

3. sz. PROJEKT FENNTARTÁSI JELENTÉS

(2022.09.29. – 2023.09.28.)

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

A műszerek segítik a kutatásokat: a) növényi/illetve gomba eredetű metabolit „ujjlenyomatok” és ismeretlen vegyület azonosítását, b) új antimikrobakteriális/tumorelleses hatóanyag-peptid konjugátumok előállítását, jellemzését, c) intelligens nanohordozók előállítását, sejtmembránra gyakorolt hatásának vizsgálatát. Az eredményeket az elmúlt évben 7 nemzetközi folyóiratcikkben, 2 szabadalomban (1 európai és egy magyar), 2 magyar nyelvű folyóiratcikkben és 20 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: a hazánkban is honos *Linum austriacum* és *L. perenne* fajok földbeni szerveiben két új (általunk linadiacin A és Bként elnevezett), és két, már ismert (justicidin B, diphyllin) lignánt azonosítottunk és bizonyítottuk ezek Covid vírus elleni és antiproliferatív hatását. Mindkét hatás mértéke ismert standard gyógyszervegyületekkel összevethető mértékű volt (Tóth, G. et al. J Nat Prod 2023). Továbbá négy *Anthriscus* (*A. caucalis*, *A. cerefolium*, *A. nitida*) faj különböző szerveinek (gyökér, levél, virágzat és termés) vizsgálatai során először azonosítottunk lignán podofillotoxin származékokat az *A. caucalis* és *A. nitida* mintákban.

In vitro gombatenyészetek metabolit-vizsgálata során: 1) Szőlő növényből izolált 270 *Alternaria* törzs in vitro tenyészeinek metabolit profiljait elemezve megállapítottuk hogy a nem-célzott metabolit ujjlenyomatok elemzései megerősítik a *A. alternata* két nagy fajcsoportjának taxonómiai, filogenetikai elkülönülését (Scientific Reports-hoz benyújtása után kedvező bírálatokkal rendelkező közlemény); 2) A *Darksidea* nemzetség több, mint 100 izolátumából nyert nem-célzott metabolit ujjlenyomatok adatainak elemzését végeztük el, kézirat készítés folyamatban van.

A munka sikerességét bizonyítja a benyújtott és elfogadott Európai szabadalom a VEKOP pályázat több témavezetőjének közreműködésével (Kovács, G; et.al. EP4134075A1; Európai szabadalom).

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.

Irányított liposzómákat készítettünk, amelyekbe metasztatizáló tumorok felismerését biztosító CREKA vagy SREKA peptideket építettünk. Az előbbi peptidet tioéter-, míg az utóbbit oxim-kötéssel kapcsoltuk a liposzóma alkotó pegilált zsírsav származékhoz. HPLC-MS segítségével igazoltuk, hogy az oxim-kötést tartalmazó származék jobb kitermelésű, tisztább és jobban jellemezhető vegyületet eredményez, ami a liposzómák jobb karakterizálását is lehetővé teszi. Az így előállított liposzómákba daunomicin (Dau) tumorelleses szert csomagoltunk és in vivo biodisztribúciós és stabilitási vizsgálatokat végeztünk. HPLC-MS segítségével meghatároztuk azok mennyiségét, így a szervezetben való eloszlásukat. Ezzel igazoltuk a liposzómák tumor dúsulását is. Szintén ezzel a módszerrel vizsgáltuk a liposzómák hatóanyag leadásának időbeni lefolyását, mely adatokból a liposzómák stabilitására tudtunk következtetni (Vári, B. et al. Drug Delivery 2023). Továbbfejlesztettük a bombezin-daunomicin konjugátumokat a hatékonyabb hatóanyag felszabadulás érdekében. A konjugátumok lebomlását patkány máj liposzóma homogenátummal kezelve, a feldolgozást követően HPLC-MS segítségével meghatároztuk a lebomlás sebességét és a keletkező metabolitok típusát. Ezek az adatok jelentősen hozzájárulnak az egyes konjugátumok hatékonyságának értelmezéséhez (Gomena, J. et al., Int J Mol Sci 2023). Hasonló vizsgálatok keretében tudtuk igazolni, hogy egy ciklikus RGD irányító peptidet és MMAE hatóanyagot tartalmazó konjugátumban a tervezett linker szekvencia nem a várt MMP-2 enzim, hanem a liposzómában jelenlévő katepszin B enzim hatására bomlik. Így sikerült értelmezni a konjugátum hatásmechanizmusát (Zambra, M. et al., Frontiers in Pharmacology 2023). Hatékony, melanoma tumorsejtekre specifikus α -MSH és F3 peptid típusú irányító molekulákat fejlesztettünk, amelyekhez hatóanyagot kapcsolva szignifikáns tumornövekedés gátlást mértünk in vivo egér modelleken. Glioma specifikus konjugátumok esetében igazoltuk, hogy a hatóanyag kapcsolódási helye, a hatóanyagok száma befolyásolja a sejtbejutási és metabolikus profilt és a hatékonyságot. Új módszert dolgoztunk ki irányított liposzómák előállítására, amelyek nagyobb szelektivitást mutattak in vivo, mint az irányító peptidet nem tartalmazó liposzómák. A rezisztens tumorsejteken több sejtfelszíni struktúrát is meghatároztunk, amelyeken keresztül a hatóanyagjelölteket célbajuttatva ezen sejtek célzottan elpusztíthatók. Előállítottunk és kémiaiilag módosítottunk különböző melanoma specifikus antigéneket, vizsgáltuk formulázhatóságukat és a tanulmányoztuk a kémiai módosítások hatását az antigének in vitro sejtbejutási képességére. Azt tapasztaltuk, hogy mind a kémiai módosítás, mind pedig a formulázás befolyásolja az antigének biológiai aktivitását. Új Sars-CoV2-ellenes és antibakteriális vegyületeket definiáltunk és jellemeztünk. Ezen hatóanyagok gazdasejt specifikus célbajuttatásához hordozó peptideket állítottunk elő. A hatóanyag jelöltek és a peptidek szerkezeti sajátosságait, membránkölesönhatásait és a sejtbejutási mechanizmusait vizsgáltuk. A peptidek jellemzésére szöveti környezetet modellező in vitro szferoidok kultúrákat alkalmaztunk. A szöveti határrétegek (elsősorban tüdő) modellezésre alámérülő, ko-kultúra konstrukciókat fejlesztettünk, a modellekben a transzepiteliális ellenállás műszeres ellenőrzésével (Tóth, G. et al., J Nat Prod. 2023). A pályázati ciklus alatt kidolgoztunk új tumorelleses hatással rendelkező hatóanyagokat, melyek hatékonyságát bizonyítja egy elfogadott magyar szabadalom is (Csámpai, A.; et al. PCT/HU2021/050047; Magyar szabadalom).

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

Vizsgáltuk különböző fehérjék natív és amiloid formáinak szilárd felületeken történő megkötődését és az ennek hatására a felületen bekövetkező morfológiai változásokat. Sikeresen fejlesztettünk ki egy hatékony polimer nanorészecske alapú hordozó rendszert hidrofíl peptidok és fehérjék hordozására. A részecskék segítségével elnyújtott hatóanyagleadást lehetett megvalósítani. A részecskék morfológiáját AFM segítségével jellemeztük. Tanulmányoztuk a polimer nanorészecskék fluid határfelületen bekövetkező megkötődését, és a hőmérséklet, ionerősség hatását a kialakuló felületi réteg szerkezetére. A kapott eredményekből a részecskék emulzió stabilizáló képességére lehetett következtetni. Folytatódott és lezárult a nagyfelbontású képalkotó technika orvosi biológiai alkalmazása a Premed Pharma Kft. szervezésében, a debreceni Kenézy Gyula Kórház, valamint a miskolci Központi Kórház szemészeti osztályaival együttműködésben. A szürkehályog műtéteknél használt phacoemulsifikációs tűk összehasonlító vizsgálata során a műtéti protokollnak megfelelően kezelt, és használt tűk morfológiai jellemzését mikroszkópos és AFM mérések segítségével végezzük. A nagyszámú mintakészlet eredményei alapján következtetést tudunk levonni az egyszer és többször használatos tűk igénybevételéről és ajánlott alkalmazásáról.

2. Folyamatban lévő kutatások

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

A növényi és gomba eredetű biológiailag aktív hatóanyagok azonosítása mellett folyamatban van újabbak szerkezetbizonyítása (Orbitrap MS/MS): Az izolált podofillotoxin származékok Covid vírus elleni és antiproliferatív hatásainak vizsgálata; valamint 2) *Ampelomyces* (4 törzs) és *Setophoma* (1 törzs) metabolit-összetételének meghatározása.

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

A következő periódusban tovább folytatjuk a célzott tumorterápiával kapcsolatos vizsgálatainkat. Ezek fontos részét képezik az előállított irányító peptidok és drog konjugátumaik tisztítását és analitikai jellemzését a VEKOP pályázat keretében beszerzett műszerek segítségével. Ezek a készülékek alkalmasak olyan preklinikai vizsgálatok elvégzéséhez is, mint a konjugátum biodisztribúciójának, metabolizmusának és a hatóanyag felszabadulásának meghatározása. Folyamatban van antibakteriális hatású szekvenciális oligopeptidok zsírsav származékainak előállítása és jellemzése, valamint új, peptid alapú antibakteriális antigének szintézise vakcinák kialakítása céljából. Folytatjuk a tumorvakcinák kifejlesztésére irányuló munkánkat is, melyben multiepitop konstrukciókat és új formulázási stratégiákat állítunk elő és dolgozunk ki.

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

Folytatódott a szén kvantumpont alapú hatóanyag-hordozók fejlesztése. A részecskék előállítására, majd ezt követő felületi funkcionálisítására különböző módszereket dolgoztunk ki. Folyamatban van a részecskék sejtmembránra gyakorolt hatásának nagyfelbontású morfológiai jellemzése.

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 7 nemzetközi folyóiratcikkben közzétettük (<https://pak.elte.hu/content/publikaciok.t.17512>) és 20 előadás hazai/nemzetközi konferencián, tartott előadásban mutattuk be 2022 október és 2023 szeptember között (<https://pak.elte.hu/content/konferencia-megjelenesek.t.7294>). 2023-ban 2 BSc, 2 M.Sc, valamint 1 PhD értekezés került benyújtásra és védésre (<https://pak.elte.hu/content/bsc-msc-diplomadolgozatok-es-phd-ertekezesek.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; és a b) 2021-ben elnyert három nemzetközi (CELSA belga-magyar, NKFIH szlovén-magyar és NKFIH osztrák-magyar) pályázat megvalósítása folytatódik, c) Bösze Szilvia vezetésével elnyert NKFIH OTKA pályázat „A fertőzés helyének támadása: peptidszármazékok és peptiddel módosított nanohordozók hatóanyagok célbajuttatására és biohasznosíthatóságuk növelésére” (2022-2026), d) Szabó Ildikó által elnyert MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj „Immunterápiában alkalmazható melanoma antigén alapú vakcinák kifejlesztése” (2022-2025), e) Horváti K. részvételével elnyert OTKA ANN pályázat (témavezető Mándity István) „CRAC csatorna inhibitorok fejlesztése fénnel aktiválható peptidmimetikumokkal” (2021-2025), f) Schlosser Gitta részvételével elnyert FK OTKA pályázat (témavezető: Rokobné Révész Ágnes); ugyancsak folytatódik g) 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 és 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. A kilenc MSc/PhD gyakorlati kurzust a 2022/23-as tanév két félévében 35 (közülük 9 angol nyelven) hallgató vette fel (<https://pak.elte.hu/content/oktatasi-tevekenysegek.t.17607>, táblázat).

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

2023. szeptember 28.

Szerkesztette: Dr. Szabó Ildikó

Dr. Hudecz Ferenc
témavezető