

# ANGIOPEP-2-DAUNOMICIN KONJUGÁTUMOK SZINTÉZISE ÉS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Szakdolgozat  
Kémia BSc

**TÉRMEG ANITA**

Témavezetők:  
Pethő Lilla tudományos segédmunkatárs  
Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadó

Szerves Kémiai Tanszék  
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest  
Természettudományi Kar  
Kémiai Intézet  
2019

## Köszönetnyilvánítás

Köszönöm *Dr. Perczel András* tanszékvezető egyetemi tanárnak és *Dr. Mező Gábor* tudományos tanácsadónak, hogy munkámat az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén, valamint az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban lehetővé tették.

Hálásan köszönöm témavezetőimnek, *Pethő Lillának* és *Dr. Mező Gábornak* lelkes támogatásukat és rengeteg türelmüket. Köszönöm, hogy irányításukkal és értékes javaslataikkal segítették munkámat és dolgozatom elkészültét.

Köszönöm *Dr. Enyedi Kata Nórának* és *Adorján Afroditénak*, hogy a munkám során bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel. Hálás vagyok a tömegspektrometriás mérésekben nyújtott segítségükért és hasznos tanácsaikért.

Szeretném köszönetemet kifejezni *Oláhné Dr. Szabó Ritának* a biológiai vizsgálatok elvégzéséért és *Dr. Farkas Viktornak* a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás vizsgálatokban való közreműködéséért. Köszönettel tartozom *Dr. Bősze Szilviának* és *Dr. Schlosser Gittának*, a Tömegspektrometriai, illetve a Sejt- és Immunkémiai Laboratóriumok vezetőinek is.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak a támogatásukat, ami végigkísért a munkám során.

A dolgozatomban bemutatott projektet a *VEKOP-2.3.3-15-2017-00020* és *NVKP\_16-1-2016-0036* pályázatok finanszírozták.

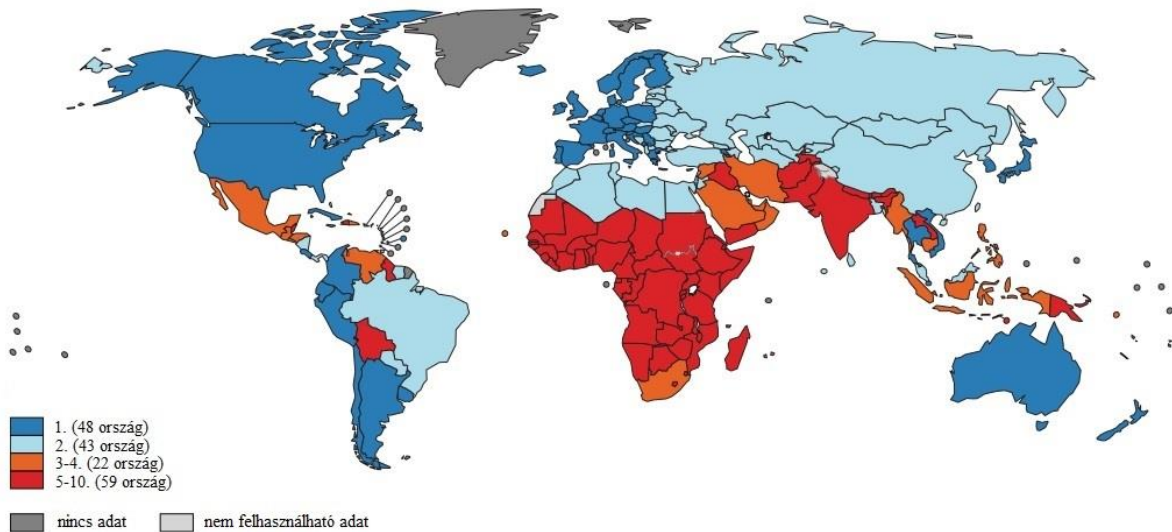
# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Daganatok.....	5
2.1.1. A daganatok kialakulása.....	5
2.1.2. Kemoterápia .....	6
2.1.3. Irányított tumorterápia.....	7
2.1.4. Központi idegrendszeri daganatok .....	9
2.2. A vér-agy gát.....	10
2.2.1. A vér-agy gáton keresztül történő anyagtranszport lehetséges útvonalai .....	10
2.2.2. Gyógyszerek átjuttatása a vér-agy gáton.....	12
2.3. Angiopep-2.....	13
2.4. Daunomicin .....	15
3. Célkitűzések .....	17
4. Anyagok és módszerek.....	19
4.1. Felhasznált anyagok .....	19
4.2. Az Angiopep-2 és a linkerrel funkcionálisított származékok szintézise .....	19
4.2.1. Szilárdfázisú peptidszintézis .....	19
4.2.2. A szintézis menete.....	23
4.2.3. Védőcsoportok szelektív hasítása.....	24
4.2.4. Linker-kapcsolás .....	25
4.2.5. Hasítás a gyantáról .....	25
4.3. Konjugálás daunomicinnel.....	26
4.4. A peptidek és konjugátumok tisztítása.....	26
4.4.1. Tisztítás preparatív HPLC rendszeren.....	27
4.4.2. Tisztítás szemipreparatív HPLC rendszeren .....	27
4.5. Analitikai vizsgálatok.....	28
4.5.1. Tömegspektrometriás mérések.....	28
4.5.2. Analitikai HPLC rendszerrel végzett vizsgálatok .....	28
4.6. Kitermelések.....	29
4.7. <i>In vitro</i> citosztázis és citotoxicitás vizsgálat .....	30
4.8. <i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálat áramlási citometriával .....	32

5. Eredmények.....	38
5.1. Az Angiopep-2 és a linkerrel funkcionált származékok szintézise.....	38
5.1.1. A szintézis menete.....	38
5.1.2. Védőcsoportok szelektív eltávolítása.....	40
5.1.3. Linker-kapcsolás.....	41
5.1.4. Hasítás a gyantáról.....	41
5.2. A konjugátumok előállítása és tisztítása.....	42
5.3. <i>In vitro</i> citosztázis és citotoxicitás vizsgálat.....	44
5.4. <i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálat áramlási citometriával.....	46
5.5. Szerkezetvizsgálat cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával.....	47
5.6. <i>In vitro</i> degradáció-vizsgálat lizoszóma preparátumban.....	50
6. Összefoglalás.....	52
7. Rövidítésjegyzék.....	54
8. Irodalomjegyzék.....	56
9. Függelék.....	61

# 1. Bevezetés

A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC) legfrissebb tanulmánya a rákos megbetegedések számát 18,1 millióra, a rák okozta halálozások számát pedig 9,6 millióra becsüli 2018-ban<sup>1</sup>, ezzel a rák a második leggyakoribb halálozási ok világszerte<sup>2</sup> (1. ábra). Az elmúlt évek tendenciáit előre vetítve az évente regisztrált új esetek száma 2040-ig 29,5 millióra emelkedhet<sup>3</sup>.



**1. ábra.** A rák okozta halálozás a világon. A szinkód azt mutatja, hogy az egyes országokban a rák következtében történő halálesetek a halálozási okok között hanyadik helyen szerepelnek a 0 és 69 év közötti populációban  
(Forrás: Bray, F. et al. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).)

A rákos megbetegedések 23,4 %-a és a rák okozta halálozások 20,3 %-a Európában történik, ugyanakkor Európa a világ népességének csak a 9 %-át teszi ki<sup>1</sup>. Európán belül a férfiak között a legmagasabb, a nők között pedig a harmadik legmagasabb rák okozta mortalitás Magyarországon figyelhető meg<sup>4</sup>. Ezért a rákmegelőzés lehetőségeinek tudatosítása és a kezelési stratégiák fejlesztése kiemelt fontosságú a globális és hazai egészségügy szempontjából.

A központi idegrendszeri daganatok magas letalitásuk és kezelési nehézségeik miatt különösen komoly problémát jelentenek. A daganatoknak ez a csoportja a gyermekek korosztályát érinti a legsúlyosabban: a 0 és 14 éves kor között kialakuló rákos megbetegedések közel egynegyede központi idegrendszeri eredetű<sup>5</sup>. Az agytumorról foglalkozó kutatások egyik fókuszpontja olyan módszerek kifejlesztése, amelyek kemoterápiás gyógyszerek központi idegrendszerbe juttatására hatékony megoldást biztosítanak.

## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1. Daganatok**

A daganat kontrollálatlanul osztódó sejtek halmaza, ezen belül akkor beszélhetünk rosszindulatú daganatról, vagyis rákos elváltozásról, ha a sejtek képesek elhagyni a keletkezésük helyét, és metasztázisokat képezni. Bár a jóindulatú tumoroknak is lehet káros hatása, a potenciális letalitás elsősorban a rosszindulatú daganatokhoz köthető.

#### **2.1.1. A daganatok kialakulása**

A legtöbb daganat monoklonális eredetű, azaz egyetlen sejtből alakul ki genetikai változások felhalmozódása és klonális növekedés eredményeként. A folyamat három lépésből áll<sup>6</sup>: az első, irreverzibilis lépés az iniciáció, amely során a sejtben spontán módon, vagy külső hatásokra az osztódást, sejthalált és differenciációt érintő mutációk keletkeznek. Az ezt követő időben elhúzódó, reverzibilis folyamat a promóció, amely során a mutációkat tartalmazó sejtől osztódással klón jön létre. A harmadik lépés a progresszió, ami a sejtek invazívá (áttétképzésre hajlamosá) válását, és így rák kialakulását eredményezi.

A rákhoz vezető út legfontosabb eleme<sup>7</sup> az osztódási homeosztázis felborulása: a sejtek elvesztik az apoptózisra való készségüket, képesek lesznek folyamatos növekedésre és osztódásra, a jelátviteli útvonalakon érkező antiproliferációs szignálokra pedig érzéketlenné válnak. A folyamat előrehaladtával egyre kevésbé jellemző rájuk a differenciáltság, ez teszi lehetővé a fokozott és teljes élettartamuk alatt fennmaradó mitotikus aktivitást. Emellett gyakran képesek az egészséges sejteket is a saját szolgálatukba állítani, például érésképződést indukálni, ezáltal egy speciális mikrokörnyezetet, ún. tumorsztrómát hoznak létre az őket körülvevő szövetben.

A progresszió stádiumában megjelenhetnek a kariotípust érintő genetikai változások, például hiányzó és extra kromoszómák, nagyobb léptékű transzlokációk, vagy akár a többsejtmagvúság is. Gyakori a sejt morfológia megváltozása és az adhézions kapcsolatok sérülése, ami kulcsfontosságú a rosszindulatú daganat kialakulásában, hiszen így a sejtek a vérárammal távoli szövetekbe is eljuthatnak, és ott áttéteket képezhetnek.

A karcinogenezis öngeneráló folyamat, ugyanis az iniciáció során általában a DNS-javító mechanizmusok is sérülnek, tehát a mutációs ráta megnő, ami az osztódási ráta növekedésével

együtt extrém mennyiségű mutáció kialakulásához vezet. (A legtöbb ráksejt több ezer pontmutációt és több száz kromoszómamutációt tartalmaz.<sup>8)</sup>

A mutációk lehetnek a daganat kialakulásához érdemben hozzájáruló driver és a tumorfejlődés szempontjából közömbös passenger mutációk<sup>9</sup>. Míg az előbbiek tényleges mikroevolúciós előnyt jelentenek, az utóbbiak csak akkor terjedhetnek el, ha a driver mutációkkal azonos genetikai állományban jelennek meg. A driver mutációknak két típusát különböztetjük meg: proto-onkogénekből funkciónyeréses mutáció révén kialakulhatnak onkogének, vagy funkcióvesztéses mutáció révén inaktiválódhatnak korábban működő tumor-szupresszor gének.

A mutációk mellett epigenetikai folyamatok (a metilációs mintázat vagy a kromatinszerkezet módosulásai) is közrejátszhatnak a rák kialakulásában<sup>10</sup>, elsősorban a promóció során, az onkogének és tumor-szupresszorok expressziós szintjének megváltoztatásával.

### **2.1.2. Kemoterápia**

A daganatos megbetegedések kezelésére típustól és stádiumtól függően különböző terápiás módszerek (sebészeti beavatkozás, sugárkezelés, immun-, hormon- és kemoterápia), illetve ezeknek megfelelő kombinációi alkalmazhatóak.

Az egyik legelterjedtebb módszer – sokszor műtéti beavatkozást vagy sugárkezelést kiegészítve – a kemoterápia, amelynek lényege, hogy a beteg szervezetébe intravénásan vagy orálisan tumorelleses gyógyszert juttatnak. Ezeknek két alapvető típusát különböztetjük meg: a citotoxinok a tumorsejteket elpusztítják, a citosztatikumok pedig az osztódásukat gátolják.

A sejtek fokozott mitotikus aktivitását kihasználva a kemoterápiás szerek az osztódás (M fázis) vagy az azt megelőző DNS-replikáció (S fázis) különböző mozzanataiba avatkoznak be. A hatásmechanizmus alapján lehetnek alkilező szerek<sup>11</sup>, amelyek a DNS-ben keresztkötéseket hoznak létre, és ezzel a replikáció során száltöréseket okoznak, antimetabolitok<sup>12</sup>, amelyek az S fázis során az új DNS-szál szintéziséhez szükséges enzimeket blokkolják, antimitotikumok<sup>13</sup>, amelyek az M fázis során a mitotikus orsó kialakulását hiúsítják meg, vagy topoizomeráz inhibitorok<sup>14</sup>, amelyek a transzkripció és replikáció után a DNS szuperhelikális szerkezetének relaxációját gátolják, és eközben száltöréseket is előidéznak. Az alkilező szerek és topoizomeráz inhibitorok citotoxikus hatása azon alapszik, hogy a nagy mennyiségben jelentkező száltörések még a tumorsejtekben is képesek apoptózist indukálni.

Ez a mechanizmus valamelyest szelektív, mert az ép sejtekben a törések – a hatékonyabban működő DNS-javító funkcióknak köszönhetően – nagyobb eséllyel állítódnak helyre, de a

kemoterápiás szerek ezzel együtt is számos kellemetlen mellékhatást okoznak elsősorban a gyorsan osztódó szövettípusokban<sup>11</sup> (például csontvelő, szőrtüsző, száj- és bélnyálkahártya). Gyakori a hajhullás, fáradékonyság, hányinger és hányás, illetve gyógyszertől függően különböző szervek (szív, máj, vese) is károsodhatnak. A citosztatikumok a csontvelőben gátolják a vér alakos elemeinek (fehérvérsejtek, vörösvértestek és vérlemezkék) termelését, ami vérszegénységhez és az immunrendszer legyengüléséhez vezet.

A kemoterápia egy további hátulütője a potenciális másodlagos daganat indukció<sup>15</sup>. A citotoxinok tumorelles hatásának kulcsa, mint láttuk, a DNS károsítása, ezért egyben tumoriniciátorok is, ami hosszú távon akár egy teljesen más típusú daganat kialakulását segítheti elő.

A gyógyszerek nagyobb dózisban való alkalmazása fokozza a hatékonyságot, azonban a mellékhatások súlyosságát is növeli. A módszer további korlátja, hogy a tumorsejtek hajlamosak rezisztenssé válni a rendszeresen adagolt szerekre<sup>16</sup>. A kezelés kombinált kemoterápiával, vagyis különböző hatásmechanizmusú szerek egyidejű használatával tehető eredményesebbé.

### **2.1.3. Irányított tumorterápia**

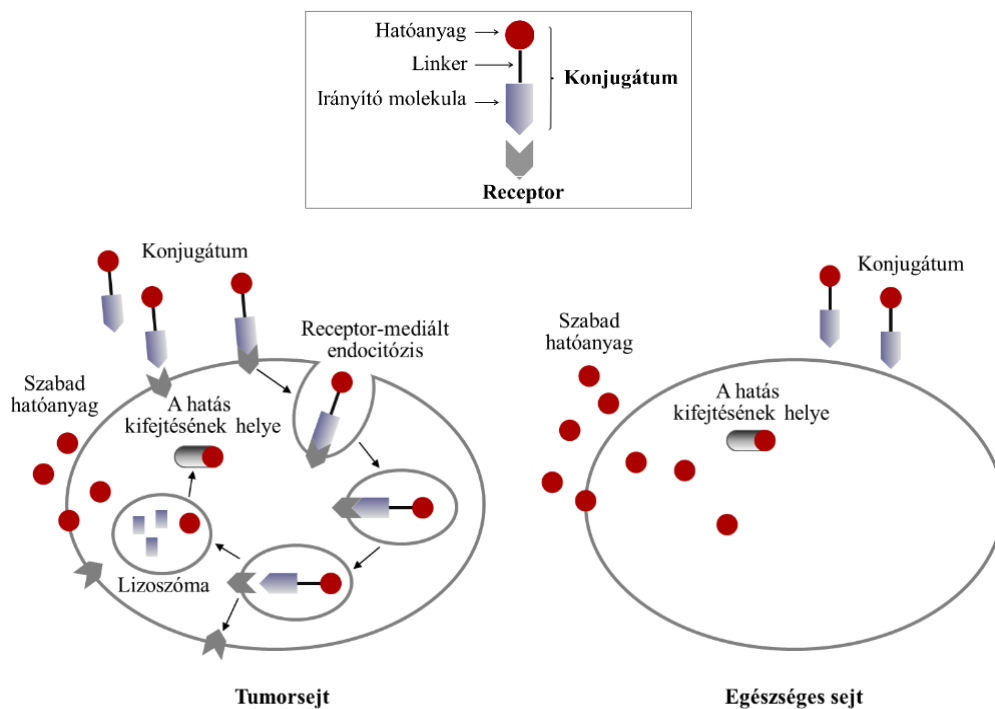
A kemoterápia mellékhatásainak kiküszöbölése érdekében a kutatások az utóbbi évtizedekben az irányított tumorterápia<sup>17</sup> felé fordultak. A cél olyan gyógyszerek kifejlesztése lett, amelyek nem a gyorsan osztódó sejteket támadják meg általában, hanem képesek szelektíven a tumorsejteken kifejteni a hatásukat az azokban túlexpresszáldó sejtfelszíni struktúrák (jellemzően receptorok) felismerése révén<sup>18</sup>.

Az irányított terápia alapvető eszköze a funkciómegosztás, az ilyen célra alkalmazott konjugátumok és hatóanyag-szállító rendszerek különböző feladatokat ellátó részekből: hatóanyagból, irányító molekulából és/vagy hordozóból, illetve az ezeket összekapcsoló linkerekből állnak<sup>19</sup>. A hatóanyagot alapvetően arra tervezik, hogy a célsejt ellen minél hatásosabban lépjen fel, az irányító molekula felelős azért, hogy a sejteket szelektíven felismerje és a hatóanyagot ezekbe bejuttassa, a hordozó feladata pedig a hatóanyag biológiai hozzáférhetőségének és kontrollált felszabadulásának a biztosítása. Az utóbbi két egység szerepét gyakran egyazon molekula tölti be, más esetekben nanorészecskéket, például biokompatibilis polimereket vagy liposzómákat használnak hordozóként, aminek a felületére kapcsolják fel nagy számban az irányító molekulát<sup>20</sup>.

A szelektivitás záloga az egészséges és a daganatos sejtek közötti strukturális és funkcionális különbségek ismerete. Olyan receptort kell keresni, amely a tumorsejtek felszínén a normál



sejtekhez képest jóval nagyobb mennyiségben van jelen, emellett nem túl szűk a szubsztrátspecifitása, így a hatóanyaggal konjugált irányító molekulát is meg tudja kötni, illetve képes internalizációra a liganddal együtt. Ha mindez adott, akkor az irányító molekula és a receptor közötti kapcsolódás hatására receptor-mediált endocitózis indul meg: a receptor-konjugátum komplex egy vezikulába lefűződve a sejtbe jut, ott a konjugátum ledisszociál a receptorról, majd lizoszomális enzimek lehasítják róla a hatóanyagot (2. ábra).



2. ábra. A szelektív hatóanyag-célbajuttatás mechanizmusa az irányított tumorterápia során  
(Forrás: Mező, G. et al. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 79–96 (2010).)

A receptor internalizációja nem feltétlenül szükséges, ebben az esetben azonban olyan linkert (például mátrix metalloproteáz-labilis linker<sup>21</sup>) kell választani, ami biztosítja a hatóanyag felszabadulását a célsejt felületén.

Ha ismert egy, a fenti feltételeknek megfelelő receptor, akkor már csak megfelelő (célszerűen peptid- vagy fehérje-típusú) irányító molekulát kell hozzá választani. Ez történhet például fágbeviteléssel<sup>22</sup> vagy az endogén ligandok receptor-kötő doménjének azonosításával<sup>23</sup>.

Az előbbi módszer lényege az, hogy különböző peptidvariánsokat kódoló bázisszekvenciákat illesztnek be fágok burkolófehérjéinek a génjeibe, így a fágok felszínén mindig a beillesztett szakasznak megfelelő peptid expresszálódik, és ezzel egy fág-könyvtár jön létre. Az utóbbi módszer során a receptor ismert szubsztrátjaiban, illetve adatbázisokból kikeresett egyéb homológ fehérjékben szekvencia-illesztéssel hasonló régiókat keresnek, ezeken belül is azonosítják az invariáns pozíciókat, majd a többi aminosav módosításával nagy számú

szekvencia-változatot állítanak elő. Végül mindkét esetben a receptorhoz való kötődést vizsgáló tesztekkel szelektálják ki a variánsok közül a potenciális irányító molekulákat.

Egy harmadik megközelítés, hogy a receptorhoz, mint antigénhez monoklonális antitesteket állítanak elő<sup>24</sup>, amik ún. molekuláris trójai faló mechanizmussal makromolekulák tumorsejtekbe juttatására képesek. Az antitestek a célreceptor egy adott molekularészletéhez képesek szelektíven kötődni és ezáltal endocitózist indukálni, azonban a felismert epitóp rendszerint nem azonos a receptor ligandkötő doménjével. Fehérje típusú hatóanyag esetén az antitestből és a hatóanyagból általában fúziós fehérjét állítanak elő, DNS esetén pedig a szállítás jellemzően antitestekkel funkcionizált liposzómába zárva történik.

Az irányított tumorterápia hátránya, hogy a receptorok száma a tumorsejteken korlátozott, ezért a gyógyszerkonjugátumok által kifejtett hatás a dózis emelésével egy bizonyos küszöb fölött nem növelhető tovább<sup>25</sup>. Erre megoldást jelenthet a kombinált irányított tumorterápia, amely során különböző receptorokat felismerő konjugátumokat alkalmaznak együttesen, vagy egy irányító molekulához több hatóanyagot is kapcsolnak.

#### **2.1.4. Központi idegrendszeri daganatok**

A központi idegrendszert, elsősorban az agy különböző területeit is megtámadhatja jó-, illetve rosszindulatú daganat. Megkülönböztetünk az agy valamelyik szövetében kialakuló elsődleges és az agyon kívül kialakuló, de áttétképzéssel az agyba is bejutó másodlagos agytumороkat.

Az elsődleges rosszindulatú agydaganatos megbetegedések körülbelül 80%-áért a malignus glioma felelős<sup>26</sup>, amely központi idegrendszeri glia sejtekből alakul ki. A leggyakoribb és egyben az egyik legagresszívabb típusa a glioblastoma: az esetek több, mint felét teszi ki, és a betegek körében a medián halálozási idő mindössze 15 hónap<sup>27</sup>.

A központi idegrendszeri daganatok előfordulási aránya gyermekkorban jellemzően magasabb, mint a felnőttek körében. A 14 év alatti populációban legtöbbször diagnosztizált malignus agytumor a medulloblastoma<sup>28</sup>.

Az agydaganatok kezelésére legtöbbször sebészeti beavatkozást és sugárkezelést használnak. Mindkét módszernek vannak hátrányai: a sebészeti eltávolítás mindig rejt magában kockázatot, sőt, abban az esetben, ha a daganat túl közel helyezkedik el az agy valamelyik fontos területéhez, nem is alkalmazható, a sugárkezelés pedig a memória és a kognitív képességek romlását okozhatja<sup>29</sup>. A két módszert ötvözi a sugársebészet, amellyel sikeresen csökkenthetőek a mellékhatások. Ennek lényege, hogy egyszeri nagy dózissal sugározzák be

kizárólag a daganatos szövetrészt, amelynek pontos helyzetét orvosi képalkotó módszerekkel (CT, MRI) határozzák meg.

A központi idegrendszeri daganatok esetén a kemoterápia alkalmazása problémákba ütközik a vér-agy gát szelektív transzportmechanizmusai miatt. A vér-agy gát működését és a kemoterápiás szerek központi idegrendszerbe juttatásának lehetőségeit a 2.2. fejezetben tárgyalom részletesen.

## **2.2. Vér-agy gát**

A vér-agy gát a perifériás keringést és az agyi extracelluláris folyadékot elszeparáló szemi-permeábilis rendszer, amelynek funkciója a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartása és a vérbe kerülő toxikus anyagokkal szembeni védelme. A tulajdonképpeni gátat az agyi kapillárisok falát alkotó endotélsejtek szokásosnál szorosabb illeszkedése (tight junction) képezi, ami a sejtek közötti paracelluláris diffúziót erősen korlátozza, ezzel elsősorban a hidrofil vagy nagy molekulatömegű anyagok átjutását gátolva.

### **2.2.1. A vér-agy gáton keresztül történő anyagtranszport lehetséges útvonalai**

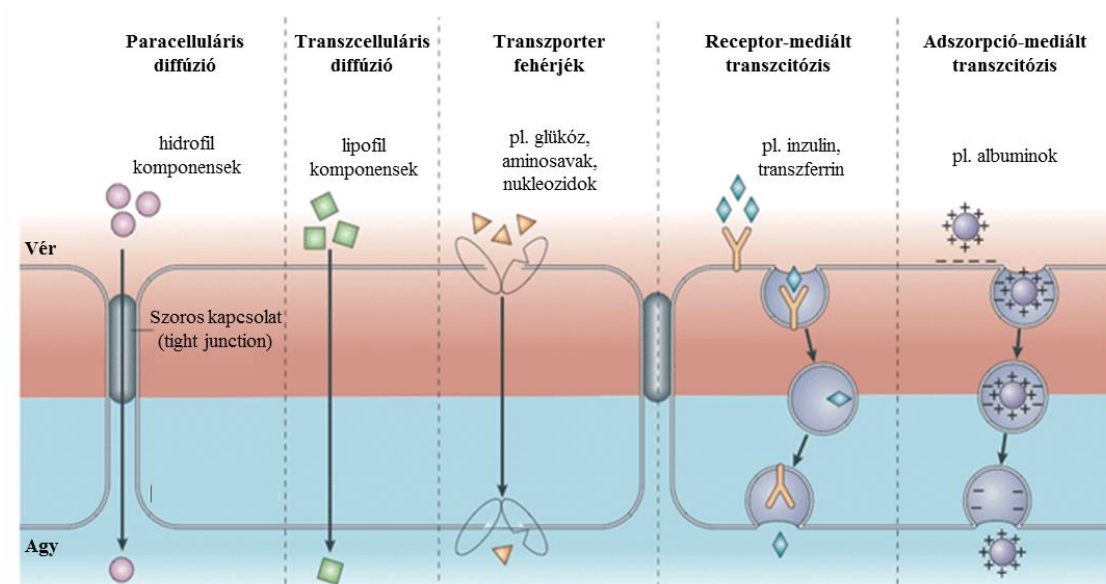
A központi idegrendszernek a normál működéshez szüksége van tápanyag- és oxigénellátásra, megfelelő ionkoncentráció-viszonyokra, illetve hormonális szabályozásra. A vér-agy gát feladatai közé tartozik a fenti folyamatokban résztvevő komponensek szelektív transzportjának lebonyolítása is a molekulaszervezetnek és funkciónak megfelelő útvonalakon (3. ábra).

A paracelluláris útvonal, amely a szervezetben általában a hidrofil komponensek széles körű passzív transzportját biztosítja, a vér-agy gát esetén erősen korlátozott, csak a vízmolekulák és kis ionok (például nátrium-, kálium- és kloridionok) számára nyitott. Az ionok szállításában és az ideális koncentráció-viszonyok fenntartásában ioncsatornák és -pumpák is részt vesznek.

A kis lipofil molekulák (például a szteroidhormonok), illetve a légzési gázok passzív diffúzióval szabadon mozoghatnak az endotélsejtek membránján keresztül. A transzcelluláris diffúzió empirikusan megállapított feltétele, hogy az oktanol-víz megoszlási hányados logaritmus (logP) 1 és 3 közé, a molekulatömeg pedig a 450 Da-os küszöb alá essen<sup>30</sup>.

Az átdiffundáló molekulák egy része, például bizonyos lipidek, szteroidok és gyógyszer-hatóanyagok koncentrációgradienssel szemben visszajutnak az apikális oldalra különböző

efflux pumpák működésének köszönhetően. Ugyanakkor más anyagok, amelyek hidrofíil jellegüknel fogva nem képesek átdiffundálni a vér-agy gáton, de nélkülözhetetlenek a központi idegrendszer számára, a vérből a bazolaterális oldalra szállíthatnak influx pumpák és transzporterek közvetítésével, akár aktív, akár passzív transzporttal. Így jutnak az agyba a bioszintetikus építőelemek (monoszacharidok, aminosavak és nukleotidok), illetve különféle töltéssel rendelkező szerves kismolekulák, például a ciklikus AMP, a szerotonin vagy a dopamin<sup>29</sup>.



3. ábra. A vér-agy gáton keresztül történő transzport lehetséges útvonalai  
(Forrás: Everts, S. *Chemical & Engineering News* **85**, 33–36 (2007).)

A makromolekulák szállítása vezikuláris transzporttal történik az endotélsejteken keresztül. Egy lehetséges transzportmechanizmus az adszorpció-mediált transzcitózis, ami pozitív töltésű peptidekre és fehérjékre jellemző. Ezek a kationos karakterük révén képesek az endotélsejtek felszínét borító glükokalix negatív töltésű glükózaminoglikán-oldalláncaival ionos kölcsönhatásba lépni<sup>31</sup>. Az ilyen módon adszorbeált molekulák egy klatrin-burkos vezikulába lefűződnek, a sejtvárendszer segítségével a bazolaterális membránhoz szállítódnak, és ott exocitózissal az agyi extracelluláris térbe ürülnek.

Receptor-mediált transzcitózissal olyan molekulák juthatnak át a vér-agy gáton, amelyek ligandjai az endotélsejtek apikális membránján expresszálódnak és internalizációra képesek receptoroknak. A transzportfolyamat kezdete egy receptor-mediált endocitózis, ezt követően a ligand-receptor kötődés megszűnik, a ligand egy külön vezikulába fűződik, végül a lizoszomális degradációt elkerülve exocitózissal a központi idegrendszerbe jut. A legtöbb fehérje, például az inzulin, az immunoglobulin G, a vas-transzferrin komplex vagy a lipoproteinek transzportja ezen az útvonalon történik<sup>29</sup>.

### 2.2.2. Gyógyszerek átjuttatása a vér-agy gáton

A központi idegrendszert megtámadó betegségek (agydaganatok különböző típusai, Alzheimer- és Parkinson-kór) kezelésében a vér-agy gát komoly kihívások elé állítja a gyógyszeripart, ugyanis számos előnyös tulajdonsággal rendelkező hatóanyag a megszokott formájában nem alkalmazható. Ennek a vér-agy gáton keresztüli csekély transzportjuk az oka, ami megakadályozza, hogy egyáltalán eljussanak a célsejtekig és a terápiás hatásukat kifejthessék.

Erre a régóta ismert problémára az első megoldások invazív módszerek voltak: a gyógyszereket sebészeti beavatkozás során beinjektálták vagy beültetett implantátumon keresztül fokozatosan adagolták az agy-gerincvelői folyadékba<sup>32</sup>. Ma már inkább olyan polimer implantátumokat használnak, amelyekhez maga a hatóanyag is hozzá van kapcsolva, és onnan egyenletesen szabadul fel a szervezetben<sup>33</sup>. Ezeket a terápiás módszereket azonban nagy kockázatuk és túlzott lokalizáltságuk miatt igyekeznek egyéb, nem-invazív eljárásokkal felváltani.

Bár az alternatív útvonalak közül például az ornyálkahártyán keresztül való bejuttatás lehetőségét is vizsgálják, a kutatások elsősorban az agy kiterjedt érhálózatára összpontosítanak. Például a véráramban szállítódó gyógyszerek számára az endotélsejtek közötti szoros kapcsolat hipertóniás oldat vagy fókuszált ultrahang segítségével átmenetileg megnyitható<sup>32</sup>. Ugyanakkor a szelektivitás hiánya miatt – az eljárás során nem csak a gyógyszer, hanem bármilyen toxikus anyag is bejuthat az agyba – ígéretesebbek a molekuláris szintű megoldások.

Egy lehetséges út a bejuttatásra olyan gyógyszer-molekulák tervezése, amelyeknek tulajdonságaiknál fogva jelentős a penetrációja a vér-agy gáton keresztül. Kis molekulatömegű hatóanyagokból lipofilizációval, vagyis a poláris molekularészletek apoláris csoportokkal való maszkírozásával előállítható olyan ún. prodrug, ami az endotél sejtrétegen át tud diffundálni, a központi idegrendszerben pedig felszabadul belőle az aktív ágens<sup>34</sup>. A peptid-, illetve fehérje-típusú hatóanyagok esetén a kationizáció segítheti elő az átjutást az adszorpció-mediált útvonalon<sup>35</sup>.

Azonban a fenti megközelítéssel járó szerkezeti kötöttségek erősen leszűkítik az alkalmazható molekulák körét, ezért az 1980-as évektől kezdve egy nagyobb szabadságot biztosító módszer, a hatóanyagok irányító molekulához való hozzákapcsolása került a kutatások középpontjába.

Az irányító molekula (és ebben az esetben egyben hordozó) lehet biológiai entitás, például génterápiás virális vektorokkal ígéretes klinikai tesztek vannak folyamatban<sup>36</sup>, sőt preklinikai stádiumban már az immun- és őssejtek vektorként való alkalmazásával is kísérleteznek<sup>37</sup>.

A másik és egyelőre elterjedtebb út a molekuláris hordozók használata. Speciális módosításokat tartalmazó rövid peptidok (például bizonyos diketopiperazinok vagy *N*-metilfenilalaninban

gazdag peptidek) passzív diffúzióval<sup>38</sup>, kationizált fehérjék és sejtpenetráló peptidek pedig adszorpció-mediált transzcitózissal<sup>31</sup> képesek hatóanyagot transzportálni az agyba.

A legnagyobb szelektivitás és az átjuttatható molekulák legszélesebb skálája azonban a receptor-mediált transzcitózishoz köthető. Ebben az esetben az irányító molekulát úgy kell megválasztani, hogy valamely, a vér-agy gát apikális oldalán expresszálandó és transzcitózis beindítására képes receptorhoz szelektíven kötődjön. Gyakori célpont az inzulin<sup>39</sup>, transferrin<sup>40,41</sup> és leptin<sup>42,43</sup> receptor, illetve az alacsony sűrűségű lipoprotein-receptorok (LDLR) családja<sup>30,44,45</sup>, például az alacsony sűrűségű lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje 1 és 2 (LRP1 és LRP2).

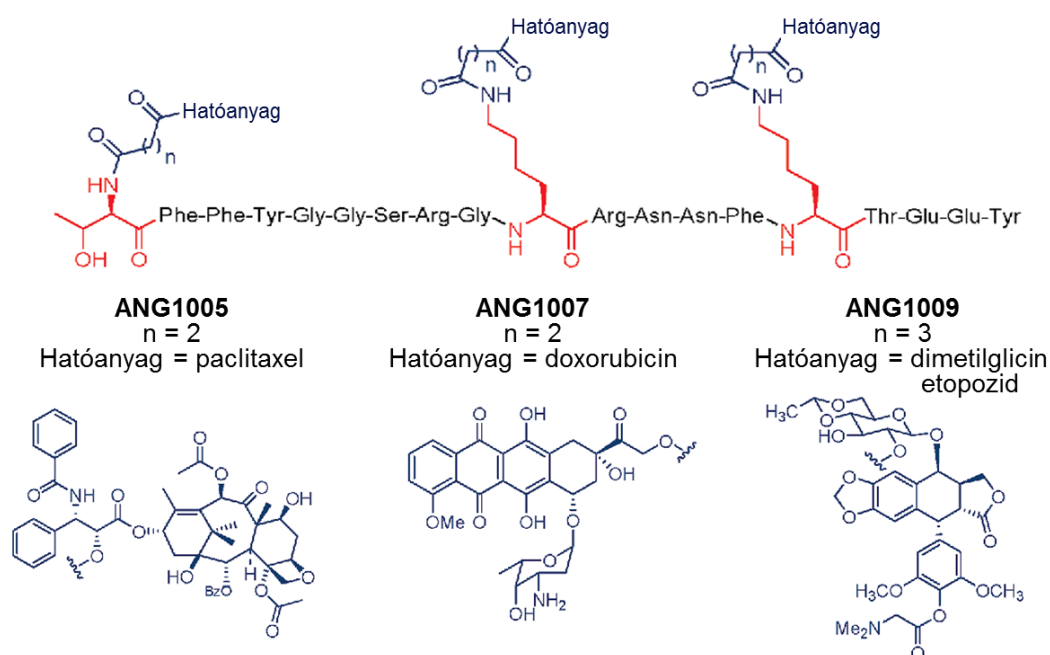
### **2.3. Angiopep-2**

A munkám során előállított konjugátumokban irányító molekulaként egy tizenkilenc aminosavból álló peptidet, az Angiopep-2-t alkalmaztam. Ez a peptid az agytumorellenes konjugátumokban kétszeres irányító funkciót tölt be, ugyanis az LRP1 receptor ligandja, ami egyrészt jelen van a vér-agy gát apikális oldalán, másrészt túlexpresszálandó bizonyos típusú tumorsejteken. Így a konjugátum először az agyba szállítható receptor mediált-transzcitózissal, majd ott szelektíven bejuttatható a tumorsejtekbe receptor-mediált endocitózissal<sup>46</sup>.

A peptid szekvenciáját (H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH) 2008-ban Demeule és munkatársai publikálták<sup>45</sup>, akik egy szerin proteáz inhibitor, az aprotinin fehérje vér-agy gát-penetráló képességét vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy alacsony hőmérsékleten vagy denaturált formában az aprotinin transzportja a vér-agy gáton keresztül jelentősen lecsökken, amiből arra következtettek, hogy a folyamat egy receptoron keresztül zajlik. A receptor és a receptor-kötő domén azonosításához az aprotinin szekvenciáját egy fehérje-adatbázis szekvencia-készletével vetették össze. A legnagyobb egyezést mutató humán fehérjék mind LRP-ligandnak, a homológ szekvenciaprészetek pedig a Kunitz-típusú proteáz inhibitor doménnek bizonyultak.

A Kunitz-domén szerepe az LRP által való felismerésben már korábban ismert volt<sup>47</sup>, sőt kísérletileg azt a minimális szekvencia-részletet is meghatározták, ami a receptorral való interakcióhoz szükséges<sup>48</sup>. Ennek a részletnek egy tizenkilenc aminosav hosszúságú, kibővített változatát hasonlították össze az adatbázisból kiválasztott fehérjékben, majd a szekvencia-illesztésből kiindulva közel száz peptidváltozatot állítottak elő és teszteltek le a vér-agy gáton való átjutás szempontjából. A screening során legeredményesebbnek talált szekvencia kapta az Angiopep-2 nevet.

Még ebben az évben megszületett az a cikk<sup>49</sup> is, amelyben az Angiopep-2-t először kemoterápiás gyógyszerhatóanyaggal konjugálták, és a konjugátum (ANG1005) glioblastoma elleni hatásosságát sikeresen demonstrálták. Az elkövetkező években még két hasonló szerkezetű tumorellenes gyógyszer-jelöltet (ANG1007 és ANG1009) állítottak elő más-más hatóanyagokkal<sup>50</sup>. A konjugátumok mindegyikében három gyógyszermolekulát kapcsoltak az Angiopep-2-re a két lizin oldallánc és az *N*-terminális aminosocsoportjain keresztül, borostyánkősav vagy glutársav linkerekkel. A linker és a hatóanyag között minden esetben észterkötést alakítottak ki. A konjugátumok szerkezete a 4. ábrán látható:



4. ábra. Az ANG1005, ANG1007 és ANG1009 konjugátumok szerkezete  
 (Forrás: Ché, C. *et al. J. Med. Chem.* **53**, 2814–2824 (2010).)

Glioblastoma sejtvonalakon végzett *in vitro* vizsgálatok alapján valamennyi konjugátum citotoxicitása összemérhető volt a megfelelő konjugátatlan hatóanyaggal (a három közül az ANG1009 bizonyult a legkevésbé hatásosnak), és *in vivo* kísérletekben az agyba való felvétel sebességi állandója az ANG1005 esetében 4,8-szor, az ANG1007 esetében 12,4-szer, az ANG1009 esetében pedig 24,4-szer nagyobb volt, mint a szabad gyógyszermolekuláé<sup>50</sup>. Így összességében az ANG1005 és ANG1007 konjugátumok jóval eredményesebben gátolták a tumornövekedést glioblastomás egerekben, mint a hatóanyagok önmagukban<sup>49,51</sup>. (Az ANG1009-ről nem áll rendelkezésre adat.)

Az előbbi két gyógyszerjelölt egy kanadai biotechnológiai cég, az Angiochem Inc. fejlesztése alatt áll. Az ANG1005 klinikai vizsgálatának I. fázisa 2010-re, II. fázisa pedig 2017-re fejeződött be, a konjugátum tolerálhatóságát és tumorellenes hatását rosszindulatú gliómán és

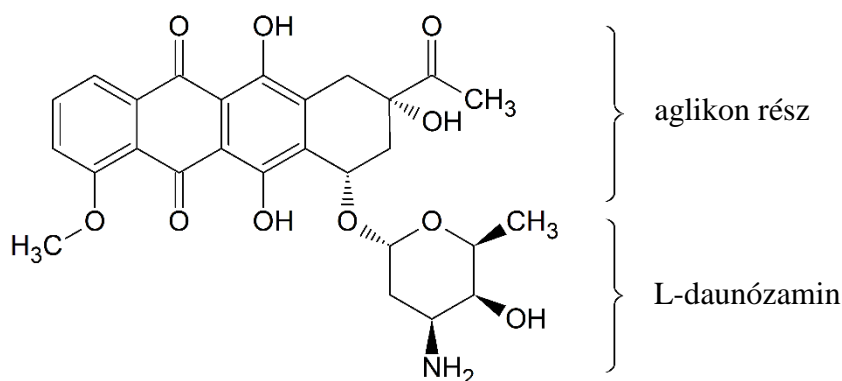
mellrák visszatérő agyi áttétein tesztelték<sup>52-54</sup>. Jelenleg az ANG1005 esetén a III. fázis, az ANG1007 esetén pedig az I. fázis vizsgálatai folynak<sup>55</sup>.

Az első sikeres próbálkozások óta az Angiopep-2-t felhasználták központi idegrendszerben ható fájdalomcsillapítóban (ANG2002<sup>56</sup>) és mellrák agyi áttétei ellen tervezett irányított tumorterápiás gyógyszerben (ANG4043<sup>57</sup>) is. Az ANG2002 konjugátumban a peptid C-terminálisára kapcsoltak egy neurotensin molekulát, az ANG4043 konjugátumban pedig az N-terminálisra egy anti-HER2 antitestet. Mindkét esetben a preklinikai stádium kísérletei zajlanak.

Számos publikáció született az Angiopep-2 nanorészecskékhez való kapcsolásáról is, ehhez liposzómákat, poli(etilén-glikol)-, poli( $\epsilon$ -kaprolaktám)-polimereket, poli(amidoamin)-dendrimereket, termoreszponzív hidrogéleket, szén nanocsöveket, arany nanorészecskéket és ezek különböző kombinációit használták<sup>58-64</sup>. A nanorészecskék az Angiopep-2-n kívül gyakran másik, a tumorsejtekhez nagy affinitást mutató irányító molekulát (például sejtpenetráló peptidet<sup>59</sup> vagy EGFP-EGF1 fúziós fehérjét<sup>61</sup>) és hatóanyagot (például doxorubicint<sup>58,60</sup> vagy terápiás gént<sup>62</sup>) is tartalmaztak. Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok azt mutatják, hogy a multifunkcionalizált nanorészecskék képesek szelektíven és jó hatékonysággal célozni az agyi daganatos sejteket.

## 2.4. Daunomicin

Az általam előállított konjugátumok kemoterápiás hatóanyagként daunomicint, vagy más néven daunorubicint tartalmaztak, amely a gyógyszerpiacon hidroklorid só formájában kapható Cerubidine néven. A daunomicin molekulájában (5. ábra) egy kondenzált gyűrűs aglikonrészhez egy monoszacharid, az L-daunózamin kapcsolódik.



5. ábra. A daunomicin szerkezeti képlete

Először 1959-ben izolálták a *Streptomyces peucetius* baktériumfajból, ami többféle citotoxikus antibiotikumot, köztük daunomicint termel a konkurens mikroorganizmusok ellen. Klinikai

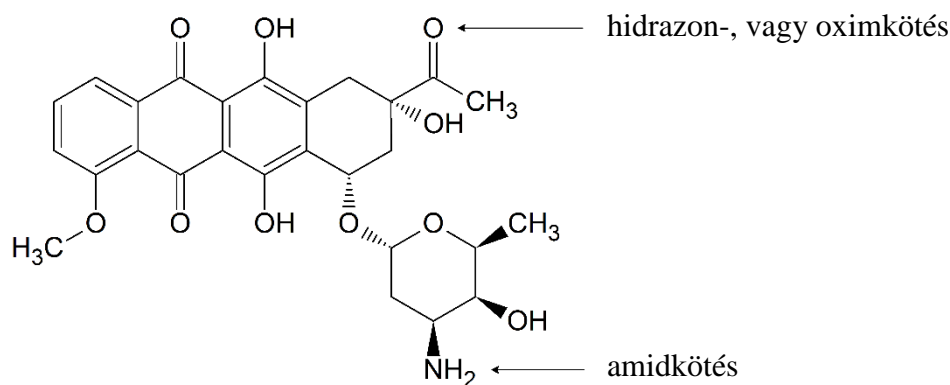


alkalmazását az Amerikai Egyesült Államokban 1979-ben engedélyezték<sup>65</sup>, és jelenleg is szerepel az Egészségügyi Világszervezet alapvető gyógyszereket tartalmazó listáján az antineoplasztikus gyógyszerek kategóriájában<sup>66</sup>.

Tumorellenes hatásának a kulcsa az, hogy a DNS-sel interkaláció révén komplexet képez, és ezzel beavatkozik a topoizomeráz II enzim működésébe. A topoizomeráz II a DNS transzkripció és replikáció utáni szuperhelikális szerkezetét bontja meg a DNS kettéhasításával, „kibogozásával”, majd visszaligálásával. A daunomicin DNS-hez való kötődése ezt az utolsó ligációs lépést gátolja, és így egyrészt kétszálú töréseket hagy a DNS-ben, másrészt megakasztja a mitózis folyamatát, tehát citotoxin és citosztatikum is egyben.

Mint a kemoterápiás hatóanyagok általában, a tumorsejtek mellett a gyorsan osztódó egészséges sejteket is károsíthatja<sup>65</sup>. Legsúlyosabb mellékhatása, hogy kardiotoxikus, nagy mennyiségben pangásos szívelégtelenséget okozhat<sup>67</sup>.

A mellékhatások csökkentése érdekében a daunomicin összekapcsolható a célzott sejtbejuttatást biztosító irányító molekulákkal, az eddigi kutatások során ehhez peptideket (például GnRH<sup>68</sup> vagy oligoarginin<sup>69</sup>) és antitesteket (például OV-TL16<sup>70</sup>) használtak. A daunomicinben két konjugációra alkalmas funkció csoport található: a daunozamin amincsoportján keresztül amidkötés, az aglikon rész 13-as szénatomján található oxocsoporton keresztül pedig hidrazon- vagy oximkötés alakítható ki<sup>71</sup> (6. ábra).



6. ábra. A daunomicin konjugálásra alkalmas funkció csoportjai

Amidkötés esetén az ideálisnál stabilabb konjugátumhoz jutunk, amiből a célsejtben mérsékelt hatékonysággal szabadul fel a tumorellenes komponens, a hidrazonkötés pedig savas (< 5) pH-n bomolhat, ami megnehezíti a konjugátum tisztítását. Ezért a munkám során a daunomicin irányító molekulára való kapcsolásához az oximkötést választottam. Ez a kötéstípus viszonylag stabil, ezért a konjugátumokból a lizoszomális degradáció során nem a szabad hatóanyag, hanem annak különböző aktív metabolitjai szabadulnak fel<sup>72</sup>.

### 3. Célkitűzések

A szakdolgozat-témám olyan agytumorellenes peptid-hatóanyag konjugátumok előállítására volt, amelyek képesek a vér-agy gáton keresztül a központi idegrendszerbe jutni, majd ott a daganatos célsejtekbe szelektíven internalizálódni, és így alkalmasak lehetnek irányított tumorterápiás célokra.

Irányító molekulaként az Angiopep-2 peptidet, hatóanyagként pedig a daunomicint választottam. A daunomicint a peptid aminocsoportjaihoz aminosav-linkeren keresztül, oxim-kötés kialakításával kapcsolom. Az Angiopep-2 a két lizin oldalláncban és az *N*-terminálison is tartalmaz aminocsoportot, így maximálisan három hatóanyag-molekulával konjugálható. Az összes olyan korábbi publikációban<sup>46,49,50</sup>, amelyben Angiopep-2 irányító molekulát használtak és az aminocsoporton keresztül való konjugálást választották, a három aminocsoport mindegyikéhez kapcsolom hatóanyagot, és ezt a döntést nem indokolták részletesen.

Pedig az, hogy maximálisan hány hatóanyag tud felszabadulni a konjugátumból, csak egy a sok tényező közül, ami szerepet játszik a citosztatikus hatás kialakításában. Egy újabb hatóanyag felkapcsolása sztérikusan leárnyékolhatja az irányító molekulát, megváltoztathatja annak a térszerkezetét és maszkíroz egy amino funkcionális csoportot, amely módosulások akár a receptor-ligand kötődés gyengüléséhez vagy a lebontást végző lizoszomális enzimek aktivitásának csökkenéséhez vezethetnek, és így összességében negatív irányba is befolyásolhatják a tumorellenes hatást. Ezért a munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy feltétlenül a háromszoros konjugáció jelenti-e a leghatékonyabb megoldást az Angiopep-2 irányító peptid esetén.

Ennek megfelelően a célom az volt, hogy az összes lehetséges, egy, kettő vagy három hatóanyagot tartalmazó Angiopep-2-daunomicin konjugátumot előállítsam (ez a kontrollként használt konjugálatlan Angiopep-2-vel együtt összesen  $2^3=8$ -féle kombinációt jelent), majd ezeket a biológiai aktivitásuk szempontjából összehasonlítsam.

Ezen belül a céljaim között szerepelt:

- Az Angiopep-2 peptid (a TFFYGGSRGKRNNFKTEEY szekvencia) szintézise különböző védőcsoport-kombinációkkal, majd ezekből a natív Angiopep-2 és a hét különböző, daunomicinnel való konjugálásra alkalmas aminosav-származék előállítása

- Egy, kettő vagy három daunomicin-molekula kemoszelektív ligációja az aminosxiacetilezett származékokhoz
- A natív peptid és a konjugátumok *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatásának vizsgálata MTT-teszttel humán glioblastoma sejteken
- A konjugátumok *in vitro* sejtbejutási hatékonyságának mérése áramlási citometriával, humán glioblastoma sejteken
- A natív peptid és a konjugátumok térszerkezetének összehasonlítása cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével
- A konjugátumok *in vitro* lizoszomális degradációjának vizsgálata és a keletkező metabolitok azonosítása LC-MS-sel

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Felhasznált anyagok

Az összes aminosav-származékot, a Wang-gyantát, illetve a *N,N'*-diizopropilkarbodiimid (DIC), benzotriazol-1-il-oxi-trisz(pirrolidino)foszfónium-hexafluorofoszfát (PyBOP) és trifluoecetsav (TFA) reagenseket az Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Németország) cégtől vásároltuk. A felhasznált Boc-aminooxiecetsav (Boc-Aoa-OH), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 4-dimetilaminopiridin (DMAP), *N,N'*-diizopropil-*N*-etilamin (DIEA), triizopropilszilán (TIS) és hidrazin-hidrát a Sigma Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) terméke volt. Az aminooxiecetsavat (H-Aoa-OH·1/2HCl) és 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-ént (DBU) a TCI Europe N.V. (Zwijndrecht, Belgium), a piperidint a Molar Chemicals Kft. (Budapest, Magyarország), a K-Oxymát a Novabiochem (Darmstadt, Németország) cégtől szereztük be. A daunomicin-hidroklorid az IVAX (Budapest, Magyarország) ajándéka volt. A szintézishez és tisztításhoz használt összes oldószert a VWR International Kft.-től (Debrecen, Magyarország), míg a tömegspektrometriás mérésekhez oldószereket a Sigma Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. Az oldószerek minden esetben analitikai vagy az elérhető legnagyobb tisztaságúak voltak.

### 4.2. Az Angiopep-2 és a linkerrel funkcionális származékok szintézise

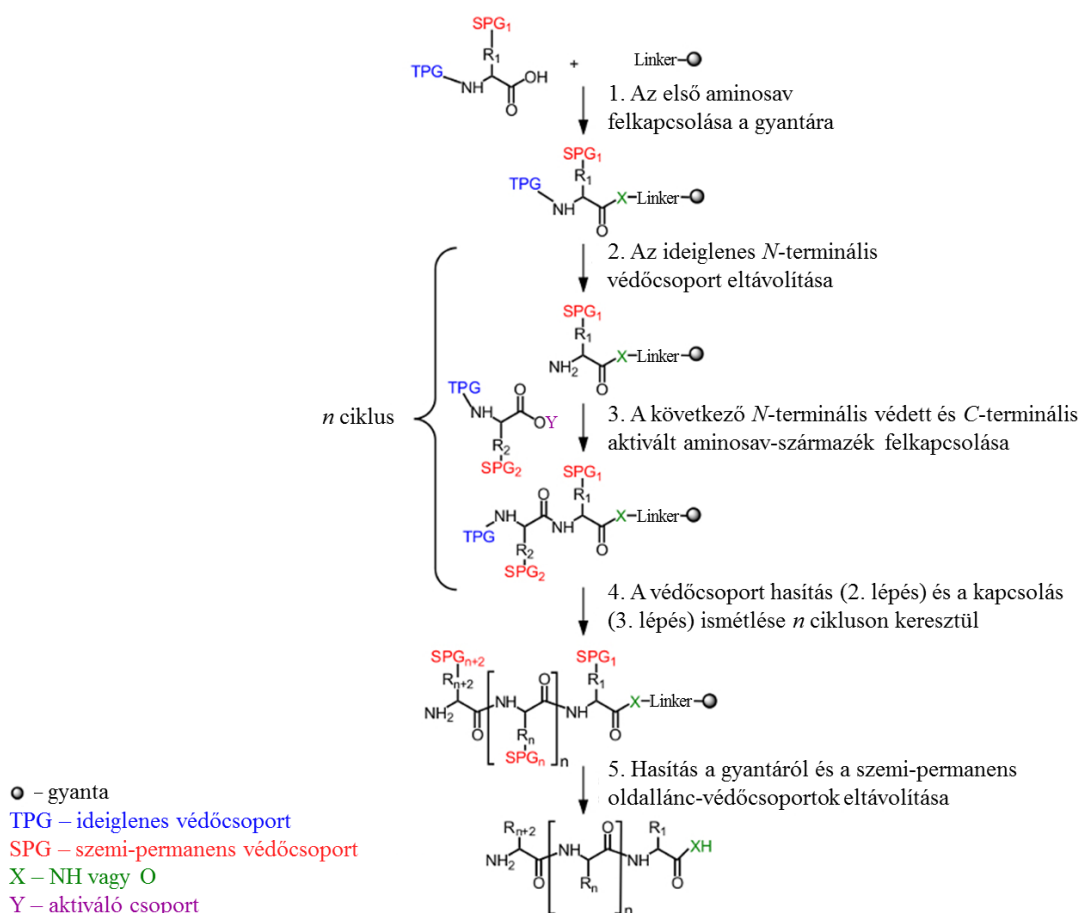
#### 4.2.1. Szilárdfázisú peptidszintézis

A natív peptidhez és a konjugátumokhoz az Angiopep-2-szekvenciát kémiai peptidszintézissel építettem fel.

Ennek két alapvető módját különböztetjük meg: az oldat- és a szilárdfázisú peptidszintézist. Oldatfázisban peptidok nagy mennyiségben és olcsón állíthatók elő, azonban a módszer időigényes, mert minden lépés után izolálni kell a terméket, emellett a kitermelés hosszú szekvenciák esetén rendszerint igen alacsony. A szilárdfázisú peptidszintézis költségesebb, ugyanakkor egyszerűbb, gyorsabb és hatékonyabb előállítás teszi lehetővé, ezért ma már elsősorban ezt alkalmazzák.

A módszer lényege, hogy az aminosavakat egyesével építik be a C-terminális felől az N-terminális felé haladva, ún. lépésenkénti (stepwise) szintézissel, miközben a növekvő peptidlánc végig egy szilárd gyantához van kovalensen rögzítve<sup>73</sup>. A kémiai reakciók a szilárd-folyadék fázishatáron játszódnak le, a reagensek feleslege, illetve a melléktermékek pedig az egyes lépések után szűréssel egyszerűen eltávolíthatók a gyanta mellől. Mivel ilyen módon nincsenek köztes izolálási lépések, fontos, hogy a kapcsolások magas konverzióval menjenek végbe, amit a reagensek nagy feleslegben való alkalmazásával érnek el.

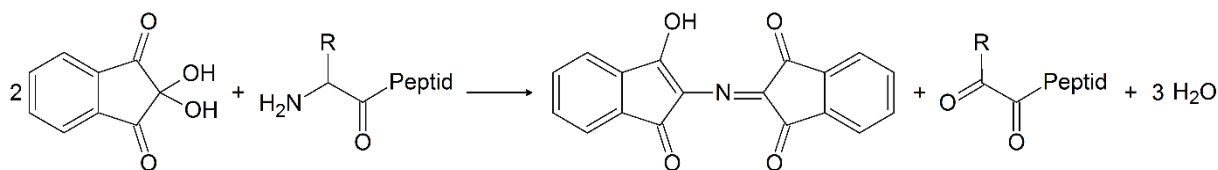
Egy karboxil- és egy aminocsoport között spontán kondenzáció, hanem sav-bázis reakció játszódik le, ezért amidkötés kialakításához a felkapcsolni kívánt aminosavak karboxilcsoportját (jellemzően *in situ* aktívészter-képzéssel) aktiválni kell. Emellett, hogy valóban csak a kívánt szekvenciának megfelelő termék keletkezzen, és ne épülhessen be egy aminosav egy kapcsolat során többször, szükség van az aminocsoport ideiglenes védelmére is. A módszer egy harmadik fontos követelménye, hogy az oldallánc-funkciós csoportok a szintézis során végig maszkírozva legyenek, ugyanis ennek hiányában a feleslegben alkalmazott reagensek az oldalláncokon mellékreakciókat indíthatnak be.



7. ábra. A szilárdfázisú lépésenkénti peptidszintézis menete  
(Forrás: Qvit, N. *et al. J. Vis. Exp.* **11**, 53589–53602 (2016).)

A szintézis részletes menete (7. ábra) tehát a következő: az *N*-terminális védett első aminosav karboxilcsoportját egy megfelelő linkeren keresztül, amid- vagy észterkötés kialakításával a gyantához kapcsolják (1. lépés). Ezt követően a kívánt szekvenciát aminosavanként felépítik egy ismétlődő protokollt követve: az utoljára beépített aminosavról először eltávolítják az ideiglenes *N*-terminális-védőcsoportot (2. lépés), majd a szabaddá vált aminocsoporthoz a következő aminosavat *N*-terminális védett, *C*-terminális aktivált formában hozzákapcsolják (3. lépés). A szintézis befejezése (4. lépés) után egy lépésben lehasítják a kész peptidet a gyantáról és eltávolítják az oldalláncokról a szemi-permanens védőcsoportokat (5. lépés).

A kapcsolási reakciók sikerességét Kaiser-tesztel<sup>74</sup> ellenőrzik a szabad aminocsoportok ninhidrinnel adott jellegzetes kék színreakcióját (8. ábra) kihasználva. Ha a gyantaszemek és az oldat színe a teszt során nem változik, az azt jelzi, hogy nincsenek jelen szabad aminocsoportok, vagyis a tesztet megelőző kapcsolás maradéktalanul végbement. Ha azonban a kék szín megjelenik, akkor a kapcsolás után még maradtak elreagálatlan aminocsoportok, így azt meg kell ismételni.



8. ábra. A Kaiser-teszt során lejátszódó reakció

Az  $\alpha$ -aminocsoport ideiglenes védelmére két funkciós csoport, a *tert*-butiloxikarbonil (Boc)- és a 9-fluorenilmtoxikarbonil (Fmoc)-csoport van használatban, ezek egyben a szilárdfázisú peptidszintézis két alapvető technikáját, a Boc/Bzl<sup>75</sup> és Fmoc/*t*Bu<sup>76</sup> stratégiát is meghatározzák. Az Angiopep-2 peptidnek és származékainak szintézisét Fmoc/*t*Bu technikával végeztem, ehhez együttesen 1,5 g, 0,45 mmol g<sup>-1</sup> kapacitású Wang-gyantát használtam.

A szintézis során a következő protokollt követtem:

1. táblázat. Az Fmoc/tBu stratégia protokollja

	Művelet	Reagens és/vagy oldószer	Időtartam / perc
1. aminosav	duzzasztás	DMF	30
	kapcsolás	2 ekv. aminosav-származék + 2 ekv. DIC + 0,2 ekv. DMAP / DMF	180
2-19. aminosav	mosás	DMF	3× 0,5-1
	Fmoc-hasítás	2% piperidin + 2% DBU / DMF	2 + 2 + 5 + 10
	mosás	DMF	3× 0,5-1
		DCM	2× 0,5-1
	Kaiser-teszt	KCN-, fenol- és ninhidrin-oldatok	3
	mosás	DMF	3× 0,5-1
	kapcsolás	3 ekv. aminosav-származék + 3 ekv. HOBt + 3 ekv. DIC / DMF	60
	mosás	DMF	3× 0,5-1
		DCM	3× 0,5-1
Kaiser-teszt	KCN-, fenol- és ninhidrin-oldatok	3	

A második aszparagin felkapcsolásától kezdve a standard Fmoc-hasítóelegyhez HOBt-t is adtam 0,1 M koncentrációban, és 2 + 2 + 5 + 10 perc helyett 5 + 5 + 10 + 10 percig végeztem a védőcsoport-hasítást.

A Kaiser-tesztek elvégzésekor néhány kivett gyantaszemhez 2-3 csepp ninhidrin- (2,5 g ninhidrin / 50 ml absz. EtOH), fenol- (40 g fenol / 10 ml absz. EtOH), és KCN-oldatot (1 ml 0,01 M KCN-oldat 49 ml piridinnel hígítva) adtam, majd 3-5 perces 104 °C-on történő melegítés után figyeltem meg a gyantaszemek és az oldat színét. Az első lizin felkapcsolását követően a teszteket már 1,5 perc után ellenőriztem, mert ennél hosszabb ideig várva az Mtt-védőcsoport lehasadhat, és így fals pozitív eredmény adódhat.

A protokollban szereplő első Kaiser-teszt nem kötelező lépés, célja csupán az Fmoc-hasítás sikerességének ellenőrzése. A hasítás után értelemszerűen szabad aminocsoportok jelenlétét, vagyis a gyantaszemek megkékülését vártam, és minden esetben ezt is tapasztaltam.

#### 4.2.2. A szintézis menete

Az Angiopep-2 és a hét konjugátum mindegyikéhez a H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH szekvenciájú peptidvázat szintetizáltam meg, de négyféle különböző védőcsoport-, majd pedig nyolcféle különböző linker-kombinációval. Így az előállítás első szakaszában a készülő peptideket együtt tudtam kezelni, majd a szintézist fokozatosan nyolcfele ágaztattam a 13. ábrának megfelelően. Ugyanezen az ábrán láthatóak az előállított anyagok kódjai is.

A kilencedik aminosav beépítéséig a TA001-TA008 peptidek szintézise együtt történt, a második lizin felkapcsolása előtt azonban a gyantát 7:8 tömegarányban kettéosztottam.

A kisebbik (700 mg tömegű gyantát és az ehhez kötött peptidszármazékot tartalmazó) részt a TA001-TA003 és TA005 peptidek előállítására használtam fel, ezért a szekvenciát Fmoc-Lys(Boc)-OH aminosav-származékkal folytattam. A négy peptidet egészen a tizennyolcadik aminosavig együtt szintetizáltam, majd a tizennyolcadik aminosav felkapcsolását követően a gyantát 3:4 arányban újra két részre osztottam.

A TA001 és TA002 peptidek szintézisét a kisebb gyantarészleten (300 mg) folytattam. Ebben az esetben a szekvenciát Boc-Thr(*t*Bu)-OH aminosavval fejeztem be, és a kapcsolás után a gyantát 1:2 arányban továbbosztottam: a gyanta  $\frac{1}{3}$  részét (100 mg) a TA001,  $\frac{2}{3}$  részét (200 mg) pedig a TA002 peptidhez használtam fel.

A TA003 és TA005 peptideket a 3:4 arányban szétosztott gyanta nagyobbik (400 mg tömegű) részletén szintetizáltam tovább, és utolsó aminosavként Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH-t kapcsoltam. Innentől a TA003 és TA005 peptid előállítását külön-külön folytattam, ezért a gyantát 1:1 arányban (200-200 mg) még egyszer kettészedtem.

A kilencedik aminosav után 7:8 arányban elosztott gyanta nagyobbik részletét (800 mg) a TA004 és TA006-TA008 peptidek szintézisére fordítottam. A négy peptid szintézisútja – a másik négyhez hasonlóan – az utolsó előtti aminosavig megegyezett. A második Fmoc-Phe-OH beépítése után a gyantát a másik ághoz hasonlóan két részre osztottam, de itt egyenlő (1:1) arányban.

A gyanta egyik felén (400 mg) a TA004 és TA006 peptidek szintézisét folytattam Boc-Thr(*t*Bu)-OH aminosavval. Az utolsó aminosav felkapcsolását követően a gyantát megint csak két egyenlő (200-200 mg-nyi) részre osztottam, a továbbiakban az egyik részen TA004, a másik részen pedig TA006 szerkezetének megfelelő pozíciókba került linker.

A tizennyolcadik aminosav után szétosztott gyanta másik felét (szintén 400 mg) a TA007 és TA008 peptidekhez használtam fel. Ebben az esetben a szekvencia szintézisét egy-egy



Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH aminosav kapcsolásával zártam, majd a TA007 és TA008 között a másik ághoz hasonlóan megfeleztam a gyantát (200-200 mg).

A szintézis különböző szakaszaiban használt reagenseket és bemérési mennyiségeket a *Függelék F1-F7. táblázataiban* tüntettem fel.

#### 4.2.3. Védőcsoportok szelektív hasítása

A tizenkilenc aminosavból álló peptidváz szintézise után az egyes peptidekről szelektíven lehasítottam azokat a védőcsoportokat (Fmoc és/vagy 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociklohex-1-ilidén)-3-etil (Dde) és/vagy 4-metiltritol (Mtt)), amelyeknek a helyére aminooxiacetsav-linkert, később pedig daunomicin-hatóanyagot terveztem beépíteni. Az Fmoc-hasítás ugyanúgy történt, mint a szintézis korábbi szakaszában, a Dde- és Mtt-csoportok hasításának protokollját pedig a 2. és 3. táblázat foglalja össze:

2. táblázat. Az Mtt-hasítás protokollja

Művelet	Reagens és/vagy oldószer	Időtartam / perc
mosás	DCM	3× 0,5-1
hasítás	1% TFA / DCM	2-3
mosás	DCM	2× 0,5-1
semlegesítés	10% DIEA / DCM	4× 1
mosás	DCM	4× 0,5-1
Kaiser-teszt	KCN-, fenol- és ninhidrin-oldatok	1,5

3. táblázat. A Dde-hasítás protokollja

Művelet	Reagens és/vagy oldószer	Időtartam / perc
mosás	DMF	3× 0,5-1
hasítás	2% hidrazin-hidrát / DMF	8× 5
Mosás	DMF	2× 0,5-1
	DCM	2× 0,5-1
Kaiser-teszt	KCN-, fenol- és ninhidrin-oldatok	1,5

Az Mtt-csoport hasítása során a 2-3. lépést addig ismételtam, amíg a hasítóelegy sárgult, ez összesen 3-4 órát vett igénybe. A hasítás vége felé már hosszabb időre, akár 15 percre is rajta

hagytam a hasítóelegyet a gyantán. Ezt a hosszas eljárást a kutatócsoport korábbi tapasztalatai alapján választottam a mellékreakciók kiküszöbölésének céljából.

A felkapcsolni kívánt hatóanyagok számának és pozíciójának megfelelően a TA001 peptidről nem hasítottam védőcsoportot, a TA002, TA003 és TA004 peptidekről egy Mtt-, Fmoc-, illetve Dde-csoportot, a TA005, TA006 és TA007 peptidekről pedig Dde, majd Mtt, Fmoc, majd Mtt, illetve Fmoc, majd Dde kombinációkban két védőcsoportot távolítottam el, végül a TA008 peptiden Fmoc-, Dde- és Mtt-hasítást is végeztem.

#### 4.2.4. Linker-kapcsolás

A lehasított védőcsoportok helyére aminosav-linkereket kapcsoltam, így egyszeresen, kétszeresen és háromszorosan funkcionális peptidszármazékokhoz jutottam. A 4. táblázatban a kapcsolás menetét, a Függelék F8. táblázatában pedig a Boc-Aoa-OH-ból és a kapcsolószerekből bemért mennyiségeket tüntettem fel.

4. táblázat. A Boc-Aoa-OH kapcsolásának protokollja

Művelet	Reagens és/vagy oldószer	Időtartam / perc
mosás	DMF	3× 0,5-1
kapcsolás	5 ekv. Boc-Aoa-OH + 5 ekv. K-Oxyma + 5 ekv. PyBOP + 10 ekv. DIEA / DMF	180-300
Mosás	DMF	3× 0,5-1
	DCM	3× 0,5-1
Kaiser-teszt	KCN-, fenol- és ninhidrin-oldatok	1,5

Azokban az esetekben, amikor egynél több aminosav-csoport beépítése volt szükséges, jellemzően legalább egyszer meg kellett ismételni a kapcsolást.

#### 4.2.5. Hasítás a gyantáról

A kész peptidszármazékok gyantáról való hasítását és a még kötött oldallánc-védőcsoportok eltávolítását TFA-val végeztem kationfogók (2,5 tf% víz és 2,5 tf% TIS) jelenlétében. TA001 esetén 3 ml, TA002-TA008 esetén pedig 5-5 ml hasítóelegyet használtam, amely az

aminooxi-csoportokra vonatkoztatva 10 ekvivalens szabad aminooxiecetsavat is tartalmazott. A hasítóelegyek pontos összetételét a *Függelék F9. táblázata* mutatja be.

Miután a reagenseket hozzáadtam a gyantához, a reakcióelegyet 15 percig jeges-vizes fürdőben, majd 75 percig szobahőmérsékleten kevertettem. A hasítás lejátszódása után az elegyet tízszeres térfogatú hideg dietil-éterbe szűrtem, a kicsapódott nyersterméket centrifugálással (5 perc, 4400 rpm) üleptettem, az étert dekantáltam, majd a folyamatot még  $2 \times 30$  ml éterral megismételtem. Ezt követően TA001-et desztillált vízben, a többi peptidszármazékot pedig B eluensben oldottam, és folyékony nitrogénben fagyasztva liofilizáltam.

### **4.3. Konjugálás daunomicinnel**

A TA002-TA008 peptideket nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás rendszerrel (HPLC) történő tisztítás (ld. *4.4.1. fejezet*) után az aminooxi-csoportokon keresztül daunomicin hatóanyaggal konjugáltam. A daunomicint közvetlenül a HPLC-ről összegyűjtött frakcióhoz adtam a linkerekre vonatkoztatva 1,5-2 ekvivalens mennyiségben. A reakcióelegyről rotációs vákuumbepárlón ledesztilláltam az oldószer nagy részét, a kapott sötétpiros oldatot 0,2 M NaOAc / AcOH pufferrel (pH = 5,1)  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  koncentrációra hígítottam, majd szobahőmérsékleten kb. 15 órán át kevertettem.

### **4.4. A peptidek és konjugátumok tisztítása**

A peptidek és konjugátumok tisztítása, illetve analízise RP-HPLC-vel történt, a futtatásokat 2 db K120 pumpából, nagy nyomású keverőegységből, kézi injektorból, K2501 típusú monokromátoros UV detektorból és adatgyűjtő szoftverből álló Knauer (Bad Homburg, Németország) HPLC rendszeren végeztem.

A futtatások során gradienselúciót alkalmaztam, amit kétféle eluens, A (0,1% TFA / desztillált víz) és B (0,1% TFA / acetonitril és desztillált víz (80:20 tf%) elegye) időben változó összetételű keverékével valósítottam meg. Az oszlopról eluálódó komponenseket spektrofotometriásan detektáltam  $\lambda = 220 \text{ nm}$  hullámhosszon, és a 0,2-0,5 feletti abszorbanciát mutató csúcsokat gyűjtöttem (manuálisan).

#### 4.4.1. Tisztítás preparatív HPLC rendszeren

A nyers peptidekszámzárkokat (kivéve TA001) és konjugátumokat preparatív HPLC-vel tisztítottam GL Sciences Inertsil ODS-3 (250 × 20 mm; 10 µm részecskeméret, 100 Å pórusméret) oszlopon, az alábbi programmal:

5. táblázat. A preparatív HPLC-vel végzett tisztítás futtatási programja

Idő / perc	Áramlási sebesség / ml perc <sup>-1</sup>	Eluens-összetétel / % B
0	16	5
5	16	5
50	16	75

A peptideket A és B eluens kb. 3:1 arányú elegyében oldottam a futtatáshoz, a konjugátumok esetén pedig magát a reakcióelegyet injektáltam fel a konjugálási idő lejártá után.

#### 4.4.2. Tisztítás szemipreparatív HPLC rendszeren

A konjugátumokban az első, preparatív HPLC-n történő tisztítás után tömegspektrometriás méréssel (ld. 4.5.1. fejezet) általában még mindig kimutathatóak voltak szennyezők, ezért további tisztítási lépésekre volt szükség, amiket a konjugátumok 8-10 mg-jával szemipreparatív HPLC-n végeztem el. A TA001 peptid teljes tisztítása szemipreparatív rendszeren zajlott.

Mivel az analitikai vizsgálatok során kiderült, hogy a szennyezők egy része csak C18, más része pedig csak C4 fordított fázison válik el, ezért mindkét típusú oszlopon (C18: GL Sciences Inertsil ODS-3 (250 × 10 mm; 10 µm részecskeméret, 100 Å pórusméret), C4: Phenomenex Jupiter (250 × 10 mm; 10 µm részecskeméret, 300 Å pórusméret)) megtisztítottam a konjugátumokat. A kétféle fordított fázishoz használt futtatási program a 6., illetve 7. táblázatban olvasható:

6. táblázat. A szemipreparatív HPLC-vel C18 fordított fázison végzett tisztítás futtatási programja

Idő / perc	Áramlási sebesség / ml perc <sup>-1</sup>	Eluens-összetétel / % B
0	4	15
5	4	15
50	4	90

7. táblázat. A szemipreparatív HPLC-vel C4 fordított fázison végzett tisztítás futtatási programja

Idő / perc	Áramlási sebesség / ml perc <sup>-1</sup>	Eluens-összetétel / % B
0	4	15
5	4	15
10	4	30
50	4	45

A tiszta konjugátumokat tartalmazó frakciókat fagyasztás után liofilizálással szárítottam.

A TA007 és TA008 konjugátumokat számos különböző programmal végzett tisztítási lépés során sem tudtam a szükséges tisztasággal előállítani, ezért ezeket a későbbiekben újraszintetizáltam csak Boc- és Dde-csoportokat használva az aminocsoportok védelmére.

## 4.5. Analitikai vizsgálatok

### 4.5.1. Tömegspektrometriás mérések

A HPLC-futtatások után tömegspektrométerrel vizsgáltam, hogy melyik frakció tartalmazza a terméket, és kimutathatóak-e mellette szennyező anyagok. (Vagyis azt is megtudtam a mérésekből, hogy a peptidok esetén melyik frakcióval kell a konjugálási reakciót elvégezni, a konjugátumok esetén pedig szükségesek-e további tisztítási lépések.)

A peptidszármazékokat, illetve konjugátumokat tömegspektrometriás azonosítása Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus típusú készüléken (Bruker Daltonics, Billerica, USA) történt elektropray ionizátor és ionspadás analizátor segítségével. A termékeket 0,1% ecetsav / acetonitril és víz (50:50 tf%) elegyben oldottuk fel a méréshez. A spektrumok felvétele pozitív módban, 10 µl / perc sebességű mintaadagolás mellett, 50-2000 tömeg / töltés tartományban folyt.

### 4.5.2. Analitikai HPLC rendszerrel végzett vizsgálatok

A késztermékek tisztaságáról az MS-mérés mellett analitikai HPLC rendszeren végzett futtatással győződtem meg. Arra is alkalmas volt az ilyen típusú analitikai vizsgálat, hogy a további tisztításokhoz a megfelelő fordított fázist és programot kiválasszam.

A kromatogramok felvételéhez Nucleosil 100-5 C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm részecskeméret; 100 Å pórusméret) és Vydac 214TP C4 (250 × 4,6 mm; 5 µm részecskeméret; 300 Å pórusméret) oszlopokat, illetve a 8. táblázatban bemutatott programot használtam:

8. táblázat. Az analitikai HPLC-vel végzett tisztaság-vizsgálatok futtatási programja

Idő / perc	Áramlási sebesség / ml perc <sup>-1</sup>	Eluens-összetétel / % B
0	1	2
5	1	2
30	1	90

A tiszta termékek MS spektrumai és analitikai HPLC kromatogramjai a *Függelék F1-F24. ábráin* megtalálhatóak.

#### 4.6. Kitermelések

A 9. táblázat foglalja össze a konjugátumok kitermeléseit a teljes előállítási folyamatra nézve és az ezek meghatározásához szükséges adatokat ( $m_{\text{szennyezett konjugátum}}$ : a konjugálás és preparatív HPLC-vel való tisztítás utáni tömeg,  $m_{\text{szennyezett konjugátum, tisztítandó}}$ : a szemipreparatív HPLC-vel történő tisztításhoz kivett tömeg,  $m_{\text{konjugátum}}$ : a tiszta konjugátum tömege). A várt tömegek ( $m_{\text{konjugátum, várt}}$ ) kiszámolásakor figyelembe vettem a kiindulási gyantamennyiséget és -kapacitást, a gyanta szétosztásának arányait és a tisztításhoz kivett tömegeket.

9. táblázat. A TA001 peptid és a TA002-TA008 konjugátumok kitermelései, illetve az ezek kiszámításához szükséges adatok

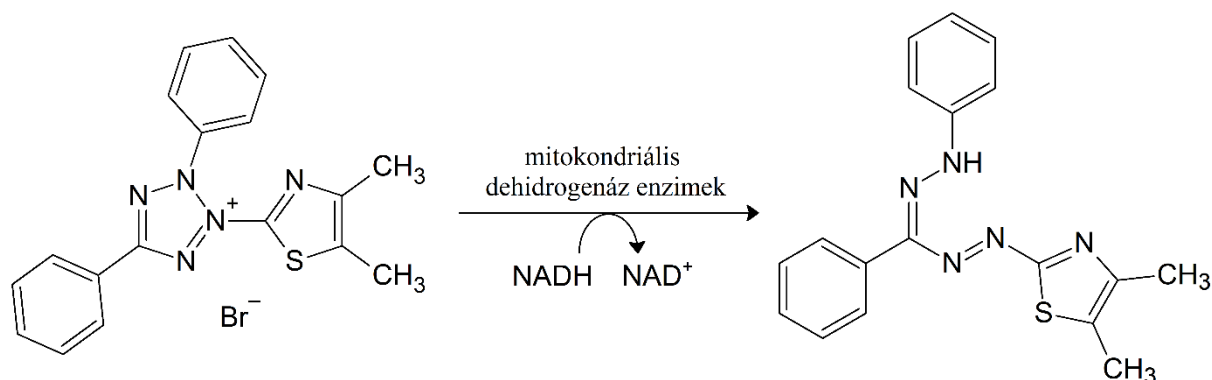
Kód	$m_{\text{szennyezett konjugátum}}$ / mg	$m_{\text{szennyezett konjugátum, tisztítandó}}$ / mg	$m_{\text{konjugátum}}$ / mg	$m_{\text{konjugátum, várt}}$ / mg	Kitermelés / %
TA001	37	9,7	7,9	27,2	29
TA002	88	9,9	7,3	29,2	25
TA003	78	9,8	7,2	32,7	22
TA004	69	9,8	7,7	36,7	21
TA005	109	8,6	4,2	24,7	17
TA006	83	8,5	3,5	31,8	11
TA007	98	8,5	3,8	27,1	14
TA008	95	8,6	3,3	33,0	10

A kitermelések csak tájékoztató jellegűek, mert egyrészt nem vettem figyelembe a Kaiser-tesztekhez, próbahasításokhoz és analitikai HPLC futtatásokhoz kivett mennyiségeket, másrészt pedig liofilizálás után a termékekben mindig marad valamennyi víz.

#### 4.7. *In vitro* citosztázis és citotoxicitás vizsgálata

Az TA001 peptid és a TA002-TA008 konjugátumok *in vitro* citosztázisát és citotoxicitását U87 humán glioblastoma sejteken vizsgáltuk MTT-teszttel.

Az MTT-teszt<sup>77</sup> az élő sejtek mitokondriális aktivitását mutatja ki és teszi kolorimetriásan mérhetővé. Az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) egy vízoldható tetrazólium só, amit a mitokondriumban található dehidrogenáz enzimek képesek redukcióval vízben nem oldódó, lila színű formazán-származékká (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazán) alakítani (9. ábra).



9. ábra. Az MTT redukciója mitokondriális enzimek hatására

A kikristályosodó termék mennyisége arányos az élő sejtek számával és dimetil-szulfoxidban (DMSO) való oldás után kolorimetriásan meghatározható. A formazán származék abszorbanciája 540 nm-en mérhető, a kapott értékből azonban ki kell vonni a háttér 620 nm-en mért fényelnyelését.

A citosztázis, illetve citotoxicitás mértéke (a még osztódásra képes, illetve életben maradó sejtek százalékos arányában kifejezve) az alábbi képlettel számolható ki:

$$\text{citosztázis/citotoxicitás mértéke (\%)} = \left( 1 - \frac{A_{\text{kezelt sejtek}}}{A_{\text{kontroll sejtek}}} \right) \cdot 100, \quad (1)$$

ahol  $A_{\text{kezelt sejtek}}$  a kezelt sejtek, míg  $A_{\text{kontroll sejtek}}$  a kontroll sejtek esetén mért háttér-korrigált abszorbancia.

A tesztet egy adott kémiai anyag különböző koncentrációi mellett elvégezve, majd a mérési pontokat grafikusán ábrázolva a citosztázis vagy citotoxicitás mértékét a koncentráció függvényében megadó görbéhez jutunk. A vizsgált anyag citosztatikus, illetve citotoxikus hatása az 50%-os függvényértékekhez tartozó ún. fél maximális gátló koncentrációval ( $IC_{50}$ ), illetve közepes letális koncentrációval ( $LC_{50}$ ) jellemezhető. Ezek azokat a koncentráció-értékeket jelentik, amelyben az anyag képes a sejtek felének az osztódását megakadályozni, illetve a sejtek felét elpusztítani. Minél kisebb az  $IC_{50}$ - vagy  $LC_{50}$ -érték, annál nagyobb a vizsgált komponens citosztatikus vagy citotoxikus aktivitása.

A peptid és a hét konjugátum aktivitását négy-négy koncentrációban vizsgáltuk, koncentrációnként négy-négy párhuzamos mérést végeztünk, és minden vizsgált vegyület esetén a méréssorozatot kétszer ismételtük.

Az U87 sejtek tenyésztése 37 °C-on, 5% szén-dioxid-tartalmú atmoszférában történt 10% magzati borjú szérumot, 2 mM L-glutamint, 50 IU penicillint és 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  streptomocint (Lonza, Basel, Svájc) tartalmazó RPMI-1640 médiumban. A sejteket a kezelést megelőző napon 96 lyukú sejtenyésztő lemezre (Sarstedt, Nümbrecht, Németország, kezdeti sejtszám a citosztázis esetén  $5 \cdot 10^3$  sejt / lyuk, a citotoxicitás esetén pedig  $10^4$  sejt / lyuk) osztottuk ki komplett médiumban.

A TA001-TA008 anyagokból 1% DMSO-tartalmú szérummentes médiummal 100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, amelyből tova futó hígítási módszerrel  $c = 50, 5, 0,5$  és  $0,05 \mu\text{M}$  koncentrációjú oldatsorozatot állítottunk elő. Mivel a TA008 konjugátum a törzsoldatból kicsapódott, a mérés hátralevő része nem volt vele elvégezhető kellő pontossággal. A többi vizsgált vegyület esetén a kezelést a törzsoldatnak, illetve a hígítási sor oldatainak 100-100  $\mu\text{l}$ -ével végeztük. A kontroll sejteket szérummentes médiummal kezeltük.

Mind a citotoxicitás-, mind a citosztázis-vizsgálat esetén a sejteket először 24 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd eltávolítottuk róluk a kezelő oldatot és kétszer 135  $\mu\text{l}$  szérummentes médiummal mostunk minden lyukat. A citotoxikus aktivitás meghatározásához az MTT-tesztet közvetlenül ezután végeztük, míg a citosztázis mérése esetén előbb minden lyuk tartalmához 135  $\mu\text{l}$  komplett médiumot adtunk, és a sejteket 37 °C-on tartottuk további 48 órán keresztül.

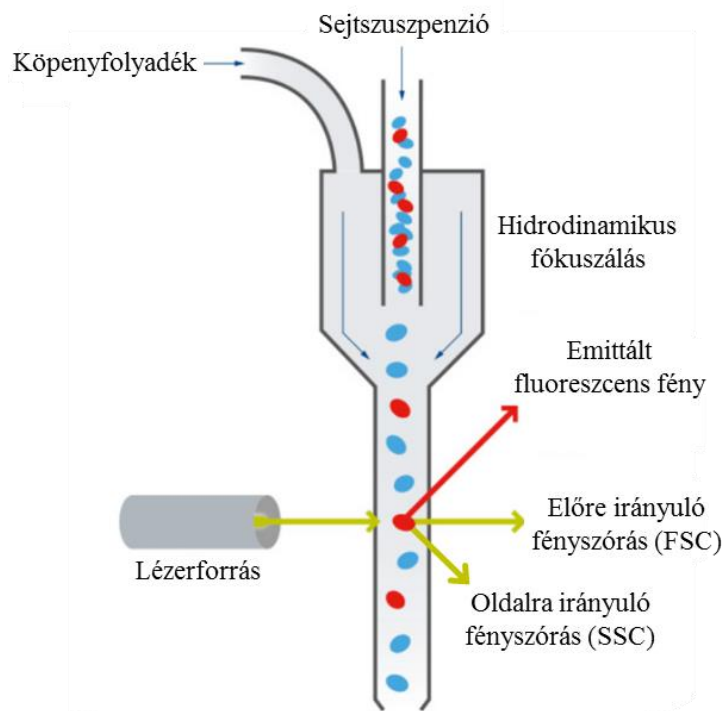
Az MTT-teszt elvégzésekor minden lyukba 45  $\mu\text{l}$  MTT-oldatot pipettáztunk ( $c = 0,367 \mu\text{g/ml}$ ), a sejteket 2,5-3 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd 5 percig 2000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a lemez alján maradt kristályokat 100  $\mu\text{l}$  DMSO-ban feloldottuk, és az így kapott minták abszorbanciáját ELISA Reader (Labsystems Diagnostics Oy, Vantaa, Finnország) segítségével  $\lambda = 540$  és  $620 \text{ nm}$ -en megmértük. A kezelt



és a kontroll sejtek abszorbanciáiból az (1) képlet segítségével számoltuk ki a citotoxicitás és citosztázis értékeket, amelyeket Microcal Origin2018 program segítségével a koncentráció függvényében grafikusán ábrázoltunk. A mérési pontokra szigmoid görbét illesztettünk, majd ennek az  $y = 50\%$  egyenessel vett metszéspontjából meghatároztuk az adott vegyület  $LC_{50}$ , valamint  $IC_{50}$  értékét. A citosztatikus hatás–koncentráció grafikonra egy példa a *Függelék F25. ábráján* látható.

#### 4.8. *In vitro* sejtbejutási vizsgálat áramlási citometriával

A TA002-TA008 konjugátumok sejtbejutásának mértékét áramlási citometriával vizsgáltuk. Az áramlási citometria egyedi, rendszerint fluoreszcens-jelölt sejtek különböző jellemzőinek (sejtszám, méret, granuláltság, fluoreszcencia-intenzitás) egymás melletti vizsgálatát teszi lehetővé. Az áramlási citométer felépítését<sup>78</sup> a 10. ábra mutatja be:



10. ábra. Az áramlási citométer felépítése

(Forrás: [www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry](http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry). (Megtekintve: 2019.04.18.))

A sejtek injektálása szuszpenzió formájában történik, a mintát a belépést követően az ún. köpenyfolyadék veszi körül és továbbítja a megvilágító lézersugár felé. A lamináris áramlás és a kamra tölcészerű kialakítása (hidrodinamikai fókuszálás) biztosítja, hogy a sejtek a megvilágító egység előtt egyenként és a lézernyalábot keresztező útvonalon haladjanak el. A lézervény a sejteken egyrészt szóródik (az előre irányuló fényszórás (FSC) a sejt méretéről, míg

az oldalra irányuló fényszórás (SSC) a granuláltságról, belső komplexitásról ad információt), másrészt, ha jelen van olyan fluorofór, amelyet az adott lézer képes gerjeszteni, akkor emisszió (SFL) is végbemegy a fluoroforra jellemző hullámhosszon. A készülék optikai elrendezése lehetővé teszi, hogy az FSC, SSC, illetve SFL jelek külön-külön detektálhatóak legyenek három megfelelően pozicionált fotoelektron-sokszorozóval.

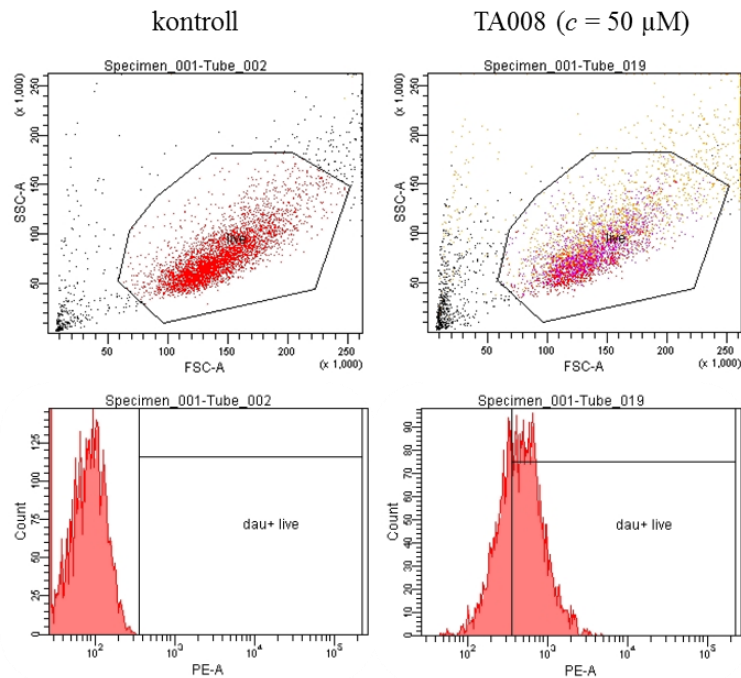
A konjugátumok a daunomicin saját fluoreszcenciájának köszönhetően jelölés nélkül vizsgálhatóak ezzel a módszerrel, a natív peptid esetében azonban nincs erre lehetőség. Minden konjugátummal háromféle koncentrációban végeztünk koncentrációnként két-két párhuzamos mérést.

Az U87 sejtek tenyésztése az 5.7. fejezetben leírt módon történt. A sejteket a vizsgálat előtti napon 24 lyukú sejttenyésztő lemezre osztottuk ki ( $5 \cdot 10^4$  sejt / lyuk).

Az oldatkészítéshez a teljes folyamat során 1% DMSO-tartalmú szérumentes médiumot használtunk. A vizsgált konjugátumokból először 100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú törzsoldatot, majd ebből 4, 20 és 100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú hígításokat készítettünk. A sejtekhez 250  $\mu\text{l}$  konjugátum-oldatot és 250  $\mu\text{l}$  szérumentes médiumot adtunk, így a kezelés során a konjugátumok végső koncentrációja 2, 10 és 50  $\mu\text{M}$  volt az oldatokban. A kontroll sejtek kezelése szérumentes médiummal történt. A sejteket minden esetben egy órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on.

A kezelési idő leteltével a médiumot eltávolítottuk, és a sejteket 500  $\mu\text{l}$  HPMI-oldattal (9 mM glükóz, 119 mM NaCl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM KCl, 0,85 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,053 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 9 mM HEPES; pH = 7,4) mostuk, majd centrifugáltuk. Lyukanként 100-100  $\mu\text{l}$  tripszin-oldat hozzáadása után a sejttenyésztő lemezt 10 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd az enzimet 400  $\mu\text{l}$  10% magzati borjú szérumot tartalmazó HPMI-oldattal inaktiváltuk. A lyukak tartalmát FACS-csővekbe pipettáztuk, 5 percig 1000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk, végül a felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket 300  $\mu\text{l}$  friss HPMI-oldatban szuszpendáltuk fel.

Az áramlási citometriás mérésekhez, majd az adatok kiértékeléséhez BD LSR II áramlási citométert és FACSDiva szoftvert (BD Bioscience, San Jose, USA) használtunk. A mérés során a megvilágítást és SFL-detektálást  $\lambda_{\text{ex}} = 488$  nm és  $\lambda_{\text{em}} = 571$  nm hullámhosszakon (FL2-csatorna) végeztük. A kiértékeléshez a granuláltság–méret és sejtszám–fluoreszcencia-intenzitás grafikonokat használtuk fel, amelyekre egy konkrét mérési példa a 11. ábrán látható:



11. ábra. Granuláltság–méret és sejtszám–fluoreszcencia-intenzitás grafikonok az egyik mérés példáján

Az előbbin kapuzással elkülöníthetőek az élő sejtek és meghatározható ezeknek az aránya, így megbizonyosodhattunk róla, hogy a kísérlet folyamán a konjugátumoknak nincs jelentős citotoxikus hatása. Az utóbbiból – amelyen már csak az élő sejtek vannak feltüntetve – pedig a tényleges sejtbejutásra vonatkozó információk (a daunomicin-pozitív sejtek százalékos aránya, átlagos fluoreszcencia-intenzitás) nyerhetőek ki.

Azt az intenzitás-küszöböt, amely fölött egy sejtet daunomicin-pozitívnak tekintettünk, a kontroll sejtek esetén mért legnagyobb fluoreszcencia-intenzitásnál húztuk meg, és a konjugátumokkal kezelt sejtek esetén a jelnek csak ezen küszöbérték fölé eső részét vettük figyelembe. A daunomicin-pozitív sejtek számát a Gauss-görbe alatti területként, az adott konjugátumra jellemző intenzitást pedig a görbe várható értékeként kaptuk meg.

#### 4.9. Szerkezetvizsgálat cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával

Az Angiopep-2 és a konjugátumok preferált peptidgerinc-konformációját cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával vizsgáltuk.

A módszer azon a jelenségen alapul, hogy egy optikailag aktív anyag kromofór-csoportja a környező királis perturbáló hatások miatt a cirkulárisan jobbra, illetve balra polarizált fényt eltérő mértékben nyeli el, ez az anyagi minőségtől, szerkezettől és hullámhossztól függő abszorbancia-különbség a cirkuláris dikroizmus ( $\Delta A$ )<sup>79</sup>. A Lambert-Beer-törvény értelmében

$\Delta A$  egyenesen arányos a vizsgált anyag koncentrációjával ( $c$ ) és az optikai úthosszal ( $l$ ), arányossági tényező a moláris cirkuláris dikroizmus ( $\Delta\varepsilon$ ).

$$\Delta A = A_L - A_R = (\varepsilon_L - \varepsilon_R)cl = \Delta\varepsilon cl, \quad (2)$$

ahol  $A_L$ , illetve  $\varepsilon_L$  a cirkulárisan balra polarizált fényre vonatkozó abszorbancia és moláris abszorpciós koefficiens,  $A_R$ , illetve  $\varepsilon_R$  pedig a megfelelő, cirkulárisan jobbra polarizált fényre vonatkozó mennyiségek.

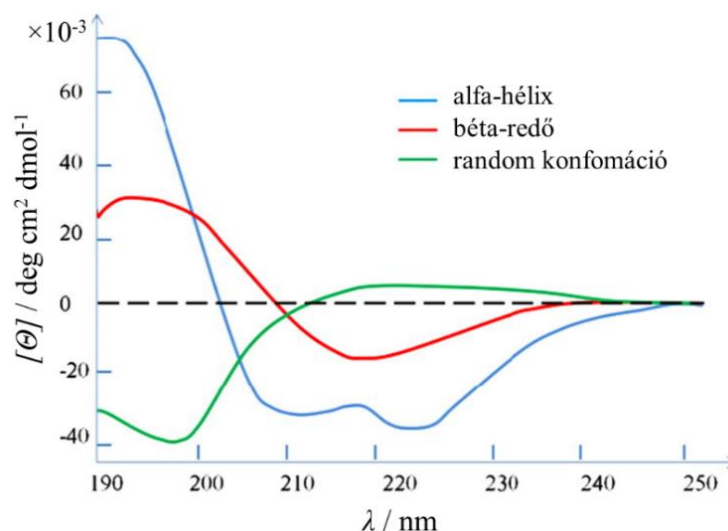
Cirkulárisan jobbra és balra polarizált fénynyalábok szuperpozíciója egyforma intenzitások esetén síkban polarizált, eltérő intenzitások esetén pedig elliptikusan polarizált fényt eredményez, ezért a síkban polarizált fény optikailag aktív közegen való áthaladás után elliptikusan polarizálttá válik. A közeg cirkuláris dikroizmusa a kis- és nagytengetyhez tartozó intenzitások arányával, illetve az ebből származtatott ellipticitással ( $\theta$ ) is megadható. A megfelelő koncentráció- és úthossz-független mennyiség a moláris ellipticitás ( $[\theta]$ ).

$$\theta = \arctg \frac{I_L - I_R}{I_L + I_R} = [\theta]cl, \quad (3)$$

ahol  $I_L$  a cirkulárisan balra,  $I_R$  pedig a cirkulárisan jobbra polarizált fény intenzitása a közegből kilépve.

A spektropolariméterekben a cirkulárisan polarizált fényt fotoelasztikus modulátor segítségével állítják elő. Optikai és polarizációs szűrők segítségével először monokromatikus, síkban polarizált fényt nyernek, amelyet egy kettőtörő kristályra a főtengetyhez képest  $45^\circ$ -os szögben bocsátanak rá. Mivel a fő- és a melléktengely mentén a modulátor törésmutatója eltér, a kilépő fényben a két tengely menti komponens különböző fázisban lesz. A törésmutatóbeli, és az ebből származó fázisbeli különbséget a kristályra kifejtett nyomással úgy szabályozzák, hogy felváltva cirkulárisan balra, illetve cirkulárisan jobbra polarizált fény keletkezzen. A két egymást követő időintervallumban a mintán áthaladó fény intenzitását fotoelektron-sokszorozóval detektálják, majd a különbségükből nyerik az éppen vizsgált hullámhosszhoz tartozó  $\Delta A$ -értéket.

A CD spektroszkópia fő alkalmazási területe peptidok, fehérjék jellegzetes másodlagos térszerkezeti elemeinek azonosítása, illetve ezek arányának meghatározása<sup>80</sup>. A módszer az amidkromofórok távoli UV-tartományban való elnyelésén alapszik, amire az  $\alpha$ -szén-kiralitáscentrumok fejtenek ki perturbáló hatást. Mivel az ellipticitást a lokális konformáció is befolyásolja, a különböző szerkezeti elemek ( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő,  $\beta$ -kanyar, poliprolin-hélix, random konformáció) karakterisztikus spektrumokkal rendelkeznek, ezek közül a három legfontosabbat a 12. ábra mutatja be:



12. ábra. Néhány másodlagos térszerkezeti elem karakterisztikus CD-spektruma

Ha a vizsgált fehérjéről vagy peptidről készült spektrumra olyan görbét illesztünk, amely a tipikus szerkezeti elemek spektrumainak lineáris kombinációjaként áll elő, akkor az együtthatókból meghatározható a különböző motívumok hozzájárulása a fehérje vagy peptid térszerkezetéhez.

A TA001 peptid, a TA002-TA008 konjugátumok és a Dau=Aoa-Thr-OH, illetve H-Lys(Aoa=Dau)-OH metabolitok spektrumait J-810 típusú spektropolariméteren (Jasco, Tokió, Japán) vettük fel 185-260 nm hullámhossz-tartományban. A mintákból 50-200  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatokat készítettünk trifluoretanol-víz (50:50 tf%) oldószerrel. A pontos koncentrációt a peptid esetén NanoDrop fotométerrel, a konjugátumok esetén pedig  $\varepsilon$  ismeretében<sup>81</sup> UV-spektrum felvételével határoztuk meg. A CD méréseket szobahőmérsékleten, folyamatos nitrogén-áramoltatás mellett végeztük 0,2 mm vastagságú cilindres kvarc küvetában. Az adatok rögzítése 0,5 nm pontossággal és 50 nm / perc sebességgel zajlott, a végső spektrumokat öt pásztázás kiátlagolásával kaptuk meg. Az egyfényutas elrendezésből adódóan alapvonal-korrekciónak volt szükség, azaz először felvettük a tiszta oldószer spektrumát, majd ezt a továbbiakban a műszer automatikusan kivonta a minták jeléből.

A kiértékelés során a könnyebb összehasonlíthatóság érdekében az eredetileg mért ellipticitás-értékeket koncentrációra és fényúthosszra normáltuk, illetve – mivel a daunomicin szintén ad CD jelet, ami a tényleges másodlagos szerkezetre jellemző spektrumot elfedi – a konjugátumok spektrumaiból a megfelelő daunomicint tartalmazó, egy aminosav hosszúságú metabolitok spektrumait kivontuk.

A másodlagos szerkezeti elemek arányát a [bestsel.elte.hu](http://bestsel.elte.hu) weboldal<sup>82</sup> segítségével határoztuk meg, amely nyolcféle motívum Fehérje Cirkuláris Dikroizmus Adatbankban (PCDDDB<sup>83</sup>)

megtalálható referencia-spektrumát használja fel bázisként a lineáris kombinációra való felbontáshoz. Fontos megjegyezni, hogy peptidek esetén a módszer megbízhatósága korlátozott, ugyanis az oldalláncok spektrumhoz való hozzájárulása másképp alakulhat, mint az aminosav-összetétel szempontjából sokkal kiegyensúlyozottabb fehérjékben.

#### **4.10. *In vitro* degradáció-vizsgálat lizoszóma preparátumban**

A konjugátumok sejten belüli lebomlásának hatékonyságát lizoszóma preparátumban végzett stabilitásvizsgálattal mértük.

A mintákból desztillált vízzel  $2,5 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ , majd ezekből  $0,2 \text{ M NaOAc} / \text{AcOH}$  pufferrel ( $\text{pH} = 5,1$ )  $0,025 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  koncentrációjú oldatokat készítettünk  $500 \mu\text{l}$  végtérfogatban. Az eredetileg  $16,6 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  koncentrációjú lizoszóma preparátumot pufferrel 20-szorosára hígítottuk, és ebből  $15-15 \mu\text{l}$ -t hozzáadtunk a konjugátumok oldataihoz, így a lizoszomális fehérjék és a konjugátumok 1:1 tömegarányban voltak jelen a végső reakcióelegyekben. A kontrollokat ugyanígy készítettük, de a hígított lizoszóma preparátum helyett csak pufferrel kezeltük a mintákat.

Az oldatokat  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on,  $600 \text{ rpm}$  fordulatszámú kevertetés mellett inkubáltuk,  $0, 1, 6, 24$  és  $72$  óra elteltével mindegyikből  $50-50 \mu\text{l}$  térfogatú részleteket kivettünk, ezekben az enzimátikus reakciót  $5-5 \mu\text{l}$  hangyasav adagolásával leállítottuk, majd a mintákat fagyasztva tároltuk.

A reakcióelegy részleteit Dionex UltiMate 3000 ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) rendszerrel kapcsolt Q Exactive™ Focus elektropray ionizációs, hibrid kvadrupól-orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Németország) analizáltuk, a kiértékeléshez pedig Xcalibur™ szoftvert használtunk. A műszer egyrészt rögzítette az össz-ionáramot a retenciós idő függvényében, másrészt minden egyes időpillanathoz a kromatogramon hozzárendelt egy MS spektrumot is, amelyeknek a kiértékelésével képet kaphattunk az éppen vizsgált minta összetételéről. Fontos megjegyezni, hogy az alkalmazott mérési körülmények között az erősen poláros fragmensek nem voltak detektálhatóak, mert a fordított fázisú kromatográfiás oszlopról a lizoszomális enzimekből származó poláros bomlástermékekkel együtt a holtidőnél eluálódtak, és az így kapott a kezdeti nagy csúcsoknak az összetétele a spektrumok komplexitásából adódóan nem volt rekonstruálható. A mérés szempontjából lényeges daunomicint tartalmazó metabolitok azonban elegendően nagy retencióval rendelkeznek ahhoz, hogy jól kimutathatóak legyenek.

## 5. Eredmények

### 5.1. Az Angiopep-2 és a linkerrel funkcionális származékok szintézise

#### 5.1.1. A szintézis menete

A natív Angiopep-2 és a konjugátumok szintézise során minden esetben egy közös szekvenciának (H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH) megfelelő peptidvázat állítottam elő, de más-más típusú védőcsoportokat használtam a felkapcsolni kívánt hatóanyagok számától és pozíciójától függően. Ugyanakkor a szintézist úgy terveztem meg, hogy a kissé különböző peptidszármazékokat ne kelljen egyenként, egymástól függetlenül felépíteni, hanem egy pontig együtt lehessen őket kezelni, majd az előállítási folyamat fokozatosan ágazzon nyolcfelé. A szintézis menete a 13. ábrán látható.

A szekvencia első lizinje esetén olyan védőcsoportot (Mtt) alkalmaztam, amely lehasítható szelektíven, ha az adott konjugátumban kapcsolódik ehhez a pozícióhoz daunomicin, ellenkező esetben pedig eltávolítható a többi oldallánc-védőcsoporttal egy lépésben. A második lizint abban az esetben, ha később daunomicint terveztem hozzákapcsolni, a szintén szelektíven eltávolítható Dde-csoporttal, egyébként pedig a standard Boc-csoporttal védtem. Az N-terminális aminocsoport védelmére hasonló logikát követve vagy szelektíven hasítható Fmoc-, vagy pedig Boc-csoportot alkalmaztam.

Így egészen a tizedik aminosavig (a második lizinig) a TA001-8 peptidek szintézise közösen folyt. A kilencedik aminosav beépítése után a gyantát kettéosztottam, a TA001-3 és TA005 peptidekhez Fmoc-Lys(Boc)-OH, a TA004 és TA006-8 peptidekhez pedig Fmoc-Lys(Dde)-OH aminosav-származékot kapcsoltam. Innentől a négy-négy peptid szintézisútja megegyezett az utolsó előtti aminosavig bezárólag, utána azonban újra két részre osztottam a gyantát mindkét ágon. Az egyik ágon a TA001 és TA002, a másik ágon pedig a TA004 és TA006 peptidek szekvenciáját Boc-Thr(*t*Bu)-OH aminosav-származékkal fejeztem be, a többi peptid (az egyik ágon a TA003 és TA005, a másik ágon pedig a TA007 és TA008) esetén pedig Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH-t kapcsoltam utolsó aminosavként. A folyamat eredményeként ugyanazt a szekvenciát négyféle védőcsoport-kombinációval állítottam elő.

A szétosztási arányokat úgy választottam meg, hogy a hét konjugátumra azonos, a konjugálatlan peptidre pedig feleakkora gyantamennyiség jusson.





A peptidnek és származékainak előállításához szilárdfázisú Fmoc/*t*Bu stratégiát alkalmaztam, mert a szekvenciában több savra érzékeny tirozin aminosav is található, ami a Boc/Bzl technika körülményei között könnyen alkileződhetne.

A szintézist Wang-gyantán végeztem, amely 4-alkoxibenzil-alkohol-csoportokkal funkcionizált sztírol-divinilbenzol kopolimer. A peptid C-terminálisa és a gyanta funkciós csoportjai között ennek megfelelően észterkötés alakítható ki, és a gyantáról való hasítás után a kész peptidszármazékok szabad karboxilvéggel kaphatóak meg.

Az első aminosavat Steglich-féle észteresítéssel, DIC kapcsolószer és DMAP katalizátor jelenlétében kapcsoltam fel a gyantára. A további kapcsolásokhoz az aminosavak karboxilcsoportját DIC és HOBt reagensek segítségével aktiváltam, az *in situ* aktívészter-képzés mechanizmusa a *Függelék F26. ábráján* látható.

Az Fmoc-védőcsoportok eltávolítását a szintézis kezdeti szakaszában standard 2% piperidin, 2% DBU / DMF hasítóeleggyel végeztem 2 + 2 + 5 + 10 perc időtartamokig. Magát a hasítást a DBU végzi, a piperidin pedig a keletkező reaktív dibenzofulvén megkötésére szolgál. A több rövidebb időtartam a dibenzofulvén rendszerből való eltávolítása, és ezáltal a mellékreakciók veszélyének csökkentése érdekében szükséges.

A második aszparagin felkapcsolásától kezdve a hasítóelegyhez 0,1 M koncentrációban 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) is adtam. Erre azért volt szükség, mert az Asn(Trt)-Asn(Trt) szekvencia esetén bázikus közegben szukcinimid-gyűrűzáródási reakció, majd piperidinnel  $\alpha$ - és  $\beta$ -piperidid képződés játszódhat le (*F27. ábra*)<sup>84</sup>. A HOBt a hasítóelegy pH-ját csökkenti, ezzel megakadályozva az NH-csoportról történő proton absztrakciót, ami a gyűrűzáródás bevezető lépése. Alacsonyabb pH-n azonban az Fmoc-eltávolítás hatékonysága is kisebb, ezért a módosított eleggyel hosszabb időtartamokig (5 + 5 + 10 + 10 percig) kellett végezni a hasításokat.

### **5.1.2. Védőcsoportok szelektív eltávolítása**

Miután a gyantán a peptideket a megfelelő védőcsoport-kombinációkkal előállítottam, azokról az aminocsoportokról, amelyekhez később linkert, illetve hatóanyagot terveztem kapcsolni, szelektíven lehasítottam az Fmoc-, Dde- vagy Mtt-csoportokat.

TA002 esetén egy Mtt-, TA003 esetén egy Fmoc-, TA004 esetén pedig egy Dde-csoportot távolítottam el szelektíven, így a három peptiden egy-egy aminocsoport vált szabaddá három különböző pozícióban. TA005-ről Fmoc-, majd Mtt-, TA006-ról Dde-, majd Mtt, TA007-ről pedig Fmoc-, majd Dde-csoportokat hasítottam le, ezzel két-két szabad aminocsoportot

létrehozva az összes lehetséges kombinációban. Végül TA008-on Fmoc-, Dde- és Mtt-hasítást is végeztem, vagyis az *N*-terminálisról és a szekvenciában szereplő két lizinről egyaránt eltávolítottam a védőcsoportokat.

Az Fmoc-hasítást a szintézis során is használt módszerrel, 2% piperidin + 2% DBU + 0,1 M HOBt / DMF oldattal, a Dde eltávolítását pedig 2% hidrazin-hidrát / DMF hasítóeleggyel végeztem.

Az Mtt szelektív eltávolítása Wang-gyantán több szempontból is problémás, ugyanis bizonyos szekvenciák esetén a szükséges savas körülmények között a tritil oldallánc-védőcsoportok és a peptid-gyanta kötések hasadhatnak<sup>85</sup>, illetve a keletkező metiltritil-kationok az arra érzékeny aminosavakat megalkilezhetik. A munkám során az általánosan elterjedt 1% TFA / DCM hasítóelegyet<sup>86</sup> és a kutatócsoportom korábbi tapasztalatai alapján alkalmasnak bizonyult protokollt használtam.

### 5.1.3. Linker-kapcsolás

A védőcsoport-hasítások után a szabaddá vált aminocsoportokat aminooxi-linkerekkel funkcionizáltam Boc-aminooxiecetsav reagens felhasználásával, ilyen módon a peptideken egy, kettő, vagy három, daunomicin konjugálásra alkalmas funkciós csoportot alakítottam ki.

A kapcsoláshoz a HOBt-DIC keveréknél erősebb aktiválószerre volt szükség, ezért PyBOP, K-Oxyma és DIEA reagenseket használtam a szabad aminocsoportokra vonatkoztatva 5, 5, illetve 10 ekvivalens mennyiségben. A Boc-Aoa-OH-ból szintén 5 ekvivalens mennyiségeket mértem be. Az aktiválási reakciót a *Függelék F28. ábrája* mutatja be. A kapcsolás még a fokozott aktiválás mellett is három-öt órás, esetenként akár egész éjszakai reakcióidőt igényelt.

### 5.1.4. Hasítás a gyantáról

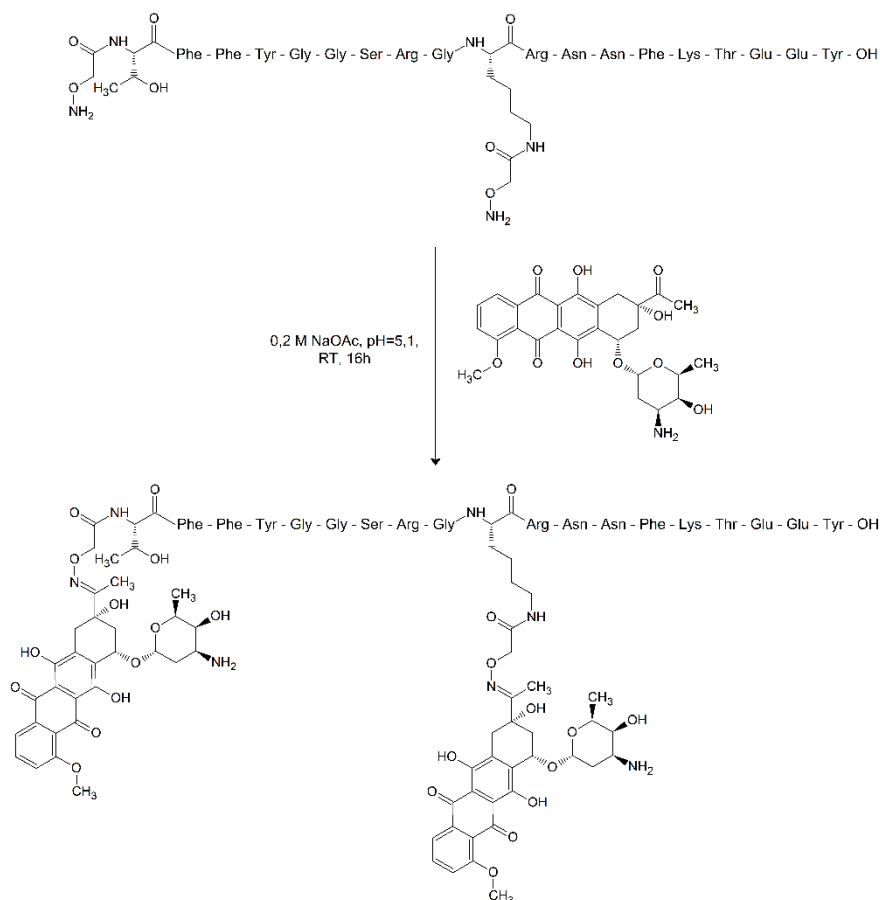
A kész peptidszármazékokat a gyantáról trifluorecetsavval hasítottam le, amelyhez kationfogókat is adtam a savas körülmények között felszabaduló reaktív karbokationok megkötésére. A *terc*-butil-kationok befogására vizet, a tritil- és 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurán-5-szulfonil (Pbf)-kationok befogására pedig triizopropilszilánt használtam. Ebben a lépésben egyúttal a szelektíven le nem hasított oldallánc-védőcsoportok eltávolítása is megtörtént.

Mivel az aminoszomszomszédosságok érzékenyek az oxovegyületekre (például az acetonnal), ezért a TA002-TA008 peptidszámzárakok esetén a hasítóelegyhez nagy feleslegben szabad aminoszomszomszédosság is adtam<sup>71</sup>, hogy az oldatban és levegőben esetlegesen előforduló oxovegyületekkel ez reagáljon el, és ne a felkapcsolt linkerek. Emellett egészen a konjugálásig igyekeztem acetonnalmentes légteret biztosítani a laboratóriumban.

A nyers termékeket a hasítóelegyből való éteres kicsapás és centrifugálással való elkülönítés után liofilizálással szárítottam.

## 5.2. A konjugátumok előállítása és tisztítása

A gyantáról való hasítást és tisztítást követően a TA002-TA008 peptidszámzárakhoz az aminoszomszédosság-linkeren keresztül daunomicin hatóanyagot kapcsoltam, ilyen módon előállítottam az összes lehetséges Angiopep-2-daunomicin konjugátumot. A konjugálási reakció során, amit a TA007 konjugátum példáján a 14. ábra mutat be, a daunomicin karbonil- és a linker aminoszomszédosság-csoportja között alakul ki oximkötés:



14. ábra. Konjugálás daunomicinnel (a TA007 konjugátum előállításának példáján)

A nyers peptideket preparatív RP-HPLC-rendszerrel, C18 oszlopon tisztítottam, és a termékeket tartalmazó frakciókat tömegspektrometriás mérésel azonosítottam. A konjugálást az aminoszomszomszágokra vonatkoztatva 1,5-2 ekvivalens daunomicinnel, enyhén savas ammónium-acetát pufferben ( $c = 0,2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 5,1$ ) végeztem közvetlenül a HPLC-frakciókat felhasználva, bepárlást követően. A reakció kevertetés mellett egy éjszaka alatt játszódott le.

A konjugátumokat a reakcióelegyben található egyéb komponensektől megint csak preparatív RP-HPLC segítségével, C18 fázison választottam el. A kapott frakciók összetételét elektropray ionizációs, ioncsapdás tömegspektrométerrel és analitikai HPLC-vel vizsgáltam. A mérések során kiderült, hogy a főfrakcióban minden konjugátum esetén jelen vannak még szennyezők, ráadásul a termék ezeknek egy részétől csak C18, más részétől pedig csak C4 fázison válik el. Ezért a konjugátumokkal szemipreparatív HPLC rendszeren további finom tisztítási lépéseket végeztem C18 és C4 típusú töltetek kombinált használatával. A TA001 peptid teljes tisztítása szemipreparatív HPLC-vel zajlott, és ebben az esetben is szükség volt mindkét típusú oszlop alkalmazására.

A késztermékek tisztaságát tömegspektrometriás és kromatográfiás analízissel ellenőriztem. Az ESI-MS-sel történő mérés körülményei között a daunomicin könnyen bomlik (az aminocukor a glikozidkötés oxigénje mellett lehasadhat), így a várt molekulatömeghez képest 129, illetve 147 Da csökkenést mutató fragmentumokat is lehet detektálni. A daunomicin MS spektruma a *Függelék F29. ábráján* található meg.

A TA001 peptid és a TA002-TA008 konjugátumok C18 és C4 fázison meghatározott retenciós időit ( $R_{t, C18}$  és  $R_{t, C4}$ ), illetve a várt és az MS mérések során kapott molekulatömegeket ( $M_{\text{várt}}$  és  $M_{\text{mért}}$ ) a *10. táblázat* foglalja össze:

**10. táblázat.** A TA001 peptid és a TA002-TA008 konjugátumok analitikai jellemzői

Kód	$R_{t, C18} / \text{min}$	$R_{t, C4} / \text{min}$	$M_{\text{várt}} / \text{Da}$	$M_{\text{mért}} / \text{Da}$
TA001	18,6	15,1	2301,5	2301,2
TA002	20,9	17,7	2884,0	2884,0
TA003	21,9	18,5	2884,0	2883,6
TA004	21,2	17,1	2884,0	2883,2
TA005	21,8	18,4	3466,6	3466,0
TA006	20,6	17,3	3466,6	3466,5
TA007	21,8	18,3	3466,6	3465,2
TA008	21,6	18,4	4049,1	4048,5

A TA007 és TA008 konjugátumokat számos különböző kromatográfiai körülmények végzett tisztítási lépés után sem sikerült teljesen elválasztani a szennyezőktől (elsősorban az alacsonyabban szubsztituált konjugátumoktól), de a rendelkezésre álló eszközparkkal elérhető legtisztább állapotba hoztam őket. A későbbiekben ezt a két konjugátumot egyszerűbb szintézisúton, más védőcsoport-kombináció használatával (csak Boc és Dde védett lizinek beépítésével) a szükséges tisztasággal újra előállítottuk.

### **5.3. *In vitro* citosztázis és citotoxicitás vizsgálat**

A natív Angiopep-2 és a konjugátumok *in vitro* citosztatikusságát és citotoxikus hatását U87 humán glioblastoma sejtvonalon vizsgáltuk MTT-teszt segítségével.

Mind a citosztázis-, mind a citotoxicitás-vizsgálat során a sejteket a TA001 peptid, illetve a TA002-TA008 konjugátumok 0,05, 0,5, 5 és 50  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldataival kezeltük, 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd mosással eltávolítottuk róluk a kezelő oldatot. A citotoxicitás méréséhez közvetlenül a kezelés után, a citosztatikusság meghatározásához pedig további 48 órás inkubálást követően végeztük el az MTT-tesztet. A %-os citotoxicitás-, illetve citosztázis-értékeket a koncentráció függvényében grafikusán ábrázoltuk, majd az  $y = 50\%$  egyenessel vett metszéspontokból meghatároztuk az  $LC_{50}$ , illetve  $IC_{50}$  értékeket.

A TA008 konjugátum a kezelés körülményei között kicsapódott, így az eredmények ebben az esetben nem voltak értékelhetőek, a mérést kisebb koncentrációkkal meg kell majd ismételni. A többi anyag közül a vizsgált koncentrációtartományban egyik sem bizonyult citotoxikusnak ( $LC_{50} > 50 \mu\text{M}$ ), citosztatikusságát azonban – a hatóanyagot nem tartalmazó TA001 peptid kivételével – minden esetben kimutatható volt. A mért  $IC_{50}$  értékek a 11. táblázatban olvashatóak.

Az eredmények először is azt mutatják, hogy a konjugátumok képesek bejutni a sejtekbe és szabadul fel belőlük citosztatikusságát ágens, a számszerű eredmények alapján pedig az is megállapítható, hogy ezeknek a folyamatoknak a hatékonysága függ nemcsak az irányító molekulára felkapcsolt hatóanyagok számától, hanem – a várakozásaimnak megfelelően – azoknak a pozíciójától is.

Az egy daunomicint tartalmazó konjugátumok sejtosztódásra gyakorolt hatásában például szignifikáns eltérések mutatkoznak: a mérések szerint a daunomicinnel az *N*-terminálison konjugált TA003  $IC_{50}$  értéke a legkisebb, míg a TA002-é, amelyben a hatóanyag a *C*-terminálishez közelebb eső lizinhez kapcsolódik, messze a legnagyobb.

11. táblázat. A TA001 peptid és a TA002-TA008 konjugátumok citosztatikus hatása U87 humán glioblastoma sejtvonalon

Kód	Szerkezet	$IC_{50}$ / $\mu$ M	
		Átlag	Szórás
TA001	H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH	> 50	-
TA002	H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH Dau = Aoa	34,7	1,6
TA003	Dau = Aoa-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH	9,9	5,1
TA004	H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH Dau = Aoa	18,2	2,8
TA005	Dau = Aoa-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH Dau = Aoa	32,3	8,1
TA006	H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH Dau = Aoa Dau = Aoa	21,6	5,4
TA007	Dau = Aoa-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH Dau = Aoa	7,8	0,5
TA008	Dau = Aoa-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH Dau = Aoa Dau = Aoa	a mérés során kicsapódott	

A C-terminális felőli lizin nem csak az egy, hanem a két daunomicint tartalmazó konjugátumokban is alacsony citosztatikus aktivitással párosul: a három konjugátum, amelyik tartalmaz ebben a pozícióban hatóanyagot (TA002, TA005 és TA006), egyben a három legrosszabb citosztatikum is. Sőt, a TA003 és TA005 konjugátumok  $IC_{50}$  értékeinek összehasonlításából az is kiderül, hogy ha egy eredetileg eredményes konjugátumban ehhez az aminocsoporthoz egy újabb hatóanyagot kapcsolunk, akkor a citosztatikus hatás nem növekszik, hanem ellenkezőleg, kifejezetten romlik.

Egy újabb daunomicin megjelenése és a citosztázis mértékének változása között azonban nem állítható fel általános összefüggés: más konjugátum-párosok esetén (például TA002-TA005 és TA004-TA006) az  $IC_{50}$  értékek összemérhetőek, nincs szignifikáns különbség, a TA002-TA006-páros esetén pedig az újabb hatóanyag felkapcsolása a citosztatikus aktivitás javulását eredményezi.

Összességében már ezek az adatok is jól szemléltetik, hogy nem feltétlenül a több hatóanyagot tartalmazó konjugátummal érhető el a nagyobb tumorellenes hatás, ugyanis az  $IC_{50}$ -értékek erősen függenek a hatóanyag(ok) molekulán belüli elhelyezkedésétől is. A legeredményesebb konjugátumok esetén a későbbiekben *in vivo* kísérletekkel tervezzük vizsgálni, hogy

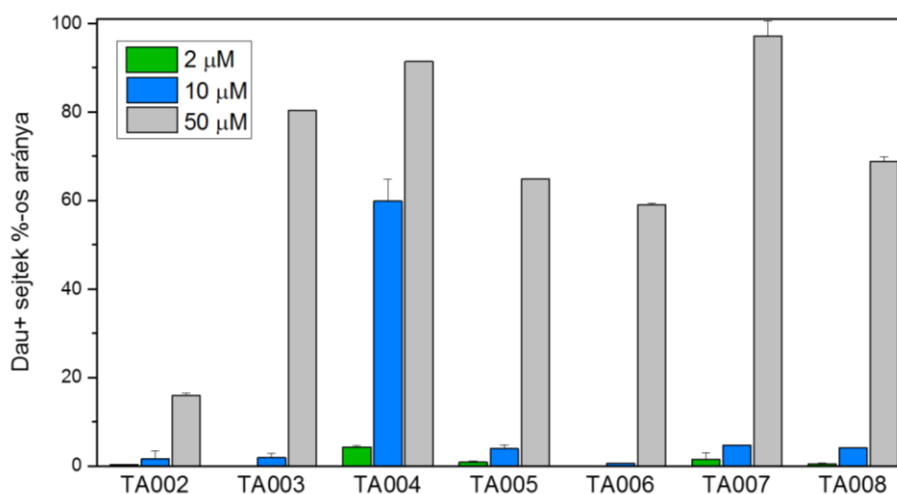
mutatnak-e az élő szervezetben is citosztaticus aktivitást, és potenciálisan felhasználhatóak-e a központi idegrendszerben ható citosztaticumként.

#### 5.4. *In vitro* sejtbejutási vizsgálat áramlási citometriával

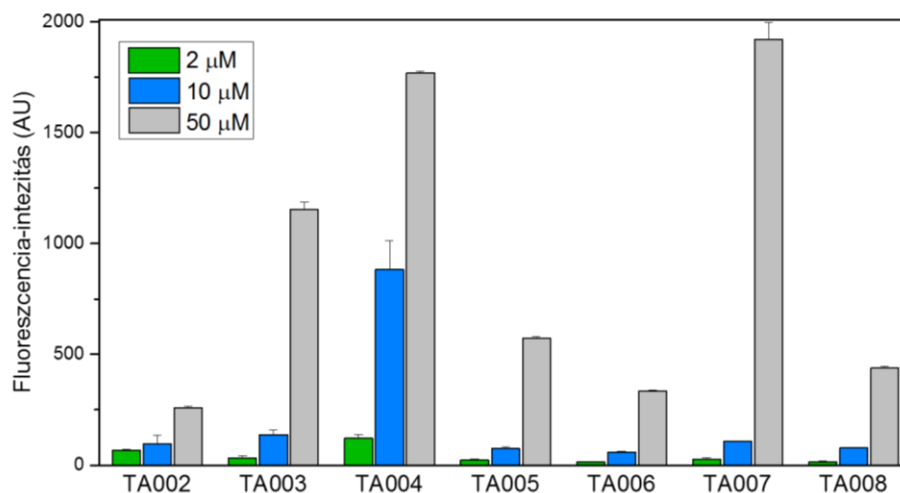
A konjugátumok citosztaticus aktivitását sok különböző tényező együttesen határozza meg, egy rendkívül fontos szempont ezek közül az internalizáció hatékonysága, amit áramlási citometriával mértük U87 glioblastoma sejteken, a daunomicin fluoreszcens aktivitását kihasználva.

Az U87 sejteket 1 órán keresztül a konjugátumok 2, 10, illetve 50  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldataival inkubáltuk, majd egy mosást követően tripszinnel kezeltük, hogy az aspecifikus kötődést lehetővé tevő sejtfelszíni strukturákat is eltávolítsuk, így valóban csak a sejtekbe bejutott konjugátum-mennyiség fluoreszcenciáját detektáljuk. A kontroll sejteket ugyanígy készítettük elő, de a kezeléshez csak szérumentes médiumot használtunk. Az áramlási citométerben a megvilágítást  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ , a fluoreszcens fény detektálását pedig  $\lambda_{\text{em}} = 571 \text{ nm}$  hullámhosszakon végeztük a daunomicin maximális fluoreszcens aktivitásának megfelelően.

A kapott granuláltság–méret grafikon alapján az élő sejtek százalékos aránya mindig magasnak adódott, ami azt mutatja, hogy a konjugátumoknak nem volt jelentős citotoxikus hatása a kísérlet során. A sejtszám–fluoreszcencia-intenzitás grafikonokból meg tudtuk határozni a sejtbejutást jellemző két mennyiséget, a daunomicin-pozitív sejtek százalékos arányát és a fluoreszcenciaintenzitás-átlagokat is. A konjugátumok különböző koncentrációi esetén az eredmények a 15. és 16. ábrán láthatóak:



15. ábra. A daunomicin-pozitív sejtek százalékos aránya a TA002-TA008 konjugátumok különböző koncentrációi esetén



16. ábra. Az átlagos fluoreszcencia-intenzitás a TA002-TA008 konjugátumok különböző koncentrációi esetén

Az általános tendencia a két mért mennyiség és három koncentráció összes kombinációja esetén nagyon hasonló, az összehasonlításához a hat adatsor közül a daunomicin-pozitív sejteknek az 50 μM konjugátum-koncentráció mellett kapott arányát veszem alapul.

Az adatokat látva elmondható, hogy ahogy a citosztatikus aktivitásban, úgy az internalizáció mértékében sem okoz egyértelműen pozitív vagy egyértelműen negatív változást a hatóanyagok számának növelése, a hatóanyag-pozíciónak viszont döntő szerepe van. Ezt már az is bizonyítja, hogy jelentős eltérések vannak az azonos számú hatóanyagot tartalmazó konjugátumok között, azonban ennél markánsabb összefüggések is megfigyelhetők.

A grafikonokon jól látható, hogy ahhoz a négy konjugátumhoz, amelyben a hatóanyag a C-terminális felőli lizinhez kapcsolódik (TA002, TA005, TA006 és TA008), a négy legkisebb sejtbejutási érték párosult. Ez feltehetőleg a fő oka a pozícióhoz köthető alacsony citosztatikus aktivitásnak is. A maradék három konjugátum közül pedig az a kettő (TA004 és TA007) internalizálódott a leghatékonyabban, amelyekben található daunomicin a másik, az N-terminális felőli lizinen.

## 5.5. Szerkezetvizsgálat cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával

A sejtbejutási kísérletek tapasztalatainak egy lehetséges magyarázata, hogy a konjugátumok globális térszerkezete a különböző hatóanyag-pozíciók esetén eltér, és így eltérő erősségű kölcsönhatást képesek kialakítani a célreceptorral. A hipotézis alátámasztásához vagy cáfolásához cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával megvizsgáltuk, hogy a natív peptidnek és a konjugátumoknak mekkora a konformációs mozgékonyasága, milyen másodlagos



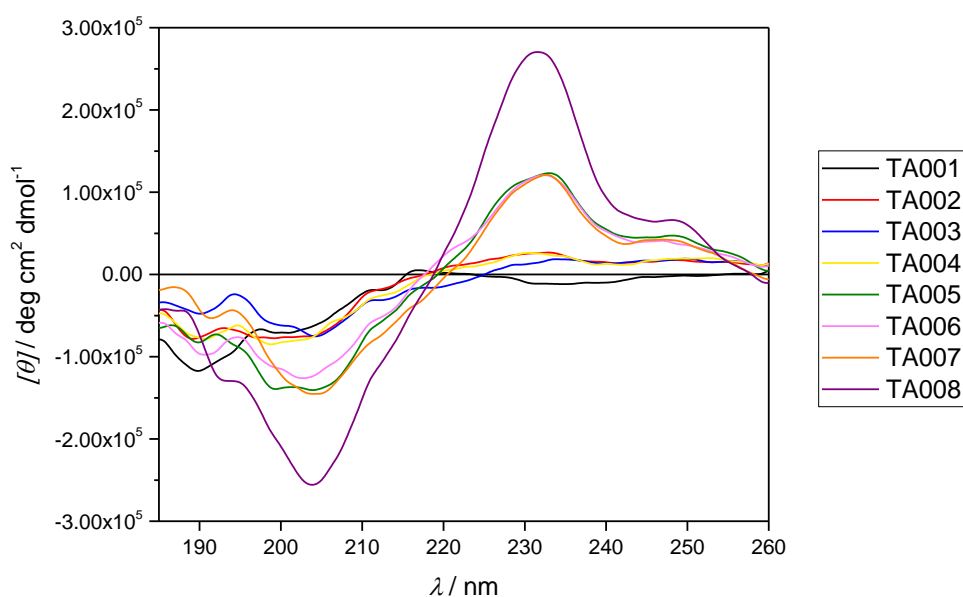
térszerkezeti elemek találhatóak bennük, és melyek között fedezhetőek fel hasonlóságok. Ezeket a vizsgálatokat azért is tartottuk fontosnak elvégezni, mert az Angiopep-2 peptidről és származékairól korábban nem közöltek semmilyen szerkezetkutatósi eredményt.

A peptidről és a konjugátumokról 185-260 nm hullámhossz-tartományban alapvonal-korrigált ellipticitás-spektrumokat vettünk fel. Az oxigén zavaró abszorpciójának kiküszöbölése érdekében a méréseket nitrogénáram alatt végeztük, és UV-tartományban teljesen fényáteresztő kvarc küvettát használtunk. A mintákat trifluoretanol-víz (50:50 tf%) elegyben oldottuk, ami elősegíti a másodlagos térszerkezeti elemek kialakulását és stabilizálódását<sup>87</sup>, és így az eredmény jobban tükrözi a ligand receptor-kötődést közvetlenül megelőző állapotát.

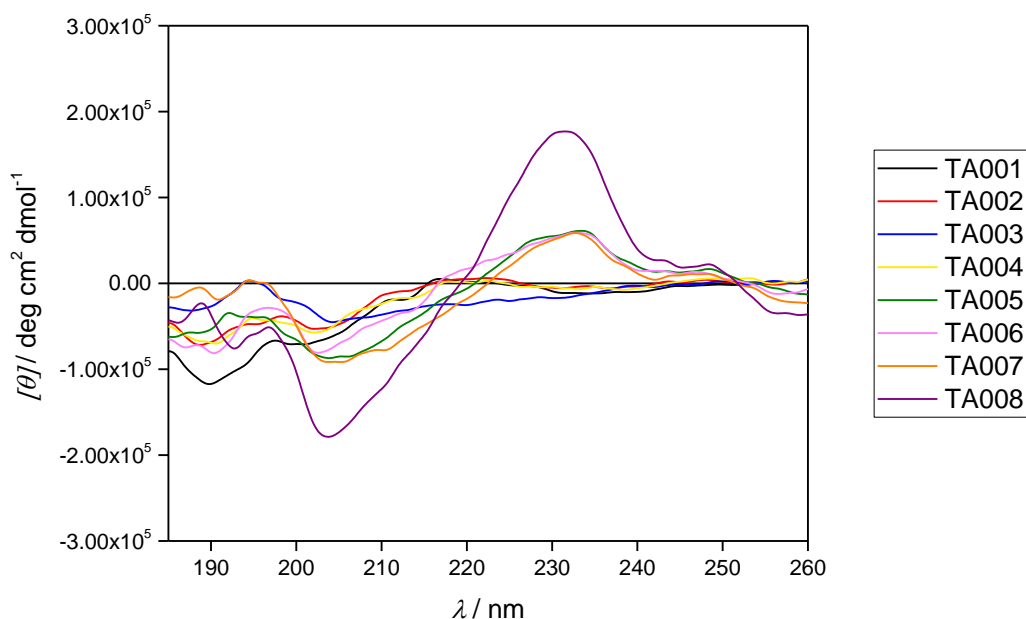
A konjugátumok spektrumainak összehasonlítását megnehezíti, hogy a peptidgerincen található amidkromofórok mellett a daunomicin-molekula antrakinon-részlete is rendelkezik a vizsgált tartományban CD átmenettel, így a két spektrum egymásra rakódik<sup>88</sup>. Ezért felvettük két daunomicin-tartalmú metabolit (Dau=Aoa-Thr-OH és H-Lys(Aoa=Dau)-OH) spektrumát is, és azzal a feltételezéssel élünk, hogy a konjugátumok adatsoraiból a tényleges másodlagos szerkezetre vonatkozó információt a hatóanyag-pozícióknak megfelelő metabolitok adatsorainak kivonásával nyerhetjük.

A peptid és a konjugátumok esetén a legfontosabb másodlagos szerkezeti elemek arányát a *bestsel.elte.hu* webszerver segítségével határoztuk meg a metabolikkal korrigált adatsorokból.

A konjugátumok eredeti és metabolitokkal korrigált, moláris ellipticitásban megadott spektrumai a 17. és 18. ábrán, a térszerkezeti motívumokra kapott százalékos értékek pedig a 12. táblázatban láthatóak.



17. ábra. A TA001 peptid és a TA002-TA008 konjugátumok CD spektrumai



18. ábra. A TA001 peptid és a TA002-TA008 konjugátumok megfelelő metabolitokkal korrigált CD spektrumai

12. táblázat. Másodlagos térszerkezeti elemek százalékos aránya a TA001 peptidben és a TA002-TA008 konjugátumokban

Kód	Másodlagos térszerkezeti elemek százalékos aránya				
	$\alpha$ -hélix	antiparalel $\beta$ -redő	paralel $\beta$ -redő	kanyar	egyéb
TA001	0,3	34,9	2,8	14,9	47,2
TA002	0,0	39,2	0,0	13,7	47,1
TA003	0,1	38,6	0,0	15,1	46,2
TA004	0,0	39,1	0,0	14,1	46,9
TA005	0,0	41,2	0,0	8,9	49,8
TA006	0,0	38,8	0,0	9,2	52,0
TA007	0,0	40,9	0,0	10,3	48,9
TA008	0,0	38,3	0,0	0,7	61,0

Az eredmények alapján elmondható, hogy minden esetben az – elsősorban random konformációt magába foglaló – egyéb kategóriába eső szerkezeti motívumok hozzájárulása volt a legnagyobb, ami arra enged következtetni, hogy a peptidrészek szerkezete kevésbé kötött. Mind a spektrumokban, mind a százalék-értékekben azonos hatóanyag-szám esetén mutatkoztak hasonlóságok, ez azonban nem feltétlenül jelent térszerkezeti tendenciát is. Lehetséges ugyanis, hogy a feltételezésünk pontatlan volt, és a daunomicin molekulák hozzájárulása a spektrumhoz nem arányos a számukkal.

Egy daunomicinnel való konjugálás esetén viszont a közelítés még működni látszik: a lizin oldalláncokon daunomicint tartalmazó TA002 és TA004 konjugátumok térszerkezete a

metabolitokkal korrigált spektrumok lefutása alapján a natív peptidéhez hasonló, míg az *N*-terminálison daunomicinnel kapcsolt TA003 ettől eltérő szerkezetű. Ez a tapasztalat azonban nehezen összeegyeztethető a sejtbejutási kísérletek eredményeivel, ahol a legmarkánsabb különbség pont az *N*- és a *C*-terminális felőli lizinhez konjugált daunomicin között volt. Az ellentmondás feloldásához más módszerekkel (például röntgenkristallográfiával) szeretnénk tovább vizsgálni az előállított anyagok térszerkezetét.

## **5.6. *In vitro* degradáció-vizsgálat lizoszóma preparátumban**

A konjugátumok citosztikus aktivitása nem csak a sejtbejutás, hanem a sejten belüli lizoszomális degradáció hatékonyságán is múlhat. Ezt jól illusztrálja, hogy a TA004 konjugátum sejtbejutására kaptuk az egyik legnagyobb értéket (91% 50  $\mu$ M koncentrációban), ennek ellenére a citosztikus hatása nem volt kiemelkedő ( $IC_{50} = 18,2 \mu$ M).

A sejten belüli lebontófolyamatok vizsgálatához a három különböző egy hatóanyagot tartalmazó konjugátumot (TA002-TA004) lizoszóma preparátummal kezeltünk, 0, 1, 6, 24 és 72 óra elteltével a reakcióelegy kivett részleteiben az enzimátikus reakciót hangyasav hozzáadásával kvencseltük, majd az összetételüket orbitrap LC-MS-sel vizsgáltuk.

Az emésztési idő előrehaladtával egyre rövidebb daunomicint tartalmazó peptidláncok jelenlétét detektáltuk, amelyekben a TA003 esetén a *C*-terminális felől, a TA002 és TA004 esetén pedig mindkét oldalról párhuzamosan fokozatosan fogyatkoztak az aminosavak. Mivel a daunomicint az aminooxiecetsav-linkerekhez viszonylag stabil oximkötésen keresztül kapcsoltuk, nem vártuk a szabad hatóanyag felszabadulását az emésztés során, és valóban, a spektrumokban megjelenő legkisebb metabolit a TA002 és TA004 esetén a H-Lys(Aoa=Dau)-OH, a TA003 esetén pedig a Dau=Aoa-Thr-OH volt.

A 13. táblázat mutatja be a három konjugátumban detektálható hasítások helyeit, illetve az említett egy aminosav-hosszúságú, daunomicint tartalmazó metabolitok megjelenéséhez szükséges időket (ez utóbbi mennyiség a degradáció sebességének jellemzésére szolgál).

13. táblázat. A lizoszomális degradáció-vizsgálat során detektált hasítások helyei és a legkisebb daunomicint tartalmazó metabolit első észleléséig eltelt idő a TA002-TA004 konjugátumok esetén

Kód	A detektálható hasítások helyei	$\text{Dau} = \text{Aoa} - \text{T} - \text{OH}$ / $\text{H} - \text{K} - \text{OH}$ $\text{Dau} = \text{Aoa}$ első megjelenése
TA002	$\text{H} - \text{T} \text{FF} \text{Y} \text{G} \text{G} \text{S} \text{R} \text{G} \text{K} \text{R} \text{N} \text{N} \text{F} \text{K} \text{T} \text{E} \text{E} \text{Y} - \text{OH}$ $\text{Dau} = \text{Aoa}$	1 óra
TA003	$\text{Dau} = \text{Aoa} - \text{T} \text{FF} \text{Y} \text{G} \text{G} \text{S} \text{R} \text{G} \text{K} \text{R} \text{N} \text{N} \text{F} \text{K} \text{T} \text{E} \text{E} \text{Y} - \text{OH}$	1 óra
TA004	$\text{H} - \text{T} \text{FF} \text{Y} \text{G} \text{G} \text{S} \text{R} \text{G} \text{K} \text{R} \text{N} \text{N} \text{F} \text{K} \text{T} \text{E} \text{E} \text{Y} - \text{OH}$ $\text{Dau} = \text{Aoa}$	6 óra

A táblázatból jól látszik, hogy – bár vannak tipikus pozíciók – a különböző konjugátumokban különböző aminosavak között detektáltunk hasításokat (azonban meg kell jegyezni, hogy a degradáció során képződhetnek más fragmensek is, amelyek a módszerrel nem detektálhatóak), és a lebomlási sebességekben is megfigyelhetőek voltak eltérések. Míg a TA002 és TA003 konjugátum esetén a megfelelő egy aminosavat tartalmazó metabolit már 1 óra elteltével kimutatható volt, 6 óra után főcsúcsként jelent meg a kromatogramban, és 72 óra után csak ez volt detektálható, addig a TA004 konjugátum esetén 6 óra elteltével észleltük először, és még 72 óra után is kisebb mennyiségben volt jelen, mint a H-GK(Dau=Aoa)R-OH és H-GK(Dau=Aoa)-OH metabolitok. A TA004 többi konjugátumnál lassabb lebomlása magyarázatot ad arra, hogy miért mértünk ebben az esetben alacsonyabb  $IC_{50}$ -értéket, mint ami a sejtbejutási eredmények alapján várható lett volna.

A kísérletnek fontos konklúziója, hogy a lizoszomális enzimek aktivitása függ a hatóanyagok pozíciójától. Legvalószínűbb, hogy ennek a hátterében sztérikus gátlás áll: ha bizonyos aminocsoportokhoz egy nagy méretű hatóanyag-molekulát hozzákapsolunk, akkor az enzimek nem férnek hozzá a környező peptidkötésekhez. A mérésekből az derült ki, hogy a legnagyobb sztérikus árnyékoló hatást az N-terminális felőli lizinhez konjugált daunomicin fejt ki.

A lebontás hatékonyságát ebben az esetben a lizin oldallánc és a linker közé beépített különböző spacerekkel (Val-Ala, Val-Ala-Gly-Gly és Gly-Phe-Leu-Gly) kíséreltük meg megnövelni. A terveink között szerepel, hogy a kapott, sztérikusan feltehetőleg kevésbé zsúfolts konjugátumok biológiai aktivitását megvizsgáljuk, és az eredményeket az eredeti TA004 konjugátum esetén mért értékekkel összevessük.

## Szakedolgozat összefoglaló

### Angiopep-2-daunomicin konjugátumok szintézise és biológiai vizsgálata

Térmeg Anita, kémia alapszakos hallgató

ELTE TTK Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

Témavezetők: **Pethő Lilla** tudományos segédmunkatárs  
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport  
**Dr. Mező Gábor** tudományos tanácsadó  
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

A rák okozta megbetegedések világszerte kiemelt helyen szerepelnek a halálozási okok között [1]. A jelenleg elérhető kezelési módszerek gyakran súlyos mellékhatásokkal járnak, ami a hatékonyságuknak is korlátot szab. A szelektivitás növelésének jegyében egy újfajta megközelítés, az irányított tumorterápia [2] került az utóbbi évtizedek során a kutatások egyik fókuszpontjába. Ennek a lényege az, hogy a kemoterápiás hatóanyagot olyan irányító molekulához kapcsolják, amely az adott tumortípusban túlexpresszáldó sejtfelszíni struktúrákhoz képes kötődni, így a citosztatikus vagy citotoxikus hatás célzottan a daganatos sejtekben érvényesül.

A munkám során agytumorellenes peptid-hatóanyag konjugátumokat állítottam elő és hasonlítottam össze a biológiai aktivitásuk szempontjából. Irányító molekulaként az Angiopep-2 peptidet [3] választottam, ami receptor-mediált úton egyszerre segíti elő a vér-agy gáton keresztül történő transzportot és a tumorsejtekbe való szelektív bejuttatást. A peptid aminocsoportjaihoz kemoterápiás hatóanyagot (daunomicin) kapcsoltam aminooxiecetsav-linkereken keresztül. A szekvenciában összesen három aminocsoport található – kettő lizin oldalláncokban, egy pedig az *N*-terminálison –, ennek megfelelően egy, kettő és három daunomicint tartalmazó konjugátumokat állítottam elő az összes lehetséges hatóanyag-pozíciót megvalósítva (ez a natív Angiopep-2-vel együtt nyolcféle kombinációt jelent).

Az elkészült konjugátumok citosztatikus aktivitását MTT-teszttel, sejtbejutását áramlási citometriával, sejten belüli lebomlását pedig lizoszóma preparátumban végzett stabilitásméréssel vizsgáltuk *in vitro*. A citosztatikus hatás nem mutatott növekvő tendenciát a hatóanyagok számának növekedésével, ellenben mindhárom mért tulajdonság erősen függött a hatóanyagok pozíciójától. A *C*-terminálishoz közelebbi lizinre kapcsolt daunomicin minden esetben alacsony sejtbejutási hatékonysággal, az *N*-terminális felőli lizinre kapcsolt daunomicin pedig lassú lizoszomális degradációval párosult. Ezeknek a tapasztalatoknak egy lehetséges magyarázata a térszerkezetek különbözősége, azonban ezt az elvégzett cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás vizsgálatok egyelőre nem támasztották alá.

Az eredmények igazolták azt az előzetes hipotézisemet, amely szerint a tumorellenes hatást nem csak az befolyásolja, hogy egy konjugátumból maximálisan hány hatóanyag szabadulhat fel, hanem az is, hogy a hatóanyagok okozta szterikus árnyékolás, térszerkezet-változás vagy funkciócsoport-maszkírozás milyen mértékben módosítja a szervezet biomakromolekuláival való kölcsönhatást (például a receptor-ligand kötődés erősségét, a konjugátum sejten belüli lebomlásának hatékonyságát, illetve a felszabaduló metabolitok szerkezetét).

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. *et al.* *CA. Cancer J. Clin.* 68 (6), 394–424 (2018).
- [2] Poste, G., Kirsh, R. *Bio/Technology* 1 (10), 869–878 (1983).
- [3] Demeule, M., Régina, A., Ché, C., Poirier, J., Nguyen, T. *et al.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 324 (3), 1064–1072 (2008).

## Bachelor thesis summary

### Synthesis and biological study of Angiopep-2-daunomycin conjugates

Anita Térmeg, BSc student in Chemistry

ELTE TTK Institute of Chemistry, Organic Chemistry Department

Supervisors: **Lilla Pethő**, assistant research fellow  
MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry  
**Gábor Mező D.Sc.**, research professor  
MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry

Cancer is a leading cause of death worldwide [1]. The currently available treatment methods are liable to induce serious side effects, which limit their efficiency, too. Targeted cancer therapy [2], however, offers a way to increase selectivity. In this novel approach, the chemotherapeutic drug is conjugated to a targeting moiety that binds to a receptor overexpressed on the surface of the given tumour cell type, and as a result, a cytotoxic or cytostatic effect is produced specifically in the target cells.

My work comprised of synthesizing brain tumour-targeting peptide-drug conjugates and comparing their biological activity. As targeting moiety, I used Angiopep-2, a peptide that facilitates both the transport through the blood-brain barrier and the uptake into the tumour cells via receptor-mediated mechanisms [3]. I attached drug molecules (daunomycin) through aminooxyacetic acid linkers to the amino functional groups of the peptide. Angiopep-2 contains three of these – two in lysine side chains plus one at the *N*-terminal end –, thus I synthesized single-, dual- and triple-functionalised conjugates in all possible combinations of positions, which means a total of eight molecules including the native peptide.

The *in vitro* cytostatic activity, cellular uptake and intracellular digestion of the conjugates were studied using MTT, fluorescence-based flow cytometric and lysosomal degradation assays, respectively. The cytostatic effect did not show an increasing tendency with the increase in the number of drug molecules, the drug-position, on the other hand, appeared to play a crucial role. A correlation could be observed between the presence of a daunomycin on the *C*-terminal side lysine and low cellular uptake efficiency as well as the presence of a daunomycin on the *N*-terminal side lysine and slow degradation. A possible explanation is a difference in the preferred peptide backbone conformation between the positions, which, however, was not confirmed by circular dichroism spectroscopic experiments so far.

These results indicate that the anti-tumour effect of a targeted therapy conjugate depends not only on the number of releasable drug molecules but also on the extent to which the steric hindrance, structure modification or masking of amino groups caused by the drug changes the targeting peptide's interactions with biomacromolecules (for example its receptor affinity, the efficiency of intracellular degradation or the structure of the released metabolites).

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. *et al. CA. Cancer J. Clin.* 68 (6), 394–424 (2018).
- [2] Poste, G., Kirsh, R. *Bio/Technology* 1 (10), 869–878 (1983).
- [3] Demeule, M., Régina, A., Ché, C., Poirier, J., Nguyen, T. *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 324 (3), 1064–1072 (2008).

## 7. Rövidítésjegyzék

AMP	adenozin-monofoszfát
Boc	<i>tert</i> -butiloxikarbonil
Bzl	benzil
CD	cirkuláris dikroizmus
CT	számítógépes tomográfia
Dau	daunomicin
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én
DCM	diklórmétán
Dde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociklohex-1-ilidén)-3-etil
DIC	<i>N,N</i> -diizopropilkarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropil- <i>N</i> -etilamin
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
Fmoc	9-fluorenilmetiloxikarbonil
FSL	előre irányuló fényszórás
GnRH	gonadotropin-felszabadító hormon
H-Aoa-OH	aminooxiecetsav
HER2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa
HOBt	1-hidroxibenztriazol
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
IARC	Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség
IC <sub>50</sub>	fél maximális gátló koncentráció
LC <sub>50</sub>	közepes letális koncentráció
LDLR	alacsony sűrűségű lipoprotein-receptor
LRP1, ill. LRP2	alacsony sűrűségű lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje 1, ill. 2
MRI	mágnesesrezonancia-képzéskészítés
MS	tömegspektrometria

Mtt	4-metiltritol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurán-5-szulfonil
PCDDB	Fehérje Cirkuláris Dikroizmus Adatbázis
PyBOP	benztriazol-1-il-oxi-trisz(pirrolidino)foszfónium-hexafluorofoszfát
RP-HPLC	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
SFL	oldalirányú fluoreszcens fény
SSL	oldalra irányuló fényszórás
<i>t</i> Bu	<i>terc</i> -butil
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropilszilán
UHPLC	ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
UV	ultraibolya



## 8. Irodalomjegyzék

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
2. WHO Mortality Database. Elérhető: <http://apps.who.int/healthinfo/statistics/mortality/whodpms/>. (Megtekintve: 2018.09.29.)
3. Global Cancer Observatory. Elérhető: <http://gco.iarc.fr/>. (Megtekintve: 2018.09.29.)
4. Menyhárt, O., Fekete, J. T., Győrffy, B. Demographic shift disproportionately increases cancer burden in an aging nation: current and expected incidence and mortality in Hungary up to 2030. *Clin. Epidemiol.* **10**, 1093–1108 (2018).
5. Kaatsch, P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat. Rev.* **36**, 277–285 (2010).
6. Plošnik, A., Vračko, M., Dolenc, M. S. Mutagenic and carcinogenic structural alerts and their mechanisms of action. *Arh Hig Rada Toksikol* **67**, 169–182 (2016).
7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
8. Martincorena, I., Campbell, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science* **349**, 1483–1489 (2015).
9. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546–1558 (2013).
10. Kanwal, R., Gupta, S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin. Genet.* **81**, 303–311 (2012).
11. Corrie, P. G. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine (Baltimore)*. **36**, 24–28 (2008).
12. Parker, W. B. Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer. *Chem. Rev.* **109**, 2880–2893 (2009).
13. Rowinsky, E. K., Donehower, R. C. The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. *Pharmacol. Ther.* **52**, 35–84 (1991).
14. Nitiss, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 338–350 (2009).
15. Bajorin, D. F., Motzer, R. J., Rodriguez, E., Murphy, B., Bosl, G. J. Acute Nonlymphocytic Leukemia in Germ Cell Tumor Patients Treated With Etoposide-Containing Chemotherapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 60–62 (1993).
16. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv. Pharm. Bull.* **7**, 339–348 (2017).
17. Lee, Y. T., Tan, Y. J., Oon, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **834**, 188–196 (2018).
18. Ehrlich, P. *Collected studies on immunity*. (J. Wiley & sons, 1906).
19. Gregoriadis, G. Targeting of drugs. *Nature* **265**, 407–411 (1977).
20. Ringsdorf, H. *Polymeric Delivery Systems*. (Gordon and Breach Science, 1978).
21. Chau, Y., Dang, N. M., Tan, F. E., Langer, R. Investigation of Targeting Mechanism of New Dextran-Peptide-Methotrexate Conjugates Using Biodistribution Study in

- Matrix-Metalloproteinase-Overexpressing Tumor Xenograft Model. *J. Pharm. Sci.* **95**, 542–551 (2006).
22. Smith, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317 (1985).
  23. Vyas, S. P., Singh, A., Sihorkar, V. Ligand-receptor-mediated drug delivery: an emerging paradigm in cellular drug targeting. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **18**, 1–76 (2001).
  24. Holliger, P., Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1126–1136 (2005).
  25. Weiland, G. A., Molinoff, P. B. Quantitative analysis of drug-receptor interactions: I. Determination of kinetic and equilibrium properties. *Life Sci.* **29**, 313–330 (1981).
  26. Goodenberger, M. L., Jenkins, R. B. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* **205**, 613–621 (2012).
  27. Alifieris, C., Trafalis, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* **152**, 63–82 (2015).
  28. Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro. Oncol.* **19**, 1–88 (2017).
  29. Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., Begley, D. J. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25 (2010).
  30. Spencer, B. J., Verma, I. M. Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. *PNAS* **104**, 7594–7599 (2007).
  31. Hervé, F., Ghinea, N., Scherrmann, J.-M. CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis. *AAPS J.* **10**, 455–472 (2008).
  32. Pardridge, W. M. Blood–brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* **12**, 54–61 (2007).
  33. Wolinsky, J. B., Colson, Y. L., Grinstaff, M. W. Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *J. Control. Release* **159**, 14–26 (2012).
  34. Khalin, I., Alyautdin, R., Ismail, N. M., Haron, M. H., Kuznetsov, D. Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 795–811 (2014).
  35. Witt, K. A., Gillespie, T. J., Huber, J. D., Egleton, R. D., Davis, T. P. Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability. *Peptides* **22**, 2329–2343 (2001).
  36. Choudhury, S. R., Hudry, E., Maguire, C. A., Sena-Esteves, M., Breakefield, X. O. *et al.* Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology* **120**, 63–80 (2017).
  37. Batrakova, E. V, Gendelman, H. E., Kabanov, A. V. Cell-mediated drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 415–433 (2011).
  38. Oller-Salvia, B., Sánchez-Navarro, M., Giralt, E., Teixidó, M. Blood–brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 4690–4707 (2016).
  39. Ulbrich, K., Knobloch, T., Kreuter, J. Targeting the insulin receptor: nanoparticles for drug delivery across the blood–brain barrier (BBB). *J. Drug Target.* **19**, 125–132 (2011).
  40. Lee, J. H., Engler, J. A., Collawn, J. F., Moore, B. A. Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2004–2012 (2001).

41. Staquicini, F. I., Ozawa, M. G., Moya, C. A., Driessen, W. H. P., Barbu, E. M. *et al.* Systemic combinatorial peptide selection yields a non-canonical iron-mimicry mechanism for targeting tumors in a mouse model of human glioblastoma. *J. Clin. Invest.* **121**, 161–173 (2011).
42. Barrett, G. L., Trieu, J., Naim, T. The identification of leptin-derived peptides that are taken up by the brain. *Regul. Pept.* **155**, 55–61 (2009).
43. Liu, Y., Li, J., Shao, K., Huang, R., Ye, L. *et al.* A leptin derived 30-amino-acid peptide modified pegylated poly-l-lysine dendrigraft for brain targeted gene delivery. *Biomaterials* **31**, 5246–5257 (2010).
44. Wang, D., El-Amouri, S. S., Dai, M., Kuan, C.-Y., Hui, D. Y. *et al.* Engineering a lysosomal enzyme with a derivative of receptor-binding domain of apoE enables delivery across the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 2999–3004 (2013).
45. Demeule, M., Régina, A., Ché, C., Poirier, J., Nguyen, T. *et al.* Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**, 1064–1072 (2008).
46. Bertrand, Y., Currie, J.-C., Poirier, J., Demeule, M., Abulrob, A. *et al.* Influence of glioma tumour microenvironment on the transport of ANG1005 via low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Br. J. Cancer* **105**, 1697–1707 (2011).
47. Kounnas, M. Z., Moir, R. D., Rebeck, G. W., Bush, A. I., Argraves, W. S. *et al.* LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted  $\beta$ -amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* **82**, 331–340 (1995).
48. Moestrup, S. K., Cui, S., Vorum, H., Bregengard, C., Erik Bjom, R. *et al.* Evidence that Epithelial Glycoprotein 330/Megalín Mediates Uptake of Polybasic Drugs. *J. Clin. Invest.* **96**, 1404–1413 (1995).
49. Régina, A., Demeule, M., Ché, C., Lavallée, I., Poirier, J. *et al.* Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br. J. Pharmacol.* **155**, 185–197 (2009).
50. Ché, C., Yang, G., Thiot, C., Lacoste, M.-C., Currie, J.-C. *et al.* New Angiopep-Modified Doxorubicin (ANG1007) and Etoposide (ANG1009) Chemotherapeutics With Increased Brain Penetration. *J. Med. Chem.* **53**, 2814–2824 (2010).
51. Demeule, M., Régina, A., Yang, G., Ché, C., Béliveau, R. *et al.* New Angiochem-modified doxorubicin with increased brain penetration and efficacy against brain tumors. *Cancer Res.* **70**, 3578–3578 (2010).
52. Drappatz, J., Brenner, A., Wong, E. T., Eichler, A., Schiff, D. *et al.* Phase I Study of GRN1005 in Recurrent Malignant Glioma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1567–1576 (2013).
53. Kurzrock, R., Gabrail, N., Chandhasin, C., Moulder, S., Smith, C. *et al.* Safety, Pharmacokinetics, and Activity of GRN1005, a Novel Conjugate of Angiopep-2, a Peptide Facilitating Brain Penetration, and Paclitaxel, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 308–316 (2012).
54. Ibrahim, N., Tang, S.-C., Brenner, A., Kesari, S., Piccioni, D. *et al.* A phase II, open-label, multi-center study of ANG1005, a novel brain-penetrant peptide-drug conjugate, in breast cancer patients with recurrent CNS metastases. *Cancer Res.* **77**, 1–12 (2017).
55. Pipeline | Angiochem: Peptide-Antibody Conjugates that Cross the Blood Brain Barrier. Elérhető: <http://angiochem.com/pipeline>. (Megtekintve: 2018.10.08.)

56. Demeule, M., Beaudet, N., Régina, A., Besserer-Offroy, É., Murza, A. *et al.* Conjugation of a brain-penetrant peptide with neurotensin provides antinociceptive properties. *J. Clin. Invest.* **124**, 1199–1213 (2014).
57. Regina, A., Demeule, M., Tripathy, S., Lord-Dufour, S., Currie, J.-C. *et al.* ANG4043, a Novel Brain-Penetrant Peptide-mAb Conjugate, Is Efficacious against HER2-Positive Intracranial Tumors in Mice. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 129–140 (2015).
58. Ruan, S., Yuan, M., Zhang, L., Hu, G., Chen, J. *et al.* Tumor microenvironment sensitive doxorubicin delivery and release to glioma using angiopep-2 decorated gold nanoparticles. *Biomaterials* **37**, 425–435 (2015).
59. Gao, H., Zhang, S., Cao, S., Yang, Z., Pang, Z. *et al.* Angiopep-2 and Activatable Cell-Penetrating Peptide Dual-Functionalized Nanoparticles for Systemic Glioma-Targeting Delivery. *Mol. Pharm.* **11**, 2755–2763 (2014).
60. Ren, J., Shen, S., Wang, D., Xi, Z., Guo, L. *et al.* The targeted delivery of anticancer drugs to brain glioma by PEGylated oxidized multi-walled carbon nanotubes modified with angiopep-2. *Biomaterials* **33**, 3324–3333 (2012).
61. Huile, G., Shuaiqi, P., Zhi, Y., Shijie, C., Chen, C. *et al.* A cascade targeting strategy for brain neuroglial cells employing nanoparticles modified with angiopep-2 peptide and EGFP-EGF1 protein. *Biomaterials* **32**, 8669–8675 (2011).
62. Huang, S., Li, J., Han, L., Liu, S., Ma, H. *et al.* Dual targeting effect of Angiopep-2-modified, DNA-loaded nanoparticles for glioma. *Biomaterials* **32**, 6832–6838 (2011).
63. Ying, X., Wang, Y., Liang, J., Yue, J., Xu, C. *et al.* Angiopep-Conjugated Electro-Responsive Hydrogel Nanoparticles: Therapeutic Potential for Epilepsy. *Angew. Chemie* **126**, 12644–12648 (2014).
64. Sun, X., Pang, Z., Ye, H., Qiu, B., Guo, L. *et al.* Co-delivery of pEGFP-hTRAIL and paclitaxel to brain glioma mediated by an angiopep-conjugated liposome. *Biomaterials* **33**, 916–924 (2012).
65. Daunorubicin - FDA prescribing information, side effects and uses. Elérhető: [www.drugs.com/pro/daunorubicin.html](http://www.drugs.com/pro/daunorubicin.html). (Megtekintve: 2018.10.06.)
66. *WHO Model List of Essential Medicines.* (2017).
67. Procópio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., Araújo, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian J. Infect. Dis.* **16**, 466–471 (2012).
68. Leurs, U., Mező, G., Orbán, E., Öhlschläger, P., Marquardt, A. *et al.* Design, synthesis, in vitro stability and cytostatic effect of multifunctional anticancer drug-bioconjugates containing GnRH-III as a targeting moiety. *Biopolymers* **98**, 1–10 (2012).
69. Miklán, Z., Orbán, E., Csík, G., Schlosser, G., Magyar, A. *et al.* New daunomycin-oligoarginine conjugates: Synthesis, characterization, and effect on human leukemia and human hepatoma cells. *Biopolymers* **92**, 489–501 (2009).
70. Omelyanenko, V., Gentry, C., Kopečková, P., Kopeček, J. HEMA copolymer–anticancer drug–OV-TL16 antibody conjugates. II. Processing in epithelial ovarian carcinoma cells in vitro. *Int. J. Cancer* **75**, 600–608 (1998).
71. Mező, G., Szabó, I., Kertész, I., Hegedüs, R., Orbán, E. *et al.* Efficient synthesis of an (aminoxy) acetylated-somatostatin derivative using (aminoxy)acetic acid as a ‘carbonyl capture’ reagent. *J. Pept. Sci.* **17**, 39–46 (2011).

72. Orbán, E., Mező, G., Schlage, P., Csík, G., Kulić, Ž. *et al.* In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin–GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin–amino acid metabolites. *Amino Acids* **41**, 469–483 (2011).
73. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
74. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595–598 (1970).
75. Merrifield, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin. *Biochemistry* **3**, 1385–1390 (1964).
76. Carpino, L. A., Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* **37**, 3404–3409 (1972).
77. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
78. Ormerod, M. G. *Flow Cytometry - A Basic Introduction*. (De Novo software, 2008).
79. Applied Photophysics | Circular Dichroism Theory. Elérhető: [www.photophysics.com/circular-dichroism/chirscan-technology/](http://www.photophysics.com/circular-dichroism/chirscan-technology/). (Megtekintve: 2019.05.02.)
80. Johnson, W. C. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **7**, 205–214 (1990).
81. Gill, S. C., Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326 (1989).
82. Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y.-H., Goto, Y. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3095–E3103 (2015).
83. Whitmore, L. Woollett, B., Miles, A. J., Klose, D. P. J., Robert W. *et al.* PCDDDB: the protein circular dichroism data bank, a repository for circular dichroism spectral and metadata. *Nucleic Acids Res.* **39**, D480–D486 (2011).
84. Lauer, J. L., Fields, C. G., Fields, G. B. Sequence dependence of aspartimide formation during 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis. *Lett. Pept. Sci.* **1**, 197–205 (1995).
85. Bourel, L., Carion, O., Gras-Masse, H., Melnyk, O. The deprotection of Lys(Mtt) revisited. *J. Pept. Sci.* **6**, 264–270 (2000).
86. Aletras, A., Barlos, K., Gatos, D., Koutsogianni, S., Mamos, P. Preparation of the very acid-sensitive Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Application in the synthesis of side-chain to side-chain cyclic peptides and oligolysine cores suitable for the solid-phase assembly of MAPs and TASP. *Int. J. Pept. Protein Res.* **45**, 488–496 (2009).
87. Sonnichsen, F. D., Van Eyk, J. E., Hodges, R. S., Sykes, B. D. Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry* **31**, 8790–8798 (1992).
88. Barthelemy-Clavey, V., Maurizot, J.-C., Dimicoli, J.-L., Sicard, P. *Self-association of daunorubicin*. (1974).

## 9. Függelék

*F1. táblázat.* Az első aminosav felkapcsolásához használt reagensek és bemérési mennyiségek

Reagens	$M / \text{g mol}^{-1}; \rho / \text{g cm}^{-3}$	Ekvivalens	Bemért mennyiség
Fmoc-Tyr( <i>t</i> Bu)-OH	459,54	2	620 mg
DIC	126,2; 0,815	2	209 $\mu\text{l}$
DMAP	122,17	0,2	17 mg

*F2. táblázat.* Az Fmoc-R(Pbf)N(Trt)N(Trt)FK(Mtt)T(*t*Bu)E(O*t*Bu)E(O*t*Bu)-OH szekvenciárészlet szintézise során használt reagensek és bemérési mennyiségek (TA001-TA008)

Reagens	$M / \text{g mol}^{-1}; \rho / \text{g cm}^{-3}$	Ekvivalens	Bemért mennyiség
Fmoc-Glu(O <i>t</i> Bu)-OH	425,47	3	862 mg
Fmoc-Glu(O <i>t</i> Bu)-OH	425,47	3	862 mg
Fmoc-Thr( <i>t</i> Bu)-OH	397,46	3	805 mg
Fmoc-Lys(Mtt)-OH	624,79	3	1265 mg
Fmoc-Phe-OH	387,43	3	785 mg
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,67	3	1208 mg
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,67	3	1208 mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,78	3	1314 mg
HOBt	153,1	3	310 mg
DIC	126,2; 0,815	3	314 $\mu\text{l}$

**F3. táblázat.** Az Fmoc-FFY(*t*Bu)GGS(*t*Bu)R(Pbf)GK(Boc)-OH szekvenciárészlet szintézise során használt reagensek és bemérési mennyiségek (TA001-TA003, TA005)

Reagens	$M / \text{g mol}^{-1}; \rho / \text{g cm}^{-3}$	Ekvivalens	Bemért mennyiség
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,54	3	443 mg
Fmoc-Gly-OH	297,31	3	281 mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,78	3	613 mg
Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH	383,44	3	362 mg
Fmoc-Gly-OH	297,31	3	281 mg
Fmoc-Gly-OH	297,31	3	281 mg
Fmoc-Tyr( <i>t</i> Bu)-OH	459,54	3	434 mg
Fmoc-Phe-OH	387,43	3	366 mg
Fmoc-Phe-OH	387,43	3	366 mg
HOBt	153,1	3	145 mg
DIC	126,2; 0,815	3	146 $\mu\text{l}$

**F4. táblázat.** A Boc-Thr(*t*Bu)-OH aminosav-származék felkapcsolásához használt reagensek és bemérési mennyiségek (TA001 és TA002)

Reagens	$M / \text{g mol}^{-1}; \rho / \text{g cm}^{-3}$	Ekvivalens	Bemért mennyiség
Boc-Thr( <i>t</i> Bu)-OH	275,35	3	112 mg
HOBt	153,1	3	62 mg
DIC	126,2; 0,815	3	63 $\mu\text{l}$

**F5. táblázat.** Az Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH aminosav-származék felkapcsolásához használt reagensek és bemérési mennyiségek (TA003 és TA005, illetve TA007 és TA008)

Reagens	$M / \text{g mol}^{-1}; \rho / \text{g cm}^{-3}$	Ekvivalens	Bemért mennyiség
Fmoc-Thr( <i>t</i> Bu)-OH	397,46	3	215 mg
HOBt	153,1	3	83 mg
DIC	126,2; 0,815	3	84 $\mu\text{l}$

**F6. táblázat.** Az FFY(*t*Bu)GGS(*t*Bu)R(Pbf)GK(Dde)-OH szekvenciárészlet szintézise során használt reagensek és bemérési mennyiségek (TA004, TA006-TA008)

Reagens	$M / \text{g mol}^{-1}; \rho / \text{g cm}^{-3}$	Ekvivalens	Bemért mennyiség
Fmoc-Lys(Dde)-OH	468,54	3	575 mg
Fmoc-Gly-OH	297,31	3	321 mg
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,78	3	701 mg
Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH	383,44	3	414 mg
Fmoc-Gly-OH	297,31	3	321 mg
Fmoc-Gly-OH	297,31	3	321 mg
Fmoc-Tyr( <i>t</i> Bu)-OH	459,54	3	496 mg
Fmoc-Phe-OH	387,43	3	418 mg
Fmoc-Phe-OH	387,43	3	418 mg
HOBt	153,1	3	165 mg
DIC	126,2; 0,815	3	167 $\mu\text{l}$

**F7. táblázat.** A Boc-Thr(*t*Bu)-OH aminosav-származék felkapcsolásához használt reagensek és bemérési mennyiségek (TA004 és TA006)

Reagens	$M / \text{g mol}^{-1}; \rho / \text{g cm}^{-3}$	Ekvivalens	Bemért mennyiség
Boc-Thr( <i>t</i> Bu)-OH	275,35	3	149 mg
HOBt	153,1	3	83 mg
DIC	126,2; 0,815	3	84 $\mu\text{l}$

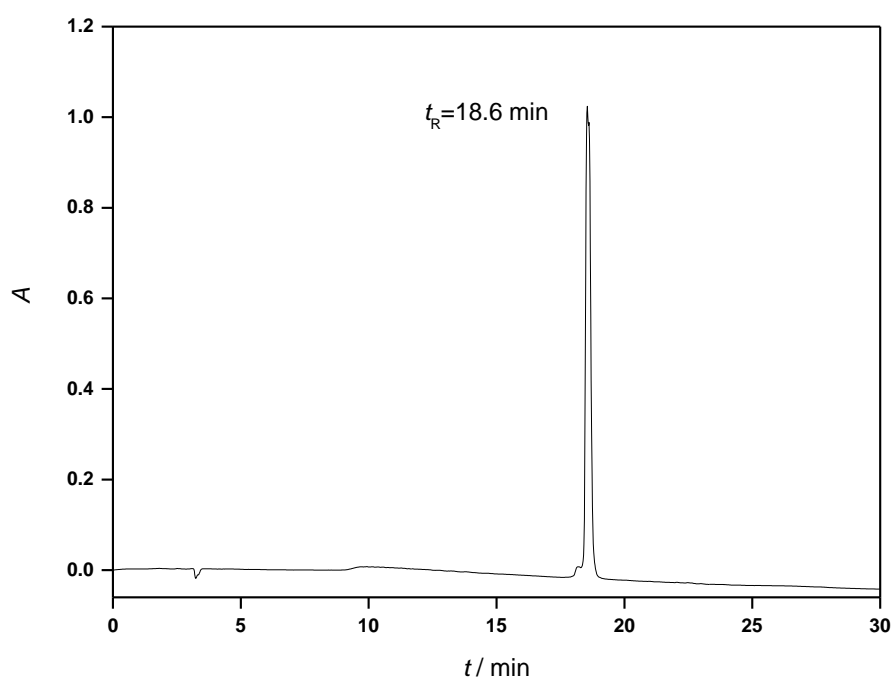
**F8. táblázat.** A Boc-Aoa-OH kapcsolásokhoz használt reagensek és bemérési mennyiségek

Reagens	$M / \text{g mol}^{-1}; \rho / \text{g cm}^{-3}$	1 db Aoa / peptid (TA002-TA004)		2 db Aoa / peptid (TA005-TA007)		3 db Aoa / peptid (TA008)	
		Ekv.	Bemért mennyiség	Ekv.	Bemért mennyiség	Ekv.	Bemért mennyiség
Boc-Aoa-OH	191,18	5	86 mg	10	172 mg	15	258 mg
K-Oxyma	180,20	5	81 mg	10	162 mg	15	243 mg
PyBOP	520,39	5	234 mg	10	468 mg	15	703 mg
DIEA	129,25; 0,742	10	157 $\mu\text{l}$	20	314 $\mu\text{l}$	30	470 $\mu\text{l}$

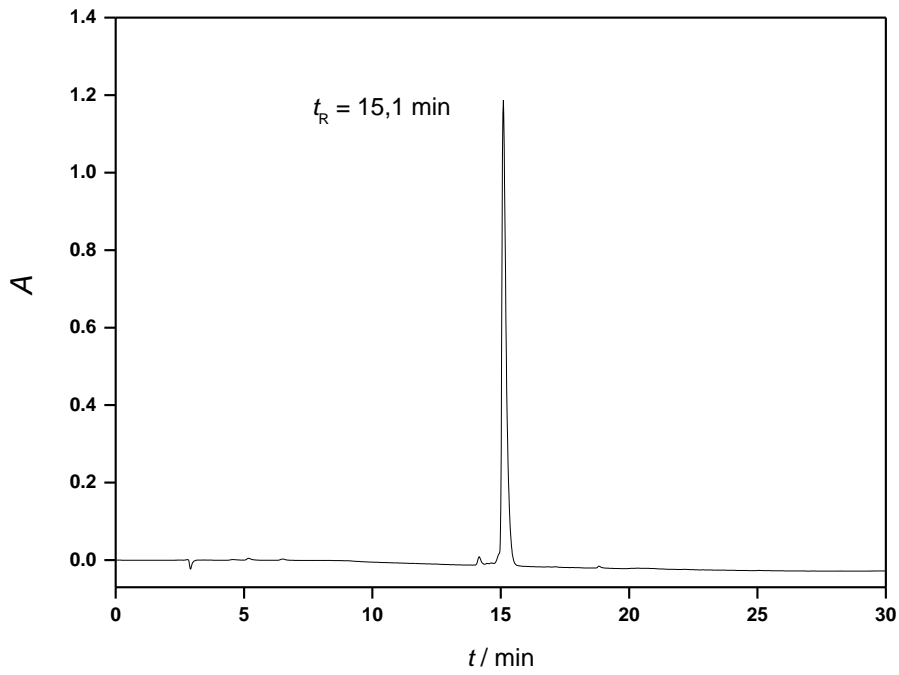


**F9. táblázat.** A gyantáról való hasításhoz használt reagensek és bemérési mennyiségek

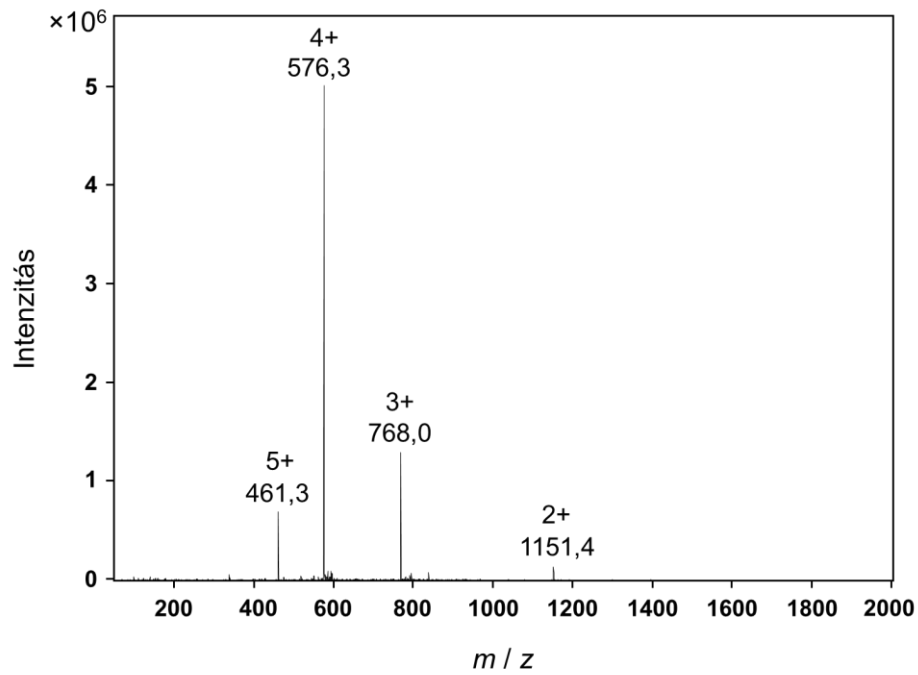
Reagens	$M / \text{g mol}^{-1};$ $\rho / \text{g cm}^{-3}$	0 db -Aoa (TA001)	1 db -Aoa (TA002- TA004)	2 db -Aoa (TA005- TA007)	3 db -Aoa (TA008)
		Bemért mennyiség			
TFA	114,02; 1,49	2,85 ml	4,75 ml		
H <sub>2</sub> O	18,02; 0,997	75 $\mu\text{l}$	125 $\mu\text{l}$		
TIS	157,35; 0,773	75 $\mu\text{l}$	125 $\mu\text{l}$		
H-Aoa-OH·1/2 HCl	109,30	-	98 mg	197 mg	295 mg



**F1. ábra.** A TA001 peptid analitikai HPLC-vel, Nucleosil 100-5 C18 oszlopon felvett kromatogramja



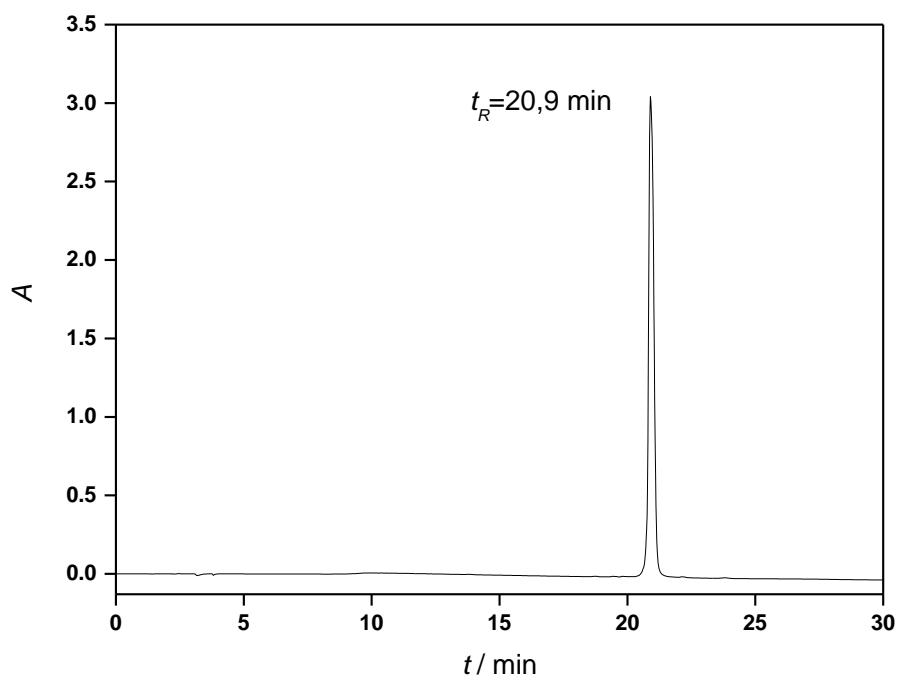
**F2. ábra.** A TA001 peptid analitikai HPLC-vel, Vydac 214TP C4 oszlopon felvett kromatogramja



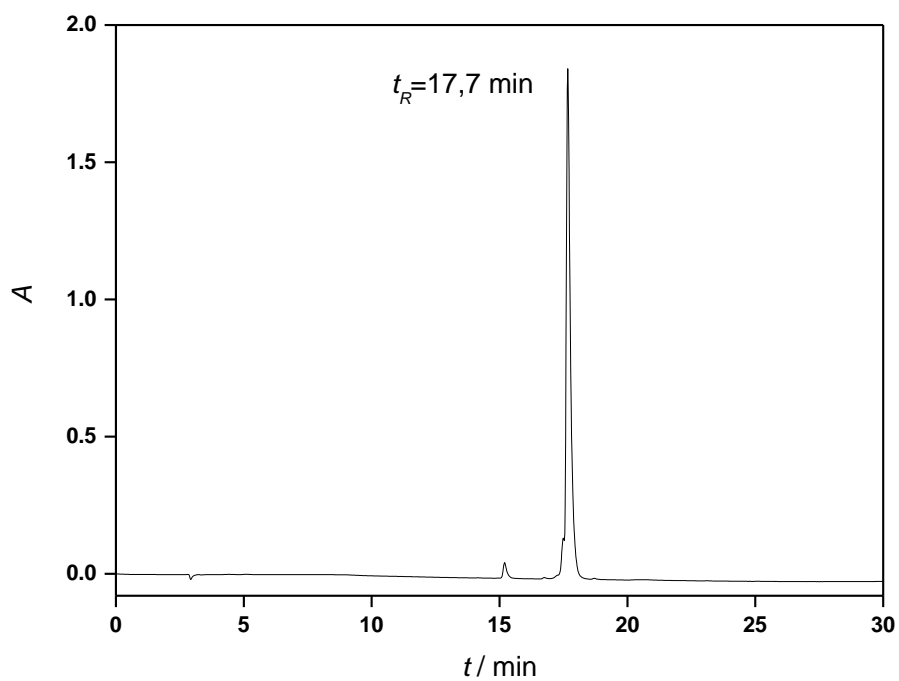
**F3. ábra.** A TA001 peptid MS spektruma

A molekula várt tömege:  $[M+H]^+$ : 2302,5 Da

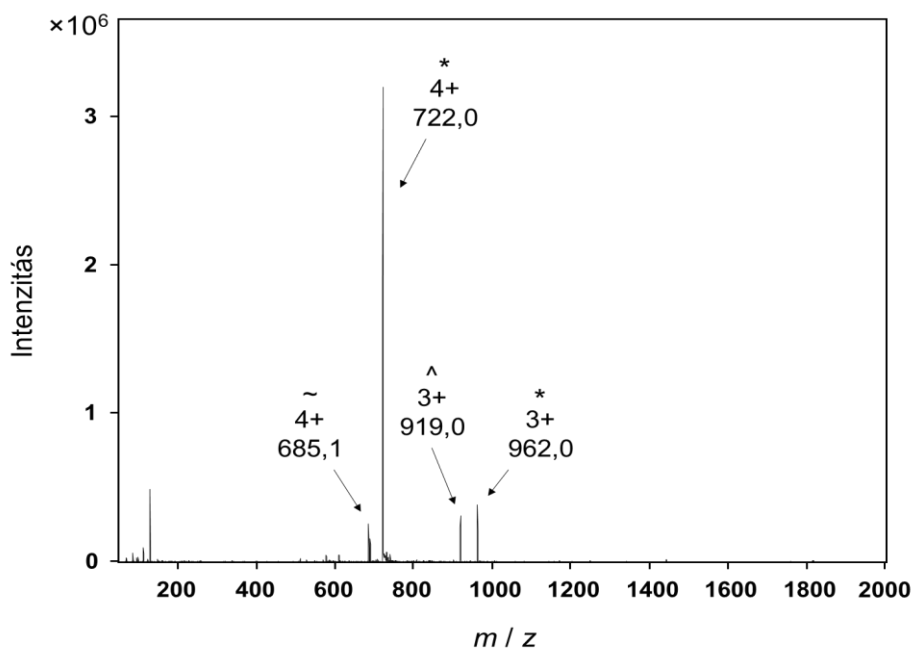
mért tömege:  $[M+H]^+$ : 2302,2 Da



F4. ábra. A TA002 konjugátum analitikai HPLC-vel, Nucleosil 100-5 C18 oszlopon felvett kromatogramja



F5. ábra. A TA002 konjugátum analitikai HPLC-vel, Vydac 214TP C4 oszlopon felvett kromatogramja



F6. ábra. A TA002 konjugátum MS spektruma

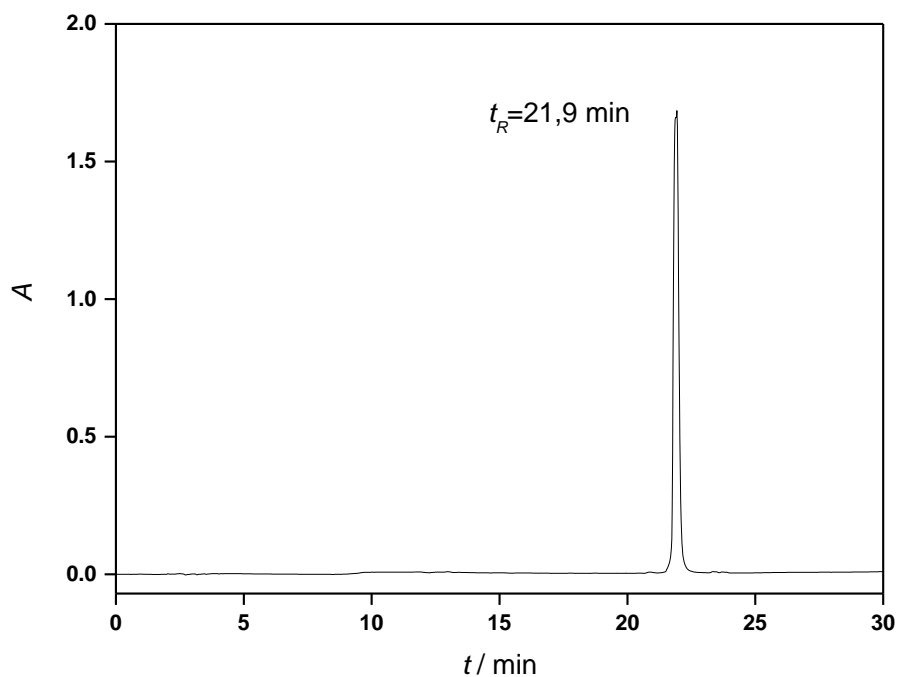
A molekula várt tömege:  $[M+H]^+$ : 2885,0 Da

mért tömege:  $[M+H]^+_1$ : 2885,0 Da (\*)

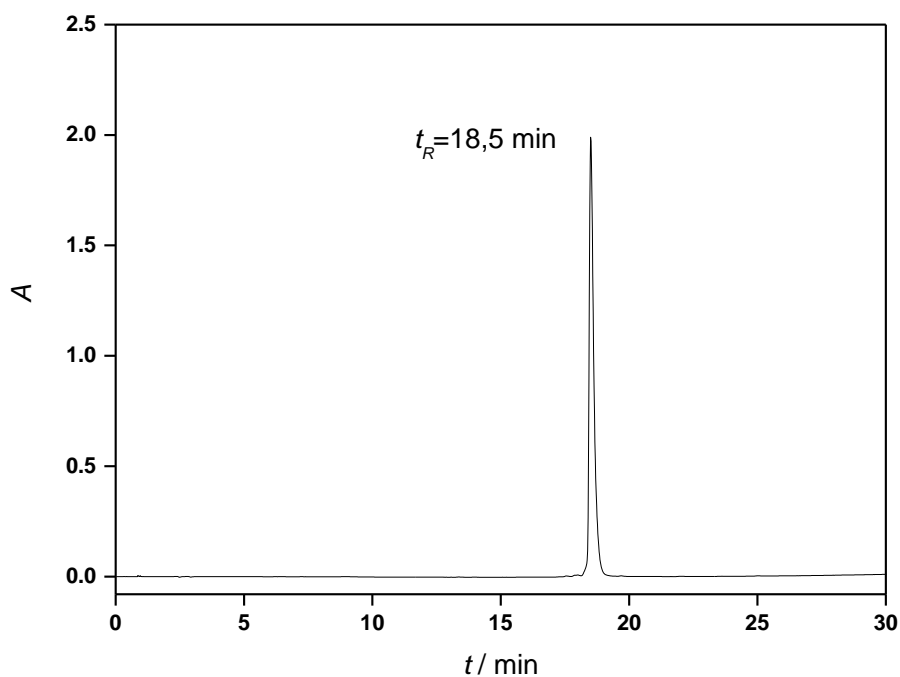
$[M+H]^+_2$ : 2755,0 Da (-129 Da) (^)

$[M+H]^+_3$ : 2737,4 Da (-147 Da) (~)

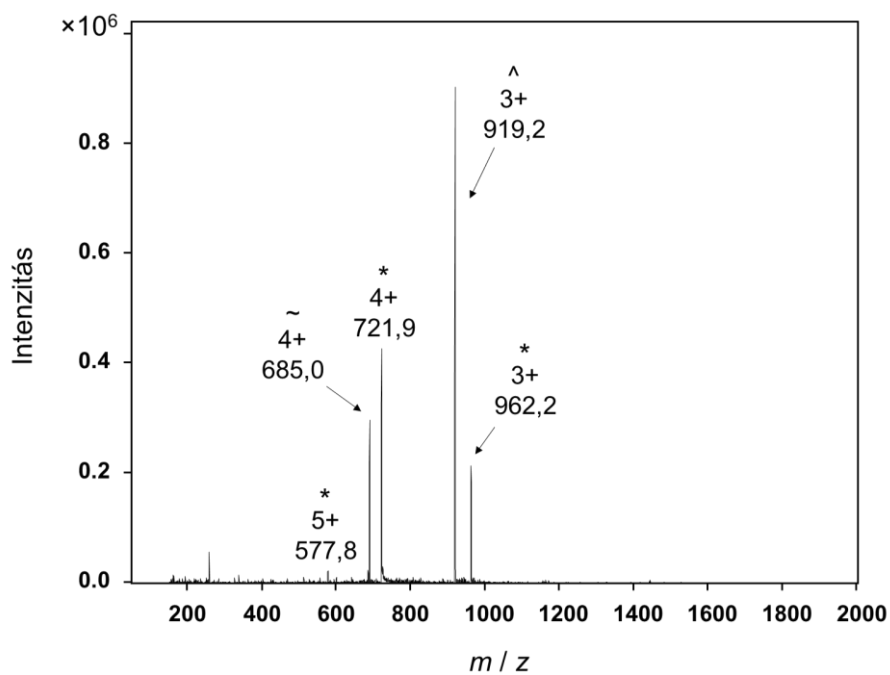
A tömegspektrométerben a mérés során lehasadt a daunomicin aminocukor része.



F7. ábra. A TA003 konjugátum analitikai HPLC-vel, Nucleosil 100-5 C18 oszlopon felvett kromatogramja



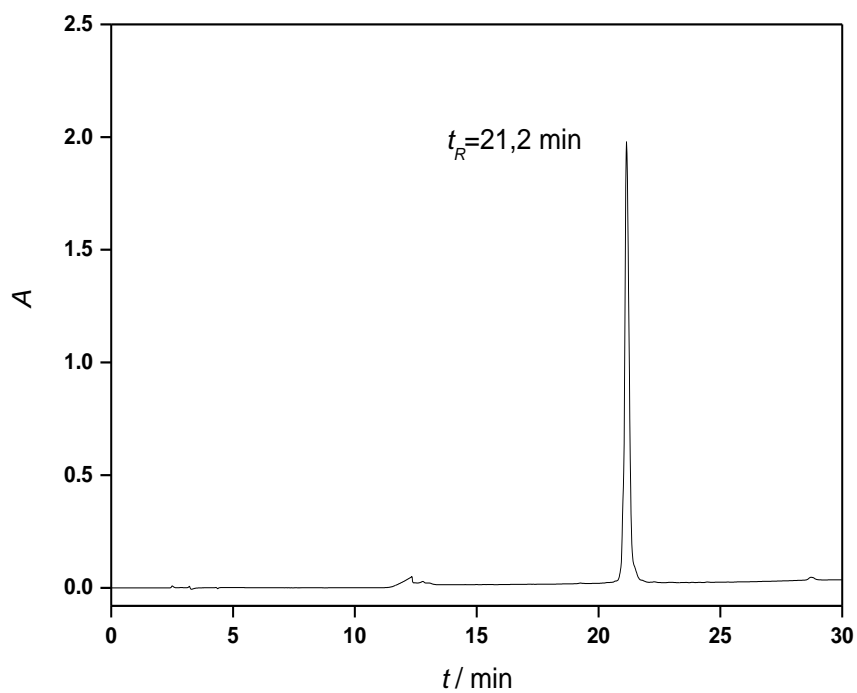
F8. ábra. A TA003 konjugátum analitikai HPLC-vel, Vydac 214TP C4 oszlopon felvett kromatogramja



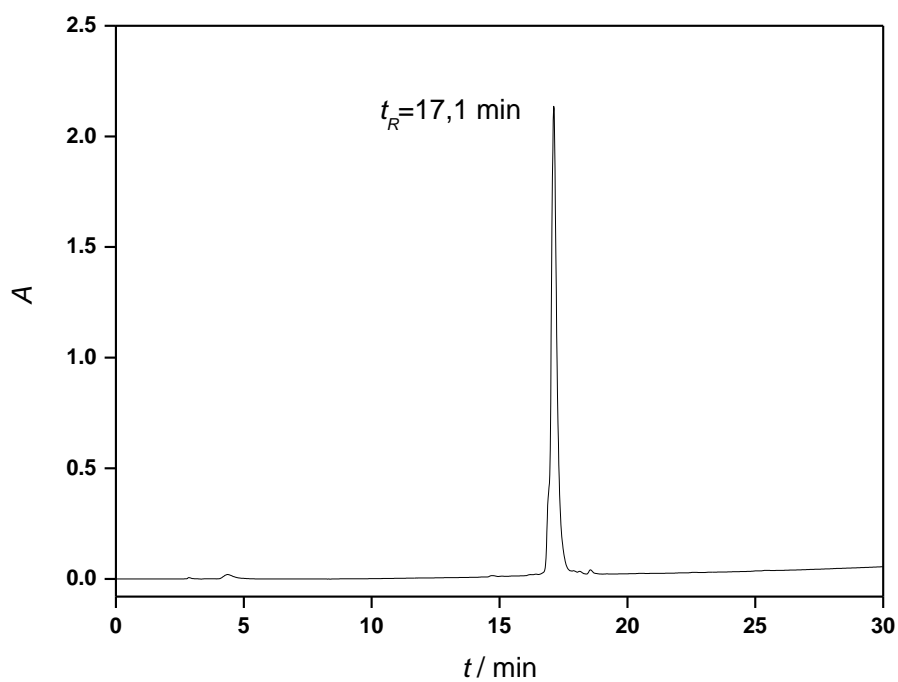
F9. ábra. A TA003 konjugátum MS spektruma

A molekula várt tömege:  $[M+H]^+$ : 2885,0 Da  
 mért tömege:  $[M+H]_1^+$ : 2884,6 Da (\*)  
 $[M+H]_2^+$ : 2755,6 Da (-129 Da) (^)  
 $[M+H]_3^+$ : 2737,0 Da (-147 Da) (~)

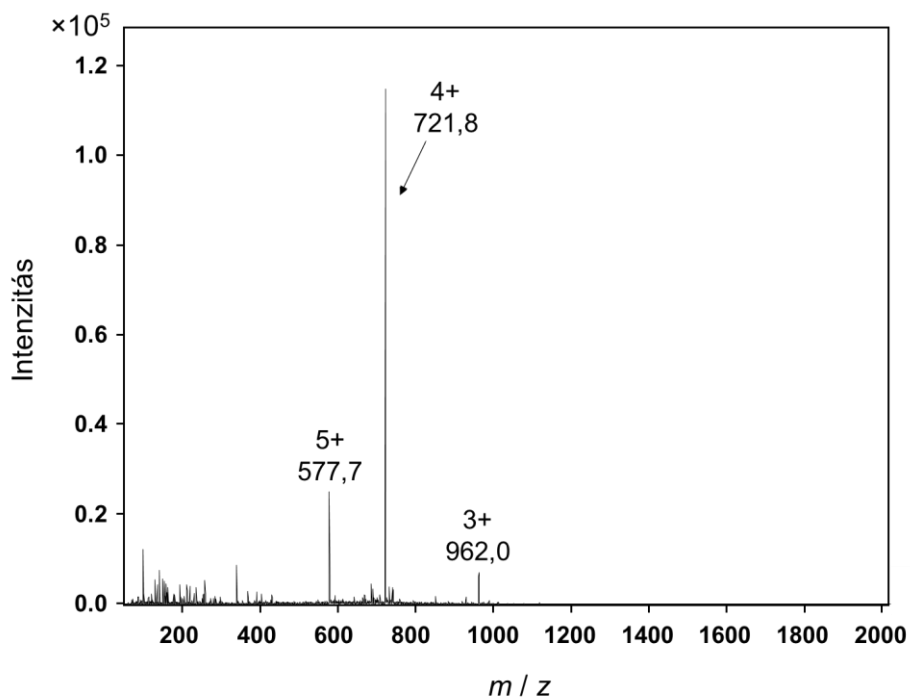
A tömegspektrométerben a mérés során lehasadt a daunomicin aminocukor része.



**F10. ábra.** A TA004 konjugátum analitikai HPLC-vel, Nucleosil 100-5 C18 oszlopon felvett kromatogramja



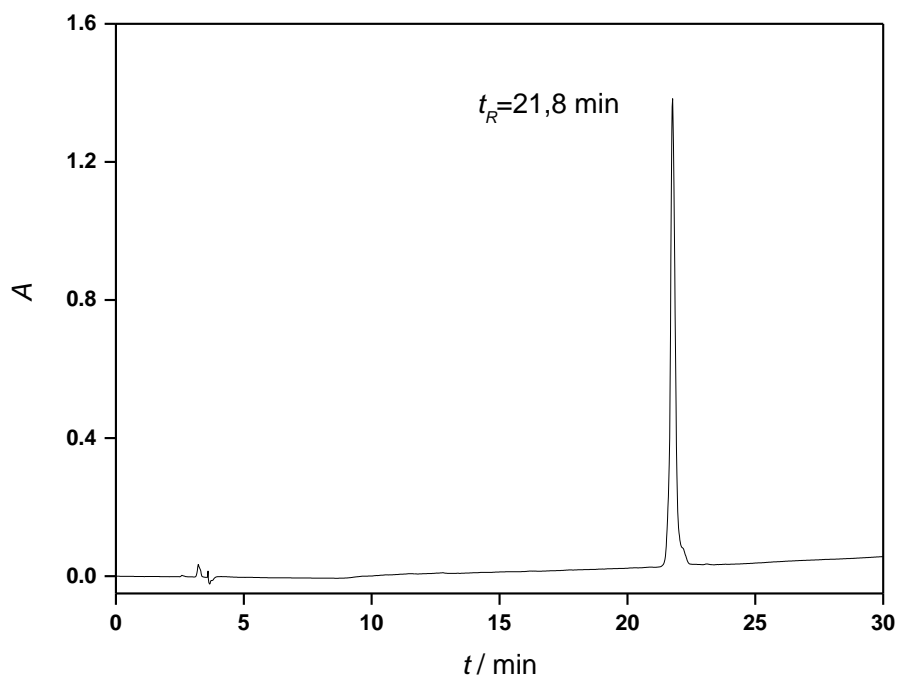
**F11. ábra.** A TA004 konjugátum analitikai HPLC-vel, Vydac 214TP C4 oszlopon felvett kromatogramja



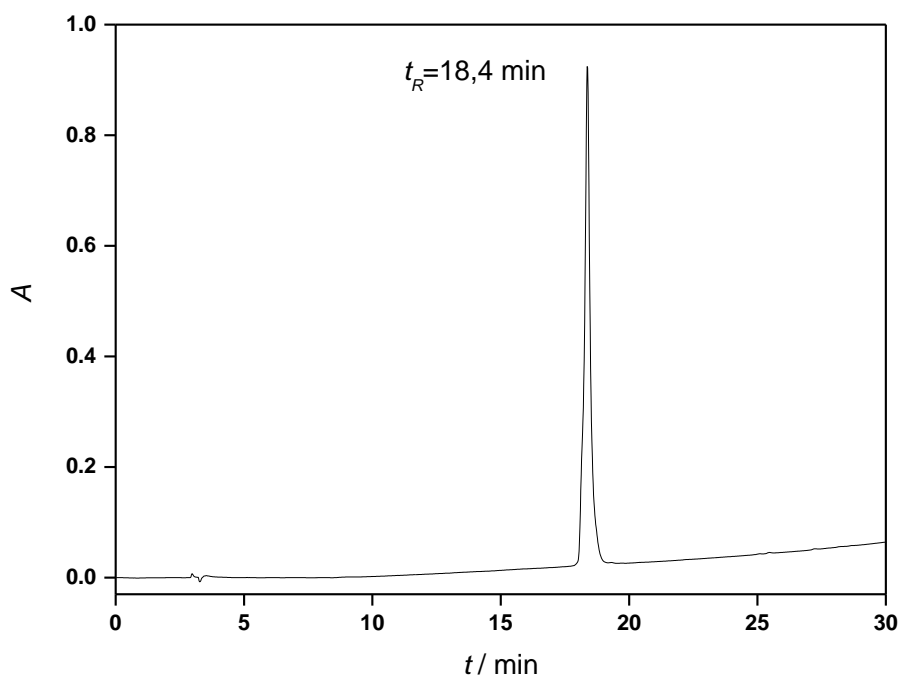
*F12. ábra.* A TA004 konjugátum MS spektruma

A molekula várt tömege:  $[M+H]^+$ : 2885,0 Da

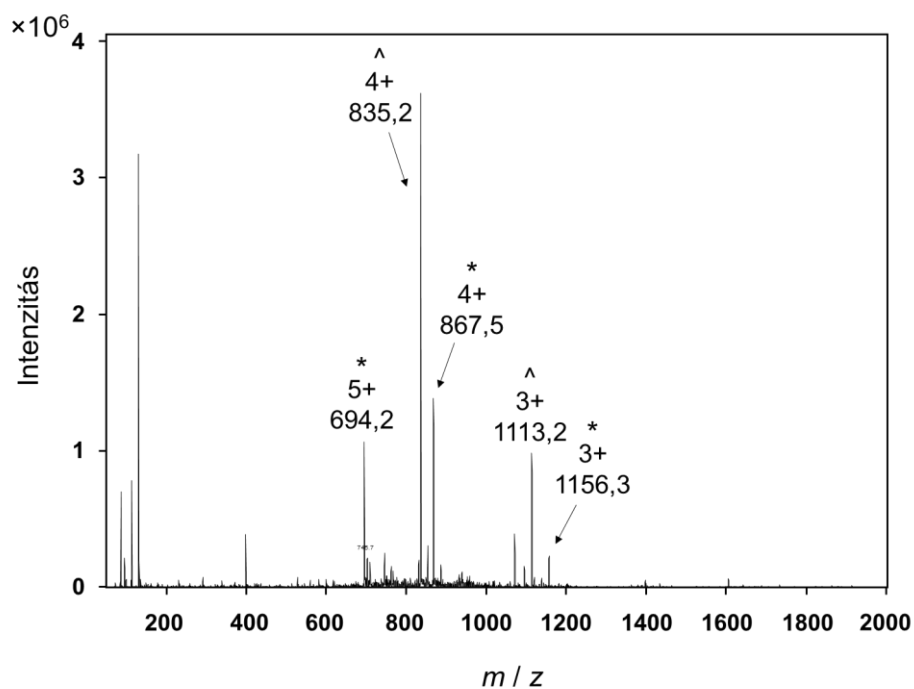
mért tömege:  $[M+H]^+$ : 2884,2 Da



*F13. ábra.* A TA005 konjugátum analitikai HPLC-vel, Nucleosil 100-5 C18 oszlopon felvett kromatogramja



F14. ábra. A TA005 konjugátum analitikai HPLC-vel, Vydac 214TP C4 oszlopon felvett kromatogramja



F15. ábra. A TA005 konjugátum MS spektruma

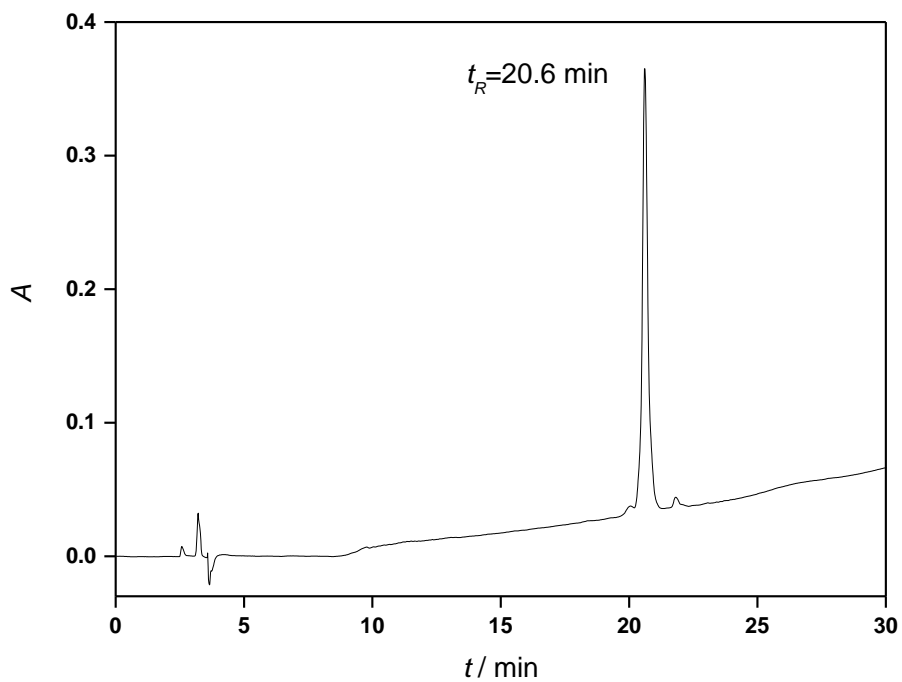
A molekula várt tömege:  $[M+H]^+$ : 3467,6 Da

mért tömege:  $[M+H]^+$ <sub>1</sub>: 3467,0 Da (\*)

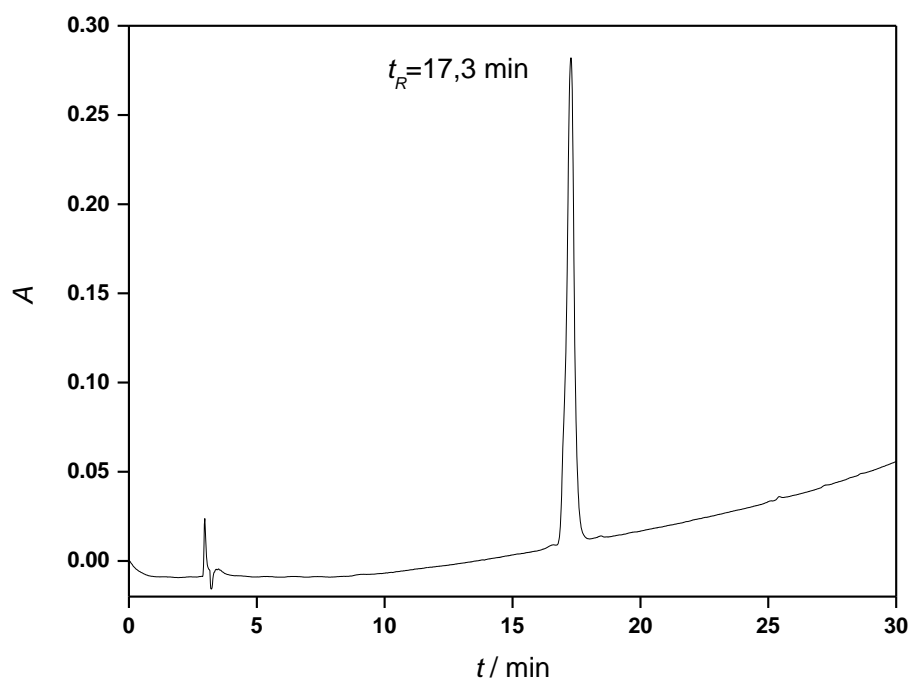
$[M+H]^+$ <sub>2</sub>: 3337,8 Da (-129 Da) (^)

A tömegspektrométerben a mérés során lehasadt a daunomicin aminocukor része.

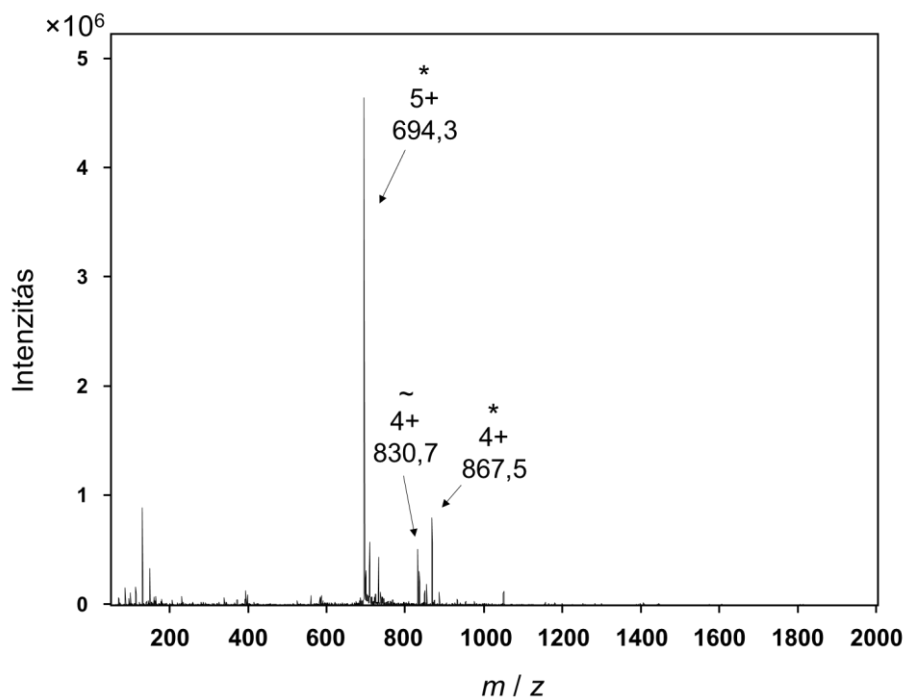




**F16. ábra.** A TA006 konjugátum analitikai HPLC-vel, Nucleosil 100-5 C18 oszlopon felvett kromatogramja



**F17. ábra.** A TA006 konjugátum analitikai HPLC-vel, Vydac 214TP C4 oszlopon felvett kromatogramja



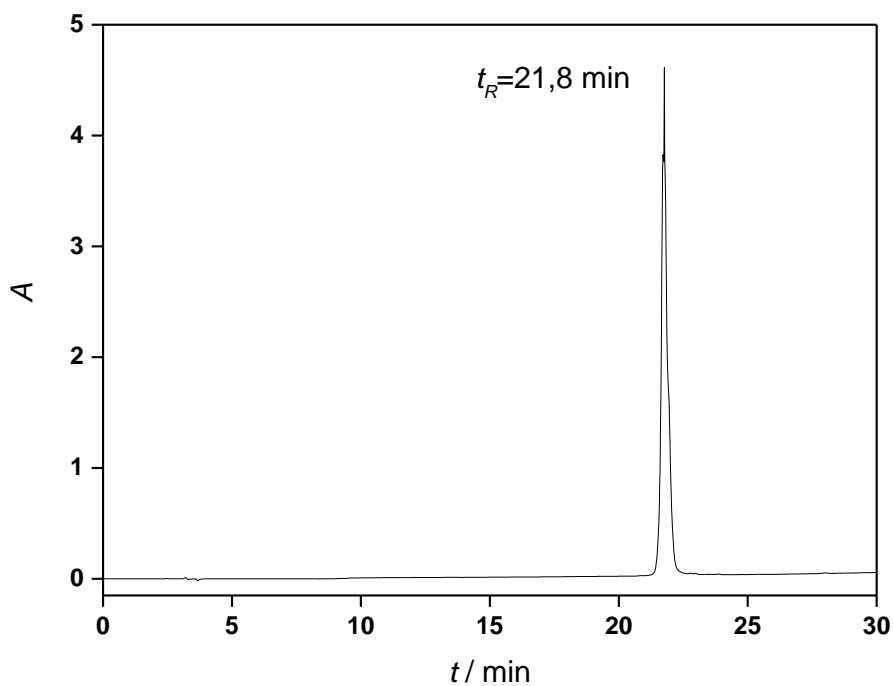
F18. ábra. A TA006 konjugátum MS spektruma

A molekula várt tömege:  $[M+H]^+$ : 3467,6 Da

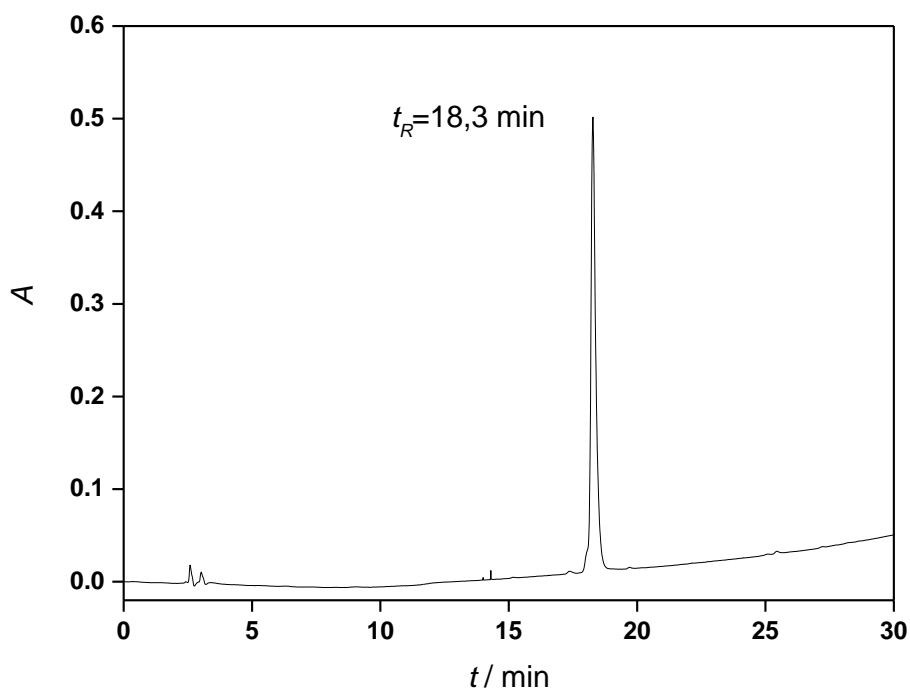
mért tömege:  $[M+H]^+_1$ : 3467,0 Da (\*)

$[M+H]^+_2$ : 3337,8 Da (-129 Da) (^)

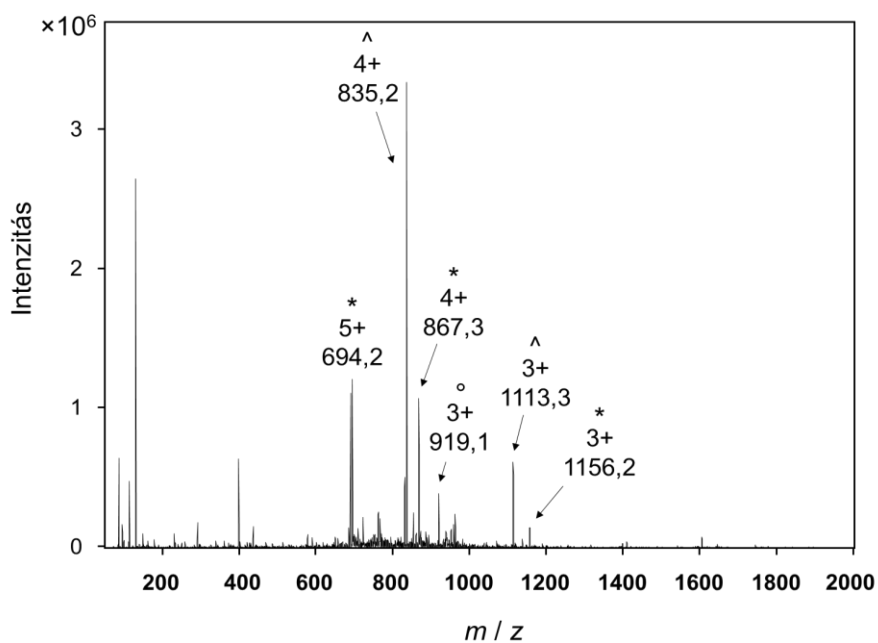
A tömegspektrométerben a mérés során lehasadt a daunomicin aminocukor része.



F19. ábra. A TA007 konjugátum analitikai HPLC-vel, Nucleosil 100-5 C18 oszlopon felvett kromatogramja



F20. ábra. A TA007 konjugátum analitikai HPLC-vel, Vydac 214TP C4 oszlopon felvett kromatogramja



F21. ábra. A TA007 konjugátum MS spektruma

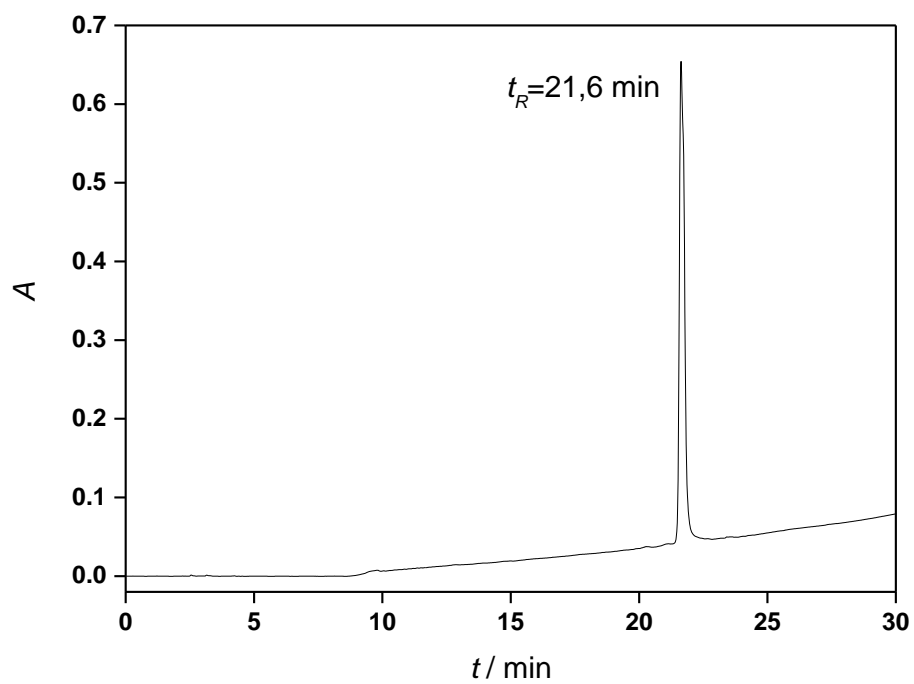
A molekula várt tömege:  $[M+H]^+$ : 3467,6 Da

mért tömege:  $[M+H]_1^+$ : 3466,2 Da (\*)

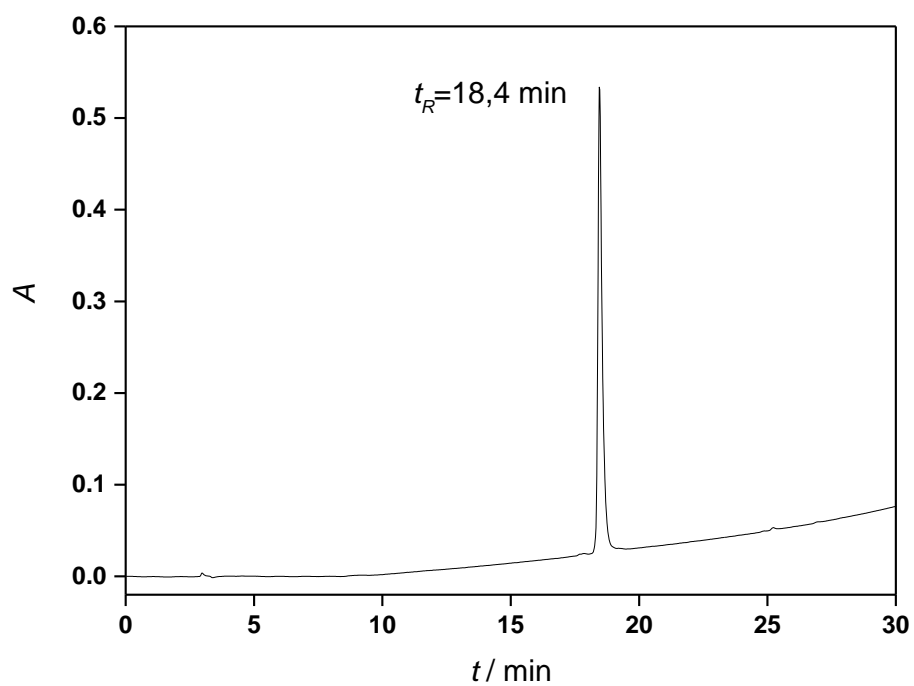
$[M+H]_2^+$ : 3337,8 Da (-129 Da) (^)

$[M+H]_3^+$ : 2755,3 Da (egy daunomicint tartalmazó konjugátum, -129 Da) (°)

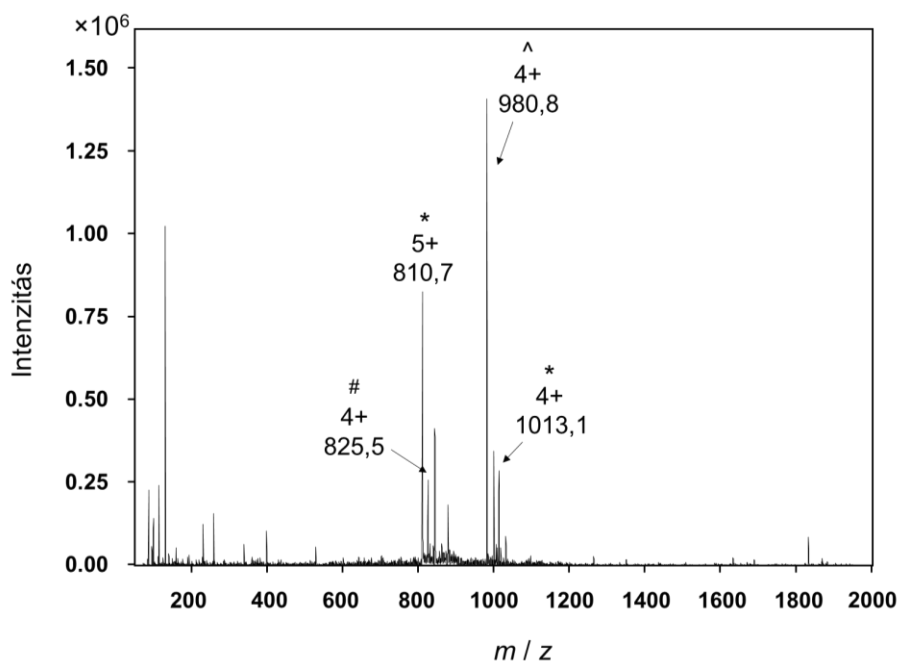
A tömegspektrométerben a mérés során lehasadt a daunomicin aminocukor része. A termék kis mennyiségben egy daunomicint tartalmazó konjugátumot is tartalmazott szennyezőként.



F22. ábra. A TA008 konjugátum analitikai HPLC-vel, Nucleosil 100-5 C18 oszlopon felvett kromatogramja



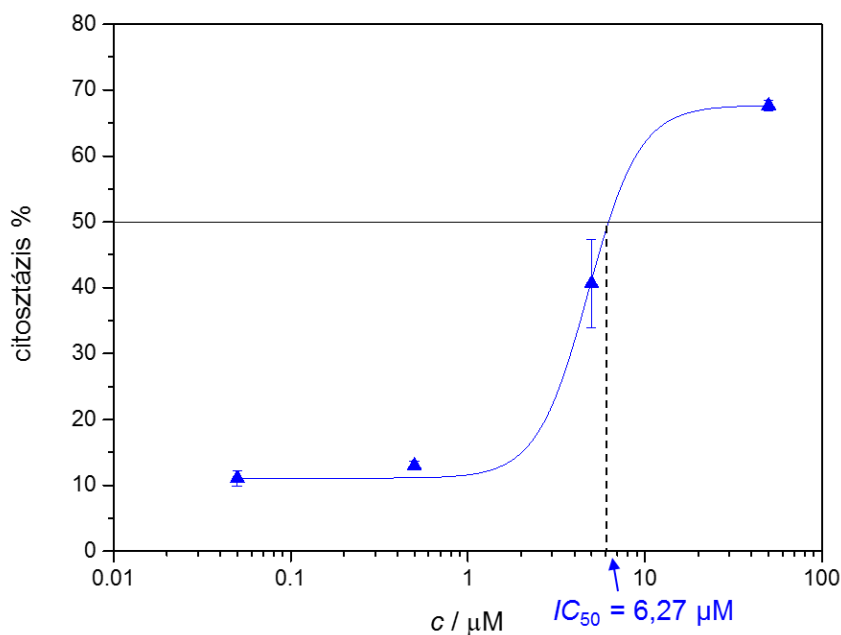
F23. ábra. A TA008 konjugátum analitikai HPLC-vel, Vydac 214TP C4 oszlopon felvett kromatogramja



F24. ábra. A TA008 konjugátum MS spektruma

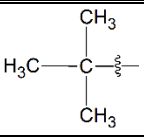
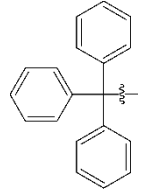
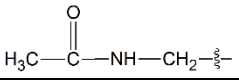
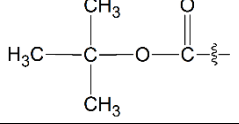
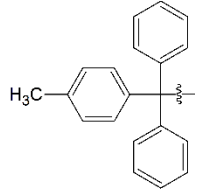
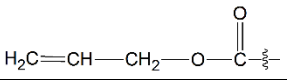
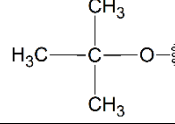
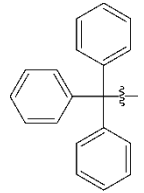
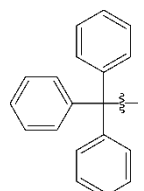
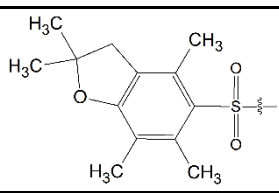
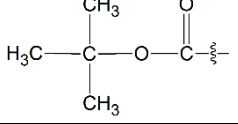
A molekula várt tömege:  $[M+H]^+$ : 4050,1 Da  
 mért tömege:  $[M+H]^+_1$ : 4049,5 Da (\*)  
 $[M+H]^+_2$ : 3920,2 Da (-129 Da) (^)  
 $[M+H]^+_3$ : 3299,0 Da (két daunomicint tartalmazó konjugátum,  
 -147 Da) (#)

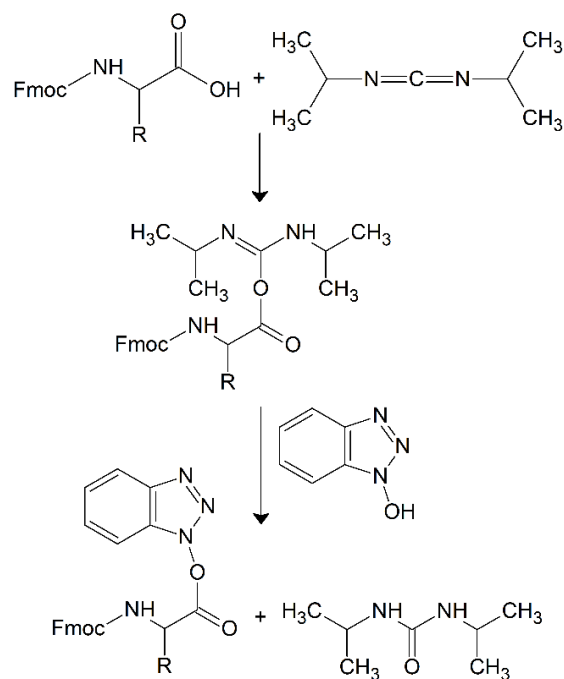
A tömegspektrométerben a mérés során lehasadt a daunomicin aminocukor része. A termék kis mennyiségben két daunomicint tartalmazó konjugátumot és egyéb szennyzőket is tartalmazott.



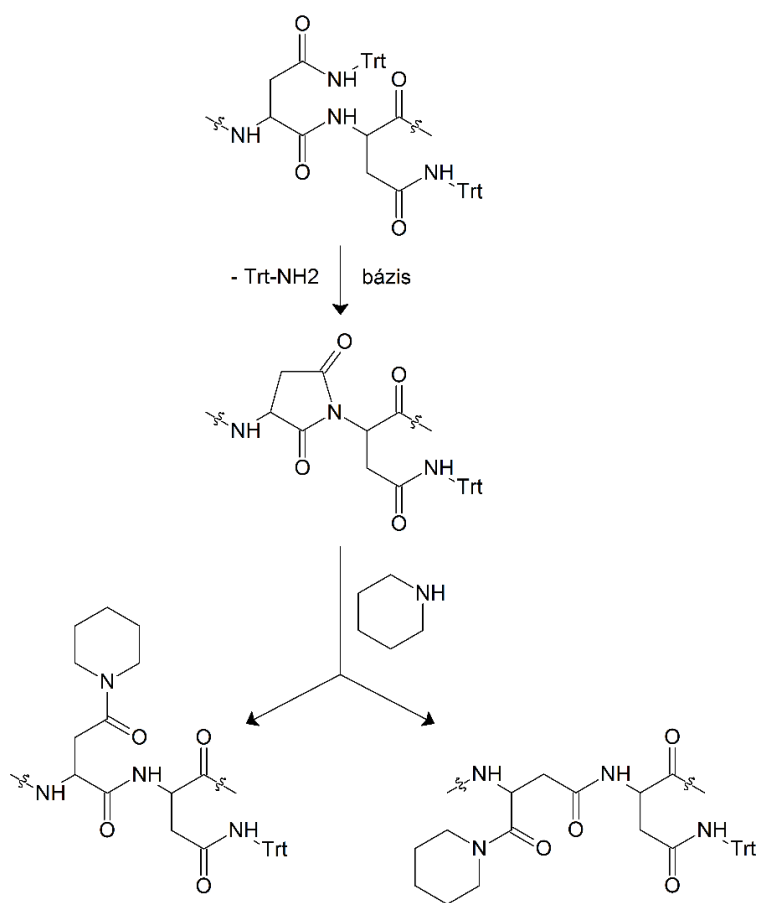
F25. ábra. A TA003 konjugátum citosztatikus hatása a koncentráció függvényében, a pontokra illesztett szigmoid görbe és az ez alapján meghatározott  $IC_{50}$  érték

F10. táblázat. Az Fmoc/tBu stratégiában általánosan használt oldallánc-védőcsoportok

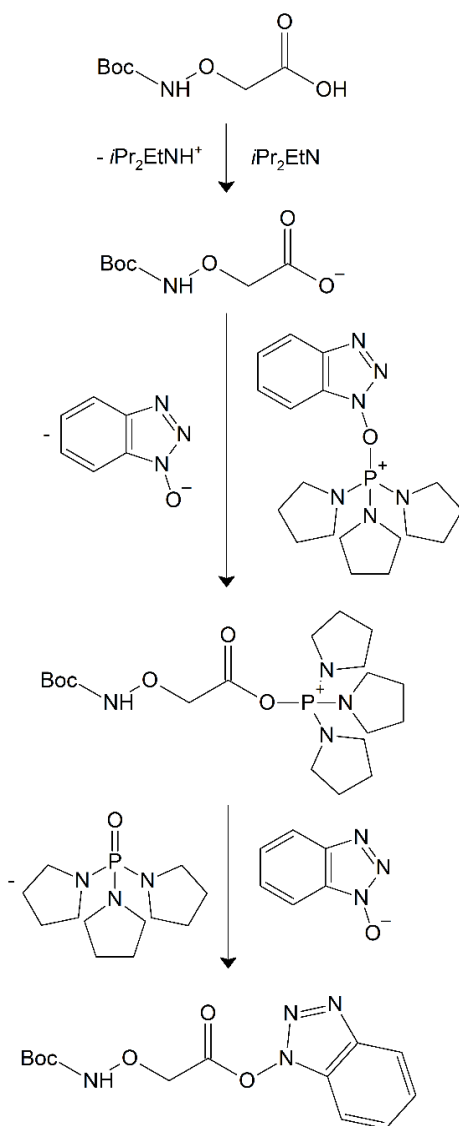
Funkciós csoportok	Aminosav	Védőcsoport	
-OH	szerin, treonin, tirozin		<i>tert</i> -butil ( <i>t</i> Bu)
-SH	cisztein		tritol (Trt)
			acetamidometil (Acm)
- <sup>ε</sup> NH <sub>2</sub>	lizin		<i>tert</i> -butiloxikarbonil (Boc)
			4-metiltritol (Mtt)
			alliloxikarbonil (Alloc)
- <sup>ω</sup> COOH	aszparaginsav, glutaminsav		<i>tert</i> -butil-észter ( <i>Ot</i> Bu)
- <sup>ω</sup> CONH <sub>2</sub>	aszparagin, glutamin		tritol (Trt)
-imidazol	hisztidin		tritol (Trt)
-guanidino	arginin		2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurán-6-szulfonil (Pbf)
-indol	triptofán		<i>tert</i> -butiloxikarbonil (Boc)



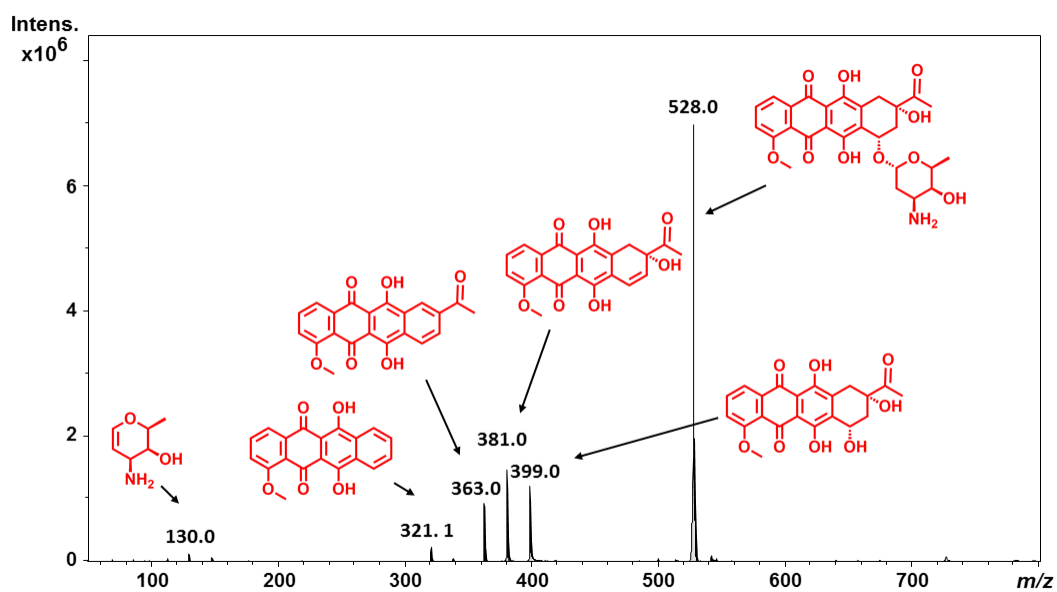
F26. ábra. *In situ* aktívészter-képzés DIC és HOBt reagensek segítségével



F27. ábra. Szukcinimid-gyűrűzáródási reakció, majd  $\alpha$ - és  $\beta$ -piperidid képződés piperidin jelenlétében



F28. ábra. *In situ* aktívészter-képzés PyBOP és DIEA reagensek segítségével



F29. ábra. A daunomicin fragmentálódása az ESI-MS mérési körülményei között