

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

KISS KRISZTINA

**Fág könyvtárból kiválasztott
peptidek alkalmazása irányító
molekulaként a célzott
tumorterápiában**

Témavezető: Dr. Mező Gábor

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport
Kémiai Intézet
Szerves Kémia Tanszék



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———
——— Természettudományi Kar ———
—— Budapest, 2014 ——

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Hudecz Ferenc tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy munkámat az ELTE Szerves Kémiai tanszékén, valamint az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban lehetővé tette.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak irányítását, tengernyi türelmét, a sok beáldozott hétvégi szabadidejét és a lekéssett meccseket. Köszönöm, hogy tanácsaival és észrevételeivel segítette munkámat és dolgozatom elkészültét.

Külön köszönettel tartozom Enyedi Kata Nórának és Pethő Lillának a tömegspektrometriás mérések elvégzéséért, a rengeteg jó tanácsért, segítségért és „buksisimikért”.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Gálné Babos Fruzsínának, Dr. Szabó Ildikónak és Dr. Bősze Szilviának a biológiai vizsgálatok elvégzéséért, illetve Dr. Gálné Babos Fruzsínának külön köszönöm, hogy a biológiai vizsgálatokkal kapcsolatos kérdéseimre külön időt szakított.

Végül szeretném köszönetemet kifejezni családomnak és barátaimnak, támogatásuk nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	
Tartalomjegyzék	
1 Bevezetés	1
2 Irodalmi áttekintés	2
2.1 Daganatterápia	2
2.1.1 Sebészeti beavatkozás	2
2.1.2 Sugárterápia	3
2.1.3 Kemoterápia	3
2.1.4 Daunomicin	4
2.1.5 Irányított tumorterápia	6
2.1.3 Kombinált irányított tumorterápia	7
2.2 Hormon peptidek antitumor hatása HT-29 vastagbél tumorsejteken	7
2.3 Fág könyvtáras peptidek	9
2.4 Peptidszintézis	10
2.4.1 A gyanta	12
2.4.2 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái	12
2.4.3 Fmoc/tBu stratégia	13
2.4.4 Kapcsolási reakciók ellenőrzése	14
3 Céltitűzések	16
4 Eredmények	17
4.1 A $\text{Dau}=\text{Aoa-VHLGYAT-NH}_2$ konjugátum szintézise	17
4.1.1 Az $\text{Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH}_2$ (1) szintézise	17
4.1.2 Az $\text{Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH}_2$ (2) és az $\text{Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH}_2$ (3) peptidek szintézise	18
4.1.3 Az aminosavacetilezett peptidek konjugálása daunomicinnel	19
4.2 A $\text{Dau}=\text{Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH}_2$ konjugátum szintézise	21
4.2.1 A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH}_2$ (7) szintézise	21
4.2.2 A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH}_2$ (8) és a $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH}_2$ (9) szintézise	21

4.2.3 A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-X-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH}_2$ ($\text{X}=\emptyset$ (7), Gly-Phe-Leu-Gly (8), Leu-Arg-Arg-Tyr(9)) ciklizálása és az izopropilidén hasítása.....	22
4.2.4 Az aminoszocietilezett ciklopeptidek (13, 14) konjugálása daunomicinhez.....	24
4.3 <i>In vitro</i> biológiai vizsgálatok.....	25
4.3.1 <i>In vitro</i> citosztázis meghatározása.....	25
4.3.2 <i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálatok áramlási citometriával.....	27
5 Kísérleti rész.....	30
5.1 A $\text{Dau}=\text{Aoa-VHLGYAT-NH}_2$ konjugátum szintézise.....	32
5.1.1 Az Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH ₂ (1) szintézise.....	32
5.1.2 Az Aoa-X-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH ₂ ($\text{X}=\text{Gly-Phe-Leu-Gly}$ (2), Leu-Arg-Arg-Tyr (3)) szintézise.....	33
5.1.3 Az Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH ₂ (1) és az Aoa-X-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH ₂ ($\text{X}=\text{Gly-Phe-Leu-Gly}$ (2), Leu-Arg-Arg-Tyr (3)) konjugálása daunomicinhez.....	35
5.2 A $\text{Dau}=\text{Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH}_2$ konjugátum szintézise.....	37
5.2.1 A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH}_2$ (7) szintézise.....	37
5.2.2 A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-X-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH}_2$ ($\text{X}=\text{Gly-Phe-Leu-Gly}$ (8), Leu-Arg-Arg-Tyr (9)) szintézise.....	38
5.2.3 Az Aoa-X-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH ₂ ($\text{X}=\emptyset$ (10), Gly-Phe-Leu-Gly (11), Leu-Arg-Arg-Tyr (12)) szintézise.....	40
5.2.4 Az Aoa-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH ₂ (13) és az Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH ₂ (14) konjugálása daunomicinhez.....	41
5.3 <i>In vitro</i> biológiai vizsgálatok.....	42
5.3.1 <i>In vitro</i> vitosztázis meghatározása MTT-teszttel.....	42
5.3.2 <i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálatok áramlási citometriával.....	43
6 Összefoglalás.....	44
7 Irodalom- és ábrajegyzék.....	45
8 Rövidítésjegyzék.....	48
9 Függelék.....	

1 Bevezetés

A WHO (Egészségügyi Világszervezet) adatai alapján 2012-ben több mint 8,2 millióan haltak meg rosszindulatú daganatos megbetegedésekben. A világon a negyedik legtöbb halált okozó rákos megbetegedés a kolorektális (vastagbél-, végbél-) tumor.¹ Az Európai Unióban a szív és érrendszeri megbetegedések után a rákos megbetegedések okozzák a második legtöbb halálozást. Azonban a kolorektális rák, itt már a második helyen áll a daganatos halálozások okozójaként.²

Hazánkban a halálozások 25%-át rákos megbetegedések okozzák. A tüdőrák után, az Európai Unióhoz hasonlóan nálunk is a második helyen áll a vastagbélrák, mint halálozást okozó ráktípus.³

A daganatok kialakulása minden esetben genetikai meghibásodásra vezethető vissza. Az ezt kiváltó tényezőket három csoportra oszthatjuk: kémiai (karcinogén vegyületek révén), fizikai (ionizáló, vagy nem ionizáló sugárzás révén), valamint biológiai (onkogén vírusok által). A daganatos sejtekre jellemző, hogy sejtnövekedésüket serkentő és gátló szabályozás felborul, és a sejtek kontrollálatlan osztódásba kezdenek.

A rákos megbetegedések sokfélesége miatt nincs általános gyógymód ellenük. A terápia megválasztása, a tumor elhelyezkedésétől, méretétől, előrehaladottságától, valamint a beteg állapotától függ. A lehetséges főbb kezelési módszerek: sebészeti beavatkozás, sugár-, kemo-, immun-, hormon-, illetve irányított terápia vagy ezek valamilyen kombinációja.⁴ Bár nem olcsó, de nagy valószínűséggel a személyre szabott, célzott tumorterápia hozhat jelentős áttörést a XXI.-századi rák gyógyításában.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Daganatterápia

A daganat a szervezetben valamennyi szervből, szövetből kiindulhat. Növekedését tekintve patológiás, progresszív növekedési tendenciát mutat, esetenként nyugalmi fázisokkal. A kontrollálatlan növekedés génhibákból adódik, ezzel elveszítve a normális növekedési és osztódási kontrollra való válaszkészséget. Daganat kialakulásának a feltétele az onkogenezis, első lépésként a génhiba halmozódása valamint a proliferatív képesség megőrzése. Fejlődésük és növekedésük a szervezet anyagcseréjétől függ. A daganatok lehetnek jóindulatúak (benignus) vagy rosszindulatúak (malignus). A benignus tumoroknak lokalizált és lassú a növekedésük, ebből következik, hogy ezekben az esetekben a sebészeti beavatkozás igen hatékony. A benignus típusú daganatok idővel malignussá alakulhatnak. A malignus tumorokat invazív, destruktív növekedés jellemzi, az esetek többségében a szervi anatómiai határokon is túlbujáznak és áttéteket képezhetnek. A daganatterápia célja a megfelelő terápia kiválasztása és alkalmazása, ez lehet: sebészeti beavatkozás, sugárterápia, immunterápia, hormonterápia, kemoterápia, valamint ezek kombinációja.⁵

A kolorektális rák kezelésében elsősorban a sebészeti beavatkozást alkalmazzák, mellette a sugár- és kemoterápiának jut fontos szerep, valamint az utóbbi időben egyre jelentősebb a célzott biológiai terápiák alkalmazása.⁶

2.1.1 Sebészeti beavatkozás

A daganatos betegek gyógyításában az első számú módszer a műtéti beavatkozás. Hatékonysága függ a tumor méretétől, illetve annak alakjától/lokalizáltságától, azaz, hogy a környező szövetekre milyen mértékben terjedt át.

Vastagbélrák esetében eddig ez az első számú és legjobb megoldás. A műtét során az érintett bélszakaszt kimetszik, illetve ezzel együtt a környező nyirokcsomókat is eltávolítják. A műtét típusa a már feljebb említett tényezőktől függ, továbbá attól, hogy a végbél záróizmait el kell-e távolítani. Az egyszerűbb esetekben gyakori az a megoldás, hogy a kimetszés után az ép vastagbélszakaszokat egyesítik.⁶

A műtét gyakran kombinált terápia része, megelőzheti, vagy követheti sugárkezelés, illetve kemoterápia, attól függően, hogy a tumor méretének a csökkentése-e a cél a beavatkozás előtt vagy az újabb kialakulást szeretnénk megelőzni.⁶

2.1.2 Sugárterápia

A sebészeti beavatkozások után a második leggyakrabban használt terápiás eljárás a sugárterápia, ez a kolorektális rák esetében is érvényes.⁶ A kezelés során ionizáló sugárzást alkalmaznak, ez a nagy energiájú ionizáló sugárzás károsítja a sejtek DNS-eit, ezzel gátolva a sejtosztódást. A károsodott DNS a sejtek pusztulását okozhatja. A leggyakrabban alkalmazott sugárforrások: ^{60}Co , ^{125}I . A sugárforrást vagy a beteg testén kívül helyezkedik el, vagy a testüregben, amikor is a szövetek közé szúrt tűben helyezik el a sugárforrást. Radioizotópos kezelés során injekció formájában juttatják be a sugárzó izotópot. Azonban ezek az eljárások nem csak a tumorsejtek DNS-ét károsítja, hanem az ép sejteket is.

Ezt az eljárást főleg a vastagbélrák esetében alkalmazzák, általában a sebészeti beavatkozás után, kombinálva kemoterápiával.⁶

2.1.3 Kemoterápia

A kemoterápiát főként a vérképző szervek rosszindulatú daganatai (leukémia, limfóma) esetén használják. Ennek ellenére a kolorektális rák utókezelésében is jelentős szerepe van.⁶ A kezelés során, a beteget citosztatikumokkal kezelik, ennek bejuttatása történhet szájon át vagy vénás infúzióként. Ezek a citosztatikumok vagy elpusztítják a rákos sejteket, vagy osztódásukat gátolják. A kemoterápiás szerek az osztódó vagy proliferáló sejteket célozzák meg. A tumorokban a normál szövetekhez képest nagyobb az osztódó sejtek száma, így a citosztatikumok hatása elsősorban ezekre hat. Azonban az emberi szervezetben a csontvelő, a száj- és bélnyálkahártya és a szőrtüszők sejtjei folyamatosan és gyorsan szaporodnak, így ezekre is hatással vannak, ezzel mellékhatásokat okozva.⁷ Mellékhatásokként jelentkezhet hajhullás, fáradékonyság, hányinger, valamint a csontvelő károsítása miatt a fehérvérsejtszám is csökken, ezzel előidézve az immunrendszer legyengülését.

A citosztatikumok hatásmechanizmusa alapján a következő típusokat különböztetjük meg:

- Alkilezőszerek (DNS replikációt gátolják, hibás replikációt eredményeznek), pl. ciszplatin, melfalán

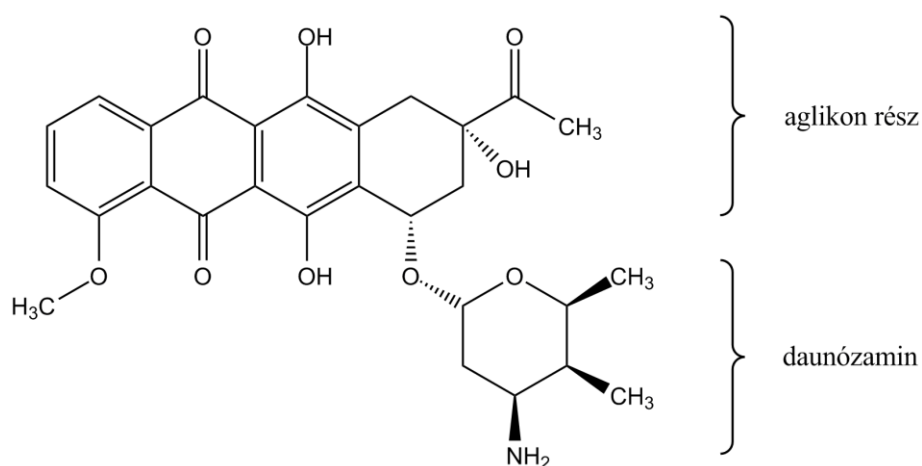
- Antimetabolitok (DNS szintézishez szükséges enzimek működését vagy köztes anyagcsere folyamatokat gátló anyagok), pl. daunomicin, doxorubicin
- Antibiotikumok (interkalációs komplexet képeznek a DNS-sel), pl. metotrexát
- Antimitotikumok (a mitotikus orsó kialakulását gátolják), pl. vinblasztin, vinkrisztin

Gyakran alkalmazzák kombináltan ezeket a citosztatikumokat eltérő hatásmechanizmusuk miatt, amely szinergista módon növelheti hatékonyságukat.⁸ Azonban a kezelés eredményességét korlátozza a beteg szerzett vagy öröklött multidrog rezisztenciája (MDR), azaz amikor a rákos sejtek rezisztenssé válnak az alkalmazott gyógyszerekkel szemben. A véráramból történő gyors kiürülés miatt a hatóanyagokat nagy dózisban kell alkalmazni, ezzel fokozódnak a toxikus mellékhatások, ami részben összefügg azzal, hogy kis molekulatömegük miatt, szabadon diffundálnak, ezáltal az egészséges szövetekhez is eljuthatnak.

2.1.4 Daunomicin

A daunomicin (1. ábra) az antibiotikumok családjába tartozó antraciklinek közé tartozik, a *Streptomyces peucetius* baktérium termeli.⁹ Vörös színű kristályos anyag. Kemoterápiás kezelések során gyakran alkalmazzák, főleg leukémia kezelésére.

Az aglikon részhez egy L-daunózamin kapcsolódik.¹⁰



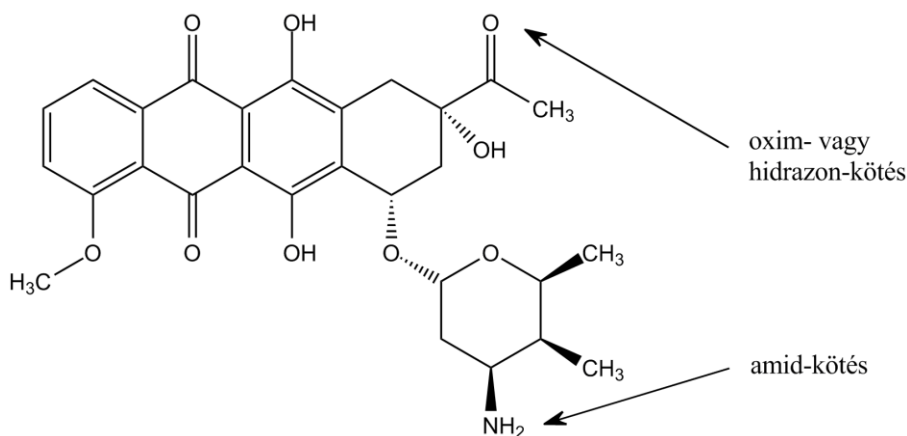
1. ábra Daunomicin

Kísérletek során megállapították, hogy a daunomicin gátolja a DNS szintézisét, így a sejtek osztódását is. Később kimutatták, hogy a kezelések során alkalmazott dózis befolyásolja a

hatásmechanizmust is. Hatásmechanizmusa során részt vehet lipidperoxidációban, alkilezheti a DNS-t, befolyásolhatja a helikáz enzim aktivitását, valamint a DNS-szálak szétválását interkaláció folytán, illetve gátolhatja a topoizomeráz II enzimet, amelynek fontos szerepe van a DNS transzkripció során.¹¹

A daunomicin — mint kemoterápiás szer — az egészséges sejtekre is hatással van, nem csak a daganatos sejtekre, így toxikus mellékhatásokkal is rendelkezik (többek között: hajhullás, hányás, hasmenés, étvágytalanság, immunszuppresszió, kardiotoxicitás). A kardiotoxicitás szervspecifikus mellékhatás, amit a szabadgyök képző tulajdonságára vezetnek vissza. Bőrrel érintkezve hólyaghúzó hatású és allergiás reakciót is kiválthat.

A káros mellékhatások elkerülése érdekében oligopeptidekhez (pl.: GnRH)^{12,13,14} és polimerekhez (pl.: HPMa¹⁵, EAK¹⁶) konjugálták a daunomicint. A daunomicin alapszerkezetének változtatása nélkül két konjugálásra alkalmas funkciós csoportja van; oxim- vagy hidrazon-kötés kialakítására az aglikon részen található 13-as C-atomján található oxocsoport és amid kötés kialakítására a daunózamin aminocsoportja (2. ábra).



2. ábra A daunomicin konjugálására alkalmas funkciós csoportok

A cukorrész aminocsoportján kialakított konjugáció nem kezdvező, mivel ekkor a konjugátum biológiai hasznosíthatósága jelentősen csökken. Hidrazon-kötés kialakítása esetén pedig, a pH érzékenysége (pH<5 esetén bomlik a hidrazon-kötés) miatt a tisztítása nehézkessé válik.¹⁴ Így a munkám során oxim-kötéssel konjugáltam a kiválasztott peptidekhez. A kötés kialakítása során a peptidlánchoz egy aminosavhoz kell kapcsolni, mely alkalmas arra, hogy a daunomicinnel kemoszelektív ligációs eljárásban oxim-kötést alakítson ki.

2.1.5 Irányított tumorterápia

Az irányított vagy célzott kemoterápia a kemoterápiának egy olyan módosított változata, amely arra törekszik, hogy a szelektivitás növelésével kiküszöbölje, de legalábbis csökkentse a kemoterápia mellékhatásait, ezáltal is javítva a kezelés alatt álló betegek életminőségét. A 90-es évek elején került előtérbe ez a módszer, lényege hogy a citosztatikus hatóanyagok szelektíven a rákos sejtekbe juttathatóak legyenek, ezzel elkerülve az egészséges szöveteken mutató toxicitását.

Ennek a terápiának az egyik csoportjába olyan anyagok tartoznak, amelyek a rákos sejtek felszínén található receptorokhoz kötődnek, meggátolva azt, hogy ezek a receptorok saját szubsztrátjukhoz kötődve olyan ingert közvetítsenek a sejtmagba, ami a sejt osztódását serkenti. Tehát a cél a receptor gátlása. Az egyik első ilyen molekula egy immunfehérje (monoklonális antitest) volt. A monoklonális antitestek, specifikusan a rákos sejt membránján található antigénekhez (receptorokhoz) kötődnek, így a megfelelő inger hiányában a rákos sejt elpusztul. A hatás fokozása érdekében ezekhez az antitestekhez különböző hatóanyagokat lehet kapcsolni.⁷

A kutatások során számos olyan receptort találtak, melyek a rákos sejtek membránján sokkal nagyobb számban vannak jelen (túlexpresszálnak). Ilyen receptorok pl. a GnRH-R, szomatostatin receptorok, EGF-R, VEGF-R, tuftsin receptorok.

Ha a hatóanyagot olyan molekulához kapcsoljuk, amely specifikusan a rákos sejtek receptoraihoz kötődnek, akkor szelektíven juttathatjuk be azokat, ezzel a hatóanyag csak a rákos sejtekre fejti ki a hatását.⁷

Ilyen rendszert alkotnak a hatóanyag szállító rendszerek (drug delivery systems), amelyek egy hordozóból, egy irányítóból és hatóanyagból épülnek föl. Hordozóként használhatunk oligo- és polipeptideket, valamint polietilénlikolt, irányítómolekulaként pedig antitesteket, cukrokat, lektineket, vagy más receptor-ligandumokat, például peptideket.¹⁷ Sokszor a hordozó és az irányító molekula megegyezik.

Az ilyen konjugátumok használatával elérhetjük, hogy azok specifikusak legyenek a daganatsejtre, továbbá ezek a konstrukciók javíthatják a citosztatikus hatóanyagok oldékonyságát. A konjugátumok a rákos sejt membránján található receptorokhoz kötődve receptor-mediált endocitózissal jutnak be a sejtbe, ahol lebomlanak és így a felszabaduló szabad hatóanyag vagy annak aktív metabolitja kifejti a hatását.¹⁸

Kolorektális rák esetén, a módszer, a daganatsejtek felszínén található növekedési faktor receptor (EGF-R) ellenanyaggal (Herceptin® (trastuzumab)) történő gátlásán alapul. Azonban ez a módszer akkor eredményes, ha a KRAS-teszt szerint a beteg a KRAS fehérje vad típusát hordozza, különben a hibás KRAS fehérje a sejtfelszíni növekedési faktor receptorfehérjének gátlása esetén is osztódási jelet fog továbbítani a sejtmag felé.¹⁹ Másik lehetséges módszer – mellyel kutatócsoportunk is foglalkozik – a már fentebb említett peptid-hatóanyag konjugátumok hormon receptorokon (GnRH és szomatosztatin receptorok) keresztül történő tumorsejtbe juttatása.^{20,21}

2.1.6 Kombinált irányított tumorterápia

A receptorok száma a tumorsejteken annak ellenére korlátozott, hogy túlexpresszálnak, ezért a konjugátum koncentrációjának a növelése egy határon túl nem teszi sikeresebbé a kezelést. Ezért több megoldást alkalmazhatunk. Az egyik lehetőség, ha egy irányító molekulához több hatóanyagot kapcsolunk, ekkor a térgátlásra figyelni kell, hogy az irányító molekula ne veszítse el a receptorhoz kötődő képességét.¹³ Egy másik megoldás különböző konjugátumok együttes alkalmazása. Ilyenkor eltérő receptorokhoz kötődő irányító molekulákat alkalmazunk, ezekhez kapcsolhatunk azonos vagy különböző hatóanyagokat. Mindkét esetben fokozott citosztatikus hatást érhetünk el additív vagy szinergista módon.

2.2 Hormon peptidek antitumor hatása HT-29 vastagbél tumorsejteken

Az irányított tumorterápiában nagy szerepet szánunk olyan konjugátumoknak, amelyek hormon peptideket tartalmaznak irányító molekulákként.¹² Ezeknek a hormon peptideknek a receptorai a legtöbb tumorsejten túlexpresszálnak, így jól alkalmazhatók szelektív célba juttatásra. A legnagyobb jelentősége a gonadotropin-releasing hormonnak (GnRH) és a szomatosztatinnak illetve analógjaiknak van, mert ezek a hormon molekulák önmagukban is tumornövekedést gátló hatással rendelkeznek. Egy GnRH – doxorubicin konjugátum már a klinikai vizsgálatok III. fázisában van emlő-, ovárium és endometrium-tumorok esetén.²² Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjában már hosszabb ideje foglalkoznak GnRH és szomatosztatin analógok daunomicint tartalmazó konjugátumaival. Ezekhez a peptidekhez aminooxiacetil-csoporton keresztül oxim-kötés kialakításával kapcsolták a daunomicint. Az oxim-kötésből a tapasztalatok szerint nem szabadul fel a szabad hatóanyag. A minimális

daunomicint tartalmazó metabolit egy olyan vegyület, amiben a Dau amonooxiacetyl-csoporton keresztül kapcsolódik egy aminosavhoz (Dau=Aoa-Aaa-OH). Bár ez a metabolit képes kötődni a DNS lánchoz, a kötődés erősségét, így az anyag hatékonyságát jelentősen befolyásolja a kapcsolódó aminosav típusa.²⁰ Tehát sok esetben hatékonyabb konjugátumokat kaptak abban az esetben, ha a daunomicint nem közvetlenül, hanem egy megfelelő enzimlabilis spaceren keresztül kapcsolták a hormon peptidhez. A teljesség igénye nélkül felsorolok néhány konjugátumot (1. táblázat), amelynek jelentősége lehet abból a szempontból, hogy az általam előállított vegyületeket össze tudjam hasonlítani a korábban előállított hormon peptid – hatóanyag konjugátumokkal.

1. táblázat GnRH és szomatosztatin analógok daunomicin konjugátumai

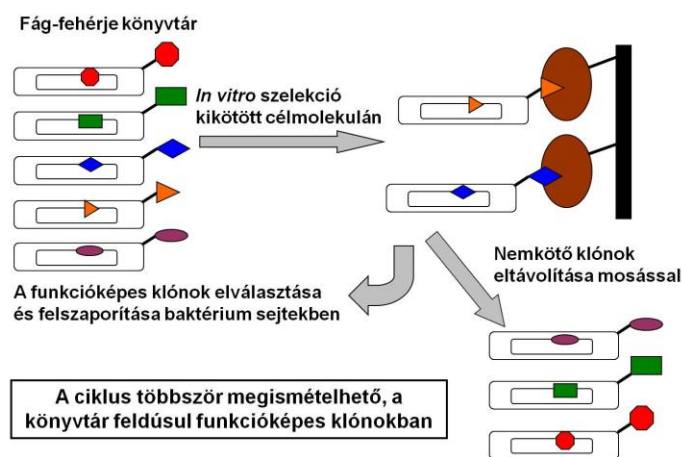
Hormon peptid – daunomicin konjugátum	Citosztázis HT-29 sejteken (IC₅₀; μM)
Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH ₂	14,2 ± 3,2
Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly)-Pro-Gly-NH ₂	19,4 ± 3,1
Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu)-Pro-Gly-NH ₂	28,6 ± 5,5
Dau=Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂	20,6 ± 4,0
Dau=Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	2,1 ± 0,9*
Dau=Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	3,2 ± 0,4*
Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	0,6 ± 0,1*

*A három szomatosztatin analóg Dau konjugátumok eredménye 24 órás kezelést követően (Hegedüs Rózsa „Tumorellenes hatóanyagtartalmú peptidhormon származékok szintézise és vizsgálata című PhD dolgozata alapján. Az adatok még nem publikáltak), míg a többi vegyület esetén 6 órás kezelést mutatnak az IC₅₀ értékek.

A kutatócsoportban további módosításokkal (szekvencia változtatás, rövid láncú zsírsavak beépítése, több és/vagy más típusú hatóanyag kapcsolása)^{13,21,23} előállítottak az itt feltüntetett vegyületeknél hatékonyabb származékokat is, de a munkámmal való összehasonlítás szempontjából ezek a vegyületek tekinthetők relevánsnak.

2.3 Fág könyvtáras peptidek

A fágbemutató (*phage display*) eljárást (3. ábra) George P. Smith alkotta meg, ezzel kísérleti körülmények között a fehérjék irányított *in vitro* evolúcióját megteremtve.²⁴ Az eljárás során a vizsgálni kívánt fehérje génjét egy bakteriofág burokkfehérjéhez kapcsolják, így fúziós fehérjék keletkeznek, amelyek beépülnek a fág burkába. Az idegen fehérje és a génje a fágon keresztül fizikailag kapcsolt, az idegen fehérje génje a fágészecske belsejében található, ezzel párhuzamosan a fágészecske külsején megjelenik az idegen fehérje. Az irányított evolúció során a gén pontosan megszabott kodonját változtatják meg. Egyidejűleg számos kodon is megváltoztatható, valamint megszabható a mutációk helye és pozíciónkénti variabilitása. A módszer során több milliárd variáns tartalmazó DNS-könyvtárakat hoznak létre, ezeket baktériumokba juttatják, ezzel létrehozva a fág-fehérje könyvtárakat. Minden fág csak egyfajta fehérjevariáns génjét hordozza. A módszer során több milliárd kísérletet végeznek párhuzamosan. A megfelelő fág-fehérje variánsokat a megfelelő gén szekvenálásával azonosítják (fizikailag kapcsolódik a fág-fehérje variáns a génhez). A módszer előnye, hogy nem függ a bonyolult sejtfüggő mechanizmusoktól, bármilyen baktériumban termelhető fehérjével lehet dolgozni, valamint a szelekció is kontrollált. A módszer során nem csak fehérjéket, hanem peptideket is lehet keresni.²⁵



3. ábra A fágbemutató sémája

A CP15 (VHLGYAT) peptidet és a diszulfidhidat tartalmazó c[CPIEDRPMC] ciklopeptidet, HT-29 vastagbél tumorsejtre való specifikusság alapján találták. Kutatások során ez a két peptid a vastagbélrák tumorsejtjeihez kötődött, de normál bélhámsejtekhez nem. Kiderült többek között azt is, hogy irányító tulajdonságuk, akkor is megmarad, ha a szekvenciát továbbépítik.^{26,27}

Bár azt még nem tudják, hogy milyen receptorhoz kötődnek és milyen módon jutnak be a sejtekbe, de nagyfokú specifikusságuk miatt irányító molekulaként használhatóak a HT-29 vastagbél tumort célzó irányított tumor terápiában.

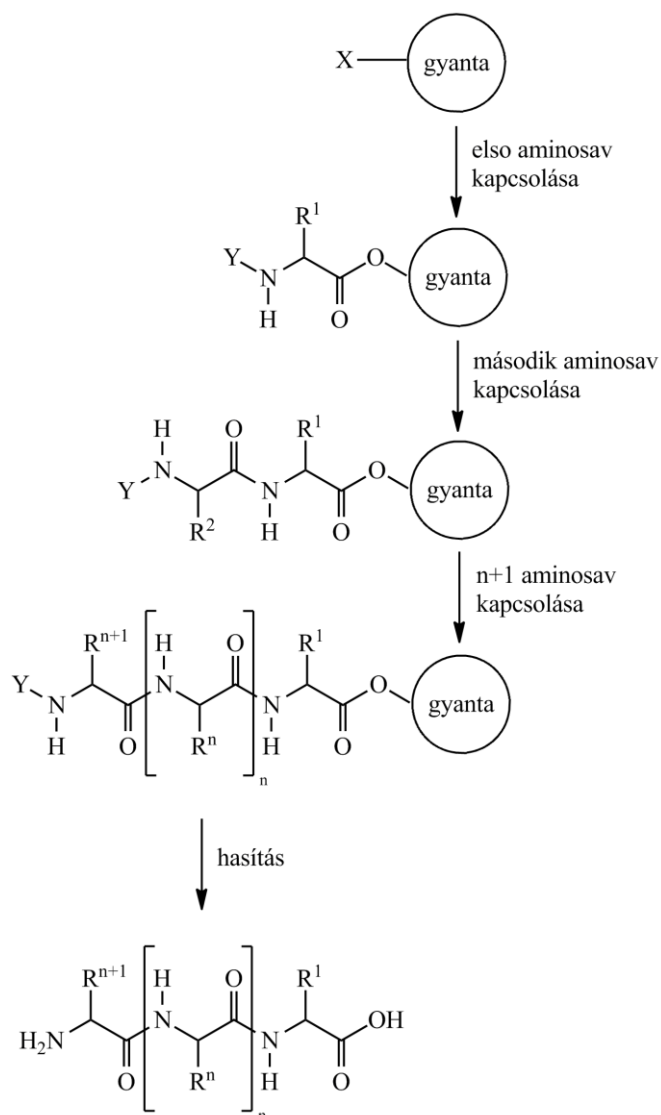
2.4 Peptidszintézis

Két legelterjedtebb módja a peptidek szintézisének, az oldatfázisú, illetve a szilárdfázisú peptidszintézis.

Az oldatfázisú peptidszintézis homogén oldatban zajlik. Minden kapcsolás után izolálni kell a terméket, ezt kicsapatással teszik meg. Egyes kapcsolások során a kitermelés 60-90%-os, így egy hosszú szintézis során, amikor sok aminosavat kell egymás után kapcsolni, előfordulhat, hogy a szintézis végére már nem marad peptid.

Ezért Merrifield kidolgozta a szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS) elvét, ezzel egyszerűbbé, gyorsabbá és hatékonyabbá téve a peptidszintézist.²⁸ Az oldatban történő szintézishez hasonlóan, a peptid felépítése történhet aminosavak lépésenkénti beépítésével (stepwise), illetve fragmentskondenzációval, amikor hosszabb, védett, vagy részlegesen védett peptidláncokat kapcsolnak össze a gyantán (konvergens szilárdfázisú peptidszintézis; CSPPS).²⁹

Az SPPS során a peptid egy szilárd, oldhatatlan hordozóhoz van kapcsolva, amíg be nem fejeződik a szintézis. A hordozó/gyanta egy oldhatatlan, funkciós csoportokat tartalmazó polimer, amelyeken keresztül a peptid C-terminális felőli első aminosava kapcsolódik (4. ábra). A szintézis során a C-terminális védelmét maga a gyanta látja el. Majd az átmeneti α -amino-védőcsoport hasítását követően, a következő aminosav-származék peptidkötéssel kapcsolható. A felkapcsolandó aminosav-származékokat megfelelő módon aktiválni, illetve védeni kell. Mivel az eljárás során nagy reagens felesleget alkalmazunk, az α -aminocsoportok mellett az érzékeny oldallánc funkciós csoportokat is védeni kell.



4. ábra A szilárdfázisú peptidszintézis elve

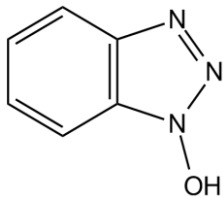
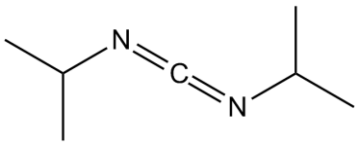
Ezeket nevezzük állandó védőcsoportoknak, mivel csak a szintézis végén kerülnek eltávolításra. A lépések ismétlésével előállítható a kívánt hosszúságú peptidlánc. A kész peptidlánchról le kell hasítani a gyantát, illetve a védőcsoportokat, ezt általában egy lépésben végezzük el. A megfelelő tisztítási eljárások után megkapjuk a szintetizálni kívánt peptidet.³⁰

A módszer előnye, hogy a reakcióelegy minden lépés után szűréssel eltávolítható és a gyanta mosható, így a melléktermékek és az elreagálatlan anyagok eltávolíthatóak, eközben a szilárd gyanta és a hozzá kapcsolt peptidlánc a szűrőn marad. Így a szintézis egyetlen reakcióedényben végezhető és a veszteségek jelentősen csökkennek. A szilárdfázisú peptidszintézis lényegesen gyorsabb (~2óra/aminosav), mint az oldatban végzett szintézis (1-2 aminosav/nap), illetve automatizálásra is lehetőséget ad.

Hátránya ugyanakkor, hogy a peptid izolálása és vizsgálata csak a gyantáról való lehasítás után lehetséges. A hibás szekvenciák elkerülése érdekében a kapcsolásoknak, hasításoknak majdnem 100%-os konverziójúnak kell lenniük. Ezt a már említett nagy reagensfelesleggel lehet elérni, 3-5 ekvivalens mennyiségű aminosav-származékot és az aktiváláshoz szükséges reagenseket jelent a gyantakapacitásra nézve.

A védett aminosavak kapcsolásához aktiválják az aminosav-származék karboxilcsoportját, ezzel elősegítve a peptidkötés kialakulását. Ehhez aktiváló reagenseket alkalmaznak, legáltalánosabban 1-hidroxibenztriazolt és valamilyen karbodiimid származékot (2. táblázat). A reakcióelegyben aktív észterek keletkeznek, ami *in situ* elreagál a növekvő peptidlánc szabad aminosocsoportjával (*in situ* akív észteres kapcsolás).

2. táblázat A peptidszintézis során használt aktiváló reagensek

aktiváló reagensek	rövidítés	képlet
1-hidroxibenztriazol	HOBt	
<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid	DIC	

2.4.1 A gyanta

A gyanta felületén funkciós csoportok találhatók, melyekhez hozzákapcsolható a peptidlánc első aminosavának a karboxilcsoportja. A jó hordozó mechanikailag stabil, kémiaiilag pedig inert, valamint az alkalmazott oldószerekben jól duzzad, ezzel elősegítve a reagensek hozzáférhetőségét az épülő peptidlánchoz. A gyanta és a peptid közti kovalens kötésnek stabilnak kell lennie a szintézis során, ugyanakkor a kész peptidláncnak könnyen lehasíthatónak kell lennie a gyantáról.

Többféle polimer hordozó (cellulóz, polivinil-alkohol, ioncserélő gyanták) közül, legjobbnak a klór-metilezett sztirol/1,4-divinilbenzol (1-2%) kopolimerje bizonyult. Ez a térhálós polimer gyanta kellőképpen porózus szerkezetű, ezzel elősegítve a reagensek számára az átjárhatóságot.³⁰

Manapság már többféle gyantát is forgalmaznak, melyek különböző funkciós csoportokat vagy funkcionizált linkereket alkalmaznak. Ezek lehetővé teszik a szilárdfázisú szintézisek sokoldalúságát.

2.4.2 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái

A szilárdfázisú peptidszintézisnek két általánosan használt típusa van:

- Boc/Bzl stratégia, ahol az aminosav-származékok α -aminocsoportját *terc*-butiloxikarbonil-csoporttal látják el, míg az oldallánc védőcsoportok többsége benzil-csoporton alapuló védőcsoport³¹
- Fmoc/^tBu stratégia, ahol az aminosav-származékok α -aminocsoportját 9-fluorenil-metiloxikarbonil-csoporttal védik, az oldalláncokat pedig *terc*-butil (ill. tritil) típusú védőcsoportokkal³²

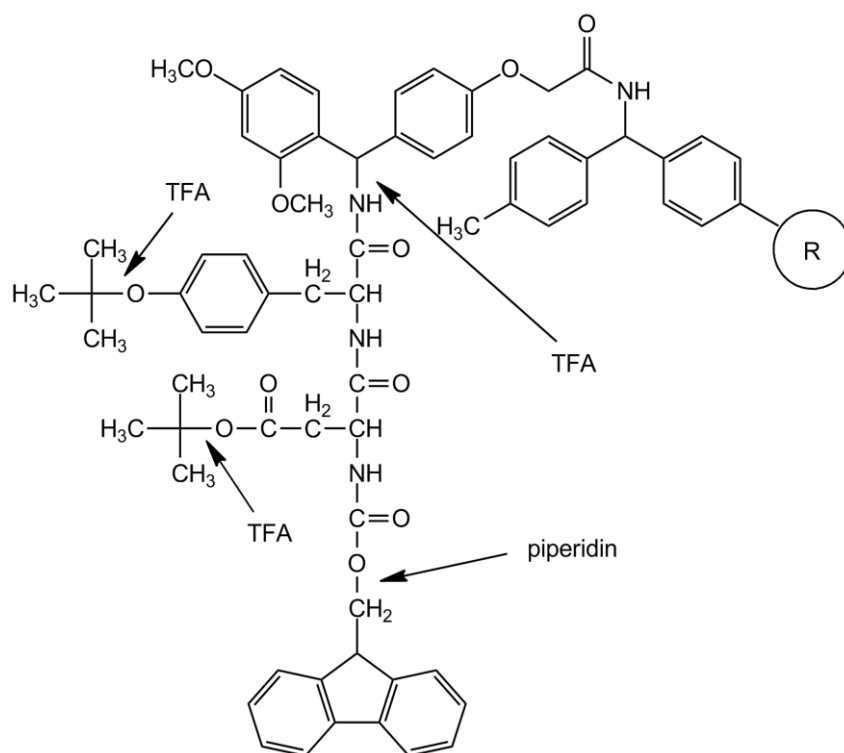
Az alkalmazott stratégiát a szintetizálandó peptid szekvenciája és/vagy a rendelkezésre álló eszközök határozzák meg.

A munkám során Fmoc/^tBu stratégiát alkalmaztam, így a következő fejezetben ezt fogom részletezni.

2.4.3 Fmoc/^tBu stratégia

Az Fmoc/^tBu módszer esetén a savas körülmények között érzékeny aminosavak (Cys, Met, Trp, Tyr) oxidációja és alkileződése elkerülhető a szintézis során, így az ilyen aminosavakat tartalmazó szekvenciák szintézisére ez a módszer az előnyösebb.

Az aminosav-származékok α -aminocsoportját 9-fluorenil-metiloxikarbonil-csoporttal (Fmoc) védik, míg az oldalláncok funkciós csoportjainak védelmére főleg *tert*-butil-típusú védőcsoportokat alkalmaznak. Az Fmoc-csoport savakkal szemben stabil, de bázisokkal szemben nem, így hasítása 20-55%-os piperidin/DMF oldattal történhet (5. ábra). A hasítás során dibenzofulvén keletkezik, ami igen reaktív és bizonyos aminosavakat képes alkilezni, de a piperidinnel stabil adduktot képez, ezzel elkerülve a mellékreakciókat.



5. ábra Fmoc-Asp(O^tBu)-Tyr(^tBu) Rink Amid MBHA gyanta

Kísérletek során igazolták, hogy a leghatékonyabb hasítóelegyként 2% piperidin és 2% 1,8-diazabiciklo[5,4,0]-undec-7-ént (DBU) tartalmazó DMF oldat alkalmazható. Ez az elegy gyorsan és hatékonyan hasítja le az átmeneti védőcsoportokat, még térbeli gátlás esetén is, valamint csökkenti az enantiomerizációt is.³³

Az aminosav-származékok kapcsolásához DIC és HOBt aktiváló reagenseket használnak, a gyantakapacitáshoz viszonyítva 3-5 ekvivalensnyi mennyiségben.

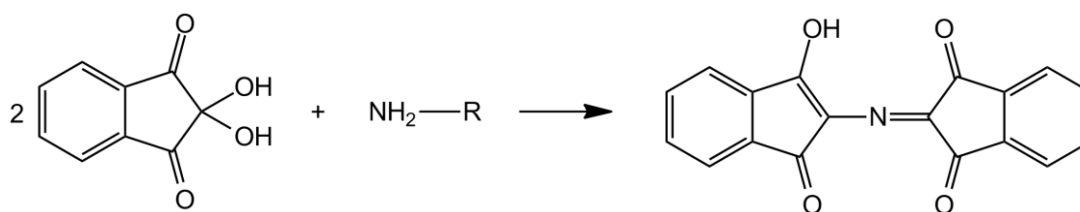
A gyantáról való lehasítással egy időben az állandó védőcsoportokat is lehasítják, ehhez 80-95%-os TFA oldatot használnak (5. ábra). A felszabadult karbokationok miatt gyökfogókat (kation befogó) kell alkalmazni. Gyökfogóként alkalmazható többek között víz, triizopropil-szilán (TIS).

Ennél a stratégiánál is többféle gyanta áll rendelkezésre a szintetizálandó peptidtől függően. A gyanták polisztirol-1,4-divilbenzol kopolimer alapúak, a savérzékenységük fokozására pedig megfelelő linkereket alkalmaznak.

A Wang-, a SASRIN- és a 2-klórtritol gyanta a hasítás után a C-terminálison karboxil véget eredményez, míg a Rink Amid típusú gyanták (pl. Rink Amid MBHA) amid végű peptidláncot eredményeznek.

2.4.4 Kapcsolási reakciók ellenőrzése

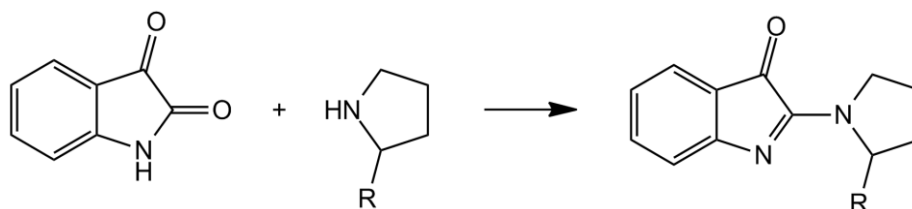
A szintézis során a hiányos szekvenciák elkerülése érdekében a reakciók sikerességét ellenőrizni kell. Kaiser-teszt során a szabad, elreagálatlan aminocsoportokat tartalmazó peptidek ninhidrinnel jellegzetes kék színű reakciót adnak (6. ábra). A teszt során a gyantaszemekhez pár csepp ninhidrin-, KCN- és fenol-oldatot adnak, majd 4-5 percen keresztül 104°C-on melegítik. Ha az oldat színe nem változik (sárga marad), akkor az a szabad aminocsoportok hiányát jelenti, tehát a kapcsolás sikeres volt. Abban az esetben, ha az oldat, illetve a gyantaszemek kékek lesznek, újrapcsolásra van szükség. A teszt már 1% szabad aminocsoport jelenlétében is pozitív tesztet ad (intenzív kék színű lesz).³⁴ Fmoc/^tBu stratégia esetén, a gyantaszemekben előfordulhat, hogy csak barnás színeződés figyelhető meg.



6. ábra Kaiser-teszt

Prolinhoz történő kapcsolás után, a Kaiser-teszt során izatint is adnak a gyantához, mivel a prolin egy aminosav, ami szintén reagál ninhidrinnel, de a keletkező termék színe sárga, így

az oldat színe nem változik meg az elreagálatlan prolin jelenlétében sem. Izatin hozzáadásával, sikertelen kapcsolás esetén a gyantaszemek vöröses-barnás színűek lesznek (7. ábra).³⁵



7. ábra Prolin reakciója izatinnal

3 Célkitűzések

A munkám célja olyan küldönböző fág könyvtárból választott peptidek daunomicinnel való konjugátumainak előállítása és vizsgálata volt, melyek szelektíven hatnak a HT-29 tumorsejtekre, ezáltal irányított tumorterápiára alkalmasak lehetnek. Irányító molekulának a VHLGYAT és a c[CPIEDRPMC] peptideket választottam, melyeket fágterképezések során találtak specifikusnak a HT-29 sejtekre.

Céлом volt:

- A VHLGYAT peptid (Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂) szintézise, illetve olyan aminooxiecetsav-származék előállítása (Aoa-VHLGYAT-NH₂), mely alkalmas a daunomicinnel való konjugációra.
- Az Aoa-VHLGYAT-NH₂ peptid konjugálása daunomicinnel.
- Tanulmányozni szerettem volna az enzimplabilis spacerek (Gly-Phe-Leu-Gly, Leu-Arg-Arg-Tyr) hogyan befolyásolják, a VHLGYAT irányítómolekula hatását, ezért céлом volt ezeket a spacereket tartalmazó VHLGYAT peptidek (Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH₂, Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂) szintézise is.
- Az enzimplabilis spacert tartalmazó VHLGYAT peptidek konjugálása daunomicinnel.
- A másik fágterképezés során talált diszulfidhidat tartalmazó (c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH₂) ciklopeptid szintézise, valamint aminooxiecetsav-származékának előállítása (Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂).
- Az Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ ciklopeptid konjugálása daunomicinnel.
- Ez esetben is vizsgálni szerettem volna, hogy az aminooxiecetsav és az irányító molekula között a spacer (GFLG, LRRY) szekvenciák, hogyan befolyásolják a biológiai hatást, ezért céлом volt ezeket a spacereket tartalmazó ciklopeptidek (Aoa-GFLG-c[CPIEDRPMC]-NH₂, Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂) szintézise is.
- A spacert tartalmazó c[CPIEDRPMC] peptidek konjugálása daunomicinhez.
- A fág könyvtárban található peptidek konjugátumainak *in vitro* biológiai vizsgálta, majd a kapott eredmények összehasonlítása a kutatócsoport által korábban szintetizált GnRH-III és szomatosztatin analógok hatásával HT-29-es sejtekre nézve, valamint az optimális szerkezet megállapítása a későbbi kombinált kezelésekhez.

4 Eredmények

A munkám során előzetes célkitűzéseimnek megfelelően, különböző peptid – hatóanyag konjugátumok szintézisével foglalkoztam.

Előállítottam két HT-29 vastagbél tumorra specifikus, fág könyvtárban található peptidet (VHLGYAT, c[CPIEDRPMC]), illetve ezeknek az aminooxiacetilezett származékait, amelyekhez később oxim-kötéssel daunomicint konjugáltam. Továbbá előállítottam az említett peptidek és az aminooxiacetsav közé épített enzimlabilis távtartó peptidekkel hosszabbított változataikat is. Az így kapott hat konjugátum *in vitro* citosztatikus hatását MTT-tesztel vizsgáltuk, HT-29 sejteken.

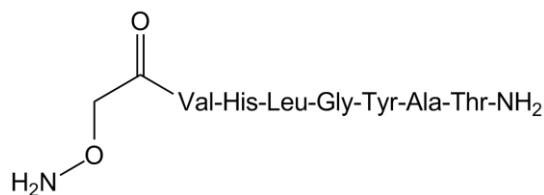
A kapott eredményeket összehasonlítottuk a kutatócsoportban korábban előállított GnRH-III analógok tumorellenes hatásával.

4.1 A Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂ konjugátum szintézise

4.1.1 Az Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (1) szintézise

A heptapeptid szintézist Fmoc/^tBu stratégiával Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán manuálisan végeztem. Az Fmoc-védőcsoportot 2% piperidin-2% DBU/DMF eleggyel hasítottam, az aminosavakat lépésenként DIC/HOBt kapcsoló reagensekkel DMF-ben építettem be a peptidláncba. A kapcsolási reakciókban a gyantakapacitásra számolt három ekvivalens mennyiségű aminosav-származékot és aktiváló reagenst használtam. A védett VHLGYAT szekvencia felépítése után a gyantát három egyforma részre osztottam, a kétharmadát későbbi továbbépítésre félreraktam, a maradék egyharmadhoz pedig Boc-védett aminooxiacetsavat (Boc-Aoa-OH) kapcsoltam. A kész peptidet 95% trifluorecetsav (TFA), 2,5% desztillált víz és 2,5% gyökfogyó eleggyel hasítottam a gyantáról. A hasítóelegy hatására a védőcsoportok is lehasadnak.

A kapott nyersterméket folyékony nitrogénben fagyasztottam le a liofilizáláshoz, ezzel elkerülve az acetonszárazjeges hűtést, mivel az aminooxiacetsav nagyon érzékeny az oxovegyületekre (acetonszárított pillanatszerűen elreagál oxim-vegyület keletkezése közben).

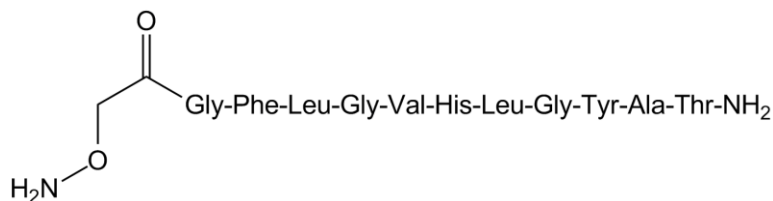


8. ábra Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (1)

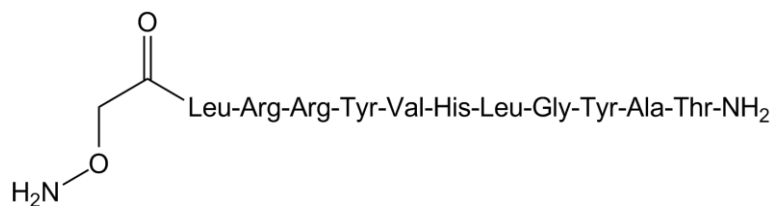
Sajnos az analitikai HPLC során kiderült, az elővigyázatosság ellenére a nyers termék jelentős részének az aminosav-oxiacetilsav-csoportja elreagált acetonnal. Az izopropilidén-csoportot liofilizálás után, 0,2M NaOAc pufferben (pH 5,08) oldva metoxiaminnal reagáltattam, hogy az aminosav-oxiacetilsavról az izopropilidén-csoportot eltávolítsam. A nyers aminosav-oxiacetilezett peptidet (8. ábra) fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztítottam. Tisztítás után a közti terméket – az érzékenysége miatt – izolálás nélkül használtam fel a daunomicinhez való konjugáláshoz.

4.1.2 Az Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (2) és az Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (3) peptidek szintézise

A peptid-gyanta félrerakott kétharmadát elfeleztem, az egyik felére GFLG, a másikra LRRY tetrapeptid spacer építettem, a megfelelő védett aminosavakból. Végül mindkét esetben a peptidek N-terminálisára aminosav-oxiacetilsavat (Boc-Aoa-OH) kapcsoltam. A kész peptideket (9. és 10. ábra) ezekben az esetekben is, a fent említett TFA/deszt. víz/gyökfogó elegyével hasítottam a gyantáról. Mivel ezekben az esetekben is jelentős mennyiségű izopropilidén származék keletkezett, a fent említett körülmények között visszaalakítottam az aminosav-oxiacetilsav származékká a peptideket. Majd preparatív RP-HPLC-n tisztítottam és liofilizálás nélkül azonnal felhasználtam a konjugáláshoz.



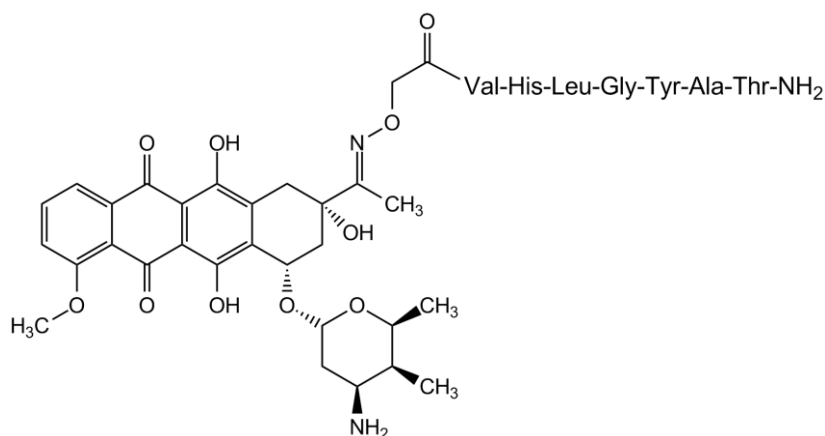
9. ábra Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (2)



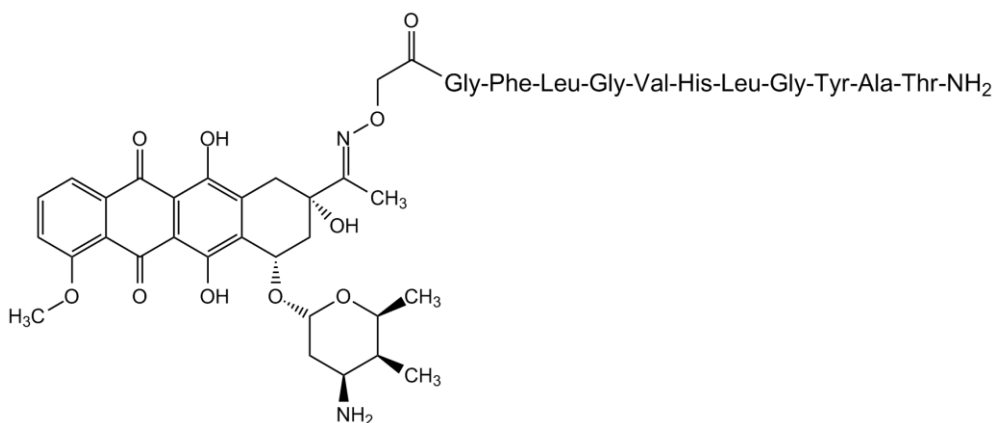
10. ábra Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (3)

4.1.3 Az aminooxiacetilezett peptidek konjugálása daunomicinnel

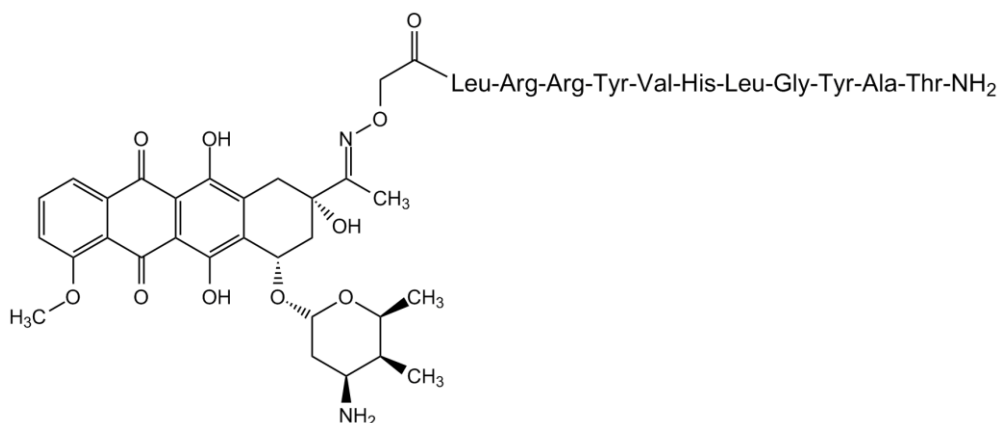
A tisztított peptideket 0,2M NaOAc pufferben (pH= 5,08) feloldottam (10 mg/ml - peptid/NaOAc puffer) és két ekvivalensnyi daunomicint adtam hozzájuk. A konjugálás szobahőmérsékleten, állandó kevertetés mellett egy éjszaka alatt végbement. A reakció során oxim-kötés alakult ki az aminooxiacetsav és a daunomicin 13-as C-atomja között (11., 12. és 13. ábra).



11. ábra Dau=Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (4)



12. ábra Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (5)



13. ábra Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (6)

A reakció előrehaladtát analitikai HPLC-vel követtem, majd a teljes átalakulás után a termékeket preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. A tisztított termékeket tömegspektrometriával azonosítottuk (3. táblázat).

3. táblázat A konjugátumok (4-6) analitikai adatainak összefoglalása

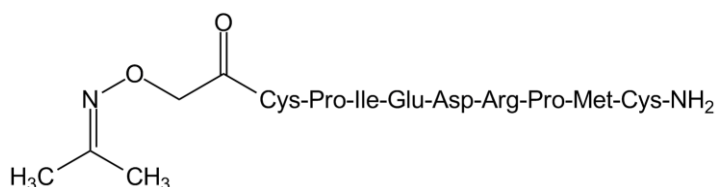
vegyület	R_t (perc)	$M_{számolt}$ (g/mol)	$M_{mért}$ (g/mol)
Dau=Aoa-VHLGYAT-NH ₂ (4)	26,1	1340,8	1341,0
Dau=Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH ₂ (5)	32,5	1715,82	1715,7
Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH ₂ (6)	28,2	1930,1	1929,9

A táblázat a Függelék 1-6. ábrái alapján készült.

4.2 A Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ konjugátum szintézise

4.2.1 A (CH₃)₂C=Aoa-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH₂ (7) szintézise

A szintézist ebben az esetben is Fmoc/^tBu stratégiával Fmoc- Rink Amid MBHA gyantán végeztem. Az Fmoc-védőcsoportot 2% piperidin-2% DBU/DMF eleggyel hasítottam, a megfelelő aminosav-származékokat DIC/HOBt keverékével kapcsoltam, itt is a gyantakapacitás alapján kiszámolt háromszoros mennyiségeket használtam. A védett peptid-gyantát elharmadoltam, az első harmadra –a korábbi tapasztalatok alapján– eleve izopropilidén-csoporttal védett aminooxiacetsavat ((CH₃)₂C=Aoa-OH) kapcsoltam a fent említett *in situ* aktív észteres eljárással, a másik két harmadot további szintézishez félretettem. Az így kapott peptidet (14. ábra) a gyantáról trifluorecetsavval hasítottam, desztillált víz, fenol, tioanizol és etánditiol jelenlétében. Az izopropilidén-csoport kivételével ekkor az összes többi védőcsoport is hasadt a peptidről. Az így kapott anyagot liofilizáltam. Majd preparatív RP-HPLC-n tisztítottam és tömegspektrometria segítségével azonosítottam.

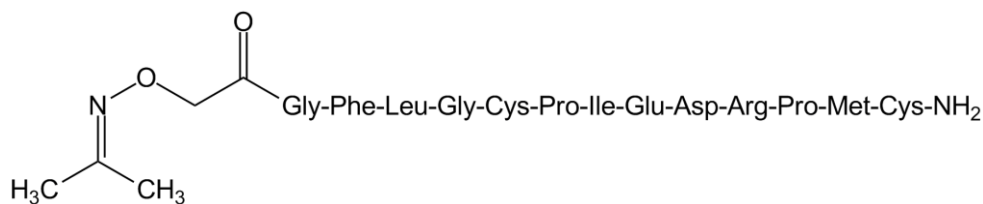


14. ábra (CH₃)₂C=Aoa-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH₂ (7)

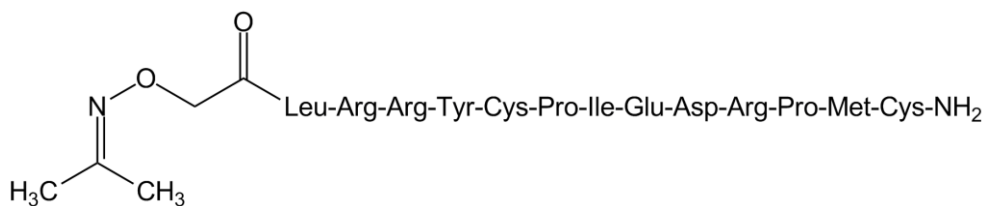
4.2.2 A (CH₃)₂C=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH₂ (8) és a (CH₃)₂C=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH₂ (9) szintézise

A peptid-gyanta félrerakott kétharmadát elfeleztem, az egyik felére GFLG, a másikra LRRY tetrapeptid spacer építettem, a megfelelő védett aminosavakból. Végül mindkét esetben a peptidek N-terminálisára megfelelően védett aminooxiacetsavat ((CH₃)₂C=Aoa-OH) DIC/HOBt keverékével kapcsoltam. A kész peptideket (15. és 16. ábra) ezekben az esetekben is, a fent említett TFA/deszt. víz/fenol/tioanizol/etánditiol eleggyel hasítottam a gyantáról.

Az így kapott nyersterméket liofilizáltam. A liofilizált anyagot preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam és tömegspektroszkópia segítségével azonosítottam.



15. ábra $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-Gly-Phe-Lue-Gly-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH}_2$ (8)



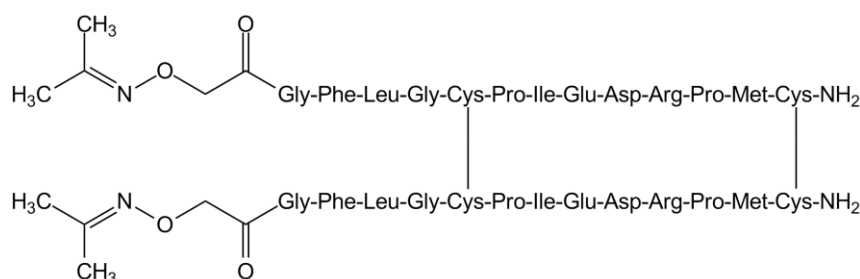
16. ábra $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH}_2$ (9)

4.2.3 A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-X-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH}_2$ (X= Ø (7), Gly-Phe-Leu-Gly (8), Leu-Arg-Arg-Tyr(9)) ciklizálása és az izopropilidén hasítása

Az előzetesen tisztított és tömegspektrometriával azonosított két ciszteint tartalmazó peptideket (7-9) 0,1M Tris pufferben (pH= 8,1) oldottam és egy éjszakán át szobahőmérsékleten ciklizáltam. Az intermolekuláris diszulfid-híd kialakulásának elkerülése érdekében híg oldatot alkalmaztam (0,2 mg/ml). A reakció végbemenetelét Elmann-teszttel ellenőriztem. A reakció befejeződése után az oldatot savanyítás után liofilizáltam. Majd preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam és analitikai HPLC-vel, illetve tömegspektrometriával ellenőriztem a terméket. Az ellenőrzött $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-X-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH}_2$ (X= Ø (10), Leu-Arg-Arg-Tyr (12)) termékeket liofilizáltam.

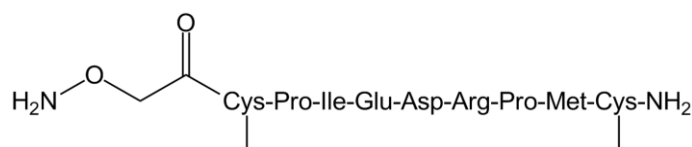
A tömegspektrometriai adatok alapján a várt $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH}_2$ (11) ciklopeptid helyett dimer ciklopeptid keletkezett (17. ábra). A dimerizáció csak a (8) peptid esetén alakult ki, tehát a GFLG spacer jelenléte növeli az aggregációt. A (8) peptid újraciklizálása során hígabb peptid-Tris puffer oldatot (0,1M; pH= 8,1) alkalmaztam (0,1 mg/ml) valamint aggregációt gátló szert ($c= 1 \text{ mol/dm}^3$) is adtam a reakcióelegyhez. (Az említett probléma és az idő hiánya miatt, a Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-

c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH₂ konjugátumot nem tudtam előállítani, az újraszintézis során eddig a lépésig jutottam el. A dolgozatomban további részében, így a Dau=Aoa-GFLG-c[CPIEDRPMC]-NH₂ konjugátum szintézise és biológiai vizsgálata nem szerepel.)

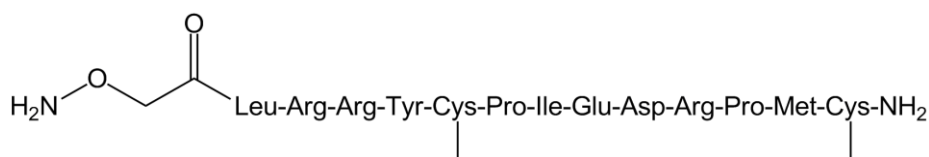


17. ábra Az izopropilidén védett Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH₂ ciklikus dimer (eddigyi tapasztalatok és irodalmak alapján, valószínűsített szerkezet)

A liofilizálás után a peptideket metoxiaminnal, 0,2M NaOAc pufferben (pH 5,08) oldva reagáltattam, hogy az aminosavakról az izopropilidén védőcsoportot eltávolítsam. Az aminosavak izopropilidén védőcsoportjának eltávolítását analitikai HPLC-vel ellenőriztem. A nyers peptideket (18. és 19. ábra) RP-HPLC-vel tisztítottam, majd az oldatot bepároltam és izolálás nélkül felhasználtam a daunomicinnel történő konjugálásukra.



18. ábra Aoa-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH₂ (13)

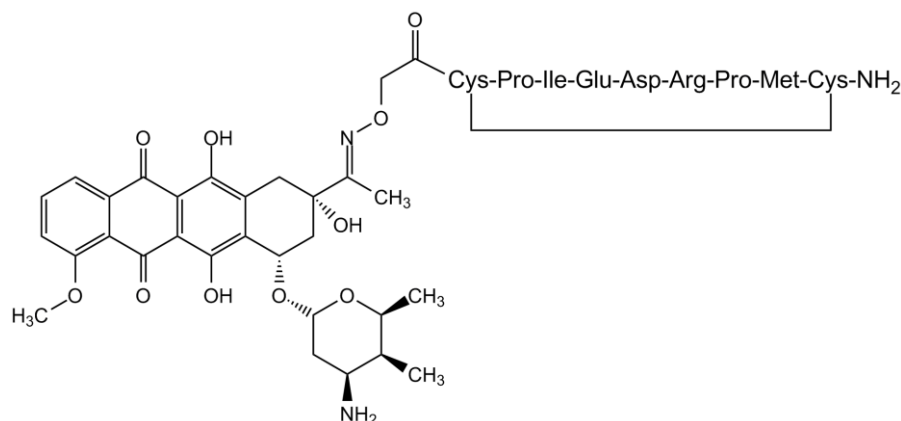


19. ábra Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH₂ (14)

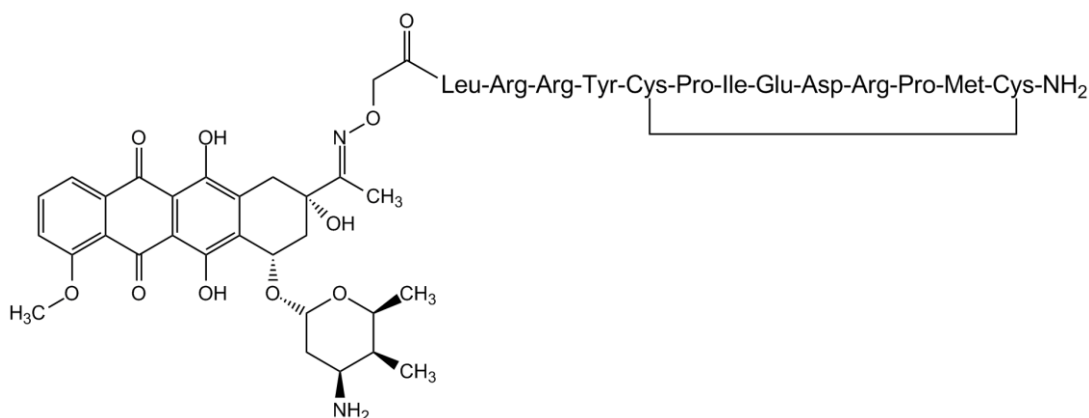
4.2.4 Az aminosavtartalmú ciklopeptid (13, 14) konjugálása daunomicinhez

Az aminosavtartalmú peptideket minden esetben 0,2M NaOAc pufferben (pH= 5,08) konjugáltam a daunomicinhez. A liofilizált peptideket két ekvivalensnyi daunomicinnel oldottam fel, majd egy éjszakán át, állandó keverés mellett, szobahőmérsékleten kapcsoltam. Oxim-kötés kialakításával a daunomicin 13-as C-atomja és az aminosav amincsoportja kapcsolódott össze (20. és 21. ábra).

A kapott termékeket preparatív HPLC-vel tisztítottam. A tiszta peptidet tömegspektrometriával és analitikai HPLC-vel analizáltam (4. táblázat).



20. ábra Dau=Aoa-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH₂ (15)



21. ábra Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH₂ (16)

4. táblázat A konjugátumok analitikai adatainak összefoglalása

vegyület	R_t (min)	$M_{számolt}$ (g/mol)	$M_{mért}$ (g/mol)
Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (15)	29,4	1642,8	1642,7
Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (16)	28,9	2231,52	2231,4

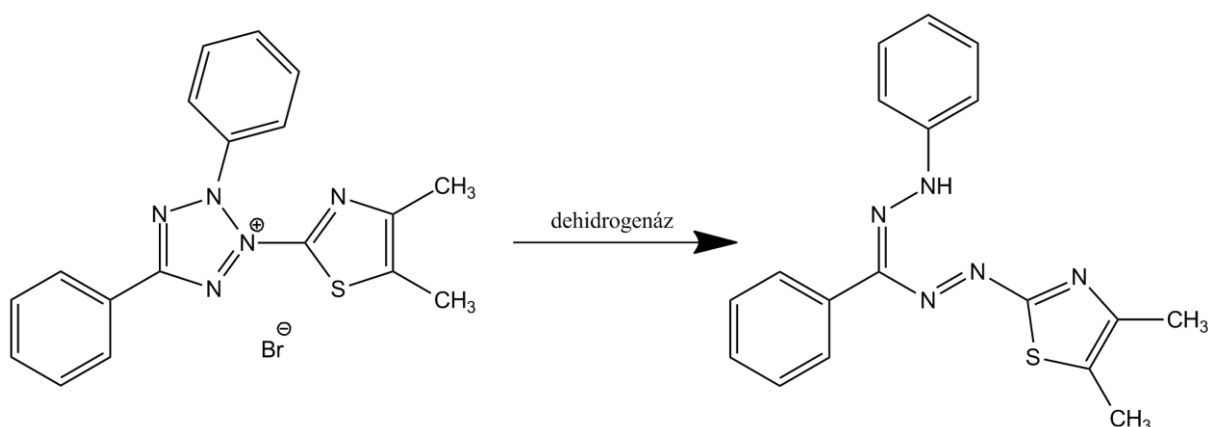
A táblázat a Függelék 11., 13., 15. és 17. ábrái alapján készült.

4.3 *In vitro* biológiai vizsgálatok

Az előállított konjugátumok *in vitro* citosztázisát MTT-teszttel határoztuk meg, a sejtbejutási tulajdonságaikat pedig áramlási citométerrel vizsgáltuk HT-29 vastagbélkarcinóma sejteken.

4.3.1 *In vitro* citosztázis meghatározása

Az MTT-t (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) az élő sejtek mitokondriumában található dehidrogenáz enzim képes átalakítani formazán származékká (22. ábra). Ez a formazán származék lila színű kristályos anyag, mely vízben nem, de DMSO-ban oldódik, így kolorimetriásan vizsgálható.



22. ábra Az MTT átalakulása a dehidrogenáz enzim hatására

A citosztázis mértékét százalékosan, az alábbi képletből kapjuk meg:

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

Az abszorbancia értékeit $\lambda=540$ nm-en mérjük. A mért értékből a $\lambda=620$ nm-en mért háttér értékeket ki kell vonni.

A képletben az $A_{\text{kezelt sejtek}}$ a kezelt sejtek, az $A_{\text{kontroll sejtek}}$ a kontroll sejtek esetében mért abszorbancia. Ha a citosztázis mértékét a koncentráció függvényében ábrázoljuk, a kapott görbe segítségével meghatározható az a koncentrációérték, amely a sejtek 50%-át gátolja az osztódásban (citosztázis). Az így kapott érték lesz az IC_{50} .

A citosztatikus hatás meghatározásához 6 és 24 órás kezelési idő után a sejteket mossuk, majd további 72 órára szérumban tartalmú médiumban inkubáljuk 37°C-on. 72 óra letelte után a vegyületek *in vitro* citosztatikus hatását MTT-teszttel határozzuk meg.

5. táblázat Az előállított konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatása HT-29 sejteken (IC_{50} értékek, μM)

vegyület	citosztázis (6 h)	citosztázis (24 h)
Dau=Aoa-VHLGYAT-NH ₂ (4)	>100	45,2
Dau=Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH ₂ (5)	>100	>100
Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH ₂ (6)	62,7	21,3

Az *in vitro* citosztázis vizsgálatok alapján (5. táblázat) az LRRY spacer tartalmazó konjugátum (6) hatékonyabbnak bizonyult a többi konjugátumhoz képest (4,5). A GFLG tetrapeptidet tartalmazó konjugátum még 24 óra elteltével se mutatott citosztatikus hatást. Ez azzal is magyarázható, hogy az apoláris tetrapeptid spacer (GFLG) rontja az oldhatóságot vízben és médiumban, így a vizsgálat során a konjugátum egy része kicsapódott. Emiatt a mért citosztatikus hatása romlott.

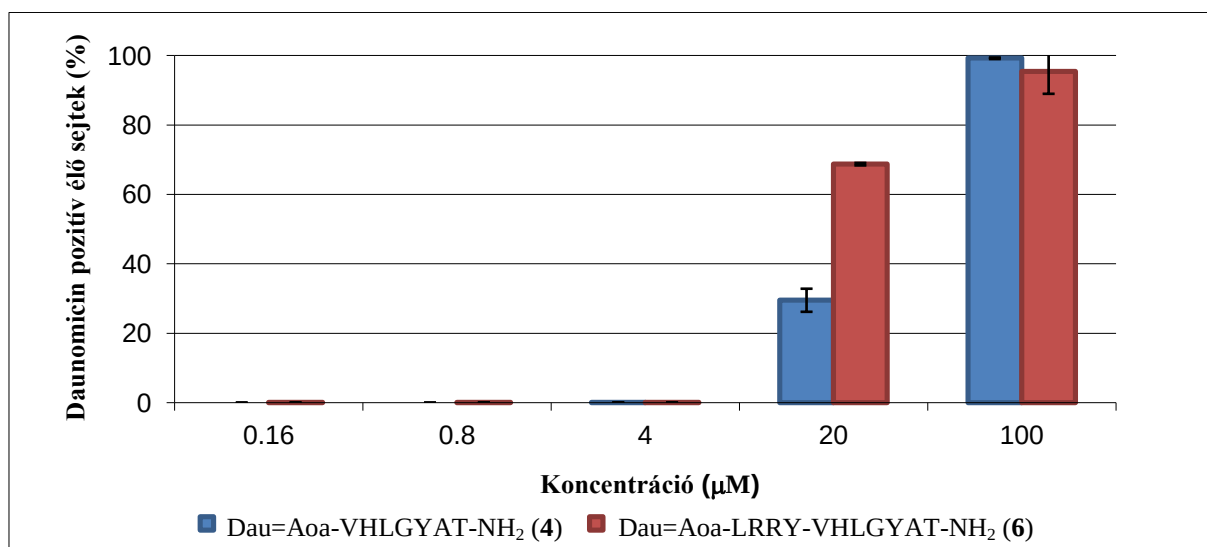
Az LRRY spacer tartalmazó lineáris konjugátum (6) IC_{50} értékeit (62,7 μM (6 órás kezelés) és 21,3 μM (24 órás kezelés)) összevetjük a 2.2. fejezetben leírt hormonpeptid konjugátumok adataival (1. táblázat), azt állapíthatjuk meg, hogy a citosztatikus hatása HT-29 sejteken némileg alacsonyabb a GnRH konjugátumok hatásánál ($IC_{50} = 14-29 \mu M$, 6 órás kezelés után). A somatosztatin analógok konjugátumai azonban egy nagyságrenddel jobb hatást mutatnak a (6) konjugátumhoz képest.

A diszulfidhidat tartalmazó ciklopeptid konjugátumok MTT vizsgálata még folyamatban van.

4.3.2 *In vitro* sejtbejutási vizsgálatok áramlási citometriával

A kiválasztott konjugátumok sejtbejutását áramlási citométerrel (BD LSR II, BD Bioscience, San Jose, CA) vizsgáltuk. Ebben a vizsgálatban nem szerepelt a Dau=Aoa-GFLG-VHLYAT-NH₂ konjugátum rossz oldékonysága miatt.

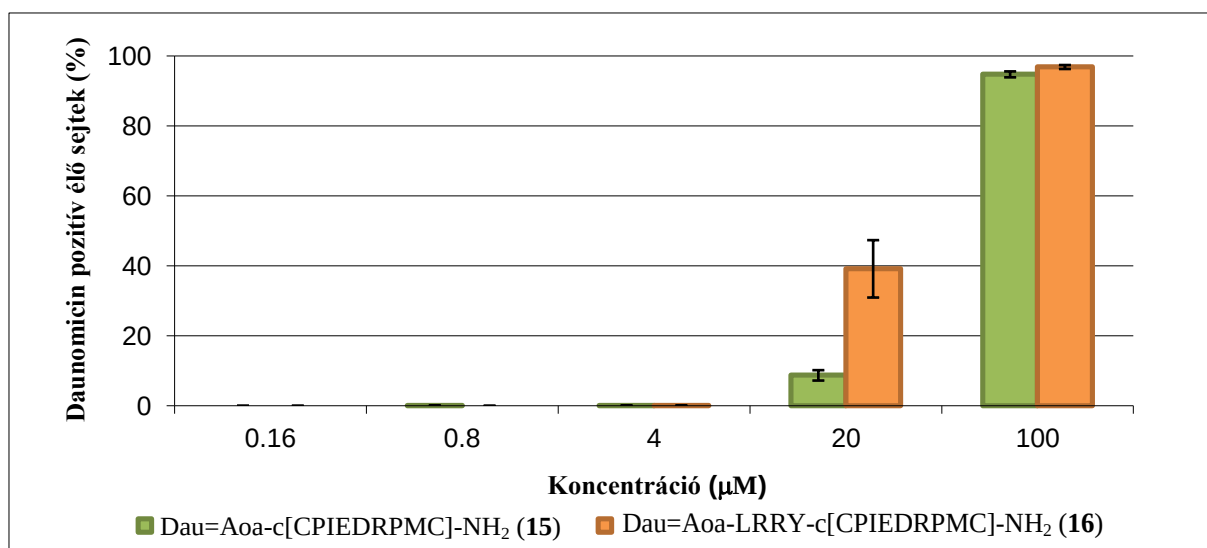
A HT-29 sejteket előkezelés nélkül 6 órán keresztül inkubáltuk a konjugátumokkal (Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂ (4), Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ (6), Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (15), Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (16)). Az inkubációs idő lejártá után a sejteket tripszinnel kezeltük, ezzel a sejtfelszínen aspecifikus kötődést lehetővé tévő sejtfelszíni struktúrákat eltávolítottuk, így csak a valóban a sejtekbe bejutott konjugátumok fluoreszcenciáját detektáljuk. A kapott fluorszcencia intenzitás eltolódásának nagyságából tudunk következtetni az *in vitro* sejtbejutás mértékére.



23. ábra Az *in vitro* sejtbejutás koncentrációfüggő profilja HT-29 sejteken a Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂ (4) és a Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ (6) konjugátumok esetén

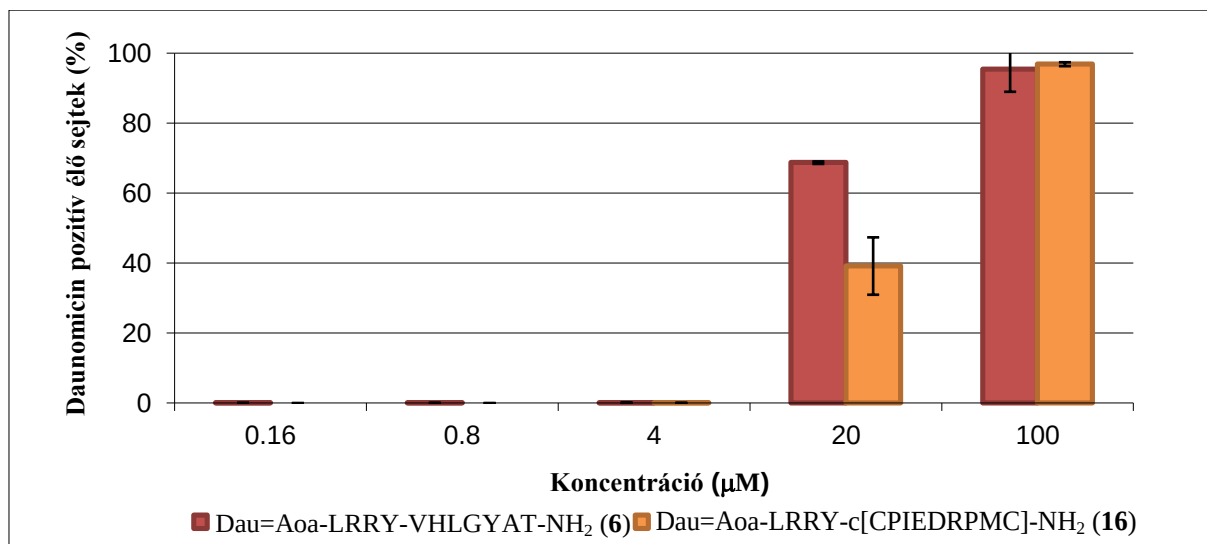
A kapott értékek alapján (23. ábra) a sejtbejutás mértéke mindkét konjugátum esetén koncentrációfüggő. A 20 μM kezelési koncentráció esetén az (4) konjugátum 29,6%-ban bejutott a sejtekbe, a (6) konjugátum 68,8%-a jutott be a sejtekbe (azonos kezelési koncentráció mellett). A eredmények alapján láthatjuk, hogy HT-29 sejteken az LRRY spacer tartalmazó konjugátum hatékonyabbnak bizonyul. A 100 μM kezelési koncentráció esetén a két konjugátum közel 100%-ban bejutott a sejtekbe, ugyanakkor a halott sejtek aránya jelentősen eltért. Az (4) konjugátum esetén csupán a sejtek 4,5%-a halt meg és a halott

sejtek 41,8%-a tartalmazott konjugátumot. Az LRRY-t tartalmazó konjugátum **(6)** vizsgálata során a halott sejtek aránya 59,3% volt és a halott sejtek 98,7% tartalmazott konjugátumot.



24. ábra Az *in vitro* sejtbejutás koncentrációfüggő profilja HT-29 sejteken a Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (15), Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (16) konjugátumok esetén

A ciklikus peptid esetén is az LRRY spacer tartalmazó peptid **(16)** volt hatékonyabb (24. ábra). A **(15)** konjugátum a sejtek 8,8%-ba, míg a **(16)** konjugátum a sejtek 39,2%-ba bejutott 20 μM kezelési koncentráció mellett. A **(15)** konjugátum esetén 100 μM kezelési koncentrációnál, ahol a sejtbejutás mindkét esetben közel 100%-os volt, a sejtek 6,9% halt meg és ezek 26,5%-a tartalmazot konjugátumot. A **(16)** konjugátumnál azonos kezelési koncentrációnál (100 μM) a halott sejtek aránya 15,3% volt és a halott sejtek 81,4%-a tartalmazott konjugátumot.



25. ábra Az *in vitro* sejtbejutás koncentrációfüggő profilja HT-29 sejteken a Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ (6), Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (16) konjugátumok esetén

A kiválasztott lineáris (6), illetve ciklikus (16) fág könyvtárban található peptid LRRY spacer tartalmazó értékei alapján a (6) konjugátum kisebb koncentráció mellett hatékonyabban jutt be a HT-29 sejtekbe, mint a (16) konjugátum (25. ábra).

A sejtbejutási vizsgálatok eredményei azt vetítik előre, hogy a ciklopeptidek citosztatikus hatása (a mérés folyamatban van) nem fogja elérni a lineáris peptid konjugátumok hatását.

Továbbá megállapíthatjuk, hogy a fág könyvtárból kiválasztott HT-29 sejtekre specifikus peptidek konjugátumai nem jutnak be kevésbé a sejtekbe 20 μM-os koncentráció mellett, mint a GnRH peptid konjugátumok, sőt az LRRY spacer tartalmazó konjugátumok (6, 15) sejtbe jutása felül is múlja a hormonpeptid konjugátumokét (az élő sejtek 5-30%-a daunomicin pozitív). Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a fág könyvtárból kiválasztott irányító molekulák valóban hatékonyan juttatják be a sejtekbe a hatóanyagot, de valószínű, más olyan hatással nem rendelkeznek, amely a sejt pusztulásához vezethet. A hormonpeptidek a receptorukhoz kötődve olyan szignál útvonalakat tudnak beindítani, amik önmagukban is a tumorsejtek pusztulását okozhatják. Ez összeadódva a hatóanyag tumorellenes hatásával okozhatja ezeknek a konjugátumoknak a nagyobb tumorellenes hatását. Ugyanakkor jól látszik, hogy a fág könyvtárból kiválasztott peptidek alkalmasak hatóanyagok célzott sejtbejuttatására, de valószínű erősebb citotoxikus anyagok esetén érhető el jelentős hatás velük. Ezért alkalmazásuk kombinált irányított tumorterápiában továbbra is célszerű lehet és megfontolandó.

5 Kísérleti rész

Az aminosav-származékokat és a gyantát az Iris Biotech GmbH-től (Marktrewitz, Németország) szereztük be, a gyökfogók, kapcsolószerek, hasítószerek és a Boc-Aoa-OH a Fluka (Buchs, Svájc) termékei. Az $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-OH}$ magunk állítottuk elő. A daunomicin hidroklorid az IVAX (Budapest, Magyarország) ajándéka volt. Az *N,N'*-dimetil-formamidot és diklórmétánt a Molar Chemicals Kft.-től (Budapest, Magyarország), a HPLC-hez használt oldószereket (metanol, acetonitril) a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) vettük. A dolgozatomban szereplő peptideket manuálisan, szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő az alábbi protokolt követve (6. táblázat).

6. táblázat Fmoc/^tBu stratégia protokollja

művelet	alkalmazott oldószerek és reagensek	időtartam (perc)
Mosás	DMF	3 x 0,5-1
Fmoc-csoport hasítása	2% piperidin – 2% DBU/DMF	2 x 2
		1 x 5
		1 x 10
Mosás	DMF	8 x 0,5-1
Kapcsolás	3 ekv. aminosav-származék + 3 ekv. DIC + HOBt/DMF	1 x 60
Mosás	DMF	3 x 0,5-1
	DCM	3 x 0,5-1
Kaiser-teszt	Ninhidrin-oldat, KCN-oldat, fenol-oldat (izatin oldat)	1 x 3-5

A Kaiser-teszt során a gyantaszemekhez pár csepp ninhidrin- (2,5 g ninhidrin 50 ml absz. EtOH-ban oldva), fenol- (40 g fenol 10 ml absz. EtOH-ban oldva), és KCN-oldatot (2 ml 0,01M KCN-oldat 98 ml piperidinnel hígítva) adunk (Pro utáni aminosav kapcsolása után izatin-oldatot (3% izatin + 5% Boc-Phe-OH benzilalkoholban oldva) is adunk az elegyhez), majd 104°C-on 3-5 percig melegítjük. Ha a gyantaszemek színe sárga marad a kapcsolás sikeres volt, ellenben ha megkékül (izatin esetén megbarnul), akkor maradt szabad aminocsoport, tehát a kapcsolást meg kell ismételni.

Tisztítás és analízis

A nyers peptideket és konjugátumaikat KNAUER RP-HPLC rendszerrel (Knauer GmbH, Bad Hamburg, Németország; 2 db K120 típusú pumpa, K2501 típusú monokromátoros UV-detektor, nagynyomású keverőegység, adatgyűjtő egység) tisztítottam. Az alkalmazott áramlási sebesség minden esetben 4 ml/perc volt, az UV detektálás $\lambda=220$ nm-en történt. Az alkalmazott gradienseket az egyes anyagok tisztításának leírásánál tüntettem fel.

Alkalmazott eluensek: A eluens: 0,1% TFA/deszt. víz

B eluens: 0,1% TFA/acetonitril + deszt. víz (80:20 V/V%)

A tisztításhoz használt oszlop típusa: Phenomenex Jupiter 10 μ m Proteo 90 Å
mérete: 250 $\times$ 10,0

A tisztított peptidok és konjugátumok analitikai vizsgálatához szintén KNAUER RP-HPLC rendszert használtam. A detektálás hullámhossza ebben az esetben is $\lambda=220$ nm volt, 1 ml/perc áramlási sebesség mellett.

Az analitikai oszlop típusa: Phenomenex Aeris PEPTIDE 3,6 μ m XB-C18
mérete: 250 $\times$ 4,6 mm

(A függelékben található $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-GFLG-CPIEDRPMC-NH}_2$ peptid HPLC kromatogramjaihoz Phenomenex Luna C18, 5 μm , 100 Å (mérete: 250 $\times$ 4,6 mm) típusú oszlopot használtam)

Alkalmazott gradiens:	0. perc	0% B
	5. perc	0% B
	50. perc	90% B

A tömegspektroszkópiás mérésekhez elektrospray ionizációs (ESI-MS) Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) típusú készüléket használtunk.

A peptideket 0,01% ecetsavat tartalmazó 50% acetonitril/víz elegyében oldottuk fel. A spektrumokat folyamatos mintaadárolás mellett (4 µl/perc sebességgel) 50-2000 *m/z* tartományban, pozitív módban vettük fel.

Az analitikai HPLC-vel felvett komatogrammok, illetve a tömegspektrumok a Függelékben találhatóak.

5.1 A Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂ konjugátum szintézise

5.1.1 Az Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (1) szintézise

A szintézishez 0,5 g Fmoc-Rink Amid MBHA gyantát (0,53 mmol/g), valamint a gyantakapacitásra számolt három ekvivalensnyi (0,795 mmol) Fmoc-aminosav-származékot és aktiválási reagenseket (DIC, HOBt) használtam (7. táblázat). A hisztidin funkciós csoportjának védésére tritil-csoportot, a treonin és tirozin hidroxilcsoportjának védelmére *terc*-butil-csoportot alkalmaztam. A többi aminosav-származék esetén nem volt szükség védelemre.

7. táblázat Az Aoa-VHLGYAT-NH₂ peptid szintéziséhez felhasznált reagens mennyiségek

reagensek	moláris tömeg (g/mol)	bemért mennyiség (mg)
Fmoc-Thr(^t Bu)-OH	397,47	316,0
Fmoc-Ala-OH	311,33	247,5
Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	459,54	365,4
Fmoc-Gly-OH	297,31	236,4
Fmoc-Leu-OH	353,41	281,0
Fmoc-His(Trt)-OH	619,71	492,7
Fmoc-Val-OH	339,39	269,8
Boc-Aoa-OH	109,30	29,0
HOBt·H ₂ O	153,10	121,7
DIC (ρ=0,815 g/cm ³)	126,20	100,4 (123 μl)

Az Fmoc-Val-His(Trt)-Leu-Gly-Tyr(^tBu)-Ala-Thr(^tBu)-R szekvencia felépítése után a gyantát három részre osztottam. Az egyik részéhez Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam. A gyantáról az elkészült peptidet 4,5 ml TFA-t, 0,25 ml H₂O-t és 0,25 ml TIS-t tartalmazó hasítóeleggyel távolítottam el. A reakcióelegyet 1,5 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten. Hasítás után a kapott elegyet 50 ml 0°C-os dietil-éterbe szűrtem, majd a kicsapódott peptidet 5 percig 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam. Az étert dekantáltam, majd az üledéket háromszor –a fent leírtakkal analóg módon– hideg éterrel mostam. A nyersteget 10%-os ecetsavban oldottam, majd az oldatot folyékony nitrogénben fagyasztottam majd liofilizáltam.

A nyers heptapeptidet preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, az általános részben megadott körülmények között.

Az alkalmazott gradiens:	0. perc	15% B
	5. perc	35% B
	50. perc	90% B

A tömegspektrometriás mérések során kiderült, hogy az aminosav jelentős része acetonnal reakcióba lépett, így a kapott $((\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH}_2)$ terméket 0,2M NaOAc pufferben (pH=5,08) oldottam (peptid koncentráció 10 mg/ml) és metoxiamint (1 mol/dm^3) adtam még a reakcióelegyhez. Az elegyet 1 órán át kevertettem szobahőmérsékleten, majd liofilizálás nélkül preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam.

Az alkalmazott gradiens:	0. perc	0% B
	10. perc	0% B
	15. perc	35% B
	50. perc	90% B

A tiszta Aoa-VHLGYAT-NH₂ (1) tartalmazó frakciót rotációs vákuumbepárlóval egy lemért lombikban szárazra pároltam, majd ezt közvetlenül használtam fel a daunomicinhez való konjugációra.

5.1.2 Az Aoa-X-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (X= Gly-Phe-Leu-Gly (2), Leu-Arg-Arg-Tyr (3)) szintézise

A félretett kétharmadnyi gyantán folytattam a szintézist. Az egyik részéhez Gly-Phe-Leu-Gly spacert építettem ki, majd Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam hozzá (8. táblázat). A második részhez Leu-Arg-Arg-Tyr tetrapeptid spacert építettem, majd ehhez is Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam (9. táblázat). A tirozin hidroxilcsoportját *terc*-butil-csoporttal védtem, az arginin funkciós csoportjának a védelmére 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-5-szulfonil (Pbf) védőcsoportot alkalmaztam. A többi aminosav-származék esetén nem volt szükség védelemre.

8. táblázat Az Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH₂ peptid szintéziséhez felhasznált reagens mennyiségek

reagensek	moláris tömeg (g/mol)	bemért mennyiség (mg)
Fmoc-Gly-OH	297,31	78,8
Fmoc-Leu-OH	353,41	93,7
Fmoc-Phe-OH	387,43	102,7
Boc-Aoa-OH	109,30	29,0
HOBt·H ₂ O	153,10	40,6
DIC ($\rho=0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,20	33,5 (41 μl)

9. táblázat Az Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ peptid szintéziséhez felhasznált reagens mennyiségek

reagensek	moláris tömeg (g/mol)	bemért mennyiség (mg)
Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	397,47	105,4
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,77	172,0
Fmoc-Leu-OH	353,41	93,7
Boc-Aoa-OH	109,30	29,0
HOBt·H ₂ O	153,10	40,6
DIC ($\rho=0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,20	33,5 (41 μl)

A gyantáról az elkészült peptideket 4,5 ml TFA, 0,25 ml H₂O, 0,25 ml TIS elegyével távolítottam el. A reakcióelegyeket szobahőmérsékleten 1,5 órán át kevertettem. A hasítás után az elegyeket 50 ml jéghideg dietil-éterbe szűrtem. A kicsapódott peptideket 5 percig 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam, majd az étert dekantáltam róla. A kapott üledéket még háromszor mostam hideg dietil-éterrel. A peptideket 10%-os ecetsavban oldtam, majd folyékony nitrogénben fagyaszottam és liofilizáltam.

A nyers peptideket preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, az általános részben megadott körülmények között.

Az alkalmazott gradiens:	0. perc	15% B
	5. perc	35% B
	50. perc	90% B

A kapott termékeknél ebben az esetben is acetonnal reakcióba lépett az aminosav, ezt tömegspektrometriás vizsgálatokkal ellenőriztük. A kapott ((CH₃)₂C=Aoa-X-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂; X= Gly-Phe-Leu-Gly, Leu-Arg-Arg-Tyr) vegyületeket 0,2M NaOAc

pufferben (pH=5,08) oldottam (peptid koncentráció 10 mg/ml) a reakcióelegyhez még metoxiamint (1 mol/dm^3) adtam. Az elegyet szobahőmérsékleten 1 órán át kevertettem, majd ezeket a termékeket is liofilizálás nélkül preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam.

Az alkalmazott gradiens:

0. perc	0% B
10. perc	0% B
15. perc	35% B
50. perc	90% B

A tiszta Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH₂ (2), valamint Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ (3) tartalmazó frakciókat rotációs vákuumbepárlóval egy lemért lombikban szárazra pároltam, majd ezeket közvetlenül használtam fel a daunomicinhez való konjugációra.

A tiszta termékek tömege és a kitermelésük a gyantakapacitásra nézve a 10. táblázatban található.

10. táblázat A tiszta termékek tömege és kitermelése a gyantakapacitásra nézve

termék	tömeg (mg)	kitermelés gyantakapacitásra nézve (%)*
Aoa-VHLGYAT-NH ₂ (1)	23,7	32,3
Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH ₂ (2)	22,2	20,8
Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH ₂ (3)	29,6	31,6

*A kitermelési adatok nem pontosak, csak tájékoztató jellegűek (ez értendő a későbbiekre is), mert a liofilizált peptidek több-kevesebb vizet visszatartanak, akár szekvenciájuktól függő mértékben, így a víztartalom mérése nélkül pontos adat nem adható meg.

5.1.3 Az Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (1) és az

**Aoa-X-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (X= Gly-Phe-Leu-Gly (2),
Leu-Arg-Arg-Tyr (3)) konjugálása daunomicinhez**

A lemért lombikokban szárazra párolt tiszta peptideket 0,2M NaOAc pufferben (pH=5,08) oldottam (peptid koncentráció 10 mg/ml), majd daunomicint adtam hozzájuk (11. táblázat).. A reakció állandó kevertetés mellett szobahőmérsékleten egy éjszaka alatt játszódott le.

11. táblázat A konjugáláshoz felhasznált reagensek mennyisége

felhasznált anyag	moláris tömeg (g/mol)	bemért mennyiség (mg)
Aoa-VHLGYAT-NH ₂ (1)	831,28	23,7
daunomicin·HCl	563,99	32,2
Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH ₂ (2)	1206,30	22,2
daunomicin·HCl	593,99	21,9
Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH ₂ (3)	1420,58	39,6
daunomicin·HCl	593,99	33,1

A reakciók sikerességét analitikai HPLC-vel ellenőriztem. A kapott termékeket –az általános részben megadott körülmények között– preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam.

Az alkalmazott gradiensek:

0. perc	15% B
5. perc	35% B
50. perc	90% B

A tiszta konjugátumokat fagyasztás után liofilizáltam.

12. táblázat A tiszta konjugátumok tömege és kitermelése

előállított konjugátumok	tiszta konjugátum tömege (mg)	kitermelés a bemért anyagra nézve (%)
Dau=Aoa-VHLGYAT-NH ₂ (4)	31,3	81,9
Dau=Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH ₂ (5)	23,4	74,1
Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH ₂ (6)	42,0	78,0

A tiszta konjugátumok tömege és kitermelése a fenti táblázatban látható (12. táblázat).

A tiszta konjugátumok analitikai HPLC kromatogramjai és az ESI-MS spektrumai a függelékben találhatóak (Függelék: 1-6. ábra, Eredmények: 4.1.3. fejezet: 3. táblázat).

5.2 A $\text{Dau}=\text{Aoa}-\text{c}[\text{CPIEDRPMC}]-\text{NH}_2$ konjugátum szintézise

5.2.1 A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa}-\text{Cys}-\text{Pro}-\text{Ile}-\text{Glu}-\text{Asp}-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Met}-\text{Cys}-\text{NH}_2$ (7) szintézise

A szintézishez 0,5 g Fmoc-Rink Amid MBHA gyantát (0,53 mmol/g), valamint a gyantakapacitásra számolt három ekvivalensnyi (0,795 mmol) Fmoc-aminosav-származékot és aktiválási reagenseket (DIC, HOBt) használtam (13. táblázat). A cisztein funkciós csoportjának védelmére tritil-csoportot, az aszparaginsav és a glutaminsav funkciós csoportjainak védelmére *tert*-butil-észtert, míg az arginin oldalláncának védelmére 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-6-szulfonil (Pbf) védőcsoportot alkalmaztam. Az aminosavak ezekben az esetekben izopropilén-csoporttal védtem.

13. táblázat A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa}-\text{CPIEDRPMC}-\text{NH}_2$ (7) peptid szintéziséhez felhasznált reagentia mennyisége

reagentia	moláris tömeg (g/mol)	bemért mennyiség (mg)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585,71	465,6
Fmoc-Met-OH	371,45	295,3
Fmoc-Pro-OH	337,37	268,2
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,77	515,8
Fmoc-Asp(O ^t Bu)-OH	411,45	327,1
Fmoc-Glu(O ^t Bu)-OH	425,47	338,2
Fmoc-Ile-OH	353,41	281,0
$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa}-\text{OH}$	131,06	34,7
HOBt·H ₂ O	153,10	121,7
DIC ($\rho=0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,20	100,4 (123 μl)

Az Fmoc-Cys(Trt)-Pro-Ile-Glu(O^tBu)-Asp(O^tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Met-Cys(Trt)-R szekvencia felépítése után a gyantát három részre osztottam. Az egyik harmadhoz $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa}-\text{OH}$ -t kapcsoltam. Az elkészült peptidet 10 ml TFA-t, 0,5 ml H₂O-t, 0,5 ml tioanizolt, 0,25 ml etánditiolt és 0,75 g fenolt tartalmazó hasítóeleggyel távolítottam el a gyantáról. Az elegyet 2 órán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten. Hasítás után a kapott elegyet 100 ml 0°C-ra

hűtött dietil-éterbe szűrtem. A kicsapódott peptidet 5 percig 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam. Az étert dekantáltam, majd az üledéket háromszor jéghideg éterrel mostam. A kapott üledéket 10%-os ecetsavban oldottam. Az oldatot folyékony N₂-ben fagyasztottam, majd liofilizáltam.

A nyers peptidet preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam –az általános részben megadott körülmények között–.

Az alkalmazott gradiens:	0. perc	15% B
	5. perc	35% B
	50. perc	90% B

A tiszta terméket (7) tartalmazó frakciót ismét folyékony nitrogénben fagyasztottam és liofilizáltam. A kapott tiszta peptidet ciklizáláshoz használtam fel.

5.2.2 A (CH₃)₂C=Aoa-X-Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys-NH₂ (X= Gly-Phe-Leu-Gly (8), Leu-Arg-Arg-Tyr (9)) szintézise

A félretett kétharmadnyi gyanta egyik felén GFLG spacert építettem fel. A másik felét LRRY enzimlabilis tetrapeptid építésével folytattam. Mind két szekvencia végéhez (CH₃)₂C=Aoa-OH-t kapcsoltam (14. és 15. táblázat). Az arginin funkciós csoportját 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-5-szulfonil (Pbf) védőcsoporttal védtem, a tirozin hidroxilcsoportjának védelmére *terc*-butil-csoportot alkalmaztam. A többi aminosav-származék esetén nem volt szükség védelemre.

14. táblázat A (CH₃)₂C=Aoa-GFLG-CPIEDRPMC-NH₂ (8) peptid szintéziséhez felhasznált reagensok mennyisége

reagensok	moláris tömeg (g/mol)	bemért mennyiség (mg)
Fmoc-Gly-OH	297,31	78,8
Fmoc-Leu-OH	353,41	93,7
Fmoc-Phe-OH	387,43	102,7
(CH ₃) ₂ C=Aoa-OH	131,06	34,7
HOBt·H ₂ O	153,10	40,6
DIC (ρ=0,815 g/cm ³)	126,20	33,5 (41 μl)

15. táblázat A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-LRRY-CPIEDRPMC-NH}_2$ (9) peptid szintéziséhez felhasznált reagensek mennyisége

reagensek	moláris tömeg (g/mol)	bemért mennyiség (mg)
Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	397,47	105,4
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,77	172,0
Fmoc-Leu-OH	353,41	93,7
$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-OH}$	131,06	34,7
HOBt·H ₂ O	153,10	40,6
DIC ($\rho=0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,20	33,5 (41 μl)

Az peptideket 10 ml TFA, 0,75 g fenol, 0,5 ml H₂O, 0,5 ml tioanizol, és 0,25 ml etánditiol elegyével hasítottam. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 2 órán keresztül kevertettem. Hasítás után a kapott elegyeket 100 ml 0°C-os dietil-éterbe szűrtem. A kicsapódott peptideket –előző fejezetben említett módon– centrifugáltam. Dekantáltam az étert, majd az üledéket háromszor mostam éterrel. A kapott nyers peptideket 10%-os ecetsavban oldottam, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottam és liofilizáltam.

A nyers peptidet preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam.

Az alkalmazott gradiens:

0. perc	15% B
5. perc	35% B
50. perc	90% B

A termékeket (7-9) tartalmazó frakciókat liofilizáltam, majd ciklizáltam.

A tiszta termékek tömege és a kitermelésük a gyantakapacitásra nézve a 16. táblázatban található.

16. táblázat A tiszta termékek tömege és kitermelése gyantakapacitásra nézve

termék	tömeg (mg)	kitermelés gyantakapacitásra nézve (%)
$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-CPIEDRPMC-NH}_2$ (7)	39,8	38,3
$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-GFLG-CPIEDRPMC-NH}_2$ (8)	48,9	35,7
$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-LRRY-CPIEDRPMC-NH}_2$ (9)	58,4	37,5

5.2.3 Az Aoa-X-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH₂ (X= Ø (10), Gly-Phe-Leu-Gly (11), Leu-Arg-Arg-Tyr (12)) szintézise

Az előző fejezetekben előállított (5.2.1 és 5.2.2 fejezet) (7-9) peptideket Tris pufferben ciklizáltam. A peptideket 0,1M Tris pufferben oldottam (peptid koncentráció 0,2 mg/ml), a ciklizálás állandó kevertetés mellett egy éjszaka alatt lejártsódott.

A GFLG tetrapeptidet tartalmazó (8) szekvencia esetén (azonos peptid-Tris puffer koncentráció mellett (0,2 mg/ml) ciklikus dimer származék keletkezett (Függelék: 7-10. ábra). Az első ciklizálás során kapott eredmények alapján a (8) peptid következő ciklizációja során a Tris pufferben alacsonyabb peptid koncentrációt alkalmaztam (0,1 mg/ml) és a reakcióelegyhez guanidium hidrokloridot (0,1 g/ml) is adtam a peptid aggregációjának visszaszorítása érdekében (a ciklizálás a fent említett körülmények között történt).

A diszulfid-hidat tartalmazó reakcióelegyeket liofilizáltam, majd preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam a ciklopeptideket.

Az alkalmazott gradiens:

0. perc	0% B
10. perc	0% B
15. perc	35% B
50. perc	90% B

A ciklopeptideket tartalmazó frakciót folyékony N₂-ben fagyasztottam, majd ismét liofilizáltam.

A GFLG tetrapeptidet tartalmazó ciklopeptid konjugátum szintézisét (a 4.2.3. fejezetben említett problémák és idő hiányában) idáig végeztem el. A szintézis (és biológiai vizsgálatok) további részében nem szerepel.

A tiszta peptidek (10, 12) tömege és a ciklizálási veszteség a 17. táblázatban található.

17. táblázat A ciklizált termékek tömege és a ciklizálási veszteség

termék	tömeg (mg)	ciklizálási veszteség (%)
(CH ₃) ₂ C=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (10)	18,8	56,8
(CH ₃) ₂ C=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (12)	27,0	58,9

Következő lépésben az izopropidilén-csoportot hasítottam le az aminooxiacetsavról, ehhez a peptideket 0,2M NaOAc puffer (pH=5,08) és metoxiamin (1 mol/dm³) elegyében oldottam. A reakciók 1 óra alatt lejátzódtak szobahőmérsékleten. A reakcióelegyeket liofilizálás nélkül preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam.

Az alkalmazott gradiens:	0. perc	0% B
	10. perc	0% B
	15. perc	35% B
	50. perc	90% B

A tiszta Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (**13**) és Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (**14**) tartalmazó frakciókat rotációs vákuumbepárlóval szárazra pároltam –egy lemezt lombikban–, majd ezeket közvetlenül használtam fel a daunomicinhez való konjugációra (18. táblázat).

18. táblázat A termékek tömege és kitermelésük a bemért anyagra nézve

termékek	tömeg (mg)	kitermelés a bemért anyagra nézve (%)
Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (13)	16,6	91,2
Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (14)	23,4	88,6

5.2.4 Az Aoa-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH₂ (**13**) és az Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-c[Cys-Pro-Ile-Glu-Asp-Arg-Pro-Met-Cys]-NH₂ (**14**) konjugálása daunomicinhez

A szárazra párolt tiszta peptideket 0,2M NaOAc pufferben (pH=5,08) oldottam (peptid koncentráció 10 mg/ml), majd daunomicint adtam hozzájuk (19. táblázat). Állandó kevertetés mellett a reakciók egy éjszaka alatt szobahőmérsékleten lejátzódtak.

19. táblázat A konjugáláshoz felhasznált reagensek mennyisége

felhasznált anyag	moláris tömeg (g/mol)	bemért mennyiség (mg)
Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (13)	1133,28	16,6
daunomicin·HCl	563,99	16,5
Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (14)	1722	23,4
daunomicin·HCl	593,99	15,3

A konjugálás sikerességét analitikai HPLC-vel ellenőriztem. A kapott termékeket –az általános részben megadott körülmények között– preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam.

Az alkalmazott gradiensek:

0. perc	15% B
5. perc	35% B
50. perc	90% B

A tiszta konjugátumokat tartalmazó frakciókat fagyasztás után liofilizáltam.

20. táblázat A tiszta konjugátumok tömege és kitermelése

előállított konjugátumok	tiszta konjugátum tömege (mg)	kitermelés a bemért anyagra nézve (%)
Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (15)	18,8	78,3
Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH ₂ (16)	23,0	75,9

A tiszta konjugátum tömege és kitermelése a táblázatban (20. táblázat) található.

A tiszta konjugátumok analitikai HPLC kromatogramja és az ESI-MS spektruma a függelékben található (Függelék 11-18. ábra, Eredmények: 4.2.3. fejezet: 4. táblázat).

5.3 *In vitro* biológiai vizsgálatok

5.3.1 *In vitro* citosztázis meghatározása MTT-tesztel

A Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂ (**4**), Dau=Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH₂ (**5**) és a Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ (**6**) *in vitro* citosztázisát HT-19 (humán vastagbél adenokarcióma) sejteken vizsgáltuk. Négy-négy párhuzamos mérést végeztünk koncentrációnként.

A HT-29 sejtek növesztése és sejt kultúrában tartása 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában történt és 10% magzati borjú szérumot, 160 µg/ml gentamicint és 2mM L-glutamint tartalmazó RPMI-1640 médiumot tartalmazott. A kezelést megelőző napon a HT-29 sejteket 96 lyukú lemezre (a megfelelő szérumtartalmú médiumban; 5·10³ sejt/lyuk) osztottuk ki. A törzsoldatot 20% deszt. vizet (a (**4**, **6**) peptidek esetén 3% DMSO-t is) tartalmazó szérummentes médiummal készítettük (200 µM), a kezeléshez a törzsoldatból csökkenő koncentrációjú oldatsorozatot készítettünk. Az oldatsorozat nyolc különböző koncentrációt tartalmazott, az ötszörös hígítási sorban szereplő első koncentráció: 2·10⁻⁵. A kontroll sejteket vizes (és DMSO-s) médiummal kezeltük.

A vizsgálatok során a sejteket 6 órán illetve 24 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on 5% CO₂ atmoszférában, majd eltávolítottuk róla a kezelő oldatokat és kétszer 135-135 µl szérummentes médiummal mostuk (minden mosási fázist centrifugálás követett). Mosás után a lyukakba 135 µl komplett médiumot mértünk be és a sejteket további 72 órára 37°C-on inkubáltuk, majd MTT-teszt segítségével meghatároztuk a konjugátumok IC₅₀ értékeit.

Az MTT-teszt során minden lyukba 45 µl MTT (3-(4,5-dimetilanizol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) oldatot adtunk (c= 2 mg/ml), majd a sejteket 3,5 órán át 37°C-on tartottuk. Az inkubálási idő letelte után a sejteket 5 percig 2000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, a felülúszót pedig eltávolítottuk. A lyukak alján maradt lila kristályokat 100-100 µl DMSO-ban oldottuk fel, majd 10 percig 37°C-on 1400 fordulat/perc sebességgel rázattuk. A kapott minták abszorbanciáját λ=540 és 620 nm-en mértük ELISA-reader (Labsystem MS Reader, Finnország) segítségével.

5.3.2 *In vitro* sejtbejutási vizsgálatok áramlási citometriával

A Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂ (**4**), Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ (**6**), Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (**15**) és a Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (**16**) konjugátumok sejtekbe való bejutásának mértékét áramlási citométerrel mértük. A vegyületekből koncentrációnként két-két párhuzamos mérést végeztünk.

A HT-29 sejteket az 5.3.1 fejezetben leírt körülmények között növesztettük és tartottuk. A mérést megelőző napon a sejteket 24 lyukú lemezre (a megfelelő szérumtartalmú médiumban; 10⁵ sejt/lyuk) osztottuk ki. Az (**4**), (**15**) és (**16**) vegyületeket 20% deszt. vizet tartalmazó szérummentes médiumban oldottuk, a (**6**) konjugátum esetén 2% DMSO-t is tartalmazott az oldat. A kontroll sejteket 300 µl szérummentes médiummal kezeltük, a kezelt sejtek esetén 150 µl szérummentes oldat + 150 µl hatóanyagot tartalmazó szérummentes oldatot adtunk. A 6 órás kezelési idő letelte után a sejtekről a médiumot eltávolítottuk és egyszer 500 µl szérummentes médiummal mostuk, majd centrifugáltuk. A centrifugálást követően eltávolítottuk a kezelő oldatot a sejtekről, majd 100 µl tripszin oldatot adtunk hozzájuk és 10 percig 37°C-on inkubáltuk. A tripszint 900 µl 10% magzati borjú szérumot tartalmazó HPMI (glükóz, NaCl, NaHCO₃, KCl, MgCl₂, CaCl₂, Na₂HPO₄·4H₂O, HEPES) oldattal inaktívtuk, majd FACS csőbe szedtük a sejteket és centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, majd 500 µl HPMI oldatban szuszpendáltuk a sejteket. A FACS méréseket a 500 µl HPMI oldatban szuszpendált sejtekből végeztük, a fluoreszcencia intenzitásukat áramlási citométerrel (BD LSR II, BD Bioscience, San Jose, CA) határoztuk meg.

6 Összefoglalás

TDK dolgozatom célja az volt, hogy két fág könyvtárból kiválasztott, HT-29 vastagbélkarcinóma sejtre specifikus peptid (VHLGYAT, c[CPIEDRPMC]) hatóanyag konjugátumait előállítsam és vizsgáljam, hogy a vegyületek alkalmasak-e az irányított tumorterápia céljára. Munkám során szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő a fenti peptideket, illetve az N-terminálison enzimlabilis spacerrel (GFLG, illetve LRRY) hosszabbított variánsaikat. Valamennyi peptid N-terminálisát aminooxiecetsavval (Aoa) módosítottam annak érdekében, hogy daunomicin tumorelleses hatóanyagot oxim-kötéssel tudjam kapcsolni a peptidekhez. Ez utóbbi lépést oldatban végeztem el. Az előállított konjugátumokat (Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂, Dau=Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH₂, Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂, Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂, Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂) fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztítottam. A tiszta konjugátumok tisztaságát analitikai HPLC-vel ellenőriztem, illetve tömegspektrometriával azonosítottuk a konjugátumokat. A ciklikus peptid konjugátum GFLG spacer tartalmazó variánsának előállítása a vegyület nagy aggregációs hajlama miatt egyelőre nem sikerült.

A kész konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását MTT-teszttel határoztuk meg. Az *in vitro* sejtbejutási vizsgálatokat áramlási citometriával végeztük.

A három előállított lineáris peptidkonjugátum *in vitro* citosztatikus hatását összehasonlítottam a kutatócsoportban korábban vizsgált GnRH- és szomatosztatin peptidkonjugátumok eredményeivel. Az *in vitro* sejtbejutási vizsgálatokat, négy kiválasztott peptidkonjugátummal (a spacer nélküli és az LRRY spacer tartalmazó konjugátumok) végeztük el.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a vizsgált konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatása elmarad a szomatosztatin analógokétól, ugyanakkor megközelítik hasonló szerkezetű GnRH konjugátumok hatását. Az *in vitro* sejtbejutási vizsgálatok során kiderült, hogy az LRRY enzimlabilis spacer tartalmazó peptid konjugátumok nagyobb mértékben jutnak be a sejtekbe. Ezeknek a konjugátumoknak a sejtbejutási képessége felülmúlja a GnRH hormon peptid konjugátumokét. Az adatok arra engednek következtetni, hogy a fágkönyvtárból kiválasztott peptidek, különösen a lineáris peptid alkalmas hatóanyagok irányított célbajuttatására. Ugyanakkor, a vizsgált hormon peptidek hasonló típusú konjugátumai hatékonyabb tumorelleses hatást mutatnak, mivel azok önmagukban is tumorelleses hatással rendelkeznek.

7 Irodalom- és ábrajegyzék

- [1] <http://www.who.int/en/>
- [2] <http://www.ksh.hu/>
- [3] <http://ec.europa.eu/health/>
- [4] <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/>
- [5] http://www2.univet.hu/sc1/feltoltott/23_1324043264.pdf
- [6] Labianca R., Pessi M. A., Zamparelli G., Treatment of colorectal cancer, *Deugs*, **1997**; 53, 593-607.
- [7] Orosz Zs., Az immunhisztokémia szerepe a daganatterápiás célpontok azonosításában, *Biokémia*, **2004**; 28, 82-86.
- [8] Bodoky Gy., A rosszindulatú daganatok kemoterápiája, *Háziorvos Továbbképző Szemle*, **1996**; 1, 41-43.
- [9] Schlegel B., Stengel C., Schumann G., Prauser H., Eckar K., Aklanonic acid-producing mutants of *streptomyces galilaeus* and *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, *J. Basic Microbiol.*, **1987**; 27, 107-111.
- [10] Hortobágyi G. N., Anthracyclines in the treatment of cancer, *Drugs*, **1997**; 54, 1-7.
- [11] Gewirtz D. A., Soldati m., Fioretti A., Dasdia T., Activity of Daunomicin, A new antitumor antibiotic, on normal and neoplastic cells grown in vitro, *Cancer Chemother. Rep.*, **1964**; 38, 39-47.
- [12] Mező G., Manea M., Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2010**; 7, 79-96.
- [13] Leurs U., Mező G., Orbán E., Öhlschläger P., Marquardt A., Manea M., Design, synthesis, *in vitro* stability and cytostatic effect of multifunctional anticancer drug-bioconjugates containing GnRH-III as a targeting moiety, *Biopolymers*, **2012**; 98, 1-10.
- [14] Mező G., Manea M., Szabó I., Vincze B., Kovács M., New derivatives of GnRH as potential anticancer therapeutic agents, *Curr. Med. Chem.*, **2008**; 15, 2366-2379.
- [15] Flanagan P. A., Duncan R., Šubr V., Ulbrich K., Kopečková P., Kopeček J., Evaluation of protein-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer conjugates as targetable drug-carriers. 2. Body distribution of conjugates containing transferrin receptor antibody or anti-Thy 1.2 antibody and effectiveness of transferrin-containing daunomicin conjugates against mouse L1210 leukemia in vivo, *J. Contr. Rel.*, **1992**; 18, 25-37.

- [16] Hudecz F., Clegg J. A., Kajtár J., Embleton M. J., Szekerke M., Baldwin R. W., Synthesis, conformation, biodistribution and in vitro cytotoxicity of daunomycin-brached polypeptide conjugates, *Bioconjug. Chem.*, **1992**; 3, 49-57.
- [17] 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.
- [18] Bai K. B., 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, *Bioconjug. Chem.*, **2008**; 19, 2260-2269.
- [19] Patil D. T., Fraser C. R., Plesec T. P., KRAS Testing and Its Importance in Colorectal Cancer, *Current Oncology Report*, **2010**; 12, 160-167.
- [20] Orbán E., Mező G., Schlage P., Csík G., Kulić Ž., Ansorge P., Fellingner 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**; 41, 469-483.
- [21] Hegedüs R., Manea M., Orbán E., Szabó I., Kiss É., Sipos É., Halmos G., Mező G., Enhanced cellular uptake and *in vitro* antitumor activity of short-chain fatty acid acylated daunorubicin–GnRH-III bioconjugates, *European Journal of Medicinal Chemistry*; **2013**; 56, 155-165.
- [22] Emons G., Sindermann H., Engel J., Schally A. V., Gründker C., Luteinizing hormone-releasing hormone receptor-targeted chemotherapy using AN-152, *Neuroendocrinology*; **2009**; 90, 15-18.
- [23] Manea M., Leurs U., Orbán E., Baranyai Zs., Öhlschläger P., Marquardt A., Schulcz Á., Tejeda M., Kapuvári B., Tótvári J., Mező G., Enhanced Enzymatic Stability and Antitumor Activity of Daunorubicin-GnRH-III Bioconjugates Modified in Position 4, *Bioconjug. Chem.*, **2011**; 22, 1320-1329.
- [24] Smith G. P.; Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science*, **1985**; 228, 1315-1317.
- [25] Pál G.; Milliárdok versengése: irányított evolúció a fehérjetudományban, *Biokémia*, **2008**; 32, 82-87.
- [26] Kelly K. A., Jones D. A., Isolation of a Colon Tumor Specific Binding Peptide Using Phage Display Selection, *Neoplasia*, **2003**; 5, 437-444.

- [27] Zhang Y., Ches J., Zhang Y., Hu Z., Hu D., Pan Y., Ou S., Liu G., Yin X., Zhao J., Ren L., Wang J., Panning and Identification of a Colon Tumor Binding Peptide from a Phage Display Peptide Library, *Journal of Biomolecular Screening*, **2007**; 12, 429-435.
- [28] Merrifield R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**; 85, 2149-2154.
- [29] Lloyd-Williams P., Alberico F., Giralt E., Convergent solid-phase peptide synthesis, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**; 37, 58-60.
- [30] Merrifield R. B., Life During a Golden Age of Peptide Chemistry, **1993**; (J. I. Seeman, Ed.) ACS, Washington, D.C.
- [31] Barany G., Merrifield R. B., The Peptides (E. Gross and J. Meienhofen Ed.), Academic Press, **1979**; 2, 1-284.
- [32] Carpino L. A., Han G. Y., The fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *J. Org. Chem.*, **1972**; 37, 3404-3409.
- [33] Fields G. B., Tian Z., Barany G., Synthetic peptides: A Users Guide, (Grant G. A. Ed.), W. H. Freeman and Co, New York, **1992**; 77-183.
- [34] 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**; 31, 595-598.
- [35] 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*, **1980**; 118, 149-151.

3. ábra A fágbemutató sémája

(FORRÁS: <http://www.mrns.hu/hirek/evolucios-modszerek-a-feherjek-kolcsonhatasainak-vizsgalataban-2-resz-a-fag-bemutatas>)

8 Rövidítésjegyzék

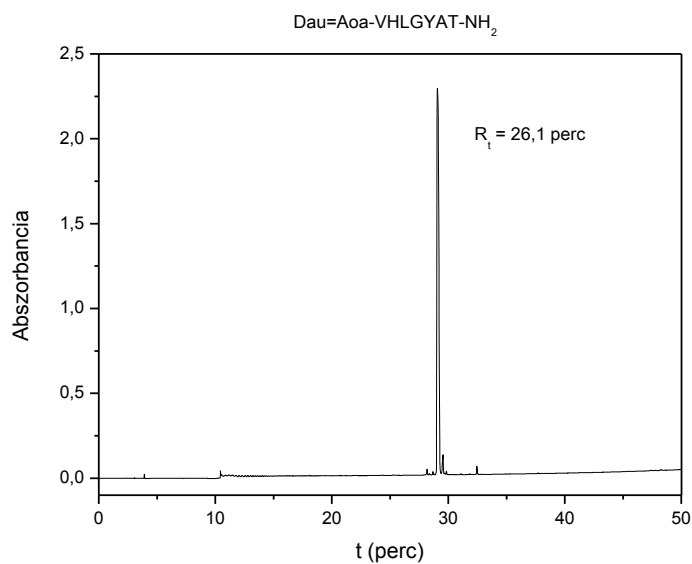
Aoa	aminooxiecetsav
Boc	<i>terc</i> -butiloxikarbonil
Bzl	benzil
CP15	VHLGYAT kódja a fágterképezés során
CSPPS	konvergens szilárdfázisú peptidszintézis
Dau	daunomicin
DBU	1,8-diazabiciklo[5,4,0]undek-7-én
DCM	diklórmétán
DCU	<i>N,N'</i> -deciklohexil-urea
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid
DIEA	<i>N,N'</i> -diizopropil- <i>N</i> -etilamin
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
EAK	poli-[Lys(Glu _i -Ala _m)] (elágazó láncú polipeptid)
EDT	1,2-etánditiol
EGF	epidermális növekedési faktor
EGF-R	epidermális növekedési faktor receptor
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
EtOH	etanol
FACS	fluorescence-activated cell sorter (áramlási citométer)
Fmoc	9-fluorenil-metiloxikarbonil
GnRH	gonadotropin-releasing hormon
GnRH-R	gonadotropin-releasing hormon receptor
HOBt	1-hidroxibenztriazol
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
HPMA	<i>N</i> -(2-hidroxipropil)-metakrilamid
IC ₅₀	median inhibitory concentration
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MBHA	4-metil-benzhidrilamin (gyanta)

MDR	multidrog rezisztencia
MTT	3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NaOAc	nátrium-acetát
RP-HPLC	fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis
^t Bu	<i>terc</i> -butil
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropil-szilán
UV	ultraibolya
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VEGF-R	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor

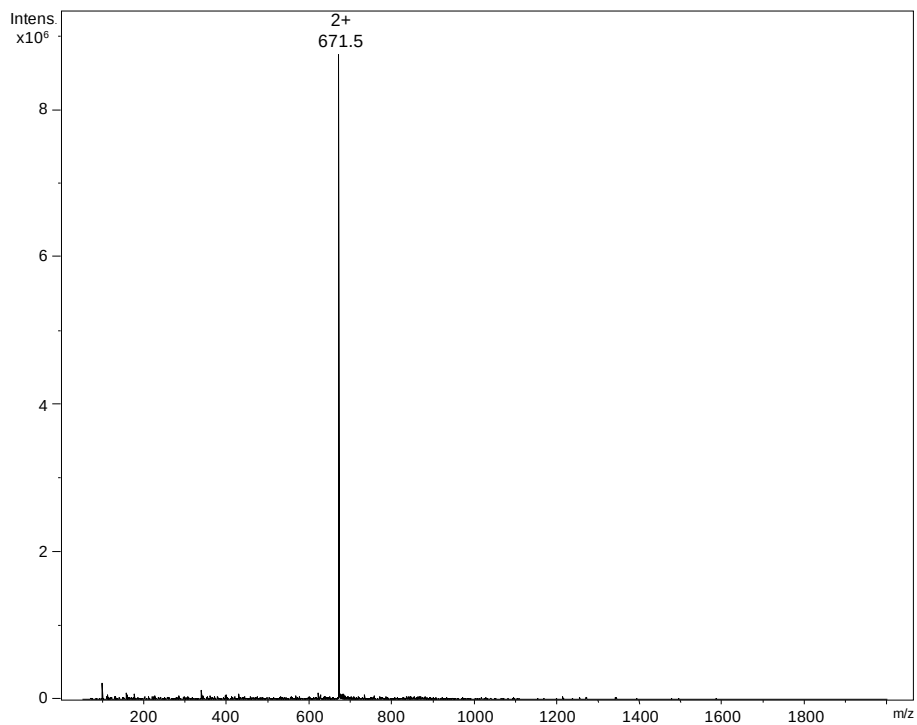
9 Függelék

Kromatogramok és spektrumok

Dau=Aoa-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (4)



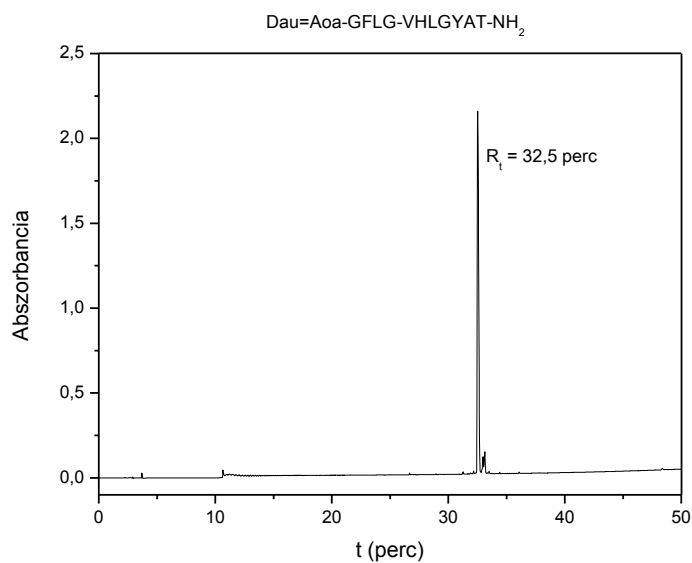
1. ábra A tiszta Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂ (4) analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja



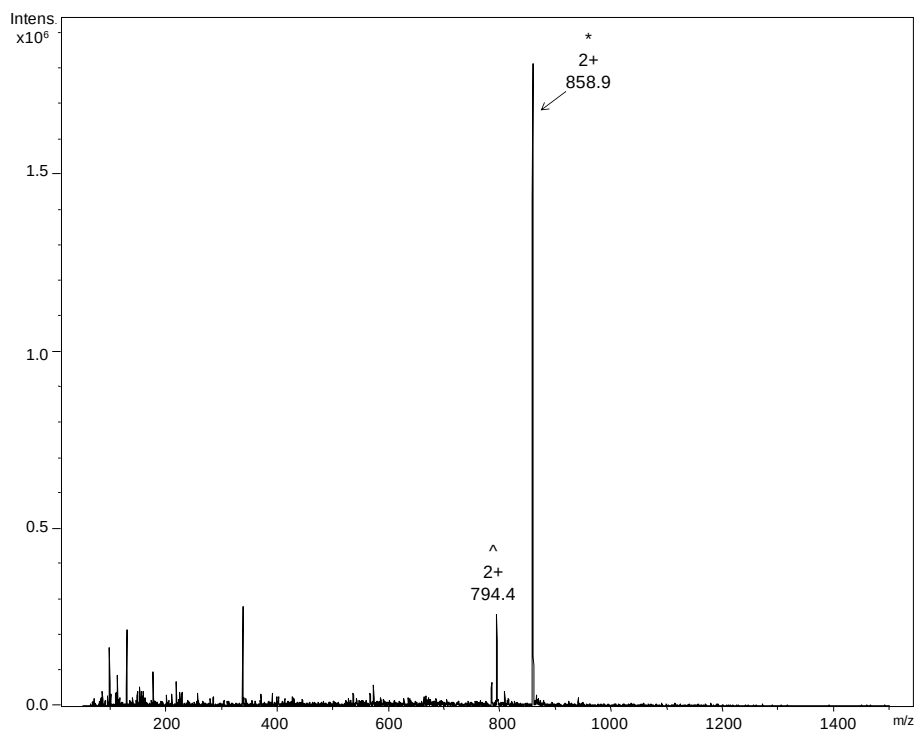
2. ábra A tiszta Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂ (4) MS spektruma

A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1340,8 g/mol
mért tömege: $[M+H]^+$: 1341,0 g/mol

Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (5)



3. ábra A tiszta Dau=Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH₂ (5) analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja



4. ábra A tiszta Dau=Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH₂ (5) MS spektruma

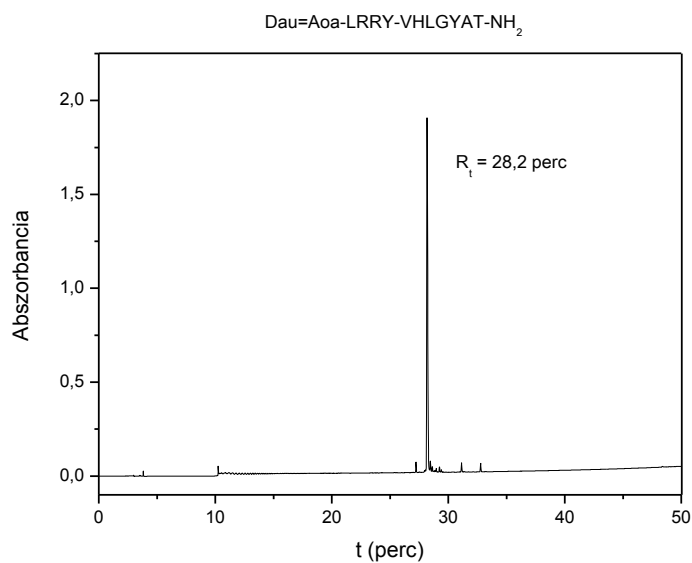
A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1715,82 g/mol

mért tömege: $[M+H]^+_1$: 1715,7 g/mol (*)

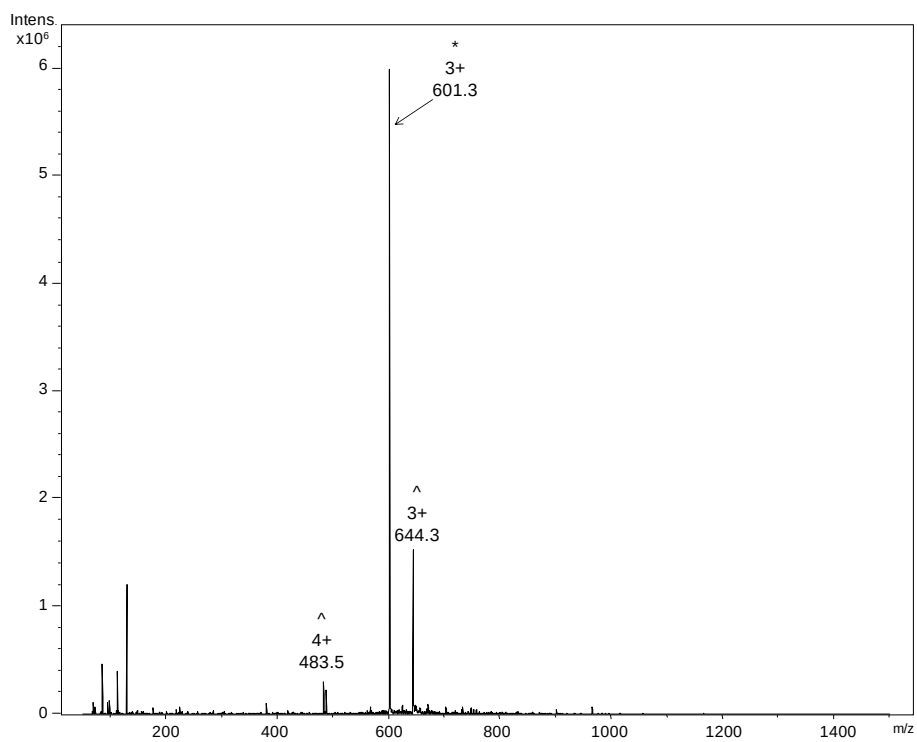
$[M+H]^+_2$: 1586,8 g/mol (M-129 g/mol) (^)

A tömegspektrométerben leszakadt a mérés során a daunomicin aminocukor részlete.

Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Val-His-Leu-Gly-Tyr-Ala-Thr-NH₂ (6)



5. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ (6) analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja



6. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ (6) MS spektruma

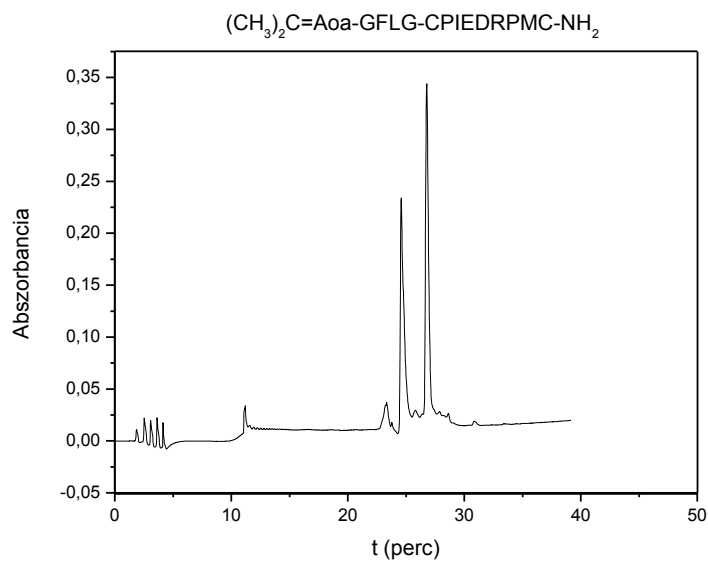
A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1930,1 g/mol

mért tömege: $[M+H]^+_1$: 1929,9 g/mol (^)

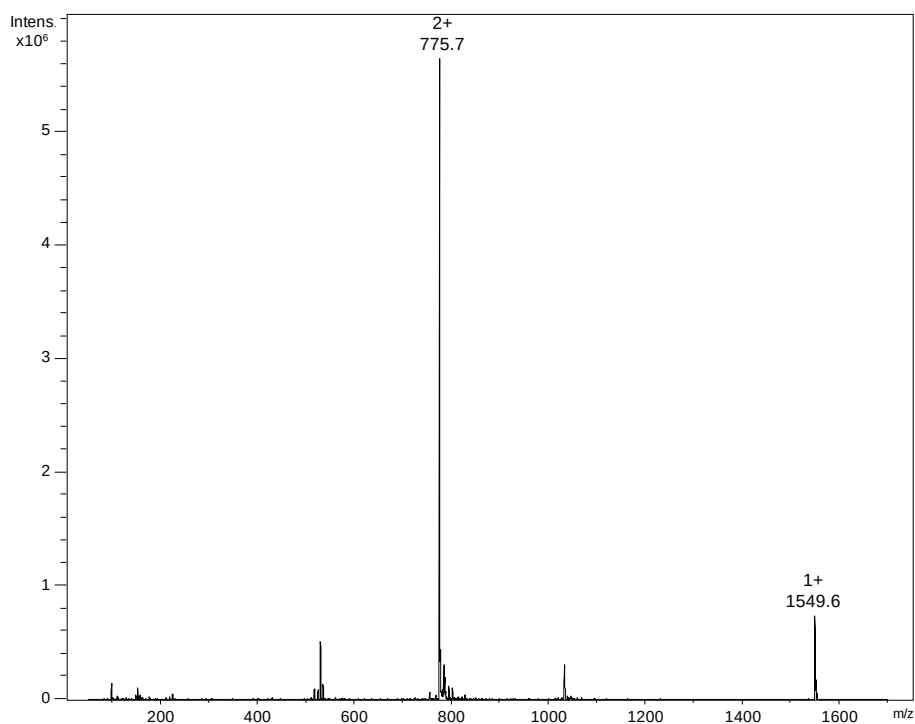
$[M+H]^+_2$: 1800,8 g/mol (M-129 g/mol) (*)

A tömegspektrométerben leszakadt a mérés során a daunomicin aminocukor részlete.

$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-GFLG-CPIEDRPMC-NH}_2$ (8)



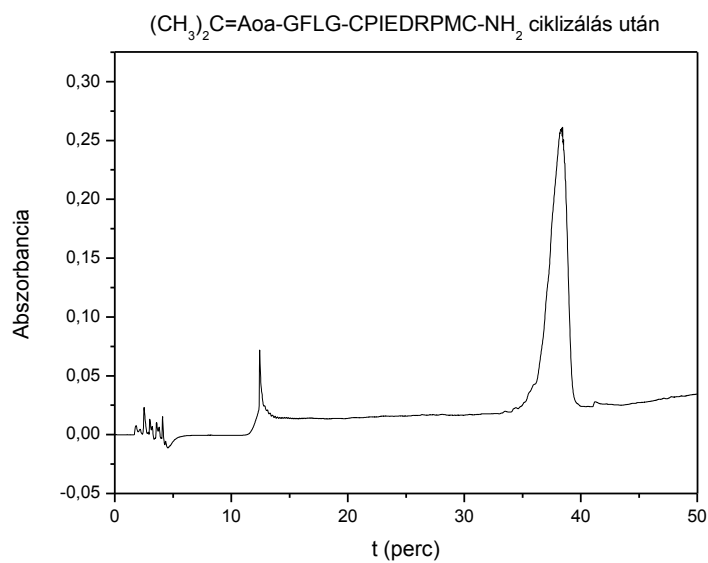
7. ábra A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-GFLG-CPIEDRPMC-NH}_2$ (8) ciklizálás előtt, analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja



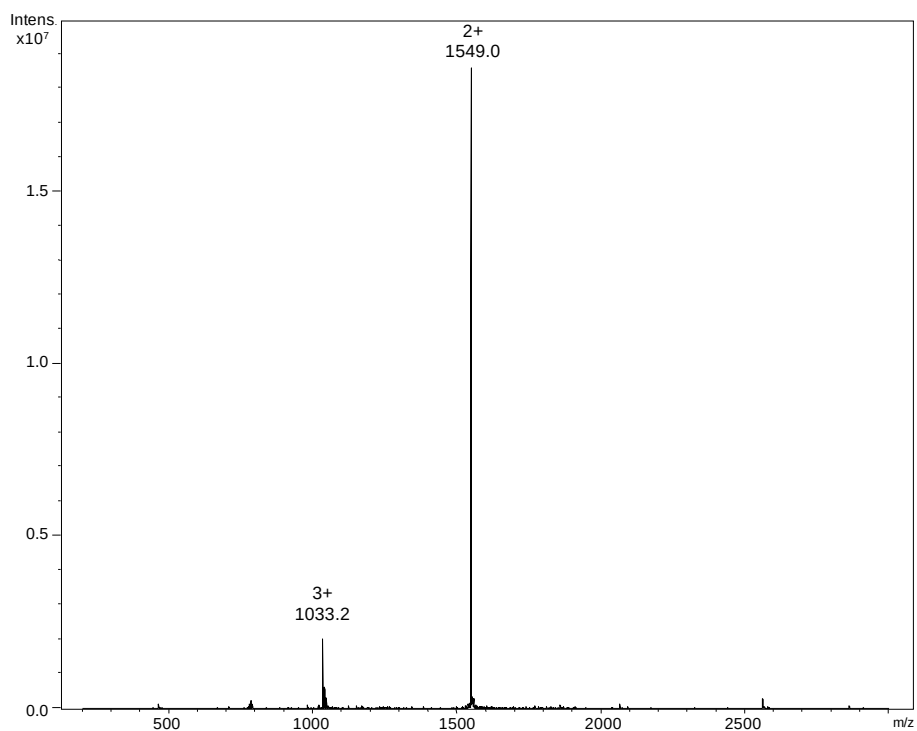
8. ábra A $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{Aoa-GFLG-CPIEDRPMC-NH}_2$ (8) ciklizálás előtt, MS spektrum

A molekula várt tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1549,72 g/mol

mért tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1549,5 g/mol



9. ábra A (CH₃)₂C=Aoa-GFLG-CPIEDRPMC-NH₂ (8) ciklizálás után, analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja



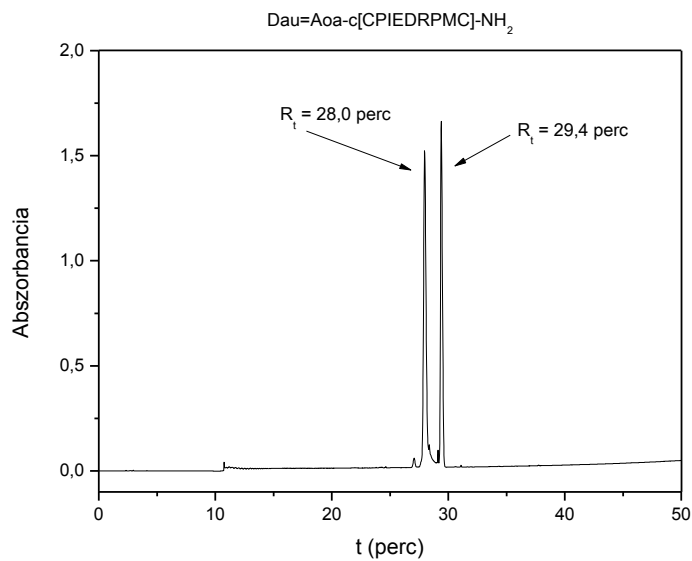
10. ábra A (CH₃)₂C=Aoa-GFLG-CPIEDRPMC-NH₂ (8) ciklizálás után, MS spektrum

A molekula várt tömege: [M+H]⁺: 1547,72 g/mol

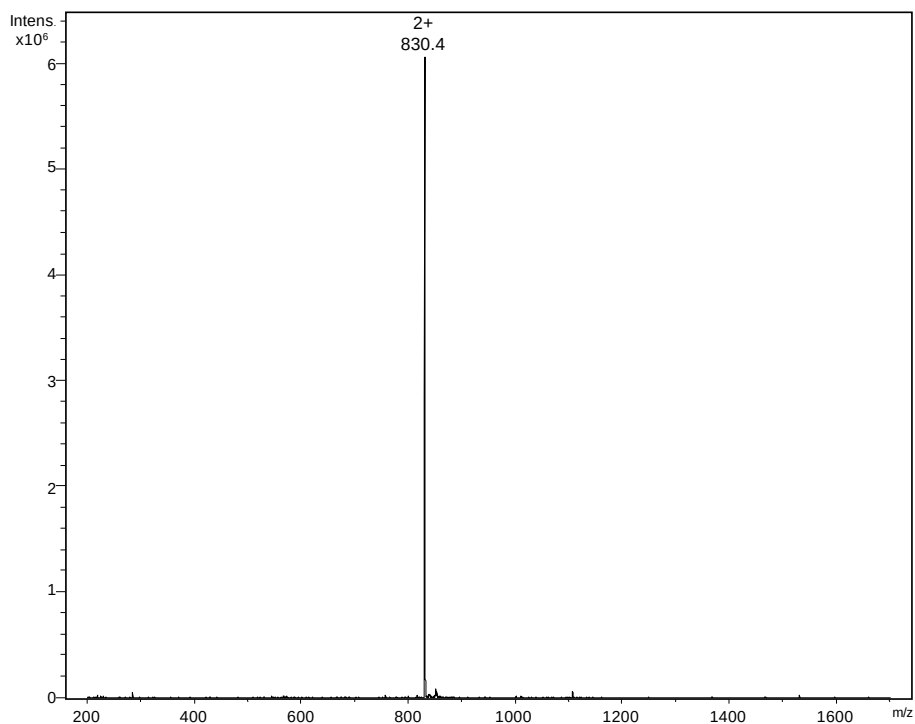
mért tömege: [M+H]⁺: 3096,7 g/mol (M+1549 g/mol)

A mért tömegből egyértelműen megállapítható, hogy ciklikus dimer keletkezett.

Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (15)



11. ábra A tiszta Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (15) analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

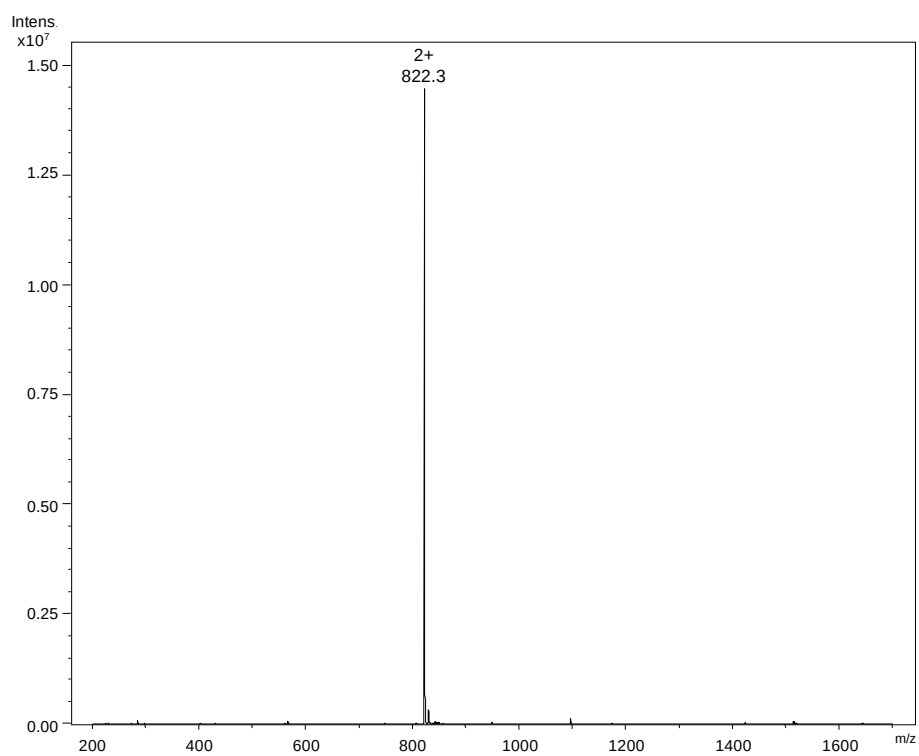


12. ábra A tiszta Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (15) MS spektruma ($R_t = 28,0$ perc)

A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1642,8 g/mol

mért tömege: $[M+H]^+$: 1658,8 g/mol ($M+16$ g/mol)

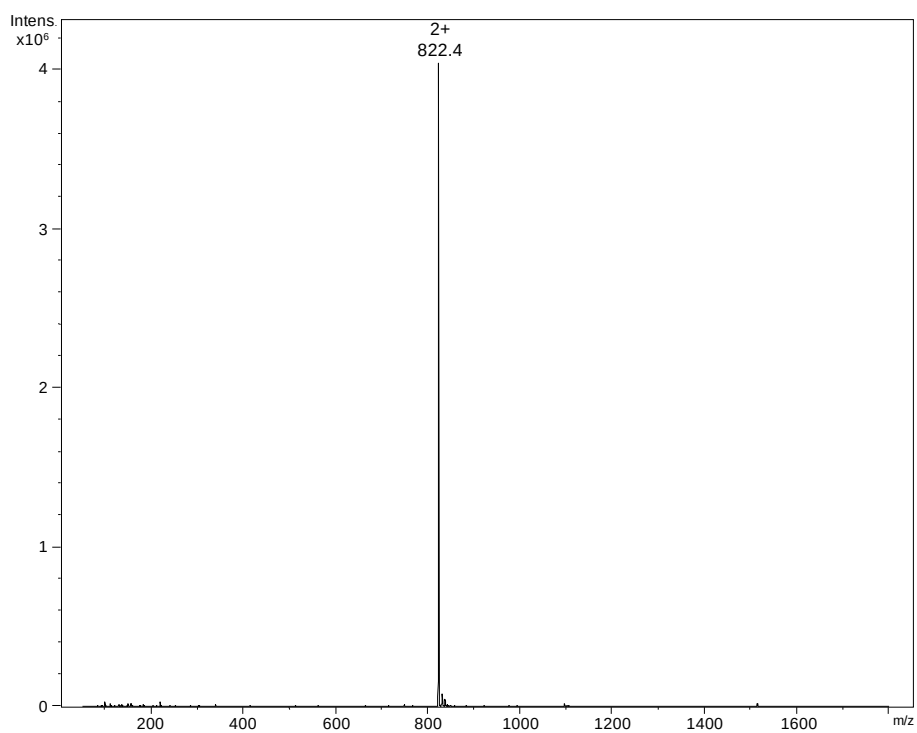
Az analitikai HPLC oszlopon a metionin oxidálódik.



13. ábra A tiszta Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (15) MS spektruma (R_t= 29,4 perc)

A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1642,8 g/mol

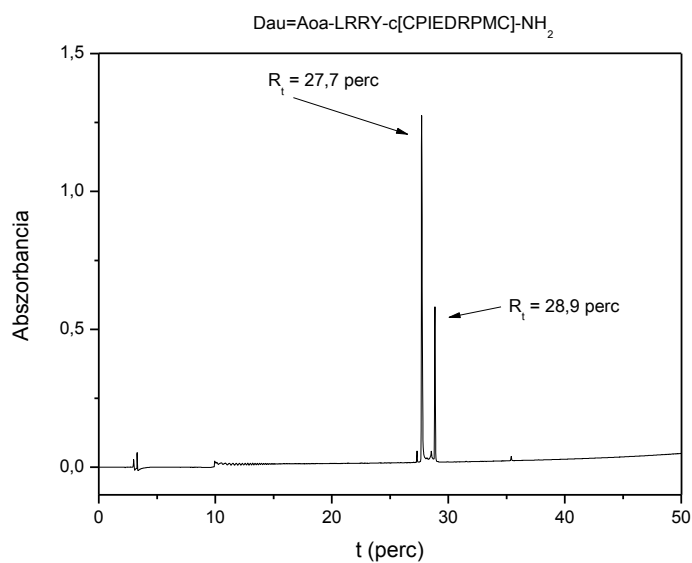
mért tömege: $[M+H]^+$: 1642,7 g/mol



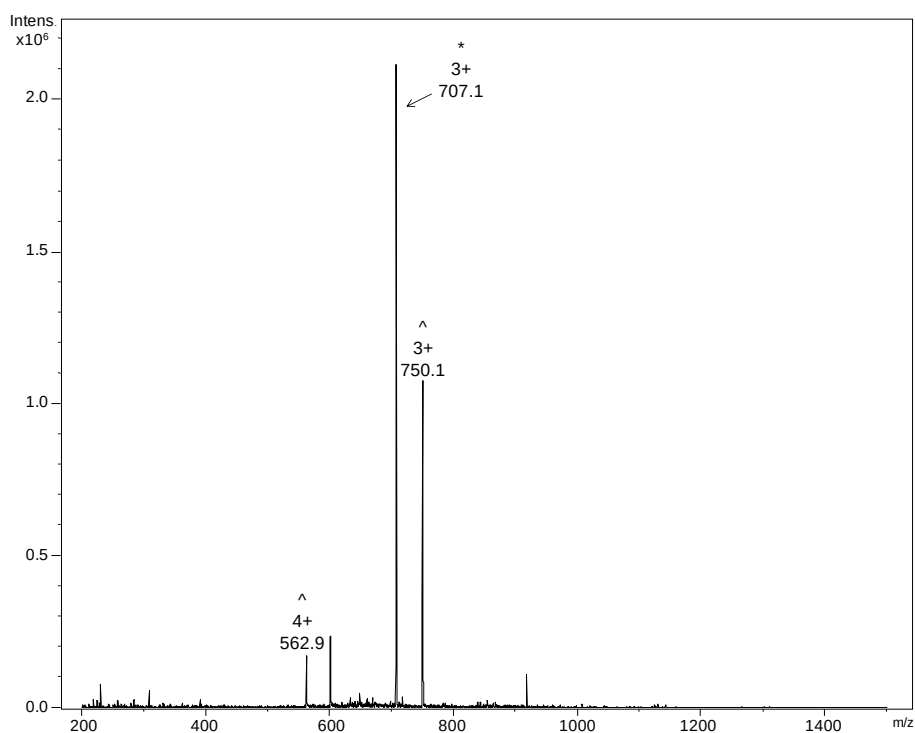
16. ábra A tiszta Dau=Aoa-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (15) MS spektruma

A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1642,8 g/mol
mért tömege: $[M+H]^+$: 1642,8 g/mol

Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (16)



15. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (16) analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja



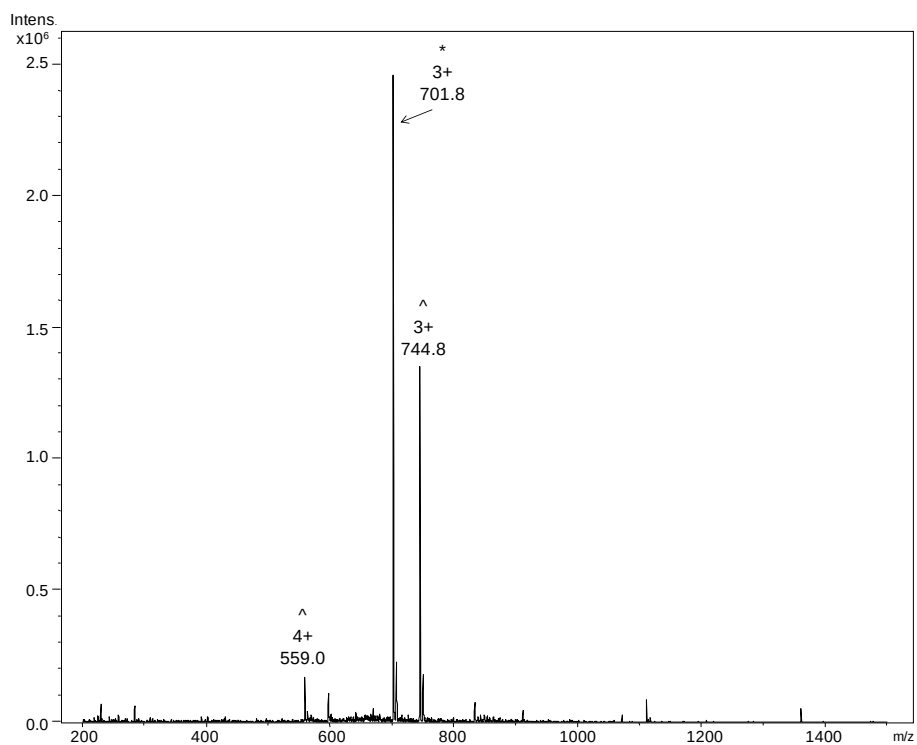
16. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (16) MS spektruma (R_t= 27,7 perc)

A molekula várt tömege: [M+H]⁺: 2231,52 g/mol

mért tömege: [M+H]₁⁺: 2247,4 g/mol (M+16 g/mol) (^)

[M+H]₂⁺: 2118,4 g/mol (M+16-129 g/mol) (*)

Az analitikai HPLC oszlopon a metionin oxidálódik. A tömegspektrométerben leszakadt a mérés során a daunomicin aminocukor részlete.



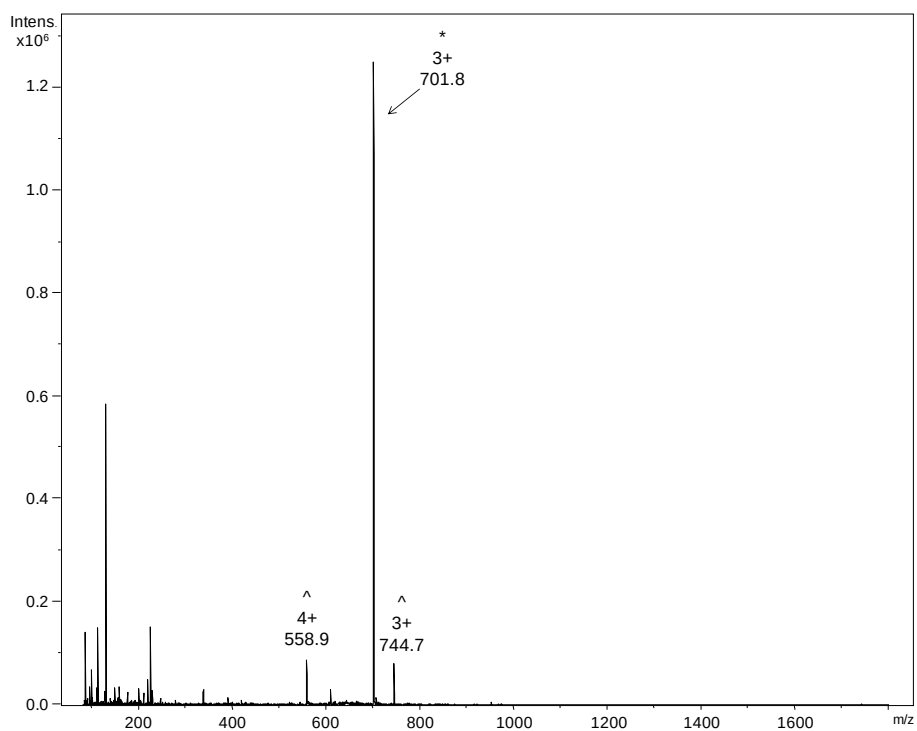
17. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-c[CPIDRPMC]-NH₂ (16) MS spektruma (R_t= 28,9 perc)

A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 2231,52 g/mol

mért tömege: $[M+H]^+_1$: 2231,4 g/mol (^)

$[M+H]^+_2$: 2102,4 g/mol (M-129 g/mol) (*)

A tömegspektrométerben leszakadt a mérés során a daunomicin aminocukor részlete.



18. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-c[CPIEDRPMC]-NH₂ (16) MS spektruma

A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 2231,52 g/mol

mért tömege: $[M+H]^+_1$: 2231,6 g/mol (^)

$[M+H]^+_2$: 2102,4 g/mol (M-129 g/mol) (*)