

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

NÉMETH ÁDÁM

**Vajsavval módosított GnRH-I és
GnRH-II – hatóanyag konjugátumok
szintézise és *in vitro* tumorelles
hatásuk vizsgálata**

Témavezetők: Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadó
Hegedüs Rózsa tudományos segédmunkatárs
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



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

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Hudecz Ferenc tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy munkámat az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén, illetve az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban lehetővé tette.

Hálásan köszönöm témavezetőimnek, Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak, valamint Hegedüs Rózsa tudományos segédmunkatársnak, hogy munkámat mindvégig nagy figyelemmel és türelemmel kísérték, tanácsaikkal, észrevételeikkel pedig segítették a TDK dolgozatom elkészítését.

Köszönettel tartozom Hegedüs Rózsának a tömegspektrometriás mérések, valamint a biológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Rövidítésjegyzék

Ac	acetil
Aoa	aminooxiacetil
Boc	<i>terc</i> -butiloxikabronil
^t Bu	<i>terc</i> -butil
nBu	butiril
iBu	izobutiril
CA	krotonil
Dau	daunorubicin
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én
DCM	diklórmétán
Dde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciklohex-1-ilidén)etil
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIEA	<i>N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
FCS	magzati borjú szérum (fetal calf serum)
Fmoc	9-fluorenilmetiloxikarbonil
FSH	follikulus stimuláló hormon
Glp	piroglutaminsav
GnRH	gonadotropin-releasing hormon
GnRH-IR	I-es típusú GnRH receptor
GnRH-IIR	II-es típusú GnRH receptor
GST	glutation-S-transzferáz
HDACi	hiszton deacetiláz inhibitor
Hex	hexanoil

HOBt	1-hidroxibenztriazol
iVa	izovaleril
LH	luteinizáló hormon
LHRH	luteinizáló-hormont felszabadító hormon
Met	metil
Mtt	4-metiltritol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
Myr	mirisztoil
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidro-benzofurán-5-szulfonil
Pr	propionil
RP	fordított fázisú (reversed phase)
SCFA	rövid szénláncú zsírsav (short-chain fatty acid)
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis (solid phase peptide synthesis)
TFA	2,2,2-trifluorecetsav
TIS	triizopropilszilán
Trt	tritol

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés	1
1.1 A daganatok kialakulása	1
1.2 Daganatterápia	2
1.2.1 Hormonterápia	3
1.2.2 Kemoterápia	3
1.2.3 Célzott tumorterápia	4
1.3 Az irányított tumorterápiában alkalmazható peptid hormonok	5
1.3.1 A gonadotropin-releasing hormon (GnRH) és élettani szerepe	6
1.3.2 A GnRH típusai	6
1.3.2.1 A GnRH-I és a tumorterápiában alkalmazható analógjai.....	7
1.3.2.2 A GnRH-II és a tumorterápiában alkalmazható analógjai	8
1.3.2.3 Módosítások a GnRH és a GnRH - hatóanyag konjugátumok szerkezetében	9
1.4 Daunorubicin	10
1.5 Rövid szénláncú zsírsavak (SCFA) az irányított tumorterápiában	12
1.5.1 Az SCFA-k szerepe az egészséges bélflórában	12
1.5.2 GnRH-daunorubicin konjugátumok módosítása rövid szénláncú zsírsavakkal	13
2. Célkitűzések.....	15
3. Alkalmazott módszerek.....	16
3.1 Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS)	16
3.1.1 Lépésenkénti (stepwise) szilárdfázisú peptidszintézis.....	16
3.1.2 A lépésenkénti SPPS általánosan alkalmazott stratégiái.....	17
3.1.2.1 Az Fmoc/ ^t Bu stratégia.....	17
3.1.3 A szilárd fázis	19
3.1.4 Kapcsolási eljárások	20
3.1.5 A kapcsolat sikerességének ellenőrzése	20
3.1.6 Peptidek hasítása a szilárd hordozóról.....	21
3.2 A peptidek tisztítására és jellemzésére használt technikák.....	21
3.2.1 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)	21
3.2.2 Tömegspektrometria (mass spectrometry, MS).....	22
4. Eredmények.....	24
4.1 Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és daunorubicin-GnRH-II konjugátumok szintézise, valamint <i>in vitro</i> biológiai vizsgálata	24
4.1.1 GnRH-I(⁴ Lys(nBu), <i>D</i> - ⁶ Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(⁴ Lys(nBu), <i>D</i> - ⁶ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok szintézise	25
4.1.1.1 GnRH-I(⁴ Lys(nBu), <i>D</i> - ⁶ Lys(Aoa)) és GnRH-II(⁴ Lys(nBu), <i>D</i> - ⁶ Lys(Aoa)) analógok szintézise	26

4.1.1.2 GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) és GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) konjugálása daunorubicinhez	29
4.1.1.3 A GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata MTT-tesztel	30
5. Kísérleti rész.....	32
5.1 A szintézisek során alkalmazott általános eljárások	32
5.1.1 A szilárdfázisú szintézisek során alkalmazott Fmoc/ ^t Bu stratégia	32
5.1.2 A kapcsolás végbemenetelének ellenőrzése (Kaiser-teszt)	32
5.1.3 A peptidek és konjugátumok analízise.....	33
5.1.3.1 Analitikai RP-HPLC	33
5.1.3.2 Tömegspektrometria	34
5.1.4 A peptidek tisztítása (preparatív RP-HPLC).....	34
5.2 Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin - GnRH-I és daunorubicin – GnRH-II biokonjugátumok szintézise és <i>in vitro</i> biológiai vizsgálata.....	35
5.2.1 A GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok szintézise	35
5.2.1.1 A GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) és GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) peptidek előállítása, tisztítása, analízise	35
5.2.1.2 A GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) és a GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) analógok konjugációja daunorubicinhez oxim-kötés kialakításával: GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok szintézise, tisztítása, analízise	39
5.2.2 <i>In vitro</i> biológiai vizsgálatok: GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata ..	42
6. Összefoglalás	45
7. Irodalomjegyzék	46

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés

A rák világszerte az egyik legtöbb áldozatot követelő betegség. A statisztikák szerint csupán a szív- és érrendszeri megbetegedések következtében hunynak el még ennél is többen. A különböző rák típusok közül a tüdő-, máj-, gyomor-, emlő- és vastagbélrák okozza a legtöbb halálesetet. A rákos megbetegedésekből következő halálesetek száma mintegy 30%-kal csökkenthető lenne megfelelő étrenddel és testmozgással, kevesebb dohányzással és alkoholfogyasztással. A WHO (Egészségügyi Világszervezet) adatai szerint 2012-ben 8,2 millióan hunytak el rákos megbetegedésekben, és az előrejelzések alapján ez a szám tovább növekedhet a betegségek gyógyításában elért jelentős áttörés hiányában. Így égető fontosságú, hogy új, az eddigieknél hatékonyabb gyógyszerek, kezelések kifejlesztése megvalósuljon.¹

1.1A daganatok kialakulása

A tumor (daganat) elnevezést a megállíthatatlanul osztódó sejtek összességére használjuk. A daganatok két nagy csoportba sorolhatók: benignus és malignus tumorok. Benignus, azaz jóindulatú a tumor mindaddig, amíg az osztódó sejtek egyben vannak. De gyakran megesik, hogy idővel ezek a gyorsan osztódó sejtek szétszóródnak a szervezet különböző pontjain (invázió), és új kolóniákat hoznak létre, ezzel áttéteket, úgynevezett metasztázisokat (másodlagos tumorokat) képezve. Ez esetben rosszindulatú, malignus tumorról van szó, ezeket nevezik rákos daganatoknak. Az élőlény halálát a tumor típusától függően okozhatja például a szervezet erőforrásainak felemésztése, a légzőhám elfedése vagy a véredények elzárása.

A daganatok a kiinduló szövettípus függvényében többfélék lehetnek. Néhány típus a teljesség igénye nélkül: a hámeredetű (epiteliális) daganatot karcinómának, a kötőszövet-, illetve izomszövet eredetű daganatot szarkómának, az idegrendszer eredetű daganatot gliómának nevezik, míg a leukémia és a limfóma vér és nyirokszövet eredetű rákot jelöl.

Nemcsak a kiinduló szövettípus alapján csoportosíthatók a daganatok, megkülönböztethetünk hormonfüggő és hormontól független tumorokat. Ugyanis számos daganattípusról ismert, hogy növekedéséhez hormonok szükségesek (pl.: bizonyos emlő-, és prosztatarák típusok). Ez általában szteroid hormonokat jelent (pl.: ösztrogén, androgén).

A daganatok kialakulásának legfőbb forrásai a DNS mutációi, azaz az örökítő anyagban végbement öröklődő változások, meghibásodások. Ezek következtében felborulnak

egy adott sejt normális működéséhez szükséges folyamatok (a sejt fejlődését, növekedését, osztódását befolyásoló mechanizmusok), mégpedig úgy, hogy ez nem a sejt pusztulását, hanem a fékezhetetlen proliferációját (osztódását) okozza. A DNS szekvenciáját módosító sérülések mellett az úgynevezett epigenetikai szabályozás megváltozása is számos esetben elősegíti a tumorok kialakulását, fejlődését. E folyamat során egy adott gén expresszióját szabályozó információ változik meg, amely azonban nem a DNS szekvenciájában, hanem a kromatin (DNS és hisztonfehérjék komplexe) szerkezetében van kódolva.

Ahhoz, hogy a daganat kialakuljon, a genetikai állomány több, egymást követő mutációjára van szükség egy sejtben belül, amely legalább 5-6 különböző folyamatot szabályozó gén működésének megváltozását okozza. Karcinómák esetében például az alábbiak szerint zajlik a folyamat: az első eseménynek köszönhetően a sejtpopuláció egyik sejtje fékezhetetlen osztódásba kezd, így létrejön a benignus tumor. Következő lépésként a sok daganatsejt egyike a mutáció folytán képes lesz olyan enzimek termelésére, amelyek az alaphártyát megemésztik, ezáltal a sejt átléphet a hám alatti kötőszövetbe. Ezután a sejtvonal egy tagja és utódsejtjei már a véráramba is képesek lesznek kijutni. Majd pedig az immunrendszer hatását kikerülve a daganatsejtek idegen környezetben telepednek meg, osztódni kezdenek, metasztázisokat képeznek, végül pedig kialakul a rákos daganat.^{2,3}

1.2 Daganatterápia

A már korábban említett életmódváltással csökkenthető lenne a daganatos megbetegedések száma. Munkám során azonban a már kialakult tumorok, illetve azok kezelésére, gyógyítására alkalmas vegyületek kifejlesztése került a középpontba.

Mivel a rák kifejezés nem csak egy betegséget, hanem egy egész betegségcsoportot jelöl, magában foglalva körülbelül 130féle daganatos megbetegedést, egyetlen átfogó gyógymód kifejlesztése sajnos lehetetlen. Figyelembe véve a betegség előrehaladottságát, a daganat helyét és méretét, számos kezelési lehetőség áll rendelkezésünkre, mint például a sebészeti beavatkozás, sugárterápia, immunterápia, hormonterápia és a kemoterápia.⁴

Miután megtörtént a ráktípus azonosítása, a következő lépés a kór előrehaladottságának felmérése, ami nélkülözhetetlen a kezelés megfelelő stratégiájának kidolgozásában. A különféle kezeléstípusok közös célja az abnormális sejtproliferáció megszüntetése, de sajnos a jelenleg alkalmazott módszerek többsége az egészséges sejtek osztódására is hatással van.

Az utóbbi évtizedekben egyre inkább elterjedőben van egy, az előbb említett probléma kiküszöbölésére alkalmas módszer, az úgynevezett célzott-, vagy irányított tumorterápia. Munkám során e célra alkalmazható biokonjugátumokat állítottam elő, melyek a hatóanyagot hormon származék irányítómolekula segítségével juttatják irányítottan a tumorsejtekbe. E tulajdonságnak köszönhetően ez a módszer mind a hormonterápiás, mind a kemoterápiás kezelések közé helyezhető, így tömören megemlítem ezeket az eljárásokat is.

1.2.1 Hormonterápia

A módszer alapja, hogy a hormon-érzékeny tumorok növekedéséhez szükséges hormonok túladagolásával érzéketlenné tehető (deszenzitizálhatók) a tumorsejtek adott hormonra specifikus receptorai, ezzel gátolva a hormon felvételét, és így a tumor növekedését. Egy másik stratégia, hogy az adott hormon termelődésének direkt blokkolásával közvetlenül vagy több hormon egymásra hatásának eredményeképp gátolható a tumornövekedés. Ez akár a hormont termelő mirigy sebészeti beavatkozással történő eltávolításával is megvalósítható.

A hormonterápia alkalmazhatósága azokra a tumorokra korlátozódik, amelyekben a tumorsejtek megtartották a hormonérzékenységet (pl.: kimutatható bennük a kezelésre használt hormon receptora). A hormonterápia gyakran megelőzi a tumor sebészeti úton történő eltávolítását, mivel a kezelés hatására a tumor mérete csökkenhet.⁵

1.2.2 Kemoterápia

A kemoterápia a rákos daganatok gyógyszeres kezelését jelenti. Az eljárás során alkalmazott sejtosztódást gátló szerek (ún. citosztatikumok) diffúzió útján jutnak be a sejtekbe, majd ott hatásukat kifejtve elpusztítják azokat. Az egyes citosztatikumok más-más hatásmechanizmussal rendelkeznek, ezért gyakori, hogy különféle kombinációkban alkalmazzák őket a kezelések során, ezzel erősítve egymás hatását.

Hatásmechanizmus szerint csoportosított néhány citosztatikum:

- alkilezőszerek: DNS-szintézis gátlása, hibás replikáció, daganatos sejt pusztulása
- antimetabolitok: a köztes anyagcsere vagy enzimek antagonistái
- antibiotikumok: interkalációs komplexek
- antimitotikumok: az osztódási orsó kialakulásának gátlása.⁴

Ezen vegyületek hátránya, hogy diffúzióval válogatás nélkül jutnak be a sejtekbe, melynek következtében más, gyorsan osztódó sejtípusokra is hatással vannak, a gyorsan osztódó normál sejteket is elpusztítják. Ide tartoznak elsősorban a vérképzősejtek, bélhámsejtek, hajhagymák tüszősejtjei, ivarsejtek. Ez okozza a kemoterápia mellékhatásait, mint például a hányinger, hányás, hasmenés, étvágytalanság, hajhullás vagy az immunrendszer gyengülése. Ez utóbbi az életminőség romlásán túl, sokszor súlyos, akár életveszélyes fertőzések kialakulását is eredményezheti. A kemoterápia számos további hátránnyal rendelkezik. Ezek közé tartozik a hatóanyag gyors kiürülése a véráramból, mely alkalmanként nagy dózisok alkalmazását teszi szükségessé, továbbá a rákos sejtekben rezisztencia alakulhat ki az alkalmazott terápiás szerekkel szemben (multidrog rezisztencia, MDR).

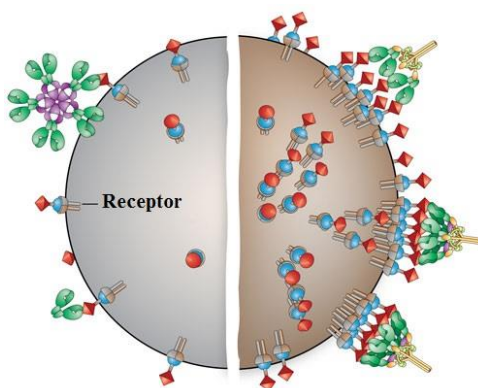
Az itt tárgyalt okokból kifolyólag a kutatók olyan megoldásokat kezdtek keresni, amiknek köszönhetően a hatóanyagokat irányítottan a rákos sejtekbe lehet juttatni, növelve ezzel azok szelektivitását. Ezáltal jelentősen csökkenthetők a kezelések mellékhatásai, valamint növelhető a hatékonyságuk.

1.2.3 Célzott tumorterápia

Az eljárás az egészséges és rákos sejtek felépítésbeli és funkcionális eltérésein alapszik. A célzott tumorterápiás módszereket két nagy csoportba sorolhatjuk:

- olyan, az adott daganattípusra jellemző molekuláris hibák (onkogének) kerülnek a célkeresztbe, amelyek a rosszindulatú transzformációban meghatározó jelentőségűek
- olyan sejtfelszíni struktúrákat veszünk célba, amelyeknek a daganat kifejlődésében, növekedésében van alapvető szerepük (rendellenes szabályozó, illetve jelátviteli elemek)

Ez utóbbi stratégia esetén a hatóanyag célba juttatására különféle receptorspecifikus ligandumokat, például peptidhormonokat alkalmaznak, melyekhez a gyógyszermolekula kovalens kötással van rögzítve. Ilyen peptidhormon lehet többek között a gonadotropin-releasing hormon (GnRH), a szomatosztatin vagy a bombesin. A daganatos sejtek felépítését felderítő kutatások ugyanis kimutatták, hogy egyes vegyületek - pl.: a szóban forgó peptid hormonok receptorai - a rákos sejteken lényegesen nagyobb számban vannak jelen, mint a normál sejteken (1. ábra⁶).



1. ábra: A normál (bal) és rákos (jobb) sejtek sejtfelszíni különbségei

Ebből kifolyólag ezek a sejtfelszíni struktúrák megfelelő célpontjait képezhetik az irányított tumorterápiának. A receptorok által közvetített felvételi útvonallal számottevő szelektivitás-növekedés érhető el, ezzel megvédve az egészséges sejteket a pusztulástól.⁷

A célzott tumorterápia előnyei:

- nagyobb hatóanyag szelektivitás
- kevesebb toxikus mellékhatás
- a hatóanyag megnövekedett tartózkodási ideje a véráramban
- stabilitásnövekedés a szervezetben lezajló enzimatis folyamatokkal szemben
- kontrollált hatóanyag felszabadulás
- a rákos sejtek rezisztenssé válásának kivédése
- oldhatóság növelése

1.3 Az irányított tumorterápiában alkalmazható peptid hormonok

A peptid hormonok legtöbbször maguk is hatással vannak a tumor növekedésére, pozitív vagy negatív irányba befolyásolva azt. A célzott tumorterápiában alkalmazott peptid hormonokat érdemes úgy megválasztani, hogy azok maguk is növekedést gátló hatással rendelkezzenek (GnRH, szomatosztatin).

Ezek a vegyületek számos előnnyel rendelkeznek, mint például a nagyfokú affinitás a receptoraikhoz, mellékhatásaik elenyészőek, és könnyen előállíthatók. Fontos továbbá, hogy szerkezetük módosítható, így a tulajdonságok kialakításában (pl.: antiproliferatív hatás, endokrin aktivitás, szerkezet) szerepet nem játszó aminosavak helyettesíthetők más aminosavakkal, amelyek lehetőséget biztosítanak további, az antitumor hatást fokozó molekulák konjugálására. Az egyetlen hátrányuk, hogy a sejtbe jutva túl gyorsan lebomlanak

(proteolitikus degradáció) és emiatt nem tudják megfelelően kifejteni növekedést gátló hatásukat. Ez részben megelőzhető például *D*-konfigurációjú természetes-, illetve nem természetes aminosavak beépítésével, ezek azonban mellékhatásokat eredményezhetnek.⁷

Munkám során GnRH-alapú konjugátumok kifejlesztése volt a cél, így ezt a vegyületcsaládot részletesebben is bemutatom.

1.3.1 A gonadotropin-releasing hormon (GnRH) és élettani szerepe

A gonadotropin-releasing hormon, vagy másik nevén, a luteinizáló hormon-releasing hormon (LH-RH) a neuropeptidek csoportjába tartozó dekaeptid hormon, melynek aminosav-szekvenciája a következő: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. A vegyületet Andrew V. Schally kutatócsoportja azonosította 1971-ben.⁸ Élettani szerepét tekintve a molekula elsődleges funkciója az emlősök szaporodási rendszerének irányítása, a gonadális aktivitás szabályozása révén. A GnRH által felszabadított gonadotrop hormonok a luteinizáló hormon (LH), valamint a folliculus stimuláló hormon (FSH). A GnRH képződésének helye a hipotalamusz, ahonnan pulzáló módon szabadul fel, majd a hipofízisen keresztül jut el az adenohipofízisbe. Itt hozzákapcsolódik a GnRH receptorokhoz, ezzel szabályozva a gonadotrop hormonok (FSH, LH) szekrécióját. Ezek felelősek az ivarsejtképződés folyamatának irányításáért, valamint a szteroidhormonok termelődéséért.⁹ A GnRH – vagy ahogy a további típusok felfedezése óta nevezik: GnRH-I - és változatai a szaporodás szabályozásában betöltött szerepükön kívül különféle neuroendokrin, neurotranszmitter és neuromodulátori funkciókkal is rendelkeznek.^{10,11}

1.3.2 A GnRH típusai

Mára már több mint 20 természetes GnRH analógot azonosítottak gerincesekben és előgerinchúrosokban. Közös tulajdonságuk, hogy 10 aminosavból épülnek fel, szekvenciájukat tekintve pedig legalább 50%-ban azonosak. Az eltérések az 5.-8. aminosavakban találhatók.¹²

A GnRH-nak 3 típusát azonosították különböző gerincesekben, amelyeknek funkciójuk, illetve szerkezetbeli eloszlásuk egymástól eltérő. A gerincesek legtöbbször a három GnRH típusból csak kettőt, valamint azok receptorait sikerült kimutatni, a 3. típust (GnRH-III) mindeddig csak halakból sikerült izolálni. Elsőként a már említett GnRH-I-et/LH-

RH-t fedezték fel, amelyet emlősök hipofíziséből nyertek ki. Ezt követte az elsőként csirkeagyból izolált GnRH-II felfedezése (cGnRH). Ezt a típust később sikerült kimutatni az emberi agyban és egyéb perifériás szövetekben is. A hormon 3. típusa (GnRH-III) a nagy tengeri ingola agyából került izolálásra, emberi szervezetben való jelenlétére máig még nem sikerült bizonyítékot találni.¹³

1.3.2.1 A GnRH-I és a tumorterápiában alkalmazható analógjai

A GnRH-I és analógjainak alkalmazása a tumorterápiában a daganatok növekedésének gátlását eredményezi. Ez két különböző módon valósulhat meg.

Egyfelől a tumorsejtek felszínén elhelyezkedő GnRH receptorokhoz kötődve fejtik ki közvetlen tumorellenes hatásukat.^{14,15} A receptorok jellemzően a reprodukcióban szerepet játszó szövetekből kialakuló tumorokon fejeződnek ki (pl.: prosztata, méh, emlő, petefészek), de jelen vannak a szaporodásban részt nem vevő szervekben kialakuló tumorokon is (pl.: száj, gége, máj).¹⁶

Másrészt pedig közvetett módon hatnak, a GnRH receptorok blokkolásával az agyalapi mirigyben, amit a gonadotropinok és szex-szteroidok szekréciójának gátlása követ. Így tehát az antagonistá analógok hatására azonnali gonadális hormonszekréció gátlás következik be. Ennek köszönhetően az antagonisták ígéretesebb jelöltek lehetnek a hormonterápiában, mint az agonista változatok, ahol a hormonok termelődése először hirtelen megugrik, majd csak utána kezd csökkenni.¹⁷

A tumorterápiában legáltalánosabban alkalmazott GnRH-I származékok:

- Triptorelin/Zoptarelin: [D-Trp⁶]GnRH-I
- Leuprolid: [D-Leu⁶, Pro⁹-NH₂]GnRH-I
- Buserelin: [D-Ser(^tBu)⁶, Pro⁹-NH₂]GnRH-I

A receptorokhoz való hozzákötődésnek köszönhetően a GnRH-I analógok az irányított tumorterápiában is alkalmazhatók, mint gyógyszerhordozó, célzó molekulák. Leggyakrabban a Zoptarelin ([D-Lys⁶]GnRH-I) nevű származékot használják erre a célra. Egy, a petefészek és méhnyálkahártya eredetű tumorokkal szemben ígéretesnek tűnő konjugátum az Andrew V. Schally kutatócsoportjában kifejlesztett AN-152. Ebben citosztatikumként doxorubicint kapcsolnak [D-Lys⁶]GnRH-I-hez észter-kötéssel, glutársav távtartó egységen keresztül.¹⁸

1.3.2.2 A GnRH-II és a tumorterápiában alkalmazható analógjai

A GnRH-II aminosav szekvenciája (Glp-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂) 70%-ban egyezik a GnRH-I szekvenciájával. Ez a típus meglepő módon a csontos halaktól egészen az emberig minden élőlényben azonos szerkezetben fordul elő, ami azt engedi feltételezni, hogy ez lehet a legkorábban kialakult GnRH típus. Az a tény, hogy a szerkezete 500 millió éven keresztül nem változott, jelzi, hogy fontos funkcióval/funkciókkal rendelkezik, illetve hogy nagy valószínűséggel van saját receptora.

A GnRH-II megtalálható az agyalapi mirigyben, a reprodukcióban szerepet játszó szövetekben, illetve egyéb perifériás szövetekben, mint például a vese vagy a csontvelő.¹⁹ Feltételezett feladatai között szerepel többek között a gonadotropin szekréció (a medio-bazális hipotalamuszban), az endokrin funkció szabályozása (az emlőben, petefészekben, méhnyálkahártyában), neuromoduláció (a központi és perifériás idegrendszerben), valamint a reprodukciós magatartás stimulálása (a limbikus rendszerben).

A vizsgálatok során sikerült igazolni azt a feltételezést, mely szerint a II-es típusú GnRH saját receptorral rendelkezik (GnRH-IIR), ennek szekvenciája közel 40%-ban azonos a GnRH-IR aminosav sorrendjével. A legszembetűnőbb különbség a GnRH-IR és a GnRH-IIR között, hogy a GnRH-II receptora a C-terminálisán citoplazmába nyúló doménnel rendelkezik, szemben a GnRH-I receptorával, melyben ez a szakasz nem található meg. A GnRH-IIR C-terminálisú citoplazmatikus doménjében nagy számban fordul elő szerin és treonin, ahol nagy valószínűséggel foszforiláció zajlik. Ez a folyamat szerepet játszhat a gyors deszenzibilizálásban és internalizációban. Ezen C-terminális hiánya a GnRH-I receptorokban magyarázhatja, hogy ezek a változatok ellenállóbbak a deszenzibilizálódással szemben, illetve nem internalizálódnak olyan gyorsan. Ez a szerkezetbeli eltérés nagyban befolyásolhatja a gyógyszermolekulák célzott sejtbejuttatásának hatékonyságát. Valószínűsíthető, hogy a GnRH-II receptorai alkalmasabbnak bizonyulhatnak erre a célra. További lényeges eltérések találhatók a receptorok extracelluláris-, transzmembrán-, és a citoplazmatikus, ún. loop domének felépítésében.¹⁹

Továbbá azt is bebizonyították, hogy a humán genomban megtalálható a GnRH-IIR-t kódoló gén, azonban a funkcionális receptort az egészséges szervezetben nem sikerült kimutatni. Az expresszió hiányának oka egyelőre ismeretlen.²⁰ Ezzel szemben az emlő, méhnyálkahártya, és petefészek tumoros szöveteiben megtalálható a receptor. A GnRH-II antiproliferatív jellege ezekben a szövetekben igazolt, mely hatását a GnRH-IR-ok közvetítésével fejt ki. Továbbá azt is kimutatták ezekből a szövetekből nyert tumorsejteken,

hogy a GnRH-II agonistái (pl.: [D-Lys⁶]GnRH-II) sokkal hatékonyabban gátolják a sejtosztódást, mint a GnRH-I agonistái.²¹

1.3.2.3 Módosítások a GnRH és a GnRH - hatóanyag konjugátumok szerkezetében

A tumorterápiában jelenleg legáltalánosabban alkalmazott GnRH-analógok közé tartozik például a Triptorelin, Zoptarelin és a Leuprolid (1.3.2.1. fejezet). Eleni V. Pappa és kutatócsoportja ezek közül a Leuprolid ([D-Leu⁶, Pro⁹-NH₂]GnRH-I) szerkezetében végrehajtott módosításokkal kívánták növelni a vegyület hatékonyságát. A módosítások a 4-es helyzetű szerint, illetve a 6-os helyzetű D-leucint érintették. Az előállított analógok antiproliferatív hatását PC3 és LNCaP prosztata tumorsejteken, enzimstabilitásukat pedig α -kimotripsinnel és szubtilizinnel szemben vizsgálták. Az enzimstabilitás növelése érdekében a 4-es helyzetbe N-Met-Ser került beépítésre, mely minden esetben növelte a vegyületek stabilitását α -kimotripsinnel szemben, míg a tumorelles hatásuk közel azonos maradt a leuprolidéval. A 4-es helyzetben N-Met-Ser-t tartalmazó analógok közül az a változat bizonyult a legstabilabbnak, amely a 6-os helyzetben D-glutaminsavat tartalmazott.⁴⁴

Tekintve, hogy mind a szteroid-hormonfüggő tumorok (pl.: emlő, prosztata, petefészek) kezelésére, mind az irányított tumorterápiában számos GnRH analógot alkalmaznak, feltételezték, hogy a GnRH I-es és II-es típusán túl a GnRH-III (Glp-His-Trp-Ser-**His-Asp-Trp-Lys**-Pro-Gly-NH₂) is rendelkezhet az említett terápiák szempontjából előnyös tulajdonságokkal, melyeknek köszönhetően új, hatékony gyógyszerek kerülhetnek kifejlesztésre.

A GnRH-III vizsgálata során kimutatták, hogy a vegyületnek *in vitro* körülmények között közvetlen antiproliferatív hatása van humán emlő-, prosztata-, és méhnyálkahártya tumorsejteken, mely hatás összefüggésben lehet az 5.-8. helyzetben lévő aminosavakkal.²²
²³A szaporodásban részt vevő szövetekből kialakult tumorokon túl a hasnyálmirigy-, és vastagbélrák esetében is hatékonyan gátolja a sejtprolifrációt. Óriási előnyt jelent az a tény is, hogy endokrin aktivitása (LH és FSH felszabadító hatása) gyenge agonistaként nagyságrendekkel kisebb, mint az I-es típusú GnRH-é (pl.: [Arg⁸]GnRH-III esetében a felszabadított luteinizáló hormon 0,41 %-a, míg a felszabadított FSH 0,40 %-a volt a GnRH-I esetében mért mennyiségekhez képest).²⁴ Ugyan eddig még sem a GnRH-III-at, sem a receptorát nem mutatták ki az emberi szervezetben, a vegyület receptorkötődési vizsgálatait azt mutatták, hogy a GnRH-IR-hoz és a GnRH-IIR-hoz egyaránt kapcsolódik, így az irányított tumorterápiában hordozó molekulaként konjugátumokban felhasználható.²⁵

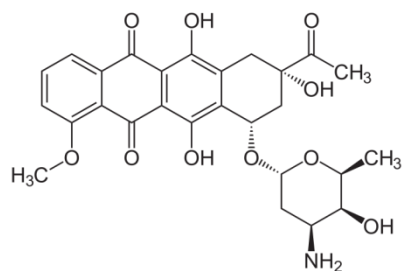
Ahogy azt már az előző bekezdésben említettem, a GnRH-III tumorellenes hatása nagy valószínűséggel a szekvencia 5.-8. aminosavait érintő szakaszával hozható kapcsolatba. Ebből a feltételezésből kiindulva számos olyan analógot állítottak elő, többek között az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban is, melyben ezt a szakaszt módosították. A vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a 8-as helyzetben lévő lizin oldallánca nem játszik meghatározó szerepet sem az antiproliferatív tulajdonság kialakításában, sem a receptorhoz való kötődésben, míg a hormonális hatás kifejtésében annál inkább, így az ϵ -aminocsoport módosításával, például hatóanyag konjugálásával a tumorellenes hatás növelése mellett jelentősen csökkenthető a hormonális aktivitás az eredeti hormonhoz képest.^{24, 27}

A 4-es helyzetben található szerin szintén nem tölt be kulcsfontosságú szerepet a molekulában, ugyanis nem vesz részt sem a receptorokhoz való kötődésben, sem a H-hidak kialakításában. Ebből kifolyólag nincs hatással az endokrin aktivitásra és a tumorellenes hatást sem befolyásolja, így ezen aminosav cseréje megengedett. $^4\text{Ser} - ^4\text{Lys}$ vagy $^4\text{Ser} - ^4\text{Lys}(\text{Ac})$ csere esetén az antiproliferatív hatás közel azonos volt az eredeti molekulához képest, illetve ugyanezek a cserék a GnRH-III($^8\text{Lys}(\text{Dau}=\text{Aoa})$) konjugátumban az eredetihez képest jelentősen növelték az *in vitro* citosztatikus hatást LNCaP humán prosztatata tumor-, MCF-7 humán emlő adenokarcinóma-, és HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken.²⁸ További tapasztalatok között szerepelt, hogy az a daunorubicin tartalmú konjugátum, amelyben a GnRH-III 4-es helyzetében, ϵ -aminocsoportján acetilezett lizin szerepel, sokkal stabilabb pepszin és tripszin jelenlétében, mint az eredeti GnRH-III($^8\text{Lys}(\text{Dau}=\text{Aoa})$) konjugátum. Továbbá a GnRH-III($^4\text{Lys}(\text{Ac})$, $^8\text{Lys}(\text{Dau}=\text{Aoa})$) esetén a sejtbe jutott vegyület mennyisége szignifikánsan nagyobb volt MCF-7 humán emlő adenokarcinóma sejteken vizsgálva, az acetyl-csoport nélküli változathoz képest.²⁸

A $^4\text{Ser} - ^4\text{Lys}$ módosítás egy újabb konjugációs helyet kínál további hatóanyag, apoptózist indukáló peptid, illetve egyéb hasznos funkcióval rendelkező molekula beépítésére, valamint a vegyületek enzimstabilitása és sejtbejutási képessége is növelhető ez által.

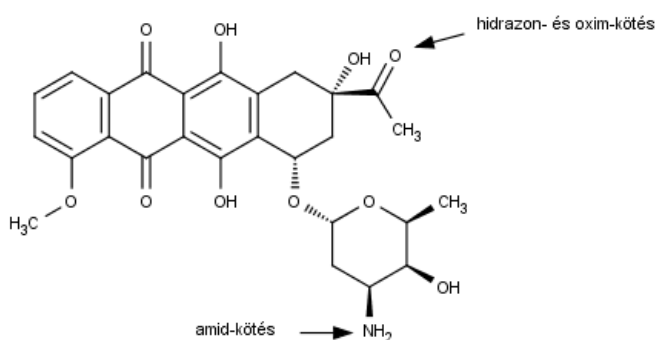
1.4 Daunorubicin

A daunorubicin (daunomicin, Dau) a doxorubicin és az epirubicin mellett az antraciklinek családjába tartozó vegyület. Közös tulajdonságuk, hogy tumorellenes hatásúak, ezért elterjedten alkalmazzák őket a daganatterápiában.



2. ábra: A daunorubicin szerkezete

A daunorubicin antiproliferatív és sejtpusztító hatását a DNS szintézisének gátlása útján fejt ki, amely több különböző mechanizmussal is magyarázható.²⁹ Hozzákötődhet a DNS-hez, valamint alkilezheti is azt, interkalálódhat a bázispárok közé, akadályozhatja a DNS szálak szeparációját. Továbbá a topoizoméráz II enzimmel is stabil komplexet alakíthat ki, ezzel gátolva annak működését, a szuperhelikális DNS szerkezet kialakulásának megelőzését.³⁰ Ezeknek a hatásoknak köszönhetően egy rendkívül hatékony vegyületről van szó, de nagy hátránya, hogy önmagában nem szelektív. Ennek következtében az itt felsorolt folyamatok az egészséges sejtekben is éppúgy lejátszódnak, mint a daganatos sejtekben, ezzel számos mellékhatást okozva (hajhullás, hasmenés, hányás, étvágytalanság). A káros mellékhatások és a multidrog rezisztencia kialakulásának kivédése, valamint az alkalmazható dózis növelése érdekében a daunorubicint különféle peptidekhez (pl.: GnRH, szomatosztatin) és egyéb hordozómolekulákhoz kapcsolták. A daunorubicin esetén két konjugációra alkalmas funkciós csoport található a molekulán (3. ábra), a hordozómolekulákat ezeken keresztül amid-, hidrazon-, és oxim-kötéssel lehet konjugálni.



3. ábra: A daunorubicin és konjugációra alkalmas funkciós csoportjai

Számos GnRH – antraciklin konjugátumot állítottak elő, kihasználva az egyes funkciós csoportok által kínált kapcsolási lehetőségeket. Amid-kötés kialakítása esetén stabil, könnyen tisztítható származék keletkezik, azonban a citotoxikus hatása jelentősen csökken.³¹ A leghatékonyabban a hidrazon-kötést, valamint doxorubicin esetén észter-kötést tartalmazó konjugátumok gátolták a sejtproliferációt *in vitro* körülmények között. A probléma az, hogy az észter-kötés a karboxilészteráz enzimek hatására bomlik, melyek a vérben is nagy

menyiségben fordulnak elő, így ezen konjugátumok féléletideje csupán 1-2 óra a véráramban. A hidrazon-kötést tartalmazó változatok pedig azon túl, hogy általában csak alacsony termeléssel állíthatók elő, savlabilitásuk miatt nehezen tisztíthatók. Továbbá az a tapasztalat, hogy ezt a kötés-típust tartalmazó konjugátumok sem teljesen stabilak a véráramban, féléletidejük kb. 24 óra.³² A kutatócsoportban korábban előállított konjugátumok esetén a legideálisabb kötésnek az oxim-kötés bizonyult, ez ugyanis széles pH-tartományban (pH = 3-9) stabil³³. Ennek köszönhetően ezen vegyületek tisztítása könnyű, nem igényel különleges körülményeket. Az oxim-kötés kialakítása aminosavak közbeiktatásával valósítható meg. A konjugátumokkal végzett enzimes vizsgálatok során azt találták, hogy az antraciklin-származék, az aminooxiacetil részlet és a hozzá kapcsolódó aminosav egyben szabadul fel. A vizsgálatok alapján ez a metabolit is képes kötődni a DNS-hez, habár a szabad hatóanyaghoz képest kisebb mértékben.³²

1.5 Rövid szénláncú zsírsavak (SCFA) az irányított tumorterápiában

A rövid szénláncú zsírsavak az élelmi rostok és rezisztens keményítők anaerob bakteriális fermentációja során keletkeznek a vastagbélben. Az elfogyasztott tápláléktól függően az alábbi fő metabolitok képződnek: ecetsav, propionsav, vajsav, valeriánsav, kapronsav, illetve az elágazó láncú zsírsavak, mint az izovajsav és az izovaleriánsav.³⁴

1.5.1 Az SCFA-k szerepe az egészséges bélflórában

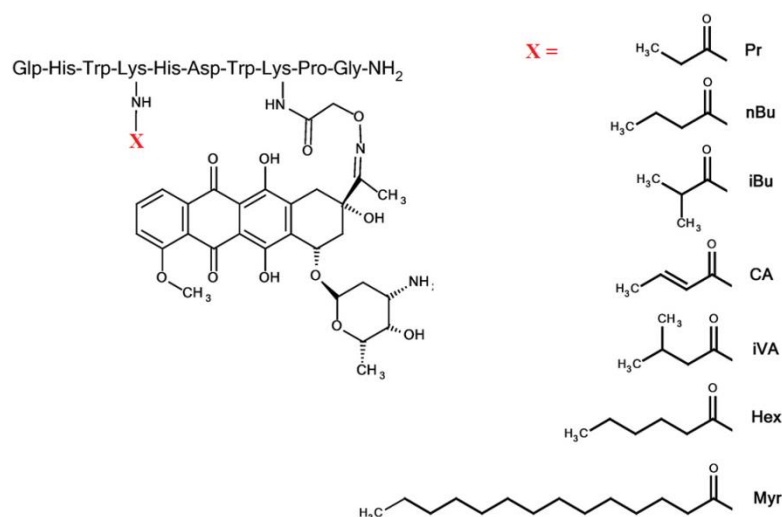
Az említett rövid szénláncú zsírsavak (különösen a vajsav) bizonyítottan fontos védelmi szereppel rendelkeznek a vastagbél fiziológiájában probiotikus aktivitásuk révén. Ezen hatásuk a tumorsejtek növekedésének gátlásában, valamint apoptózist kiváltó folyamatok beindításában nyilvánul meg.³⁵ Az egészséges sejtek életben maradását segítik, az átalakult (transzformálódott) sejtek túlélésének esélyét pedig csökkentik.

Jelenlegi ismereteink szerint a vajsav ezt a hatását főként specifikus gének expressziójának szabályozásával éri el hiszton deacetiláz inhibitor aktivitása révén.³⁶ A hiszton fehérjékben lévő lizinek ^εN-acetil-csoportjának lehasításával a nukleoszómában megerősödik a hisztonok és a DNS közötti kötés. Az enzim gátlásának eredményeképpen a nukleoszómák hiperacetilált, lazább szerkezete alakul ki, így a transzkripciós faktorok számára könnyebben hozzáférhetővé válik a DNS, ezzel megnövekedett transzkripciót kiváltva. Tehát a vajsav változásokat indukál a génexpresszióban.³⁷

A hiszton deacetiláz inhibitor aktivitásán túl a vajsav glutation-S-transzferáz aktivitással is rendelkezik, melynek köszönhetően hozzájárul a táplálékkal felvett rákkeltő vegyületek detoxifikációjához.³⁷

1.5.2 GnRH-daunorubicin konjugátumok módosítása rövid szénláncú zsírsavakkal

Figyelembe véve az 1.3.2.3. fejezetben bemutatott eredményeket (megnövekedett enzimstabilitás, sejtbe jutás és citosztatikus hatás), valamint a rövid szénláncú zsírsavak tumornövekedést gátló hatását, feltételezhető, hogy 4-es helyzetű lizin ϵ -aminocsoportjának SCFA-kal való acilezésével nemcsak a sejtbejutás és az enzimstabilitás növelhető, hanem a konjugátumok tumorellenes aktivitása is. Ezek alapján az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban a következő konjugátumok kerültek előállításra: GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)), ahol X = propionil (Pr), butiril (nBu), izobutiril (iBu), hexanoil (Hex), izovaleril (iVa), mirisztoil (Myr), krotonil (CA).³⁴



4. ábra³⁴: GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa))

Az előállított biokonjugátumok enzimstabilitását sejtenyésző médiumban, patkány máj lizoszóma homogenátum és α -kimotripszin jelenlétében vizsgálták.

Az enzim jelenlétében a legtöbb, zsírsavláncot tartalmazó konjugátumban (Pr, iBu, nBu, CA, iVa, Hex) a - ³Trp - ⁴Lys(X) - kötés mentén lánchasadást mutattak ki. Megállapították, hogy a kimotripszin általi degradáció mértéke függ a beépített zsírsavlánc jellegétől. Továbbá kapcsolatot fedeztek fel a degradáció mértéke és a zsírsavlánc hossza között. Ez alól kivétel a GnRH-III(⁴Lys(iBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)), ami a többi vegyülettel szemben jóval gyorsabban lebomlott a kimotripszin hatására. A többi vegyület esetében azt tapasztalták, hogy a lánchossz növekedésével növekszik a kimotripszinnel szemben mutatott

enzimstabilitás mértéke. Például a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) származéknak csupán a 36%-a bomlott el 6 óra elteltével (24 óra alatt azonban teljesen degradáció következett be). A telítetlen krotonsav tartalmú GnRH-III(⁴Lys(CA), ⁸Lys(Dau=Aoa)) azonban kevésbé bizonyult stabilnak, annak ellenére, hogy szintén 4 szénatomos a lánc hossza, akárcsak a vajsavval módosított származék esetében. A krotonsav tartalmú származéknak 6 óra után már az 50%-a degradálódott, 24 óra elteltével pedig teljes mértékben végbement. Ennél stabilabbnak bizonyult az izovaleriánsavval acilezett származék, 6 óra elteltével mindössze 34%-a bomlott el, azonban 24 óra után ez a vegyület is teljesen elbomlott. A legnagyobb stabilitást a kapronsavval acilezett származék mutatta, 6 óra alatt csak a 30%-a degradálódott, és 24 óra elteltével is 10%-ban kimutatható maradt. Ezek alapján egyértelmű, hogy a GnRH-III 4-es helyzetű lizin ε-aminocsoportjának SCFA-kal történő acilezése növeli a konjugátumok kimotripszinnel szembeni enzimstabilitását.

A vegyületek sejtbejutását és *in vitro* citosztatikus hatását MCF-7 humán emlő adenokarcinóma-, és HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken vizsgálták. A tapasztalatok szerint leghatékonyabban az izovajsavval és a vajsavval acilezett származékok jutottak a sejtekbe, mindkét sejtípus esetén. Ez magyarázhatja a vegyületek vizsgálata során tapasztalt megnövekedett *in vitro* antiproliferatív hatást. Az izovajsavval és vajsavval acilezett származék antiproliferatív hatása hasonló volt, ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy mindkét zsírsav képes apoptózis indukálására, valamint a sejtproliferáció akadályozására HT-29 sejtek esetében.³⁴

Mindezt összegezve elmondható, hogy helytálló az a feltételezés, mely szerint a GnRH-III 4-es helyzetű lizin ε-aminocsoportjának SCFA-kal történő acilezésének következtében fokozható a vizsgált biokonjugátumok hatékonysága az irányított tumorterápiában. Az eredmények alapján ez különösen igaz a vajsavval és izovajsavval acilezett változatokra.

2. Célkitűzések

A dolgozatban bemutatott munka célja olyan GnRH – hatóanyag konjugátumok előállítása és vizsgálata volt, melyben az irányítómolekula szerepét 4-es (vajsavval acilezett lizin) és 6-os (aminooxiacetilezett *D*-lizin) helyzetben módosított GnRH-I és GnRH-II származékok töltik be, hatóanyagként pedig oxim-kötésben daunorubicin szerepel.

Az előállítandó analógokat az alapján terveztük meg, hogy a korábbi eredmények (1.5.2. fejezet) szerint a GnRH-III esetén a ⁴Ser – ⁴Lys csere, illetve a szóban forgó lizin ε-aminocsoportjának különböző rövid szénláncú karbonsavakkal való acilezése nagymértékben növelte a konjugátum enzimestabilitását, valamint tumorelles hatását. Ezek az eredmények a vajsav alkalmazása során voltak a legjobbak, így a tervezett és vizsgálni kívánt GnRH analógokat is vajsavval terveztünk módosítani és vizsgálni. Kíváncsiak voltunk ugyanis, hogy ez a módosítás a GnRH-I- illetve a GnRH-II-származékok esetében is hasonlóan pozitívan befolyásolja-e a konjugátumok tumorelles hatását.

A tervezett vegyületek szintézise és vizsgálata:

1. 4-es helyzetben vajsavval módosított GnRH-I és GnRH-II

1. GnRH-I(⁴Lys(nBu), ⁶*D*-Lys(Aoa))
Glp-His-Trp-Lys(nBu)-Tyr-*D*-Lys(Aoa)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂
2. GnRH-II(⁴Lys(nBu), ⁶*D*-Lys(Aoa))
Glp-His-Trp-Lys(nBu)-His-*D*-Lys(Aoa)-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂

2. Az előállított analógok konjugálása daunorubicinhez oxim-kötéssel.

3. Az előállított konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata HT-29 sejteken MTT-teszttel (sejt proliferációs teszt), és az eredmények összehasonlítása a szabad hatóanyag és a korábban előállított vegyületek hatásával.

3. Alkalmazott módszerek

A fejezetben bemutatom a konjugátumok előállítása során alkalmazott szintetikus és analitikai módszereket.

3.1 Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS)

A peptidek szintetikus előállítására két módszer ismeretes: oldatfázisú, valamint szilárdfázisú szintézis (SPPS). A SPPS módszerének kifejlesztése Bruce Merrifield nevéhez fűződik, munkáját 1984-ben Nobel díjjal jutalmazták.³⁹A SPPS-nek két típusát különböztethetjük meg. A konvergens (CSPPS) és a lépésenkénti (stepwise) szintézis. A CSPPS esetében védett, vagy részben védett fragmenseket kapcsolnak össze szilárd hordozón. Munkám során szilárd hordozón lépésenkénti szintézissel állítottam elő az egyes GnRH-analógokat.

3.1.1 Lépésenkénti (stepwise) szilárdfázisú peptidszintézis

A módszer alapelve, hogy a peptidlánc felépítése lépésenként történik, miközben a lánc egyik vége egy oldhatatlan, funkciós csoportokkal vagy funkcionizált linkerekkel rendelkező polimer hordozóhoz van rögzítve, kovalens kötéssel. A kialakított hordozó-peptid egység így egy szűrő közbeiktatásával és mosással könnyen megszabadítható a reagens feleslegtől, illetve a menet közben keletkezett melléktermékektől, míg oldatfázisú szintézis esetén ehhez kristályosításra és extrakcióra lenne szükség. További előny, hogy a lánc növekedése során jelentkező oldékonyság csökkenés is kiküszöbölésre kerül. A technika hátránya, hogy a kész peptid tisztítására és izolálására csak a szintézis végeztével nyílik lehetőség, ezért nagyon fontos, hogy az egyes kapcsolások hozama közel 100%-os legyen. Ennek érdekében az aminosavszármazékokból és a kapcsolószerekből egyaránt 3-10 ekvivalens felesleget alkalmazunk a gyantakapacitáshoz mérten, emiatt azonban pazarló és drága a módszer. Ekkora feleslegek alkalmazásánál az is gondot okozhat, hogy az aminosavak α -aminocsoportjánál kevésbé nukleofil oldallánc funkciós csoportok is reagálhatnak. Ennek kiküszöbölésére olyan aminosavszármazékokat alkalmazunk, melyeknek oldalláncaikon található funkciós csoportjaik állandó védőcsoporttal vannak ellátva. Az aminosavak az állandó védőcsoportok mellett tartalmaznak egy átmeneti védőcsoportot is, mely az α -aminocsoport védelmére szolgál, hogy az épp beépítendő, aktivált aminosav-molekulák egymással ne alakítsanak ki peptidkötést.

A szintézis C → N terminális irányban történik. Az aminosavak kapcsolása során az első lépés a már szilárd hordozón levő aminosav α-aminocsoport védőcsoportjának szelektív eltávolítása, ezt követi a karboxilcsoportján aktivált (és α-aminocsoportján védett) aminosavszármazék beépítése. Ez a ciklus ismétlődik mindaddig, amíg meg nem kapjuk a kívánt szekvenciát. Ezt követően lehasítjuk a gyantáról a peptidet, lehetőleg az oldalláncon lévő funkciós csoportok védőcsoportjaival együtt.

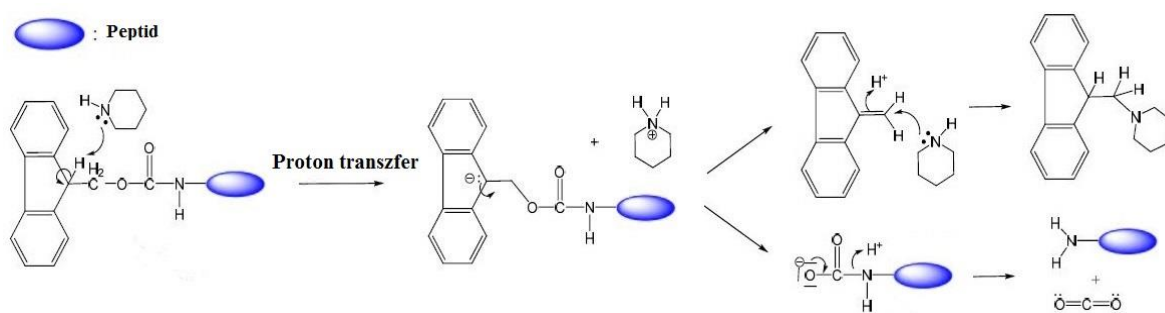
3.1.2 A lépésenkénti SPPS általánosan alkalmazott stratégiái

1. Fmoc/^tBu: Az α-aminocsoport védelme 9-flourenil-metil-oxikarbonil-csoporttal történik, míg az oldalláncon védőcsoportjai ^tBu-típusúak
2. Boc/Bzl: Az α-aminocsoport védelme terc-butiloxikarbonil-csoporttal történik, az oldalláncon védőcsoportjai pedig benzil-típusúak

Utóbbi stratégia hátránya, hogy savérzékeny aminosavakat (Cys, Met, Tyr, Trp) tartalmazó peptidek szintézisére kevésbé alkalmas, mivel az oldalláncon állandó védőcsoportjai, illetve az α-aminocsoport átmeneti védőcsoportja egyaránt különböző erősségű savak hatására hasadnak, az említett aminosavak ilyen körülmények között könnyen oxidálódnak, alkileződnek. Mivel az általam előállítani kívánt GnRH-analógok triptofánt és tirozint egyaránt tartalmaznak, a választás az Fmoc/^tBu stratégiára esett, így ezt mutatom be részletesebben.

3.1.2.1 Az Fmoc/^tBu stratégia

Ahogy azt az előző fejezetben már említettem, az aminosavszármazékok α-aminocsoportjainak védelmét Fmoc (9-flourenil-metil-oxikarbonil) csoport biztosítja. Hasítása bázisokkal (főleg szerves szekunder aminokkal) lehetséges, mint például a piperidin (5. ábra). A munkám során alkalmazott hasítóelegy 2% piperidin – 2% DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undek-7-én) / DMF elegye volt.

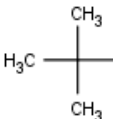
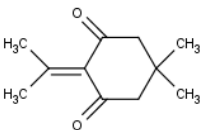
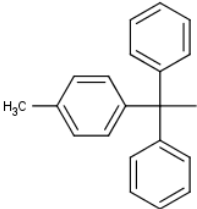
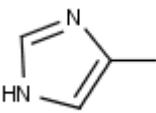
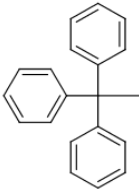
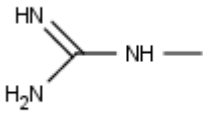
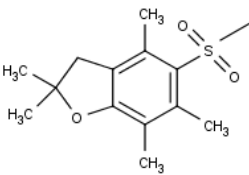


5. ábra: Az Fmoc hasításának a mechanizmusa

Az Fmoc csoport savakkal szemben stabil. Az aminosavak oldalláncain található funkciós csoportokat főleg ^tBu és Trt típusú csoportok védik. Az állandó oldallánc védőcsoportok hasítása külön lépést nem igényel, azokat a kész peptid gyantáról való hasításával egyidejűleg távolítjuk el. A gyantáról való hasítást trifluorecetsav (TFA) 80-95%-os oldatával végezzük, ami enyhébb, kedvező körülményeket biztosít a savas körülmények között oxidációra és alkileződésre hajlamos aminosavak számára. További reagensként kationfogók alkalmazása is szükséges, a keletkező reaktív karbokationok ártalmatlanításának céljából. Mivel a peptid hidrolízise ilyen körülmények között nem következik be, ezért a ^tBu-kationok befogására alkalmazhatunk vizet.

Az általam felhasznált aminosavak védőcsoportjait az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat: A felhasznált aminosavak védőcsoportjai

Védendő funkciós csoport	Aminosav	Védőcsoport	
		Képlete	Neve
-OH	Tyr, (Ser, Thr)		Terc-butil (^t Bu)
- ^ε NH ₂	Lys		1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciklohex-1-ilidén)etil (Dde)
			4-metil-tritil (Mtt)
	His		Tritil (Trt)
	Arg		2,2,4,6,7-pentametildihidro-benzofurán-5-szulfonil (Pbf)

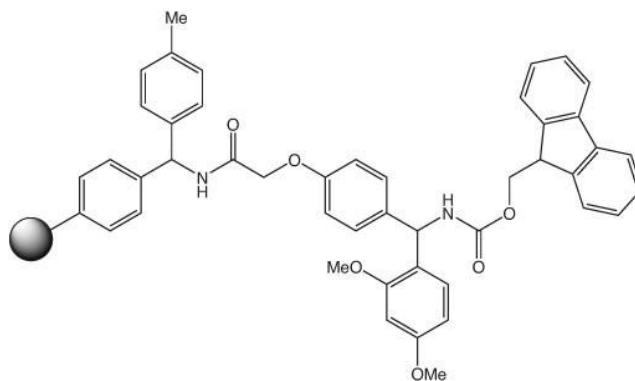
3.1.3 A szilárd fázis

A szilárd hordozó szerepét nagyon finom szemcséjű (akár 10 millió szemcse/g), úgynevezett polimer gyanták töltik be, melyek legtöbbször sztírol-divinil-benzol kopolimerek. A szemcsék felülete, illetve belseje olyan funkciós csoportokkal (linkerekkel) van ellátva, melyeken keresztül különféle vegyületeket (pl.: aminosavakat) kapcsolhatunk hozzájuk kovalens kötéssel. A gyanták lényeges jellemzője a gyantakapacitás, ami azt adja meg, hogy 1 g gyanta hány mmol aminosav megkötésére képes (gyantakapacitás: mmol/g).

A gyantáknak az alábbi követelményeknek kell eleget tenniük:

- funkcionizálható legyen, hogy az első aminosav felkapcsolása megvalósulhasson
- kémiai stabilitás (inert legyen a szintézis során alkalmazott összes vegyülettel szemben)
- mechanikai stabilitás (ne töredezzon keverés hatására)
- jól duzzadjon a szintézis során alkalmazott oldószerben, növelve ezzel a hozzáférhetőséget
- peptid-gyanta kötés stabil legyen a szintézis alatt
- peptid-gyanta kötés hatékonyan hasítható legyen a szintézis végeztével
- szennyezőktől mentes legyen

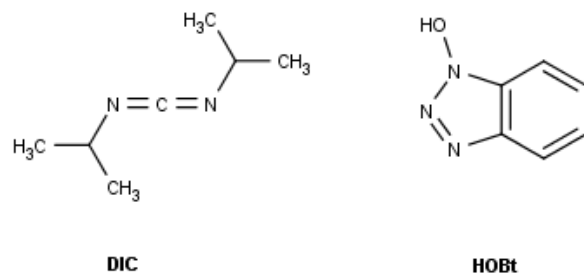
Az Fmoc/^tBu stratégia alkalmazása során savmentes körülményeket alkalmazunk, így erre a célra olyan gyantákat fejlesztettek ki, melyekről már gyenge savakkal is hatékonyan eltávolítható a kész peptidlánc. Alapvetően két nagy csoportba sorolhatjuk ezeket a gyantákat: amelyek hasítás után a C-terminálison szabad karboxilcsoportot eredményeznek (1), mint például a Wang-, vagy a 2-klórritil gyanta, illetve amelyek amid terminálist eredményeznek (2), mint például a BHA-, Rink-amid-, vagy a nagyobb savstabilitással rendelkező, a szintézisek során általam is használt Rink-amid MBHA gyanta (6. ábra).



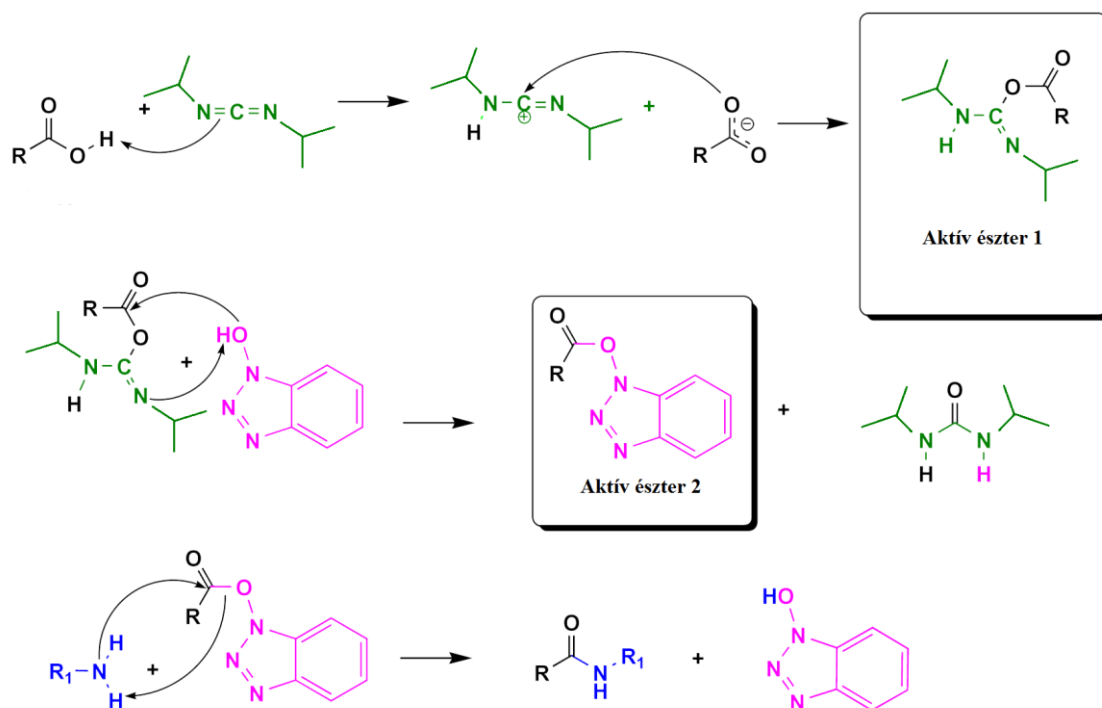
6. ábra: Rink-Amid MBHA gyanta

3.1.4 Kapcsolási eljárások

Minden egyes kapcsolás során a gyantához kötött szabad N-terminálisú aminosav, és az α -aminocsoportján védett, karboxilcsoportján pedig aktivált aminosavszármazék közötti peptidkötés kialakítása a cél. Az aktiválásnak és a kapcsolásnak legelterjedtebb változata az *in situ* aktív észteres kapcsolás, mely során kapcsolóreagensként DIC (*N,N'*-diizopropilkarbodiimid) és HOBt (1-hidroxibenzotriazol) elegyét alkalmazzák DMF-ban oldva (7. és 8. ábra).



7. ábra: *In situ* aktív észteres kapcsolás során alkalmazott kapcsolószerek

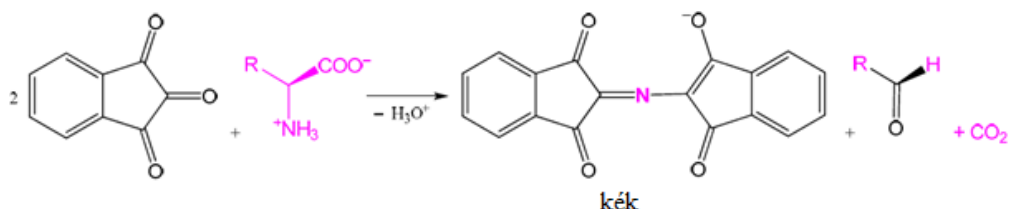


8. ábra: Az *in situ* aktív észteres kapcsolás mechanizmusa

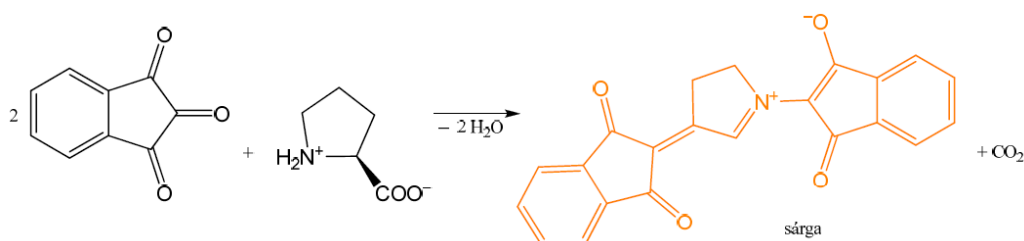
3.1.5 A kapcsolás sikerességének ellenőrzése

A kapcsolások végbemenetelét az ún. Kaiser-teszttel (ninhidrin teszt) ellenőrizhetjük. Az eljárás lényege, hogy a ninhidrin az α -aminosavakat először iminosavakká dehidrogénezi, ezek hidrolízis és dekarboxileződés útján ammóniává, széndioxiddá és aldehiddé bomlanak,

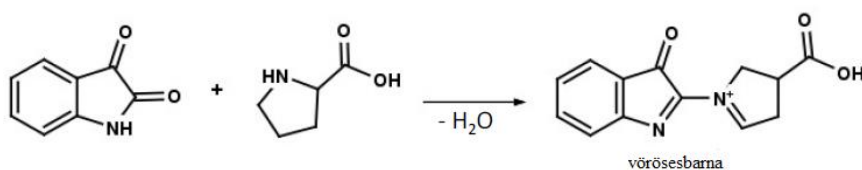
végül az ammónia a ninhidrin redukciós termékével és változatlan ninhidrinnel kékes-ibolya színű anyaggá kondenzálódik (9. ábra). Ez azonban csak α -aminosavak esetén pozitív, így Pro (iminosav) esetén nem használható. A reakció ugyan lejátszódik, de nincs színváltozás (10. ábra).⁴⁵ Ebben az esetben ninhidrin helyett izatin alkalmazása szükséges, amely a Pro-nal reagálva vörösesbarna színreakciót ad (11. ábra). A Kaiser-teszt rendkívül érzékeny, akár már 1% szabad aminos csoport jelenlétében is erősen elszíneződik.



9. ábra: Kaiser-teszt



10. ábra: A ninhidrin és a prolin reakciója



11. ábra: Az izatin és a prolin reakciója

3.1.6 Peptidek hasítása a szilárd hordozóról

A szilárdfázisú szintézis záró lépése a peptid gyantáról való lehasítása. Ennek végrehajtása Fmoc/^tBu stratégia esetén trifluorecetsav (TFA) 80-95%-os oldatával történik, és a gyantáról való lehasadás mellett a peptidet felépítő aminosavak savérzékeny, állandó védőcsoportjai is lehasadnak. Eközben azonban nagyon reaktív karbokationok is keletkeznek, így szükségessé válik kationfogók alkalmazása is.

3.2 A peptidek tisztítására és jellemzésére használt technikák

3.2.1 Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

Az egyik legelterjedtebb módszer a peptidkémia területén az analitikai és preparatív elválasztására a normál és fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia. A

normál (NP-HPLC) és a fordított fázisú (RP-HPLC) változat az álló (stationer) és a mozgó (mobil) fázis polaritás viszonyaiban különbözik egymástól. Abban az esetben, ha az álló fázis az áramló fázisnál apolárisabb, akkor fordított fázisú, míg a poláris álló fázishoz képest apolárisabb mozgó fázis alkalmazása esetén normál fázisú folyadékkromatográfiáról beszélünk. Ez alapján az NP-HPLC esetében mozgófázisként apoláris oldószereket (pl.: hexán, diklórmétán), RP-HPLC alkalmazása során pedig vizes alapú, metanolt, etanolt, acetonitrilt, acetont tartalmazó oldószereket, illetve ezekből álló elegyeket használnak. A normál fázisú változat főként apoláris, hidrofób, valamint kevésbé poláris funkciók csoportokkal rendelkező vegyületeket tartalmazó minták elválasztására használható. Ekkor az elválasztást elsődlegesen a stationer fázis és a minta közötti kölcsönhatás szabja meg. A fordított fázisú folyadékkromatográfia ezzel szemben olyan vegyületek szeparálására alkalmas, melyek poláris funkciók csoportokat tartalmaznak. Ez esetben az elválasztásra inkább az áramló fázis tulajdonságai (polaritás, oldószer elegyek, adalékok) vannak hatással, a töltet-minta közötti kölcsönhatás ebből a szempontból kevésbé meghatározó.

A mozgó fázis, eluens adagolása kényszeráramlás létrehozásával történik, amihez nagy nyomású pumparendszer (5-40 MPa) használatos. Az elúciós elválasztás kifejlesztése két módon lehetséges:

- Izokratikus elúció: az eluens összetétele az elválasztás ideje alatt állandó
- Gradiens elúció: az eluens összetétele/tulajdonságai az elválasztás során lépcsőzetesen, vagy valamely függvény szerint (pl.: lineáris, konvex, konkáv, exponenciális) változnak

A HPLC-s eljárások az oszlop méretétől függően egyaránt alkalmazhatók analitikai vizsgálatokra, illetve szemi-preparatív és preparatív tisztításra.⁴⁰

Munkám során az előállított peptidek, illetve konjugátumok tisztítására az RP-HPLC módszerét alkalmaztam.

3.2.2 Tömegspektrometria (mass spectrometry, MS)

A tömegspektrometria széles körben alkalmazott analitikai eljárás. A tömegspektrométerben a vizsgálandó komponens a szerkezeti sajátosságainak megfelelően fragmentálódik és részben ionizálódik. Az így kialakult gázfázisú pozitív vagy negatív töltésű ionok relatív tömeg (m)/töltés (z) szerint szeparálódnak, és a detektorban intenzitásukkal arányos jelet adnak. Így kapjuk meg a tömegspektrumot, amely az analitikai információt szolgáltatja, ebből válik meghatározhatóvá a vizsgált molekula tömege.

Számos ionizációs módszer ismeretes, mint például az elektronütközéses ionizáció (elektronionizáció, EI), ahol nagy sebességű elektronokkal páratlan elektronszámú pozitív töltéssel rendelkező, instabil gyökionokat (molekulaionokat) hoznak létre, melyek gyorsan fragmentálódnak. Az ún. „lágy” ionizációs módszerek alkalmazása során egyszeresen vagy többszörösen protonált/deprotonált/kationizált ion keletkezik, amelyet kvázi molekulaionnak neveznek. Ez páros elektronszáma következtében lényegesen stabilabb, a fragmentáció így nem vagy csak kis mértékben játszódik le. Az általam szintetizált vegyületek vizsgálata elektropray ionizációs tömegspektrométerrel (ESI-MS), Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus típusú berendezéssel történt. Az elektroporlasztásos ionizáció során a mintaoldat porlasztása légköri nyomáson, elektromos áram segítségével zajlik. Ehhez a mintaoldatot egy fém kapillárison vezetik keresztül. A porlasztást a kapillárisra kapcsolt nagyfeszültség (2-5 kV) és a porlasztógáz végzi.⁴¹

4. Eredmények

Munkám során olyan, az irányított tumorterápiában alkalmazható vegyületeket állítottam elő, amelyekben az irányítómolekula szerepét GnRH analóg tölti be, a hatóanyag pedig a daunorubicin. A hordozó molekulához a hatóanyag aminooxiacetil részleten keresztül, oxim-kötéssel kapcsolódik.

A konjugátumok szintézise, tisztítása és vizsgálata az alábbiak szerint történt:

- GnRH-analógok előállítása szilárdfázisú peptidszintézissel
- Antiproliferatív hatású vegyület (daunorubicin) konjugálása a peptidekhez
- A konjugátumok tisztítása és jellemzése
- A vegyületek *in vitro* biológiai vizsgálata

A peptidek szintézise szilárd fázison történt manuálisan, melynek során az Fmoc/^tBu stratégiát alkalmaztam.

A vajsav, valamint az aminooxiacetsav beépítése amid-kötés kialakításával zajlott, a láncban található lizinek ε-aminocsoportjain keresztül. A daunorubicin kapcsolásához szükséges oxim-kötést a Dau 13-as számú szénatomja és a 6-os pozícióban levő *D*-lizinhez kapcsolt aminooxiacetsav aminooxi-csoportja között hoztam létre.

4.1 Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és daunorubicin-GnRH-II konjugátumok szintézise, valamint *in vitro* biológiai vizsgálata

Az 1.3.2.3. fejezetben tárgyaltak szerint a GnRH-III peptidhormon 4-es helyzetben található szerin aminosava nincs hatással sem az endokrin aktivitásra, sem a tumorellenes hatás kifejtésére, sem a receptorhoz való kötődésre. A különböző GnRH analógokban a 4-es helyzetű szerin körüli kötések az emésztő enzimek (pl.: α-kimotripszin) elsődleges hasítási helyei.³¹ A molekulák enzimstabilitása fokozható, ha 4-es helyzetben levő szerint *N*-Me-Ser vagy Lys(Ac) váltja fel²⁸, s amely csere a gyógyszermolekulák antiproliferatív hatására nincs befolyással. A vegyületek megnövekedett enzimstabilitása főként szájon át történő adagolás esetén jelentős. Ennek következtében ezen aminosav cseréje lehetőséget biztosít a GnRH-alapú gyógyszermolekulák továbbfejlesztésére.

Az eddigi kutatások eredményei szerint (1.5.2. fejezet) a rövid szénláncú zsírsavak (leginkább a vajsav) beépítése a célzott tumorterápiában használatos hatóanyag hordozó molekulákba hozzájárul a tumorelles hatás növeléséhez.³⁶ Ezeket az eredményeket figyelembe véve olyan daunorubicin-GnRH-I és daunorubicin-GnRH-II biokonjugátumok szintézisét terveztük, amelyekben a hordozó szerepét betöltő GnRH-I és GnRH-II szekvenciájában a 4-es pozícióban levő szerint lizin váltja fel, melynek oldalláncát vajsavval acilezzük. Ezzel a módosítással azt szeretttük volna megvizsgálni, hogy az I-es és II-es típusú GnRH esetén is növekedik-e a hatékonyság a vajsav daunorubicin tartalmú konjugátumokba való beépítésével.

A konjugátumok szintézisét, tisztítását, és analitikai jellemzését követően MTT-teszt alkalmazásával megvizsgáltuk azok *in vitro* citosztatikus hatását.

4.1.1 GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok szintézise

A konjugátumok szintézise során először előállítottam a 4-es helyzetben vajsavval, 6-os helyzetben aminooxiacetsavval acilezett GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) analógokat, ezt követően pedig oxim-kötés kialakításával kapcsoltam hozzájuk a hatóanyagot (daunorubicin).

Az oxim-kötés kialakítása azért kedvező, mert az aminooxi- és karbonilcsoport nagy kemoselektivitással reagálnak.^{26,42} Az aminooxiacetyl-csoporttal rendelkező peptidok azonban érzékenységből kifolyólag számos mellékreakcióra hajlamosak, ami miatt a velük való munka nagy körültekintést igényel. Ezek közül az egyik ilyen reakció például az NH-O részlet *N*-túlacileződése a Boc-aminooxiacetsav beépítése, vagy a peptidlánc további szintézise folyamán. Ennek kivédésére többféle módszer is alkalmazható:

- a karbodiimid származékkal való acilezés alkalmával nélkülözzük a bázis használatát
- Boc-védőcsoporttal ellátott aminooxiacetsavat használunk acilezésre, *in situ* aktív észteres kapcsolással
- nagy feleslegben alkalmazzuk a Boc-Aoa-OH-t, rövid reakcióidővel

További problémát okozhat az aminooxi-csoport ketonokkal és aldehidekkel szembeni nagymértékű reaktivitása, aminek következtében még a mosogatás után visszamaradt nyomnyi acetonnal vagy a műanyagokban lágyítóként használt formaldehiddel is el tudnak reagálni. Ez a mellékreakció a szintézistől kezdve (hasítás, ligáció) a tisztításon át egészen a

liofilizált tiszta termékkel való munka során bármikor lejátszódhat. Ezen probléma kiküszöbölésére a kutatócsoportban az aminosav-acetilezett peptidek hasításakor nagy feleslegben alkalmazunk szabad állapotú aminosavakat a hasítóelegyben, mely karbonil befogó funkcióval rendelkezik.⁴³ A tapasztalatok szerint ezek a körülmények alkalmasak a mellékreakciók nagymértékű visszaszorítására, és a hasított peptid hónapokig eltartható +4°C-os hőmérsékleten is. Így nem szükséges acetonmentes körülményeket alkalmaznunk, mint például az argon- vagy nitrogénatmoszféra, vagy a frissen desztillált dietil-éter a peptidek kicsapásához a gyantáról való hasítás után.

4.1.1.1 GnRH-I(⁴Lys(nBu), *D*-⁶Lys(Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), *D*-⁶Lys(Aoa)) analógok szintézise

A 4-es helyzetben vajsavval acilezett, 6-os helyzetben glicin helyett *D*-lizint tartalmazó és aminosav-acetilezett GnRH-I és GnRH-II származékokat manuálisan állítottam elő szilárdfázisú peptidszintézissel, melynek során Fmoc/^tBu stratégiát alkalmaztam. Szilárd hordozóként Rink-Amid MBHA gyantát használtam. Mivel a tervezett módosítások egy szekvencián belül két különböző helyzetű lizint érintettek, szükségessé vált az említett aminosavak ortogonális védelmének alkalmazása. Ennek értelmében a 4-es és a 6-os helyzetű lizin beépítéskor egymástól eltérő mechanizmus szerint (pl.: sav – bázis, sav – hidrogénezés) hasadó oldallánc-védőcsoportokkal ellátott származékokat választottam. Ennek köszönhetően lehetőségem nyílt a védőcsoportok szelektív lehasítására. A 4-es pozícióba Fmoc-Lys(Dde)-OH, míg a 6-os helyzetbe Fmoc-*D*-Lys(Mtt)-OH származék került beépítésre. A Dde-védőcsoport lehasítását 2% hidrazin-hidrát/DMF (tf%) oldatával végeztem, majd az így szabaddá vált ε-NH₂ csoportot vajsavval acileztem. Az Mtt védőcsoportot 2% TFA/DMF (tf%) oldatával távolítottam el. Ilyen töménységű trifluorecetsav alkalmazása a peptid-gyanta közötti kötésre nincs számottevő hatással, így a peptid gyantáról való lehasadásával nem kell számolni. A védőcsoport lehasítását követően a Boc-Aoa-OH-t építettem be, HOBt és DIC kapcsolóreagensek segítségével.

A vajsavval és aminosav-acetilezett *D*-lizinnel módosított GnRH-I és GnRH-II származékokat trifluorecetsavval távolítottam el a szilárd fázisról, megfelelő kationfogók hozzáadásával (5.2.1.1. fejezet).

A GnRH-I és GnRH-II analógok szintézisét bemutató sematikus ábrák:

Glp-His(Trt)-Trp-**Lys**(Dde)-Tyr(tBu)-**D-Lys**(Mtt)-Leu-Arg(Pbf)-Pro-Gly- gyanta

- ↓
1. Dde hasítása: 2% hidrazin-hidrát/DMF
 2. Vajsav kapcsolása: vajsav-anhidrid, DIEA/DMF

Glp-His(Trt)-Trp-**Lys**(nBu)-Tyr(tBu)-**D-Lys**(Mtt)-Leu-Arg(Pbf)-Pro-Gly- gyanta

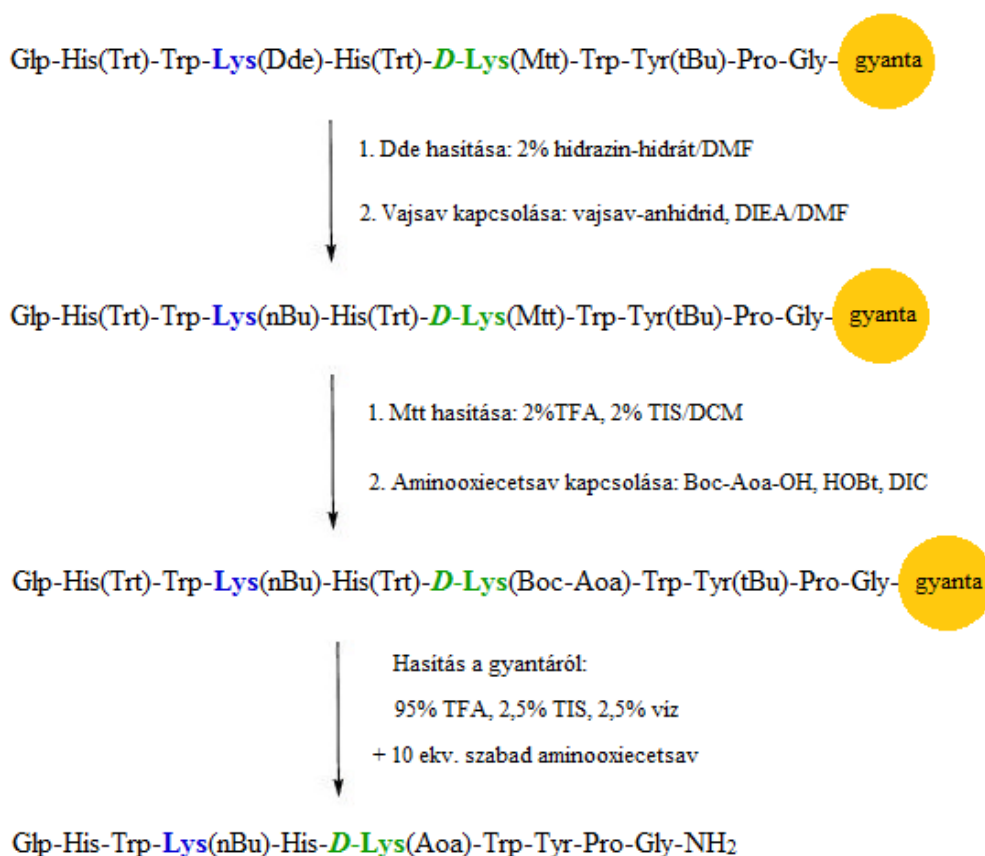
- ↓
1. Mtt hasítása: 2%TFA, 2% TIS/DCM
 2. Aminooxiecetsav kapcsolása: Boc-Aoa-OH, HOBt, DIC

Glp-His(Trt)-Trp-**Lys**(nBu)-Tyr(tBu)-**D-Lys**(Boc-Aoa)-Leu-Arg(Pbf)-Pro-Gly- gyanta

- ↓
- Hasítás a gyantáról:
- 95% TFA, 2,5% TIS, 2,5% víz
- + 10 ekv. szabad aminooxiecetsav

Glp-His-Trp-**Lys**(nBu)-Tyr-**D-Lys**(Aoa)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

12. ábra: A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) peptid szintézise



13. ábra: A GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) peptid szintézise

A nyers peptidek tisztítását RP-HPLC alkalmazásával végeztem, a tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem. A termékek azonosítása ESI-MS segítségével történt. Az analízisekhez szükséges mintákat az analitikai RP-HPLC-vel nyertem, amelyeket a vizsgálatok elvégzése előtt liofilizáltam. Az előállított peptidek analitikai jellemzését a 2. táblázat tartalmazza. Pontos hozam számolására nem volt lehetőségem, mert a peptid érzékenysége miatt azokat a tisztítás után izolálás nélkül az oldószer bepárlását követően azonnal felhasználtam a konjugálási reakcióhoz. Ezen kívül néhány egyéb oka is van a pontos termelési adatok hiányának. Az egyik ilyen ok, hogy a liofilizált termékek vizet és TFA-t kötnek meg, ami valótlan tömegértékeket eredményez, így a hozam meghatározása a tömegadatokból nem lehetséges. Másrészt pedig, a szintézisek során alkalmazott Kaiser-teszt miatt csökken a kiindulási gyanta mennyisége, ezért az eredeti mennyiségből számolva nem kapnánk a valóságnak megfelelő adatokat.

2. táblázat: Az előállított peptidek analitikai jellemzése

	RP-HPLC t_R / perc	ESI-MS $MW_{\text{számolt}}/MW_{\text{mért}}$
GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa))	23,9	1438,0 / 1437,0
GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa))	24,5	1491,0 / 1491,4

Az analízis körülményeit a kísérleti részben (5.2.1.1.) ismertetem.

4.1.1.2 GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) konjugálása daunorubicinhez

A hatóanyag konjugálását a peptidekben lévő aminooxiacetyl-csoport és a daunorubicin 13-as számú C-atomján található oxocsoport közötti reakcióval hajtottam végre. A reakciót enyhén savas körülmények között hajtottam végre, 0,2 M-os ammónium-acetát pufferben (pH = 5,0), folyamatos kevertetés közben, 16 órás reakcióidővel. A vegyület tisztítását preparatív RP-HPLC segítségével végeztem, az analízise pedig analitikai RP-HPLC-vel, valamint tömegspektrométerrel történt.

A folyadékkromatográfiás vizsgálat során kiderült, hogy az oxim-kötés kialakítása csaknem teljes mértékben végbement, a terméket csak a feleslegként visszamaradt szabad daunorubicintől kellett megtisztítani.

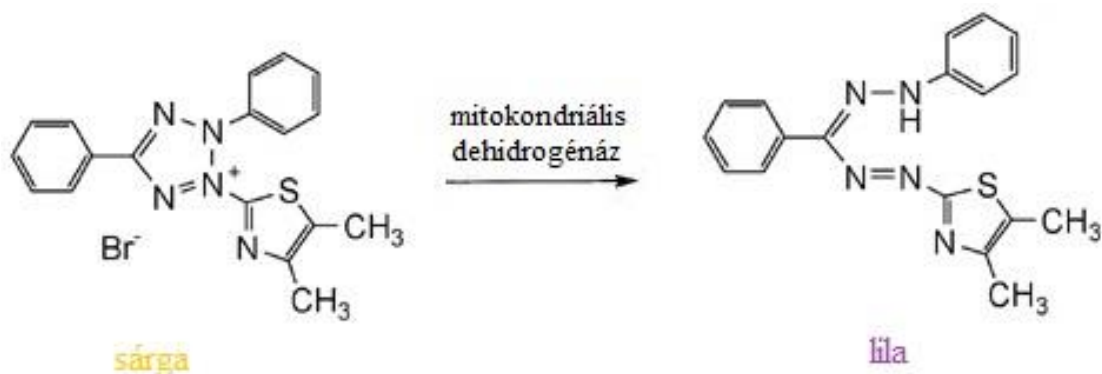
3. táblázat: Az előállított konjugátumok analitikai jellemzése

	RP-HPLC t_R / perc	ESI-MS $MW_{\text{számolt}}/MW_{\text{mért}}$
GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa))	27,0	1946,9 / 1947,0
GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa))	27,5	2001,4 / 2000,8

Az analízis körülményeit a kísérleti részben (5.2.1.2.) ismertetem.

4.1.1.3 A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata MTT-tesztel

Az MTT-teszt (sejtprolifrációs teszt) alkalmazása során a sejtek életképességét, valamint proliferációját vizsgáljuk. A módszer alapja a sárga színű MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) alkalmazása, amelyet a metabolikusan aktív sejtek endocitózis útján felvesznek, s lila színű formazán származékká redukálnak (14. ábra). A folyamat tehát csakis élő sejtekben megy végbe, amelyet a mitokondriális dehidrogénáz enzim katalizál. A vizsgált vegyület, konjugátum hatékonysága úgy határozható meg, hogy összehasonlítjuk a hatóanyaggal kezelt, valamint a kezeltlen (kontroll) sejtekben képződött lila formazán származék mennyiségeket egymással. Ebből az összehasonlításból következtethetünk az okozott sejthalál mértékre.



14. ábra: Az MTT átalakulása

A teszt alkalmazásával az előállított konjugátumok citosztatikus hatását vizsgáljuk. Azokat a vegyületeket nevezzük citosztatikusnak, amelyekkel kezelve a sejteket, megváltoztatják azok proliferációját. A citosztatikus hatás az adott molekulára jellemző adat, valamint nagyban függ a kezelt sejt típusától is.

A vegyületek *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 sejteken vizsgáltuk 6 órás kezelést alkalmazva, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport sejtlaborjában. A kezelés után a sejteket további 72 órán keresztül kultúrában tartottuk, ezt követően pedig meghatároztuk a konjugátumok sejtprolifrációra gyakorolt hatását. A teszt során kapott eredményeket összehasonlítottuk a kutatócsoportban korábban előállított vajsav nélküli GnRH-I(D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(D-⁶Lys(Dau=Aoa)) mérése során nyert adatokkal (4. táblázat). A GnRH-II-t tartalmazó konjugátum esetében a módosítás következtében jelentősen nőtt az *in*

vitro citosztatikus hatás. Ezzel szemben a vajsavval módosított GnRH-I alapú konjugátum nem ért el számottevő hatásnövekedést.

4. táblázat: Az előállított GnRH-I és GnRH-II konjugátumok IC₅₀ értékének összehasonlítása korábban szintetizált vegyületek értékeivel

Biokonjugátum	Citosztázis (HT-29) IC ₅₀ / μ M
GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa))	16,9 $\pm$ 3,3
GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa))	3,5 $\pm$ 0,2
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa))	2,0 $\pm$ 0,6
GnRH-I(D- ⁶ Lys(Dau=Aoa))	20,2 $\pm$ 5,0
GnRH-II(D- ⁶ Lys(Dau=Aoa))	19,3 $\pm$ 3,1
Dau·HCl	0,1 $\pm$ 0,0

Lényeges továbbá, hogy a végrehajtott módosítás a GnRH-III alapú származékok esetén a citosztatikus hatás mellett növelte a konjugátumok enzimstabilitását is. Mivel a GnRH-I típusú konjugátum esetében ez a változtatás nincs negatív hatással a citosztatikus hatásra, az enzimstabilitás növelése érdekében mindenképp célszerű továbbra is alkalmazni a módosítást, más GnRH-I származékok előállítása során is. A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) vegyület hatása mindkét általam előállított konjugátum hatásánál jobbnak bizonyult. A különbséget valószínűleg a keletkező, eltérő metabolitok okozzák. Így a további célok között szerepel olyan enzimes reakciók elvégzése, melyek során a keletkező metabolitok kerülnek meghatározásra, s amelyek magyarázatot adhatnak a kapott eredményekre.

5. Kísérleti rész

5.1 A szintézisek során alkalmazott általános eljárások

5.1.1 A szilárdfázisú szintézisek során alkalmazott Fmoc/^tBu stratégia

A dolgozatban szereplő peptideket a szilárdfázisú peptidszintézis Fmoc/^tBu stratégiájával állítottam elő, melynek protokollját az alábbi táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat: Az Fmoc/^tBu stratégia protokollja

	Reagens	Idő / ismétlésszám x perc
Mosás	DMF	3x0,5-1
Fmoc védőcsoport hasítása	2% piperidin-2% DBU/DMF	2x2
		1x5
		1x10
Mosás	DMF	8x0,5-1
Kapcsolás	3 ekv. Fmoc-Aaa-OH + 3 ekv. DIC/HOBt (DMF)	1x60
Mosás	DMF	3x0,5-1
Mosás	DCM	2x0,5-1
Kaiser-teszt	Ninhidrin oldat + fenol oldat + KCN oldat	1x5
	(+ izatin oldat prolinhoz történő kapcsolás esetén)	

5.1.2 A kapcsolás végbemenetelének ellenőrzése (Kaiser-teszt)

A szilárdfázisú szintézis során előfordulhat, hogy az adott kapcsolás nem játszódik le megfelelően, ezért a reakcióidő leteltével ellenőrizzük annak végbemenetelét. Erre szolgál a ninhidrin-teszt, illetve prolin esetében az izatin teszt.

A tesztekhez az alábbi oldatokra van szükség:

- Ninhidrin oldat: 2,5 g ninhidrin 50 cm³ absz. etanolban oldva
- Fenol oldat: 40 g fenol 10 cm³ absz. etanolban oldva
- KCN oldat: 0,01 M-os KCN oldat, 98 cm³ piridinnel hígítva
- Izatin oldat: 0,4 g izatin 12 cm³ benzilalkoholban oldva, amit 2 óráig kevertetünk, szűrünk, és a szűrlethez cm³-enként 50 mg Boc-Phe-OH-t adunk

A ninhidrin (Kaiser) teszt végrehajtása:

A kapcsolási reakció, valamint a protokoll szerinti mosások után a gyanta néhány szemcséjét egy kis kémcsőbe helyezzük, és ehhez 3-3 cseppet adunk ninhidrinből, fenolból és KCN-ből. Ekkor a kémcső tartalma sárga színű. Az elegyet 104°C-ra hevítjük, és ezen a hőmérsékleten tartjuk további 5 percig. Ezt követően ellenőrizzük az oldat, valamint a gyantaszemcsék színét. Ha az oldat és a gyanta színe változatlan (negatív teszt), akkor az aminosav kapcsolása sikeres volt, a szintézis folytatódhat, ugyanis ez azt jelenti, hogy nincs jelen szabad aminocsoport, amivel a ninhidrin reagálhatott volna. Ellenben ha az oldat és a gyanta szemcséi elkékülnek (pozitív teszt), a kapcsolást meg kell ismételni, mert ekkor még szabad aminocsoportok találhatók a gyanta szemcséin.

Az izatin teszt végrehajtása:

Ez a teszt csupán annyiban tér el az előzőtől, hogy elsőként az izatin oldatból cseppentünk a gyantaszemcsékhez (szintén 3 cseppet), az oldatok további sorrendje azonos a ninhidrin tesztben alkalmazottéval. Ezt követi a melegítés: 104°C, 5 percig, majd ellenőrizzük az oldat és a gyantaszemcsék színét. Ha a kémcső tartalma továbbra is narancsszínű (negatív teszt), a kapcsolat sikeres volt. Ellenkező esetben a gyanta színe sötét vörösesbarnára változik, ami azt jelenti, hogy a gyantaszemcséken szabad iminocsoportok találhatók, ezért a kapcsolási reakciót meg kell ismételni.

5.1.3 A peptidek és konjugátumok analízise

5.1.3.1 Analitikai RP-HPLC

Az előállított peptidek tisztaságát analitikai RP-HPLC (KNAUER GmbH, Hamburg, Németország) segítségével ellenőriztem, az alábbi oszlop felhasználásával:

Phenomenex Luna (Torrence, CA, USA); C18; 250 x 4,6 mm; 5µm szilika, 100 Å töltetű oszlop.

Az elválasztás kifejlesztését lineáris gradiens elúcióval végeztem. A pontos program az adott vegyület jellemzésénél megtalálható.

A mozgófázist az alábbi vegyületek alkották:

„A” eluens: víz (0,1% TFA-val)

„B” eluens: acetonitril-víz (80:20 térf%, 0,1% TFA-val)

A vegyületeket az „A” eluensben vagy desztillált vízben oldottam, a koncentrációjuk 0,5-1 mg/ml volt. Az oszlopra injektált mennyiségek: 20 µl. Az elválasztásokat szobahőmérsékleten végeztem, az oszlop számára külön termosztált közeg nem volt. A komponenseket abszorbancia mérés segítségével detektáltam, $\lambda = 220$ nm hullámhosszon. Áramlási sebesség: 1 ml/perc.

5.1.3.2 Tömegspektrometria

A tömegspektrometriás mérésekhez elektropray ionizációs (ESI-MS) Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus típusú berendezés állt rendelkezésre, melyek elvégzéséért Hegedüs Rózsának köszönettel tartozom.

Az azonosítani kívánt vegyületeket 0,01% ecetsavat tartalmazó 50% ACN-víz elegyében oldottuk fel. A spektrumok felvétele folyamatos, 4 µl/perc sebességű mintaadagolás mellett, 50-2000 m/z tartományban, pozitív üzemmódban zajlott.

5.1.4 A peptidek tisztítása (preparatív RP-HPLC)

Az előállított nyers peptidek, valamint a konjugátumok tisztítását az alábbi preparatív oszlop segítségével végeztem:

- preparatív RP-HPLC (KNAUER GmbH, Hamburg, Németország):

Az oszlop (Phenomenex Luna) paraméterei: C18; 250 x 21,2 mm; 10 µm; 100 Å. Az elválasztást gradiens elúció segítségével végeztem. A mintát „A” és „B” eluens elegyében oldottam. 1-1 injektálás során az oszlopra vitt mennyiség 2 ml volt. Az elválasztást szobahőmérsékleten végeztem, 9 ml/perces áramlási sebességet alkalmazva. Az egyes komponensek detektálása abszorbancia mérésével történt $\lambda = 280$ nm hullámhosszon.

5.2 Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin - GnRH-I és daunorubicin – GnRH-II biokonjugátumok szintézise és *in vitro* biológiai vizsgálata

5.2.1 A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok szintézise

5.2.1.1 A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) peptidek előállítása, tisztítása, analízise

A GnRH-I és GnRH-II analógokat az alábbi módosításokat végrehajtva állítottam elő: a 4-es helyzetben levő lizint vajsavval acileztem, míg az eredeti szekvenciák 6-os pozíciójában található glicin helyére D-lizint építettem be, melynek oldalláncát aminooxiacetsavval acileztem. A szintézist manuálisan, az Fmoc/^tBu stratégia alkalmazásával hajtottam végre, melynek protokollját az 5.1.1. pontban mutattam be. A szilárd fázisként Rink-Amid MBHA gyanta (0,52 mmol/g) 1000 mg-ját használtam.

6. táblázat: A szintézisekhez felhasznált aminosavszármazékok

	[D-Lys ⁶]GnRH-I	[D-Lys ⁶]GnRH-II
1.	Fmoc-Gly-OH	Fmoc-Gly-OH
2.	Fmoc-Pro-OH	Fmoc-Pro-OH
3.	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH
4.	Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Trp-OH
5.	Fmoc-D-Lys(Mtt)-OH	Fmoc-D-Lys(Mtt)-OH
6.	Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	Fmoc-His(Trt)-OH
7.	Fmoc-Lys(Dde)-OH	Fmoc-Lys(Dde)-OH
8.	Fmoc-Trp-OH	Fmoc-Trp-OH
9.	Fmoc-His(Trt)-OH	Fmoc-His(Trt)-OH
10.	Glp	Glp

Az első két aminosav kapcsolása után a gyantát két részre osztottam és úgy folytattam a két peptid szintézisét. Az alaplánc felépítését követően a 4-es helyzetben található lizinek oldalláncainak védőcsoportjait (Dde) távolítottam el, melyhez 2% hidrazin/DMF (tf%) elegyét használtam (6 x 5 perc). Az így szabaddá vált ε-aminocsoportokat vajsavval acileztem

3 ekvivalens vajsav-anhidrid : 3 ekvivalens DIEA dimetilformamidos oldatával (a gyantakapacitásra vonatkoztatva). A kapcsolási reakció 1 órán át zajlott, melynek sikerességét Kaiser-tesztel ellenőriztem. Következő lépésként a 6-os helyzetben található *D*-Lys-ek oldalláncait védő Mtt csoportokat hasítottam le. Ehhez 2% TFA, 2% TIS/DCM (tf%) összetételű elegyet használtam. Az így felszabadult ϵ -aminocsoportokhoz Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam HOBt és DIC kapcsolóreagensek segítségével. Ezeket szintén 3-3 ekvivalens mennyiségben alkalmaztam, a kapcsolási reakció pedig 2 órán át tartott, s végbemeneteléről Kaiser-teszt elvégzésével győződtem meg. Ennek végeztével a gyantát absz. etanollal mostam, majd exszikkátorban szárítottam.

Az elkészült peptidek gyantáról való hasítását a 9,5 ml TFA, 250 μ l víz, 250 μ l TIS (10 ml) összetételű hasítóeleggyel végeztem. A felsorolt vegyületeken kívül 10 ekvivalens szabad aminosav (karbonil-csoport megkötésére képes) is hozzáadtam az elegyhez, a láncban lévő aminosav mellékreakcióinak elkerülése végett. A hasítás során a gyantaszemcséken levő peptideket az első 15 percben jeges-vizes hűtéssel (0 °C), majd további 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. Következő lépésként a peptideket 100 ml hideg dietil-éterbe szűrve kicsaptam. A visszamaradt gyantát ezután TFA-val, illetve DCM-nal mostam. A peptidet centrifugálással ülepítettem 5 percen keresztül, 4000/perc fordulatszámmal (Eppendorf 5702, Eppendorf, Ausztria). A leülepített peptidről a dietil-étert dekantálással távolítottam el, majd a peptidet az előzőek szerint 3 további alkalommal centrifugálással mostam. Ezután desztillált vízben feloldottam a peptideket, majd a lehetséges dietil-éter nyomokat rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam. Az oldatokat folyékony N₂-ben lefagyasztottam, majd liofilizáltam.

A nyerstekek tisztítását RP-HPLC-vel végeztem, a tisztítást követően a termékeket liofilizálás nélkül, az oldószer bepárlását követően rögtön felhasználtam a következő konjugálási lépésben a peptidek érzékenysége miatt. A peptidek egy kis mennyisége azonban liofilizálásra került, analízis céljából: analitikai RP-HPLC, valamint ESI-MS mérésre (15.-18. ábra).

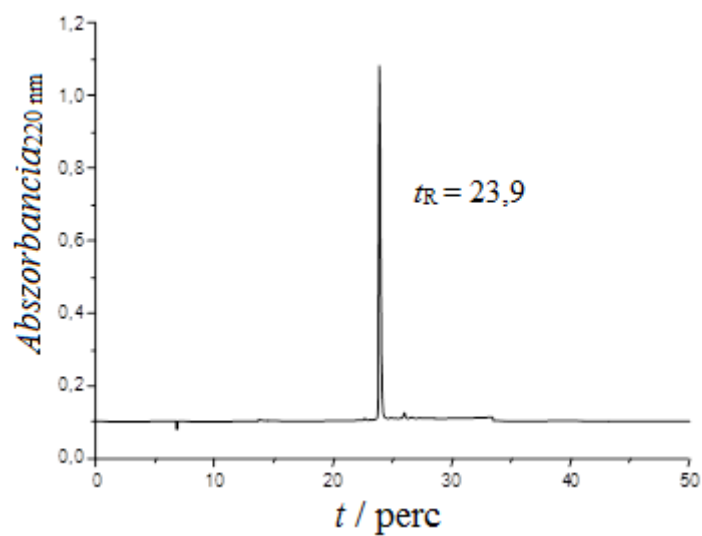
Az előállított peptidek tisztaságvizsgálatát analitikai RP-HPLC-vel (5.1.3.1. fejezet) végeztem a 7. táblázatban összefoglalt gradiens elúciót alkalmazva.

7. táblázat: Az analitikai RP-HPLC során alkalmazott gradiens elúció programja

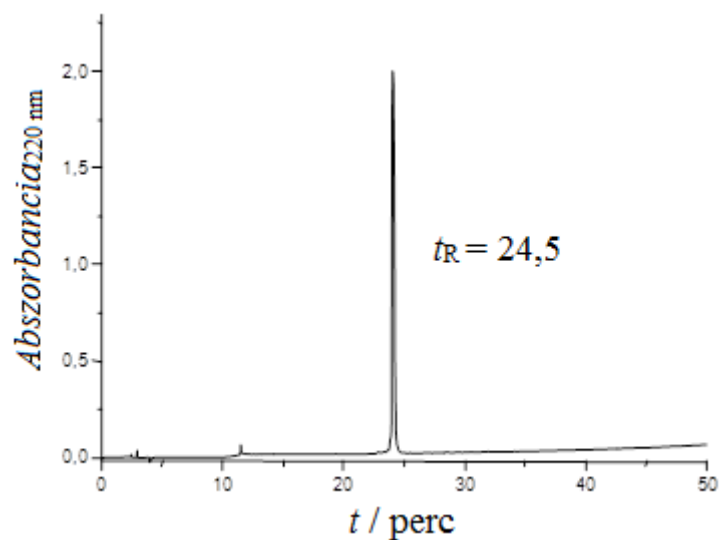
t / perc	B%
0.	0
5.	0
50.	90

Az alkalmazott áramlási sebesség: 1 ml/perc

UV detektálás: $\lambda = 220$ nm



15. ábra: A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) RP-HPLC kromatogramja



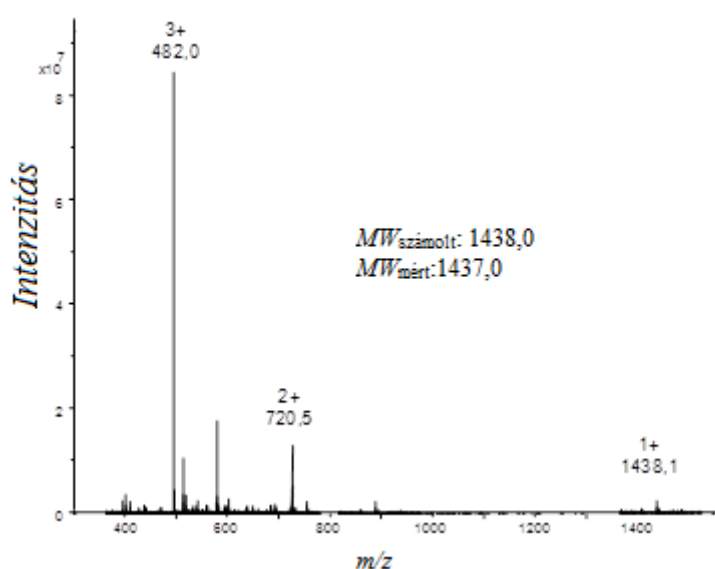
16. ábra: A GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) RP-HPLC kromatogramja

A peptideket preparatív RP-HPLC segítségével tisztítottam (5.1.4. fejezet) a 8. táblázatban összefoglalt gradiens elúciót alkalmazva.

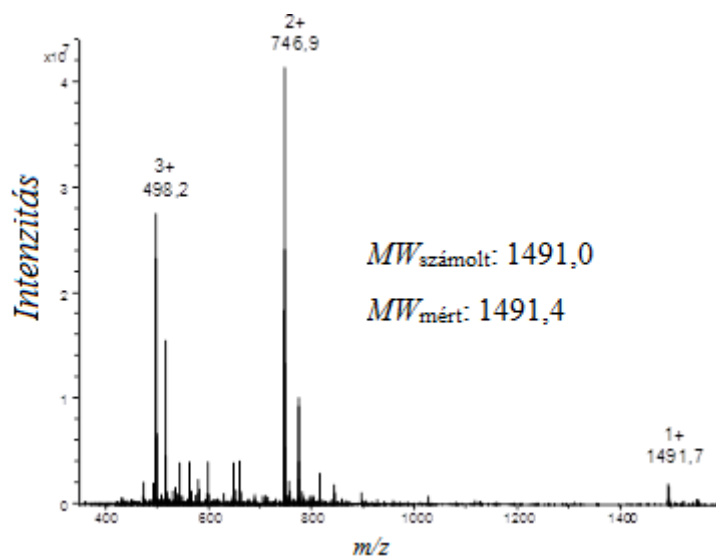
8. táblázat: A preparatív tisztítás során alkalmazott gradiens elúció programja

t/perc	B%
0.	40
5.	40
60.	100

A tömegspektrumok felvétele az 5.1.3.2. pontban leírtak szerint történt.



17. ábra: A GnRH-I(4Lys(nBu), D-6Lys(Aoa)) ESI-MS tömegspektruma



18. ábra: A GnRH-II(4Lys(nBu), D-6Lys(Aoa)) ESI-MS tömegspektruma

5.2.1.2 A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) és a GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) analógok konjugációja daunorubicinhez oxim-kötés kialakításával: GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok szintézise, tisztítása, analízise

A peptidek konjugálása daunorubicinhez a peptidekben található aminooxiacetil-, és a daunorubicin 13-as számú C-atomján található karbonilcsoportja közötti oxim-kötés kialakításával valósult meg. A reakciókat 0,2 M-os NH₄OAc (pH = 5,0) pufferoldatban végeztem. A peptidek oldatát 10 mg/ml-es koncentrációban, a daunorubicint pedig a peptidekre vonatkoztatva körülbelül 1,5 ekvivalens feleslegben alkalmaztam. A reakcióelegyet 16 órán át szobahőmérsékleten kevertettem. A reakcióidő letelte után az oldatokat RP-HPLC-vel tisztítottam. Az egyes frakciókat folyékony N₂ segítségével lefagyasztottam és liofilizáltam, analitikai RP-HPLC és ESI-MS vizsgálatok elvégzése céljából (19.-22. ábra).

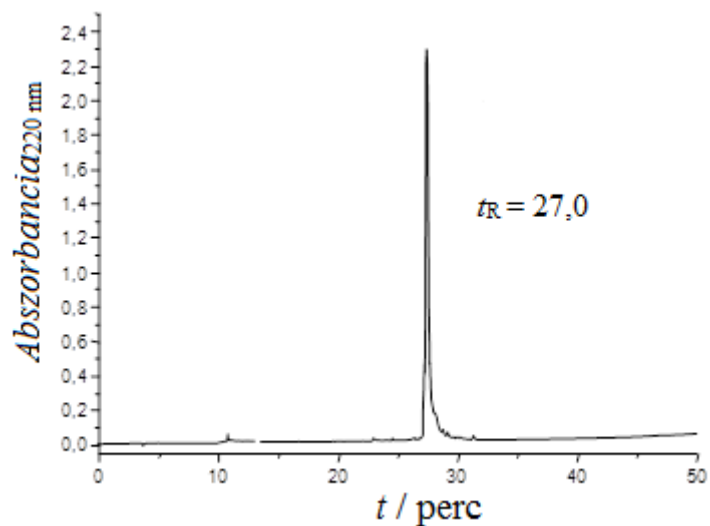
Az előállított konjugátumok tisztaságvizsgálatát ugyancsak RP-HPLC-vel (5.1.3.1. fejezet) végeztem a 9. táblázatban összefoglalt gradiens elúciót alkalmazva.

9. táblázat: A konjugátumok analíziséhez alkalmazott gradiens elúció programja

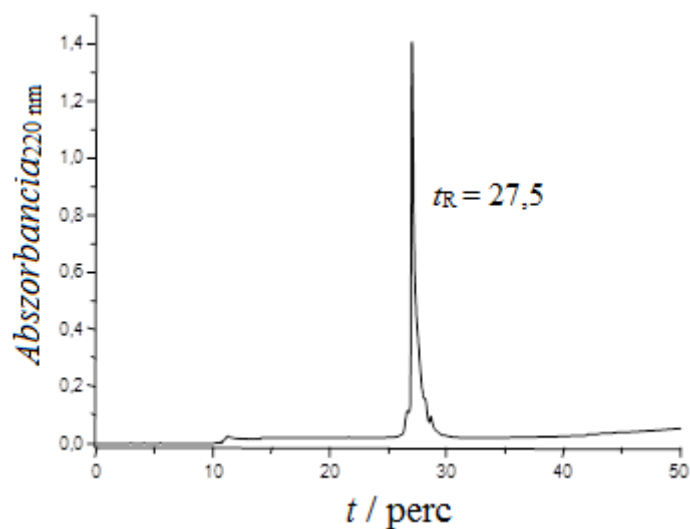
t/perc	B%
0.	0
5.	0
50.	90

Az alkalmazott áramlási sebesség: 1 ml/perc

UV detektálás: $\lambda = 220$ nm



19. ábra: A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys (Dau=Aoa)) RP-HPLC kromatogramja



20. ábra: A GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys (Dau=Aoa)) RP-HPLC kromatogramja

A konjugátumokat a peptidekhez hasonlóan preparatív RP-HPLC segítségével tisztítottam (5.1.4. fejezet) a 10. táblázatban összefoglalt gradiens elúciót alkalmazva.

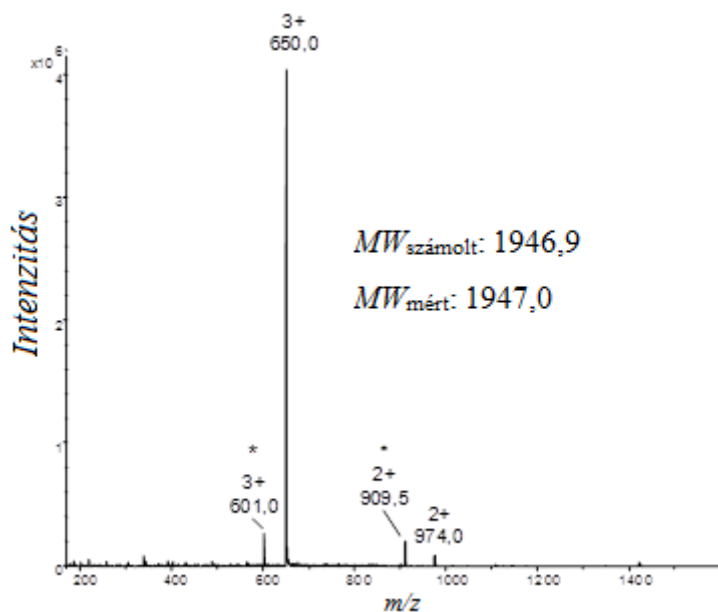
10. táblázat: A konjugátumok tisztítása során alkalmazott gradiens elúció programja

t/perc	B%
0.	30
5.	30
60.	100

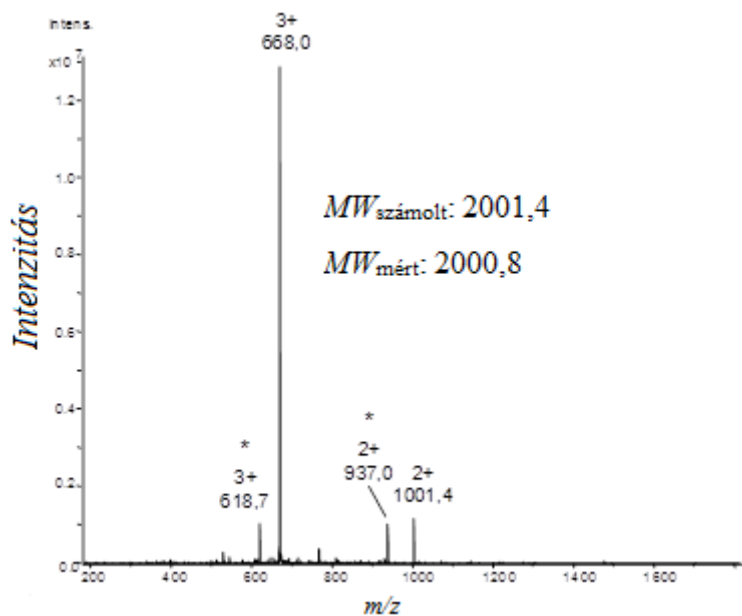
Az alkalmazott áramlási sebesség: 9 ml/perc

UV detektálás: $\lambda = 280$ nm

A tömegspektrumok felvétele az 5.1.3.2. pontban leírtak szerint történt.



21. ábra: A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys (Dau=Aoa)) ESI-MS tömegspektruma



22. ábra: A GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys (Dau=Aoa)) ESI-MS tömegspektruma

5.2.2 *In vitro* biológiai vizsgálatok: GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata

Az előállított konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken vizsgáltuk.

Az MTT-teszt kivitelezése:

A sejtek kultúrában tartása és növesztése 37°C-os hőmérsékleten, 5% CO₂ tartalmú atmoszféra mellett, komplett RPMI 1640 médiumban (HT-29) zajlott. A komplett médium összetétele:

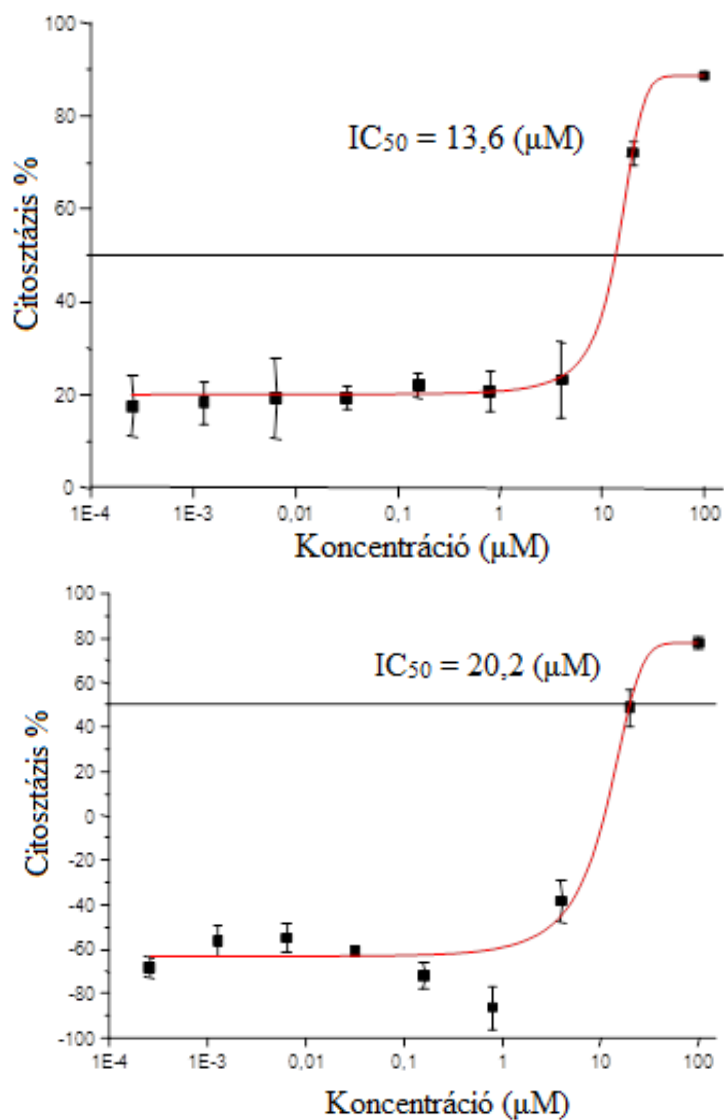
- magzati borjú szérum (FCS): 10%
- L-glutamin: $c = 2 \text{ } \mu\text{g/ml}$
- gentamicin: $c = 160 \text{ } \mu\text{g/ml}$

A kísérlet előtti napon az előző bekezdésben ismertetett körülmények között tartott sejteket 96 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottuk 100 μl szérumtartalmú, komplett médiumban (5×10^3 sejt/lyuk). Másnap eltávolítottunk 50 μl médiumot, ezt követően a negatív kontroll sejtekre 150 μl szérummentes médiumot, a kezelt sejtekre pedig 50 μl szérummentes médiumot és 100 μl szérummentes médiumban oldott hatóanyagot adagoltunk, különböző koncentrációkban. A kezeléseket $c = 2,56 \times 10^{-4} \text{ } \mu\text{M} - 100 \text{ } \mu\text{M}$ koncentráció tartományban végeztük. A kezelési idő lejárta után a sejteket 135-135 μl szérummentes médiummal kétszer mostuk, majd lyukanként szintén ennyi teljes médiumot adagoltunk a sejtekhez. Ezután további 72 óra inkubálást követően $c = 0,345 \text{ } \mu\text{M}$ koncentrációjú MTT oldatból (oldószerként szérummentes médiumot alkalmaztunk, az oldatot 0,22 μm szűrővel szűrtük) lyukanként 45 μl -t adagoltunk a sejtekhez, amit 3,5 órán át tartó 37°C-os inkubálás követett. Az inkubálási idő lejárta után centrifugálással óvatosan eltávolítottuk a sejtekről a felülúszót. A lila kristályokat 100 μl DMSO-ban oldottuk fel. Az optikai denzitás meghatározása ELISA Reader segítségével zajlott, $\lambda = 540$ és $\lambda = 620$ hullámhosszakon. Háttérkorrekció elvégzése céljából az 620 nm-en mért értékeket kivontuk a 540 nm-en mért értékekből, így megkaptuk a kompenzált abszorbanciát, majd meghatároztuk a citosztatikus mértékét (%) az alábbi képlet segítségével:

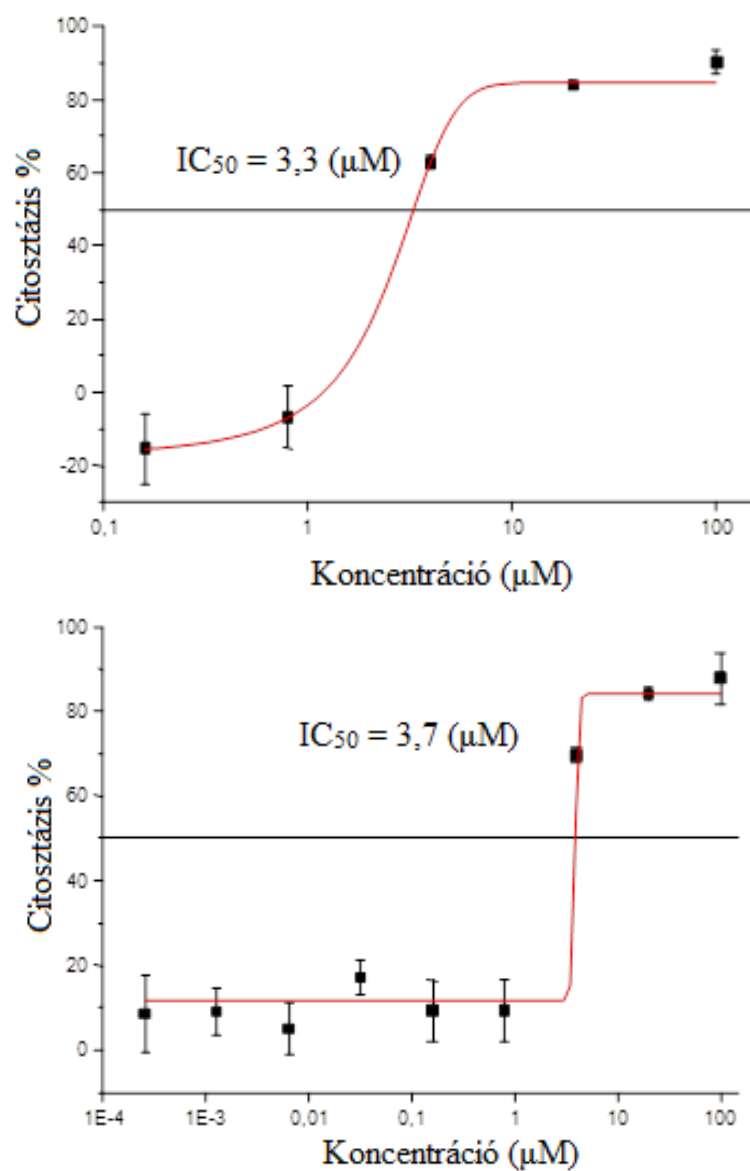
$$\text{Citosztatizis (\%)} = \left(\frac{1 - A_{\text{kezelt}}}{A_{\text{kontroll}}} \right) \cdot 100,$$

ahol A_{kezelt} a kezelt sejtek, A_{kontroll} a kontroll sejtek kompenzált abszorbanciáját jelöli.

Ha a citosztázis mértékét ábrázoljuk a koncentráció függvényében, a kapott görbék felhasználásával meghatározhatjuk az IC_{50} értékeket, mely azt mutatja meg, hogy mekkora koncentráció okozza a vizsgált sejt kultúra 50%-ának osztódását (23.-24. ábra).



23. ábra: A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys (Dau=Aoa)) citosztatikus hatása HT-29 humán vastagbél karcinóma sejteken



24. ábra: A GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys (Dau=Aoa)) citosztatikus hatása HT-29 humán vastagbél karcinóma sejteken

6. Összefoglalás

A statisztikák szerint a rák az egyik legfőbb halálozási ok világszerte. Mára azonban már számos módszer áll a daganatos megbetegedések kezelésére, illetve folyamatosan zajlanak a kutatások újabb, hatékonyabb gyógyszerek, eljárások kifejlesztése érdekében.

Ilyen újszerű módszer a dolgozatom alapjául szolgáló irányított vagy célzott tumorterápia is. Napjainkban a kutatók nagy hangsúlyt fektetnek ezen eljárás fejlesztésére, tökéletesítésére, hiszen a módszer szelektivitásának köszönhetően nagymértékben csökkenthetők a kemoterápia mellékhatásai, illetve egyéb hátrányok is kiküszöbölhetők (pl.: toxicitás, hatóanyag gyors kiürülése a véráramból). Ennek kivitelezésére olyan molekulákat alkalmazhatunk, amelyek specifikusak kötődnek a tumoros sejteken nagy mennyiségben expresszáldott receptorokhoz (pl: GnRH peptidhormonok). Így tehát ezeket a molekulákat a citotoxikus molekulákhoz kapcsolva azok célzottan a tumorsejtekbe juttathatók, megkímélve ezzel az egészséges sejteket. Ezen peptidhormonok további előnye, hogy önmagukban is gátolják a tumorsejtek növekedését.

Munkám során 4-es helyzetben vajsavval acilezett lizint, 6-os helyzetben aminooxiacetyl-távtartó egységen keresztül daunorubicint tartalmazó [*D*-Lys⁶]GnRH-I és [*D*-Lys⁶]GnRH-II konjugátumokat állítottam elő. Azt szerettem volna megvizsgálni, hogy a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) esetében tapasztaltakhoz hasonlóan, a GnRH-I és GnRH-II alapú konjugátumok esetén is növekedik-e a vegyületek enzimstabilitása, illetve tumorelles hatása a ⁴Ser – ⁴Lys(nBu) csere következtében.

Az előállított konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 humán vastagbél karcinóma sejteken végzett MTT-teszt alkalmazásával határoztuk meg, majd a kapott eredményeket összehasonlítottuk a szabad hatóanyag, illetve korábban előállított konjugátumok hatékonyságával.

A GnRH-I(⁴Lys(nBu), *D*-⁶Lys(Dau=Aoa)) esetében a 4-es lizin vajsavval való acilezése nem növelte meg jelentős mértékben a konjugátum citosztatikus hatását, azonban az enzimstabilitás növelés céljából célszerű lehet alkalmazni az említett módosítást. Ezzel szemben a GnRH-II(⁴Lys(nBu), *D*-⁶Lys(Dau=Aoa)) esetében ez a módosítás egyértelműen a citosztatikus hatás növekedését eredményezte. Ennek ellenére egyik vegyület sem érte el a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) alkalmazása során tapasztalt citosztatikus hatást.

7. Irodalomjegyzék

- [1.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/2014.10.07>
- [2.] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Molecular Biology of the Cell*, *Garland Science*, New York, **2002**
- [3.] Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J., *Molecular Cell Biology*, *W. H. Freeman*, New York, **2000**
- [4.] Balázs A., *Daganatbiológia*, *Gondolat kiadó*, Budapest, **1984**
- [5.] Beyersdorff D., *A rák komplex kezelése*, *Medicina Könyvkiadó Rt.*, Budapest, **1999**
- [6.] <http://incurablediseasesbiz.com/cancer-cells-in-our-bodies-learn-how-to-prevent-the-multiplication-of-cancer-cells/2014.10.14>
- [7.] Mező G., Manea M., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2010**, 1, 79-96.
- [8.] Matsuo H., Baba Y., Nair R.M., Arimura A., Schally A.V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1971**, 43, 1334-1339.
- [9.] Fonyó A., *Medicina Könyvkiadó Rt.*, Budapest, **1998**
- [10.] Pawson A. J., McNeilly A. S., *Anim. Reprod. Sci.*, **2005**, 88, 75-94.
- [11.] Millar R., Lu Z-L., Pawson A. J., Flanagan C. A., Morgan K., Maudsley S. R., *Endocr. Rev.*, **2004**, 25, 235-275.
- [12.] Limonta P., Moretti R. M., Marelli M.M., Motta M., *Front. Neuroendocrinol.*, **2003**, 24, 279-295.
- [13.] Sower S. A., Chiang Y-C., Lovas S., Conlon J. M., *Endocrinol.*, **1993**, 132, 1125-1131.
- [14.] Emons G., Gründker C., Günthert A. R., Westphalen S., Kavanagh J., Verschraegen C., *Endocr. Relat. Cancer*, **2003**, 10, 291-299.
- [15.] Keller G., Schally A. V., Gaiser T., Nagy A., Baker B., Halmos G., Engel J. B., *Eur. J. Cancer*, **2005**, 41, 2196-2202.
- [16.] Nagy A., Schally A.V., *Biol. Reprod.*, **2005**, 73, 851-859.
- [17.] Brawer M. K., *Rev. Urol.*, **2001**, 3S, 1-9.

- [18.] Nagy A, Schally AV, Armatis P, Szepesházi K.,Halmos G., Kovács M., Zarándi M., Groot K., Miyazaki M., Jungwirth A., Horváth J.,*Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1996**, 93, 7269-7273.
- [19.] Pawson A. J., Morgan K., Maudsley S. R., Millar R. P., *Reproduction*, **2003**, 126, 271-278.
- [20.] Neill J. D., Musgrove L. C., Wayne L. D., *Trends in Endoc. Metab.*, **2004**, 15, 383-392.
- [21.] Gründker C., Günthert A. R., Millar R. P., Emons G.,*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2002**, 87, 1427-1430.
- [22.] Lovas S., Pályi I., Vincze B., Horváth J., Kovács M., Mező I., Tóth G., Teplán I., Murphy R., F., *J. Peptide Res.*, **1998**, 52, 384–389.
- [23.] Mező I., Lovas S., Pályi I., Vincze B., Kálnay A., Turi G., Vadász Z., Seprődi J., Idei M., Tóth G., Gulyás E., Ötvös F., Mák M., Horváth J. E., Teplán I., Murphy R. F.,*J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 3353–3358.
- [24.] Kovács M., Vincze B., Horváth J. E., Seprődi J., *Peptides*, **2007**, 28, 821-829.
- [25.] Kraus S.,Naor Z., Seger R., *Cancer Lett.*, **2006**, 234, 109-123.
- [26.] Rose K.,*J. Am. Chem. Soc.*,**1994**, 116, 30-33.
- [27.] Herédi-Szabó K.,Lubke J., Tóth G., Murphy R.F., Lovas, S., *Peptides*, **2005**, 26, 419–422.
- [28.] Manea M., Leurs U., Orbán E., Baranyai Zs., Öhlschläger P., Marquardt A., Schulcz Á., Tejeda M., Kapuvári B., Tóvári J., MezőG., *Bioconjug. Chem.*, **2011**, 22, 1320-1329.
- [29.] DiMarco A., Soldati M., Fioretti A., Dasdia T., *Cancer Chemother. Rep.*, **1964**, 38, 39-47.
- [30.] Gewirtz D. A., *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, 57, 727-741.
- [31.] Mező G., Manea M., Szabó I., Vincze B., Kovács M., *Curr. Med. Chem.*, **2008**, 15, 2366-2379.
- [32.] Mező G., *Természet világa*, **2011**, 142, 555-558.
- [33.] Kalia J., Raines R.T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2008**, 47, 7523-7526.
- [34.] Hegedüs R., Manea M., Orbán E., Szabó I., Kiss É., Sipos É., Halmos G., Mező G., *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 56, 155-165.
- [35.] Beyer-Sehlmeyer G., Glei M., Hartmann E., Hughes R., Persin C., Böhm V., Rowland I., Schubert R., Jahreis G., Pool-Zobel B. L., *Br. J. Nutr.*, **2003**, 90, 1057-1070.

- [36.] Lecona E., Olmo N., Turnay J., Santiago-Gomez A., López de Silanes I., Gorospe M., Lizarbe M. A., *Biochem. J.*, **2008**, 409, 311-320.
- [37.] Scharlau D., Borowicki A., Habermann N., Hofmann T., Klenow S., Miene C., Munjal U., Stein K., Gleis M., *Mutat. Res.*, **2009**, 682, 39-53.
- [38.] Manea M., Mező G., *Protein Pept. Lett.*, **2013**, 20, 439-449.
- [39.] Merrifield R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149–2154.
- [40.] Kremmer T., Torkos K., *Akadémiai kiadó*, Budapest, **2008**
- [41.] Schlosser G. (Szerk.: Orosz, Gy., Szabó, D.), *Eötvös Kiadó*, Budapest, **2012**
- [42.] Shao J., Tam J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 3893-3899.
- [43.] Mező G., Szabó I., Kertész I., Hegedüs R., Orbán E., Leurs U., Bösze Sz., Halmos G., Manea M., *J. Pept. Sci.*, **2011**, 17, 39-46.
- [44.] Pappa E.V., Zompra A.A., Spyralanti Z., Diamantopoulou Z., Pairas G., Lamari F.N., Katsoris P., Spyroulias G.A., Cordopatis P., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **2011**, 96, 260-272.
- [45.] Bruckner Gy., Szerves kémia I-1., *Tankönyvkiadó*, Budapest, **1954**

Lezárás dátuma: 2014. december 2.

