

Módosított peptidek szintézise és vizsgálata

Doktori értekezés

Kormosné Varró Nikolett

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Gyógyszertudományok és Egészségügyi Technológiák Tagozat



Témavezető: Dr. Mándity István, habil. PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szabó Ildikó, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Antal István, PhD

Tagok: Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D.

Dr. Beke-Somfai Tamás, Ph.D.

Budapest
2026

1. Bevezetés

A biopolimerek, köztük a nukleinsavak, fehérjék és peptidek alapvető szerepet töltenek be az élő szervezetek szerkezetében és működésében. A fehérjék aminosavakból épülnek fel, és a kutatásban egyre fontosabbá váltak a nem természetes aminosavak és peptidszerű analógok. A peptidek hormonális szabályozásban, immunválaszban és gyógyszer szállítási rendszerekben betöltött szerepük miatt kiemelt alkalmazási potenciállal rendelkeznek. A kutatások intenzíven vizsgálják a peptidek szerkezetét és stabilitását, különös tekintettel a β -, γ - és δ -peptidekre és az önszerveződő foldamerek biomimetikus alkalmazásaira. A β -peptid foldamerek β -aminosavakból állnak, nagyobb stabilitást és proteázrezisztenciát mutatnak az α -peptidekhez képest, és jobb membránpermeabilitást biztosítanak. Oldalláncaik módosíthatósága, ciklikus szerkezeteik és kiralitásuk széles konformációs változatosságot és funkcionális sokszínűséget tesz lehetővé. A β -peptidek antimikrobiális, antivirális és antitumor aktivitással rendelkezhetnek, valamint képesek enzimeket és fehérje–fehérje kölcsönhatásokat gátolni, ezért ígéretes terápiás jelöltek.

A folyamatos áramlásos szintézis precíz hőmérséklet, nyomás és tartózkodási idő szabályozást, jobb reprodukálhatóságot és skálázhatóságot kínál a hagyományos batch módszerekhez képest. A mikroreaktorokra és áramlásos rendszerekre jellemző kiváló hő- és anyagátadás, valamint csökkentett hulladék- és oldószerhasználat különösen előnyös a gyógyszeriparban és anyagtudományban. Az SPPS Fmoc-stratégiája automatizálható és áramlásos integrációval kombinálva rövidebb ciklusidőt, jobb hozamot és zöldebb, fenntarthatóbb peptidszintézist tesz lehetővé.

2. Célkitűzések

Doktori kutatásom során mesterséges, önszerelő foldamerek szintetizálására, szerkezetük elemzésére, szintézisük automatizálására, a szintézis térfogatának növelésére és környezeti fenntarthatóságuk fokozására törekedtem. Első lépésként szilárd fázisú peptidszintézissel β -aminosavakból álló önszerveződő molekulát állítottam elő, majd a keletkezett peptidet fordított fázisú HPLC-vel tisztítottam. A szintetizált peptid szerkezetének feltérképezésére különböző NMR-

méréseket (COSY, TOCSY, ROESY), ECD- és FT-IR-vizsgálatokat végeztem.

A következő lépés a szintézis automatizálása volt, amely kezdetben nehézségekbe ütközött a β -aminosavak kapcsolása miatt; ennek következtében az automatizált szintézis feltételeit a lehető legoptimálisabb paraméterekkel kellett meghatározni. Ezt először rövidebb, α -aminosavakból álló peptidláncokkal végeztem, majd fokozatosan növelt lánchosszakkal és jobb hozamokkal hosszabb szekvenciákat állítottam elő. A sikeres szintézishez szükséges paraméterek így meghatározhatók voltak. A kísérlet egy folyamatos áramlású, automatizált rendszerben sikeresen megvalósult. A legfőbb kihívást a szintézis környezeti fenntarthatóságának javítása jelentette. A kutatás azt mutatta, hogy az elmúlt években a propilén-karbonát vált a legelterjedtebb „zöld” oldószerré, ezért a DMF-et ezzel az alternatívával helyettesítettem.

3. Módszerek

A szilárd fázisú peptidszintézist Merrifield-típusú üvegedényben végeztem, Fmoc-stratégiát alkalmazva Tentagel R RAM (0,20 mmol g⁻¹) gyantán. A kapcsoláshoz Fmoc-védett aminosavat,

OxymaPure aktiválószer és DCC-t használtam. Az oldószer (DMF) volt. Az aminosavak kapcsolása 2 órán keresztül, rázatással történt. A kapcsolást követően a gyantát többször mostam DCM-mel és MeOH-val a reagensek eltávolítása miatt. A deprotektálás 2% DBU-t és 2% piperidint tartalmazó DMF oldattal történt, 5 illetve 15 perces reakcióidőkkel, majd az előzőekhez hasonlóan mosások követték. A gyantáról való lehasítást TFA/water/TIPS/DTT (95:2:2:1) keverékkel 0 °C-on, 2 órán át végeztem.

A folyamatos áramlásos (continuous flow) szilárd fázisú peptidszintézis során is Tentagel R RAM (0,20 mmol g⁻¹) gyantát alkalmaztam. A berendezés egy modulárisan összeállított CF rendszer volt, melyet PEEK oszlop, félautomata pumpa, HPLC mintaadagoló, termosztát, szelepegységek és nyomás-szabályozó egység alkotott. A kapcsolószerkezet keverékét az autosampler készítette elő közvetlenül a reakció előtt; a reagensek aránya 1,5 ekv. Fmoc-védett β -aminosav, 1,5 ekv. OxymaPure és 1,5 ekv. DIC volt DMF oldószerben. Az Fmoc védőcsoport eltávolításához 2% DBU és 2% piperidin DMF-oldata került felhasználásra, illetve a lépések közötti mosáshoz DMF-et alkalmaztam 5 percig. A hasítás a fent leírtak alapján történt, TFA/water/TIPS/DTT (95:2:2:1) keverékkel 0 °C-on, 2 órán át.

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A CD-spektrumok rögzítése Jasco J-1500 spektropolariméterrel, 25 °C-on, 0,1 cm optikai úthosszú kvarc küvetában, folyamatos pásztázás mellett 190–250 nm tartományban, $50 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ sebességgel, 0,5 nm adatlépéssel, 1 nm sávszélességgel és háromszori akkumulációval történt. A minták koncentrációja 1 mM volt ultrapure vízben, metanolban és PBS-ben.

Fourier-transzformált infravörös spektroszkópia (FT-IR)

FT-IR méréseket Varian 2000 Scimitar készülékkel, MCT detektorral és „Golden Gate” egyreflexiós gyémánt ATR kiegészítővel végeztem. A mintából 3 μl -t helyeztem a gyémántfelületre, a pufferoldószer fokozatos elpárologtatása után száraz filmen mértem a spektrumot. Elvégeztem az ATR-korrekción, pufferkivonást és alapvonal-korrekción, valamint GRAMS/32 szoftverrel végeztem a spektrális feldolgozást.

Nukleáris mágneses rezonancia (NMR)

A strukturális hozzárendeléshez 500 MHz-es Bruker Avance III spektrométer cryoprobe-bal szolgált, a minták 4 mM koncentrációban készültek $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10), DMSO-d_6 vagy CD_3OH oldószerekben. ROESY és TOCSY spektrumokat is rögzítettünk. T2-relaxációs vizsgálatokat CPMG alapú pulzus-sémával végeztünk különböző relaxációs késleltetések mellett.

Az NH/ND cserét CD₃OD-ban 4 mM mintákon Varian Mercury 400 készüléken rögzítettük. Az ¹H spektrumok 45°-os impulzussal és 5 s relaxációs késleltetéssel készültek, a felvétel a teljes feloldódást követő 10. perctől indult.

Dinamikus fényeloszlás (DLS)

A részecskeméret-eloszlás meghatározásához a peptideket 4 mM koncentrációban oldottam MQ vízben, és 25 °C-on mértem Litesizer 500 készüléken He–Ne lézerrel. A mérési konfiguráció backscatter detektorral 175°-nél, oldalszórás 90°-nál és frontszórás 15°-nél volt rögzítve; a korrelációs függvényt és a látszólagos hidrodinamikai átmérő (dh) intenzitás szerinti eloszlását 3×10 felvétel alapján határoztam meg.

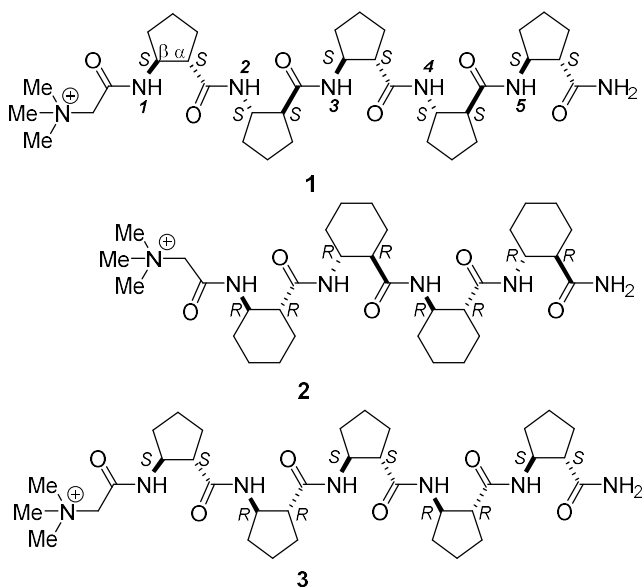
Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A morfológiai vizsgálatokhoz 1 mM peptid vizes oldatát 5 percig szonikáltam, majd 5 µL cseppet helyeztem 200-mesh rézháló formvar filmmel borított rácsra és 10 percig levegőn szárítottam. A mintákat MORGAGNI 268D TEM-mel, 80 kV ráfeszítéssel és Quemesa 11 MP CCD kamerával vizsgáltuk. A felvételeket ×8 000 és ×10 000 nagyítással készítettük és iTEM platformon elemeztük.

4. Eredmények

4.1. Betain-konjugált foldamerek

A kísérletek során először több önrendeződő foldamer szintézisét végeztem el. Az előállított foldamerek szerkezetei az alábbi ábrán láthatók:



A homokirális [1S,2S]-ACPC homooligomerek által alkotott 1-es vegyület H12-es hélix szerkezetet, továbbá a másik homokirális vegyület, melyet az [1R,2R]-ACHC tetramer hoz létre H10-es hélix szerkezetet mutat. Ez a H10-es hélix szerkezet a betain konjugátum rákapcsolásával H14-es hélix szerkezetté alakult. A szálszerű konformációt tökéletesen bemutatja az alternáló

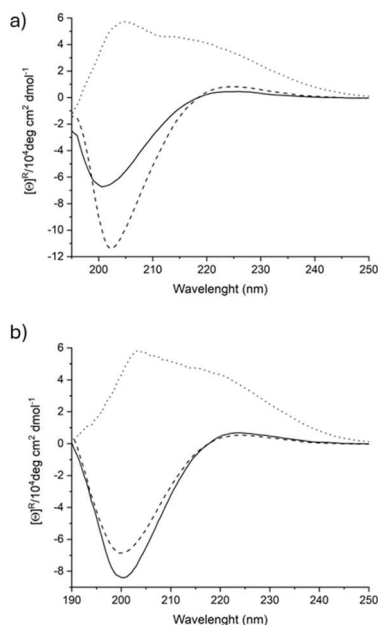
heterokirális [1S,2S]- és [1R,2R]-ACPC egységekből álló homooligomer. Ezeket az oligomereket az N-terminális részen betain-konjugátummal láttuk el: Így állítottuk elő a foldamerek végleges szerkezetét.

A 1–3. vegyületek kezdeti előállítására hagyományos szilárd fázisú peptidszintézissel sikertelen volt, mivel a betain, mint térfoglaló kvaterner ammóniumcsoportot tartalmazó rész, nem volt beépíthető és a céltermékek nem voltak izolálhatók. A problémát folyamatos áramlású, szilárd fázisú peptidszintézissel oldottuk meg, mely hatékony kötéssel, minimális aminosav-többlettel és teljes konverzió biztosításával működik. Optimalizált CF-SPPS feltételek mellett a vegyületek sikeresen előállíthatók voltak; a nyers termékek tisztasága meghaladta a 96%-ot, az izolált hozam pedig 91% fölötti volt.

Az NH/ND cserekinetika és részletes NMR (COSY, TOCSY, ROESY) vizsgálatok igazolták, hogy a betain-konjugáció erősen módosítja a β -peptid foldamerek másodlagos szerkezetét. Az 1-es vegyület H12 típusú hélixet tart meg intramolekuláris hidrogénkötésekkel és lassú, helyenként védett NH-cserével. A 2-es vegyület H14 jellegű hélixre és lehetséges önasszociációra utaló, extrém lassú NH/ND cserét és megfelelő NOE-mintázatot mutat. A 3-as vegyületnél az azonnali amidproton-csere, a NOE-

hiány és gyenge jeldiszperzió szál szerű, kiterjedt konformációt valószínűsít; a betain kvaterner ammóniumcsoportja javítja az oldhatóságot.

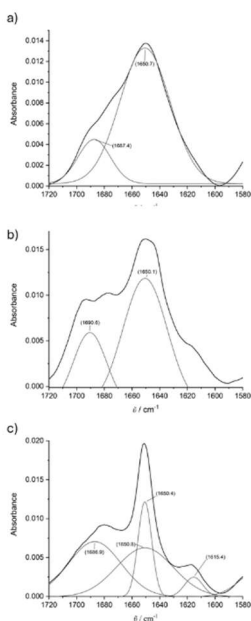
A továbbiakban elvégzett elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) vizsgálatok metanolban és vizes oldatban (1 mM, szobahőmérséklet) alátámasztották a szintetizált vegyületek másodlagos szerkezetére vonatkozó NMR-eredményeket.



Az ECD-adatok konzisztensen megerősítik, hogy a betain-konjugáció nem rontotta a spektrális mérhetőséget, sőt

javította az oldhatóságot metanolban és vízben, és egyértelműen differenciálják a vegyületek konformációját: az 1-es H12-es hélixet, a 2-es H14 jellegű, kompakt hélixet, a 3-as pedig kiterjedt, szál-szerű szerkezetet képvisel.

A Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR) amide I tartománya alapján a 1–3. vegyületek konformációs jellemzői jól elkülöníthetők, és összhangban vannak a korábbi NMR/ECD eredményekkel.

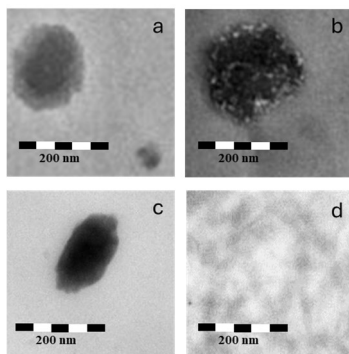


A dekonvolált amide I spektrumok alapján mindhárom vegyület esetében a fő sávok a különböző erősségű $\text{C=O}\cdots\text{H-N}$

hidrogénkötések meglétét jelzik, amelyek a másodlagos szerkezet típusát határozzák meg. Az első vegyület domináns $\sim 1641\text{ cm}^{-1}$ sávja erős intramolekuláris hidrogénkötésre és stabil helikális konformációra utal, míg a másodikon a $1646/1690\text{ cm}^{-1}$ sávok aránya H14 típusú hélix kialakulását támasztja alá, ami a betain-konjugáció hatására bekövetkező szerkezetátmenetet jelzi. A harmadik vegyületnél a ~ 1643 és $\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ jelek mellett megjelenő $\sim 1611\text{ cm}^{-1}$ váll intermolekuláris hidrogénkötéseket és szálas, β -redő-szerű konfigurációt valószínűsít.

TEM-vizsgálatok 4 mM vizes oldatokban megmutatták, hogy a helikális 1-es és 2-es betain-konjugált β -peptidek gyorsan vezikulákat képeznek; az 1-es vezikulái $\sim 130\text{--}200\text{ nm}$, a 2-eséinek átlagos mérete $\sim 200\text{ nm}$. A 2-es komponensnél a vezikulaképződés azonnal, oldódás és szonikálás után jelentkezett, ami arra utal, hogy a betainnel bevezetett kvaterner ammóniumcsoport növeli az amphifilitást és elősegíti az önszerveződést. A 3-as vegyület nem ad vezikulákat, hanem nanoméretű fibrilláris hálózatot alkot, összhangban a szál szerű konformációval. Az eredmények összességében azt mutatják, hogy a betain funkcionizáció egyszerre módosítja a β -peptidek másodlagos szerkezetét és a magasabb rendű önszerveződést,

lehetővé téve vízi környezetben vezikulák és fibrillumok kialakulását.

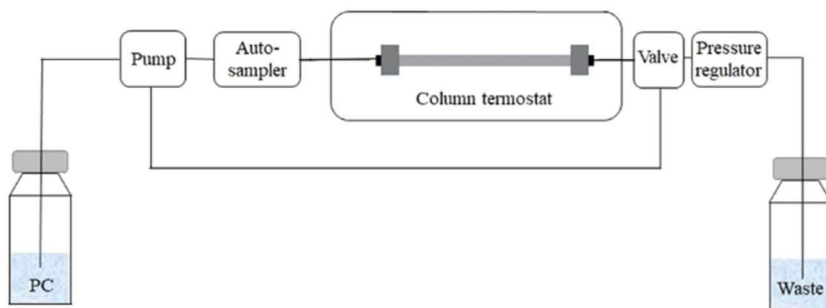


4.2. Peptidszintézis folyamatos áramlású reaktorban

A folyamatos áramlásos szilárd fázisú peptidszintézis (CF SPPS) fejlesztése csökkenti a veszélyes reagenshasználatot és növeli a folyamat hatékonyságát, így hozzájárul a fenntarthatóbb kémiai gyártáshoz. A propilén-karbonát környezetbarát oldószerként ismert, mert előállítása propilén-oxid és CO_2 reakcióján alapul, ezáltal CO_2 -hasznosítást tesz lehetővé. A propilén-karbonát alacsony toxicitása javítja az emberi és környezeti biztonságot.

A cél propilén-karbonát beépítése CF SPPS protokollokba és egy gramm-skálán működő, skálázható folyamatos áramlásos peptidszintézis platform kialakítása volt. A rendszer HPLC autosamplerből, termosztátos rozsdamentes acél kolonnából,

félautomata HPLC pumpából, visszanyomás-szabályozóból és vonalválasztó szelep-sorozatból állt, amelyek lehetővé tették a reagensoldatok recirkulációját a gyantaágyon keresztül és a pulzusmentes, reprodukálható adagolást.



A CF-SPPS protokoll feltételeinek rendszeres optimalizálása során a reakcióhőmérsékletet, a nyomáse, a térfogatáramot és az aminosav-egyenértéket vizsgáltam.

A kísérletek során az alábbi paraméterek bizonyultak a legoptimálisabbnak: 70 °C hőmérséklet, 60 bar nyomás, 5 perces tartózkodási idő ($0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), 25 cm hosszú oszlopba töltött 300 mg TentaGel R RAM gyanta, 1,5 ekv. aminosav + 1,5 ekv. OxymaPure + 1,5 ekv. DIC, automatikus reagenskeverés és PC-alapú deprotektálás (2% piperidin + 2% DBU), 5 perc PC-mosással a lépések között.

Ezzekkel a paraméterekkel különböző α -peptidek szintézise 96% izolált hozammal és >98% tisztasággal zárult. A protokoll

sikeresen alkalmazható volt további biomedikálisan releváns α -peptidre, köztük antimikrobiális és sejtpenetráló szekvenciákra, magas tisztaságokkal és jó hozamokkal.

A módszert β -aminosavakat tartalmazó szekvenciákra is kiterjesztettem. Kezdetben a HATU/DIPEA keverék PC-ben csapadékképződést és csőeldugulást okozott, ezért OxymaPure/DIC kapcsolószereket alkalmaztam recirkulációs üzemmóddal. A kapcsolás és deprotektálás idejét 30 percre növeltem, ami sikeresnek bizonyult a szintézist tekintve, hiszen a nyers termékek kiváló tisztaságot és jó izolált hozamokat mutattak, igazolva a CF-SPPS robosztusságát összetett szerkezetek esetén.

Összehasonlítások alapján a CF-SPPS jelentősen rövidítette a szintézis idejét az SPPS-hez képest, és közel két nagyságrenddel csökkentette az oldószer-felhasználást, javítva a környezeti fenntarthatóságot és csökkentve a költségeket.

A méretnövelési kísérletek 250 mm hosszú oszlopokkal (10 mm és 20 mm belső átmérő) lehetővé tették a gramm méretű peptidek előállítását 5–8 óra alatt. A 20 mm átmérőjű oszlop alkalmazásával penetratinból >4 g izolált mennyiséget kaptunk, kevesebb mint 6 óra alatt.

5. Következtetések

A szintetizált, módosított β -peptidek megfeleltek a kitűzött koncepciónak, és jól definiált szerkezetek alakultak ki, amelyek önszerveződő módon helikális konformáció felvételére képesek. A β -aminosav-alapú peptid víz-oldhatósága betainnal történő kvaterner töltés bevezetésével növelhető.

A korábbi β -peptid hélixek szerkezetének módosítása N-terminális betain-konjugációval valósult meg. Részletes szerkezetvizsgálatok (NMR, ECD, FT-IR) és molekulamodellezés alapján a betain-konjugáció nem változtatta meg az [1S,2S]-ACPC pentamer H12 jellegű helikális konformációját. Ezzel szemben a [1R,2R]-ACHC tetramer jelentős konformációs eltolódást mutatott, és a várt H10 helyett H14 hélixet vett fel.

Kiemelendő, hogy a tanulmány elsőként igazolta TEM-felvételekkel egy H12 jellegű β -peptid önasszociációját vezikuláris struktúrák képződésével. Az alternáló heterokirális pentamer betain-konjugációja fokozta a vizes oldhatóságot és támogatta a várt kiterjedt szál konformáció kialakulását. TEM-képek fibrilszerű hálózatot mutattak, amely a szál alapú önszerveződésre jellemző.

Az eredmények azt igazolják, hogy a betain-konjugáció egyaránt befolyásolja az oldhatóságot, a másodlagos szerkezetet és a magasabb rendű (tercier) önszerveződést vizes közegben. A kvaterner ammóniumcsoportok bevezetése új lehetőségeket nyit bioaktív β -peptid foldamerek tervezésében, különösen receptor–ligandum kölcsönhatások és anyagtudományi alkalmazások tekintetében.

Ezzel párhuzamosan kidolgozásra került egy hatékony, környezetbarát és skálázható folyamatos áramlásos szilárd fázisú peptidszintézis (CF-SPPS) protokoll propilén-karbonát (PC) oldószer alkalmazásával. A fő cél a dimetil-formamid (DMF) helyettesítése a GSK oldószerválasztó útmutató által ajánlott, ökológiailag kedvező PC-vel volt. A kompatibilitás felmérésére négy eltérő α -peptidet szintetizáltak, kiváló tisztaságú termékeket kapva; a módszer hatékonyságát komplex szekvenciák, köztük négy β -peptid foldamer és egy α/β hibrid sikeres szintézise is igazolta.

A skálázhatóságot geometriai számításokkal és fokozatos kísérleti validációval vizsgálták; meghatározták a szükséges gyanta-mennyiséget és az optimális térfogatáramot a kívánt 5 perces tartózkodási idő fenntartásához nagyobb kolonnák esetén. Az iteratív skálázás eredményeként a CF-SPPS platform képes

volt hatékonyan peptideket előállítani több grammos mennyiségben. A PC alkalmazása nemcsak javította a fenntarthatóságot, hanem minimálisra csökkentette az oldószer-felhasználást, így a kifejlesztett technológia ígéretes előrelépést jelent a peptidszintézis terén, különösen a gyógyszerfejlesztés és a gyógyszeripari előállítás számára.

6. Saját publikációk jegyzéke

1. N. Varró, B. Mándityné Huszka, E. Erdei, A. Mándoki, I. Mándity

Upscaled synthesis of α - and β -peptides in a continuous-flow reactor using propylene carbonate as an eco-friendly solvent

Chemistry Methods (2025)

DOI: doi.org/10.1002/cmt.202500010

2. I. Mándity, N. Varró, E. Erdei, D. Bogdán, E. Kalydi, R. Deme, B. Balogh, I. Cs. Szigyártó, T. Beke-Somfai, Z. Varga, P. Szabó

Betaine-Conjugated β -Peptide Foldamers, Influence of Quaternary Charge on Self-Organization and Morphology Formation

Chemistry Open (2025)

DOI: [10.1002/open.202500340](https://doi.org/10.1002/open.202500340)

Egyéb publikációk

1. I. Mándity, E. Erdei, J. Marcos, N. Varró, B. Bacsa, K. Horváti

Spatiotemporal Control in Biomedicine: Photoswitchable Peptides and Foldamers

British Journal of Pharmacology (2025)

2. B. Balogh, D. Bogdán, A. Czompa, R. Deme, P. Dunkel, Z. Kaleta, N. Kormosné Varró, G. Krajsovsky, I. Mándity, P. Pollák et al.

Szerves kémia szemináriumok II.

Budapest, Magyarország: Semmelweis Egyetem (2024)

ISBN: 9786155722363

Közlemény: 35084700 Admin láttamozott Forrás Könyv
(Oktatási anyag) Oktatási

3. B. Balogh, D. Bogdán, A. Czompa, R. Deme, P. Dunkel, Z. Kaleta, N. Kormosné Varró, G. Krajsovsky, I. Mándity, P. Pollák et al.

Szerves kémia szemináriumok I.

Budapest, Magyarország: Semmelweis Egyetem (2023)

ISBN: 9786155722301

Közlemény: 34433118 Admin láttamozott Forrás Könyv
(Oktatási anyag) Oktatási

4. A. Mirzahosseini, M. Molaei, K. Mazák, T. Pála, I. Köteles, N. Varró, I. Mándity, B. Noszál

Species-specific acid-base characterization of carnosine and homocarnosine using nuclear magnetic resonance

Chemical Physics Letters 808 Paper: 140128, 6 p. (2022)

5. L. Petri, P. Ábrányi-Balogh, D. Vagrys, T. Imre, N. Varró, I. Mándity, A. Rácz, L. Wittner, K. Tóth, E. Zs. Tóth et al.

A covalent strategy to target intrinsically disordered proteins: Discovery of novel tau aggregation inhibitors

European Journal of Medicinal Chemistry 231 Paper: 114163, 13 p. (2022)

6. B. Nizami, D. Bereczki-Szakál, N. Varró, K. el Battioui, V. U Nagaraj, I. Cs. Szigyártó, I. Mándity, T. Beke-Somfai

FoldamerDB: a database of peptidic foldamers

Nucleic Acids Research 48: D1 pp. D1122-D1128. (2020)

7. K. Nemeth, N. Varro, B. Reti, P. Berki, B. Adam, K. Belina, K. Hernadi

Synthesis and investigation of SiO₂-MgO coated MWCNTs and their potential application

Scientific Reports 9 Paper: 15113, 11 p. (2019)