

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT



Tuftsín és tuftsín antagonisták alkalmazása irányított tumorterápiára alkalmas konjugátumokban

CZAKÓ ÉVA
KRAM NASSIMA DOROTTYA

Témavezető: Dr. Mező Gábor



MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Kémiai Intézet
Szerves Kémia Tanszék
2014

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnénk köszönetet mondani Dr. Hudecz Ferenc tanszékvezető egyetemi tanárnak, a kutatócsoport vezetőjének, hogy munkánkat az ELTE Szerves Kémia Tanszékén, valamint az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban lehetővé tette.

Hálás köszönettel tartozunk témavezetőnknek, **Dr. Mező Gábornak** az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport tudományos tanácsadójának, hogy tanácsaival, kritikai észrevételeivel és határtalan türelmével segítette munkánk elkészülését.

Szeretnénk továbbá köszönetet mondani Pethő Lillának, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport PhD hallgatójának, az MS-spektrumok felvételéért és a sejtes vizsgálatok elvégzéséért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozunk Enyedi Kata Nórának és Hegedüs Rózsának, valamint az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport valamennyi tagjának, akik tanácsaira mindig számíthattunk és kérdéseinkre bármikor készségesen válaszoltak.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. Korunk rettegett betegsége, a rák.....	7
2.2 A leukémia	9
2.3 A kemoterápia	10
2.4 Az irányított tumorterápia	11
2.5 A daunomicin	12
2.6 A tuftsin és tuftsin antagonisták	14
2.7 A peptidszintézis	16
2.7.1 A szilárdfázisú peptidszintézis	16
3. Célkitűzések	22
4. Kísérletek.....	23
4.1 Alkalmazott aminosavak, oldószerek, reagensek.....	23
4.2 Általánosan alkalmazott eljárások.....	24
4.2.1 A peptidszintézis protokollja	24
4.2.2. Kaiser-teszt kísérleti megvalósítása.....	25
4.2.3 Hasítás a gyantáról	25
4.2.4 Az anyagok tisztítása és tisztaságuk ellenőrzése RP-HPLC-vel	26
4.2.5. Tömegspektrometriás elemzés	27
4.3. A peptidek szintézise.....	27
4.3.1. Tuftsin és tuftsin antagonisták irányító molekulát tartalmazó konjugátumok előállítása ...	27
5. Eredmények és értékelésük	36
5.1 A peptidek előállítása	36
5.2 A peptidek tisztítása és konjugálása daunomicinnel	37
5.3 A tisztított termék tömegspektrometriás analízise.....	41
6. Összegzés	48
7. Irodalomjegyzék.....	49

A FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

Aaa	alfa-aminosav
Aoa	aminooxiecetsav
Arg (R)	arginin
Boc	<i>terc</i> -butiloxikarbonil
BOP	benzotriazol-1-il-oxi-trisz-dimetilamino-foszfónium hexafluorofoszfát
<i>t</i> Bu	<i>terc</i> -butil
Bzl	benzil
CT	computed tomography (számítógépes tomográfia)
Da	dalton
Dau	daunomicin
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid
DCM	diklórmétán
DCU	<i>N,N'</i> -diciklohexilurea
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropil-etil-amin
DIU	<i>N,N'</i> -diizopropilurea
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDT	1,2-etánditiol
ESI-MS	ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry (Elektrospray ionizációs tömegspektrometria)
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
Gly (G)	glicin
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia)
IC ₅₀	50%-os gátláshoz szükséges koncentráció
IgG	Immunglobulin G

Leu (L)	leucin
Lys (K)	lizin
MRI	magnetic resonance imaging (mágneses magrezonancia képalkotás)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid
OBzl	benzilészter
OtBu	<i>terc</i> -butilészter
OT	oligotuftsín
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenezofurán-5-szulfonil
PET	pozitronemissziós tomográfia
Phe (F)	fenilalanin
Pro (P)	prolin
RP-HPLC	reversed phase HPLC (fordított fázisú HPLC)
R _t	retenciós idő
TFA	trifluor-ecetsav
Thr (T)	treonin
Trt	tritol
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)
VEGF-R	vascular endothelial growth factor receptor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor)

1. Bevezetés

„Az egészség korona az ember fején, de csak a beteg ember láthatja meg azt” [1].

Tudományos diákköri dolgozatunk témájául a rákkutatást és annak gyógyászati lehetőségeit választottuk, ezen belül a célzott tumorterápiával való gyógy mód bemutatását. E tématerülettel manapság nagyon sok kutatócsoport foglalkozik. Mi a dolgozatunkban hatóanyagok tumorsejthez való célzott eljuttatására térünk ki, mely peptidek segítségével hajtható végre.

A rák korunk egyik legpusztítóbb betegsége. A WHO (World Health Organization) felmérése szerint 2012-ben 8,2 millióan veszítették életüket rosszindulatú daganatos megbetegedésben. A rákos megbetegedések közel 30%-a megelőzhető lenne [2], mivel minden harmadik tumoros megbetegedés a helytelen táplálkozás és a mozgáshiány következménye. A világon évente több mint 12 millió új rákos megbetegedést regisztrálnak. Minden harmadik európainál diagnosztizálnak élete során daganatot, és minden negyedik európai ember rákban hal meg. A prognózisok is növekedéssel számolnak, a megbetegedések száma a terápiákat illető jelentős áttörések hiányában 2030-ra elérheti akár az évi 17 millió halálos áldozatot is, a rákbetegek száma pedig megháromszorozódik [3].

Európában a világviszonylathoz képest rossz a helyzet, azonban hazánkban az egyik legrosszabb (1. táblázat).

1. táblázat: Daganatos megbetegedések aránya Magyarországon és a környező országokban 100.000 lakosra vonatkoztatva [4]

Ország	Daganatos megbetegedések
Magyarország	248,3
Szlovákia	206,0
Románia	179,6
Németország	165,8
Ausztria	161,6

Magyarország szempontjából ezért is különösen fontos egy hatékony terápia kifejlesztése a betegségre.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Korunk rettegett betegsége, a rák

A rák orvosi értelemben a hámszövet aránylag gyors növekedésű, rosszindulatú daganata. A hétköznapi szóhasználat viszont minden tumort ráknak nevez, szakszerűen viszont csak a hámszövet eredetű tumor a rák. Ezek megjelenhetnek a nyálkahártyán, a bőrön vagy a szervek belsejében. Szövettanilag a laphámból kiinduló laphámrák és a mirigyhámból kiinduló adenocarcinoma különböztethető meg.

A rákbetegség története egészen Hippokratész koráig nyúlik vissza. Ő volt az, aki már az ókorban két csoportra osztotta a rákos betegségeket és többfajta rákbetegséget is dokumentált. A jóindulatú tumorokat *onkosz*-nak nevezte (ez duzzanatot jelent), melyből ered a mai onkológia kifejezés; a rosszindulatúakat pedig *karcinosz*-nak hívta, mely a rák neve görögül.

A rosszindulatú daganatsejtek közös jellemzői például az apoptózis kerülése, magukat növekedési faktorokkal látják el, határtalan osztódási képességgel rendelkeznek, melynek a sebessége felgyorsul, a fokozott táplálékigényük miatt maguk körül elősegítik új erek képződését (ezt angiogenezisnek nevezzük) és a környező szöveteket lényegében elnyomják és a táplálékot is elvonják tőlük.

A rákos szövetek morfológiája elég jellemző képet mutat mikroszkóp alatt. Ilyen jellegzetességek a sok, osztódásban résztvevő sejt, melyek alakja és mérete változó, a sejtmagok is eltérőek egymástól mind formában, mind pedig a nagyságukban, és a szokványos szövetszerveződés is felbomlik, a tumor határa elmosódik [5]. A rák kórtanának kérdése a mai napig sem lezárt. A kialakulásában számos tényező – öröklődés, táplálkozás, mozgásszegény életmód, szteroidhormonok, vírusok, krónikus mechanikus ártalom, vegyi anyagok, ionizáló sugárzás – szerepét feltételezik [6].

A daganatos betegség időben való felismerésére számos diagnosztikai módszer áll segítségünkre. Amennyiben a tünetek következtében merül fel a daganat gyanúja, a páciens vizsgálatokra küldik. A legelterjedtebbek a CT, az MRI, a PET, a röntgen és a biopszia. Az, hogy a daganat jó vagy rosszindulatú csak a szövettani vizsgálatok után derül ki.

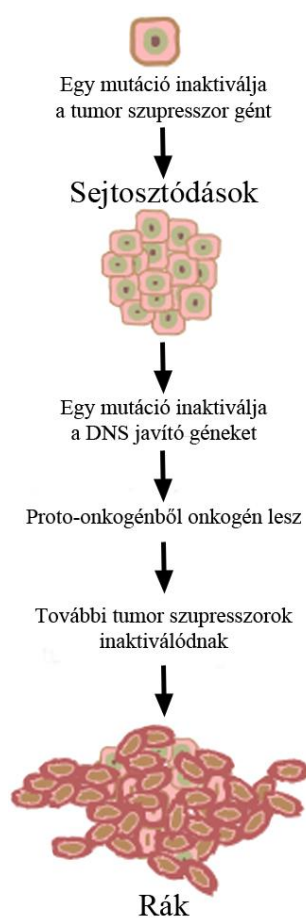
A daganattal kapcsolatos információk megszerzését követően kiválasztásra kerül a megfelelő terápiás módszer, mellyel a rosszindulatú sejtek száma és azok burjánzása a leginkább csökkenthető.

A rák nem egy konkrét betegség, hanem több mint százféle daganatos megbetegedés gyűjtőneve.

Az emberi szervezetben több mint 210féle sejttípus működik összehangoltan egymás mellett. Mindegyiknek megvan a saját feladata, melyet a sejtosztódás utáni utódsejtek is

megőriznek. Daganat akkor képződik, ha a sejtosztódási szabályozó folyamatokba valamilyen hiba csúszik, melyet a szervezet nem képes kijavítani. Mivel több, mint 210 féle sejttípus létezik, ezért megkülönböztetünk legalább ennyi ráktípust, melyeket logikus, hogy nem lehet egyféle módszerrel kezelni. Éppen ezért, olyan, hogy rák elleni csodaszer nem létezik.

Mindegyik ráktípusnak van olyan pontja, ahol a daganat növekedését és metasztázis (áttét) képzését a leghatékonyabban tudják az orvosok megakadályozni vagy lassítani. Áttét akkor alakul ki, ha a primer tumort malignus sejt(ek) hagyják el és ezek a keringési vagy nyirokrendszeren távolabbi szervekhez, szövetekhez jutnak el, ahol másodlagos tumorokat képeznek.



A rák kialakulásában általában mutációk sorozata áll. A kialakulási folyamatban onkogének és tumorszupresszor gének játszanak szerepet. Az onkogéneknek főszerepük van bizonyos típusú tumorok kialakulásában. Onkogénekké alakulhatnak a protoonkogén gének bizonyos karcinogén anyagok, vagy káros sugárzások hatására. A protoonkogéneknek a sejtosztódás szabályozásában van szerepük. A tumorszupresszor gének pedig a rák kialakulását akadályozzák meg addig, amíg valamilyen mutáció hatására ki nem kapcsolódnak [7].

A ráktípusokat osztályozhatjuk aszerint, hogy milyen fejlődéstani sejtcsoportból erednek vagy aszerint, hogy hol találhatóak a kiindulási sejtek.

1. ábra: A rák kialakulása

A kiindulási sejt helye alapján az alábbi csoportokba sorolhatjuk a rákos megbetegedéseket:

- a karcinóma epiteliális sejtéből indul, ebbe a csoportba tartoznak a leggyakoribb megbetegedések, például: a mell, a prosztata, a tüdő, a vastagbél, a bőr, az emésztőrendszer vagy a mirigyek rákjai
- a leukémia a csontvelői őssejtekből indul,
- a limfóma a nyirokcsomó betegsége,

- a melanóma a melanocitákból,
- a szarkóma a kötőszövetekből,
- a teratóma a magzati sejtekből,
- a glióma az agy sejteiből indul ki,
- a szeminóma pedig a here daganata [8]

A munkánk során leukémia gyógyítására alkalmas biokonjugátumokat állítottunk elő, mely során leukémia gyógyítására alkalmazott hatóanyagot (daunomicin) kapcsoltunk peptid alapú irányító molekulához. Ezért a következőkben a leukémiát fogjuk részletesebben tárgyalni.

2.2 A leukémia

A fehérvérűség, vagy más néven leukémia a vérképző rendszer rosszindulatú megbetegedése, amikor a csontvelőben a vérsejtképzés folyamata kórossá válik, és korlátlan sejtburjánzás kezdődik el. A leukémia az ötödik leggyakoribb a daganatos megbetegedések között, ugyanakkor a 15 éven aluli gyermekek körében a leggyakoribb rosszindulatú daganatos megbetegedés. A csontvelőből a kóros fehérvérsejtek a véráramba jutnak. A rosszindulatú csontvelői szövetben a burjánzó sejtek kiszorítják az eredeti csontvelői sejtömeget. Emiatt zavart szenved a vérlemezkék (trombociták) képzése, ami fokozott vérzési hajlamhoz vezet. A fehérvérsejtek a patogén hatások elleni védekezésben játszanak szerepet, így számuknak a csökkenése fertőzésekkel szembeni védtelenséget okoz [9].

A fehérvérűség kialakulása, lefolyása, kezelési módja és prognózisa alapján négy csoportra osztható. A leukémiának ún. mieloid és limfoid típusát különítik el, aszerint, hogy a csontvelőben normálisan előforduló két sejtvonallal melyikét érinti a betegség. A betegség lefolyása szerint akut és krónikus leukémiát különböztetnek meg. Akut leukémiában a sejtgyarapodás mértéke gyorsabb, míg a krónikus formában lassúbb, ennek következtében az akut leukémia gyorsabb, míg a krónikus leukémia lassúbb lefolyású betegség.

A leukémia kialakulásának oka, az esetek legnagyobb részében ismeretlen. Vannak azonban bizonyos tényezők, amelyek megnövelik a betegség kialakulásának veszélyét. Ezek közé tartozik az ionizáló sugárzás, a nagyfeszültségű áramvezetékek és transzformátorok, bizonyos kémiai anyagok (benzol, egyes rákellenes gyógyszerek), öröklött vagy szerzett immunhiányos állapotok, bizonyos genetikai tényezők és olyan behatások, amelyek a csontvelő kimerülését eredményezik.

A megbetegedés sokáig teljesen tünetmentes lehet, más esetekben pedig igen változatos tünetek léphetnek fel már a betegség elején. A daganatos sejtek nem tudják ellátni a

fehérvérsejtek normál feladatait, nem tudják legyőzni a szervezetet megtámadó kórokozókat, így gyakran lázzal járó fertőzőes megbetegedések lépnek fel. A gátolt vörösvértest- és vérlemezke képzés miatt vérszegénység és vérzékenység alakul ki.

A leggyakoribb tünetek a következők: gyengeség, krónikus álmoság, ismeretlen eredetű láz, ismeretlen eredetű fogyás, gyakori baktérium- vagy vírusfertőzések, fejfájás, testszerte bőrpír, csontfájdalom, fokozott vérzéshajlam (orr-, vagy fogíny vérzése, vér a vizeletben vagy a székletben), nyirokcsomó vagy lép megnagyobbodás, hasi teltségérzés.

Akut leukémiában a tünetek korán megjelennek és gyorsan fokozódnak, így a beteg hamar orvoshoz fordul. Ezzel szemben a krónikus leukémia hosszú ideig tünetmentes lehet, és a tünetek megjelenésekor, azok rendszerint enyhék, és csak lassan, fokozatosan súlyosbodnak. Ez az oka annak, hogy a krónikus leukémiás megbetegedések egy része rutin orvosi vizsgálat, vérképpenőrzés során, véletlenül kerül felismerésre [9].

A fehérvérűség kezelésére többféle módszert is alkalmaznak, többek között a kemoterápiát, ami az egész szervezetre hat, mivel a cél a leukémia sejtek teljes elpusztítása. Sok esetben sugárterápiát, illetve csontvelő átültetést is alkalmaznak. A hatékonyság érdekében a csontvelő átültetést is rendszerint megelőzi a leukémia sejtek lehető legteljesebb elpusztítása kemoterápiával.

2.3 A kemoterápia

Kemoterápiánál kémiai úton támadják a rákos sejteket. A tumorsejtek a szervezetbe juttatott gyógyszereknek köszönhetően pusztulnak el, melyek gátolják a sejt szaporodását vagy anyagcseréjét. A kemoterápia leginkább a gyorsan osztódó sejtekre hat, azonban nem specifikus a ráksejtekre, így az egészséges gyorsabban osztódó sejteket is elpusztítja. Ebből kifolyólag a csontvelő, a bőr, a haj, a bélhámsejtek és a szőrtüszők is károsodnak a kezelés során [10]. A terápia egyik hátránya, hogy a használt hatóanyagok kis szelektivitásúak, hamar kiürülnek a véráramból, azonban súlyos mellékhatásaik vannak olyan dózisban, mely a kívánt hatás eléréséhez lenne szükséges. A módszer másik problémája a kialakuló rezisztencia. A tumorsejtek a terápia során bizonyos idő elteltével rezisztenssé válnak az alkalmazott gyógyszerekre, azonban ennek esélye csökkenthető a kombinált kemoterápiás módszerrel, mely során több kemoterápiás szert is alkalmaznak a kezelés során [11]. Ezek hatása akár összegződhet is, ha a különböző szereknek más-más támadási pontjaik vannak a sejteken. Áttétes rák esetében a kemoterápiát használják a leggyakrabban, mivel az összes tumorsejtet támadja a szervezetben, míg a műtét és a sugárterápia nem ennyire hatékony ezekben az

esetekben. A kemoterápiát is több részletben végzik, akár csak a sugárterápiát, a túl intenzív mellékhatások elkerülése, illetve az egészséges szövetek regenerálódásának érdekében.

Az alkalmazott citosztatikumok főleg antimitotikumok (pl. Vinka-alkaloidok), melyek a mitotikus orsó kialakulásának blokkolásával fejtik ki a hatásukat; vagy antimetabolitok (pl. metotrexát), melyek pedig a köztes anyagcsere és enzimek antagonistái; esetleg különböző antibiotikumok (pl. daunomicin, adriamicin), melyek pl. interkalálódnak a DNS kettősspirálba, ezzel gátolva a DNS szál megkettőződését és a sejt osztódást.

A kemoterápiának lehetnek késői mellékhatásai is, melyek évtizedek után jelentkezhetnek. Ilyenek lehetnek többek között másodlagos tumorok, szívproblémák, légzőrendszeri problémák és elhízás is. A szívet ért sugárterhelés és a nagy dózisú antraciklin kezelés összefügg a késői szívproblémák miatt jelentkező, súlyos, életet is fenyegető következményekkel [12-14].

Mindezek alapján már régóta foglalkoztatja a kutatókat, hogy hogyan lehetne a citosztatikus szereket szelektíven a rákos sejtbe juttatni úgy, hogy azok mellékhatásait meg lehessen szüntetni, de legalábbis is csökkenthetők legyenek. Az irányított tumorterápia e kérdéssel foglalkozik.

2.4 Az irányított tumorterápia

Az irányított tumorterápia célja kiküszöbölni a kemoterápia hibáit, azaz a kis szelektivitást, a bejuttatott citosztatikumok szervezetből való gyors kiürülését, a rezisztencia kialakulását és a mellékhatásokat.

A célzott tumorterápia lényege, hogy irányító molekulák segítségével célzunk meg olyan sejtfelszíni képleteket (pl. receptorokat), amelyeket a tumorsejtek vagy túlexpresszálnak, így nagyobb mennyiségben fordulnak rajtuk elő, mint az egészséges sejteken; vagy pedig csakis a tumorsejteken/szöveteken találhatóak (tumorspecifikus molekulák). Ilyen sejtfelszíni molekulák lehetnek például bizonyos, a sejtek működésében szabályozó szerepet játszó peptidek receptorai [15]. Irányító molekulák pedig lehetnek cukrok, antitestek, receptor-ligandumok, mint például a peptidek is [15-17], melyek segítségével a citosztatikum (hatóanyag) célzottan a tumorsejtekbe juttatható, ezáltal csökkentve a toxikus mellékhatásokat (hajhullás, emésztőszervi rendellenességek, az immunrendszer gyengülése stb). E peptidek közül a tuftsinnal és ennek antagonistájával foglalkoztunk a laboratóriumi munkánk során.

Több olyan sejtfelszíni receptort is ismerünk, melyek a rákos sejtekben és szövetekben túltermelődnek. Ezek ligandumai alkalmasak lehetnek rákellenes hatóanyagok célzott sejtbejuttatására. Ilyen támadási pontok lehetnek például a tuftsin-kötő receptorok is. A

hatóanyagot és a peptidet olyan kémiai kötéssel kapcsoljuk össze, amely biztosítja egy aktív metabolit vagy a szabad hatóanyag felszabadulását [15].

Ennél a kezelésmódnál rendkívül fontos tudni, hogy az adott sejten elégséges mennyiségben jelen van-e a támadni kívánt receptor.

Az irányító molekula kiválasztásánál fontos, hogy a molekula kizárólag olyan sejtekhez kötődjön, amelyeken annak receptora megtalálható. Előnyt jelent, ha az irányító molekula tumorelles hatással is rendelkezik, és ez a hatás apoptotikus folyamat beindításán keresztül jön létre [14].

A célzott tumorterápia során a rákos sejteket pusztulásra kényszerítjük. A sejteken az apoptózis két fő útját írták le: a „halál receptoron” és a mitokondriális útvonalon történő sejthalál.

A mitokondriális útvonalat a DNS-károsodás indítja be, melynek egyik kiváltó oka lehet a kemoterápia vagy a sugárkezelés is. A mitokondriális útvonalban fontos szerepet játszanak az apoptotikus fehérjék, vannak közöttük anti-, és proapoptotikus proteinek is. Ezen fehérjék aránya határozza meg az apoptózis kimenetelét. Ha az antiapoptotikus fehérjék vannak túlsúlyban, akkor a sejt elkerüli az apoptózist, de ha a proapoptotikus fehérjék mennyisége a nagyobb, akkor bekövetkezik a programozott sejthalál.

Az apoptotikus fehérjék egyensúlya a daganatos megbetegedések során eltolódik az antiapoptotikus fehérjék javára [15].

Ezen munka keretében az apoptotikus hatást a daunomicin nevű rákellenes hatóanyag fogja ellátni.

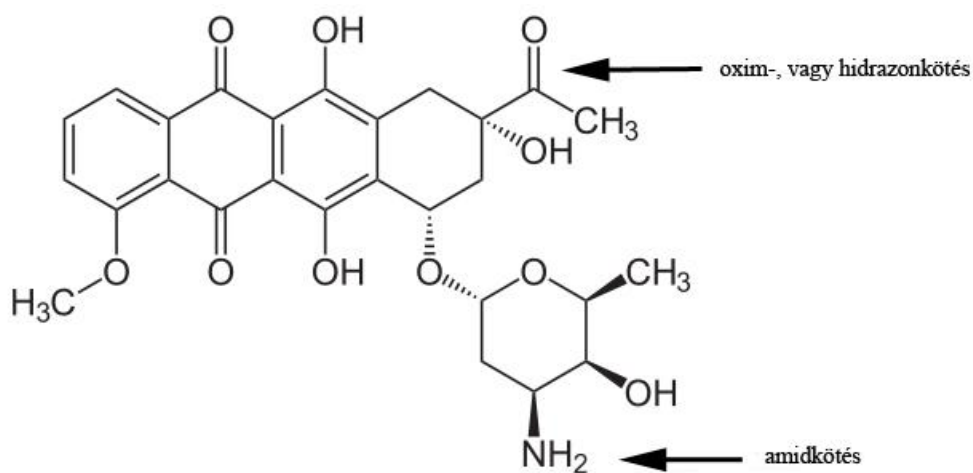
2.5 A daunomicin

Esetünkben az a hatóanyag, melyet a tumorsejtekbe szeretnénk juttatni lehetőleg szelektíven, az antraciklinek családjába tartozó daunomicin, {(7S,9S)-9-acetil-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hidroxi-6-metiloxán-2-il]oxi-6,9,11-trihidroxi-4-metoxi-8,10-dihidro-7H-tetracén-5,12-dion}, mely a 3. ábrán látható. Citotoxikus gyógyszerek közé tartozó vegyület, mely a topoizomeráz-II gátlók közé sorolható. Ennek az enzimnek a működését három különböző kémiai szerkezetű vegyület képes felfüggeszteni: az antraciklinek, az antracendiolo és a podofillotoxinok.

Az antraciklinek kémiai szerkezete: vázuk egy tetraciklusos gyűrű, amihez aminocukor és egy alkil-oldallánc kapcsolódik. A két középső gyűrűn lévő kinon-hidrokinon csoport elektronküldő szerepet tölt be, és aktív gyökök (ilyen pl. a hidroxil-gyök) képzését teszi lehetővé [12]. A daunomicint a sugárgombák közé tartozó *Streptomyces peucetius* termeli

[18]. Fizikai tulajdonságait tekintve vörös, szagtalan, maró, hólyaghúzó kristályos anyag, hidroklorid só formájában hozzák forgalomba. A daunomicint DiMarco és munkatársai írták le először 1964-ben [19]. DNS-károsító hatását főleg a DNS-kettősspirálhoz való kötődésével, vagy annak alkilezésével, illetve interkalációval fejtí ki. Főleg a GC nukleobázisok közé ékelődik, ezáltal a transzkripciót akadályozza. Mindezek mellett a replikációban pótolhatatlan szerepet játszó helikáz enzim aktivitását is befolyásolhatja, illetve a topoizomeráz-II-vel is stabil komplexet képezhet, így gátolva annak működését és a replikációban betöltött szerepét [12, 18]. Jelen vizsgálati eredmények arra engednek következtetni, hogy a daganatgátló hatást a DNS-hez történő kötődés határozza meg; míg a legjelentősebb toxikus mellékhatását, a kardiotoxicitást az aktív szabad gyökök képzése okozza. Valószínű, hogy az alapvegyület és az anyagcseretermékei egyaránt károsítják a szívet [13].

Klinikai dózisa 60-90 mg/m², háromhetente intravénásan az akut limfoid leukémiában szenvedő pácienseknél [12]. Az antraciklinek zsírban oldódó vegyületek, így a sejtek membránján való átjutásuk passzív diffúzióval valósul meg [13,14], így nemcsak a rákos sejteket, hanem az egészségeseket is képesek károsítani. Ennek a folyamatnak az akadályozására szolgál az irányított tumorterápia.



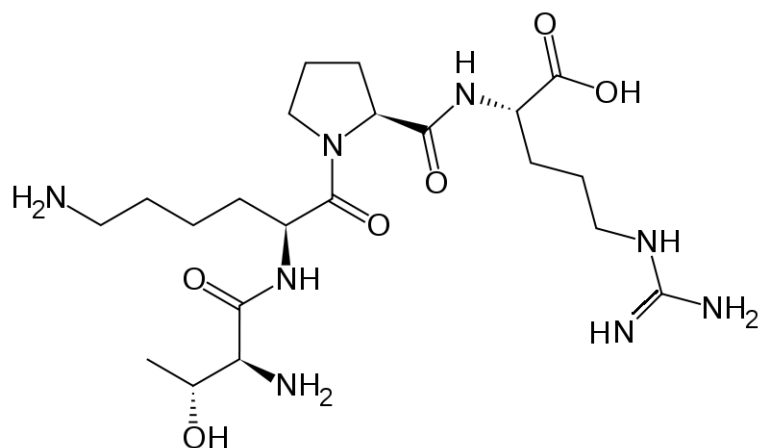
2. ábra: A daunomicin szerkezeti képlete és a lehetséges konjugálási helyek

A daunomicin többféleképpen konjugálható peptidekhez. Tartalmaz egy daunóz-amin cukorrészt, melyen keresztül lehetőség nyílik amidkötés kialakításával kapcsolni peptidekhez (2. ábra). Ez a konjugálási forma a tumorelles hatás elvesztéséhez vezethet, mivel ebben az esetben akkor kapunk hatásos vegyületet, ha a hatóanyag szabad formában felszabadul a konjugátumból. Oxim- és hidrazonkötés kialakítására is alkalmas a molekula a 13-as C atomon lévő oxo-csoporton keresztül (2. ábra). A hidrazonkötés savlabilis, éppen ezért a

szabad daunomicin könnyen felszabadul a lizoszomákban, ahol enyhén savas környezet van, viszont a savlabilitás a konjugátumok előállítását nagyban megnehezíti. Az oximkötés stabil és egyszerűbben kialakítható. Ezeknek a konjugátumoknak igazoltan erős tumorelles hatása van [20], bár a szabad hatóanyag nem szabadul fel ebből a konstrukcióból. A daunomicint a káros mellékhatások kiküszöbölése és a terápiás dózis emelése céljából különböző célfelismerő egységet tartalmazó hordozókhoz konjugáltuk. Esetünkben a daunomicin szelektív sejtbejuttatását a tuftsin nevű peptidhez és annak antagonistájához való kapcsolással kívántuk elérni.

2.6 A tuftsin és tuftsin antagonistá

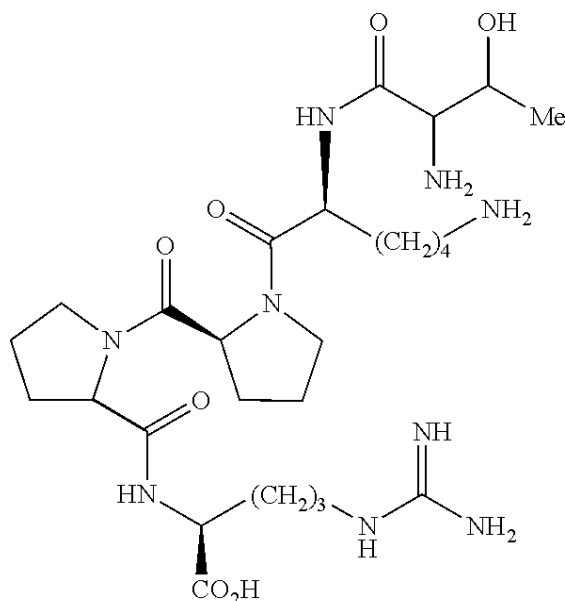
A munkánk során a daunomicint tuftsin-alapú hordozómolekulákhoz kapcsoltuk. A humán tuftsin (3. ábra) egy természetes, 4 aminosavból álló tetrapeptid. A szekvenciája TKPR, azaz H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH. 1970-ben írta le Najjar és Nishioka az amerikai Tufts egyetemen. A molekula neve is innen ered [21].



3. ábra: Tuftsin

A molekula biológiailag aktív konformációjára két feltételezés is napvilágot látott. Az egyik szerint a lizin ϵ -aminocsoportja és a C-terminális karboxilcsoportja között intramolekuláris kölcsönhatás van, a másik szerint pedig a peptid β -kanyar szerkezetű [22]. Az IgG nehéz lánc szekvenciájának 289-292 pozíciójában található tetrapeptid, amely 2 enzim hatására hasad ki. Az egyik enzim a lépben termelődik, a másik pedig a makrofágok felszínén található kötött állapotban. A tuftsin egy immunstimuláló peptid, mely serkenti a fagocitózist, a sejt vándorlást és antitumor hatással is rendelkezik [21-24]. Az immunsejtek (makrofágok, monociták) tuftsin receptoraihoz képesek kötődni [23], melynek aktív formája két alegységből áll [22].

A tuftsin antagonista (4. ábra) egy olyan tuftsin-szerű pentapeptid, amely egy prolinnal tér el (TKPPR) a natív tuftsin-tól, de jobban kötődik a tuftsint kötő receptorokhoz.



4. ábra: Tuftsin antagonista

A tuftsin nem csak az immunsejteken található tuftsin receptorhoz kötődik a szervezetben, hanem a nem-tirozin kinázok közé tartozó neuropilin-1 receptorhoz is.

Mind a humán tuftsin (TKPR), mind pedig az antagonista (TKPPR) specifikusan kötődik e receptorhoz, azonban az antagonista négyszer nagyobb affinitással. A lineáris dimer és tetramer formák még nagyobb affinitást mutatnak a receptorokhoz. A neuropilin-1 receptor egy 120 kDa tömegű fehérje és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptornak (VEGFR) a ko-receptora, ami a keringési rendszer fejlődésében vesz részt. A tuftsin azáltal, hogy képes kötődni a neuropilin-1 receptorhoz meggátolja a VEGF kötődését a receptorához, ezzel gátolva az érképződést [25].

A tumorsejteknek szüksége van a jó vérellátásra, így megfelelő érrendszerre, ezért nagymértékben expresszálódik rajtuk a VEGFR és a ko-receptora a neuropilin-1 receptor, ezzel biztosítva a szelektivitást. A neuropilin-1-hez való kötődést elsősorban a tuftsin antagonista esetén vizsgálták, és bizonyították, hogy ezek a vegyületek nem csak a leukémia, hanem más típusú tumorok esetén is jól alkalmazhatóak [25].

Mi azonban a munkánk során a tuftsin analógokkal történő hatóanyag célbajuttatást leukémia sejteken kívántuk vizsgálni. A biokonjugátumok előállításához szükséges irányító peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel állítottuk elő, így a következőkben ezt kívánjuk tárgyalni.

2.7 A peptidszintézis

Maga a peptidszintézis több mint 100 éves múltra tekint vissza. Emil Fischer is nagyban hozzájárult a peptidek és az enzimek kémiájának a leírásához. Az első peptidszintézis (1903) is az ő nevéhez köthető [26]. Az első szilárdfázisú peptidszintézis pedig Bruce Merrifield nevéhez fűződik [27]. Mivel munkánkban csak ez utóbbi eljárást alkalmaztuk, így a továbbiakban a szilárdfázisú peptidszintézis módszerét ismertetjük.

2.7.1 A szilárdfázisú peptidszintézis

A szilárdfázisú peptidszintézis alapjait 1963-ban Robert Bruce Merrifield publikálta [27], melyért 1984-ben Nobel-díjat kapott. A módszerrel lehetővé vált a peptidek gyors előállítása. A szilárdfázisú peptidszintézisnek kétféle típusát különböztetjük meg. Egyik a stepwise, azaz lépésenkénti eljárás, mely során aminosavanként építjük fel a peptidet. A másik eljárás során először szilárd hordozón építünk fel kisebb fragmenseket, majd a gyantáról lehasított védett, vagy részlegesen védett fragmenseket fragmenskondenzációval kapcsoljuk össze szilárd hordozón (konvergens szilárdfázisú peptidszintézis, CSPPS), vagy oldatban.

A szilárdfázisú szintézis lényege, hogy a funkciós csoporttal ellátott finomszemcsés szilárd hordozóhoz (polisztirol-divinilbenzol kopolimer) a kívánt szekvenciának megfelelő aminosavszármazékokat sorra a C-terminális felől az N-terminális irányába haladva egymáshoz kapcsoljuk, majd a szintézis befejeztével a kész peptidet eltávolítjuk a gyantáról.

Az egyes szintetikus lépéseket követően nem tudjuk a peptideket tisztítani, így a módszer alkalmazása során törekedni kell a teljes konverzióra. Emiatt használunk nagy felesleget a reagensekből. Ez általában 3-10 ekvivalens mennyiség a gyantakapacitásra számolva. Mivel ilyen reagensfeleslegek mellett nemcsak az amin-nukleofil, hanem más oldallánc funkciós csoportok is reagálhatnak, ezeket szintén védeni kell az egyértelmű reakciók elérése érdekében. A reagensek feleslegét szűrővel távolítjuk el a gyanta mellől.

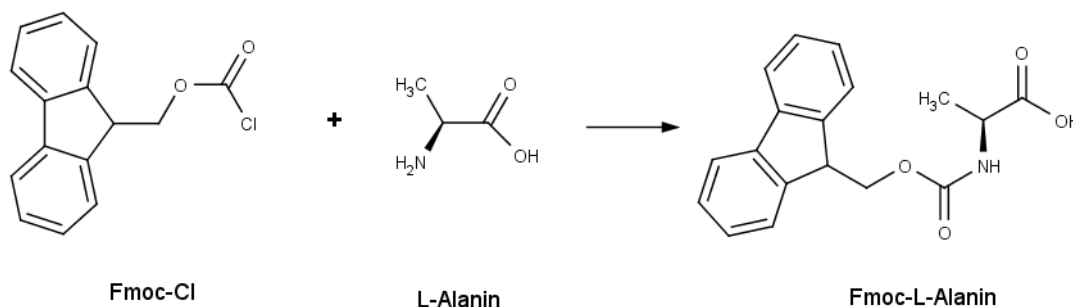
A szilárdfázisú peptidszintézisnél a karboxil-terminális védelmét a gyanta biztosítja. Ez az eljárás automatizálható.

Szilárdfázisú peptidszintézist illetően két módszer terjedt el, a Boc/Bzl és az Fmoc/tBu stratégia. A két módszer az alkalmazott védőcsoportokban és a hasítások során használt reagensekben különbözik egymástól.

Munkánk során mindvégig a kíméletesebb Fmoc/tBu stratégiát alkalmaztuk, így ezt mutatnánk be részletesebben.

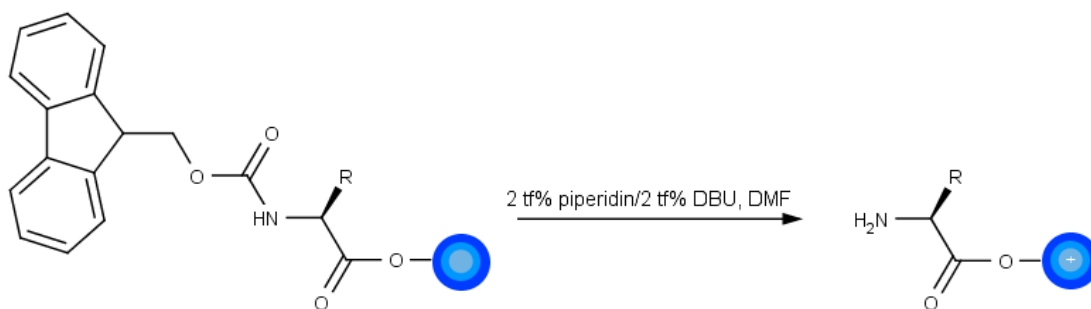
2.7.1.1 Fmoc/tBu stratégia

Az Fmoc/tBu stratégiánál az aminosavak α -aminocsoportját Fmoc-védőcsoport (5. ábra), oldalláncaikat pedig általában tBu és Trt típusú csoportok védik. Ezen eljárás során kíméletesebb reagenseket alkalmazunk, így olyan peptideket is szintetizálhatunk gond nélkül, melyek oxidációra érzékenyek, illetve könnyen alkileződnek.



5. ábra: Fmoc amino-védőcsoport bevitele

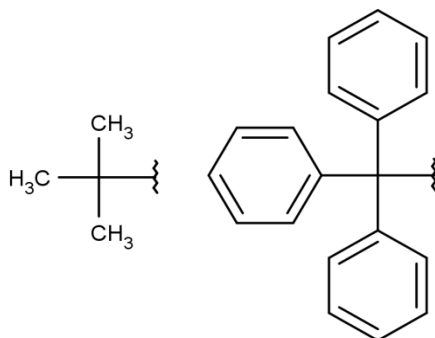
Az Fmoc védőcsoport savakkal szemben ellenálló, bázisokra azonban érzékeny, így hasítása 2 tf% piperidin/2 tf% DBU DMF-es elegyével lehetséges (6. ábra). Semlegesítésre ennél a módszernél nincs szükség, csupán DMF-el mossuk és duzzasztjuk a gyantát. Az aminosav kapcsolást ebben az esetben is aktiválás előzi meg, amit leggyakrabban HOBt és DIC alkalmazásával végzünk.



6. ábra: Fmoc hasítás

A gyantáról történő hasítást — a Boc/Bzl stratégiánál alkalmazott erős savas hasításhoz képest — szintén kíméletesebb körülmények között 80-95 tf%-os TFA oldattal végezzük, mely egyben az oldallánc védőcsoportokat is, (általában *terc*-butil és tritil-típusú

védőcsoportok (7. ábra)) eltávolítja. Ebben az esetben is gyökfogókat/kationfogókat kell alkalmazni a nagyszámban lehasadó karbokationok megkötése érdekében.



7. ábra: Terc-butil, tritil csoportok

2.7.1.2 A szilárd hordozó

A szilárdfázisú peptidszintézis során a gyanta tölti be a hordozó szerepét, amely egyben a C-terminális védelmét is szolgálja. A gyanta olyan térhálós polimer, mely funkciós csoportokkal van ellátva.

Az első aminosav felkapcsolását ezeken a csoportokon keresztül tudjuk megtenni.

A gyantákkal szembeni fő elvárások [28]:

- kémiaiilag stabil legyen (inert legyen az alkalmazott vegyszerekkel szemben)
- mechanikailag is stabil legyen (ne törjön a keverés közben)
- jól duzzadjon a szintézis során alkalmazott oldószerekben
- a peptid-gyanta kötés stabil legyen a szintézis során
- a peptid-gyanta kötés eredményesen hasítható legyen a szintézis végén

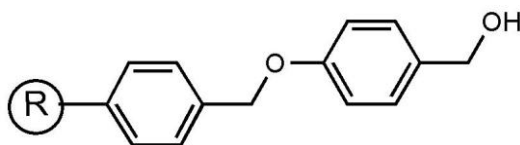
A kifejlesztett gyanták többségének az alpmátrixa polisztirol és 1,4- vagy 1,2-divinilbenzol (1-2%) kopolimere. Utóbbi monomer felelős a polimerben a keresztkötésekért.

A gyantákhoz általában még kapcsolnak egy ún. linker molekulát, mely a felhasználhatóság sokféleségét biztosítja. Azt, hogy milyen gyantát válasszunk a szintézishez több dolog is befolyásolja, pl.: hogy a peptidláncot melyik stratégiával építjük fel és az is, hogy a C-terminálison milyen funkciós csoport legyen (karboxil-vég vagy amid-vég) a végső hasítás után.

Néhány gyantatípus a teljesség igénye nélkül melyeket az Fmoc/tBu stratégiánál alkalmaznak [28]:

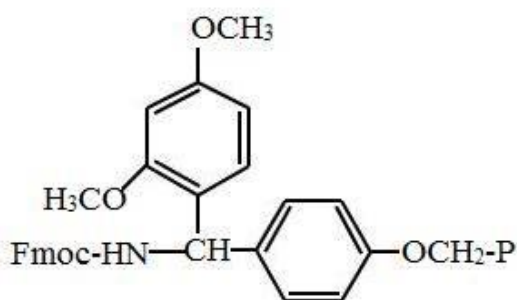
Fmoc/tBu stratégiánál alkalmazott gyanták:

- 4-alkoxibenzilalkohol (Wang) gyanta:



A végső hasításnál COOH-csoportot tartalmazó C-terminálisú peptidet fog eredményezni.

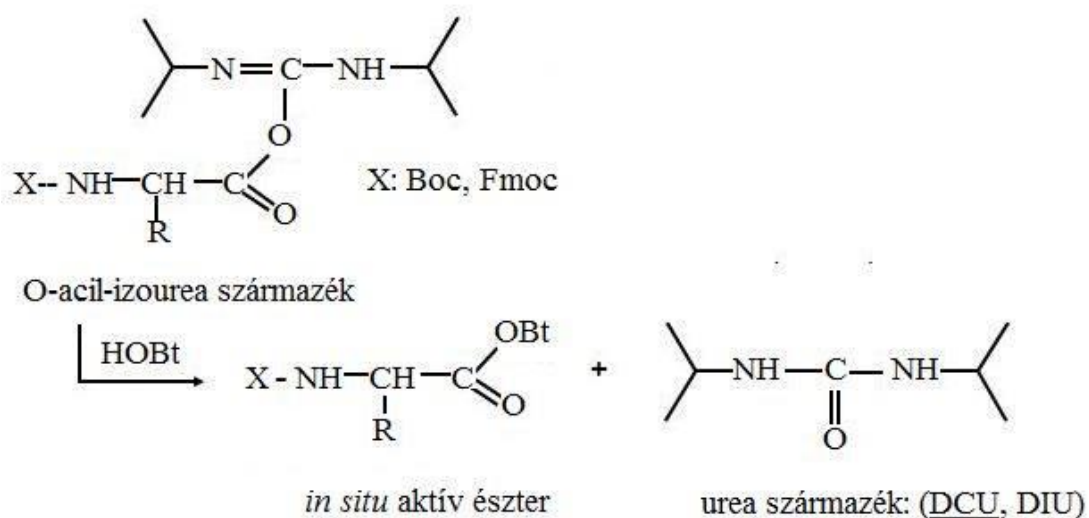
- Rink Amide gyanta:



Ennek a gyantának az alkalmazásakor, viszont amid-csoportot tartalmazó C-terminálisú peptideket fogunk kapni a gyantáról való hasításkor.

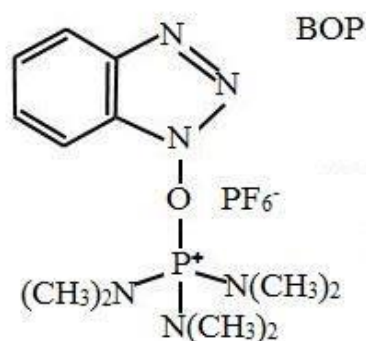
2.7.1.3 A peptidkötés kialakítása

A peptidkötést a beépítendő α -aminocsoporton védett aminosav aktivált karboxilcsoportja és a gyantához kötött aminosav vagy peptid szabad N-terminálisa között alakítjuk ki. Aktivált aminosavszármazék előállítható a reakció előtt is, de *in situ* a reakcióelegyben is. *In situ* aktív észterek képzéséhez a leggyakrabban használt reagensek a karbodiimidek (DCC, DIC) melyek mellett ekvivalens mennyiségű HOBt reagenst adagolunk [28]. A reakció eredményeként megkapjuk az aminosav 1-hidroxi-benzotriazol aktív észterét, mely acilezi a szabad N-terminálisa. Melléktermékként DCU keletkezik, ha DCC-t használunk, vagy DIU ha DIC-et alkalmazunk. A 8. ábrán látható az *in situ* aktív észter kialakítása DIC-cel és HOBt-vel.



8. ábra: Kapcsolás *in situ* aktív észterrel

A Boc technikánál használják a DCC kapcsolószert, hiszen a keletkezett DCU savban jól oldódik, így könnyen eltávolítható a TFA-s hasítási lépésben. A DIC-et pedig mind az Fmoc mind pedig a Boc technikánál is lehet alkalmazni, hiszen a keletkező DIU DMF-ben jól oldódik, így könnyen eltávolítható a gyanta mellől. Előnyösebb a DIC használata, hiszen a DCC allergizáló hatású. Ezeken kívül a kapcsoláshoz alkalmazhatunk még foszfónium és urónium típusú kapcsolószereket is. Ezek alkalmazásakor karbodiimid használata nélkül közvetlenül kialakítható az *in situ* HOBT-észter. Ilyen kapcsolóreagens lehet például a BOP [28].

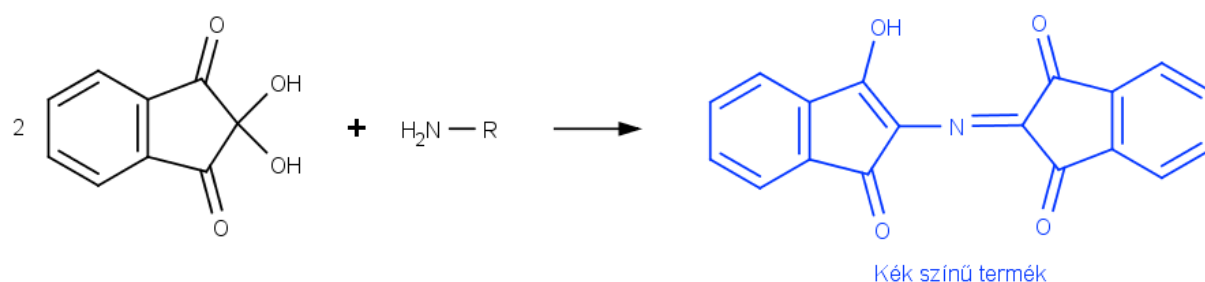


2.7.1.4 A kapcsolás követése

A kapcsolás sikerességét ninhidrin teszttel ellenőrizzük, mellyel az elreagálatlan, szabad aminos csoportot mutatjuk ki (9. ábra). Ha prolinhoz kapcsoljuk a következő aminosavszármazékot, akkor a ninhidrin helyett izatint (2,3-indolin-dion) használunk, hiszen a ninhidrin-prolin komplex sárga színű (10. ábra), csak úgy, mint a gyantaszemek, így nem

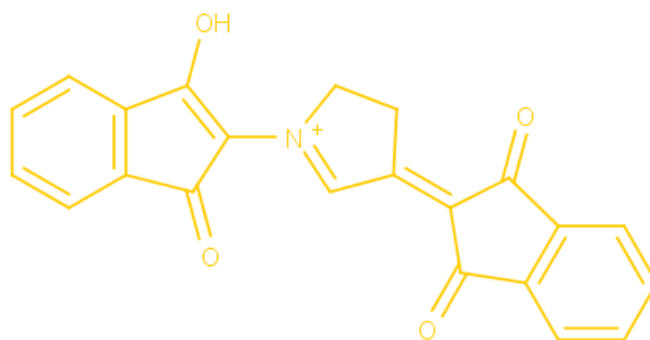
állapítható meg, hogy a kapcsolás végbement-e. Ha sárga marad az oldat és a gyantaszemek, akkor nincs a rendszerben szabad α -aminocsoport (prolin esetében iminocsoport); ellenben, ha megkékül az oldat és a gyantaszemek (vagy izatin esetében vörösesbarnák lesznek, ahogy ezt a 11. ábra is mutatja), akkor az azt jelenti, hogy a kapcsolás nem volt teljesen sikeres, hiszen maradtak szabad α -aminocsoportok (Pro-nál iminocsoportok) [28, 29]. Ilyenkor a kapcsolást meg kell ismételni, hiszen a szilárdfázisú peptidszintézis során muszáj, hogy a kapcsolások teljes konverzióval játszódjanak le, különben a kitermelés (főleg egy nagyobb peptidlánc esetében) rossz lesz.

Ninhidrin reakciója szabad aminocsoporttal:



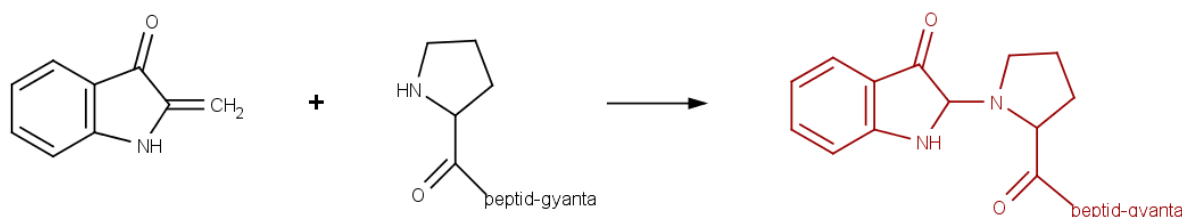
9. ábra: Ninhidrin reakciója szabad aminocsoporttal

Prolin végű peptidlánc esetén: az addukt sárga színű, mint a gyanták:



10. ábra: Ninhidrin-prolin addukt

Izatin reakciója prolin N-terminálisú peptiddel: vöröses-barnás színű terméket eredményez.



11. ábra: Izatin és prolin reakciója

3. Célkitűzések

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjában kifejlesztettek egy hordozót (OT20), amelyben négyszer ismétlődött a C-terminálisán glicinnel hosszabbított, kutyából származó tuftsin analóg ([TKPKG]₄). Az előállított hordozómolekulát alkalmazták hatóanyag-peptid konjugátumok előállításában.

Felmerült a kérdés, hogy valóban szükség van-e ilyen hosszú irányító egységre a megfelelő hatás eléréséhez. Így célul tűztük ki olyan kisebb tuftsin és tuftsin antagonistá szarmazékok szintézisét, melyeket daunomicinnel kívántunk konjugálni és az előállított konjugátumok *in vitro* tumorelles hatását akartuk vizsgálni.

Munkánk során olyan biokonjugátumokat kívántunk előállítani, amelyek alkalmasak lehetnek a leukémia gyógyítására. Mivel a leukémia sejteken a tuftsin receptorok nagy számban fordulnak elő, ezért ki szeretttük volna próbálni a tuftsint és a tuftin antagonistát irányító egységként kísérleteinkben. Hatóanyagként daunomicint terveztünk alkalmazni, melyet oximkötéssel kapcsolunk az irányító egységhez. Vizsgálni kívántuk továbbá, hogy miként változik a tumorelles hatás, ha két lineárisan ismétlődő egységet tartalmaz a konjugátum a tuftsintól és a tuftsin antagonistától. Tanulmányozni szeretttük volna, hogy van-e a tumorelles hatásra befolyása annak, ha nem közvetlenül a TKPR-hez, vagy a TKPPR-hez kapcsolódik a daunomicin, hanem egy enzim labilis spaceren keresztül. Távtartó molekulaként a GFLG tetrapeptidet kívántunk alkalmazni, mivel az a katepszin B lizoszómális enzim hatására hasad, mely túltermelődik a tumorsejtekben.

Ezek alapján a következő konjugátumok előállítását terveztük:

Tuftsin irányító molekula:

- Dau=Aoa-TKPR-OH
- Dau=Aoa-GFLG-TKPR-OH
- Dau=Aoa-[TKPR]₂-OH
- Dau=Aoa-GFLG-[TKPR]₂-OH

Tuftsin antagonistá irányító molekula:

- Dau=Aoa-TKPPR-OH
- Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH
- Dau=Aoa-[TKPPR]₂-OH
- Dau=Aoa-GFLG-[TKPPR]₂-OH

A konjugátumok felépítésének tervezett lépései:

1. A tervezett peptidek előállítása szilárdfázisú peptidszintézis Fmoc/tBu stratégiával.
2. Az előállított peptidek hasítása a gyantáról.
3. Tisztításuk HPLC-vel.
4. Konjugálás daunomicinnel és a konjugátumok tisztítása, jellemzése.
5. Az előállított konjugátumok *in vitro* tumorelles hatását kívántuk tanulmányozni HL-60 humán promieloid leukémia sejt kultúrán MTT-teszt segítségével.

4. Kísérletek

4.1 Alkalmazott aminosavak, oldószerek, reagensek

A szintézishez használt gyantát, és az aminosavszármazékokat az Iris Biotech GmbH-től (Marktredwitz, Németország) szereztük be. A védett aminosavszármazékokat, az aminosavak egy-, és hárombetűs kódjukat a 2. táblázatban soroltuk fel.

2. Táblázat: Alkalmazott aminosavak, gyanta

Aminosav	Hárombetűs kód	Egybetűs kód	Aminosav, védőcsoporttal
Leucin	Leu	L	Fmoc-Leu-OH
Fenilalanin	Phe	F	Fmoc-Phe-OH
Glicin	Gly	G	Fmoc-Gly-OH
Arginin	Arg	R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH
Prolin	Pro	P	Fmoc-Pro-OH
Lizin	Lys	K	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Treonin	Thr	T	Fmoc-Thr(<i>t</i> Bu)-OH
gyanta	Wang	4-alkoxibenzil-alkohol	

A peptidszintézis során alkalmazott anyagokat a rövidítésükkel együtt a 3. táblázatban soroltuk fel.

3. Táblázat: Alkalmazott reagensek, oldószerek

	Rövidítés	Név	Gyártó
Reagensek	DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid	Sigma-Aldrich Kft. Budapest, Magyarország
	HOBt	1-hidroxibenzotriazol	Iris Biotech GmbH Marktredwitz, Németország
	EDT	1,2-etánditiol	Fluka Buchs, Svájc
	DBU	1,8-diazobicyclo[5.4.0]undek-7-én	Fluka Buchs, Svájc
	DIEA	<i>N,N'</i> -diizopropil-etil-amin	Fluka Buchs, Svájc

	TFA	trifluorecetsav	Reanal Budapest, Magyarország
Oldószerek	DMF	N,N-dimetilformamid	Molar Budapest, Magyarország
	DCM	diklórmétán	Molar Budapest, Magyarország
	-	piperidin	Fluka Buchs, Svájc
	-	dietil-éter	Molar Budapest, Magyarország
	-	ecetsav	Molar Budapest, Magyarország

4.2 Általánosan alkalmazott eljárások

4.2.1 A peptidszintézis protokollja

A peptidek szintézisét szilárd hordozón, Fmoc/tBu stratégiával hajtottuk végre, melynek protokollját a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. Táblázat: Fmoc/tBu protokoll

Művelet	Reagensek	Ismétlés/ Időtartam
Mosás (duzzasztás)	DMF	3 X 0,5-1 perc
Hasítás	2 tf % piperidin+ 2tf % DBU/DMF	2 X 2 perc 1 X 5 perc 1 X 10 perc
Mosás (duzzasztás)	DMF	8 X 0,5-1 perc
Kapcsolás	3-3 ekv. HOBt+ DIC+ Fmoc-Aaa/DMF	1 X 60 perc
Mosás (duzzasztás)	DMF DCM	2 X 0,5-1 perc 2 X 0,5-1 perc
Kaiser teszt	1. KCN+ fenol+ ninhidrin oldatok 2. Pro-hoz történő kapcsolás után: + izatin	1 X 5 perc

4.2.2. Kaiser-teszt kísérleti megvalósítása

A ninhidrin vagy Kaiser-teszthez szükséges oldatok:

- 40 gramm kristályos fenol 10 ml abs. etanolos oldata
- 65 mg KCN 100 ml deszt. vizes oldata (ebből az oldatból 2 ml-t hígítunk 98 ml piridinnel)
- 2,5 gramm ninhidrin 50 ml absz. etanolos oldata

A megvalósításához egy kis kémcsőbe kell helyoznunk néhány gyantaszemet, majd hozzá 3-3 csepp ninhidrin-, KCN- és fenol-oldatot kell adni. A prolinhoz történő kapcsolás sikerességének ellenőrzéséhez két csepp izatin oldatot is adunk a fent említett oldatokhoz.

Az izatin-teszthez szükséges oldatok:

- 3 % izatin 5% Boc-Phe-OH benzilalkoholos oldatban
- + ninhidrin-teszt oldatok

Ezután egy 105°C hőmérsékletű Thermo Block-ba helyezzük a kémcsövet, és 5 percig folyamatosan figyeljük, hogy történt-e színváltozás. Kapcsolás után, ha sárga színűek maradtak a gyantaszemek, akkor a kapcsolás sikeresen lezajlott és beépíthető a következő aminosav a peptidláncba; ellenben ha kék színűek lesznek a gyanták (izatin esetében vörösek), akkor a kapcsolást meg kell ismételni.

4.2.3 Hasítás a gyantáról

A peptid gyantáról való lehasítását, és egyben a védőcsoportok eltávolítását a következő általános eljárás szerint végeztük.

Az alkalmazott hasítóelegy a következő összetevőkből állt:

- 0,38 g kristályos fenol
- 5 ml TFA
- 250 µl tioanizol
- 250 µl desztillált víz
- 200 mg szabad aminosav

A hasítás két órát vett igénybe, melyet folyamatos kevertetés mellett hajtottunk végre, az első félóránban jeges hűtést alkalmazva, majd szobahőmérsékleten folytatva.

A feldolgozás során az elegyet 50 ml hideg éterbe szűrve kicsaptuk, ezt követően centrifugáltuk. Az éter dekantálása után háromszor megismételtük a hideg éterrel való mosást. Ezután tömény ecetsavban oldottuk, majd az éter nyomokat rotációs vákuumbepárlóval

távolítottuk el. Majd a folyékony nitrogénnel történő fagyasztást követően liofilizáltuk az elegyet.

4.2.4 Az anyagok tisztítása és tisztaságuk ellenőrzése RP-HPLC-vel

A nyers peptidek és az előállított konjugátumok tisztítását és analitikai vizsgálatát Knauer típusú RP-HPLC rendszerrel (Bad Hamburg, Németország) végeztük, gradiens elúciót alkalmazva az 5. és 6. táblázatban megadott körülmények között.

Az analitikai vizsgálatokhoz 1 mg/ml koncentrációjú oldatokat, a tisztításhoz 10 mg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk. Az oldatok elkészítéséhez A eluent alkalmaztunk.

5. táblázat: A tisztítás során alkalmazott körülmények

Folyási sebesség	9 ml/perc
Oszlop	Phenomenex Luna (Torrance, CA, USA) C18, 10 µm, 100 Å 250 x 21 mm
Gradiens	mindegyik konjugátumnál más, az adott fejezetekben fogjuk részletezni
Eluensek	A eluens: 0,1% TFA/víz B eluens: 0,1 % TFA-t tartalmazó 90 % metanol és 10 % víz elegye
Detektálás	220 nm-en

6. táblázat: Az analitikai HPLC adatai

Folyási sebesség	1 ml/perc
Oszlop	Phenomenex Luna (Torrance, CA, USA) C18, 5 µm, 100 Å 250 x 4,6 mm
Gradiens	0 perc: 0% B 5 perc: 0% B 50 perc: 90 % B
Eluensek	A eluens: 0,1% TFA/víz B eluens: 0,1 % TFA-t tartalmazó 80 % acetonitril és 20 % víz elegye
Detektálás	220 nm-en

4.2.5. Tömegspektrometriás elemzés

A minta electrospray ionizáció során kerül porlasztásra, mely egy lágyionizációs módszer. A keletkező fragmensek m/z (tömeg/töltés) szerint szeparálódnak egymástól az analizátorban. Az ESI tömegspektrumok felvételét Bruker Daltonics Esquire 3000+ (Bréma, Németország) típusú készülékkel vettük fel folyamatos mintaadagolás mellett (4 μl /perc sebességgel) 50-2000 m/z tartományban, pozitív üzemmódban.

A konjugátumokat a vizsgálat elvégzéséhez 0,01% ecetsavat tartalmazó 50% acetonitril-víz elegyében oldottuk fel.

4.3. A peptidek szintézise

A biokonjugátumok peptidgerince mindig egy tuftsin-ból (TKPR) vagy egy tuftsin antagonistából (TKPPR) áll, melyet Fmoc/*t*Bu technikával építettünk fel Wang-gyántán, melyre előzetesen fel volt kapcsolva az első aminosav (Fmoc-Arg(Pbf) 12. ábra), így a gyantakapacitást nem kellett meghatároznunk a bemért mennyiségek kiszámolásához. A gyantakapacitás 0,58mmol/g volt. Minden kapcsoláshoz DIC/HOBt reagenst használtunk az *in situ* aktív észter kialakításához. Az összes reagensből, beleértve az aminosavakat is a gyantakapacitásnak megfelelően három ekvivalenst mértünk be. Ez egy empirikusan meghatározott adat, a megfelelően jó kitermelés és az egyértelmű reakciók elérése végett.

7. Táblázat: A szintézishez szükséges anyagok

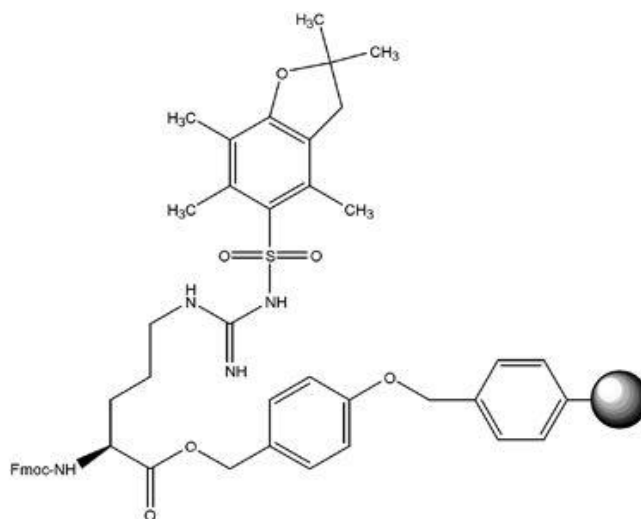
Bemért anyag	Moláris tömeg (g/mol)	Bemért tömeg (mg)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8	-
Fmoc-Pro-OH	337,4	587
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,6	815
Fmoc-Thr(<i>t</i> Bu)-OH	397,5	692
HOBt (12% víz)	153,1	266
DIC ($\rho=0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,2	220/(269 μl)
Boc-Aoa-OH	191,2	83

4.3.1. Tuftsin és tuftsin antagonista irányító molekulát tartalmazó konjugátumok előállítása

4.3.1.1. A Dau=Aoa-TKPR-OH, Dau=Aoa-TKPPR-OH szintézise és tisztítása

Szintézis: A szintéziseket manuálisan műanyag fecskendőben hajtottuk végre, melynek aljára szűrőt helyeztünk. Ez megakadályozta, hogy a gyantaszemek távozzanak a

fecskendőből, amikor a reagenseket, vagy az oldószert eltávolítottuk a gyantáról. A szintézist a szekvencia C-terminálisától az N-terminális felé haladva végeztük.



12. ábra: Fmoc-Arg(Pbf)-Wang-gyanta

A szintézist az Fmoc/tBu stratégia protokollja (4.2.1.) szerint hajtottuk végre. Kimértünk egy az alján szűrővel ellátott fecskendőbe 1 g Fmoc-Arg(Pbf)-Wang-gyantát, majd mostuk 3-szor DMF-el. Ezután az arginin α -aminocsoportjának védőcsoportját lehasítottuk a 2 tf% piperidin + 2 tf% DBU/DMF összetételű hasítóeleggyel a protokollban foglaltak szerint. Ezt újabb nyolcszori DMF-es mosás követte, hogy a hasítóelegyet maradéktalanul kimossuk a gyantából, majd a soron következő aminosav (prolin) kapcsolását hajtottuk végre. Kapcsoláskor az aminosavszármazékot és a HOBt-t minimális mennyiségű DMF-ben oldottuk fel, majd hozzáadtuk a DIC-et, végül az elegyet a gyantára öntöttük úgy, hogy éppen ellepje a gyantát. 1 órát hagytunk a kapcsolat lejátszódására, mely során az elegyet időről-időre megkevertük.

A reakció lejátszódása után a reagenseket eltávolítottuk a gyantáról vízsugár szivattyú segítségével, majd DMF-el és DCM-el mostuk. Ezután Kaiser-teszttel ellenőriztük (4.2.2.) azt, hogy a reakció ténylegesen lejátszódott-e. A gyantaszemek és az oldat színe nem változott meg, így a kapcsolat sikeresen lejátszódott.

A protokollban ismertetett lépéseket minden aminosavszármazék kapcsolásakor megismételtük. Mindegyik kapcsolása elsőre sikeres volt.

A gyantákat ezt követően elnegyedeltük, hiszen a következő szekvencia egy tuftsin és egy tuftsin antagonist dimer volt, és a harmadik kiépítendő szekvencia pedig a GFLG távtartóval

ellátott tuftsin és tuftsin antagonist monomer, majd ezután egy távtartóval ellátott tuftsin és tuftsin antagonist dimer kiépítése következett.

A következő lépésben a gyanták háromnegyedét félreraktuk és a negyedéhez Boc-aminooxiecetsavat kapcsoltunk. Lehasítottuk a peptid végén lévő aminosavról (treoninról) az Fmoc-csoportot, majd a kapcsolást a gyantakapacitásra számolt 3 ekvivalens mennyiségű HOBt, DIC és a Boc-Aoa-OH elegyével végeztük el. Ennek is elsőre sikeres volt a kapcsolása.

A gyantákat végül etanollal mostuk, majd egy éjszakán keresztül exsikkátorban szárítottuk.

Végső hasítás: Ezután lehasítottuk a peptideket a gyantákról a **4.2.3.** alfejezetben leírtak szerint.

A hasítást 2 órán keresztül végeztük úgy, hogy az első 15 percben jeges vizes fürdővel hűtöttük, majd a további időben a labor hőmérsékletén (20 °C) kevertettük a reakcióelegyet.

Feldolgozás: Az elegyeket a hasítás után 50 cm³ éterbe szűrve kicsaptuk, majd centrifugálással üleptítettük, az étert dekantáltuk róla és 3-szor újra hideg éterrel mostuk. Ezután feloldottuk tömény ecetsavban, és az elegyeket körülbelül a térfogatuknak felére bepárooltuk az esetleges éternymok eltávolítása miatt. Ezt követően folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk az oldatokat, majd liofilizálással nyertük ki a nyerstermékeket.

Nyerstermékek kitermelése: (gyantakapacitás: 0,58 mmol/g, m_{gyanta}=0,25g)

● **Aoa-TKPR-OH** **M_{Aoa-TKPR-OH} = 557,65 g/mol**

$m_{H-Aoa-TKPR-OH} = 47,2 \text{ mg}$

$5,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot 0,25 = 1,45 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 100\%$

$8,46 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 58\%$

● **Aoa-TKPPR-OH** **M_{Aoa-TKPPR-OH} = 672,78 g/mol**

$m_{H-Aoa-TKPPR-OH} = 49 \text{ mg}$

$5,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot 0,25 = 1,45 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 100\%$

$7,28 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 50\%$

Tisztítás, konjugálás daunomicinnel és azonosítás: A **4.2.4.** alfejezetben leírt HPLC összeállítással végeztük el a nyers peptidek tisztítását. Ebből annyit oldottunk fel A eluensben, hogy a koncentráció 10 mg/ml-es legyen.

Az alkalmazott gradiens:

Gradiens	0 perc: 0 % B 5 perc: 0 % B 50 perc: 40 % B
----------	---

Ezután szárazra pároltuk a megfelelő frakciókat ismert tömegű lombikokban, majd 0,2 M-os ammónium-acetát pufferben oldottuk őket. Az elegyhez 50 %-os feleslegben daunomicin·HCl-t (A daunomicin·HCl az IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft ajándéka volt) adtunk.

. A konjugálás 1 napon keresztül szobahőmérsékleten zajlott. Ezután egy újabb tisztítás következett preparatív RP-HPLC-vel (4.2.4.).

Az alkalmazott gradiens:

Gradiens	0 perc: 15 % B 5 perc: 15 % B 50 perc: 70 % B
----------	---

A szedett frakciókat liofilizáltuk és a tisztaságvizsgálat miatt analitikai HPLC-n felvettük az anyagok kromatogramját, majd azonosítás céljából MS-spektrumokat, melyek az **Eredmények és értékelésük** című fejezetben találhatóak meg.

Kitermelések:

- **Dau=Aoa-TKPR-OH** $M_{\text{Dau=Aoa-TKPR-OH}} = 1082,60 \text{ g/mol}$

a nyers peptidhez 48,0 mg daunomicin-hidrokloridot adtunk

$$8,46 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$4,34 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 51\%$$

$$m_{\text{Dau=Aoa-TKPR-OH}} = \underline{47,0 \text{ mg}}$$

- **Dau=Aoa-TKPPR-OH** $M_{\text{Dau=Aoa-TKPPR-OH}} = 1197,73 \text{ g/mol}$

a nyers peptidhez 48,1 mg daunomicin-hidrokloridot adtunk

$$7,28 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$5,59 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 77\%$$

$$m_{\text{Dau=Aoa-TKPPR-OH}} = \underline{67,0 \text{ mg}}$$

4.3.1.2. Dau=Aoa-[TKPR]₂-OH és Dau=Aoa-[TKPPR]₂-OH szintézise és tisztítása

A szintézist a félretett gyantarészletek harmadán folytattuk, melyekre már felépítettünk egy TKPR illetve egy TKPPR részt. A feladat még egy tuftsin és egy tuftsin antagonistá rész kiépítése volt ugyancsak Fmoc/tBu stratégiával a fentebb leírtak szerint. (4.2.1.)

8. táblázat: Az Aoa-[TKPR]₂-OH és az Aoa-[TKPPR]₂-OH felépítéséhez bemért mennyiségek (0,25 g gyantához viszonyítva):

A bemért anyag neve:	Moláris tömege (g/mol):	Bemérendő tömeg (mg):
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,77	282,2
Fmoc-Pro-OH	337,37	146,8
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,54	203,8
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397,46	172,9
HOBt	152,0	66,1
DIC	126,2	55/(67 µl)
Boc-Aoa-OH	191,18	20,8

A tuftsin dimer és a tuftsin antagonistá dimer kiépítése és az aminosavak felkapcsolása után a gyantáról való hasítást ugyancsak a fent leírt hasítóeleggyel és módszerrel végeztük el, illetve a feldolgozás is ugyanúgy zajlott.

A nyers peptideket félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk az előző konjugátumoknál leírtak szerint, majd a megfelelő csúchoz tartozó frakciókat 1 napon keresztül szobahőmérsékleten konjugáltuk daunomicin·HCl-al, majd újra tisztítottuk preparatív RP-HPLC rendszerrel.

Kitermelés: (gyantakapacitás: 0,58 mmol/g, m_{gyanta}=0,25g)

●Aoa-[TKPR]₂-OH M_{Aoa-[TKPR]₂-OH} = 1040,24 g/mol

m_{H-Aoa-[TKPR]₂-OH} = 88,8 mg

$5,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot 0,25 = 1,45 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 100\%$

$8,54 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 59\%$

●Aoa-[TKPPR]₂-OH M_{Aoa-[TKPPR]₂-OH} = 1270,5 g/mol

m_{H-Aoa-[TKPPR]₂-OH} = 97,0 mg

$5,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot 0,25 = 1,45 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 100\%$

$7,76 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 54\%$

A konjugálás utáni tisztítás gradiense:

Gradiens	0 perc: 15 % B 5 perc: 15 % B 10 perc: 25 % B 50 perc: 70 % B
----------	--

Az előző fejezetben leírtak szerint jellemeztük analitikai HPLC-vel és MS spektrummal, melyek az **Eredmények és értékelésük** című fejezetben találhatóak meg.

• **Dau=Aoa-[TKPR]₂-OH**

$$M_{\text{Dau=Aoa-[TKPR]}_2\text{-OH}} = 1566,2 \text{ g/mol}$$

a nyers peptidhez 71,0 mg daunomicin-hidrokloridot adtam

$$8,54 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$5,36 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 63\%$$

$$m_{\text{Dau=Aoa-[TKPR]}_2\text{-OH}} = \underline{84,0 \text{ mg}}$$

• **Dau=Aoa-[TKPPR]₂-OH**

$$M_{\text{Dau=Aoa-[TKPPR]}_2\text{-OH}} = 1796,46 \text{ g/mol}$$

a nyers peptidhez 65,7 mg daunomicin-hidrokloridot adtam

$$7,76 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$6,20 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 80\%$$

$$m_{\text{Dau=Aoa-[TKPPR]}_2\text{-OH}} = \underline{110,9 \text{ mg}}$$

4.3.1.3. Dau=Aoa-GFLG-TKPR-OH és Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH szintézise és tisztítása

A szintéziseket a maradék gyanta felén hajtottuk végre. Minden lépésében a fentebb leírtakhoz igazodva. A feldolgozást, a tisztítást és az analitikai jellemzést is ugyanúgy végeztük. Az analízis az **Eredmények és értékelésük** című fejezetben található meg.

9. táblázat: Az Aoa-GFLG-TKPR-OH és az Aoa-GFLG-TKPPR-OH felépítéséhez bemért mennyiségek (0,25 g gyantához viszonyítva):

A bemért anyag neve:	Moláris tömege (g/mol):	Bemérendő tömeg (mg):
Fmoc-Gly-OH	297,31	129,3
Fmoc-Leu-OH	353,41	153,7
Fmoc-Phe-OH	387,43	168,5
HOBt	152,0	66,1
DIC	126,2	55/(67 µl)
Boc-Aoa-OH	191,18	20,8

Kitermelés: (gyantakapacitás: 0,58 mmol/g, $m_{\text{gyanta}}=0,25\text{g}$)

● **Aoa-GFLG-TKPR-OH**

$$M_{\text{Aoa-GFLG-TKPR-OH}} = 916,11 \text{ g/mol}$$

$$m_{\text{H-Aoa-GFLG-TKPR-OH}} = \underline{94,8 \text{ mg}}$$

$$5,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot 0,25 = 1,45 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 69\%$$

● **Aoa-GFLG-TKPPR-OH**

$$M_{\text{Aoa-GFLG-TKPPR-OH}} = 1031,24 \text{ g/mol}$$

$$m_{\text{H-Aoa-GFLG-TKPPR-OH}} = \underline{73,1 \text{ mg}}$$

$$5,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot 0,25 = 1,45 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$7,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 49\%$$

A konjugálás utáni tisztítás gradiense:

Gradiens	0 perc: 15 % B 5 perc: 15 % B 10 perc: 25 % B 50 perc: 70 % B
----------	--

● **Dau=Aoa-GFLG-TKPR-OH**

$$M_{\text{Dau=Aoa-GFLG-TKPR-OH}} = 1457,04 \text{ g/mol}$$

a nyers peptidhez 56,3 mg daunomicin-hidrokloridot adtunk

$$1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$6,66 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 67\%$$

$$m_{\text{Dau=Aoa-GFLG-TKPR-OH}} = \underline{97,0 \text{ mg}}$$

● **Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH**

$$M_{\text{Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH}} = 1572,17 \text{ g/mol}$$

a nyers peptidhez 53,5 mg daunomicin-hidrokloridot adtunk

$$7,10 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$5,22 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 74\%$$

$$m_{\text{Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH}} = \underline{82,1 \text{ mg}}$$

4.3.1.4. Dau=Aoa-GFLG[TKPR]₂-OH és a Dau=Aoa-GFLG[TKPPR]₂-OH szintézise és tisztítása

A szintéziseket a megszokott szűrővel ellátott fecskendőben hajtottuk végre manuálisan Fmoc/tBu stratégiával a megmaradt gyantán (0,25 g).

**10. táblázat: Az Aoa-GFLG[TKPR]₂-OH és a Aoa-GFLG[TKPPR]₂-OH felépítéséhez
bemért mennyiségek (0,25 g gyantához viszonyítva):**

A bemért anyag neve:	Moláris tömege (g/mol):	Bemérendő tömeg (mg):
Fmoc-Pro-OH	337,37	151,8
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,54	210,9
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397,46	178,9
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,77	292,0
Fmoc-Gly-OH	297,31	133,8
Fmoc-Leu-OH	353,41	159,1
Fmoc-Phe-OH	387,43	174,4
HOBt	152,0	68,4
DIC	126,2	56,8 (70 µl)
Boc-Aoa-OH	191,18	86,1

A kapcsolások ellenőrzése is a megszokott módon történt.

A ditufstin esetében az 5. aminosavat (TKPRTKPR, Fmoc-Arg(Pbf)-OH) újra kellett kapcsolni (a szokásos kapcsolószerekkel), a ditufstin antagonistá származék esetében pedig a 12. aminosavat (GFLG-[TKPPR]₂-OH, Fmoc-Leu-OH), mert mindkét esetben a Kaiser-tesztnél a gyantaszemek kb. fele megkékült, tehát a reakció után is még sok elreagálatlan aminocsoport maradt. Az újrakapcsolásuk sikeres volt mindkét esetben.

A peptidláncok felépítése után ugyanúgy, mint az eddigi szekvenciáknál a láncok végére beépítettük az aminooxiacetsavat, majd lehasítottuk a peptideket a gyantákról a szokásos hasítóeleggyel. A feldolgozást, a tisztítást, a konjugálást és az analitikai jellemzést is a megszokott módon végeztük el.

Kitermelés: (gyantakapacitás: 0,58 mmol/g, m_{gyanta}=0,25g)

● **Aoa-GFLG-[TKPR]₂-OH**

$$M_{\text{Aoa-GFLG-[TKPR]}_2\text{-OH}} = 1382,71 \text{ g/mol}$$

$$m_{\text{H-Aoa-GFLG-[TKPR]}_2\text{-OH}} = 101,0 \text{ mg}$$

$$5,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot 0,25 = 1,45 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$7,30 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 50\%$$

● **Aoa-GFLG-[TKPPR]₂-OH**

$$M_{\text{Aoa-GFLG-[TKPPR]}_2\text{-OH}} = 1612,97 \text{ g/mol}$$

$$m_{\text{H-Aoa-GFLG-[TKPPR]}_2\text{-OH}} = 99,7 \text{ mg}$$

$$5,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot 0,25 = 1,45 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$6,18 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 43\%$$

A konjugálás utáni tisztítás gradiense:

Gradiens	0 perc: 10 % B 5 perc: 10 % B 10 perc: 20 % B 50 perc: 60 % B
----------	--

• **Dau=Aoa-GFLG-[TKPR]₂-OH**

M_{Dau=Aoa-GFLG-[TKPR]₂-OH} = 1939,64 g/mol

a nyers peptidhez 58 mg daunomicin-hidrokloridot adtunk

$$7,30 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$3,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 54\%$$

$$m_{\text{Dau=Aoa-GFLG-[TKPR]}_2\text{-OH}} = \underline{77,0} \text{ mg}$$

• **Dau=Aoa-GFLG-[TKPPR]₂-OH**

M_{Dau=Aoa-GFLG-[TKPPR]₂-OH} = 2169,90 g/mol

a nyers peptidhez 57,02 mg daunomicin-hidrokloridot adtunk

$$6,18 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 100\%$$

$$4,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow 80\%$$

$$m_{\text{Dau=Aoa-GFLG-[TKPPR]}_2\text{-OH}} = \underline{107,2} \text{ mg}$$

Az analízis eredményei az **Eredmények és értékelésük** című fejezetben találhatóak meg.

5. Eredmények és értékelésük

Célkitűzésünknek megfelelően munkánk során négy-négy biokonjugátumot állítottunk elő szilárdfázisú peptidszintézissel és kemoszелеktív ligációval. A konjugátumok hatóanyag irányított célbajuttatására alkalmazhatóak. Az előállított konjugátumok célmolekulái elsősorban a leukémia sejteken nagyszámban jelenlévő tuftsin receptorok, illetve a tumorszövetek angionezise során túltermelődő VEGFR koreceptora a neuropilin-1 lehet.

A biokonjugátumok peptidgerince mindig egy tuftsin, vagy egy tuftsin antagonistá származék, melyeket Fmoc/tBu stratégiával építettünk fel. Az összes általunk előállított peptid N-terminálisára aminooxiecetsavat kapcsoltunk, majd a hasított és tisztított peptidekre oximkötéssel daunomicint konjugáltunk.

A nyers peptideket RP-HPLC rendszerrel tisztítottuk; a megtisztított végtermékeket tömegspektrometriával azonosítottuk és a tisztaságukat analitikai HPLC-vel ellenőriztük.

Az előállított biokonjugátumok hatásosságát a leukémia sejteken az *in vitro* biológiai vizsgálatok elkészítése után lehet kimondani. Az MTT-teszteket Pethő Lilla PhD hallgató végezte el, melyek eredményét ezen dolgozat keretében mi is részletezünk.

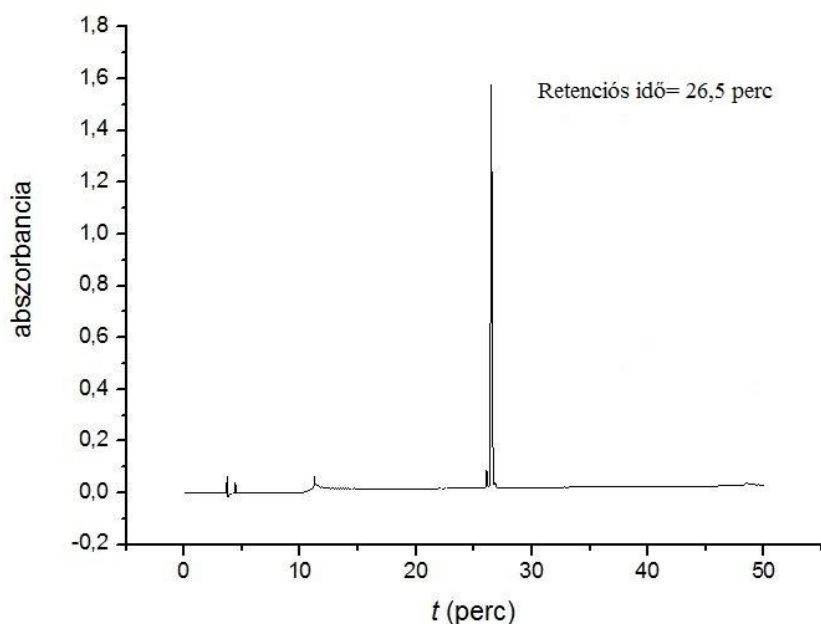
5.1 A peptidek előállítása

A peptideket Fmoc/tBu stratégiával építettük fel olyan Wang-gyantán, amely az első aminosav származékot (Fmoc-Arb(Pbf)) tartalmazta. Az első tetra-, és pentapeptid szekvenciákat (TKPR, TKPPR) a gyanták összmennyiségén építettük fel, majd a peptidek elkészülését követően negyedeltük a gyantákat. Az első negyedre Boc-aminooxiecetsavat kapcsoltunk. A második negyedén folytattuk a szintézist. Felépítettünk a TKPR tertapeptidre és a TKPPR pentapeptidre a GFLG spacer molekulát, majd erre is Boc-aminooxiecetsavat kapcsoltunk. Az eredeti gyantamennyiségek felén folytattuk a szintézist, és felépítettünk még egy TKPR és TKPPR szekvenciát, majd a tuftsin-, és a tuftsin antagonistá dimer peptidek elkészülését követően ketté osztottuk a gyantákat. Egyik felére Boc-aminooxiecetsavat kapcsoltunk, másik felére a spacer molekulát (GFLG) építettünk fel, melyre szintén Boc-aminooxiecetsavat kapcsoltunk. Így összesen nyolc peptidet állítottunk elő, melyek mindegyike aminooxiecetsavat tartalmazott az N-terminálisán. A szintéziseket követően a kész peptideket hasítottuk a gyantáról. A terminális Boc védőcsoportokat külön nem hasítottuk, azokat a peptid gyantáról történő hasításkor a többi védőcsoporttal együtt távolítottuk el.

A szintézishez Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, és Fmoc-Arg(Pbf)-OH védett aminosav származékokat használtunk, a többi aminosavnak nem volt oldallánc funkciós csoportja.

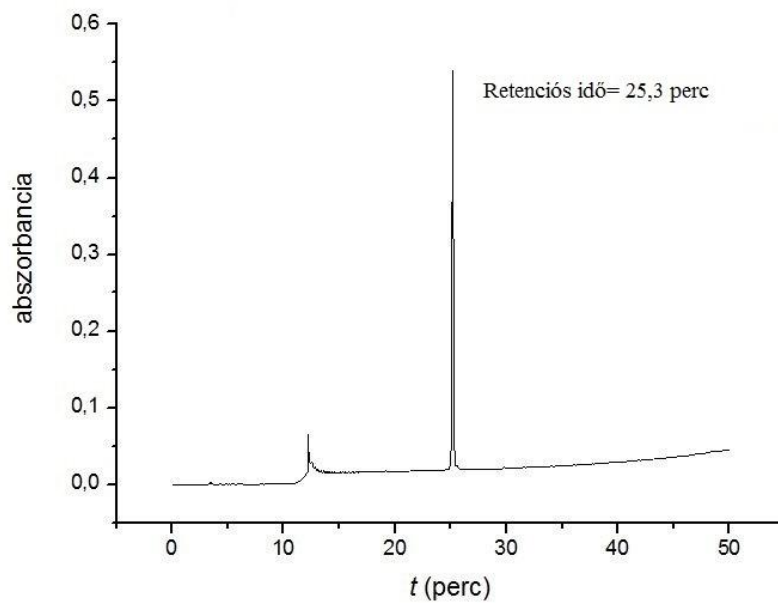
5.2 A peptidek tisztítása és konjugálása daunomicinnel

A nyers peptidekről analitikai fordított fázisú HPLC segítségével kromatogramot vettünk fel, amelynek segítségével megterveztük a tisztításukhoz alkalmazandó gradiens elúciót. Az anyagok oldását követően A eluensben 10 mg/ml-es koncentrációjú oldatokat állítottunk elő. Négyszeri injektálásra sikerült az összes terméket megtisztítanunk. Az aminooxiacetil-csoport érzékenysége miatt a terméket nem izoláltuk liofilizálással. Az oldatot egy lemért tömegű gömblombikban rotációs vákuumbepárlóval szárazra pároltuk és a maradék anyag tömegét visszamértük. Ezt követően ammónium-acetát 0,5 M, pH=5 pufferben feloldottuk őket, majd 50%-os moláris feleslegben daunomicin hidroklorid sót adtunk hozzájuk. A reakció lejárta után közvetlenül HPLC-vel tisztítottuk, majd a termékeket liofilizálással izoláltuk. Az anyagok tisztaságát analitikai HPLC-n ellenőriztük (13-20. ábra)



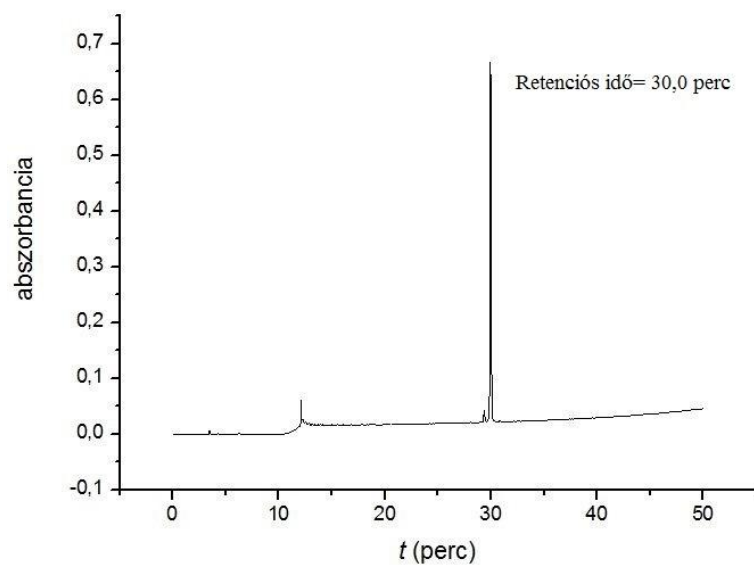
13. ábra: Dau=Aoa-TKPR-OH analitikai RP-HPLC kromatogramja

A kromatogram alapján látható, hogy a kapott konjugátum >95 %-os tisztaságú.



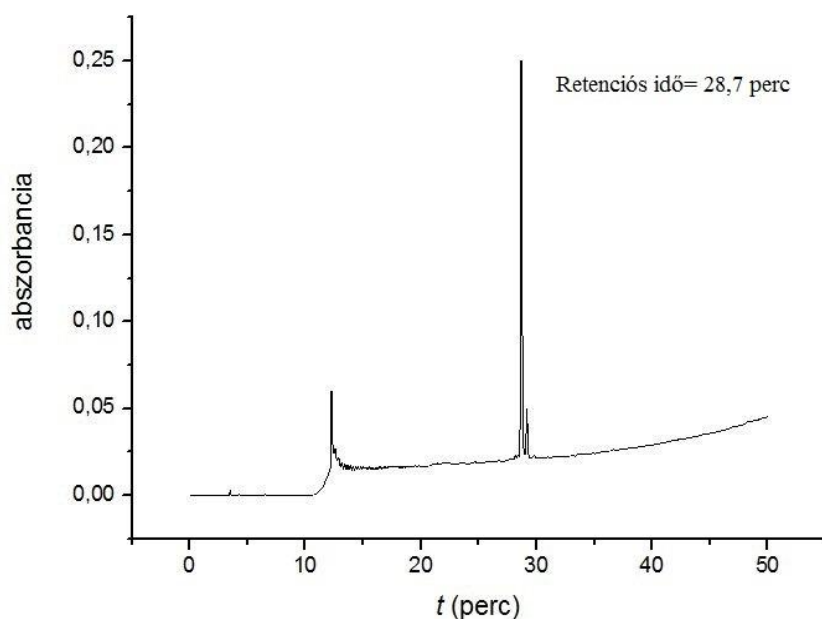
14. ábra: Dau-Aoa-[TKPR]₂-OH analitikai RP-HPLC kromatogramja

A kromatogram alapján látható, hogy a kapott konjugátum >95 %-os tisztaságú.



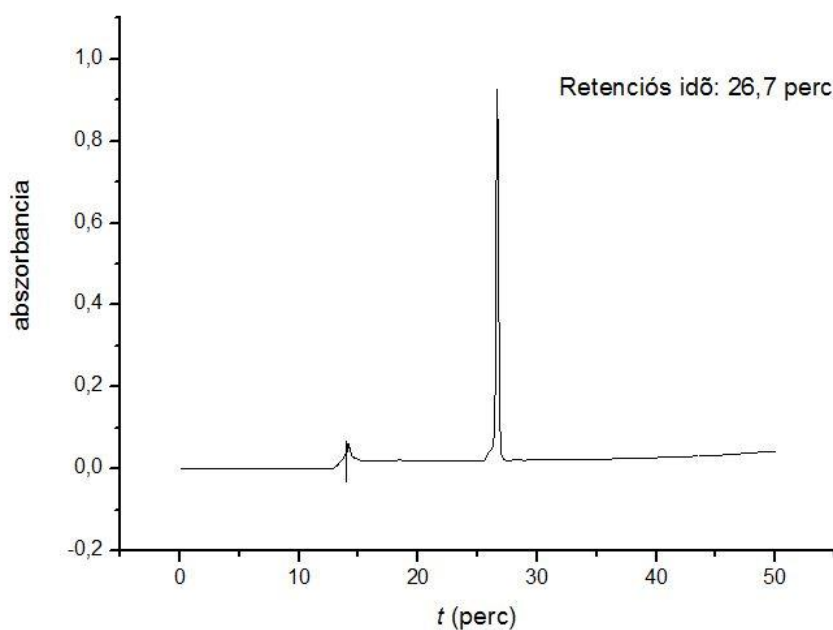
15. ábra: Dau-Aoa-GFLG-TKPR-OH analitikai RP-HPLC kromatogramja

A kromatogram alapján látható, hogy a kapott konjugátum több, mint 95 %-os tisztaságú.



16. ábra: Dau-Aoa-GFLG-[TKPR]₂-OH analitikai RP-HPLC kromatogramja

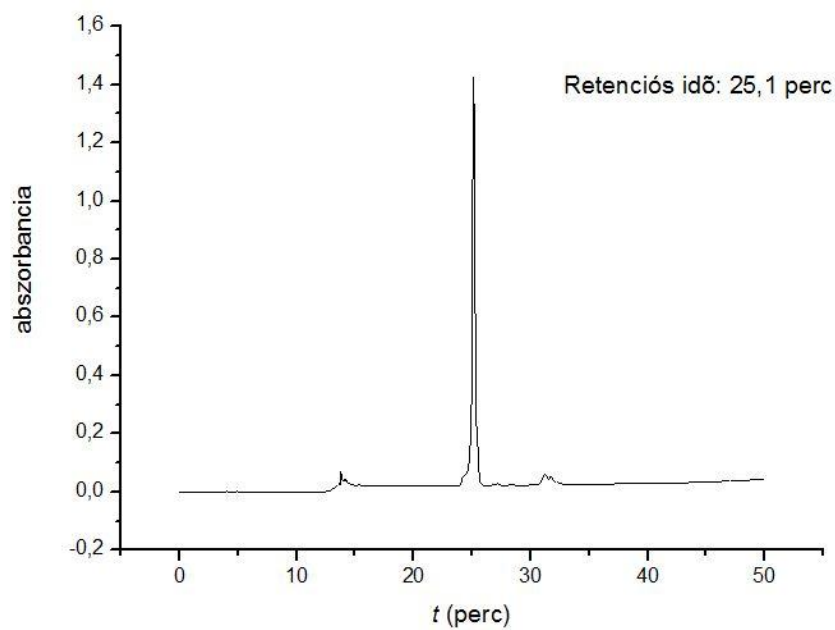
A kromatogram alapján látható, hogy a kapott konjugátum közel 90 %-os tisztaságú.



17. ábra: Dau=Aoa-TKPPR-OH analitikai RP-HPLC kromatogramja

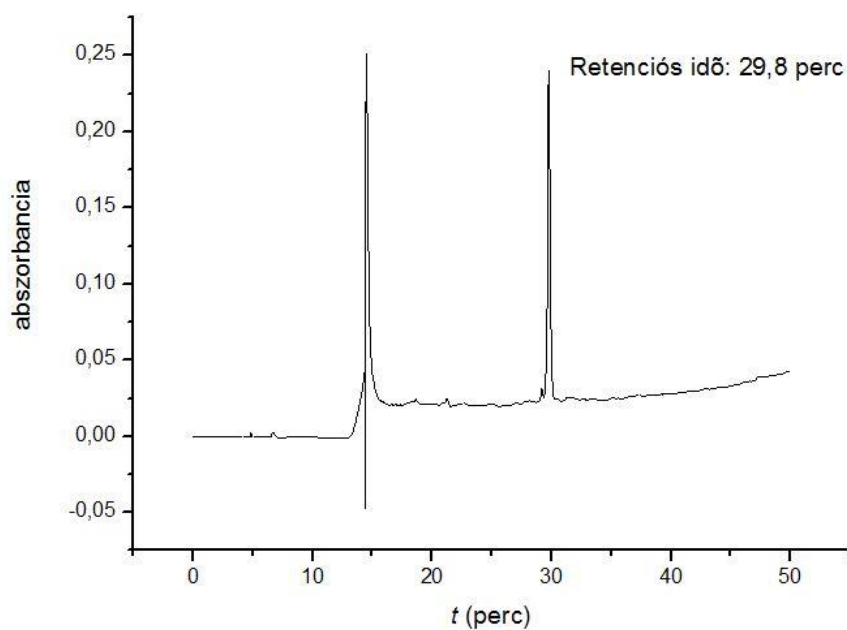
A kromatogram alapján látható, hogy a kapott konjugátum közel 90 %-os tisztaságú.

A 13-14 percnél látható kis abszorbanciájú csúcs (amely csak akkor látszik számottevően, ha nagyon híg oldatot injektáltunk), a készülékből származó oldószerhatás, mivel a távtartó egységgel konjugált molekulák jobb oldékonysága miatt több acetonitrilt kellett alkalmaznunk.



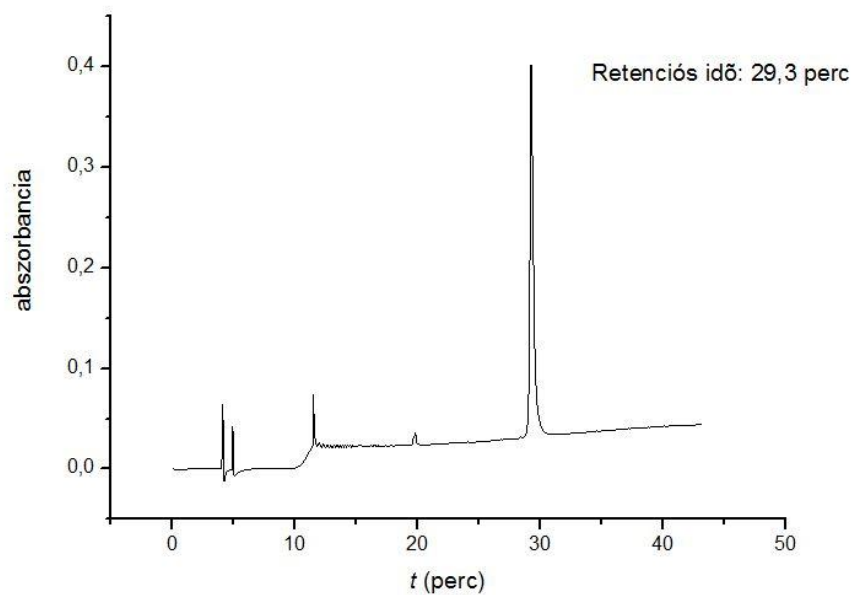
18. ábra: Dau-Aoa-[TKPPR]₂-OH analitikai RP-HPLC kromatogramja

A kromatogram alapján látható, hogy a kapott konjugátum közel 90 %-os tisztaságú.



19. ábra: Dau-Aoa-GFLG-TKPPR-OH analitikai RP-HPLC kromatogramja

A kromatogram alapján látható, hogy a kapott konjugátum több, mint 95 %-os tisztaságú.

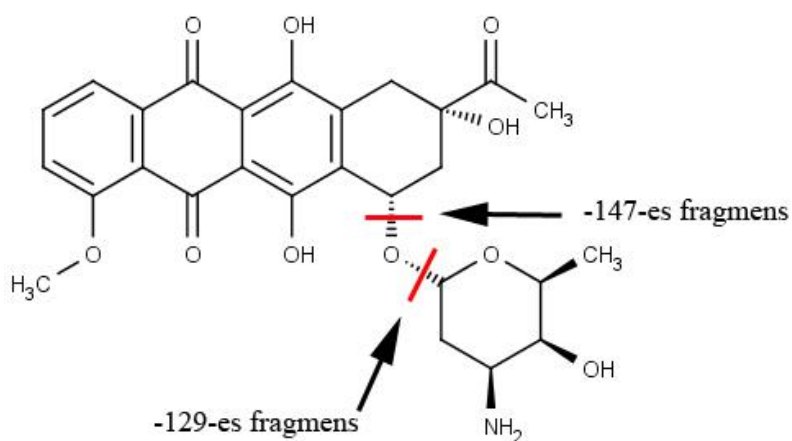


20. ábra: Dau-Aoa-GFLG-[TKPPR]₂-OH analitikai RP-HPLC kromatogramja

A kromatogram alapján látható, hogy a kapott konjugátum több, mint 95 %-os tisztaságú.

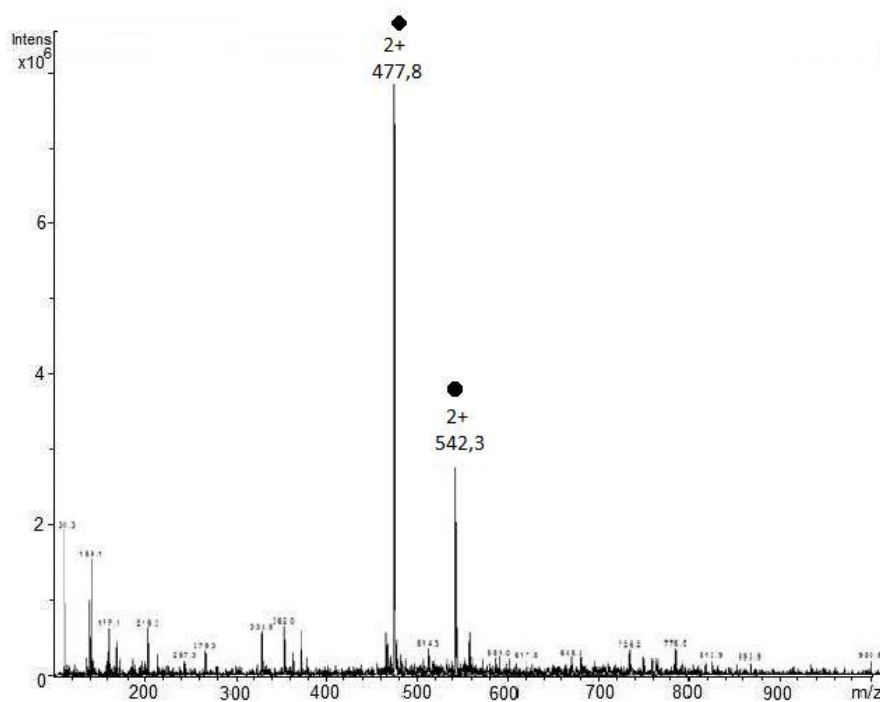
5.3 A tisztított termék tömegspektrometriás analízise

A tömegspektrometria körülményei között a daunomicin nem stabil, a daunózamin cukorrész lehasadhat, melyet a jelenlevő pozitív töltések katalizálnak. A daunomicin felhasadásának kétféle módja van: egy 129 Da és/vagy egy 147 Da tömegű fragmens leszakadása (21. ábra). Ez utóbbi esetben az antraciklin gyűrűben egy kettős kötés is kialakul.



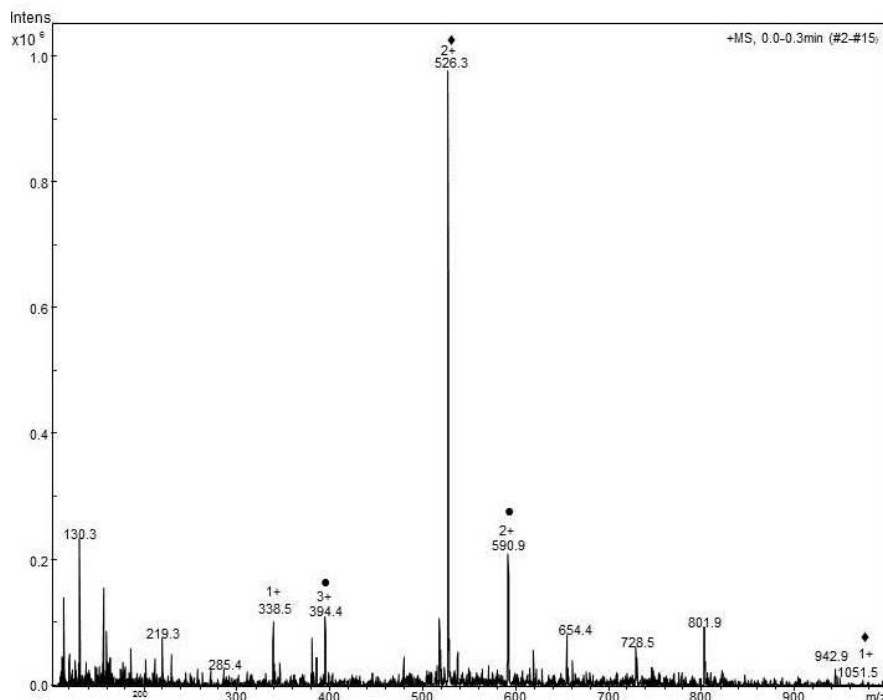
21. ábra: A daunomicin hasadási helyei MS-analízisnél

A tiszta Dau – peptid konjugátumok tömegspektrumait a 22-29. ábrák mutatják. Külön jelezzük a mérés során keletkező fragmentumokat is.



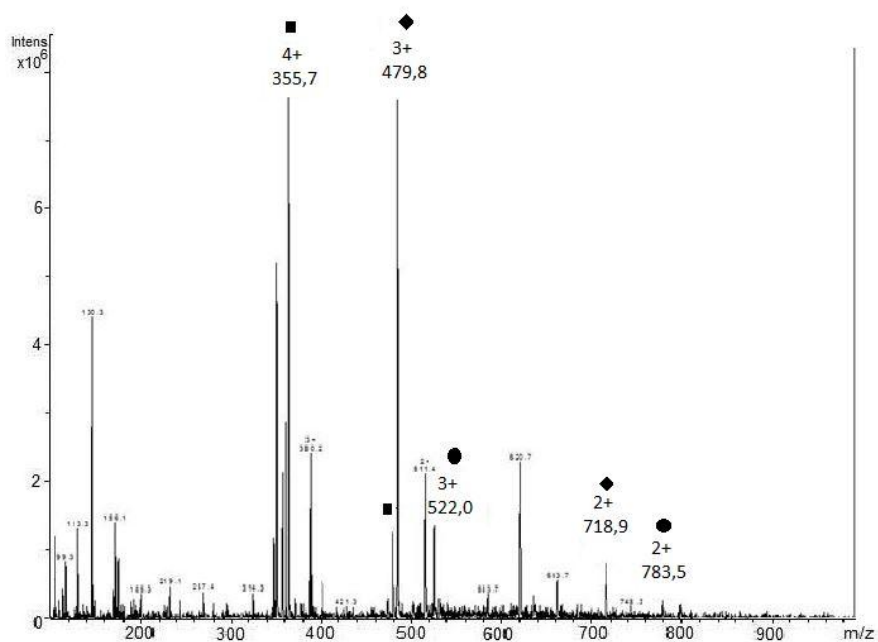
22. ábra: Dau=Aoa-TKPR-OH tömegspektruma

számított tömeg: 1082,6 Da; mért tömeg: ● 1082,6 Da ♦ 953,6 Da (-129 Da)



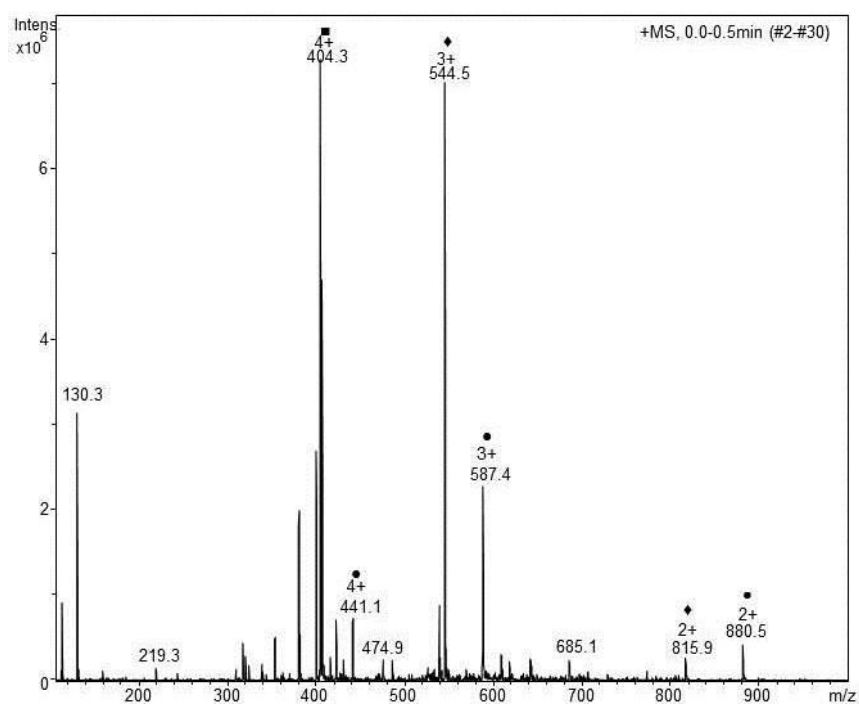
23. ábra: Dau=Aoa-TKPPR-OH tömegspektruma

számított tömeg: 1180,0 Da; mért tömeg: 1180,72 Da ● 1180,0 ♦ 1050,7 (-129 Da)



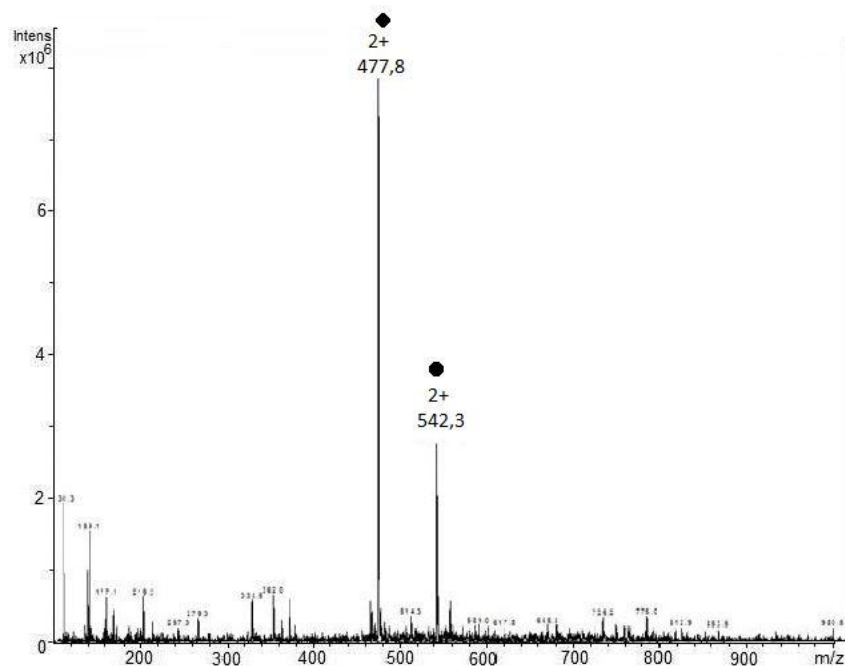
24. ábra: Dau=Aoa-[TKPR]₂-OH tömegspektruma

számított tömeg: 1566,2 Da; mért tömeg: ● 1566,0 Da ♦ 1436,7 Da (M-129 Da) ■ 1418,7 Da (M-147 Da)



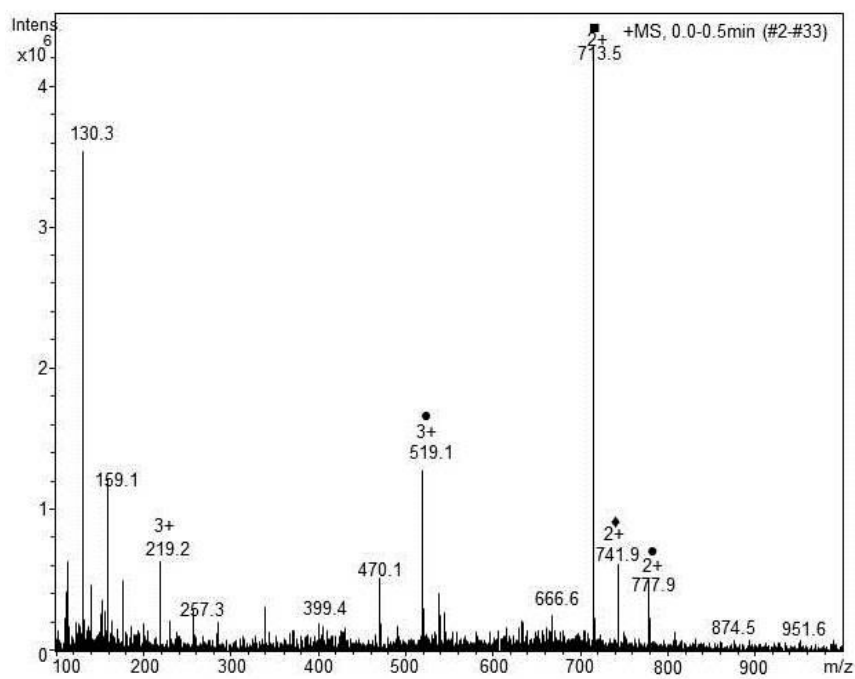
25. ábra: Dau=Aoa-[TKPPR]₂-OH tömegspektruma

számított tömeg: 1759,44 Da; mért tömeg: ● 1759,33 Da ♦ 1630,3 (-129 Da) ■ 1613,0 (-147 Da)



26. ábra: Dau=Aoa-GFLG-TKPR-OH tömegspektruma

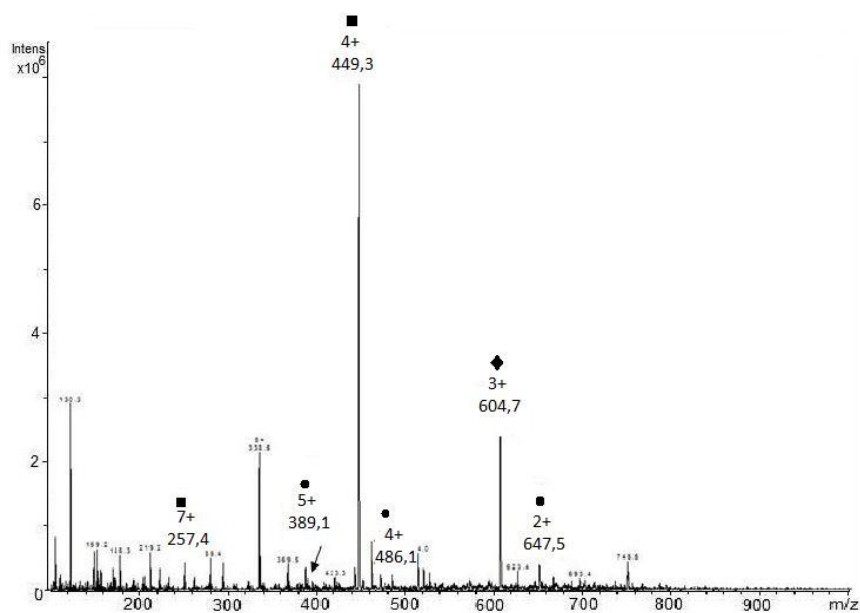
számított tömeg: 1457,04 Da; mért tömeg: ● 1456,9 Da ♦ 1329,0 Da (M-129 Da)



27. ábra: Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH tömegspektruma

számított tömeg: 1554,16 Da; mért tömeg: 1554,05 Da ■ 1424,9 (-129 Da) ♦ 1481,8 (-72)

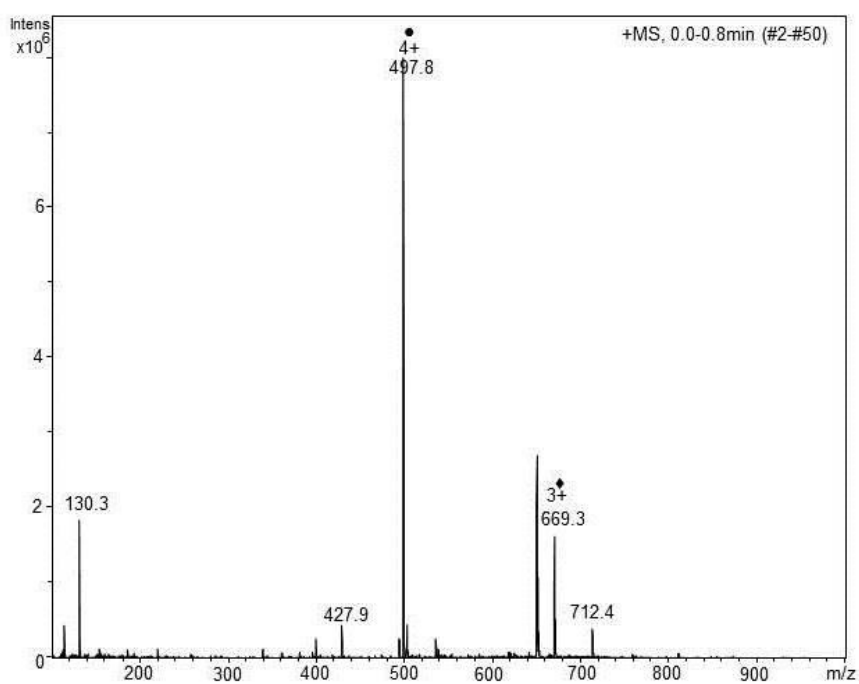
● 1554,05



28. ábra: Dau=Aoa-GFLG-[TKPR]₂-OH tömegspektruma

számított tömeg: 1939,64 Da; mért tömeg: ● 1939,4 Da ♦ 1811,1 Da (M-129 Da)

■ 1793,1 Da (M-147 Da)



29. ábra: Dau=Aoa-GFLG-[TKPPR]₂

számított tömeg: 1988,88 Da; mért tömeg: 1987,20 Da ● 1987,2 (-147 Da) ♦ 2005,0 (-129 Da)

5.5 *In vitro* citosztázis vizsgálatok

Ahogy a célkitűzésben is említettük az előállított konjugátumok tumorelles hatását MTT-teszt segítségével HL-60 humán promieloid leukémia sejtültúrán vizsgáltuk.

Az MTT egy sárga színű tetrazólium só (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid), amelyet az élő sejtek mitokondriumában található dehidrogenáz enzim képes formázán származékká alakítani. Ez a származék lila kristályos anyag, mely vizes közegben nem oldódik, de DMSO-ban feloldva kolorimetriásan vizsgálható. Mivel ezt az átalakítást csak az élő sejtek képesek megvalósítani, így a kolorimetriás detektálás alkalmas a konjugátumok citosztatikuss hatásának vizsgálatára.

A citosztatikuss hatás megállapításához a 6 órás kezelési időt követően a sejteket szérumsmentes médiummal mosták, ezután 3 napon keresztül szérums tartalmú médiumban inkubálták 37°C-on. A 72 óra elteltét követően a vegyületek *in vitro* citosztatikuss hatását MTT-teszttel határozták meg. A sejtes kísérleteket Pethő Lilla PhD hallgató végezte.

A citosztázis százalékos mértékét $\lambda=540$ nm-en mért abszorbancia értékek alapján a következő képlettel lehet meghatározni (a minták abszorbanciáját ELISA-reader Labsystems MS Reader, Finnország segítségével mérték), melyből ki kell vonni a $\lambda=620$ nm-en mért háttér értéket):

$$\text{citosztázis}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{Kezelt sejtek}}}{A_{\text{kontrollsejtek}}}\right) \cdot 100$$

ahol $A_{\text{kezelt sejtek}}$ a kezelt sejteknél, míg $A_{\text{kontroll sejtek}}$ a kontroll sejteknél mért abszorbancia. A citosztázis mértékét a koncentráció függvényében ábrázolva a kapott görbe segítségével meghatározható az a koncentráció érték, amely a sejtek felének osztódását akadályozza (citosztázis). Ez az érték az IC_{50} , melyeket a 11. táblázatban foglaltunk össze.

11. táblázat: Az előállított Dau – tuftsin-származék konjugátumok IC₅₀ értékei HL-60 humán promieloid leukémia sejteken

konjugátumok	átlag	szórás
Dau=Aoa-TKPR-OH	20,1	0,8
Dau=Aoa-[TKPR] ₂ -OH	14,5	4,5
Dau=Aoa-GFLG-TKPR-OH	1,1	0,6
Dau=Aoa-GFLG-[TKPR] ₂ -OH	3,8	0,6
Dau=Aoa-TKPPR-OH	47,7	19,5
Dau=Aoa-[TKPPR] ₂ -OH	7,4	1,8
Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH	0,5	0,2
Dau=Aoa-GFLG-[TKPPR] ₂ -OH	3,2	0,1

A kapott IC₅₀ értékek alapján megállapítható, hogy a GFLG spacer jelenléte a hatóanyag és az irányító molekula között növeli a tumorelles hatást. Ez minden bizonnyal a konjugátumok metabolizmusával van összefüggésben. Mivel a tapasztalataink szerint a szabad daunomicin nem szabadul fel az oximkötésből, így a legkisebb metabolit mindig a Dau=Aoa-Aaa-OH (Aaa a kapcsolódó aminosav). Tehát annak az aminosavnak a típusa, amelyhez a Dau kapcsolódik oximkötéssel keresztül nagyban befolyásolja a hatékonyságot. Ez két ok miatt lehetséges; az egyik, hogy milyen hatékonysággal szabadul fel ez a metabolit, a másik, hogy milyen affinitással tud kötődni a DNS-hez. Korábbi eredmények azt mutatták, hogy a Dau=Aoa-Gly-OH könnyen felszabadul lizoszóma homogenátumban és hatékonyan kötődik a DNS lánchoz [30]. A Dau=Aoa-GFLG-TKPR-OH és Dau=Aoa-GFLG-[TKPR]₂-OH, illetve a Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH és Dau=Aoa-GFLG-[TKPPR]₂-OH konjugátumpárok *in vitro* citosztatikus hatásai közel azonosak, tehát csak kis mértékben függ attól, hogy a konjugátumok egy vagy két kópiát tartalmaznak, illetve hogy tuftsinból vagy tuftsin antagonistából állnak. Azonban a jelen adatokból a Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH konjugátum tűnik a jobb jelöltnek. Későbbiekben vizsgálni fogjuk a konjugátumok stabilitását és sejtbejutási képességét. Ezen további információk alapján tudjuk majd véglegesen kiválasztani azt az irányító molekulát, amelyet majd leghatékonyabban tudunk alkalmazni az irányított tumorterápiában.

6. Összegzés

Napjainkban a világon az egyik vezető halálozási oknak a rákos megbetegedéseket tekintik. Mivel rengeteg típusa van ennek a kórnak, ezért nincs rá általánosan alkalmazható gyógymód. Ellenben számos módszer létezik a kezelésére, melyeknek megvannak a maguk előnyeik és hátrányaik is. A cél viszont mindig ugyanaz; a lehető legszelektívebben elpusztítani a rákos sejteket. Erre a küzdelemre úgy tűnik, hogy nagyon ígéretes módszer az irányított tumorterápia, mely során az antitumor hatású drogot egy irányító molekulára kapcsoljuk (pl. peptidre) ami specifikusan kötődik a tumorsejteken túléxpresszált receptorokhoz. Így a hatóanyag szelektíven a rákos sejtbe juttatható.

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban évek óta foglalkoznak az irányított tumorterápiában alkalmazható tuftsin alapú biokonjugátumok szintézisével. Egy 20 aminosavból felépülő hordozót (OT20), amely a kutyából származó tuftsin analógra (TKPK) épül, már használták hatóanyag célba juttatására, és több *in vitro* biológiai vizsgálat során sikerrel alkalmazták.

A Tudományos Diákköri kutatómunkánk során nyolc, az irányított tumorterápiára potenciálisan alkalmas peptid-hatóanyag konjugátumot állítottunk elő. Irányító molekulaként tuftsint, egy négy aminosavból (TKPR) álló természetes tetrapeptidet, illetve tuftsin antagonistát (TKPPR) (vagy azoknak származékait) alkalmaztuk, melyekhez aminooxiacetsavon keresztül oximkötéssel kapcsoltuk a rákellenes hatóanyagot, ami jelen esetben a daunomicin volt. A nyolc peptid – hatóanyag konjugátum segítségével vizsgáltuk, hogy a tuftsin egységek száma a peptidláncban, illetve egy enzimlabilis spacer beépítése az irányító molekula és a hatóanyag közé hogyan befolyásolja a biológiai aktivitást.

A peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel állítottuk elő, majd a daunomicint oldatban kemoselektív ligációs eljárással kötöttük az aminooxiacetyl-csoportot tartalmazó peptidhez. A konjugátumokat RP-HPLC módszerrel tisztítottuk, tisztaságukat analitikai HPLC-vel ellenőriztük, majd tömegspektrumukkal azonosítottuk azokat.

Az elkészített konjugátumok *in vitro* citosztázisát HL-60 promieloid leukémia sejt kultúráján vizsgáltuk, melyből kiderült, hogy azok a konjugátumok hatásosabbak, melyekben egy GFLG enzim labilis spacer is található. Ez azzal magyarázható, hogy más-más a konjugátumokból felszabaduló metabolit a két esetben, mivel a szabad hatóanyag nem keletkezik az oximkötésű konjugátumból. Annak viszont nincs szignifikáns hatása, hogy a tuftsin hány kópiában található meg a peptidláncban.

A leghatásosabb konjugátumnak a Dau=Aoa-GFLG-TKPPR-OH bizonyult, így a későbbiekben ezt a vegyületet még érdemes további biológiai vizsgálatoknak alávetni és hatásosságát akár *in vivo* vizsgálatok során tesztelni.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Zawawi M., 1001 Keleti közmondás – 1001 napra, *Szent Gellért Kiadó és Nyomda*, Budapest, **2009**
- [2] <http://www.who.int/cancer/en/>
- [3] http://www.ma.hu/eletmod.hu/201032/Vilagmeretu_osszefogas_februar_4_a_rakellenes_kuzdelem_vilagnapja
- [4] http://portal.ksh.hu/pls/ksh/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/tab17_02_08i.html
- [5] Biológiai lexikon, *Akadémiai Kiadó*, Budapest, **1977.**, 468.
- [6] Molekuláris Medicina Alapjai, Debreceni Egyetem jegyzete, Debrecen, **2011.**, 62-63
- [7] Tannock I.P., Hill R.P. et al, The Basic Science of Oncology (4th ed), *McGraw-Hill*, **2005**
- [8] SEER Stat Fact Sheets: Leukemia
- [9] <http://bhc.hu/magan/betegsegek/betegsegek-i-m/leukemia/?gclid=CJDkpLGC5b0CFXMPtAodbnUA7Q>
- [10] Malhotra V., Perry M.C., Classical chemotherapy mechanisms toxicities and the therapeutic window, *Cancer Biol Ther*, **2003**
- [11] Schally, A.V., Nagy, A.: Chemoterapy targeted to cancers through tumoral hormone receptors, *Trends Endocrinol. Metab.*, **2004**, 15, 300-310
- [12] Hortobágyi G. N., Anthracyclines in the treatment of cancer, *Drugs*, **1997.**; 54, 1-7.
- [13] Semsei F., Lautner-Csorba O., Kutszegi N., Schermann G., Eipel O., Falus A., Szalai Cs., Kovács T. G., Erdélyi D., A gyermekkori akut limfoid leukémia farmakogenetikája egy gyógyszer mellékhatás példáján, *Magyar Tudomány*, **2012.** 06. különszám
- [14] Šimunek T., Stérba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Gersl V., Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron, *Pharmacological Reports*, **2009.**, 61, 154–171.
- [15] Mező G., Hegedüs R., Szabó I., Célzott rákgyógyítás, *Természet Világa*, **2012.**, 143, 448-451.

- [16] Dharap S. S., Wang Y., Chandna P., Khandare J. J., Qiu B., Gunaseelan S., Sinko P. J., Stein S., Farmanfarmaian A., Minko T., Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide; *PNAS*; **2005.**; 12; 12962-12967.
- [17] Mező G., Manea M., Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones, *Expert Opin Drug Deliv.*, **2010.**, Jan, 7, 79-96.
- [18] Gyires K., Fürst Zs., *Farmakológia – farmakológia és farmakoterápia I.*, Medicina Könyvkiadó, Budapest, **2007.**, 965-968.
- [19] 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.*, **1964**, 38, 39-47
- [20] Szabó, I., Manea, M., Orbán, E., Csámpai, A., Bősze, Sz., Szabó, R., Tejeda, M., Gaál, D., Kapuvári, B., Radnai, L., Pryzbylski, M., Hudecz, F., Mező, G.: Development of an oxime bond containing daunorubicin-gonadotropin-releasing-hormone-III conjugate as a potential multivalent anticancer drug. *Bioconjugate Chemistry*, **2009**, 20, 656-665
- [21] Siemion I. Z., Kluczyk A., Tuftsin: on a 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery, *Peptides*, **1999.**, 20, 645-674.
- [22] Nishioka K., Amoscato A. A., Babcock G. F., Tuftsin: A hormone-like tetrapeptide with antimicrobial and antitumor activities, *Life Sci.*, **1981.**, 28, 1081-1090.
- [23] Bai K., Láng O., Orbán E., Szabó R., Köhidai L., Hudecz F., Mező G., Design, synthesis, and *In Vitro* Activity of Novel Drug Delivery Systems Containing Tuftsin Derivatives and Methotrexate, *Bioconjugate Chem.*, **2008.**, 19, 2260-2269.
- [24] Mező G., Kalászi A., Reményi J., Majer Zs., Hilbert Á., Láng O., Köhidai L., Barna K., Gaál G., Hudecz F., Synthesis, conformation and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence, *Biopolymers*, **2004.**, 73, 645-656.
- [25] Wey, J. S., Fan, F., Gray, M. J., Bauer, T. W., McCarty, M. F., Somcio, R., Liu, W., Evans, D. B., Wu, Y., Hicklin, D. J., Ellis, L. M.: Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer.*, **2005**, 104, 427-438

- [26] Merrifield B., [1] Concept and Early Development of Solid-Phase Peptide Synthesis, *Methods in Enzymology*, **1997**, 289, 3-13.
- [27] Merrifield R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149–2154.
- [28] Gregory A. G., *Synthetic Peptides – A User’s Guide*, W. H. Freeman and Company, **1992**.
- [29] 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*, **1970**, 34, 595-598.
- [30] Orbán E., Mező G., Schlage P., Csík G., Kulić Z., Ansorge P., Fellinger E., Möller H. M., Manea M. 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*, **2011**, 469-483