
MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
TÁMOGATOTT KUTATÓHELYEK

TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK
1999–2002

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST • 2003

A kötet szerkesztői

Halász Béla
Hazai László
Hunyady György
Medzihradzsky Kálmán
Paál Huba
Papp László
Standeisky Éva

ISBN 963 508 422 6

Kiadja
a Magyar Tudományos Akadémia
Kiadásért felel: Paál Huba, Támogatott Kutatóhelyek Irodája
Nyomdai előkészítés: MTA Történettudományi Intézet kiadványcsoportja
Kiadói szerkesztő: Kovács Éva
Tördelés, borító: Csányi Attila
Nyomdai munkálatok: Akaprint Nyomdaipari Kft.
Felelős vezető: Freier László igazgató
Készült 60 (A/5) ív terjedelemben, 600 példányban

MTA-ELTE PEPTIDKÉMIAI KUTATÓCSOPORT

HUDE CZ FERENC, a kémiai tudomány doktora

1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A

Tel.: (1) 372 28 28

Fax: (1) 372 26 20

E-mail: fhudecz@ludens.elte.hu

A kutatócsoport tudományos tevékenységének központjában biológiailag aktív peptidok, peptidszarmazékok, valamint peptid-kimérák és konjugátumok szintézise, új szerkezet-hatás típusú törvényszerűségek feltárása áll. Olyan vegyületeket terveznek, állítanak elő és jellemeznek, amelyek megalapozhatják peptid-antigének, ill. gyógyszerhatóanyagok kifejlesztését. A kutatások három témakörre koncentrálnak. Immunokémiai kutatások keretében foglalkoznak mucin glikoproteinek (MUC1 és MUC2), *Herpes simplex vírus* D glikoprotein, *Mycobacterium tuberculosis* 16 kDa és 38 kDa, valamint hsp 60 protein antigén-szerkezetének feltérképezésével. Előállítanak és jellemeznek új típusú szintetikus peptid-antigéneket és immunogéneket. A rákkemoterápiai kutatások célja tumorelles szerep hatékonyságának növelése, peptid-tumorelles szer biokonjugátumok szintézise, jellemzése és a hatás tanulmányozása. Az elmúlt években kiemelten foglalkoztak a Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases (TIMP) – 1 metalloproteináz inhibitor vizsgálatával is. A neuropeptidok tanulmányozása, előállítása és vizsgálata területén opioid és nociceptin agonista/antagonista peptidok, valamint analógjaik kutatása, új enzimrezisztens és szuperaktív vegyületek előállítása áll a középpontban.

AZ IMMUNOKÉMIAI KUTATÁSOK egyik kulcskérdése a fehérjék ellenanyagválasz kiváltásáért felelős szakaszainak (B-sejt epitópok), illetve a sejt immunválasz létrejöttéért felelős régióinak (T sejt epitópok) azonosítása. A fehérjék epitópszervezetének ismerete lehetővé teszi olyan mesterséges peptidok, peptidszarmazékok, kimérák és biokonjugátumok racionális tervezését és előállítását, amelyek orvosbiológiai (pl. tumorelles peptidvakcinák) és/vagy diagnosztikai (pl. TBC vagy *Herpes simplex vírus* fertőzés specifikus kimutatása) gyakorlat számára is hasznosítható adatokat nyújtanak. A csoport ezért a korábban azonosított lineáris epitópok ismeretében előállított módosított származékokat, ciklust tartalmazó variánsokat, epitóp kimérákat és epitóp peptid-konjugátumokat. E téma művelése az EU FP5 és FP6 programjainak kiemelt kutatási irányzatai közé tartozik. A kutatócsoport munkájának és eredményeinek elismeréseként is tekinthető, hogy az EU COST Chemistry A16 keretében 2000-től elindíthaták és koordinálják azt a programot, amelyben 5 ország 7 laboratóriuma vesz részt és amelynek célkitűzése mesterséges antigének előállítása és funkció-

nális vizsgálata. E kérdések megválaszolására – korábbi eredményeik alapján – modellként három fehérjét választottak ki.

– *Ellenanyag (B-sejt-) epitópot tartalmazó mucin peptidszármazékok.* Céljuk az emlő, ill. vastagbél karcinomával kapcsolatos mucin-1/mucin-2 (MUC1/MUC2) fehérje ellenanyag-epitópot tartalmazó peptidvariánsok szintézise és ellenanyagkötődési tulajdonságaik vizsgálata volt. Kémiai szintézissel előállítottak olyan toxin-kiméra molekulákat (13-34 aminosavrész), amelyek a 2 diszulfid híddal rögzített szerkezet adott szakaszán MUC1 epitópot tartalmaznak. A lineáris, az egy-, ill. kétciklusos peptidok összehasonlító elemzése rámutatott arra, hogy a ciklizálás következményeként létrejövő béta-kanyar szerkezet elengedhetetlen a hatékony ellenanyag felismeréshez.

Felismerték, hogy a MUC-2 glikoprotein TGTQ szekvenciájú B sejt epitóp ellenanyaghoz való kötődésében az N-terminálison kapcsolódó „lebegő szakasznak” kiemelt szerepe van, ennek oka e régió fokozott béta-kanyar képző képessége. Bizonyították, hogy e szakasz D-aminosavat is tartalmazhat, ami nem befolyásolja az ellenanyag-kötődést mértékét.

– *Neutralizáló epitóp peptidok a Herpes simplex vírus (HSV) D glikoproteinből.* Céljuk a vírusspecifikus immunválasz (immunogenitás) fokozása volt. Kémiai szintézissel a HSV D glikoprotein két szekvencia részletéből új mono- és biciklusos peptidsorozatot, valamint α -konotoxin kimérákat állítottak elő. Tanulmányozták e vegyületek térszerkezetét és ellenanyagkötődését. Felismerték, hogy az epitópszakaszokból kialakított ciklusos származékok gyűrűnagysága jelentősen befolyásolja az ellenanyag-felismerést, egyetlen metilén-csoport-többlet jelenléte a gyűrűben az aktivitás teljes elvesztését idézheti elő. Kimutatták azt is, hogy a kimérába beépített epitópszakasz megőrizte specifikus biológiai sajátosságait. Módszert fejlesztettek ki olyan új peptid-konjugátumok előállítására, amelyekben HSV ellenanyag-epitópot kapcsolódik tioéter kötéssel a hordozóhoz.

– *Tuberculin fehérjék T sejt epitópjainak azonosítása.* Kutatásaik célja a TBC fertőzésre jellemző általuk lokalizált *M. tuberculosis* fehérje eredetű T-sejt epitópot immunválaszt kiváltó képességének fokozása volt. Elsőként mutatták ki, hogy a funkcionális T sejt epitóp peptid megőrzi hatékonyságát szintetikus, makromolekulához történt kovalens kapcsolás után is, sőt az *in vitro* T sejt proliferáció mértékét a konjugátum hordozó része jelentősen befolyásolja. Előállítottak új típusú peptid-konjugátumokat, amelyekben *M. tuberculosis* fehérje specifikus T sejt epitópot kapcsolódik biológiai közegben is stabil, tioéter kötéssel a hordozóhoz.

A RÁKKEMOTERÁPIÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ KUTATÁSAIK központi kérdése a tumorspecifikus hatás elérése. Ezért tumorellenes ágenst tartalmazó peptid-biokonjugátumok előállításával és vizsgálatával, valamint új potenciális hatóanyagok azonosításával (pl. Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases [TIMP] – 1 metalloproteináz inhibitor) foglalkoztak. Kutatásaik célja olyan összefüggések feltárása, amelyek hosszabb távon a daganatterápia hatékonyságát javíthatják.

– *Tumorellenes szer – peptid-konjugátumok szintézise és jellemzése.* Peptid-hordozókkal kapcsolatos kutatásaikat kiterjesztették annak vizsgálatára, hogy a

sejtmembránt modellező foszfolipid membránok és a polipeptidek közötti kölcsönhatást milyen tényezők befolyásolják. Megállapították, hogy a polipeptid és a foszfolipid kettősréteg (liposzóma) töltése, a peptid oldalláncok, ill. a kettősréteg összetétele és felépítése határozza meg a kölcsönhatást. Megfigyelték, hogy amfoter polipeptidek liposzóma jelenlétében rendezett térszerkezetet vesznek fel. Ezzel párhuzamosan oldalláncaik a foszfolipid kettősréteg belső régiójával is kapcsolatba kerülnek. Tanulmányozták e polipeptidek kemotaktikus hatását egysejtű modellen. Megállapították, hogy e vegyületek – a kémiai szerkezettől függően – jelentősen eltérő kémiai szignált jelentenek a sejtek számára. Új eljárást dolgoztak ki metotrexát – polipeptid konjugátumok előállítására. *In vivo* kísérletekben kimutatták, elsőként a szakirodalomban, hogy e vegyületek nemcsak tumorelleses, hanem jelentős *Leishmania donovani* parazitaellenes hatással is rendelkeznek. A polikation típusú peptidet tartalmazó származék a szabad metotrexáthoz képest is csökkentette a paraziták számát. Előállítottak két új, tumorelleses hatású oligotuftsin polipeptidet és GnRH-III hormont tartalmazó konjugátumot.

Előállították a TIMP-1 C-terminális, 59 aminosavból álló és öt diszulfid kötetést tartalmazó doménjének megfelelő teljesen védett lineáris peptidet, valamint fragmensek sorozatait. A komplex nagy tagszámú peptid előállítása során felmerült nehézségek megoldására új fragmenskondenzációs módszert dolgoztak ki. Megfigyelték, hogy a TIMP-1 doménjéből származó (szabad) peptidek között vannak olyanok, amelyek MCF-7 emlőkarcinóma sejteken növekedési-faktorszerű hatást mutatnak.

NEUROPEPTIDEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK SZINTÉZISE. Előállítottak olyan új endomorfín és endomorfínol származékokat, amelyek – inaktíválódáshoz vezető – enzimatis hasítással szemben ellenállóak. E vegyületek D-aminosavat, ill. N-alkil csoportot tartalmaznak. Előállítottak hatásos agonista, ill. antagonistá sajátágot mutató nociceptin-analógokat. Új, karbamoil és redukált peptidkötést tartalmazó nociceptin peptidszármazékok szintézisét oldották meg. A vegyületek farmakológiai vizsgálata során MVD (egér vas deferens) izolált szerv preparátumon kiváltott simaizom összehúzódást regisztrálva következtettek a vegyületek agonista/antagonista tulajdonságaira.

A kutatócsoport tagjai 1999 és 2002 között 60 cikket és 48 könyvrészletet publikáltak. Ezek közül 103 jelent meg angol nyelven. A kutatók 120 alkalommal mutattak be posztert/előadást nemzetközi, 51 esetben pedig hazai konferencián. Meghívottként előadtak nemzetközi konferencián 12 alkalommal. Eredményeikről az MTA Peptidkémiai és az MTA Bioorganikus Kémiai Munkabizottságainak ülésein 72 esetben számoltak be. A kutatók az ELTE-n akkreditált PhD-programban témavezetőként vesznek részt. Hét hallgató nyert el PhD-fokozatot. Jelenleg tizenketten folytatják tanulmányaikat. A csoportban 32 hallgató készített diploma-, 17 hallgató pedig tudományos diákköri dolgozatot az elmúlt 4 évben. A csoport tevékenységét a hazai és nemzetközi tudományos együttműködés jellemezte. A kollaborációk sikerét nemzetközi szervezetek (WHO, Európai Közösség, Európai Rákkutató Társaság) és programok

(ERASMUS), valamint kétoldalú programok (ELTE–Free University Brussels, magyar–lengyel, magyar–spanyol, magyar–indiai) segítették. A kutatásokat az OTKA, OM, Népjóléti Minisztérium és a Nemzeti Kulturális Örökség Minisztériuma, valamint a WHO, az EU5, COST, EACR és az European Peptide Society, a Milleneumi Richter Alapítvány, az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért támogatta.

Publikációk

- Botyánszki J., Bódi J., Stratford I. J., Süli-Vargha H.: Synthesis and cytotoxic activity of N-(2-chloroethyl)-N-nitroureas and N-(2-chloroethyl)-N-nitrocarbamates. *Anti-Cancer Drugs*, 1999. 10:903–909.
- Hudecz F., Pimm M. V., Rajnavölgyi É., Mező G., Fabra A., Gaál D., et al.: Carrier design: New generation of polycationic branched polypeptides containing OH groups with prolonged blood survival and diminished in vitro cytotoxicity. *Bioconjugate Chemistry*, 1999. 10:781–790.
- Szatmári I., Orosz G., Medzihradzky K., Borsodi A.: Affinity labeling of delta opioid receptors by an enkephalin- derivative alkylating agent, DSLET-Mal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999. 265:513–519.
- Mező G., Drakopoulou E., Paál V., Rajnavölgyi É., Vita C., Hudecz F.: Synthesis and immunological studies of a-conotoxin chimera containing an immunodominant epitope from the 268–284 region of HSV gD protein. *J. Peptide Research*, 2000. 55: 7–17.
- Mező G., Mihala N., Andreu D., Hudecz F.: Conjugation of epitope peptides to branched chain polypeptides via Cys(Npys). *Bioconjugate Chemistry*, 2000. 11:484–491.
- Nagy I. B., Varga I., Hudecz F.: Preparation method of In(III)-labelled DTPA-peptides purified by 8-hydroxy quinoline. *Analytical Biochemistry*, 2000. 287:17–24.
- Uray K., Kajtár J., Vass E., Price M. R., Hollósi M., Hudecz F.: Effect of D-amino acid substitution in a Mucin 2 epitope on mucin-specific monoclonal antibody recognition. *Arch. Biochemistry and Biophysics*, 2000. 378:25–32.
- Al-Khrasani M., Orosz G., Kocsis L., Farkas V., Magyar A., Lengyel I., et al.: Receptor constants for endomorphin-1 and endomorphin-1-ol indicate differences in efficacy and receptor occupancy. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001. 421:61–67.
- Hudecz F.: Design of synthetic branched chain polymeric polypeptides for targeting/delivering bioactive molecules. In: Agelli A., et al. (eds): *Self-Assembling peptide systems in biology, medicine and engineering*. Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 2001. 139–160.
- Igaz P., Bősze Sz., Tóth S., Falus A., Hudecz F.: C-terminal peptides of interleukin-6 modulate the expression of the junB protooncogen and the production of fibrinogen by HepG2 cells. *Biol. Chem.*, 2001. 382:669–676.

- Kóczán Gy., Csík G., Csámpai A., Balog E., Bősze Sz., Sohár P., et al.: Synthesis and characterisation of 4-ethoxymethylene-2-[1]-naphtyl-5(4H)-oxazolone and its fluorescent amino acid derivatives. *Tetrahedron*, 2001. 57:4589–4598.
- Mihala N., Bódi J., Gömöry Á., Süli-Vargha H.: An alternative solid phase peptide fragment condensation protocol with improved efficiency. *J. Peptide Sci.*, 2001. 7:565–568.
- Desai P., Prachand M., Coutinho E., Saran A., Bódi J., Süli-Vargha H.: Activity and conformation of a cyclic heptapeptide possessing the message sequence His-Phe-Arg-Trp of α -melanotropin. *International J. Biological Macromolecules*, 2002. 30:187–195.
- Kóczán Gy., Ghose A. C., Mookerjee A., Hudecz F.: Methotrexate conjugate with branched polypeptide influences *Leishmania donovani* infection in vitro and in experimental animals. *Bioconjugate Chemistry*, 2002. 13:518–524.
- Windberg E., Hudecz F., Marquardt A., Sebestyén F., Kiss A., Bősze Sz., et al.: Analysis of combinatorial libraries of mucin-2 antigen peptides by high resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002. 16:34–39.