

4. sz. PROJEKT FENNTARTÁSI JELENTÉS

(2023.09.29. – 2024.09.28.)

A VEKOP-2.3.3-15-2017-00020 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 9 nemzetközi folyóiratcikkben, 1 nemzetközi szabadalomban, 1 magyar nyelvű ismeretterjesztő folyóiratcikkben és 12 előadásban közzétettük. A műszeregyüttes hatékonyan segítette az oktatást és a kutatási pályázatokat.

1. Tudományos kutatási eredmények

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

Növényi minták anyagcseretermékeinek vizsgálata során: i) gyógy- és fűszernövényként is használt *Nepetoideae* alcsaládba tartozó, magyarországi előfordulású növényfajok (*Mentha*, *Salvia*, *Thymus*, *Nepeta*, *Glechoma* nemzetségek képviselői) levél és gyökér mintáiban tanulmányoztuk a bioaktivitásért felelős rozmaringsav és rozmaringsav-származékok enzimatiszus átalakulási folyamatait. A vizsgált kivonatokban korábban még nem azonosított rozmaringsav-származékokat izoláltunk és mutattunk ki; és ii) hazai *Anthriscus* – turbolya és *Linum* – len fajok növénykémiái vizsgálata során ritka lignán- és kávésav-származékokat azonosítottunk és izoláltunk. Rokon szerkezetek szakirodalomban ismert antiproliferatív és antivirális hatásai miatt elindítottuk az általunk izolált összetevők sejtszétömlő és Covid vírus elleni hatásainak vizsgálatát.

In vitro gombatenyészetek metabolit vizsgálata során: i) szőlő növényből izolált 270 *Alternaria* törzs *in vitro* tenyésztéseinek metabolit profilját elemeztük (Molnár, A. et al. Sci Rep (2023) 13, 19298.); ii) a *Periconia macrospinosus* gyökérendofiton gomba *in vitro* tenyésztéseiből a táptalaj összetételének módosításával egy új izokumarin származék izolálását, szerkezetazonosítását; valamint iii) az *Anthriscus* növényi minták gyökereiből izolált endofiton gombák metabolit vizsgálatát végeztük el.

A munka sikerességét bizonyítja, hogy az újonnan definiált és jellemzett állati koronavírusok ellen hatékony vegyületekre a vizsgálati eredményei alapján PCT szabadalmi bejelentést nyújtottunk be (WO/2024/170920).

b) Új antimikrobiális/tumorelleses hatóanyag-peptid konjugátumok előállítása és jellemzése

Új peptid-hatóanyag konjugátumokat állítottunk elő célzott tumor terápia céljára. A terápia sikeressége jelentősen függ a hatóanyag, vagy egy aktív metabolitjának hatékony felszabadulásától, ezért vizsgáltuk a konjugátumok lebomlását patkány máj lizoszóma homogenátumban és HPLC-MS segítségével meghatároztuk a lebomlás sebességét, valamint a keletkező metabolitok típusát. Ezek az adatok jelentősen hozzájárulnak az egyes konjugátumok hatékonyságának értelmezéséhez. A kísérletek publikációjának előkészítése folyamatban van.

Előállítottunk, kémiaiilag, valamint *in vitro* és *in vivo* jellemeztünk különböző melanoma specifikus α -MSH irányító peptid-hatóanyag konjugátumokat. Bizonyítottuk a konjugátumok *in vivo* tumornövekedést gátló hatását, amelyet jelentősen befolyásol a célbavívó egység hossza, valamint a hatóanyag pozíciója; azonban a hatóanyag számának növelése nem eredményezett fokozottabb tumornövekedés gátlást (Szabó, I. et al. Int J Mol Sci (2024) 25(2), 1095.). Tumorvakcina konstrukciókban meghatároztuk a zsírsavval módosított antigének *in vitro* hemolitikus aktivitását, citotoxikus hatását PBMC sejteken, valamint sejtbejutási képességüket humán dendritikus sejtekbe. A módosított antigének sem a vörösvértestekre, sem pedig a PBMC sejtekre nem voltak citotoxikusak, és a palmitoilezés nem csupán növelte a fehérvérsejtekbe való bejutást, hanem az antigének szelektív, tumorvakcinák esetében fontos, konvencionális kettes típusú dendritikus sejtekben történő bejutását is.

Ígéretes hatóanyagjelölt szalicilanilidok, valamint származékaik (5-kloropirazinoát-, 4-formilbenzoát-, urea típusú 4-aminoszalicilsav származékok) *in vitro* aktivitását vizsgáltuk. Oximkötés kialakításával hatóanyag-hordozó (tuftsin származékokat: [TKPKG]_n, n=1-4) peptid konjugátumokat állítottunk elő, vizsgáltuk a szabad hatóanyagok és a konjugátumok citosztatikuss, valamint autofágia-indukáló hatását humán U87 glioblasztóma sejteken. Bizonyítottuk, hogy a konjugátumok sejtbejutása idő- és koncentrációfüggő, és a tetramer OT20 ([TKPKG]₄) származék sejtbejutása a legnagyobb mértékű. Egyes szalicilanilid származékok és a konjugátumok (elsősorban a megnövelt sejtbejutás miatt) kimagasló *in vitro* gátló hatást mutattak, amely emelkedett LC3 expressziós szinttel párosult. Ezen adatok alapján valószínűsíthetjük, hogy a tumorsejtek gátlását autofágiával összefüggő folyamatok okozzák (Horváth, L. et al. ACS Omega. 2024;9(15), 16927.). Együttműködés keretében: i) vizsgálatuk *Juglans nigra* kérgéből és leveléből származó vegyületek membránpermeabilitását párhuzamos mesterséges membránpermeabilitási próbával (PAMPA), valamint antiproliferatív tulajdonságaikat humán tumorsejtkultúrán (Osztie, R. et al. Int J Mol Sci. 2024, 25(13), 6930.); ii) új antimikrobiális és antivirális hatóanyag jelölteket definiáltunk, és az aktív vegyületek célbajuttatására (tumorsejtek, fertőzött gazdasejtek) különböző (pl. penetráló, receptor specifikus HSV gD eredetű és tandem szekvenciájú) hordozó peptideket terveztünk. Meghatároztuk a vegyületek és konjugátumaik sejtbejutási profilját különböző szöveti eredetű sejteken, valamint a szöveti környezetet modellező *in vitro* szferoidokon. A rendszert a jövőben további antibakteriális, antivirális és antitumor hatóanyagjelölt és hordozó peptid penetrációs sajátosságainak jellemzésére használjuk; iii) antimikrobiális hatású peptidek hatásmechanizmusának vizsgálatai közül *in vitro* citotoxicitás vizsgálatokat végeztünk (Battioui, K. et al Nat Commun, 2024, 15(1), 3424.).

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

Folytatódtak a szén kvantumpont alapú nanorendszerek fejlesztésére irányuló kutatásaink. Vizsgáltuk különböző módon előállított és felületmódosított kvantumpontok összetételét, azok kölcsönhatását sejtmembránokkal. A sejtekre gyakorolt hatásokat nagy felbontású AFM mérésekkel elemeztük, amelyek során egyértelmű összefüggést figyeltünk meg a citotoxicitás és a sejtmembrán érzékenységének változása között. A morfológiai változások nyomon követésével sikerült információkat nyernünk a kvantumpontok és sejtek közötti kölcsönhatás mechanizmusáról. További kutatásaink során szén kvantumpontokból szilárd hordozón kialakított felületi rétegeket hoztunk létre, amelyek szerkezetét részletesen vizsgáltuk. Ezen vizsgálatok célja, hogy különböző polaritású részecskékből funkcionális, antibakteriális

bevonatokként használható felületeket hozunk létre. A kapott eredmények hozzájárulhatnak új, innovatív felületkezelési technológiák kidolgozásához.

Az adatok feldolgozásával és közlésével lezárult a Premed Pharma Kft. szervezésében, a debreceni Kenézy Gyula Kórház, valamint a miskolci Központi Kórház szemészeti osztályaival megvalósult együttműködés. A kutatás során a szürkehályog műtéteknél használt phacoemulsifikációs tűk morfológiai degradációját vizsgáltuk a műtéti protokoll függvényében mikroszkópos és AFM mérések segítségével. Az eredmények alapján a műtéti protokollokkal kapcsolatos ajánlásokat lehetett megfogalmazni.

2. Folyamatban lévő kutatások

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

A rozmaringsav *in silico* Covid vírus elleni hatásosságára alapozva az izolált vegyületeink *in vitro* vírusgátló hatásának vizsgálatait tervezzük. Megkezdjük annak áttekintését, hogy az ELTE TTK Központi Kutató és Ipari Kapcsolatok Centrum (KKIC) segítségével könnyebbé lehetne tenni a műszer fenntartását, K+F+I együttműködés kialakítását.

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

A következő periódusban tovább folytatjuk a célzott tumorterápiával kapcsolatos vizsgálatainkat. Ezek fontos részét képezik az előállított irányító peptidek 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 oligopeptidek zsírsav származékainak előállítása és jellemzése, valamint új, peptid alapú antibakteriális antigének szintézise vakcinák kialakítása céljából. Folytatjuk a tumorvakcinák kifejlesztésére irányuló kutatásainkat is, amelyben multiepitop konstrukciókat és új formulázási stratégiákat állítunk elő és dolgozunk ki.

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

Továbbra is zajlik a különböző polaritású szénkvantumpontokból önszerveződő határfelületi struktúrák létrehozása. Az így előállított rétegek antibakteriális bevonatokként való alkalmazása mellett potenciált mutatnak elektrokémiai rendszerek kontrollált tulajdonságú elektródjainak fejlesztésére, amelyek hozzájárulhatnak új energiatárolók létrehozásához. Emellett folytatjuk a funkcionális nanorészecskék előállítását is, amelyek lehetőséget biztosítanak az irányított hatóanyag célbajuttatás megvalósítására.

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 9 nemzetközi folyóiratcikkben közzétettük (<https://pak.elte.hu/content/publikaciok.t.17512>) és 12 előadás hazai/nemzetközi konferencián, tartott előadásban mutattuk be 2023 október és 2024 szeptember között (<https://pak.elte.hu/content/konferencia-megjelenesek.t.7294>). 2023/24 tanévben 1 BSc. 2 MSc, valamint 2 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) a HUN-REN–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))], valamint vakcinák fejlesztés [(Horváti K., Grant 860325 (2019-2023))]; és a b) 2021-ben elnyert három nemzetközi (CELSA belga-magyar, NKFIH szlovén-magyar és osztrák-magyar) pályázat megvalósítása folytatódott, c) Bösze Sz. vezetésével elnyert NKFIH OTKA pályázat „A fertőzés helyének támadása: peptidszármazékok és peptiddel módosított nanohordozók hatóanyagok célbajuttatására és biohasznosíthatóságuk növelésére” (2022-2026), d) Szabó I. 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 I.) „CRAC csatorna inhibitorok fejlesztése fénnel aktiválható peptidmimetikumokkal” (2021-2025), f) Schlosser G. részvételével elnyert FK OTKA pályázat (témavezető: Rokobné Révész Ágnes) és valamint együttműködés az ELTE TTK (Schlosser G.) és a Győr-Moson-Sopron Vármegyei Petz Aladár Oktató Kórház, Gyógyszerészeti Osztály (Erdélyi Lóránd József) részvételével; ugyancsak folytatódik, g) Horváti K. MTA Lendület kutatási programja „Peptidalapú vakcinák: új formulációs stratégiák” (2021-2026).

4. Oktatás, a nyilvánosság tájékoztatása

Az ELTE 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 8 BSc/MSc/PhD gyakorlati kurzust a 2023/24-es tanév két félévében 119 (közülük 5 angol nyelven) hallgató vette fel (<https://pak.elte.hu/content/oktatasi-tevekenysegt.17607>, táblázat).

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

2024. szeptember 28.

Szerkesztette: Dr. Szabó Ildikó

Dr. Hudecz Ferenc
témavezető