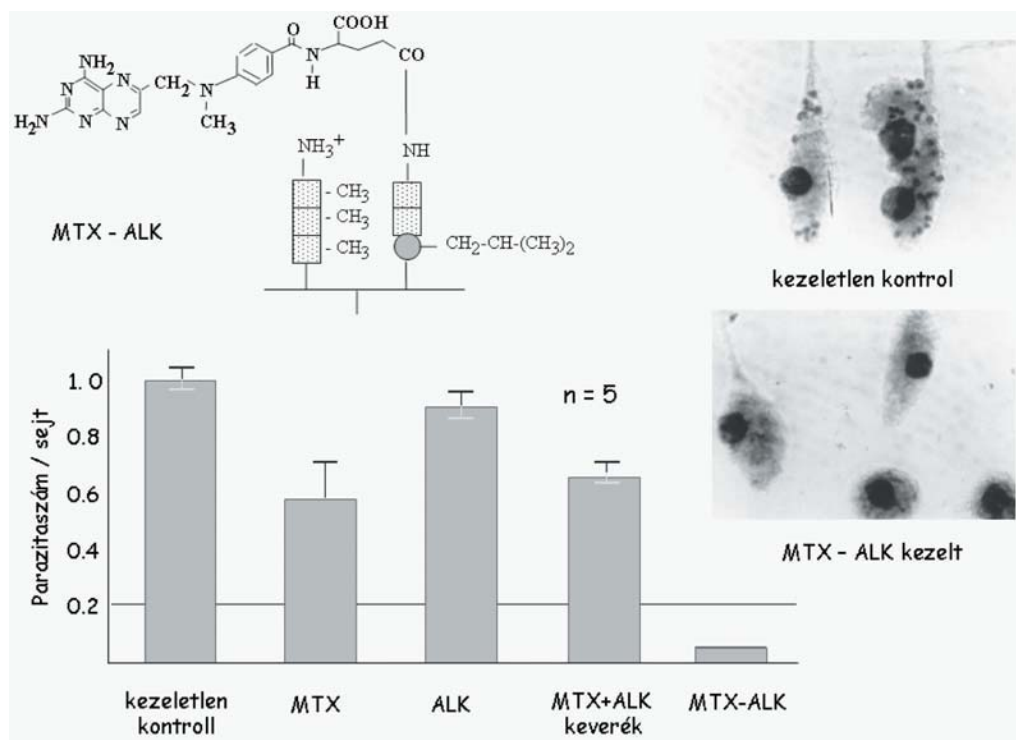
Az amfoter sajátságú, oldallánc végeken Glu aminosavat tartalmazó elágazó lánccú polipeptiddel konjugált Dau (cAD-EAK) L1210 leukémiában szenvedő egereken végzett állatkísérletekben teljes túlélést eredményezett (12. ábra).^{13,43} A kezeletlen vagy csak daunomicinnel illetve a polipeptid és Dau keverékével kezelt állatok 10-24 napon

belül elpusztultak. Ezzel szemben, az azonos dózisu kezelés, amelyet az oldallánc végeken Ser aminosavat tartalmazó, polikationos polipeptidhez – azonos kötással – kapcsolt daunomicinnel (cAD-SAK) végeztünk nem eredményezett túlélést, az állatok 24 napon belül elhaltak. E megfigyelés világosan dokumentálja a hordozó molekula komplex szerepét a Dau tumorellenes hatására nézve.⁴⁴



13. Ábra. Az amfoter sajátságú, oldallánc végeken Glu aminosavat tartalmazó elágazó lánccú polipeptiddel (EAK) konjugált daunomicin hatása L1210 leukémiában szenvedő egerek túlélésére. A = Ala, K = Lys, E = Glu, cAD = cis-aconitil-Dau.

A hatás különbség elemzésére irányuló kutatások eredményei arra utaltak, hogy a kétféle konjugátumból (cAD-EAK vs cAD-SAK) – azonos körülmények között – lényegében azonos kinetika szerint szabadul fel a hatásért felelős szabad daunomicin és hasonló mértékű a különböző sejtvonalakon tapasztalt *in vitro* citoxikus hatás is. Jelentős különbséget lehetett észlelni ugyanakkor a sejtfelvétel mértékében sejtkultúrákban *in vitro* illetve a biodisztribúció jellemzőiben *i.v.* kezelés után (véráramban eltöltött idő, szöveti megoszlás). Ezek az egybeesések és különbözőségek megegyeznek a polipeptid hordozók esetében leírtakkal, azaz a konjugátumok sajátosságaira a hordozó molekularész markáns hatással van.^{45,46}



14. Ábra. A polikation sajátosságú, oldalláncotveknél Leu aminosavat tartalmazó elágazó láncú polipeptiddel (ALK) konjugált metotrexát (MTX) hatása Leishmani donovani parazitával fertőzött tengeri malac lép parazitaszámára.

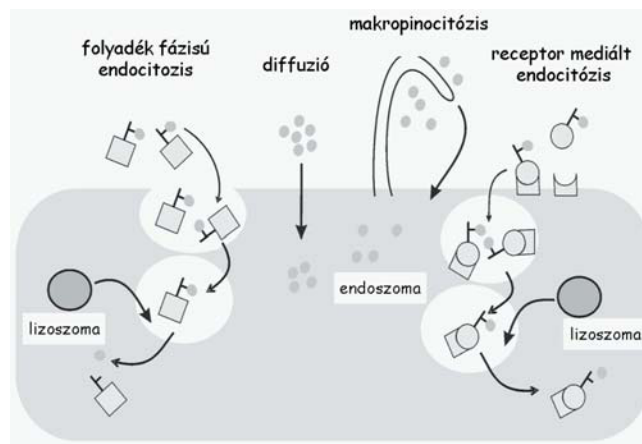
Az *in vivo* kísérletek jelentős különbségeket mutattak a konjugátumok (tumorelleses illetve *L. donovani* fertőzés ellenes) hatásában. E jelenségek értelmezésére mind a sejt, mind pedig a szervezet szintjén további kutatási programokat indítottunk.

Újabb kísérleteink arra utalnak, hogy a szabad hatóanyag, a monoklonális fehérjével vagy az elágazó láncú polipeptiddel konjugált származék felvétele a sejtek (pl. szenzitív illetve rezisztens tumorsejtek, makrofágok) részéről egymástól eltérő mechanizmus szerint valósul meg. A kismolekulák általában diffúzió útján, a receptor felismerő egységgel rendelkező ellenanyag konjugátum receptor mediált endocitózissal, míg a szintetikus polipeptid konjugátumok folyadék fázisú endocitózissal jutnak a sejtbe (16. ábra). Kimutattuk azt is, hogy e konjugátum család esetében – a hordozó szerkezete által meghatározott mértékben – az A típusú scavenger receptor is részt vesz a folyamatban.^{46,48,49}

A molekulaszerkezet (a hordozó felépítése, a kötéstípus a hordozó és „cargó” molekularész között) és a biológiai hatása

A *Leishmania donovani* parazitafertőzés elleni szert (metotrexát, MTX), valamint elágazó láncú, polikationos sajátosságú polipeptid makromolekulát tartalmazó konjugátumok hatásának összehasonlító vizsgálata szerint a hordozó polikationos polipeptidek oldalláncának felépítése fontos szerepet játszik az állatkísérletekben tapasztalt (*in vivo*) fertőzés ellenes hatás létrejöttében.

A kezeletlen, a szabad vagy polipeptid + MTX keverékkel kezelt állatokhoz képest, az MTX – ALK konjugátum, amelyben a Leu aminosav a polilizin gerinchez közel helyezkedik el, a parazitaszám drámai csökkenését eredményezte (15. ábra).^{44,47}



15. Ábra. Vegyületek sejtbejutásának főbb módzatai.

közötti összefüggések feltárása lényegét tekintve a „feldező kutatás” igazi célja és öröme. Az összefüggések alapján előállított, a korábbi törekvéseknél hatékonyabbnak mutakozó vegyületek pl. a tumorelleses szert (Dau), vagy

a *Leishmania donovani* parazitafertőzés elleni szert (MTX), valamint polipeptidet tartalmazó konjugátumok pedig új irányokat jelölhetnek ki vagy létező irányokat erősíthetnek meg a gyógyszerkutatás ezen területein.

6. Kitekintés

A biokonjugátumok kutatása, időközben, az 1990-es évek elején az érdeklődés előterébe került. Ennek egyik oka az volt, hogy az irodalomban hiányoztak azok a szintézismódszerek, analitikai eljárások, amelyekkel jól definiált származékokhoz, új – a komponensek előnyös sajátságait kombináló - konjugátumokhoz lehetett jutni. E kutatások fontosságát jelzi az a tény is, hogy az Amerikai Kémiai Társaság 1990-ben indított folyóiratot (*Bioconjugate Chemistry*).⁵⁰

A fenti rövid és vázlatos ismertetés jelzi, hogy a terület, mind biomolekuláris kémiai, mind pedig gyógyszer- és vakcina-kutatási vonatkozásban nemzetközileg fontosnak és eredetinek tekinthető.

A biokonjugátumok kutatása terén elért eddigi eredményeink izgalmasak és biztatóak. E témakörben az ELTE - Doktori Iskola keretében hét PhD dolgozat, több mint 20 szakdolgozat született, jelenleg is több PhD hallgató és egyetemista dolgozik valamilyen kapcsolódó kutatásban. Eredményeink elismerésének is tekinthető, hogy e cikk szerzője – felkérésre - 1998-tól a *Bioconjugate Chemistry* „Advisory Board” tagjaként, 2007 óta pedig Associate Editorként vesz részt a szakterület vezető folyóiratának munkájában.

A biokonjugátumok újabb generációit - ideértve a különböző kiméra vegyületeket is - széles körben használják alap és alkalmazott kutatásokban. Kiemelten intenzív kutatások három területen folynak: a) hatóanyag-peptid konjugátum terapeutikumok szintézise a gyógyhatású vegyületek hatékonyságának fokozására, b) mesterséges antigének/immunogének kutatása szintetikus vakcinák vagy immunodiagnosztikumok céljára, c) bioszenzorok, valamint izotóp/fluorofor-konjugátumok kialakítása sejtanalitikai célra, proteomikai kutatások céljára.^{51,52,53}

Köszönetnyilvánítás

Az előadásban bemutatott eredmények tanárain, munkatársaim, a laborban dolgozó doktori hallgatók, szakdolgozó és tudományos diákkörös diákok, valamint hazai és nemzetközi együttműködő partnerek sokéves munkáját tükrözik. Köszönöm professzoraim, †Szeckerke Mária tud. tanácsadó, †Gergely János egyetemi tanár, akadémikus, Kovács János egyetemi tanár, Kucsman Árpád egyetemi tanár és Medzihradszky Kálmán egyetemi tanár, akadémikus támogatását, tanácsait. Köszönöm, hogy a diploma illetve a doktori fokozat megszerzése után †Dr. Karel Blaha (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague), Prof. Stanley A. Plotkin (Wistar Institute, Philadelphia), Prof. Robert W. Baldwin (University of Nottingham), Professor Hiroshi Maeda (Kumamoto University), Prof. Yasutsugu Shimonishi (Osaka University) és Dr. Juraj Iványi (MRC, London) munkatársaként sokat

tanulhattam laboratóriumaikban az elmúlt évek során.

Köszönöm az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport korábbi és jelenlegi munkatársainak az élvezetes együttműködést. Köszönöm annak lehetőségét, hogy számos elkötelezett PhD hallgató doktori munkájának megvalósításában témavezetőként közreműködhettem.⁵⁴⁻⁶⁸

Köszönöm azoknak, akik segítettek és segítik a napi munkát a laborokban, az irodákban.

Köszönöm, hogy együtt dolgozhattam †Dr. Michael R. Price (University of Nottingham), †Dr. Claudio Vita (CEA, Sacley), Prof. Asoke Ghose (Bose Institute, Calcutta) kollégákkal és évtizedek óta együtt dolgozhatok Prof. David Andreu (Pompeu Fabra University, Barcelona), Prof. Michael Przybylski (University of Konstanz), Prof. Francesco Dieli (University of Palermo) és Prof. Shiroh Futaki (Kyoto University) kutatókkal.

Köszönöm családom minden tagjának, különösen feleségemnek Gabinak, fiaimnak Gergőnek és Andrisnak, testvéremnek Istvánnak, hogy segítettek a térkép olvasását, velem tartottak e kiránduláson, a „peptid-úton” itthon és külföldön.

Köszönöm az MTA, az ELTE, az OTKA, valamint a Népjóléti Minisztérium, Művelődési és Közoktatási Minisztérium, az NKTH (és utódaik), továbbá az NKFP, a GVOP, a Tét Alapítvány (Magyar-Spanyol, Magyar-Francia, Magyar-Indiai, Magyar-Brit, Magyar-Japán, Magyar-Lengyel, Magyar-Román programok), a TEMPUS, a WHO, a 6. és 7. FP programok, a COST, az ANR, az EACR, az EPS, a Royal Society, ipari partnereink, Richter G. Nyrt, Reanal Rt, Béres Rt, Softflow kft és a többiek évtizedes támogatását az „utazás” során.

Hivatkozások

- Dudek, N.L.; Perlmutter, P.; Aguilar, M.I.; Croft, N.P.; Purcell, A.W. *Curr Pharm Des.* 2010, 16, 3149-3157.
- Robinson, J.A., Demarco, S., Gombert, F., Moehle, K., Obrecht, D. *Drug Discov Today.* 2008, 13, 944-951.
- Naz, R.K.; Dabir, P. *Front Biosci.* 2007, 12, 1833-1844.
- Hudecz, F. *Biomedical Peptides, Proteins and Nucleic Acids* 1995, 1, 213-220.
- Hudecz, F. *Biologicals*, 2001, 29, 197-207.
- Hudecz, F. *In Methods in Molecular Biology, vol.298: Peptide Synthesis and Applications*, Howl, J., Ed.; Humana Press, Totowa, NJ, USA 2005, pp. 209-224.
- Ducry, L.; Stump, B. *Bioconjugate Chemistry* 2010, 21, 5-13.
- Maeda, H. *Bioconjugate Chemistry* 2010, 21, 797-802.
- Brumlik, M.J.; Daniel, B.J.; Waehler, R.; Curiel, D.T.; Giles, F.J.; Curiel, T.J. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008, 5, 87-103.
- Hudecz, F.; Szeckerke, M. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1980, 45, 4439-4449.
- Hudecz, F.; Votavova, H.; Gaál, D.; Sponar, J.; Kajtár, J.; Blaha, K.; Szeckerke, M. *In Polymeric Materials in Medication* (Gebelein, Ch.G., Carragher, Ch.E., Eds.; Plenum Press: New York, 1985; pp 265-289.
- Mező, G.; Kajtár, J.; Nagy, I.; Szeckerke, M.; Hudecz, F. *Biopolymers* 1997, 42, 719-730.
- Hudecz, F. *Anti-Cancer Drugs* 1995, 6, 171-193.
- Hudecz, F. *Magyar Tudomány* 1998, 43 1211-1221.
- Hudecz, F. *In Self-Assembling peptide systems in biology*,

- medicine and engineering: Agelli, A., Boden, N., Zhang, S., Eds.; Kluwer Academic Publisher: The Netherlands, 2001; pp 139-160.
16. Nagy, I.B.; Hudecz, F.; Alsina M.A.; Reig, F. *Biopolymers* **2003**, *70*, 323-335.
 17. Hudecz, F.; Gönczöl, É.; Plotkin, S.A. *Vaccine*, **1985**, *3*, 300-304.
 18. Gönczöl, E.; Hudecz, F.; Dietzschold, B.; Ianacone, J.; Plotkin, S.A. *J. Virology* **1986**, *58*, 661-664.
 19. Hudecz, F. *In Synthetic peptides in the search for B-and T-cell epitopes*. Rajnavölgyi, E., Ed.; R.G. Landes Company: Austin **1994**; pp 19-30.
 20. Windberg, E.; Hudecz, F.; Marquardt, A.; Sebestyén, F.; Kiss, A.; Bősze, Sz.; Medzihradzky-Schweiger, H.; Przybylski, M. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 34-39.
 21. Windberg, E.; Uray, K.; Illyés, E.; Skribanek, Zs.; Price, M.R.; Sebestyén, F.; Hudecz, F. *J. Peptide Science* **2004**, *10*, 56-65.
 22. Hudecz, F.; Hilbert, Á.; Mező, G.; Kajtár, J.; Rajnavölgyi, É. *In Synthetic peptides in the search for B-and T-cell epitopes*. Rajnavölgyi, E., Ed.; R.G. Landes Company: Austin **1994**; pp 157-169.
 23. Price, M.R.; Hudecz, F.; O'Sullivan, C.; Baldwin, R.W.; Edwards, Ph.M.; Tendler, S.J.B. *Molec. Immunol.* **1990**, *27*, 795-802.
 24. Uray, K.; Price, M.R.; Hudecz, F. *J. Peptide Science* **1998**, *4*, 319-326.
 25. Bősze, Sz.; Caccamo, N.; Majer, Zs.; Mező, G.; Dieli, F.; Hudecz, F. *Biopolymers*, **2004**, *73*, 467-476.
 26. Schlosser, G.; Mező, G.; Kiss, R.; Vass, E.; Majer, Zs.; Fejlbrieff, M.; Perczel, A.; Bősze, Sz.; Welling-Wester, S.; Hudecz, F. *Biophysical Chemistry* **2003**, *106*, 155-171.
 27. Tugyi, R.; Mező, G.; Fellingner, E.; Andreu, D.; Hudecz, F. *J. Peptide Science* **2005**, *11*, 642-649.
 28. Mező, G.; de Oliveira, E., F.; Krikorian, D.; Fejlbrieff, M.; Jakab, A.; Tsikaris, V.; Sakarellos, C.; Welling-Wester, S.; Andreu, D.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 1260-1269
 29. Krikorian, D.; Stavroudis, A.; Biris, N.; Andreu, D.; de Oliveira, E.; Mező, G.; Majer, Zs.; Hudecz, F.; Welling-Wester, S.; Thong Cung, M.; Tsikaris, V. *Biopolymers*, **2006**, *84*, 383-399.
 30. Wilkinson, K.A.; Hudecz, F.; Vordermeier, H.M.; Ivanyi, J.; Wilkinson, R.J. *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 2788-2796.
 31. Wilkinson, K.A.; Vordermeier, M.H.; Wilkinson, R.; Ivanyi, J.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry* **1998**, *9*, 539-547.
 32. Mező, G.; Dalmadi, B.; Mucsi, I.; Bősze, Sz.; Rajnavölgyi, É.; Hudecz, F. *J. Peptide Science* **2002**, *8*, 107-117.
 33. Uray, K.; Kajtár, J.; Vass, E.; Price, M.R.; Hollósi, M.; Hudecz, F. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *378*, 25-32.
 34. Tugyi, R.; Uray, K.; Iván, D.; Fellingner, E.; Perkins, A.; Hudecz, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2005**, *102*, 413-418.
 35. Töke, O.; Tugyi, R.; Uray, K.; Hudecz, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *358*, 739-742.
 36. "Paul Ehrlich - Biography". Nobelprize.org. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/ehrllichbio.html
 37. Mező, G.; Mező, I.; Seprődi, A.; Teplán, I.; Kovács, M.; Vincze, B.; Pályi, I.; Kajtár, J.; Szekerke, M.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7*, 642-650.
 38. Horváti, K.; Mező, G.; Szabó, E.; Hudecz, F.; Bősze, Sz. *J. Peptide Science* **2009**, *15*, 385-391.
 39. Hudecz, F.; Kajtár, J.; Szekerke, M. *Biophysical Chemistry* **1998**, *31*, 53-61.
 40. Nagy, I.B.; Varga, I.; Hudecz, F. *Analytical Biochemistry* **2000**, *287*, 17-24.
 41. Hudecz, F.; Kóczán, Gy.; Reményi, J. *In Molecular pathomechanisms and new trends in drug research*, Keri, Gy., Toth, I. Eds.; Taylor and Francis Group, London, **2003**, pp. 553-578.
 42. Hudecz, F.; Ross, H.; Price, M.R.; Baldwin, R.W. *Bioconjugate Chemistry* **1990**, *1*, 197-204.
 43. Gaál, D.; Hudecz, F. *Eur.J.Cancer* **1998**, *34*, 155-161.
 44. Hudecz, F.; Reményi, J.; Szabó, R.; Kóczán, Gy.; Mező, G.; Kovács, P.; Gaál, D. *J. Mol. Recognition* **2003**, *16*, 288-298.
 45. Reményi, J.; Csík, G.; Kovács, P.; Reig, F.; Hudecz, F. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 280-289.
 46. Szabó, R.; Bánóczy, Z.; Mező, G.; Láng, O.; Köhidai, L.; Hudecz, F. *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1798*, 2209-2216.
 47. Kóczán, Gy.; Ghose, A.C.; Mookerjee, A.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13*, 518-524.
 48. Szabó, R.; Peiser, L.; Plüddemann, A.; Bősze, S.; Heinsbroek, S.; Gordon, S.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 1442-1450.
 49. Szabó, R.; Mező, G.; Pállinger, É.; Kovács, P.; Köhidai, L.; Bősze, Sz.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 1078-1088.
 50. <http://pubs.acs.org/journal/bcches>
 51. Majumdar, S.; Siahaan, T.J. *Med Res Rev.* **2010** Sep 2. [Epub ahead of print]
 52. Voskens, C.J.; Strome, S.E.; Sewell, D.A. *Curr Mol Med.* **2009**, *9*, 683-693.
 53. Andresen, H.; Bier, F.F. *Methods Mol Biol.* **2009**, *509*, 123-134.
 54. Uray, K. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **1997**.
 55. Wilkinson Bogdán, K. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **1998**.
 56. Bősze, Sz. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **1998**.
 57. Nagy, I. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **1999**.
 58. Kóczán, Gy. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2001**
 59. Reményi, J. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2004**.
 60. Skribanek, Zs. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2004**.
 61. Windberg, E. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2004**.
 62. Szabó, R. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2005**.
 63. Tugyi, R. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2005**.
 64. Bánóczy, Z. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2007**.
 65. Tüdös, É. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2006**.
 66. Bartos, Á. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2009**.
 67. Miklán Zs. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2010**.
 68. Orbán E. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2011**.

The "Peptide route": from the Trefort campus to the Lágymányos

Protein/polypeptide carriers (e.g. KLH, BSA, synthetic branched polypeptides) are frequently applied in immunology to induce

specific immune responses against attached haptens. The function of carrier in these conjugates could be considered as targeting of epitopes to immunocompetent cell for production of epitope specific antibody or T-cell responses. Biological molecules have realized and potential use as targeting carriers of drugs, and/or reporter molecules. Such conjugates have been developed to alter

the biodistribution and/or bioavailability of the attached bioactive molecule, which might result in decreased toxic side effects, improved stability against normal biodegradation, increased circulation half-life, delayed plasma and/or tissue clearance, increased circulation half-life, delayed plasma and/or tissue clearance improved localisation at desired sites.

In order to increase immunoreactivity (antigenicity and immunogenicity) of linear peptides belonging to sequential or continuous topographic B-cell epitope or T-cell epitope classes several experimental approach has been investigated. Since B-cell epitope sequences are frequently localised in β -turn or loop regions of a protein, the corresponding cyclic peptide could be a logical and perhaps better mimicry of the native secondary structure. Specific T-cell responses induced by peptides containing minimal size functional T-cell epitope could be modulated by the alteration

of the flanking regions connected to the N- and/or C-terminal of the core. Another strategy for increasing the sensitivity of antigen binding or the immunogenic properties is the multiplication of copies of the same or defined number of different B- or T-cell epitopes of microbial or tumour origin. In order to achieve this covalent epitope-carrier conjugates were prepared using optimal size oligopeptides representing functional epitopes and protein or synthetic carriers (e.g. KLH, BSA, branched chain polymeric polypeptides, multiple antigenic peptides, sequential oligopeptide carrier, oligotuftsin). These approaches are not only to provide a better understanding of the antigenic structure of proteins, but also contribute to the development of synthetic antigens as artificial vaccines or diagnostic reagents. A brief overview presented here on our results obtained recent years with antibody epitopes from herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D and from mucin1 and mucin2 glycoproteins or with T-cell epitopes from 16 kDa and 38 kDa proteins of *M. tuberculosis*.