

**Peptid-hatóanyag konjugátumok stabilitásának vizsgálata
lizoszmális közegben, LC-MS módszerrel**

Szakdolgozat

Vegyész Mesterszak

KALMÁR DOROTTYA

Témavezető: Dr. Schlosser Gitta, egyetemi adjunktus

Dr. Szabó Ildikó, tudományos munkatárs

Analitikai Kémiai Tanszék

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest

Természettudományi Kar

Kémiai Intézet

A védés helye: Analitikai Kémiai Tanszék

2019

Tartalomjegyzék

1.) Rövidítések.....	3
2.) Bevezetés.....	5
3.) Irodalmi áttekintés.....	6
3.1.) Célzott tumorterápia.....	6
3.1.1.) Irányító peptidek.....	8
3.1.2.) Linkerek, kötések.....	11
3.1.3.) Hatóanyag.....	17
3.2.) α -Melanocita stimuláló hormon a melanoma terápiában és diagnosztikában	18
3.2.1.) α -Melanocita stimuláló hormon	18
3.2.2.) Melanoma	19
3.2.3.) MC1R, mint célreceptor	19
3.2.4.) α -MSH analógok	20
3.3.) Tömegspektrometria	22
3.3.1.) Elektrospray ionizáció és HPLC-MS kapcsolás.....	22
3.3.2.) Tandem tömegspektrometria	23
3.3.3.) Orbitrap analizátor.....	24
3.3.4.) Proteomika, fehérje azonosítás	26
4.) Célkitűzés.....	29
5.) Kísérleti munka	30
5.1.) Anyagok és készülékek.....	30
5.2.) Stabilitásvizsgálat lizoszóma preparátumban	30
5.3.) Lizoszóma preparátum proteomikai vizsgálata.....	32
6.) Eredmények.....	34
6.1.) A peptid-hatóanyag konjugátumok jellemzése.....	34
6.2.) A konjugátumok emésztése	37
6.2.1.) A konjugátumok stabilitása pufferben.....	38
6.2.2.) A konjugátumok lebomlásának vizsgálata lizoszóma preparátumban	39
6.3.) Lizoszóma preparátum fehérje összetétele	53
7.) Eredmények összefoglalása.....	55
8.) Szakdolgozat összefoglaló	56
9.) Summary.....	57
10.) Köszönetnyilvánítás	58
11.) Irodalomjegyzék.....	59
12.) Függelék.....	62

1.) Rövidítések

1. táblázat: A dolgozatban használt rövidítések.

Rövidítés	Magyar megfelelő	Angol megfelelő
ACTH	adenokortikotróp hormon	adrenocorticotropic hormone
ADC	antitest-hatóanyag konjugátum	antibody-drug conjugate
Ala, A	alanin	alanine
α -MSH	α -melanocita stimuláló hormon	α -melanocyte-stimulating hormone
Aoa	aminooxiacetsav	aminooxyacetic acid
Arg, R	arginin	arginine
Asn, N	aszparagin	asparagine
Asp, D	aszparaginsav	aspartic acid
BN	bombezin	bombesin
Cys, C	cisztein	cysteine
Cys, C	cisztein	cysteine
Dau	daunomicin	daunomycin
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraacetát	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
Dox	doxorubicin	doxorubicin
ECM	extracelluláris mátrix	extracellular matrix
ESI	elektrospray ionizáció	electrospray ionization
EGF	epidermális növekedési faktor	epidermal growth factor
FACS	áramlási citometria	fluorescence-activated cell sorting
FDA	Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal (USA)	Food and Drug Administration
¹⁸ FDG-PET	¹⁸ fluor-2-dezoxi-D-glükóz pozitron emissziós tomográfia	¹⁸ fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography
FTICR-MS	Fourier-transzformációs ionciklotron rezonancia-tömegspektrometria	Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
Gln, Q	glutamin	glutamine
Glu, E	glutaminsav	glutamic acid
Gly, G	glicin	glycine
GnRH	gonadotropin releasing hormon	gonadotropin-releasing hormone
His, H	hisztidin	histidine
HPLC-MS	nagynyomású folyadékkromatográffal kapcsolt tömegpektrométer	high-performance liquid chromatography-mass spectrometry
IC ₅₀	egy mért paraméter 50%-os gátlásához szükséges hatóanyag koncentráció (mol·dm ⁻³)	half maximal inhibitory concentration (mol·dm ⁻³)

Rövidítés	Magyar megfelelő	Angol megfelelő
Ile, I	izoleucin	isoleucine
Leu, L	leucin	leucine
LRP-1	kis sűrűségű lipoprotein receptorhoz köthető fehérje 1 receptor	low density lipoprotein receptor-related protein 1
Lys, K	lizin	lysine
MALDI	mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció	matrix assisted laser desorption ionization
MC1R	melanokortin receptor 1	melanocortin receptor 1
Met, M	metionin	methionine
MS/MS	tandem tömegspektrometria	tandem mass spectrometry
MT-1	Melanotan I	Melanotan I
MT-2	Melanotan II	Melanotan II
NGR	NGR szekvenciát tartalmazó peptid	NGR peptide motif
Nle	norleucin	norleucine
NPY	neuropeptid Y	neuropeptide Y
NT	neurotenszin	neurotensin
PDC	peptid-hatóanyag konjugátum	peptide-drug conjugate
Phe, F	fenilalanin	phenylalanine
Pro, P	prolin	proline
RGD	RGD szekvenciát tartalmazó peptid	RGD peptide motif
Ser, S	szerin	serine
SPECT	egy foton emissziós komputer tomográfia	single photon emission computed tomography
SST	szomatosztatin	somatostatin
TFA	trifloreccsav	trifluoroacetic acid
Thr, T	treonin	threonine
Trp, W	triptofán	tryptophan
Tyr, Y	tirozin	tyrosine
UPLC	ultra nagy nyomású folyadékkromatográfia	ultra high performance liquid chromatography
Val, V	valin	valine
VIP	vazoaktív intesztinális peptid	vasoactive intestinal peptide

2.) Bevezetés

A világon a vezető halálokok között a rák szerepel a második helyen, közvetlenül a szív -és érrendszeri megbetegedések után. A rákos megbetegedések száma évről-évre emelkedik: míg 2008-ban 12 millió regisztrált esetből 7 millió végződött halállal [1], 2018-ban ez a szám a WHO jelentése alapján már 9,6 millió volt [2]. Egyes becslések szerint az új megbetegedések száma 2030-ra több, mint 70%-al fog emelkedni [1]. Az adatok alapján világos, hogy nagy szükség van az újabb és hatékonyabb diagnosztikai és terápiás szerek kifejlesztésére. Az egyik komolyan kutatott irány a célzott tumorterápia -és diagnosztika. Ezen módszerek azon alapulnak, hogy a rákos sejtek mikrokönyezete, a bennük zajló molekuláris folyamatok bizonyos szempontból eltérnek az egészséges sejtektől. Például egyes ráktípusok fokozottabban expresszálnak bizonyos sejtfelszíni molekulákat, ami lehetőséget ad a rákos sejt specifikus megcélzására. A célzó molekulára a rákos sejtet pusztító terápiás szert, vagy a metasztázisok kimutatása céljából diagnosztikai szert kapcsolnak. Előnyös tulajdonságaik miatt igen elterjedt a peptidok, mint irányító molekulák alkalmazása. Az immár több évtizedes fejlesztések eredményeképp számos peptid-alapú célzott tumorterápiás rendszer érte el a klinikai vizsgálatokat. Közülük a Fázis III vizsgálatokat elérő, méhnyálkahártya rákellenes Zoptarelin DOX (AN152, AEterna Zentaris, Quebec, Kanada), és a vér-agy gáton átjutó ANG1005 (Angiochem Inc., Montreal, Kanada) jól példázza a célzott tumorterápia potenciálját.

3.) Irodalmi áttekintés

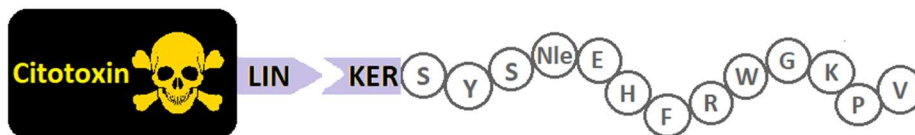
3.1.) Célzott tumorterápia

A klinikai gyakorlatban jelenleg a tumor sebészi kimetszését, kemoterápiát és sugárkezelést alkalmaznak. A kemoterápiás hatóanyagok lényegükben főként citotoxikusak, azonban szelektivitás hiányában a rákos sejtek mellett az egészséges szöveteket is pusztítják, súlyos mellékhatásokat okozva. Emellett sok kemoterápiás hatóanyag vízoldhatósága és metabolikus stabilitása is alacsony. A gemcitabin (2'-dezoxi-2',2'-difluor-citidin) esete jól példázta, hogy milyen komoly problémákkal küzd a konvencionális kemoterápia. Hosszútávú alkalmazás után a gemcitabin citotoxikusabbá válik az egészséges sejtekre, mint a rákosakra. Ennek oka, hogy a rákos sejtek gyors és szabályozatlan mutációk által képesek csökkenteni a gemcitabin felvételéhez szükséges sejtfelszíni nukleozid receptoraik számát, így rezisztenssé válnak a hatóanyaggal szemben [2].

Az aspecifikus, egész testben szétterjedő kemoterápiás szerek hátrányait látva, a kutatók figyelme már több évtizede a célzott tumorterápia felé fordult. Újabb citotoxikus szerek kutatása helyett, a meglévő és ismert hatásúkat igyekeznek irányított tumorterápiás rendszerekbe beépíteni. Ezen rendszerek felépítése leírható egy általános sémával. A kiválasztott hatóanyagot megfelelő linkerrel keresztül egy hordozóra kapcsolják, amihez egy irányító molekulát is kötnek. Ily módon az irányító molekula szelektíven a rákos sejtekhez szállítja a citotoxikus szert.

A tumorok szelektív megcélzása azáltal lehetséges, hogy a mikrokörnyezetük néhány szempontból eltér az egészséges sejtektől. Egy alapvető és általános különbség, hogy a mitokondriális aerob elektrontranszportlánc helyett az anaerob glikolízis a fő energiatermelő folyamatuk, melyben a glükózt laktáttá bontják le. Ennek következménye, hogy a tumor környezete 0,5-1,0 pH egységgel savasabb. A fokozott glikolízis okozta megemelkedett glükóz felvételt a ^{18}F -dezoxiglükóz pozitron emissziós tomográfia (^{18}F FDG-PET) használja ki. A célzott daganatterápiában szintén jól kihasználható tulajdonsága a rákos sejteknek, hogy egyes esetekben bizonyos sejtfelszíni receptorokat lényegesen nagyobb mennyiségben expresszálnak, mint a normál sejtek. Ilyen receptorok például a szomatosztatin receptor [9], a gonadotropin releasing hormon (GnRH) receptor [8], és a humán epidermális növekedési faktor (EGF) receptor [2].

A hatóanyag irányított szállítására különböző stratégiákat dolgoztak ki. 1) A készítményt olyan pro formában adják a betegeknek, ami a vérkeringésben stabil és nem citotoxikus, majd a tumor mikro környezetében, pl. a savasabb pH, vagy egy membránkötött enzim hatására felszabadul az aktív hatóanyag [3]. 2) A hatóanyagot hordozóba zárják (nanorészecske, kalixarén, ciklodextrin), melyhez linkerrel kapcsolják az irányító molekulát (peptid, ellenanyag, kismolekula, aptamer) [4], vagy 3) magát a hatóanyagot kapcsolják kovalensen, közvetlenül vagy linkeren keresztül az irányító molekulához. Az utóbbi összeállításba tartoznak az úgynevezett peptid-hatóanyag konjugátumok (PDC) is (1. ábra), ahol az irányító peptid egyben hordozóként is funkcionál. Fő feladata, hogy a citotoxikus szert szelektíven a tumoros sejten lévő receptorokhoz szállítsa.



1. ábra: Egy PDC felépítése: hatóanyag, linker, irányító peptid

Szerencsére már több száz olyan peptidet ismernek, amelyek különböző típusú rákos sejteken túlexpresszált receptorhoz kötődnek. Ezek egyrésze természetes hormonok analógja. Sokféle potenciálisan bioaktív peptidet találtak és azonosítottak továbbá Fág bemutatás módszerrel [5, 6]. A peptid-hatóanyag konjugátumok célzott tumorterápiában való alkalmazása sok szempontból előnyös. A peptidek viszonylag gyorsan, nagy mennyiségben előállíthatók szilárd fázisú peptidszintézissel. Általában kémiai viszonylag stabilak, jól tolerálják a módosítás és konjugáció közben alkalmazott erélyesebb körülményeket is [7]. A receptorhoz kötődő peptidszekvencia kiegészíthető a kötődést nem zavaró, de az egész konjugátum fizikai-kémiai tulajdonságait pozitívan befolyásoló aminosavakkal, csoportokkal. Ezáltal növelhető a hatóanyag, illetve a konjugátumok víz oldhatósága, vérkeringésben mutatott stabilitása, változtatható a töltöttsége, ellátható olyan funkciós csoportokkal, melyekhez hatékonyan lehet kapcsolni a linkert vagy amelyek a vesén keresztüli kiürülését késleltetik, a vesében való dúsulását csökkentik. Emellett fontos, hogy a peptid-hatóanyag konjugátumok kis méretüknél fogva általában nem váltanak ki immunreakciót [7]. Összességében egy PDC farmakokinetikai tulajdonságai sokkal egyszerűbben javíthatók, tervezhetők, mint egy szabad hatóanyagé. A konjugátum irányító peptidjének módosítására több lehetőség is kínálkozik, miközben a hatóanyag változatlan marad, ezért nem kell a biológiai aktivitásának elvesztésétől tartani.

3.1.1.) Irányító peptidek

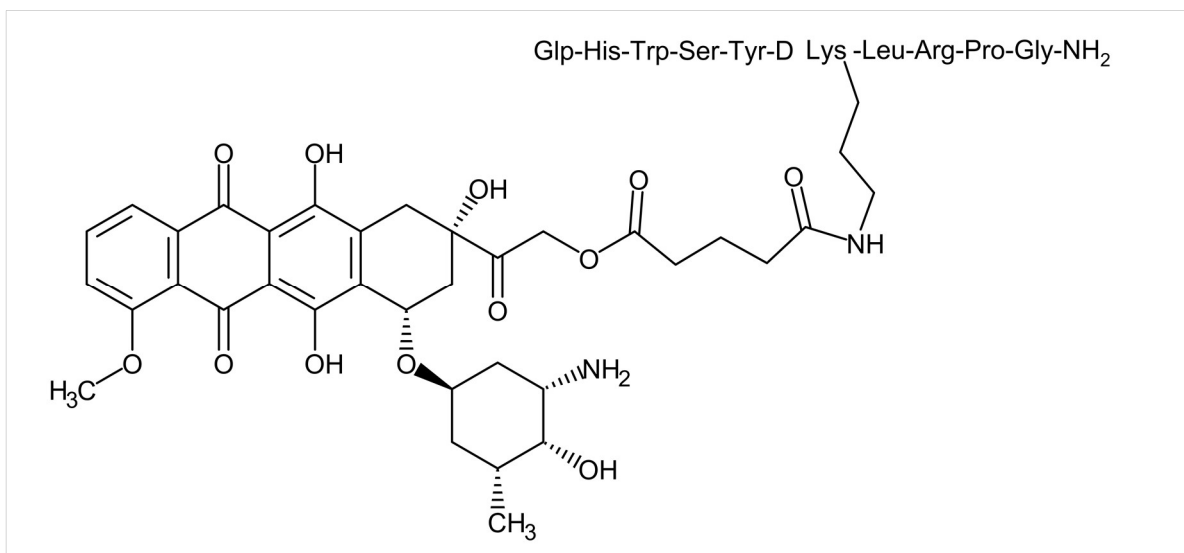
Egy peptid-hatóanyag konjugátumok terápiás hatását a citotoxikus ágens hatékonysága, és a peptid irányító tulajdonsága együttesen határozza meg. Egy potenciális irányító peptidnek az alábbi feltételeknek kell megfelelnie: 1) Nagy affinitással és 2) szelektíven kötődjön olyan 3) sejtfelszíni receptorhoz, 4) melyből a rákos sejtek legalább háromszor annyit fejeznek ki, mint az egészségesek. Tehát a receptor-peptid komplex disszociációs állandója ($K_d / \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) a nanomólos-szubnanomólos tartományban legyen, és ez ne nőjön a citotoxikus szer konjugációja után se. Gyakran nehézséget okoz, hogy a megcélzott receptor egy több, hasonló tagból álló receptorcsalád egyik altípusa. Ezért a peptid tervezésekor szem előtt kell tartani, hogy az minél kisebb affinitással kötődjön az olyan rokon receptor altípusokhoz, amelyek egészséges sejteken fejeződnek ki nagy számban. Ahhoz, hogy a PDC kifejtse a hatását, nem elég, hogy a sejtfelszíni receptor megkösse, hanem a sejtnék receptor közvetített endocitózissal fel is kell vennie. Erre egyrészt nem minden receptor alkalmas, másrészt meg kell arról is győződni, hogy a receptor közvetített endocitózis nemcsak a szabad peptid, hanem a konjugátum esetén is működik. 5) A peptidnek praktikusán olyan aminosav(ak)at is tartalmaznia kell, melyhez hatékonyan lehet konjugálni a linkert: ilyenek a lizin (Lys), a cisztein (Cys) és a glutaminsav (Glu), valamint a peptid N-terminálisa. 6) Az irányító tulajdonság megőrzése érdekében a vérkeringésben lévő enzimek ne hasítsák el a peptidet. Ennek érdekében gyakran alkalmazzák a peptidek ciklizálását, illetve nem természetes és D-konfigurációjú aminosavak beépítését. A ciklizálás hatására általában növelhető a receptor kötés affinitása, szelektivitása, és késleltethető a PDC szerkezetből való kiürülése.

A 2. táblázatban felsoroltam néhány potenciális irányító peptidet. Ezek természetes hormonok, azok származékai vagy olyan peptid ligandumok, melyekről ismert, hogy receptoraik túlexpresszálódnak bizonyos ráktípusokon.

2. táblázat: Célzott daganterápiában irányító peptidként alkalmazható peptidek, és az általuk megcélzott rák típusok

Peptid család	Peptid név -és szekvencia	Receptor	Fokozottan expresszáló ráktípus	Hivatkozás
EGF	GE11 YHTYGYTPQNV I	ErbB1	számos tumor típus	[2]
GnRH-III	pEHWSHDWKPG-NH ₂	GnRHR	méh-, prosztata-, tüdő- és mellrák	[8]
RGD	CDCRGDCFC, c[RGDFK]	Integrin $\alpha\beta3$	angiogenetikus ér, glioblasztóma, melanoma, prosztata- és mellrák	[2, 8]
SST	Octreotide Fc[CFWKTC]T	SSTR2/5	hasnyálmirigy-, prosztata- és tüdőrák, agyalapimirigy daganat, oszteosarkóma	[9]
Angiopep-2	TFFYGGSRGKRNNFKTEEY	LRP-1	agyrák	[10]
α -MSH	NAPamid Ac-NleDHF ^R WGK-NH ₂	MC1R	melanoma	[8]
Bombesin (BN)	[D-Tyr ⁶ , β -Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]-BN ₍₆₋₁₄₎ YQWAV β HFX-NH ₂	BBR	tüdő-, prosztata-, mell-, vastagbél- és hasnyálmirigy rák	[11]
Vasoactive intestinal peptide (VIP)	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKK YLNSILN-NH ₂	VIPR	vastagbél-, mellrák, endokrin tumorok	[12]
Neurotensin (NT)	NT ₍₈₋₁₃₎ RRPYIL	NT1R	hasnyálmirigy-, vastagbél-, mell-, tüdő-, prosztatarák	[13]
Neuropeptid Y (NPY)	[Phe ₇ ,Pro ₃₄]-NPY YPSKPDFPGEDAPAEDLARYYSA LRHYINLITRPRY-NH ₂	hY1R	mellrák, Ewing szarkóma	[14]
NGR	c[CH ₂ -CO-KNGRC]-NH ₂	CD13	mellrák, angiogenetikus ér	[15]

pE = piroglutaminsav; c = ciklo; F = D-fenilalanin; W = D-triptofán; Ac = acetil; Y = D-tirozin; β = β -alanin; X = L-norleucin, a természetes aminosavak betű kódja a rövidítések fejezetben (1. fejezet) található

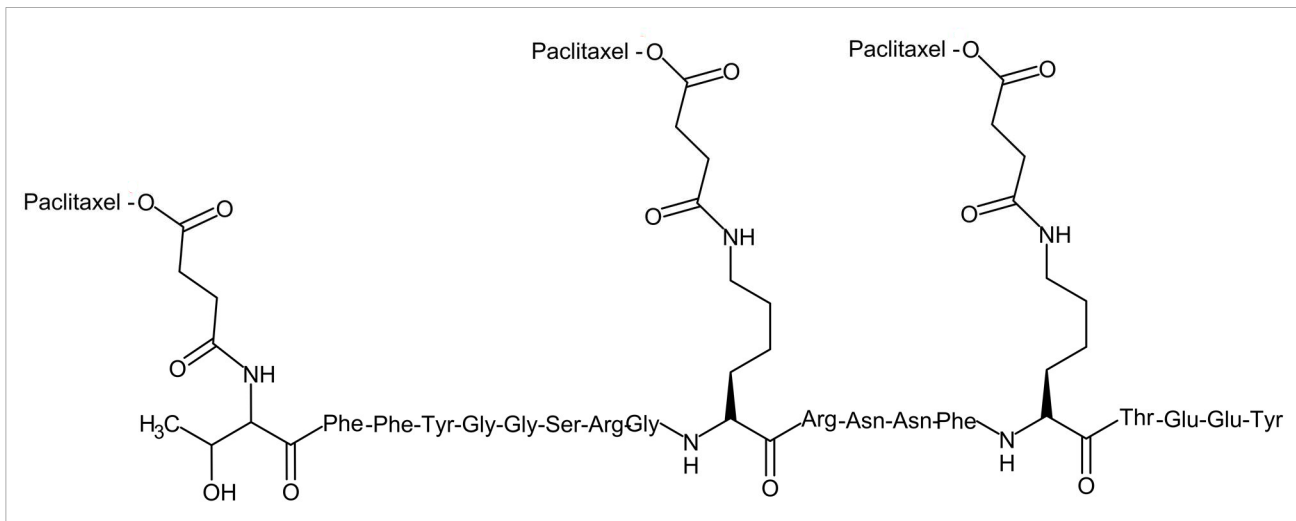


2. ábra: Az AN152 egy potenciálisan méhnyálkahártya rákellenes PDC, ami már elérte a Fázis III vizsgálatokat.

Jelenleg még egyik peptid-hatóanyag konjugátum se jutott el az engedélyezésig, azonban számos klinikai tesztelés alatt áll [16], és közülük kettő (AN152 és ANG1005) már elérte a Fázis III klinikai vizsgálatokat [2]. A Zopectarelin DOX (AN152, AETerna Zentaris, Quebec, Kanada) egy doxorubicinből (Dox) és egy GnRH-receptor agonista [Lys⁶]-GnRH-I peptidből áll (2. ábra). A molekulában a doxorubicint a lizin ε-amino-csoportjához észterkötéssel kapcsolták, egy szukcinil-csoporton keresztül (2. ábra). Fázis II vizsgálatokban 44 GnRH-receptor pozitív méhnyálkahártya rákban szenvedő nő bevonásával azt tapasztalták, hogy az AN152 fokozottabb tumorellenes aktivitással rendelkezik, ugyanakkor kevésbé toxikus, mint a Dox [17].

Az ANG1005 (Angiochem Inc., Montreal, Kanada) nevű konjugátum különlegessége, hogy a kismolekulák 98%-ával (köztük a paclitaxellel) ellentétben képes átjutni a vér-agy gáton, így alkalmas lehet rosszindulatú agyi daganatok kezelésére. Az ANG1005-ben egy angiopep-2 irányító peptidre három paclitaxel molekulát kapcsolnak, észterkötéssel, szukcinil-csoporton keresztül (3. ábra). A konjugációt az angiopep-2 amino-terminálisán és két lizin ε-amino-csoportján végzik. Az angiopep-2 receptor közvetített transzcitózissal jut keresztül a vér-agy gáton, miután kötődött a vér-agy gátat képző agyi kapillaris endotél sejtek felszínén található LRP-1-hez (kis sűrűségű lipoprotein receptorhoz köthető fehérje 1 receptor) [2]. A Fázis I vizsgálatokat 2007-ben végezték, 63 előrehaladott vagy kiújuló rosszindulatú gliómás beteg bevonásával. A betegek a kezelést jól tolerálták, és kimutatták, hogy az ANG1005 valóban átjut a vér-agy gáton és tumorellenes hatást fejt ki agyi áttét és előrehaladott szolid tumor esetén is [18]. 2017-ben már befejeződtek a Fázis II vizsgálatok, azonban az eredményeket

még nem publikálták. Ugyanakkor bejelentették, hogy kedvező eredményeket értek el, és hamarosan Fázis III vizsgálatokat fognak indítani [48].



3. ábra: ANG1005 PDC képes átjutni a vér-agy gáton, ezért potenciálisan alkalmas lehet rosszindulatú agyi daganatok kezelésére. Már elérte a Fázis III vizsgálatokat

3.1.2.) Linkerek, kötések

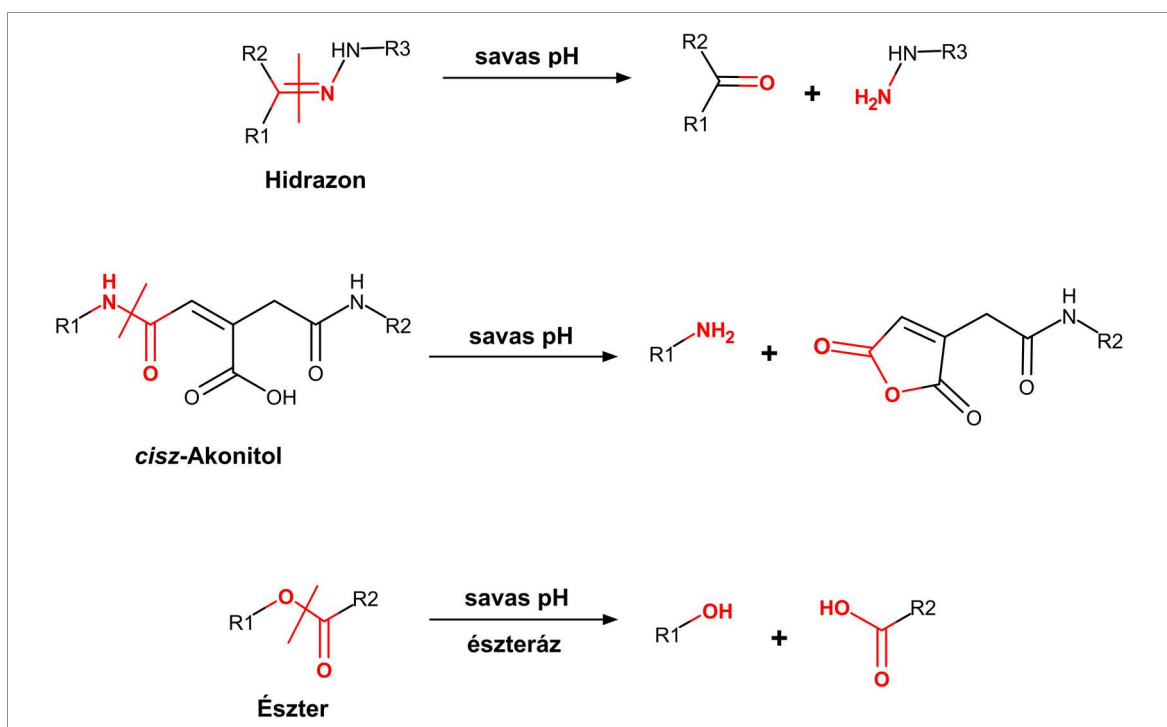
Egy peptid-hatóanyag konjugátum tervezésénél komoly hangsúlyt kap a megfelelő linker kiválasztása. Az egyik legfontosabb szempont, hogy olyan kötésekkel kapcsolódjon a peptidhez és a hatóanyaghoz, amelyek 1) stabilak a véráramban, illetve a konjugátum szintézise és tisztítása közben is. 2) Emellett nem elengedhetetlen, de előnyös, ha a lizoszómában a szabad hatóanyag szabadul fel. Ellenkező esetben számolni kell azzal, hogy a linkerrel módosított gyógyszer molekula esetleg alacsonyabb biológiai aktivitással bír, mint a szabad forma. 4) Lényeges, hogy a linker minőségét és a konjugáció helyét helyesen válasszuk meg. Ne befolyásolja a peptid receptor kötő részének térszerkezetét, ugyanis ez csökkentheti a receptor kötés affinitását. 5) A peptiden és a citotoxikus szeren található funkciós-csoportok természetesen behatárolják a választható linkerek körét. A választásnál a fentiekén kívül szempont lehet még a linker hossza, hidrofilítása/hidrofobitása, bomlásának mechanizmusa is.

A receptor közvetített endocitózis után a PDC-k végül a sejt lizoszómájába kerülnek, a receptorok pedig gyakran nem kerülnek lebontásra, hanem visszajutnak a sejtfelületre. A lizoszóma egy savas (pH=4,5-6,0) és redukív közegű kompartment, melyben különböző enzimek bontják le az endocitózissal felvett anyagokat. Az enzimek között proteázok (pl. katepszinek), lipázok, észterázok, dezoxiribonukleázok, ribonukleázok, foszfatázok és különböző glikozidázok is előfordulnak. Az irányító peptidok lebontása szempontjából a

katepszinek családjába tartozó cisztein proteázok a legfontosabbak, melyek összkoncentrációja a lizoszómában 1 mM felett van. Legtöbbjük endopeptidáz, tehát a polipeptidlánc belsejében lévő amidkötéseket hasítják (Katepszin L, V, S, K, F, B, H), azonban vannak exopeptidázok is, amik az amino- (Katepszin H, C) vagy karboxil-terminálison (Katepszin B, X) dipeptid- (Katepszin B, X, C) vagy mono-peptid (Katepszin X, H) egységeket hasítanak le [19].

A lizoszómába került konjugátum a linker, illetve a konjugáció során kialakított kötéstípustól függő mechanizmus szerint bomlik el. „pH labilisak” például a hidrazon- és észterkötést, illetve a cisz-akonitollal kialakított amidkötést tartalmazó molekulák (4. ábra). A hatóanyag és a linker között ilyen kötést kialakítva, a szabad hatóanyag fog felszabadulni a lizoszómában.

A leggyakrabban alkalmazott „pH labilis” kötés a hidrazon, melyet hidrazin- és karbonil-

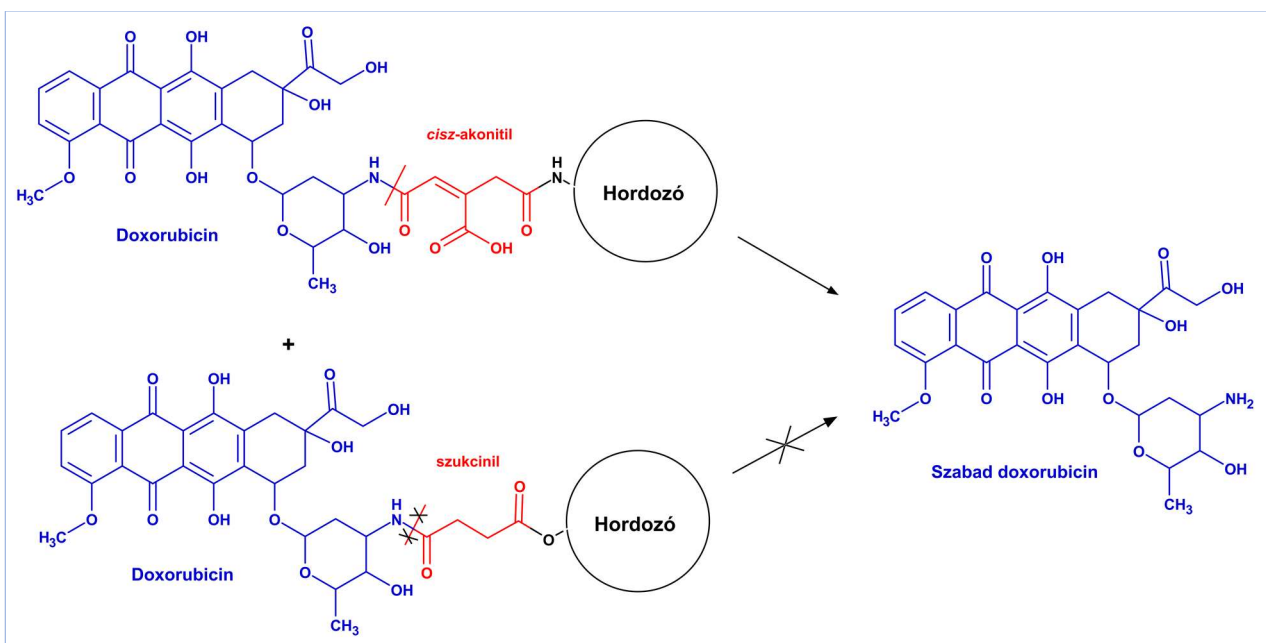


4. ábra: A lizoszómális savas pH hatására a konjugáció során kialakított hidrazon- és észterkötés, illetve a közbeékelte cisz-akonitil csoporttal kialakított amidkötés elhasad, és az ábrán látható bomlástermékek keletkeznek

csoport reakciójával lehet kialakítani a gyógyszer molekula és a linker között. Irodalmi adatok alapján pH=5-7 tartományban stabil [46], a lizoszómák pH=4,5-6,0 savas közegében viszont elbomlik, lehetővé téve a szabad hatóanyag felszabadulását. Ennek ellenére *Schlage és munkatársai* hidrazon kötést tartalmazó GnRH-III – daunomicin konjugátumok stabilitásvizsgálatánál kimutatható mennyiségben találtak szabad daunomicint a 7,4-es pH-jú pufferben, mindössze 2 óra inkubálás után [20]. Szintén a hidrazon kötés lassú bomlását tapasztalták *in vivo* körülmények között egy antitest-hatóanyag konjugátum (ADC)

(Mylotarg, anti-CD33-calicheamicin) vizsgálatánál [21]. Feltételezhetően emiatt a konjugátum vérkeringésben mért átlagos féleletideje mindössze 72 óra. Ugyanakkor egy másik, hidrazon kötést tartalmazó ADC (inotuzumab ozogamicin - N-acetyl-c-calicheamicin) lényegesen nagyobb szérumban- és plazmabeli stabilitással bír: a hidrolízis sebessége napi 1,5-2% volt, 4 napon keresztül vizsgálva [21]. *Hamann és munkatársai* a hidrazon kötéshez közeli pozícióban szubsztituált konjugátumokat állítottak elő, melyek közül volt, amely pH=7,4 pufferben 24 óra után is teljes stabilitást mutatott [22]. Ezek az esetek jól mutatják, hogy a hidrazon kötés keringésbeli stabilitása konjugátumként is eltérhet. Ennek vizsgálata azért fontos, mert a szabad hatóanyag véráramban való lassú felszabadulása jelentős mellékhatásokat okozhat.

Zhu és munkatársai a szintén „pH labilis”, *cis*-akonitollal kialakított amidkötést vizsgálták. NGR szekvenciát tartalmazó polimert *cis*-akonitollal, illetve borostyánkőssavval funkcionáliszták, amelyhez amidkötéssel kapcsolták a doxorubicin amino-csoportját (5. ábra). A vérkeringésben mindkét PDC stabil volt, de a lizoszóma savas közegében csak a *cis*-akonitol hasadt le a doxorubicinról. Mivel a doxorubicin amino-csoportjának lényeges szerepe van a hatóanyag DNS-hez kötődésében, elengedhetetlen volt a szabad forma felszabadulása. Borostyánkőssavval kialakított amidkötés esetén ez nem történt meg, ezzel összhangban lényegesen csökkent a konjugátum biológiai aktivitása *in vitro*. Ugyanakkor a *cis*-akonitil csoport maradéktalanul lehasadt, ezért ígéretes linkernek bizonyult [23].



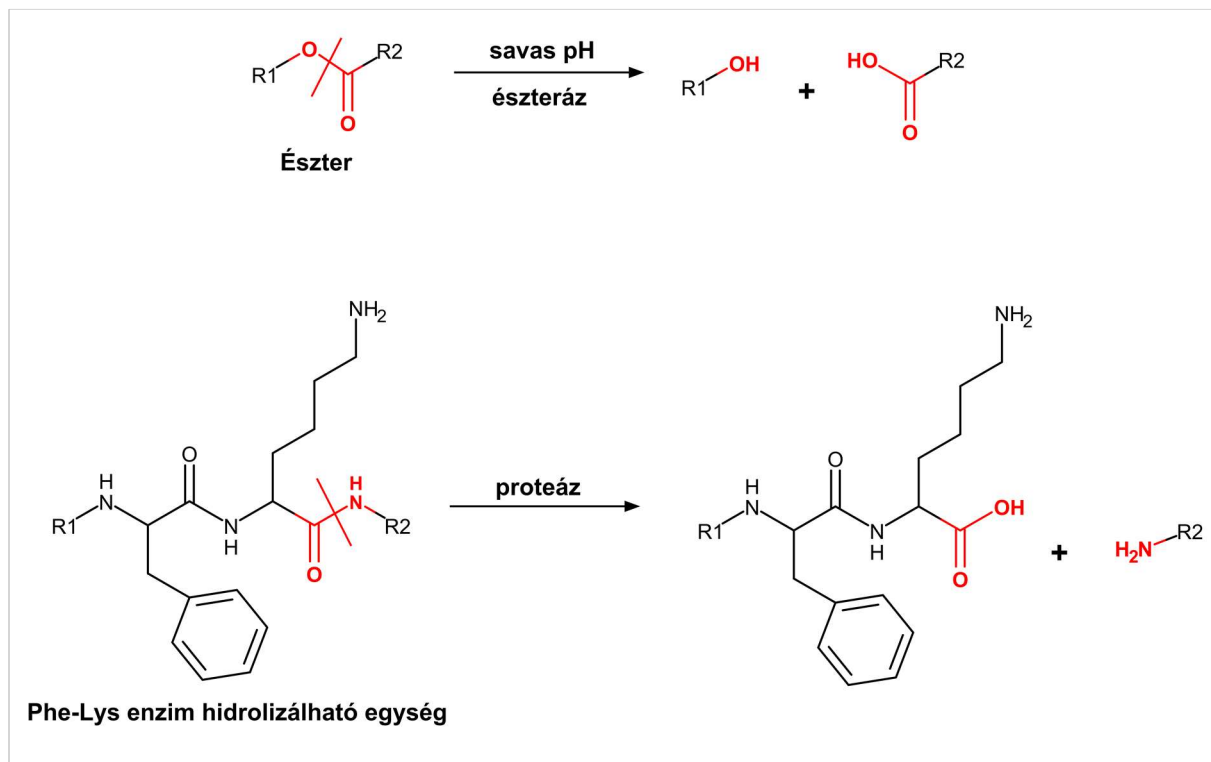
5. ábra: *Zhu és munkatársai* amidkötést alakítottak ki a linker és a citotoxin között. A lizoszomális savas közegben a *cis*-akonitollal kialakított amidkötés elhasadt, a borostyánkőssavval kialakított nem

A diszulfid-hidat tartalmazó konjugátumnak szintén az az előnye, hogy az oxidatív extracelluláris térben (vérkeringésben) relatíve stabilak, viszont a lizoszóma redukzív közegében elhasadnak, lehetővé téve a szabad citotoxin felszabadulását (6. ábra) [24]. A diszulfid-híd plazmabeli stabilitása növelhető a híddal szomszédos szén atomok metilálásával [25].



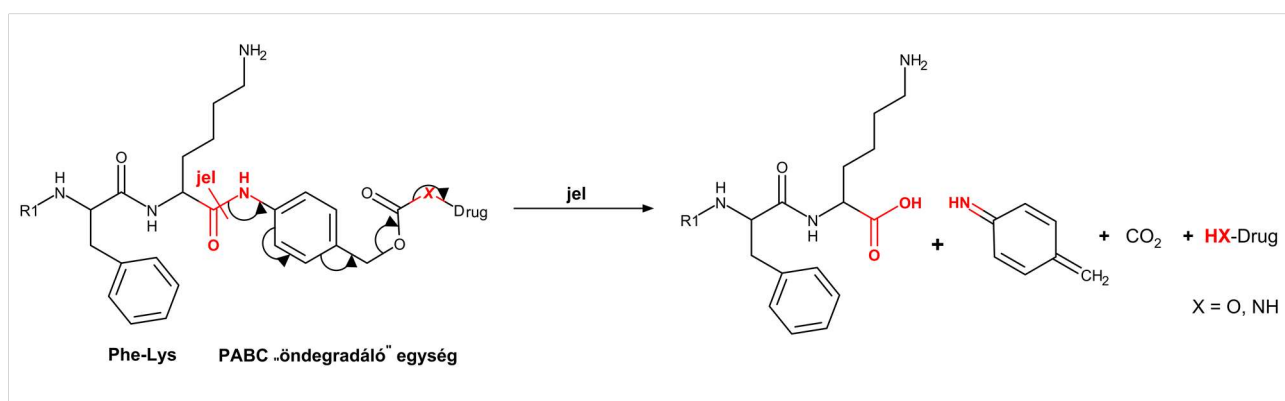
6. ábra: A lizoszómális redukzív közegben a konjugáció során kialakított diszulfid-híd elhasad

A linkerek egy másik csoportja enzim hidrolizálható észter- vagy amidkötéssel kapcsolódik a gyógyszer molekulához, amelyeket rendre észteráz vagy proteáz enzimek hasítanak (7. ábra). Jelenleg aktív kutatás folyik olyan peptid linkerek iránt, melyek peptidkötését a rákos sejten jelenlévő enzimek képesek hasítani. A katepszin B például egy olyan proteáz, mely fokozott mennyiségben expresszálódik invazív és metasztázisos rákos sejt típusokban [26]. A katepszin B többek között a Val-Cit (valin-citrulin) és a Phe-Lys (fenilalanin-lizin) szekvenciát ismeri fel specifikusan, és a dipeptid C-terminálisánál lévő amidkötést hasítja [2].



7. ábra: A lizoszómális enzimek hatására a konjugáció során kialakított észterkötés, illetve bizonyos oligopeptidekkel kialakított amidkötés elhasad

Nagy figyelmet kaptak az úgynevezett „önpusztító linkerek”, mint a *p*-amino-benziloxikarbonil (PABC), amely amino- és hidroxil-csoportot tartalmazó gyógyszer molekulához is kapcsolható, rendre karbamát- és karbonát kötéssel [8]. Adott jelre kaszkádszerű intramolekuláris elektronátrendeződés megy végbe, mely eredményeképp a PABC maradék nélkül lehasad a citotoxikus szerről. Komoly előnnyel járhat, ha az enzim-hidrolizálható egységet PABC közbeékelésével kapcsolják a hatóanyaghoz. Ilyenkor a PABC öndeградábilis távtartóként funkcionál közöttük, így az enzim-hidrolizálható egységet hasító enzim könnyebben, sztérikus gátlás nélkül hozzáfér a hasítandó kötéshez (8. ábra).

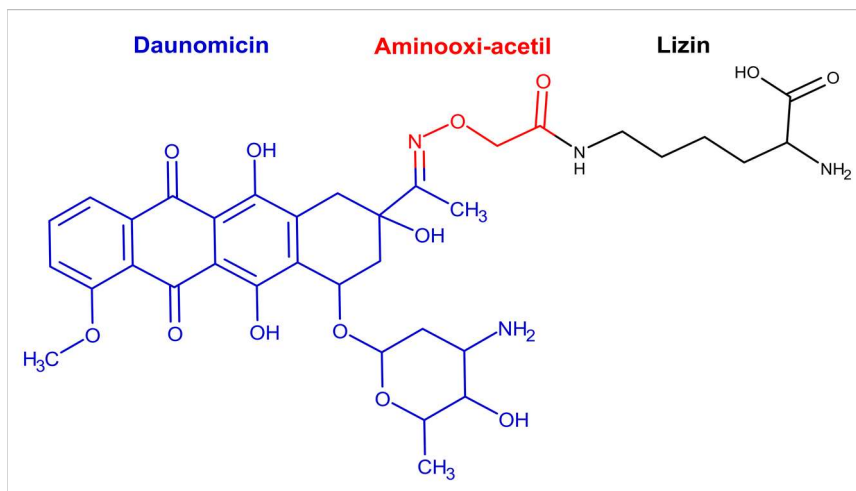


8. ábra: Phe-Lys dipeptidből és a PABC-ből álló linker a lizoszomális Katepszin B hatására degradálódik, és lehetővé teszi a szabad citotoxin felszabadulását

Dubowchik és munkatársai ilyen rendszerek humán plazmabeli stabilitását, valamint a citotoxin felszabadulásának gyorsaságát vizsgálták patkány lizoszomális enzimek hatására. Kiváló plazmabeli stabilitást tapasztaltak. Eredményeik szerint PABC távtartó nélkül, az enzim-hidrolizálható Phe-Lys dipeptid nem hasadt le a hatóanyagról. PABC közbeékelésével viszont 1 óra alá csökkent a konjugátumok féléletideje [27].

Schlage és munkatársai olyan GnRH-III – daunomicin (Dau) és GnRH-III – doxorubicin konjugátumokat állítottak elő, melyek a konjugáció során kialakított kötéstípusban tértek el egymástól. 1) Észterkötést alakítottak ki a doxorubicin hidroxil-csoportja és a glutarsavval funkcionalizált irányító peptid között. 2) Oxim kötéssel kapcsolták a daunomicin karbonil csoportját az aminooxiecetsavval (Aoa) funkcionalizált irányító peptidhez. 3) Phe-Lys enzimhidrolizálható dipeptid linkert PABC közbeiktatásával kapcsolták a doxorubicin amino-csoportjához. Vizsgálták az előállított konjugátumok patkány lizoszóma homogenátum jelenlétében mutatott lebomlását. Az észterkötést és PABC-t tartalmazó konjugátumból a várakozásnak megfelelően felszabadult a szabad daunomicin és doxorubicin, viszont az oxim kötés nem hasadt el. Utóbbi konjugátum esetében csak az irányító peptidet bontották le a

lizoszomális proteázok, így a legkisebb daunomicin tartalmú metabolit a *H-K(Aoa=Dau)-OH* lett (9. ábra).



9. ábra: A Schlage és munkatársai által vizsgált peptid-hatóanyag konjugátumban a daunomicin és az aminooxiacetsav, valamint az aminooxiacetsav és az irányító peptid között kialakított oxim- és amidkötés nem bomlik lizoszomális közegben. Ezért a szabad hatóanyag nem tud felszabadulni, a legkisebb daunomicin tartalmú metabolit az aminooxi-acetil-csoportot és a hozzá kapcsolódó egy aminosavat is tartalmazza

A konjugátumok *in vitro* citotoxikus hatását MCF-7 humán mellrák és HT-29 humán vastagbél karcinóma sejteken vizsgálták. Az észterkötést és PABC-t tartalmazó konjugátumok nagyjából 1 nagyságrenddel alacsonyabb IC₅₀ értékkel rendelkeztek, mint az oxim kötéses. Ez egyrészt azzal magyarázható, hogy a lizoszomális emésztés során keletkező *H-K(Aoa=Dau)-OH* metabolit gyengébben kötődik a DNS-hez [28], mint a szabad daunomicin. Másrészt, azzal, hogy az áramlási citometriai (FACS) mérések alapján az oxim kötéses konjugátum sejtbe-jutása rosszabb a többinél. (A szerzők arra is felhívták a figyelmet, hogy a FACS mérésnél kapott alacsonyabb fluoreszcencia intenzitást feltehetően a konjugátumból képződő metabolit (*H-K(Aoa=Dau)-OH*) alacsony fluoreszcencia intenzitása is eredményezi). Figyelembevétel az oxim kötés humán szérumban mutatott stabilitását is, alkalmas kötéstípusnak ígérkezik biokonjugátumok kialakítására. Az észterkötést tartalmazó konjugátumoknak kedvező ugyan a citotoxicitása, viszont fennáll annak a veszélye, hogy a humán vérkeringésben jelen lévő karboxilészterázok idő előtt elhasítják. A PABC-t tartalmazó konjugátumot kedvező citotoxicitása ellenére elvetették, mivel szintézise nem volt elég hatékony, illetve a kémiai, biológiai stabilitása, és hosszútávú eltarthatósága se volt megfelelő. [20].

Az oxim kötés egyszerű és kemoszelektív szintézise, valamint kiváló kémiai és plazmabeli stabilitása miatt Orbán és munkatársai [28] összehasonlítást végeztek két különböző, oxim

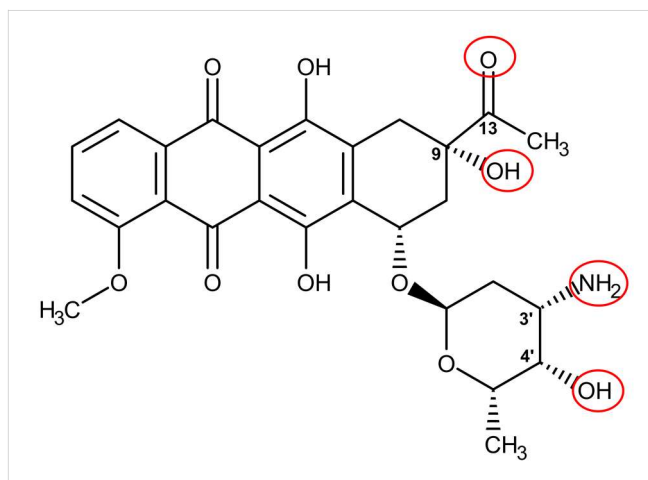
kötést tartalmazó GnRH-III – daunomicin konjugátum *in vitro* citotoxicitása között. Egyik esetben a daunomicinhez oxim kötéssel kapcsolt aminooxiecetsavat közvetlenül az irányító peptid lizinjének ϵ -amino-csoportjához kapcsolták. A másik esetben beékeltek egy Gly-Phe-Leu-Gly peptid linkert az aminooxiecetsav és a lizin közé. Mindkét konjugátum legalább 1 napig stabil volt humán szérumban. Patkány lizoszóma homogenátum jelenlétében a legkisebb méretű Dau tartalmú metabolit rendre a *H-Lys(Dau=Aoa)-OH* (9. ábra) és a *Dau=Aoa-Gly-OH* (10. ábra) voltak. Ezekkel a metabolitokkal DNS-kötődés vizsgálatokat is végeztek, hogy megtudják, hogy a szabad daunomicinhez képest mekkora affinitással kötődnek a DNS-hez. Eredményeik szerint a szabad hatóanyag mindkét metabolitnál nagyobb affinitással kötődött a DNS-hez, azonban az eltérés nem volt szignifikáns. Emellett a lizin és glicin tartalmú metabolitok (*H-Lys(Dau=Aoa)-OH* és *Dau=Aoa-Gly-OH*) DNS kötése szinte azonos affinitású volt [28].

3.1.3.) Hatóanyag

A biokonjugátum utolsó komponense a hatóanyag. A vele szemben támasztott legfontosabb elvárások: 1) rendelkezzen a konjugációhoz alkalmas funkciós csoporttal. 2) A konjugáció eredményeképp biológiai aktivitása ne csökkenjen. 3) Legyen elég toxikus a kezelendő ráktípusra nézve: a maximális biológiai aktivitás 50%-ához tartozó hatóanyag koncentráció ($IC_{50} / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) az alacsony nanomólos tartományba essen. A National Cancer Institute szerint jelenleg több, mint 250 FDA által engedélyezett tumorelleses gyógyszer molekula létezik rosszindulatú daganatok kezelésére [1]. Ilyenek például a gemcitabin, paclitaxel, calicheamicin, metotrexát, sunitinib, doxorubicin és daunomicin. Mikor a peptid-hatóanyag konjugátum tervezésekor ebből a hatalmas repertoárból választanak, figyelembe kell venni, hogy ezek különböző mechanizmus szerint fejtik ki tumorelleses hatásukat.

A daunomicin az antraciklin vázas antibiotikumok családjába tartozik, elterjedten alkalmazzák kemoterápiás szerként leukémiás betegek kezelésére. Az általános rossz közérzet, fájdalom és a szőrzet kihullása mellett más súlyos mellékhatásai az immunszupresszió, nefrotoxicitás és kardiotoxicitás. A daunomicin a DNS-be interkalálódva fejt ki citosztatikus hatását: gátolja a replikációt, és a transzkripciót, mivel stabil komplexet képez a topoizomeráz II-vel. Citotoxikus hatását a kinon típusú szabadgyökök keletkezésének fokozásával éri el. A daunomicin apoláris antraciklin váza a kétszálú helikális DNS egymás fölött lévő bázispárjai közé illeszkedik be. Az antraciklin váz síkjára nagyjából merőlegesen álló cukor egység a B-DNS nagy árkába ékelődik, amino-csoportja elektrosztatikus, hidroxil-

csoportja H-hidas kölcsönhatást létesít a DNS foszfát-csoportjaival [47]. A daunomicin négy olyan funkciós csoporttal rendelkezik, mellyel peptid-hatóanyag konjugátumhoz lehet kapcsolni. A C4' és C9 hidroxil csoportnál észter- vagy karbonát kötéssel, a C13 karbonil csoportnál oxim vagy hidrazon kötéssel, a C3' amino-csoportnál amino- vagy karbamát kötéssel (10. ábra).



10. ábra: A daunomicin szerkezete és a konjugációra alkalmas funkciós csoportjai

3.2.) α -Melanocita stimuláló hormon a melanoma terápiában és diagnosztikában

3.2.1.) α -Melanocita stimuláló hormon

Az α -melanocita stimuláló hormon (α -MSH) egy 13 aminosavból álló természetes peptid hormon (11. ábra). A proopiomelanokortin (POMC) peptid proteolitikus hasadásával keletkezik az ACTH (adenokortikotróp hormon), β -MSH és γ -MSH mellett. Az α -MSH biológiai hatását a sejtfelszíni melanokortin receptorokhoz (MCR) kötve fejt ki. A



11. ábra: A természetes α -MSH

melanokortin receptoroknak jelenleg 5 altípusát ismerik: MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R, melyek testszerte számos sejttípus felszínén megtalálható G fehérje kapcsolt receptorok. Az α -MSH legnagyobb affinitással a bőrsejteken (melanocitákon, immun-, endotél- és melanoma sejteken) található MC1R-hez [29], valamint az agyban, endokrin mirigyekben és gyomorban megtalálható MC5R-hez [42] kötődik. Szintén nagy affinitással köt a kizárólag agyban található MC4R-hez is [29,]. α -MSH hatására fokozódik a melanociták

eumelin termelése, ami a bőr pigmentációját, sötétedését okozza. Az α -MSH által elindított jelátviteli utakból és molekuláris folyamatokból mára sokat feltérképeztek. Kiderült, hogy az α -MSH-nak a bőr pigmentációja mellett más nagyon fontos szerepe is van. Az egészséges és melanomás sejtekben is gátolja a gyulladásos folyamatokat, illetve immunszuppresszorként funkcionál. Összességében az α -MSH védi a bőrsejteket az UV-sugárzás, valamint a gyulladást és oxidatív stresszt kiváltó külső hatások következményeitől. A melanoma sejtekre nézve ez azt jelenti, hogy a gyulladásos folyamatok gátlása által részben gátolja a migrációjukat, inváziójukat, és késlelteti az áttét képződést. Viszont immunszupresszor szerepe miatt csökkenti az immunrendszer melanoma felismerő képességét. Némileg talán ez utóbbival is magyarázható a melanoma „sikeressége” [30].

3.2.2.) Melanoma

A melanoma a melanocita sejtek rosszindulatú elváltozásával kialakuló rendkívül agresszív ráktípus, mely a hagyományos kemoterápiára jellemzően rezisztens. Rövid időn belül képez áttétet (metasztázist), tipikusan a csontokban, agyban, májban, tüdőben, izmokban és a bőrben. Korábban, míg csak a klasszikus kemoterápiás szerek álltak rendelkezésre, a sebészileg nem eltávolítható metasztatikus melanoma 5 éves túlélési aránya 5%-19% között volt [31]. Jelenleg az ajánlott kezelés a tumor és az érintett nyirokcsomók sebészi kimetszése, illetve kiegészítő kezelésként az utóbbi 10 évben engedélyezett immunterápia, BRAF-gátló vagy MEK-gátló valamelyikének alkalmazása. Az utóbbi kettő kismolekulás gyógyszer, melyek a melanoma sejt BRAF vagy MEK fehérje génjében történt pontmutáció okozta korlátlan proliferációját gátolják [1]. A megfelelő kezelést a betegség stádiuma szerint állapítják meg, melyhez korszerű képalkotó eljárásokra van szükség (PET, CT, MRI, SPECT) [1].

3.2.3.) MC1R, mint célreceptor

DNS array módszerrel megállapították, hogy egyes melanoma sejtvonalak nagy-, mások közepes-, és vannak, amik alig detektálható mértékben fejezik ki az MC1R-t. Azonban ezeket a kísérleteket mind *in vitro* végezték, és ismert, hogy a fehérje expresszió *in vitro* és *in vivo* körülmények között egészen eltérő lehet. Emiatt sokáig vitatott volt, hogy az MC1R valóban kifejeződik-e a rosszindulatú humán melanoma tumorokon, és ha igen, akkor a normál melanocitákhoz képest milyen arányban [32]. Végül 2013-ban *Tafreshi és munkatársai* folytattak egy igen átfogó vizsgálatot a kérdés megválaszolására. Dermatopatológus bevonásával immunhisztokémiai módszerrel vizsgálták az MC1R kifejeződését humán

szövetmintákon. 20 normál bőr mintát, 54 anyajegyet és összesen 150, különböző stádiumú, primer és metasztatikus melanoma mintát értékelték. A normál, nem neoplasztikus szövetekben az MC1R kis mennyiségben vagy kis sűrűségben volt jelen. A különböző stádiumú primer melanómák 20-80%-ában, és a metasztatikusak 25-70%-ában közepes vagy nagy mennyiségben találták meg [33]. *Hadley és munkatársai* [Nle⁴,D-Phe⁷]- α -MSH irányító peptiddel ellátott poli-vinilalkohol gyöngyöcskék receptor közvetített internalizációját figyelték meg humán melanoma és MC1R pozitív normál bőrsejteken fluoreszcens mikroszkóppal. MC1R negatív sejteknél ezt nem tapasztalták [34]. A fenti kísérletekkel bizonyítást nyert, hogy az MC1R megfelel a receptorral szemben támasztott követelményeknek, ezért az α -MSH analógok alkalmas irányító molekulák lehetnek a legtöbb metasztatikus melanoma diagnosztizálásában és a célzott terápiában is.

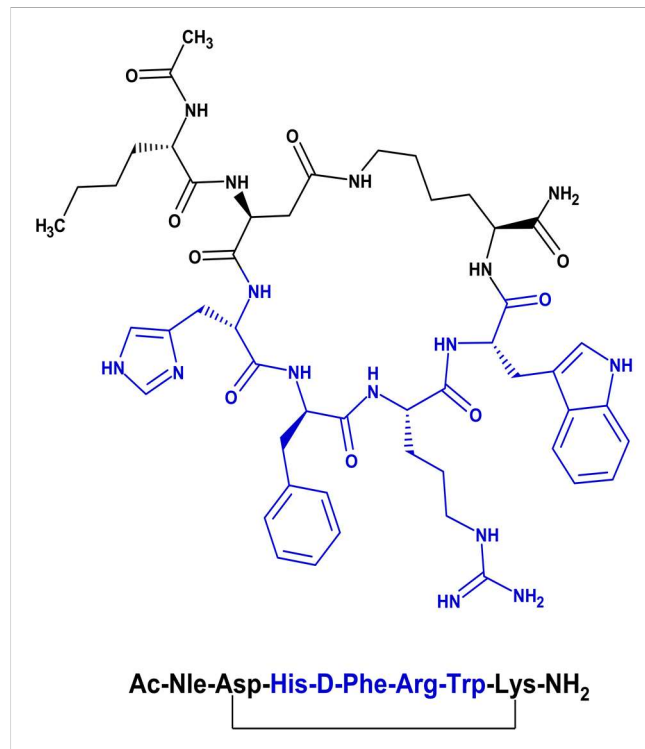
3.2.4.) α -MSH analógok

Az első sikeres α -MSH analóg a Melanotan-I (MT-1) [Nle⁴,D-Phe⁷]- α -MSH volt, ami két aminosavban tér el a természetes α -MSH-tól (12. ábra). Egyrészt a 4-es pozícióban lévő L-metionint L-norleucinra (Nle) cserélték, miután megfigyelték, hogy a metionin oxidációjával az α -MSH elveszti receptorkötő képességét. A metionin oxidációra igen érzékeny, viszont ezzel a módosítással úgy tudták növelni a peptid kémiai stabilitását, hogy közben a receptor kötő affinitása nem csökkent. A másik változtatás a 7-es pozícióban lévő L-fenilalanin D-fenilalaninra (D-Phe) való cseréje volt [32]. Ennek eredményeként nőtt a peptid receptorkötő affinitása és a humán szérumbeli, Phe⁷-Arg⁸ kötést hasító endopeptidázzal szemben mutatott stabilitása is [35].



12. ábra: Melanotan-I, egy mesterséges, lineáris α -MSH analóg. Az α -MSH-tól a kékkel szedett két aminosavban tér el

A második szuperpotens analóg a Melanotan-II (MT-2) Ac-Nle⁴-cyclo[Asp⁵,D-Phe⁷,Lys¹⁰]-NH₂- α -MSH₄₋₁₀ volt, amit az aszpartát és a lizin oldalláncával laktám gyűrűvé zártak (13. ábra). Az analóg szerkezetét *Al-Obeidi és munkatársai* tervezték, miután számítógépes modellezésekkel valószínűsítették, hogy a természetes α -MSH MC1R kötött szerkezetét a Glu⁵ karboxil csoportja és a Lys¹¹ ϵ -aminocsoportja között létrejövő ionos kölcsönhatás stabilizálja [36]. Ma már ismert, hogy az α -MSH 4 aminosavas, centrális régiója [His⁶,Phe⁷,Arg⁸,Trp⁹] vesz részt a MC1R-hez való kötésben [34].



13. ábra: Melanotan-II, egy mesterséges, ciklikus α -MSH analóg. Késsel szedve az MCI receptor kötésben részt vevő aminosavak

A Melanotan-II-höz hasonlóan lerövidített, de lineáris szerkezetű NAPamid [Ac-Nle⁴,Asp⁵,D-Phe⁷,Lys¹¹-NH₂]- α -MSH₄₋₁₁. vizsgálatakor is nagyon jó MC1R kötő affinitást tapasztaltak [37] (14. ábra).



14. ábra: NAPamid, egy mesterséges, lineáris α -MSH analóg. A természetes α -MSH-nál rövidebb, és a három késsel szedett aminosavban eltér

A 2000-es évektől kezdve a kutatások döntően radioaktív izotóppal jelölt α -MSH konjugátumok fejlesztésére irányultak, amelyek metasztatikus melanoma szelektív, PET vagy SPECT kimutatására alkalmasak [38]. A konjugátumokban a PET esetén pozitron sugárzó (⁶⁸Ga, ⁴⁴Sc, ⁶⁴Cu), SPECT esetén gamma sugárzó (¹¹¹In, ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga) iont egy kelátképző molekulával (pl. DOTA) komplexáltak, melyet rendszerint amidkötéssel kapcsolnak az α -MSH analóg irányító peptid valamely amino-csoportjához [38]. Ugyan ezekkel a diagnosztikai célú konjugátumokkal szemben részben mások az elvárások, mint a peptid-hatóanyag konjugátumokkal szemben, de támpontot adhatnak az irányító peptid MC1R kötő affinitása, valamint a tumoros és egyéb szövetben való dúsulása tekintetében. Például Froidevaux és munkatársai egy ¹¹¹In-al jelölt NAPamid vizsgálatánál azt tapasztalták, hogy a NAPamid C-terminálisának deamidálása drasztikusan, mintegy tizedére csökkenti a

konjugátum MC1R kötő affinitását, *in vitro* [37]. Sok lineáris analógról, amelyek *in vitro* körülmények között nagy affinitással kötődtek az MC1R-hez (pl. Melanotan-I) az *in vivo* vizsgálatok során kiderült, hogy irányító molekulának nem megfelelőek [38]. Ezért tanulmányozták a ciklikus analógokat is, melyek nagy MC1R kötő affinitásuk mellett jellemzően jobban ellenálltak a plazmabeli proteolitikus hasításnak, és jobb farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkeztek: *in vivo* egér modelleken végzett kísérletekben fokozottabb tumorbeli dúsulást tapasztaltak, főleg a laktám gyűrűs [39, 40] és rénium-oxiddal (ReO) [41] ciklizált analógok esetén.

3.3.) Tömegspektrometria

A tömegspektrometria analitikában és szerkezetkutatásban alkalmazott nagyműszeres módszer, ami a vizsgálandó vegyület molekulatömegének -és mennyiségének meghatározására, valamint szerkezetének igazolására, jellemzésére ad lehetőséget. Különösen érzékeny technika. A műszer típusától és a célvegyülettől függően akár 10^{-15} - 10^{-18} mol is kimutatható. A tömegspektrométer ionforrása gázfázisú ionokat állít elő, amiket az ionoptika fókuszál, az analizátor tömeg/töltés arány (m/z) szerint térben vagy időben szétválaszt, és a detektor az ionok mennyiségével arányos jelet kelt. Különböző típusú tömegspektrométerek léteznek, amelyek leginkább az ionforrás és az analizátor típusában térnek el. A vizsgálható minták (folyadék, szilárd, gáz), -és a célvegyületek körét az ionforrás szabja meg. Az analizátor pedig a molekulatömeg mérés pontosságát és felbontását határozza meg.

3.3.1.) Elektrospray ionizáció és HPLC-MS kapcsolat

A megfelelő ionizációs technika kiválasztásakor a célvegyületek polaritását és molekulatömegét kell figyelembe venni. Peptidek és fehérjék vizsgálatára MALDI (mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció) és DESI (deszorpciós elektrospray) mellett legelterjedtebben elektrospray ionizációt (ESI) használnak. Az ESI alkalmas kismolekulák, (bio)polimerek és nem kovalens komplexek ionizációjára is, nagyjából 70 KDa molekulatömegig. A vizsgálandó vegyületek köre poláristól vagy polarizálhatótól az ionosig terjed. Lágy ionizáció révén alkalmas molekulatömeg meghatározásra. A folyadék fázisú mintát egy nagyfeszültségű (1-5 kV) fém kapillárison át vezetik az ESI ionforrásba, ahol porlasztódik és töltött cseppecskék keletkeznek. Az elektroporlasztásra általában pneumatikus porlasztással is rásegítenek. A fűtött térben az oldószer párologása miatt a töltött cseppek Coulomb-robbanásokkal aprózódnak, míg végül gázfázisú ionok keletkeznek. ESI

ionizációval többszörösen töltött ionok alakulnak ki: a molekula általában 1000 Da-onként vesz fel egy töltést. Emiatt az ionok a molekulatömegüknél kisebb m/z -nél jelennek meg a tömegspektrumban, ami lehetővé teszi több 10000 Da-os makromolekulák alacsony méréshatárú quadrupol készülékekkel való vizsgálatát is. Pozitív módban leggyakrabban protonált $[M+nH]^{n+}$ molekulák képződnek, de az oldat összetételétől függően alkálifémion adduktok $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, szénhidrátok esetében ammóniumion adduktok $[M+NH_4]^+$ és vegyes adduktok is megjelenhetnek. Negatív módban leggyakrabban deprotonált $[M-H]^-$ molekulák és kloridion $[M+Cl]^-$ adduktok képződnek. Az ESI előnye, hogy HPLC-vel online kapcsolható és mennyiségi meghatározásra is alkalmas, mert az ionizáció mértéke arányos a célvegyület koncentrációjával. Hátránya, hogy nem tűri a nem illékony sók jelenlétét, melyek eltömíthetik az ionforrást, elnyomják a célvegyületek ionizációját és drasztikusan megemelik a hátteret. Ennek elkerülése érdekében kis koncentrációjú illékony puffereket (ammónium-acetát, ammónium-formiát) és a protonálódás elősegítésére illékony eluens módosítókat (hangyasav, ecetsav) kell választani. Keverék minták direkt analízisénel számolni kell az ionelnyomás jelenségével. Ez azt jelenti, hogy a nagyobb proton affinitású molekula hatékonyabban ionizálódik és elnyomja a kisebb proton affinitású ionizációját. Ennek elkerülése érdekében a komponensek előzetes HPLC-s elválasztása szükséges. Így csökkenthető a rosszul ionizálódó vegyületek kimutatási határa. HPLC-ESI-MS kapcsolat esetén az ionizáció hatékonysága tovább növelhető az áramlási sebesség csökkentésével, illetve a HPLC oszlop belső átmérőjének csökkentésével. Proteomikában, ahol kis mennyiségű, nagyon komplex fehérjekeverékekből kell lehetőleg minél több fehérjét azonosítani, a HPLC-ESI-MS rendszer nanoHPLC-ből és mikroionspray vagy nanospray forrásból áll, a lehető leghatékonyabb ionizáció érdekében. A nanoHPLC pumparendszere képes 0,5-1 μ l/perc áramlási sebességgel szállítani az eluent, a kapilláris oszlop belső átmérője 75-150 μ m, és a mikroionspray 50-1000 nL/perc, vagy a nanospray 20-50 nL/perc sebességgel képes porlasztani a mintát. Az ilyen rendszerekben még a legkisebb elérhető holtterfogat is számottevő csúcs szélesedést okoz, ezért a kromatográfia szempontjából nem könnyű technika, de az ionizáció hatásfoka szempontjából előnyös megoldás.

3.3.2.) Tandem tömegspektrometria

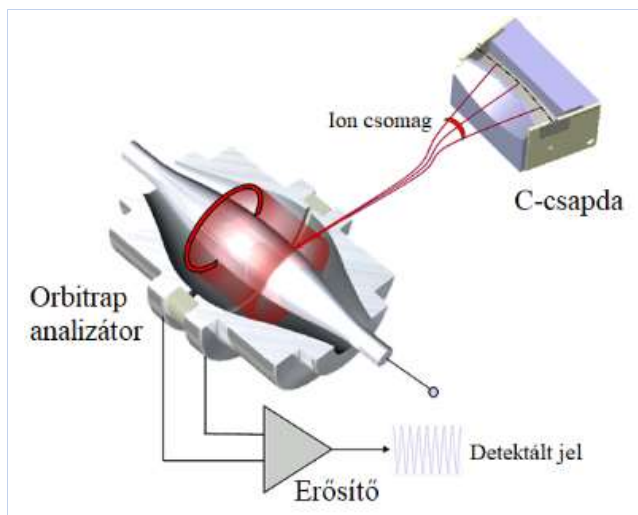
Szerkezeti információ tandem tömegspektrometriás (MS/MS) kísérletekkel kapható. Ilyenkor a kiválasztott anyai ion fragmentációjával keletkező leányionokat detektálják. Ezek m/z értéke és intenzitás aránya jellemző az adott molekulára. Fehérjék és peptidek vizsgálatánál a szerkezeti információ leginkább az aminosav sorrendet, és a poszttranszlációs módosítások

helyét jelenti. Peptidek esetén legelterjedtebben ütközéses aktiválással (CID), magasabb energiájú ütközéses aktiválással (HCD)-és elektron befogásos aktiválással (ETD) történő fragmentációt alkalmaznak. Ezek mechanizmusa eltérő, ezért ugyanabból a polipeptidből különböző típusú fragmensek keletkeznek. A CID, és az orbitraphez kifejlesztett HCD hasonló elven működik. Inert gázzal (pl. Ar, N₂) ütköztetve növelik az anyaion belső energiáját, míg az *b* és *y* típusú ionokra esik szét. ETD-nél a kis kinetikai energiájú és többszörösen pozitív töltésű anyaionoknak egy gyökkanion adja át az elektront, ami az anyaion fragmentálódásához vezet. Ekkor elsősorban *c* és *z* típusú ionok keletkeznek. Az ETD előnye a CID-del és HCD-vel szemben, hogy csak a polipeptid gerinc hasadását okozza, a poszttranszlációs módosítások zömét a helyén hagyja. A két ütköztetési technika komplementer információt nyújt, ezért proteomikában sokszor egymás mellett használják.

3.3.3.) Orbitrap analizátor

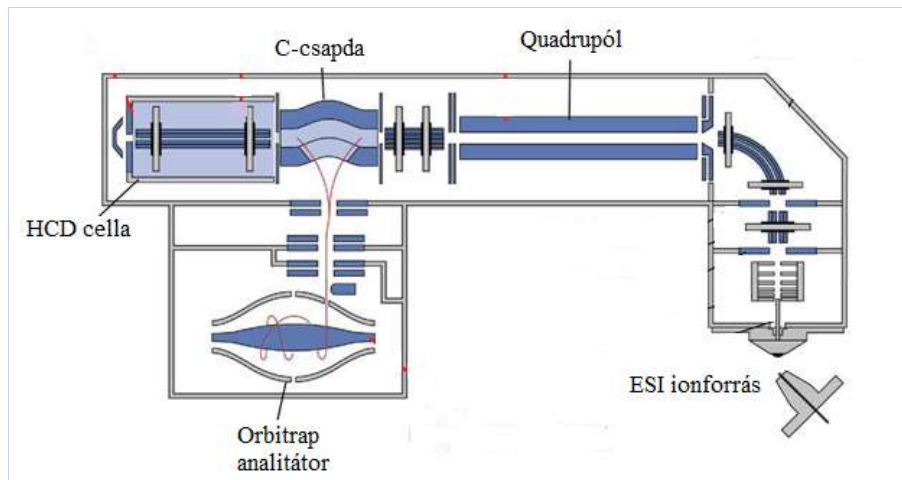
Az orbitrap a legújabb 2005 óta forgalmazott Fourier transzformációs analizátor. Nagy felbontású és tömegpontos. Nagy előnye a hasonló tulajdonságokkal bíró FTICR-rel (Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia analizátorral) szemben, hogy az orbitrapben nincs szükség szupravezető mágnesre, mivel a csapdázott ionok tisztán elektromos térben mozognak. Az orbitrap nem destruktív detektálást tesz lehetővé, a Fourier-transzformációs detektálás miatt egyszerre veszi fel a tömegspektrumot a csapdában lévő összes ionról, és a felbontás a detektálási idő nyúlásával egyre jobb lesz. Fontos, hogy ez idő alatt az ionok ütközés mentesen mozogjanak a csapdában, amihez az FTICR-hez hasonlóan ultra-nagy vákuumra van szükség (10⁻⁹ mbar). Ez nagyságrendileg több tíz km szabad úthosszat jelent. Az ultra-nagy vákuum igény miatt a fragmentálást nem lehet az orbitrap analizátorban elvégezni, hanem egy külön ütközési cellára van szükség. Az orbitrap analizátorban az ionok egy három elektródból álló térben csapdázódnak. Két egymás felé fordított kúp alakú elektród határolja a teret, és középen található a harmadik, orsó alakú elektród (15. ábra). Amikor feszültséget kapcsolnak a külső -és belső elektródok közé, olyan elektromos tér jön létre, mely a középső elektród tengelye mentén lineáris, ezért az ionok ebbe az irányba harmonikusan fognak oszcillálni. Ugyanakkor, az elektromos tér sugár irányú komponense a középső elektród felé vonzza az ionokat. A nagy energiájú ionokat a középső elektród tengelyére merőlegesen, egy kis résen keresztül injektálják a csapdába. Itt a sugár irányú elektromos tér a középső elektród felé hajlítja a pályájukat, a centrifugális erő viszont nem engedi őket belecsapódni. Megfelelő beállítások mellett az ionok egy közel kör alakú pályán kezdenek keringeni a középső elektród körül. Eközben, a külső, kúp alakú elektródok a csapda középső,

legszeleesebb része felé taszítják az ionokat, tengelyirányú harmonikus oszcillációt indukálva. Az oszcilláció frekvenciája az ion m/z arányától függ, az $\frac{1}{T} = \omega \sim \frac{1}{\sqrt{m/z}}$ egyenlet szerint, ahol T (s) a harmonikus oszcilláció periódus ideje, ω a frekvenciája (s^{-1}). A tengely irányban oszcilláló ionnyalábok ionáramot indukálnak a külső, detektáló elektródban, amiből Fourier transzformációval kapják a tömegspektrumot [43].



15. ábra: Forrás: R.A. Zubarev, A. Makarov, *Orbitrap mass spectrometry*, ACS Publications, 2013.

Az orbitrap készülékek leggyakrabban ESI ionforrással vannak felszerelve, mely folyamatos ionizációt biztosít. Az orbitrap analízátorba viszont egyszeri ionsomagokat kell bejuttatni. Ennek az áthidalására szolgál a C-csapda, mely adott idejű töltődés után a begyűjtött ionokat kis csomaggá rendezi, és egyszerre löki be az analízátorba. Az orbitrap analízátort tartalmazó készülékek mindig hibridek, ahol a második analízátor az orbitrap és előtte egy quadrupol vagy egy lineáris ioncsapda található. MS/MS kísérleteknél ezek végzik az anyaion kiválasztását. A készülék felszereltségétől függően a fragmentálás történhet HCD vagy ETD cellában, ahonnan a fragmensek a C-csapdán keresztül végül az orbitrap analízátorba kerülnek. A méréseimhez használt készülék sematikus rajza a 16. ábrán látható. Full Scan módban a quadrupol az összes iont átengedi, és a tömegspektrumot a nagyfelbontású orbitrap analízátor veszi fel. MS/MS módban az egységnyi felbontású quadrupol végzi az anyaion kiválasztását, ami a HCD cellában fragmentálódik, majd a leányionokról az orbitrap készít scant.



16. ábra: Forrás: <https://www.thermofisher.com>

3.3.4.) Proteomika, fehérje azonosítás

A proteomika egy szervezet adott pillanatban expresszált teljes fehérjeállományának minőségi és mennyiségi analizisét, illetve a fehérjeállomány különböző körülmények hatására bekövetkező összetétel változását vizsgáló tudományág. A proteomika feladatai közé tartozik a vizsgálandó fehérj(ék) elválasztása és azonosítása, egy fehérje aminosav sorrendjének, vagy a poszttranszlációs módosításainak meghatározása, fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata, és bizonyos fehérjék mennyiségének meghatározása. Egy fehérje tömegspektrometrián alapuló vizsgálata, azonosítása például a következő lépésekből állhat. Egy biológiai kísérletben valamilyen hatásnak tesznek ki egy élőlényt, majd összehasonlítják a kezelt és kezeletlen csoport fehérjeinek 2 dimenziós (2D) gélelektroferogramját. Olyan fehérje foltokat keresnek, amelyek eltűntek, megjelentek vagy intenzitásuk változott a kezelés hatására. Ezeket festés után kivágják a gélből. A gélben található fehérjék diszulfid hídjait kémiaiailag redukálják, és a szulfhidril-csoportokat módosítják, hogy ne alakulhassanak újra a diszulfid hidak. Ezután a denaturált polipeptideket valamilyen specifikus helyen hasító enzimmel peptidekké emésztik. Ez leggyakrabban tripszinnel történik, ami a lizin és arginin C-terminálisánál hasítja az amidkötést, és általában 4-20 aminosavas peptideket eredményez. Az ilyen méretű peptidek ideálisak a proteomikára általában használt hibrid tömegspektrométerek 2000 m/z -ig mérő quadrupoljának mérési tartományának, és kedvező a fragmentációs viselkedésük. Az emésztés után következik a peptidek (nano)HPLC-ESI-MS/MS kromatográfiás elválasztása és mérése. Ilyenkor információ függő mérést (IDA vagy DDA) végeznek. Ennek lényege, hogy a tömegspektrométer folyamatosan full scan módban mér, és ha valamelyik ion intenzitása meghaladja az előre beállított limit értéket, akkor azt fragmentálja és felveszi róla az MS/MS spektrumot. Így mindössze 1 kromatográfiás futtatás

alatt megkapjuk a minta peptidjeinek tömegét és MS/MS spektrumát is. Utóbbiból manuálisan is visszafejthető a peptid (részleges) aminosav szekvenciája, de a hatalmas adat mennyiség miatt a kiértékelés bioinformatikai módszerrel, adatbázisok és keresőmotorok segítségével történik. Ezt az MS/MS spektrumokon alapuló fehérje azonosítási módszert hívják bottom-up módszernek. A bottom-up kifejezés arra utal, hogy a fehérje elsődleges szerkezetét alulról, a fehérje elemésztésével kapott peptid szekvenálásával fejtik fel. Kiértékeléskor a kereső program egyenként összehasonlítja a kísérletesen kapott MS/MS spektrumokat az adatbázisban található fehérjék *in silico* emésztésével, majd a peptid *in silico* fragmentálásával kapott elméleti MS/MS spektrumaival. Természetesen az átnézett MS/MS spektrumok körét előbb szűkíteni kell, a felhasználó által beállított paraméterek alapján. Ilyen beállítások a faj, és az alkalmazott emésztő enzim, amivel az *in silico* emésztést is végezik. Beállítandó a minta-előkészítés során bekövetkező biztos -és változó módosulások köre. Előbbire példa a diszulfid-hidak redukálása és alkilezése, utóbbira az oxidációra érzékeny metionin esetleges oxidációja. Fontos a fragmentálás során keletkező leány ionok típusa, ami alapján az *in silico* fragmentálás is történik. Be kell állítani hogy a kereső program monoizotópos vagy átlag tömeget keressen a spektrumokban. Ez a készülék felbontásának a függvénye. Meg kell adni a peptid anyaiionok várható töltését és a készülék hozzávetőleges tömegpontosságát. Utóbbival kizárhatók azok az *in silico* emésztéssel kapott peptid, melyek tömege nagyon eltér a kísérletesen mért peptid tömegektől.

Az elméleti és a mért MS/MS spektrumok közti hasonlóságot a kereső program egy értékkel jellemzi, és minden mért MS/MS spektrumhoz a legnagyobb értéket kapott peptidet rendeli hozzá. A hasonlóságot jellemző értéket a különböző kereső programok más és más algoritmussal, statisztikai módszerrel számolják, és a párosítás helyessége döntően befolyásolja, hogy az azonosított fehérjék hány százaléka fals pozitív és hány százaléka található meg valóban a mintában. A helytelen peptid hozzárendelésnek számos oka lehet, ezek közül a legfontosabbak következnek: 1) Az elméleti MS/MS spektrumokban a fragmentumok intenzitása azonos, viszont a valóságban az intenzitás arányokat számos faktor befolyásolja, pl. az, hogy milyen aminosavak határozzák az elhasított peptidkötést. 2) A kis mértékű fragmentáció, az alacsony jel/zaj arány, és a minta-előkészítés során bevitt szennyezők is növelik a helytelen peptid hozzárendelés valószínűségét. 3) A fragmentációra szánt anyaiion kiválasztását általában egységnyi felbontású quadropollal végzik. Ezért előfordulhat, hogy egynél több, nagyon hasonló m/z értékű anyaiiont is egyszerre beenged az ütközési cellába, így ugyanabban az MS/MS spektrumban több különböző peptid fragmentumai

is megjelennek. 4) Ha az adatbázis több, hasonló molekulatömegű, és aminosav szekvenciájú homológ peptidet is tartalmaz, akkor előfordulhat, hogy a valós helyett egy homológ peptid elméleti MS/MS spektrumát értékeli a mért MS/MS spektrumhoz leghasonlóbbnak a program. 5) Ha a készülék egy peptid monoizotópos csúcsa helyett az első vagy a második izotóp csúcsát választja ki fragmentációra, akkor a felvett MS/MS spektrumhoz helytelen, akár 1-2 Da-al nagyobb peptidtömeget mér. Ilyenkor a rosszul megmért peptidtömeg okozza egy hibás peptid párosítását a mért MS/MS spektrumhoz. 6) Amennyiben az emésztő enzim az előre beállítottnál több hasítási helyet is kihagy, akkor az így keletkező hosszú peptid biztos, hogy nem lesz azonosítva. 7) Egy peptid akkor se lesz azonosítva, ha egy olyan szekvencia variáns, vagy új peptid, ami nem szerepel az adatbázisban.

Azután, hogy a mért MS/MS spektrumokhoz 1-1 peptidet rendelt a program, az azonosított peptideket kell fehérjékhez rendelni, és ennek a megbízhatóságát is egy értékkel jellemezni. Ennél a lépésnél is jelentősen nőhet a fals pozitív fehérje találatok száma. Ennek egyik oka, hogy az MS/MS spektrumhoz helyesen hozzárendelt peptidek viszonylag kis számú, de a mintában valóban benne levő fehérjében tömörülnek. Viszont a hibásan azonosított peptidek szinte mindegyike egy-egy újabb, a hatalmas több 10 000-es adatbázisban megtalálható fehérjével növeli a listát. Éppen ezért a csak 1 peptiddel azonosított fehérjék nem megbízható találatok. Emellett problémát okoz, hogy a homológ fehérjék, a különböző izoformák, a konzervált szekvenciákat tartalmazó fehérjék közös szekvencia részleteket is tartalmaznak. Ez azt jelenti, hogy egyes azonosított peptidek több fehérjéhez is hozzárendelhetők, ami szintén a fals pozitív fehérje találatok számát növeli [44]. Ezt próbálja a Scaffold program kiküszöbölni, ami a keresőmotorral kapott eredményeket összetett statisztikai módszerekkel értékeli, és kiszortírozza a valószínűsíthetően fals fehérjéket. Emellett, a találati értéket (score-t), amit a keresőmotor az azonosított fehérjékhez rendelt, azonosítási valószínűséggé konvertálja, így összehasonlíthatóvá teszi a különböző keresőmotorokkal kapott eredményeket [45].

A bottom-up stratégiától egészen eltérő, újabb proteomikai módszerek is megoldást nyújthatnak a közös szekvenciárészletet tartalmazó fehérjék problémájára. Az egyik az úgynevezett top-down proteomika, melynek lényege, hogy az intakt fehérjét vizsgálják a peptid emésztmény helyett. Egy másik alternatíva lényege, hogy célzottan csak bizonyos, nagy információ tartalmú peptideket keresnek az emésztményben, melyek egyértelműen csak egyetlen fehérjéhez rendelhetők [44].

4.) Célkitűzés

Célul tűztem ki három különböző, α -MSH analóg irányító peptidből és daunomicin gyógyszer molekulából felépülő peptid-hatóanyag konjugátum sejten belüli, lizoszomális lebomlásának modellezését laboratóriumi körülmények között. Céлом az irányító peptiden belüli enzimikus hasadási helyek azonosítása, a daunomicin esetleges bomlási folyamatainak, „cukorvesztésének” felderítése. A PDC-k terápiás hatásossága szempontjából különösen fontos a konjugációhoz alkalmazott oxim kötés stabilitásának vizsgálata lizoszomális enzimek jelenlétében, pH=5 közegben. Mivel az irodalmi adatok alapján várható, hogy ez a kötéstípus nem teszi lehetővé a szabad daunomicin felszabadulását, ezért céлом volt a legkisebb, daunomicin tartalmú metabolit meghatározása. Továbbá vizsgálni terveztem, hogy a két különböző konjugációs hely hogyan befolyásolja a legkisebb daunomicin tartalmú metabolitig való lebomlás sebességét.

A metabolikus folyamatok felderítése mellett célul tűztem ki a lizoszomális lebomlás modellezéséhez használt patkány máj lizoszóma homogenátumban található fehérjék azonosítását tömegspektrometriára épülő proteomikai módszerrel. A kísérletek során arra kerestem a választ, hogy azonosíthatóak-e a készítményben a PDC-k lebontásában részt vevő enzimek.

5.) Kísérleti munka

5.1.) Anyagok és készülékek

Kísérleteim során Sigma-Aldrich-től beszerzett nátrium-acetátot, tömény ecetsavat, 1,4-DL-ditiotreitolt és jódcetamidot használtam. Az ammónium-hidrogén-karbonát, a hypergrade, LC-MS minőségű tömény hangyasav (HCOOH), a HPLC-MS vizsgálatokhoz használt hypergrade, LC-MS minőségű acetonitril (ACN), víz és 2-propanol (IPA), valamint a minta-előkészítéshez használt metanol (MeOH) a Merck-től származott. A tömény trifluor-ecetsav (TFA) a VWR-től lett beszerezve. A tömegspektrometriás szekvenáláshoz alkalmas minőségű (sequencing grade) tripszin a Worthingtontól, és az azonos minőségű LysC a Promegától származott. A fehérje emésztéshez Waters Rapigest felületaktív szert használtam. A fehérje emésztményt Thermo Scientific Pierce C18 oszlopokon tisztítottam. A mintákat Eppendorf fiolákban tároltam. A vizsgált PDC-ket Szabó Ildikó állította elő. A patkány máj lizoszóma preparátumot Orbán Erika izolálta korábban publikált módszer szerint [28]. A minta-előkészítés során Dlab D1008 centrifugát, Eppendorf ThermoMixer C kevertetős termosztátot és Genevac SpeedVac vákuum centrifugát használtam. Az LC-MS méréseket Thermo Scientific Ultimate 3000 UPLC-hez kapcsolt Thermo Scientific Q Exactive Focus nagyfelbontású tömegspektrométerrel végeztem.

5.2.) Stabilitásvizsgálat lizoszóma preparátumban

A kísérlet során a 3. táblázatban felsorolt PDC-ket vizsgáltam.

3. táblázat: A vizsgált PDC-k

PDC kód	Szekvencia	Bemért mennyiség
SZI-7	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGKPV-NH ₂	55 µg
SZI-8	Ac-SYSNleEHFRWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	62 µg
SZI-9	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	55 µg

A kísérlethez patkány májból izolált lizoszóma homogenátumot használtam, mely fehérjetartalma 16,6 µg/µl volt. Pontos enzim tartalma nem ismert, ezért a reakcióelegyet úgy állítottam össze, hogy a PDC és a lizoszóma preparátum fehérje tartalma 1:1 tömegarányú legyen.

10 µl térfogatú lizoszóma preparátumot 0,2 M-os nátrium-acetát pufferben (pH=5,03) 0,83 µg/µl koncentrációjúra higítottam. A bemért liofilizált PDC-kből előbb 0,25 µg/µl koncentrációjú törzsoldatokat készítettem vízben, amiket 0,2 M-os nátrium-acetát pufferrel (pH=5,03) 0,025 µg/µl koncentrációjúra higítottam. Az oldatok 900 µl-éhez 27 µl higított lizoszóma preparátumot adtam. A reakcióelegyet 37°C-on, 600 rpm folyamatos keverés mellett inkubáltam, és 0 perc, 5 perc, 15 perc, 30 perc, 1 óra, 2 óra, 6 óra, 24 óra és 72 óra elteltével 100 µl térfogatú mintát vettem belőle. 10 µl tömény hangyasav hozzáadásával a mintákban azonnal leállítottam az enzimreakciót, és az LC-MS analízisig -20°C-on tároltam. A kontroll mintát azonos módon készítettem el, azzal a különbséggel, hogy a PDC oldathoz higított lizoszóma preparátum helyett puffert adtam: 500 µl 0,025 µg/µl-es PDC oldathoz 15 µl 0,2 M-os nátrium-acetát puffert (pH=5,03) pipettáztam. Ebben az esetben 0 perc, 1 óra, 6 óra, 24 óra és 72 óra elteltével vettem mintát.

Az LC-MS analízist Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UPLC-hez kapcsolt Thermo Scientific Q Exactive Focus nagyfelbontású tömegspektrométerrel végeztem. A mérések vezérlését és a kiértékelést Thermo Scientific Xcalibur 4.1 szoftverrel végeztem. Az enzimatis emésztmény komponenseinek kromatográfiás elválasztásához Supelco Ascentis C18 fordított fázisú oszlopot (150 mm x 2,1 mm, 3 µm) használtam, azonos töltetű előtét oszloppal. Az „A” eluens 0,1 V/V% HCOOH tartamú víz, a „B” eluens 0,1 V/V% HCOOH és 80 V/V% acetonitril:víz elegy volt. A túmosó 0,1 V/V% HCOOH tartamú víz, a pumpamosó pedig 10 V/V% izopropanol tartamú víz volt. 35 µl térfogatú mintát injektáltam az oszlopra. A komponenseket gradiens módszerrel választottam el, az 4. táblázatban látható program szerint. Az áramlási sebesség végig 0,2 ml/perc volt. Az oszlop termosztát 40 °C-ra volt állítva. Az ESI ionforrás pozitív módban üzemelt. A függöny-, porlasztó- és szárítógáz nitrogén volt, utóbbi hőmérséklete 400 °C-ra állítva. Az orbitrap analizátor 200-2000 *m/z* tartományban full scan módban üzemelt, nagyjából 70000-es felbontással.

4. táblázat: Gradiens program

<i>t</i> (perc)	% „B”
0	2
1	2
17	90
17,5	90
18	2
20	2

5.3.) Lizoszóma preparátum proteomikai vizsgálata

12,5 µg fehérjét tartalmazó lizoszóma preparátumból 625 µg/ml koncentrációjú hígított lizoszóma preparátumot készítettem pH=5,03 0,2 M nátrium-acetát pufferben.

Diszulfid-hidak redukálása: 20 µl hígított lizoszóma preparátumhoz 40 µl 200 mM-os vizes ammónium-hidrogénkarbonát oldatot és 1,5 µl MeOH-t adtam. Majd 5µl 0,5 m/V%-os Rapigest és 2 µl 200 mM-os ditiotreitolt vizes oldat hozzáadása után 30 percig 60°C-on inkubáltam az elegyet. Miután szobahőmérsékletűre hűlt 5 µl 200 mM-os ammónium-hidrogénkarbonát vizes oldatot és 2,5 µl 200 mM-os jódacetamid vizes oldatot adtam hozzá, és 30 percig 37°C-on 300 rpm-es kevertetés mellett, a jódacetamid fényérzékenysége miatt sötétben inkubáltam.

Enzimatis emésztés: Az előző elegyhez 1 µl 0,25 µg/ml-es LysC és tripszin közös vizes oldatát adtam, és 1 óráig 37°C-on, 300 rpm kevertetés mellett inkubáltam. Ezután 2 µl 0,25 µg/ml-es tripszin vizes oldatát adtam hozzá, és 2 óráig 37°C-on 300 rpm kevertetés mellett inkubáltam. A reakciót 1,5 µl tömény hangyasav hozzáadásával állítottam le, majd a mintát SpeedVac készülékkel vákuum alatt beszárítottam.

A sóalanítást C18-as állófázissal töltött spin oszlopon (Pierce C18 spin column) végeztem. Az összes centrifugálási lépés 1 percig 1500 rpm-en történt. Az oszlopot három lépésben kondicionáltam 200-200 µl 50 V/V% metanol:víz eleggyel, két lépésben ekvibráltam 200-200 µl 0,5 V/V% TFA tartalmú 5 V/V% acetonitril:víz eleggyel, majd két lépésben mostam 200-200 µl 0,1 V/V% TFA tartalmú vízzel. A beszárított mintát 50 µl 0,1 V/V% TFA tartalmú vízben feloldottam és felvittem az oszlopra. 1 perc centrifugálás után az átfolyó oldatot újra az oszlopra vittem. Ezután az oszlopon megkötődött peptideket két lépésben mostam 100-100 µl térfogatú 0,1 V/V% TFA tartalmú vízzel. Végül két lépésben 50-50 µl 0,1 V/V% TFA tartalmú 70 V/V% acetonitril:víz eleggyel tiszta LoBind eppendorf fiolába eluáltam a peptideket. A mintát SpeedVac készülékkel vákuum alatt beszárítottam.

A proteomikai mérést a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UPLC-hez kapcsolt Thermo Scientific Q Exactive Focus nagyfelbontású tömegspektrométerrel végeztem, információ függő HPLC-MS/MS módszerrel.

Az LC-MS analízist Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UPLC-hez kapcsolt Thermo Scientific Q Exactive Focus nagyfelbontású tömegspektrométerrel végeztem. A mérések vezérlése Thermo Scientific Xcalibur 4.1 szoftverrel történt. A triptikus fehérje emésztmény

komponenseinek kromatográfiás elválasztásához Waters Acquity BEH C18 fordított fázisú oszlopot (150 mm x 1,0 mm, 1,7 μm) használtam. Az „A” eluens 0,1 V/V% HCOOH tartamú víz, a „B” eluens 0,1 V/V% HCOOH tartalmú acetonitril volt. A túmosó 0,1 V/V% HCOOH tartamú víz, a pumpamosó pedig 10 V/V% izopropanol tartamú víz volt. 10 μl térfogatú mintát injektáltam az oszlopra. A komponenseket gradiens módszerrel választottam el, a 5. táblázatban látható program szerint. Az áramlási sebesség végig 0,1 ml/perc volt. Az oszlop termosztát 45 °C-ra volt állítva. Az ESI ionforrás pozitív módban üzemelt. A függöny-, porlasztó- és szárítógáz nitrogén volt, utóbbi hőmérséklete 400 °C-ra állítva. Az információfüggő mérés során az MS spektrumok felvételét 350-2000 m/z tartományban, full scan módban, nagyjából 35000-es felbontással végezte az orbitrap analizátor. Az MS/MS spektrumok felvétele nagyjából 17500-as felbontással történt, a fragmentálásra kiválasztott anyaiionok izolálása 3 m/z széles ablakban történt, a HCD ütközési cellában 27-es normalizált ütközési energia volt beállítva.

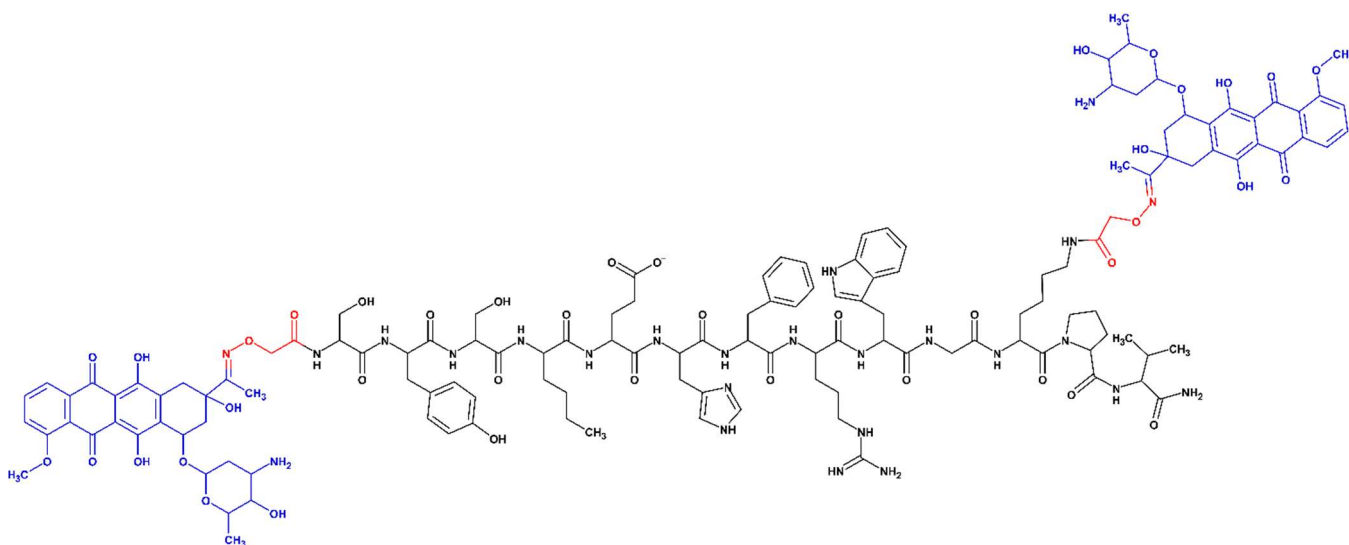
5. táblázat: Gradiens program

t (perc)	% „B”
0	8
1	8
70	40
71	80
75	80
76	8
86	8

A Swissprot adatbázis 700 kDa-nál kisebb rágcsáló eredetű fehérjei között Mascot keresőmotorral végeztem az adatbázis keresést. Az *in silico* triptikus emésztésben maximum két kihagyott hasítási helyet engedélyeztem. A minta-előkészítés során a diszulfid-hidak redukálása után a szulfhidril csoportok karbamidometilálását állandó módosításnak, és a metioninok esetlegesen bekövetkező spontán oxidációját, illetve a glutamin és aszparagin deamidációját változó módosításnak állítottam be. Az *in silico* emésztéssel kapott peptidek egyszeresen, kétszeresen vagy háromszorosan protonáltak lehetnek, és tömegük maximum 5 ppm-el térhet el a mért monoizotópos tömegtől. Az *in silico* peptid fragmentációval kapott elméleti fragmentumok tömege maximum 0,03 Da-al különbözhetett a mért értéktől. Minden MS/MS spektrumhoz csak a legnagyobb Mascot értékű peptidet lehetett hozzárendelni. Egy fehérje azonosításához legalább két peptid kellett, melyek minimum 5 aminosavból álltak. Az adatbázis fehérjeszekvenciáinak megfordításával számolt fals pozitív fehérje azonosítási ráta maximum 1% lehetett.

6.) Eredmények

Melanoma specifikus konjugátumok sejten belüli metabolizmusát modelleztem laboratóriumi körülmények között patkány lizoszóma preparátum felhasználásával. A három vizsgált PDC felépítése hasonló: az irányító peptid, a hatóanyag és a közöttük kialakított kötés minősége azonos. A konjugáció helyében és a kapcsolt daunomicin molekulák számában térnek el. Az irányító peptid egy lineáris α -MSH analóg, ami a melanoma sejtfelszíni MC1 receptorát hivatott megcélozni. A természetes α -MSH-tól egy aminosavban tér el: a 4-es pozícióban lévő L-metionin egy L-norleucinra lett cserélve, a kémiai stabilitás érdekében. A Dau konjugációja az SZI7 jelű PDC esetén a peptid *N*-terminálisán, az SZI8 esetén a 11-es pozíciójű lizin ϵ -amino-csoportján történt. Az SZI9 esetén mindkét konjugációs helyet kihasználták. A konjugációhoz a peptid megfelelő amino-csoportját aminosavval funkcionálisították, melyhez oxim kötéssel kapcsolták a Dau karbonil csoportját. Példaként, a 17. ábrán az SZI9 jelű molekula szerkezetét mutatom be, feketével az irányító peptidet, pirossal az aminosav-oxim kötés részét és kékkel a daunomicin (Dau) molekulát jelölve.



17.. ábra: Az SZI9 jelű PDC szerkezete. Feketével az irányító peptid (α -MSH analóg), pirossal az aminosav-oxim kötés részét és kékkel a daunomicin (Dau) molekulát jelölve

6.1.) A peptid-hatóanyag konjugátumok jellemzése

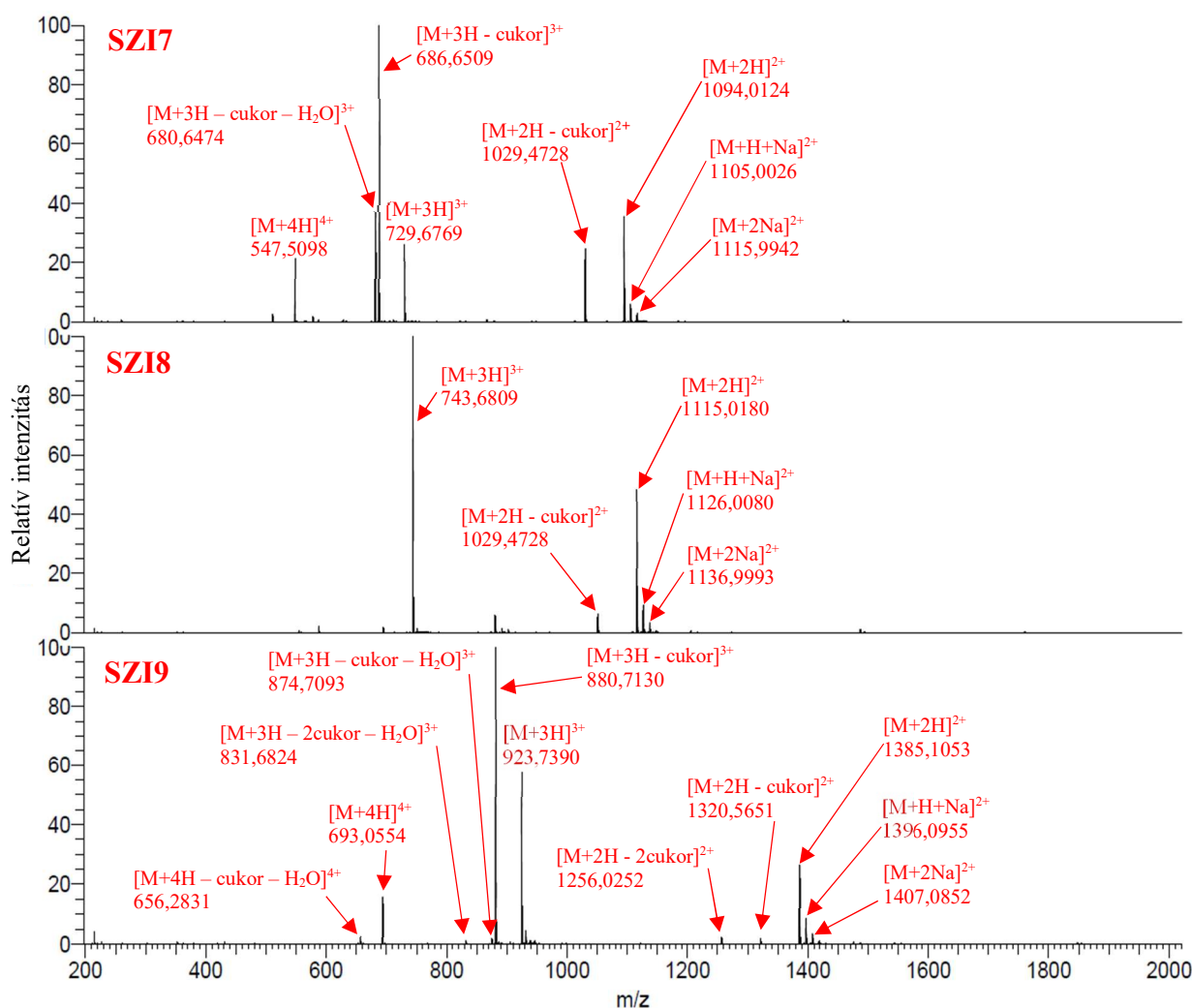
A peptidek lizoszomális metabolizmusának vizsgálatára PDC-t és patkány máj lizoszóma homogenátumot tartalmazó, 5-ös pH-jú reakcióelegyet készítettem, melyből 37 °C-on inkubálva bizonyos időközönként mintát vettem. A kontroll mintákat azonos módon készítettem el, azzal a különbséggel, hogy azok nem tartalmaztak lizoszóma preparátumot.

Elsőként a konjugátumok molekulatömegét és tisztaságát ellenőriztem a 0. percben vett kontroll minta felhasználásával. A nagyfelbontású tömegspektrométerrel meghatározott molekulatömeg mindhárom PDC esetén megfelelt a várt értéknek (6. táblázat).

6. táblázat: A vizsgált konjugátumok mért molekulatömege megfelel az elméleti értéknek, a tömegmérés hibáján belül

PDC kód	Elméleti monoizotópos molekulatömeg (Da)	Mért monoizotópos molekulatömeg (Da)	Eltérés (ppm)
SZI7	2186,0109	2186,0092	-0,8
SZI8	2228,0215	2228,0204	-0,5
SZI9	2768,1959	2768,1950	-0,3

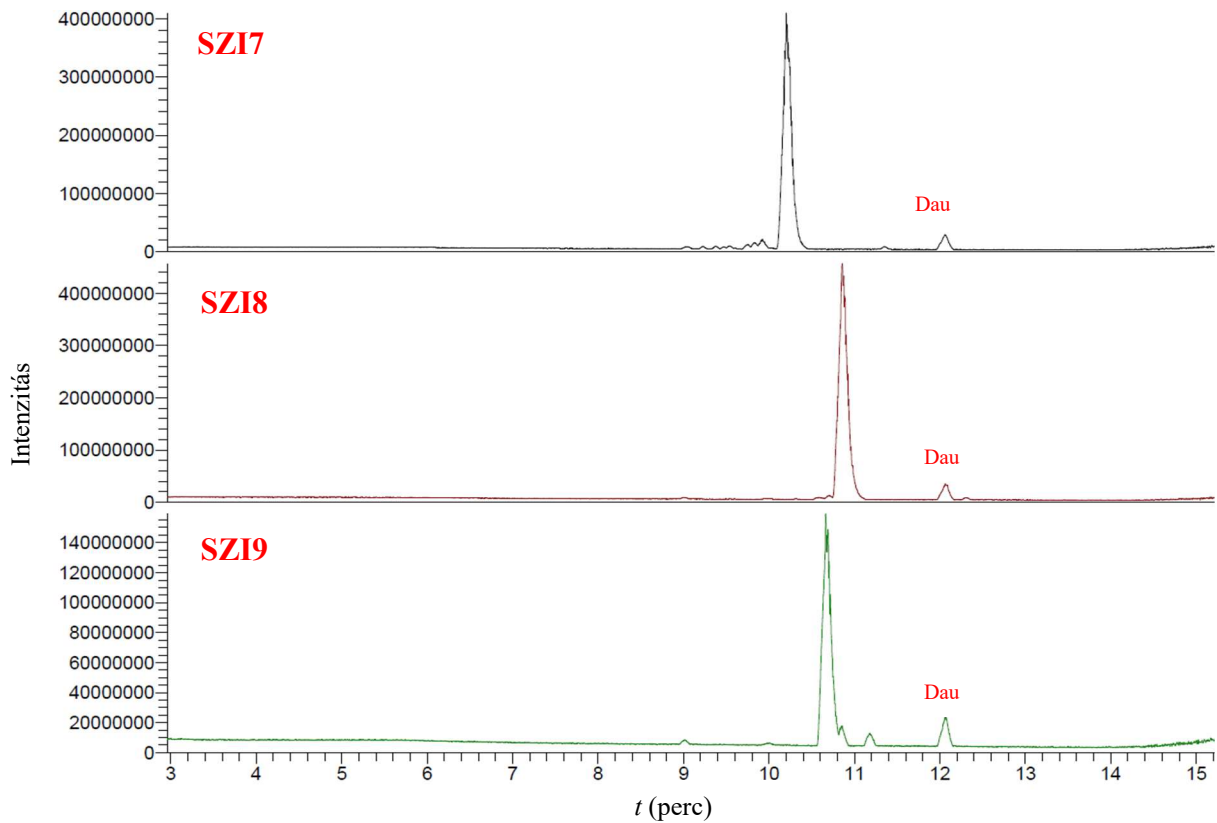
A tömegspektrumban (18. ábra) legintenzívebben a háromszorosan protonált molekulák jelentek meg, de emellett sikerült azonosítanom a kétszeresen -és négyszeresen protonált molekulákat, illetve különböző Na^+ adduktokat is, emellett vízvesztést is tapasztaltam. Az ionforrásban bekövetkező fragmentáció miatt megjelentek a tömegspektrumban úgynevezett



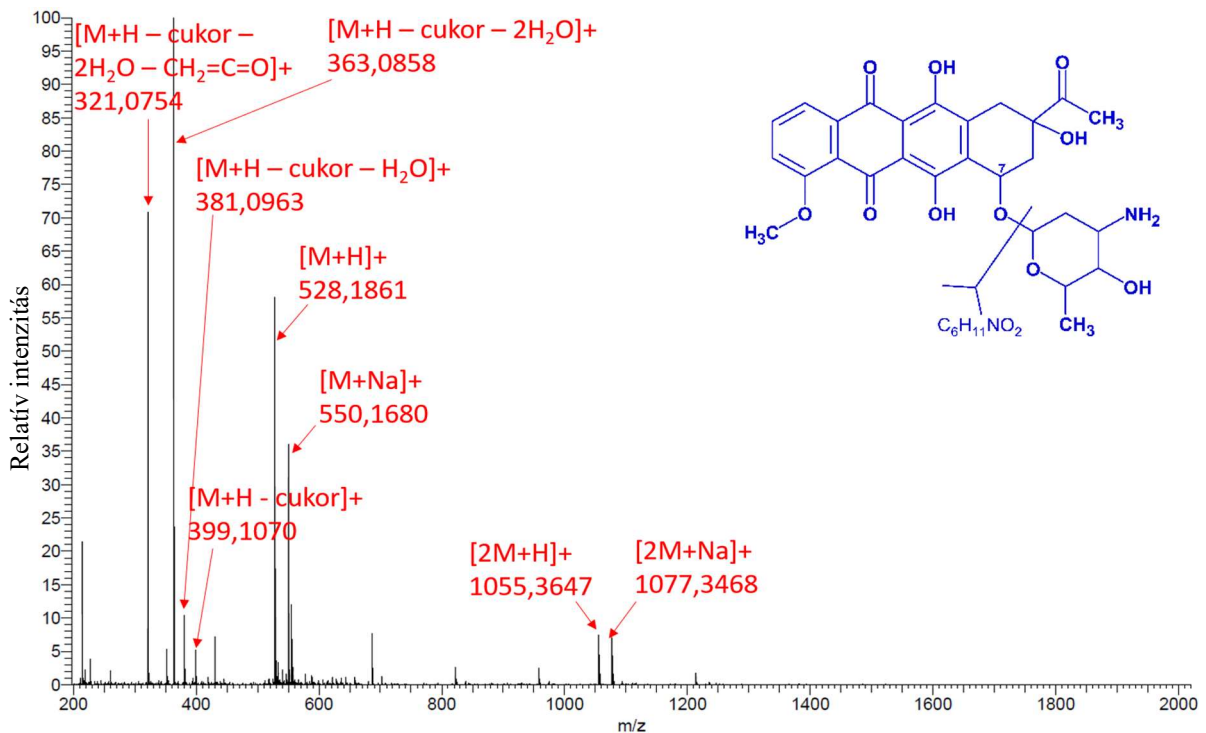
18. ábra: A három vizsgált PDC asszignált tömegspektruma.

„cukor vesztett” protononált ionok is. „Cukorvesztéskor” a Dau $C_6H_{11}NO_2$ összegképletű daunozamin része letörik az antraciklin vázról, és egy hidroxil-csoport marad a 7-es C-atomon (20. ábra, jobb felső sarok).

A konjugátumok tisztaságát a 0. percben vett kontroll minta HPLC-MS bázisesúcs kromatogramja alapján ellenőriztem (19. ábra). A főtermék mellett mindhárom PDC mintában találtam szennyezőként szabad Dau-t, melynek asszignált tömegspektruma a 20. ábrán látható.



19. ábra: A 0. percben vett kontroll minták bázis ion kromatogramjai. A főtermék mellett Dau mutatható ki



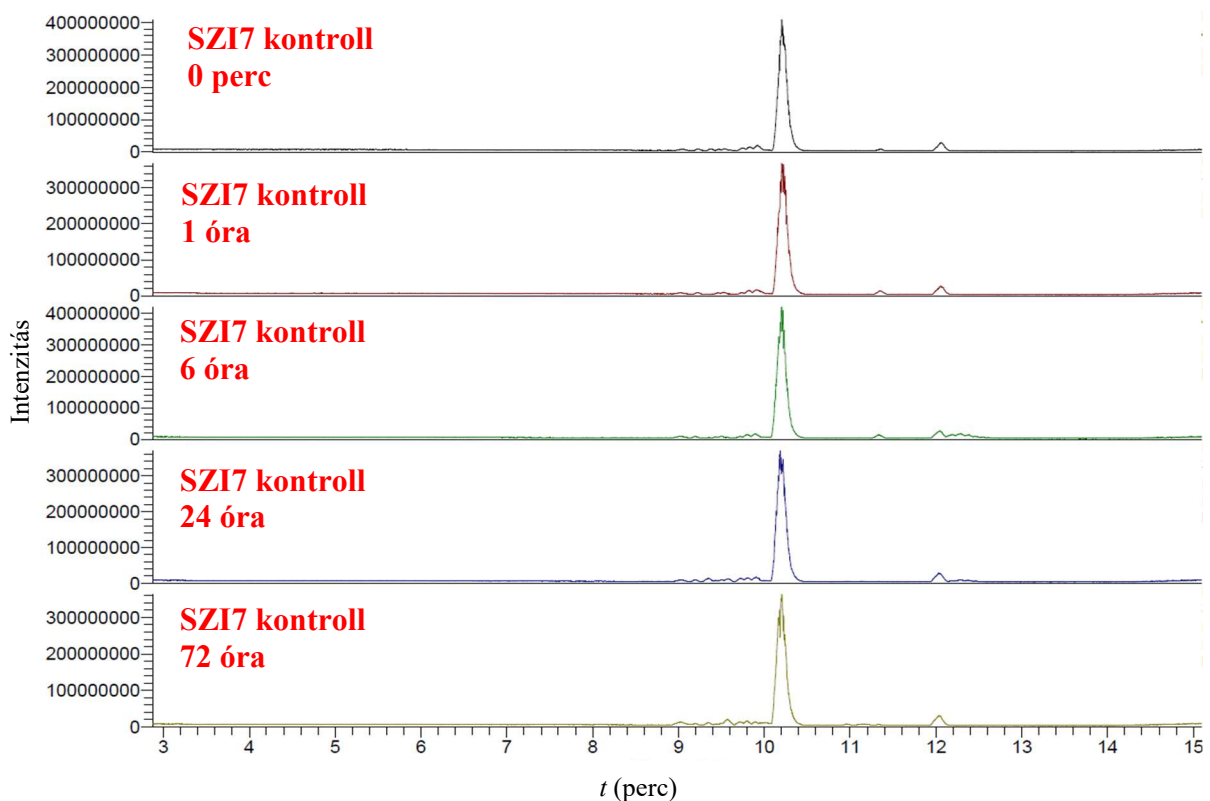
20. ábra: A szennyezőként minden PDC mintában jelenlévő Dau asszignált tömegspektruma. Jobb felső sarokban a cukorvesztéskor letörő daunosamin molekula részlet, mely helyén egy hidroxil-csoport marad a 7-es C-atomon

6.2.) A konjugátumok emésztése

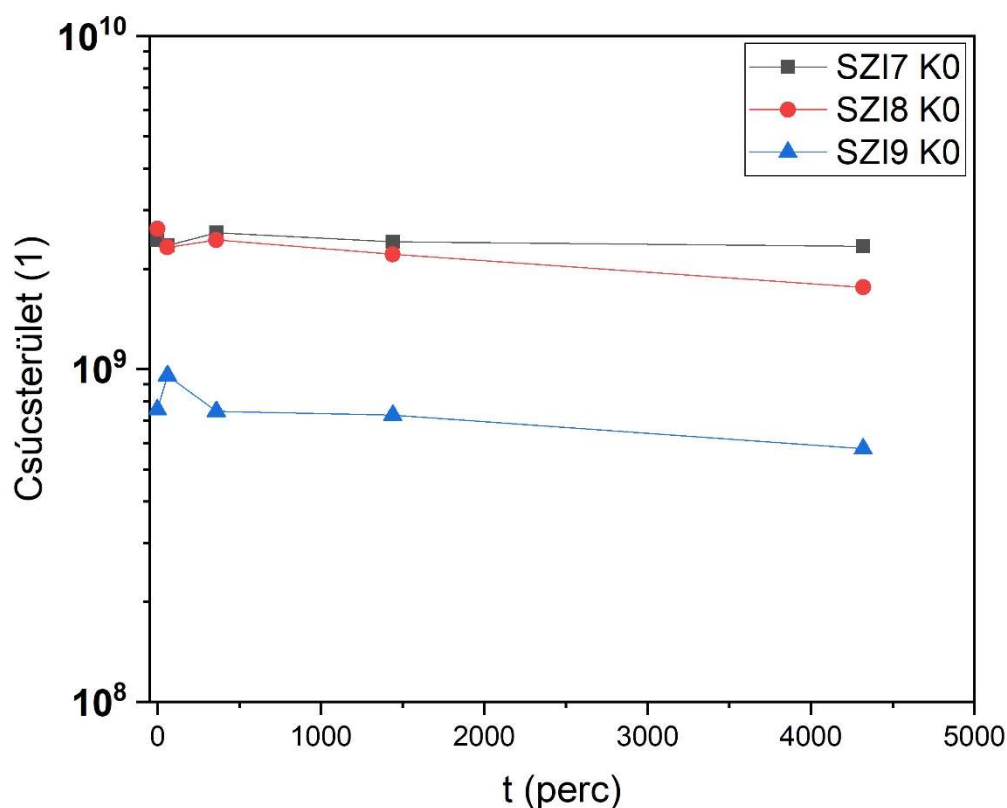
A gyógyászati célra szánt konjugátumok metabolizmusának felderítése elengedhetetlen feladat még a preklinikai vizsgálatokban. A vérkeringésből a sejt által endocitózissal felvett intakt konjugátumok a célsejt lizoszómájába kerülnek. Itt a konjugáció során kialakított kötés, vagy a linker minőségétől függően a szabad hatóanyag, vagy valamely metabolitja szabadul fel, ami döntően befolyásolhatja a citotoxin hatékonyságát. Kísérleteim során a konjugátumok lizoszomális enzimek hatására bekövetkező lebomlását kívántam modellezni, különös tekintettel a legkisebb daunomicin tartalmú metabolit meghatározására. Ehhez patkány májból izolált lizoszóma homogenátum jelenlétében, a lizoszómák savasságának megfelelő 5-ös pH-jú közegben inkubáltam a vizsgált konjugátumokat. Mivel mennyiségi meghatározást nem végeztem, és korábbi kísérletek alapján ismeret volt, hogy a lizoszomális enzimek a peptidkötések hasadását okozza, ezért minden mintából egyet-egyét készítettem elő.

6.2.1.) A konjugátumok stabilitása pufferben

Mindenekelőtt ellenőrizni kellett, hogy a konjugátumok stabilak-e az alkalmazott kísérleti (37 °C, pH=5 nátrium-acetát puffer) és mérési körülmények között. Ennek érdekében kontroll mintát készítettem, mely lizoszóma preparátumot nem tartalmazott, csak PDC-t és puffert. Ebből időről-időre mintát vettem, amiket HPLC-MS analízisnek vettem alá. A három PDC csúcsterületének időbeli változása a 22. ábrán látható. Az SZI7 kontroll mintáról különböző időpontokban felvett bázis ion kromatogramok a 21. ábrán, az SZI8 és SZI9-ről pedig a függelék 36., 37.ábrájain láthatók. Egyik PDC csúcsterületének se tapasztaltam a jelentős csökkenését. A bázis ion kromatogramokon 72 óra elteltével se jelentek meg új csúcsok, és a meglévő kromatográfias csúcsok tömegspektruma nem változott, ezért a PDC-k stabilnak mondhatók az alkalmazott kísérleti körülmények között.



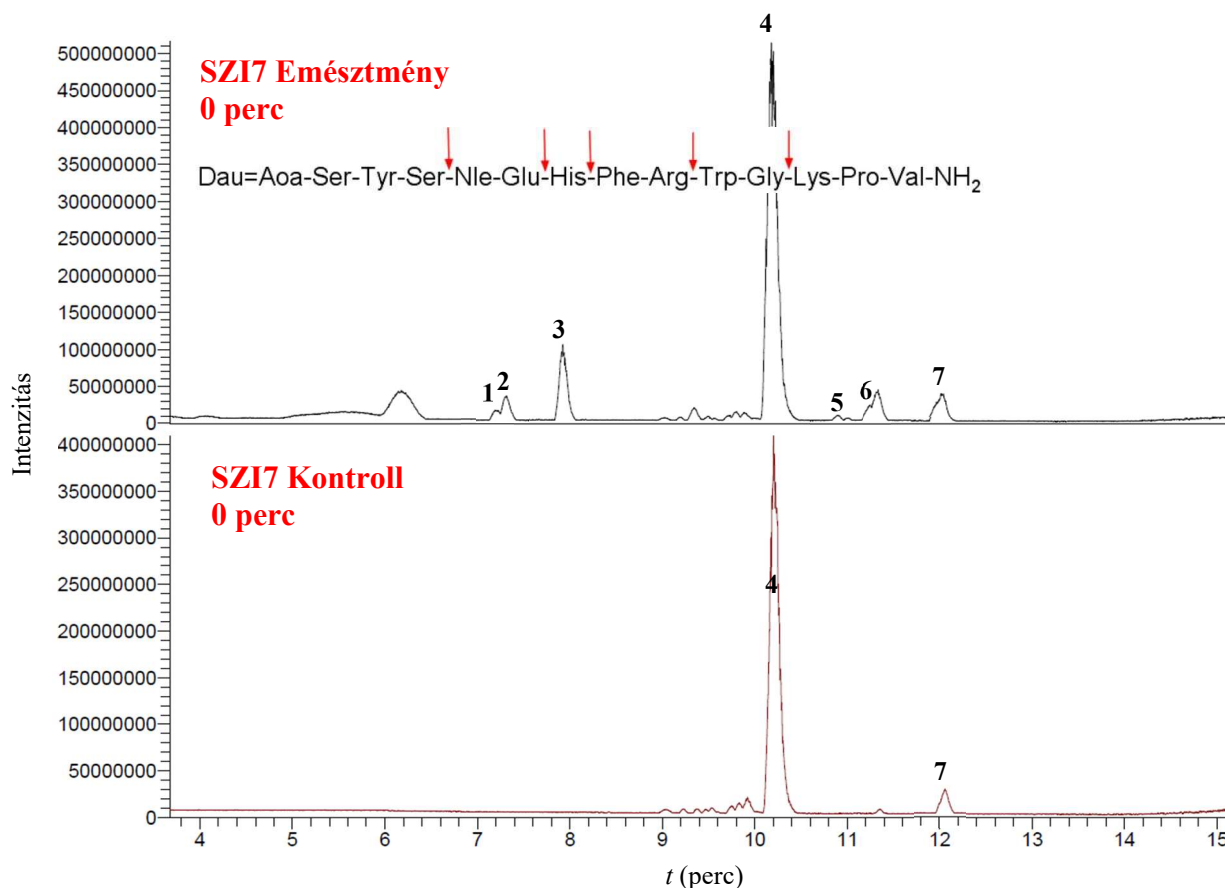
21. ábra: A kontroll mintákban az intakt PDC-k csúcsterületének változása. Nem tapasztaltam számottevő csökkenést, ami a PDC-k bomlására utalna pH=5,03 nátrium-acetát pufferben, 37 °C-on



22. ábra: Az SZI7 kontroll mintáról 0 perc, 1 óra, 6 óra, 24 óra, 72 óra elteltével felvett bázis ion kromatogramok. Nem jelentek meg új kromatográfias csúcsok

6.2.2.) A konjugátumok lebomlásának vizsgálata lizoszóma preparátumban

A PDC-k lizoszomális metabolizmusának nyomonkövetésére a lizoszóma preparátummal inkubált mintából adott időközönként mintát vettem, és HPLC-MS vizsgálatnak vettem alá. A különböző kötés -és szubsztrát specificitású lizoszomális enzimek közül a peptidkötést hasító katepszinek vettek részt döntően a PDC-k lebontásában. A katepszinek nem szelektív endo- és/vagy exopeptidáz lévén szinte az összes aminosav mellett képesek voltak elhasítani a lineáris irányító peptidet. Viszont az aminosav és a peptid megfelelő amino-csoportja között kialakított amidkötést, illetve az aminosav és a Dau közötti oxim kötést nem tudták elhasítani. Ennek eredményeképp a legkisebb Dau tartalmú metabolit tartalmazta az aminosav-acetil molekularészletet, és az ehhez kapcsolt lizint vagy szerint is: $H-K(-Aoa=Dau)-OH$ (9. ábra) és $Dau=Aoa-S-OH$.



23. ábra: 0 perc elteltével az SZI7 lizoszomális emésztmény és a kontroll minta bázis ion kromatogramjai. A 4-es csúcs az intakt konjugátum (RT=10,2 perc), 7-os csúcs a kontrollban szintén megtalálható Dau (RT=12,0 perc). Az azonosított metabolitokat a 7. táblázatban soroltam fel.

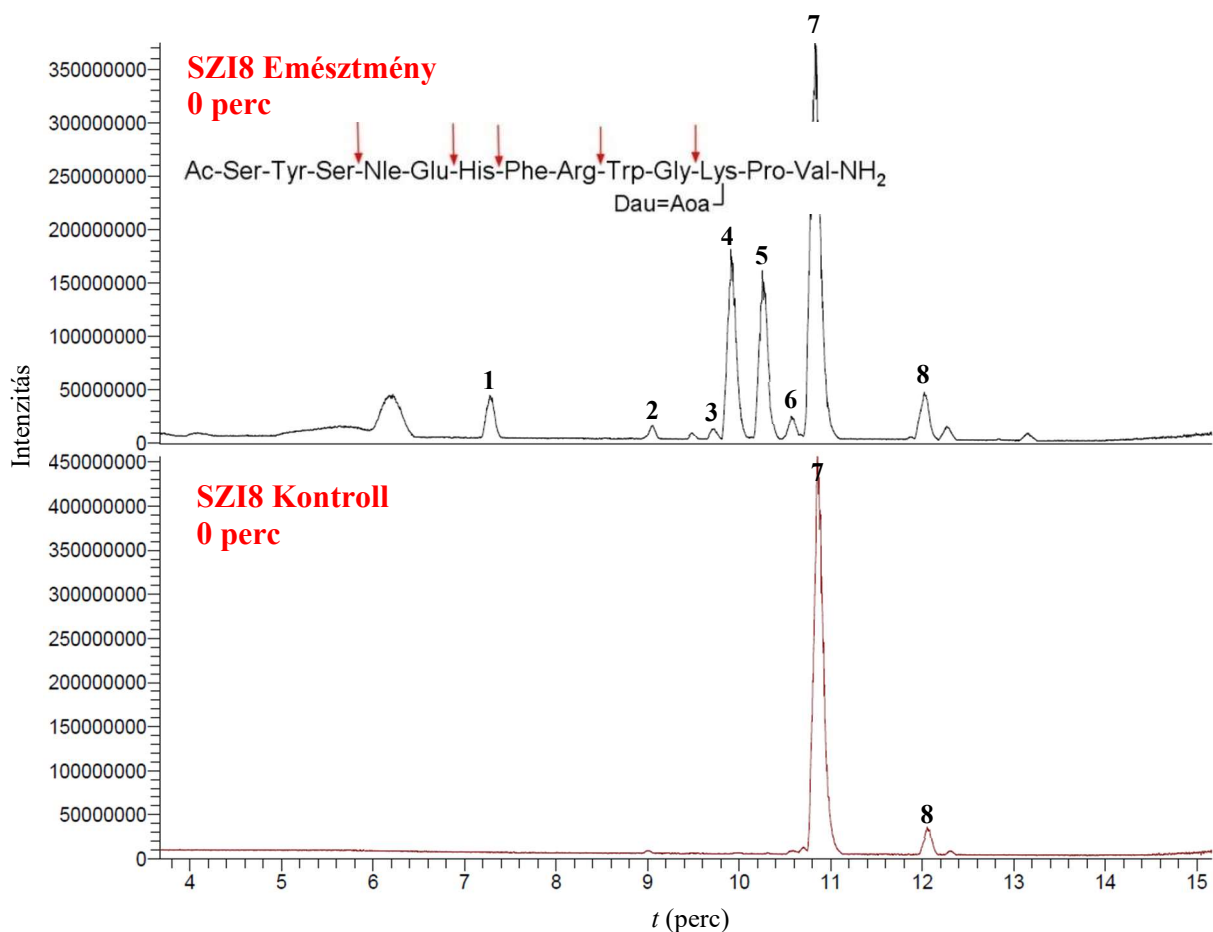
7. táblázat: 0 perc elteltével a lizoszomális enzimek hatására az SZI7 PDC-ből keletkező metabolitok

Csúcs	Metabolit	RT (perc)
-	H-KPV-NH ₂	2,8
1	H-WGKPV-NH ₂	7,2
2	H-HFRWGKPV-NH ₂	7,3
3	H-FRWGKPV-NH ₂	7,9
3	H-NleEHFRWGKPV-NH ₂	7,9
4	intakt SZI7	10,2
4	Dau=Aoa-SYSNleEHFR-OH	10,3
5	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWG-OH	10,9
6	Dau=Aoa-SYS-OH	11,2

A reakcióelegy összemérése után legnagyobb mennyiségben még az intakt konjugátumok voltak jelent, azonban rögtön megkezdődött a proteázok általi lebontása is. Az SZI7 esetén először egy-egy endopeptidáz hatására a Ser³-Nle⁴ és a Gly¹⁰-Lys¹¹ kötések hasadtak el. Megjelent a Dau=Aoa-SYS-OH (6), és a komplementer H-NleEHFRWGKPV-NH₂ (3), illetve

a Dau=Aoa-SYSNleEHFRWG-OH (5), és a vele komplementer *H*-KPV-NH₂ (RT=2,8 perc) is (23. ábra). Emellett megjelentek az egy-két aminosavval rövidebb metabolitok, amik exopeptidázok hatására keletkeztek. A *H*-HFRWGKPV-NH₂ (2), és a *H*-FRWGKPV-NH₂ (3) feltételezhetően a *H*-NleEHFRWGKPV-NH₂-ből keletkezett, az *N*-terminálisról dipeptidet vagy tripeptidet lehasító enzimek hatására. A Dau=Aoa-SYSNleEHFR-OH (4) pedig valószínűsíthetően a Dau=Aoa-SYSNleEHFRWG-OH-ból keletkezett, a *C*-terminális dipeptid lehasításával. Ezeket a feltételezéseket alátámasztja a dolgozat 6.3. fejezetében tárgyalt proteomikai kísérlet, mellyel kimutattam ilyen aktivitású enzimek jelenlétét a lizoszóma preparátumban.

Az SZI8 PDC is azonos módon kezdett el bomlani, mint az SZI7. 0 perc elteltével a lizoszomális enzimek ugyanazokat a peptidkötéseket hasították el. Az endo- és exopeptidázok hatására öt különböző Dau tartalmú metabolit (3, 4, 5, 6) és három oligopeptid (1, 2, 5) keletkezett (24. ábra és 8. táblázat).

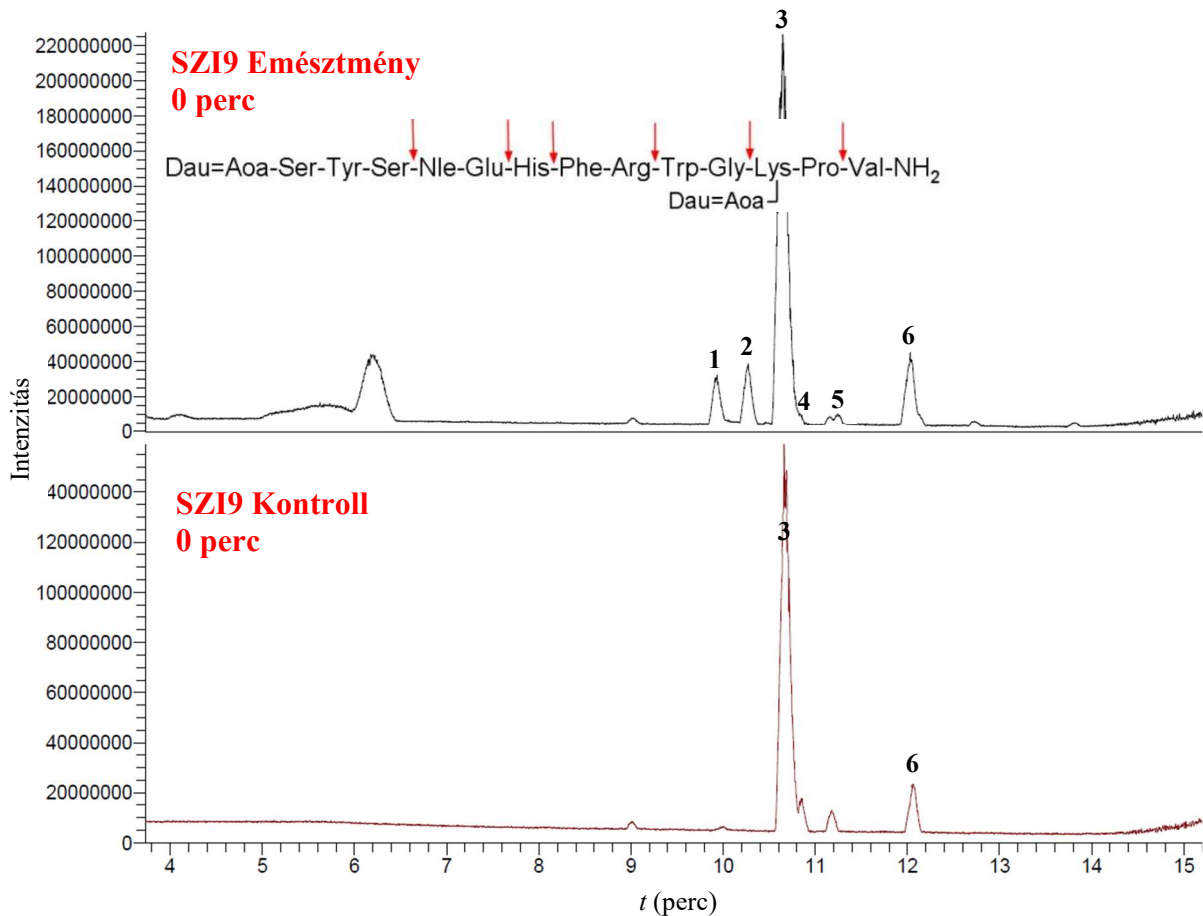


24. ábra: 0 perc elteltével az SZI8 lizoszomális emésztmény és a kontroll minta bázis ion kromatogramjai. 7-es csúcs az intakt konjugátum (RT=10,8 perc), 8-os csúcs a Dau, ami a kontrollban is megtalálható (RT=12,0 perc). Az azonosított metabolitokat a 8. táblázatban soroltam fel.

8. táblázat: 0 perc elteltével a lizoszomális enzimek hatására az SZI8 PDC-ből keletkező metabolitok

Csúcs	Metabolit	RT (perc)
1	Ac-SYS-OH	7,3
2	Ac-SYSNleEHFR-OH	9,1
3	H-HFRWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	9,7
4	H-NleEHFRWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	9,9
4	H-K(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,0
5	H-FRWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,3
5	Ac-SYSNleEHFRWG-OH	10,3
6	H-WGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,6
7	intakt SZI8	10,8

Az SZI9-et is az előző két PDC-vel azonos módon kezdték el a lizoszomális enzimek lebontani, azzal az egy különbséggel, hogy 0 perc elteltével már a Pro¹²-Val¹³ kötés hasadása is kimutatható volt a Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGK(Aoa=Dau)P-OH (3) metabolit megjelenésével (25. ábra és 9. táblázat).

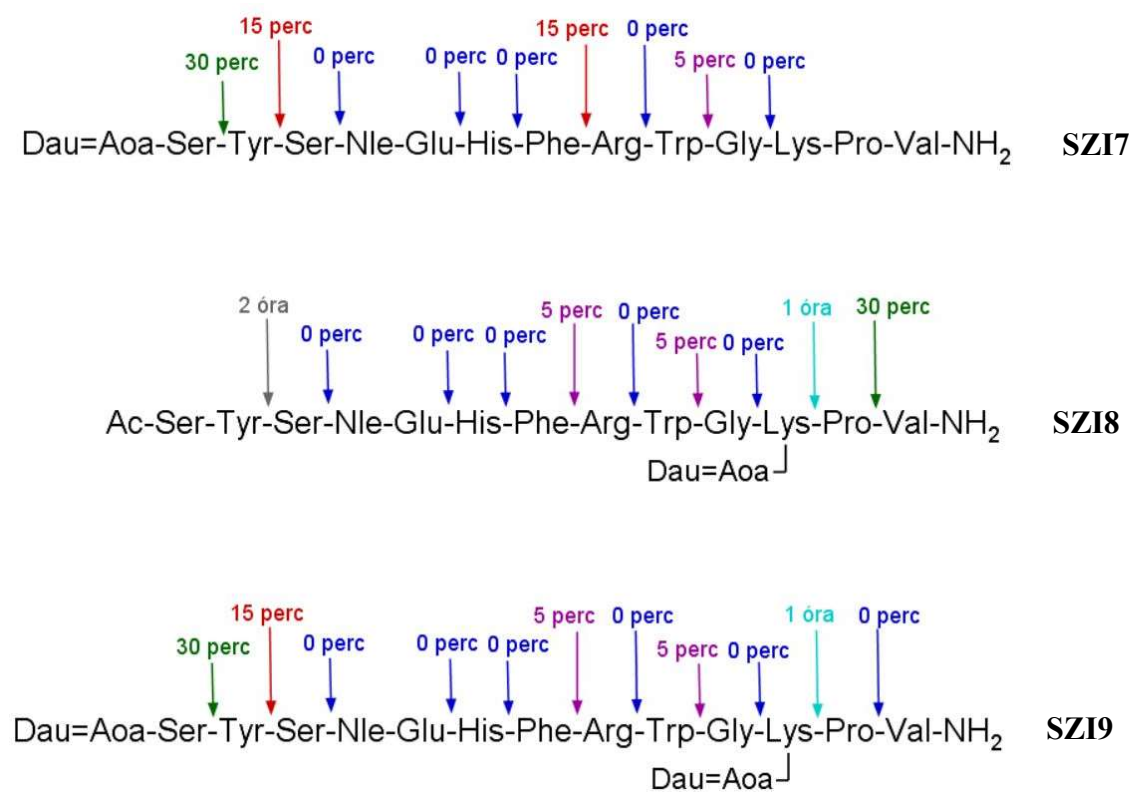


25. ábra: 0 perc elteltével az SZI9 lizoszomális emésztmény és a kontroll minta bázis ion kromatogramjai. 3-as csúcs az intakt konjugátum (RT=10,8 perc), 6-os csúcs a Dau, ami a kontrollban is megtalálható (RT=12,0 perc). Az azonosított metabolitokat a 9. táblázatban soroltam fel.

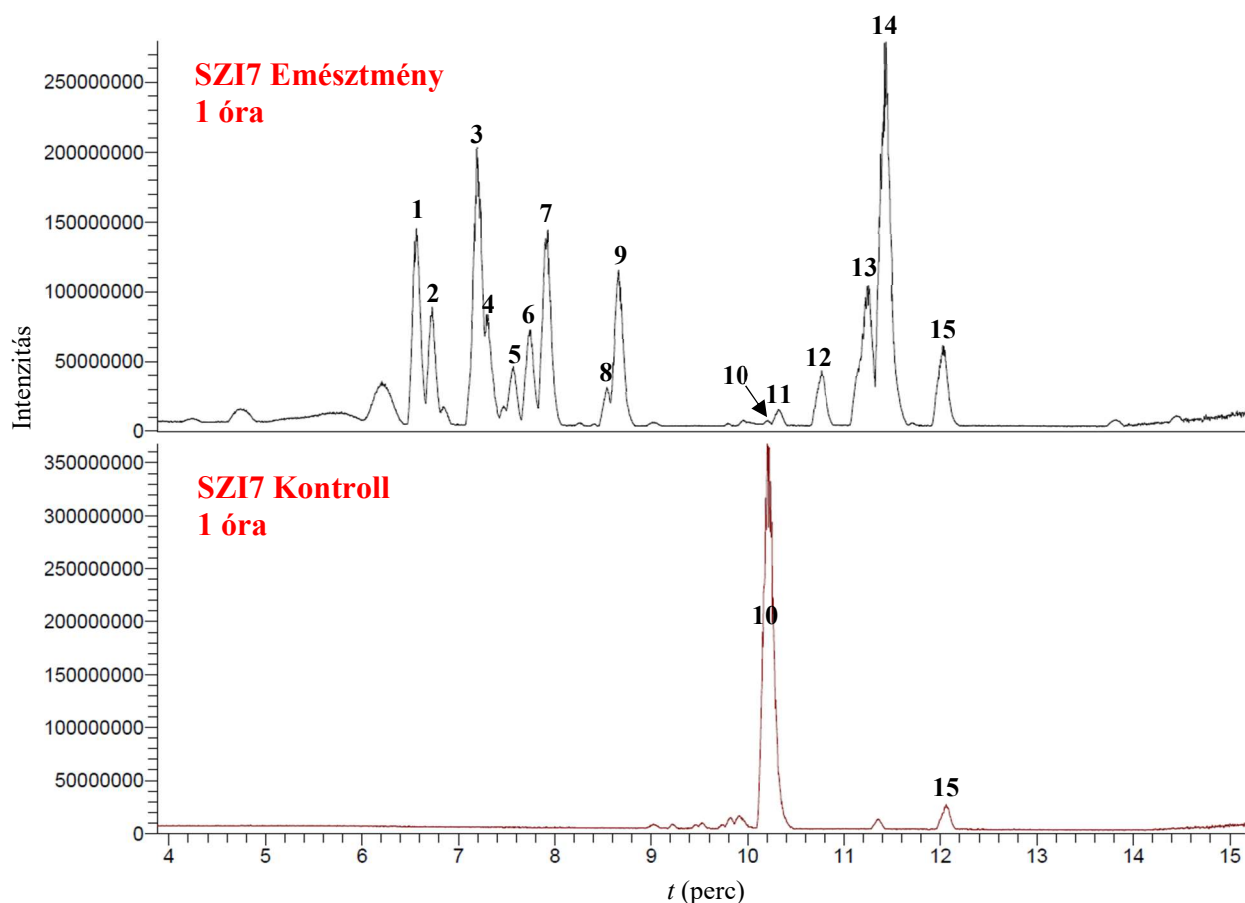
9. táblázat: 0 perc elteltével a lizoszomális enzimek hatására az SZI8 PDC-ből keletkező metabolitok

Csúcs	Metabolit	RT (perc)
1	H-NIeEHFRWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	9,9
1	H-K(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,0
2	H-FRWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,3
2	Dau=Aoa-SYSNIeEHFR-OH	10,3
3	H-WGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,6
3	intakt SZI9	10,7
3	Dau=Aoa-SYSNIeEHFRWGK(Aoa=Dau)P-OH	10,8
4	Dau=Aoa-SYSNIeEHFRWG-OH	10,9
5	Dau=Aoa-SYS-OH	11,2

A reakció kezdetétől számított 1 órán belül szinte az összes hasítható peptidkötés enzimatis bontása megkezdődött (26. ábra). Az intakt PDC-k mennyisége drasztikusan csökkent, miközben egyre rövidebb peptidláncú metabolitok jelentek meg az amino-di- és tripeptidázok, valamint a karboxi-mono- és dipeptidázok hatására (6.3. fejezet). Reprezentatív példaként az 1 óra reakcióidő után felvett, asszignált HPLC-MS kromatogramokat mutatom be a 27-28. ábrákon.



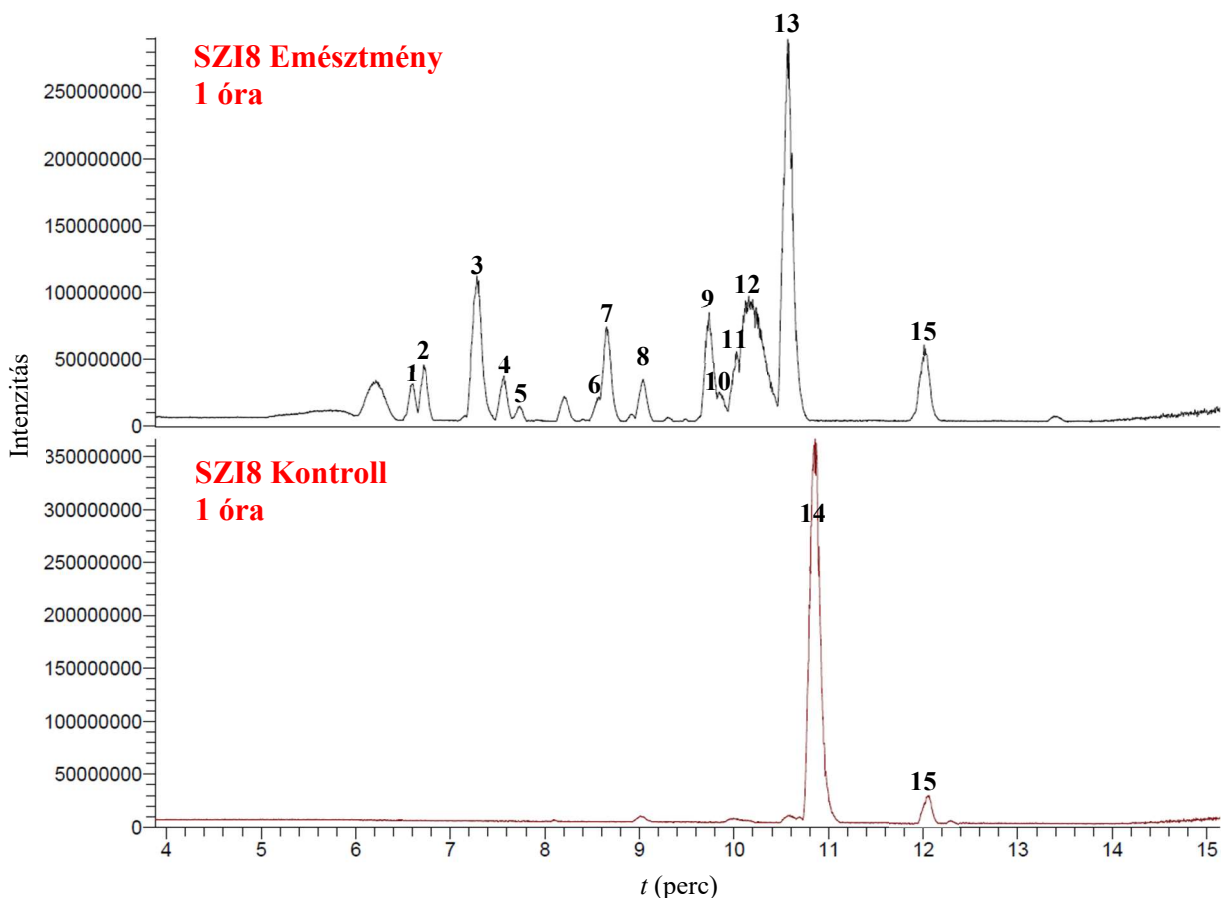
26. ábra: A lizoszóma preparátummal való kezelés során enzimatisan hasított peptidkötések az SZI7, SZI8 és SZI9 PDC-
khen



27. ábra: 1 óra elteltével az SZI7 lizoszomális emésztmény és a kontroll minta bázis ion kromatogramjai. Az intakt konjugátumból (10-es csúcs, RT=10,2 perc) már alig van. A 15-ös csúcs a Dau, ami a kontrollban is megtalálható (RT=12,0 perc). Az azonosított metabolitokat a 10. táblázatban soroltam fel.

10. táblázat: 1 óra elteltével a lizoszomális enzimek hatására az SZI7-ből keletkező metabolitok

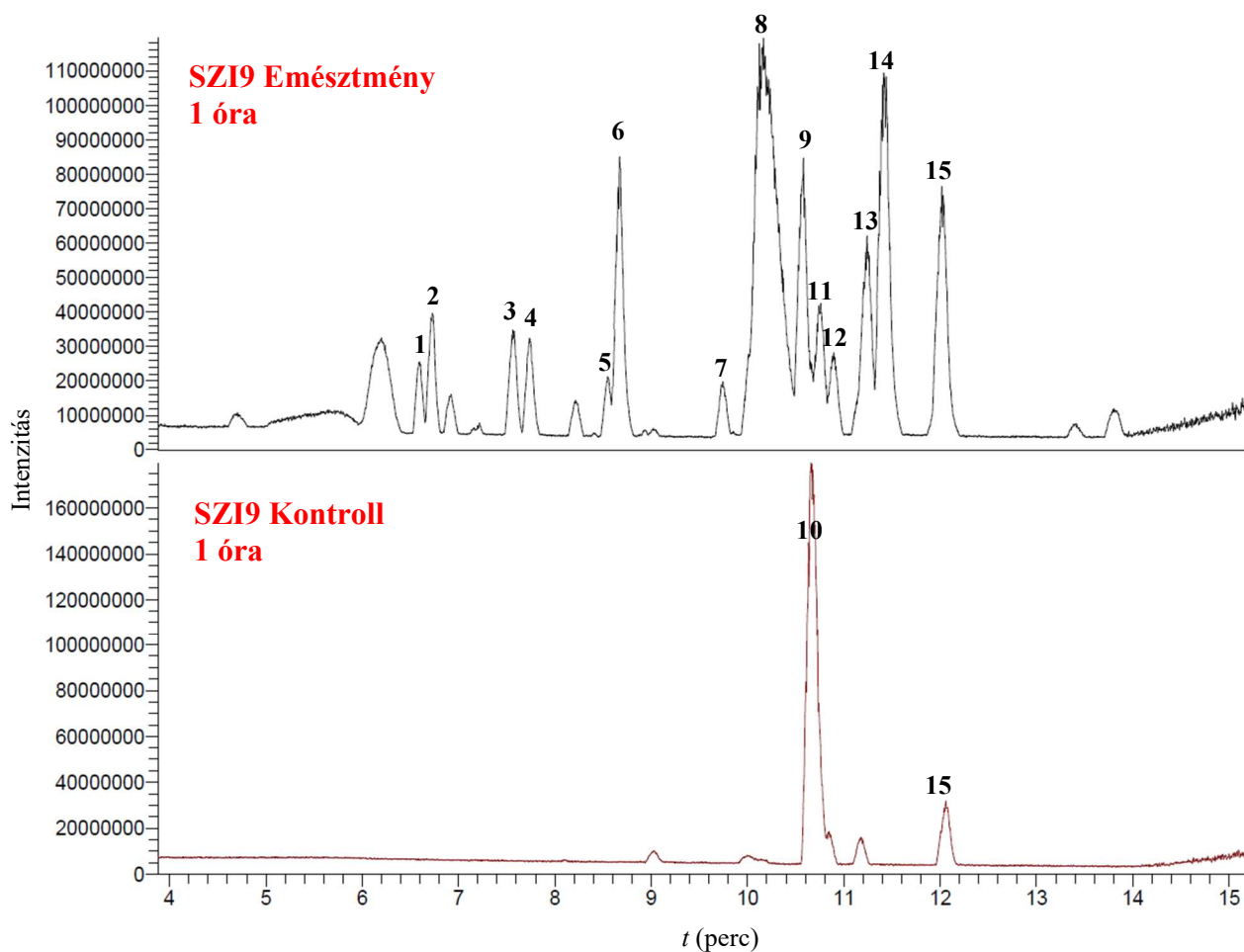
Csúcs	SZI7 Metabolit L1	RT (perc)
1	H-RWGKPV-NH ₂	6,6
2	H-NleEHFR-OH	6,7
3	H-WGKPV-NH ₂	7,2
4	H-HFRWGKPV-OH	7,3
5	H-WG-OH	7,6
6	H-HFRWG-OH	7,7
7	H-NleEHFRWGLPV-NH ₂	7,9
7	H-FRWGKPV-NH ₂	7,9
8	H-NleEHFRWG-OH	8,5
9	H-FRWG-OH	8,7
10	intakt SZI7	10,2
11	Dau=Aoa-SYSNleEHFR-OH	10,3
12	Dau=Aoa-SYSNleEH-OH	10,8
12	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWG-OH	10,9
13	Dau=Aoa-S-OH	11,2
13	Dau=Aoa-SYS-OH	11,2
14	Dau=Aoa-SY-OH	11,4



28. ábra: 1 óra elteltével az SZI8 lizoszomális emésztmény és a kontroll minta bázis ion kromatogramjai. Az intakt konjugátum még kis mennyiségben kimutatható. A 15-ös csúcs a Dau, ami a kontrollban is megtalálható (RT=12,0 perc). Az azonosított metabolitokat a 11. táblázatban soroltam fel.

11. táblázat: 1 óra elteltével a lizoszomális enzimek hatására az SZI8-ból keletkező metabolitok

Csúcs	SZI8 Metabolit L1	RT (perc)
1	H-RWG-OH	6,6
2	H-NleEHFR-OH	6,7
3	Ac-SYS-OH	7,3
4	H-WG-OH	7,6
5	H-HFRWG-OH	7,7
6	Ac-SYSNleEH-OH	8,5
6	H-NleEHFRWG-OH	8,5
7	H-FRWG-OH	8,6
8	Ac-SYSNleEHFR-OH	9,0
9	H-RWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	9,7
10	H-RWGK(Aoa=Dau)-OH	9,8
11	H-RWGK(Aoa=Dau)P-OH	9,9
12	H-GK(Aoa=Dau)-OH	10,0
12	H-GK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,0
12	H-K(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,0
12	H-K(Aoa=Dau)P-OH	10,2
12	H-FRWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,3
13	H-WGK(Aoa=Dau)-OH	10,6
13	H-WGK(Aoa=Dau)P-OH	10,6
13	H-WGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,6



29. ábra: 1 óra elteltével az SZI9 lizoszomális emésztmény és a kontroll minta bázis ion kromatogramjai. Az intakt PDC (10-es csúcs, RT=10,7 perc) még jelentős mennyiségben van jelen. A 15-ös csúcs a Dau, ami a kontrollban is megtalálható (RT=12,0 perc). Az azonosított metabolitokat a 12. táblázatban soroltam fel.

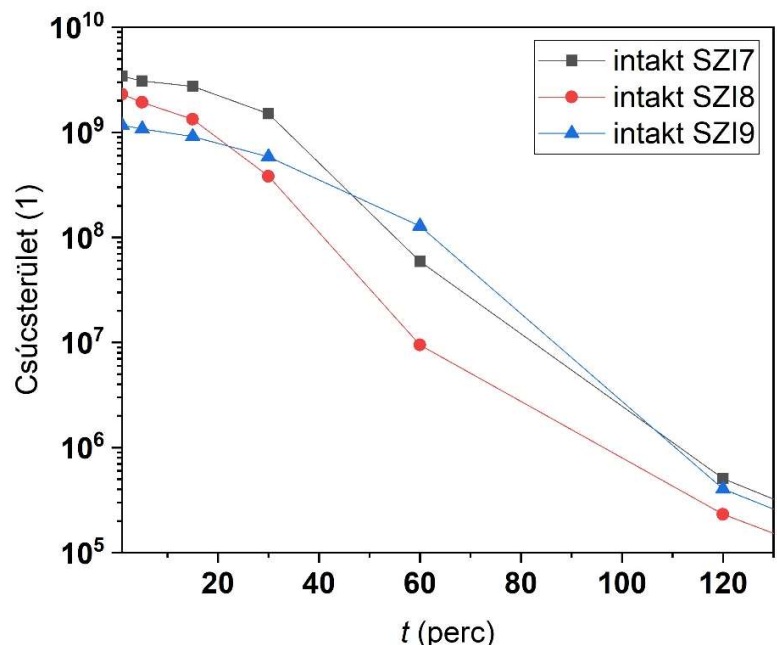
12. táblázat: 1 óra elteltével a lizoszomális enzimek hatására az SZI9-ből keletkező metabolitok

Csúcs	SZI9 Metabolit L1	RT (perc)
1	H-RWG-OH	6,6
2	H-NleEHFR-OH	6,7
3	H-WG-OH	7,6
4	H-HFRWG-OH	7,7
5	H-NleEHFRWG-OH	8,5
6	H-FRWG-OH	8,7
7	H-HFRWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	9,7
7	H-RWGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	9,7
7	H-HFRWGK(Aoa=Dau)P-OH	9,8
7	H-HFRWGK(Aoa=Dau)-OH	9,8
7	H-GK(Aoa=Dau)-OH	9,8

12. táblázat: (Folytatás) 1 óra elteltével a lizozomális enzimek hatására az SZI9-ből keletkező metabolitok

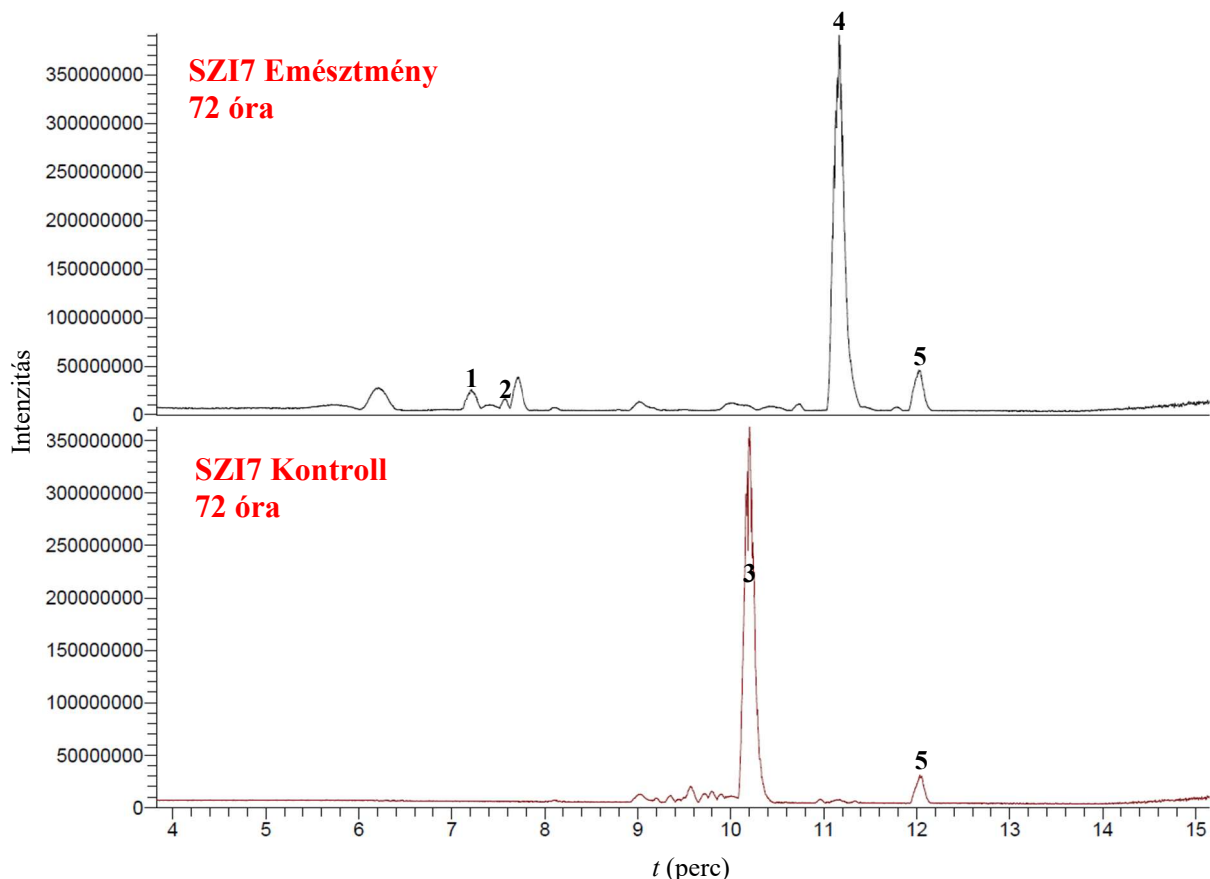
Szám	SZI9 Metabolit L1	RT (perc)
8	H-K(Aoa=Dau)PV-OH	10,0
8	H-GK(Aoa=Dau)PV-OH	10,0
8	H-GK(Aoa=Dau)P-OH	10,1
8	H-K(Aoa=Dau)P-OH	10,2
8	H-FRWGK(Aoa=Dau)PV-OH	10,3
8	Dau=Aoa-SYSNleEHFR-OH	10,3
8	H-FRWGK(Aoa=Dau)P-NH ₂	10,4
9	H-WGK(Aoa=Dau)-OH	10,5
9	H-K(Aoa=Dau)-OH	10,5
9	H-WGK(Aoa=Dau)P-OH	10,6
9	H-WGK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,6
10	intakt SZI9	10,7
11	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGK(Aoa=Dau)-OH	10,7
11	Dau=Aoa-SYSNleEH-OH	10,8
11	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGK(Aoa=Dau)P-OH	10,8
12	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWG-OH	10,9
13	Dau=Aoa-S-OH	11,2
13	Dau=Aoa-SYS-OH	11,2
13	Dau=Aoa-SYSNleEHF-OH	11,3
14	Dau=Aoa-SY-OH	11,4

Az enzimátikus kezelés hatására az intakt SZI7 és az SZI8 tűnt el a leghamarabb a mintából. 1 óra alatt a csúcsterületük nagyjából az 1%-ára csökkent a reakció elindítása után közvetlenül mérthez képest. Ugyanebben az időpontban az intakt SZI9-nek még nagyjából 10%-a jelen volt. Viszont 2 óra kezelési idő elegendő volt, hogy mindhárom intakt konjugátum gyakorlatilag eltűnjön a mintákból (30. ábra).



30. ábra: Az intakt konjugátumok lizozomális emésztés hatására bekövetkező csúcsterület változása. 2 óra emésztés után mindhárom konjugátum gyakorlatilag eltűnt a mintából

Az utolsó mintát 72 óra reakcióidő után vettem. Ennyi idő elég volt az SZI7 teljes mennyiségének lebontására. Néhány oligopeptid mellett, a Dau tartalmú metabolitok közül már csak egyetlen egy, a Dau=Aoa-S-OH volt jelen (31. ábra és 13. táblázat).



31. ábra: 72 óra elteltével az SZI7 lizoszomális emésztmény és a kontroll minta bázis ion kromatogramjai. Az intakt SZI7 (3) már nem kimutatható az emésztményben. Az egyetlen Dau tartalmú metabolit a Dau=Aoa-S-OH (4). Az 5-ös csúcs a Dau, ami a kontrollban is megtalálható (RT=12,0 perc). Az azonosított metabolitokat a 13. táblázatban soroltam fel

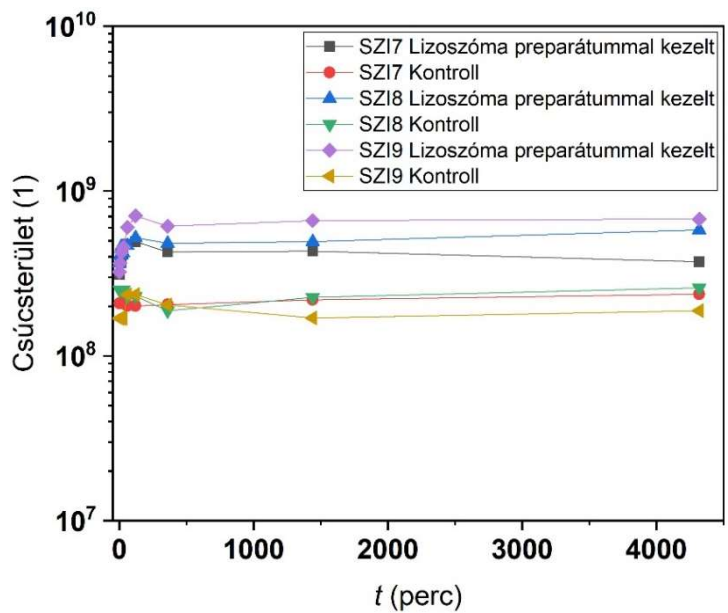
13. táblázat: 72 óra elteltével a lizoszomális enzimek hatására az SZI7-ből keletkező metabolitok

Csúcs	SZI7 Metabolit L72	RT (perc)
1	H-WGKPV-NH ₂	7,2
2	H-WG-OH	7,6
4	Dau=Aoa-S-OH	11,2

A mintában szennyezőként eleve jelen lévő Dau csúcsterülete a lizoszomális emésztés során nagyságrendileg nem nőtt, amiből arra következtettem, hogy a lizoszomális enzimek nem képesek az oxim kötést hasítani. Ez egybevágott az irodalmban fellelt korábbi eredményekkel [28]. A szabad daunomicin csúcsterületének időbeli alakulása a 32. ábrán látható. Ugyan a kontroll mintához képest az emésztményben némileg nagyobb csúcsterületet mértem az összes mérési pontban, azonban ezt a két minta eltérő összetétele okozhatja: Az

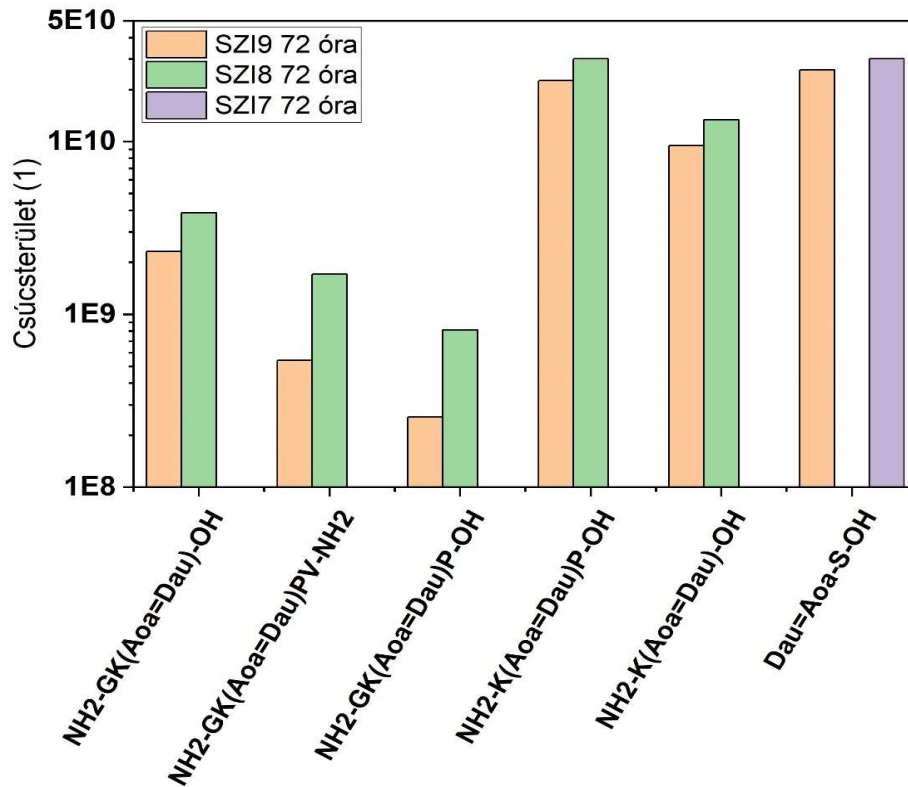
emésztményben jelen lévő lizoszomális fehérjék befolyásolhatják a Dau ionizációjának mértékét és esetleges kitapadását a reakcióhoz használt műanyag cső falára.

32. ábra: A szabad Dau csúcsterületének időbeli változása a lizoszomális emésztményekben és a kontroll mintákban. Oxim kötést hasító enzim hiányára utalt, hogy a Dau csúcsterülete nem nőtt nagyságrendekkel. Az emésztményekben mért nagyobb Dau csúcsterületet a kontroll minta és a lizoszomális emésztmény eltérő összetétele okozhatja.



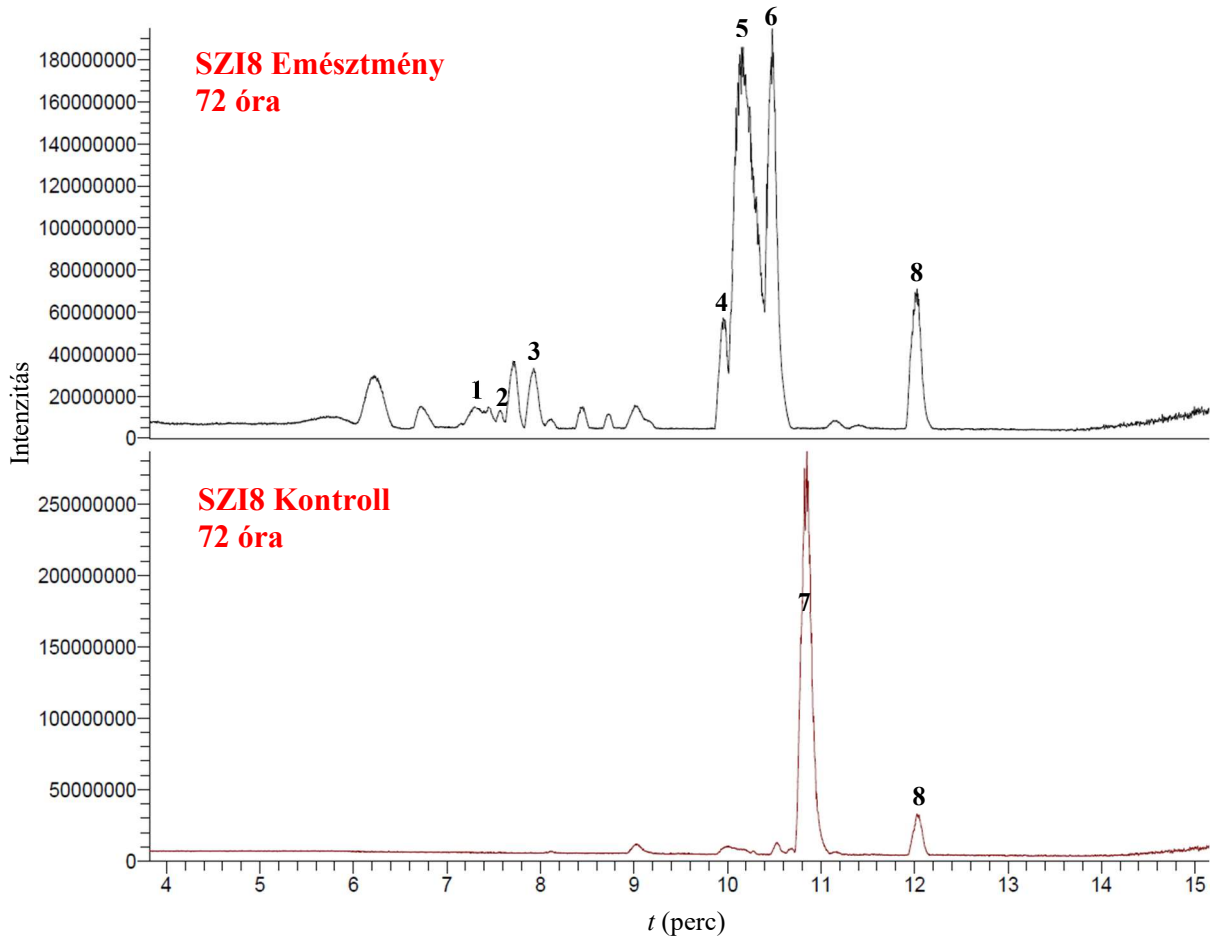
Az SZI7-el ellentétben, 72 óra nem volt

elég az SZI8 teljes mennyiségének $H-K(Aoa=Dau)-OH$ -ig való lebontására. Mellette még 5 másik, szintén Dau tartalmú, de pár aminosavval hosszabb peptidláncú metabolit is jelen volt, nem elhanyagolható mennyiségben: csúcsterületük összemérhető volt a $H-K(Aoa=Dau)-OH$ -éval (34. ábra). Koelúciójuk miatt ez nem látszik jól a 34. ábra kromatogramján, ezért a 33. ábrán, oszlop diagramként mutatom be a 72 órás emésztés után maradt Dau tartalmú



33. ábra: 72 órás lizoszóma preparátummal való inkubálás után maradt Dau tartalmú metabolitok egymáshoz viszonyított csúcsterülete az SZI7, SZI8 és SZI9 mintákban

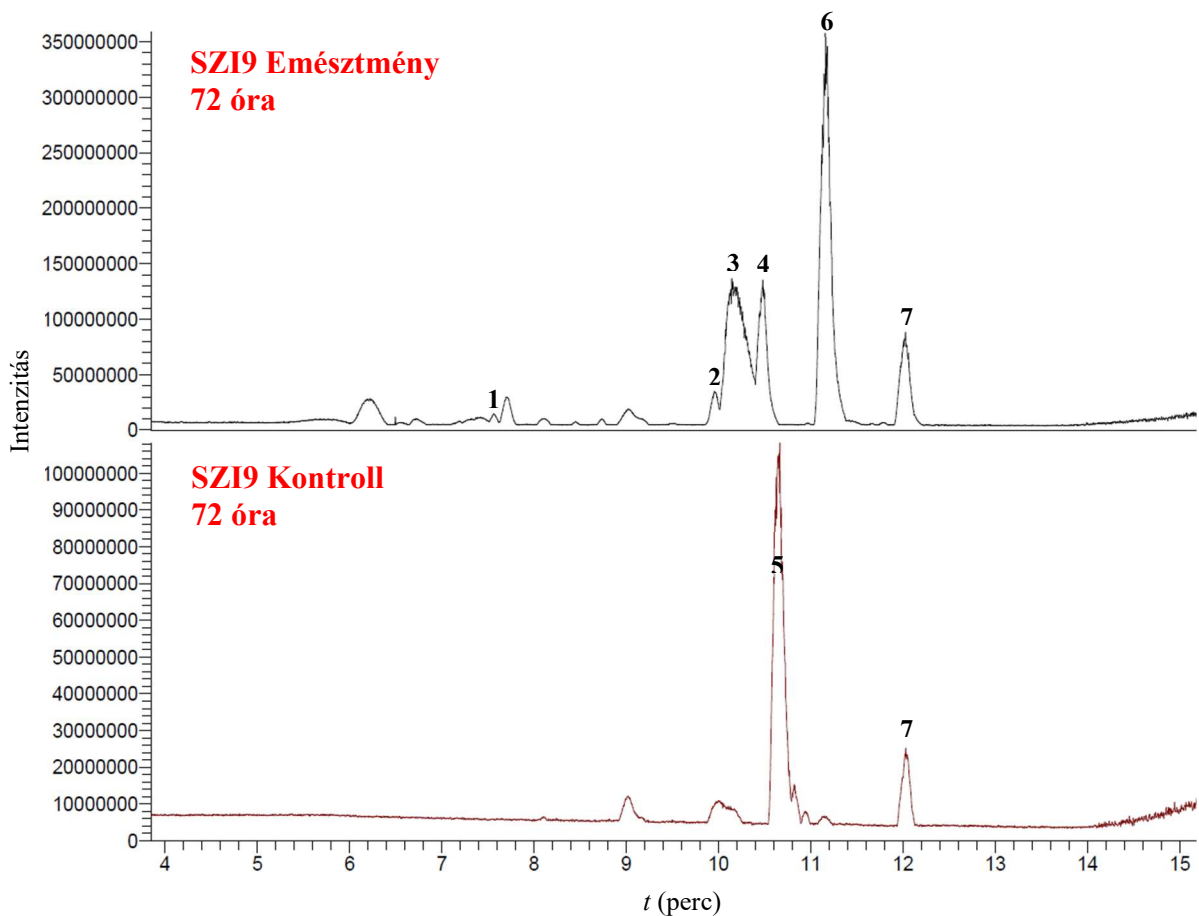
metabolitok egymáshoz viszonyított csúcsterületét. Ezen világosan látszik, hogy az $H-K(Aoa=Dau)P-OH$ még hasonló mennyiségben van jelen, mint az $H-K(Aoa=Dau)-OH$, az SZI8 és SZI9 mintákban is.



34. ábra: 72 óra elteltével az SZI8 lizoszomális emésztmény és a kontroll minta bázis ion kromatogramjai. Az intakt SZI8 (7) már nem kimutatható az emésztményben. Az $NH_2-K(Aoa=Dau)-OH$ -n kívül a 14. táblázatban felsorolt Dau tartalmú metabolitok is jelentős mennyiségben megtalálhatók az emésztményben. Az 8-as csúcs a Dau, ami a kontrollban is megtalálható (RT=12,0 perc).

14. táblázat: 72 óra elteltével a lizoszomális enzimek hatására az SZI8-ből keletkező metabolitok

Csúcs	SZI8 Metabolit L72	RT (perc)
1	Ac-SYS-OH	7,3
2	H-WG-OH	7,6
3	Ac-SY-OH	7,9
4	H-GK(Aoa=Dau)-OH	10,0
4	H-GK(Aoa=Dau)P-OH	10,0
4	H-GK(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,0
4	H-K(Aoa=Dau)PV-NH ₂	10,0
5	H-K(Aoa=Dau)P-OH	10,2
6	H-K(Aoa=Dau)-OH	10,5



35. ábra: 72 óra elteltével az SZI9 lizoszomális emésztmény és a kontroll minta bázis ion kromatogramjai. Az intakt SZI9 (5) már nem kimutatható az emésztményben. A $\text{Dau}=\text{Aoa-S-OH}$ -n és a $\text{NH}_2\text{-K}(\text{Aoa}=\text{Dau})\text{-OH}$ -n kívül a 15. táblázatban felsorolt Dau tartalmú metabolitok is jelentős mennyiségben megtalálhatók az emésztményben. Az 7-es csúcs a Dau, ami a kontrollban is megtalálható ($\text{RT}=12,0$ perc).

15. táblázat: 72 óra elteltével a lizoszomális enzimek hatására az SZI9-ből keletkező metabolitok

Szám	SZI9 Metabolit L72	RT (perc)
1	$H\text{-WG-OH}$	7,6
2	$H\text{-GK}(\text{Aoa}=\text{Dau})\text{-OH}$	10,0
2	$H\text{-GK}(\text{Aoa}=\text{Dau})\text{PV-NH}_2$	10,0
2	$H\text{-GK}(\text{Aoa}=\text{Dau})\text{P-OH}$	10,0
3	$H\text{-K}(\text{Aoa}=\text{Dau})\text{P-OH}$	10,2
4	$H\text{-K}(\text{Aoa}=\text{Dau})\text{-OH}$	10,5
6	$\text{Dau}=\text{Aoa-S-OH}$	11,2

A két Dau molekulával konjugált SZI9 esetében ugyanazt tapasztaltam, mint az SZI7-nél és SZI8-nál. 72 óra alatt az irányító peptid C-terminális része hasonlóan az SZI7-hez teljesen lebomlott $\text{Dau}=\text{Aoa-S-OH}$ -ig. Viszont az SZI8-hoz hasonlóan, az $H\text{-K}(\text{Aoa}=\text{Dau})\text{-OH}$ mellett még hosszabb peptidláncú metabolitok is jelen voltak (33. és 35. ábrák, 15. táblázat).

Az SZI8 és SZI9 esetében tapasztalt lassabb lebomlás nem meglepő, hisz a a Lys¹¹ után közvetlenül egy Pro¹² következik a peptid szekvenciában. A prolin szekunder β-amino-csoportjával kialakított peptidkötéshez a peptidáz enzimek általában nehezen férnek hozzá. Mindazonáltal, a Lys¹¹-Pro¹² kötés hasítása megtörténik, és a lassabb lizoszomális lebomlás se jelent problémát egy peptid-hatóanyag konjugátumnál.

Összességében, a konjugátumokból nem tudott szabad Dau felszabadulni a vizsgált, lizoszomális közeget modellező körülmények között. Ezért lényeges kérdés, hogy vajon a konjugátumokból keletkező legkisebb Dau tartalmú metabolitok, a Dau=Aoa-S-OH és az H-K(Aoa=Dau)-OH milyen affinitással kötődnek a DNS-hez, ugyanis ez döntően meghatározza a konjugátumok citotoxikus hatékonyságát. *Orbán és munkatársai* már végeztek ilyen vizsgálatokat a H-K(Aoa=Dau)-OH-val és a Dau=Aoa-G-OH-val is [28]. Megállapították, hogy ezek a metabolitok nagyjából fele akkora affinitással kötnek a DNS-hez, mint a szabad hatóanyag. Ez a különbség nem szignifikáns, és a PDC citosztatikus hatékonysága tovább javítható például két Dau molekula konjugálásával. Azonban a Dau=Aoa-S-OH metabolittal még nem végeztek DNS-kötés vizsgálatokat.

Eddig csak a konjugátumok proteázok általi lebontásáról volt szó, mivel ez volt a legjelentősebb folyamat, azonban kis mértékben kimutatható volt a lizoszóma preparátumban lévő glikozidázok aktivitása is. Az SZI7-ből, SZI8-ből és SZI9-ből keletkező Dau=Aoa-S-OH és H-K(Aoa=Dau)-OH metabolitoknak sikerült kimutatnom az enzimatikusan „cukorvesztett” formáját is 72 óra emésztés után. A cukorvesztett formák retenciós ideje rendre 13,7 -és 12,2 perc volt. A daunózamin enzimek általi lehasítása, illetve az ESI ionforrásban történő letörése ugyanakkora pontostömegű molekulákat eredményez, viszont az enzimatikusan „cukorvesztett” és nem „cukorvesztett” formák kromatográfiásan elváltak egymástól, ezért az enzimátikus „cukorvesztést” egyértelműen meg lehetett különböztetni a forrásban történt fragmentációs folyamattól. A metabolit biológiai aktivitása a „cukorvesztés” hatására feltételezhetően sokat csökken, mivel a daunozamin molekularészlet amino- és hidroxil-csoportja is H-hidas kölcsönhatással részt vesz a DNS-kötésben. Szerencsére csak nagyon kis mennyiségben keletkeztek, csúcsterületük csak egy-két százaléka volt a „nem cukorvesztett” formáénak.

6.3.) Lizoszóma preparátum fehérje összetétele

A konjugátumok lizoszomális metabolizmusának értelmezésében segítséget jelent a lizoszóma preparátumban található enzimek szubsztrát -és kötés specificitásának ismerete. Ezért egy tömegspektrometrián alapuló proteomikai kísérletet végeztem a lizoszóma preparátumban található fehérjék azonosítása céljából. A kísérlethez a bottom-up stratégiát alkalmaztam, ezért a lizoszóma preparátumban található fehérjéket nem kellett egymástól elválasztani, az elegyet egyszerre lehetett peptidekké emészteni. A minta-előkészítés során legelőször ditiotreitollal redukáltam a fehérjékben előforduló diszulfid-hidakat, majd spontán visszaoxidálódásuk megakadályozására a kialakított szulhidril-csoportokat jódacetamiddal alkileztem. Ezután következett a polipeptid láncok kisebb peptidekké való enzimátikus emésztése. Ezt két lépésben végeztem. Előbb LysC és tripszin keverékével rövidebb ideig „előemésztettem” a polipeptideket, hogy a második lépésben hosszabb ideig alkalmazott tripszin lehetőleg minden hasítási helyhez hozzáférjen. A LysC specifikusan a lizinek C-terminálisánál, a tripszin pedig a lizinek és argininek C-terminálisánál hasítja a peptidkötést, kivéve, ha a peptidláncban prolin következik. A HPLC-MS/MS mérés előtt a mintát C18 spin oszlopon sóalanítottam és előtisztítottam, a minél érzékenyebb és megbízhatóbb fehérje azonosítás érdekében.

A triptikus emésztéssel kapott peptidek alapján adatbázis kereséssel történt az eredeti fehérjék azonosítása. Az alkalmazott keresési feltételek mellett összesen 56 féle fehérjét azonosítottam a lizoszóma preparátumban, azonban ezek döntő része az izolálás során szennyezőként megkerülhetetlenül bekerülő fehérje volt. Például a vérből származó hemoglobin α - és β -alegység, a szérum albumin, illetve számos mitokondriális fehérje. Utóbbiak bekerülésének oka a lizoszóma preparátum izolációs eljárásában keresendő. Az első lépésben alkalmazott centrifugálás során a mitokondriumok és lizoszómák egy frakcióba tömörülnek, majd a második lépésben alkalmazott sűrűség-gradiens centrifugálással se lehet tökéletes szeparálás elérni.

A lizoszóma preparátumban azonosított, valóban lizoszomális enzimeket a 16. táblázatban összesítettem. A táblázatban feltüntetett sorrend az azonosítás jóságát jellemző adatbáziskeresési pontszám (Mascot score) felel meg. Az általam azonosított enzimek többsége endo- vagy exopeptidáz, de van köztük poliszacharidok monomerenkénti lebontására alkalmas exoglikozidáz, lipidek karbonsavészter kötésének hidrolízisére alkalmas foszfolipáz, és foszforil-csoport lehasítására alkalmas foszfatáz is. Az azonosított peptidázok

nem szelektíven hasítják a peptid-kötést, és az ismert funkciójuk jól magyarázza a vizsgált konjugátumok irányító peptidjének lebomlását.

16. táblázat: A lizoszóma preparátumban azonosított lizoszomális enzimek

Lizoszomális enzim	Mascot score	Funkció
Dipeptidil-peptidáz 1	372	amino-dipeptidáz
Karboxipeptidáz Q	342	endopeptidáz
Katepszin B	274	endopeptidáz és karboxi-dipeptidáz
β -glükuronidáz	239	exoglikozidáz
Foszfolipáz B-like 1	213	foszfolipáz A1 és A2 aktivitás
Katepszin D	211	endopeptidáz
Tripeptidil-peptidáz 1	184	amino-tripeptidáz
α -N-acetilgalactozaminidáz	155	exoglikozidáz
Serin carboxipeptidáz 1	151	karboxi-monopeptidáz
Katepszin Z	127	karboxi-mono- és dipeptidáz
β -hexózaminidáz	123	exoglikozidáz
Lizoszomális savas foszfatáz	100	foszfatáz

7.) Eredmények összefoglalása

A dolgozat első felében melanoma specifikus peptid-hatóanyag konjugátumok lizoszomális lebomlását modelleztem. A vizsgált konjugátumok aminosavakkal funkcionális α -MSH analóg irányító peptidből és daunomicin gyógyszer molekulából álltak, melyek között oxim kötést alakítottak ki. A kísérlet során patkány májból izolált lizoszóma preparátummal, pH=5 nátrium-acetát pufferben, 37°C-on inkubáltam a három vizsgált konjugátumot, melyből időnként mintát vettem. Az alkalmazott körülmények között a legjelentősebb folyamat az irányító peptid lebomlása volt. A Dau konjugációja során kialakított oxim kötés, valamint az aminosav és a peptid közötti amidkötés a kísérlet 72 óráján át stabil volt. Így szabad Dau nem tudott felszabadulni, a legkisebb Dau tartalmú metabolitok a Dau=Aoa-S-OH és a H-K(Aoa=Dau)-OH voltak. Az intakt PDC-k 2 óra emésztés után eltűntek a mintából, és 72 óra elég volt, hogy a teljes mennyiségük egészen Dau=Aoa-S-OH-ig lebomoljon. Ezzel szemben, a H-K(Aoa=Dau)-OH-ig való teljes lebomláshoz 72 óránál több időre van szükség. A konjugátumok citotoxikussága szempontjából nagyon fontos a legkisebb metabolitok DNS-kötő affinitása. A Dau=Aoa-S-OH molekula DNS-kötő affinitása nem, de a H-K(Aoa=Dau)-OH molekuláé ismert: nagyjából a fele a szabad hatóanyagénak. Ezt egybevéve az oxim kötés kedvező humán plazmabeli stabilitásával, az oxim kötéses konjugáció alkalmazása előnyös, ráadásul a konjugátum citotoxikus hatékonysága fokozható, ha az irányító peptidre több Dau molekulát konjugálnak. Az irodalmi adatok alapján a plazmabeli stabilitás érdekében az irányító peptid 7-es pozíciójú L-Phe-jét mindenképp érdemes D-Phe-ra cserélni, és a peptid ciklizációját is érdemes kipróbálni.

A dolgozat második részében a lizoszóma preparátumban található fehérjéket egy tömegspektrometrián alapuló proteomikai kísérlettel, bottom-up stratégiával azonosítottam. A kimutatott lizoszomális peptidázok funkciója összhangban van a konjugátumok lebomlásánál tapasztaltakkal: nem specifikus endo- és exopeptidázok végzik az irányító peptid lebontását.

Szakedolgozat összefoglaló

Peptid-hatóanyag konjugátumok stabilitásának vizsgálata lizoszomális közegben, LC-MS módszerrel

Kalmár Dorottya, vegyész mesterszakos hallgató

Készült: az ELTE TTK Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszékén és az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban

A védés helye: Analitikai Kémiai Tanszék

Témavezetők: **Dr. Schlosser Gitta** egyetemi adjunktus
ELTE Analitikai Kémiai Tanszék, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport
Dr. Szabó Ildikó tudományos munkatárs
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

A WHO jelentése alapján 2018-ban 9,6 millió ember halálát okozták rákos megbetegedések. Ezzel a világon a vezető halálokok között a rák jelenleg a második helyen szerepel. Egyes becslések szerint az új megbetegedések száma 2030-ra több, mint 70%-al fog emelkedni. Az adatok jól mutatják, hogy komoly szükség van újabb terápiás- és diagnosztikai szerek fejlesztésére, melyek alkalmasak a korai stádiumú daganatok kimutatására, és a rákos sejtek hatékony pusztítására. A kutatások egyik fő irányvonala a célzott tumorterápia, mely a konvencionális kemoterápiás szerekkel szemben, lehetővé teszi a rákos sejtek szelektív pusztítását, az egészséges szövetek károsítása nélkül.

Munkám során egy melanoma specifikus peptid-hatóanyag konjugátum sejtbejutását követő lizoszomális lebomlását modelleztem. A konjugátum *Ac-SYSNleEHFRWGKPV-NH₂* szekvenciájú irányító peptidből és daunomicin (Dau) hatóanyagból épült fel. A konjugáció érdekében az irányító peptid *N*-terminálisa, lizin oldallánca vagy mind a kettő aminosavval (Aoa) lett funkcionálizálva, melyhez a hatóanyagot oxim kötéssel kapcsolták. A konjugátum lizoszomális lebomlását patkány máj lizoszóma homogenátum jelenlétében, pH=5 nátrium-acetát pufferben, 37°C-on inkubálva modelleztem. Az időről-időre vett minták összetételét HPLC-MS módszerrel analizáltam, a metabolitokat pontos tömegük alapján azonosítottam. A legjelentősebb folyamat az irányító peptid lebomlása volt. Az oxim kötés stabilitása miatt, a szabad hatóanyag nem szabadult fel, így a konjugátum biológiai aktivitását meghatározó legkisebb daunomicin tartalmú metabolitok a *Dau=Aoa-Ser-OH* és a *H-K(-Aoa=Dau)-OH* voltak, melyek az aminosavak molekuláris részleteit, és a hozzá kapcsolódó egy aminosavat is tartalmazták. A *Dau=Aoa-Ser-OH* -ig való teljes lebomláshoz 72 óra elég volt, a *H-K(-Aoa=Dau)-OH* -ig való teljes degradációhoz több idő szükséges.

A konjugátumok lizoszomális metabolizmusának felderítése mellett az emésztéshez alkalmazott lizoszóma homogenátum fehérjeprofilját is meghatároztam. Ezt egy tömegspektrometrián alapuló proteomikai méréssel, bottom-up stratégiát alkalmazva végeztem. A konjugátumok lebontását végző specifikus endo- és exopeptidázok mellett egyéb lizoszomális enzimeket is azonosítottam.

Summary

LC-MS investigation of lysosomal metabolism of peptide-drug conjugates

Ms. Dorottya Kalmár, MSc student in Chemistry

Place of diploma work: Analytical Chemistry Department, MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry, Institute of Chemistry, ELTE Eötvös L. University, Budapest

Place of defence: Analytical Chemistry Department

Supervisors: **Dr. Schlosser Gitta** assistant professor
Analytical Chemistry Department, Institute of Chemistry, ELTE Eötvös L. University
MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry
Dr. Szabó Ildikó research assistant professor
MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry

Cancer is the second leading cause of death. According to the WHO's 2018 report, cancer caused the death of 9,6 million people worldwide. The appearance of new cases is projected to increase by more than 70%, by 2030. These data suggest, that novel diagnostic and therapeutical drugs are needed, which can detect early-stage malignant tumors, and are potent enough against cancerous cells. Targeted tumor therapy is in the focus of clinical researches. Contrary to conventional chemotherapy, it can selectively block the growth and spread of cancer.

Lysosomal degradation of three α -MSH based, melanoma specific PDCs were evaluated. The PDCs consist of *Ac-SYSNleEHFRWGKPV-NH₂* peptide as targeting unit and daunomycin (Dau) as cytotoxic drug. Peptide's *N*-terminus, the lysine side chain or both were functionalized with aminooxyacetic acid (Aoa), which was coupled with daunomycin through oxim-bond. The experiment was carried out in a model system, containing rat liver lysosome homogenate, buffered with pH=5 sodium-acetate buffer and incubated at 37 °C. Samples were taken from time-to-time, and were analyzed with LC-MS. Metabolites were identified based on their accurate molecular mass. The most significant process was the cleavage of the targeting peptide at various peptide bonds. Under the experimental conditions, the oxime bond was stable at least for 72 hours. Thus, the release of free drug is inhibited, and the smallest daunomycin containing metabolites, which define PDC's cytotoxicity, were *Dau=Aoa-S-OH* and *H-K(-Aoa=Dau)-OH*. In 72 hours PDCs could fully degrade to *Dau=Aoa-S-OH*, but not to *H-K(-Aoa=Dau)-OH*.

Beside the investigation of PDC's metabolism, I performed a mass spectrometry based proteomic experiment, to analyze the protein profile of the lysosomal homogenate. Using bottom-up strategy, I identified non-specific endo- and exopeptidases, that caused the degradation of the targeting peptide, and several other lysosomal enzymes.

10.) Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Schlosser Gittának a szakmai segítségét és a végtelen kedvességét. Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szabó Ildikónak a dolgozat írásakor nyújtott szakmai észrevételeit, valamint, hogy rendelkezésemre bocsájtotta a peptid-hatóanyag konjugátumokat. Köszönöm Szabó Dániel PhD hallgatónak a proteomikai minta-előkészítésben és kiértékelésben nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Drahos László kutatócsoport vezetőnek (MTA Természettudományi Kutatóközpont, MS Proteomikai Kutatócsoport) a proteomikai kiértékeléshez nyújtott tanácsait.

Köszönöm Dr. Orbán Erikának a lizoszóma preparátum elkészítését.

Köszönöm Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak, hogy munkámat lehetővé tette az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban.

A kutatást támogatta a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) a Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Program (NVKP_16-1-2016-0036) keretében.

A 2018-1.2.1-NKP-2018-00005 számú, HunProtExc Kiválósági Program projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a 2018-1.2.1-NKP pályázati program finanszírozásában valósult meg.

A kutatás az ELTE Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (1783-3/2018/FEKUTSRAT) keretében valósult meg az Emberi Erőforrások Minisztériuma támogatásával.

A VEKOP-2.3.3-15-2017-00020 projekt keretében folyó kutatásokat az Európai Unió és Magyarország Kormánya támogatta az Európai Regionális Fejlesztési Alap hozzájárulásával.

11.) Irodalomjegyzék

- [1] National Cancer Institute 2019, USA gov., accessed 12 April 2019, <<http://www.cancer.gov>>
- [2] E.I. Vrettos, G. Mező, A.G. Tzakos, On the design principles of peptide–drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site, *Beilstein journal of organic chemistry* 14(1) (2018) 930-954.
- [3] S.R. Denmeade, A.M. Mhaka, D.M. Rosen, W.N. Brennen, S. Dalrymple, I. Dach, C. Olesen, B. Gurel, A.M. DeMarzo, G. Wilding, Engineering a prostate-specific membrane antigen–activated tumor endothelial cell prodrug for cancer therapy, *Science translational medicine* 4(140) (2012) 140ra86-140ra86.
- [4] A. Accardo, L. Aloj, M. Aurilio, G. Morelli, D. Tesaro, Receptor binding peptides for target-selective delivery of nanoparticles encapsulated drugs, *International journal of nanomedicine* 9 (2014) 1537.
- [5] L.A. Landon, S.L. Deutscher, Combinatorial discovery of tumor targeting peptides using phage display, *Journal of cellular biochemistry* 90(3) (2003) 509-517.
- [6] P. Kapoor, H. Singh, A. Gautam, K. Chaudhary, R. Kumar, G.P. Raghava, TumorHoPe: a database of tumor homing peptides, *PLoS One* 7(4) (2012) e35187.
- [7] J.C. Reubi, Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy, *Endocrine reviews* 24(4) (2003) 389-427.
- [8] D. Böhme, A.G. Beck-Sickinger, Drug delivery and release systems for targeted tumor therapy, *Journal of Peptide Science* 21(3) (2015) 186-200.
- [9] L.-C. Sun, D. H Coy, Somatostatin receptor-targeted anti-cancer therapy, *Current drug delivery* 8(1) (2011) 2-10.
- [10] A. Regina, M. Demeule, C. Che, I. Lavallee, J. Poirier, R. Gabathuler, R. Beliveau, J.P. Castaigne, Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2, *British journal of pharmacology* 155(2) (2008) 185-197.
- [11] T.W. Moody, S.A. Mantey, T.K. Pradhan, M. Schumann, T. Nakagawa, A. Martinez, J. Fuselier, D.H. Coy, R.T. Jensen, Development of high affinity camptothecin-bombesin conjugates that have targeted cytotoxicity for bombesin receptor-containing tumor cells, *Journal of Biological Chemistry* 279(22) (2004) 23580-23589.
- [12] B. Tang, X. Yong, R. Xie, Q.-W. Li, S.-M. Yang, Vasoactive intestinal peptide receptor-based imaging and treatment of tumors, *International journal of oncology* 44(4) (2014) 1023-1031.
- [13] C. Falciani, B. Lelli, J. Brunetti, S. Pileri, A. Cappelli, A. Pini, C. Pagliuca, N. Ravenni, L. Bencini, S. Menichetti, Modular branched neurotensin peptides for tumor target tracing and receptor-mediated therapy: a proof-of-concept, *Current cancer drug targets* 10(7) (2010) 695-704.
- [14] R.M. Söll, M.C. Dinger, I. Lundell, D. Larhammer, A.G. Beck-Sickinger, Novel analogues of neuropeptide Y with a preference for the Y1-receptor, *European journal of biochemistry* 268(10) (2001) 2828-2837.
- [15] Z.J. Li, C.H. Cho, Peptides as targeting probes against tumor vasculature for diagnosis and drug delivery, *Journal of translational medicine*, BioMed Central, 2012, p. S1.
- [16] A.A. Kaspar, J.M. Reichert, Future directions for peptide therapeutics development, *Drug discovery today* 18(17-18) (2013) 807-817.
- [17] G. Emons, G. Gorchev, P. Harter, P. Wimberger, A. Stähle, L. Hanker, F. Hilpert, M.W. Beckmann, P. Dall, C. Gründker, Efficacy and safety of AEZS-108 (LHRH agonist linked to doxorubicin) in women with advanced or recurrent endometrial cancer expressing LHRH receptors: a

multicenter phase 2 trial (AGO-GYN5), *International Journal of Gynecologic Cancer* 24(2) (2014) 260-265.

[18] R. Kurzrock, N. Gabrail, C. Chandhasin, S. Moulder, C. Smith, A. Brenner, K. Sankhala, A. Mita, K. Elian, D. Bouchard, 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, *Molecular cancer therapeutics* 11(2) (2012) 308-316.

[19] V. Turk, B. Turk, D. Turk, Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities, *The EMBO journal* 20(17) (2001) 4629-4633.

[20] P. Schlage, G. Mező, E. Orbán, S. Bősze, M. Manea, Anthracycline-GnRH derivative bioconjugates with different linkages: synthesis, *in vitro* drug release and cytostatic effect, *Journal of controlled release* 156(2) (2011) 170-178.

[21] J.A. Flygare, T.H. Pillow, P. Aristoff, Antibody-drug conjugates for the treatment of cancer, *Chemical biology & drug design* 81(1) (2013) 113-121.

[22] P.R. Hamann, L.M. Hinman, I. Hollander, C.F. Beyer, D. Lindh, R. Holcomb, W. Hallett, H.-R. Tsou, J. Upešlaciš, D. Shochat, Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody–calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia, *Bioconjugate chemistry* 13(1) (2002) 47-58.

[23] S. Zhu, M. Hong, L. Zhang, G. Tang, Y. Jiang, Y. Pei, PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugates: *in vitro* evaluation and *in vivo* tumor accumulation, *Pharmaceutical research* 27(1) (2010) 161-174.

[24] G. Saito, J.A. Swanson, K.-D. Lee, Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, *Advanced drug delivery reviews* 55(2) (2003) 199-215.

[25] G.D.L. Phillips, G. Li, D.L. Dugger, L.M. Crocker, K.L. Parsons, E. Mai, W.A. Blättler, J.M. Lambert, R.V. Chari, R.J. Lutz, Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody–cytotoxic drug conjugate, *Cancer research* 68(22) (2008) 9280-9290.

[26] C.S. Gondi, J.S. Rao, Cathepsin B as a cancer target, *Expert opinion on therapeutic targets* 17(3) (2013) 281-291.

[27] G.M. Dubowchik, K. Mosure, J.O. Knipe, R.A. Firestone, Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 2. Models of anticancer drugs paclitaxel (Taxol®), mitomycin C and doxorubicin, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 8(23) (1998) 3347-3352.

[28] E. Orbán, G. Mező, P. Schlage, G. Csík, Ž. Kulić, P. Ansorge, E. Fellingner, H.M. Möller, M. Manea, *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(2) (2011) 469-483.

[29] Z. Abdel-Malek, Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58(3) (2001) 434-441.

[30] P.C. Eves, S. MacNeil, J.W. Haycock, α -Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma, *Peptides* 27(2) (2006) 444-452.

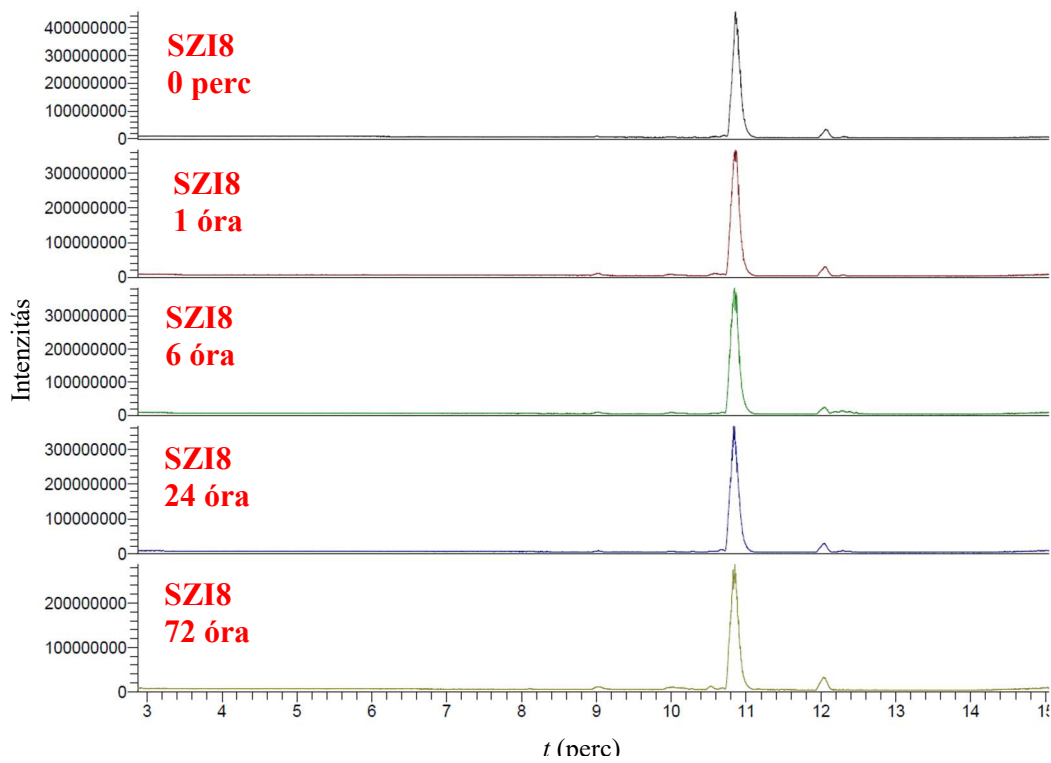
[31] H. Helmbach, E. Rossmann, M.A. Kern, D. Schadendorf, Drug-resistance in human melanoma, *International journal of cancer* 93(5) (2001) 617-622.

[32] D. Bard, Malignant melanoma: Targeting strategies based on α -melanocyte stimulating hormone: A review, *Inflammopharmacology* 3(1) (1995) 7-23.

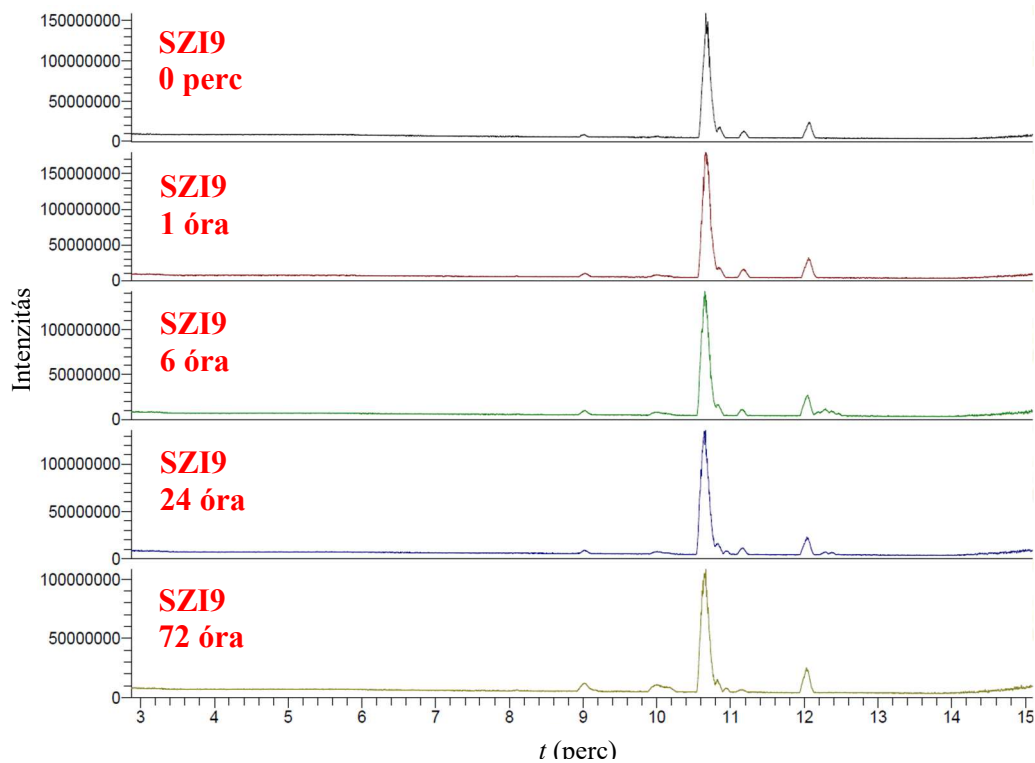
[33] N.K. Tafreshi, A. Silva, V.C. Estrella, T.W. McCardle, T. Chen, Y. Jeune-Smith, M.C. Lloyd, S.A. Enkemann, K.S. Smalley, V.K. Sondak, *In vivo* and *in silico* pharmacokinetics and biodistribution of a melanocortin receptor 1 targeted agent in preclinical models of melanoma, *Molecular pharmaceutics* 10(8) (2013) 3175-3185.

- [34] M.E. Hadley, V.J. Hruba, J. Jiang, S.D. Sharma, J.L. Fink, C. HASKELL-LUEVANO, D.L. Bentley, F. AL-OBEIDI, T.K. Sawyer, Melanocortin receptors: identification and characterization by melanotropic peptide agonists and antagonists, *Pigment cell research* 9(5) (1996) 213-234.
- [35] N. Marks, F. Stern, A.J. Kastin, Biodegradation of α -MSH and derived peptides by rat brain extracts, and by rat and human serum, *Brain research bulletin* 1(6) (1976) 591-593.
- [36] F. Al-Obeidi, A.M.d.L. Castrucci, M.E. Hadley, V.J. Hruba, Potent and prolonged-acting cyclic lactam analogs of α -melanotropin: design based on molecular dynamics, *Journal of medicinal chemistry* 32(12) (1989) 2555-2561.
- [37] S. Froidevaux, M. Calame-Christe, H. Tanner, A.N. Eberle, Melanoma targeting with DOTA- α -melanocyte-stimulating hormone analogs: structural parameters affecting tumor uptake and kidney uptake, *Journal of Nuclear Medicine* 46(5) (2005) 887-895.
- [38] S. Lee, J. Xie, X. Chen, Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis, *Chemical reviews* 110(5) (2010) 3087-3111.
- [39] Y. Miao, F. Gallazzi, H. Guo, T.P. Quinn, ¹¹¹In-labeled lactam bridge-cyclized α -melanocyte stimulating hormone peptide analogues for melanoma imaging, *Bioconjugate chemistry* 19(2) (2008) 539-547.
- [40] H. Guo, J. Yang, F. Gallazzi, E.R. Prossnitz, L.A. Sklar, Y. Miao, Effect of DOTA position on melanoma targeting and pharmacokinetic properties of ¹¹¹In-labeled lactam bridge-cyclized α -melanocyte stimulating hormone peptide, *Bioconjugate chemistry* 20(11) (2009) 2162-2168.
- [41] J. Chen, Z. Cheng, N.K. Owen, T.J. Hoffman, Y. Miao, S.S. Jurisson, T.P. Quinn, Evaluation of an ¹¹¹In-DOTA-rhenium cyclized α -MSH analog: a novel cyclic-peptide analog with improved tumor-targeting properties, *Journal of Nuclear Medicine* 42(12) (2001) 1847-1855.
- [42] Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A. and Olsson, I., 2015. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), p.1260419., <<http://proteoinatlas.org>>
- [43] R.A. Zubarev, A. Makarov, *Orbitrap mass spectrometry*, ACS Publications, 2013.
- [44] A.I. Nesvizhskii, O. Vitek, R. Aebersold, Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry, *Nature methods* 4(10) (2007) 787.
- [45] B.C. Searle, Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies, *Proteomics* 10(6) (2010) 1265-1269.
- [46] Shao, J. and Tam, J.P., 1995. Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages. *Journal of the American Chemical Society*, 117(14), pp.3893-3899.
- [47] Di Marco, A., Arcamone, F. and Zunino, F., 1975. Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin and structural analogues: biological activity and mechanism of action. In *Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents* (pp. 101-128). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [48] National Institutes of Health 2019, USA.gov, accessed 14 April 2019, <<http://www.clinicaltrials.gov>>

12.) Függelék



36. ábra: Az SZI8 kontroll mintáról 0 perc, 1 óra, 6 óra, 24 óra, 72 óra elteltével felvett bázis ion kromatogramok. Nem jelentek meg új kromatográfiás csúcsok



37. ábra: Az SZI9 kontroll mintáról 0 perc, 1 óra, 6 óra, 24 óra, 72 óra elteltével felvett bázis ion kromatogramok. Nem jelentek meg új kromatográfiás csúcsok