

---

**MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA**  
**TÁMOGATOTT KUTATÓHELYEK**

**TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK**  
**1996–1998**

**MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA**  
**BUDAPEST • 1999**

---

A kötet szerkesztői  
Dohy János  
Halász Béla  
Hunyady György  
Medzihradzsky Kálmán  
Paál Huba  
Standeisky Éva

Olvasószerkesztő  
Kovács Éva

**ISBN 963 508 160 X**

Kiadja a  
Magyar Tudományos Akadémia  
Kiadásért felel: Paál Huba, MTA Támogatott Kutatóhelyek Irodája  
Kiadói szerkesztő: Burucs Kornélia  
Borító: Horváth Imre  
Szedés, tördelés: MTA Történettudományi Intézete  
Nyomdai munkálatok: Áldási és Németh Nyomda Bt.  
Felelős vezető: Németh József  
Készült 48,25 A/5 ív terjedelemben, 1000 példányban

## MTA–ELTE PEPTIDKÉMIAI KUTATÓCSOPORT

MEDZIHRADESKY KÁLMÁN, az MTA rendes tagja

1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A

Tel.: (1) 209 05 55

Fax: (1) 372 26 20

E-mail: medzy@ludens.elte.hu

A csoport kutatási tevékenysége három részből áll. Az IMMUNOKÉMIAI KUTATÁSOK egyik kulcskérdése, a fehérjék ellenanyagválasz kiváltásáért felelős szakaszainak, illetve a sejt immunválasz létrejöttéért felelős régióinak (T-sejt epitópok) azonosítása. E vizsgálataik során számos eredeti megfigyelést tettek mikrobiális fehérjék, valamint humán tumorról összefüggő proteinek epitópszerkezetének meghatározása terén. Az elmúlt néhány évben olyan metodikai arzenált építettek ki, amely lehetővé teszi elméleti (predikciós) módszerek, valamint szintetikus peptideken alapuló kísérleti megközelítések hatékony kombinációját. Fontos körülmény, hogy a fehérjék epitópszerkezetének ismerete az orvosi biológia (pl. tumorellenes peptid-vakcinák) és diagnosztikai (pl. tbc-fertőzés specifikus kimutatása) gyakorlat számára is hasznosítható adatokat nyújt. E téma az EU kiemelt kutatási irányzatai közé tartozik. E kérdések megválaszolására – korábbi eredményeik alapján – modellként három fehérjét választottak ki.

1. 1. *Ellenanyag (B-sejt)-epitópok azonosítása mucin proteineken.* Céluk az emlő, illetve vastagbél karcinómával kapcsolatos MUC1/MUC2 fehérjén ellenanyag-epitópok azonosítása, valamint ezek peptidvariánsainak szintézise. Predikciós módszerekkel valószínűsítették, majd CD- és FT-IR-vizsgálatokkal és MUC2 specifikus monoklonális ellenanyag segítségével bizonyították, hogy a MUC2 glikoprotein egyik immunodomináns B-sejt epitópja a fehérje azon szakaszán helyezkedik el, amelyik bétakanyar szerkezetet vesz fel. Meghatározták a minimális és optimális epitóp szerkezetét, erre vonatkozóan modellt javasoltak. Tisztázták az immobilizált és az oldatbeli epitóp ellenanyag felismerésének jellemző sajátosságait és felhívták a figyelmet arra, hogy a két megközelítés egymástól eltérő eredményre vezet.

Kémiai szintézissel előállítottak olyan toxin-kiméra molekulákat (13–34 aminosavrésszel), amelyekben a 2 diszulfid híddal rögzített szerkezet adott szakaszán a MUC1 epitópot tartalmazza.

1. 2. *Tuberculin fehérjék T-sejt epitópjainak azonosítása.* Céluk a tbc-fertőzésre jellemző T-sejt epitópok lokalizálása, továbbá annak vizsgálata, hogy *a)* mi a minimális szerkezeti feltétele az epitóp sajátágnak; *b)* milyen szerkezeti változtatásokkal lehet eljutni a legegyszerűbb, de optimális T-sejt válasz kiváltására képes peptid-antigénhez; *c)* lehet-e az aktívnek bizonyult peptid hatását – makromolekulához történő kapcsolás révén – növelni. Szintetikus peptid segítségével bizonyították, hogy *a)* a dedukciós módszerrel levezetett T-sejt epitópok

önmagukban nem viselkednek epitópként; *b*) kiegészítésükkel meghatározható a minimális funkcionális epitóp szekvenciája, *c*) a dedukált epitóp nem natív régiókkal kiegészíthető úgy, hogy az funkcionális epitóp legyen. Elsőként az irodalomban előállítottak olyan mesterséges peptid-antigént, amely a natív epitóp-nál hatékonyabb T-sejt választ indukált egerekben.

Új felismerésük, hogy a funkcionális T-sejt epitóp peptid képes megőrizni hatékonyságát szintetikus makromolekulához történt kovalens kapcsolás után is. Ennek nagy jelentősége lehet egy korszerű, peptidalapú *M. tuberculosis* diagnosztikum kifejlesztésében. Előállítottak olyan mesterséges peptid-antigéneket, amelyekben a polipeptid gerinchez kétféle, *M. tuberculosis* fehérje eredetű T-sejt epitóp kapcsolódik. Immunizálást követően megállapították, hogy immunizált egerekben mindkét epitópra specifikus T-sejt válasz jön létre.

1. 3. *Herpes simplex virus D glikoprotein: vírusellenes immunoválasz szerkezeti feltevélei.* Céluk a vírusspecifikus immunválasz fokozása olyan szintetikus antigénekké előállításával és jellemzésével, amelyek térben rögzített formában tartalmazzák a neutralizáló ellenanyagválasz kiváltásáért felelős epitópot. Kémiai szintézissel előállítottak olyan lineáris és monociklusos laktám kötést tartalmazó peptideket, valamint  $\alpha$ -konotoxin kimérákat, amelyekben a D glikoproteinből származó epitóp van jelen. Tanulmányozták e vegyületek térszerkezetét és ellenanyag-kötődését.

A RÁKKEMOTERÁPIÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ KUTATÁSAIK központi kérdése a tumorspecifikus hatás elérése. Kutatásaik célja olyan összefüggések feltárása, amelyek hosszabb távon a daganatterápia hatékonyságát javíthatják. Ezért foglalkoztak a metasztázis képződésben szerepet játszó kollagenáz enzim-inhibitorok és származékaik szintézisével (2. 1.). „Célfelismerő” struktúrák és citosztatikumok kombinációja alkalmas lehet arra, hogy a tumorgátló szer a tumorban vagy annak közvetlen környezetében fejtsse ki hatását. Kutatásaik közvetlen célja olyan vegyületek szintézise, amelyekben a hordozói funkciót ellátó peptidhez kovalens kötéssel kapcsolódik a tumorellenes ágens. Ezért előállítottak peptidhormont (2. 2.), illetve polipeptid típusú makromolekulát (2. 3.) tartalmazó konjugátumokat.

2. 1. *Kollagenáz enzim inhibitorok szintézise és jellemzése.* Lineáris és gyűrűbe zárt kollagénfragmenseket és analógokat, valamint melfalán tartalmú származékokat szintetizáltak. A gyűrűs vegyületek segítségével tisztázták a másodlagos szerkezet szerepét a kollagenáz katalizálta hidrolízisben. A térszerkezeti és enzimaktivitási vizsgálatokból arra következtettek, hogy a IV. típusú kollagenáz esetében a flexibilis lineáris forma a kedvező az enzim számára. Tanulmányozták melfalán tartalmú kollagénfragmensek hatását a kollagenáz enzimet termelő daganatsejtek szaporodásának gátlására. A potenciális kollagenáz inhibitorok új családját alakították ki kelátképző sajátosságú oligopeptid származékok szintézisével. Tanulmányozták e vegyületek fémionokkal (cink, réz) képzett komplexek stabilitását, összetételét.

2. 2. *Tumorellenes szer – peptidhormon konjugátumok szintézise és jellemzése.* Az irodalomban az elsők között alkalmaztak szintetikus peptideket az MSH-receptor és a hormonhatás vizsgálatára. Újabban az MSH fragmenseiből, valamint

melfalánt, illetve D-aminosavat tartalmazó analógjaikból makrociklusos vegyületeket szintetizáltak és tanulmányozták kötődésüket, citosztatikus hatásukat humán melanomasejteken. Megállapították, hogy a ciklopeptidek egy része prolongált biológiai hatással rendelkezik. Előállítottak olyan új vegyületeket, amelyekben  $\alpha$ -difluorometil-ornitin kapcsolódik melanotropin fragmenshez. Sejtostódást gátló hatásukat melanotropin-receptort tartalmazó és receptorhiányos sejtvonalakon vizsgálták. Megállapították, hogy a peptid-konjugátum egy nagyságrenddel hatékonyabb, mint a tumorgátló szer önmagában. E kutatásaikhoz kapcsolódva megfigyelték, hogy az N-terminálison  $\alpha,\alpha$ -diszubsztituált aminosavat tartalmazó peptideket az aminopeptidáz M – a várakozással ellentétben – hasította. Modellvegyületek segítségével tisztázták e jelenség hátterét.

2. 3. *Tumorelles szer – polimer polipeptid konjugátumok szintézise és jellemzése.* Szisztematikus kutatás alapján előállítottak és sokoldalúan jellemeztek új, OH-tartalmú, elágazó láncú polipeptideket. E vegyületek az első olyan polikationok a szakirodalomban, amelyek a vérkeringésben hosszabb ideig vannak jelen, így alkalmasak lehetnek prolongált hatású konjugátumok előállítására. A „solid” (szilárd) tumorokban megfigyelt, nagymolekula-tömeg polimer vegyületekre leírt felhalmozódási („enhanced permeability and retention”) jelenség figyelembevételével korábban előállított danunomicin (Dau) -polipeptid konjugátumot in vivo kísérletekben vizsgálták. Kimutatták, hogy a vegyület jelentős tumorelles hatást vált ki L1210 leukémiás állatokon (100%-os túlélés: 60 nap). A polipeptid jelenléte nagymértékben csökkentette a nemkívánatos – Dau által kiváltott – mellékhatásokat (toxicitás, immunszuppresszió). Eredményeik alapján a kutatócsoportot meghívták az EU „Synthetic Polymers in Drug Delivery Research” hálózat munkájában való részvételre. E program keretében 7 ország, 14 laboratóriuma polimer alapú terapeutikumok kutatásán dolgozik.

A RECEPTORKUTATÁSSAL a kutatócsoport hosszabb ideje foglalkozik. Szintetikus peptidek és „riporter”-csoporttal kiegészített származékaik kiemelkedő szerepet játszanak receptorok lokalizálásában, szerkezetük vizsgálatában. Nagy molekulájú fehérje-ligandumok esetében segítségükkel a receptorkötődésért felelős peptidszakasz is sok esetben azonosítható. Kutatásaik célja olyan opiátreceptoron ható természetes peptidek, szintetikus analógjaik, valamint származékaik szintézise volt, amelyek alkalmasak receptorspecifikus affinitási jelzésre (3. 1.). Tisztázni kívánták, hogy a citokinek közé tartozó interleukin 6 fehérje mely szegmense(i) vesznek részt a receptorkötődésben, váltanak ki biológiai hatást (3. 2.).

3. 1. *Opioid peptidek és származékaik szintézise.* Az endogén opioidok (enkefalinok, dinorfin-származékok) korábban feltárt szerkezethatás összefüggései alapján az egyes opiátreceptor-altípusokra szelektív agonistákat és antagonistákat állítottak elő. Felfedeztek egy új, delta specifikus antagonistát. Felismerték továbbá, hogy az enkefalinban kulcsfontosságú N-terminális tirozin a nitrogénmustár karakterű melfalánnal helyettesíthető, s ez az analóg az opiát-receptorhoz irreverzibilisen kötődik. Az opioid receptor feltételezett merkaptó csoportjának kimutatására kétféle, alkilező csoportot tartalmazó opioid ligand szintézisét valósították meg. Az epoxid tartalmú és maleil csoportot hordozó

enkefalin származékok mellett előállították az epoxi-szukcinil variánsokat is. Az epoxid-részletet a C-terminálison a megfelelő klórmetil-keetonokból alakították ki. A maleil-csoportot kiépítették az enkefalin típusú vegyületek N-terminálisán, valamint hidrazid csoport közbeiktatásával a C-terminálison is. Ez utóbbi vegyületek jelentős irreverzibilis kötődést mutattak az egyes opioid receptor altípusokon. Az enkefalinok N-terminálisán epoxi-szukcinil csoportot tartalmazó analóg – előkísérletekben – antagonistá hatást valószínűsít.

3. 2. *Az interleukin 6 (IL-6) citokin biológiai hatásért felelős régióinak azonosítása.* Az utóbbi évtizedben ugrásszerűen megnőtt a citokinekkal és receptoraikkal foglalkozó kutatások jelentősége. Ennek a fehérje „szupercsaládnak” az egyik multifunkcionális tagja az IL-6, amely fontos szerepet tölt be a szervezet homeosztázisának szabályozásában. Túltermelődése összefüggésbe hozható egyes gyulladásszerű, autoimmun, illetve tumoros megbetegedések kialakulásával. Ugyanakkor nem tisztázott, a receptorkötődésért (IL-6R) felelős régió(k) elhelyezkedése. Céluk szintetikus peptidok és fluorofor származékok segítségével olyan szakaszok lokalizálása, amelyek képesek a) kiváltani IL-6-szerű hatást és/vagy b) kötődni szolubilis IL-6R-hoz. E program keretében előállítottak olyan oligopeptideket (8-25 aminosav-rész), amelyek átlapoló módon lefedték az IL-6 fehérje N-terminális részét. Elsőként írták le az irodalomban, hogy e peptidok között vannak olyanok, amelyek IL-6 hatást mutatnak, azaz képesek indukálni akut fázis fehérjék (fibrinogén és B faktor) szintézisét, valamint indukálni a junB proto-onkogén aktiválódását HepG2 sejtvonalon. CD-vizsgálatok alapján kimutatták, hogy még bizonyos oktapeptidek is fokozott hajlamot mutatnak a helikális térszerkezet kialakítására. A receptorkötődési vizsgálatok céljára előállítottak fluorofor tartalmú peptidszármazékokat. Ennek kapcsán új, aminosoporra könnyen beépíthető naftil-oxazon (naOx) vegyületet szintetizáltak. Bebizonyították, hogy e fluoreszcens csoport a kapcsolási reakciót követően stabil a szilárd fázisú peptidszintézis körülményei között. Létrehozták a naOx-aminosavak, valamint fluorofor-peptid konjugátumok irodalomban mind ez ideig ismeretlen csoportját. A jelzett peptidok segítségével kimutatták, hogy bizonyos N-terminálisból származó peptidok jelentős mértékben kötődnek a szolubilis IL-6 receptorhoz. E kutatások IL-6 agonista/antagonista hatású vegyületek kifejlesztéséhez vezethetnek.

A kutatócsoport tagjai 1996 és 1998 között 42 cikket és 17 könyvrészletet publikáltak. Ezek közül 55 jelent meg angol nyelven. A kutatók 61 alkalommal tartottak előadást nemzetközi, 21 esetben pedig hazai konferencián. Meghívottként előadtak nemzetközi konferencián 6 alkalommal. Eredményeiről az MTA Peptidkémiai és az MTA Bioorganikus Kémiai Munkabizottságainak ülésein 45 esetben számoltak be. A kutatók három, az ELTE-n akkreditált PhD-programban témavezetőként vesznek részt. Négy hallgató nyert el PhD-fokozatot. Jelenleg nyolcan folytatják tanulmányaikat. A csoportban 10 hallgató készített diploma-, 12 hallgató pedig tudományos diákköri dolgozatot az elmúlt 3 évben. A csoport tevékenységét a hazai és nemzetközi tudományos együttműködés jellemezte.

A kollaborációk sikerét nemzetközi szervezetek (WHO, Európai Közösség, Európai Rákkutató Társaság), valamint kétoldalú programok (ELTE-Free University,

Brüsszel, Magyar–Francia Balaton, Magyar–Spanyol, Magyar–Indiai) segítették. A kutatásokat az OTKA, OMFB, Népjóléti Minisztérium és a Művelődési és Kulturális Minisztérium, valamint a WHO, az EU (COST) és az EACR támogatta.

### Publikációk

- Sartania N., Benyhe S., Magyar A., Rónai A. Z., Medzihradzky K., Borsodi A.: Opioid binding profile of morphiceptin, Tyr-MIF-1 and dynorphin-related peptides in rat brain membranes. *Neuropeptides*, 1996. 30:225–230.
- Pimm M. V., Hudecz F.: Biodistribution in tumour-bearing mice of polycationic, amphoteric and polyanionic branched polypeptides with poly(L-lysine) backbone labelled with  $^{125}\text{I}$  and  $^{111}\text{In}$ . *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1996. 122:45–54.
- Orosz G., Givens R. S., Schowen R. L.: A model for mechanism of peroxyoxalate chemiluminescence as applied to detection in liquid chromatography. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1996. 26:1–27.
- Likó Zs., Botyánszki J., Bódi J., Vass E., Majer Zs., Hollósi M., Süli-Vargha H.: Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the secondary structure of linear and cyclic collagen sequence analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996. 227:351–359.
- Benyhe S., Ketevan A., Simon J., Hepp J., Medzihradzky K., Borsodi A.: Affinity labelling of frog brain opioid receptors by dynorphin-(1-10) chloromethyl ketone. *Neuropeptides*, 1997. 31:52–59.
- Bódi J., Süli-Vargha H., Ludányi K., Vékey K., Orosz G.: New strategy for the synthesis of large peptides as applied to the c-terminal cysteine-rich 41 amino acid fragment of the mouse agouti protein. *Tetrahedron Letters*, 1997. 38:3293–3296.
- Mező G., Kajtár J., Nagy I., Szekerke M., Hudecz F.: Carrier design: Synthesis and conformational studies of poly[L-Lys] branched polypeptides with OH groups. *Biopolymers*, 1997. 42:719–730.
- Süli-Vargha H., Morandini R., Bódi J., Nagy L., Medzihradzky-Schweiger H., Ghanem G.: In vitro cytotoxic effect of difluoromethylornithine increased non-specifically by peptide coupling. *J. Pharm. Sci.*, 1997. 86:991–1000.
- Tímár F., Botyánszki J., Süli-Vargha H., Babó I., Oláh J., Pogány G., Jeney A.: The antiproliferative action of a melphalan-hexapeptide with collagenase cleavable site. *Cancer. Chem. Pharm.*, 1998. 41:292–298.
- Bősze Sz., Kajtár J., Szabó R., Falus A., Hudecz F.: Synthesis, solution conformation and interleukin-6 related activities of IL-6 peptides. *J. Peptide Research*, 1998. 52:216–228.
- Gaál D., Hudecz F.: Low toxicity and high antitumour activity of daunomycin by conjugation to immunopotential amphoteric branched polypeptide. *Eur. J. Cancer.*, 1998. 34:155–161.
- Mező G., Mihala N., Kóczán Gy., Hudecz F.: Cyclohexyloxycarbonyl based orthogonal solid phase peptide synthesis in Boc chemistry. *Tetrahedron*, 1998. 54:6757–6766.

- Nagy I. B., Haro I., Alsina A., Reig F., Hudecz F.: Interaction of branched chain polymeric polypeptides with phospholipid model membranes. *Biopolymers*, 1998. 46:169–179.
- Nishiuchi Y., Inui T., Nishio H., Bódi J., Kimura T., Tsuji F. I. et al.: Chemical synthesis of the precursor molecule of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998. 95:13549–13554.
- Peták I., Mihalik R., Bauer P. I., Süli-Vargha H., Sebestyén A., Kopper L.: BCNU is a caspase-mediated inhibitor of drug-induced apoptosis. *Cancer Research*, 1998. 58:614–618.
- Prachand M. S., Dhingra M. K., Saran A., Coutinho E., Bódi J., Süli-Vargha H., Medzihradzky K.: Comparative conformational studies on cyclic hexapeptides corresponding to message sequence His-Phe-Arg-Trp of  $\alpha$ -melanotropin by NMR. *J. Peptide Research*, 1998. 51:251–265.
- Uray K., Price M. R., Hudecz F.: Localisation of a protein core specific epitope from gastrointestinal mucin (MUC2). *J. Peptide Science*, 1998. 4:319–326.
- Várnagy K., Sóvágó I., Goll W., Süli-Vargha H., Micera G., Sanna D.: Potentiometric and spectroscopic studies on transition metal complexes of bis(imidazolyl) and bis(pyridyl) derivatives of amino acids. *Inorg. Chim. Acta*, 1998. 283:233–242.
- Wilkinson K. A., Vordermeier M. H., Kajtár J., Jurcevic S., Wilkinson R., Iványi J., Hudecz F.: Modulation of peptide specific T cell responses by non-native flanking regions. *Mol. Immunol.*, 1998. 34:1237–1246.
- Wilkinson K. A., Vordermeier M. H., Wilkinson R., Iványi J., Hudecz F.: Synthesis and in vitro T cell immunogenicity of conjugates with dual specificities: attachment of epitope peptides of 16 kDa and 38 kDa proteins from *M.tuberculosis* to branched polypeptide. *Bioconjugate Chemistry*, 1998. 9:539–547.