

# BIOKÉMIA

A Magyar Biokémiai Egyesület tájékoztatója  
Quarterly Bulletin of the Hungarian Biochemical Society

Szerkesztőbizottság:  
BENYHE SÁNDOR, ERDŐDI FERENC, GERGELY PÁL,  
HUDECZ FERENC, NYESTE LÁSZLÓ, NYITRAY LÁSZLÓ, SARKADI BALÁZS,  
SÜMEGI BALÁZS, VÁRADI ANDRÁS

Felelős szerkesztő:  
SZÉKÁCS ANDRÁS

XXXI. ÉVF. 1. SZÁM

2007. MÁRCIUS

A tartalomról:

- ◇ A G-kvadruplexek szerkezete és biológiai jelentősége – *Ambrus Attila*
- ◇ Dendrimeralapú nanogyógyászat: nanoeszközök szintézise, jellemzése és biológiai vizsgálata – *István J. Majoros, Thommey P. Thomas, Kimberly A. Candido, Mohammad T. Islam, Scott Woehler, Chandan B. Mehta, Alina Kotlyar, Zhengyi Cao, Jolanta F. Kukowska-Latallo és James R. Baker, Jr.*
- ◇ Nemzetközi nyomelem-kutatási rendezvény – *Szilágyi Mihály*
- ◇ Analóg vegyületek a gyógyszerkutatásban (könyvismertetés, J. Fischer, C. R. Ganellin [Eds.]: *Analogue-based Drug Discovery*) – *Székács András*

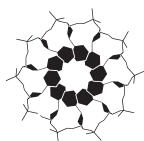
Címlapkép:

*A c-MYC kvadruplex oldatbeli (NMR) szerkezete. Látható a síkok között stabilan koordinálódó két K<sup>+</sup>-ion (zöld gömbök), a felső és alsó tetradokat stabilizáló 5' és 3' irányban túlnyúló szekvenciák orientációja, valamint a huroknukleotidok (guanin: sárga, adenin: vörös, timin: kék) helyzete. A megvalósuló szerkezet kimagaslóan stabil, és még 95 °C hőmérsékleten sem oldható fel. (Engedélyezett újraközlés / Reprinted with permission from Biochemistry, 44: 2048–2058 (2005). Copyright (2005) American Chemical Society; ld. a vonatkozó közleményt a 2–8. oldalon).*



Contents:

- ◇ G-quadruplexes: structure and biological significance – *Attila Ambrus*
- ◇ Dendrimer-based nanomedicine: engineered nanodevice synthesis, characterization, and biological testing – *István J. Majoros, Thommey P. Thomas, Kimberly A. Candido, Mohammad T. Islam, Scott Woehler, Chandan B. Mehta, Alina Kotlyar, Zhengyi Cao, Jolanta F. Kukowska-Latallo and James R. Baker, Jr.*
- ◇ International symposium on trace element research – *Mihály Szilágyi*
- ◇ Analogue compounds in drug research (book review) – *András Székács*



MAGYAR  
BIOKÉMIAI  
EGYESÜLET

Kiadja a Magyar Biokémiai Egyesület, 4012 Debrecen, Pf. 6  
e-mail: [biokemia@nki.hu](mailto:biokemia@nki.hu) <http://www.webio.hu/biokemia>  
Felelős kiadó: Dr. Fésüs László

Az engedély száma: III/SZI/397/1977 HU ISSN 0133-8455  
Készíti és terjeszti a **dART studio** (1137 Budapest, Újpesti rakpart 6. Tel.: 349-3426)  
Ára • a Magyar Biokémiai Egyesület tagjai részére: tagdíj ellenében,  
• nem egyesületi tagoknak: 750 Ft + postaköltség

**WEBio**  
BioScience Portal

# A G-kvadruplexek szerkezete és biológiai jelentősége

## G-quadruplexes: structure and biological significance

*Ambrus Attila*

Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémia Intézet,  
1088 Budapest, Puskin u. 9.  
E-mail: ambrus@puskin.sote.hu

### Összefoglalás

A nukleinsavak meghatározott háromdimenziós szerkezetet felvéve fejthetik ki biológiai funkciójukat. Eddig úgy gondoltuk, hogy a DNS rigid és passzív molekula, amelynek elsődleges szerepe az, hogy a genetikai információt tárolja. Az utóbbi években azonban fény derült arra, hogy több olyan szokatlan DNS-szerkezet is létezik, amelyekhez biológiai szerep is kapcsolható. Ezek között kiemelkedő jelentőséggel bírnak az ún. G-kvadruplex DNS-szerkezeti motívumok. Ezek a szerkezetek az eukarióta genom számos helyén megtalálhatók, és olyan, biológiailag fontos régiókba csoportosulnak, mint a telomerek, különböző gének promóterei és a rekombináció regulációs pontjai. Ez a közlemény a G-kvadruplexek szerkezetének általános jellemzőit és biológiai szerepüket mutatja be, s részletesebben tárgyalja a c-MYC protoonkogén promóter régiójában kialakuló és a humán telomerben található G-kvadruplexeket.

*Ambrus, A.*

Semmelweis University, Department of Medical Biochemistry, H-1088 Budapest, Puskin u. 9, Hungary, E-mail: ambrus@puskin.sote.hu

### Summary

Nucleic acids need to adopt a particular three-dimensional structure to exert their biological function. Previously it was believed that DNA is a rigid and passive molecule with the sole purpose to store genetic information, but in the latest years scientific evidence has been collected for a full repertoire of unusual DNA structures associated with biological functions. Among those, G-quadruplex DNA structures are of particular importance. They are widely dispersed in eukaryotic genomes, and are abundant in regions of biological significance, for example, in telomeres, in promoters of genes and at recombination hotspots. In this contribution, the general properties of the structure and the biological significance of the G-quadruplexes is delineated. A special emphasis is laid on the G-quadruplexes forming in the promoter region of the proto-oncogene c-MYC and the human telomere.

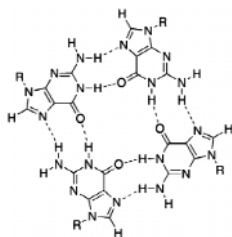
### A DNS szerkezeti variánsai

A DNS kettős helikális térbeli szerkezete alapvetően meghatározza és behatárolja azokat a lehetséges biokémiai eseményeket, amelyek kifejeződésre juthatnak általa. Természetesen a DNS legalapvetőbb és legfontosabb szerepe az, hogy tárolja a genetikai kódot, azonban manapság kezdjük elfogadni azt a nézetet, hogy a genetikai információ kifejeződése a transzkripció szintjén szoros kapcsolatban állhat nemcsak a DNS bizonyos részeihez kötődő és egymást is modulálni képes fehérjékkel (például ún. transzkripciós faktorokkal), hanem magával a DNS lokális szerkezetével is. Azt már eddig is tudtuk, hogy nemcsak a fiziológiásan legáltalánosabban előforduló ún. B-DNS létezik, hanem a hélixstruktúra bizonyos változásával a DNS egy rövidebb részén kialakulhatnak a reguláris DNS-től eltérő szerkezetű

régiók is. Ilyen, élettanilag is jelentős konformáció például az A-DNS és a Z-DNS. Ezen biológiailag is fontos konformációk mellett létezik még például C-, D-, E-, H-, L-, M- és P-DNS is (az ábécének csupán az F, Q, U, V és Y betűihez nem kapcsolódik DNS-konformáció) [1,2], amelyek lényegében mind a kettős-hélix-struktúrán alapulnak. Az, hogy melyik konformáció valósul meg, függ a bázissorrendtől, a kémiai és molekuláris környezettől (fehérje-kölcsönhatások, kémiai modifikációk, oldatkörülmények). Semleges pH-n és magas sókoncentrációnál kialakulhat az egyszálú DNS-nek is egy flexibilis hélix, amely azonban kevésbé stabilis. Fontos megemlíteni még a háromszálú DNS-t is, amely igazából nem tekinthető különálló konformációnak; erről akkor beszélünk, ha egy speciális kettős láncú DNS-régióhoz szorosan kötődik egy egyszálú DNS-szakasz [3].

## A Hoogsteen H-híd és a G-kvadruplexek felfedezése

A Watson–Crick-féle hidrogénhíd (H-híd) nem az egyedüli lehetőség bázisok közötti kapcsolat létrehozására, hiszen az más bázis- és atomkombinációkban is kialakulhat. Karst Hoogsteen már 1963-ban észrevette, hogy a nem reguláris H-hidaknak szerepe lehet a DNS-szerkezet alakításában. Vizsgálódásai alapján elméletileg a nukleotidbázisok szinte minden kombinációjában kialakulhatnak párok, triplettek, kvartettek vagy akár pentettek is. Ezen formációk fiziológiás előfordulása és jelentősége azonban sok esetben kérdéses. A fent említett multinukleotid-asszociációk közül kitüntetett stabilitású és biológiailag is értékes a guaninbázisok által létrehozott ún. G-tetraplex (G-kvartett, G-kvadruplex), amely négy guanin planáris rendeződéséből áll elő (1. ábra). Bizonyos mértékű stabilitással rendelkezik még a C-C pár, a T-triplett, az A-triplett, a T-A-A triplett, az A-tetraplex, a G-C-G-C tetraplex, a G-G-G-C tetraplex, a G-G-A-A tetraplex, az A-T-A-T tetraplex és a G-G-G-A pentad is [1,2, 4–7].



**1. ábra** A G-tetrad és a Hoogsteen-féle hidrogénhíd (H-híd) szerkezete. Alapvető különbség a Watson–Crick-féle H-hidaktól, hogy két guanin között kettő hidrogénkötés valósul meg (nem három, mint citozinnal), és hogy a guanin N7 is részt vesz egy H-kötésben.

Már az 1900-as évek elején észrevették, hogy a guanozin és származékai vízzel viszkózus géleket alkotnak. 1962-ben Gellert röntgenkristallográfiás adatai azt mutatták, hogy a guanozin-5'-monofoszfát-gélekben tetramer elrendeződések tapasztal-

hatók, amelyeket G-kvartetteknek neveztek el. Arnott és Zimmerman egymástól függetlenül a hetvenes években homopoli-guaninokon végzett röntgenvizsgálatokkal fényt derítettek egy négyszálú nukleinsav-szerkezetre, amelyet egymásra illeszkedett G-tetradok tartottak össze [8]. Gray 1974-ben CD-spektroszkópiás módszerrel G-tetradokat azonosított poli-dG-molekulákban [9]. Howard 1977-ben IR spektroszkópiás úton szintén megerősítette a G-tetradok létezését [10]. Guschlbauer 1990-ben több mint hatvan guaninszármazéknál talált hasonló elrendeződéseket [11]. A felsoroltakon kívül számos más laboratórium publikált eredményeket G-kvartettek létezésére vonatkozóan, azonban ezek az adatok mindaddig nem kerültek az érdeklődés középpontjába, ameddig a G-kvadruplexek kialakulásának élettani jelentőségére rá nem mutattak a 90-es évek elején.

## A G-kvadruplexek szerkezete

A Hoogsteen-féle H-híddal (1. ábra) összekapcsolt G-tetrad szerkezete önmagában még nem eléggé stabilis, azonban ha egy másik (vagy akár több) ugyanilyen szerkezet térben egymás fölé/alá kerül, akkor azok egymást (elsősorban  $\pi$ - $\pi$ -kölsönhatások és fémion-koordináció által) tovább képesek stabilizálni. Legáltalánosabban három G-tetrad alkot egy tipikus G-kvadruplex szerkezeti motívumot (2. ábra), amelyhez így legalább négy olyan DNS-láncdarab szükséges, amely (legalább) három guanint tartalmaz közvetlenül egymás után (G-triád). A G-tetradokhoz a guaninokat szolgáltató G-triádok lehetnek ugyanazon a kovalens polinukleotid-láncon, vagy akár több DNS-láncon is. Attól függően, hogy hány láncból áll össze a G-kvadruplex unimolekuláris, dimer és tetramer kvadruplexekről beszélhetünk (2. ábra). Élettani jelentősége elsősorban az unimolekuláris kvadruplexeknek van, hiszen azok egy folyamatos DNS-lánc feltekercződéséből jönnek létre [12–15]. Unimolekuláris és dimer kvadruplexekben laterális, átlós és láncfordító hurkok kapcsolják össze a G-tetradokat,

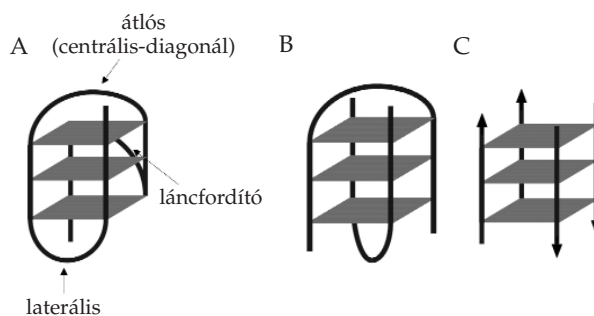


**Ambrus Attila** a KLTE vegyész szakán szerzett diplomát 1996-ban. PhD-tanulmányait a Debreceni Orvostudományi Egyetem Biokémia Intézetében végezte, majd öt évig az Arizonai Egyetemen dolgozott posztdoktorként fehérje- és nukleinsavszerkezet-kutatásban. Jelenleg a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémia Intézetében a Neurobiokémiai Munkacsoportban dolgozik, és szerkezeti biokémiával foglalkozik.

amelyek a G-triádok között a DNS kovalens láncában lévő nukleotidokat tartalmazzák (2. ábra). A lehetséges lánc- és hurokorientációk, illetve a láncok sztöchiometriája alapján a G-kvadruplexek nagymértékű polimorfizmusáról beszélhetünk (2. ábra) [2,4,6]. Szinte minden kvadruplexvariáns esetében eltérő számú és méretű árkok valósulnak meg a DNS-szerkezetben (kis, közepes és nagy árok jöhet létre – ellentétben a B-DNS kétféle árkával), amely hozzájárul a különböző kvadruplexek specifikus felismeréséhez (fehérje- és gyógyszer-kölcsönhatásokban). A hurkokban lévő nukleotidok száma és típusa alapján máris számos törvényszerűséget állítottak fel arra vonatkozóan, hogy egy bizonyos szekvencia milyen valószínűséggel vesz fel különböző típusú kvadruplex szerkezeteket [16,17]. Például ha három egy nukleotidból álló hurok köti össze a három tetradot, akkor szinte bizonyosan parallel (propeller) kvadruplex alakul ki [16]. A huroknukleotidok nagymértékben befolyásolják a kvadruplex stabilitását is (kevesebb huroknukleotid jelentősen nagyobb stabilitást jelent). Elsősorban a hosszabb hurokláncokat tartalmazó szerkezetekre igaz az, hogy azonos hurokhosszak mellett a különböző kvadruplextopológiák között nincs jelentős energiakülönbség, és oldatban akár több konformáció egyszerre is jelen lehet (ezért nem sikerült évekig meghatározni a humán telomer-DNS oldatszerkezetét  $K^+$  jelenlétében) [16]. Az *in vivo* ténylegesen megvalósuló konformációt a szekvenciaszomszédok [12,13] és a specifikus fehérje-kölcsönhatások fogják meghatározni [4].

### Fémionok hatása

A kvadruplexek stabilitása óriási mértékben megnövekszik, ha megfelelő fémionok koordinálódnak a G-tetradok közé, a két tetrad nyolc karboniloxigénje által alkotott koordinációs környezetbe. Mivel sejten belül a  $\sim 140$  mM  $K^+$ -koncentráció határozza meg elsősorban az ionkörnyezetet, ezért a G-kvadruplexek vizsgálata ilyen pufferekben releváns. Általában már jóval a fiziológias  $K^+$ -koncentráció alatt megtörténik a kvadruplexek maximális  $K^+$ -telítése és ezáltal stabilizációja [12,13]. Ez azt mutatja, hogy a G-kvadruplex szerkezet felépülése fiziológiásan is releváns lehet. Különböző egy- és kétértékű fémionok G-kvadruplexeket stabilizáló képessége a következő módon alakul:  $K^+ \gg Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ \gg Li^+$ , illetve  $Sr^{2+} \gg Ba^{2+}$



**2. ábra** G-kvadruplexek polimorfizmusa: unimolekuláris (A), dimer (B) és tetramer (C) kvadruplextopológiák egy-egy példája. Az A szerkezeten a legáltalánosabb hurokformák is láthatóak. Fontos megjegyezni, hogy mindegyik molekularitású kvadruplexnél a példaként bemutatott szerkezeti tulajdonságok/elemek (hurkok, láncirányok) minden racionális geometriai kombinációban előfordulhatnak.

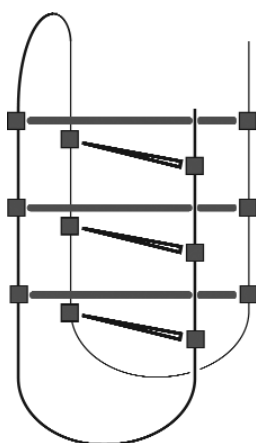
$Ca^{2+} > Mg^{2+}$ . Érdekes, hogy a  $Li^+$  szinte minden G-kvadruplex kialakulását gátolja.

### I-motívum

Azon DNS-régiókban, ahol a dupla szálú DNS szétválik és a guaningazdag szálon G-kvadruplex alakul ki, a komplementer szál citozinban gazdag. Ilyen esetben egy a G-kvadruplexeknél lényegesen instabilabb konformáció alakulhat ki, amit I-motívumnak neveznek [18]. Az I-motívum a hidrogénhidak speciális, interkalációs elrendeződéséről kapta a nevét (3. ábra). Mivel az összetartó erő a citozinok hemiprotonált alakja által kialakított gyenge H-híd, és ez a proton nagymértékű cserében áll az oldószer protonjaival, stabilitása és felépülése is sok esetben kérdéses. Fehérje-kölcsönhatások azonban stabilizálhatják az I-motívumot, ami így génregulációs szerepet is betölthet, akár együttműködve a komplementer szálon kialakuló G-kvadruplexszel, illetve megfelelő speciális fehérjékkel. Az I-motívumban is hasonló molekularitással (láncösszetétellel) és hurokvariánsokkal alakulhatnak ki szerkezetek, mint a kvadruplexek esetén. Az I-motívumban nincs lehetőség erős fémionkoordinációra, ez is hozzájárul a kisebb stabilitáshoz ( $T_m \sim 20^\circ C$ ).

### Biológiai jelentőség

Az utóbbi néhány év kutatásai azt mutatják, hogy a G-kvadruplexeknek valóban van biológiai szerepük, s ez olyannyira igaz, hogy már az eddig megismert információk is alapvetően átforgalmazzák ed-



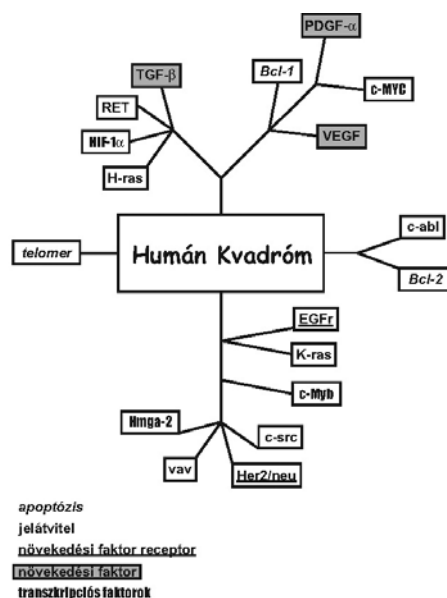
3. ábra Az I-motívum H-híd szerkezete. A H-kötések egymás alatt és felett, keresztezve haladnak (interkaláció). Ez a motívum pirimidinnukleotidokból áll, és nem stabilizálódik fémion-koordinációval, így sokkal kevésbé stabil, mint a G-kvadruplexek.

digi képünket a transzkripció, a génexpresszió és a sejtciklus-szabályozás egyes területein [19–23].

A humán genomban ~370 ezer helyen fordulhat elő potenciálisan G-kvadruplex, és már számos igen figyelemreméltó pozícióban azonosították is a jelenlétét [24–26]. Ez az ún. humán kvadróm, amelynek egyre gazdagabb világában alapvető biológiai folyamatok szabályozásáért felelős DNS/RNS-régiók: promóterek, telomerek, egyéb regulációs helyek [19–23] és DNS/RNS-aptamerek [27] találhatóak (4. ábra). Regulációs célpontjaik között vannak izomspecifikus gének [28], a humán inzulingén [29], immunglobulinok váltórégiói [30], protoonkogének – transzkripciós faktorok, növekedési faktorok és receptoraik, szignáltranszdukciós és apoptózisfehérjék génjei (4. ábra) –, a  $\beta$ -globin-génje [31] és a Fragile X-szindróma FMR1 génje [32]. Kvadruplexet tartalmazó aptamerekre példa a HIV-1 integrázt gátló aptamer [33] és a trombin-kötő aptamer [34]. Más fajokban hasonló funkciókat betöltve, többször más szekvenciákkal szintén megjelennek kvadruplex szerkezetek [24,26].

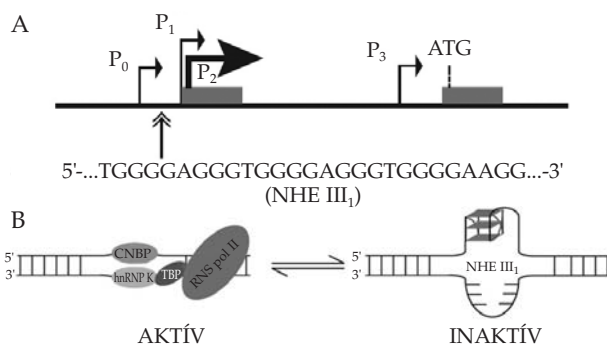
**c-MYC G-kvadruplex**

Az eddig legrészletesebben vizsgált rendszer a c-MYC protoonkogén promóterében található ún. csendesítő elem (5B. ábra), amely egy nem várt stabilitású G-kvadruplexből ( $T_m > 95^\circ\text{C}$ ) és a megfelelő I-motívumból épül fel; épp e szerkezet megbomlásának tulajdonítják a c-MYC fehérje kontrollálatlan kifejeződését malignus elváltozásokban [13,20]. A c-MYC fehérje a karcinómák egy igen széles



4. ábra A humán (onkogén) kvadróm. Az ábra a kvadruplexeket különböző szerkezeti típusaikkal, míg a géntermékeket funkciójuk szerint csoportosítja.

spektrumában túltermelődik, és az általa – mint transzkripciós represszor és aktivátor által direkt vagy indirekt módon – szabályozott nagyszámú (~1600) gén deregulációja közvetlenül hozzájárul a szomatikus sejtek normál ciklusának felbomlásához [20]. Számos eredmény mutat egyértelmű kapcsolatot a c-MYC onkogén és a karcinogenezis között [20]. A c-MYC transzkripció 80–90%-át a promóterében található ún. nukleáz-hiperszenzitív elem (NHE III<sub>1</sub>) szabályozza (5A. ábra). A 27 bázisból álló szekvenciában bizonyítottan egy parallel szerkezetű G-kvadruplex alakul ki (6. ábra) [13,20].

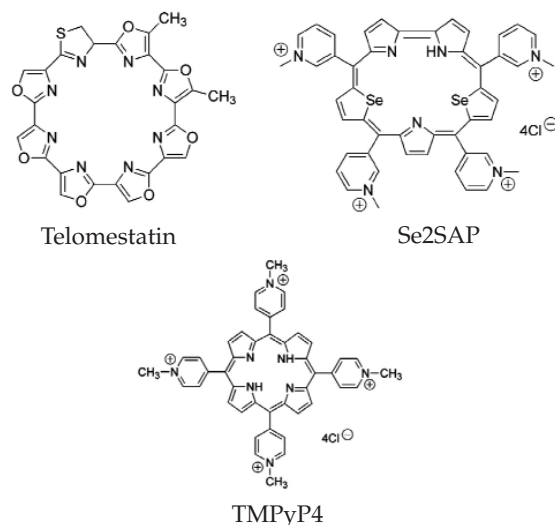


5. ábra A c-MYC gén promóterszerkezete (A), illetve a NHE III<sub>1</sub>-ben kialakuló ún. csendesítő elem működése (B). A guanin-gazdag régióban felépülő G-kvadruplex (és I-motívum) a transzkripciós egység kikapcsolt állapotát eredményezi. A csendesítő elem planáris kismolekulákkal stabilizálható, ami a transzkripciós hatékonyság csökkenését eredményezi.

**6. ábra** (lásd a címlapon) A *c*-MYC kvadruplex oldatbeli (NMR) szerkezete. Látható a síkok között stabilan koordinálódó két  $K^+$ -ion (zöld gömbök), a felső és alsó tetradokat stabilizáló 5' és 3' irányban túlnyúló szekvenciák orientációja, valamint a huroknukleotidok (guanin: sárga, adenin: vörös, timin: kék) helyzete. A megegyező szerkezet kimagaslóan stabil, és még 95 °C hőmérsékleten sem oldható fel. (Engedélyezett újraközlés / Reprinted with permission from [13]. Copyright (2005) American Chemical Society.)

Kvadruplexek és potenciálisan általuk szabályozott transzkripció rendszer vizsgálatára bevált kvadruplexkötő molekulák használatosak (7. ábra). Ezek általában planáris, policiklusos alapszerkezetűek, és stabilizálni képesek ezt a motívumot, elsősorban a felső és alsó tetradokhoz való kötődés által (már léteznek G-kvadruplexre szelektív, erősen kötődő és kevésbé citotoxikus vegyületek:  $EC_{50} \sim \text{szub-}\mu\text{M/nM}$ ,  $IC_{50} > 20\text{--}100 \mu\text{M}$ ) [35]. Több stabilizáló ágens szelektálni is képes bizonyos kvadruplex konformációk között, illetve némelyik konvertálni is képes azokat egy másik típusba, ha a komplex úgy stabilabb. A *c*-MYC kvadruplex is stabilizálható ilyen ágensekkel; TMPyP4-kezelés a *c*-MYC-expresszió jelentős csökkenésével jár MIA PaCa-2 és HELA S<sub>3</sub> sejtekben [20]. A TMPyP4 egérmodellekben csökkenti a tumornövekedés sebességét, és meghosszabbítja az élettartamot [20]. DNS-*chip*-technikával kimutatható, hogy a TMPyP4 sok más gén regulációjára is hat (pozitív vagy negatív irányban), valószínűleg más kvadruplex régiókkal való kölcsönhatásokon keresztül [20]. A *c*-MYC esetében részletes vizsgálatok egyértelműen igazolták, hogy a *c*-MYC-expressziót csökkentő és *in vitro* G-kvadruplex-specifitással rendelkező molekulák az NHE III<sub>1</sub> elemében kialakuló kvadruplexszel való interakción keresztül hatnak [20]. Az eredetileg a *c*-MYC kvadruplex stabilizálására szerkezeti alapon megalkotott egyik kismolekula-gyógyszer jelenleg az Egyesült Államokban a klinikai első fázisban kipróbálás alatt van [36].

Mivel az emelkedett *c*-MYC-szint pozitívan szabályozza a telomeráz enzim (hTERT) expresszióját is, ezért az immortalis sejtek telomerázaktivitása is csökken TMPyP4 hatására [23]. Érdekes, hogy a telomeráz (amely reverz transzkriptáz enzim) szubsztrátja az egyszálú telomer DNS (egy repetitív (TTAGGG)<sub>n</sub> szekvencia emlősökben), amelyben szintén felépülhet (stabilizálódhat) egy kvadruplex, meggátolva ezzel a telomeráz működését [21–23]. A *c*-MYC kvadruplex mellett a humán



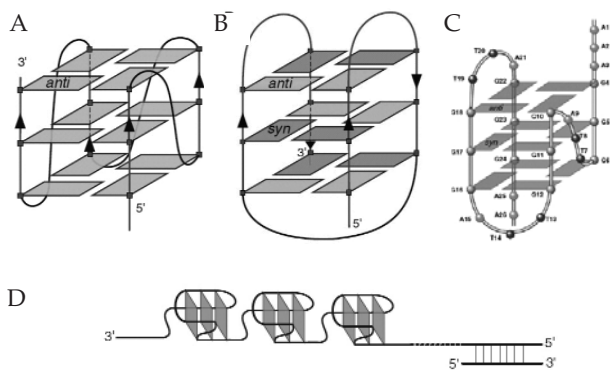
**7. ábra** G-kvadruplex-interaktív kismolekulák szerkezete. A telomestatin egy természetes metabolit (*Streptomyces anulatus*), ami kimagaslóan erősen kötődik néhány G-kvadruplexhez (és feltekeredésüket is képes indukálni), valamint hatékony telomerázgátló. A TMPyP4 és a Se2SAP szintetikus molekulák, és szintén nagy affinitással kötődnek bizonyos kvadruplexekhez; a Se2SAP képes kvadruplex szerkezeteket konvertálni egymásba, míg a TMPyP4 *in vivo* is hatékony antitumorogén hatással rendelkezik.

telomer G-kvadruplex szerkezetének kutatása juttott annyira előrehaladott állapotba, hogy gyógyszertervezésről lehessen beszélni [12,15] (habár a bcl-2 [14,37] és a HIF-1 $\alpha$  [38] promotóereket reguláló kvadruplexek részletes analízise is elkezdődött).

## A humán telomer G-kvadruplex

A kromoszómák vége egy 5–8 kb hosszúságú, nem kódoló szakasz, amely egy 100–200 nukleotidnyi egyszálú DNS-ben végződik a 3' végen (a láncvégi RNS-indító kivágása utáni be nem pótlódás miatt a DNS replikációjánál) [21]. Ez a speciális DNS-szakasz számos fehérjével áll kölcsönhatásban [39], amelyek megvédik attól, hogy hibás DNS-ként lebontásra kerüljön, illetve hogy a kromoszómák ne fuzionáljanak általuk, mert az mitotikus törésekhez és apoptózishoz vezetne. Ilyen duplaszálú-DNS-kötő fehérje például a TRF1 és TRF2, míg egyszálú-DNS-kötő fehérje például a hPot1 [21]. A telomer DNS-lánc szomatikus sejtekben minden sejtosztódáskor ~50–200 bázispárral megrövidül, és egy kritikus számú osztódás és telomerrövidülés után a sejt apoptózissal elhal. A telomeráz enzim aktivitása szinte minden neoplastikus elváltozásnál jelen van, biztosítva a telomervegek állandó meghosszabbítását és így a sejtek immortalitását

(néhány sejt alternatív módon, a telomeráz nélkül is képes meghosszabbítani a telomervégeket). Az enzim nem működik, ha kvadruplexstabilizáló ágensek vannak jelen [21,23]. Az a telomeralapú gyógyszer, amely kizárólag a telomeráz enzimet gátolja, nem lenne kellően hatékony, ezért olyan molekulákat keresnek, amelyek a telomerek – mint kiterjedt DNS-fehérje-komplexek – integritását bontják meg, és rövid idő alatt apoptózisra kényszerítik a sejtet. Több ilyen kvadruplexspecifikus molekulát is találtak, és hatásukat annak tulajdonítják, hogy ezek a molekulák a duplaszálú, egyszálú és kvadruplex DNS-ek közötti egyensúlyi folyamatok befolyásolásán keresztül a telomer szerkezet mint egész instabilitását okozzák [23]. Ezzel egybevágó kísérleti eredmény, hogy TMPyP4 hatására rövid idő alatt kromozómafúzióra jellemző anafázisú hidak jelennek meg [23]. Bizonyos periléntípusú vegyületek a G-kvadruplexeket feloldani képes helikázok aktivitását is megakadályozzák, ezáltal valószínűleg a telomerázfüggetlen (ALT) mechanizmusú telomermeghosszabbítást is gátolva [23].



**8. ábra** A humán telomer G-kvadruplex DNS szerkezete  $K^+$  jelenlétében röntgen-kristallográfiás (A),  $Na^+$  jelenlétében oldatban NMR spektroszkópiás (B) és a meghosszabbított és stabilizált lánc mérésével  $K^+$  jelenlétében oldatban NMR spektroszkópiás (C) módszerrel meghatározva. A  $Na^+$ -ionos szerkezet ún. kosár típusú kvadruplex, amely oldatban  $K^+$  hatására két konformáció keverékévé alakul. A  $K^+$ -ionos kristályszerkezet párhuzamos láncú, ún. propeller típusú kvadruplex, és bizonyítottan nem reprezentálja az oldatbeli viszonyokat. A  $K^+$ -ionos NMR-szerkezet ún. hibrid típusú kvadruplex, és egyéb technikákkal a humán telomerre kapott eredményekkel összhangban írja le a humán telomer DNS szerkezetét. A telomer 3' végén (D) lévő egyszálú  $(TTAGGG)_n$ -szekvenciák egymást stabilizáló G-kvadruplexekbe csavarodnak fel, és gátolják a telomeráz enzim működését. A kvadruplex szerkezetek stabilizálása kismolekula-gyógyszerekkel daganatos elváltozásokban a telomervegek rövidülését, telomerinstabilitást és apoptózist okoz.

A  $K^+$  jelenlétében megvalósuló humán telomer G-kvadruplex szerkezet (8C. ábra) 2006-ig nem állt rendelkezésre [12], így az eddig kipróbált gyógyszermolekulák csak részleges sikereket könyvelhettek el [21,40]. A  $Na^+$  jelenlétében megoldott oldat szerkezet (8B. ábra) [41] 1993, míg a  $K^+$ -oldatból kristályosított kvadruplex szerkezete [42] 2002 óta ismert. Ez a két szerkezet alapvetően eltér, és független mérések azt bizonyították, hogy egyik szerkezet sem felel meg a  $K^+$ -oldatban ténylegesen jelen lévő konformációnak [43]. A fiziológiásan releváns szerkezet meghatározása az eredetileg vizsgált alapszekvencia kiterjesztése (stabilizálása) által vált lehetségessé. Ez a megközelítés a natív telomerben egymást stabilizáló kvadruplexek közötti molekuláris kölcsönhatásokat próbálta utánozni (8D. ábra). A megfejtett topológia a G-kvadruplexek családjában eddig nem ismert szerkezetet mutat (8C. ábra), amely lehetőséget teremt a szerkezet alapú gyógyszertervezésre, illetve hogy kezdetleges képet alkothassunk az emlőstelomerek DNS-komponensének kiterjedtebb térbeli szerkezetéről (8D. ábra) [12].

## Összefoglalás

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a DNS-kvadruplexek olyan regulációs szerkezeti elemek, amelyek a DNS térbeli szerkezetén keresztül modulálnak bizonyos biológiailag fontos és központi transzkripció mechanizmusokat és enzimaktivitásokat. Ez a DNS-struktúra érzékeny a DNS szekvenciájára (mutációjára), stabilizáló kismolekulákra és fehérje-kölcsönhatásokra. Az esetlegesen jelen lévő endogén kvadruplexstabilizáló kis- és makromolekulák feltérképezése szükséges lépés lesz a kapcsolódó szabályozások teljes megértéséhez. A gyakran szokatlan báziskapcsolatokkal megvalósuló nem reguláris DNS/RNS-konformációk léte és biológiai szerepe példa arra, hogy a természet akár négy (vagy még kevesebb) nukleotid felhasználásával is hányféle értelmes és funkcióval rendelkező szerkezetet volt képes létrehozni. Az a nézet is kezd erősödni, hogy a guanin speciális tulajdonságai tehetők potenciálisan lehetővé az RNS-alapú világnak DNS-alapúra való konverzióját [4,6].

A guaninszármazékok nagymértékű asszociációs/polimerizációs készsége a tudomány és technika más területeit sem hagyta érintetlenül. Többek között szintetikus ionspecifikus membrán-ion-

csatornákat [44], 100 nm méret nagyságrendű nanocsöveket (nanotechnológia) [45], folyadékkristályokat [46], biomolekuláris (tranzisztor jellegű) elektronikát [47] és más szupramolekuláris szerkezeteket [48] készítenek guaninalapú módosított anyagokból.

## Irodalomjegyzék

- [1] Ghosh, A., Bansal, M. (2003) *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.*, **59**: 620–626.
- [2] Phan, A. T., Kuryavyi, V., Patel, D. J. (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**: 288–298.
- [3] Lee, J. S., Johnson, D. A., Morgan, A. R. (1979) *Nucleic Acids Res.*, **6**: 3073–3091.
- [4] Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., Neidle, S. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**: 5402–5415.
- [5] Davis, J. T. (2004) *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **43**: 668–698.
- [6] Simonsson, T. (2001) *Biol. Chem.*, **382**: 621–628.
- [7] Suhnel, J. (2001) *Biopolymers*, **61**: 32–51.
- [8] Poler, J. C., Zimmermann, R. M., Cox, E. C. (1995) *Langmuir*, **11**: 2689–2695.
- [9] Gray, D. M., Ratliff, R. L. (1977) *Biopolymers*, **16**: 1331–1342.
- [10] Howard, F. B., Frazier, J., Miles, H. T. (1977) *Biopolymers*, **16**: 791–809.
- [11] Guschlbauer, W., Chantot, J. F., Thiele, D. (1990) *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **8**: 491–511.
- [12] Ambrus, A., Chen, D., Dai, J. X., Bialis, T., Jones, R. A., Yang, D. Z. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**: 2723–2735.
- [13] Ambrus, A., Chen, D., Dai, J. X., Jones, R. A., Yang, D. Z. (2005) *Biochemistry*, **44**: 2048–2058.
- [14] Dai, J. X., Chen, D., Jones, R. A., Hurley, L. H., Yang, D. Z. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**: 5133–5144.
- [15] Phan, A. T., Luu, K. N., Patel, D. J. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**: 5715–5719.
- [16] Hazel, P., Huppert, J., Balasubramanian, S., Neidle, S. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**: 16405–16415.
- [17] Hazel, P., Parkinson, G. N., Neidle, S. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**: 2117–2127.
- [18] Phan, A. T., Mergny, J. L. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**: 4618–4625.
- [19] Hurley, L. H. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 188–200.
- [20] Hurley, L. H., Von Hoff, D. D., Siddiqui-Jain, A., Yang, D. Z. (2006) *Semin. Oncol.*, **33**: 498–512.
- [21] Neidle, S., Parkinson, G. (2002) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**: 383–393.
- [22] Neidle, S., Read, M. A. (2000) *Biopolymers*, **56**: 195–208.
- [23] Rezler, E. M., Bearss, D. J., Hurley, L. H. (2003) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**: 359–379.
- [24] Huppert, J. L., Balasubramanian, S. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**: 2908–2916.
- [25] Maizels, N. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**: 1055–1059.
- [26] Todd, A. K., Johnston, M., Neidle, S. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**: 2901–2907.
- [27] Darnell, J. C., Warren, S. T., Darnell, R. B. (2004) *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.*, **10**: 49–52.
- [28] Yafe, A., Etzioni, S., Weisman-Shomer, P., Fry, M. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**: 2887–2900.
- [29] Catasti, P., Chen, X., Moyzis, R. K., Bradbury, E. M., Gupta, G. (1996) *J. Mol. Biol.*, **264**: 534–545.
- [30] Sen, D., Gilbert, W. (1988) *Nature*, **334**: 364–366.
- [31] Antoniou, M., Deboer, E., Habets, G., Grosveld, F. (1988) *EMBO J.*, **7**: 377–384.
- [32] Weisman-Shomer, P., Cohen, E., Hershko, I., Khateb, S., Wolfovitz-Barchad, O., Hurley, L. H., Fry, M. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**: 3963–3970.
- [33] Phan, A. T., Kuryavyi, V., Ma, J. B., Faure, A., Andreola, M. L., Patel, D. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**: 634–639.
- [34] Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A., Feigon, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**: 3745–3749.
- [35] Hurley, L. H., Siddiqui-Jain, A. (2005) *Genet. Eng. News*, **25**: 26.
- [36] Lim, J. K. C., Rice, W. G., Schwaeb, M. K., Siddiqui-Jain, A., Trent, K. B., Whitten, P., Hurley, L. H., von Hoff, D. D. (2005) *J. Clin. Oncol.*, **23**: 2425.
- [37] Dai, J. X., Dexheimer, T. S., Chen, D., Carver, M., Ambrus, A., Jones, R. A., Yang, D. Z. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**: 1096–1098.
- [38] De Armond, R., Wood, S., Sun, D. Y., Hurley, L. H., Ebbinghaus, S. W. (2005) *Biochemistry*, **44**: 16341–16350.
- [39] Mattern, K. A., Swiggers, S. J. J., Nigg, A. L., Lowenberg, B., Houtsmuller, A. B., Zijlmans, J. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**: 5587–5594.
- [40] Neidle, S., Thurston, D. E. (2005) *Nat. Rev. Cancer*, **5**: 285–296.
- [41] Wang, Y., Patel, D. J. (1993) *Structure*, **1**: 263–282.
- [42] Parkinson, G. N., Lee, M. P. H., Neidle, S. (2002) *Nature*, **417**: 876–880.
- [43] Li, J., Correia, J. J., Wang, L., Trent, J. O., Chaires, J. B. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**: 4649–4659.
- [44] Davis, J. T., Spada, G. P. (2007) *Chem. Soc. Rev.*, **36**: 296–313.
- [45] Kotlyar, A. B., Borovok, N., Molotsky, T., Cohen, H., Shapir, E., Porath, D. (2005) *Adv. Mater.*, **17**: 1901–1905.
- [46] Pieraccini, S., Giorgi, T., Gottarelli, G., Masiero, S., Spada, G. P. (2003) *Mol. Cryst. Liquid Cryst.*, **398**: 57–73.
- [47] Maruccio, G., Visconti, P., Arima, V., D'Amico, S., Blasco, A., D'Amone, E., Cingolani, R., Rinaldi, R., Masiero, S., Giorgi, T., Gottarelli, G. (2003) *Nano Lett.*, **3**: 479–483.
- [48] Jurga-Nowak, H., Banachowicz, E., Dobek, A., Patkowski, A. (2004) *J. Phys. Chem. B*, **108**: 2744–2750.

## ÁLLÁSHIRDETÉS

### A Pannon Egyetem (Veszprém) Interdiszciplináris Műszaki és Természettudományok Doktori Iskolája

várja a molekuláris biológia, sejtbiológia vagy biotechnológia területén jártassággal rendelkező **doktoranduszok** jelentkezését az alábbi témákban:

- mesterséges fehérjereceptorok létrehozása irányított evolúcióval,
  - funkcionális nanorészecskék előállítása,
- biokatalizátorok és fermentációs technológiák fejlesztése.



Jelentkezés önéletrajzzal és publikációs listával  
 Dr. Vonderviszt Ferenc doktoriiskola-vezetőnél  
 (E-mail: von007@almos.vein.hu) 2007. május 15-ig.



# Dendrimeralapú nanogyógyászat: nanoeszközök szintézise, jellemzése és biológiai vizsgálata

## Dendrimer-based nanomedicine: engineered nanodevice synthesis, characterization, and biological testing

István J. Majoros, Thommey P. Thomas, Kimberly A. Candido, Mohammad T. Islam, Scott Woehler, Chandan B. Mehta, Alina Kotlyar, Zhengyi Cao, Jolanta F. Kukowska-Latallo and James R. Baker, Jr.

Michigan Nanotechnology Institute for Medicine and Biological Sciences, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109-0533, USA,  
E-mail: majoros@umich.edu

Majoros, I. J., Thommey, T. P., Candido, K. A., Islam, M. T., Woehler, S., Mehta, C. B., Kotlyar, A., Cao, Z., Kukowska-Latallo, J. F., Baker, J. R., Jr.

Michigan Nanotechnology Institute for Medicine and Biological Sciences, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109-0533, USA,  
E-mail: majoros@umich.edu

### Összefoglalás

Ez a cikk a legújabb eredményeket foglalja össze, amit a Michigani Egyetem Orvosi és Biológiai Tudományok Nanotechnológiai Intézete ért el a dendrimeralapú nanomedicina területén. Ötödik generációs (G5) poli-amido-amin (PAMAM) dendrimeralapú, gyógyszerhatóanyagok célzott bevitelét biztosító makromolekula tervezését, szintézisét, jellemzését és biológiai bevizsgálását (*in vitro* és *in vivo* teszteredményeit) ismerteti.

### Summary

This paper provides an update and summary of the advancements made in dendrimer-based nanomedicine by the Michigan Nanotechnology Institute for Medicine and Biological Sciences. A description of improvements in design, synthetic workup, and characterization of targeted drug delivery systems is given. Summarized findings of preliminary *in vitro* and *in vivo* biological testing of devices utilizing methotrexate (MTX) are also presented.

Progress within the field of dendrimer-based nanomedicine has advanced rapidly over the past decade. The multifunctionality of these star-shaped dendron-arm macromolecules allows for a variety of diverse usages including drug delivery, gene therapy, protein-receptors, catalysts, and imaging. While an array of dendritic macromolecules continue to be studied for use as carriers for an assortment of drugs, targeting moieties, and imaging units [1–4]. The poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer has proven to be one of the most successful carriers for delivery of multiple agents within the body. These carriers may be utilized for both non-specific drug delivery, and controlled, targeted drug delivery. The nano-scale proportions of these dendrimers mimic those of biomolecules within the body, allowing for increased biocompatibility. The characteristic non-toxicity and high biocompatibility of this dendrimer makes it an optimal choice for use as a carrier for targeted, controlled delivery of chemothera-

peutic drugs within the human body. Molecular engineering affords us the capability of synthesizing complex yet *well-defined* devices, which is a key principle of targeted drug delivery technology and dendrimer-based nanomedicine [1].

Synthesis of targeted, controlled delivery devices requires partial acetylation to neutralize a large fraction of the dendrimer surface, thereby preventing non-specific interactions during drug delivery and increasing solubility in reaction of dye conjugation. The remaining non-acetylated primary amino groups on the dendrimer surface may then be utilized for the conjugation of various functional molecules [5,6]. The characteristic multi-valency of the PAMAM dendrimer also serves to facilitate the addition of functional molecules. In our studies, the functional molecule folic acid (FA) was attached to the dendrimer for site-specific targeting of the membrane-associated folate receptors (folate bind-

ing proteins), over-expressed in many types of cancer cells. Fluorescein isothiocyanate (FITC) was utilized as the imaging unit for each device, and the chemotherapeutic drug MTX was additionally conjugated to induce cellular cytotoxicity. MTX prevents cell proliferation and induces cytotoxicity through a variety of mechanisms primarily by inhibiting the enzyme dihydrofolate reductase (DHR), which decreases the number of reduced folates available for biosynthesis of nucleic and amino acids. Ester bonds, as opposed to amide bonds (previously utilized by Fréchet and colleagues as a drug-carrier linker) were used for drug conjugation. Detailed device syntheses have been previously published [5].

### Dendrimer Synthesis

PAMAM dendrimers are synthesized from an initiator ethylenediamine (EDA) core with four dendron arms radiating from it. Michael addition of methyl acrylate (MA) and condensation (amidation) reactions of the resulting methyl ester with large excesses of EDA produce each full generation. Repetition of this reaction sequence generates a highly branched macromolecule terminated in primary amino groups which may be activated for attachment of a variety of functional molecules (imaging, targeting, drug, sensors). The intrinsic repetition of synthetic steps has made it possible to derive mathematical equations for the precise description of dendrimer theoretical structure [7].

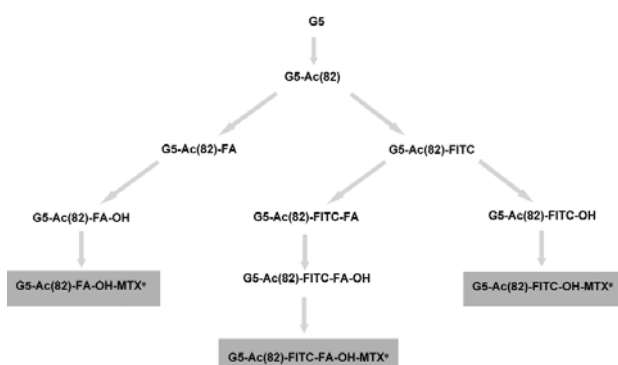
Each successive reaction sequence theoretically doubles the number of primary amino groups present in each generation. Non-specific drug delivery relies on the primary (surface) and tertiary (interior) amino groups of the dendrimer and their responsiveness to changes in pH. Drug release by non-specifically targeted PAMAM dendrimers is triggered by low pH [6,8,9].

The prepared G5 PAMAM dendrimer (detailed synthesis described elsewhere) was partially acetylated in order to neutralize the dendrimer surface, increase solubility in reaction of dye conjugation, and prevent non-specific targeting interactions [5,6]. Theoretically, the G5 PAMAM dendrimer has 128 primary and 126 tertiary amine groups. These values can be determined through the use of mathematical models. Potentiometric titration was used to establish the number of primary amines (110) on the G5 PAMAM dendrimer surface, so that a stoichiometric relationship between the number of primary amines and acetic anhydride (Ac) (used to cap a fraction of the surface amines) could be determined [6]. A ratio between dendrimer and acetic anhydride was established such that acetylation of approximately 82 primary amines was achieved. The remaining primary amines were utilized for the conjugation of various combinations of the functional molecules: FA, the targeting molecule, FITC, the imaging molecule, and MTX, a chemotherapeutic drug. A reaction scheme for synthesis of dendritic devices is given in *Figure 1*. Attachment of either FA or FITC occurs prior to

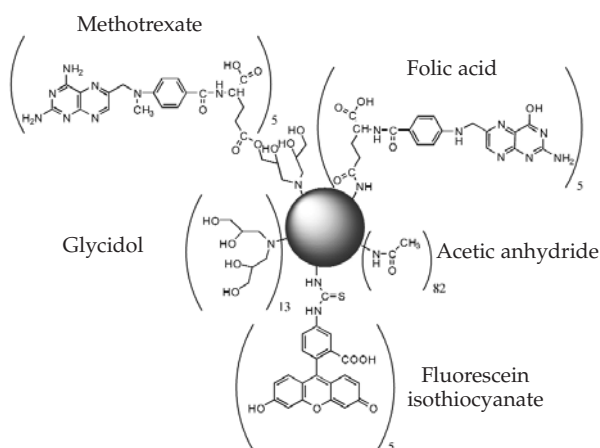


**István J. Majoros** received his M.S. in Chemical Engineering in 1971. He earned his PhD degree Summa Cum Laude in 1979, which focused on Organic/Polymer Chemistry. He subsequently built up extensive research experience in industry and as a faculty member of the Kossuth Lajos University in Debrecen, Hungary. From 1990 to 1998 he was a Visiting Professor of Polymer Science at the University of Akron, Ohio, where he synthesized highly ordered polymer structures and worked on the characterization of multi-arm star polymers. He joined the Center for Biologic Nanotechnology in 1998 as a Research Associate II

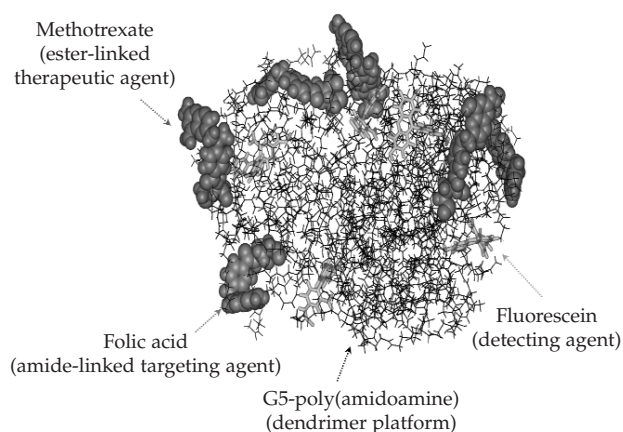
and has worked steadily on the design, synthesis and characterization of novel hybrid dendritic macromolecules. In 2001 he was appointed a Research Investigator in the Division of Allergy, Department of Medicine, and the Center for Biologic Nanotechnology, and has set up a unique and flexible HPLC-GPC system with UV, RI, and MALLS detectors. He published twenty-three peer-reviewed papers on macromolecular structures, polymer synthesis and purification, recently co-authored a book chapter on dendrimers and supramolecular polymer structures, and has been awarded fourteen patents worldwide and submitted four US patents. He has extensive experience in conceptualizing new molecular designs, conducting multi-step syntheses, designing technologies, and managing plants with production scales of up to 150 tons per day. He has trained and supervised BS, MS and PhD level student chemists, chemical engineers, and technicians. (On the picture you can see I. J. Majoros – *right*, and J. R. Baker, Jr. – *left*).



**Figure 1** Scheme for synthesis of dendritic devices utilizing MTX as the chemotherapeutic drug. Superscript *e* signifies conjugation through an ester bond. Final products:  $G5-Ac(82)-FA-OH-MTX^e$ , will serve as a candidate device for *in vitro*, *in vivo* studies and clinical trials;  $G5-Ac(82)-FITC-OH-MTX^e$ , served as a control device for *in vitro* and *in vivo* studies,  $G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX^e$  served as an experimental device for *in vitro* and *in vivo* studies.



**Figure 2** Chemical structure of the trifunctional nanodevice,  $G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX^e$ .



**Figure 3** 3D computer model of the trifunctional nanodevice.

conjugation of MTX. The structure of the resultant dendritic devices is depicted in *Figures 2* and *3*.

#### $G5-Ac(82)-FA-OH$

Conjugation of FA to the partially acetylated dendrimer produced the monofunctional device  $G5-Ac(82)-FA$ . FA was attached in two consecutive steps. Conjugation was carried out *via* the  $\gamma$ -carboxyl group of FA and the primary amino groups of the dendrimer. First, FA-active ester was synthesized through reaction of FA with 14-fold excess of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimide (EDC) active ester forming agent, in a mixture of DMF and DMSO at room temperature. This solution was then added dropwise to an aqueous solution of the partially acetylated G5 dendrimer dissolved in DI water. Addition of glycidol to the purified monofunctional device produced the hydroxy functionalized  $G5-Ac(82)-FA-OH$  necessary for conjugation of drug *via* an ester bond.

#### $G5-Ac(82)-FITC-OH$ and $G5-Ac(82)-FITC-FA-OH$

After reaction of FITC with the partially acetylated dendrimer and intensive purification,  $G5-Ac(82)-FITC$  was produced. The formed thiourea bond was stable during investigation of the devices. Additionally, the bifunctional device  $G5-Ac(82)-FITC-FA$  was formed after the attachment of FA to the monofunctional device. After conjugation of FITC and FA, the dendrimer was fully acetylated again as needed for use as a control device for *in vitro* cytotoxicity study, following the reaction sequence described previously [8]. In another reaction pathway the partially acetylated  $G5-Ac(82)-FITC$  and  $G5-Ac(82)-FITC-FA$  were glycidolated to form the monofunctional device  $G5-Ac(82)-FITC-OH$ , and the bifunctional device  $G5-Ac(82)-FITC-FA-OH$ , converting the remaining primary amino groups to alcohol groups. The conjugation of glycidol to the partially acetylated devices was a necessary precursory step to attaching MTX *via* an ester linkage, eliminating the remaining  $NH_2$  to avoid any unwanted nonspecific targeting within the biological system.

#### $G5-Ac(82)-FA-OH-MTX^e$ , $G5-Ac(82)-FITC-OH-MTX^e$ and $G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX^e$

MTX has been attached to the glycidolated monofunctionalized devices  $G5-Ac(82)-FA-OH-MTX^e$  and

G5-Ac(82)-FITC-OH-MTX<sup>e</sup>, and the bifunctional device G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> through ester bonds. MTX was conjugated utilizing an ester linkage, as a test for improved cleavage as compared to MTX conjugation to the dendrimer *via* an amide linkage. The MTX is attached by use of EDC chemistry as previously described for conjugation of MTX to the acetylated bifunctional dendritic device with an amide link [5].

### Characterization of dendrimers

GPC analysis has determined the number of conjugated FITC, FA, glycidol and MTX to be: FITC: 5.8, FA: 5.7, OH: 28–30, and MTX<sup>e</sup>: 5–6. The number of conjugated molecules determined by GPC was slightly higher than assumed; most probably due to the effect of citric acid in the eluent, which has varying effects dependent on the device in question. The numbers of conjugated molecules determined by GPC have been used in combination with values obtained through analysis of NMR and UV spectra to precisely determine the number of each functional molecule attached to the dendrimer [5].

The UV spectra for free FA, MTX and FITC and that of G5-Ac(82), mono-, bi- and trifunctional dendritic devices indicated proper coupling in the dendritic substance. The defining peaks for FA appear at precisely 281 nm and 349 nm; for MTX at 258 nm, 304 nm and 374 nm; and for FITC at 493 nm. The distinguishing peaks in dendritic devices visible for FA, FITC and MTX are dependent on the conjugation of each molecule to the dendrimer. The additive properties of UV spectra (described elsewhere) allowed for comparison of the spectra of free material to dendrimer-conjugated material in order to establish whether or not the functional molecule(s) in question had been attached to the dendrimer. G5-Ac(82), the carrier dendrimer demonstrates no characteristic peaks above 300 nm. Conjugation of FITC to the carrier forms the monofunctional device G5-Ac(82)-FITC. The characteristic peak of free FITC (493 nm) is shifted to 500 nm upon conjugation to the carrier dendrimer. Building upon this same principle, the attachment of FA, to form the bifunctional device G5-Ac(82)-FITC-FA, shifts the peak from 349 nm for free FA to approximately 358 nm for conjugated FA. The location of the other peak characteristic of free FA, 281 nm, remains

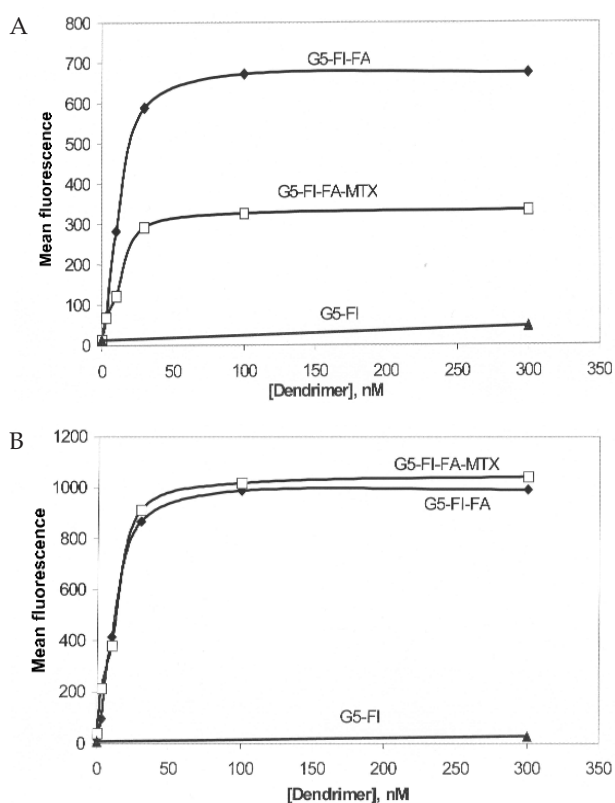
unchanged in the conjugated device, and the peak for conjugated FITC in spectrum B is shifted to 502 nm. The trifunctional device G5-Ac(82)-FITC-FA-MTX<sup>e</sup> also has slightly shifted peaks. Peaks for conjugated MTX appear at 262 nm and 304 nm, peaks representing a combination of the conjugated MTX and FA converge at 372 nm, and a peak occurs at 505 nm for conjugated FITC. UV spectroscopy permits identification of what has been attached to the dendritic carrier through comparison of the characteristic absorption peaks of each functional group and the carrier after conjugation has occurred. UV spectroscopy also allows us to determine how the wavelength at which maximum absorption occurs for each attached function is affected by its conjugation to the dendrimer.

Comprehensive high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed on PAMAM dendrimer-based multifunctional devices. Methods were developed for detection and separation of various surface functionalized dendrimer conjugates and small molecules (FITC, FA, and MTX) using a common gradient [10]. Additionally, <sup>1</sup>H NMR, size exclusion chromatography (SEC), and capillary electrophoresis (CE) was extensively utilized to determine the structures, molecular weight, molecular weight distribution, and molecular heterogeneity of each intermediary and final products [6,11,12].

### Applications

#### *In vitro studies*

The cellular uptake and cytotoxicity of an engineered multifunctional dendritic nanodevice containing FA as the targeting molecule, MTX as the chemotherapeutic drug, and FITC as the detecting agent was studied *in vitro* [13]. FITC and FA were conjugated to the G5 PAMAM dendrimer through amide linkage and MTX through ester linkage to generate the trifunctional dendrimer G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup>. This trifunctional dendrimer-drug conjugate bound to FA receptor-expressing KB cells in a dose-dependent and saturable manner. Confocal microscopic analysis demonstrated cellular internalization of the conjugate. G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> induced a time- and dose-dependent inhibition of cell growth in KB cells. The targeted dendrimer-conjugates G5-Ac(82)-FITC-



**Figure 4** Dose-dependent binding of G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> in KB cells. The cells were maintained under FA-free medium and incubated with different concentrations of the indicated dendrimers for 1 hour. The cells were then rinsed and resuspended in PBS and the fluorescence was measured in a flow cytometer (panel A). In panel B, the mean cell fluorescence after normalized for the fluorescence of standard solutions of the dendrimers is presented.

FA-OH-MTX<sup>e</sup> and G5-Ac(82)-FA-OH-MTX<sup>e</sup> inhibited cell growth in KB cells, whereas the non-targeted G5-Ac(82)-FITC-MTX failed to induce growth inhibition. These studies show the potential of G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> or G5-Ac(82)-FA-OH-MTX<sup>e</sup> for targeting and growth suppression of tumor cells which over express FA-receptors. The devices are effective in the specific targeting and killing of tumor cells that over express the FA-receptor.

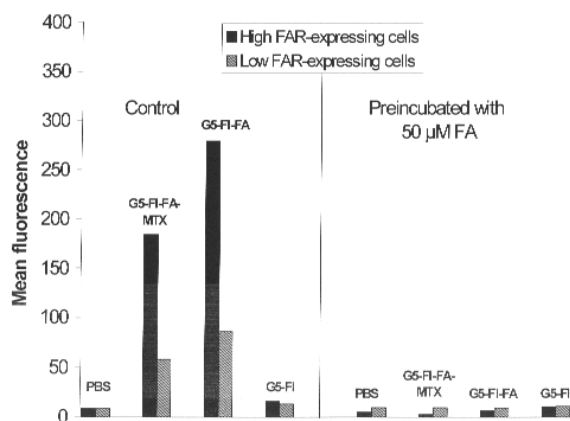
#### Cellular uptake of the dendrimer-drug conjugates

The cellular uptake of the dendrimers was measured in KB cells which express a high cell surface FA-receptor (FAR) [14]. The FA-conjugated dendrimers bound to the cells in a dose-dependent fashion, with 50% binding at 10–15 nM for both the G5-Ac(82)-FITC-FA and G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup>, while the control dendrimer G5-Ac(82)-FITC

was not detected in the KB cells (Figure 4A). Identical binding curves were obtained for the G5-Ac(82)-FITC-FA and G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> when the fluorescence obtained was normalized for the quenching observed in the standard solutions of the dendrimers (Figure 4B). Analysis of the kinetics of the binding of the G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> (100 nM) showed that maximal binding was achieved within 30 minutes (data not shown), which is similar to reports for the binding of free folate.

In order to confirm the receptor specificity for the conjugate, the effect of free FA on the uptake of the dendrimers was tested in KB cells that express both high and low FAR. The binding of the conjugates to the low FAR-expressing KB cells was 30% of that of the high FAR-expressing cells for both the G5-Ac(82)-FITC-FA and G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> (Figure 5, left panel). 50  $\mu$ M FA completely blocked the uptake of either targeted dendrimers (30 nM) in both the low- and high-FAR-expressing cells (Figure 7, right panel).

The binding and internalization of the conjugates to KB cells was also assessed by confocal microscopy. As shown in Figure 6, conjugates containing the targeting molecule FA internalized into the cells within 24 hours.

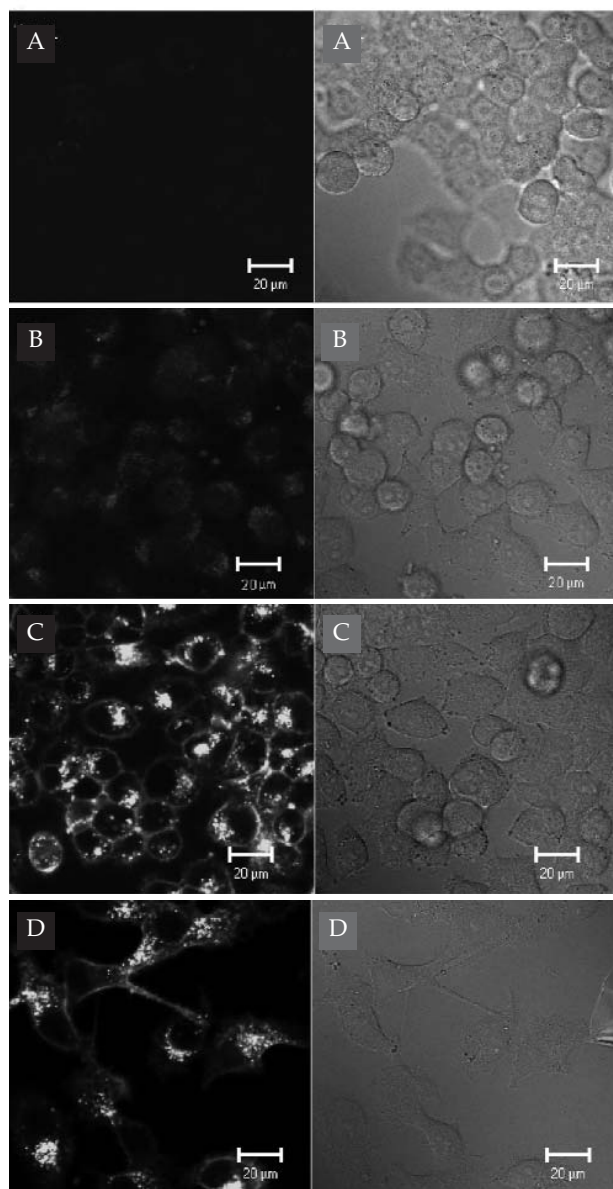


**Figure 5** Effect of free FA on the uptake of G5-Ac(82)-FITC-FA and G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> in KB cells expressing high- and low-FAR. KB cells which express high (solid bars) and low (shaded bars) FAR were incubated with 30 nM of the dendrimers for 1 hour at 37  $^{\circ}$ C, rinsed, and the fluorescence of cells was determined by flow cytometric analysis (left panel). Pre-incubation with 50  $\mu$ M free FA for 30 min totally prevents cellular binding and uptake of the polymer conjugates (right panel).

As compared to the cells treated with the control conjugates, the cells exposed to G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> were less adherent and rounded up, indicating cytotoxicity induced by the drug-conjugate.

#### In vivo studies

*In vivo* mouse trials utilizing saline, free drug or nanodevice have been performed. The trials served



**Figure 6** Confocal microscopy of KB cells treated with dendrimer-conjugates. KB cells were incubated with 250 nM of the indicated dendrimers for 24 hours and confocal images were taken. The left and right panels under each treatment represent FITC fluorescence and a differential interference contrast (DIC) image of the same observation field. Panel A: PBS, Panel B: G5-Ac(82)-FITC, Panel C: G5-Ac(82)-FITC-FA, Panel D: G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup>. (White bars in the lower right corner indicate a length of 20 µm.)

to determine the (1) drug effectiveness utilizing this particular delivery device/method, (2) *in vivo* targeting capabilities of an FA-conjugated device, and (3) systemic toxicity of the nanodevice. Human KB cells over-expressing the high affinity folic acid receptor (FAR) were injected into CB-17 SCID mice at a volume of  $5 \times 10^6$  KB cells in 200 µl saline suspension after 21 days of folate-deficient diet [15]. After day 4 of tumor cell injection, mice received an injection *via* the tail vein twice weekly of saline, free drug, or nanodevice. Injections consisted of doses of equimolar concentration (in 200 µl of saline per 20 g mouse) of free MTX, the experimental nanodevice (G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup>), nanodevice without the imaging molecule FITC (G5-Ac(82)-FA-OH-MTX<sup>e</sup>), nanodevice without the drug MTX (G5-Ac(82)-FITC-FA), nanodevice without targeting molecule FA (G5-Ac(82)-FITC-OH-MTX<sup>e</sup>), or saline as a control.

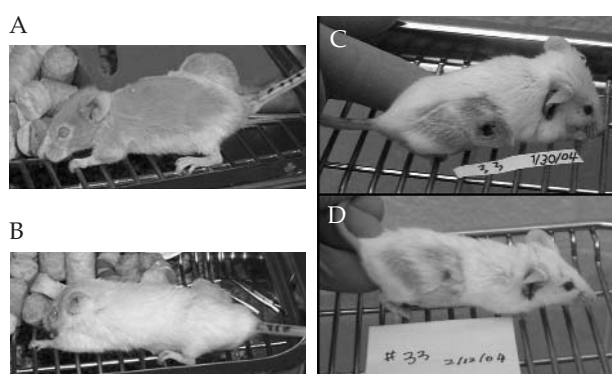
#### Discussion

The observations that G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> bound to FA-expressing cells in a time- and dose-dependent fashion, that the control dendrimer G5-Ac(82)-FITC failed to bind to KB cells, that G5-Ac(82)-FITC failed to associate with KB cells that do not overexpress FAR, and that free FA competed with the conjugate for binding (Figures 4 and 5), all indicate specific, receptor-mediated binding of the conjugate. The concentration-dependent, saturable binding of the conjugate is similar to previous results obtained for the binding of free FA in KB cells [16,17]. G5-Ac(82)-FITC-FA and G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> bound to the KB cells with similar binding curves (Figure 4B), indicating that the addition of MTX did not alter the affinity of the conjugate. Confocal microscopic analysis demonstrated internalization of the dendrimers and the possibility of utilizing the nanodevice as an intracellular drug delivery agent.

One of the limiting factors in the application of an anti-folate such as MTX is the development of drug resistance. Our results suggest that the MTX on the dendrimer surface is primarily carried into the cell through FAR-mediated endocytosis with minimal participation of the RFC (Reduced Folate Carrier). FAR is known to not be involved in MTX-induced drug resistance [18]. Therefore the drug resistance due to the altered expression of RFC [19] may be

overcome in targeted therapy using the conjugate. Similarly, as the conjugate retention in the cell is independent of polyglutamation, the resistance caused by reduced polyglutamation, similar to that which has been observed in multiple human leukemia cells [20] can be avoided.

These results demonstrate the applicability of dendrimers as suitable macromolecular polymers for the specific delivery of molecules capable of targeting, imaging, and killing cancerous cells. The development of a multifunctional dendrimer conjugate is promising for combining cancer imaging



**Figure 7** Mice administered either free MTX (15 mg/kg) (A) or G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> (3 mg/kg) (B). Progress of treatment with G5-Ac(82)-FA-OH-MTX<sup>e</sup> within a 22 day period. (C, D).

and targeted drug delivery. Targeted drug delivery may also help overcome forms of drug resistance caused by free drug, and help eliminate non-specific cytotoxicity caused by free drug interacting with healthy cells.

*In vitro* cytotoxicity assays have shown, as predicted, that the nanodevice lacking the targeting molecule FA (G5-Ac(82)-FITC-OH-MTX<sup>e</sup>) fails to induce cytotoxicity, as it has no means of entering the cells. Administration of free MTX produced great hair and weight loss, and failed to induce comparable cytotoxicity to the targeted nanodevice G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> when examined on the same day (Figures 7A and 7B). Nanodevices containing FA for targeting of the over-expressed FAR in KB cells (G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> and G5-Ac(82)-FA-OH-MTX<sup>e</sup>) however, were able to induce cytotoxicity, as they were able to enter cells (Figure 7B).

Results of the *in vivo* mouse trial indicate that treatment with the bi- and trifunctional nanodevices G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup> and G5-Ac(82)-FA-OH-

MTX<sup>e</sup>, showed statistically significant ( $P < 0.01$ – $0.05$ ) slowing of tumor growth as compared to treatment with equimolar concentrations of free drug. One significant outcome of this trial was occurred on day 39, where a mouse receiving intravenous doses of the nanodevice G5-Ac(82)-FA-OH-MTX<sup>e</sup> was completely cured, with the tumor remaining unpalpable for the 20 following days. Figure 7C and 7D demonstrates progress of treatment with G5-Ac(82)-FA-OH-MTX<sup>e</sup> within a 22 day period. Results of this trial confirm the effectiveness of these targeted nanodevices as chemotherapeutic drug delivery agents. At 84 days, 3 out of 8 mice were alive in the group receiving G5-Ac(82)-FA-OH-MTX<sup>e</sup>, 4 out of 8 mice were alive in the group receiving G5-Ac(82)-FITC-FA-OH-MTX<sup>e</sup>, and one mouse out of 7 was alive in the group receiving G5-Ac(82)-FITC-FA, the drug free control. Forty-four percent of the mice receiving the drug-containing, targeting, nanodevices are alive at day 84, which indicates that these nanodevices delay tumor growth by at least 30 days based on an end-point volume of 4 cm<sup>3</sup>.

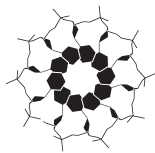
## Acknowledgement

Financial support from the National Cancer Institute (No. N01-CM-97065-32) and by a SPORE grant from the University of Michigan are gratefully recognized.

## References

- [1] Majoros, I. J., Thomas, T. P., Baker, J. R., Jr. (2006) Molecular Engineering in Nanotechnology: Engineered Drug Delivery. In: *Handbook of Theoretical and Computational Nanotechnology*. (Rieth, M., Schommers, W., Eds.) (American Scientific Publishers: Valencia, CA, USA) Vol. 10, *in press*.
- [2] Patri, A. K., Majoros, I. J., Baker, J. R., Jr. (2002) Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 466–471.
- [3] Tomalia, D. A., Majoros, I. J. (2000) Dendrimeric Supramolecular and Supramacromolecular Assemblies. In: *Supramolecular Polymers*. (Ciferri, A., Ed.) (Marcel Dekker Inc.: New York) pp. 359–434.
- [4] Tomalia, D. A., Majoros, I. J. (2003) Dendrimeric supramolecular and supramacromolecular assemblies. *J. Macromol. Sci. C*, 43: 441–477.
- [5] Majoros, I. J., Keszler, B., Woehler, S., Bull, T., Baker, J. R., Jr. (2003) Acetylation of poly(amidoamine) dendrimers. *Macromol.*, 36: 5526–5529.
- [6] Majoros, I. J., Thomas, T. P., Mehta, C. B., Baker, J. R., Jr. (2005) PAMAM dendrimer-based multi-functional engineered nanodevice for cancer therapy. *J. Med. Chem.*, 48: 5892–5899.
- [7] Majoros, I. J., Mehta, C. B., Baker, J. R., Jr. (2004) Mathematical description of dendrimer structure. *J. Comp. Theor. Nanosci.*, 1: 193–198.
- [8] Quintana, A., Raczka, E., Piehler, L., Lee, I., Myc, A., Majoros, I. J., Patri, A., Thomas, T., Mulé, J., Baker, J. R., Jr. (2002) Design and function of dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm. Res.* 19: 1310–1316.

- [9] Baker, J. R., Jr., Quintana, A., Piehler, L., Banazak-Holl, M., Tomalia, D. A., Raczka, E. (2001) The synthesis and testing of anti-cancer therapeutic nanodevices. *Biomed. Microdev.* **3**: 61–69.
- [10] Islam, M., Majoros, I. J., Baker, J. R., Jr. (2005) Analysis of PAMAM dendrimer based multifunctional devices. *J. Chrom. B*, **822**: 21–26.
- [11] Shi, X., Majoros, I. J., Baker, J. R., Jr. (2005) Capillary electrophoresis of poly(amidoamine) dendrimers: from simple derivatives to complex multi-functional medical nanodevices. *Molec. Pharm.*, **2**: 278–294.
- [12] Shi, X., Majoros, I. J., Patri, A. K., Bi, X., Islam, M. T., Desai, A., Ganser, T. R., Baker, J. R., Jr. (2005) Molecular heterogeneity analysis of poly(amidoamine) dendrimer-based mono- and multifunctional nanodevices by capillary electrophoresis. *The Analyst*, **2**: 278–294.
- [13] Thomas, T. P., Majoros, I. J., Kotlyar, A., Kukowska-Latallo, J. F., Bielinkska, A., Myc, A. Baker, J. R., Jr. (2005) Targeting and inhibition of cell growth by an engineered dendritic nanodevice, *J. Med. Chem.*, **48**: 3729–3735.
- [14] Leamon, C. P., Reddy, J. A. (2004) Folate-targeted chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**: 1127–1141.
- [15] Kukowska-Latallo, J. F., Candido, K. A., Cao, Z., Nigavekar, S. S., Majoros, I. J., Thomas, T. P., Balogh, L. P., Khan, M. K., Baker, J. R., Jr. (2005) Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res.*, **65**: 5317–5324.
- [16] Sobrero, A. F., Bertino, J. R. (1986) Endogenous thymidine and hypoxanthine are a source of error in evaluating methotrexate cytotoxicity by clonogenic assays using undialyzed fetal bovine serum. *Int. J. Cell Cloning*, **4**: 51–62.
- [17] Roehm, N. W., Rodgers, G., Hatfield, S., Glasebrook, A. (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods*, **142**: 257–265.
- [18] White, J. C., Goldman, I. D. (1981) Methotrexate resistance in an L1210 cell line resulting from increased dihydrofolate reductase, decreased thymidylate synthetase activity, and normal membrane transport. Computer simulations based on network thermodynamics. *J. Biol. Chem.*, **256**: 5722–5727.
- [19] Kamen, B. A., Wang, M., Streckfuss, A. J., Peryea, X., Anderson, R. G. (1988) Delivery of folates to the cytoplasm of MA104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles. *J. Biol. Chem.*, **263**: 13602–13609.
- [20] Westerhof, G. R., Schoranagel, J. H., Rijnbouts, S., Pinedo, H. M., Jansen, G. (1993) Identification of a reduced folate/methotrexate-carrier in human Kb cells expressing high levels of membrane associated folate binding protein. In: *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*. (Ayling, J. E., Nair, M. G., Baugh, C. M., Eds.) (Plenum Press: New York) pp. 771–774.



MAGYAR  
BIOKÉMIAI  
EGYESÜLET

## A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi Vándorgyűlése

Debrecen, 2007. augusztus 26–29.

Örömmel jelezzük, hogy a Magyar Biokémiai Egyesület Debrecenben rendezi meg 2007. évi Vándorgyűlését. A konferencia helyszíne a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Élettudományi Épülete.

A konferencián előadással, illetve poszterrel lehet részt venni. Az egyesület vezetősége, illetve a Vándorgyűlés Szervezőbizottsága a beérkezett előadás-kivonat alapján – figyelembe véve a lehetséges előadások korlátozott számát – szerkeszti meg a végleges programot. A poszterek esetében várhatóan minden szakmailag megalapozott jelentkezést el tudunk fogadni.

A Vándorgyűlés felhívása, illetve a jelentkezési lap az egyesület honlapjáról (<http://www.mbkegy.hu>) tölthető le. A jelentkezési lap a szálláslehetőségeket is tartalmazza a konferencia résztvevői számára.

A rendezvény programját, valamint az előadókat és az előadások/poszterek összefoglalóit az egyesület folyóirata, a *Biokémia*, 2007. évi 3. száma fogja közölni. A Vándorgyűlés dokumentumai (előzetes program, végleges program, hasznos információk, az esetleges változások stb.) az egyesület honlapján lesznek elérhetők.

Kérjük, hogy az érdeklődők a jelentkezési lapot, illetve az előadások (poszterek) összefoglalóit **2007. május 31-ig** küldjék el a következő e-mail címre: [ekho94@t-online.hu](mailto:ekho94@t-online.hu). (Az „üzenet tárgya” mezőbe kérjük, írják be: „MBKE 2007”) Kérjük továbbá, hogy intézetükben a biokémia iránt érdeklődő kollégák figyelmét szíveskedjenek felhívni a konferenciára.

Fésüs László  
az MBKE elnöke

Buday László  
az MBKE főtitkára

Gergely Pál  
a Szervezőbizottság elnöke



# Nemzetközi nyomelem-kutatási rendezvény

Tájékoztató a „Mikroelemek a táplálékláncban” című nemzetközi szimpóziumról

Az MTA Mikroelem Munkabizottsága és az MTA Anyag- és Környezetkémiai Intézete Budapesten, 2006. május 25–27-én az MTA Székházában rendezte a Nyomelemek a táplálékláncban című nemzetközi szimpóziumát (*Trace Elements in the Food Chain*, tefc2006). Az MTA Mikroelem Munkabizottsága mikroelem témakörben évtizedek óta, általában kétévenként szervez hasonló rendezvényt. A Munkabizottság feladatának tekinti, hogy lehetőséget kínáljon a mikroelemek biológiai hatásaival kapcsolatos kutatási eredmények közreadására, hazai és külföldi érdeklődők számára egyaránt.

A legutóbbi rendezvény különösen jó lehetőséget nyújtott a különböző témakörökben, a mikroelemekkel összefüggésben létrejött legújabb eredmények ismertetésére, illetve azok integrálására. Az alábbi témacsoportokat hirdettük meg: (1) A nyomelemkutatás módszertani vonatkozásai. Speciáció. (2) A nyomelemkutatás környezettudományi vonatkozásai. Víz, talaj, mikroorganizmusok, növények. (3) A nyomelemek a humán táplálkozásban, az állati takarmányozásban. Kölcsönhatások, élelmiszer-biztonság, élelmiszer-, takarmánykiegészítők. (4) Nyomelemek az ember és az állatok egészségi állapotával összefüggésben.

A szimpóziumot Medzihradzky Kálmán akadémikus, osztályelnök úr nyitotta meg. A rendezvény két nyitó előadását a szakterület két prominens kutatója tartotta: Manfred Anke (*Friedrich Schiller University*, Jena) a molibdén környezeti és táplálkozástani szerepét tekintette át, Domy C. Adriano (*University of Georgia*, Aiken, USA) pedig metalloidekkel és nehézfémekkel szennyezett területek remediációs lehetőségeiről szolt. Ezt követően az előadások öt szekcióba szervezve zajlottak. A szelén táplálékláncban betöltött szerepével 7 előadás és 6 poszter, az arzén hasonló szerepével 2 előadás foglalkozott, a nyomelemek módszertani vonatkozásaira 2 előadás és 5 poszter tért ki. A konferencia vitathatatlanul legtöbb prezentációt felvonultató része a nyomelemkutatás környezeti vonatkozásait tárgyaló szekció volt, ahol 6 előadás mellett 40 poszter szerepelt. Hasonlóan népes bemutatót vonzott a nyomelemek emberi és állati táplálkozásban betöltött szerepével foglalkozó szekció, ahol 11 előadást hallhattunk és 23 posztert tekinthettünk meg.

Nagy szakmai elismerést és örömet jelentett számunkra, hogy a résztvevők megértették elképzelésünket, szándékainkat, és a nyomelemkutatás széles területeiről érkeztek kéziratok és érdeklődők. A 134 résztvevő 18 országból érkezett. A szimpózium résztvevői a regisztráláskor kézhez kapták a végleges tudományos programot, az előadások összefoglalóit tartalmazó 88 oldalas kötetet és az 534 oldalas, lektorált dolgozatokat tartalmazó kiadványunkat [1], valamint a konferencia jellegzetesen magyar vonatkozású emléktárgyát, egy nyakba akasztható tarsolylemezt, amely egy honfoglalás-kori lelet másolata.



Három tag a konferencia tudományos és szervező bizottságából: Pais István, Huszti Zsuzsanna és Szilágyi Mihály (balról jobbra).

Örömről szólhat, hogy az egyes témakörök hazai és külföldi szakértői elfogadták meghívásunkat. Óhatatlan elfogultságunk ellenére megállapíthatjuk, hogy rendkívül hátrányos kutatási körülményeink ellenére hazánkban a mikroelemkutatás komoly, elismerésre méltó eredményeket ért el, amelyek révén nemzetközi összehasonlításban is előkelő helyen szerepelünk. A résztvevők – köszönetük kinyilvánítása mellett – javasolták, hogy a rendezvényt a jövőben hasonlóképpen kövessék. A tisztelt érdeklődők kiadványunkat megtekinthetik a konferencia honlapján [2].

## Irodalomjegyzék

- [1] Szilágyi, M., Szentmihályi, K. (Eds.) (2006) *Proceedings, International Symposium on Trace Element in the Food Chain* (Working Committee on Trace Elements / Institute of Materials and Environmental Chemistry, Hungarian Academy of Science, Budapest) ISBN 963 7067 132.
- [2] <http://www.chemres.hu/tefc2006>

Szilágyi Mihály

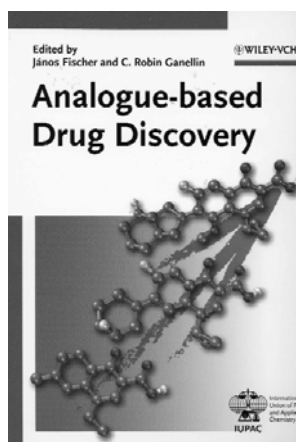
**J. Fischer, C. Robin Ganellin (Eds.):  
ANALOGUE-BASED DRUG  
DISCOVERY**

(Könyvismertetés)

Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, 2006

A gyógyszerfejlesztés tudományterületére nézve jelentős, magyar vonatkozású könyv látott napvilágot a Wiley kiadónál a múlt évben: a Fischer János (Richter Rt.) és C. Robin Ganellin (University College, London, UK) szerkesztésében kiadott *Analogue-based Drug Discovery* (Analógalapú gyógyszerkutatás) című munka. A szerzők a gyógyszervegyületek kutatási-fejlesztési területének vezető szakemberei, s a könyvben szereplő 19, részletesen ismertetett gyógyszertípus közül 9 bemutatását olyan kutatótól olvashatjuk, aki kulcsszerepet töltött be az adott vegyületcsalád felfedezésében. Nem kivétel ez alól a két szerkesztő sem: C. Robin Ganellin egyebek között – Graham J. Durant és John C. Emmett mellett – a gyomor-savtermelést visszaszorító, s így a gyomorfekély műtétet kiváltó gyógyszeres kezelését lehetővé tevő *cimetidin* felfedezője, Fischer János pedig hazai vezető kardiovaszkuláris gyógyszerek (ACE-gátló vérnyomáscsökkentők) fejlesztésének résztvevője. A szerkesztő Fischer János mellett a könyv 28 szerzője közül 11 további fejezetíró magyar, részint a Richter Gedeon Rt., részint a Semmelweis Egyetem és a budapesti Szent János Kórház munkatársai.

A könyv első három fejezetében a szerkesztők pontos definíciót adnak az „analóg” kifejezésre, és ismertetik a terület általános jellemzőit és történetét. A klasszikus definíció szerint analógnak tekinthető az a gyógyszer, amely szerkezetében vagy biológiai tulajdonságai tekintetében hasonló egy korábbi gyógyszervegyülethez. A monográfia ezen belül a szerkezeti és farmakológiai értelemben egyaránt analóg gyógyszerekre fókuszál. Amint kitűnik belőle, az analógtervezés fontos szerepet játszik a gyógyszerkémiai és a gyógyszeres terápia fejlesztésében. Kiváló áttekintést olvashatunk a kvantitatív szerkezet-hatás-összefüggésvizsgálatok (QSAR) hőskorából is közismert Camille-Georges Wermuth tollából a gyógyszeranalógok tervezésének kémiai eszköztáráról, s hasonlóan érdekes be-



vezető áttekintést nyújt a szakterület – illetve a QSAR, az abszorpciós-eloszlási-metabolikus-kiválasztási (ADME) tervezés, a kombinatorikus kémia és nagy hatékonyságú tesztelés (HTS), valamint a bioinformatika (kemogénomika) gyógyszerfejlesztési alkalmazásainak területe – másik ki-

emelkedő alakja, Hugo Kubinyi is. Egyes hatóanyagok (10 analógcategóriában 65 vegyület) szerkezet-hatás-összefüggéseit (SAR) tárja fel John R. Proudfoot fejezete, ám csupán a legegyszerűbb kémiai deskriptorok (hidrogénkötés-akceptor és -donor tulajdonságok, lipofilitás és moláris tömeg) alapján. Ezt követően a kutatás és az ipar adott területen vezető személyiségei részletesen ismertetik az egy-egy analóg hatóanyag kapcsán végzett fejlesztéseket. Így a szerkezeti optimalás és a gyógyászati háttér részleteit leíró egyes fejezetek történeti szempontból is érdekesek, s a monográfia egésze áttekinti a hatóanyag-fejlesztésben korábban alkalmazott és jelenlegi stratégiákat. Kitér a hisztaminantagonisták, az angiotenzinreceptor- és ACE-inhibitorok, a protonpumpagátlók és béta-blokkolók, a kalciumantagonisták, az opioidok, a kinolon típusú antibiotikumok, a szteroidok és a rákterápiában alkalmazott platinavegyületek ismertetésére, összegzésében lefedve szinte valamennyi gyógyszertípust és terápiai területet. Bár a szerkesztők – illő, ám talán indokolatlanul szerény – saját megítélése szerint a munka nem nyújt teljes körű ismertetőt valamennyi analógtípusról, mérítése valójában igen széles, s nemcsak a tematikus fejezetekben nyújtott részletes áttekintések, hanem a könyv végén szereplő összesítés révén is. Utóbbi – Alapi M. Erika és Fischer János összeállításában – önálló részként jelenik meg, s jelentőségében korántsem törpül el a tematikus fejezetek mellett: táblázatos formában foglalja össze a kereskedelmi forgalomban jelentős gyógyszeranalógokat, kémiai szerkezet, hatásmechanizmus és szabadalmazhatóság szerinti összehasonlításban. A táblázat jelentős

összegző munkát tükröz: a piacvezető gyógyszerek között anatómiai és terápiás kémiai (ATC) osztály szerinti csoportosításban 69 gyógyszeranalóg kategórián belül 421 analóg gyógyszert sorol fel, a vonatkozó eredeti szabadalmak lajstromszámát és az oltalmi idő kezdetét is feltüntetve.

Az 575 oldalas monográfia megjelenésére a kémikusok legjelentősebb nemzetközi szervezete, az *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) orvosi kémiával és gyógyszerfejlesztéssel foglalkozó albizottsága által 2003-ban indított, a könyvvel azonos című, Fischer János vezette kutatási projektje [1] teremtett lehetőséget. A projekt eredményeképpen kiderült, hogy a forgalmazott gyógyszerek között átlagosan minden második analógszármazék, és hogy az analóg gyógyszerek piaca a teljes gyógyszerpiac kétharmadát teszi ki. Az analógiás gyógyszertervezés leggyakoribb kiindulópontja valamely természetes vegyület, melynél az analóg specifikusabb, biológiai hozzáférhetősége kedvezőbb, káros mellékhatásoktól mentes. Például szolgálhatnak a gyomor savas környezetében is hatásos félszintetikus penicillin-származékok, a *moxifloxacin*, a sztigminszármazékok, az opioidreceptor morfinanalóg ligandumai). Más esetekben az analógia alapjául szolgáló vezérvegyület lehet már leírt gyógyszer, melynek javítani kell a tulajdonságait, adagolhatóságát, csökkenteni kell napi dózisát, vagy éppen növelni felszívódóképességét, hatástartósságát, esetleg bizonyos mellékhatásait szükséges elkerülni. Korábbi szintetikus gyógyszerek szerkezetéből kiindulva olyan analógok is fejleszthetők, melyek valamely új terápiás kezelésre teremtenek alapot. Példaként említhető a *sulfanilamide* antibakteriális gyógyszer esete, amely azonban a szénsavanhidráz enzim gátlása révén a vizeletet ellúgosította. Ez vezetett a szulfonamid diuretikumok kidolgozásához, melyek révén a korábban használt, toxikus szerves higanyvegyületeket ki lehetett vonni a gyakorlatból. Hasonló esetek, az antihisztamin *promethazine* hatásfokozására előállított halogénezett származékok közül kikerült antipszichotikus *phenothiazine* vagy a foszfodiészteráz enzim gátlójaként kardiovaszkuláris terápiás célzattal fejlesztett vegyületek között előállított *sildenafil*, mely a férfi-merevedésszavarok hatékony gyógyszerévé vált. Esetenként élettani célpontok (enzimek, receptorok) ligandumainak fejlesztéseként

jelennek meg analóg gyógyszerek, mint például az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) első gátlószere, a *captopril*, az első H<sub>1</sub>-receptor-antagonista antihisztamin *phenbenzimine*, az első  $\beta$ -blokkoló *pronehalol* vagy az első hisztamin H<sub>2</sub>-receptor-antagonista *cimetidin*.

A biológiailag aktív vegyületekkel foglalkozó szakember talán csupán annyit sajnálhat, hogy ugyan a könyv foglalkozik a gyógyszer-elővegyületek (*prodrug*) fejlesztésével, lényegesen kevesebb figyelem fordul a bioizosztéria kérdésére, pedig e területen jelentős magyar informatikai eszközfejlesztés is történt [2]. Az áttekintő fejezetek között Wermuth professzor ugyan kitér ezen analógtervezési módszerre is, a könyv egészében az izosztéria – legalábbis néven nevezve – aránylag kis súlyt kap. Szintén kevés szó esik a számítógépes hatóanyag-tervezésről (QSAR, COMFA stb.), melynek oka nyilván az, hogy ezek nem esnek a „direkt” analógiás tervezés definíciója alá.

A gyógyszerhatóanyag-fejlesztés igen költséges tevékenység, melyben számos vegyületet empirikus, próba szerencse módszerrel sikerült megtalálni. A gyógyszerpiacon megtalálható legtöbb hatóanyagot valamely másik gyógyszer (természetes vegyület, konkurens termék vagy megismert vezérvegyület) szerkezeti optimalálásában fejlesztették ki. Ezen optimalások célkitűzése vagy a hatóanyag hatásának javítása vagy a mellékhatások visszaszorítása volt. Utóbbi területen kiderült, hogy egyes mellékhatások vizsgálata alapvetően új alkalmazási területeket is megnyithat. A szisztematikus fejlesztést tehát hatékonyan segíti az analógtervezés, s az ezen terület eredményeit áttekintő *Analogue-based Drug Discovery* monográfia igényes kiadvány, amely összefoglaló ismeretanyagot és szemléletet nyújt a gyógyszerkémia területén jártas, ám a szűkebb szakterületet teljességében nem ismerő szakembereknek, rendszerezett információi révén pedig a gyakorlati gyógyszerfejlesztők számára is hasznosan forgatható kézikönyv.

## Irodalomjegyzék

- [1] <http://www.iupac.org/projects/2002/2002-051-1-700.html>
- [2] Ujváry, I. (2003) BIOSTER Database (Accelrys Software, Inc.: San Diego, CA, USA)  
[http://www.accelrys.com/products/chem\\_databases/databases/bioster.html](http://www.accelrys.com/products/chem_databases/databases/bioster.html)

Székács András

**Bodnár Imre** rajztagozatos középiskolai, majd Várpalotán a Kirakatrendező és Dekorátor Iskolában folytatott tanulmányait követően 1986-ban rajztanári diplomát szerzett a Janus Pannonius Tudományegyetemen Pécsen, mestere Bérces Gábor volt, majd 1997-ben végzett az Iparművészeti Egyetem multimédia szakán. Az Ajkai Grafikai Műhely (AGM, 1982) és az 5-KOR Művészcsoport (5-KOR, 2005) alapító tagja, a Művészeti Alap, a Magyar Alkotóművészek Országos Egyesülete, a Magyar Grafikuművészek Szövetségének, illetve a Rézkarcoló Művészek Egyesületének tagja. 1989 óta külföldi (Németország, Ausztria, Irán, Japán, Bulgária) és hazai egyéni és csoportos kiállításokon szerepel. 1999-ben tanulmányutat tett Iránban a Teheráni Modern Művészetek Múzeuma meghívására. Főbb kitüntetései, ösztöndíjai: Art '89 I. díj (1989), Kisgrafikai Biennálé, a Váci Grafikai Műhely díja (1992), Magyar Grafikuművészek Szövetsége díja (2005).

1982 óta foglalkozik a sokszorosító grafikával, mióta a Tokaji Művésztelepen megismerkedett a rézkarctelével, melynek elsajátításában és tökéletesítésében utóbb Kéri Imre grafikuművésztől, az AGM művészeti vezetőjétől kapott jelentős segítséget. Emellett ceruzarajzokat, tusrajzokat készít, illetve pasztellképeket fest. Munkái gyakran irodalmi kötődésűek, nem illusztrációk, hanem olyan kifejezőmódot képviselnek, mellyel a saját belső világát mutathatja meg. Jelenleg – és mint mondja, várhatóan még jó ideig – általa kitalált növények ábrázolásán dolgozik. Elképzelt növényi világát Borges kitalált lényei ihlették, s az argentin íróhoz hasonlóan ő is mélyebb filozófiai tartalommal megtöltve, valószínűleg kívánja bemutatni teremtett lényeit, latin névvel is megnevezve őket, az alkotásokat – a grafikától a könyvkötésig saját készítésű – egy példányos, reprezentatív művészkönyvben összeállítva.

Bodnár Imre munkái megtekinthetők a Nádor Galéria grafikai anyagában (1051 Budapest, József nádor tér 8.)



Bodnár Imre, *Ahogy Te szeretsz* (1999), ceruzarajz



Bodnár Imre, *Hétköznapi örömei* (1998), ceruzarajz



## 15<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology

2007. július 18–20.

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar, Budapest

A Magyar Mikrobiológiai Társaság (MMT) 2007. évi 15. Nemzetközi Kongresszusát a Magyar Immunológiai Társaság, a Magyar Biokémiai Egyesület Biotechnológiai Szakosztálya, a Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság, az MMT Alapítványa, valamint a házigazda Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kara részvételével rendezi meg.

A konferencia tudományos szekciói a mikrobiológia valamennyi ágát felölelik.

Az MMT aktív tagjainak kongresszusi részvételét a MMT Alapítványa személyenként több tízezer forint összeggel támogatja. Kérjük, hogy jelentkezésüket a Magyar Mikrobiológiai Társaság honlapján (<http://www.mmt.org.hu>) tegyék meg.



SIGMA-ALDRICH

Fontos!

Létszak a fiatal  
kutatók!

LL

SIGMA-ALDRICH Kft.  
H-1072 Budapest  
Nagy Diófa u. 7. IV. fl.  
Tel.: (06-1)-269-6474  
Fax: (06-1)-235-9050  
E-mail: info@sigma.sial.hu

## Tisztelt Fiatal Kutató!

A Sigma-Aldrich Nemzetközi Részvénytársaság magyarországi leányvállalata 1997-ben, alapításának ötödik évfordulója alkalmából pályázatot hirdetett 35 év alatti, Magyarországon vagy ideiglenesen külföldön ösztöndíjasként dolgozó kutatók részére, akik elsőszerzős közleményekben **Sigma, Aldrich, Fluka, Supelco, Riedel-de Haën, RBI** vagy **Genosys** termékekre hivatkoztak. Hagyományteremtő szándékkal, azóta minden évben meghirdetjük pályázatunkat. A nyertesek sorrendjét a közlemények száma

- I. díj 150.000 Ft**  
**II. díj 100.000 Ft**  
**III. díj 75.000 Ft**

(Az összegek nettó értéket jelentenek, a pénzdíjakat csak egyszer lehet elnyerni.)

**Benyújtási határidő:** 2007. április 30. **Eredményhirdetés, ünnepélyes díjkiosztás:** 2007. május. A pályázathoz kérjük a tudományos közlemények másolatát csatolni, valamint a hivatkozásokat kiemelni. Akik már nyújtottak be pályázatot, csak a benyújtás óta megjelent közleményeket küldjék, a korábbiakat nyilvánításba vettük. A pályázatokat az alábbi címre kérjük küldeni: Sigma-Aldrich Kft. 1399 Budapest, Pf. 701/400.

### Eddigi nyerteseink:

I. helyezettek: **Török Béla** (Szegedi Tudományegyetem TTK), **Szabó Csaba** (MTA KOKI), **Szöllösi György** (Szegedi Tudományegyetem TTK), **Balázsik Katalin** (Szegedi Tudományegyetem TTK), **Filipcsei Genoveva** (BME), **Helyes Zsuzsanna** (Pécsi Tudományegyetem ÁOK), **Vásárhelyi Barna** (Szemmelweis Egyetem ÁOK), **Mócsai Attila** (Szemmelweis Egyetem ÁOK), **Osváth Szabolcs** (Szemmelweis Egyetem ÁOK), **Jancsó Attila** (Szegedi Tudományegyetem TTK), **Gáspár Attila** (Debreceni Egyetem TTK), **Gyurcsányi E. Róbert** (BME)

II. helyezettek: **Acsády László** (MTA KOKI), **Benyó Zoltán** (Szemmelweis Egyetem ÁOK), **Buglyó Péter** (Debreceni Egyetem TTK), **Forró Enikő** (Szegedi Tudományegyetem ÁOK), **Antal Zsuzsanna** (Szegedi Tudományegyetem TTK), **Péter Mária** (Szegedi Tudományegyetem GYTK), **Kocsis István** (Szemmelweis Egyetem ÁOK), **Százaz Leonóra** (KÉKI), **Nagy Szabolcs** (Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet), **Kóta Zoltán** (MTA SZBK), **Jakab Annamária** (Központi Kémiai Kutatóintézet), **Czirják Gábor** (Szemmelweis Egyetem ÁOK), **Hegyi Árpád** (Szent István Egyetem, MKK)

III. helyezettek: **Sperlágh Beáta** (MTA KOKI), **Török Gabriella** (Szegedi Tudományegyetem TTK), **Pacher Pál** (Szemmelweis Egyetem ÁOK), **Fási András** (MTA KKI), **Ungvári Zoltán** (Szemmelweis Egyetem ÁOK), **Oroszi Gábor** (Pécsi Tudományegyetem ÁOK), **Reglodi Dóra** (Pécsi Tudományegyetem TTK), **Szatmári István** (Debreceni Egyetem TTK), **Kredics László** (Szegedi Tudományegyetem TTK), **Lente Gábor** (Debreceni Egyetem TTK), **Szokodi István** (Pécsi Tudományegyetem ÁOK), **Fekete Erzsébet** (Debreceni Egyetem TTK), **Kövesdi Dorottya** (ELTE TTK), **Mohammedné Ziegler Ildikó** (Richter Gedeon Rt.), **Gajdáné Schrantz Krisztina** (Szegedi Tudományegyetem, TTK)

Szívélyes üdvözléssel a Sigma-Aldrich Kft. összes munkatársának nevében,  
Budapest, 2007. március

Dr. Gráf Márta  
ügyvezető igazgató

Dr. Matus Ilona  
ker. és marketingigazgató

# KÖRNYEZETVÉDELEM - VÍZANALITIKA

## GYORSTESZTEK

**QUANTOFIX** **VISOCOLOR**

UNIFERIAL **DRUGIT** **VIDUAL** **TRICOLOR**

INDUKTOR ÉS TESZTPAPÍR 1 - 1000 mg/l

0,001 - 1000 mg/l

FOTOMETRIÁS TESZTKESZLET

## SZŰRŐPAPÍROK MEMBRÁNSZŰRŐK SZŰRŐKARTONOK

A minőségi minőségi  
membránokhoz ajánlunk!

MEMBRÁN

MEMBRÁN

MEMBRÁN

**KVALITATIV TESZTPAPÍROK**

**pH - PAPIROK**

**KVALITATIV TESZTPAPÍROK**

MACHEREY-NAGEL MN

**NAGYOBB TELJESÍTMÉNY  
KISEBB MÉRÉTBEN**

liquiTOC IKA

Magas hőmérsékletű TOC és TN

1. KÉSZLETTEL ÉS 2. KÖZLEKEDÉSI

TOC és TN

**VÍZANALITIKA**  
mobil, laboratóriumi és on-line kivitelben

WTW

MULTIPARAMETERES ELKÉPZŐDŐ

WTW

**ULTRA TISZTA VÍZ**

**CSAPVÍZBŐL TÁROZTATÁSRA**

**EASypure<sup>®</sup> direct RoDi**

TOC < 0,1 ppb

18,2 MegOhm/cm

ASTM Typ I  
minőségi víz

**automess**

**RÁDIOAKTÍV SUGÁRZÁSMÉRŐ  
MŰSZEREK ÉS MONITOROK**

**Desztilláció, extrakció, termokáció**

**behr**

"NEHÉZ" MÉRÉSEK KÖNYVEDÉN

KOK, AOX, AOX  
Sulfid, ammóniák  
ACOC, POC, POC  
Amid, metilamid  
amid, sulfid  
oxán, OH-oxán  
oxo-P stb.

**Chromatography**

**Bioanalysis**

**NITROGEN / PROTEIN  
tartalom mérése**

Dumas módszer szén-dioxid elvezetéssel  
automata analízatorokkal

**Rapid N** **Vario MAX**

A Dumas módszer előnyei:

- kevesebb anyag felhasználás
- nagy mintamennyiség
- kevesebb karbantartás

**KERN**

**Mérlegok**

Waagen und  
Prüfservice 2006

**AKTIVIT Kft.**

H-1581-Budapest, Pf.: 104.  
H-1145-Budapest, Pétervárad u. 14.  
Tel: 221-7865, 221-7866. Fax: 252-9940.

**PROFESSZIONÁLIS MÉRÉSTECHNIKA ELÉRHETŐ ÁRON**

**Elementar GmbH**  
**elemanalízátorok**

1 ppm...100% elemtartalomra

vario EL vario MACRO vario LIQID

**VARIO** analízator család

C-H-N-O-S-Cl

vario IRMS vario MAX

**ELEMALIZIS FELSOFOKON**

**AUTOMATA VÍZMINTAVEVŐK**

Handhabbar (mobil) és telepített típusok

A megújult mérő tiszta levegővel szennyeződésmentes víz mintavételre alkalmas

• szűrő nélküli vízvesztésmentes

• szűrő nélküli vízvesztésmentes

• szűrő nélküli vízvesztésmentes

**WTW**

**10 SENSOR NET**

**MULTI-PARAMETERES  
MULTI-MÉRŐHELYES**

**VÍZMINŐSÉG MONITOR  
SZENNYVÍZ-MINŐSÉG ELLENŐRZŐ**

• csak 2-eszer kalibráció

• kalibrációs helyettesítés

• moduláris rendszer

• telepített változat

• automatikus szennyeződésmentesítés

• alacsony teljesítményű szűrő

• szűrő nélküli vízvesztésmentes

• automatikus szennyeződésmentesítés

• automatikus szennyeződésmentesítés

• automatikus szennyeződésmentesítés

**ON-LINE MÉRÉSTECHNIKA**

WTW

MULTIPARAMETERES ELKÉPZŐDŐ

WTW

# LABORTECHNIKA, ON-LINE MÉRÉSTECHNIKA

# One Stop



For All Your Cell Culture Needs



bioprocess containers • media • buffers • reagents • serum-free media • FBS alternatives • sera

 **HyClone**<sup>®</sup>

**kvalitex**

Tudományos, Technológiai, Kereskedelmi Kft. • Scientific, Technological, Trading Ltd.

H-1136 Budapest, Pannónia u. 7. Tel.: (36-1) 340-4700 Tel./fax: (36-1) 339-8274 E-mail: [info@kvalitex.hu](mailto:info@kvalitex.hu)