



ELTE

EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

A nucleolin receptort felismerő F3 peptid átlapoló fragmenseinek szintézise és vizsgálata

TDK dolgozat

Szerző(k): Basa Bettina

VI. évfolyam, biológia-kémia osztaltan tanári mesterképzés, MSc

Témavezető(k): Dr. Mező Gábor¹, Dr. Enyadi Kata Nóra²

¹Tudományos tanácsadó, Szerves Kémiai Tanszék

²Tudományos munkatárs, Szerves Kémiai Tanszék

Lezárva: 2021. december 06.

Tartalmi összefoglaló.

A rosszindulatú daganatos megbetegedések szövődményei, a második vezető haláloknak tekinthetők világszerte. Ebből kifolyólag a modern orvostudomány egyik legfontosabb kutatási területe, egy olyan gyógymód kifejlesztése, amely a legtöbb rák típussal szemben hatékonyan alkalmazható. A gyakorlatban egyre elterjedtebbé válnak az irányított tumorterápiás eljárások, melyek az alkalmazott kemoterápiás szereket célzottan a tumorsejtbe juttatják, növelve azok hatékonyságát. A módszer alapja, hogy a hatóanyagot egy irányító molekulához kapcsolják, amely szelektíven képes kötődni, a célzott sejt által nagy mértékben expresszált receptorokhoz. A tumorössejt elmélet alapján, a daganatot alkotó sejtkolónián belül, elkülöníthető egy olyan szubpopuláció, amely megnövekedett metasztatikus képességgel, valamint nagyobb osztódási potenciállal rendelkezik, mint a többi szubpopuláció sejtjei. Ezeket a tumorössejteknek feltételezett sejtcsoportokat teszik felelőssé a daganat egyes szubpopulációinak kialakításáért, valamint a daganatok kiújulásának folyamatáért. Mindezekből következik, hogy az irányított tumorterápiás eljárások hatékonyságát nagy mértékben növelheti, ha a kezelések során ezeket a tumorössejteknek vélt sejtcsoportokat célozzák. A munkám célja egy olyan peptidalapú irányítómolekula tervezése volt, amely szelektíven képes kapcsolódni, a tumorsejteken, valamint tumorössejteken is nagy mértékben expresszált nucleolin fehérjéhez. A vizsgálatokhoz a 31 aminosavból álló F3 peptidet vettem alapul, amely szelektíven képes kötődni sejtfelszíni nucleolin fehérjéhez, így alkalmas hordozó molekula lehet a tumor ellenes hatóanyagok sejtbe juttatására. A költséghatékonyabb gyógyszerjelölt előállítása érdekében, munkám során az F3 peptid szerkezetének optimalizálására törekedtem. Ennek érdekében nyolc átlapoló dekapeptidet szintetizáltam, melyek lefedték a vizsgálni kívánt peptidet. Az egységes hatóanyag felszabadulás érdekében, az egyes peptidekhez enzimlabilis távtartó tetrapeptidet kapcsolattam (GFLG). Tumorelles hatóanyagként daunomicint alkalmaztam, amelyet aminosavcsoport linkeren keresztül, oxim-kötéssel kapcsolattam az egyes peptidszármazékokhoz. A szerkezet-hatás összefüggések meghatározására, az elkészített konjugátumokat cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai módszerrel vizsgáltuk, majd az egyes konjugátumok *in vitro* citotoxicitását A2058 humán melanóma, valamint HT-29 humán kolorektális adenokarcinóma sejteken határoztuk meg. A mérések eredménye alapján megállapítottuk, hogy az N-terminális szekvenciát magába foglaló Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRSAR-NH₂ konjugátum citotoxicitása, a teljes szekvenciához képest nagyobb mértékű volt, így ezen a konjugátumon további vizsgálatokat végeztünk. A szerkezet további optimalizálására, a szekvencián alanin-szkennelést végeztem, annak érdekében, hogy megállapítsam azokat a pozíciókat, ahol az aminosavak cserélhetők. Az elkészített új konjugátumok citotoxicitásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy abban az esetben, ha a szekvencián belül az 1. illetve 8. pozícióban cseréltük le az aminosavat, a konjugátum hatékonysága tovább növekedett. A továbbiakban, terveim között szerepel, a konjugátum szerkezetének további optimalizálása, azáltal, hogy azokban a pozíciókban, amelyekben az aminosavak szabadon cserélhetők, olyan aminosavakat építsek, amelyek növelik a peptid plazmastabilitását, valamint irányító hatékonyságát.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1 Daganatok.....	6
2.1.1. Daganatok kialakulásának elméletei.....	6
2.2 Terápiás lehetőségek.....	8
2.2.1 Műtéti beavatkozás.....	8
2.2.2 Sugárterápia.....	8
2.2.3 Kemoterápia.....	9
2.2.4 Irányított tumorterápia.....	9
2.3 A nucleolin fehérje.....	10
2.3.1 A nucleolin fehérje és a tumorgenezis kapcsolata.....	12
2.3.2. Az F3 peptid.....	13
2.4 Daunomicin.....	14
3. Alkalmazott módszer.....	16
3.1 Peptidszintézis.....	16
3.1.1 Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS).....	16
3.1.2 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái.....	18
3.1.3 A gyanta.....	19
3.1.4 Kapcsolási reakciók sikerességének követése.....	19
4. Célkitűzések.....	21
5. Eredmények.....	22
5.1 Az átlapoló decapeptidek, GFLG-tetrapeptiddel kapcsolt aminosav származékának szintézise.....	22
5.2 Az elkészített szekvenciák feldolgozása.....	23
5.2 Az izopropilidén védelem eltávolítása.....	23
5.3 Peptidszármazék konjugálása daunomicinnel.....	24
5.4 Az átlapoló decapeptid származékok vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával.....	25
5.5 A konjugátumok <i>in vitro</i> citotoxicitási vizsgálata.....	26
5.6 A B1 peptidszármazék alanin-szken változatainak szintézise.....	27
5.7 Az B1 peptidszármazék alanin-szken változatainak feldolgozása.....	28
5.8 Az izopropilidén védelem eltávolítása.....	28
5.9 A B1 peptidszármazék alanin-szken változatainak konjugálása daunomicinnel.....	28
5.10 A B1 peptidszármazékok alanin-szken konjugátumainak vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával.....	29

5.11 A B1 peptidszármazékok alanin-szken konjugátumainak in vitro citotoxicitási vizsgálata. .	29
5.12 Eredmény összefoglaló.....	30
6. Kísérleti rész	33
6.1 Alkalmazott anyagok	33
6.2 Alkalmazott eljárások.....	33
6.2.1 A szilárdfázisú peptidszintézis során alkalmazott protokoll.....	33
6.2.2 A Kaiserteszt elvégzése.	34
6.2.3 A peptid hasítása a gyantáról.....	34
6.2.4 Izopropil védőcsoport eltávolítása.	35
6.2.5 Peptidszármazékok konjugálása daunomicinnel.	35
6.2.6 A peptidek és konjugátumok tisztítása és analízise.	36
6.2.7 Tömegspektrometria.....	38
6.2.8. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia.....	39
6.2.9. In vitro citotoxicitási vizsgálat.	39
7. Rövidítések.....	40
9. Irodalomjegyzék.....	41
10. Függelékek.....	44

1. Bevezetés

Rákos megbetegedésnek tekintünk minden olyan, a szervezetben lejátszódó kóros elváltozást, melynek során a testi sejtek kontrollálatlan növekedésbe kezdenek, és szétterjednek a szervezet különböző pontjaira.¹ A rosszindulatú daganatok biokémiai és sejtbiológiai szempontból rendkívül változatosak, ugyanis a test szöveteinek bármelyikéből kialakulhatnak. Ezen változékonyságra vezethető vissza, hogy a rákos megbetegedések hatékony kezelésére nincs egyetlen általánosan alkalmazható módszer.²

A rákkal szembeni effektív gyógyászati eljárások kifejlesztése, továbbra is a modern orvostudomány egyik legfontosabb kutatási területe. A tumorsejtek felépítésének és működésének alaposabb megismerése újfajta kezelési módszerek kialakítására ad lehetőséget. Mindez azért rendkívül fontos, mivel a szív és érrendszeri betegségek okozta halálozásokat követően, a rákos sejtburjánzás szövődményei tekinthetők a világon a második vezető haláloknak. 2017-ben mintegy 9,56 millió fő halálát okozta ez a megbetegedés, és az újonnan diagnosztizáltak száma évről évre folyamatosan növekszik.³

2. Irodalmi áttekintés

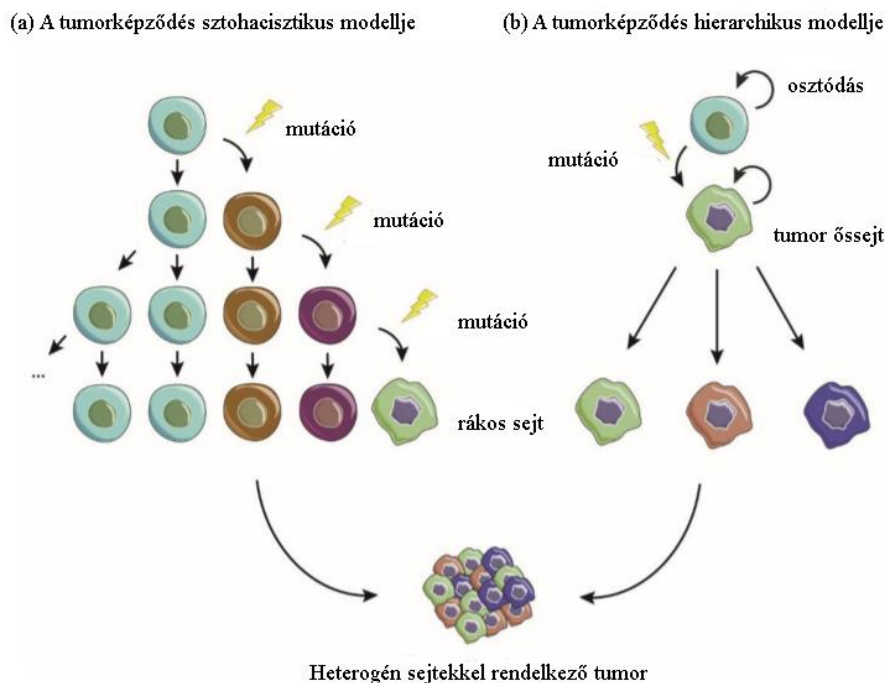
2.1 Daganatok

A daganatok (tumorok) olyan abnormális sejtekből kialakult sejtkolóniák, amely sejtek osztódási kontrolljukat elveszítve immortálissá váltak, azaz elméletben végtelen osztódási potenciáljuk révén állandóan képesek megújítani önmagukat.⁴ A tumorokat alapvetően két csoportra oszthatjuk: *benignus* (jóindulatú) tumorokról beszélünk abban az esetben, ha a korlátlanul osztódó sejtek nem képesek elhagyni a területet ahol kialakultak, míg *malignus* (rosszindulatú) tumoroknak tekintjük azokat a sejtsszaporulatokat, amelyek a képződési környezetüket elhagyva áttéteket képesek kialakítani a szervezetben.¹

2.1.1. Daganatok kialakulásának elméletei. A daganatok szerkezeti szempontból nem tekinthetők egyetlen homogén egységnek, mivel a kolóniát alkotó tumorsejtek kisebb szubpopulációkat alkotnak. Az egyes szubpopulációk különbözhetnek a sejtfelszíni mintázatukban, a metasztatikus képességeikben, valamint a szervezet immunválaszaival szembeni rezisztenciájukban is. A tumorok kialakulásának folyamatát a *stochacisztikus*-, vagy más néven klonális evolúció elmélettel szokás magyarázni. A modell alapja, hogy a tumort képző sejtek kezdetben egyenértékűek, így képességük a további sejtek generálására megegyezik (1. ábra). Ezek a sejtek többszörös genetikai, valamint epigenetikai mutációt szenvednek, s a megváltozott információtartalommal bíró sejtek további osztódásaként létejenek a heterogén tumoron belül az egyes szubpopulációk.⁵

A modern vizsgálati módszerek segítségével, több tumor esetében is kimutattak különösen viselkedő szubpopulációkat. Ezek a sejtcsoportok, a többi szubpopulációhoz képes nagyobb mértékű metasztatikus képességgel, valamint megnövekedett osztódási potenciállal rendelkeznek. A különleges sejtcsoportok jellemzőinek felismerése, egy másik elmélet megfogalmazását eredményezte. Ezt az elméletet hierarchikus-, vagy más néven daganat-össejt elméletnek is nevezik.^{5,6} A modell alapja, hogy a daganat szubpopulációi közül, ez az egyetlen speciális tulajdonságokkal rendelkező sejtcsoport felelős a többi szubpopuláció megalkotásáért (1. ábra). Az elmélet a tumor-össejtek jelenlétével magyarázza a daganatok kiújulásának folyamatát is. A hipotézis alapján ezek az össejtek rendkívül ellenállóak a hagyományos terápiás módszerekkel

szemben, így a kezelés hatására csak a többi szubpopuláció pusztul el, a tumor-össejtek kis csoportja pedig a szervezetben marad. Ez a kis sejtcsoport pedig a nagymértékű osztódási képessége révén, képes újjá alkotni a tumort.^{5,6}



1. ábra – A tumorképződés sztohasztikus és hierarchikus modellje⁵

A hierarchikus elméletet igazolására Al-Hajj és kollégái⁷ mellrákból vett mintából izoláltak különböző fenotípussal rendelkező szubpopulációkat, majd ezeket immunszuppresszált egerekbe juttatva vizsgálták, hogy mely sejtcsoportok okoznak daganatos sejtburjánzást az állatokban. A vizsgálat eredményeként kimutatható volt, hogy a magas CD44 és az alacsony CD24^{-/low} sejtfelszíni receptor expressziót mutató szubpopuláció tagjai, nagyon kis sejtszám mellett is daganatot képeztek az egerekben. Azok a sejtcsoportok pedig, amelyek ezzel a jellegzetes sejtfelszíni mintázattal nem rendelkeztek, nagyobb sejtszám mellett sem alakítottak ki tumort. A kísérleti eredmények ellenére a daganatok kialakulásának modellje továbbra sem tekinthető teljes mértékben tisztázott elméletnek. *In situ* vizsgálatok során kimutatták, hogy a környezeti jellemzőktől függően a tumorössejtek képesek a sejtfelszíni receptor mintázatuk megváltoztatására. Az eredmények alapján megállapítható, hogy normál sejtenyésztési körülmények között, a tumorössejteknek feltételezett sejtek, a többi szubpopulációhoz hasonló sejtfelszíni mintázattal rendelkeznek, míg a tumorössejtekre jellemző fenotípus, csak speciális hypoxiás körülmények között jelenik meg.⁸

A hierarchikus elmélet tisztázatlansága miatt, manapság egyre nagyobb teret nyer a tumor-plaszticitás elmélete, amely a hierarchikus és a stochasztikus elmélet elemeit ötvözi.⁶ A modell alapja, hogy a daganatot alkotó sejtkolóniában vannak olyan szubpopulációk amelyek képesek változtatni az összejt- valamint nem-össejtállapotukat. Ezzel az elmélettel megmagyarázható, hogy a vizsgálati körülmények miért befolyásolják a tumor-össejtek jelenlétét, valamint hogy bizonyos tumorok esetén miért nem sikerült még összejt-szubpopulációt kimutatni.

2.2 Terápiás lehetőségek

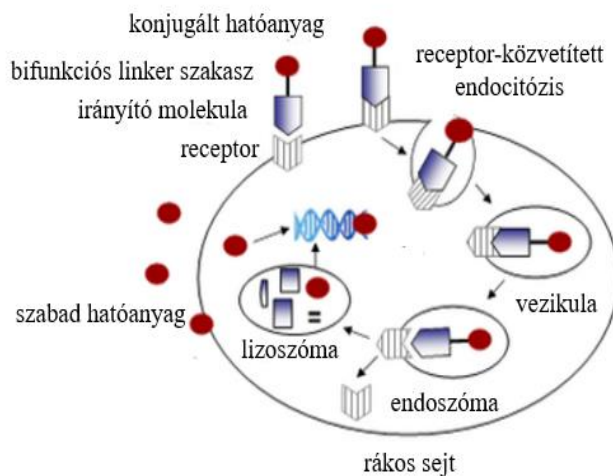
2.2.1 Műtéti beavatkozás. A különböző sebészeti eljárások széles körben alkalmazott módszerek a rákos elváltozásokkal szemben. Egy adott tumor operálhatósága sok esetben függ a daganat előrehaladottságától, elhelyezkedésétől, valamint a beteg állapotától is. A műtét során a sebészek nem csak a daganatot távolítják el a szervezetből, hanem a közeli egészséges szövetből is vágnak ki rétegeket, annak érdekében, hogy a lehető legalacsonyabbra csökkentsék az esetleges áttétek kialakulásának valószínűségét.⁹

2.2.2 Sugárterápia. A sugárterápia során a daganatos területet ionizáló sugárzással célozzák, amely az érintett sejtek örökítőanyagát károsítva, azok pusztulását okozza. A radioterápia egy rendkívül hatékony kezelési eljárás, ugyanakkor a gyakorlatban leginkább csak a tumor méretének csökkentésére, nem pedig annak elpusztítására alkalmazzák. Mindez azzal magyarázható, hogy az emberi szervezet egyes területei csak meghatározott mértékű sugárzást képesek elviselni. Ebből következik, hogy ha egy kezelés során eléri az adott testfelületre vonatkoztatott maximális dózist, azon a területen további sugárkezelés nem alkalmazható, a daganat kiújulása esetén sem.¹⁰

2.2.3 Kemoterápia. A kemoterápia napjainkban az egyik legelterjedtebben alkalmazott kezelési módszer. Az eljárás alapja, hogy a beteg szervezetébe olyan sejtmérgeket (ún. citosztatikumokat) juttatnak, amelyek a tumorsejtek elpusztítására vagy osztódási képességük megszüntetésére képesek. A daganatot képző sejtek rendkívül érzékenyek ezekre a gyógyszerekre, ugyanis fokozott osztódási mechanizmusaik miatt az extracelluláris térrel is aktívabb anyagtranszportot folytatnak, melynek eredményeként a hatóanyagot diffúzió során nagyobb mértékben veszik fel, mint a többi nyugalmi állapotban lévő sejt.

A kemoterápia rendkívül hatékony módszer olyan daganatok kezelésére, amelyek esetében a műtéti beavatkozás vagy a radioterápia nem lenne célravezető, például metasztázisok kezelése során. A módszer legnagyobb hátránya, hogy az említett hatóanyagok nem kizárólagosan a ráksejtekre szelektívek, hanem a keringési rendszer révén az egészséges szövetekbe is eljutva pusztítják az ott található aktív osztódásra képes sejteket is. Ezzel magyarázható, hogy a kemoterápia mellékhatásaként a betegek hajhullást, émelygést, valamint az immunrendszer gyengülését tapasztalhatják.¹¹

2.2.4 Irányított tumorterápia. Az irányított tumorterápia során, a kemoterápiás eljárások esetében alkalmazott citosztatikumokat szelektíven a tumorsejtekbe juttatják, ezáltal növelik hatékonyságukat, a szabad hatóanyaggal szemben (2. ábra). Mivel tumor-össejtek jelenléte a szubpopulációk között egyre inkább elfogadott elméletté válik, a modern terápiák a legtöbb esetben az össejtpopulációk elpusztítására fektetik a hangsúlyt. Ebből kifolyólag az irányított tumorterápia esetén is igyekeznek olyan módszereket kifejleszteni, amelyek kifejezetten a tumor össejteket célozzák.¹²



2. ábra – Az irányított hatóanyag célbajuttatásának folyamata¹³

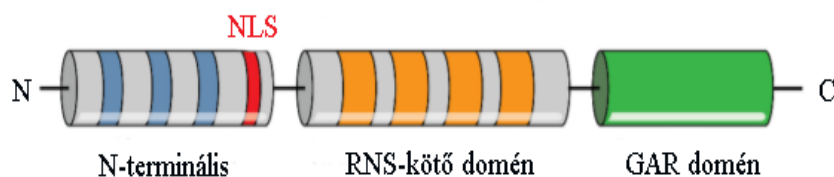
Az eljárás során gyakran antitesteket, valamint kisebb peptideket alkalmaznak irányító molekulaként. A gyakorlati alkalmazásban a peptid-hatóanyag konjugátumok egyre nagyobb teret nyernek, ugyanis könnyen és olcsón előállíthatók, valamint az antitestekkel ellentétben nincs immunogén hatásuk. A peptid-hatóanyag konjugátumok alapvetően három részből épülnek fel: a daganatot elpusztító *hatóanyagból*, a gyógyszermolekulát a tumorsejtekhez szállító *irányító molekulából*, valamint az előző két egységet összekapcsoló *bifunkciós linker szakaszból*.¹² Az irányító szakasz feladata, hogy felismerje a tumor sejtek által nagyobb mértékben expresszált, de az egészséges sejtekre nem jellemző receptorokat, ezzel minimalizálva a lehetséges mellékhatások kockázatát. A hatóanyag molekula, egy olyan citotoxikus anyag, amely a sejtbe jutva megváltoztatja annak sejtbiológiai mechanizmusait (génexpresszió befolyásolása, enzimatikus folyamatok gátlása stb.) ezáltal elpusztítja azt. A bifunkciós linker szakasz pedig amellett, hogy kapcsolatot teremt a két funkcionális egység között, fontos szerepet játszik abban, hogy a hatóanyag a sejtben belül megfelelő körülmények között szabaduljon fel.

2.3 A nucleolin fehérje

A hatóanyag irányított célbajuttatásához elengedhetetlen az olyan sejtfelszíni receptorok meghatározása, amelyek az irányító molekulát egyértelműen a kiválasztott célponthoz vezetik.

Manapság az egyik legnagyobb mértékben kutatott tumormarker a nucleolin fehérje, amelyet először Novikoff-hepatóma vizsgálata során mutattak ki.¹⁴

A nucleolin fehérjét szerkezeti szempontból három nagy egységre bonthatjuk (3. ábra). Az *N-terminális domén* belül, több savas karakterű régiót különíthetünk el, amelyeket bázikus szakaszok választanak el egymástól. Ez a szerkezeti mintázat lehetővé teszi, hogy a molekula a H1 hiszton fehérjéhez kapcsolódva, a sejt transzkripció folyamatát befolyásolja. A molekula centrális régiójában elhelyezkedő *RNS-kötő domén* a pre-riboszomális RNS transzlációjának szabályozásáért felelősek, míg a C-terminálison található GAR-domén legfőbb szerepe a különböző fehérjék közötti interakció kialakítása.¹⁴



3. ábra – A nucleolin molekula szerkezete ⁵

A szerkezeti sajátosságok, valamint a sejtbiológiai vizsgálatok során megállapították, hogy a fehérje jelenléte elengedhetetlen a sejtciklus zavartalan működéséhez, hiszen részt vesz a pre-riboszomális RNS szintézisének és transzlációjának szabályozásában, valamint a riboszómák érési és összeszerelődési mechanizmusainak irányításában is.¹⁵

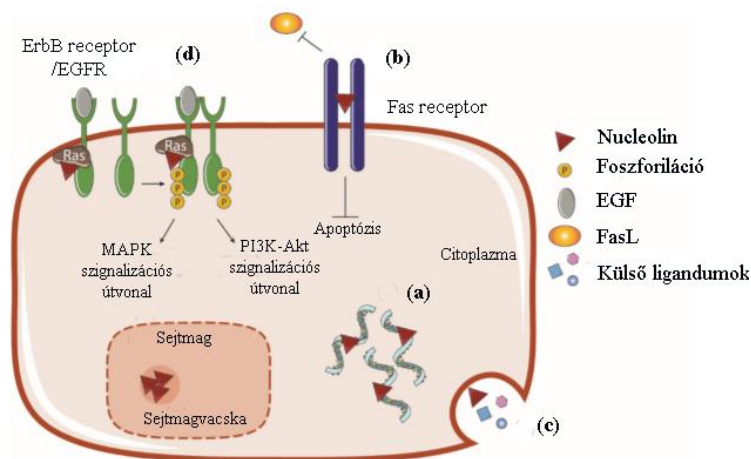
A nucleolin fehérje jellemzően az aktívan osztódó sejtek sejtmagvacskájában valamint citoplazmájában jelenik meg. Tumor-össejteknek vélt populációk vizsgálata során, ugyanakkor kimutatták a fehérjét a sejtfelszínen is, ezáltal a nucleolin molekula az irányított tumorterápia egyik kulcs molekulájává vált.⁵

2.3.1 A nucleolin fehérje és a tumorgenezis kapcsolata. A nucleolin fehérjének rendkívül fontos szerepe van az aktívan osztódó sejtek homeosztázisának szabályozásában, így ha genetikai mutáció hatására a molekula mennyisége megnövekszik egy sejtben, az több folyamat során is erősítheti a tumorgenezist.

Abban az esetben, ha a nucleolin fehérjék nagy mértékben felszaporodnak egy adott sejtben, képesek bizonyos sejtmembrán receptorokhoz kötődni, befolyásolva azok működését (4. ábra). A hám eredetű növekedési faktor receptorok (EGFR - epidermal growth factor receptor), olyan transzmembrán receptorok, amelyek a sejt növekedésével, valamint génexpressziós folyamatainak szabályozásával kapcsolatos mechanizmusokat befolyásolják. A nucleolin fehérje az EGFR-hez kapcsolódva megakadályozza annak lebomlását, ligandum-független sejtnövekedést eredményez.¹⁶

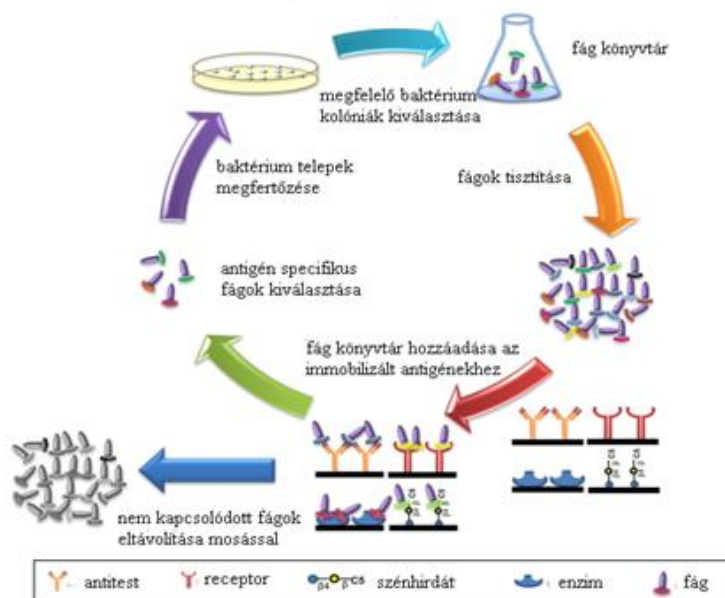
A Fas receptor család a szervezet felől érkező apoptotikus információ továbbításában játszik szerepet. A nucleolin fehérje Fas receptor antagonistaként, csökkenti a sejt szenzitivitását a szervezet felől érkező apoptotikus jelekre¹⁷ (4. ábra).

Mindezek mellett pedig, a nucleolin molekuláról különböző antitest vizsgálatok segítségével kimutatták, hogy nem csak a sejtmagvacskában és a citoplazmában található meg, hanem bizonyos körülmények között a tumorsejt membránján is előfordul¹⁸ (4. ábra). Ehhez a sejt felszíni nucleolin receptorhoz kapcsolódva olyan külső faktorok kerülhetnek a sejtbe, amelyek szerepet játszanak a tumor kialakulásában, valamint segítik a daganatot ellátó érrendszer kialakulását (angiogenezis)⁵.



4. ábra – A nucleolin molekula szerepe a tumorképződés mechanizmusában⁵

2.3.2. Az F3 peptid. Annak érdekében, hogy az irányított tumorterápia a lehető leghatékonyabb legyen, olyan hordozó molekulák szerkezetét kell meghatározni, amelyek képesek az elpusztítani kívánt sejtekhez szelektíven kapcsolódni. Az ilyen molekulák meghatározásához az ún. fágbemutató módszer alkalmazták (5. ábra). Az eljárás alapja, hogy különböző peptideket kódoló DNS-szakaszokat, géntechnológia segítségével, bakteriofág vírusok burokképletét kódoló génszakaszhoz kapcsolják, így a vizsgált peptid megjelenik a fág burokképletében. A módszer során számos variáns hoznak létre, s ezeket egy olyan közegbe juttatják, ahol a vizsgálni kívánt sejtfelszíni molekulák immobilizált formában vannak jelen. A mosási lépés során azok a fágok amelyek fehérje burokképletében nem tartalmaztak olyan fehérjét amely a vizsgált célmolekulához kötődni tudott volna kikerülnek a rendszerből. A megkötődött, funkcióképes fágokat izolálják, majd baktériumtenyészetek segítségével felszaporítják. A felszaporított fágok DNS szekvenálást követően pedig meg tudják határozni a receptorba illeszkedő peptid szerkezetét.¹⁹



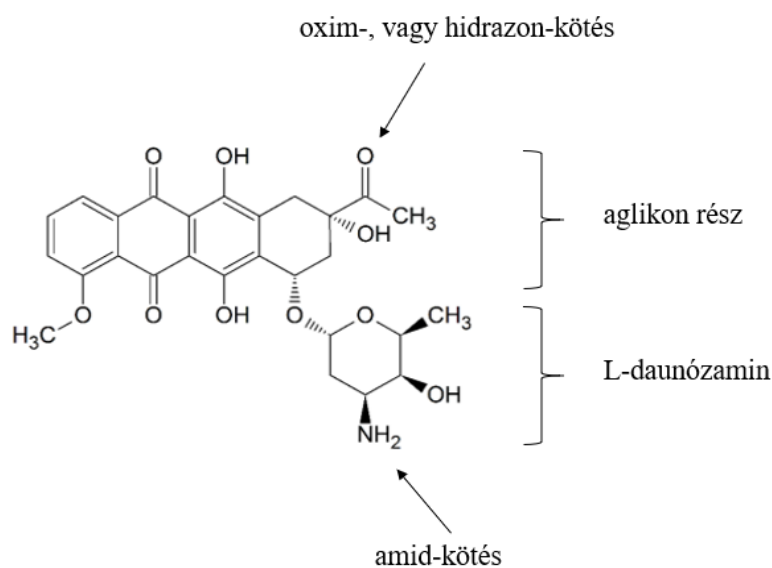
5. ábra – Fág könyvtár létrehozásának mechanizmusa¹⁹

Az F3 peptid szerkezetét hasonló fágbemutató eljárás segítségével határozták meg. Az F3 peptid egy 31 aminosavból álló (¹KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK³¹) erősen bázikus karakterű molekula, amely szelektíven képes a tumorsejtek membránján expresszált nucleolin fehérjéhez kapcsolódni.²⁰ Fluoreszcens vizsgálatok segítségével, több esetben is kimutatták az F3 peptidet olyan tumorsejtek sejtmagjában, amelyek felszínükön nucleolin fehérjét

expresszáltak,²¹ míg a sejtfelszíni nucleolinnal nem rendelkező sejtek esetében, ilyen F3 felvételi folyamatot nem tudtak kimutatni. Ebből arra következtethetünk, hogy tumorsejtek membránjában elhelyezkedő nucleolin fehérje valamilyen transzport folyamatban is szerepet játszik a tumorsejt membránja és sejtmagja között, s ebből kifolyólag az F3 peptid rendkívül hatékony irányító molekulának ígérkezik, a tumor-össejtek eliminálására fókuszáló módszer kifejlesztéséhez.

2.4 Daunomicin

A daunomicin, vagy más néven daunorubicin egy antibiotikum alapú citotoxikum, amelyet először a *Streptomyces peucetius* baktérium szekrétumaként mutattak ki. A molekula alapvetően két szerkezeti egységből épül fel: egy pigmentált aglikon molekulából, amelyhez egy amino-cukor, az L-daunózamin kapcsolódik glikozidos kötéssel²² (6.ábra).



6. ábra – A daunomicin szerkezete, és konjugálható funkciós csoportjai

A daunomicin molekula képes a DNS kettős hélixébe interkalálódni, és képes egy stabil komplexet kialakítani az örökítőanyagot felépítő nukleinsavak bázispárjaival (G-C bázispár). Ezzel megakadályozza a DNS replikáció során topoizoméráz II enzimátikus működését. A topoizoméráz II a replikáció során kialakult szuperspiralizáció megszüntetéséért felelős enzim. Az enzim a szuperspiralizáció megszüntetésére kettős száltöréseket alakít ki, majd ezt követően ezeket összekapcsolja.²³ Abban az esetben, ha a daunomicin kapcsolódik a DNS kettős hélixhez, ez a

ligációs lépésnem történik meg, így két szálú törések maradnak az örökítőanyagban amely a sejt apoptózisához fog vezetni. A daunomicin rendkívül hatásos kemoterápiás szer, ugyanakkor hasonlóképpen a többi citotoxikumhoz, az egészséges aktívan osztódó sejteket is nagy mértékben pusztítja. Emellett pedig mellékhatásként kimutatták, hogy a hatóanyag a szívizomsejtekre is toxikus hatással van, így nagy mennyiségben alkalmazva akut vértolulósos szívelégtelenséget okozhat.²²

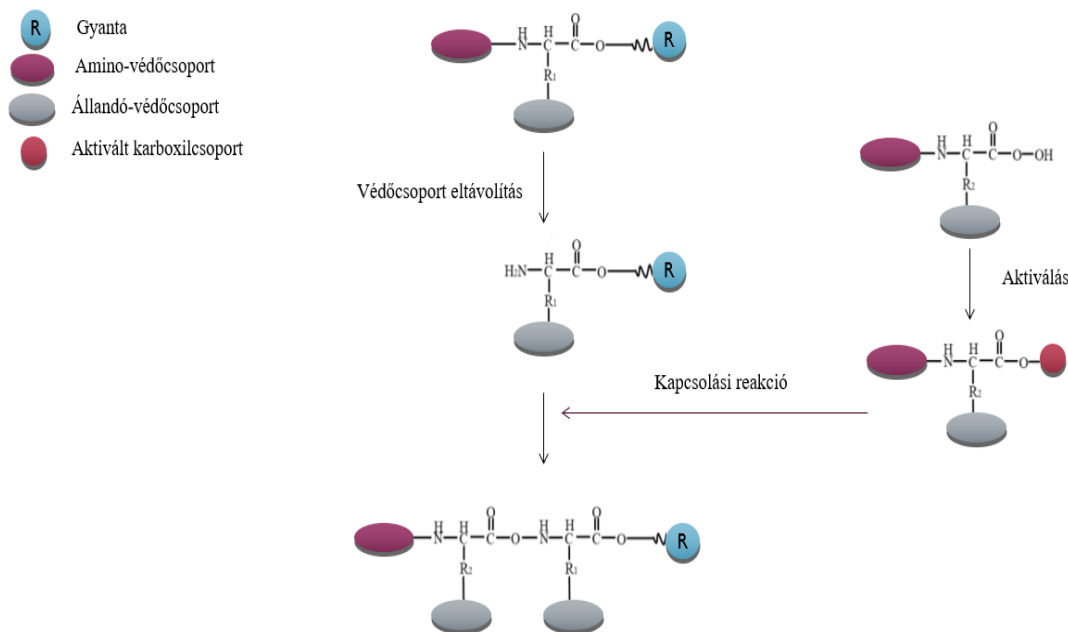
3. Alkalmazott módszer

3.1 Peptidszintézis

A peptidszintézisnek alapvetően két eljárását különböztethetjük meg: a manapság elterjedtebben használt szilárdfázisú, valamint a kissé háttérbe szoruló oldatban végzett peptidszintézist. Az oldat szintézis ugyan olcsó eljárásnak számít, de a szintézis folyamata rendkívül időigényes, valamint az egyes kapcsolási lépéseket követően a terméket izolálni kell, amely egy hosszabb peptid esetén jelentős anyagvesztéssel jár.

A szilárdfázisú peptidszintézis eljárásnak kidolgozása Bruce Merrifield, amerikai biokémikus nevéhez fűződik.²⁴ Habár a szilárdfázisú szintézis, a nagymértékű reagens felesleg miatt drágább eljárás, mint az oldatban végzett szintézisek, mégis egyre nagyobb teret nyer a gyártási folyamatok során. A szilárdfázisú szintézis előnyeikhez tartozik a gyors szintézis út, a rendkívül jó arányú kitermelés, valamint, hogy sok esetben nem szükséges manuálisan végezni a folyamatokat, hanem automata szintetizátorokkal is elkészíthető a kívánt peptid.

3.1.1 Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS). A szilárdfázisú eljárás fő jellemzője, hogy a szintézist egy szilárd halmazállapotú, stabil porózus polimer gyanta felületén végezzük. Mivel az aminosavak legalább bifunkciós vegyületek, ezért a kapcsolási reakciók során alapvetően többféle termék is keletkezhet. Annak érdekében, hogy a szintézis során meghatározott szerkezetű végterméket kapjunk, az egyes aminosavak megfelelő funkciós csoportjait védőcsoportokkal kell ellátni. A szintézis kezdetén a peptid C-terminálisán lévő első aminosavat a karboxilcsoportján keresztül, stabil kovalens kötéssel a hordozó gyantához kapcsoljuk.²⁵ Ezt követően lépésenként kapcsoljuk az egyes aminosavakat a gyantán épülő szekvenciához. A ciklikusan ismételt kapcsolási reakciók alapvetően két elemi lépésre bonthatók (7. ábra). A ciklus első lépéseként eltávolítjuk a gyantán épülő peptid N-terminális aminosavának aminocsoportján található ideiglenes védőcsoportot, majd a második lépés során ehhez a szabad aminocsoporthoz hozzákapcsoljuk a következő, karboxilcsoportján aktivált, aminocsoportján pedig védett aminosavat. A ciklus két lépését mindaddig ismételjük, amíg el nem készül a kívánt peptid.



7. ábra – A szilárdfázisú peptidszintézis folyamata

Az oldat szintézissel ellentétben, a szilárdfázisú szintézis során nincs lehetőség a reakciókat követően az egyes termékek izolálására, így a reakciók során törekedni kell a 100%-os konverzióra. Ennek elérése érdekében a reakciók során a gyanta kapacitásához mérten 3-5 ekvivalens feleslegben kell a reakcióelegyhez adnunk az egyes aminosavszármazékokat.

A nagy mértékű reagens felesleg miatt, bizonyos aminosavak esetében nem csak az aminocsoportot, hanem az oldalláncon található funkciós csoportot is védőcsoporttal kell ellátni. Ezek az oldallánc védőcsoportok stabilak maradnak az egyes reakcióciklusokban végzett hasítási lépésekkel szemben, így a szintézis folyamán mindvégig az oldalláncon maradnak, ezáltal megakadályozzák a különböző melléktermékek képződését.

A kapcsolási reakció továbbá csak akkor tud maradéktalanul végbemenni, ha a kapcsolni kívánt aminosav karboxilcsoportját aktiváljuk. Az egyik legelterjedtebb ilyen módszer az *in situ* aktív észteres kapcsolás, melynek során aktiváló szerek segítségével az aminosavszármazék aktív észter formáját alakítjuk ki, amely a szabad aminocsoporttal reagálva alakítja ki a peptidkötést. A gyakorlatban leginkább alkalmazott aktiváló szerek a diizopropil-karbodiimid (DIC), valamint a 1-hidroxibenzotriazol (HOBt).

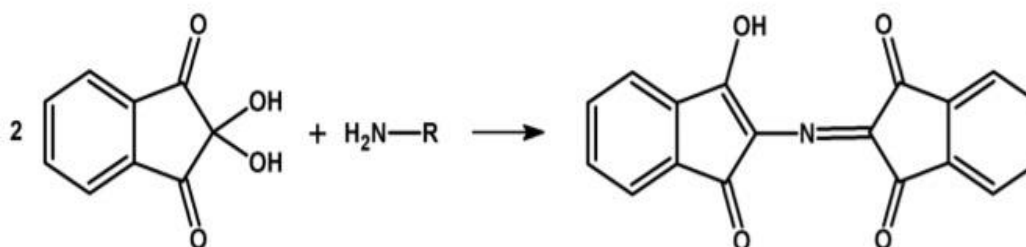
A szintézis befejeztével, az elkészült peptidet lehasítjuk a gyantáról. A hasítóelegyet úgy választjuk meg, hogy ne csak a szekvenciát távolítsuk el a gyantáról, hanem az egyes aminosavak oldalláncain lévő állandó védőcsoportokat is le tudjuk hasítani egyetlen lépésben. A hasítási lépést követően a kapott termék még tartalmazhat az elkészíteni tervezett szekvenciához nagyon hasonló, de hiányos elemeket, így a kapott terméket még tisztítani kell. Ehhez, a modern elválasztási eljárások közül a nagy hatékonyságú folyadék kromatográfiát (RP-HPLC) alkalmazzák, az elválasztott komponensek közül pedig, a tiszta termék azonosítására tömegspektrometriás módszereket lehet alkalmazni.

3.1.2 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái. A szilárd fázisú szintézisen belül, az alkalmazott védőcsoportok alapján, két féle stratégiát különböztethetünk meg. A Boc/Bzl stratégia során²⁶, az aminocsoport ideiglenes védőcsoportjaként *tert*-butiloxikarbonil (Boc) csoportot alkalmaznak, míg az egyes aminosavak oldalláncait benzil-típusú (Bzl) csoportokkal védik. A Boc-csoport középérős savakra érzékeny, így 33% TFA/DCM eleggyel az ideiglenes védőcsoport eltávolítható. A Boc-csoport hasítása során reaktív *tert*-butil kationok szabadulnak fel, amelyek az olyan érzékeny aminosavakat, mint a cisztein, metionin vagy a triptofán mellékreakció során alkilezni képesek, így abban az esetben, ha a szintetizálandó szekvencia tartalmazza a fenti aminosavak valamelyikét a Boc/Bzl stratégia alkalmazása nem ajánlott. Az Fmoc/^tBu stratégia²⁷ kevésbé érzékeny reakciókörülményeket igényel, így egyre inkább elterjedt a laboratóriumi alkalmazásban. Az aminocsoport ideiglenes védőcsoportjaként, bázisokra (elsősorban szerves szekunder aminokra) érzékeny 9-fluoroenil-metoxikarbonil (Fmoc) csoportot, az oldalláncok védelmére bázisokkal szemben stabil, savakra pedig érzékeny *tert*-butil típusú (^tBu), védőcsoportokat alkalmaznak. Az Fmoc csoport lehasítása 2% piperidint valamint 2% 1,8-diazobiciklo[5.4.0]-undek-7-én-t (DBU) tartalmazó *N,N*-dimetilformamid (DMF) oldattal történhet. Az Fmoc/^tBu stratégia során a peptid hasítása a gyantáról trifluoroecetsavat tartalmazó reakcióeleggyel történik, ugyanis így egy lépésben a ^tBu védőcsoportokat is el tudjuk távolítani. A savas közeg révén, a hasítási reakció során is felszabadulhatnak reaktív karbokationok, így az esetleges mellékreakciók elkerülése érdekében, a reakcióelegybe ezeket semlegesítő, ún. gyökfogóként funkcionáló komponenseket is teszünk (pl. víz, triizopropilszilán).

3.1.3 A gyanta. A szintézishez alkalmazott gyanták szilárd halmazállapotú, oldhatatlan polimerek. A gyanta típusától függően különböző funkciós csoportok lehetnek a felszínén, amely lehetővé teszi, hogy az első aminosavat stabilan hozzá kapcsoljuk. Egy gyanta csak abban az esetben alkalmazható a szintézis során, ha megfelelő kémiai és mechanikai stabilitással rendelkezik, valamint jól képes duzzadni az alkalmazott oldószerben. Ezen felül pedig elengedhetetlen fontosságú, hogy a gyanta és a szintetizálandó peptid között stabil kölcsönhatás alakuljon ki, amelyet viszont a hasítási reakció során könnyen fel lehet bontani.²⁴

A szilárdfázisú peptidszintézis eljárásának megalkotásakor a legelterjedtebben alkalmazott gyanta, a polisztirol-1,4-divinilbenzol kopolimer volt (Marrifield-gyanta). A módszer fejlesztésének eredményeként, manapság már számos különböző funkciós csoporttal ellátott gyantát alkalmazhatunk a szintézis során. A legelterjedtebben alkalmazott szilárd hordozók közé sorolhatók a 4-metil-benzhidrilamin (MBHA) típusú gyanták, valamint a 4-metoxi-benzilalkohol funkciós csoportot hordozó Wang gyanták.

3.1.4 Kapcsolási reakciók sikerességének követése. A szilárdfázisú szintézis során az egyes kapcsolási lépéseket követően, nincs lehetőség a termékek izolálására, más módot kell választani arra, hogy ellenőrizzük a reakció sikerességét. A Kaiser-teszt²⁸ alapja, hogy a ninhidrin szabad primer aminocsoportok jelenlétében kék színreakciót ad (7. ábra).



8. ábra – Ninhidrin-hidrát reakciója a szabad aminocsoporttal

A teszt során néhány szem gyantát a tesztcsőbe teszünk, majd kálium-cianát, fenol, valamint ninhidrin oldatokat adunk hozzá, és kb. 3 percen át 103-105 °C-os hőmérsékleten tartjuk. A három perc elteltével megvizsgáljuk az oldatot, valamint a gyantaszemeket. Amennyiben kék

elszíneződést tapasztalunk az, azt jelenti, hogy a rendszerben szabad primer aminocsoportok vannak jelen, vagyis a reakció sikertelen volt, így a kapcsolást újra el kell végezni. Ha a gyantaszemek és az oldat színe is sárga marad, a reakció sikeres volt.

A prolin esetében viszont a Kaiser-teszt nem működik, ugyanis a prolin aminocsoportja egy szekunder amin, így ha reakcióba is lép a ninhidrinnel, színreakciót nem fogunk tapasztalni. A prolinhoz történő kapcsolás sikerességét ezért izatin-teszttel mutatjuk ki. A teszt elvégzése gyakorlatilag megegyezik a Kaiser-teszt kivitelezésével, annyi különbséggel, hogy ninhidrin helyett a reakcióelegybe pár csepp izatint cseppentünk. Abban az esetben, ha a kapcsolási reakció sikertelen volt, a gyantaszemek barnára színeződnek, sikeres reakció esetében pedig narancssárgák maradnak.²⁹

4. Célkitűzések

A munkám célja volt, egy olyan peptidalapú irányítómolekula tervezése, amely a későbbiekben egy új fajta irányított tumorterápia kifejlesztésének alapja lehet. A terápiás eljárás hatékonyságának növelése érdekében, úgy gondoltuk, hogy olyan sejtfelszíni markert érdemes célozni, amelyek a tumoros sejteknek vélt szubpopulációkon jellemzően előfordulnak. Ilyen sejtfelszíni molekula a nucleolin fehérje is, melyhez az F3 peptid szelektíven képes kapcsolódni. A 31 aminosavat tartalmazó peptid alkalmazása hordozóként nem túl költségkímélő, de egy fragmens kivételével az F3 peptid rövidebb fragmenseit nucleolin felismerés szempontjából még nem vizsgálták.

A munkám során célul tűztem ki:

- Az F3 peptid szintézise nyolc átlapoló decapeptid formájában, annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a molekulában hol található, a kötődés szempontjából kritikus motívum.
- Az egyes decapeptidek hosszabbítása GFLG tetrapeptiddel. Ezt a tetrapeptidet a tumor sejt lizoszómájában található katepszin-B szelektíven képes hasítani, így elérhető, hogy a hatóanyag aktív metabolitja szelektíven, a tumor sejten belül szabaduljon fel.
- Az egyes szekvenciák konjugálása daunomicin hatóanyaggal aminooxiacetsav linker segítségével kialakított oxim-kötésen keresztül.
- Az egyes konjugátumok szerkezetének meghatározása cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával, szerkezet hatás összefüggések céljából.
- Az egyes konjugátumok *in vitro* citotoxicitásának vizsgálata tumorsejteken.
- Az *in vitro* sejtbiológiai vizsgálatok alapján hatékonynak talált szekvenciák szerkezetének további optimalítása alanin-szkennelés módszerével.
- Az alanin-szken során elkészített konjugátumok további sejtbiológiai vizsgálat, hogy megállapítsuk, azokat a pozíciókat, ahol az aminosavak cserélhetők (pozíció szkennelés módszerrel) – akár nem természetes aminosavakra – a peptid irányító hatékonyságának illetve plazmastabilitásának növelése érdekében.

5. Eredmények

A munkám során a célkitűzéseknek megfelelően, az F3 peptid szerkezetének optimalizálására törekedtem, annak érdekében, hogy egy tumor-összett populációval szemben is minél hatékonyabb irányító molekulát hozzak létre. Ennek érdekében szintetizáltam nyolc átlapoló dekapeptidek, amelyek így lefedik az F3 peptid teljes szekvenciáját, majd az egyes szekvenciákhoz GFLG spacer szakaszt, valamint izopropil védett aminosavszármazékot kapcsoltam. A daunomicin hatóanyagot kemoselektív ligációs eljárással az aminosavszármazék linkerén keresztül oxim-kötés kialakításával konjugáltam az egyes szekvenciákhoz. Az így elkészült konjugátumok *in vitro* citotoxicitását vizsgáltuk, amelyek alapján az N-terminális dekapeptidből készült Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRSAR-NH₂ konjugátum tumorelles hatása nagyban felülmúlta a többi hatóanyag konjugátum hatékonyságát.

Ezt követően a fent említett konjugátum irányító peptid szakaszán alanin-szkennelést végeztem a nucleolin kötődés szempontjából kritikus régiók megállapítására, amelyhez ismét *in vitro* citotoxicitás vizsgálatokat végeztünk. Az eredmények azt mutatták, hogy az 1. és 8. pozícióban a Lys illetve Ser kicserélve alaninnal még fokozta is a citotoxikus hatást, míg a 6. és 7. pozícióban nem szükséges a bázisos arginin jelenléte. Legkevesbé a ²DEQP⁵ szekvencia részlet változtatható, így fontos szerepet játszhat a nucleolin fehérjéhez való kötődésben.

5.1 Az átlapoló dekapeptidek, GFLG-tetrapeptiddel kapcsolt aminosavszármazékának szintézise

Az egyes dekapeptid származékokat szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő, Fmoc/^tBu stratégia alkalmazása mellett. A szintézishez szilárd hordozóként Rink Amid MBHA-gyantát alkalmaztam, annak érdekében, hogy a hasítást követően savamid C-terminálissal rendelkező peptidet kapjak. Első lépésként a gyantán található Fmoc védőcsoport hasításához 2% piperidin, 2% DBU / DMF összetételű elegyet alkalmaztam. Ezt követően a kapcsolási reakció során, az aminosavszármazékból, valamint az aktiváló szerekből (HOBt, DIC) a gyanta kapacitás alapján számolt három ekvivalens mennyiséget adtam a gyantához. A reakció sikerességét követően a hasítási és kapcsolási lépéseket ciklikusan alkalmazva elkészítettem az átlapoló peptideket. Egy-egy dekapeptid szintézisét követően, az egyes szekvenciákhoz Gly-Phe-Leu-Gly-aminosavakból álló enzimlabilis távtartó szakaszt építettem, majd az N-terminálissal, izopropilidén-védett aminosavszármazékkal (>=Aoa) zártam. Az >=Aoa kapcsolása során szintén a gyanta kapacitásnak megfelelő 3 ekvivalens mennyiséget mértem be, mind az általunk készített >=Aoa-ból, mind pedig

a kapcsolószerként alkalmazott HOBt-ből és DIC-ből is. A szintézis során elkészített szekvenciákat az 1. táblázat foglalja össze

1. Táblázat – Az F3 peptid átlapoló szekvenciái

Kód	Szekvencia
B1	$\geq$ Aoa-GFLG-KDEPQRRSAR-NH ₂
B2	$\geq$ Aoa-GFLG-PQRRSARLSA-NH ₂
B3	$\geq$ Aoa-GFLG-RSARLSAKPA-NH ₂
B4	$\geq$ Aoa-GFLG-RLSAKPAPPK-NH ₂
B5	$\geq$ Aoa-GFLG-AKPAPPKPEP-NH ₂
B6	$\geq$ Aoa-GFLG-APPKPEPKPK-NH ₂
B7	$\geq$ Aoa-GFLG-KPEPKPKKAP-NH ₂
B8	$\geq$ Aoa-GFLG-PKPKKAPAKK-NH ₂

5.2 Az elkészített szekvenciák feldolgozása

A szintézis befejeztével az elkészült peptideket eltávolítottam a gyantáról. A hasítási reakcióhoz használt elegyet, oly módon választottam meg, hogy a peptid gyantáról történő hasítása, valamint az állandó-védőcsoportok eltávolítása egy lépésben történjen meg. Az B1-B4 szekvenciák esetében a Pbf-védett arginin tartalom miatt a fenol/H₂O/EDT/tioanizol/TFA összetételű hasítóelegyet alkalmaztam. Az B5-B8 szekvenciák esetében pedig TFA/H₂O megfelelő arányú elegyével távolítottam el a peptidet a gyantáról. A hasítást követően a reakcióelegyet dietil-éterbe szűrtem, ahol az elkészített nyers peptid kicsapódott. A centrifugálást követően a kapott terméket acetonitril-víz elegyében oldottam, majd fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával tisztítottam (RP-HPLC). A kromatográfia során kapott termékek közül a vizsgálni kívánt peptidet pedig tömegspektrometriával azonosítottam.

5.2 Az izoporopilidén védelem eltávolítása

A konjugálási reakció előtt, a megtisztított peptidről eltávolítottam az izopropil védelmet. A megtisztított peptidből ammónium-acetát oldat felhasználásával 1 mg/ml koncentrációjú oldatot

készítettem. A reakcióelegyhez 3 ekvivalensnyi szilárd metil-hidoxilamint adtam, majd ezt követően fél órán keresztül, 35 °C-on kevertettem. A reakcióidő lejártát követően, a mintát HPLC segítségével megtisztítottam, a kapott termékek közül az izopropil-védőcsoport mentes peptideket tömegspektrometria segítségével meghatároztam.

5.3 Peptidszármazék konjugálása daunomicinnel

Az izopropil-védelem hiányában, a szabad aminooxiecetsav véggel rendelkező peptidszármazékok érzékenyek az oxovegyületekre (aldehidek, ketonok), így az eljárást acetons mentes környezetben végeztem. A peptidszármazékhoz megfelelő mennyiségű daunomicint adtam, majd az keveréket kevés ammónium-acetát oldatban oldottam. A reakcióelegyet 2 napon keresztül 35°C-on kevertettem, majd félpreparatív HPLC segítségével elválasztottam a kapott termékeket. A termékek azonosítására tömegspektrometriával történt, az egyes termékek tisztaságát pedig analitikai-HPLC-vel vizsgáltam. Az elkészített konjugátumok jellemzőit a 2. táblázat tartalmazza. (Spektrumok és kromatogramok a Függelékben megtekinthetők.)

2. Táblázat – Az elkészített szekvenciák daunomicin konjugátumai

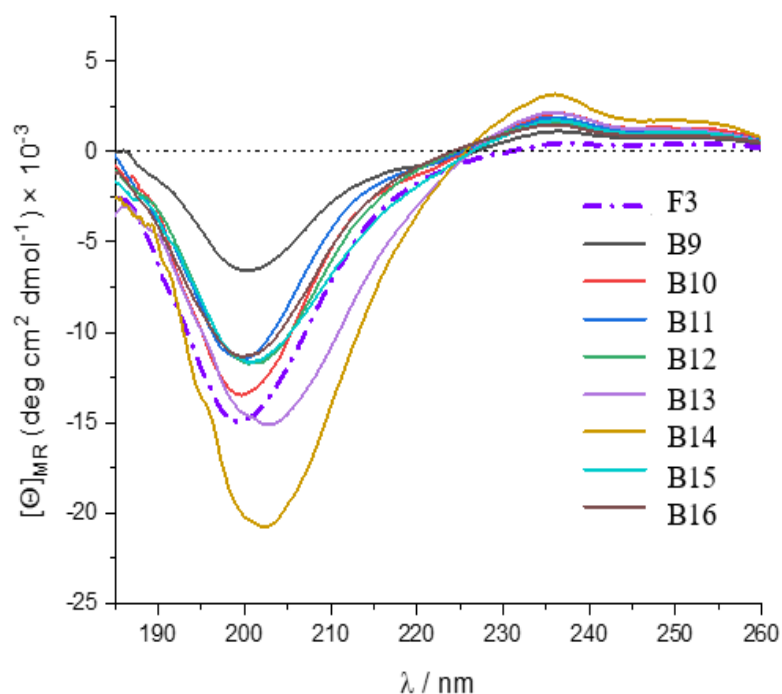
Kód	Szekvencia	M _{sámolt} (Da)	M _{mért} (Da) ¹	R _t (min) ²
B9	Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRSAR-NH ₂	2198,4	2198,1	21,08
B10	Dau-Aoa-GFLG-PQRRSARLSA-NH ₂	2097,3	2097,1	21,08
B11	Dau-Aoa-GFLG-RSARLSAKPA-NH ₂	2012,3	2012,0	21,75
B12	Dau-Aoa-GFLG-RLSAKPAPPK-NH ₂	2020,3	2020,1	22,01
B13	Dau-Aoa-GFLG-AKPAPPKPEP-NH ₂	1987,2	1987,0	21,97
B14	Dau-Aoa-GFLG-APPKPEPKPK-NH ₂	2044,3	2044,1	21,80
B15	Dau-Aoa-GFLG-KPEPKPKKAP-NH ₂	2075,4	2075,1	21,22
B16	Dau-Aoa-GFLG-PKPKKAPAKK-NH ₂	2048,4	2048,1	21,07

¹ Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus; mód: pozitív; áramlási sebesség: 10 µl / perc; minta adagolás: folyamatos; mérési tartomány: 50-2000 m/z

² KNAUER RP-HPLC; oszlop: C18 10 µm, 100 Å, 20 x 250mm; eluensek: A eluens [0,1% TFA/H₂O], B eluens [0,1% TFA, 80% acetonitril/H₂O]; gradiens: 0 perc: 2% B - 5 perc: 2% B - 30 perc: 90% B; áramlási sebesség: 16 ml/perc; detektálás: λ=220 nm

5.4 Az átlapoló decapeptid származékok vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával

A szerkezet-hatás összefüggések meghatározására, az egyes szekvenciák szerkezetét cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával vizsgáltuk. A mérési eredmények alapján (8. ábra) a peptid-származékok alapvetően rendezetlen szerkezetet mutatnak, enyhe rendezettséget az B5 és B6 szekvencia esetében figyeltünk meg. Ez a rendezettség a szekvenciákban található 5-5 prolin aminosav által kialakított poliprolin II konformációval magyarázható. A mérés során feltüntetett F3 kódú konjugátum (Dau-Aoa-KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK-NH₂) előállítását az 5.1 – 5.4 pontokban feltüntetett protokolloknak megfelelően történt a laboratóriumon belül, egy másik hallgató munkájának keretében.



9. ábra – Daunomicin konjugátumok CD-spektroszkópia vizsgálatának eredménye

5.5 A konjugátumok *in vitro* citotoxicitási vizsgálata

A konjugátumok IC₅₀ hatását A2059 típusú humán melanóma valamint HT29 humán kolorektális adenokarcinóma sejteken vizsgáltuk. A mérések során a B1 peptiszármazékból készített B9-es kódú konjugátum bizonyult a leghatékonyabbnak, míg a többi konjugátum esetében pedig közepes, vagy gyenge hatékonyságot állapítottunk meg. A vizsgálat során mért értékeket a 3. táblázat tartalmazza. A mérés során feltüntetett F3 kódú konjugátum (Dau-Aoa-KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK-NH₂) előállítás az 5.1 – 5.4 pontokban feltüntetett protokolloknak megfelelően történt a laboratóriumon belül, egy másik hallgató munkájának keretében.

3. táblázat – A konjugátumok in vitro citotoxicitásának adatai

Kód	Citotoxicitás (IC ₅₀ μ M) A258	Citotoxicitás (IC ₅₀ μ M) HT-29
F3	18,4 $\pm$ 4,0	28,0 $\pm$ 18,0
B9	14,4 $\pm$ 4,0	14,7 $\pm$ 2,9
B10	32,6 $\pm$ 7,1	35,4 $\pm$ 1,0
B11	> 100	> 100
B12	47,0 $\pm$ 0,6	43,9 $\pm$ 3,5
B13	53,0 $\pm$ 1,1	48,1 $\pm$ 13,0
B14	31,5 $\pm$ 1,3	31,0 $\pm$ 9,9
B15	65,0 $\pm$ 11,5	61,3 $\pm$ 20,0
B16	42,2 $\pm$ 6,4	63,5 $\pm$ 5,4

IC₅₀ érték meghatározása MTT-teszttel.

5.6 A B1 peptidszármazék alanin-szken változatainak szintézise

Az alanin-scan során az egyes dekapeptid származékokat az 5.1 pontban levezetett protokollnak megfelelően állítottam elő. Az elkészített szekvenciák a 4. táblázatban láthatók. Összesen kilenc peptidszármazékot készítettem, mivel az irányító peptid szekvenciájának 9. pozíciójában eredetileg is alanin található, így ott nem végeztem aminosav cserét.

4.táblázat – Az B1 kódú szekvencia alanin-szkenje során elkészített szekvenciák

Kód	Szekvencia
B17	>=Aoa-GFLG-KDEPQRRSAA-NH ₂
B18	>=Aoa-GFLG-KDEPQRRRAAR-NH ₂
B19	>=Aoa-GFLG-KDEPQRASAR-NH ₂
B20	>=Aoa-GFLG-KDEPQARSAR-NH ₂
B21	>=Aoa-GFLG-KDEPARRSAR-NH ₂
B22	>=Aoa-GFLG-KDEAQRRSAR-NH ₂
B23	>=Aoa-GFLG-KDAPQRRSAR-NH ₂
B24	>=Aoa-GFLG-KAEPQRRSAR-NH ₂
B25	>=Aoa-GFLG-ADEPQRRSAR-NH ₂

5.7 Az B1 peptidszármazék alanin-szken változatainak feldolgozása

A szintézis végeztével az elkészült peptideket eltávolítottam a gyantáról. A hasításhoz használt reakcióelegyet oly módon választottam meg, hogy a peptid gyantáról történő hasítása, valamint az állandó-védőcsoportok eltávolítása egy lépésben történjen meg. A Pbf-védett arginin tartalom miatt mind a kilenc szekvencia esetében fenol/H₂O/EDT/tioanizol/TFA összetételű hasítóelegyet alkalmaztam. A hasítást követően a reakcióelegyet dietil-éterbe szűrtem, ahol az elkészített nyers peptid kicsapódott. A centrifugálást követően a kapott terméket acetonitril-víz elegyében oldottam, majd fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával tisztítottam (RP-HPLC). A kromatográfia során kapott termékek közül a vizsgálni kívánt peptidet pedig tömegspektrometriával azonosítottam.

5.8 Az izopropilidén védelem eltávolítása

Az izopropilidén védelem eltávolítását az 5.3 pontban leírt protokollnak megfelelően végeztem el.

5.9 A B1 peptidszármazék alanin-szken változatainak konjugálása daunomicinnel

A konjugálási eljárást az 5.4 pontban leírt protokollnak megfelelően végeztem el. Az elkészített konjugátumok jellemzőit az 5. táblázat tartalmazza.

5.táblázat – A B1 peptidszármazék alanin-szken változatainak daunomicin származékai

Kód	Szekvencia	M _{számolt} (Da)	M _{mért} (Da) ¹	R _t (min) ²
B26	Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRSAA-NH ₂	2113,2	2112,5	21,15
B27	Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRRAAR-NH ₂	2182,3	2182,7	21,00
B28	Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRASAR-NH ₂	2113,2	2112,5	21,18
B29	Dau-Aoa-GFLG-KDEPQARSAR-NH ₂	2113,2	2112,7	21,05
B30	Dau-Aoa-GFLG-KDEPARRSAR-NH ₂	2141,2	2140,7	21,08
B31	Dau-Aoa-GFLG-KDEAQRRSAR-NH ₂	2172,2	2171,6	21,58
B32	Dau-Aoa-GFLG-KDAPQRRSAR-NH ₂	2140,2	2139,6	21,88
B33	Dau-Aoa-GFLG-KAEPQRRSAR-NH ₂	2154,3	2153,6	21,07
B34	Dau-Aoa-GFLG-ADEPQRRSAR-NH ₂	2141,2	2140,6	21,57

¹Q Exactive Focus; mód: pozitív; áramlási sebesség: 5 µl / perc; minta adagolás: folyamatos; mérési tartomány: 200-1800 m/z

²KNAUER RP-HPLC; áramlási sebesség: 16 ml/perc; eluensek: A eluens [0,1% TFA/H₂O], B eluens [0,1% TFA, 80% acetonitril/H₂O]; gradiens: 0 perc: 2% B - 5 perc: 2% B - 30 perc: 90% B; oszlop: C18 10 µm, 100 Å, 20 x 250mm

5.10 A B1 peptidszármazékok alanin-szken konjugátumainak vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával

A dolgozat beadásakor, a CD-spektroszkópiai vizsgálatok még folyamatban voltak.

5.11 A B1 peptidszármazékok alanin-szken konjugátumainak in vitro citotoxicitási vizsgálata.

A konjugátumok IC₅₀ hatását A2059 típusú humán melanóma valamint HT29 humán kolorektális adenokarcinóma sejteken vizsgáltuk. A mérések során a B27 és a B34 konjugátumok bizonyultak hatékonyak, míg a többi konjugátum esetében közepes vagy gyenge hatékonyságot állapítottunk meg. A mérési eredmények a 6. táblázatban találhatók.

6. táblázat - A B1 peptidszármazékok alanin-szken konjugátumainak in vitro citotoxicitásának adatai

Kód	Citotoxicitás (IC ₅₀ μM)	
	A2058	HT-29
B26	35,4	34,9
B27	9,8	6,1
B28	22,8	27,1
B29	14,1	16,1
B30	71,4	61,1
B31	68,7	61,3
B32	30,7	33,6
B33	57,3	75,5
B34	2,9	6,2

Egy mérés sorozatból 3 párhuzamos alapján (MTT) teszt

5.12 Eredmény összefoglaló

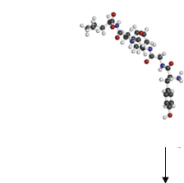
Végeredményben, a célkitűzéseknek megfelelően, a munkám során az alábbi eredményeket értem el (9. ábra):

- Nyolc darab átlapoló dekapeptid szintézise, amelyek lefedik a nucleolint felismerő 31 amisavas F3 peptid teljes szekvenciáját.
- Enzimlabilis GFLG-spacer, valamint izopropil-védett aminooxiecetsav kapcsolása egyes szekvenciák N-terminálisára, amelyek a hatóanyag konjugálását és sejten belüli felszabadulását biztosítják.
- Termékek tisztítása preparatív RP-HPLC segítségével, és azonosításuk tömegspektrometriával.
- Daunomicin hatóanyag konjugálása az egyes peptidszármazékokhoz, oxim-kötéssel.
- A konjugátumok tisztítása félpreparatív RP-HPLC segítségével, és azonosításuk tömegspektrometriával.
- A konjugátumok szerkezetének vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával, a szerkezet-hatás összefüggések megállapítása érdekében.
- A konjugátumok citotoxicitásának vizsgálata.
- A sejtbiológiai vizsgálatok alapján leghatékonyabbnak bizonyult Dau-Aoa-GFLG- KDEPQRRSAR-NH₂ konjugátum alanin-szken vizsgálata.
- Az alanin-szken során szintetizált új szekvenciájú peptidekhez GFLG-spacer, valamint izopropil-védett aminooxiecetsav kapcsolása.
- A kapott termékek tisztítása preparatív RP-HPLC-vel és azonosításuk tömegspektrometriával.

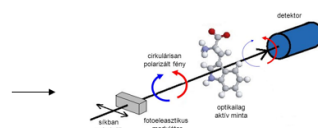
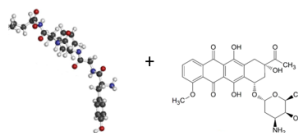
- Daunomicin hatóanyag konjugálása az egyes konjugátumokhoz oxim-kötéssel.
- A konjugátumok tisztítása félpreparatív RP-HPLC segítségével, és azonosításuk tömegspektrometriával.
- A konjugátumok citotoxicitásának vizsgálata.

Összefoglalva elmondható, hogy kísérleteim segítségével sikerült az F3 peptidet tartalmazó konjugátumhoz képest szignifikánsan hatékonyabb, rövidített szekvenciájú peptidkonjugátumot előállítani. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy további vizsgálatok szükségesek annak eldöntése érdekében, hogy ez a rövidebb peptidet tartalmazó konjugátum valóban a nukleolinhoz kötődik, vagy más receptor(ok) játszanak szerepet a sejtbe juttatásukban. Ezek alapján vizsgálni fogjuk a jövőben az új hatékony konjugátum nucleolni és tumor / tumosóssejt specifikitását is.

F3 peptid átlapló
szekvenciáinak szintézise

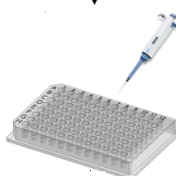


Szekvenciák konjugálása
daunomicin hatóanyaggal

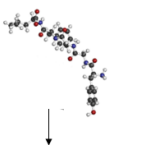


Konjugátumok szerkezetének
vizsgálata CD-spektroszkópiával

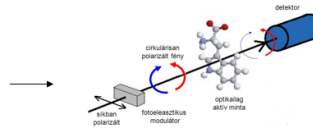
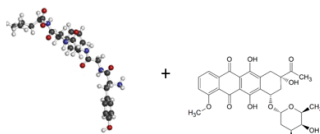
Konjugátumok
citotoxicitásának vizsgálata



Citotoxicitás szempontjából
hatékonyak bizonyult B9
konjugátum alapját képző B1
szekvencia alanin-szkenje

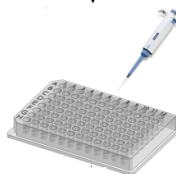


Az alanin-szken során
elkészített szekvenciák
konjugálása daunomicinnel

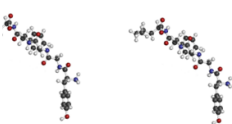


Konjugátumok szerkezetének
vizsgálata CD-spektroszkópiával

Konjugátumok
citotoxicitásának vizsgálata



Citotoxicitás szempontjából
hatékonyak bizonyult B27 és
B34 konjugátumok további
vizsgálata



10. ábra – Az elvégzett munkafolyamatok összefoglalása

6. Kísérleti rész

6.1 Alkalmazott anyagok

Az eljárások során alkalmazott anyagokat, valamint azok beszerzési helyét a Függelékben tüntettem fel.

6.2 Alkalmazott eljárások

Az alább felsorolt eljárásokat, protokollokat alkalmaztam minden előállított peptid és konjugátum esetén.

6.2.1 A szilárdfázisú peptidszintézis során alkalmazott protokoll. A munkám során az egyes peptideket a szilárdfázisú peptidszintézis Fmoc/^tBu stratégiája alapján építettem meg. Az eljárás protokollját a 7. táblázat foglalja össze.

7. táblázat – Az ideiglenes védőcsoport hasításának protokollja Fmoc/^tBu stratégia esetén

	Művelet	Alkalmazott reagens	Időtartam (perc)	Ismétlések száma
1.	Mosás	DMF	0,5-1	3
2.	Fmoc-csoport hasítása	2% piperidin, 2% DBU, DMF	2+2+5+10	4
3.	Mosás	DMF	0,5-1	8
4.	Aminosav származék kapcsolása	Aminosavszármazék (3 ekv.) + HOBt (3 ekv.) + DIC (3 ekv.)	60	1
5.	Mosás	DMF DCM	0,5-1 0,5-1	2 2
6.	Kaiser-teszt	KCN oldat + fenol oldat+ ninhidrin oldat (izatin-oldat)	3-5	1

6.2.2 A Kaiserteszt elvégzése. A kapcsolási reakciók sikerességének ellenőrzésére Kaiser-tesztet alkalmaztunk. A teszt során az alábbi reagenseket adjuk a vizsgálni kívánt gyantaszemekhez:

- 1 ml 0,01 M kálium-cianid, 49 ml piridinnel hígítva
- 40 g kristályos fenol 10 ml abszolút etanolban oldva
- 2,5 g ninhidrin 50 ml abszolút etanolban oldva

A prolint követő aminosav kapcsolódását izatin teszttel ellenőrizhetjük. Az izatin teszt során a Kaiser-teszt esetében alkalmazott reagensek mellé az alábbi összetételű izatinoldatot adjuk.

- 3% izatin, 5% Boc-Phe-OH benzilalkoholban oldva

A teszt elvégzése során a reakcióközeggől pár szem gyantát a tesztcsőbe helyeztem, majd hozzáadtam a fent említett reagensek elegyét. A tesztcsövet 3-5 percen keresztül 104 °C-on melegítettem, majd megvizsgáltam az eredményt. A ninhidrin a szabad aminosocsoportokkal kék színreakciót ad, így amennyiben a teszt eredményeként a gyantaszemek megkékültek, a kapcsolási reakció sikertelen volt és újra kapcsolást kellett végezni. Abban az esetben pedig, ha a tesztet követően a gyantaszemek, valamint az reakcióközeg is sárga színű maradt, a reakció sikeresnek tekinthető, és elkezdhető a következő aminosav kapcsolása.

6.2.3 A peptid hasítása a gyantáról. A peptidszármazékok szintézisét Fmoc/^tBu stratégia alkalmazása mellett, 0,69 mmol/g gyantakapacitású Rink Amid MBHA gyantán végeztem. A hasításhoz szükséges elegyet a gyanta típusa, valamint az alkalmazott stratégia sajátosságai alapján választottam meg. Az Fmoc/^tBu stratégia esetében savas környezetet kell biztosítani a hasítási reakció során, ugyanis mind a peptid-gyanta kapcsolat, mind az állandó védőcsoportok savlabilisak. A savas környezet ugyanakkor reaktív karbokationok keletkezését segíti elő, így a mellékreakció elkerülése végett az elegyhez H₂O-t kell adnunk. A munkám során, az alábbi hasítóelegyet alkalmaztam.

a. „C-típusú” hasítóelegy összetétele:

- 0,75 gramm fenol
- 5 ml H₂O
- 5 ml tioanizol

- 2,5 ml 1,2-etánditiol (EDT)
- 10 ml trifluoroecetsav (TFA)

b. „A-típusú” hasítóelegy összetétele

- 5 ml H₂O
- 9,5 ml trifluoroecetsav (TFA)

A hasítóelegy típusának megválasztásakor figyelembe kell venni, hogy a hasítani kívánt peptid tartalmaz-e arginint vagy metionint. Amennyiben igen, a hasítás során a „C-típusú” elegyet kell alkalmazni, mivel a benne található etánditiol, víz valamint tioanizol képes arra, hogy a Pbf-védőcsoport hasadása során keletkező karbokationokat megfogja, ezzel a további mellékreakciók elkerülhetők, egyben redukív környezetet biztosítanak a metionin oxidációjának elkerülése érdekében. Abban az esetben, ha a szekvencia nem tartalmaz metionint vagy arginint, az A-típusú hasítóeleggyel is probléma nélkül lehasítható a peptid a gyantáról.

6.2.4 Izopropil védőcsoport eltávolítása. Az izopropil védőcsoport eltávolítási reakcióját ammónium-acetát oldatban (0,2 M; pH= 5) végeztem. A megtisztított, izopropil-védett aminosavakat tartalmazó peptidből 10 mg-ot mértem ki, majd a pufferrel 1 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettem. A reakcióelegybe 1 mg szilárd metil-hidroxilamin reagenst adtam, majd az elegyet fél órán keresztül 35 °C-on melegítettem, majd pedig RP-HPLC-n tisztítottam.

6.2.5 Peptidszármazékok konjugálása daunomicinnel. Az aminosavakat véggel rendelkező peptid származékból 10 mg-ot kimértem, és ehhez szintén 10 mg daunomicint adtam. A keveréket 10 ml koncentrációjú ammónium-acetát oldatban (0,2 M; pH= 5) feloldottam, így 1 mg peptid/ml koncentrációjú oldatot hoztam létre, majd az elegyet 2 napon keresztül 35 °C-on kevertettem.

6.2.6 A peptidek és konjugátumok tisztítása és analízise. A nyers peptideket és peptidkonjugátumokat preparatív fordított fázisú, nagy hatékonyságú folyadék kromatográfiával tisztítottam. Az eljárást KNAUER RP-HPLC (KNAUER GmbH, Bad Homburg, Németország; 2 db K120 típusú pumpa; nagy nyomású keverő egység; K2501 típusú monokromátoros UV detektor, adatgyűjtő szoftver) rendszerrel végeztem. A futtatások során a felhasznált eluensek összetételét folyamatosan változtattam (gradiens elúció). A tisztítások során alkalmazott beállításokat az alábbi táblázatok foglalják össze. (8-10. táblázat)

8. táblázat - A nyers peptidek tisztítása során alkalmazott preparatív kromatográfiás beállítások

Oszlop	Típusa: Intersil ODS-3 GL Sciences Inc. C18, 10 μ m, 100Å Mérete: 20 x 250 mm
Alkalmazott eluensek	A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz B eluens: - 0,1% TFA / 80% acetonitril-20% desztillált víz
Alkalmazott gradiens	0 perc : 2% B 65 perc: 100% B
Áramlási sebesség	16 ml / perc
Detektálás hullámhossza	λ = 220 nm

9. táblázat - A konjugátumok tisztítása során alkalmazott félpreparatív kromatográfiás beállítások

Oszlop	<i>Típusa:</i> Phenomenex Luna C18, 10 μ m, 100Å <i>Mérete:</i> 10 x 250 mm
Alkalmazott eluensek	A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz B eluens: - 0,1% TFA / 80% acetonitril-20% desztillált víz
Alkalmazott gradiens	0 perc : 2% B 65 perc: 100% B
Áramlási sebesség	4 ml / perc
Detektálás hullámhossza	λ = 220 nm

10. táblázat - A konjugátumok tisztaságának ellenőrzésére használt analitikai RP-HPLC beállításai

Oszlop	<i>Típusa:</i> Nucleosil 100-5 C18 5 μ m, 100Å <i>Mérete:</i> 4,6 x 250 mm
Alkalmazott eluensek	A eluens: 0,1% TFA / desztillált víz B eluens: - 0,1% TFA / 80% acetonitril-20% desztillált víz
Alkalmazott gradiens	0 perc : 2% B 5 perc: 2 % B 30 perc: 90% B
Áramlási sebesség	1 ml / perc
Detektálás hullámhossza	λ = 220 nm

6.2.7 Tömegspektrometria. A konjugátumok meghatározásához tömegspektrometriát alkalmaztunk. A mérések egy részénél Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus (Bréma, Németország) típusú, elektropray ionizációs ioncsapdát használtunk (ESI-MS). A szilárd halmazállapotú mintákat 0,1% ecetsav tartalmú 50% acetonitril/víz elegyben oldottuk, majd injektáltuk a műszerbe. A spektrumok felvétele a 11. táblázatnak megfelelő beállítások mellett történt.

11. táblázat – Az ESI-MS mérés során alkalmazott beállítások

Mód	pozitív
Áramlási sebesség	10 µl / perc
Minta adagolás	flyamatos
Mérési tartomány	50-2000 <i>m/z</i>

A spektrumok kiértékelésére a Bruker Compass Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonic GmbH, Bréma, Németország) programot alkalmaztuk.

A tömegspektrometriás mérések másik részéhez elektropray ionizációs Q Exactive Focus hibrid kvadrupol-orbitrap tömegspektrométert (Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország) alkalmaztunk. A szilárd halmazállapotú mintákat 0,1% hangyasav tartalmú 50% acetonitril/víz elegyében oldottuk fel. A spektrumok felvétele a 12. táblázatnak megfelelő beállítások mellett történt.

12. táblázat – A hibrid kvadrupol-orbitrap tömegspektrométerrel végzett mérések során alkalmazott beállítások

Mód	pozitív
Áramlási sebesség	5 µl / perc
Minta adagolás	flyamatos
Mérési tartomány	200-1800 <i>m/z</i>

Az adatokat az Xcalibur program (Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország) segítségével elemeztük ki. A konjugátumok MS spektrumai a Függelékben találhatók.

6.2.8. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia. A cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai méréseket J-1500 spektrofotométerrel végeztük. A méréseket vízben, 0,2-0,3 mM-os konjugátum koncentráció mellett, szobahőmérsékleten hajtottuk végre. Az eljárás során 0,1 cm-es küvettát alkalmaztunk, a mérések pedig 185-260 nm között történtek. Egy spektrumot 5 mérés átlagából készítettük el, melynek során víz nullvonalat alkalmaztunk.

6.2.9. In vitro citotoxicitási vizsgálat. A *in vitro* citotoxicitási vizsgálatokhoz A2058 humán melanóma és HT29 humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonalakat alkalmaztunk. A sejtenyészeteket 37 °C-on 5%-os szén-dioxid atmoszférában 10% főtális borjú szérumot (FBS) és 1% Penicillin-Sztreptomycin oldatot tartalmazó RPMI médiumban tartottuk fenn. A sejteket szükséges időközönként, 85% konfluencia elérésekor passzáltuk és új flaskába, valamint friss médiumba vittük tovább.

A vizsgálat során a sejteket tripszin-EDTA oldat segítségével passzáltuk, majd tripánkék oldat felhasználásával fénymikroszkóp segítségével meghatároztuk az élő sejtek számát. Az egyes sejtvonalakból meghatározott számú sejtet 96 lyukú sejtenyésző lemez belső lyukaiban lévő RPMI médiumba tettük. (A2058 humán melanóma sejtvonal esetén 4000 sejt/lyuk, HT29 humán kolorektális adenokarcinóma esetén 6000 sejt/lyuk.) A sejtenyésző lemez lyukait pedig PBS pufferrel töltöttük fel. 24 óra inkubálást követően a sejteket a konjugátumok különböző koncentrációjú oldatával kezeltük (22 µl / lyuk), a kontrollok esetében a konjugátumok helyett komplett RPMI médiumokat alkalmaztunk.

A kezelést követően a sejteket 72 órán keresztül inkubáltuk, majd 22 µl, 5 mg /ml koncentrációjú PBS pufferben oldott 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid (MTT) oldatot adtunk minden lyukakhoz. Négy óra inkubációt követően a felülúszót eltávolítottuk, majd minden lyukba 100 µl etanol-dimetil-szulfoxid (DMSO) 1:1 arányú elegyét adtuk.

Az eredményeket CLARIOstar Plus (BMG Labtech) készülék segítségével olvastuk le, majd az adatokat Microsoft Excel, valamint GraphPad Prism 6 segítségével analizáltuk.

7. Rövidítések

Aoa	aminooxiecetsav
$\geq$ Aoa	izopropil-védett aminooxiecetsav
Boc	<i>terc</i> -butiloxikarbonil
Bzl	benzil
Da	dalton
Dau	daunomicin, daunorubicin
DBU	1,8-diazobiciklo[5.4.0]-undek-7-én
DCM	Diklórmétán
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
EDT	1,2-etánditiol
EDTA	etilén-diamin tetraecetsav
EGFR	hám eredetű növekedési faktor
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
FBS	fötális borjú szérum
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
HOBt	1-hidroxibenztriazol
KCN	kálium-cianid
MBHA	4-metil-benzhidrilamin
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-6-szulfonil
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (sejttenyésztő médium)
RP-HPLC	fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
Rt	retenció idő
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis
^t Bu	<i>terc</i> -butil
TFA	trifluorecetsav

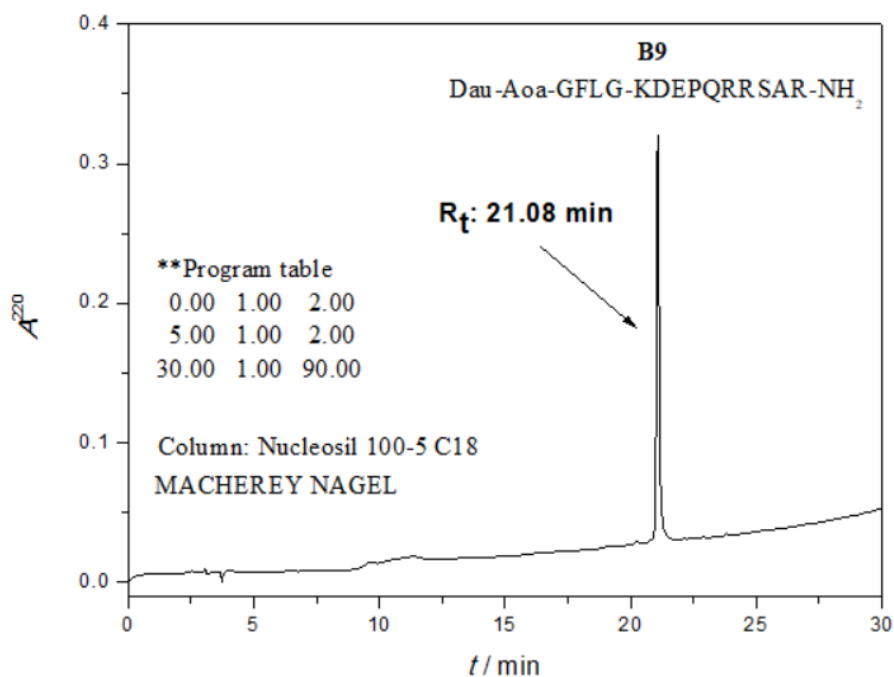
9. Irodalomjegyzék

1. National Cancer Intitute – Cancer - elérhető: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (utolsó megtekintés: 2021.09.30)
2. Menyhárt, O., Fekete, J. T., Gyórfy, B.: Demographic shift disproportionately increases cancer burden in an aging nation: current and expected incidence and mortality in Hungary up to 2030. *Clinical Epidemiology*, 2018, **10**, 1093–1108
3. Our world in data: Causes of death – elérhető: <https://ourworldindata.org/causes-of-death> (utolsó megtekintés: 2021.09.30)
4. National Cancer Intitute - Dictionaries - elérhető: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor> (utolsó megtekintés: 2021.09.30)
5. L. S. Carvalho, N. Grançalves, N. A. Fonseca, J. N. Moreira: Cancer Stem Cells and Nucleolin az Drivers of Carcinogenesis, *Pharmaceuticals*, 2021; **14 (1)**; 60, 1-21
6. V. da Silva-Diz, L. Lorenzo-Sanz, A. Bernat-Peguera, M. Lopez-Cerda, P. Muñoz: Cancer cell plasticity: impact on tumor progression and therapy response, *Seminars in cancer biology*, 2018, **53**, 48-58
7. M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, M. F. Clarke: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2003, **100**, 3983–3988
8. J. Lin, X. Wang, X. Wang, S. Wang, R. Shen, Y. Yang, J. Xu, J. Lin: Hypoxia increases the expression of stem cell markers in human osteosarcoma cells, *Oncology Letters*, 2021, **21**, 3, article number: 217
9. National Cancer Institute – Surgery. Elérhető: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery> (utolsó megtekintés: 2021.09.30)
10. National Cancer Institute – Radiation-therapy – elérhető : <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy> (utolsó megtekintés: 2021.09.30)
11. National Cancer Institute – Chemotherapy – elérhető : <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy> (utolsó megtekintés: 2021.09.30)
12. G. Mező., K. Kiss., B. Bihari-Kovács, R. Oláhné Szabó.: Személyre szabott rákgyógyítás, *Természet Világa*, **2017**, *148*, 9, 386-389.

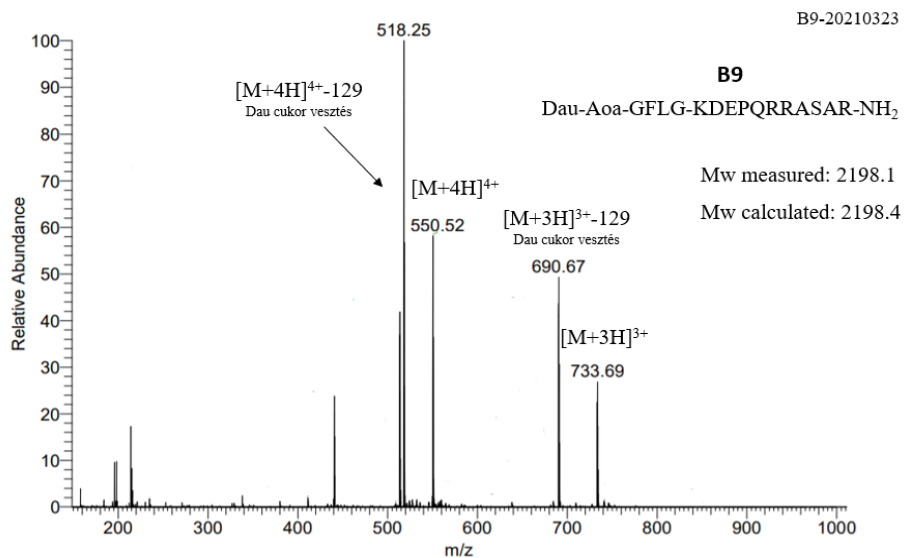
13. G.Mező, M. Manea: Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones, *Expert Opinion in Drug Delivery*, 2010; **7**,79-96.
14. M. M. Tajrishi, R. Tuteja, N. Tuteja: Nucleolin, the most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleus, *Communicative & Integrative Biology* , 2011, **4(3)**, 267-275.
15. H. Ginisty, H. Sicard, B. Roger, P. Bouvet: Structure and function of nucleolin, *Journal of Cell Science*, 1999, **112**, 761-772.
16. B.Rude Voldborg, L. Damstrup, M Spang-Thosen, H.Skocgaard Poulsen: Epidermal Growth factor receptor (EGFR) mutations, function and possible role in critical trials, *Annals of Oncology*, 1997, **8**, 1197-1206.
17. A. Strasser, P. J. Jost, S. Nagata: The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System, *Immunity*, 2009, **30**, 180-192.
18. E. A. Said, B. Krust, S. Nisole, J. Svab, J. P. Briand, A. G. Hovanessian: The Anti-HIV cytokine Midkine Binds the Cell Surface-expressed Nucleolin as a Low Affinity Receptor, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**, 40, 37492-37052.
19. Chisen-Hsun Wu, I-Ju Lu, Ruei-Min Lu, Han-Chung Wu: Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science, *The Journal of Biomedical Science* 2016, **23**, 8.
20. S. Christian, J. Pilch, M. E. Akerman, K. Porkka, P. Laakkonen, E. Ruoslahti: Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cell in angiogenic blood vessels, *The Journal of Biomedical Science*, 2003, **163**, 4, 871-878.
21. Porkka, K., P. Laakkonen, J.A. Hoffman, M. Bernasconi, and E. Ruoslahti: A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Biochemistry*, 2002, **99**, 7444 -7449.
22. C. Tan, H. Tasaka, Kou-Ping Yu, M. L. Murphy, D. A. Karnofsky: Daunomycin an antitumor antibiotic in the treatment of neoplastic disease, *American Cancer Society Journals*, 1967, **20**, 3, 333-353.
23. Daunorubicin – elérhető: <https://www.drugs.com/pro/daunorubicin.html> (utolsó megtekintés: 2021.09.30)
24. R. B. Merrifield: Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *Journal of the American Chemical Society*, 1963, **85**, 2149–2154.
25. P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt: Convergent solid-phase peptide synthesis, *International Journal of Peptide and Protein Research.*, 1991; **37**, 58-60.

26. G. Barany, R. B. Merrifield: The Peptides (E. Gross and J. Meienhofen Ed.), *Academic Press*, 1979; **2**, 1-284.
27. L. A Carpino, G. Y Han: The fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *Journal of Organic Chemistry*, 1972; **37**, 3404-3409.
28. E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook: Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Analytical Biochemistry*, 1970, **34**, 595–598.
29. E. Kaiser, C. D. Bossinger, R. L. Colescott, D. B. Olsen: Color test for terminal prolyl residues in the solid phase synthesis of peptides, *Analytica Chimica Acta*, 1980; **118**, 149–151.

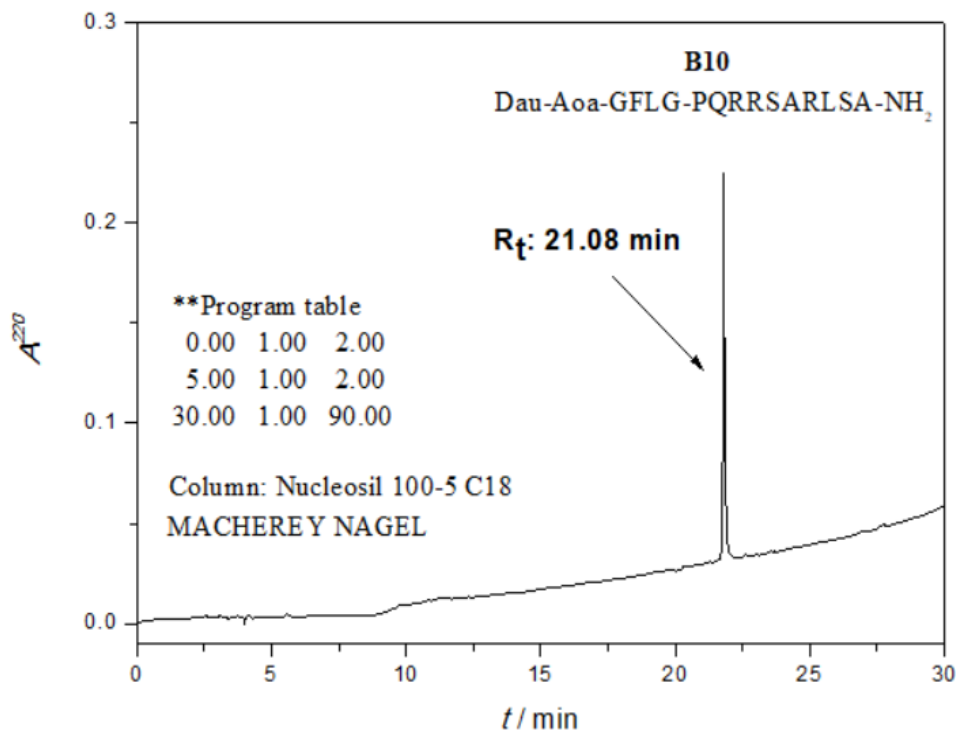
10. Függelék



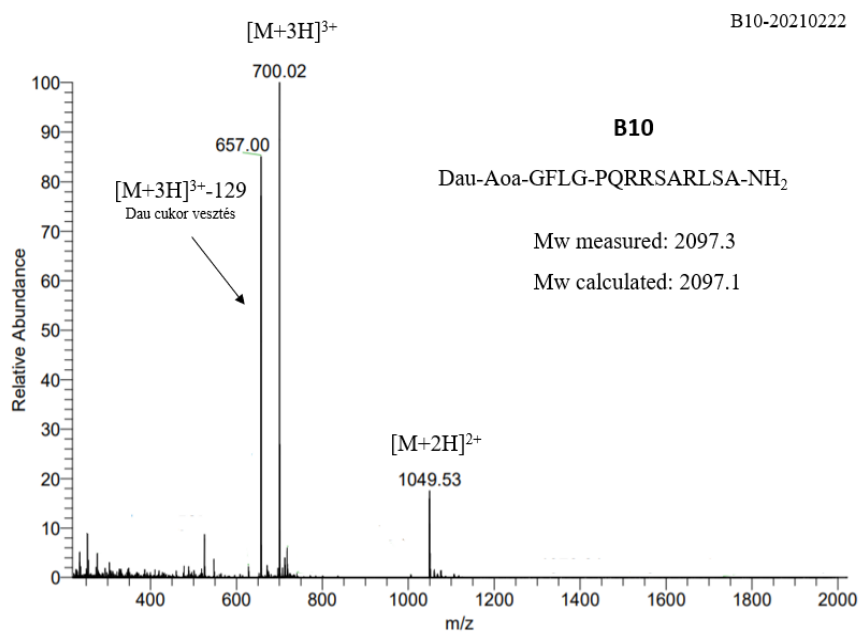
F1. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRSAR-NH₂ (B9) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



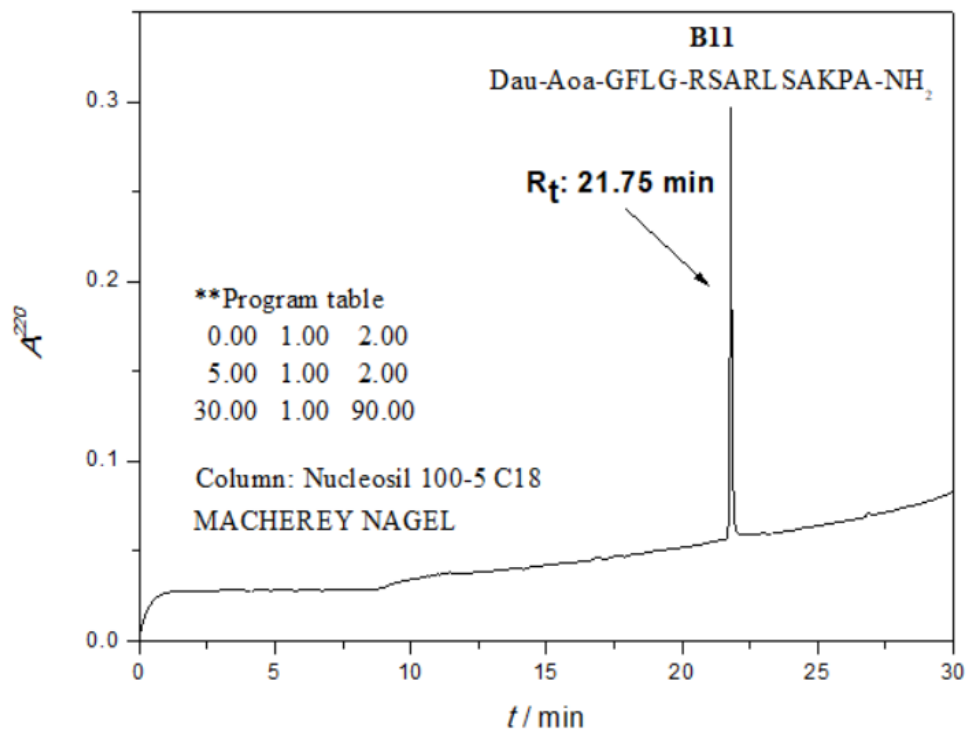
F2. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRSAR-NH₂ (B9) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztesé csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe.)



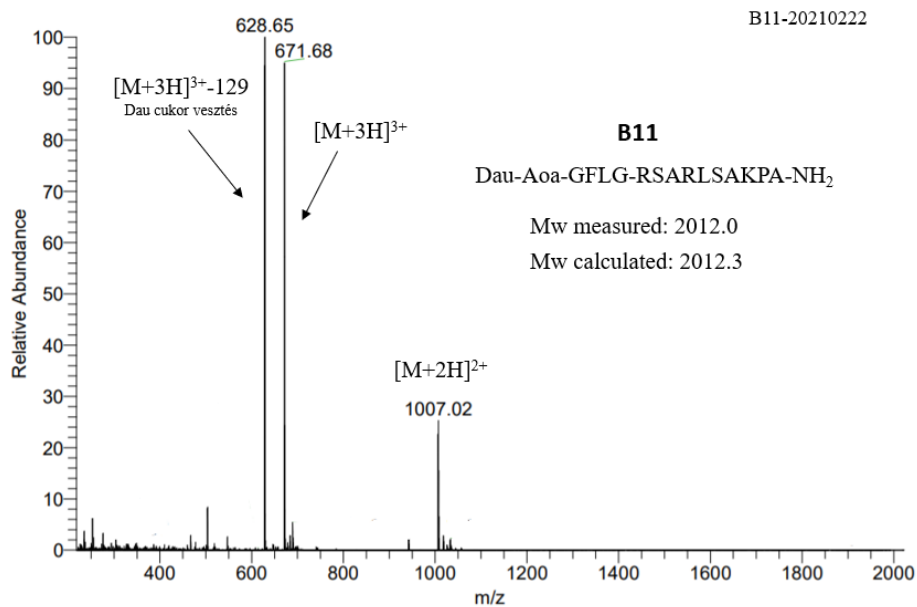
F3. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-PQRRSARLSA-NH₂ (B10) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



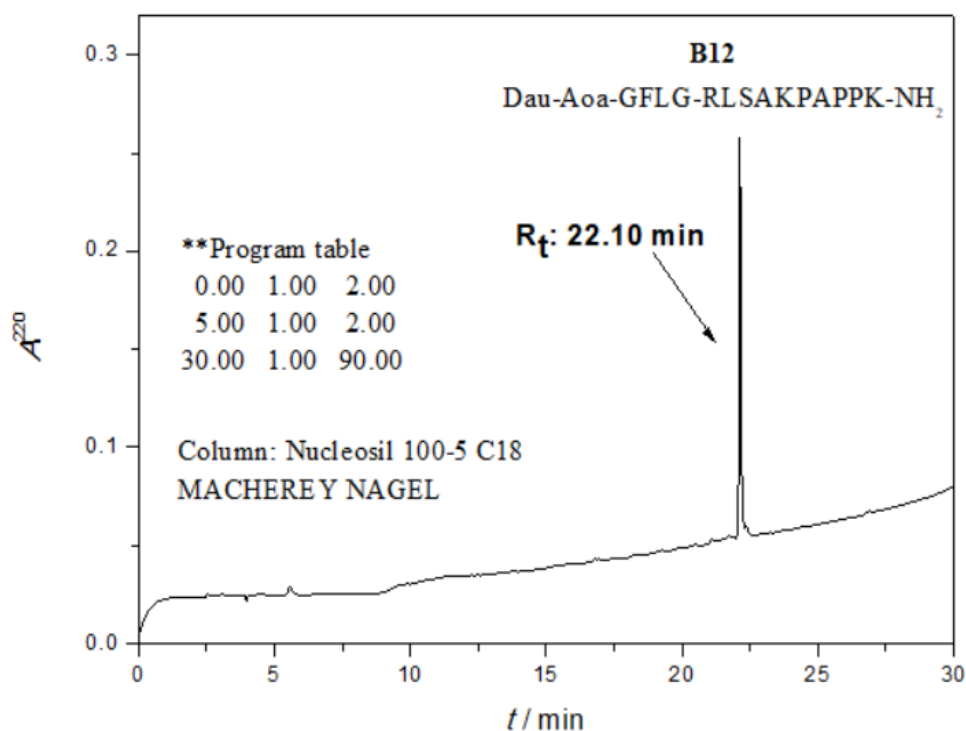
F4. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-PQRRSARLSA-NH₂ (B10) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztese csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe.)



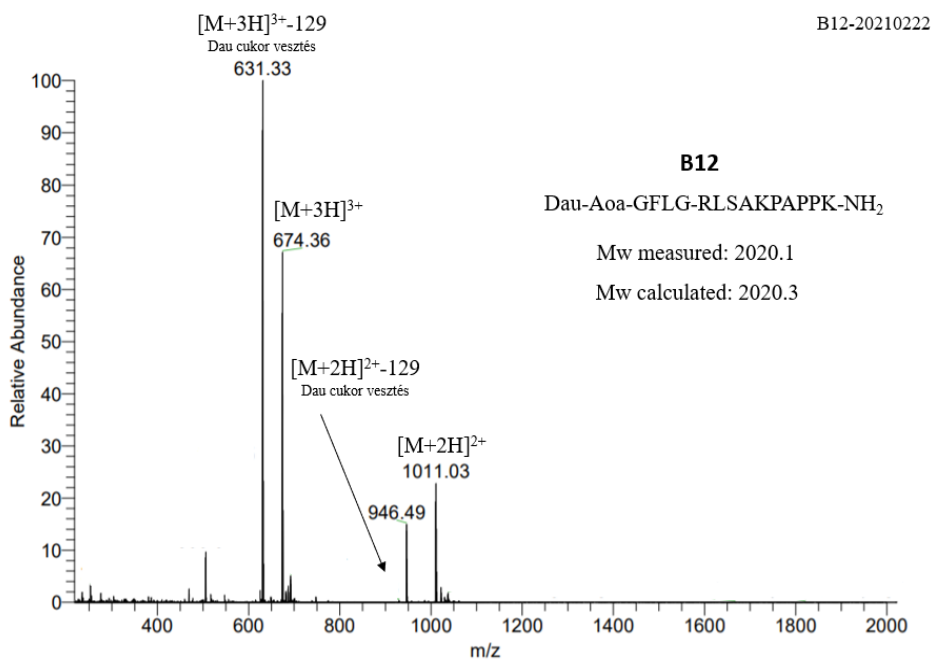
F5. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-RSARLSAKPA-NH₂(B11) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



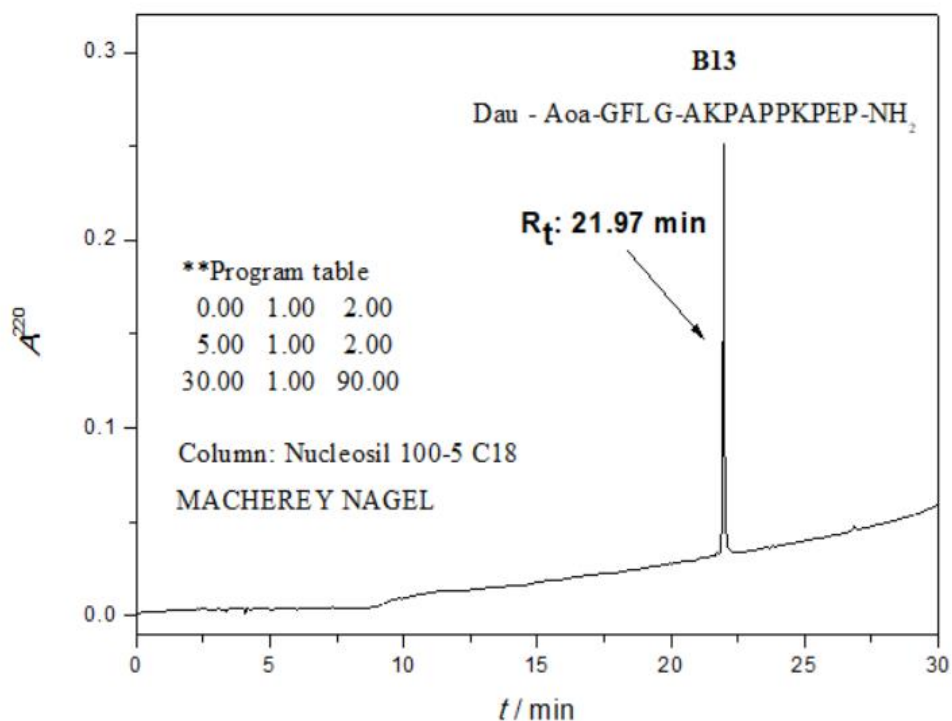
F6. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-RSARLSAKPA-NH₂(B11) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztese csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



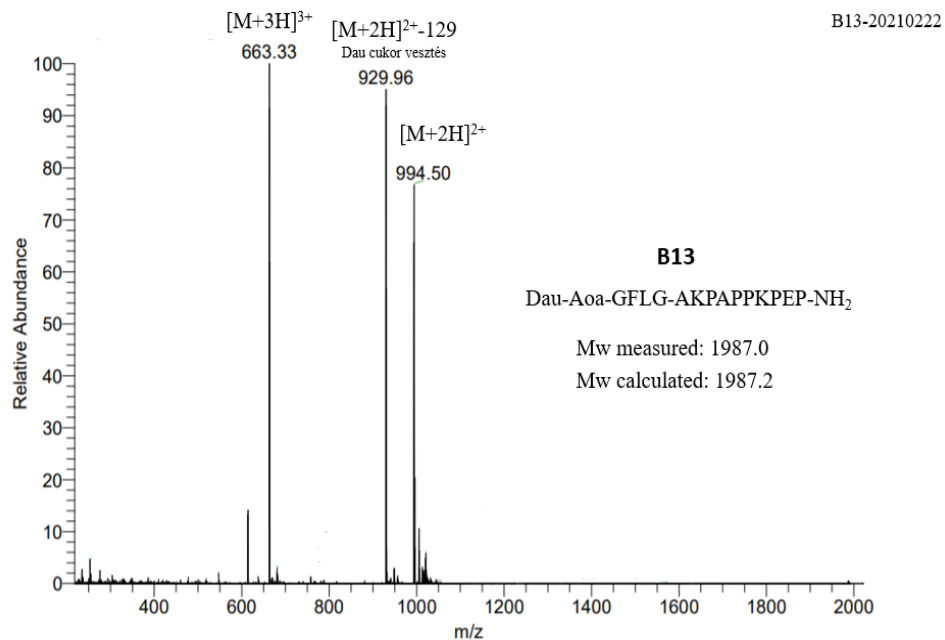
F7. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-RLSAKPAPPK-NH₂(B12) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



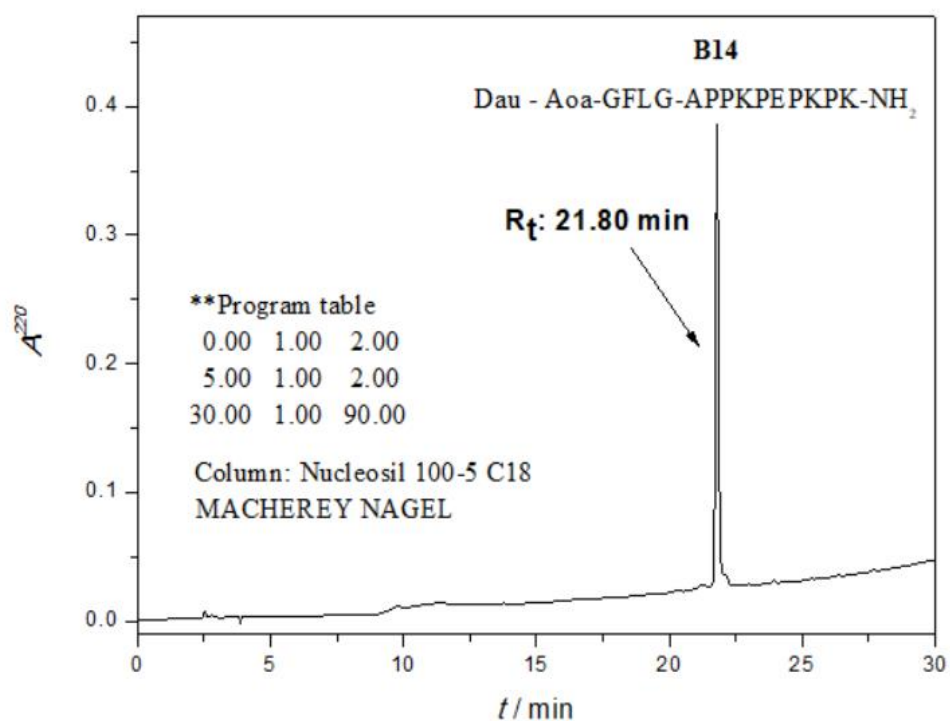
F8. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-RLSAKPAPPK-NH₂(B12) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztese csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



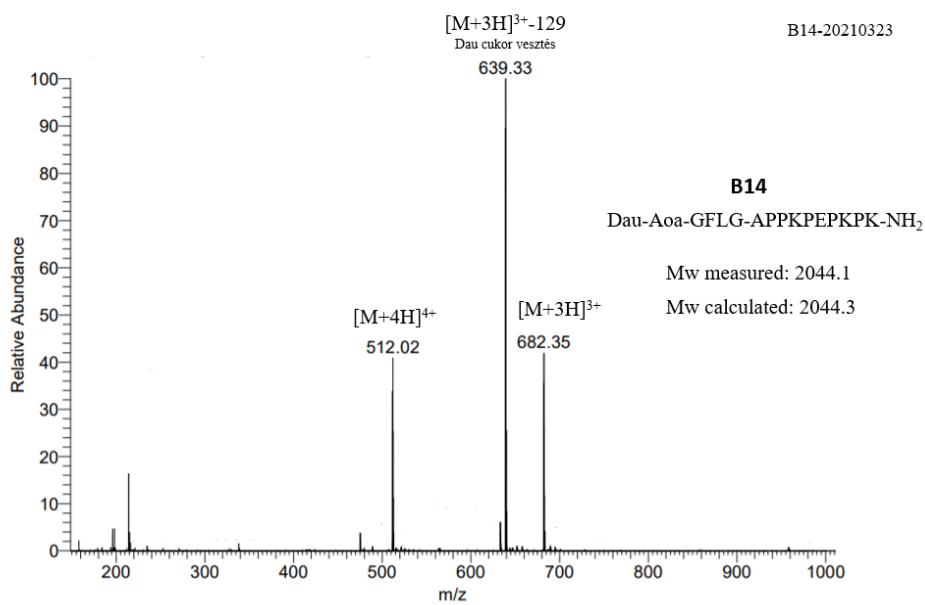
F9. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-AKPAPPKPEP-NH₂(B13) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



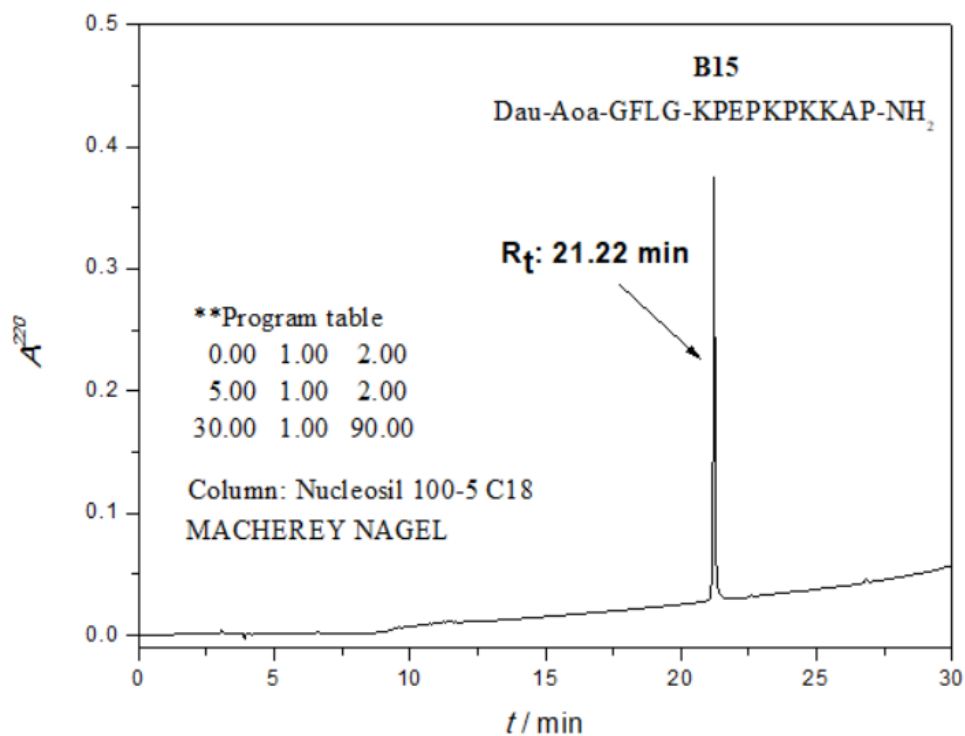
F10. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-AKPAPPKPEP-NH₂(B13) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztese csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



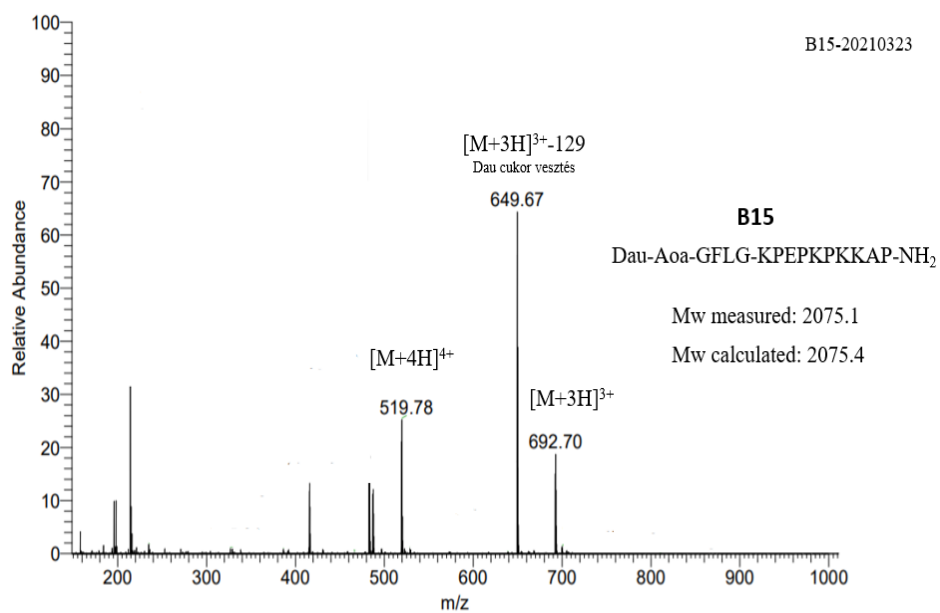
F11. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-APPKPEPKPK-NH₂ (B14) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



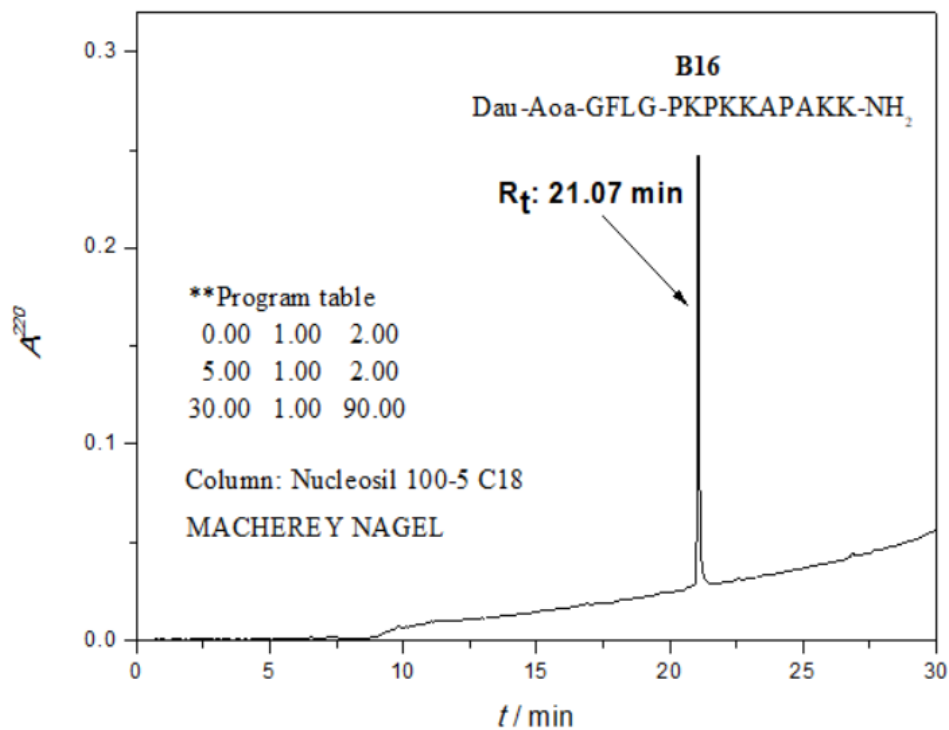
F12. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-APPKPEPKPK-NH₂ (B14) konjugátum MS spektruma
 (A Dau cukor vesztese csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



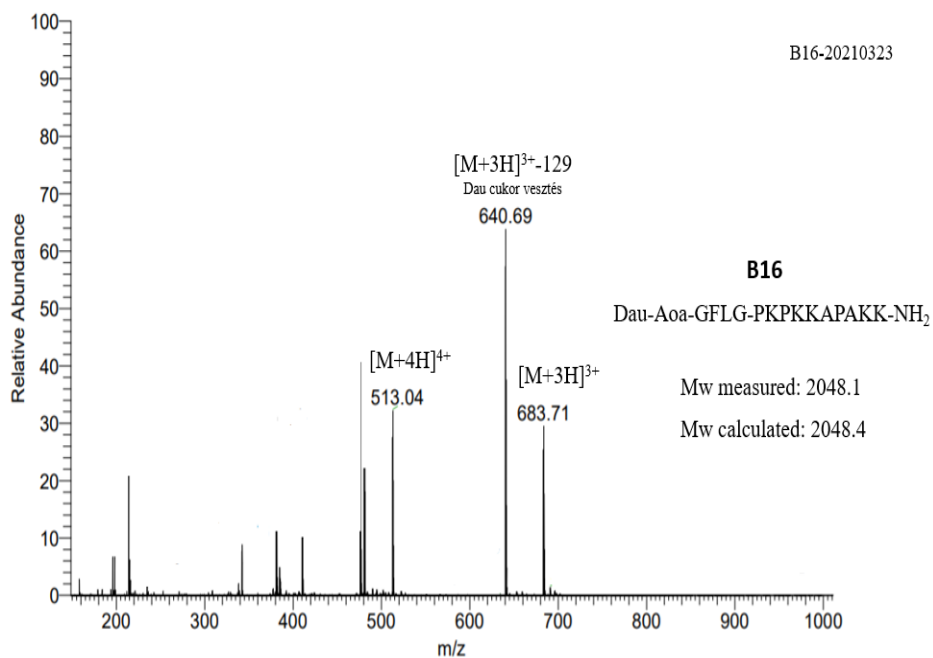
F13. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KPEPKPKKAP-NH₂ (B15) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



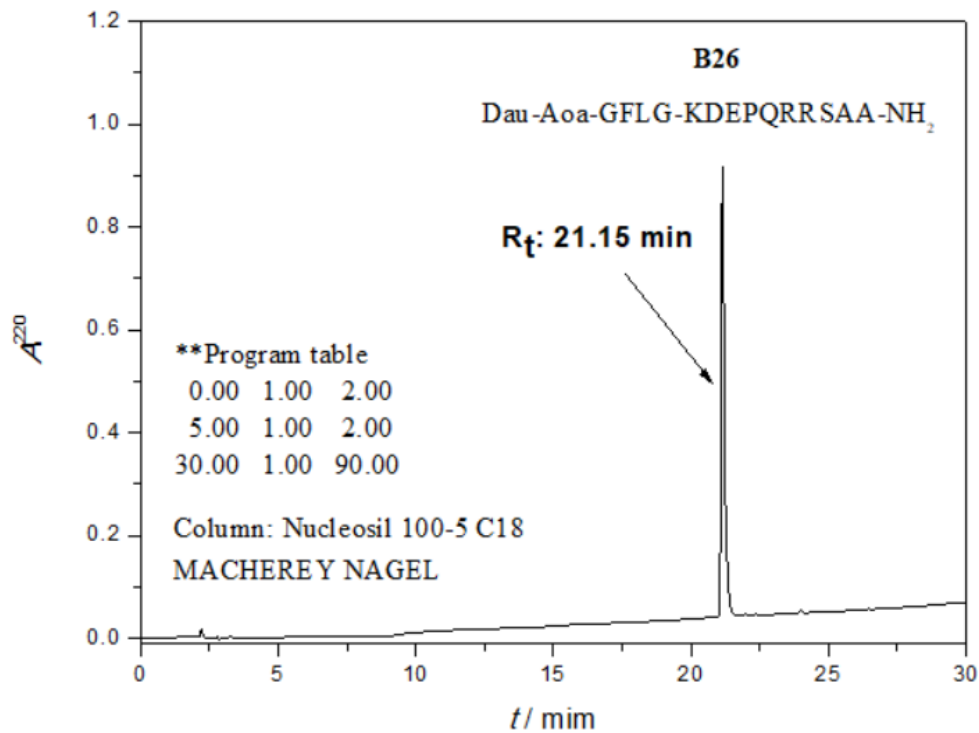
F14. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KPEPKPKKAP-NH₂ (B15) konjugátum MS spektruma
 (A Dau cukor vesztesége csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



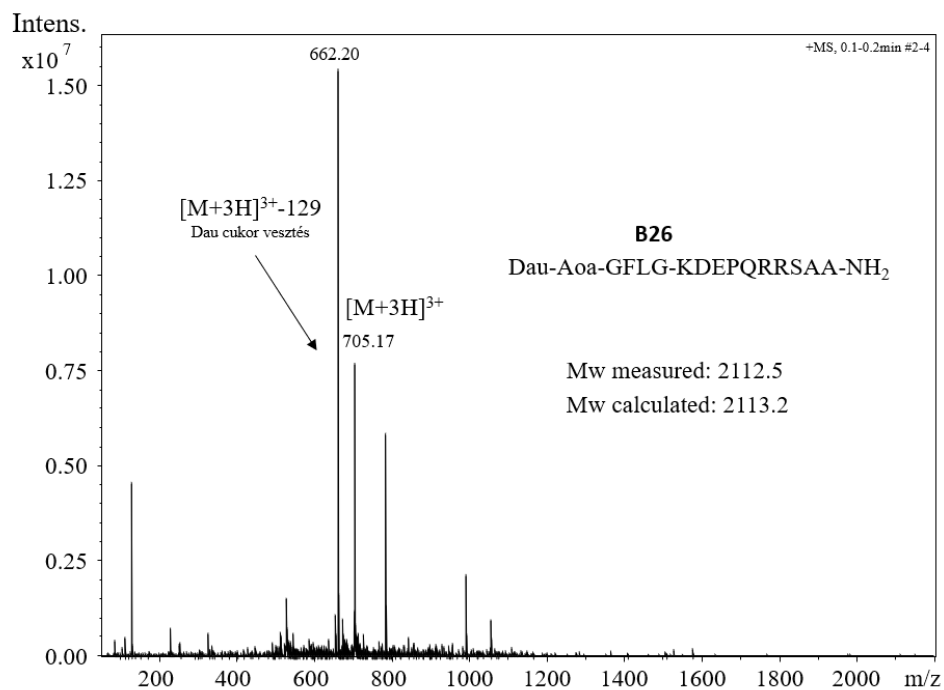
F15. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-PKPKKAPAKK-NH₂ (B16) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



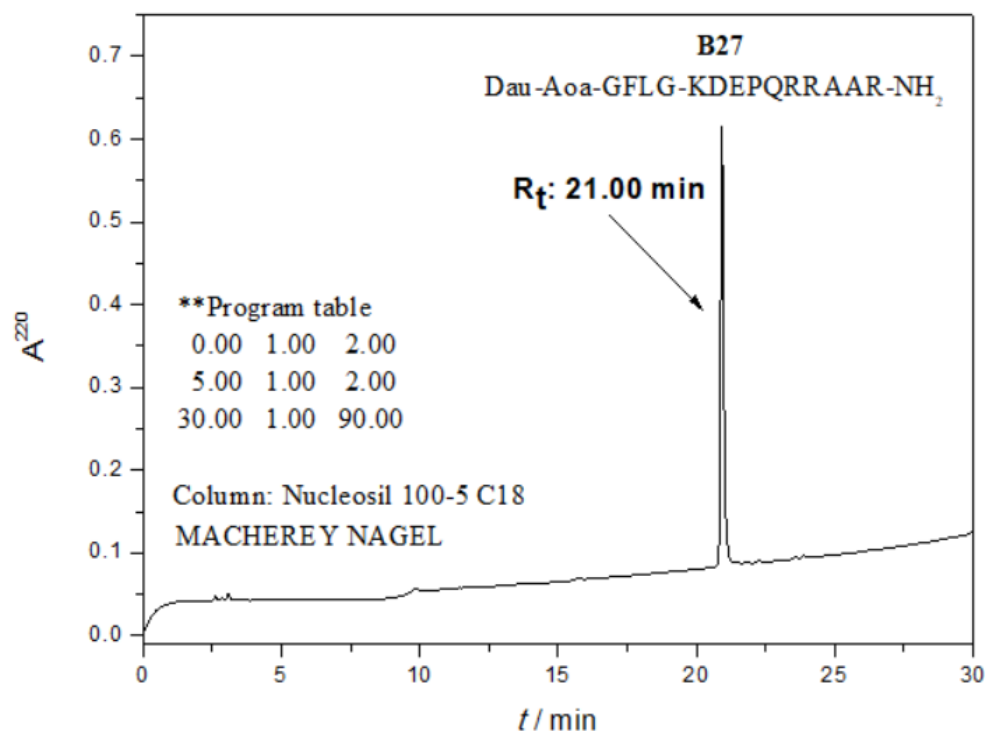
F16. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-PKPKKAPAKK-NH₂ (B16) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztesége csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



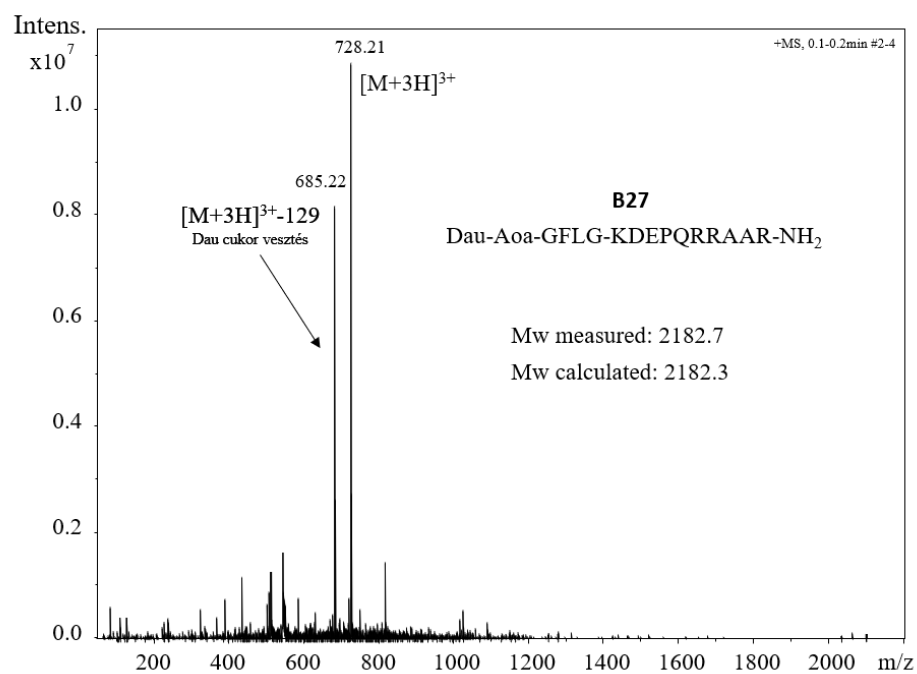
F17. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRSAA-NH₂(B26) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



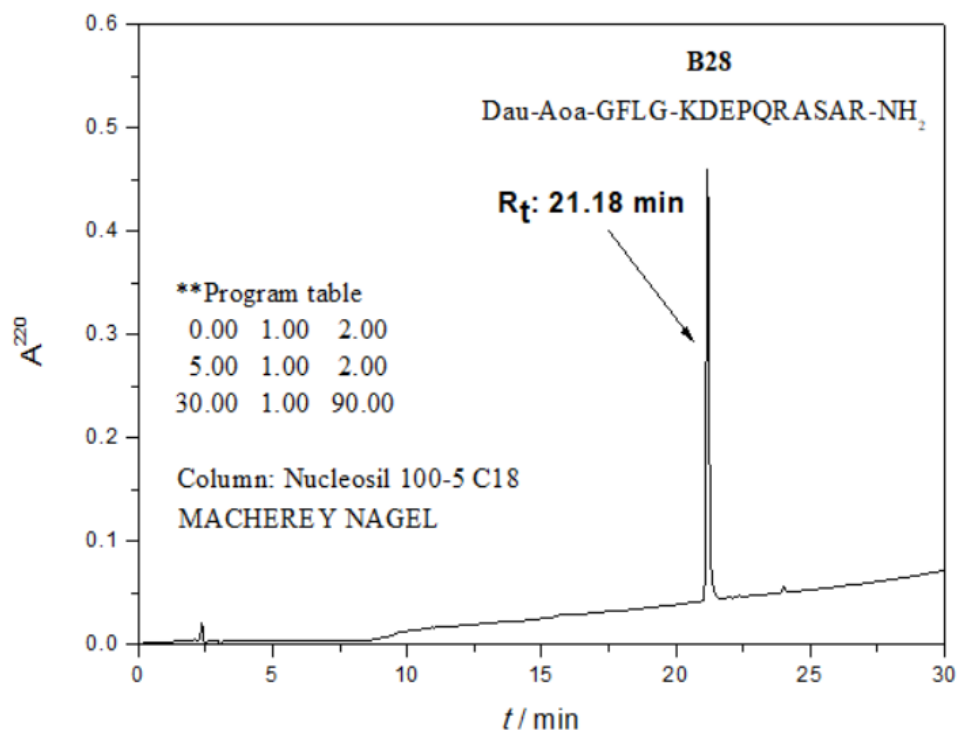
F18. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRSAA-NH₂(B26) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztése csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



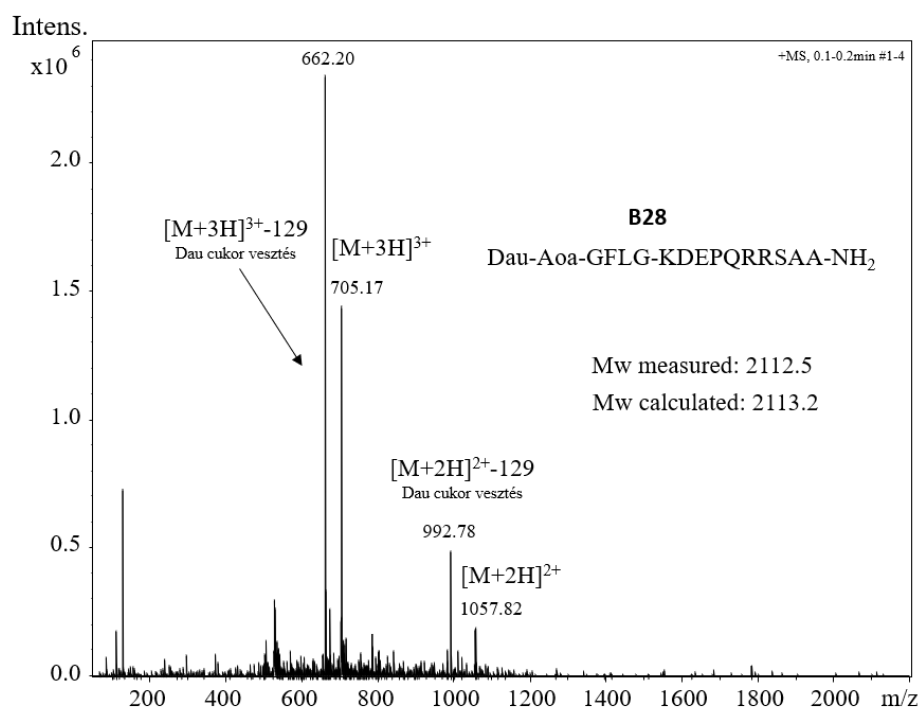
F19. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRRAAR-NH₂ (B27) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



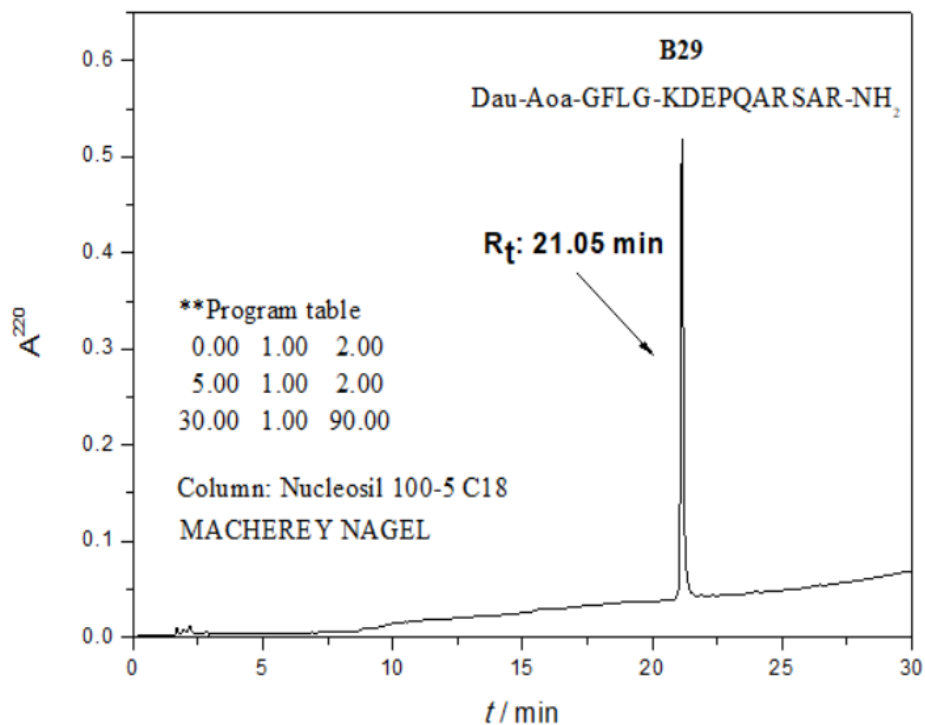
F20. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRRRAAR-NH₂ (B27) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztese csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



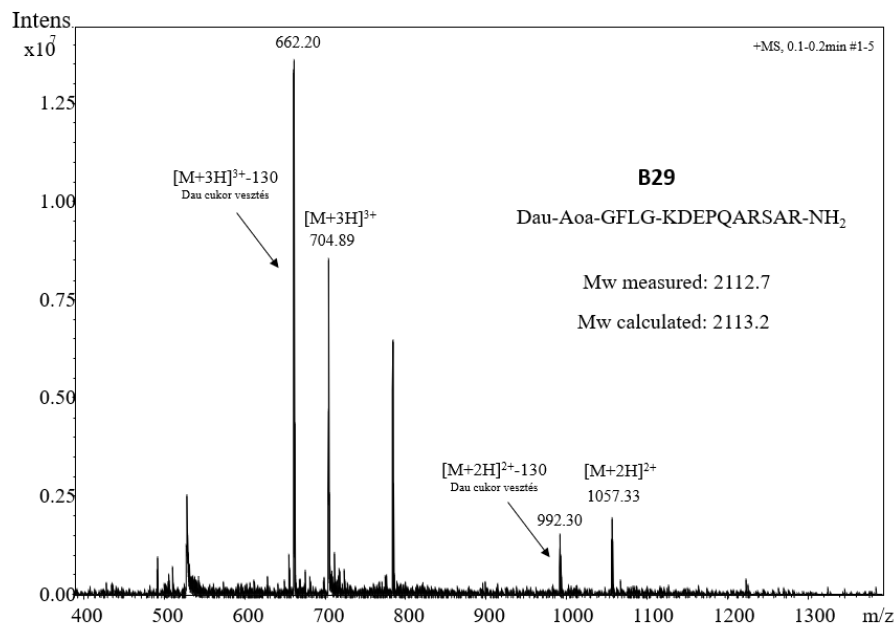
F21. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRASAR-NH₂(B28) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



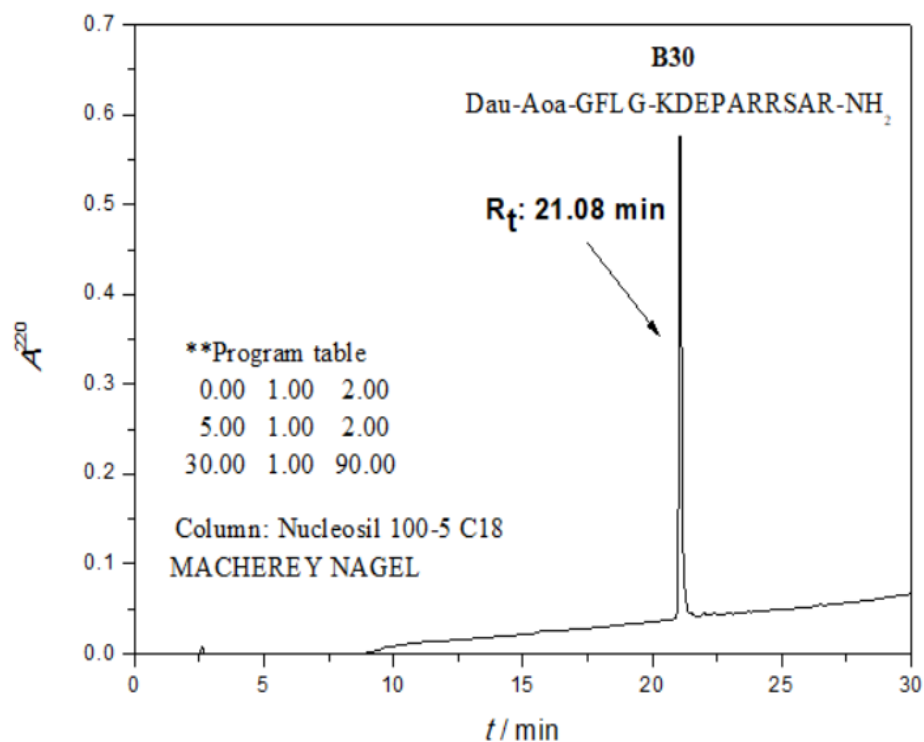
F22. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQRASAR-NH₂(B28) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztése csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



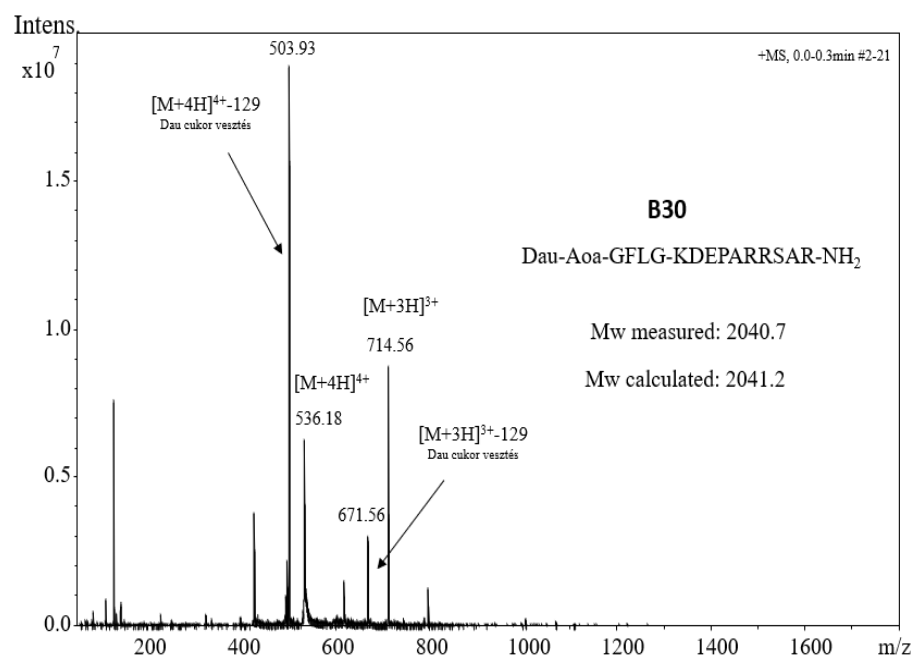
F23. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQARSAR-NH₂ (B29) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



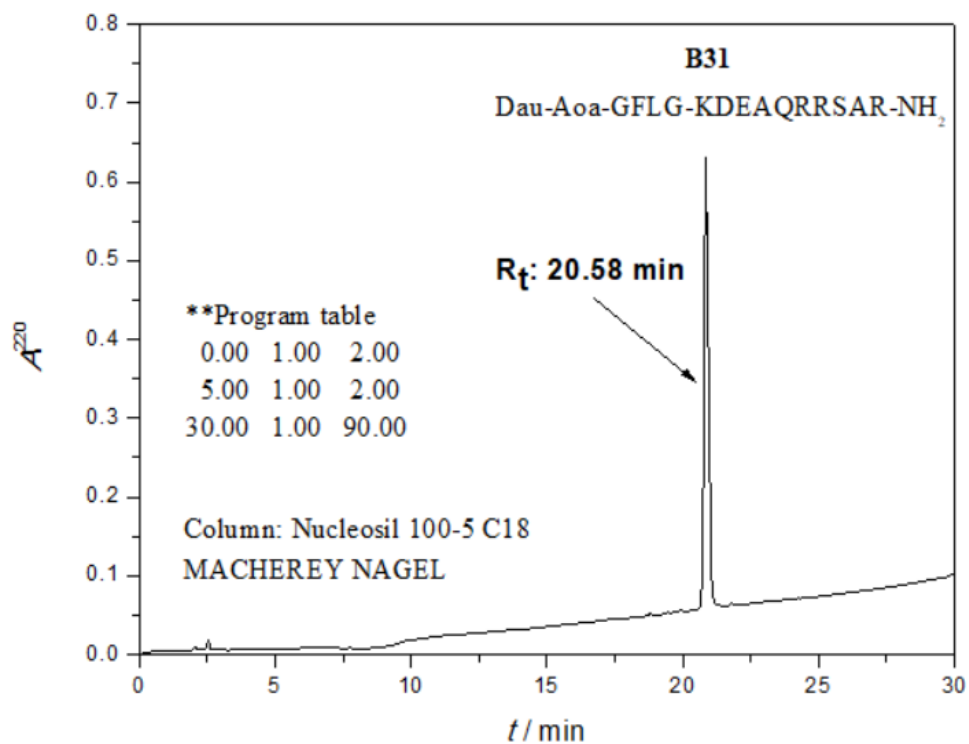
F24. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPQARSAR-NH₂ (B29) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztesége csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



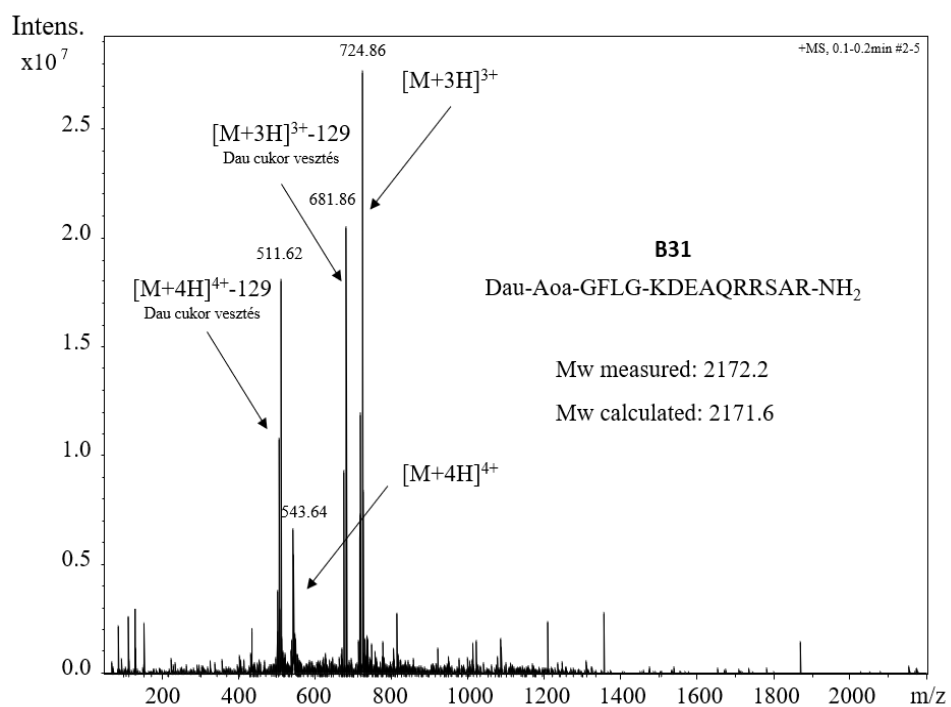
F25. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPARRSAR-NH₂(B30) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



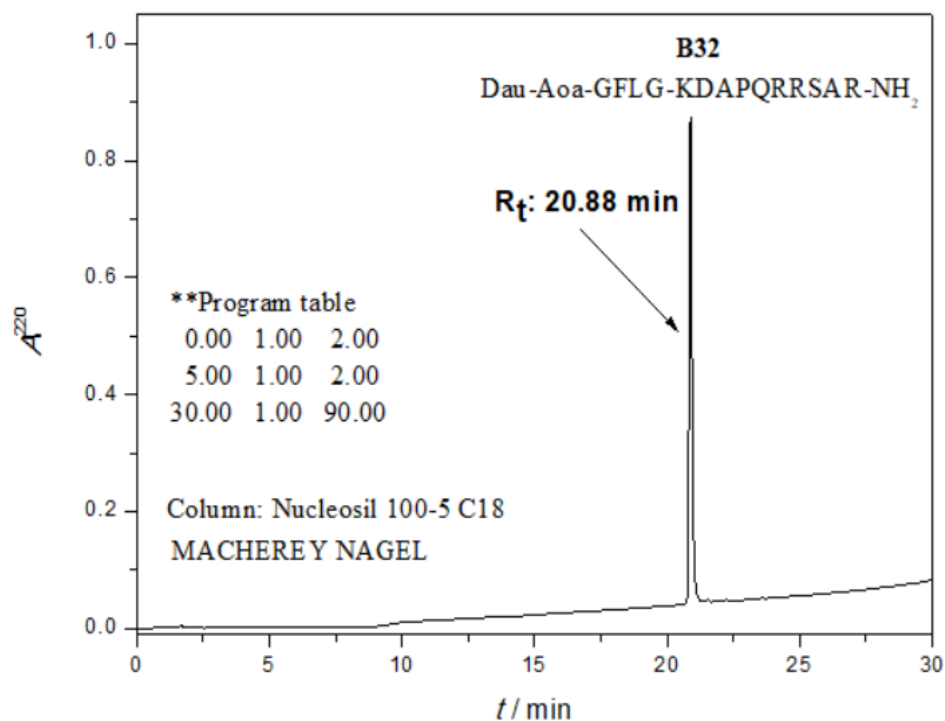
F26. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEPARRSAR-NH₂(B30) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztesége csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



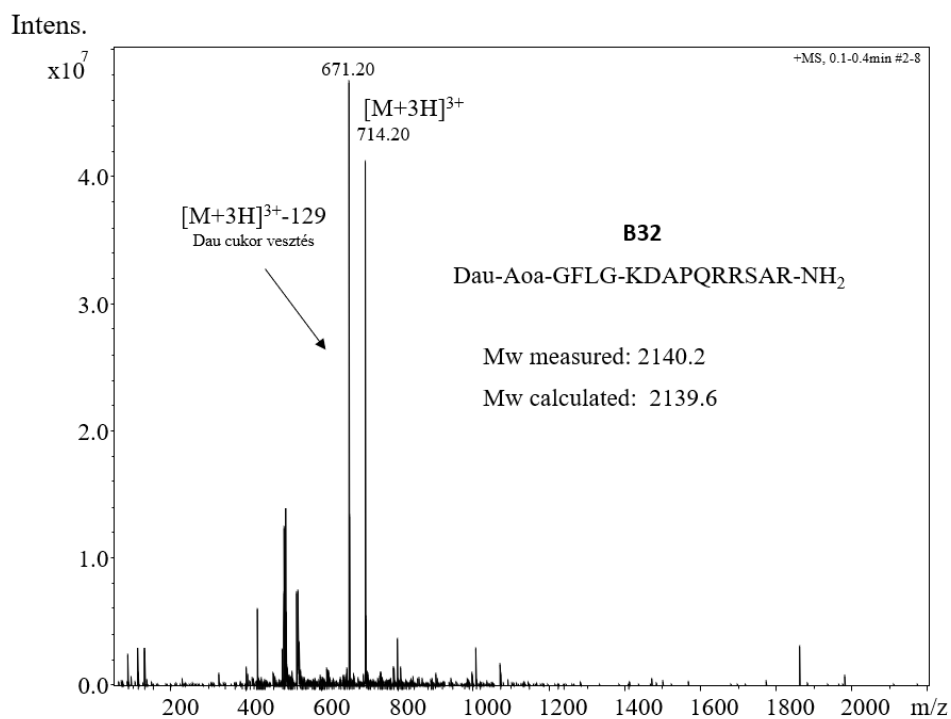
F27. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEAQRRSAR-NH₂ (B31) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



F28. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDEAQRRSAR-NH₂ (B31) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztesé csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)

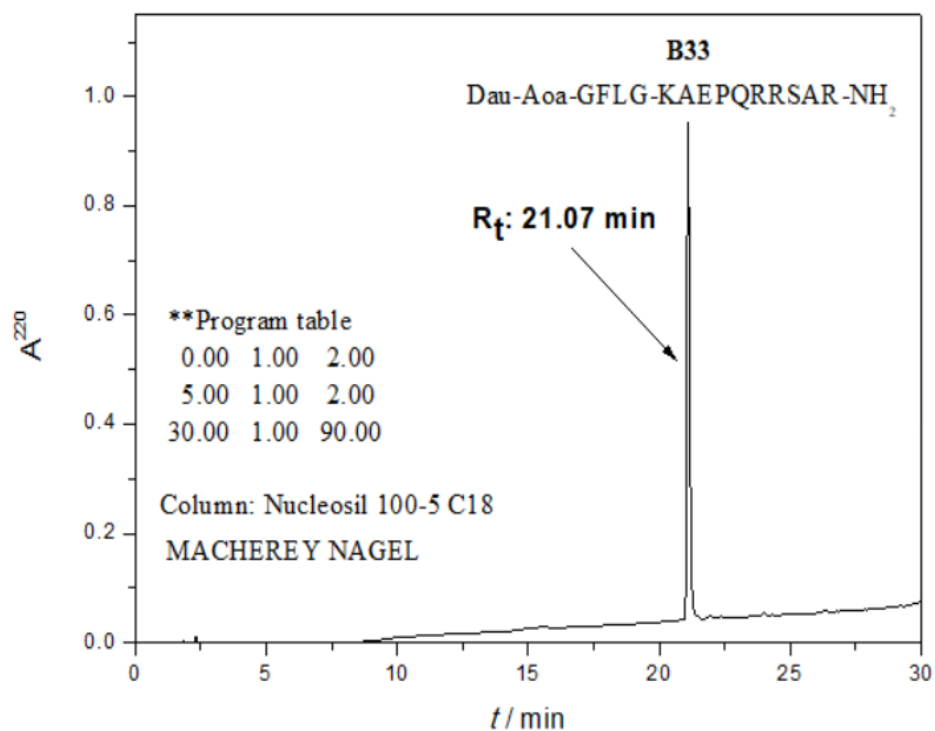


F29. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDAPQRRSAR-NH₂(B32) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja

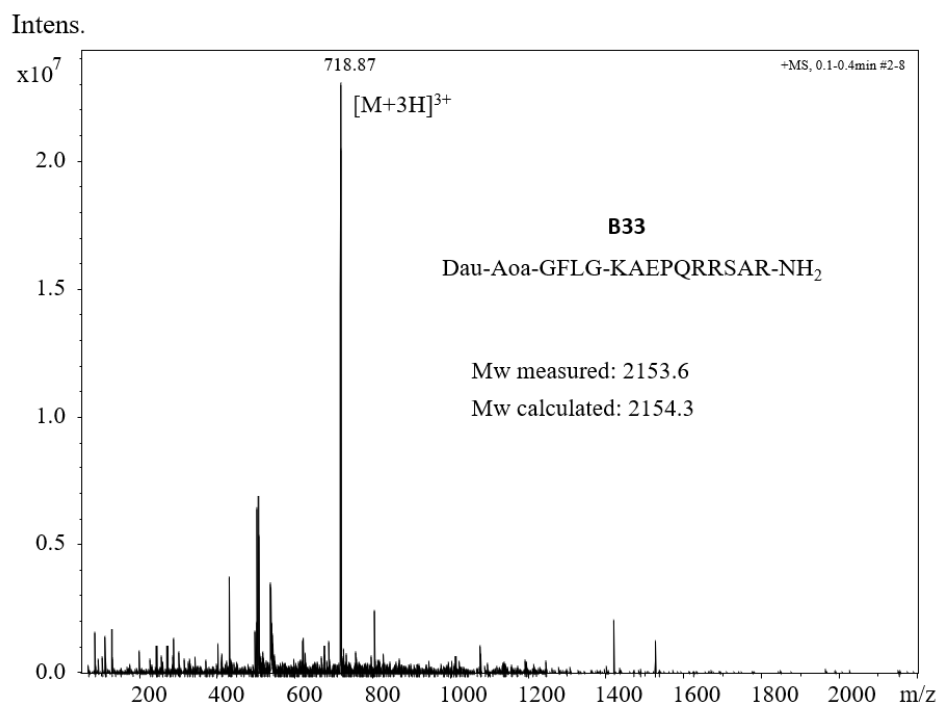


F30. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KDAPQRRSAR-NH₂(B32) konjugátum MS spektruma

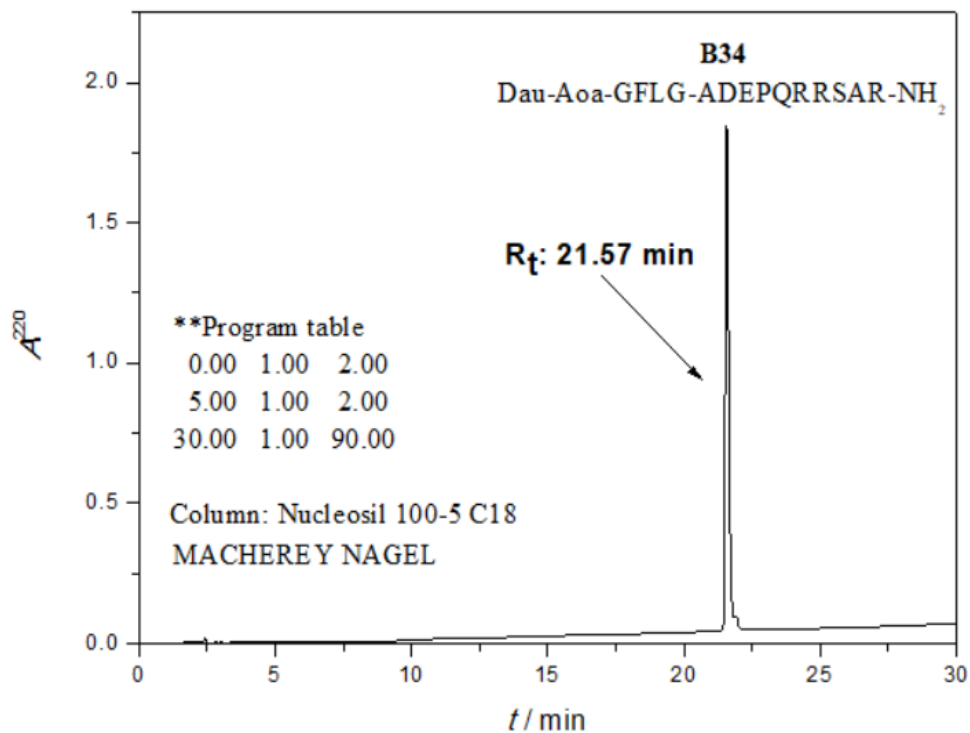
(A Dau cukor vesztése csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe)



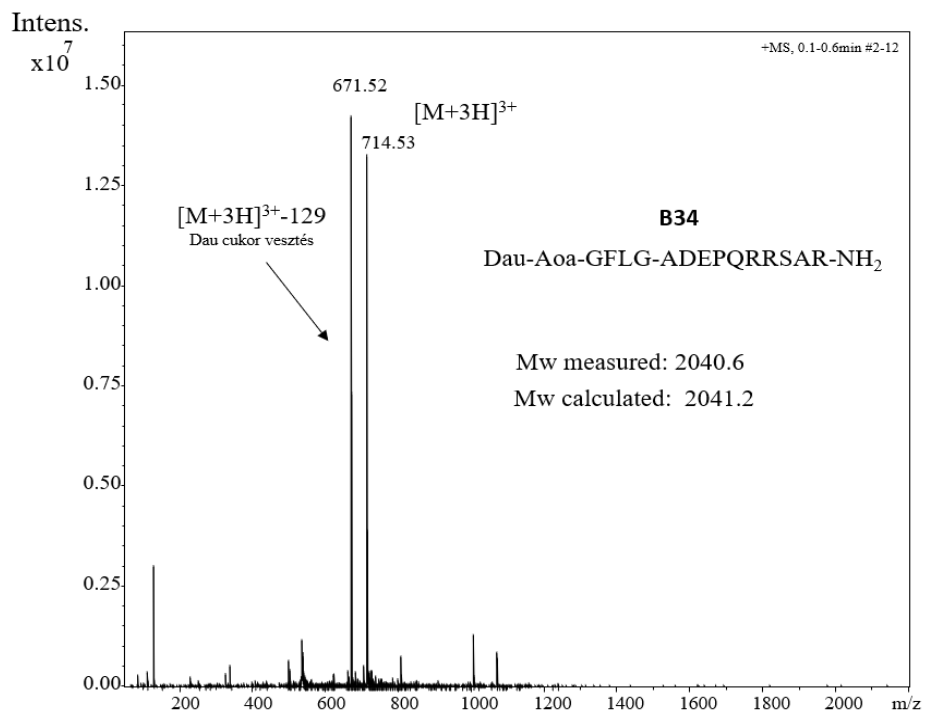
F31. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KAEPQRRSAR-NH₂(B33) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



F32. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-KAEPQRRSAR-NH₂(B33) konjugátum MS spektruma



F33. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-ADEPQRRSAR-NH₂(B34) konjugátum analitikai RP-HPLC kromatogramja



F33. ábra – A Dau-Aoa-GFLG-ADEPQRRSAR-NH₂(B34) konjugátum MS spektruma
(A Dau cukor vesztesége csak a tömegspektroszkópiai mérés körülményei között megy végbe.