



Eötvös Loránd Tudományegyetem
Kémia Doktori Iskola
Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program

**METOTREXÁT TARTALMÚ PEPTID-
BIOKONJUGÁTUMOK SZINTÉZISE ÉS
JELLEMZÉSE**

SEBESTYÉN MÓNIKA
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Doktori értekezés tézisei

Témavezető:
Dr. Hudecz Ferenc
egyetemi tanár

Konzulens:
Kóczán György

Budapest
2017

BEVEZETÉS

A *Leishmania* (*L.*) nemzetséghez tartozó egysejtű paraziták által okozott leishmaniasis igen komoly problémát jelent a trópusokon és a mediterrán régióban.¹ Ennek ellenére antileishmania hatású gyógyszerek továbbra is csak korlátozott számban állnak rendelkezésre. Ezen korlátozott kemoterápiás lehetőségek és a meglévő gyógyszerekkel szembeni fokozódó rezisztencia folyamatosan fenntartják az új gyógyszerek fejlesztésének igényét. A betegség visceralis formájában a paraziták a retikulo-endoteliális rendszer sejtjeit fertőzik, elsősorban a makrofágokat. A doktori munkám során a leishmaniasis kezelésében kísérleti stádiumban lévő metotrexáttal (MTX) foglalkoztam. Felhasználását súlyos mellékhatásai, többek között a csontvelő-károsodás, a hepato-, neuro- és nephrotoxicitás és légzőszervi komplikációk kialakulása korlátozzák. Kutatócsoportunkban régóta foglalkozunk célzottan sejtbe juttatható MTX-konjugátumok szintézisével. Munkám során célbajuttató egységként hidrofób aminosavat vagy arginint tartalmazó polilizin gerincű polipeptideket alkalmaztam a kutatócsoportban elért korábbi eredményekből kiindulva.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során *Leishmania donovani* parazita ellenes MTX-polipeptid konjugátumok tervezését és szintézisét, funkcionális tulajdonságainak jellemzését és a szerkezet-hatás összefüggések feltárását tűztem ki célul.

Az irodalomban először, trifoszfátes eljárással terveztem szintetizálni a poli[Lys(X_i-DL-Ala_m)], ahol X: Ile, Nle, Leu, Val, Arg (IAK, NleAK, LAK, VAK, RAK), továbbá a poli[Lys(X_i)], ahol X: Leu (L_iK) polimereket.

Az arginin-tartalmú polimer szintézise kapcsán egy új módszert terveztem kidolgozni a guanidino-NO₂ védőcsoport benzil-típusú védőcsoportok melletti szelektív hasítására nátrium-borohidrid segítségével.

A szerkezet-hatás kapcsolat felderítése céljából a polipeptidek oldatbeli konformációjának és annak pH- és ionerősség-függésének meghatározását, valamint a makromolekula szerkezeti

¹World Health Organization (2010) Control of Leishmaniases. WHO Technical Report Series no. 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010

alapegységét modellező oligopeptid-konjugátumok előállítását terveztem. A konjugátumokban a hatóanyag a polipeptidhez kapcsolódik, kovalens kötéssel.

Mivel a hatóanyagot a humán sejten belül élősködő parazitához kell eljuttatnunk, célom volt a polipeptidek és MTX-konjugátumaik citotoxicitásának és sejt felvételének vizsgálata egészséges makrofág sejteken, továbbá *in vitro* antileishmania hatásukat is tanulmányozni terveztem *L. donovani* promastigota és *L. pifanoi* amastigota parazita sejteken.

MÓDSZEREK

A poli[Lys(X_i-DL-Ala_m)], ahol X: Leu, Ile, Nle, Val, Arg (LAK, IAK, NleAK, VAK, RAK) és a poli[Lys(X_i)], ahol X: Leu (LiK) polimerek előállítása

A polilizin kiindulási anyagának, a L-Lys(Z)-NCA vegyületnek a szintézisét² optimalizáltam. A módosított szintézis: a trifoszfén előzetesen feloldottam tetrahydrofuranban, majd az oldatot 60°C-on tartottam 1 órán keresztül. A finoman elporított H-L-Lys(Z)-OH-t 5 részletben adagoltam az oldathoz. További két órát keverttem 60°C-on a reakcióelegyet, melynek során a H-L-Lys(Z)-OH teljes mennyisége feloldódott. A tiszta oldatot bepároltam rotációs vákuumbepárló segítségével. A távozó foszfén kezelését megfelelő csapdázással oldottam meg. A kapott olajat kristályosítással tisztítottam.

A polipeptidek összetételét aminosav-analízissel határozták meg.

A Z-Arg(NO₂)-OH NH-NO₂ védőcsoportjának szelektív eltávolítása NaBH₄-del

A RAK vegyületet szintézise kapcsán egy új redukciós eljárást dolgoztam ki a Z-Arg(NO₂)-OH NH-NO₂ védőcsoportjának szelektív eltávolítása. Z-Arg(NO₂)-OH-t és réz-acetilacetamid katalizátort absz. etanolban keverttem, majd nátrium-borohidridet adtam az elegyhez. Tömény ecetsav hozzáadásával állítottam le a reakciót, majd RP-HPLC analízist végeztem a konverzió megállapítására. A termék keletkezését tömegspektrometriával igazoltam.

Elágazó láncú polipeptidek oldatbeli konformációjának vizsgálata ECD spektroszkópiával

A polipeptid mintákat 0,5-1,0 mg/ml koncentrációban oldottam 0,02, 0,2 vagy 2,0 M töménységű NaCl oldatban, a pH beállítása pedig 1,0 M HCl oldattal vagy 1,0 M NaOH oldattal

² Katchalski E.; Grossfeld I.; Frankel, M. Poly-condensation of alpha-amino acid derivatives; poly-lysine J. Am. Chem. Soc. (1948) 70(6): 2094–2101.

történt. A $[\theta]_{MR}$ értékeket a főlánc egy lizin egységére vonatkoztatva állapítottuk meg beleértve a teljes oldalláncot. A polipeptidekről különböző pH értékű (pH 3, pH 7,4, pH 12) és ionerősségű (0,02 M, 0,2 M, 2,0 M) vizes oldatban felvett ECD spektrumok interpretációja irodalmi adatok alapján³ történt.

MTX-konjugátumok szintézise

A MTX konjugálása (0,2 ekv a monomer egységre tekintettel) 1-hidroxibenzotriazol és benzotriazol-1-il-oxi-trisz-pirrolidono-foszfónium-hexafluoro-foszfát (PyBOP) kapcsolószer segítségével történt dimetil-formamidban *N,N*-diizopropiletilamin (DIEA) bázis jelenlétében. A konjugátumok tisztítása dialízissel történt desztillált vízzel szemben, a terméket pedig liofilizálással izoláltam. A MTX tartalom meghatározása aminosav-analízissel történt.

Elágazó láncú polimer polipeptidek és MTX konjugátumaik fluoreszcens jelölése 5(6)-karoxifluoreszceinnel (Cf), tisztítása és jellemzése

A polimerek fluoreszcens jelöléséhez 5(6)-karboxifluoreszcein *N*-hidroxiszukcinimid észtert (Cf-OSu, 0,1 ekv. a monomeregységre tekintettel) használtam DIEA bázis jelenlétében. A konjugátumok tisztítása dialízissel történt desztillált vízzel szemben, a terméket pedig liofilizálással izoláltam. A fluoreszcein tartalmat UV-VIS spektroszkópiával határoztuk meg.

Fluorofór tartalmú MTX modell oligopeptidek szintézise

Boc stratégia esetén a szintézist MBHA gyantán valósítottam meg. A Boc védőcsoportot 33% TFA/DCM (V/V) oldattal, az Fmoc védőcsoportot pedig 2% piperidin + 2% DBU/DMF (V/V/V) oldattal hasítottam. Az aminosavak, a MTX, valamint a Cf kapcsolásához DIC/HOBt kapcsolószeret elegyét használtam. A kapcsolás reakcióideje 60 perc. A kapcsolás sikerességét a Kaiser által kifejlesztett ninhidrin-módszerrel ellenőriztem. A peptidek gyantáról való hasítására többféle módszert is alkalmaztam. Egyrészt TMSOTf-tal, 50% tioanizol, 25% etánditiol (EDT) és 25% *p*-krezol (V/V/V) gyökfogók, valamint TFA jelenlétében, másrészt HF-dal, *p*-krezol vagy anizol gyökfogó jelenlétében végeztem a hasítást.

Fmoc stratégia esetén Rink-Amide MBHA gyantát használtam, a védőcsoportok hasítása megegyezik a Boc stratégia során alkalmazottal. A peptidek gyantáról való hasításához alkalmazott hasítóelegy 95% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% TIS (V/V) oldata volt.

³ Votavová, H.; Hudecz, F.; Kajtár, J.; Szekerke, M.; Sponar, J.; Bláha K. *Conformation of branched polypeptides based on poly(L-lysine): Circular dichroism study. Coll. Czech. Chem. Commun. (1979) 45: 942-949.*

A peptidet még az üvegszűrőn 10%-os ecetsav oldatban oldottam és szűréssel eltávolítottam a gyantától. Ezután az oldatból a peptidet fagyasztva szárítással izoláltam. A peptideket szemipreparatív HPLC-vel tisztítottam, tömegspektrometriával azonosítottam és analitikai HPLC-vel ellenőriztem a tisztaságot.

Fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszer RP-HPLC

A szintetizált oligopeptidek tisztítására RP-HPLC-t használtam. A nyers termék tisztaságát Knauer analitikai HPLC készülék (Knauer GmbH, Berlin, Németország) segítségével ellenőriztem, Phenomenex Synergi C12, 4 μ , 120 Å, 4,6×300 mm oszlopot használva. Az eluensek: A eluens 0,1% TFA/H₂O (V/V), B eluens 0,1% TFA/H₂O-ACN (20:80 V/V). Az elválasztást szobahőmérsékleten végeztem, az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. Az elválasztáshoz lineáris gradiens elúciót alkalmaztam (20-80% B (5-20 perc)), a detektálás UV fotométer segítségével, $\lambda=220$ nm-en történt.

A nyerstermékek tisztítását Knauer RP-HPLC készülékkel (Knauer GmbH, Berlin, Németország) végeztem, Phenomenex Jupiter C18, 5 μ m, 10 × 300 mm Az eluensek: A eluens: 0,1% TFA/H₂O (V/V), B eluens: 0,1% TFA/H₂O-ACN (20:80 V/V). Az elválasztást szobahőmérsékleten valósítottam meg, az áramlási sebesség 9 ml/perc volt. Az elválasztáshoz lineáris gradiens elúciót alkalmaztam (5–100 % B (5–60 min)), a detektálás UV fotométer segítségével, $\lambda=220$ nm-en történt.

Az MTX-oligopeptid izomerek elválasztása 10–100 % B (5–55 perc) lineáris gradiens elúcióval történt azonos körülmények között.

Tömegspektrometria

A vegyületek molekulatömegét Bruker Esquire 3000+ típusú ioncsapdás tömegspektrométerrel (Bruker, Karlsruhe, Németország) végeztem ESI ionizáció alkalmazásával. A készülék MSⁿ felvételére (fragmens kiválasztás, további fragmentáció) is alkalmas. A mintákat 0,1% ecetsavat tartalmazó ACN/H₂O 1:1 (V/V) oldószerkeletben oldottam. A minta injektálása fecskendőpumpa segítségével, 10 μ l/perc áramlási sebességgel történt. A spektrumokat 4,0 kV túlfeszültséggel és 40,0 V orifice-feszültséggel vettem fel. A készüléket pozitív és negatív módban használtam 50-3000 m/Z tartományban, 13000 m/Z/sec mintavételi sebességgel.

A polipeptidek és MTX-konjugátumok citotoxicitása egér csontvelői eredetű makrofágokra

A kísérleteket Dr. Szabó Ritával kooperációban végeztem. A makrofágokat 96 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottuk 10^4 /lyuk kiindulási sejtszámmal R10 M-CSF médiumban. A polipeptidekkel és konjugátumokkal 0,8-100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációtartományban kezeltük a sejteket, 5x-ös futó hígítást alkalmazva szérumentes RPMI 1640 médiumban 1 és 24 óráig 37°C -on. Kontrollként kezeletlen sejtek szolgáltak, amelyekhez a hatóanyag oldatával megegyező térfogatú médiumot adtunk. Az életképes sejtek kontrollhoz viszonyított mennyiségét MTT-tesztel határoztuk meg. Az abszorbanciát ELISA-leolvasóval (Labsystems iEMS Reader) mértük $\lambda=540$ nm és $\lambda=620$ nm-es referencia hullámhosszon. A citotoxicitás mértékének meghatározása a $\text{Citotoxicitás } [\%] = (1 - A_{\text{kezelt}}/A_{\text{kontroll}}) \times 100$ képlettel történt. A citotoxicitás % értékeket a koncentráció függvényében ábrázoltuk, amelyből meghatároztuk az 50%-os inhibíciós koncentrációt (IC_{50}).

A Cf-jelölt polipeptidek és konjugátumok sejtbe jutásának meghatározása egér csontvelői eredetű makrofágokon

A kísérleteket Dr. Szabó Ritával kooperációban végeztem. A sejteket 24 órával kezelés előtt 24 lyukú szuszpenziós lemezre osztottuk 10^5 sejt/lyuk kiindulási sejtszámmal. A Cf-el jelölt vegyületekkel szérumentes médiumban inkubáltuk 37°C -on a sejteket 1 óráig 37°C -on 0,16; 0,8; 4; 20 és 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban. A sejtbe jutás mértékét áramlási citometriával BD LSRII (Franklin Lakes, NJ, Egyesült Államok) készüléken határoztuk meg 5-10000 sejtet lemérve ($\lambda_{\text{ex}}=488$ nm, $\lambda_{\text{em}}=519$ nm). A kapott hisztogramok fluoreszcencia intenzitás középértékét ábrázoltuk a kontroll értékének kivonásával a kezelési koncentráció függvényében. A statisztikai analízist kétmintás t-próbával végeztük ($p=0,05$).

A sejt felvétel vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával

A kísérleteket Dr. Szabó Ritával kooperációban végeztem. A sejteket 24 órával kezelés előtt 24 lyukú sejtenyésztő lemezbe osztottuk 10^5 sejt/lyuk kiindulási sejtszámmal. A sejteket 1 óráig 37°C -on inkubáltuk a Cf-polipeptid illetve Cf-konjugátum vegyületekkel szérumentes médiumban 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban. A jelölt vegyületek elhelyezkedését a felvételt követően CKX41 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk ($\lambda_{\text{ex}}=488$ nm). A felvételeket a mikroszkóphoz csatolt Olympus E250 kamerával rögzítettük, és ImageJ programmal szerkesztettük.

Az MTX-konjugátumok in vitro parazita ellenes hatása L. donovani promastigota és L. pifanoi amastigota sejtekre

A kísérleteket Dr. Luís Rivas csoportjában ((Eukaryotic Antibiotic Peptides Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Spanish National Research Council (CSIC), Madrid) együttműködésben, betanítást követően önállóan végeztem, az ott kidolgozott és rendelkezésemre bocsátott módszerek⁴ alapján.

A parazita sejtek életképességének meghatározása rövid kezelést követően:

Steril, 96 lyukú lemezre kiosztottam 60 µl/lyuk parazita szuszpenziót (20×10^6 sejt/ml HBSS). Hozzáadtam 60 µl/lyuk mennyiségben a mérendő vegyület 100 µg/ml töménységű oldatát és 4 órán keresztül inkubáltam promastigota sejtek esetében 27°C-on, amastigota sejtek esetében 32°C-on. A statisztikai szignifikancia érdekében minden egyes ponton három párhuzamos mérést végeztem. A mérésekhez referenciaként a pozitív kontroll (kezeletlen paraziták) szolgált. 50 µl MTT oldatot (a végső MTT koncentráció 0,5 µg/ml) adtam minden egyes lyukhoz, majd 27°C-on, illetve 32°C-on inkubáltam, míg a pozitív kontroll lyukak (kezeletlen paraziták) jól látható színt mutattak (kb. 30 perc). Ezután 50 µl 10% (w/v) SDS oldatot adtam minden egyes lyukhoz - a blaneket is beleértve – a reakció leállítására, majd mértem az abszorbanciát. Az élő sejtek számának meghatározására az MTT módszert használtam. 600 nm-es szűrővel felszerelt mikrolemez olvasóval olvastam le az abszorbanciát $\lambda=595$ nm-es hullámhosszon. Negatív kontrollként a sejteket nem tartalmazó médium szolgált. A citotoxicitás mértékének meghatározása a $\text{Citotoxicitás [\%]} = (1 - A_{\text{kezelt}}/A_{\text{kontroll}}) \times 100$ képlettel történt.

A parazita sejtek életképességének meghatározása hosszú kezelést követően:

A 4 órás inkubáció követően 20 µl sejszuszpenziót pipettáztam egy új, steril 96 lyukú lemezre, amely már tartalmazott 180 µl/lyuk promastigota sejtek esetén fenol vörös mentes, 10% HIFCS-t tartalmazó RPMI 1640 médiumot, amastigota sejtek esetén amastigota médiumot. A sejteket további 3 napon keresztül, 27°C-on, illetve 32°C-on inkubáltam. Ezt követően 50 µl MTT oldatot (a végső MTT koncentráció 0,5 µg/ml) adtam minden egyes lyukhoz, majd 27°C-on, illetve 32°C-on inkubáltam, míg a kezeletlen parazitákat tartalmazó (pozitív kontroll) lyukak jól látható színt mutattak (kb. 30 perc). Ezután 50 µl 10% (w/v) SDS oldatot adtam

⁴ Luque-Ortega, J.R.; Rivas, L. Characterization of the leishmanicidal activity of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol.* (2010) 618:393-420.

minden egyes lyukhoz a reakció leállítására, majd a rövid távú kezelésben leírttal analóg módon mértem az abszorbanciát.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1.

A korábban alkalmazott reagens (foszgén) helyett a biztonságosabb trifoszgén alkalmazásával, az irodalomban leírt módszert módosítva új eljárást dolgoztam ki a polilizin "gerinc" szintézise kiindulási anyagának, az oldalláncon Z-védőcsoporttal védett lizinből képzett Leuchs-anhidrid [L-Lys(Z)-NCA] előállítására.

2.

Előállítottam számos új, és korábban ismert elágazó láncú polimer polipeptidet: poli[Lys(X_i-DL-Ala_m)], ahol X: Leu, Ile, Nle, Val, Arg (LAK, IAK, NleAK, VAK, RAK) és poli[Lys(Leu_i)] (L_iK).

3.

A RAK polimer szintézisének tervezése során kidolgoztam egy eljárást a guanidino-nitro védőcsoport hasítására, mely a Z védőcsoportot érintetlenül hagyja, tehát ortogonalitást biztosít. A Z-Arg(NO₂)-OH mintavegyületen vizsgálva megállapítottam, hogy réz(II)-acetilacetonát katalizátor jelenlétében nátrium-borohidriddel a NO₂-védőcsoport sztöchiometrikusan eltávolítható a Z védőcsoport megkímélésével. Ilyen szelektív eljárás eddig nem volt ismert az irodalomban.

4.

Az új polipeptidek oldatbeli konformációját ECD spektroszkópiával határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy fiziológias körülmények között (pH~7,4, 0,2 M NaCl oldat) mind az alkil aminosav oldallánc (Leu, Ile, Nle, Val), mind a pozitívan töltött aminosav oldallánc (Arg) jelenléte rendezett szerkezet kialakulásához vezethet annak ellenére, hogy hidrofób vagy ionos karakterű aminosav van az oldallánc végén. Ez az oldalláncok között létrejövő különböző másodlagos kölcsönhatásokkal magyarázható. A pH és az ionerősség hatásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a rendezettség mértéke a pH és az ionerősség emelésével növekszik.

5.

Előállítottam és jellemeztem olyan új konjugátumokat, amelyekben az elágazó láncú polipeptidhez [(poli[Lys(X_i -DL-Ala $_m$)] X: Leu, Ile, Nle, Val, Arg (LAK, IAK, NleAK, VAK, RAK) vagy poli[Lys(Leu $_i$)] (L $_i$ K)] metotrexát és/vagy 5(6)-karboxifluoreszcein kapcsolódik. A szintéziseket aktívészteres illetve PyBOP kapcsolószer alkalmazásával valósítottam meg.

6.

Előállítottam az elágazó láncú polipeptid-család "alapvegyületének", a poli[Lys-(MTX-DL-Ala $_m$)], (MTX-AK) konjugátumnak a tulajdonképpeni "monomerjét", a K(MTX-AaAa)-NH $_2$ (oligo)peptidet és ennek N^α -aminocsoporton fluoreszcensen jelzett származékát [Cf-K(MTX-AaAa)-NH $_2$], valamint a rövidebb származékait. Az egyszerű szerkezet ellenére a peptidszintézis során számos problémát/mellékreakciót azonosítottam, ezek közül a leginkább meglepő olyan hiányos szekvenciák keletkezése volt, melyek arra utalnak, hogy a fluoreszcein lakton-karboxil-csoportja is képes bizonyos körülmények között acilezni. Tapasztalataim figyelmeztetnek arra, hogy erősen savas közegben anizol-típusú gyökfogók alkilezik a metotrexátot, valamint igazoltam, hogy a MTX DIC/HOBt-s kapcsolása során nemcsak a két karboxil-csoportnak megfelelő konstitúciós izomer keletkezik, de számolni kell a glutaminsav-egység racemizációjával is.

7.

A leishmaniasis kemoterápiája során talán a legnagyobb kihívás az, hogy a parazita elpusztítására hivatott toxikus hatóanyagot a humán sejten belül élősködő mikroorganizmushoz kell eljuttatni. Ezért fontos volt annak tisztázása, hogy a polimerek, valamint MTX-konjugátumaik bejutnak-e az egér csontvelői eredetű makrofág-sejtekbe illetve az MTX jelenléte befolyásolja-e a polimer felvétel mértékét. A kérdés tisztázására a fluoreszceinnel jelölt konjugátumokkal fluoreszcens mikroszkópos és áramlási citometriás vizsgálatokban megállapítottam, hogy a korábban hatékonynak talált MTX-ALK konjugátumnál mind a MTX-NleAK konjugátum, mind a hatóanyagot nem tartalmazó NleAK, sejtfelvétele nagyobb mértékű.

A MTX-konjugátumok citotoxicitásának tanulmányozása során megállapítottam, hogy a polipeptidek nagy része nem mutatott toxicitást a vizsgált kísérleti körülmények között, de az arginin-tartalmú konjugátum (RAK) kiemelkedően, míg a L $_i$ K polipeptid egy nagyságrenddel kisebb mértékben ugyan, de toxikusnak bizonyult, a konjugátumok közül szintén csak az MTX-RAK és az MTX-L $_i$ K toxikus, körülbelül azonos mértékben.

8.

Az előállított vegyületek parazita ellenes hatását szabad (azaz gazdasejt-nélküli) *L. donovani* promastigota (csillós-formájú) és *L. pifanoi* amastigota (csillótlan, a betegség kialakulása szempontjából fontosabb) parazita sejteken vizsgáltam *in vitro* körülmények között. Továbbá, tanulmányoztam *L. pifanoi* amastigota parazitával fertőzött egér-hashártya eredetű makrofág sejteken a vegyületek sejtfelvételét, lokalizációját.

Nem várt módon promastigota sejtekre nézve a vizsgált polipeptidek önmagukban sokkal toxikusabbnak bizonyultak, mint a MTX-konjugátumaik, vagy mint a szabad MTX hatóanyag. Megállapítottam, hogy a legtoxikusabbnak a L_iK, IAK és NleAK polipeptidek, valamint az MTX-L_iK, MTX-IAK és MTX-NleAK konjugátumok bizonyultak. Konfokális mikroszkópiás vizsgálattal sikerült megerősíteni, hogy a konjugátumok bejutnak a parazita sejtekbe.

A szabad amastigota sejteken a polipeptidek közül a L_iK és a LAK mutatott parazita ellenes hatást. A promastigotákkal ellentétben toxikusnak bizonyult az MTX-L_iK és az MTX-RAK konjugátum, valamint az MTX.

ÖSSZEGZÉS

Összegezve elmondható, hogy kutatómunkám során számos, új vegyületet állítottam elő, eredeti megfigyelést tettem. Kiemelkedő eredménynek tartom annak megállapítását, hogy a MTX-NleAK konjugátum jut be a leghatékonyabban a makrofág illetve a fertőzött makrofág sejtbe és toxikus nemcsak a promastigotákra, de az amastigotákra nézve is. Szintén perspektivikus a MTX-L_iK konjugátum, amely ugyan mérsékelten toxikus a makrofág sejtekre nézve, ugyanakkor erősen toxikus, valamint antiproliferatív mind a promastigota mind az amastigota sejtekre. Meglepő eredmény, hogy a hatóanyag-mentes L_iK polipeptid önmagában is igen hatékony *Leishmania* ellenes vegyület, mind a promastigota mind az amastigota sejtekre nézve.

PUBLIKÁCIÓK A DOKTORI KUTATÁSI TÉMÁBAN:

1. **Sebestyén, M**; Kóczán, G; Hudecz, F.: Pitfalls in the synthesis of fluorescent methotrexate oligopeptide conjugates. *Amino Acids* (2016) 48: 2599-2604. DOI:10.1007/s00726-016-2285-1
2. **Sebestyén, M**; Kóczán, G; Csámpai, A; Hudecz, F.: NaBH₄ – a novel method for the deprotection of N^o-nitro-arginine. *Tetrahedron Letters* (2016) 57: 546-548. DOI: 10.1016/j.tetlet.2015.12.081
3. **Sebestyén, M** and Szabó, R; Kőhidai, L; Pállinger, É; Mező, G; Kóczán, Gy; Hudecz, F.: Synthesis, conformation and cytotoxicity of new, branched polymeric polypeptides containing hydrophobic amino acid or arginine moiety. *Struct Chem* (2017) 28: 527–535. DOI 10.1007/s11224-016-0901-z
4. Szabó, R; **Sebestyén, M**; Kóczán, Gy; Orosz, Á; Mező, G; Hudecz, F.: Cellular uptake mechanism of cationic branched polypeptides with poly[L-Lys] Backbone. *ACS Com. Sci.* (2017) 19: 246–254. DOI: 10.1021/acscombsci.6b00133

AZ ELNYERT KÜLFÖLDI ÖSZTÖNDÍJ A DOKTORI KUTATÁSI TÉMÁBAN:

Campus Mundi ösztöndíj. Az ösztöndíj időtartama: 2016.07.26-08.23. Fogadó intézmény: Eukaryotic Antibiotic Peptides Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Spanish National Research Council (CSIC) /Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid/

POSZTEREK, ELŐADÁSOK A DOKTORI KUTATÁSI TÉMÁBAN:

1. Szabó, R; **Sebestyén, M**; Kóczán, G; Hudecz, F.: Synthesis, cytotoxicity and cellular uptake of new, branched polymer conjugates containing hydrophobic amino acids or arginine and methotrexate *34th European Peptide Symposium*, Leipzig, Germany, 2016.09.04-2016.09.09.
2. **Sebestyén, M**; Kóczán, G; Hudecz F.: Pitfalls in the synthesis of fluorescent methotrexate-containing oligopeptide conjugates. *14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vienna, Austria, 2015.08.03-2015.08.07.
3. **Sebestyén M**; Szabó R; Kóczán G; Hudecz F.: Új, hidrofób aminosavat vagy arginint és metotrexátot tartalmazó elágazó láncú polimer konjugátumok szintézise, citotoxicitása és sejtfelvétele *MKE 2. Nemzeti Vegyészkonferencia* (Hajdúszoboszló, Hungary, 2015.08.31-2015.09.02.
4. Oláhné Szabó, R; **Sebestyén, M**; Kóczán, G; Kőhidai, L; Hudecz, F.: Drug targeting strategy with polypeptide based methotrexate conjugates against leishmania infection. *17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology*, Budapest, Hungary, 2015.07.8-2015.07.10.
5. **Sebestyén, M**; Kóczán, Gy; Hudecz, F.: NaBH₄ – a novel modest method for the deprotection of N^o-nitro-arginine. *20th International Conference on Organic Synthesis*, Budapest, Hungary, 2014.06.29-2014.07.04.