

**VEKOP-2.3.3-15-2017-00020**  
**1. sz. PROJEKT FENNTARTÁSI JELENTÉS**  
(2020.09.29. - 2021.09.28.)

A Kutatási infrastruktúra megerősítése pályázat keretében a VEKOP-2.3.3-15-2016-00020 projekt célja egy, a legmagasabb nemzetközi elvárásoknak megfelelő, három-komponensű műszeregyüttes beszerzése és kutatási/oktatási használatba helyezése volt: kromatográfiai és tömegspektrometriás elemző-platform (UHPLC-MS/MS), számítógép-vezérelt „félpreparatív” folyadékkromatográf (HPLC) és a bioerőmérő, atomi erő mikroszkóp (Nanosurf Fluid-AFM).

A műszerek segítségével kutatóink a) meghatároztak növényi illetve gomba eredetű metabolit „ujjlenyomatokat”, azonosítottak számos ismeretlen vegyületet, b) előállítottak és jellemeztek új antimikobakteriális és tumorelleses hatóanyag-peptid konjugátumokat, c) kialakítottak intelligens nanoméretű hordozókat, vizsgálták a konjugátumok sejtmembránra gyakorolt hatását. Az eredményeket az elmúlt évben 9 nemzetközi folyóiratcikkekben és 11 előadásban közöltük. A műszeregyüttes hatékonyan segítette az oktatást és a kutatási pályázatok megvalósítását.

## **1. Tudományos kutatási eredmények**

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

Növényi minták feldolgozásával folytattuk a *Linum* nemzetségbe tartozó 5 faj növénykémiai vizsgálatát. Tanulmányoztuk a *Mentha* nemzetség (4 faj) természetes élőhelyi és *in vitro* mintáit, a *Gaultheria procumbens* levél mintáit, *Juglans nigra*, *Artemisia austriacum* és *Ononis spinosa* kivonatait. Azonosítottunk a fenoloidok csoportjába tartozó (lignánok, flavonoidok, szalicilsav- és naftokinon származékok) összetevőket. Két, más növényi forrásból már ismert ariltetralin lignán azonosítása mellett két, eddig nem ismert lignán szerkezetét bizonyítottuk.

*In vitro* gomba tenyészetek metabolit vizsgálatai során *Aspergillus* izolátumokból (10) egy antrakinon származék izolálása és szerkezetazonosítása történt meg, 2 faj (*Periconia macrospinoso*, *Cadophora* sp.) metabolit-profilját vizsgáltuk eltérő táptalajon és kezelések mellett összesen 104 mérésel. Négy izokumarin-származék azonosítása mellett, 3 vegyület szerkezetét bizonyítottuk. Tizenhat különböző tömlősgomba nemzetség összesen több, mint 200 izolátumát vizsgáltuk, elkészítettük metabolit profiljukat és a metabolitok optimális kinyeréséhez nyersanyagot kerestünk. E kutatás során számos ismert vegyület új forrásait azonosítottuk. A hatástani vizsgálatokhoz az izolált vegyületek rendelkezésre állnak.

### **b) Új antimikobakteriális és tumorelleses hatóanyag-peptid konjugátumok előállítása és jellemzése.**

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

Természetes eredetű, szerkezetileg jellemzett növényi/gomba eredetű metabolitok *in vitro* antitumor tesztelését végeztük el, számos hatékony jelöltet definiálva (Berek-Nagy et al. *Phytochem.*, 2021; Zürn et al. *Int J Mol Sci.*, 2021).

Sejtpenetráló peptidok szerkezetét tanulmányozva igazoltuk, hogy különböző módosítások (pl. fluoreszcens jelölések) befolyásolják a peptidok szerkezetét, valamint sejtbefutását (Sebák et al. ACS Omega. 2021). Bizonyítottuk, hogy e peptidok kémiai sajátságai és intracelluláris lokalizációja kontrolláltan változtatható.

Membrán-aktív peptidok szerkezetét és *in vitro* biológiai aktivitását vizsgáltuk különböző kismolekulák jelenlétében. Megállapítottuk, hogy egyes gyógyszer-molekulák (pl. hemin származékok, ételfesték molekulák) jelentősen befolyásolják a peptidok szerkezetét/aktivitását; így hozzájárulhatnak bizonyos kórképek kialakulásához (pl. krónikus gyulladások) (Juhász et al. Sci Rep., 2021).

Hatóanyagok és hordozó peptidok penetrációs sajátságainak jellemzésére szöveti miliót modellező sferoid rendszereket és Transwell alapú barrier modelleket fejlesztettünk (Baranyai et al. J Med Chem. 2021; Horváti et al. Front Immunol. 2021).

Új antimikobakteriális, tuberkulózis baktérium ellenes hatóanyagokat konjugáltunk peptid hordozókkal. Megállapítottuk, hogy a gyógyszer-molekula intracelluláris *M. tuberculosis* baktérium ellenes hatása jelentősen fokozódott. E mikroba jelentős szerepet játszik a látens fertőzések, a nehezen kezelhető gyógyszer rezisztens betegségek esetében (Horváti et al., Front Immunol. 2021).

A célzott tumorterápiára alkalmas peptid-hatóanyag konjugátumok biohasznosíthatóságának megállapítására vizsgáltuk e vegyületek *in vitro* és *in vivo* stabilitását, valamint a konjugátumból felszabaduló szabad hatóanyag, vagy annak aktív metabolitja mértékét tumorsejtekben. Ezért a konjugátumok metabolizmus vizsgálata is nagyon fontos a szerkezet-hatás összefüggések felderítése érdekében. Elsősorban neurotensin és bombesin receptorra specifikus, illetve plektin fehérjét felismerő konjugátumokat vizsgáltunk. E vegyületekben a klinikumban alkalmazott tumorellenes daunomicint (Dau), kapcsoltunk irányító peptidokhoz oxim-kötéssel. Az oxim-kötés stabil, ami előnyös az intakt konjugátum tumorsejtbe/ tumorsejtbe juttatásában, de a sejtbefutást követően a lizoszómális degradáció során is csak nagyon kis mértékben szabadul fel a Dau. A fő aktív metabolit a Dau=Aoa-Aaa-OH (ahol az Aoa aminooxiacetil-csoport, míg az Aaa az első aminosav). Az Aaa típusa és a szekvenciális környezete jelentősen befolyásolja a metabolizmus sebességét, a keletkezett metabolitok összetételét és ezáltal a konjugátumok tumorellenes hatását. E tényezők hasonlóan fontos paraméterek a konjugátumok receptor kötődési/sejtbefutási affinitása mellett. E vizsgálatok segítségével a legtöbb esetben sikerült értelmezni olyan hatásbeli különbségeket, amik a sejtfelvétel-különbséggel nem magyarázhatók. Az eredmények révén jelentősen előre tudunk lépni az új konjugátumok tervezésében.

Más kísérletekben is folyamatos a szintézissel előállított vegyületek enzimstabilitásának vizsgálata patkány májból izolált lizoszóma preparátum jelenlétében, plazmában és/vagy szérumban. A metabolitok szerkezetbizonyítását és szemikvantitatív meghatározását HPLC elválasztás után LC-MS vagy LC-MS/MS módszerrel végezzük. Módszertani fejlesztésként pl. HILIC-MS/MS detektálási módszert dolgoztunk ki glikánok szerkezetvizsgálatára, kvantitatív meghatározására antranilsavas származékképzést követően. E módszerrel részletesen vizsgáltuk egy tumoros megbetegedésben szenvedő csoport vérmintáit. Megállapítottuk, hogy az alfa-savas glikoprotein (AGP) fukozilációs mintázata jellegzetes változást mutat rosszindulatú melanoma esetén. A statisztikai elemzés rámutatott arra, hogy a mintázat változása jobb biomarkerként használható, mint a diagnosztikai célra egyébként elterjedten használt S100B fehérje (Virág, D. et al. Molecules, 2021).

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

Rákellenes hatóanyagok peptid-konjugátumainak membránaffinitását vizsgálva megállapítottuk, hogy a SynB3 sejt-penetráló peptid jelenléte hatóanyag-peptid konjugátumokban nagymértékben növeli a daunomicin membránaffinitását. A penetrációs mérésekben monoréteggként a „brain extract polar lipid” keveréket alkalmaztuk, ami a vér-agy gát lipid összetételét modellezi. A membránaffinitás mérés szerint ígéretes konstrukciók kiváló sejtes internalizációt mutattak.

Egy másik vizsgálat sorozatban bebizonyosodott, hogy hatóanyag-peptid konjugátumok, melyek jelentős membránaffinitást és sejt-felvételt mutatnak, nem roncsolják a membránt, integritásuk lényegében megmarad. Erre a következtetésre immobilizált sejteken végzett AFM mérések segítségével jutottunk. A szilárd hordozóra rögzített, kezelt és fixált sejtek felszínén nagyfelbontású morfológiai méréseket végezve analizáltuk az érdeességet, és megállapítottuk, hogy a hatóanyag konjugátummal való kölcsönhatás szignifikáns változást nem okozott.

## 2. Folyamatban lévő kutatások

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

Folytatjuk növényi mintákban új természetes metabolitok és ismert metabolitok új forrásainak feltárását. A gombákra irányuló kutatások is folytatódnak (metabolit profilozás, új vegyületek azonosítása, vizsgálata) egyre erősödő hangsúllyal a gomba-baktérium kölcsönhatások másodlagos anyagcseretermékek termelésére gyakorolt hatásának és a fajon belüli variabilitás kérdésének vizsgálatára. Ezen kutatások során izolált, szerkezetazonosított természetes vegyületeket biológiai hatásvizsgálatra készítünk elő.

### b) Új antimikrobakteriális és tumorellenes hatóanyag-peptid konjugátumok előállítása és jellemezése.

Folyik új, antimikobakteriális hatású *N*-szubsztituált szalicilanilid vegyületek tervezése, szintézise és e vegyületek hatásának, szelektivitásuknak meghatározása MonoMac-6 sejteken. Az új hatóanyagokat peptidhordozókhoz kapcsoljuk és vizsgáljuk a szalicilanilid hatóanyagok felszabadulását, azonosítjuk a lizoszóma preparátumokkal történő inkubálás során felszabaduló degradációs termékeket.

További új, antitumor hatású szalicilanilidszármazékokat tervezünk és állítunk elő, a vegyületeket jellemezzük és vizsgáljuk a citosztikus hatást glioblasztóma sejteken.

Természetes eredetű, szerkezetileg jellemzett növényi és gomba eredetű metabolitok antibakteriális hatásának *in vitro* tesztelése során vizsgáljuk e vegyületek szelektivitását, különböző intracelluláris baktérium gazdasejt modelleken.

Célunk rezisztens tumorsejtek (pl. tumor őssejt) elpusztítására (is) képes peptid-hatóanyag konjugátumok tervezése, előállítása és jellemzése. Mind a szenzitív, mind pedig a rezisztens tumor típuson előforduló nukleolint specifikusan felismerő hatóanyag-konjugátumok szintézisével és szerkezeti/funkcionális jellemzésével foglalkozunk. Az irányító molekula optimálásában jelentős szerep jut a stabilitási és metabolizmus vizsgálatoknak, amelyekhez a pályázatban beszerzett HPLC-MS készülék nyújt nagy segítséget. Továbbá a tumor őssejteken (illetve más rezisztens sejteken) megjelenő CD44v3 és CD44v6 receptorok célzására alkalmas

peptideket/konjugátumaikat szintetizáljuk és vizsgáljuk a potenciális gyógyszerjelöltek kiválasztása céljából.

Tervezzük antibakteriális hatású szekvenciális oligopeptidek, zsírsav származékainak előállítását és jellemzését, valamint új, peptid alapú antibakteriális antigének szintézisét. Ez utóbbiak alkalmasak lehetnek szintetikus, biológiai eredetű komponenseket nem tartalmazó vakcinák előállítására. Az immunogenitás fokozására újfajta adjuvánsokat és formulációs eljárásokat dolgozunk ki nanoméretű hordozók és emulziók felhasználásával *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokhoz.

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

Folytatódik az új típusú, nanoméretű hordozók fejlesztése felületaktív anyag keverék alkalmazásával, valamint a nanoprecipitációval való kombinálás útján. Ily módon peptidek/fehérjék számára megfelelő hatóanyag-hordozó képezhető, amely lehetővé teszi a stabilizált állapotban való tárolást, illetve felhasználást.

Megkezdődött a nagyfelbontású képkalkotó technika orvosi biológiai alkalmazása a Premed Pharma Kft. szervezésében, a debreceni Kenézy Gyula Kórház, valamint a miskolci Központi Kórház szemészeti osztályaival. A szürkehályog műtéteknél használt phacoemulsifikációs tűk összehasonlító vizsgálata során elvégezzük a műtéti protokollnak megfelelően kezelt, és használt tűk morfológiai jellemzését mikroszkópos és AFM mérések segítségével. A nagyszámú mintakészlet eredményei alapján várhatóan következtetést tudunk levonni az egyszerű és többször használatos tűk igénybevételéről és ajánlott alkalmazásáról.

## 3 . Tudományos eredmények közzététele

A projekt tudományos eredményeiről dedikált egyetemi honlap (<https://pak.elte.hu/vekop-2-3-3-15-2017-00020>) útján folyamatosan tájékoztatjuk a szakmai közvéleményt. A VEKOP keretében beszerzett műszeregyüttes használata révén elért új tudományos eredményeinket 7 nívós nemzetközi folyóiratcikkekben, angol nyelven közzeltük. Érdemes megjegyezni, hogy a zárójelentésben jelzett, korábban beküldött 3 cikk is publikálásra került (<https://pak.elte.hu/content/publikaciok.t.17512>). Hazai vagy on-line nemzetközi konferencián három, MTA munkabizottsági ülésen, további 8 előadás keretében számoltunk be eredményeinkről 2020 október és 2021 október között (<https://pak.elte.hu/content/konferencia-megjelenesek.t.7294>).

2021-ben 3 új PhD értekezés került benyújtásra és egy dolgozat sikeres védésére is sor került (<https://pak.elte.hu/content/bsc-msc-diplomadolgozatok-es-phd-ertekezések.t.7296>). A honlapon bemutattuk az elnyert kutatási pályázatok listáját (<https://pak.elte.hu/content/tamogatott-projektek-elbiralas-alatt-allo-palyazatok.t.18808>).

Az előrehaladást, a tudományos eredmények elfogadottságát jelzi: a) az ELKH–ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársai által, a korábban elnyert két EU Horizon 2020, Marie Skłodowska-Curie ITN programban való eredményes részvétel (célzott tumorterápia [(Mező G., Grant 861316 (2019-2023))], krónikus betegségekre ható vakcinák fejlesztése [(Horváti K., Grant 860325 (2019-2023))] magyar/külföldi diákok, PhD hallgatók; b) 2021-ben elnyert két nemzetközi (CELSA belga-magyar, NKFIH szlovén-magyar) pályázat, valamint 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 kutató- és oktatóképzés során a BSc, az MSc és a PhD programokban megjelent a korszerű LC-MS/MS és a bioerőmérő készülék (AFM). Az ELTE biológus, vegyész, anyagkutató, biotechnológia MSc, a Semmelweis Egyetem gyógyszerészképzés, az ELTE kémiai és biológiai doktori (PhD) képzéseiben résztvevők és tudományos diákkör (TDK) iránt érdeklődő hallgatók megismerkedhettek az új vizsgálati módszerek által nyújtott lehetőségekkel. Például *Osvai Gréta* vegyész MSc hallgató aktív kutatómunkája és kiváló tanulmányi eredményei alapján elnyerte az ELTE TTK Kar Kiváló Hallgatója díjat. Kilenc MSc/PhD gyakorlati kurzust vezettünk be (<https://pak.elte.hu/content/oktatasi-tevekenyseg.t.17607>). Ezek közül az elmúlt tanév két félévében (2020/21) a kilenc kurzust 83 (köztük 16 nemzetközi, angolul oktatott) hallgató vette fel (<https://pak.elte.hu/content/oktatasi-tevekenyseg.t.17607>, táblázat).

E műszerek segítik a VEKOP programban részt vevő kutatócsoportok mellett az ELTE Kémiai Intézet számos kutató/oktató laboratóriumát (pl. pontos molekulatömeg-meghatározással), továbbá a külső partnerekkel való együttműködést, a mérési szolgáltatási és a fejlesztési tevékenységet. Például egy magyar (Biofil Mikrobiológiai, Géntechnológiai és Biokémiai Kft.) KKV termékeihez és termékfejlesztéseihez kapcsolódó metabolit termelő képesség méréseket.

2022. március 24.

Dr. Hudecz Ferenc  
témavezető egyetemi tanár