A MedInProt Szinergia III pályázat keretében előállítottunk monofunkcionalizált hiperelágazásos poliglicidolt (HbPG), amelyet sikeresen kapcsoltunk EGF receptort felismerő peptidszekvenciákhoz. Az így előállított konjugátumokhoz daunomicin tumorellenes szert kapcsoltunk oxim ligációs módszerrel. A HbPG beépítésével a vegyületek vízoldékonyságát jelentősen lehetett növelni. Ez lehetővé tette, hogy a konjugátumok biológiai vizsgálatát elkezdjük, többek között a MedInProt műszerpályázatán elnyert gélelektroforézis és Western blot készülékek segítségével.

**Szinergia féléves összegző űrlap**

(a pályázók közösen ezt az űrlapot töltik ki)

**Célzott tumorterápiában fontos receptor fehérjék és azok jelátviteli változásának vizsgálata peptid―hatóanyag―polimer nanorendszer segítségével**

***A pályázatban együttműködő partnerek:***

**Partner 1:**

* Név: **Dr. Mező Gábor**
* Tudományos fokozat: az MTA Doktora
* Jelenlegi tudományos besorolás: tudományos tanácsadó
* gmezo@elte.hu

**Partner 2:**

* Név: **Dr. Iván Béla**
* Tudományos fokozat: a kémiai tudományok doktora
* Jelenlegi tudományos besorolás: az MTA levelező tagja, kutatóprofesszor
* [ivan.bela@ttk.mta.hu](mailto:ivan.bela@ttk.mta.hu)

**Partner 3:**

* Név: **Dr. Kőhidai László**
* Tudományos fokozat: az orvostudományok kandidátusa

- Jelenlegi tudományos besorolás: Med. Habil.; egyetemi docens

- [kohlasz2@gmail.com](mailto:kohlasz2@gmail.com)

***A pályázat a szinergizmus szakmai fókuszpontjai, kiemelt kutatási témái közül a következőkhöz csatlakoznak:***

1) Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben

4) Alkalmas nanorendszerek fejlesztése peptid- és fehérjealapú hatóanyagok stabilitásának és felszívódásának fokozása érdekében.

1. Fejtsék ki pontosan, hogy a kutatási együttműködésük hogyan kapcsolódik az alább megadott MedinProt **fókuszpontok** legalább egyikéhez *(max. 300 szó)****.***
   * + 1. **pont: Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben**

A tumorsejteken megjelenő sejtspecifikus vagy túltermelődött sejtfelszíni struktúráknak (pl. receptor fehérjék) óriási jelentősége van a célzott, személyre szabott tumorterápiában. Mivel ezen receptorok típusainak száma limitált, nagyobb hatékonyság lenne elérhető, ha egyszerre több receptor-típust lehetne támadni, vagyis több célponton keresztül lehetne tumorellenes hatóanyagot juttatni a tumorsejtekbe, amelyek így additív módon fejthetik ki hatásukat. A peptidligandumaik kötődése után a receptorok azonban különböző jelátviteli útvonalakon és komplex folyamatokon át befolyásolhatják egymás expresszióját, szerkezetét (pl. foszforiláltság), jeltovábbító képességüket és endocitózisra való hajlamukat. Ezeknek a folyamatoknak az ismerete elengedhetetlen a megfelelő kombinált kezelés kidolgozásához.

A receptor tirozin kinázok családjába tartozó EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) számos malignus tumorfajtában expresszálódik. A tumorterápiák ígéretes célpontjai mivel (i) az általuk közvetített jelátviteli fehérjék a sejtek növekedésének és differenciálódásának szabályozása mellett a daganatok kialakulásában is fontos szerepet játszanak; (ii) a jelátviteli utak beindításában fontos szerepe lehet az e receptorokra jellemző dimerizációnak is. A pályázat keretében EGFR-hoz kötődő két peptidnek (GE11: Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile és D4: Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr) a jelátviteli fehérjékre és ezáltal más receptorokra (pl. gonadotropin-releasing hormon (GnRH) receptor) gyakorolt hatását kívánjuk vizsgálni.

**4. pont: Alkalmas nanorendszerek fejlesztése peptid- és fehérjealapú hatóanyagok stabilitásának és felszívódásának fokozása érdekében.**

Az általunk vizsgálni kívánt két EGFR-hoz kötődő peptid, rosszul oldódik vizes közegben különösen spaceren keresztül kapcsolt hatóanyag konjugátum formában. A célzott tumorterápia elengedhetetlen követelménye azonban, hogy az irányító molekula-hatóanyag konjugátum eljusson a tumoros szövetekig, ott megfelelően kötődjön a célzott receptorokhoz és a kapcsolt hatóanyag bejusson a tumorsejtekbe. Annak érdekében, hogy a hatékonynak bizonyuló, de rossz oldhatósággal bíró konjugátumok biohasznosultsága megfelelő legyen, különböző módszereket alkalmaznak (pl. liposzómába zárás, PEG-kapcsolás). Ezek a módosítások sokszor a szelektivitás és a receptor affinitás csökkenésével járhatnak, viszont az oldékonyság növelésére irányuló módosításuk a biohasznosíthatóság érdekében elengedhetetlen. A jelen pályázat keretében megkísérlünk egy új típusú, polihidroxil-karakterű, nem lineáris, hanem térben kompaktabb elágazó polimer segítségével olyan nanorendszert kifejleszteni, melynek oldhatósága megfelelő, és vizsgálni kívánjuk, hogy a polimer hogyan befolyásolja a peptid-hatóanyag konjugátumok stabilitását, oldékonyságát, receptor-kötődését és sejtbejutását.

1. Foglalják össze **közérthetően** szinergia programjuk, és közös munkájuk eddigi eredményeit *(max. 300 szó).*

Munkánk során olyan hiperelágazásos poliglicidolt (HbPG) készítettünk, amely alkalmas lehet peptid-hatóanyag konjugátumokhoz kapcsolva azok vízoldékonyságának növelésére. Ezért olyan makromolekulát állítottunk elő, mely egy funkcióscsoporttal rendelkezik. Ennek a megvalósítására egy korábban nem vizsgált iniciátorrendszert (ftálimid/ftálimid-kálium 9:1 mol/mol) alkalmaztunk, mellyel különböző molekulatömegű HbPG-t állítottunk elő. A molekulatömegüket 1H-NMR és UV spektroszkópiákkal határoztuk meg. Az alkalmazott iniciátor előnye, hogy egyszerűen a ftalil-csoport eltávolításával közvetlenül előállítható monoamin-funkciós HbPG, mely konjugálható peptidekkel, valamint továbbalakítható más konjugációs reakciókban releváns csoportokká. A klóracetil- vagy maleimid-csoportokkal módosított HbPG származékok előállítása és jellemzése folyamatban van. A HbPG származékok előállításáról egy közlemény készül.

Elvégeztük négy kiválasztott peptid szintézisét, amelyek a *C*-terminálison karboxilcsoportot tartalmaztak. Mivel a korábbi kísérletekben a Gly-Phe-Leu-Gly spacer tartalmú származékok oldékonysága volt a legrosszabb, ezért minden peptid tartalmazta ezt a katepszin B-re érzékeny peptid spacert. A HbPG és a peptid közötti távolság befolyásolhatja a receptor-kötődést és a konjugátum hatékonyságát, ezért előállítottunk olyan származékokat is, melyek a *C*-terminálison egy pentaglicin távtartót tartalmaztak. A daunomicin konjugálását oxim-kötés kialakításával kívántuk megvalósítani, ezért a peptidek *N*-terminálisára aminooxiecetsav származékot építettünk be. Az aminooxiecetsav érzékenysége miatt olyan származékot választottunk, amely stabil mind a peptid gyantáról történő hasítása, mind a HbPG kapcsolása során. Az izopropilidén védőcsoport 1M metoxilaminnal ammónium-acetát pufferben (pH=5,1) könnyen hasítható volt. Így a daunomicin konjugálását a szintézis utolsó lépéseként tudtuk megvalósítani. Az előállított HbPG-peptid-hatóanyag konjugátumok mindegyike jól oldódott. A HbPG molekulatömegének megfelelő PEG-származékot megvásároltuk, és az összehasonlító vizsgálatokhoz szükséges konjugátumok szintézisét elkezdtük. Ezekről a kísérletekről egy konferencia posztert csatolunk.

A sejtbiológiai vizsgálatokban két EGFR-hoz kötődő peptidhez (GE11 és D4) YRRL vagy GFLG spacerrel kapcsolt daunomicin internalizációját és citotoxicitását vizsgáltuk HT29 sejteken. D4 esetében kimutattuk a GFLG internalizációt gátló jellegét, valamint az IC50 érték fokozódását Dau=Aoa-GE11 vs. Dau esetében. A MedinProt Műszerpályázat keretében elnyert gélelektroforézis – Western blot készülék segítségével a vizsgálni kívánt sejteken az EGFR és GnRH-R kimutatása folyamatban van.

1. Értékeljék és véleményezzék eddigi közös munkájukat (sikereiket, nehézségeiket, illetve azon ötleteiket, javaslataikat, amelyeknek köszönhetően a következő programok hatékonysága javulhat) *(max. 200 szó).*

A közös munkát egy hatékony megbeszéléssel kezdtük, ahol ütemtervet és feladatokat állítottunk össze. Ennek megfelelően párhuzamosan elkezdődtek a HbPG polimer- (MTA-TTK) és a peptidszintézisek (MTA-TKI), illetve a sejtes vizsgálatok előkészítése (sejtvonalak, ellenanyagok és gélelektroforézishez és Westrern blothoz való anyagok beszerzése), a mérések optimalizálásának kidolgozása (SE, MTA-TKI). A HbPG konjugálásra alkalmas funkciós csoportjának kialakításában segítséget nyújtottak azok a konzultácók, amelyek során az MTA-TKI csoportban alkalmazott ligációs technikák polimerekre történő adaptációját tárgyaltuk meg. Ugyancsak hasznosak voltak a polimer-peptid konjugátumok tisztításában azok a tapasztalatok, amelyeket az MTA-TTK osztott meg az MTA-TKI kutatóival. Az *in vitro* biológiai vizsgálatokat a SE és az MTA-TKI kutatói közösen végzik egymás partnerintézeteiben megtalálható készülékeken. Itt még konkrét eredményekben csak szerényen látszik a szinergiából származó pozitív hatás. Ennek oka részben a vegyületek elkészültének időigénye (csak nem rég kezdődhettek el velük a kísérletek), részben pedig az új készülék - amit a pályázat megvalósítása érdekében szereztünk be a MedInProt támogatásával - beállításának és optimálásának időigényessége miatt. Azonban az már most látszik, hogy a biológusok és kémikusok együttgondolkodása hatékonyabb molekulatervezést és fókuszáltabb biológiai vizsgálatokat eredményez.

1. Szabadon fogalmazzák meg a MedInProt kapcsán támogató és/vagy kritikus észrevételeiket. *(max. 200 szó)*

A szinergia pályázat valóban egy olyan lehetőség, amely olyan kutatókat tud egy asztalhoz ültetni, akik tématerülete nem feltétlenül fed át, de egy együttgondolkodással megtalálhatók azok a közös pontok, amelyek mentén magas színvonalú kutatási eredményeket lehet elérni. A szűkös kutatási források egy ilyen együttműködés keretében jobban hasznosulhatnak, mert az interdiszciplináris kutatási eredmények nagyobb érdeklődésre tarthatnak számot a tudományos világban. Amennyiben a szinergia pályázat együtt jár egy új műszer beszerzési lehetőségével, mint a mi esetünkben, az még tovább növeli az esélyét annak, hogy új kutatási területekre terjesszük ki az együttműködést.

In the frame of MedInProt Synergy Grant mono-functionalized hyper branched polyglicidol (HbPG) that was successfully attached to peptides recognizing EGF receptors. The prepared conjugates were linked to antitumor agent daunomycin via oxime linkage. The water solubility of the new compounds was extremely improved by the incorporation of HbPG. This fact provided possibilities to study the peptide – drug conjugates in biological assays e.g. with gel electrophoresis and Western blot that were obtained by the MedInProt Grant for Laboratory Tools and Accessories.