

2. sz. PROJEKT FENNTARTÁSI JELENTÉS

(2021.09.29. – 2022.09.28.)

A VEKOP-2.3.3-15-2016-00020 projekt célja a nemzetközi elvárásoknak megfelelő műszeregyüttes beszerzése és helyezése: kromatográfiás és tömegspektrometriás platform (UHPLC-MS/MS), számítógép-vezérelt „félpreparatív” folyadékkromatográf (HPLC) és a atomi erő mikroszkóp (Nanosurf Fluid-AFM).

A műszerek segíti a kutatásokat: a) növényi/illetve gomba eredetű metabolit „ujjlenyomatok” és ismeretlen vegyület azonosítását, b) új antimikrobakteriális/tumorelleses hatóanyag-peptid konjugátum előállítását, jellemzését, c) intelligens nanohordozók előállítását, sejtmembránra gyakorolt hatásának vizsgálatát. Az eredményeket az elmúlt évben 6 nemzetközi folyóiratcikkben és 4 előadásban közzétettük. A műszeregyüttes hatékonyan segítette az oktatást és a kutatási pályázatokat.

**1. Tudományos kutatási eredmények**

**a) Növényi/gomba eredetű metabolit-ujjlenyomat, vegyületek azonosítása.**

Folytattuk a *Linum* nemzetség tanulmányozását: fő eredményként egy hidroxifahéjsav-származék eddigi legnagyobb mennyiségű előfordulását, ill. 3 ariltetralin lignánt mutattunk ki. A rokonságban álló *Chaerophyllum* és *Physocaulis* (Apiaceae) nemzetség 2 fajának szerveiből, kivonatokból ismert flavonoid- és kávésav-származékok mellett egy, valószínűleg új metabolit kimutatása (a szerkezetbizonyítása folyamatban). A törökmogyoró gyógyászati szempontból jelentős diarilheptanoid és flavonoid típusú anyagcseretermékei membrán penetrációjának és stabilitásának vizsgálatokor e vegyületek szerkezetazonosításában nélkülözhetetlen szerepet kapott az Orbitrap MS készülék (Felegyi-Tóth, C.A. et al., Pharmaceutics 2022).

*In vitro* gombatenyészetek metabolit-vizsgálata során: 1) Különböző élőhelyekről, pázsitfűfélék gyökereiből származó, 106 *Darksidea* izolátum metabolit-összetételének elemzése során 16 vegyületet izoláltunk/azonosítottunk, közülük 4 új természetes vegyületnek bizonyult. 2) Gyógynövények földbeli szerveiből származó 24 *Cadophora* törzs metabolit-összetételének analizisekor számos összetevőt detektáltunk (szerkezetazonosítás folyamatban).

**b) Új antimikrobakteriális/tumorelleses hatóanyag-peptid konjugátumok előállítása és jellemzése.**

Nagyszámú szerves vegyület szerkezetvizsgálatát, pontos molekulatömeg-meghatározását végeztük el, tisztított vegyületek esetén elsősorban az idő- és anyagtakarékos közvetlen injektálási módszerrel, oldószeráramban.

Számos peptid-hatóanyag konjugátum illetve liposzómákba csomagolt hatóanyag biohasznosulásának és farmakokinetikai tulajdonságát, *in vitro* és *in vivo* stabilitását vizsgáltuk. Meghatároztuk a felszabaduló szabad hatóanyag és az aktív metabolit mértékét vérplazmában vagy tumorsejtekben fontos a szerkezet-hatás összefüggések felderítése érdekében. A konjugátumok, a hatóanyagok stabilitásának követésére, a keletkező metabolitok szerkezetbizonyítására, szemikvantitatív meghatározására LC-MS vagy LC-MS/MS módszereket fejlesztettünk a beszerzett, HPLC-Orbitrap MS készüléken.

A két legjobb irányító hatással rendelkező GnRH-III analóghoz daunomicint (Dau) illetve paclitaxelt kapcsoltunk Katepszin B enzimmel hasítható illetve nem hasítható linkerrel keresztül. A szerkezetileg jellemezett konjugátumok metabolizmusát (patkány máj lizoszóma preparátumban) követtük az Orbitrap LC-MS készülékkel. Megállapítottuk, hogy mind a Dau, mind a paclitaxel esetében szükséges a szabad hatóanyag felszabadulása a biológiai aktivitáshoz. Ezen információk hasznosak új konjugátumok tervezéséhez. (Schuster S., et al., Int. J. Mol. Sci. 2022).

Irányító molekulával dekorált liposzómákat is használtunk hatóanyagok célzott tumorsejtbe juttatására. A szabad és formulázott hatóanyag *in vitro* sejtfelvételét, *in vivo* stabilitását és biodisztribúcióját HPLC-MS/MS módszerrel tanulmányoztuk. A hatóanyag sejtfelvétele összefüggést mutat a biológiai aktivitással *in vitro* modellekben. Megállapítottuk, hogy a liposzómába csomagolt hatóanyag *in vivo* stabilitása és felhalmozódása (májban, lépben, vesében, primer tumorban, szívben, tüdőben) függ a liposzóma felszínén használt irányító peptidről, és a felszín telítettségéről (Vári B., et al., elbírálás alatt 2022).

További új, az irodalomban nem szereplő *in vitro* antituberkulotikus hatású származékokat állítottunk elő. Az új, szalicilanilid alapú antituberkulotikus vegyületeket jellemeztük és biohasznosíthatóságának növelése érdekében előállítottuk tuftsin típusú hordozó peptiddel képzett konjugátumait, jellemeztük fiziko-kémiai és *in vitro* funkcionális tulajdonságait (Horváth, L.B. et al. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2022).

Mannóz-kötő, lektin-kapcsolt szerin proteáz inhibitor ciklopeptidek szerkezetének optimalizálása során vizsgáltuk a variánsok szérumban stabilitását LC-MS készülékkel. A hatásbeli különbségek a szerkezeti változások kötődésre gyakorolt hatására vezethetők vissza, amelyet nem befolyásol a ciklopeptidek szérumban stabilitása. (Dürvanger Z., et al., ACS Chemical Biology 2022).

Tumorellenes hatású imipridon-ferrocén hibridvegyületek ESI-MS alapú azonosítását végeztük el közvetlen injektálási módszerrel. Az *in vitro* biológiai analízis során hatékony vegyületeket azonosítottunk (Czuczai T., et al., Pharmaceuticals 2022). Többféle tömegspektrométer alkalmazásával optimalizáltuk a citrullin tartalmú peptidek MS/MS szekvenálásának körülményeit, vizsgáltuk többféle proteomikai keresőmotor jóságát. Energiafüggő tandem MS kísérletekben a peptidekre jellemző fragmentációs útvonalak elemzése során meghatároztuk azokat a körülményeket, amelyeknek alkalmazásával a módosítás a leghatékonyabban azonosítható (Steckel A., et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2022).

**c) Intelligens nanoméretű hordozók előállítása, hatóanyag-konjugátumok sejtmembránra gyakorolt hatásának vizsgálata.**

Vizsgáltuk a különböző para-aminoszalicilsav származékok és peptid konjugátumok membrán affinitását és sejt toxicitását. A szilárd felületen immobilizált sejtek membrán morfológiájára gyakorolt hatását AFM mérésekkel tanulmányoztuk. Különbségeket lehetett találni a különböző készítmények által indukált membrán érdesség értékekben, amelyeket párhuzamba lehetett állítani a toxicitás mérések eredményeivel (Horváth, L.B. et al. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2022).

## 2. Folyamatban lévő kutatások

### a) Növényi/gomba eredetű metabolitok, metabolit-ujjlenyomat, ismeretlen vegyületek azonosítása.

A növényi és gomba eredetű biológiailag aktív hatóanyagok azonosítása mellett folyamatban van újabbak szerkezetbizonyítása (Orbitrap MS/MS). Új vegyületek azonosítása mellett várható már ismert vegyületek új forrásainak identifikálása.

### b) Új antimikrobakteriális/tumorelles hatóanyag-peptid konjugátumok előállítása és jellemzése.

Növényi/gomba eredetű metabolitok antibakteriális hatásának *in vitro* tesztelése során vizsgáljuk a vegyületek különböző intracelluláris baktérium gazdasejt modelleken.

Folytatjuk a tumorsejtek (pl. tumor őssejt) elpusztítására képes peptid-hatóanyag konjugátumok előállítását és jellemzését, különös tekintettel a CD44v3 és CD44v6 receptorok célzására alkalmas peptidekre és konjugátumaikra.

Folyamatban van antibakteriális hatású szekvenciális oligopeptidek zsírsav származékainak előállítása és jellemzése, valamint új, peptid alapú antibakteriális antigének szintézise vakcinák kialakítása céljából.

A „A COVID-19 JÁRVÁNYRA ADOTT KOMPLEX JÁRVÁNYÜGYI ÉS KLINIKAI VÁLASZ” pályázati munkához tartozó kutatásainkat folytattuk. Munkánk során új, irodalomban eddig nem szereplő, potenciális antivirális hatású vegyületeket azonosítottunk. Szabadalmat nyújtottunk be (P2100293, EP21191707.5). Szabadalmi bejelentés: Bősze Sz. et al. „Antiviral compound for use against SARS-CoV-2”; (Budapest, 2021. augusztus 18. illetve 17 August 2021). Közzététel várható időpontja: 2023. februárja; Érdemi vizsgálat kérelmezésének várható határideje: 2023. augusztusa.

### c) Intelligens nanoméretű hordozók előállítása, hatóanyag-konjugátumok sejtmembránra gyakorolt hatásának vizsgálata.

Megkezdődött az új, szén kvantumpont hatóanyag-hordozók fejlesztése. Demonstráltuk a peptidekkel történő konjugációra való alkalmasságot. Folytatódtak a biodegradábilis polimer és keverékeiken alapuló hordozó rendszerek fejlesztése.

Folytatódik a nagyfelbontású képképző technika orvosi biológiai alkalmazása (Premed Pharma Kft., debreceni Kenézy Gyula Kórház, miskolci Központi Kórház).

## 3. Tudományos eredmények közzététele

Az eredményekről dedikált egyetemi honlap (<https://pak.elte.hu/vekop-2-3-3-15-2017-00020>) útján folyamatosan tájékoztatjuk a szakmai közvéleményt. A műszeregyüttes használata révén elért új tudományos eredményeinket 6 nemzetközi folyóiratcikkben közzeltük (<https://pak.elte.hu/content/publikaciok.t.17512>) és 4 előadás hazai/nemzetközi konferencián, tartott előadásban mutattuk be 2021 október és 2022 október között (<https://pak.elte.hu/content/konferencia-megjelenesek.t.7294>).

2022-ben 2 PhD értekezés került benyújtásra és 1 dolgozat védésére került sor (<https://pak.elte.hu/content/bsc-msc-diplomadolgozatok-es-phd-ertekezések.t.7296>). A honlapon (<https://pak.elte.hu/content/tamogatott-projektek-elbiralas-alatt-allo-palyazatok.t.18808>) megtalálható az elnyert kutatási pályázatok listája. A tudományos eredmények elfogadottságát jelzi: a) az ELKH–

ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársai által elnyert két EU Horizon 2020, Marie Skłodowska-Curie ITN programban való részvétel (célzott tumorterápia [(Mező G., Grant 861316 (2019-2023)], vakcinák fejlesztés [(Horváti K., Grant 860325 (2019-2023))] magyar/külföldi diákok, PhD hallgatók bevonásával; b) 2021-ben elnyert két nemzetközi (CELSA belga-magyar, NKFIH szlovén-magyar) pályázat, c) Horváti K. MTA Lendület kutatási programja „Peptidalapú vakcinák: új formulációs stratégiák” (2021-2026).

#### **4. Oktatás, a nyilvánosság tájékoztatása**

A Biológiai Intézetben és a Kémiai Intézetben folyó képzés során BSc, MSc, PhD programok továbbra is használják a nagyfelbontású Orbitrap LC-MS és a bioerőmérő (AFM) készülékeket. Az ELTE anyagkutató, biológus, biotechnológia, vegyész MSc, a Semmelweis Egyetem gyógyszerész képzés, az ELTE biológiai és kémiai doktori (PhD) képzéseiben résztvevők megismerkedhettek az új vizsgálati módszerek által nyújtott lehetőségekkel. Egy öt napos gyakorlati képzés keretében 10 fiatal kutató vett részt fehérjék és peptidek LC-MS elemzésének elsajátításában. A kilenc MSc/PhD gyakorlati kurzust a 2021/22-es tanév két félévében 61 (köztük 12 nemzetközi, angolul oktatott) hallgató vette fel (<https://pak.elte.hu/content/oktatasi-tevekenyseg.t.17607>, táblázat).

E műszerek folyamatosan segítik a külső partnerekkel való együttműködést, a mérési szolgáltatási és a fejlesztési tevékenységeket.

2022. szeptember 30.

Összeállította

Dr. Borbély Adina Noémi  
tudományos munkatárs

Dr. Hudecz Ferenc  
témavezető