

Hogyan befolyásolja a primer szerkezet elágazó láncú polipeptidek* térszerkezetét és konjugátumaik funkcionális tulajdonságait?

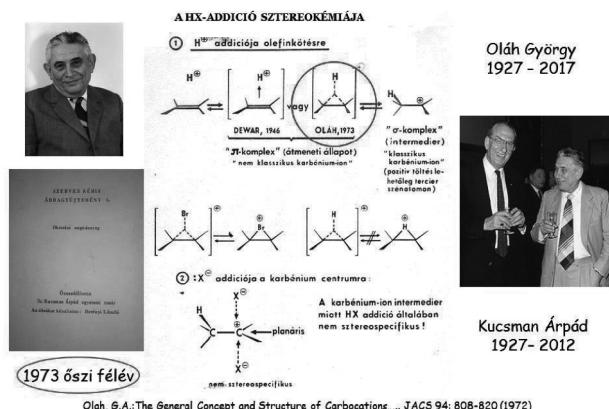
HUDECZ Ferenc^{a,b}

^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

Oláh György professzor nevével először a Szerves kémia előadáson találkoztam. Az ELTE TTK vegyész szakos hallgatójaként a II. év első félévében került sor a Szerves kémia tárgy (heti 4 óra) előadásaira. 1973 őszén Kucsman Árpád professzor, a főkéllégium előadója az addíciós reakciók mechanizmusát elemezve mutatta be azt az eredményt, amelyet Dr. G. A. Olah nem sokkal előbb 1972-ben közölt (JACS 94: 808-820) és amely jelentős mértékben megalapozta a Nobel-díjat (1994). A 70-es évek szerves előadásai, az előadó törekvéseinek megfelelően, a szakmai minőség és a teljesítmény elismerése jegyében szóltak hozzánk. Később személyesen is találkoztam az MTA tiszteleti tagjával és őrzöm a metanol-gazdasággal foglalkozó, magyarul 2007-ben megjelent kötetének egy dedikált példányát.



A biológiailag aktív elágazó láncú polimer polipeptidek kutatásának jelentős hazai hagyományai vannak az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban. Sela és munkatársai 60-as években közölt inspiráló eredményei¹ és Szekerke Mária munkássága² nyomán a kutatócsoport az 1970-es évektől foglalkozik polilizin gerincű elágazó polipeptidek szintézisével, szerkezeti (kémiai) és funkcionális (biológiai) jellemzésével.

Az elmúlt évtizedekben közel 50 tagú új vegyületcsalád együtttest állítottunk elő. A polipeptidek közös tulajdonsága, hogy bennük egy átlagosan 100-150, esetenként 200 lizin egységből álló polimer "gerinchez", a poli[L-Lys] homopolipeptidhez ugyancsak aminosavakból álló "oldalláncok" kapcsolódnak. Ezek az oldalláncok átlagosan 1-6 aminosavat tartalmaznak, egy, kettő vagy háromféle aminosavból épülnek fel és eltérnek egymástól az aminosav sorrend tekintetében is. Az oldalláncok a lizin egységek -amino csoportján egy rövid, 3-4 aminosavból álló oligo(DL-Ala) vagy oligo(DL-Ser) szakaszt és/vagy egy vagy kétféle optikailag aktív (L- vagy D-konfigurációjú) aminosavat (X és/vagy U) tartalmaznak. Az X és U aminosav megválasztásával létre lehetett hozni különböző töltésű, töltéssűrűségű, hidrofil/ hidrofób karakterű vegyületeket.³⁻¹⁶

Az MTA Kémiai Tudományok osztálya Oláh György emlékülésén (Budapest, 2017. május 3.) elhangzott előadás alapján készült jelen össze-foglaló áttekintést nyújt e vegyületek szintézisének stratégiájáról, főbb lépéseiről és három különböző elágazó láncú vegyületcsoport tanulmányozása során megfigyelt összefüggésekről. Példákon keresztül bemutatja, hogy a polipeptidek primer szerkezete (az aminosavösszetétel, az oldalláncok felépítése, a vegyület töltésviszonyai) miként befolyásolja az oldatbeli konformációt, az *in vitro* citotoxicitás mértékét, valamint a biodisztribúció egy elemének (jelenlét a vérkeringésben) jellemzőit. További tájékozódást nyújthatnak a korábban közölt összefoglaló cikkek^{5,10,14} és az eredeti közlemények, amelyeket az irodalomjegyzék sorol fel.

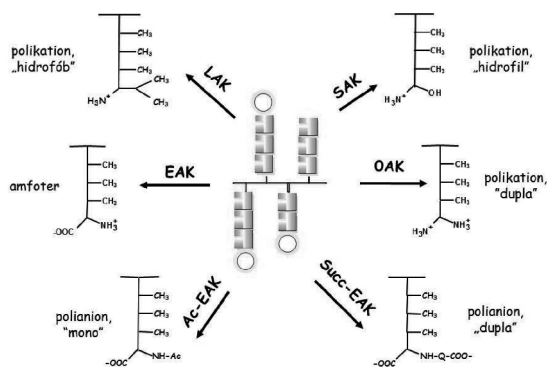
Terjedelmi okok miatt e szöveg nem tér ki a szerkezet-hatás összefüggések teljes körének bemutatására, ezért csak utalhatunk arra, hogy az oldalláncok felépítése, különösen a láncvégi aminosavrész hidrofobicitása, a molekula töltésviszonyai és az oldatbeli konformáció meghatározóak a polipeptid foszfolipid modelmembránon kifejtett aktivitásában.¹⁷⁻²¹ Dr. Rajnavölgyi Éva (ELTE Immunológia Tanszék) kutatásai alapján bizonyítást nyert, hogy állatkísérletekben az oldallánc aminosav összetétele, az oldalláncvégi, optikailag aktív aminosav konfigurációja

* Az elágazó láncú polipeptidek elnevezésénél a megfelelő szabályokat [IUPAC-IUB, 1984] alkalmaztuk. Az m index az oligo-DL-alanin láncok átlagos hosszát adja meg (pl. m = 3), az i pedig az X aminosav átlagos szubsztitúció fokát jelzi (i ??1). A vegyületek nevének rövidítésénél az aminosavak egybetűs kódját alkalmaztuk, azaz K = lizin, A = ala-nin, X = az oldalláncban szereplő aminosav. [IUPAC-IUB Commission on Biomedical Nomenclature. Eur. J. Biochem. 138, 9-37 (1984)].

jelentősen befolyásolja a polipeptidek immunválaszt kiváló képességét, az immunreakció sajátosságait. ²²⁻²⁴ Dr. Gaál Dezső (Országos Onkológiai Intézet) vizsgálatai szerint szerkezetüktől függően modulálják sejtes immungének által indukált immunválaszt, ellensúlyozni képesek tumorelles kemoterápiás szerek (pl. vinkrisztin) vagy radioaktív sugárzás *in vivo* immunszuppresszív hatását. ²⁵⁻²⁷

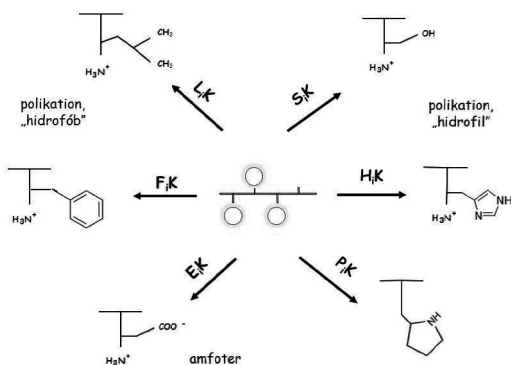
2. Az elágazó láncú polilizin gerincű polipeptidek szintézise, primer szerkezete és jellemzése

A tárgyalt vegyületek három csoportjának vázlatos szerkezetét és egyes reprezentánsokat mutatja be az első három ábra (1-3. ábra). A poli[Lys(X_i-DL-Ala_m)]* (továbbiakban XAK) vegyületek csoportjában a poli[Lys] polimer polipeptidhez rövid oligo(DL-Ala) lánc kapcsolódik -amid kötéssel és annak N-terminálisán (-amid kötés révén) helyezkedik el az X aminosav illetve acilezett (pl. Ac-Glu, Suc-Glu vagy Mal-Glu) származéka (1. ábra).



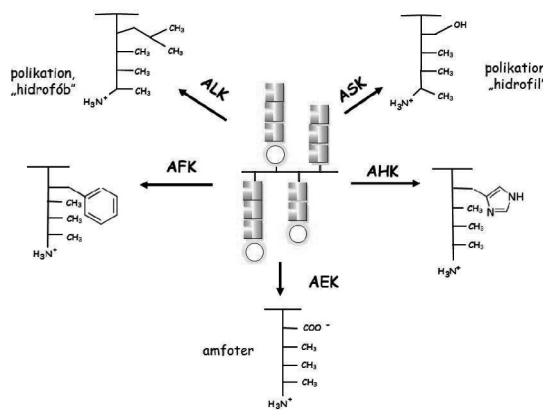
1. Ábra. A poli[Lys(X_i-DL-Ala_m)] (továbbiakban XAK) vegyületek, ahol $i < 1$, $m \sim 3-4$ és X = (D)Leu, Ile, Nle, Val, (D)Phe, (D)Tyr, Pro, (D)His, (D)Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, (D)Glu, Ac-Glu, Suc-AK, Suc-Glu vagy Mal-Glu.

Az X aminosavat tartalmazó poli[Lys(X_i)] (továbbiakban X_iK) típusú polipeptidekben az oldallánc rövid, csupán egyetlen X aminosavból áll (2. ábra), amelyet -savamid kötés rögzít a poli[Lys] gerinchez.



2. Ábra. A poli[Lys(X_i)] (továbbiakban X_iK) vegyületek, ahol $i < 1$ és X = (D)Glu, (D)Leu, (D)Phe, (D)Ala, Ile, Pro, His, Ser

Az XAK vegyületekkel azonos aminosavakat tartalmazó, de fordított szekvenciájú oldalláncokkal rendelkeznek a poli[Lys(DL-Ala_mX_i)] (továbbiakban AXK) csoport tagjai (3. ábra).

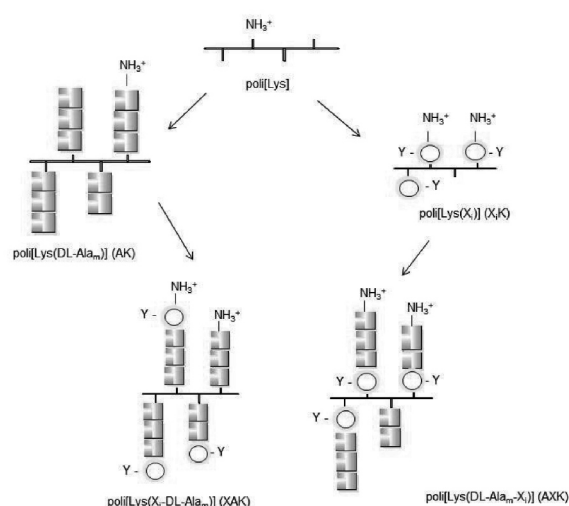


3. Ábra. A poli[Lys(DL-Ala_mX_i)] (továbbiakban AXK) vegyületek, ahol $i < 1$, $m \sim 3-4$ és X = (D)Leu, Phe, Pro, His, Ser, (D)Glu.

Említést érdemel, bár ebben az összefoglalóban nem kerül részletes tárgyalásra, hogy készültek az oldalláncvégeken Lys-Lys, Glu-Glu vagy Tyr-Tyr dipeptidet illetve átlagosan három aminosavból Lys vagy Glu peptidszakaszt tartalmazó variációk is.

A Kutatócsoportban az évek során a kidolgozott és optimalizált szintézis stratégiát, annak gondolatmenetét mutatja be a 4. ábra.

A poli[L-Lys] polipeptidláncot L-Lys(Z)-NCA dietilamin iniciált polimerizációjával előállítottuk elő. Az N-karboxi anhidrid szintézise L-Lys(Z)-OH származék és korábban foszgén, ^{3,4} majd trifoszgén felhasználásával, optimalizált körülmények kimunkálásával valósult meg. ¹⁶



4. Ábra. A poli[Lys(X_i-DL-Ala_m)] (XAK), a poli[Lys(X_i)] (X_iK) és a poli[Lys(X_i-DL-Ala_m)] (AXK) vegyületek, ahol $i < 1$, $m \sim 3-4$. szintézisének stratégiája.

Az XAK típusú polipeptidek előállításakor először eltávolítottuk az N-Z védőcsoportokat (HBr/jégecet), majd a poli[L-Lys] szabad N-amino csoportjai reagáltak DL-Ala NCA-val úgy, hogy átlagosan 3-4, esetenként hosszabb (6-9) aminosavból álló oligo(DL-Ala) oldalláncok jönnek létre. Az így kialakított poli[Lys(DL-Ala_m)] (AK) oldalláncok N-terminálisához konjugáltuk a védett X aminosavat aktív észteres kapcsolással HOBt kapcsolószer jelenlétében.^{3,4,11} Az Arg tartalmú polipeptideknél a guanidino-NO₂ védőcsoport szelektív hasítására új módszer kidolgozására is sor került: NaBH₄ segítségével, réz komplex katalizátor jelenlétében.¹⁶ A védőcsoportoktól mentes Glu tartalmú polipeptid acilezésével állítottunk elő polianionos (Ac-EAK, Suc-EAK, Mal-EAK) származékokat.^{9, 15}

Az X_iK típusú polipeptidek szintézisének, N-Z védőcsoport eltávolítását követően a polilizin N-amino csoportjaihoz – az N-amino csoporton és szükség esetén az X aminosav oldalláncán (pl. Glu -COOH csoport) védett – aminosavat [pl. Z-Glu(OBzl)] kapcsolunk aktív észteres módszerrel, majd a védőcsoport(ka)t eltávolítottuk HBr/jégecet kezeléssel.^{6-8,11}

Ez a polipeptid (X_iK) szolgált iniciátorként az AXK típusú polimer polipeptidek szintéziséhez, amikor N^α-karboxi-DL-Ala anhidrid (DL-Ala NCA) felhasználásával 3-4 aminosavból álló oligo(DL-Ala) oldalláncot alakítottunk ki (4.ábra).^{6-8, 11}

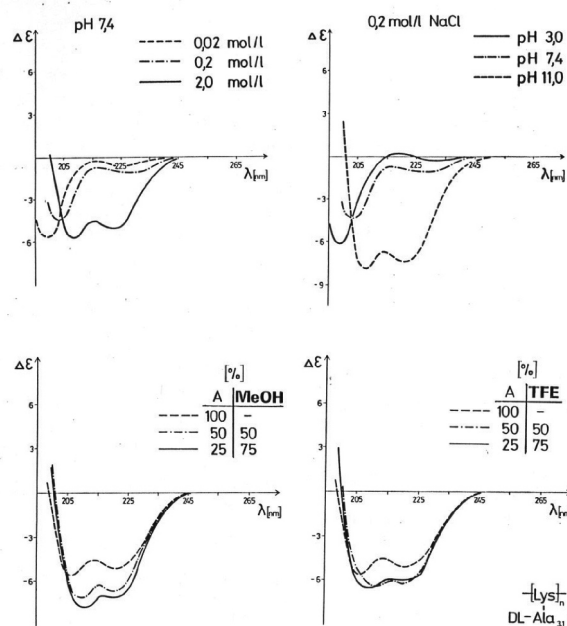
Megjegyzendő, hogy sor került SK és XSK (ahol X = Leu vagy Glu) típusú polipeptidek előállítására is. Ekkor a poli[L-Lys] N-amino csoportjai DL-Ala NCA helyett N^α-Z-DL-Ser(Bzl) anhidriddel reagáltak úgy, hogy a kívánt hosszúságú oligo(Ser) oldalláncok jönnek létre. A védett poli[Lys(DL-Ser_m)] (SK) polipeptid N-amino csoportjaihoz ezután került sor az X aminosav megfelelő származékának kapcsolására, majd a benzil-éter védőcsoportok lehasítására.¹¹⁻¹³

Az oldalláncok összetételének, az aminosavak konfigurációjának (L/D) módszeres változtatásával egymással rokon, de kisebb-nagyobb mértékben eltérő szerkezettel (pl. töltés, hidrofilitás) jellemezhető polimer polipeptidek kerültek előállításra (1-3. ábrák).¹⁴⁻¹⁶ A primer szerkezet és a méret minden korábbinál pontosabb leírása során meghatározták a polipeptidek méreteloszlását (szedimentációs analízis, géelpermeációs kromatográfia, újabban tömegspektrometria.²⁸⁻³⁰) és összetételét (aminosavanalízis és végcsoportanalízis), az oldalláncok hosszúság-eloszlását és enantiomer-összetételét.³¹⁻³³

3. Térszerkezet - az oldatbeli konformáció jellemzése

A polimer polipeptidek konformációs tulajdonságait cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával jellemeztük. Az első oldatbeli térszerkezet vizsgálatokra Dr. Karel Blaha kutatócsoportjában, Prágában (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences) került sor.³⁴

A módszer nagy előnye, hogy segítségével érzékenyen detektálható a környezeti tényezők (pH, ionerősség, oldószer polaritása, hőmérséklet stb.) konformációt befolyásoló hatása. A polipeptidek CD spektrumait különböző kémhatású [savas (pH~3), közel semleges (pH~7,4), bázikus (pH~12)], ionerősségű (0,02, 0,2, 2,0 M NaCl) illetve alkohol tartalmú (TFE illetve MeOH, 100%, 75%, 50%), c = 0,5-1,0 mg/cm³ koncentrációjú oldószerben. A [θ]_{MR} értékeket a főlánc egy lizin egységére vonatkoztatva állapítottuk meg beleértve a teljes oldalláncot. Példaként az AK polipeptid – különböző körülmények között felvett – spektrumait mutatja be az 5. ábra.

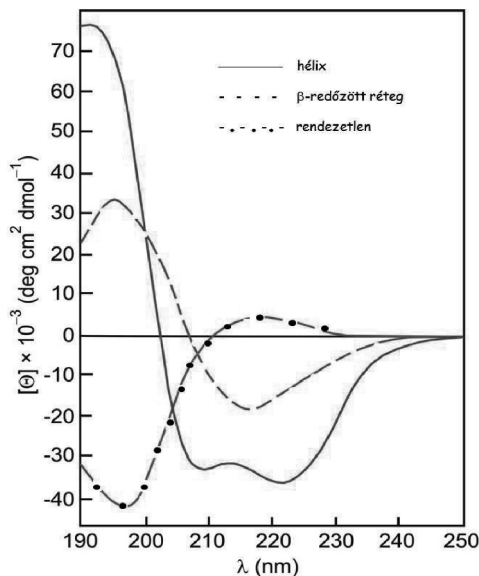


5. Ábra. A poli[Lys(DL-Ala_m)] (AK) polipeptid, ahol m ~ 3-4 CD spektrumai különböző ionerősségű (0.02 M, 0.2 M, 2.0 M NaCl), kémhatású (pH 3, 7.4 vagy 11) és alkohol tartalmú vizes oldatban

A környezeti hatások feltérképezése lehetővé teszi a polipeptid konformációjának jellemzését, az elsődleges szerkezet és a térszerkezet közötti összefüggések tanulmányozását. Összehasonlító elemzésekből következtetéseket vontunk le a töltés, a hidropátia tulajdonságok konformációt befolyásoló hatására vonatkozóan.^{5-8, 10-14, 16, 34-36}

A spektrumok interpretációja a lineáris homopolimer polipeptidek, elsősorban a poli[L-Lys] spektrumán alapul (6. ábra).^{37,38} Az -helikális szerkezet három abszorpciós maximummal jellemezhető: negatív sáv (= 222-224 nm), amely az n- * átmenethez rendelhető, azonos intenzitású negatív sáv (= 206-208 nm) és egy pozitív sáv a (= 191 nm), amelyek a - * átmenethez tartoznak. Az n- * sáv intenzitása csak kis mértékben függ a helikális szakasz hosszától, míg a - * sáv páros intenzitása erősen függ a szakaszt alkotó aminosavak számától. A rendezetlen konformáció spektruma, vizes, sómentes oldatokban egy gyenge pozitív maximumot (= 217-218 nm), és egy

intenzív negatív maximumot ($\lambda = 196-198$ nm) mutat, nagy sókoncentráció esetén egy gyenge ($\lambda = 220-225$ nm) és egy erős negatív maximum ($\lambda = 190-205$ nm) észlelhető. A β -szerkezet spektruma egy negatív maximum ($\lambda \sim 215$ nm) és egy intenzívebb pozitív maximum ($\lambda \sim 205$ nm) jellemzi.

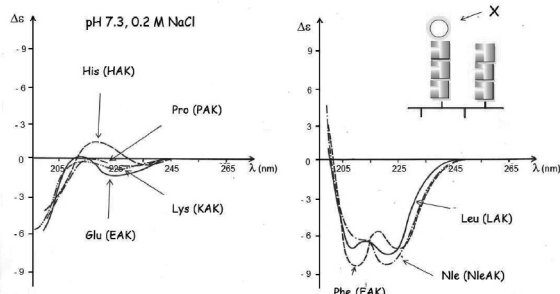


6. Ábra. A poli[L-Lys] CD spektrumai és a görbék értelmezése^{37,38}

Az alábbiakban példák segítségével bemutatásra kerül a) miként befolyásolja az X aminosav minemősége és annak pozíciója az oldatbeli 3D szerkezetet, b) milyen jellemző struktúrák jöhetnek létre a fiziológiás körülmények között (pH 7,4, 0,2 M NaCl).

2.1 Az oldallánc N-terminálisán elhelyezkedő X aminosav minemiségének szerepe

A DL-Ala_m (AK) illetve X-DL-Ala_m (XAK) oligopeptid oldalláncok N-terminálisán elhelyezkedő aminosavak közös sajátossága (a Pro kivételével), hogy -NH₂ csoportot tartalmaznak. Ennek következtében e vegyületek savas (pH ~3) és közel semleges (pH ~7,4) körülmények között pozitív töltésűek, míg bázikus oldatban (pH ~12) nem viselnek töltést. Ez magyarázhatja azt a megfigyelést, amely szerint a vizes oldat pH értékének növelése a rendezett térszerkezet kialakulásának kedvez.



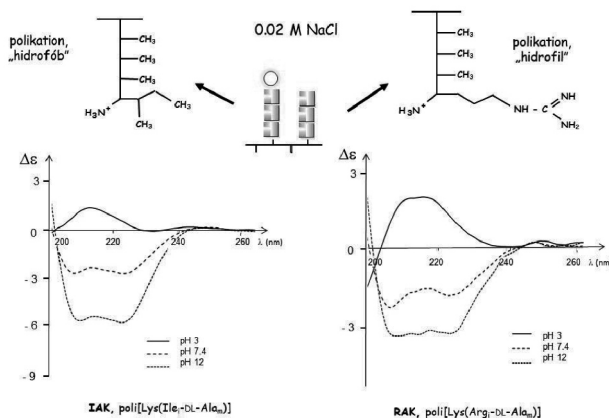
7. Ábra. A poli[Lys(X_i-DL-Ala_m)] vegyületek, ahol $i < 1$, $m \sim 3-4$ és X = His, Lys, Glu, Pro illetve Leu, Nle, vagy Phe CD spektruma közel fiziológiás ionerősségű (0,2 M NaCl) és kémhatású (pH 7,4) vizes oldatban.

Az ionerősség emelése elősegíti a polipeptid rendezett, döntően α -helikális konformációjának kialakulását (6. ábra). Fehérjékre leírt irodalmi adatok szerint a TFE megjelenése a vizes oldatban a rendeződésnek kedvez. Adataink ezt megerősítették a szintetikus polipeptidek vonatkozásában és bizonyítást nyert, hogy e sajátossággal rendelkeznek más alkohol (pl. MeOH) is.³⁴⁻³⁶

A kísérletek azt mutatták, hogy a közel fiziológiás (pH ~7,4, 0,2 M NaCl) oldatban az aminosavoldalláncban töltéssel bíró N-terminális aminosavak (X = His, Lys, Orn, Glu) jelenléte rendezetlen térbeli elrendeződést eredményez (7. ábra). Ugyanakkor a hidrofób aminosav-oldalláncú aminosavak karakterétől (lineáris, elágazó, aromás) függő mértékben, az X = Leu, Ile, Nle, Val, Phe, Tyr tartalmú polipeptidek alapvetően rendezett konformációt vesznek fel (7. ábra).^{16, 34-36} Fontos az a megfigyelés is, amely szerint Ser vagy Thr tartalmú polipeptidek (SAK, TAK) CD spektrumai részben rendezett konformációra illetve a rendezett és rendezetlen konformerek elegyére utalnak.¹¹

Érdeemes felhívni a figyelmet arra, hogy – fenti körülmények között – a Leu (LAK), Ile (IAK), Nle (NleAK) vagy Val (VAK) jelenléte egymáshoz hasonló CD spektrumokat eredményez, de esetenként a kimutatható konformerek elegye eltérő összetételű lehet. Például, a Val tartalmú polipeptid (VAK) részben α -hélix és részben β -kanyar konformert hoz létre, míg a Nle tartalmú vegyület (NleAK) CD spektrumában a β -kanyar konformer és rendezetlen szerkezet mutatható ki. A különbség értelmezésénél az alkil oldalláncok különbözősége, a hidrofób kölcsönhatás erőssége játszhat szerepet.¹⁶

Újabb eredményeink arra is utalnak, hogy rendezett konformáció létrehozható kationos oldalláncú (X = Arg) aminosav beépítésével (RAK) is. A hidrofób oldalláncú Ile (IAK) és a guanidino csoportot tartalmazó Arg (RAK) CD spektrumainak összevetése azonos körülmények között (8. ábra) jelzi, hogy a pH változása a lúgos tartomány irányába (pH 3 - pH 7,4 - pH 12) mindkét elágazó láncú polipeptid esetében a rendezett konformáció domináns jelenlétét eredményezi.¹⁶

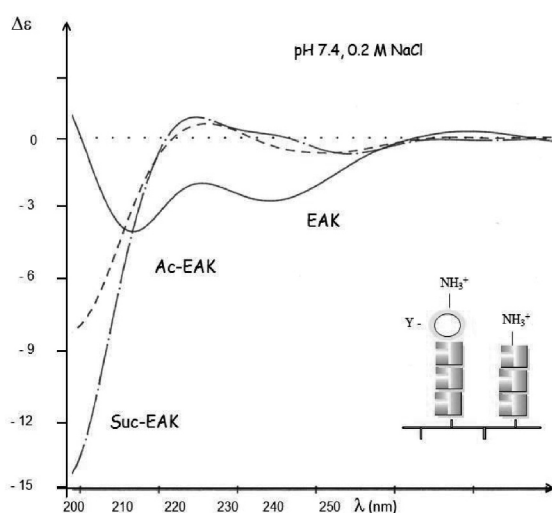


8. Ábra. A poli[Lys(X_i-DL-Ala_m)] X = Ile (IAK) és X = Arg (RAK) polipeptidek, ahol $i < 1$, $m \sim 3-4$ CD spektrumai különböző kémhatású (pH 3, 7,4 vagy 12), 0,02 M NaCl ionerősségű vizes oldatban.

Kiemelést érdemel, hogy az arginin tartalmú polipeptid (RAK) CD spektrumai - meglepő módon - az *N*-terminálison hidrofób oldalláncú izoleucint tartalmazó vegyület (IAK) spektrumával mutat hasonlóságot és nem a szintén kationos, láncvégén Lys aminosavat tartalmazó polipeptiddel (KAK) (lásd 7. és 8. ábra).

Megállapítható tehát, hogy a vizsgált kationos, elágazó láncú, XAK típusú, polipeptidek esetében mind a magasabb pH érték (savás vs bázikus), mind a növekvő ionerősség a rendezett, jellemzően helikális szerkezet kialakulásához vezet. Az oldalláncvégi $-NH_2$ csoportok csökkenő protonáltsága, illetve az növekvő ionkoncentráció „árnyékoló” képessége rendezett szerkezetet alakít ki.

Ha az *N*-terminális X pozícióban levő glutaminsavat acetilezzük (Ac-EAK) vagy szukcinilezzük (Suc-Glu) – különböző töltéssűrűségű – polianionos vegyületekhez jutunk.^{9, 15} Az azonos körülmények között rögzített CD spektrumok (9. ábra) jelzik, hogy míg az amfoter sajátosságú EAK görbéje rendezettsége utal, a csak negatív töltést hordozó származékokra a rendezetlenségre jellemző. Ez értelmezhető a monomer egységenként egy (Ac-EAK) illetve két (Suc-EAK) negatív töltés taszító hatásával.

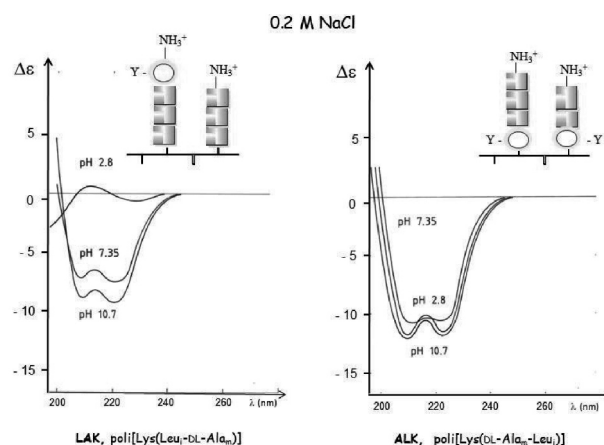


9. Ábra. A poli[Lys(X_i -DL-Ala $_m$)] $X =$ Glu (EAK), Ac-Glu (Ac-EAK) és Suc-Glu (Suc-EAK) polipeptidek, ahol $i < 1$, $m \sim 3-4$ CD spektrumai vizes oldatban (pH 7.4, 0,2 M NaCl).

Összegezve megállapítható, hogy az XAK típusú elágazó láncú polipeptidek oldatban rendezett konformációt hozhatnak létre. Ennek hátterében lehet az oldallánc végi X-aminosavak között fellépő intramolekuláris ionos (pl. Arg, Glu), hidrofób (pl. Leu, Nle), valamint a H-híd kölcsönhatás (pl. Ser, Thr). A jelenség értelmezése az oldalláncok közötti kölcsönhatások kombinációjához és ezek erősségéhez köthető. Ennek felismerése lehetővé teszi az adott körülmények között kívánatos konformációjú vegyület tervezését.^{5,10, 14, 16, 34-36}

2.2 Az oldalláncban elhelyezkedő X aminosav pozíciójának szerepe

Az X aminosav oldalláncban elfoglalt helye befolyásolhatja a térszerkezetet. Ennek vizsgálatára a fenti módszertan szerint felvett CD spektrumok összehasonlító elemzése történt meg. Az XAK és AXK típusú polipeptid párok ($X =$ Leu vagy Phe) esetében azt tapasztalható, hogy a rendezett konformáció kialakulásának körülményeit az X aminosav oldallánc milyensége és az oligopeptid oldalláncban elfoglalt helye határozza meg. Például Leu kapcsolódása közvetlenül a polilizin gerinc -amino csoportjához (ALK) rendezett -hélix)

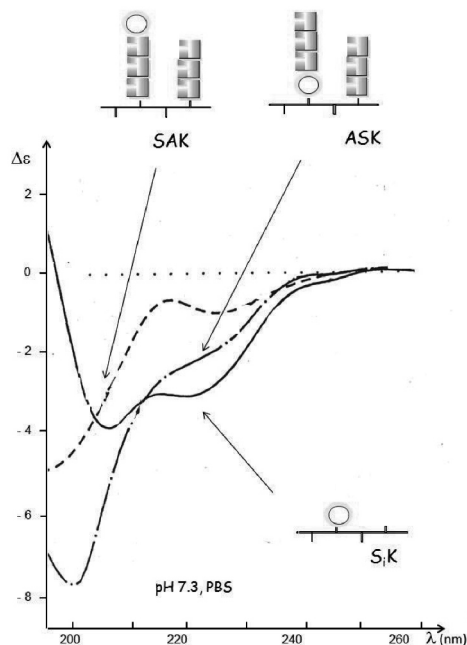


10. Ábra. A poli[Lys(Leu-DL-Ala $_m$)] (LAK) és a poli[Lys(DL-Ala $_m$ Leu $_i$)] (ALK) polipeptid, ahol ahol $i < 1$, $m \sim 3-4$ CD spektrumai különböző kémhatású (pH 3, 7.4, 10,7), 0,2 M NaCl tartalmú vizes oldatban

konformációhoz vezet savas, alacsony ionerősségű 0.02 M NaCl oldatban, míg a Leu jelenléte az oligopeptid oldallánc *N*-terminálisán (LAK) – azonos körülmények között – rendezetlen térszerkezetet eredményez (10. ábra).

Érdeemes megjegyezni, hogy ez a markáns különbség lényegében eltűnik, ha az oldat pH értékét emelik. Semleges vagy bázikus oldatban mindkét polipeptid kifejezetten rendezett konformációra utaló CD spektrumot mutat (10. ábra). Hasonló viselkedésminták voltak tapasztalható az FAK vs AFK polipeptid pár esetében (pH 3.0, 0.02 M NaCl).⁶

Az SAK és ASK polipeptidek oldallánci protonáltak savas (pH 2.1, 0.02 M NaCl) vizes oldatban és mindkét vegyület konformációja rendezetlen. A pH emelésére (pH 7.2) egyformán reagálnak és részben rendezett konformáció jelenik meg. Ugyanakkor az ionerősség növelése (0.2 M NaCl) és/vagy a pH további emelése – szemben az ASK polipeptiddel – az SAK polipeptid esetében markáns hélix-tartalom (rendezettség) növekedésével járt (11. ábra).



11. Ábra. A poli[Lys(Ser_i-DL-Ala_m)] (SAK), a poli[Lys(DL-Ala_m-Ser_i)] (ASK) polipeptid és a poli[Lys(Ser_i)] (S_iK), ahol ahol $i < 1$, $m \sim 3-4$ CD spektrumai (pH 7.4) 0.2 M NaCl tartalmú vizes oldatban.

Ez arra utalhat, hogy a polilizin gerinchez közeli pozícióban a Ser jelenléte kevésbé segíti elő a rendezett konformáció kialakulását, míg a távolabbi (az oligopeptid oldallánc *N*-terminálisán) pozíció markáns rendezettséghez vezet.^{11,12} Ezt az interpretációt finomítja az SAK, ASK és S_iK polipeptidek fiziológias körülmények között felvett CD spektrumainak összehasonlító elemzése (11. ábra). Az S_iK polipeptid spektrumának lefutása arra utal, hogy a vegyület jelentős mértékben rendezett. A rendezettség kialakításában szerepet játszó (az OH csoport jelenlétével összefüggő) H-híd kötés markáns hatását „lerontja” a Ser aminosavhoz (S_iK) kapcsolt oligo(DL-Ala) oldallánc.¹²

A Glu tartalmú polipeptidek ECD spektrumainak összehasonlítása arra utal, hogy a glutaminsav jelenléte a polilizin gerinc közvetlenül kapcsolva (E_iK) savas kémhatású oldatban (pH 2) már alacsony ionerősség esetén (0.02 M NaCl) részleges rendezettséget eredményez, amelynek mértéke nő az ionerősség növelésével (0.2 illetve 2.0 M NaCl). Az oligo(DL-Ala) oldalláncokkal kiegészített polipeptid (AEK) ezzel ellentétben csak magasabb ionerősség (0.2 M NaCl, pH 2.1) esetén mutat részleges rendezettséget. Ugyanakkor az oldallánc *N*-terminálisán szereplő Glu (EAK) a teljes pH tartományban (1.1 – 9.7) rendezetlen (0.2 M NaCl oldatban) és csak a legmagasabb ionerősség (2.0 M NaCl) képes rendezettséget kiváltani.

Az amfoter EAK és AEK (valamint az E_iK) polipeptidek oldalláncái töltést viselnek a teljes pH tartományban. Savas közegben az -amino csoportok protonáltak, míg bázikus közegben a -karboxil csoportok viselnek negatív töltést. Vizes oldatban, a körülmények (pH és ionerősség) térszerkezet befolyásoló hatása az -amino és a -karboxil

csoportok közötti ionos kölcsönhatás létrejöttével lehet összefüggésben. Ezen ionos kölcsönhatás pedig jelentős mértékben attól függ, hogy a polipeptid oldalláncban a Glu aminosav (-karboxil) térben hol helyezkedik el: közelebb (EAK) vagy távolabbi (AEK) a polipeptid oldalláncvégi -amino csoporthoz képest.⁸

Összegezve elmondható, hogy az elágazó láncú polipeptidek térszerkezetét az oldallánc felépítése: az X aminosav pozíciója, oldalláncának hidrofób karaktere, heteroatom, ionizálható csoport jelenléte együttesen befolyásolja.

A rendezett, rendszerint -helikális konformáció, kialakulását, stabilizálódását elősegítheti az apoláros aminosav alkil vagy aril oldalláncok közötti hidrofób kölcsönhatás (XAK vs AXK polipeptidek X = Leu, Phe), az ionos kölcsönhatás a Glu -karboxil és az oldalláncvégi -aminocsoport (EAK vs AEK) vagy H-híd kötés a Ser hidroxil csoport és a polipeptid oldalláncvégi -aminocsoport között (SAK vs. ASK). Fontos hangsúlyozni, hogy a kölcsönhatás mértéke, s így a térszerkezetre gyakorolt hatása függ a partnerek közötti távolságtól. Az eredmények arra utalnak, hogy a fenti típusú, az X aminosav jelenlétével összefüggő kölcsönhatások – az adott körülmények (pH, ionerősség, oldószer) – erősebbnek bizonyultak, mind a polipeptid oldalláncok végén elhelyezkedő -aminocsoportok közötti taszító hatás.

3. Szerkezet - *in vitro* citotoxicitás

A következő példák segítségével röviden bemutatjuk, hogy milyen összefüggést állapítottunk meg a különböző sejteken megfigyelt *in vitro* citotoxicitás/citosztatikus hatás mértéke, valamint a szerkezetbeli eloszlás (biodisztribúció) sajátosságai és a kémiai szerkezet között.

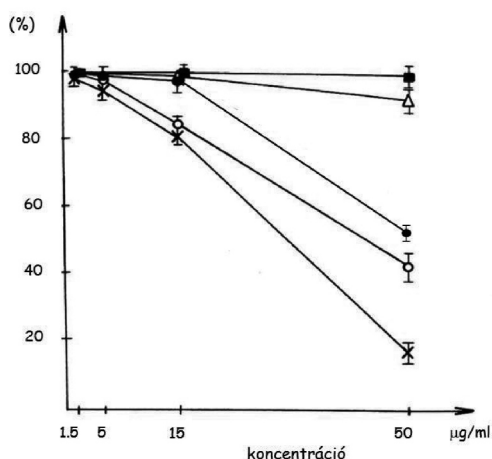
A polipeptidek *in vitro* citotoxicitását izolált patkány máj-, egér lépsejteken²⁶, egér csontvelői eredetű makrofág sejteken¹⁵ illetve Balb/c eredetű J774 monocita-makrofág sejtvonalon³⁹ sejtein vizsgáltuk. A citosztatikus tulajdonságot C26 egér vastagbél carcinoma¹², HeLa humán carcinoma^{23,24}, HT-29 humán (ATCC HB-8065)⁴⁰ és HepG2 humán hepatocelluláris carcinoma (ATCC HTB-38)⁴⁰ sejtek szaporodására gyakorolt gátló hatással jellemeztük.

A polipeptideket izolált patkány máj- vagy egér lépsejtekkel inkubáltunk (1 és 24 óra, 37°C, 1,5-50 g/ml koncentrációtartomány).^{12, 24, 26} Az élő sejtek arányát (%) határoztuk meg a kezeletlen kontrollhoz képest (12. Ábra).

A polipeptidek toxikus hatását izolált májsejtekre nagymértékben befolyásolta az oldalláncában előforduló X aminosav minemúsége. A szabad -aminocsoportokat (pK_a = 10,53) hordozó poli[L-Lys] – és nagyobb mértékben – a poli[D-Lys], valamint az oldallánc végén lizint tartalmazó változat (KAK) toxikusnak bizonyult. Ezzel szemben a szabad -aminocsoportokat hordozó poli[-Lys] lényegesen kisebb mértékben csökkentette a sejtek életképességét.^{24, 26}

Az amfoter (EAK), a polianionos (Ac-EAK, Suc-EAK) polipeptidek vagy az oldalláncban hidroxil csoportot (SAK, S_iK) tartalmazó polikationos vegyületek nem csökkentették az élő sejtek számát.^{12, 24} Ehhez hasonlóan a polikationos polipeptidek (X = Leu, Phe, His, Pro) sem mutattak markáns citotoxikus hatást (< 5%).

Érdemes megjegyezni, hogy az oligo(DL-Ala) oldallánc hossza (m = 3,5 vagy 8,5) befolyásolja a sejtszám csökkenés mértékét. Fontos megfigyelésünk, hogy az oldalláncban sem az X aminosav pozíciója (EAK/AEK, SAK/ASK, LAK/ALK), sem pedig az X aminosav konfigurációja (pl. EAK/D-EAK, LAK/D-LAK, FAK/D-FAK, KAK/D-KAK, HAK/D-HAK) nem befolyásolta az effektus mértékét.^{10, 12, 24}



12. Ábra. A poli[Lys], poli[Lys(Lys)], poli[Lys(DL-Ala_m)] (A_mK), továbbá XAK és AXK típusú polipeptidek *in vitro* citotoxicitása. Izolált patkány májsejtek viabilitása a koncentráció függvényében (inkubálás: 1 óra, 37° C), ahol ■ = EAK, AEK, SAK, ASK, Δ = LAK, ALK, D-LAK, FAK, D-FAK, HAK, D-HAK, PAK, D-EAK, A_mK (m = 8.5) vagy poli[Lys(Lys)], ● = A_mK (m = 3), ○ = KAK, D-KAK, × = poli[Lys].

Az elágazó láncú polipeptidek metotrexáttal képzett konjugátumai – az alkalmazott polipeptid kémiai szerkezetétől függően – igéretes *Leishmania donovani* intracelluláris parazita ellenes hatást mutattak.⁴¹ A makrofágokban fellelhető kórokozó perspektivikus eltávolítása érdekében kutatásaink során tanulmányoztuk a hordozóként alkalmazni kívánt polipeptidek citotoxicitását egér csontvelőből izolált makrofág sejteken tripánkék eljárást alkalmazva.¹⁵ Alacsony koncentrációban (c = 1,0 g/ml) sem a poli[L-Lys], sem a polikationos vagy amfoter poli[Lys(X_i)] (X_iK, X=His, Pro illetve Glu), sem pedig az XAK típusú polikationos (SAK, TAK), amfoter (EAK) vagy polianionos (Ac-EAK, Suc-EAK, Mal-EAK) vegyület nem mutatott toxikus hatást (1 óra, 37°C). Töményebb oldatban (c = 20 g/ml), két X_iK típusú elágazó láncú (P_iK, H_iK) és a lineáris a poli[L-Lys] polikationos vegyület csökkentette az élő sejtek számát (rendre 30 %, 80% illetve 90%-kal).^{15, 42}

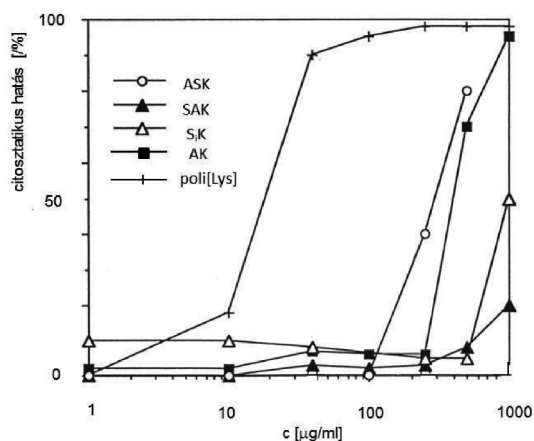
Egy másik kísérletsorozatban e sejteket polikationos XAK (X = Arg, Leu, Ile, Nle, Val), valamint X_iK (X = Leu) polimer polipeptidekkel inkubáltuk (1 óra, 37°C, c = 0,6-100 g/ml). A citotoxicitás mértékét MTT módszer alapján az

IC₅₀ értékkel jellemeztük.¹⁶ Azt tapasztaltuk, hogy az Arg tartalmú vegyület (RAK), amely az -NH₂ csoport mellett guanidino csoportot is magában foglal (IC₅₀=17,9 5,4 g/ml) és a polipeptid gerinchez közvetlenül kapcsolt leucint tartalmazó L_iK (IC₅₀=121,2 21,9 g/ml) polipeptidek citotoxikusak voltak. Ugyanakkor a szintén polikationos, hidrofób oldalláncú aminosavat és láncvégi -NH₂ csoportot tartalmazó vegyületek (LAK, IAK, NleAK, VAK) nem okoztak sejtszám csökkenést a vizsgált koncentráció tartományban (IC₅₀ > 100 g/ml).¹⁶

A következőkben Balb/c eredetű J774 monocita-makrofág sejtvonal sejtjeit kezeltük (1, 24 vagy 48 óra, 37°C, c = 0,2-200 g/ml) a polipeptidekkel és az élő sejtek számát MTT módszerrel határoztuk meg.³⁹ Rövid inkubációt követően a legmagasabb koncentrációban (c = 200 g/ml) a poli[Lys] (LC₅₀ = 65.7 g/ml), a polikationos X_iK, (X=His), valamint a polianionos Suc-EAK okozott sejtpusztulást (rendre 85% illetve 25%). De sem a polikationos Pro, vagy amfoter Glu tartalmú X_iK, sem az AK, sem az XAK típusú polikationos (SAK, TAK), amfoter (EAK), polianionos (Ac-EAK) vegyületek nem bizonyultak toxikusnak. Hosszabb (24 óra) kezelést követően a polikationos X_iK (X = Pro, His) és XAK (SAK, TAK), valamint az amfoter X_iK (X = Glu) és a polianionos Suc-EAK okozott jelentősebb (15-40 %) sejtpusztulást.^{39, 42}

A human HeLa carcinoma sejtek szaporodására gyakorolt gátló (citosztatikus) hatást az egyes polipeptidekre meghatározott CT₀ (g/ml) értékkel (3 nap, 37°C) jellemeztük.^{23, 24} Ennek alapján a polipeptideket három csoportba osztottuk: alacsony (CT₀ > 100 g/ml), közepes (10 < CT₀ < 100 g/ml) és magas (CT₀ < 10 g/ml) citosztatikus hatású vegyületek. Az amfoter polipeptideknek (pl. EAK) nem volt gátló hatásuk (CT₀ > 400 g/ml), míg bizonyos polikationos vegyületek közepesen (AK) és az X (XAK) aminosavtól függően [X = (D)His, (D)Leu, (D)Phe, Pro] (10 < CT₀ < 100 g/ml) vagy erősen [X = (D)Lys] gátló hatásának bizonyultak (CT₀ < 10 g/ml). Sem az X aminosav oldalláncbéli pozíciója (pl. EAK/AEK, LAK/ALK) sem konfigurációja (pl. EAK/D-EAK, FAK/D-FAK, HAK/D-HAK, KAK/D-KAK) nem befolyásolta e besorolást. Megjegyzendő, hogy mind a poli- -lizin, mind pedig a poli- -lizin kifejezetten citosztatikusnak bizonyultak (5 g/ml < CT₀).^{23, 24}

C26 egér vastagbél carcinoma sejtek osztódására a poli- -lizin (poli[L-Lys]) markáns gátló hatást fejt ki (13. ábra). Az oligo(DL-Ala) oldallánc kiépítése [poli[Lys(DL-Ala_m)] (AK), ahol m = 6.5] egy nagyságrenddel, míg a Ser aminosav megjelenése közvetlenül a poli[L-Lys] gerincen [poli[Lys(Ser_i)] (S_iK), ahol i < 1] két nagyságrenddel csökkenti a citosztatikus hatást. A Ser pozíciójának az oligopeptid oldalláncban jelentős befolyása van: láncvégi helyzetben (SAK) a vegyület nem citosztatikus, míg a polilizin gerinchez közeli pozícióban (ASK) az AK polipeptidhez mérhető gátló hatása van.¹²



13. Ábra. A Ser tartalmú polipeptidek, továbbá a poli[L-Lys] és poli[Lys(DL-Ala_m)] (AK) (ahol $m=6,5$) *in vitro* citosztatikussága C26 egér vastagbél carcinoma sejteken (inkubálás: 3 óra, 37°C): o = ASK, ▲ = SAK, △ = S,K, (ahol $i < 1$) ■ = AK és × = poli[Lys].

A polikationos polipeptidek HT-29 humán vastagbél carcinoma (ATCC HB-8065) illetve HepG2 humán hepatocelluláris carcinoma sejtvonalból származó sejtek osztódására gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Az inkubálást követően (1 óra, 37°C, $c = 6,25-100$ g/mL) az élő sejtek arányát MTT módszerrel meghatározva mindkét sejtpopuláción azt tapasztaltuk, hogy az AK, az XAK (X = Arg, Ser, vagy Thr) vagy AXK (X = Leu), illetve az X_iK (X = Leu, His vagy Pro) polimer polipeptidek nem befolyásolták a sejtek életképességét még az alkalmazott legnagyobb koncentrációban ($c = 100$ g/mL) sem. Ugyanakkor a poli[L-Lys] toxikusnak bizonyult mind a HT-29 ($LC_{50} = 44.1 \pm 4.6$ µg/mL), mind a HepG2 sejteken ($LC_{50} = 32.3 \pm 10.8$ µg/mL).⁴⁰

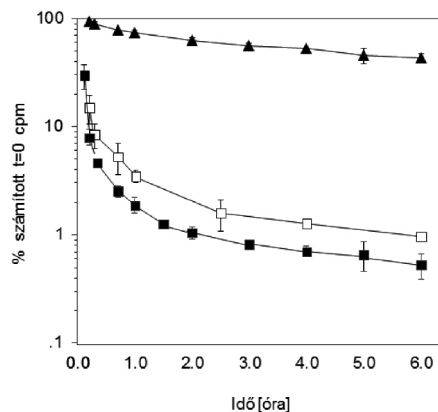
Habár a citotoxikus/citosztatikus hatást nagyon különböző sejteken vizsgáltunk, összefoglalásként érdemes felhívni a figyelmet arra, hogy az elágazó polipeptidek gerincét képező poli[L-Lys] illetve az XAK (X = Lys) származék pusztító/gátló hatása jól megfigyelhető volt. Azok a polipeptidek, amelyek oldalláncaikban -karboxil (pl. EAK, Ac-EAK, AEK) vagy hidroxil (pl. SAK, ASK, TAK) csoportot hordoznak, azaz Glu, Ser vagy Thr aminosavat tartalmaznak nem mutattak markáns citotoxikus/citosztatikus hatást sem izolált patkány máj-, sem egér lép- vagy csontvelo eredetű sejteken, sem pedig a vizsgált különböző sejtvonalak (J774, C26, HT-29 vagy HepG2) sejtjein.

3. Szerkezet - *in vivo* plazmakoncentráció

Az elágazóláncú polipeptidek szerkezete befolyásolja a vegyületek szöveti eloszlását, biodisztribúcióját.^{9,12,43} E kutatási program keretében radioaktív izotóppal jelzett polipeptideket intravénásan adtunk egészséges és tumort hordozó kísérleti állatoknak és azt tanulmányoztuk, hogy a különböző szerkezetű vegyületek milyen gyorsan távoznak a keringésből, mely szövetekben és milyen mértékben halmozódnak fel 24 óra után.

Az XAK típusú polikationos (AK), amfoter (EAK) és polianionos (Ac-EAK, Suc-EAK) polipeptidek jelölésére három különböző izotópot használtunk. A ¹²⁵I bevétele 3-(4-hidroxi-5-[¹²⁵I]jódfenil)-propionsav-*N*-hidroxiszukcinimid-észter (Bolton-Hunter reagens) segítségével történt⁴³, míg az ¹¹¹In vagy ⁵¹Cr izotópok a polipeptidek kelátor (DTPA) származékával képeztek stabil komplexet.^{9,44} Azt figyeltük meg, hogy a jelzett vegyületek keringésből történő távozására, annak kinetikájára az alkalmazott izotóp, a jelölés módja (kovalens vs komplex kötés) nincs markáns hatással. Megállapítottuk, hogy a szöveti eloszlást, szervekben (tumorból) való felgyűlés mértékét nagyban befolyásolhatja a választott izotópot tartalmazó vegyület metabolizmusa.⁴⁶

Ugyanakkor a polimer polipeptid szerkezete jelentős mértékben meghatározza a konjugátumok keringésből történő távozását (14-16. ábrák). A polikationos sajátosságú vegyületek (AK, LAK) gyorsan távoznak a keringésből (14. ábra).

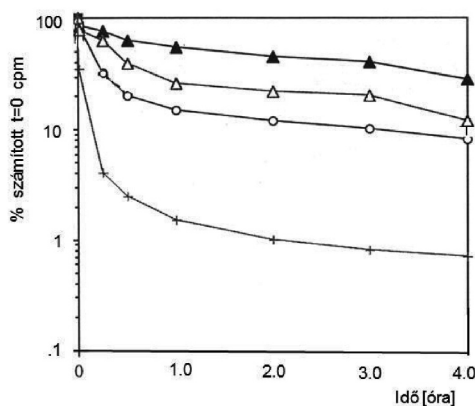


14. Ábra. ¹²⁵I izotóppal jelölt amfoter (EAK) és polikationos (LAK, AK) polipeptidek távozása a vérkeringésből az idő függvényében. BALB/c egerek intravénás kezelése után: ▲ = EAK, ■ = LAK és □ = AK (ahol $i < 1$).

Ezzel szemben az amfoter karakterű polipeptid (EAK) lényegesen hosszabb ideig maradnak a vérkeringésben. Ezt a különbséget az X-aminosav konfigurációja (pl. LAK/D-LAK, EAK/D-EAK) érzékelhető módon nem befolyásolja.^{43,46}

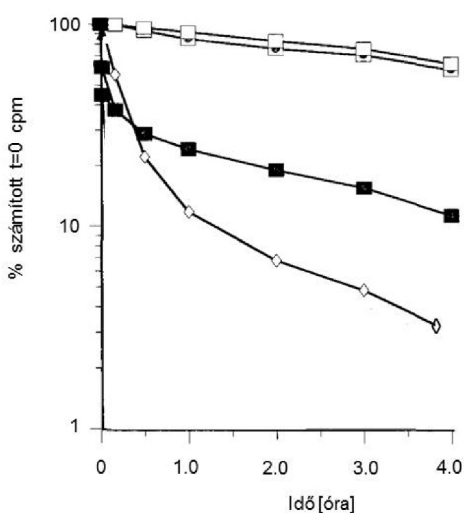
Fontos megjegyezni, hogy a polikationos polipeptidek távozásának kinetikája függ az oldalláncban szerkezetétől, az X aminosav jelenlététől, minőségétől és az oldalláncban elfoglalt helyétől (15. ábra). Például a Leu (LAK) vagy Lys (KAK) tartalmú vegyület⁴⁵ rövidebb ideig, a Ser tartalmú polipeptid (SAK) pedig hosszabb ideig és ebből adódóan 4 óra után különböző koncentrációban van jelen a keringésben (lásd 14. és 15. ábra). A hidroxil csoportot tartalmazó Ser közvetlenül a polipeptid gerincéhez kapcsolódva (S_iK) gyorsan, míg az oligo(DL-Ala) egységgel kiegészített származék (ASK) lassabban távozik a vérkeringésből. Az oligopeptid *N*-terminálisán elhelyezett Ser variáns (SAK) pedig az injektált dózis közel 50%-nak jelenléte mutatható ki egészséges egerek vérmintáiban.¹²

Az amfoter polipeptidhez (EAK) hasonlóan viselkedik a polianionos, de monomer egységenként egyetlen negatív töltést hordozó polipeptid, az acetilezett EAK (Ac-EAK).



15. Ábra. I^{125} izotóppal jelölt, Ser tartalmú polipeptid és poli[Lys(DL-Ala_m)] (AK) (ahol $m=3$) távozása a vérkeringésből az idő függvényében. BALB/c egerek intravénás kezelése után: \blacktriangle = SAK, \circ = ASK, Δ = S_iK, (ahol $i < 1$) és $+$ = AK.

Amennyiben egy polikationos vegyület (pl. AK) oligopeptid oldalláncának -amino csoportját acilezzük borostyánkósav anhidriddel ugyancsak polianionos, monomerenként egyetlen töltést hordozó származékhoz jutunk. E vegyületek (pl. Suc-AK, Suc-LAK) jelentősen hosszabb ideig tartozkodnak a vérkeringésben, mint az acilezés nélkül kiindulási vegyületek (pl. AK, LAK).⁹ Az N-aminocsoporton módosított amfoter EAK, amely így monomer egységenként két negatív töltést visel (Suc-EAK), távozása a keringésből jelentősen felgyorsul (16. ábra).⁴⁵



16. Ábra. I^{111} izotóppal jelölt XAK polipeptid és poli[Lys(DL-Ala_m)] (AK) (ahol $m=3,1$) távozása a vérkeringésből az idő függvényében. BALB/c egerek intravénás kezelése után: \blacksquare = EAK, \diamond = Suc-EAK, \square = Ac-EAK és \blacksquare = AK.

Az eredményeket összegezve arra a következtetésre jutottunk, hogy a polimer polipeptidok véráramban való jelenlétének mértéke, ennek csökkenése és a vegyület kémiai szerkezete között szoros – elsősorban a vegyületek töltésével

és a töltéssűrűséggel összefüggő – kapcsolat áll fenn. Az amfoter, illetve – az X aminosav oldalláncától függően – bizonyos polikationos vegyületek (pl. X = Ser), valamint az egyszeres negatív töltéssel bíró polianionos vegyületek (pl. Ac-EAK) jelenléte a vérkeringésben markáns mértékben hosszabb, mint az oldalláncban N-aminocsoportot (pl. KAK) vagy kétszeres negatív töltést hordozó polipeptideké (pl. Suc-EAK). E megfigyelések érvényeseknek bizonyultak tumort hordozó egerek esetében is.^{46,47}

4. Összefoglalás és kitekintés

A hazai és nemzetközi tudományos együttműködésben feltárt összefüggések azt bizonyítják, hogy az elágazó láncú polimer polipeptidok kémiai szerkezet (aminosavösszetétel, oldallánc felépítés, aminosav konfiguráció) átgondolt módosításával előállítható olyan, különböző töltéssel rendelkező (pozitív/negatív/amfoter karakterű) vegyület, amely adott (pl. fiziológiai) körülmények között rendezett/rendezetlen oldatbeli térszerkezetet vesz fel. A feltárt, kémiai szerkezet és biológiai hatás, összefüggések alapján lehetőség nyílik olyan polipeptidok tervezésére is, amelyek *in vitro* citotoxicitása elhanyagolható mértékű és vérkeringésben a kívánt (hosszabb/rövidebb ideig van jelen. Állatkísérletekkel bizonyítottuk, hogy e polimerek vérkeringésből történő távozását, szervezetbeli eloszlását, sejtotoxicitását töltésviszonyaik (pozitív/negatív, sűrűség) nagymértékben befolyásolják.

Az előadásban bemutatott eredmények vezettek olyan, új biokonjugátumok tervezéséhez, előállításához és funkcionális jellemzéséhez, amelyekben tumorelles (pl. daunomicin⁴⁸⁻⁵⁰, hormon^{15a}), antimikrobiális (pl. metotrexát^{16,41,51}) szer kapcsolódik makromolekuláris hordozóként alkalmazott elágazó láncú polipeptidhez, a hatásos vegyületek esetében a hatásmechanizmus tisztázásához (pl. a „scavenger A” szerepének tisztázása).

Köszönetnyilvánítás

Az előadásban bemutatott eredmények, munkatársaim, a laborban dolgozó doktori hallgatók, diákok, valamint hazai (a szövegben említettek kivül: Dr. Kajtár Judit, ELTE Szerves kémiai Tanszék, Dr. Kovács L. Attila, ELTE Állatszervezettani tanszék, Dr. Kurucz István, Gyógyszerkutató Intézet, Dr. Köhidai László, SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet) és nemzetközi (Dr. K. Blaha és Dr. H. Votavova, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague; Prof. R. W. Baldwin, Dr. J. Clegg és Dr. M.V. Pimm, University of Nottingham; Prof. S.Gordon, Oxford University; Professor H. Maeda, Kumamoto University) partnerek munkáját tükrözik.

Köszönöm az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársainak, doktoránsainak a hatékony együttműködést.

Köszönöm az MTA, az ELTE, az OTKA, valamint az MTA-CsTA (Magyar-Cseh), a Tét alapítvány (Magyar-Brit, Magyar-Japán) és EU-COST programok, ipari partnereink, Richter G. Nyrt, Reanal Rt és a többiek támogatását.

Hivatkozások

- Sela M. in: Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins. (ed. Stahmann, M.A.) Univ Wisconsin Press, Madison, Wisconsin **1962**, 347- 358. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60614-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60614-2)
- Szekerke, M.; Wade, R.; Whisson, M.E. *Neoplasma*, **1972**, 19, 199-209. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80716-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80716-7)
- Hudecz, F.; Szekerke, M. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1980**, 45, 933-940. <https://doi.org/10.1135/cccc19800933>
- Hudecz, F.; Szekerke, M. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1985**, 50, 103-113. <https://doi.org/10.1135/cccc19850103>
- Hudecz, F.; Votavova, H.; Gaál, D.; Sponar, J.; Kajtár, J.; Blaha, K.; Szekerke, M. In: Polymeric Materials in Medication. (eds.: Gebelein, Ch.G., Carraher, Ch.E.). Plenum Press, New York, **1985**, 265-289.
- Mező, G.; Votavova, H.; Hudecz, F.; Kajtár, J.; Sponar, J.; Szekerke, M. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1988**, 53, 2843-2858. <https://doi.org/10.1135/cccc19880903>
- Mező, G.; Hudecz, F.; Kajtár, J.; Szókán, Gy.; Szekerke, M. *Biopolymers*, **1989**, 28, 1801-1826. <https://doi.org/10.1002/bip.360281013>
- Mező, G.; Kajtár, J.; Hudecz, F.; Szekerke, M. *Biopolymers*, **1993**, 33, 873-883. <https://doi.org/10.1002/bip.360330603>
- Hudecz, F.; Kojima, Y.; Miyamoto, Y.; Kajtár, J.; Maeda, H. *J. Controlled Release* **1994**, 28, 301-302 [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90189-9](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90189-9)
- Hudecz, F. *Anti-Cancer Drugs* **1995**, 6: 171-193. <https://doi.org/10.1097/00001813-199504000-00001>
- Mező, G.; Kajtár, J.; Nagy, I.; Szekerke, M.; Hudecz, F. *Biopolymers*, **1997**, 42, 719-730. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199711\)42:6<719::AID-BIP9>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199711)42:6<719::AID-BIP9>3.0.CO;2-X)
- Hudecz, F.; Pimm, M.V.; Rajnavölgyi, É.; Mező, G.; Fabra, A.; Gaál, D.; Kovács, A.L.; Horváth, A.; Szekerke, M. *Bioconjugate Chemistry*, **1999**, 10, 781-790. <https://doi.org/10.1021/bc990015q>
- Mező, G.; Reményi, J.; Kajtár, J.; Barna, K.; Gaál, D.; Hudecz, F. *J. Controlled Release* **2000**, 63, 81-95. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00175-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00175-3)
- Hudecz, F. In: Self-Assembling peptide systems in biology, medicine and engineering. (eds.: Agelli, A., Boden, N., Zhang, S.) Kluwer Academic Publisher, The Netherlands **2001**, 139-160.
- a) Mező G.; Mező, I.; Pimm, M. V.; Kajtár, J.; Seprődi, J.; Teplán, I.; Kovács, M.; Vincze, B.; Pályi, I.; Idei, M.; Szekerke, M.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry*, **1996**, 7, 642-650. <https://doi.org/10.1021/bc9600574>
b) Szabó, R.; Peiser, L.; Plüddemann, A.; Bösze, S.; Heinsbroek, S.; Gordon, S.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry*, **2005**, 16, 1442-50. <https://doi.org/10.1021/bc050168f>
- Sebestyén, M.; Szabó, R.; Kőhidai, L.; Pállinger, É.; Mező, G.; Kóczán, Gy.; Hudecz, F. *Structural Chemistry*, **2017**, 28: 527-536. <https://doi.org/10.1007/s11224-016-0901-z>
- Nagy, I.B.; Haro, I.; Alsina, A.; Reig, F.; Hudecz, F. *Biopolymers*, **1998**, 46, 169-179. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199809\)46:3<169::AID-BIP4>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199809)46:3<169::AID-BIP4>3.0.CO;2-J)
- Nagy, I.B.; Majer, Zs.; Hudecz, F. *Biopolymers*, **2001**, 58, 152-164. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(200102\)58:2<152::AID-BIP40>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0282(200102)58:2<152::AID-BIP40>3.0.CO;2-V)
- Hudecz, F.; Nagy, I.B.; Kóczán, Gy.; Alsina, M.A.; Reig, F. In: Biomedical polymers and polymer therapeutics. (eds.: Chiellini, E., Sunamoto, J., Migliari, C., Ottenbrite, R.M., Cohn, D.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York **2001**, 103-120. https://doi.org/10.1007/0-306-46842-5_9
- Szabó, R.; Hudecz, F.; Reig, F. *J. Colloid and Interface Science* **2003**, 267, 18-24. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00604-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00604-0)
- Nagy, I.B.; Hudecz, F.; Alsina M.A.; Reig, F. *Biopolymers*, **2003**, 70, 323-335. <https://doi.org/10.1002/bip.10494>
- Rajnavölgyi, E.; Hudecz, F.; Mező, G.; Szekerke, M.; Gergely, J. *Mol. Immunol.* **1986**, 23, 27-37. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(86\)90168-9](https://doi.org/10.1016/0161-5890(86)90168-9)
- Rajnavölgyi, É.; Lányi, A.; Hudecz, F.; Kurucz, I.; Kiss, K.; László, G.; Szekerke, M.; Gergely, J. *Molec. Immunol.* **1989**, 26, 949-958. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(89\)90113-2](https://doi.org/10.1016/0161-5890(89)90113-2)
- Hudecz, F.; Gaál, D.; Kurucz, I.; Lányi, S.; Kovács, A.L.; Mező, G.; Rajnavölgyi, É.; Szekerke, M. *J. Controlled Release* **1992**, 19, 231-243. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(92\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0168-3659(92)90079-7)
- Gaál, D.; Hudecz, F.; Szekerke, M. *J. Biol. Resp. Modifiers*, **1984**, 3, 174-184. PMID:6547165
- Gaál, D.; Hudecz, F.; Kovács, A.L.; Szekerke, M. *J. Biol. Resp. Modifiers* **1986**, 5, 148-159. PMID:3525762
- Gaál, D.; Hudecz, F.; Szekerke, M. *Eur. J. Cancer* **1993** 29A: Suppl. VI, S225. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(93\)91882-L](https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)91882-L)
- Hudecz, F.; Kovács, P.; Kutassi-Kovács, S.; Kajtár, J. *Colloid and Polymer Sci.*, **1984**, 262, 208-212. <https://doi.org/10.1007/BF01458962>
- Idei, M.; Dibó, G.; Bogdán, K.; Mező, G.; Horváth, A.; Érchehyi, J.; Mészáros, Gy.; Teplán, I.; Kéri, Gy.; Hudecz, F. *Electrophoresis* **1996**, 17, 1357-1360. <https://doi.org/10.1002/elps.1150170813>
- Schlosser, G.; Jakab, A.; Pocsfalvi, G.; Vékey, K.; Hudecz, F.; Mező, G. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2009**, 23, 1249-1254. <https://doi.org/10.1002/rcm.3993>
- Szókán, Gy.; Mező, G.; Hudecz, F. *J. Chromatography*, **1988** 444, 115-122. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94014-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94014-2)
- Hudecz, F.; Kutassi-Kovács, S.; Mező, G.; Szekerke, M. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1989**, 370, 1019-1026. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1989.370.2.1019>
- Hudecz, F.; Dibó, G.; Kovács, P.; Szókán, Gy. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1992**, 373, 337-342. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1992.373.1.337>
- Votavova, H.; Hudecz, F.; Kajtár, J.; Szekerke, M.; Sponar, J.; Blaha, K. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1980**, 45, 941-949. <https://doi.org/10.1135/cccc19800941>
- Votavova, H.; Hudecz, F.; Sponar, J.; Szekerke, M.; Blaha, K. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1982** 47: 3437-3446 (1982). <https://doi.org/10.1135/cccc19823437>
- Votavova, H.; Hudecz, F.; Kajtár, J.; Sponar, J.; Blaha, K.; Szekerke, M. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1985**, 50, 228-244. <https://doi.org/10.1135/cccc19850228>
- Greenfield, N.J. *Nat Protoc.* **2006**, 1, 2876-2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>
- Greenfield, N.J.; Fasman G.D. *Biochemistry*. **1969**, 8, 4108-4116. <https://doi.org/10.1021/bi00838a031>
- Szabó, R.; Mező, G.; Pállinger, É.; Kovács, P.; Kőhidai, L.; Bösze, Sz.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry*, **2008**. 19, 1078-1088. <https://doi.org/10.1021/bc7004544>
- Szabó, R.; Sebestyén, M.; Kóczán, Gy.; Orosz, Á.; Mező, G.; Hudecz, F. *ACS Combinatorial Science*, **2017**, 19, 246-254. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.6b00133>

41. Kóczán, Gy.; Ghose, A.C.; Mookerjee, A.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chemistry*, **2002**, 13, 518-524. <https://doi.org/10.1021/bc015530e>
42. Szabó, R. Ph.D. Disszertáció, **2005**, Eötvös Loránd Tudományegyetem,
43. Clegg, J.A.; Hudecz, F.; Mező, G.; Pimm, M.V.; Szekerke, M.; Baldwin, R.W. *Bioconjugate Chem.*, **1990**, 1, 425-430. <https://doi.org/10.1021/bc00006a009>
44. Pimm, M.V.; Clegg, J.A.; Hudecz, F.; Baldwin, R.W. *Int. J. Pharmaceutics* **1992**, 79, 77-80. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90096-K](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90096-K)
45. Pimm, M.V.; Gribben, S.J.; Mező, G.; Hudecz, F. *J. Labelled Compd Radiopharm.* **1995**, 36, 157-172. <https://doi.org/10.1002/jlcr.2580360208>
46. Pimm, M.V.; Gribben, S.J.; Bogdán, K.; Hudecz, F. *J. Controlled Release* **1995**, 37, 161-172. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00080-R](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00080-R)
47. Pimm, M.V.; Hudecz, F. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1996**, 122, 45-54. <https://doi.org/10.1007/BF01203072>
48. Gaál, D.; Hudecz, F. *Eur. J. Cancer* **1998**, 34, 155-161. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00338-9](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00338-9)
49. 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>
50. Szabó, R.; Bánóczy, Z.; Mező, G.; Láng, O.; Köhidai, L.; Hudecz, F. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2010**, 1798, 2209-2216. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.023>
51. Díaz, E.; Köhidai, L.; Ríos, A.; Silva, A.; Vanegas, O.; Szabó, R.; Mező, G.; Hudecz, F.; Ponte Sucre, A. *Experimental Parasitology* **2013**, 135, 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.007>

Influence of primary structure of branched chain polypeptides on solution conformation, *in vitro* cytotoxic/cytostatic effect and on *in vivo* blood clearance properties.

Despite numerous papers in the literature which include many encouraging results even in experimental and/or preclinical models, very few systematic studies were reported on structural and functional factors required for an optimal macromolecular carrier. To this end we have initiated investigation for establishing structure - function type correlation to facilitate rational design and/or selection of polymeric polypeptides as synthetic macromolecular carrier. We have prepared new groups of branched chain polymeric polypeptides with the general formula poly[Lys(X_i-DL-Ala_m)] (XAK), poly[Lys(X_i)] (X_iK) and poly[Lys(DL-Ala_m-X_i)] (AXK) where $i < 1$, $m \sim 3$, and X represent an additional optically active D- or L-amino acid residue. These polymeric polypeptides were characterized by their size, chemical (primary structure, solution conformation) and biological (*in vitro* cytotoxicity, pyrogenicity, biodegradation, immunoreactivity and biodistribution) properties. In this communication a brief outline is provided concerning the synthesis, structural analysis with a special emphasis on solution conformation new the above three sets of polymeric polypeptides. In

addition two aspects related to biological properties, namely *in vitro* cytotoxic/cytostatic effect on isolated rat liver, mouse spleen and mouse bone-marrow cells as well as on various cell lines (J774, C26, HepG2, HT-29) and blood clearance after i.v. injection of ¹²⁵I, ¹¹¹In or ⁵⁴Cr labelled polypeptides. In all three chapters the focus of the discussion is on the correlation between primary structure (amino acid composition, side chain structure, charge properties) and the solution conformation studies by CD spectroscopy, cell viability/inhibition and blood clearance/survival. We report here that the formation of ordered conformation in solution could be well designed by the appropriate intramolecular secondary linkages (e.g. ionic, H-bond and/or hydrophobic) between the branches. This can be achieved by the nature, configuration and position of amino acid X. The *in vitro* cytotoxic/cytostatic effect of the polypeptide as well as the *in vivo* blood clearance properties are predominantly determined by the charge of the compounds. High positive or negative charge density could result in marked cytotoxicity/cytostasis and quick and efficient disappearance of the polypeptide from the blood circulation.