

Biokonjugátumok – összefogni érdemes

HUDECZ Ferenc^{a,b}

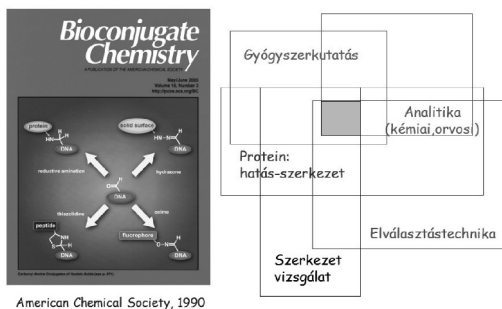
^aELTE Szerves Kémiai Tanszék, Pázmány Péter sétány 1A, H-1117 Budapest, Magyarország

^bMTA – ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Természettudományi Kar, Kémiai Intézet, Pázmány Péter sétány 1A, H-1117 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A székfoglaló előadás a 2010-ben áttekintett sajátos utazás („Peptid-út”: a Trefort-kertől Lágymányosig) óta eltelt időben elért, egyes tudományos megfigyeléseinkről tudósítja a tisztelt Olvasót.¹ További tájékozódást nyújthatnak a Magyar Kémiai Folyóiratban 2012-ben megjelent rövid közlemények, amelyek az MTA-ELTE Peptidkémiai kutatócsoportban elért, vonatkozó eredményeket foglalták össze.^{2,3,4,5} A részletesebb áttekintésre a – döntően – angolul közzétett tudományos közlemények (<http://vm.mtmt.hu>) adnak lehetőséget. Mindezek dokumentálják azt a sikeres, tudományos és multidiszciplináris együttműködést, amelyben kiváló hazai és külföldi munkatársak, partnerek és elkötelezett diákok vettek részt.

A biokonjugátumok kutatása, önálló tudományterületként 1990-ben jelent meg, amikor az American Chemical Society, Claude F. Meares professzor (University of California, Davis) főszerkesztő felkérésével *Bioconjugate Chemistry* címmel, elindította folyóiratát. Az eredeti tudományos közleményeket közlő lap megjelenése integrálni volt képes a sokféle tudományterületről származó előzményeket, amikor definiálta a biokonjugátum fogalmát és lehetőséget adott olyan szintézismódszerek, kémiai és biológiai analitikai eljárások közzétételére, amelyekkel jól definiált vegyületekhez lehet jutni (1. ábra). A biokonjugátum olyan vegyület, amely két-vagy több partner molekulát kovalens kötással kapcsol össze úgy, hogy komponensek a kötés kialakítása után is megőrzik eredeti funkcionális sajátosságukat, amelyek motiválták a kovalens kapcsolatot. Ilyen tulajdonságok lehetnek: a „riporter” sajátosság (pl. kromofór/fluorofór jelleg, radioaktivitás), a kötődési/felismerési képesség (pl. enzim-szubsztrát, hormon-receptor, ellenanyag-antigén) vagy az *in vitro/in vivo* kifejtett „biológiai” hatás (pl. citosztatikus/citotoxikus hatás, sejtbejutási képesség, vagy a specifikus immunválaszt kiváltó képesség, farmakokinetikai sajátosság).^{6,7}



1. Ábra. A biokonjugátum kutatás eredményeinek bemutatására az American Chemical Society 1990-ben indította a *“Bioconjugate Chemistry”* folyóiratát <http://pubs.acs.org/journal/bcches>. E tudományterület forrásvidéke szerteágazó, kialakulásában szerepet játszott – többek között – a kémia, a biológia, a biotechnológia és a gyógyszerkutatás.

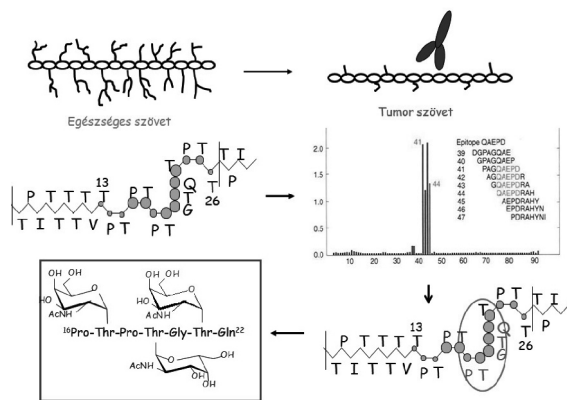
A kémikus számára a fenti követelmény teljesítése komplex feladatot jelent. Egyrészt azonosítani kell a partner vegyületeknek azon részeit (funkciós csoportokat, régiókat), amelyek részt tudnak venni a konjugálási folyamatban, azaz nem felelősek a kérdéses – megőrzendő – funkcionális tulajdonságért. Másrészt, olyan kémiai kötést kell kiépíteni a partnerek között, amely kellően stabil és nem befolyásolja a partnerek jellemző, a funkcionális sajátosságokért felelős szerkezeti elemeit. Ez azt jelenti, hogy a kísérletező a lehetséges reakciókörülmények (pl. hőmérséklet, fény, oldószer, sav/bázis érzékenység) által meghatározott „kémiai teret” (chemical space) jelentős mértékben csökkenteni kényszerül. Ügyelnie kell arra, hogy a szintézis és a cél-vegyület tisztítása során „enyhe” körülményeket használjon. Tevékenysége akkor tekinthető sikeresnek, ha a biokonjugátum szerkezete nemcsak megegyezik a kívánt struktúrával, de a funkcionális jellemzés során megbizonyosodott arról, hogy a komponensek megőrizték azon biológiai, spektroszkópiai stb. tulajdonságaikat, amelyekkel a kémiai kötés létrehozása előtt rendelkeztek.^{8,9} A fentiekből érzékelhető, hogy a biokonjugátumok tervezése, szintézise, jellemzése multidiszciplináris megközelítést követel meg, amelyben a szerves kémiai kompetencia jelentősen kiegészül. A biokonjugátumok kutatását jelentősen motiválja a széleskörű alkalmazás is: az alaptudományokban, az életjelenségek sejt szintű vizsgálatától a gyógyszerkutatásig, a korszerű molekuláris diagnosztikától a teljes test képalkotó technikák fejlesztéséig.¹⁰

A következőkben néhány példán, a peptid-biokonjugátumok illetve komponenseik kutatása során feltárt új törvényszerűségeket, eredményeket mutatom be – a teljesség igénye nélkül.

1. A poszt-transzlációs módosulás hatása az ellenanyag felismerésre

Az következő példák segítségével azt vizsgáltuk miért viselkednek a fehérjék bizonyos szakaszai építőként, azaz milyen szerkezeti tényezőkre vezethető vissza az immunfelismerésért felelős molekula részlet (építő, antigéndetermináns) megjelenése.^{11,12} Lineáris B-sejt építők azonosítása során tisztáztuk, hogy a poszt-transzlációs módosítás¹³ (glikozilezés vagy citrullináció) kiemelt szerepet játszhat egyes fehérjék immunválaszt kiváltó sajátosságának kialakulásában. A tumoros megbetegedéssel összefüggésbe hozható fehérjék (pl. mucin glikoproteinek) illetve az autoimmun betegségekben autoantigénként szerepet játszó fehérjék (pl. filaggrin, fibrin, desmoglein^{14,15}) a poszt-transzlációs módosulás előtt nem viselkednek „idegen” fehérjeként, míg azt követően immunreakciót váltanak ki.

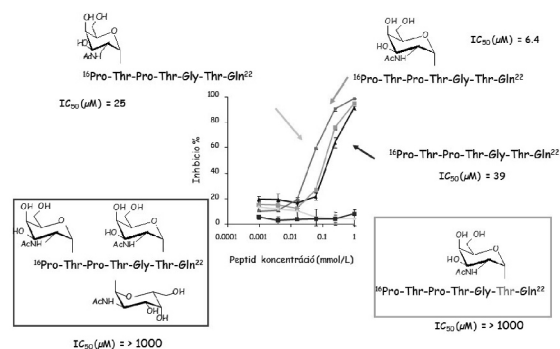
Ismeretes, hogy az érintett mucin glikoproteinek egészséges szövetben jelentős mértékben glikozilezettek, míg rosszindulatú megbetegedésekben – nemcsak túltermelődnek, de – a tumoros szövetből izolált fehérje alig tartalmaz szénhidrát oldalláncokat. A fehérjegerinc így hozzáférhetővé válik az immunrendszer számára és mint „testidegen antigén” fehérje immunválaszt indukálhat. E jelenségnek mind diagnosztikai, mind pedig terápiás jelentősége is lehet. Korábbi vizsgálatainkban azonosítottuk az vastagbél-tumorok esetében kimutatott mucin 2 glikoprotein egyik lineáris B-sejt epitópját (21 TQTPT 25)¹⁶ és epitóp régióját (16 PTPTGTQ 22) (2. ábra).¹⁷



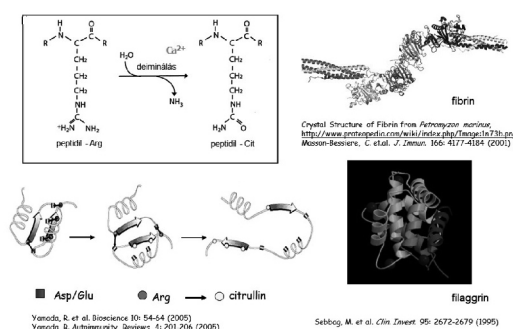
2. Ábra. A mucin 2 glikoprotein ismétlődő szakaszán az epitóp (16 PTPTGTQ 22) azonosításának gondolatmenete: térszerkezet predikció, átfedő peptidek szintézise és kötődésvizsgálata, a potenciális glikozilezési helyek.

Annak tisztázására, hogy a glikozilezés milyen szerepet játszhat a mucin 2 glikoprotein immun-felismerésében olyan biokonjugátumokat állítottunk elő, amelyekben a 16 PTPTGTQ 22 hepta-peptid egy, kettő, vagy mindhárom Thr oldal-láncához monoszacharid egység kapcsolódik.¹⁸ Kimutattuk, hogy akár egyetlen monoszacharid (D-glükóz) egység jelenléte és pozíciója jelentősen meghatározhatja a fehérjeszakasz ellenanyag-kötődését (3. ábra). A D-glükóz a T 17 vagy T 19 aminosav oldallánchoz kapcsolódva csökkenti az ellenanyag fehérje kötődésének a mértékét: a cukorrész nélküli peptid – ellenanyag kölcsönhatást jellemző értékhez ($IC_{50} = 6,4 \mu M$) képest gyengébb kötődésre utaló $IC_{50} = 25 \mu M$ (T 17) illetve $IC_{50} = 39 \mu M$ (T 19) értékeket kaptunk. Ugyanakkor T21 oldalláncához kapcsolt D-glükóz teljesen megakadályozza az ellenanyag -epitóp kötődést ($IC_{50} > 1000 \mu M$) (3. ábra).¹⁸

Megfigyelték, hogy az autoimmun folyamatok pl. a rheumatoid arthritis (RA) esetében az arginin (Arg) helyett citrullint (Cit) tartalmazó fehérjék fontos szerepet játszanak a betegség kiváltásában. Igazolták, hogy a peptidil-arginin-deimináz enzimek családja, amely az Arg/Cit átalakulást katalizálja, bizonyos fehérjékben (pl. fibrin, filaggrin) megváltoztatja a töltésviszonyokat. Ennek hatására módosul a térszerkezet, új fehérjeszakaszok exponálódnak, a megváltozott aminosav-oldallánc hozzájárulhat új, immunválaszt kiváltó epitópok megjelenéséhez, patogén (autoimmun) ellenanyagok bioszintéziséhez (4. Ábra).¹⁹



3. Ábra. A monoszacharid egység jelenlétének ellenanyagkötődést befolyásoló hatása. A mucin 2 glikoprotein ismétlődő szakaszán azonosított epitóp peptid (16 PTPTGTQ 22) kötődésének mértékét a D-glükóz a 17-es vagy 19-es pozícióban csökkenti, a 21-es Thr módosítása pedig teljesen megszünteti.



4. Ábra. A peptidil-arginin-deimináz (PAD) enzimecsaládja katalizálja bizonyos fehérjékben (pl. fibrin, filaggrin) elforduló Arg/Cit átalakulást. Ez megváltoztatja a töltésviszonyokat és módosul a fehérje térszerkezete.

Együttműködésben Prof. Sármay Gabriellával és munkatársaival (ELTE Immunológia Tanszék) a filaggrin egyik epitóprégióját (306 SHQESTXGXSXRSGRSGS 324) (X = Cit) vizsgálva megállapítottuk, hogy az autoimmun válasz kiváltásában döntő szerepe van az Arg/Cit átalakulásban résztvevő aminosavak számának és egymáshoz viszonyított elhelyezkedésének (5. ábra).^{20,21}

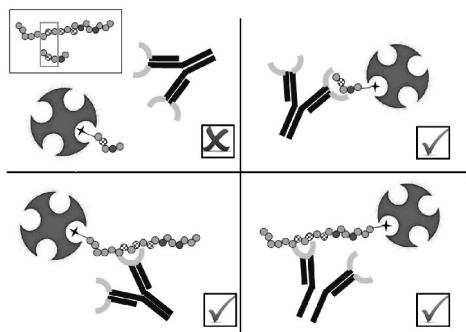
Ezen epitóprégió belül – az egészséges és RA betegségben szenvedő személyek szérummintái-nak összehasonlításával – azonosítottuk azt a legkisebb peptidszakaszt (311 TXGRS 315), amely ellenanyag (B-sejt) epitópként viselkedik és alkalmas lehet a betegség korai és specifikus kimutatására.^{20,21}

19-mer peptid analógok	Rövidítés a C 112 (306-324) peptid N-terminálisán	Rövidítés a C 112 (311-324) peptid C-terminálisán
306 SHQESTRGRSRGRSRGRSGS 324	306 SHQESTXGRSRGRSRGRSGS 324	311 TXGRSRGRSRGRSGS 324
306 SHQESTXGRSXGRSXGRSXGRSGS 324	307 HQESTXGRSRGRSRGRSGS 324	311 TXGRSRGRSRGRSGS 323
306 SHQESTXGRSXGRSXGRSXGRSGS 324	308 QESTXGRSRGRSRGRSGS 324	311 TXGRSRGRSRGRSGS 322
306 SHQESTXGRSXGRSRGRSGS 324	309 ESTXGRSRGRSRGRSGS 324	311 TXGRSRGRSRGRSGS 321
306 SHQESTXGRSXGRSRGRSGS 324	310 STXGRSRGRSRGRSGS 324	311 TXGRSRGRSGS 320
306 SHQESTXGRSRGRSRGRSGS 324	311 TXGRSRGRSRGRSGS 324	311 TXGRSRGRSGS 319
306 SHQESTRGRSXGRSXGRSGS 324	312 XGRSRGRSRGRSGS 324	311 TXGRSRGRSGS 318
306 SHQESTRGRSRGXGRSXGRSGS 324		311 TXGRSRSGS 317
306 SHQESTRGRSRGXGRSXGRSGS 324		311 TXGRSRSGS 316
306 SHQESTRGRSRGRSGS 324	Kontrol peptidek	311 TXGRSGS 315
306 SHQESTXGRSXGRSRGRSGS 324	PLAQ666666	311 TXGRSGS 314
306 SHQESTXGRSXGRSRGRSGS 324	6LAQ666666	311 TRGRSGS 314
306 SHQESTXGRSRGRSGS 324		

(X=citrullin)

5. Ábra. Az Arg/Cit átalakulás szerepe a filaggrin 306 SHQESTXGXSXRSGRSGS 324 epitóprégióban. A citrullin megjelenése a 12. 14 és 16-os pozícióban az arginin helyett kiemelt fontosságú. A peptid N-terminálisának rövidítése vezet a 311 TXGXSXRSGRSGS 324 peptid epitóphoz, amelynek N-terminálisán azonosítottuk a minimális („mag”) epitóp (311 TXGRS 315) pentapeptid szakaszt.

Egy másik kísérlet sorozatban azt vizsgáltuk, hogy miként befolyásolja az peptid orientációja (N-C vagy C-N) illetve hossza az ellenanyagkötődést. Ennek érdekében olyan biokonjugátum-sorozatokat szintetizáltunk, amelyben a (hosszabb) epitóprégió peptid ($^{306}\text{SHQESTXGXSRSGRSGS}^{324}$) illetve a (rövidebb) epitóprégió peptid ($^{311}\text{TXGRS}^{315}$) N-vagy C-terminálisához biotint kapcsolunk.²² (A biotin-avidin kötődés²³, amely a legerősebb nem-kovalens kölcsönhatásként [$K_d = 1,3 \times 10^{-15}$] ismert gyakran használják analitikai célra úgy, hogy biotinnal jelöljük azt a vegyületet, amelynek a receptor/enzím kötődését vizsgálják.²⁴) A konjugátum avidinkötődési tulajdonságának megőrzését a biztosította, hogy a biotin és az epitóprégió peptid között 6-aminohexánsav „távolság-tartó” részlet került beiktatásra. A négy vegyület összehasonlítva megállapítottuk, hogy az epitóprégió peptidet tartalmazó két konjugátum ($^{306}\text{SHQESTXGXSRSGRSGS}^{324}\text{K}$ -biotin és biotin- $^{306}\text{SHQESTXGXSRSGRSGS}^{324}$) egyaránt kötődtek az RA betegekből származó szérumelleanyagokhoz. Ugyanakkor az epitóprégió peptid biokonjugátumok között jelentős különbség volt észlelhető: a biotint az N-terminálison tartalmazó (biotin- $^{311}\text{TXGRS}^{315}$) peptidet nem ismerte fel az ellenanyagmintá, míg a C-terminálisra beépített biotin ($^{311}\text{TXGRS}^{315}$ -biotin) nem zavarta az ellenanyagkötődést (6. ábra).²²



6. Ábra. Az epitóprégió/epitóprégió peptid orientációja (N-C vagy C-N) és mérete ($^{311}\text{TXGRS}^{315}$ vs. $^{306}\text{SHQESTXGXSRSGRSGS}^{324}$) egyaránt meghatározza az ellenanyagkötődést. (+ jelöli a biotint).

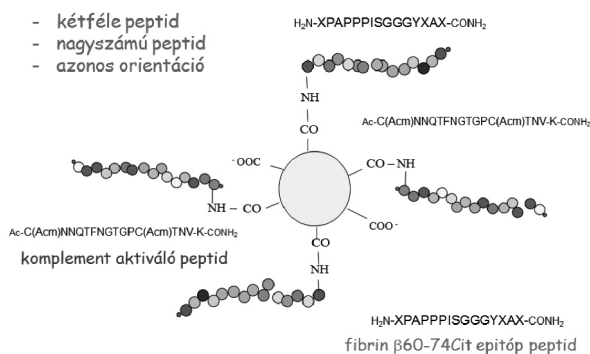
E kísérleti eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy az epitópként funkcionáló peptid mérete (5 vs 19 aminosav) és orientációja (N-C vagy C-N) egyaránt meghatározó lehet az ellenanyagkötődésben, s ez hatékony immundiagnosztikumok kialakításánál döntő szempont lehet.

Egy másik, az RA kialakulásban fontos szerepet játszó, esetenként arginin helyett citrullint (X) tartalmazó fibrin fehérje (α -és β -lánc) antigénszerkezetét tanulmányozva Dr. Guy Serre professzorral és munkatársaival (CNRS -Université Toulouse 3) folytatott közös kutatásaink során három immundomináns fibrin epitóprégiót azonosítottunk. A fibrin α -és β -láncból származó Arg/Cit tartalmú $^{34}\text{GPRVVXHQSACKDS}^{48}$ (α 36-50) és $^{60}\text{RPAPPPISGGYXAX}^{74}$ (β 60-74) peptidek szérum ellenanyagkötésének összehasonlító tanulmányozása alapján jelentős különbséget lehetett tapasztalni az egészségesek és betegek mintái között.^{25,26} E tanulmányok, valamint a fentiekben összegzett epitóprégió-orientáció-kötődés elemzés alapján választottuk ki azt az ellenanyag (B-sejt) epitóprégió peptidet ($^{60}\text{RPAPPPISGGYXAX}^{74}$, β 60-74), amelyet az alábbiakban „célbajuttató” egységként használtunk egy háromkomponensű biokonjugátum tervezésénél, szintézisének.^{25,26}

2. Célbajuttatás háromkomponensű peptid-konjugátumokkal

A biokonjugátumok kutatásának másik fontos iránya azt tanulmányozza, milyen szerkezeti fel-tételek teljesülése szükséges ahhoz, hogy a kovalensen kapcsolt partner molekula (pl. hatóanyag, fluorofor) szelektíven a kívánt (cél)sejtbe jusson és ezáltal ne veszélyeztesse az ép sejteket.

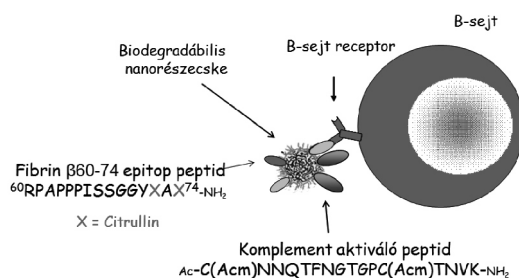
Az általunk tervezett háromkomponensű peptid biokonjugátumban biodegradábilis poli(tejsav-glikolsav) + pluronic sav kopolimer nanorészecskéhez kapcsolódik az az oligopeptid egység, amely felelős a célsejt felismeréséért, a specifikus receptorkötődés kialakításáért, valamint egy másik oligopeptid, amely képes a célsejt elpusztítására (7. ábra)^{27,28}



7. Ábra. Háromkomponens poli(tejsav-glikolsav) + pluronic sav kopolimer nanorészecskét tartalmazó biokonjugátum, amely több kópiában, azonos orientációban tartalmaz célsejtfelismerő fibrin β 60-74 ($^{60}\text{RPAPPPISGGYXAX}^{74}$) peptidet és komplement-aktiváló ($\text{Ac-C}^{233}\text{(Acm)NNQTFNGTGPC(Acm)TNV}^{247}\text{K-CONH}_2$) peptidet.

A 8. ábrán vázlatosan bemutatott munkahipotézis alapján azt kívántuk megvizsgálni, hogy e konjugátum képes-e elpusztítani azokat a B-sejteket, amelyek az autoimmunválasz során keletkező citrullinált fibrin epitóprégióspecifikus ellenanyagokat állítják elő.²⁹

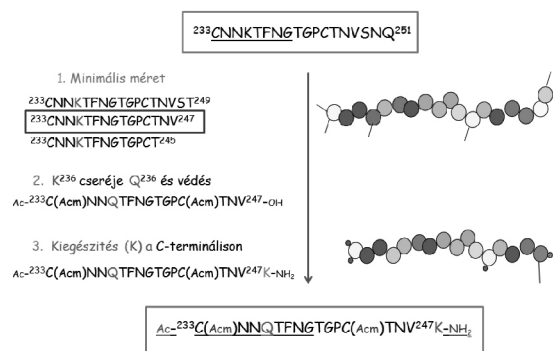
Azokat a B-sejteket vettük tehát célba, amelyek a fibrin β -láncból származó $^{60}\text{RPAPPPISGGYXAX}^{74}$ (β 60-74) epitóprégió-specifikus és a RA autoimmun betegség kialakulásában szerepet játszó ellenanyag fehérjéket termelnek. Ezen sejtek felszínén ugyanis – a célsejtre jellemző – receptorok vannak, amelyek ezt az epitóprégió peptidet ismerik fel, kötődnek hozzá.



8. Ábra. A citrullinált fibrin – specifikus ellenanyagot termelő B-sejt lizise („elpusztítása”) háromkomponensű biokonjugátummal. A célsejtet a fibrin β -láncból származó $^{60}\text{RPAPPPISGGYXAX}^{74}$ (β 60-74) epitóprégió peptid ismeri fel, míg a lizist a komplement rendszer aktiválásával a $\text{Ac-C}^{233}\text{(Acm)NNQTFNGTGPC(Acm)TNV}^{247}\text{K-CONH}_2$ oligopeptid indukálja.

Az előző fejezetben leírtuk²², hogy az epitóp peptid orientációja befolyásolhatja az ellenanyaghoz (célsejt) való kötődést. E megfigyelésre való tekintettel az epitóp peptid orientációját úgy választottuk meg, hogy a nanorészecskéhez kapcsolást követően is megőrződjön az ellenanyagkötődési képesség. Ezért a peptid (NH₂-⁶⁰PAPPISSGGYXAX⁷⁴-CONH₂) szabad N-terminális aminocsoportján keresztül N-C orientációban – savamid kötással – kapcsolunk a nanorészecske felszínén kialakított szabad karboxil csoporthoz.

A konjugátum másik – szintén a nanorészecske hordozóhoz kapcsolódó – alkotórésze a sejt elpusztulását, akár kis mennyiségben is, előidézni képes molekula. Választásunk egy komplement aktiváló sajátosságú, a HIV gp 120 glikoproteinből származó, az irodalomban leírt³⁰ fehérjeszakaszra esett (²³³CNNKTFNGTGPCTNVSQ²⁵¹). Először e peptid hatásért felelős részét azonosítottuk, majd a legrövidebb, konjugálható származékát állítottuk elő (9. ábra).



9. Ábra. A HIV gp 120 fehérjéből származó komplement aktiváló peptidszakasz (²³³CNNKTFNGTGPCTNVSQ²⁵¹) egyforma, azonos orientációjú konjugálásra alkalmas változatának létrehozása: a méret, a kapcsolási hely és a funkció csoport kialakítása.

Meghatároztuk, mi az a hatásért felelős legkisebb molekularész, amely még megőrzi a komplement aktiváló sajátosságot. Kikísérleteztük, hogy a peptid mely funkció csoport felhasználásával kapcsolható úgy a nanorészecskéhez, hogy ne veszítse el sejtpusztulást eredményező funkcióját. A legkisebb (²³³CNNKTFNGTGPCTNV²⁴⁷), hatásos oligopeptidet alkalmassá kellett tenni az egyféle és azonos orientációjú térbeli „megjelenésre”. Ezért a Lys236 aminosavat helyettesítettük (Gln236) és egy további aminosavat (Lys248) építettünk be a peptid C-terminálisára. E vegyület megőrizte komplement aktiváló hatását azután is, hogy a C-terminálison keresztül C-N orientációban, savamid kötással konjugáltuk a nanorészecskéhez.

Összegezve megállapítható²⁹, hogy a háromkomponensű, biodegradálható (tejsav-glikol-sav) + pluronic sav kopolimer nanorészecske konjugátum nagy számban és azonos orientációban tartalmaz sejtfelismerő epitóp peptidet (⁶⁰RPAPPISSGGYXAX⁷⁴) és sejtpusztulást előidéző komplement aktiváló peptidet (Ac-²³³C(Acm)NNQTFNGTGPC(Acm)TNV²⁴⁷K-CONH₂) (7. ábra). A háromkomponensű, biodegradálható konjugátum a) kötődik fibrin β-lánc β60-74 epitóp peptid specifikus IgG ellenanyaghoz és RA betegből szá

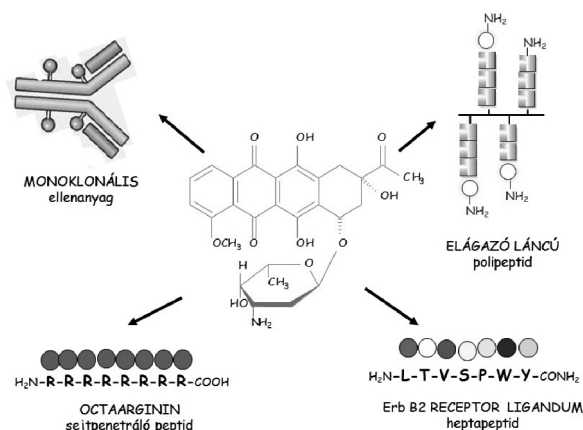
rmazó B-sejtekhez, b) aktiválja a komplement rendszert és ennek kö-vetkezményeként, c) elpusztítja *in vitro* azokat a B-sejteket, amelyek fibrin β-lánc β60-74 epitóp peptid specifikus ellenanyagot (autoellenanyag) termelnek.

E konjugátumcsalád létrehozása és jellemzése a Kutatócsoport (Dr. Magyar Anna és Dr. Uray Katalin főmunkatársak), Prof. Kiss Éva ((ELTE Kémiai Intézet, Határfelületi-és Nanoszerkezetek Laboratóriuma), Prof. Sármay Gabriella (ELTE Immunológia Tanszék) és munkatársaik közös eredménye, amely új távlatokat nyithat a rheu-matoid arthritisben szenvedő betegek kezelésben.

3. A hatóanyag célbajuttatás peptid-konjugátummal: a protein expresszió – mechanizmus kutatás

Korábbi kutatásaink során a tumorellenes hatású antraciklint (daunomicint, Dau) konjugáltuk a sejtfelszíni struktúrákat szelektíven felismerő monoklonális ellenanyagokhoz³¹, elágazó láncú polimer polipeptidhez³², valamint sejtpenetráló oligoarginin peptidhez.^{33,34} (10. ábra)

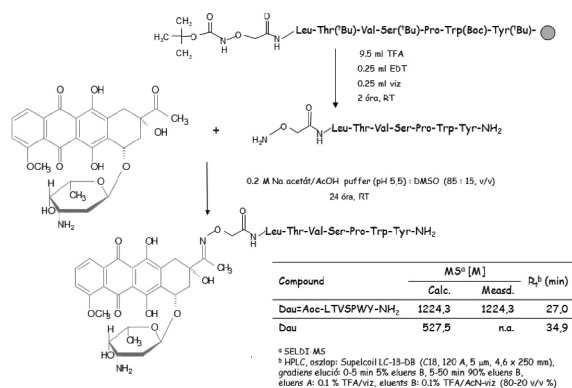
Eredményeink arra utaltak, hogy a szabad hatóanyag és fehérjével, elágazó láncú polipeptiddel vagy oktaargininnel konjugált származékok hatása és sejtekbe történő bejutása egymástól eltérő mechanizmus szerint valósul meg.



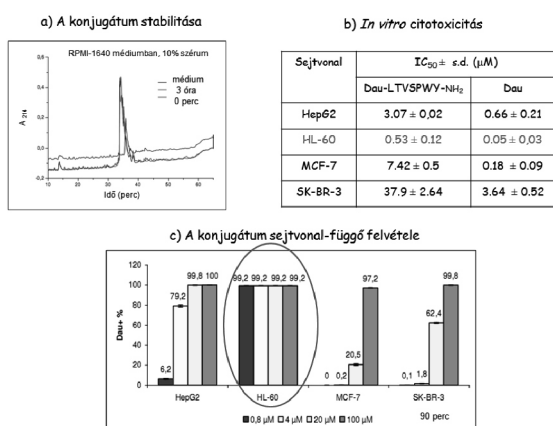
10. Ábra. A tumorellenes hatású daunomicin ellenanyag fehérje, szintetikus polipeptid és oligopeptid konjugátumai.

A Dau, kismolekulaként diffúzió útján, a receptor felismerő egységgel bíró ellenanyag konjugátum receptor mediált endocitózissal, míg a különböző szintetikus polipeptid konjugátumok – a hordozó szerkezete által meghatározott módon – az „A típusú” scavenger receptor bekapcsolódásával vesz részt a folyamatban.^{34,35,36,37}

Új kísérleteinkben, az ErbB2 receptor ligandumát az LTVSPWY oligopeptidet és Dau-t tartalmazó konjugátum állítottunk elő.³⁸ Az ErbB2 receptor fokozott expresszióját figyelték meg bizonyos (pl. HER2 receptor pozitív emlő) tumorok esetében³⁹, ligandumát fágát stratégia segítségével azonosították.⁴⁰ A két partner vegyületet oxim kötással kapcsolunk össze, a védett, N-terminálisán amino-oxi-acetil csoportot tartalmazó peptidet szilárd hordozón állítottuk elő és hasítás után a konjugálás oldatban valósult meg (11. ábra).³⁸



11. Ábra. A Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátum szintézisének stratégiája és körülményei, a konjugátum jellemzése (lásd MS és R_f értékek)



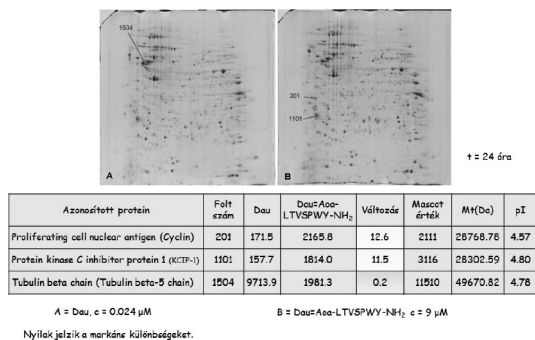
12. Ábra. A Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátum kémiai stabilitása, *in vitro* citotoxicitása (IC₅₀ értékek) és sejtfelvétele (% Dau pozitív sejt, c = 0,8 – 100 µM, 90 perc) különböző ErbB2 receptort tartalmazó sejteken.

A tiszta és szerkezetileg jellemzett konjugátum felhasználásával azt kívántuk vizsgálni, hogy mennyiben tér el tumorsejt fehérje-expressziós profilja a szabad és konjugált Dau kezelés esetében. Először a konjugátum stabilitását vizsgáltuk a tervezett kísérleti körülmények között annak tisztázására, hogy nem bomlik-e a vegyület a sejtek számára használt médiumban. Négy tumor-sejtvonalat összehasonlítva megállapítottuk, hogy a HL-60 humán leukémia sejtek reagálnak a legérzékenyebben a vegyületekkel (szabad és Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátom) történő kezelésre. E megfigyelést mind az *in vitro* citotoxicitás (IC₅₀ = 0.53 ± 0.12 µM), mind pedig a sejtbejutás vizsgálat (99,2 % c = 0,8 µM, 90 perc) megalapozta (12. ábra).³⁸

A kezelés után, a kétdimenziós gélelektroforetikus elválasztást követően, a fehérje fragmentálás és a tömegspektrometriás aminosav-sorrend meghatározás, valamint a protein adatbázisban való keresés világosan kimutatta, hogy a Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátum illetve a szabad Dau kezelt sejtek – a kezeletlen kontrol sejtekhez képest – más fehérjéket, más mennyiségben szintetizálnak.³⁸

A szabad daunomicinnel és a célfelismerő egységgel rendelkező konjugátummal kezelt HL-60 humán leukémia sejtek közötti különbség igen markánsnak bizonyult (13. ábra).

A proteomikai módszerekkel azonosított három fehérje közül kettő [proliferating cell nuclear antigen (Cyclin), protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP-1)] több mint 10-szer nagyobb, míg a tubulin beta-5 chain fehérje 5-ször kisebb mértékben jelent meg a Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátummal kezelt sejtek hidrolizátumában, mint a szabad Dau kezelést követően.



13. Ábra. A szabad daunomicin (A) és a Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátum (B) hatása HL-60 humán leukémia sejtek protein expressziós mintázatára a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis után.

A kezelt sejtek fehérje mintázata nemcsak egymástól, de a kezeletlen sejtektől is jelentős mértékben különbözik (14. ábra). A kezeletlen sejtekhez képest a szabad Dau hatására két fehérje expressziója megemelkedik (tubulin beta-5 chain fehérje, Ran-specific GTPase-activating protein), míg két másik fehérjéből kevesebb van jelen [(proliferating cell nuclear antigen (Cyclin), actin, cytoplasmic 1 (beta-actin)]. A Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátum fordított változást idézett elő a HL-60 sejteken: a proliferating cell nuclear antigen (Cyclin) expressziója jelentősen nőtt, míg a tubulin beta-5 chain fehérje kifejeződésnek mértéke csökkent. Ugyanakkor két másik fehérje expresszióját a konjugátum nem befolyásolta [Ran-specific GTPase-activating protein, actin cytoplasmic 1 (beta-actin)]. A protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP-1) fehérje szint viszont markánsan emelkedett.³⁸

Protein	Control	Dau	Változás	Dau=Aoa-LTVSPWY-NH ₂	Változás
Proliferating cell nuclear antigen (Cyclin)	1440.7	171.5	0.12 ↓	2165.8	12.6 ↑
Tubulin beta chain (Tubulin beta-5 chain)	1337.6	9713.9	7.26 ↑	1981.3	0.2 ↓
Ran-specific GTPase-activating protein (Ran-binding protein 1)	789.7	1648.5	2.09 ↑	Nincs változás	
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	11178.5	1615.8	0.14 ↓	Nincs változás	
Protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP-1)	157.7	Nincs változás		1814.0	11.5 ↑

14. Ábra. A kezelt és kezeletlen sejtek protein expressziós profiljának összehasonlítása - egy lehetséges értelmezés: Cyclin és tubulin beta-5 fehérjék mindkét folyamatban szerepet játszanak, a Ran-binding protein 1 és actin változik a szabad Dau kezelés után, és a protein kinase C (KCIP-1) változik a Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátum kezelés után.

Érdeemes megjegyezni, hogy a „receptor-célfel-ismerő” egység lecserélése a Dau=Aoa-LTVSPWY-amid konjugátumban sejtpenetráló tulajdonságú oligopeptidre (pl. oktaargininre, 10. ábra) újabb, a fentitől eltérő mechanizmusú (nem receptor-mediált) sejtbejutást tesz lehetővé és más fehérjemintázatot eredményez (közlés alatt).

E vázlatos áttekintés is jelzi, hogy e proteomikai megközelítési módszer lehetőséget adhat a hatásmechanizmus (szabad vs. konjugált hatóanyag) megértésére, valamint új fehérje célpontok, bio-szintetikus utak felfedezésére.

Ezek a megfigyelések jelzik a szabad és konjugált kemoterápiás szerek eltérő hatásmechanizmusát, s új utakat nyithatnak meg a gyógyszer-hatóanyag célpontok azonosításában.

4. Kitekintés

Összefoglalva, az elmúlt években új konjugálási stratégiák, szintézismódszerek, analitikai eljárások kidolgozásával és felhasználásával, valamint szisztematikus szerkezethatás összefüggések elemzésével olyan, új konjugátumokat állítottuk elő, amelyekben tumorellenes (daunomicin, vin-blasztin⁴¹, folsav antagonisták származékok^{42,43,44}) vagy antimikrobiális hatású molekula kapcsolódik oligo- vagy polipeptidhez^{45,46}. A hatásos vegyületek esetében ígéretes első lépéseket tettünk a hatás mechanizmusának tisztázására is (pl. a konjugátum által kiváltott protein expressziós profil jellemzésére³⁸, a tubulin rendszerre gyakorolt hatásra⁴¹, a „scavenger A” receptor³⁷ illetve más felvételi utak⁴⁷ azonosítására vonatkozóan).

Újabb eredményeink jelzik, hogy e vegyülettípus alkalmas lehet a) fehérjék antigénstruktúrájának feltárására^{11,12}, egyes poszt-transzlációs módosulások tanulmányozására (lásd autoimmunitás molekuláris szintű jellemzése), b) tumorellenes szerek hatásának kutatására, a sejten belüli folyamatok megértésére (lásd szabad és konjugált Dau hatásmechanizmusának proteomikai elemzése). Ezen alapkutatási eredmények ugyanakkor megalapozhatják új, hatékony pl. diagnosztikai módszerek és terápiás megközelítések kialakítását bizonyos az autoimmun betegségek vonatkozásában illetve új gyógyszer-célpontok azonosítását („target validálás”) tumor- és vagy mikrobiális fertőzés ellenes hatóanyagok fejlesztésére. Az elmúlt évtizedekben, a hagyományostól alapvetően eltérő típusú gyógyszerkutatói irányzatok kibontakozása összefüggésben van a biokonjugátumok sikeres megjelenésével a gyógyászatban (pl. a bizonyos körökben ígéretes monoklonális ellenanyagok és kemoterápiás szerrel vagy „riporter” molekulával konjugált változataik). Másrészt előtérbe került a célfelismerő, a célsejt-bejutást elősegítő struktúrát tartalmazó oligopeptid -hatóanyag konjugátumok szintézise, tulajdonságaik vizsgálata szerkezethatás összefüggések feltárása révén.

Köszönetnyilvánítás

Az előadásban bemutatott eredmények, munkatársaim, a laborban dolgozó doktori hallgatók, diákok, valamint hazai és nemzetközi együttműködő partnerek főként utolsó közel 10 éves munkáját tükrözik. Köszönöm professzoraim, †Szekerke Mária tud. tanácsadó, †Gergely János egyetemi tanár, akadémikus, Kovács János egyetemi tanár, †Kucsman Árpád egyetemi tanár és Medzihradzky Kálmán egyetemi tanár, akadémikus támogatását, tanácsait. Köszönöm, hogy az MTA levelező tagjává történt megválasztásom után (is) együtt dolgozhattam Prof. Francesco Dieli (University of Palermo), Prof. Toshiyuki Inazu (Tokai University,

Tokyo), Dr. Jerome Kucharczak (Université Lyon), Prof. Milica Pešič (University of Belgrade), Prof. Gabriella Pócsfalvi (CNR, Naples), Prof. Luis Rivas (CIB, CSIC, Madrid), Prof. Guy Serre (Université Toulouse 3) és Prof. Kata és Robert Wilkinson (University of Cape Town) kollégákkal és évtizedek óta együtt dolgozhatok Prof. David Andreu (Universitat Pompeu Fabra, Barcelona), Prof. Shiroh Futaki (Kyoto University), Prof. Claude F. Meares (University of California, Davis) és Prof. Michael Przybylski (Universität Konstanz) professzorokkal és munkatársaikkal.

Köszönöm az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársainak, doktoránsainak a hatékony együttműködést. Köszönöm annak lehetőségét, hogy e – 1961-ben Bruckner Győző akadémikus által alapított – kutatócsoport vezetője lehettem az elmúlt 18 évben.

Köszönöm azoknak, akik segítettek és segítik a napi munkát a laborokban, az irodákban.

Köszönöm családom minden tagjának, különösen feleségemnek, Gabinak, édesanyjának dr. Csik Lászlónénak, fiaimnak, Gergőnek és Andrisnak, feleségeiknek Dórinak és Katinak, testvéremnek, Istvánnak és feleségének, Gertrúdnak, hogy velem voltak és vannak itthon és külföldön.

Köszönöm az MTA, az ELTE, az OTKA, valamint az MTA-CNR (Magyar-Olasz), a TÉT alapítvány (Magyar-Francia, Magyar-Japán és Magyar-Dél-Afrika) és EU-COST programok, ipari partnereink, Richter G. Nyrt, Reanal Rt, Softflow kft és a többiek támogatását.

Hivatkozások

1. Hudecz, F. *Magyar Kémiai Folyóirat*, **2012**, 118, 5-16.
2. Hudecz, F. *Magyar Kémiai Folyóirat*, **2012**, 118, 87-88.
3. Mező, G.; Szabó, I.; Orbán, E.; Szabó, R.; Bánóczi, Z.; Hudecz, F. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2012**, 118, 89-91.
4. Bősze, Sz.; Horváti, K.; Mező, G.; Medzihradzky-Schweiger, H.; Hudecz, F. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2012**, 118, 92-94.
5. Uray, K.; Magyar, A.; Bősze, Sz.; Schlosser, G.; Hudecz, F. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2012**, 118, 95-98.
6. Hermanson, G.T. *Bioconjugate techniques* (3rd Edition) Academic Press, **2013**
7. Aslam, M.; Dent M.A. *Bioconjugation*, Macmillan Reference Ltd., **1998**
8. Mark, S.S. (Ed.) *Bioconjugation Protocols* (2nd Edition) Methods in Molecular Biology, Springer, **2011**
<https://doi.org/10.1007/978-1-61779-151-2>
9. Mihala, N.; Hudecz, F. *In Specialist Periodical Reports Amino Acids, Peptides and Proteins* Farkas, E.; Ryadnov, M. Eds., Royal Society of Chemistry, London **2012**, 37, 1-39.
10. Narain, R. (Ed.): *Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications*, Wiley, **2014**
<https://doi.org/10.1002/9781118775882>
11. Uray, K.; Hudecz, F. *In Specialist Periodical Reports Amino Acids, Peptides and Proteins* Farkas, E.; Ryadnov, M. Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, 39, 68-113.
12. Bősze, Sz.; Hudecz, F.: *In Specialist Periodical Reports Amino Acids, Peptides and Proteins* Ryadnov, M. Hudecz, F. Eds. Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2016**, 40, 146-198.

13. Petersen, J.; Purcell, A.W.; Rossjohn, J. *J. Mol. Med.* **2009**, *87*, 1045-1051. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0526-4>
14. Szabados, H.; Bősze, Sz.; Silló, P.; Kárpáti, S.; Hudecz, F.; Uray, K. *J. Peptide Science* **2013**, *19*, 84-94. <https://doi.org/10.1002/psc.2476>
15. Szabados, H.; Uray, K.; Majer, Zs.; Silló, P.; Kárpáti, S.; Hudecz, F.; Bősze, Sz. *J. Peptide Science* **2015**, *21*, 731-742. <https://doi.org/10.1002/psc.2800>
16. Uray, K.; Price, M.R.; Hudecz, F. *J. Peptide Science* **1998**, *4*, 319-326. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1387\(199808\)4:5<319::AID-PSC151>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1387(199808)4:5<319::AID-PSC151>3.0.CO;2-1)
17. Uray, K.; Hudecz, F. *Molecular Diversity* **2012**, *16*, 103-112. <https://doi.org/10.1007/s11030-012-9362-5>
18. Uray, K.; Mizuno, M.; Inazu, T.; Goto, K.; Hudecz, F. *Biopolymers* **2014**, *102*, 390-395. <https://doi.org/10.1002/bip.22526>
19. Yamada, R. *Autoimmunity Reviews* **2005**, *4*, 201-206. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2004.11.002>
20. Magyar, A.; Brózik, M.; Hudecz, F. *Collection Symposium Series* **2011**, *13*, 80-84. <https://doi.org/10.1135/css201113080>
21. Szarka, E.; Babos, F.; Magyar, A.; Huber, K.; Szittner, Z.; Papp, K.; Prechl, J.; Pozsgay, J.; Nagy, Gy.; Rojkovich, B.; Gáti, T.; Kelemen, J.; Baka, Zs.; Brozik, M.; Pazár, B.; Poór, Gy.; Hudecz, F.; Sármay, G. *Immunology* **2014**, *141*, 181-191. <https://doi.org/10.1111/imm.12175>
22. Babos, F.; Szarka, E.; Nagy, Gy.; Majer, Zs.; Sármay, G.; Magyar, A.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 817-827. <https://doi.org/10.1021/bc400073z>
23. Green, N. M. *Adv. Prot. Chem.* **1975**, *29*, 85-133. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60411-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60411-8)
24. Sélo, I.; Négroni, L.; Crémignon, C.; Grassi, J.; Wal, J. M. *J. Immunol. Methods* **1996**, *199*, 127-138. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(96\)00173-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(96)00173-1)
25. Iobagiu, C.; Magyar, A.; Nogueira, L.; Cornillet, M.; Sebbag, M.; Arnaud, J.; Hudecz, F.; Serre, G. *J. Autoimmunity* **2011**, *37*, 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.07.003>
26. Cornillet, M.; Sebbag, M.; Verrouil, E.; Magyar, A.; Babos, F.; Ruysen-Witrand, A.; Hudecz, F.; Cantagrel, A.; Serre, G.; Nogueira L. *Ann. Rheumatic Diseases*, **2014**, *73*, 1246-1252. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202868>
27. Magyar, A.; Gyulai, G.; Pozsgay, J.; Schlosser, G.; Uray, K.; Szarka, E.; Rojkovich, B.; Nagy, Gy.; Kiss, É.; Sármay, G.; Hudecz, F. *In 23rd Polish Peptide Symposium, Book of Abstracts*, Kolesińska, B.; Kierus, K.; Fraczyk, A. Eds, (ISBN 978-83-61479-69-7), Spala, Poland, **2015**, 42.
28. Gyulai, G.; Kiss, É.; Pozsgay, J.; Uray, K.; Magyar, A.; Nagy, Gy.; Rojkovich, B.; Hudecz, F.; Sármay, G. *In 2nd International Symposium on Scientific and Regulatory Advances in Complex Drugs, Book of Abstracts*, Klebovich, I.; Crommelin, D.J.A.; Mühlebach, S.; Shah, V.P. Eds. (ISBN 978-015-5070-78-1), OOK-Press Ltd, Veszprém, **2016**, 68.
29. Pozsgay, J.; Babos, F.; Uray, K.; Magyar, A.; Gyulai, G.; Kiss, É.; Nagy, Gy.; Rojkovich, B.; Hudecz, F.; Sármay, G. *Arthritis Research & Therapy*, **2016**, *18*, 15-27. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0918-0>
30. Süsal, C.; Kirschfink, M.; Kropelin, M.; Daniel, V.; Opelz, G. *Blood* **1996**, *87*, 2329-2336.
31. Hudecz, F.; Ross, H.; Price, M.R.; Baldwin, R.W. *Bioconjugate Chemistry* **1990**, *1*, 197-204. <https://doi.org/10.1021/bc00003a004>
32. Hudecz, F.; Kóczán, Gy.; Reményi, J. *In Molecular pathomechanisms and new trends in drug research*, Keri, Gy., Toth, I. Eds.; Taylor and Francis Group, London, **2003**, pp. 553-578.
33. Bánóczy, Z.; Peregi, B.; Orbán, E.; Szabó, R.; Hudecz, F. *ARKIVOC* **2008**, 140-153.
34. Miklán, Zs.; Orbán, E.; Csík, G.; Schlosser, G.; Magyar, A.; Hudecz, F. *Biopolymers (Peptide Science)* **2009**, *92*: 489-501. <https://doi.org/10.1002/bip.21264>
35. Hudecz, F.; Reményi, J.; Szabó, R.; Kóczán, Gy.; Mező, G.; Kovács, P.; Gaál, D. *J. Mol. Recognition* **2003**, *16*, 288-298. <https://doi.org/10.1002/jmr.639>
36. Reményi, J.; Csík, G.; Kovács, P.; Reig, F.; Hudecz, F. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.12.008>
37. Szabó, R.; Bánóczy, Z.; Mező, G.; Láng, O.; Kőhidai, L.; Hudecz, F. *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1798*, 2209-2216. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.023>
38. Orbán, E.; Manea, M.; Marquadt, A.; Bánóczy, Z.; Csík, G.; Fellingner, E.; Bősze, Sz.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry*, **2011**, *22*, 2154-2165. <https://doi.org/10.1021/bc2004236>
39. Seoane, S.; Montero, J.C.; Ocaña, A.; Pandiella, A. *J. Natl. Cancer Inst.* **2010**, *102*, 1432-1446. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq315>
40. Shadidi, M.; Sioud, M. *FASEB J.* **2003**, *17*, 256-258.
41. Bánóczy, Z.; Gorka-Kereskényi, Á.; Reményi, J.; Orbán, E.; Hazai, L.; Tőkési, N.; Oláh, J.; Ovádi, J.; Béni, Z.; Háda, V.; Szántay Jr., Cs.; Hudecz, F.; Kalas, Gy.; Szántay, Cs. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 1948-1955.
42. Miklán, Zs.; Orbán, E.; Bánóczy, Z.; Hudecz, F. *J. Peptide Science*, **2011**, *17*, 805-811. <https://doi.org/10.1002/psc.1407>
43. Szabó, I.; Orban, E.; Schlosser, G.; Hudecz, F.; Bánóczy, Z. *Eur. J. Med. Chemistry*, **2016**, *115*, 361-368. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.034>
44. Sebestyén, M.; Kóczán, Gy.; Hudecz, F. *Amino Acids*, **2016**, *48*, 2599-2604. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2285-1>
45. Horváti, K.; Bacsa, B.; Szabó, N.; Dávid, S.; Mező, G.; Grolmusz, V.; Vértessy, B.; Hudecz, F.; Bősze, Sz. *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 900-907. <https://doi.org/10.1021/bc200221t>
46. Horváti, K.; Bacsa, B.; Szabó, N.; Fodor, K.; Balka, Gy.; Rusvai, M.; Kiss, É.; Mező, G.; Grolmusz, V.; Vértessy, B.; Hudecz, F.; Bősze, Sz. *Tuberculosis (Edinb)*. **2015**, *95*, 207-211. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.026>
47. Szabó, R.; Sebestyén, M.; Kóczán, Gy.; Orosz, Á.; Mező, G.; Hudecz, F. *ACS Combinatorial Science*, **2017** (in press) <https://doi.org/10.1021/acscorgb.6b00133>
48. Kalia, J.; Raines, R.T. *Cur. Org. Chem.* **2010**, *14*, 138-147. <https://doi.org/10.2174/138527210790069839> <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.017>
49. Ming, X.; Laing, B. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.002>
50. Albada, B.; Metzler-Nolte, N. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1179711839. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00166>
51. Hu, Q.Y.; Berti, F.; Adamo, R. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *5*, 1691-1719. <https://doi.org/10.1039/C4CS00388H>
52. Foubert, A.; Beloglazova, N. V.; Rajkovic, A.; Sas, B.; Madder, A.; Goryacheva, I.Y.; De Saeger, S. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *83*, 31-48. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.008>
52. Miklán, Zs. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd, Tudományegyetem, **2010**.
53. Orbán, E. Ph.D. Disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2011**.
54. Babos, F. Ph.D. Disszertáció, (témavezető: Magyar Anna) Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2014**.
55. Szabados, H. Ph.D. Disszertáció, (témavezetők: Bősze Szilvia, Uray Katalin) Eötvös Loránd Tudományegyetem, **2016**.

Bioconjugates - the solution lies in concerted action

Novel results and observations are presented in the field of two- or three-party peptide-bioconjugates including the preparation and structural/functional analysis of the components coupled by covalent linkage. In this type of research the chemical space utilized by the researcher could be rather limited in terms of experimental conditions (e.g. temperature, pressure, light, solvent) applied. This is due to requirements concerning bioconjugates in which all two/three components must preserve their functional properties (e.g. spectral characteristics, binding, biological activity). It means no changes in these features are allowed after the development of the covalent bond(s) formed between or among the parties.

In the first two studies, the effect of post-translational modification of proteins on immune recognition was investigated. In this project, we have identified antigenic sites (epitopes) of a protein to learn more about the structural requirements for immune reactions. More precisely we intended to identify changes in the protein structure responsible for immune recognition (e.g. antibody-antigen or/and T-cell-antigen). During the identification of linear (sequential) B-cell (antibody) epitopes we have clarified the role of two types of post-translational modifications (glycosylation, citrullination). Namely, relationship was analyzed between the antibody binding properties and glycosylation status of an epitope originated from mucin 2 glycoprotein derived from cancer patients or healthy individuals. We have demonstrated that the presence of even a single monosaccharide unit (D-glucose) in a "right" position ($^{16}\text{PTPTGT}(\text{Glc})\text{Q}^{22}$) could fully destroy the binding of a monoclonal antibody recognising the non-glycosylated peptide epitope ($^{16}\text{PTPTGTQ}^{22}$) of mucin 2 glycoprotein. Similarly, we have studied several epitope-regions from proteins (filaggrin, fibrin) whose citrullinated forms are playing a pivotal role in the development of autoimmune diseases like rheumatoid arthritis (RA). By designing, synthesizing and using a group of new oligopeptide-biotin conjugates we have observed that the interaction of autoimmune polyclonal serum antibodies raised against citrullin (Cit) containing proteins (e.g. filaggrin, fibrin) markedly depends not only on the number and relative position of Arg/Cit post-translational modifications, but also on the orientation (C to N or N to C terminal) of the epitope/epitope-region peptides. These findings were applied for measuring the antibody levels in serum samples from diseased as well as healthy subjects with

tumour (mucin 2 glycoprotein) or with rheumatoid arthritis (filaggrin). Data are promising to develop novel, sensitive and selective peptide antigens (synthetic peptides) for efficient and early diagnosis and following up the result of therapies.

We have prepared novel bioconjugates for targeting of effector compounds to relevant cellular targets. In a three-party conjugate an oligopeptide was attached to a biodegradable, non-toxic copolymer nanoparticle of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) /pluronic acid as recognition unit. With this epitope peptide of fibrin β chain the nanoconjugate was able to bind specifically to B-cells producing citrullinated fibrin in RA. The third component of the bioconjugate was another oligopeptide, but from HSV1 gp 120 protein with the capacity to activate the complement system. This construct after binding to the surface receptor of the targeted B-cells (by the epitope peptide) triggered the complement cascade, which resulted in the lysis of the cell involved in the autoimmune disease. It is important to emphasize that uniform and standardized orientation of both oligopeptides in multiple copies was an essential element of the design to achieve the desired *in vitro* action in biological samples of RA patients. The last example presented provided evidences concerning the different mechanism of a free vs. conjugated antitumour drug in clinical practice. For these studies daunomycin (Dau), an anthracyclin-type compound was coupled with an oligopeptide (LTVSPWY) by stable oxime bond. The effect of Dau and its conjugated derivative on the protein expression profile of HL60 human leukemia cells was compared. The peptide component of the conjugate represents a ligand of the cell membrane receptor, ErbB2, which is very much overexpressed on certain tumour cells (e.g. in HER2 positive breast carcinoma). Both compounds were cytotoxic *in vitro* and were taken up by the treated cells under identical experimental conditions. Thus the conjugate was engulfed by receptor-mediated endocytosis, while the free drug penetrated into the cell by diffusion. We have observed that the protein expression profile of the HL60 cells were dependent of the compound used for the administration. Three proteins were identified, whose expression was markedly altered. Two were up-regulated and the third one was present at a very low concentration in the cell lysate after the same treatment protocol. These data could be considered as identification not only new markers, but also new mechanisms guiding the design of novel drug based on differential protein expression using bioconjugates.