

# **HER2-pozitív emlőtumor célzására alkalmas biokonjugátumok fejlesztése**

TDK dolgozat  
Kémia Alapszak

**Rábai Károly Tamás**

Témavezető: Dr. Mező Gábor

HUN-REN-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport  
Kémiai Intézet  
Szerves Kémiai Tanszék



**ELTE | TTK**

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest  
Természettudományi Kar  
Kémiai Intézet

# 1 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm *Dr. Novák Zoltán* tanszékvezető egyetemi tanárnak és *Dr. Mező Gábor* tudományos tanácsadónak, hogy munkámat az ELTE Szerves Kémiai Tanszéken, valamint a HUN-REN-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban lehetővé tették.

Köszönöm témavezetőmnnek, *Dr. Mező Gábor* tudományos tanácsadónak, hogy tengernyi türelmével, tanácsaival és vicces mondataival segítette munkám és dolgozatom létrejöttét.

Köszönettel tartozom *Dr. Mándity Istvánnak* amiért rendelkezésemre bocsátotta peptidszintetizátorát.

Külön köszönettel tartozom *Basa Bettinának*, *Dr. Enyedi Kata Nórának* és *Kiss Krisztinának* a tömegspektrometriás mérések elvégzéséért, valamint azért, hogy a nap bármely percében segítségemre álltak akár egy jó tanáccsal, akár jó történetek mesélésével, amivel remek hangulatot teremtettek a laborban.

Továbbá köszönettel tartozom *Dr. Bősze Szilviának*, *Dr. Uray Katalinnak* és *Kiskó Máriának* a biológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Külön meg szeretném köszönni *Kiss Krisztinának* a végtelen türelmét és a HPLC-s mérések közben játszott szórakoztató társasjátékokat.

Végül szeretném köszönetemet kifejezni családomnak és barátaimnak a megértésükért és tengernyi támogatásukért, nélkülük ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

## 2 Tartalomjegyzék

|       |                                                                                 |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Köszönetnyilvánítás .....                                                       | 2  |
| 2     | Tartalomjegyzék.....                                                            | 3  |
| 3     | Rövidítésjegyzék .....                                                          | 6  |
| 4     | Bevezetés.....                                                                  | 8  |
| 5     | Irodalmi áttekintés.....                                                        | 9  |
| 5.1   | Daganatterápia .....                                                            | 9  |
| 5.2   | Sebészeti beavatkozás .....                                                     | 9  |
| 5.3   | Sugárterápia .....                                                              | 10 |
| 5.4   | Kemoterápia .....                                                               | 10 |
| 5.5   | Célzott tumorterápia .....                                                      | 11 |
| 5.6   | Daunomicin (Dau).....                                                           | 12 |
| 5.7   | Humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa (HER2 vagy ErbB2) .... | 14 |
| 5.8   | Korábban vizsgált HER2 specifikus peptidek .....                                | 15 |
| 5.9   | Szilárdfázisú peptidszintézis .....                                             | 15 |
| 5.9.1 | A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái .....                                | 18 |
| 5.9.2 | A kapcsolás végbementének ellenőrzése.....                                      | 20 |
| 6     | Célkitűzések.....                                                               | 22 |
| 7     | Eredmények.....                                                                 | 24 |
| 7.1   | Hexamer irányítórésszel rendelkező konjugátumok (13-18) szintézise.....         | 24 |
| 7.1.1 | Az aminooxiecetsavat tartalmazó peptidek szintézise .....                       | 24 |
| 7.1.2 | Daunomicin konjugálása az aminooxiacetilezett peptidekhez.....                  | 26 |
| 7.1.3 | Dau=Aoa-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH <sub>2</sub> (13) .....                      | 28 |
| 7.1.4 | Dau=Aoa-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH <sub>2</sub> (16).....                       | 30 |
| 7.2   | Dodekamer irányítórésszel rendelkező konjugátumok (31-36) szintézise .....      | 31 |

|        |                                                                                                                                    |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.2.1  | Az aminooxiecetsavat tartalmazó peptidek szintézise .....                                                                          | 31 |
| 7.2.2  | Daunomicin konjugálása az aminooxiacetilezett peptidekhez.....                                                                     | 33 |
| 7.2.3  | Dau=Aoa-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH <sub>2</sub> (31).....                                                  | 35 |
| 7.2.4  | Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH <sub>2</sub><br>(32)                                    | 37 |
| 7.2.5  | Dau=Aoa-Nle-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH <sub>2</sub> (33) .....                                                 | 39 |
| 8      | Kísérleti rész.....                                                                                                                | 41 |
| 8.1    | Felhasznált anyagok.....                                                                                                           | 41 |
| 8.2    | Általános eljárás .....                                                                                                            | 41 |
| 8.2.1  | Peptidszintézis .....                                                                                                              | 41 |
| 8.2.2  | Peptid hasítás a gyantáról .....                                                                                                   | 43 |
| 8.2.3  | Preparatív RP-HPLC kromatográfia .....                                                                                             | 44 |
| 8.2.4  | Analitikai RP-HPLC kromatográfia.....                                                                                              | 44 |
| 8.2.5  | Tömegspektrometria .....                                                                                                           | 45 |
| 8.2.6  | Izopropilidén védőcsoport eltávolítása aminooxiecetsavat tartalmazó<br>peptidekről .....                                           | 45 |
| 8.2.7  | Daunomicin konjugálása.....                                                                                                        | 46 |
| 8.2.8  | <i>In vitro</i> citosztázis meghatározása MTT-teszttel.....                                                                        | 46 |
| 8.2.9  | <i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálatok áramlásos citometriával .....                                                             | 48 |
| 8.2.10 | <i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálatok konfokális mikroszkópiával.....                                                           | 48 |
| 8.3    | Az Aoa-KCCYSL-NH <sub>2</sub> - és Aoa-KAAYSL-NH <sub>2</sub> peptidek és spacerrel ellátott analógjaik (1-<br>6) szintézise ..... | 49 |
| 8.4    | A (7-12) peptidek konjugálása daunomicinnel .....                                                                                  | 51 |
| 8.5    | Az Aoa-KAAYSLGYYNPT-NH <sub>2</sub> peptid analógjainak és spacerrel ellátott verzióinak (19-<br>24) szintézise .....              | 52 |
| 8.6    | A (25-30) peptidek konjugálása Daunomicinnel .....                                                                                 | 58 |
| 9      | Összefoglaló.....                                                                                                                  | 59 |

|    |                       |    |
|----|-----------------------|----|
| 10 | Irodalomjegyzék ..... | 60 |
|----|-----------------------|----|

### 3 Rövidítésjegyzék

|                   |                                                                                |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Aaa               | aminosav                                                                       |
| Ac <sub>2</sub> O | ecetsavanhidrid                                                                |
| ADCs              | ellenanyag-hatóanyag konjugátumok                                              |
| Aoa               | aminooxiecetsav                                                                |
| Boc               | <i>tert</i> -butiloxikarbonil                                                  |
| Bzl               | benzil                                                                         |
| DAPI              | 4',6-diamidino-2-fenilindol                                                    |
| Dau               | daunomicin                                                                     |
| DBU               | 1,8-diazobiciklo[5.4.0]undek-7-én                                              |
| DCM               | diklórmétán                                                                    |
| DIC               | <i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid                                           |
| DIPEA             | <i>N,N</i> -diizopropil- <i>N</i> -etilamin                                    |
| DMF               | <i>N,N</i> -dimetilformamid                                                    |
| DMSO              | dimetilszulfoxid                                                               |
| DMEM              | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco-módosított Eagle-médium)</i>     |
| DNS               | dexoziribonukleinsav                                                           |
| EGFR              | epidermális növekedési faktor receptor                                         |
| ESI-MS            | elektrospray ionizációs tömegspektrometria                                     |
| EtOH              | etanol                                                                         |
| FACS              | fluorescence-activated cell sorter (áramlásos citométer)                       |
| FBS               | magzati borjú szérum                                                           |
| Fmoc              | 9-fluorenilmetiloxikarbonil                                                    |
| GnRH-R            | gonadotropin felszabadító hormon-receptor                                      |
| HEPES             | 2-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-etánszulfonsav                           |
| HER2/ErbB2        | Humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa                       |
| HOBt              | 1-hidroxibenztriazol                                                           |
| HPLC              | nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia                                        |
| IC <sub>50</sub>  | median inhibitory concentration (sejtek 50%-nak osztódását gátló koncentráció) |
| IUPAC             | Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség                            |

|                                                                                      |                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| MBHA                                                                                 | 4-metil-benzhidrilamin                                   |
| MTT                                                                                  | 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid   |
| Mtt                                                                                  | 4-metiltritol                                            |
| NaOAc                                                                                | nátrium-acetát                                           |
| Nle                                                                                  | norleucin                                                |
| OBOC                                                                                 | one-bead one compound                                    |
| Oxyma B                                                                              | 5-(hidroxiimin)-1,3-dimetil-1,3-diazinán-2,4,6-trion     |
| Oxyma Pure                                                                           | etil-ciano(hidroxiimino)acetát                           |
| Pbf                                                                                  | 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-5-szulfonil       |
| PBS                                                                                  | foszfáttal pufferolt sóoldat                             |
| RNS                                                                                  | ribonukleinsav                                           |
| RP-HPLC                                                                              | fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia |
| SPPS                                                                                 | szilárdfázisú peptidszintézis                            |
| TaPSy                                                                                | Tecan add-on Peptide Synthesizer                         |
| <sup>t</sup> Bu                                                                      | <i>tert</i> -butil                                       |
| TFA                                                                                  | trifluorecetsav                                          |
| TIS                                                                                  | triizopropil-szilán                                      |
| Trt                                                                                  | tritol                                                   |
| UV                                                                                   | ultraibolya                                              |
| >=Aoa                                                                                | izopropilidén védett aminooxiecetsav                     |
| Az aminosavak rövidítésére a IUPAC által elfogadott 1 és 3 betűs kódokat használtam. |                                                          |

## 4 Bevezetés

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization) 2018. évi statisztikai adatai alapján a rákos megbetegedések okozzák világszerte a második legtöbb halálesetet.<sup>1</sup> 2022-ben megközelítőleg 20 millió rákos megbetegedést diagnosztizáltak és 9,7 millió ember hunyt el ebben a betegségben, tehát megközelítőleg minden 6. haláleset valamilyen tumoros megbetegedéshez volt köthető.<sup>2</sup> Az évenkénti egyre több esetszám alapján azt jósolják, hogy az évtized végére akár elérhetjük az évenkénti 24,1 millió diagnosztizált esetszámot és a 11,9 millió halálesetet a rákos megbetegedések következményeként, míg 2050-re a jelenlegi esetszámok megduplázódását várják.<sup>3</sup>

Férfiak esetén a tüdő-, prosztata-, vastagbél-, gyomor- és májrák a leggyakoribb típusok, míg nőknél a mell-, vastagbél-, tüdő-, méhnyak- és pajzsmirigydaganat a legvalószínűbb. 2022-es adatok alapján 2,3 millió nőt diagnosztizáltak különböző rosszindulatú mellrákkal és 670 ezer áldozatot követeltek világszerte. 185 országból 157 országban az emlőrák a vezető daganatos elváltozás a nők körében. A mellrák azonban nem csak a nőket fenyegeti, megközelítőleg 1%-a az ilyen típusú daganatoknak férfiakat érint. Ezen tumorok fő ismérve, hogy nők esetén a betegségben szenvedők majdnem felénél bármiféle mellrák növelő rizikófaktor nélkül jelentkezett a kóros elváltozás, leszámítva az életkort és a nemet.<sup>4</sup>

Az Európai Unión belül Magyarország kifejezetten rossz helyen áll a daganatos betegségek esetszámában, illetve a halálozási arányban. 2022-ben Magyarországon 650,7 daganatos eset jutott 100 ezer főre levetítve, mely jelentősen meghaladja az Uniós átlagot, amely csak 616,3 eset volt 100 ezer főre nézve. A női populáció körében az emlő rosszindulatú daganatos elváltozása élen jár mind Magyarországon, mind a világ több pontján is.<sup>2</sup> A nők között továbbá ez a ráktípus nem csak az idősebb, 50-70 év közötti korosztályt érinti, hanem a fiatalabb nők esetén is egyre gyakrabban diagnosztizálják.<sup>5</sup>

A daganatos megbetegedések megelőzése és kezelése a 21. század egyik meghatározó egészségügyi kihívásává vált. A rendelkezésre álló adatok alapján a rákos esetek legalább 40%-a megelőzhető lett volna hatékony prevenciós intézkedésekkel és a mortalitás mértéke is jelentősen csökkenthető lenne a tumorok korai stádiumban való felfedezésével. A daganatos megbetegedések továbbá igen változatosak, bármilyen szövettípusból kialakulhatnak, így nem létezik rájuk általános, minden esetben alkalmazható gyógymód. Így nem meglepő, hogy napjainkban is rendkívül sok kutatás zajlik a tumoros betegségek megértését, biológiai hátterük feltérképezését célozva, illetve hatékony terápiák fejlesztését illetően.<sup>1,6</sup>

## 5 Irodalmi áttekintés

### 5.1 Daganatterápia

A szervezetben a tumoros elváltozások bármelyik szövetből kiindulhatnak. Megkülönböztetünk jóindulatú- vagy másnéven *benignus*, illetve rosszindulatú- vagy *malignus* daganatos elváltozásokat. A *benignus* tumorok növekedése lassú, helyük pedig egyértelműen meghatározható. Idővel ezen típus *malignussá* alakulhat, ezért amennyiben lehetséges eltávolítják őket. Lokalizáltságuk miatt velük szemben a sebészeti beavatkozások meglehetősen hatékonyak. A *malignus* tumorokat az intenzív, destruktív növekedés jellemzi, gyakran áttéteket képeznek, ezzel átlépve a kiindulási szerv anatómiai határait. A megfelelő kezelés kiválasztása függ a páciens egészségügyi állapotától, a daganat stádiumától, méretétől, fajtájától és a különböző szervek érintettségétől.<sup>7</sup> A kezelés történhet sebészeti beavatkozással, sugárterápiával, kemoterápiával, immunterápiával, hormonterápiával vagy ezek kombinációjával, illetve az utóbbi időkben egyre nagyobb szerepet kapnak a biológikumokkal történő célzott terápiák.

### 5.2 Sebészeti beavatkozás

Daganatos elváltozások kezelésére a leggyakrabban alkalmazott módszer a sebészeti beavatkozás. Hatékonysága erősen függ a daganat méretétől, típusától, elhelyezkedésétől és a környező szövetek érintettségétől. Ennek okán bizonyos esetekben nem, vagy csak nagyon drasztikus műtéti beavatkozással lehet fellépni az elváltozás ellen.

Mellrák esetén is ez a leggyakrabban alkalmazott módszer. Függetlenül attól, hogy a sebészeti beavatkozás során a daganattal együtt mit távolítanak el a páciensből a következő kezelések léteznek:

- masztektómia, amely során az emlő egészét eltávolítják a zsírszövetekkel, nyirokcsomókkal és a mellizomzattal együtt;
- kvadrantektómia, amely során a mell egy részét, általában negyedét távolítják el a daganattal együtt;
- lumpektómia, amely során kizárólag a rákos csomót és az azt közvetlenül körülvevő szöveteket távolítják el.

Függetlenül az alkalmazott kezeléstől, az esetek legnagyobb részében a műtéti beavatkozást sugár- vagy kemoterápia követi, vagy éppen előzi meg attól függően, hogy a

kiújulás valószínűségét szeretnék csökkenteni vagy a tumor méretét a beavatkozás előtt. Az esetek túlnyomó részében a kezeléssel kapcsolatos döntések többségét felkészült mellsebészek, onkológusok, patológusok és radiológusok hozzák meg a legjobb eredmény elérésének érdekében.<sup>8</sup>

## 5.3 Sugárterápia

A sugárterápia a második leggyakrabban alkalmazott módszer daganatos elváltozások kezelésére. Az eljárás a nagyenergiájú ionizáló sugárzásokon alapszik, melyek a DNS károsítása révén fejtik ki hatásukat a szervezetben. A módszer nem szelektív, az ionizáló sugárzással kölcsönhatásba lépő összes sejt, szövet károsodik a kezelés során, de a modern technikának köszönhetően a legnagyobb károsodás a daganatos szöveteket éri. A leggyakrabban alkalmazott radionuklidok terápiás kezeléseket esetén a  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{131}\text{I}$  vagy a  $^{103}\text{Pd}$ .<sup>9–11</sup>

Mellrák esetén szinte csak kizárólag kiegészítő kezelésként használják a sebészeti beavatkozás előtt méretcsökkentésre, vagy műtét után a daganat kiújulásának megelőzésére.

## 5.4 Kemoterápia

A kemoterápia fő alkalmazási területei a vérképző szerveket érintő rosszindulatú daganatok terén van. A kezelés célja gyakran nem a daganat teljes megszüntetése, hanem a beteg életminőségének javítása, állapotának fenntartása vagy élettartamának meghosszabbítása. A betegek kezelésére olyan szereket használnak, amelyek a daganatos sejteket elpusztítják, vagy osztódásukat gátolják, ezeket hívjuk citosztatikumoknak. Leggyakrabban intravénásan adagolják, azonban léteznek orálisan adagolható változatok is. A kemoterápia előnye és egyben egyik hátránya is, hogy olyan páciensek kezelésére is megfelelően alkalmazható, akikben a daganat már áttéteket képzett, mivel a szervezetben lévő összes sejtet képes károsítani az alkalmazott szer. Hatásossága abban rejlik, hogy a citosztatikumok a osztódást gátolják, mivel a tumoros szövetekben az osztódó sejtek száma jelentősen meghaladja a szervezet normál szöveteiben lévő osztódó sejtek számát, így a citosztatikum legnagyobb része a tumoros szövetekben kerül felvételre. A legnagyobb mellékhatásnak kitett szövetek az előzőekből következően a normál élettani körülmények között gyors sejtosztódással bíró szövetek; ilyenek a csontvelő, a száj- és bélnyálkahártya, illetve a szőrtüszők. Az immunrendszer az ilyen kezeléseket során jelentős mértékben legyengül a vérképző rendszer elégtelen működése folytán.<sup>12</sup> A kemoterápiát gyakran alkalmazzák sugárterápiát vagy sebészeti beavatkozást kiegészítő kezelésként.

A citosztatikumok hatásmechanizmusuk alapján hat fő csoportra oszthatóak, amelyek a következők:

- Alkilezőszerek: gátolják vagy hibás DNS replikációt idéznek elő, pl. ciszplatin, karboplatin, melfalán;
- Antibiotikumok: a DNS-sel interkalációs komplexet képeznek, pl. daunomicin (Dau), doxorubicin, mitomicin C;
- Antimetabolitok: a DNS szintéziséhez szükséges anyagszerfolyamatokat és enzimek működését gátolják, pl. gemcitabin, metotrexát;
- Antimitotikumok: gátolják a mitotikus orsó létrejöttét, pl. vinblasztin, vinkrisztin;
- Topoizomeráz inhibitorok: gátolják a topoizomeráz I. és II. enzim működését, pl. irinotekán, topotekán.<sup>13</sup>

Az utolsó, hatodik csoportba az egyéb hatásmechanizmussal bíró szerek tartoznak. A különböző hatásmechanizmussal bíró szereket bizonyos esetekben kombinálva alkalmazzák annak reményében, hogy hatásosságuk szinergista módon növekszik. Hatásmechanizmustól függetlenül elmondható, hogy a citosztatikumok a szervezetből gyorsan kiürülnek, ezért nagy dózisban és/vagy ismételt kezelésben kell őket alkalmazni, ez pedig növeli a toxikus mellékhatások megjelenésének a valószínűségét.

## 5.5 Célzott tumorterápia

A célzott tumor- vagy kemoterápia a kemoterápia továbbfejlesztett változata, mely során a citosztatikumot célzottan a tumoros sejtekhez juttatják valamilyen célzó molekula segítségével. A terápia célja, hogy csökkentse vagy teljes mértékben kiküszöbölje a kemoterápia súlyos mellékhatásait, hogy ne romoljon a páciensek életminősége a kezelés során. A módszer első megjelenése az 1980-as évek végén, az 1990-es évek elején történt.

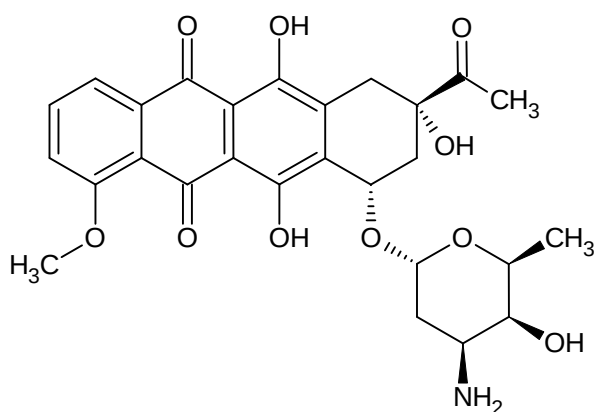
A célzott tumorterápia egyik csoportjába tartozik az a megközelítés, amely során a ráksejtek felszínén megtalálható receptorokat célozza egy molekula. A receptorhoz való kötődéssel a molekula gátolja a receptor szervezetben fellelhető szubsztrátjának a kötődését, amely a kötődéssel olyan ingereket válthatna ki a sejtben, amelyek a sejtsztódást serkentik. Az egyik első sikeres kísérlet egy monoklonális antitesttel történt, amely specifikusan kötődött a ráksejtek felszínén található antigénhez. Az antitest antigén receptorhoz való kötődése miatt a sejt nem kapta meg az osztódáshoz szükséges ingert, így a sejt elpusztult. A hatékonyság fokozásának érdekében az antitesthez különböző hatóanyagokat kapcsoltak, így létrejöttek az úgynevezett ellenanyag–hatóanyag konjugátumok (ADCs).<sup>12</sup> A klinikumban ma már több mint

tíz ilyen konjugátumot alkalmaznak. A kísérletek során azonban gyakran nem érték el a várt nagyobb arányú sejthalálózást. Bár az ellenanyagok és drog konjugátumaik igen specifikusak és akár hetekig megmaradnak a véráramban, hátrányuk többek között a gyenge szövetpenetráció és a magas gyártási költség. Ezért a kutatások fő irányvonala a kisebb molekulák, főleg a peptidalapú konjugátumok felé fordult.

A kutatások számos olyan tumorsejtfelszíni peptidligandumot felismerő receptort tártak fel, melyek a szervezet normál sejtjeihez képest a tumorsejteken túlexpresszálódnak, így alkalmasak lehetnek különböző peptidalapú konjugátumok célpontjának. Ilyen receptorok például az EGFR család, közülük is a különösen fontos ErbB2, vagy a GnRH-R. A hatóanyagot tehát ha egy olyan peptidhez kapcsoljuk, amit a rákos sejt felszínén található receptor specifikusan felismer, akkor a hatóanyag kizárólag a tumorsejtre fejt ki a hatását. Ilyen rendszert alkotnak azok a hatóanyag szállító rendszerek, amelyek egy hordozóból, egy irányítóból és egy hatóanyagból épülnek fel.<sup>14</sup> Gyakori eset, hogy az irányító- és a hordozó egység szerepét egy és ugyanaz az anyag tölti be. Irányítók lehetnek peptidek, antitestek, cukrok, lektinek, míg hordozók a leggyakrabban peptidek, illetve a polietilén-glikol, de ide sorolhatóak a különböző szerkezetű nanorészecskék is, pl. liposzómák. Munkám során irányító és hordozóként is peptideket alkalmaztam a célzott receptor pedig az ErbB2 vagy másnéven HER2 volt.

## 5.6 Daunomicin (Dau)

A daunomicin vagy másnéven daunorubicin az antraciklinek közé tartozó vegyület, az antibiotikumok családjába, ezen belül is citotoxikus hatással bíró szerek közé sorolható (1. ábra).<sup>15</sup> A *Streptomyces peucetius* baktérium termeli és innen is izolálták.<sup>16</sup> Megjelenését

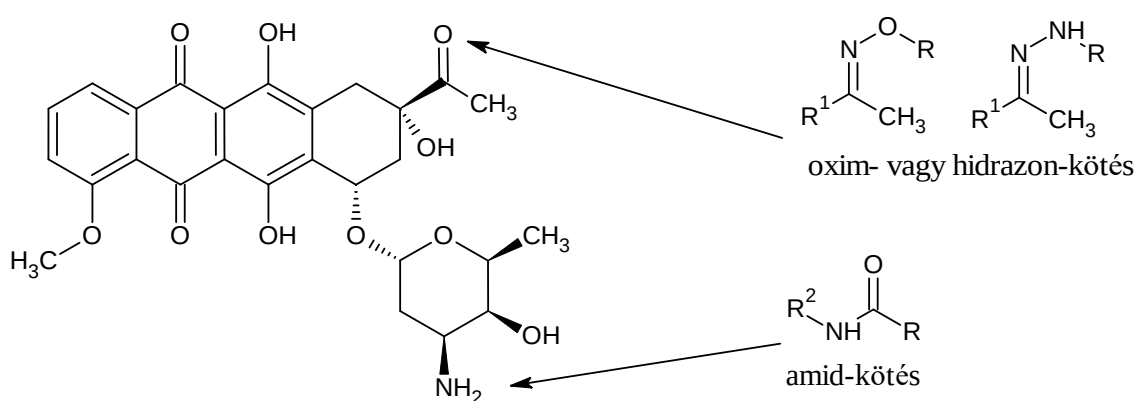


1. ábra A daunomicin szerkezete

tekintve vörös színű, kristályos anyag. Főleg leukémiás esetek kezelésére használják, de gyakran megjelenik más kemoterápiás kezelések esetén is.

Hatását tekintve a daunomicin a DNS cisztein és guanin bázispárjai közé való interkalációval gátolja a DNS kettős spiráljának széttekeredését és így a DNS, illetve az RNS szintézisét a sejtosztódási ciklus S szakaszában. Az előzőből következően a daunomicin kemoterápiás kezelés esetén minden osztódásra képes sejtre hatással tud lenni, nem csak a daganatos sejtekre.<sup>17</sup> Jellegzetes mellékhatásai a kezelt embereknek a hajhullás, hányinger, hányás, étvágytalanság, hasmenés. A Dau továbbá kardiotoxikus hatással is rendelkezik.

A káros mellékhatások elkerülésének, illetve a tumorspecifitás elérésének érdekében a szert valamilyen más vegyülettel konjugálják. A konjugálásra használt molekulák olyanok, amelyek nagy szelektivitással és specifitással ismerik fel a tumorsejtek felszínén található tumorspecifikus vagy túlexpresszáldott receptorokat. Munkám során a daunomicint a nagyon rossz prognózisú, HER2 receptort tartalmazó tumorsejteket célzó peptidekhez konjugáltam. A konjugálás a Dau módosítása nélkül két helyen valósítható meg: az aglikon rész 13-as C-atomján található oxocsoporton és a daunozamin aminocsoportján. Az aminocsoporton amid-kötésen keresztül történhet a konjugálás, ennek hátránya, hogy amennyiben a szabad hatóanyag nem képes felszabadulni a konjugátumból, akkor a citotoxicitás mértéke jelentősen csökken. Az olyan linkerek, spacerok kialakítása melyből a szabad hatóanyag fel tud szabadulni igen drága, ezért már bizonyított hatású konjugátumok hatásfokozására célszerű őket alkalmazni.<sup>18,19</sup> Az aglikon részen található oxocsoportot hidrazon- vagy oxim-kötés kialakítására lehet használni (2. ábra). A hidrazon-kötés savérzékenysége lehetőséget ad a



2. ábra A daunomicin konjugálásra alkalmas csoportjai és a lehetséges kötések módja

lizoszómában a szabad hatóanyag felszabadulására. A savérzékenység azonban a konjugátum előállítás és tisztítása során problémákat okoz, így nagyobb mennyiségű anyag előállítása

esetén számolni kell az esetleges jelentősebb anyagveszteségekkel. A daunomicint oxim-kötéssel peptidekhez aminooxiecetsavon (Aoa) keresztül lehet kapcsolni. Az aminooxiecetsavat a peptidlánc egy megfelelő aminocsoportjához, legáltalánosabban a peptid N-terminális végére kell kapcsolni, majd megfelelő kemoszelektív ligációs eljárással az oxim-kötést ki lehet alakítani az irányító peptid és a daunomicin között. Az oxim-kötéssel létrehozott konjugátumok előnye, hogy szintézisük és tisztításuk egyszerű, továbbá a felszabaduló aktív metabolit, ami a daunomicin és az aminooxiecetsav mellett tartalmazza azt az aminosavat (Aaa) amelyhez a drog kapcsolódik (Dau=Aoa-Aaa-OH), továbbra is megfelelő mértékű biológiai aktivitással rendelkezik.<sup>20</sup> Munkám során ezért a daunomicint oxim-kötés segítségével konjugáltam az előállított peptidekhez. A daunomicin további előnye, hogy autofluoreszcens tulajdonsága miatt a konjugátumok sejtbe jutása jól követhető áramlási citométerrel, konfokális- vagy fluoreszcens mikroszkóppal, így az irányító peptidek hatása a sejtfelvételre közvetlenül összehasonlítható.

## **5.7 Humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa (HER2 vagy ErbB2)**

A HER2 egy 185 kDa-os transzmembrán glikoprotein, mely az epidermális humán növekedési faktor receptor (EGFR) epitéliális tirozin-kináz fehérjék családjához tartozik. A receptorcsaládot négy transzmembrán fehérje alkotja, ennek egyike a HER2, amely a szervezetben számos sejt felszínén megjelenik.<sup>21</sup>

Az EGFR család tagjai kölcsönhatásba lépnek egymással, ezzel komplex és kulcsfontosságú szerepet betöltve a sejtek növekedési és differenciálódási szabályozásának jelátviteli folyamataiban.<sup>22</sup> Normális körülmények között a sejtmagban található gén proto-onkogén szakasza határozza meg, hogy a sejt felszínén mekkora mennyiségben található meg a receptor. Egy esetleges génhiba következtében, ha a proto-onkogén szakasz aktiválódik, akkor a HER2 mennyisége megemelkedik a sejt felszínén, ami felborítja a sejt szabályozási folyamatait. A sejt elveszti az egyensúlyi állapotát és ezzel lehetővé teszi agresszív tumorsejtek kialakulását.<sup>23,24</sup> Ez a típusú génamplifikáció nagy eséllyel megtörténhet a mellszövetekben, amely agresszív, úgynevezett HER2-pozitív emlődaganat kialakulását eredményezi. Ezen tumortípus fő ismérvei, hogy kifejezetten nagy méretű és a klinikai kezelések kimenetele kifejezetten rossz, munkám során ezért ezzel a daganattípussal foglalkoztam.<sup>25</sup>

## 5.8 Korábban vizsgált HER2 specifikus peptidek

A HUN-REN-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjában *Biri-Kovács* és munkatársai<sup>21</sup> munkájukhoz az irodalomban leírt KCCYSL-NH<sub>2</sub> szekvenciájú<sup>26</sup> peptidet választottak ki HER2-t célzó peptidek fág-könyvtárából. A kiválasztott peptidből analógokat szintetizáltak, hogy megvizsgálják a peptidben található két cisztein szerepét és/vagy szükségességét a HER2 receptorhoz való kötődésben. Egy másik irodalmi peptidet (GYYNPT-NH<sub>2</sub>), amelyet egy one-bead one-compound (OBOC) nevezetű módszerrel választottak ki HER2 specifikus irányító molekulának, szintén vizsgáltak. A peptideket az N-terminálisukon 5,6-karboxifluoreszceinnel (CF) módosították a sejtbejutási vizsgálatok követhetősége érdekében. Az előállított peptidek *in vitro* biológiai vizsgálatával arra a következtetésre jutottak, hogy:

- a ciszteineknek egymás mellett kell lenni a jobb biológiai hasznosíthatóság érdekében;
- a ciszteinek által képzett diszulfidhidak nincsennek befolyással a sejtfelvételre;
- a ciszteinek lecserélhetőek szerinekre vagy alaninokra a jobb sejtfelvétel érdekében

A mérések alapján a legjobb sejtfelvétellel a CF-KSCYSL-NH<sub>2</sub> és a CF-KAAYSL-NH<sub>2</sub> szekvenciák rendelkeztek. A két bízató szekvenciát ezután kombinálták az OBOC módszerrel kiválasztott szekvenciával és új, 12 aminosav hosszú peptideket állítottak elő. A legjobb sejtbejutást a CF-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub> szekvencia mutatta, amely megközelítőleg tízszeres növekedést mutatott a CF-KAAYSL-NH<sub>2</sub> szekvenciához képest.<sup>21</sup> Továbbá megállapították, hogy a két fragmens (KAAYSL, GYYNPT) sorrendje nem cserélhető fel. Munkám során az ebben a kutatásban elért eredményeket alapul véve dolgoztam tovább és szintetizáltam új daunomicint tartalmazó peptidkonjugátumokat célzott tumorterápiás vizsgálatok céljára.

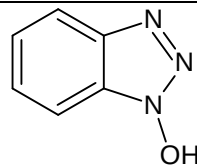
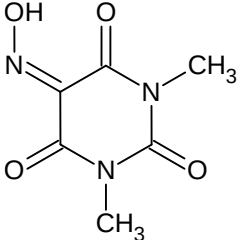
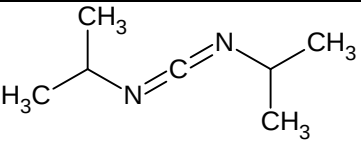
## 5.9 Szilárdfázisú peptidszintézis

A különböző peptidek szintézisének legelterjedtebb módja az oldatban történő, illetve a szilárdfázisú peptidszintézis. Oldatfázisú szintézis során minden egyes aminosav kapcsolása után a terméket izolálni és tisztítani kell. Az egyes kapcsolások során így a tiszta termék kitermelése 60- és 90% közé esik. Hosszabb polipeptidek esetén ez azt jelenti, hogy a végleges polipeptid mennyiségéhez képest jóval nagyobb mennyiségű kiindulási anyag szükséges a szintézishez. Az oldatfázisú szintézis hátrányainak, elsősorban kitermelésbeli problémáinak, illetve időigényességének kiküszöbölésére dolgozta ki *Robert Bruce Merrifield* a szilárdfázisú peptidszintézist (SPPS).<sup>27</sup> Az oldatban történő szintézishez hasonlóan az SPPS esetén is történhet a peptidlánc felépítése lépésenkénti beépítéssel, illetve fragmentskondenzációval.

Az SPPS során a peptid egy oldhatatlan, szilárd hordozóhoz van kikötve. A hordozó az SPPS során egy polimer gyanta. Felülete úgy van funkcionálizálva, hogy az aminosavak karboxilcsoportja hozzá tudjon kapcsolódni. A gyantával szemben a következő elvárásokat támasztjuk: kémiaiilag inert, mechanikailag stabil, az alkalmazott oldószerekben jól duzzad és a peptidlánccal bontható kovalens kötést tud létesíteni. A legáltalánosabban alkalmazott gyanta a klór-metilezett sztírol és 1,4-divinilbenzol 1-2%-os kopolimerje, amely kiválóan megfelel ezen elvárásoknak.<sup>28</sup> Ez a kopolimer a térhálósága miatt megfelelően porózus, ezáltal a reagensek könnyedén át tudják járni, amely elősegíti a minél gyorsabb reakciókat. A gyanták az elmúlt évtizedekben nagy fejlődésen mentek keresztül és a piacon megjelentek a különböző funkciós csoportokkal és linkerekkel ellátott gyanták, melyek lehetővé teszik a szilárdfázisú szintézisek egyre különbözőbb alkalmazásait.

A szintézis során a peptid C-terminálisán lévő első aminosav karboxilcsoportja kapcsolódik a gyanta felületén található funkciós csoporthoz. Az első aminosav felkapcsolásától a szintézis befejeztéig a gyanta látja el a peptid C-terminálisának védelmét. Az aminosavak  $\alpha$ -aminocsoportjának védelmét egy átmeneti/ideiglenes védőcsoport látja el, melyet a következő aminosav kapcsolása előtt le kell hasítani. Azon aminosavakat, melyek oldallánca olyan funkciós csoportot tartalmaz, amely a szintézis során a lejátszódó reakciókba bezavarhat úgyszintén védeni kell, ezen oldalláncvédő csoportokat hívjuk állandó védőcsoportoknak, mivel ezeket csak a peptidszintézis végén távolítjuk el a peptidlánchról.

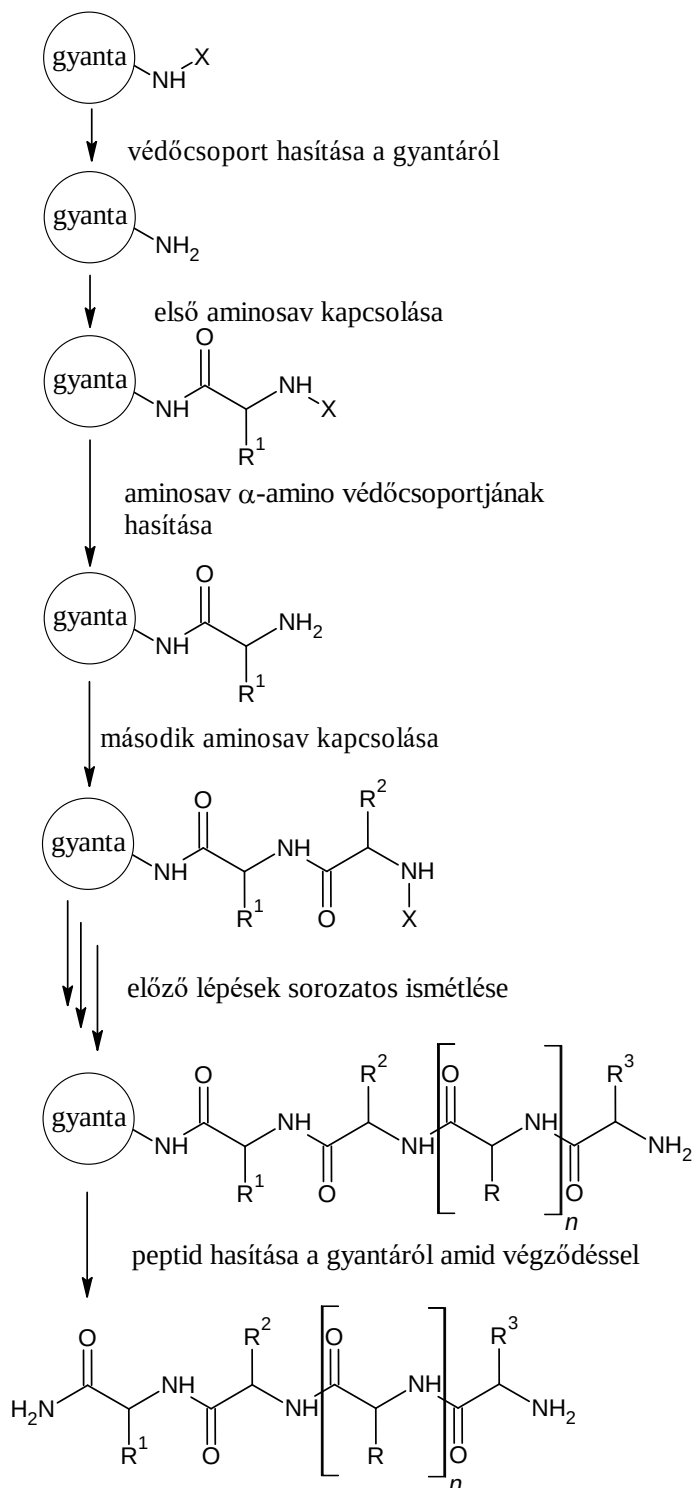
### 1. táblázat Gyakran alkalmazott aktiváló reagensek

| Aktiváló reagens neve                                | Rövidítése | Képlete                                                                               |
|------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1-hidroxibenzotriazol                                | HOBt       |  |
| 5-(hidroxiimin)-1,3-dimetil-1,3-diazinán-2,4,6-trion | Oxyma B    |  |
| <i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid                 | DIC        |  |

A gyantára rögzített aminosavszármazék ideiglenes védőcsoportjának hasítása után a kapcsolni kívánt aminosavszármazék karboxilcsoportját a kapcsolat előtt valamilyen módon aktiválni kell. Az **1. táblázat** tartalmazza a leggyakrabban alkalmazott aktiválószerket. A reakció során aktív észterek keletkeznek, amelyek *in situ* képesek elreagálni a peptidlánc szabad aminocsoportjával, ezért ezt a kapcsolási módszert *in situ* aktív észteres kapcsolásnak hívjuk.

A módszer nagy előnye, hogy kapcsolat után a reakcióelegyben lévő nem kívánatos anyagok, szennyeződések a gyanta mosásával és szűréssel eltávolíthatóak, míg a peptid-gyanta a szűrőn marad. A bekezdésben leírt lépések ismétlésével a kívánt hosszúságú peptidlánc előállítható. A kész peptidláncot el kell távolítani a gyantáról, továbbá a peptid oldalláncán található állandó védőcsoportokat le kell hasítani (**3. ábra**). Ezeket az esetek többségében egy lépésben hajtjuk végre. A hasítások után a nyers peptidet megfelelő módszerrel meg kell tisztítani, hogy megkapjuk a kívánt tiszta peptidet.<sup>28</sup>

A hagyományos SPPS-sel egy aminosav felkapcsolása megközelítőleg 2 órát vesz igénybe, továbbá a módszer lehetőséget nyújt arra, hogy automatizálják, szemben az oldatban végzett lassú szintézissel. A módszer



**3. ábra** A szilárdfázisú peptidszintézis sematikus ábrája

hátránya azonban, hogy a peptid vizsgálata csak a gyantáról való lehasítás után lehetséges, így a hibás szintézisek elkerülésének az érdekében a kapcsolásoknak közel kvantitatív módon kell lejátszódnuk, ezt viszonylag nagy reagensfeleslegekkel lehet elérni. A kapcsoláshoz az alkalmazott gyanta kapacitására nézve az aminosavszármazékokból és az aktiválószerkekből is 3-10 ekvivalens mennyiségű szükséges.

### 5.9.1 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái

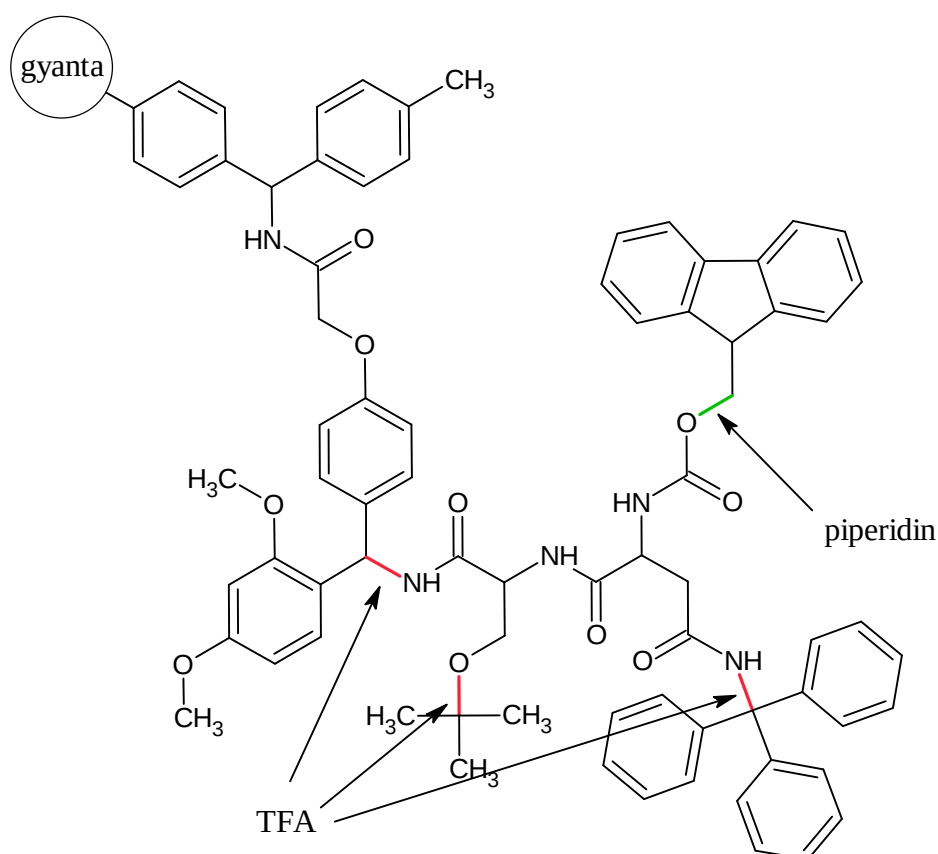
A szilárdfázisú peptidszintézis során két általános stratégia használatos napjainkban, hogy melyiket használjuk, azt az előállítani kívánt peptid szekvenciája és a rendelkezésre álló eszközpark határozza meg. A két általánosan alkalmazott stratégia:

- Boc/Bzl stratégia: az aminosavszármazék  $\alpha$ -aminocsoportját *tert*-butiloxikarbonil-csoport (Boc) védi, az aminosavszármazékok oldalláncán a védelem többsége benzil-csoporton (Bzl) alapul;<sup>29</sup>
- Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia: az aminosavszármazék  $\alpha$ -aminocsoportját 9-fluorenilmetiloxikarbonil-csoport (Fmoc) védi, az aminosavszármazékok oldalláncán a védelem *tert*-butil- (<sup>t</sup>Bu), illetve tritil (Trt) típusú csoportokon alapul.<sup>30</sup>

Munkám során az Fmoc/<sup>t</sup>Bu módszert alkalmaztam, így a következőkben ezt fogom részletezni.

Az Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia, amely egy kíméletesebb módszer és az utóbbi időben elterjedtebb, az olyan peptidszekvenciák szintézise esetén különösen előnyös, amelyek olyan aminosavakat tartalmaznak, melyek savas körülmények között érzékenyek az oxidációra és az alkileződésre. Ezen aminosavak a cisztein, a metionin, a triptofán és a tirozin.

Az  $\alpha$ -aminocsoport védelmét ellátó Fmoc-csoport savakkal szemben stabil, azonban bázikus körülmények között labilis, így hasítása a szintézis során bázissal, elsősorban szerves szekunder aminokkal történik. Az Fmoc-csoport bevezetésekor 20-55% piperidint tartalmazott a védőcsoport hasítására szánt elegy, a maradék rész *N,N*-dimetilformamid (DMF) volt (4. ábra). Kísérletek azonban bizonyították, hogy az Fmoc-csoport jelenleg ismert leghatékonyabb hasítóelegye 2% piperidint és 2% 1,8-diazobiciklo[5.4.0]-undek-7-ént (DBU) tartalmazó DMF oldat. A védőcsoport hasítása így gyorsan és nagy hatékonysággal történik még térgátlás esetén is, továbbá a DBU jelenléte csökkenti az enantiomerizációt. A hasítás során dibenzofulvén keletkezik, ami igen reaktív és könnyen képes alkilezni bizonyos aminosavakat, de a piperidinnel stabil adduktot képez, ami ezt megakadályozza. Az adduktképzés a DBU-val nem történik meg, ezért szükséges a hasítóelegybe mindenképpen a piperidin jelenléte is.<sup>31</sup>



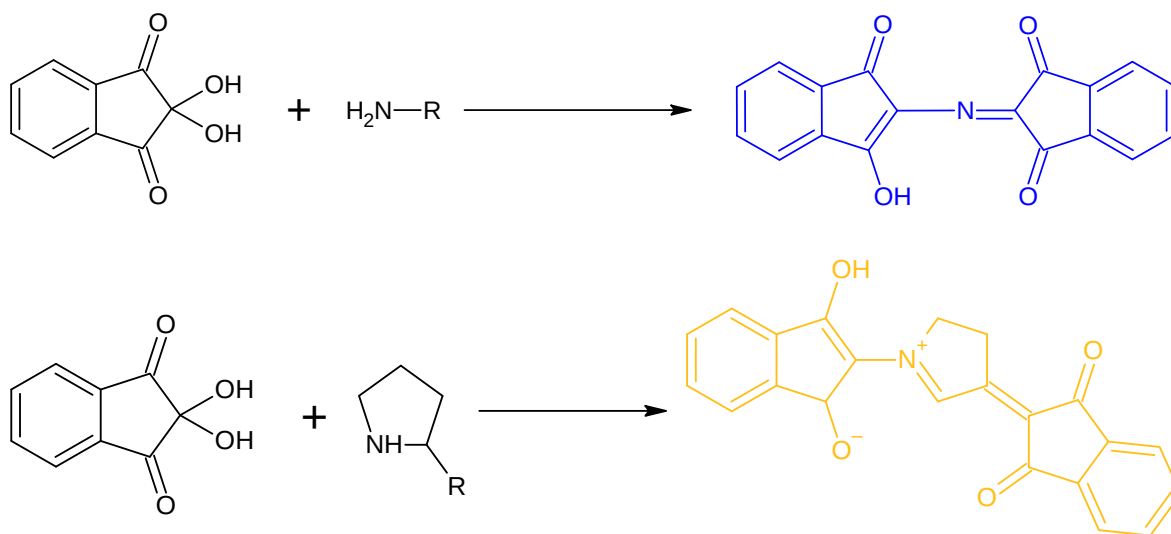
**4. ábra Fmoc-Asn(Trt)-Ser(<sup>t</sup>Bu) Rink Amide MBHA gyanta (a nyilak és a kiemelt kötések a hasításra alkalmas pontokat jelölik)**

A peptidlánc gyantáról való lehasítása az állandó védőcsoportokat is eltávolítja a peptidről. A gyantáról való lehasításhoz savas körülmények szükségesek, ezért trifluorecetsav (TFA) 80-90%-os oldatát használják erre a célra. Az oldalláncok védelmére szolgáló csoportokból reaktív specíesek szabadulhatnak fel, ezért a hasítóelegynek úgynevezett gyökfogókat kell tartalmaznia. Ilyen gyökfogó lehet például a víz vagy a triizopropil-szilán (TIS). Mivel az átmeneti védőcsoport lehasítása során használt anyagok nem hasítják le az állandó védőcsoportokat, illetve fordítva sem, ezért elmondható, hogy az Fmoc védelem ortogonális az oldallánc védelemre, és ezért fontos, hogy még a végső hasítás előtt eltávolítsuk a peptid N-terminális aminosaván lévő Fmoc-ot (**4. ábra**). Ezen stratégiánál is alkalmazható többfajta gyanta attól függően, hogy milyen peptid kerül szintetizálásra és hogy a szintetizált peptid C-terminálisát milyen formában (szabad karboxil vagy savamid) szükséges megkapni. A módszernél alkalmazott legtöbb gyanta alapja polisztirol – 1,4-divinilbenzol kopolimer. A polimer megfelelő funkcionálisációjával, linkerek kapcsolásával hangolható a gyanta savérzékenysége. Az Fmoc stratégia esetén gyakran alkalmazott gyanták a Wang-, a 2-klórtritol-

és a SASRIN gyanta, melyek a C-terminálison karboxilcsoportot, míg a Rink Amid típusú gyanták, amid véget eredményeznek. Munkám során Rink Amid MBHA gyantát használtam, így az általam előállított peptidek mindegyike amid véggel rendelkezik.

## 5.9.2 A kapcsolás végbementének ellenőrzése

A korábbiakban tárgyalt módon SPPS esetén a kapcsolásoknak közel kvantitatív módon kell lejátszódnuk annak érdekében, hogy elkerüljük a hibás, főleg aminosav hiányos szekvenciák keletkezését. Ennek érdekében *Kaiser* és munkatársai<sup>32</sup> kidolgoztak egy módszert, mellyel a gyantáról való lehasítás nélkül, gyorsan ellenőrizhető, hogy egy kapcsolás milyen mértékben játszódott le. A Kaiser- vagy ninhidrin-teszt alapja, hogy a szabad aminos csoportot tartalmazó peptidláncok ninhidrinnel jellegzetes kék színű reakciót adnak (**5. ábra**). A teszt igen érzékeny, már 1% szabad aminos csoport jelenlétében is intenzív kék szín tapasztalható.<sup>32</sup>

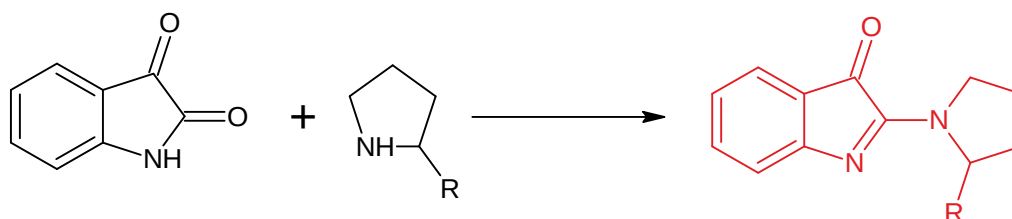


5. ábra Ninhidrin reakciója aminosavakkal (felül) és iminosavakkal (alul)

A teszt során a reakcióedényből eltávolítanak néhány gyantaszemet és egy kémcsőben pár csepp ninhidrin-, fenol- és KCN-oldatot adnak hozzá, majd 3-5 percen keresztül  $104^\circ\text{C}$ -on melegítik azt. A gyanta színe amennyiben sárga marad, a teszt negatív, tehát a reakcióedényben nincs szabad aminos csoport, a kapcsolás lezajlott. Amennyiben azonban a gyanta és a körülötte lévő oldat kék színű lesz, az szabad aminos csoportok jelenlétét mutatja, a teszt pozitív, tehát az aminosav újrakapcsolására van szükség.

Az eredeti Kaiser-teszttel csak primer aminokra való kapcsolást lehet kimutatni. Az iminosavakra, például a prolin és származékaira való kapcsolást az eredeti Kaiser-teszt nem

tudja kimutatni, mivel bár reagálnak a ninhidrinnel, de a képződő vegyület sárga színt ad (5. ábra), amely megegyezik a gyanta színével. *Kaiser* és munkatársai<sup>33</sup> ezért továbbfejlesztették az eredeti tesztet azzal, hogy amennyiben iminosavra való kapcsolás hatékonyságát akarják ellenőrizni, akkor a meglévő teszt oldatok mellé izatint adtak, amivel már látható változást lehet elérni. Pozitív teszt esetén a gyantaszemek vöröses-barna színt adnak, tehát újrakapcsolásra van szükség (6. ábra).<sup>33</sup>



6. ábra Iminosavak reakciója izatinnal

## 6 Célkitűzések

Munkám célja HER2-receptort célzó peptidek konjugálása volt, amelyek alkalmasak lehetnek célzott tumorterápiás kezelésre.

Munkámhoz a már korábban említett *Biri-Kovács* és munkatársai által előállított nagy affinitással és szelektivitással rendelkező HER2-receptort célzó peptidek nyújtották az alapot.<sup>21</sup> Az eredményeik alapján a következő három peptidet választottam ki szintézisre és módosításra:

- KCCYSL-NH<sub>2</sub>;
  - KAAYSL-NH<sub>2</sub>;
  - KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub>.
1. Céлом volt, hogy a kiválasztott hexamer peptideket három-három féle módon konjugáljam daunomicinhez annak érdekében, hogy vizsgáljam különböző katepszin B labilis spacer-ek (távartók) hatását a konjugátumok biológiai aktivitására. Ezek a következők:
    - aminooxiecetsav kapcsolása közvetlenül a peptid N-terminálisán lévő  $\alpha$ -aminocsoporthoz, majd daunomicin konjugálása az aminooxiecetsavhoz;
    - GFLG szekvenciájú spacer beépítése a peptid N-terminálisán lévő  $\alpha$ -aminocsoporton keresztül, a spacer N-terminálisának végén lévő  $\alpha$ -aminocsoporthoz aminooxiecetsav kapcsolása, majd daunomicin konjugálása az aminooxiecetsavhoz;
    - LRRY szekvenciájú spacer beépítése a peptid N-terminálisán lévő  $\alpha$ -aminocsoporton keresztül, a spacer N-terminálisának végén lévő  $\alpha$ -aminocsoporthoz aminooxiecetsav kapcsolása, majd daunomicin konjugálása az aminooxiecetsavhoz.
  2. Céлом volt továbbá, hogy a kiválasztott 12 aminosav hosszú peptid N-terminális végén lévő lizin oldalláncán lévő aminocsoport szerepét vizsgáljam. Ennek érdekében a lizin lecserélését terveztem norleucinra, amely hasonlóan egyenes oldalláncot tartalmaz azonos C-atom számmal, mint a lizin. Illetve a lizin vajsavval történő alkilezését, ami a pozitív töltés megszüntetése mellett a tapasztalatok alapján növeli a konjugátum sejtbejutási képességét. Az így előállított peptidek konjugálását terveztem a fentiekben említett módszerekkel (a GFLG spacer alkalmazását itt nem terveztem kipróbálni, mert a korábbi tapasztalatok alapján a dodekapeptid eleve rossz oldékonysággal rendelkezik). Ezek a következők:
    - aminooxiecetsav kapcsolása közvetlenül a peptid N-terminálisán lévő  $\alpha$ -aminocsoporthoz, majd daunomicin konjugálása az aminooxiecetsavhoz;

- LRRY szekvenciájú spacer beépítése a peptid N-terminálisán lévő  $\alpha$ -aminocsoporton keresztül, a spacer N-terminálisának végén lévő  $\alpha$ -aminocsoporthoz aminooxiécetsav kapcsolása, majd daunomicin konjugálása az aminooxiécetsavhoz.
3. A munkám során továbbá vizsgálni szerettem volna az előállított konjugátumok *in vitro* citosztázisát és sejtfelvételét, illetve a peptidek távtartókkal történt módosításával elért hatásokat is.

## 7 Eredmények

Munkám során a *Célkitűzések* résznek megfelelően HER2-t célzó peptidek szintézise és konjugálása volt a cél. Munkám során előállítottam összesen 12 peptidet, amelyből új, eddig nem vizsgált konjugátumokat hoztam létre. A peptideket részben a kutatócsoportunk korábbi munkája alapján terveztem.<sup>21</sup> Az előállított peptid-konjugátumok hatásosságát több biológiai méréssel vizsgáljuk, többek között meghatározzuk az *in vitro* citosztázisukat MTT-teszt segítségével, továbbá két módszerrel (áramlásos citometria és konfokális mikroszkópia) az *in vitro* sejtbejutásukat.

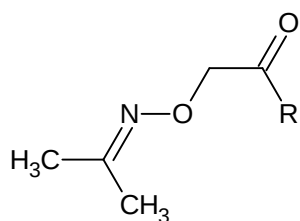
Az ebben a fejezetben használt módszerek pontos leírását a *Kísérleti rész* megfelelő fejezetei tartalmazzák.

Sajnálatos módon a dolgozat leadási határidejéig a biológiai vizsgálatok eredménye nem érkezett meg, mivel a vizsgálatához szükséges sejtek nem nőttek fel. Reményeim szerint ezek az előadásomban már bemutatásra kerülnek. A használni kívánt módszerek pontos leírását azonban a fentebb említett helyen leírtam.

### 7.1 Hexamer irányítórésszel rendelkező konjugátumok (13-18) szintézise

#### 7.1.1 Az aminosavszármazékot tartalmazó peptidek szintézise

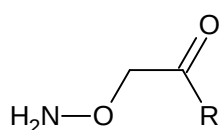
A peptidek szintézisét Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával Fmoc-Rink Amide MBHA gyantán manuális szintézissel végeztem. Az Fmoc-védőcsoport hasítására 2% piperidint és 2% DBU-t tartalmazó DMF oldatot használtam. A kapcsolásokat a gyanta kapacitására számolt 3 ekvivalens aminosavszármazékkal, 3 ekvivalens Oxyma B-vel és 6 ekvivalens DIC alkalmazásával végeztem. Mind a KCCYSL-NH<sub>2</sub>, mind a KAAAYSL-NH<sub>2</sub> szekvenciákat három-három módon szerettem volna konjugálni, így ezek alapján vagy közvetlenül a szekvenciák N-terminálisára kapcsoltam izopropilidén védett aminosavszármazékot, vagy a hexamerekre épített tetramer spacer-ek (GFLG vagy LRRY) N-terminálisára. A kész peptideket 95% trifluorecetsavat, 2,5% vizet és 2,5% triizopropil-szilánt tartalmazó eleggyel hasítottam a gyantáról. A hasítóelegy hatására az aminosavak oldalláncán lévő védőcsoportok is lehasadtak (7. ábra).



- R:
- Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (1)
  - Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (2)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (3)
  - Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (4)
  - Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (5)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (6)

7. ábra Az előállított hexamer irányítórészrel rendelkező védett aminooxiecetsavat tartalmazó peptidek

A nyers peptideket liofilizáltam, majd RP-HPLC segítségével tisztítottam őket. A tiszta peptideket tartalmazó frakciókat liofilizáltam. Az aminooxiecetsav aminocsoportjának védelmére szolgáló izopropilidén csoportot NaOAc-oldatban oldott *O*-metilhidroxilamin hidroklorid segítségével lehasítottam és az elegyet RP-HPLC-val tisztítottam. Az izopropilidén védőcsoport nélküli peptideket ezután liofilizáltam (8. ábra). A tisztítás után nyert peptidek kitermelését 2. táblázat tartalmazza.



- R:
- Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (7)
  - Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (8)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (9)
  - Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (10)
  - Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (11)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (12)

8. ábra Az előállított hexamer irányítórészrel rendelkező szabad aminooxiecetsavat tartalmazó peptidek

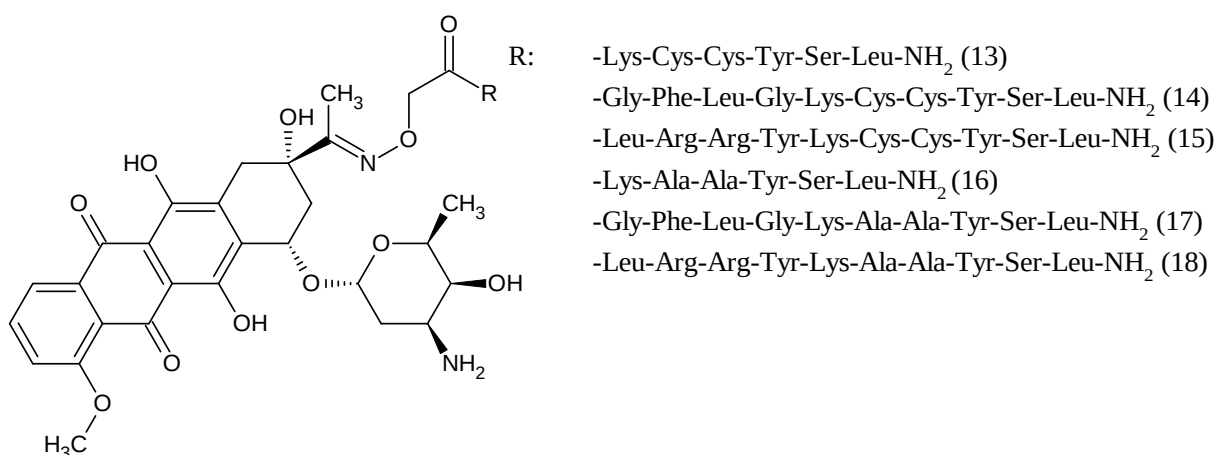
2. táblázat A liofilizálás után kapott peptidek tömege és kitermelése

| Termék és azonosítója                | Tömeg (mg) | Kitermelés (%) <sup>a</sup> |
|--------------------------------------|------------|-----------------------------|
| Aoa-KCCYSL-NH <sub>2</sub> (7)       | 26,0       | 29,6                        |
| Aoa-GFLG-KCCYSL-NH <sub>2</sub> (8)  | 25,0       | 19,3                        |
| Aoa-LRRY-KCCYSL-NH <sub>2</sub> (9)  | 35,4       | 23,0                        |
| Aoa-KAAYSL-NH <sub>2</sub> (10)      | 24,1       | 29,8                        |
| Aoa-GFLG-KAAYSL-NH <sub>2</sub> (11) | 20,0       | 16,3                        |
| Aoa-LRRY-KAAYSL-NH <sub>2</sub> (12) | 29,3       | 20,0                        |

<sup>a</sup>A szintézis során használt gyanta mennyiségére és kapacitására számított kitermelés; számolásánál nem vettem figyelembe a Kaiser-teszt során eltávolított gyanta mennyiségét, sem azt, hogy a liofilizált peptidek vizet tartalmaznak

### 7.1.2 Daunomicin konjugálása az aminosavakkal

A tisztított peptideket NaOAc-oldatban oldottam és a peptidek moláris tömegére számolt 1,1 ekvivalens mennyiségű daunomicint adtam hozzájuk. A konjugálást 12-24 óra alatt végeztem szobahőmérsékleten. A konjugálás lejátszódása után az elegyet közvetlenül RP-HPLC-vel tisztítottam. A tiszta konjugátumot tartalmazó frakciókat liofilizáltam. A konjugátumok szerkezetét a **9. ábra** mutatja be.



**9. ábra** Az előállított hexamer irányítórészrel rendelkező konjugátumok

A tisztított konjugátumokat tömegspektrometriával és analitikai RP-HPLC-vel azonosítottam. A tisztított termékek analitikai adatait, illetve a bemérésre számolt kitermelésüket a **3. táblázat** tartalmazza.

**3. táblázat Az előállított hexamer irányítórésszel rendelkező konjugátumok adatainak összefoglalása**

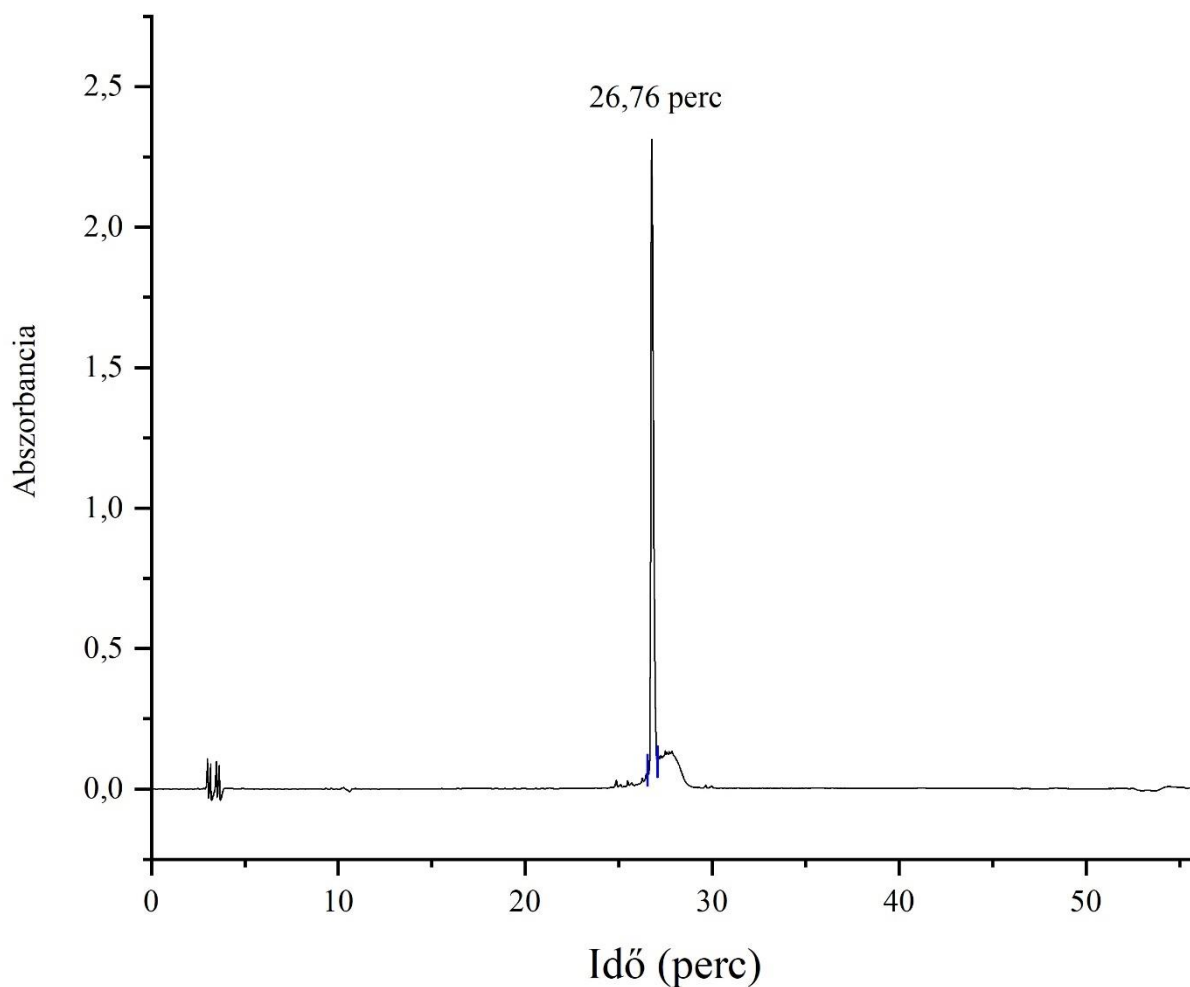
| <b>Termék és azonosítója</b>                       | <b><math>M_{\text{számolt}}</math><br/>(g/mol)</b> | <b><math>M_{\text{mért}}</math><br/>(g/mol)</b> | <b><math>R_t</math><br/>(perc)</b> | <b>Kitermelés<br/>(%)<sup>a</sup></b> |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Dau=Aoa-KCCYSL-NH<sub>2</sub><br/>(13)</b>      | 1296,50                                            | 1294,20                                         | 26,76                              | 43,1                                  |
| <b>Dau=Aoa-GFLG-KCCYSL-NH<sub>2</sub><br/>(14)</b> | 1670,70                                            | folyamatban <sup>b</sup>                        |                                    |                                       |
| <b>Dau=Aoa-LRRY-KCCYSL-NH<sub>2</sub><br/>(15)</b> | 1884,85                                            | folyamatban <sup>b</sup>                        |                                    |                                       |
| <b>Dau=Aoa-KAAYSL-NH<sub>2</sub><br/>(16)</b>      | 1232,56                                            | 1232,38                                         | 26,53                              | 87,4                                  |
| <b>Dau=Aoa-GFLG-KAAYSL-NH<sub>2</sub><br/>(17)</b> | 1606,76                                            | folyamatban <sup>b</sup>                        |                                    |                                       |
| <b>Dau=Aoa-LRRY-KAAYSL-NH<sub>2</sub><br/>(18)</b> | 1820,91                                            | folyamatban <sup>b</sup>                        |                                    |                                       |

<sup>a</sup>A konjugáláshoz bemért peptid mennyiségére és kapacitására számolt kitermelés

<sup>b</sup>A konjugálás során leszakadt a daunomicin cukorrésze vagy a tisztítás során az anyag nem érte el a biológiai vizsgálatokhoz szükséges tisztaságot

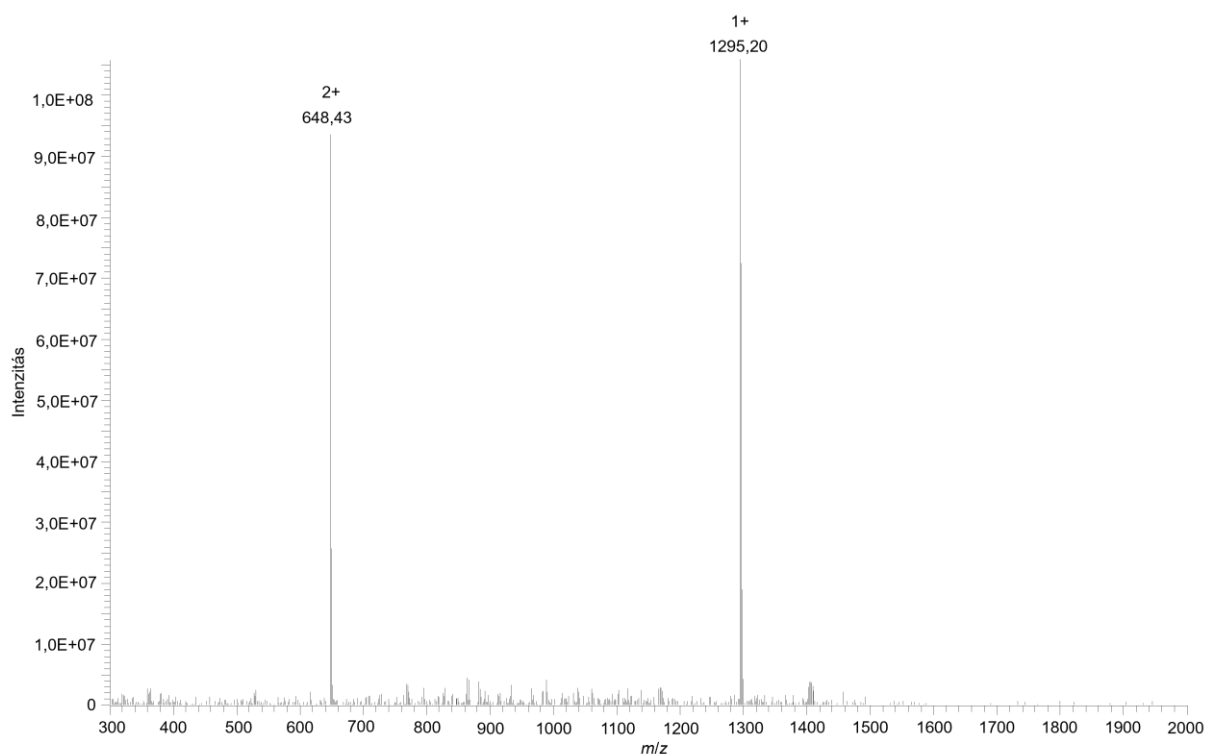
A továbbiakban a biológiai kísérletekhez szükséges tisztasággal rendelkező konjugátumok felvett tömegspektrumai, analitikai kromatogramjai és információi szerepelnek.

### 7.1.3 Dau=Aoa-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (13)



10. ábra A Dau=Aoa-KCCYSL-NH<sub>2</sub> analitikai kromatogramja

A kromatogram alapján az anyag nem éri el a 95%-os tisztaságot. A konjugátum után eluálódó komponens azonban a tömegspektrometria mérések alapján megegyezik a konjugátummal. A tömegspektrometriai mérések alapján feltehetőleg diszulfidhíd okozza ezt a fajta eluálódást.



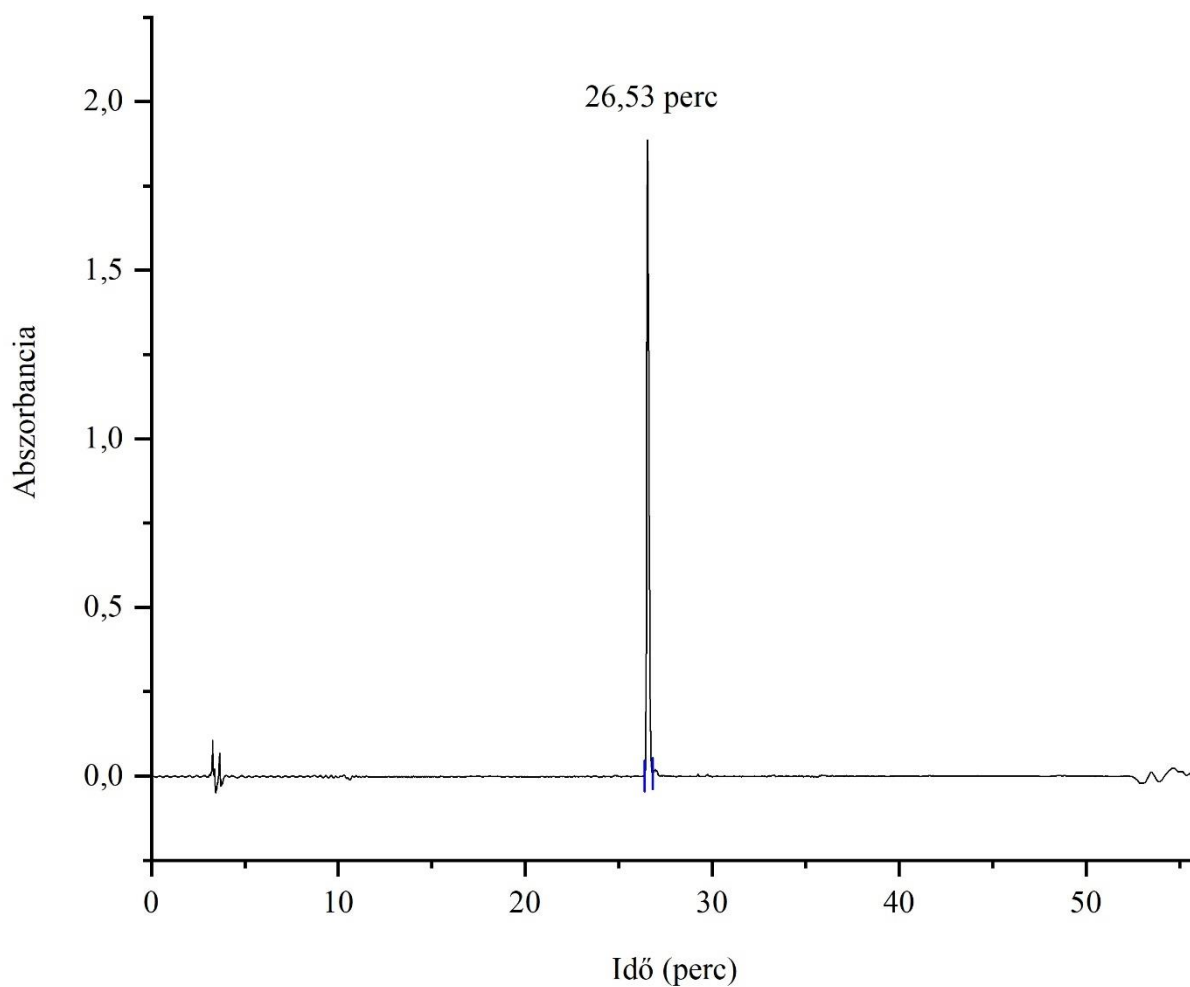
**11. ábra A Dau=Aoa-KCCYSL-NH<sub>2</sub> tömegspektruma**

A konjugátum várt tömege:  $[M+H]^+ = 1297,50 \text{ g/mol}$

A konjugátum mért tömege:  $[M+H]^+ = 1295,20 \text{ g/mol}$

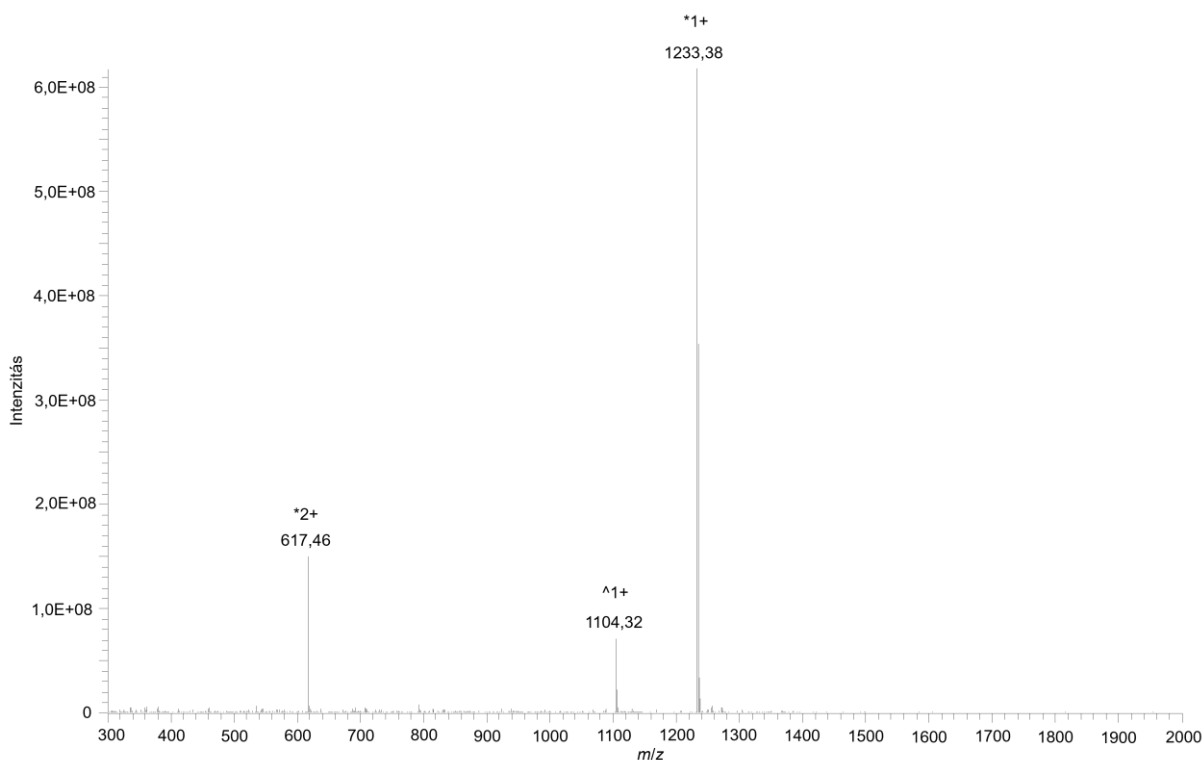
A tömegspektrum alapján a konjugálás során diszulfidhíd keletkezett a molekulában. Mivel a közvetlenül egymás mellett lévő ciszteinek térgátlás miatt ritkán képeznek diszulfidhidat, ezért feltételezhetőleg dimer molekula keletkezett. Tapasztalataink alapján a diszulfid dimerek ugyanolyan tömegspektrumot mutatnak, csak eltérő töltöttséggel. A feltevés igazolására pontosabb tömegspektrometriai mérések szükségesek, melyek jelenleg nem állnak a rendelkezésünkre.

#### 7.1.4 Dau=Aoa-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH<sub>2</sub> (16)



12. ábra A Dau=Aoa-KAAYSL-NH<sub>2</sub> analitikai kromatogramja

A felvett kromatogram alapján a konjugátum megfelelő tisztaságú a biológiai vizsgálatok elvégzésére, tisztasága 98,42%.



**13. ábra A Dau=Aoa-KAAYSL-NH<sub>2</sub> tömegspektruma**

A konjugátum várt tömege:  $[M+H]^+ = 1233,56 \text{ g/mol}$

A konjugátum mért tömege:  $[M+H]^+_1 = 1233,38 \text{ g/mol} (*)$

$[M+H]^+_2 = 1104,32 \text{ g/mol} (^)$

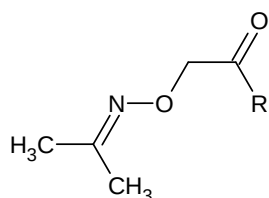
A tömegspektrométerben műtermék keletkezését tapasztaltam, a mérés során leszakadt a daunomicin cukorrésze.<sup>34</sup>

## 7.2 Dodekamer irányítórésszel rendelkező konjugátumok (31-36) szintézise

### 7.2.1 Az aminosavszármazékot tartalmazó peptidek szintézise

A peptidek szintézisét Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával Fmoc-Rink Amide MBHA gyantán részben manuális szintézissel, részben peptidszintetizátor segítségével végeztem. Az Fmoc-védőcsoport hasítására módszertől függetlenül 2% piperidint és 2% DBU-t tartalmazó DMF oldatot használtam. Manuális szintézis esetén a tizenegyedik aminosavszármazék kapcsolásától a hasítóelegy oldószere 1:2 arányban tartalmazott DMSO-t és DMF-et. A kézi szintézis esetén a gyanta kapacitására számolt 5 ekvivalens aminosavszármazékot, 5 ekvivalens Oxyma B-t és

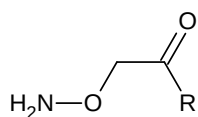
10 ekvivalens DIC-t használtam. A szintetizátor a kapcsolásokat a gyanta kapacitására számolt 3 ekvivalens aminosavszármazékkal, 3 ekvivalens Oxyma Pure és 6 ekvivalens DIC alkalmazásával végezte. A kész peptideket 95% trifluoecetsavat, 2,5% vizet és 2,5% triizopropil-szilánt tartalmazó eleggyel hasítottam a gyantáról. A hasítóelegy hatására az aminosavak oldalláncán lévő védőcsoportok is lehasadtak (**14. ábra**).



- R:
- Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (19)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (20)
  - Nle-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (21)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Nle-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (22)
  - Lys(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (23)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (24)

**14. ábra** Az előállított dodekamer irányítórészrel rendelkező védett aminooxiacetsavat tartalmazó peptidek

A nyers peptideket liofilizáltam, majd RP-HPLC segítségével tisztítottam őket. A tiszta peptideket tartalmazó frakciókat liofilizáltam. Az aminooxiacetsav aminocsoportjának védelmére szolgáló izopropilidén csoportot NaOAc-oldatban oldott *O*-metilhidroxilamin hidroklorid segítségével lehasítottam és az elegyet RP-HPLC-vel tisztítottam. Az izopropilidén védőcsoport nélküli peptideket ezután liofilizáltam (**15. ábra**).



- R:
- Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (25)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (26)
  - Nle-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (27)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Nle-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (28)
  - Lys(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (29)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (30)

**15. ábra** Az előállított dodekamer irányítórészrel rendelkező szabad aminooxiacetsavat tartalmazó peptidek

A tisztítás után nyert peptidek kitermelését a **4. táblázat** tartalmazza.

**4. táblázat** A liofilizálás után kapott peptidek tömege és kitermelése

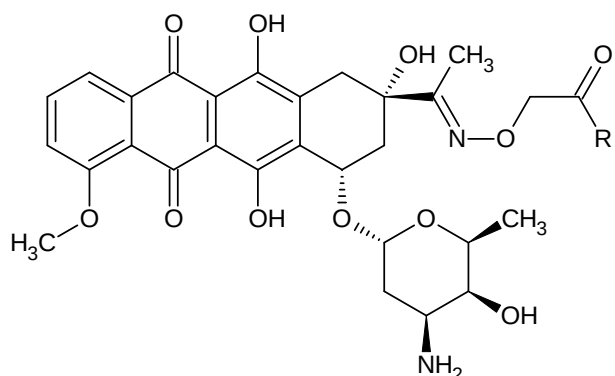
| Termék és azonosítója                                                                       | Tömeg (mg) | Kitermelés (%) <sup>a</sup> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------|
| <b>Aoa-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(25)</b>                                       | 54,9       | 19,3                        |
| <b>Aoa-LRRY-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(26)</b>                                  | 63,4       | 21,0                        |
| <b>Aoa-Nle-AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(27)</b>                                   | 57,9       | 27,4                        |
| <b>Aoa-LRRY-Nle-AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(28)</b>                              | 42,8       | 14,3                        |
| <b>Aoa-K(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(29)</b>      | 46,1       | 20,5                        |
| <b>Aoa-LRRY-K(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(30)</b> | 38,9       | 12,4                        |

<sup>a</sup>A szintézis során használt gyanta mennyiségére és kapacitására számított kitermelés; számolásánál nem vettem figyelembe a Kaiser-teszt során eltávolított gyanta mennyiségét, sem azt, hogy a liofilizált peptidek vizet tartalmaznak

## 7.2.2 Daunomicin konjugálása az aminosxiacetilezett peptidekhez

A tisztított peptideket NaOAc-oldatban oldottam és a peptidek moláris tömegére számolt 1,1 ekvivalens mennyiségű daunomicint adtam hozzájuk. A konjugálást 12-24 óra alatt végeztem szobahőmérsékleten. A konjugálás lejátszódása után az elegyeket RP-HPLC-vel tisztítottam. A tiszta konjugátumot tartalmazó frakciókat liofilizáltam. A konjugátumok szerkezetét a **16. ábra** mutatja be.

A tisztított konjugátumokat tömegspektrometriával és analitikai RP-HPLC-vel azonosítottam. A tisztított termékek analitikai adatait, illetve a bemérésre számolt kitermelésüket az **5. táblázat** tartalmazza.



- R:
- Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (31)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (32)
  - Nle-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (33)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Nle-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (34)
  - Lys(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (35)
  - Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (36)

16. ábra Az előállított dodekamer irányítórészrel rendelkező konjugátumok

5. táblázat Az előállított dodekamer irányítórészrel rendelkező konjugátumok adatainak összefoglalása

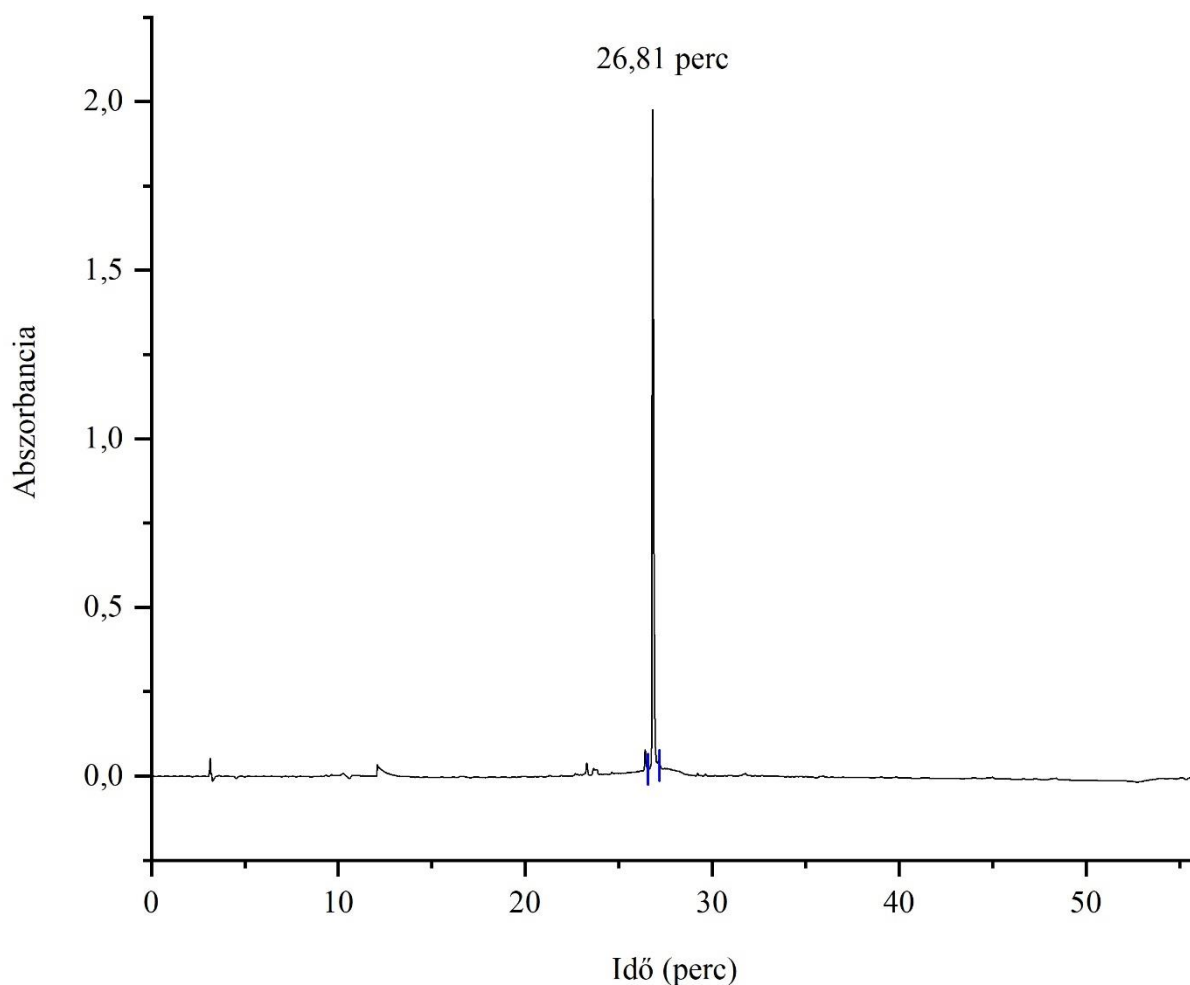
| Termék és azonosítója                                                                    | $M_{\text{számolt}}$<br>(g/mol) | $M_{\text{mért}}$<br>(g/mol) | $R_t$<br>(perc) | Kitermelés<br>(%) <sup>a</sup> |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------|--------------------------------|
| <b>Dau=Aoa-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br>(31)                                       | 1927,85                         | 1927,37                      | 26,81           | 85,0                           |
| <b>Dau=Aoa-LRRY-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br>(32)                                  | 2516,20                         | 2516,64                      | 25,16           | 70,2                           |
| <b>Dau=Aoa-Nle-AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br>(33)                                   | 1912,84                         | 1912,54                      | 30,87           | 92,5                           |
| <b>Dau=Aoa-LRRY-Nle-AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br>(34)                              | 2501,19                         | folyamatban <sup>b</sup>     |                 |                                |
| <b>Dau=Aoa-K(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br>(35)      | 1997,89                         | folyamatban <sup>b</sup>     |                 |                                |
| <b>Dau=Aoa-LRRY-K(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br>(36) | 2586,24                         | folyamatban <sup>b</sup>     |                 |                                |

<sup>a</sup>A konjugáláshoz bemért peptid mennyiségére számolt kitermelés

<sup>b</sup>A konjugálás során leszakadt a daunomicin cukorrésze vagy a tisztítás során az anyag nem érte el a biológiai vizsgálatokhoz szükséges tisztaságot

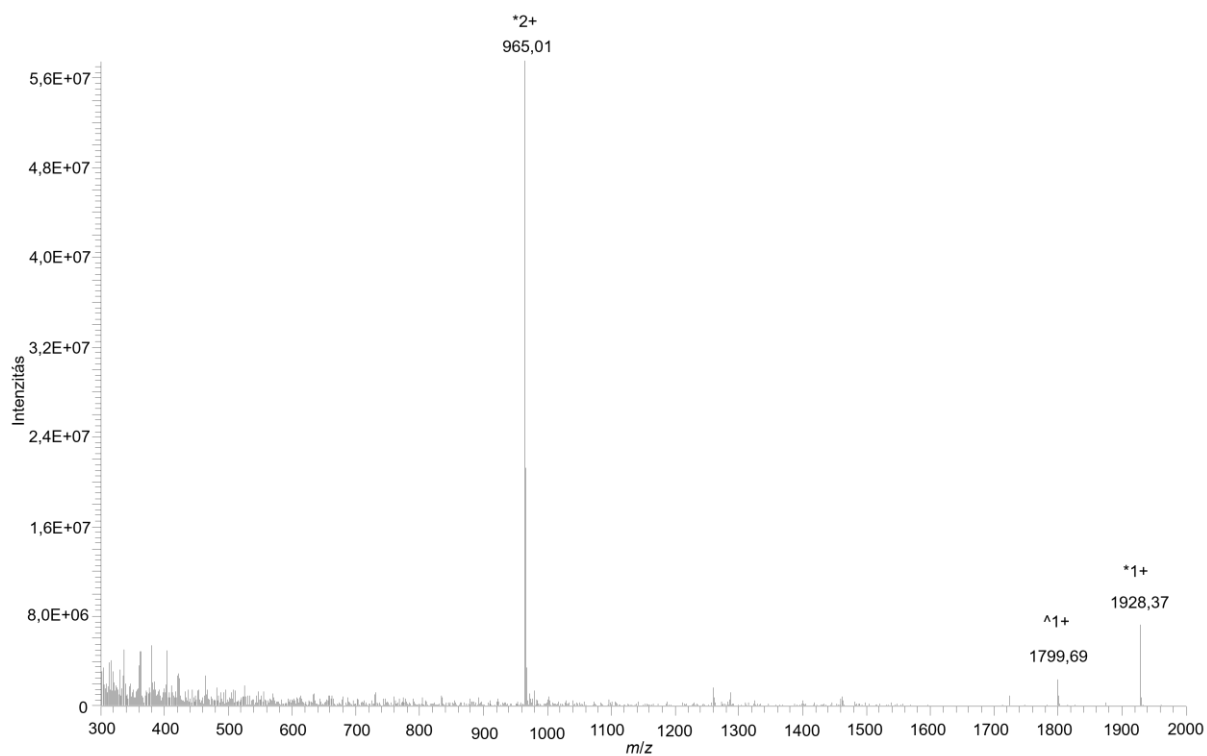
A továbbiakban a biológiai kísérletekhez szükséges tisztasággal rendelkező konjugátumok felvett tömegspektrumai, analitikai kromatogramjai és információi szerepelnek.

### 7.2.3 Dau=Aoa-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (31)



17. ábra A Dau=Aoa-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub> analitikai kromatogramja

A felvett kromatogram alapján a konjugátum megfelelő tisztaságú a biológiai vizsgálatok elvégzéséhez, tisztasága 95,39%.



**18. ábra A Dau=Aoa-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub> tömegspektruma**

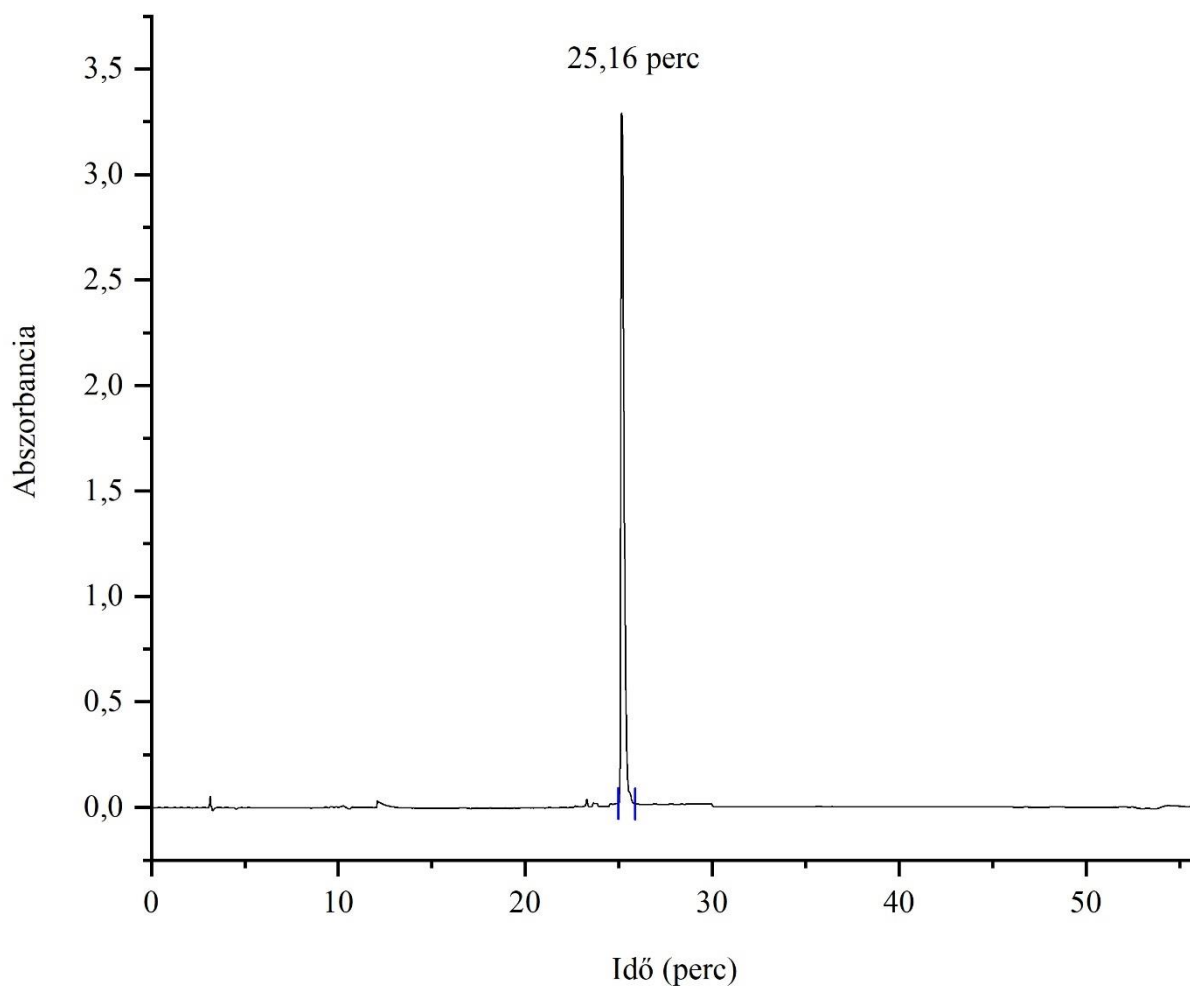
A konjugátum várt tömege:  $[M+H]^+ = 1928,85 \text{ g/mol}$

A konjugátum mért tömege:  $[M+H]^+_1 = 1928,37 \text{ g/mol} (*)$

$[M+H]^+_2 = 1799,69 \text{ g/mol} (^)$

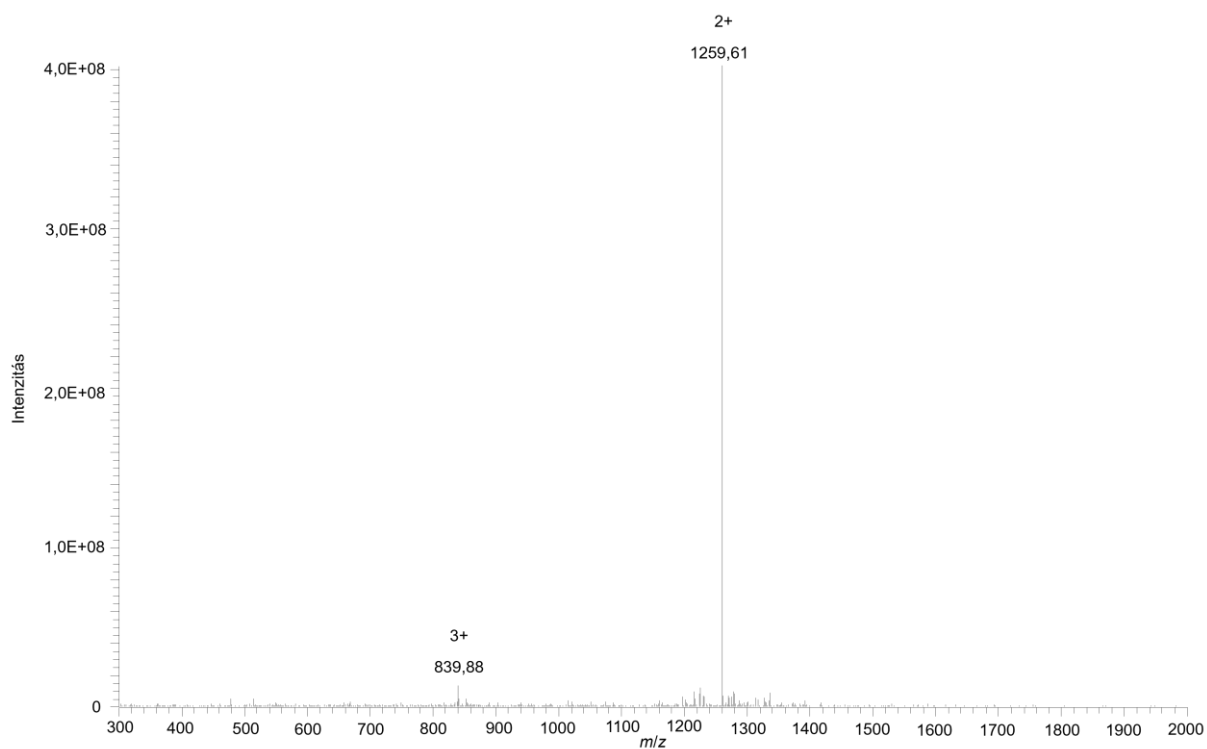
A tömegspektrométerben műtermék keletkezését tapasztaltam, a mérés során leszakadt a daunomicin cukorrésze.<sup>34</sup>

#### 7.2.4 Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub> (32)



19. ábra A Dau=Aoa-LRRY-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub> analitikai kromatogramja

A felvett kromatogram alapján a konjugátum megfelelő tisztaságú a biológiai vizsgálatok elvégzéséhez, tisztasága 98,29%.



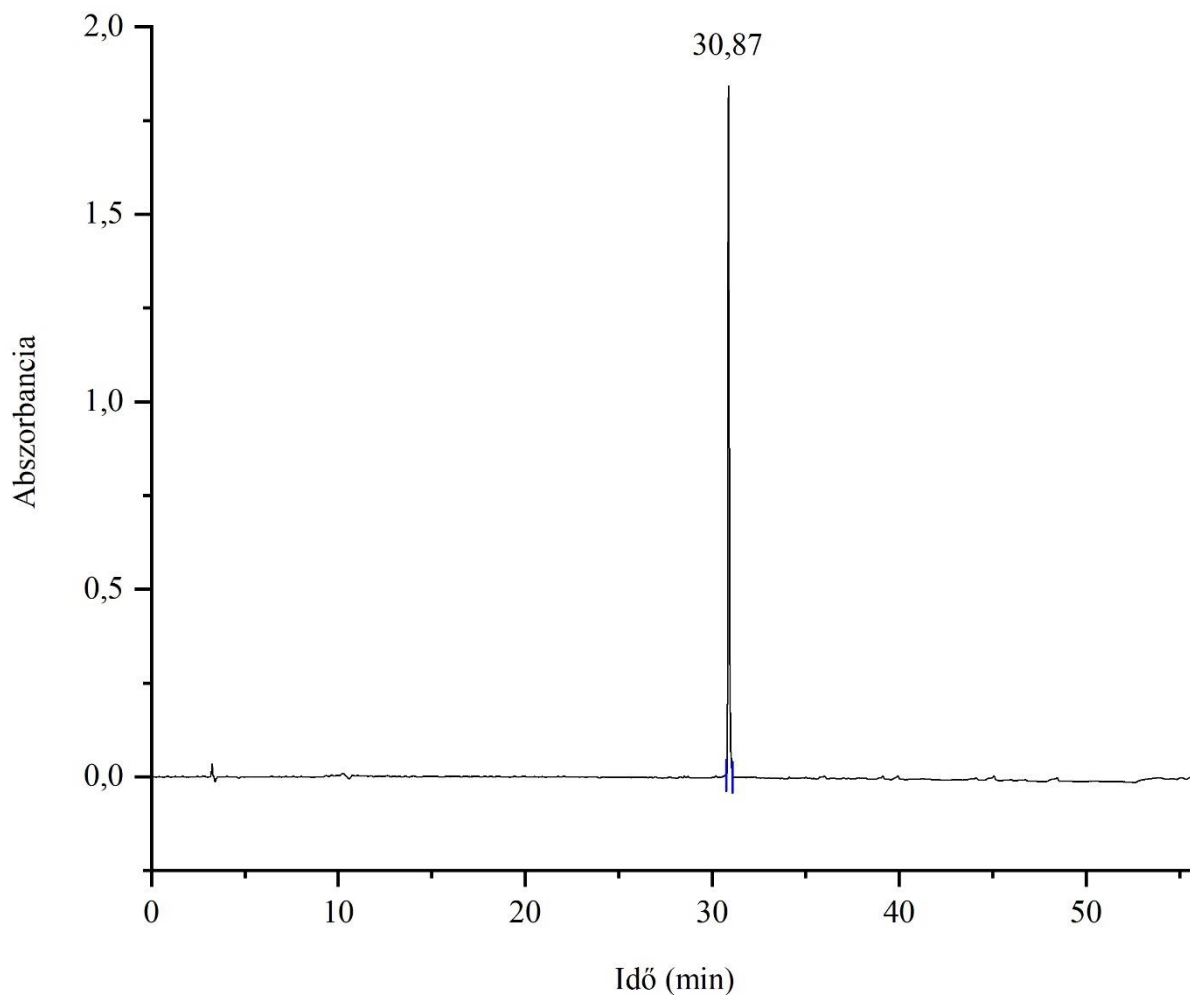
**20. ábra A Dau=Aoa-LRRY-KAAYSLGYNPT-NH<sub>2</sub> tömegspektruma**

A konjugátum várt tömege:  $[M+H]^+ = 2517,20 \text{ g/mol}$

A konjugátum mért tömege:  $[M+H]^+ = 2517,64 \text{ g/mol}$

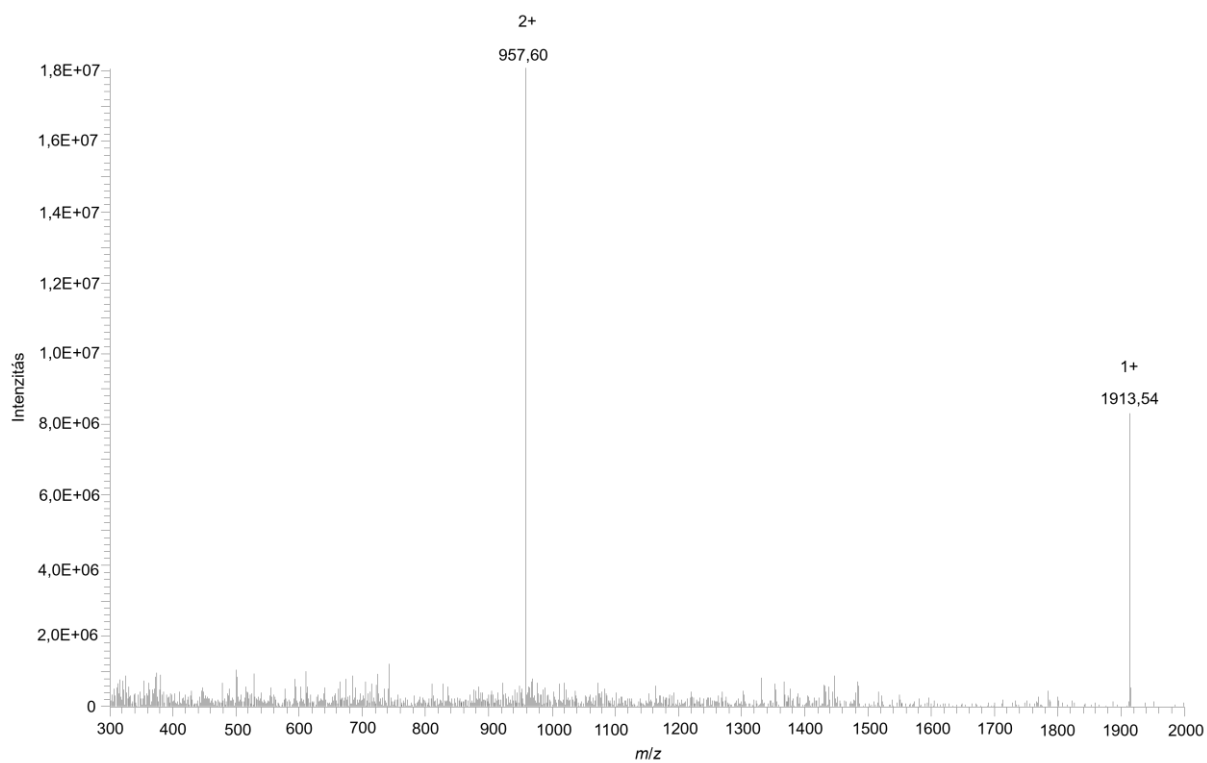
A tömegspektrum is igazolta a várt anyag tisztaságát.

**7.2.5 Dau=Aoa-Nle-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH<sub>2</sub>**  
**(33)**



**21. ábra A Dau=Aoa-Nle-AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub> analitikai kromatogramja**

A felvett kromatogram alapján a konjugátum megfelelő tisztaságú a biológiai vizsgálatok elvégzéséhez, tisztasága 98,83%.



**22. ábra A Dau=Aoa-Nle-AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub> tömegspektruma**

A konjugátum várt tömege:  $[M+H]^+ = 1913,84 \text{ g/mol}$

A konjugátum mért tömege:  $[M+H]^+ = 1913,54 \text{ g/mol}$

A tömegspektrum alapján a várt anyag tiszta.

## 8 Kísérleti rész

### 8.1 Felhasznált anyagok

Munkám során a felhasznált aminosavszármazékokat és a gyantát az Iris Biotech GmbH-től (Marktrewitz, Németország) szereztük be. A kapcsolószereket, hasítószereket és gyökfogókat a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország), az *N,N*-dimetil-formamidot és a diklórmétánt a Molar Chemicals Kft.-től (Budapest, Magyarország), a HPLC-hez használt acetonitrilt a VWR International Kft.-től (Debrecen, Magyarország) vásároltuk. A daunomicin pedig az IVAX (Budapest, Magyarország) ajándéka volt.

### 8.2 Általános eljárás

#### 8.2.1 Peptidszintézis

A dolgozatomban szereplő peptidek egy részét manuálisan, egy részét pedig peptidszintetizátor alkalmazásával szilárdfázisú peptidszintézis segítségével állítottam elő. A manuális szintézis során a **6. táblázat** által bemutatott protokollt követtem az aminosavszármazékok és az izopropilidén védett aminooxiecetsav kapcsolása során.

A Kaiser-teszt során a reakcióedényből kivett pár szem gyantához a következőkből adtam hozzá pár cseppet: ninhidrin-, fenol- és KCN-oldat. Prolinra való kapcsolás esetén pedig izatin-oldatot is adtam a gyantaszemekhez. A felsorolt oldatok a következő módon készültek:

- ninhidrin-oldat: 2,5 g ninhidrin-t oldottam 50 ml absz. EtOH-ban
- fenol-oldat: 40 g fenolt oldottam 10 ml absz. EtOH-ban
- KCN-oldat: 2 ml 0,01 M KCN-oldatot hígítottam 98 ml piperidinnel
- Izatin-oldat: benzilalkoholban oldottam 3 m/V% izatint és 5 m/V% Boc-Phe-OH-t

A gyantaszemeket tartalmazó edényt az oldatok hozzáadása után 104°C-on 3-5 percen keresztül melegítettem. A reakcióidő letelte után, ha a gyantaszemek sárgák maradtak, akkor a gyantaszemek nem tartalmaznak szabad aminocsoportot, ha megkékültek vagy izatin-oldat esetén megbarnultak, akkor a gyantaszemek tartalmaznak szabad aminocsoportot. A hasítás ellenőrzése során amennyiben nem tapasztaltam kék vagy izatin-oldat esetén barna színt, akkor a hasítást megismételtem, ha másodszorra is az előzőekben leírtat tapasztaltam, akkor pedig az újbóli hasításhoz használt oldatot úgy módosítottam, hogy a hasítóelegy a 2-2% piperidin-DBU

mellett 32% DMSO-t és 64% DMF-et tartalmazott. Az előbb említett hasítóelegyet csak olyan szekvenciák esetén alkalmaztam, melyek nem tartalmaztak ciszteint.

**6. táblázat A manuális szintézis során alkalmazott protokoll**

| Művelet               | Reagensek, oldószer                             | Időtartam (perc) |
|-----------------------|-------------------------------------------------|------------------|
| Mosás                 | DMF                                             | 3 x 0,5-1        |
| Fmoc-csoport hasítása | Piperdin / DBU / DMF<br>(2- / 2- / 96%)         | 2 + 2 + 5 + 10   |
| Mosás                 | DMF                                             | 3 x 0,5-1        |
|                       | DCM                                             | 2 x 0,5-1        |
| Kaiser-teszt          | Ninhidrin-, fenol-, KCN-oldat (izatin oldat)    | 3-5              |
| Mosás                 | DMF                                             | 3 x 0,5-1        |
| Kapcsolás             | Aaa / Oxyma B / DIC<br>(3- / 3- / 6 ekvivalens) | 60-90            |
| Mosás                 | DMF                                             | 3 x 0,5-1        |
|                       | DCM                                             | 3 x 0,5-1        |
| Kaiser-teszt          | Ninhidrin-, fenol-, KCN-oldat (izatin oldat)    | 3-5              |

A munkám során alkalmazott peptidszintetizátor egy Tecan add-on Peptide Synthesizer (Solid Science Kft., Budapest, Magyarország) rövidítve TaPSy volt.<sup>35</sup> A peptidszintetizátorral végzett szintézis során a Kiss és munkatársai<sup>35</sup> által írt cikkben szereplő protokollt használtam (7. táblázat).

Az acetilezésre azért volt szükség, mert a szintetizátor alkalmazása esetén nem volt mód a kapcsolások ellenőrzésére. Az acetilezéssel így elkerüljük az aminosavhiányos szekvenciák keletkezését, továbbá segíti a rövidebb (nem teljes) szekvenciák elválását a teljes hosszában megépült peptidtől a kromatográfiás tisztítás során.

**7. táblázat A peptidszintetizátor által alkalmazott protokoll**

| Művelet                 |               | Reagensek, oldószerek                              | Időtartam (perc) |
|-------------------------|---------------|----------------------------------------------------|------------------|
| Inicializáció           | Duzzasztás    | DMF                                                | 30               |
|                         | Fmoc hasítása | Piperdin / DBU / DMF<br>(2- / 2- / 96%)            | 4 x 1            |
|                         | Mosás         | DMF                                                | 6 x 1            |
| Kapcsolás               |               | Aaa / Oxyma Pure / DIC<br>(3- / 3- / 6 ekvivalens) | 45               |
| Mosás                   |               | DMF                                                | 3 x 1            |
| Acetilezés <sup>a</sup> |               | Ac <sub>2</sub> O / DIPEA                          | 10               |
| Mosás <sup>a</sup>      |               | DMF                                                | 3 x 1            |
| Fmoc-csoport hasítása   |               | Piperdin / DBU / DMF<br>(2- / 2- / 96%)            | 2 x 1            |
| Mosás                   |               | DMF                                                | 6 x 1            |

<sup>a</sup>Az eredeti protokoll nem tartalmazza ezt a lépést

## 8.2.2 Peptid hasítás a gyantáról

Az elkészült N-terminálisán izopropilidén védett aminosavakat tartalmazó peptideket a gyantáról 4,50 ml TFA-t, 0,25 ml TIS-t és 0,25 ml H<sub>2</sub>O-t tartalmazó oldattal hasítottam le. A gyantát az oldatban 1,5 órán át hagytam keveredni szobahőmérsékleten. A reakcióidő letelte után a hasítóelegyet egy 0°C-os dietil-étert tartalmazó edénybe szűrtem. Az éterben kicsapódott peptidet ezután 5 percen keresztül 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam. Az étert a leülepedett peptidről dekantáltam. A peptidre mosás céljából újabb adag hideg étert öntöttem és felfuszpendáltattam benne, majd az előzőekben leírt módon centrifugáltam azt. A mosási lépést még kétszer megismételtem. Az utolsó dekantálás után a peptidet levegőn hagytam az étertől megszáradni. Száradás után a peptidet 10%-os ecetsavban oldottam, majd folyékony nitrogénben megfagyasztottam az oldatot. A fagyasztott peptid oldatot ezután liofilizáltam.

### 8.2.3 Preparatív RP-HPLC kromatográfia

A liofilizáló készülékről eltávolított nyers peptideket fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) rendszerrel tisztítottam. Ehhez egy KNAUER RP-HPLC rendszert (Knauer GmbH, Bad Homburg, Németország) használtam:

- D-14163 típusú injektor,
- 2 db K120 típusú pumpa,
- Nagynyomású keverőegység,
- K2501 típusú monokromátoros UV-detektor,
- Adatgyűjtő egység.

Az elválasztás során az alábbi oldatösszetételeket használtam:

- A eluens: 0,1% TFA, 99,9% desztillált víz
- B eluens: 0,1% TFA, 99,9% acetonitril

A tisztításhoz egy Phenomenex Luna 10 µm C18(2) 100 Å 250 x 21,2 mm preparatív oszlopot használtam 10 ml/perces áramlási sebességgel. A detektálást 220 nm hullámhosszúságon végeztem. Az alkalmazott gradiens a következő volt:

|          |        |
|----------|--------|
| 0. perc  | 5% B   |
| 15. perc | 5% B   |
| 25. perc | 20% B  |
| 65. perc | 40% B  |
| 75. perc | 60% B  |
| 76. perc | 100% B |
| 86. perc | 100% B |
| 87. perc | 5% B   |
| 92. perc | 5% B   |

Az egyes nyers peptideknél az alkalmazott módszert az első futtatás után az adott anyagra optimalizáltam a tisztítási folyamat meggyorsítására. Az izopropilidén védelem hasítása utáni tisztításának és a konjugátumok tisztításának gradiensét az általános eljárás megfelelő fejezetében (8.2.6 *Izopropilidén védőcsoport eltávolítása aminooxiecetsavat tartalmazó peptidekről* és 8.2.7 *Daunomicin konjugálása*) írtam le.

### 8.2.4 Analitikai RP-HPLC kromatográfia

A tisztított peptidek és konjugátumok analíziséhez analitikai RP-HPLC segítségét is igénybe vettem. Az analitikai kromatográfiához is egy KNAUER RP-HPLC rendszert (Knauer GmbH, Bad Homburg, Németország) használtam:

- D-14163 típusú injektor,
- 2 db Azura P 2.1S típusú pumpa,
- DYNAMIC MIXING CHAMBER (dinamikus keverőcella),
- Azura UVD 2.1S típusú monokromátoros UV-detektor,
- Adatgyűjtő egység.

Az elválasztás során az alábbi oldatösszetételeket használtam:

- A eluens: 0,1% TFA, 99,9% desztillált víz
- B eluens: 0,1% TFA, 99,9% acetonitril-desztillált víz (80:20 *V/V*%)

A tisztításhoz egy Phenomenex Aeris PEPTIDE 3,6  $\mu\text{m}$  XB-C18 100 Å 250 x 4,6 mm analitikai oszlopot használtam 1 ml/perces áramlási sebességgel. A detektálást 220 nm hullámhosszúságon végeztem. Az alkalmazott gradiens egységesen a következő volt:

|          |       |
|----------|-------|
| 0. perc  | 5% B  |
| 5. perc  | 5% B  |
| 50. perc | 90% B |
| 51. perc | 5% B  |
| 56. perc | 5% B  |

## 8.2.5 Tömegspektrometria

A tisztítások során nyert frakciók azonosítására tömegspektroszkópiás méréseket végeztem. A méréshez elektropray ionizációs (ESI-MS) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus tömegspektroszkópot (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) használtam 300-2000 *m/z* tartományban. A méréshez az anyagokat acetonitril-víz 1-1 arányú elegyében oldottam úgy, hogy az anyagra nézve az oldat 0,5 mg/ml-es legyen. Az analitikai HPLC-vel felvett kromatogramok (vak futtatással korrigálva), illetve az MS készülékkel felvett tömegspektrumok az *Eredmények* megfelelő fejezeteiben találhatók.

## 8.2.6 Izopropilidén védőcsoport eltávolítása aminosavakat tartalmazó peptidekről

Az izopropilidén védett aminosavakat tartalmazó peptidekről a konjugálás előtt az izopropilidén védőcsoportot el kell távolítani. A védőcsoport hasításához az alábbi eljárást alkalmaztam:

- Az előtisztított termékből 10 mg/ml-es oldatot készítettem NaOAc-oldat (pH=5,08) segítségével és az oldathoz annyi *O*-metilhidroxilamin hidrokloridot adtam, hogy arra nézve az oldat 1 M-os legyen.

- Az elegyet ezután szobahőmérsékleten 1 órán keresztül kevertettem.

A reakcióidő letelte után az elegyet preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam a reakcióban keletkező melléktermékektől a következő egységesen alkalmazott gradiens elúcióval:

|          |        |
|----------|--------|
| 0. perc  | 5% B   |
| 15. perc | 5% B   |
| 16. perc | 100% B |
| 36. perc | 100% B |
| 37. perc | 5% B   |
| 42. perc | 5% B   |

A peptidet tartalmazó frakciókat ezután liofilizáltam.

### 8.2.7 Daunomicin konjugálása

Az izopropilidén védőcsoport nélküli peptidet NaOAc-oldatban (pH=5,08) oldottam úgy, hogy a peptidre nézve az oldat koncentrációja 10 mg/ml-es legyen. Az oldathoz ezután a peptidre nézve 1,1 ekvivalens mennyiségű daunomicint adtam. Az elegyet ezután szobahőmérsékleten 12-24 órán át kevertettem. A reakció előrehaladtát analitikai HPLC-vel követtem. A reakció befejeződése után az elegyet preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam a következő gradiens szerint:

|          |        |
|----------|--------|
| 0. perc  | 5% B   |
| 15. perc | 5% B   |
| 25. perc | 20% B  |
| 65. perc | 40% B  |
| 75. perc | 60% B  |
| 76. perc | 100% B |
| 86. perc | 100% B |
| 87. perc | 5% B   |
| 92. perc | 5% B   |

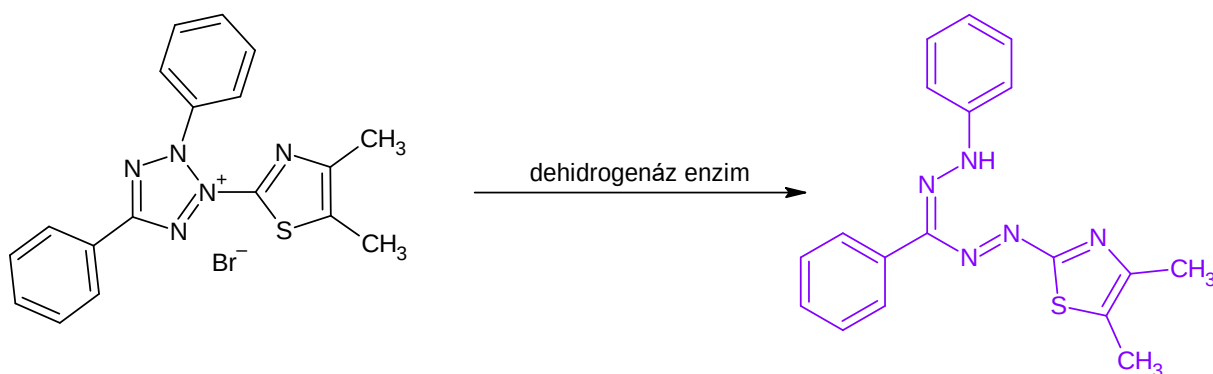
A konjugátumot tartalmazó frakciókat ezután liofilizáltam. A liofilizátumot a korábban leírt módon tömegspektrometriával és analitikai HPLC-vel ellenőriztem és vizsgáltam.

### 8.2.8 *In vitro* citosztázis meghatározása MTT-tesztel

A biológiai vizsgálatokat minden esetben minimum 95%-os tisztaságú anyagokkal végezzük. Az előállított konjugátumok (13-18, 30-36) *in vitro* citosztázisát MDA-MB-453 HER2+ humán emlőkarcinóma sejteken vizsgáljuk. Koncentrációnként négy-négy párhuzamos

mérést végzünk. Az MDA-MB-453 sejtek növesztése és kultúrában tartása DMEM médiumban történik, amely 10% magzati borjú szérumot (FBS) és 160 µl/ml gentamicint tartalmaz. A sejteket 96-lyukú szövettenyésztő lemezre osztjuk ki  $5 \times 10^3$  sejt/lyuk számmal, majd 24 órán keresztül 5%-os CO<sub>2</sub> atmoszféra alatt 37°C-on inkubáljuk azokat. A sejteket ezután 24 órán keresztül inkubáljuk 5%-os CO<sub>2</sub> atmoszféra alatt 37°C-on 2,5-100 µM közötti koncentrációtartományban a konjugátumokkal. A kontroll sejteket megfelelő mennyiségű vizet tartalmazó médiummal kezeljük. Az inkubáció után a kezelő oldatokat eltávolítjuk és a sejteket kétszer 135 µl szérummentes médiummal mossuk, minden mosás előtt az oldatokat centrifugáljuk 1000 fordulat/perces sebességgel. A mosás után 135 µl komplett médiumot mérünk be és a sejteket további 48 órára 5%-os CO<sub>2</sub> atmoszféra alatt 37°C-on inkubáljuk. Az idő letelte után MTT-teszt segítségével meghatározzuk a konjugátumok IC<sub>50</sub> értékeit.

Az MTT-teszt során a sejtekhez MTT-oldatot (3-(4,5-dimetilanizol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) adunk. Az élő sejtek mitokondriumában található dehidrogenáz enzim az MTT-t képes átalakítani úgynevezett formazán származékká, amely lila színű DMSO-ban jól oldódó kristályos anyag (**23. ábra**). Spektroszkópiásan az oldott formazán származék mennyisége meghatározható és kontroll teszt alapján alkalmazható a konjugátummal kezelt sejtek élő-halott arányának meghatározására.



**23. ábra** Az MTT molekula átalakulása a dehidrogenáz enzim hatására

A teszt során minden lyukba 45 µl 2 mg/ml koncentrációjú MTT-oldatot teszünk. A sejteket ezután az oldattal 3 órán át 37°C-on inkubáljuk. Az idő letelte után a sejteket 5 percen keresztül 2000 fordulat/perces sebességgel centrifugáljuk. A centrifugálás után a felülúszót leöntjük. A lyukak alján maradt lila kristályokat 100-100 µl DMSO-ban oldjuk. Az így kapott mintákat spektroszkópiásan mérjük 540 nm- és 620 nm hullámhosszúságon egy ELISA-reader-rel (Labsystem iEMS Reader, Finnország). A mért eredményekből a következő összefüggés alapján számítható a citosztázis mértéke:

$$\text{Citosztázis mértéke (\%)} = \left( 1 - \frac{A_{\text{kezelt sejtek}}}{A_{\text{kontroll sejtek}}} \right) 100$$

ahol  $A_{\text{kezelt sejtek}}$  és  $A_{\text{kontroll sejtek}}$  értéke az 540 nm hullámhosszúságon mért abszorbancia érték és a 620 nm hullámhosszúságon mért abszorbancia érték különbsége mind a kezelt, mind a kontroll sejtek esetén is. A számolt citosztázis mértékét a koncentráció függvényében ábrázolva a kapott görbéről leolvasható az az érték ( $IC_{50}$ ), ahol a sejtek 50%-nak osztódását gátolja az adott konjugátum.

### 8.2.9 *In vitro* sejtbejutási vizsgálatok áramlásos citometriával

Az előállított konjugátumok (13-18, 30-36) *in vitro* sejtbejutási mértékét áramlásos citométerrel (BD LSR II, BD Bioscience, San José, California, USA) vizsgáltuk MDA-MB-453 sejteken. A konjugátumokból 25  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatot készítünk, koncentrációnként két-két párhuzamos mérést végzünk.

A sejteket 24-lyukú szövettenyésztő lemezre osztjuk ki  $10^5$  sejt/lyuk számban a kezelést megelőző napon. A konjugátumokat a méréshez szérumbmentes médiumban oldjuk úgy, hogy a sejtekre mért oldat 1% DMSO-t tartalmazzon. A vizsgálatok során a konjugátumokat a sejtekkel 37°C-on 5%  $\text{CO}_2$  atmoszférában egy órán keresztül inkubáljuk. Az idő letelte után a sejteken lévő oldatot eltávolítjuk, majd 800  $\mu\text{l}$  szérumbmentes médiummal mossuk és centrifugáljuk. A mosást és a centrifugálást még kétszer végezzük el, azonban a harmadik mosást már HPMI-oldattal (100  $\mu\text{M}$  NaCl, 5,4  $\mu\text{M}$  KCl, 0,4  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ , 0,04  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  HEPES, 20  $\mu\text{M}$  glükóz, 24  $\mu\text{M}$   $\text{NaHCO}_3$ , 5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH = 7,4) hajtjuk végre. A centrifugálás után az oldatot eltávolítjuk a sejtekről, majd 100  $\mu\text{l}$  tripszin oldatot helyezünk minden lyukba. A sejteket így 5 percig 37°C-on inkubáljuk. Az idő letelte után a tripszint 800  $\mu\text{l}$  10% FBS-t tartalmazó HPMI-oldattal inaktiváljuk. A sejteket ezután FACS csövekbe rakjuk és 5 percen át 1000 fordulat/perces sebességgel centrifugáljuk őket. A centrifugálás után a felülúszót leöntjük, majd a sejteket 500  $\mu\text{l}$  HPMI-oldatban felfuszpendáljuk. Az így kezelt sejtek fluoreszcencia intenzitásának mértékét áramlásos citométerrel határoztuk meg.

### 8.2.10 *In vitro* sejtbejutási vizsgálatok konfokális mikroszkópiával

A mikroszkópiás vizsgálatokhoz szövettenyésztő lemezre MDA-MB-453 sejteket osztunk ki és 25  $\mu\text{M}$  koncentrációjú konjugátum oldatokkal kezeljük őket. A konjugátumokkal kezelt sejteket 3 órán át inkubáljuk. A sejtekről az idő letelte után az oldatot eltávolítjuk és 250

μl PBS-oldattal mossuk őket. A szövettenyésztő lemez minden lyukába fedőlemezt (Assistent, 13 mm átmérőjű, 1001/13) helyezünk. A sejtekről eltávolítjuk a szérummentes médiumot és 500 μl PBS-oldattal mossuk őket. A mosás után a sejteket paraformaldehid oldat segítségével 37°C-on 20 percen keresztül fixáljuk a fedőlemezen, majd a rendszert háromszor 500 μl PBS-oldattal mossuk. A sejtmagokat PBS-ben oldott 350 ng/ml DAPI segítségével festjük 15 percen át fénytől védett helyen. A festett sejteket tartalmazó fedőlemezeket ezután tárgylemezre ragasztjuk és egy napos száradás után konfokális mikroszkóp (Zeiss LSM 710) segítségével vizsgáljuk őket.

### 8.3 Az Aoa-KCCYSL-NH<sub>2</sub>- és Aoa-KAAYSL-NH<sub>2</sub> peptidek és spacerrel ellátott analógjaik (1-6) szintézise

Az (1-6) peptidek szintézisét teljesen manuálisan végeztem. A szintézis elkezdéséhez 1,0 g Fmoc-Rink Amide MBHA gyantát használtam, melynek kapacitása 0,67 mmol/g volt. A 8.2.1 *Peptidszintézis* című fejezet alapján a kapcsolások során a gyanta kapacitására számolt 3 ekvivalens mennyiségű aminosavszármazékot és Oxyma B-t ( $M = 185,14$  g/mol) használtam, míg DIC ( $V_M = 156$  ml/mol) esetén 6 ekvivalenst, ez az első gyantaosztásig az előbbieket esetén 2,01 mmol, illetve az utóbbi esetén 4,02 mmol volt.

A szintézis során a harmadik aminosavszármazék beépítése után a gyantát két egyenlő részre osztottam és a szintézist külön folytattam. Az első reakcióedényben a ciszteint tartalmazó szekvenciák szintézisét folytattam, míg a másik edényben az alanint tartalmazókat. A hatodik aminosavszármazék beépítése után mindkét reakcióedény tartalmát három egyenlő részre osztottam. A hat reakcióedényt három csoportra bontottam, mindegyik csoport egy-egy reakcióedényt tartalmazott a ciszteines és az alaninos szekvenciából. A csoportokban ezután mindkét reakcióedény esetén ugyanazt az aminosavszármazékot vagy izopropilidén védett aminooxiecetsavat építettem be a szekvenciák befejezéséig. A szintézisek befejeztével hat anyagot állítottam elő (8. táblázat).

A szintézis során az aminosavak oldallánc védelmére a következő védőcsoportokat használtam: a szerin és tirozin hidroxilcsoportjának védelmére *tert*-butilcsoportot (<sup>t</sup>Bu), a cisztein tiolcsoportjának védelmére tritilcsoportot (Trt), a lizin aminocsoportjának védelmére *tert*-butiloxikarbonil csoportot (Boc), az arginin guanidocsoportjának védelmére pedig 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-5-szulfonil csoportot (Pbf). Az aminooxiecetsav aminocsoportjának védelmét a már korábban említett izopropilidén csoport látta el.

**8. táblázat Az (1-6) szekvenciák szintéziséhez felhasznált reagensek mennyisége**

|                          |                             | >=Aoa-<br>KCCYSL-<br>NH <sub>2</sub><br>(1) | >=Aoa-<br>GFLG-<br>KCCYSL-<br>NH <sub>2</sub><br>(2) | >=Aoa-<br>LRRY-<br>KCCYSL-<br>NH <sub>2</sub><br>(3) | >=Aoa-<br>KAAYSL-<br>NH <sub>2</sub><br>(4) | >=Aoa-<br>GFLG-<br>KAAYSL-<br>NH <sub>2</sub><br>(5) | >=Aoa-<br>LRRY-<br>KAAYSL-<br>NH <sub>2</sub><br>(6) | Oxyma B;<br>DIC                 |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Reagens                  | Moláris<br>tömeg<br>(g/mol) | Bemért mennyiség (mg)                       |                                                      |                                                      |                                             |                                                      |                                                      | Bemért<br>mennyiség<br>(mg; µl) |
| Fmoc-<br>Leu-OH          | 353,4                       | 710,3                                       |                                                      |                                                      |                                             |                                                      |                                                      | 372,1;<br>627,1                 |
| Fmoc-<br>Ser('Bu)-<br>OH | 383,4                       | 770,6                                       |                                                      |                                                      |                                             |                                                      |                                                      | 372,1;<br>627,1                 |
| Fmoc-<br>Tyr('Bu)-<br>OH | 459,6                       | 923,8                                       |                                                      |                                                      |                                             |                                                      |                                                      | 372,1;<br>627,1                 |
| Fmoc-<br>Cys('Bu)-<br>OH | 585,7                       | 588,6                                       |                                                      |                                                      | -                                           |                                                      |                                                      | 186,1;<br>313,6                 |
| Fmoc-<br>Ala-OH          | 311,3                       | -                                           |                                                      |                                                      | 312,9                                       |                                                      |                                                      |                                 |
| Fmoc-<br>Cys('Bu)-<br>OH | 585,7                       | 588,6                                       |                                                      |                                                      | -                                           |                                                      |                                                      | 186,1;<br>313,6                 |
| Fmoc-<br>Ala-OH          | 311,3                       | -                                           |                                                      |                                                      | 312,9                                       |                                                      |                                                      |                                 |
| Fmoc-<br>Lys(Boc)-<br>OH | 468,5                       | 470,8                                       |                                                      |                                                      | 470,8                                       |                                                      |                                                      | 186,1;<br>313,6                 |
| >=Aoa                    | 131,131                     | 131,8                                       | -                                                    | -                                                    | 131,8                                       | -                                                    | -                                                    | 62,0;<br>104,5                  |
| Fmoc-<br>Gly-OH          | 297,3                       | -                                           | 99,6                                                 | -                                                    | -                                           | 99,6                                                 | -                                                    |                                 |
| Fmoc-<br>Tyr('Bu)-<br>OH | 459,6                       | -                                           | -                                                    | 154,0                                                | -                                           | -                                                    | 154,0                                                |                                 |
| Fmoc-<br>Leu-OH          | 353,4                       | -                                           | 118,4                                                | -                                                    | -                                           | 118,4                                                | -                                                    | 62,0;<br>104,5                  |
| Fmoc-<br>Arg(Pbf)-<br>OH | 648,8                       | -                                           | -                                                    | 217,3                                                | -                                           | -                                                    | 217,3                                                |                                 |
| Fmoc-<br>Phe-OH          | 387,4                       | -                                           | 129,8                                                | -                                                    | -                                           | 129,8                                                | -                                                    | 62,0;<br>104,5                  |
| Fmoc-<br>Arg(Pbf)-<br>OH | 648,8                       | -                                           | -                                                    | 217,3                                                | -                                           | -                                                    | 217,3                                                |                                 |
| Fmoc-<br>Gly-OH          | 297,3                       | -                                           | 99,6                                                 | -                                                    | -                                           | 99,6                                                 | -                                                    | 62,0;<br>104,5                  |
| Fmoc-<br>Leu-OH          | 353,4                       | -                                           | -                                                    | 118,4                                                | -                                           | -                                                    | 118,4                                                |                                 |
| >=Aoa                    | 131,131                     | -                                           | 43,9                                                 | 43,9                                                 | -                                           | 43,9                                                 | 43,9                                                 | 62,0;<br>104,5                  |

\*A vízszintes vastag vonalak a gyantaosztás helyét jelzik

A gyantáról az elkészült peptidek (1-6) hasítását a 8.2.2 *Peptid hasítás a gyantáról* című fejezetben leírt módon végeztem. Liofilizálás után a nyers peptidek tisztítását a 8.2.3 *Preparatív RP-HPLC kromatográfia* című fejezetben leírt módon végeztem, a tisztítás során gyűjtött frakciókat pedig a 8.2.5 *Tömegspektrometria* című fejezet alapján azonosítottam, azzal a különbséggel, hogy az analízishez a frakciókat nem liofilizáltam, majd készítettem belőle megfelelő koncentrációjú oldatokat, hanem a HPLC-ről gyűjtött frakciókat közvetlenül használtam fel a mérés során. A megfelelő tiszta peptidet (7-12) tartalmazó frakciókat a mérés után liofilizáltam.

## 8.4 A (7-12) peptidek konjugálása daunomicinnel

A konjugálást a 8.2.7 *Daunomicin konjugálása* című fejezet alapján végeztem. A konjugáláshoz használt peptidek (7-12) és a daunomicin mennyiségét a **9. táblázat** tartalmazza.

**9. táblázat** A konjugáláshoz felhasznált peptidek (7-12) és daunomicin mennyisége

| Bemért anyag                               | Moláris tömeg (g/mol) | Bemért mennyiség (mg) |
|--------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Aoa-KCCYSL-NH<sub>2</sub> (7)</b>       | 787,3                 | 20,0                  |
| <b>Daunomicin</b>                          | 527,5                 | 14,7                  |
| <b>Aoa-GFLG-KCCYSL-NH<sub>2</sub> (8)</b>  | 1161,5                | 20,0                  |
| <b>Daunomicin</b>                          | 527,5                 | 10,0                  |
| <b>Aoa-LRRY-KCCYSL-NH<sub>2</sub> (9)</b>  | 1375,7                | 20                    |
| <b>Daunomicin</b>                          | 527,5                 | 8,4                   |
| <b>Aoa-KAAYSL-NH<sub>2</sub> (10)</b>      | 723,4                 | 20                    |
| <b>Daunomicin</b>                          | 527,5                 | 16,0                  |
| <b>Aoa-GFLG-KAAYSL-NH<sub>2</sub> (11)</b> | 1097,6                | 20                    |
| <b>Daunomicin</b>                          | 527,5                 | 10,6                  |
| <b>Aoa-LRRY-KAAYSL-NH<sub>2</sub> (12)</b> | 1311,7                | 20                    |
| <b>Daunomicin</b>                          | 527,5                 | 8,8                   |

## 8.5 Az Aoa-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub> peptid analógjainak és spacerrel ellátott verzióinak (19-24) szintézise

A (19) peptid szintézisét manuálisan végeztem el. Kiindulásként 300 mg Fmoc-Rink Amide MBHA gyantát használtam. A kapcsolásokat a 8.2.1 *Peptidszintézis* című fejezet alapján végeztem az ötödik aminosav felkapcsolásáig, ahonnan kezdve a 3 ekvivalens aminosavszármazék és Oxyma B nem volt elegendő a sikeres kapcsoláshoz, ezért az ötödik aminosav felkapcsolásától 5 ekvivalens aminosavszármazékot és Oxyma B-t, illetve 10 ekvivalens DIC-et használtam. A tizedik aminosav kapcsolása során már az 5 ekvivalens sem bizonyult elegendőnek, de az ekvivalensek növelése helyett a többszöri kapcsolás mellett döntöttem. Az izopropilidén védett aminooxiecetsav felkapcsolását pedig már csak három egymást követő kapcsolással sikerült elérni. A peptid gyantáról való lehasítása és liofilizálása után azt tapasztaltam, hogy a várt megközelítőleg 130 mg nyers peptid helyett alig 30 mg-ot sikerült kinyerni. Ennek okán témavezetőmmel a peptid szintetizátorban való előállítása mellett döntöttünk.

A szintézis során az aminosavak oldallánc védelmére a következő védőcsoportokat használtam: a szerin, treonin és tirozin hidroxilcsoportjának védelmére *terc*-butilcsoportot (<sup>t</sup>Bu), az aszparagin savamid-csoportjának védelmére tritilcsoportot (Trt), a lizin aminocsoportjának védelmére a (19-20) peptidek esetén *terc*-butiloxikarbonil csoportot (Boc), a (23-24) peptidek esetén 4-metiltritol csoportot (Mtt), az arginin guanidocsoportjának védelmére pedig 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-5-szulfonil csoportot (Pbf). Az aminooxiecetsav aminocsoportjának védelmét a már korábban említett izopropilidén csoport látta el.

A szintetizátorba a 8.2.1 *Peptidszintézis* című fejezetben leírt protokoll alapján mértem be a szükséges reagenseket, oldatokat. A beméréseket 300 mg gyantára végeztem és az adatokat a 10. táblázat tartalmazza.

**10. táblázat A (19) peptid szintézisének bemérése a szintetizátorba**

| <b>Reagens</b>                     | <b>Moláris tömeg<br/>(g/mol)</b> | <b>Bemért mennyiség<br/>(mg)</b> | <b>Oldószer<br/>mennyisége (ml)</b> |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Fmoc-Ala-OH</b>                 | 311,3                            | 747,2                            | 5,2                                 |
| <b>Fmoc-Gly-OH</b>                 | 297,3                            | 535,1                            | 3,6                                 |
| <b>Fmoc-Lys(Boc)-OH</b>            | 468,5                            | 843,3                            | 3,6                                 |
| <b>Fmoc-Leu-OH</b>                 | 353,4                            | 636,1                            | 3,9                                 |
| <b>Fmoc-Asn(Trt)-OH</b>            | 596,7                            | 1074,1                           | 3,6                                 |
| <b>Fmoc-Pro-OH</b>                 | 337,4                            | 607,3                            | 3,6                                 |
| <b>Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH</b> | 383,4                            | 690,1                            | 3,6                                 |
| <b>Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH</b> | 397,5                            | 715,5                            | 3,9                                 |
| <b>Fmoc-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-OH</b> | 459,6                            | 1378,5                           | 6,0                                 |
| <b>&gt;=Aoa</b>                    | 131,1                            | 235,9                            | 3,0                                 |
| <b>Oxyma Pure</b>                  | 142,1                            | 1896,0                           | 20,0                                |
| <b>Piperidin</b>                   | 85,2                             | 1,82 ml                          | -                                   |
| <b>DBU</b>                         | 152,2                            | 1,82 ml                          | -                                   |
| <b>DIC</b>                         | 126,2                            | 2,42 ml                          | -                                   |
| <b>Ac<sub>2</sub>O</b>             | 102,1                            | 0,70 ml                          | -                                   |
| <b>DIPEA</b>                       | 129,2                            | 2,30 ml                          | -                                   |

Az elkészült peptidet (19) a 8.2.2 *Peptid hasítás a gyantáról* című fejezet alapján távolítottam el a gyantáról. A nyers peptidből liofilizálás után analitikai kromatogramot és tömegspektrumot vettem fel, ezekből megállapítottam, hogy a hetedik aminosavszármazék felkapcsolásakor a peptidláncok megközelítőleg 40%-ára nem kapcsolódik fel elsőre a következő aminosavszármazék, tehát az acetilezés miatt ezekre a láncokra a peptid tovább nem épül. A tapasztalatok alapján úgy döntöttem, hogy a (20-24) peptidek szintézise során a legnagyobb kitermelés elérésének az érdekében a hetedik aminosavszármazéktól a kapcsolások már duplán történjenek meg.

A (20) peptidet a szintetizátorban állítottam elő 300 mg gyantán. A (21-24) peptidek szintézisének a megkönnyítésére a szekvenciát a tizenegyedik aminosav kapcsolásáig a szintetizátor végezte 900 mg gyantán, majd a szintetizátorból kivett peptid-gyantát négy egyenlő részre osztottam és manuálisan folytattam a szintézist. A szintetizátor a *8.2.1 Peptidszintézis* című fejezetben leírt módon hajtotta végre a szintézist azzal a különbséggel, hogy a hetedik aminosavszármazék kapcsolásától minden esetben dupla kapcsolást hajtott végre. A szintézishez bemért anyagok mennyiségét a **11. táblázat** és a **12. táblázat** tartalmazza. A kézi szintézishez a *8.2.1 Peptidszintézis* című fejezetben leírt manuális szintézis esetén alkalmazandó protokollt használtam, azonban 3 ekvivalens helyett 5 ekvivalens alkalmaztam. A manuálisan végzett kapcsolások során minden esetben a DMSO-t is tartalmazó Fmoc hasítóelegyet alkalmaztam, továbbá az aminosavszármazékokat és az izopropilidén védett aminooxiecetsavat kétszer kapcsoltam. A manuális szintézis beméréseit a **13. táblázat** tartalmazza.

A (23-24) peptidek esetén a lizin felkapcsolása és a következő aminosavszármazék beépítése után a vajsavas acilezés következett. A kapcsolás ellenőrzése után a lizin oldalláncát védő Mtt-csoport hasítását végeztem. Ehhez a gyantát 2% TFA-t és 2% TIS-t tartalmazó DCM-es oldattal kezeltem. A gyantát kétszer 2 percig-, kétszer 5 percig-, 10 percig, majd 30 percig kevertettem az eleggyel. A félórás hasítás után a gyantát DCM-el mostam. A hasítóelegy semlegesítésének érdekében a gyantát ezután háromszor 0,5-1 percig DCM-el, négyszer 0,5-1 percig 10% DIPEA-t tartalmazó DCM-oldattal, majd megint háromszor 0,5-1 percig DCM-el mostam. A mosás után az edényekből Kaiser-teszthez mintát vettem és elvégeztem a tesztet. Az oldatok bekékültek, ami az Mtt-csoport lehasadását jelezte.

A szabad oldalláncot ezután vajsav-anhidrid, DIPEA és DMF 1-1-3 arányú oldatával 30 percen keresztül acileztem. A reakcióidő letelte után a gyantát kétszer 0,5-1 percig DMF-el, majd kétszer 0,5-1 percig DCM-el mostam. A reakcióedényekből Kaiser-teszthez mintát vettem és elvégeztem a tesztet. A gyantaszemek sárga színűek maradtak, ami a vajsav beépülését jelezte. A szintézist ezután a korábban követett protokoll szerint folytattam.

**11. táblázat A (20) peptid előállításához bemért anyagok mennyisége**

| <b>Reagens</b>                     | <b>Moláris tömeg<br/>(g/mol)</b> | <b>Bemért mennyiség<br/>(mg)</b> | <b>Oldószer<br/>mennyisége (ml)</b> |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Fmoc-Ala-OH</b>                 | 311,3                            | 1120,7                           | 7,8                                 |
| <b>Fmoc-Gly-OH</b>                 | 297,3                            | 535,1                            | 3,6                                 |
| <b>Fmoc-Lys(Boc)-OH</b>            | 468,5                            | 1124,4                           | 4,8                                 |
| <b>Fmoc-Leu-OH</b>                 | 353,4                            | 1272,2                           | 7,8                                 |
| <b>Fmoc-Asn(Trt)-OH</b>            | 596,7                            | 1288,9                           | 4,7                                 |
| <b>Fmoc-Pro-OH</b>                 | 337,4                            | 607,3                            | 3,6                                 |
| <b>Fmoc-Arg(Pbf)-OH</b>            | 648,8                            | 2335,3                           | 7,8                                 |
| <b>Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH</b> | 383,4                            | 920,2                            | 4,8                                 |
| <b>Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH</b> | 397,5                            | 715,5                            | 3,9                                 |
| <b>Fmoc-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-OH</b> | 459,6                            | 2205,6                           | 9,6                                 |
| <b>&gt;=Aoa</b>                    | 131,1                            | 314,5                            | 4,0                                 |
| <b>Oxyma Pure</b>                  | 142,1                            | 3792,0                           | 40,0                                |
| <b>Piperidin</b>                   | 85,2                             | 2,38 ml                          | -                                   |
| <b>DBU</b>                         | 152,2                            | 3,92 ml                          | -                                   |
| <b>DIC</b>                         | 126,2                            | 5,21 ml                          | -                                   |
| <b>Ac<sub>2</sub>O</b>             | 102,1                            | 0,90 ml                          | -                                   |
| <b>DIPEA</b>                       | 129,2                            | 3,00 ml                          | -                                   |

**12. táblázat A (21-24) peptidek szintézisének bemérése a peptidszintetizátorba**

| <b>Reagens</b>                     | <b>Moláris tömeg<br/>(g/mol)</b> | <b>Bemért mennyiség<br/>(mg)</b> | <b>Oldószer<br/>mennyisége (ml)</b> |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Fmoc-Ala-OH</b>                 | 311,3                            | 3362,1                           | 23,4                                |
| <b>Fmoc-Gly-OH</b>                 | 297,3                            | 1605,3                           | 10,8                                |
| <b>Fmoc-Leu-OH</b>                 | 353,4                            | 1908,3                           | 11,7                                |
| <b>Fmoc-Asn(Trt)-OH</b>            | 596,7                            | 3866,7                           | 14,1                                |
| <b>Fmoc-Pro-OH</b>                 | 337,4                            | 1821,9                           | 10,8                                |
| <b>Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH</b> | 383,4                            | 2760,6                           | 10,8                                |
| <b>Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH</b> | 397,5                            | 2146,5                           | 11,7                                |
| <b>Fmoc-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-OH</b> | 459,6                            | 4411,2                           | 19,2                                |
| <b>Oxyma Pure</b>                  | 142,1                            | 4740,0                           | 50,0                                |
| <b>Piperidin</b>                   | 85,2                             | 7,14 ml                          | -                                   |
| <b>DBU</b>                         | 152,2                            | 11,76 ml                         | -                                   |
| <b>DIC</b>                         | 126,2                            | 15,63 ml                         | -                                   |
| <b>Ac<sub>2</sub>O</b>             | 102,1                            | 2,70 ml                          | -                                   |
| <b>DIPEA</b>                       | 129,2                            | 9,00 ml                          | -                                   |

**13. táblázat A (21-24) peptidek manuális szintézisének bemérései**

|                  |                             | >=Aoa-Nle-<br>AAAYSLGYYNPT<br>-NH <sub>2</sub><br>(21) | >=Aoa-LRRY-<br>Nle-<br>AAAYSLGYYNPT<br>-NH <sub>2</sub><br>(22) | >=Aoa-<br>K(C(O)C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )-<br>AAAYSLGYYNPT<br>-NH <sub>2</sub><br>(23) | >=Aoa-LRRY-<br>K(C(O)C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )-<br>AAAYSLGYYNPT<br>-NH <sub>2</sub><br>(24) | Oxyma B;<br>DIC                              |
|------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Reagens          | Moláris<br>tömeg<br>(g/mol) | Bemért mennyiség (mg) <sup>a</sup>                     |                                                                 |                                                                                              |                                                                                                   | Bemért<br>mennyiség<br>(mg; µl) <sup>a</sup> |
| Fmoc-Nle-OH      | 353,4                       | 266,4                                                  | 266,4                                                           | -                                                                                            | -                                                                                                 | 139,5;<br>235,2                              |
| Fmoc-Lys(Mtt)-OH | 624,8                       | -                                                      | -                                                               | 470,9                                                                                        | 470,9                                                                                             |                                              |
| >=Aoa            | 131,1                       | 98,8                                                   | -                                                               | 98,8                                                                                         | -                                                                                                 | 139,5;<br>235,2                              |
| Fmoc-Tyr('Bu)-OH | 459,6                       | -                                                      | 346,4                                                           | -                                                                                            | 346,4                                                                                             |                                              |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH | 648,8                       | -                                                      | 489,0                                                           | -                                                                                            | 489,0                                                                                             | 139,5;<br>235,2                              |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH | 648,8                       | -                                                      | 489,0                                                           | -                                                                                            | 489,0                                                                                             | 139,5;<br>235,2                              |
| Fmoc-Leu-OH      | 353,4                       | -                                                      | 266,4                                                           | -                                                                                            | 266,4                                                                                             | 139,5;<br>235,2                              |
| >=Aoa            | 131,1                       | -                                                      | 98,8                                                            | -                                                                                            | 98,8                                                                                              | 139,5;<br>235,2                              |

<sup>a</sup>A bemért mennyiségek egy kapcsolásra vannak megadva

Az elkészült peptideket (20-24) a gyantáról a 8.2.2 *Peptid hasítás a gyantáról* című fejezet alapján hasítottam le, majd liofilizálás után a 8.2.3 *Preparatív RP-HPLC kromatográfia* című fejezet alapján tisztítottam meg. A tisztított liofilizált peptidekről (19-24) ezután a 8.2.6 *Izopropilidén védőcsoport eltávolítása aminosavakat tartalmazó peptidekről* című fejezet alapján lehasítottam az aminosav védőcsoportját és megtisztítottam őket. Mindkét tisztítás során a gyűjtött frakciókat a 8.2.5 *Tömegspektrometria* című fejezet alapján azonosítottam, azzal a különbséggel, hogy az analízishez a frakciókat nem liofilizáltam, majd készítettem belőle megfelelő koncentrációjú oldatokat, hanem a HPLC-ről gyűjtött frakciókat közvetlenül használtam fel a mérés során. A megfelelő tiszta peptidet (25-30) tartalmazó frakciókat a mérés után liofilizáltam.

## 8.6 A (25-30) peptidek konjugálása Daunomicinnel

A konjugálást a 8.2.7 *Daunomicin konjugálása* című fejezet alapján végeztem. A konjugáláshoz használt peptidek és a daunomicin mennyiségét a **14. táblázat** tartalmazza.

**14. táblázat** A konjugáláshoz felhasznált peptidek (25-30) és daunomicin mennyisége

| Bemért anyag                                                                                | Moláris tömeg<br>(g/mol) | Bemért<br>mennyiség<br>(mg) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <b>Aoa-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(25)</b>                                       | 1418,7                   | 20,0                        |
| <b>Daunomicin</b>                                                                           | 527,5                    | 8,2                         |
| <b>Aoa-LRRY-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(26)</b>                                  | 2007,0                   | 20,0                        |
| <b>Daunomicin</b>                                                                           | 527,5                    | 5,8                         |
| <b>Aoa-Nle-KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(27)</b>                                   | 1403,7                   | 20                          |
| <b>Daunomicin</b>                                                                           | 527,5                    | 8,3                         |
| <b>Aoa-LRRY-Nle-AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(28)</b>                              | 1992,0                   | 20                          |
| <b>Daunomicin</b>                                                                           | 527,5                    | 5,8                         |
| <b>Aoa-K(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(29)</b>      | 1488,7                   | 20                          |
| <b>Daunomicin</b>                                                                           | 527,5                    | 7,8                         |
| <b>Aoa-LRRY-K(C(O)C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)AAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub></b><br><b>(30)</b> | 2077,1                   | 20                          |
| <b>Daunomicin</b>                                                                           | 527,5                    | 5,6                         |

## 9 Összefoglaló

### HER2-pozitív emlőtumor célzására alkalmas biokonjugátumok fejlesztése

Rábai Károly Tamás, III. évf. kémia

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

**Témavezető:** Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadó

ELTE Szerves Kémiai Tanszék, HUN-REN-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Napjainkban a rákos megbetegedések okozzák a második legtöbb halálesetet világszerte a WHO statisztikái szerint. Különösen sok ember esik áldozatul a mellráknak, ráadásul gyakran az igen agresszív HER2-pozitív változatnak. A közép-európai régióban és kifejezetten Magyarországon pedig az esetszámok rendkívül magasak. [1] Az utóbbi időben így rendkívül fontossá váltak az emlőtumor és HER2-pozitív változatának gyógyítására irányuló kutatások. Az elmúlt években előtérbe kerültek az irányított tumorterápiás megoldások, amelyek azon alapulnak, hogy a tumorelles szerek egy irányítómolekula segítségével nagy szelektivitással a tumorsejtekhez juttatják.

Biri-Kovács és munkatársai HER2 receptort specifikusan felismerő peptidet választottak ki (KCCYSL-NH<sub>2</sub>) az irodalomban leírt fág-könyvtárból. [2] A peptid és analógjainak szintézisével vizsgálták a molekulában található két cisztein szerepét és szükségességét a receptorhoz való kötődésben. Munkájuk során az előállított szekvenciák közül a KAAYSLGYYNPT-NH<sub>2</sub> bizonyult a leghatásosabbnak.

Munkám során a fent leírt eredményeket alapul véve szintetizáltam eddig le nem írt peptidkonjugátumokat. Tizenkettő peptid és ugyanennyi konjugátum előállítását végeztem el, melyek a fent említett két szekvencia mellett a KAAYSL-NH<sub>2</sub> peptiden alapultak. A hexamer peptideket három módon konjugáltam daunomicinhez (Dau). Az első esetben közvetlenül a peptidlánc végén lévő  $\alpha$ -aminocsoportra kapcsoltam aminooxiacetsavat (Aoa), amelyen keresztül oxim-kötéssel kötöttem a Dau-t. A másik két módszerben enzimlabilis távtartókat (GFLG vagy LRRY) építettem a peptid N-terminálisára, ezek végére kapcsoltam az Aoa-t, majd rá a Dau-t. A dodekamer esetén vizsgáltam a szekvenciában található lizin oldalláncán lévő aminocsoport szerepét. A vizsgálathoz a lizint egy esetben vajsavval acileztem, egy esetben pedig norleucinra cseréltem. Az így előállt három peptidet fejenként két-két módszerrel konjugáltam. Egyik esetben közvetlenül Aoa-n keresztül, a másik esetben pedig LRRY távtartóra épített Aoa-n keresztül. Az itt előállított hat peptidet ugyanúgy Dau-val konjugáltam.

Az előállított peptideket és konjugátumokat preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, tömegspektrometriával és analitikai HPLC-vel azonosítottam és jellemeztem. A konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását MTT-teszt segítségével vizsgáljuk, *in vitro* sejtbejutási képességüket pedig áramlásos citometriával és konfokális mikroszkópiával határozzuk meg.

[1] Cancer Today. <https://gco.iarc.who.int/today/>

[2] Biri-Kovács, B. *et al.* *Biomolecules* **10**, 183 (2020)

## 10 Irodalomjegyzék

1. Cancer. <https://www.who.int/health-topics/cancer>.
2. Cancer Today. <https://gco.iarc.who.int/today/>.
3. Cancer Tomorrow. <https://gco.iarc.who.int/today/>.
4. Breast cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
5. Címlap | [www.stat.nrr.hu](http://www.stat.nrr.hu). <https://stat.nrr.hu/>.
6. Cancer Statistics - NCI. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics> (2015).
7. Ludwig, J. A. & Weinstein, J. N. Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 845–856 (2005).
8. Riis, M. Modern surgical treatment of breast cancer. *Ann. Med. Surg.* **56**, 95–107 (2020).
9. Radiation Therapy. <http://oftankonyv.reak.bme.hu/tiki-index.php?page=Sug%C3%A1rter%C3%A1pia>.
10. Homonnay, Z. *Nukleáris kémia és környezetvédelem*. (ELTE EÖTVÖS KIADÓ, Budapest, 2023).
11. Nori, D. *et al.* Palladium-103: a new radioactive source in the treatment of unresectable carcinoma of the pancreas: a phase I-II study. *J. Surg. Oncol.* **61**, 300–305 (1996).
12. Zs, O. Az immunhisztokémia szerepe a daganatterápiás célpontok azonosításában. *Biokémia* **28**, 82–86 (2004).
13. Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J. & González Barón, M. Classification of anticancer drugs—a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat. Rev.* **29**, 515–523 (2003).
14. Dharap, S. S. *et al.* Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 12962–12967 (2005).
15. Hortobágyi, G. N. Anthracyclines in the Treatment of Cancer. *Drugs* **54**, 1–7 (1997).

16. Schlegel, B., Stengel, C., Schumann, G., Prauser, H. & Eckardt, K. Aklanonic acid-producing mutants of *Streptomyces galilaeus* and *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *J. Basic Microbiol.* **27**, 107–111 (1987).
17. DiMarco, A., Soldati, M., Fioretti, A. & Dasdia, T. Activity of Daunomycin, a New Antitumor Antibiotic, on Normal and Neoplastic Cells Grown *in vitro*. *Cancer Chemother. Rep.* **38**, 39–47 (1964).
18. Yamamoto, K., Acton, E. M. & Henry, D. W. Antitumor activity of some derivatives of daunorubicin at the amino and methyl ketone functions. *J. Med. Chem.* **15**, 872–875 (1972).
19. Mezo, G., Manea, M., Szabo, I., Vincze, B. & Kovacs, M. New Derivatives of GnRH as Potential Anticancer Therapeutic Agents. *Curr. Med. Chem.* **15**, 2366–2379 (2008).
20. Orbán, E. *et al.* In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin–GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin–amino acid metabolites. *Amino Acids* **41**, 469–483 (2011).
21. Biri-Kovács, B. *et al.* Structure–Activity Relationship of HER2 Receptor Targeting Peptide and Its Derivatives in Targeted Tumor Therapy. *Biomolecules* **10**, 183 (2020).
22. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127–137 (2001).
23. Yarden, Y. Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer. *Oncology* **61**, 1–13 (2001).
24. Hynes, N. The biology of erbB-2/nue/HER-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1198**, 165–184 (1994).
25. Hsu, J. L. & Hung, M.-C. The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 575–588 (2016).

26. Karasseva, N. G., Glinsky, V. V., Chen, N. X., Komatireddy, R. & Quinn, T. P. Identification and Characterization of Peptides That Bind Human ErbB-2 Selected from a Bacteriophage Display Library. *J. Protein Chem.* **21**, 287–296 (2002).
27. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
28. Merrifield, B. *Life during a Golden Age of Peptide Chemistry: The Concept and Development of Solid-Phase Peptide Synthesis*. (American Chemical Society, Washington, DC, 1993).
29. Barany, G. & Merrifield, R. The peptides, Vol 3, Gross, E. and Meienhofer, J., Ed. (1979).
30. Carpino, L. A. & Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* **37**, 3404–3409 (1972).
31. Grant, G. A. *Synthetic Peptides: A User's Guide*. (Oxford University Press, 2002).
32. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595–598 (1970).
33. Kaiser, E., Bossinger, C. D., Colescott, R. L. & Olsen, D. B. Color test for terminal prolyl residues in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Chim. Acta* **118**, 149–151 (1980).
34. Pethő, L., Mező, G. & Schlosser, G. Overcharging Effect in Electrospray Ionization Mass Spectra of Daunomycin-Tuftsine Bioconjugates. *Molecules* **24**, 2981 (2019).
35. Kiss, K., Ránky, S., Gyulai, Z. & Molnár, L. Development of a novel, automated, robotic system for rapid, high-throughput, parallel, solid-phase peptide synthesis. *SLAS Technol.* **28**, 89–97 (2023).