

IRÁNYÍTOTT TUMORTERÁPIÁBAN ALKALMAZHATÓ HATÓANYAG-PEPTID KONJUGÁTUMOK HATÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA

Doktori értekezés



Pethő Lilla

Témavezető: Dr. Mező Gábor kutató professzor

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

ELTE Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Kémia Doktori Iskola

Szintetikus kémia, szerves és biomolekuláris kémia doktori program

Iskolavezető: Dr. Császár Attila egyetemi tanár

Programvezető: Dr. Perczel András egyetemi tanár

2019

Kányádi Sándor: Álmodó

Várost álmodtam ide én;
fölraktam, itt van: az enyém.

Utat álmodtam, kész az út;
fűrészem: milyen messze fut?

Fényről álmodtam: fény ragyog.
És álmodtam egy ablakot,
ahonnan majd a végtelen
tavaszi eget nézhetem.

Megvan végre az ablakom,
van szobám, ahol lakhatom,
van alázatos szőnyegem,
naponta többször ehetem.

Mi kell még – kérdik –, nem elég?
Örülök persze – szólanék,
de csak a fejem ingatom.
Állok némán – és álmodom.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Hudecz Ferenc és Dr. Perczel András tanszékvezető egyetemi tanároknak, hogy munkámat az ELTE Szerves Kémiai tanszékén lehetővé tették, továbbá köszönöm Dr. Hudecz Ferencnek és Dr. Mező Gábornak, hogy ezt a munkát az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban végezhettem.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak, hogy ez idő alatt mindvégig mellettem állt, és tanácsaival, észrevételeivel segítette és irányította munkámat. Köszönöm rengeteg türelmét, és a bátorítást, amivel lehetővé tette a dolgozatom elkészültét.

Köszönet illeti Dr. Murányi Józsefet és Dr. Péntes Kingát a fotodinamiás mérések során nyújtott segítségükért. Köszönöm Dr. Brauswetter Diánának és Dr. Gurbi Biankának az immunhisztokémiás, Dr. Halmos Gábornak pedig a receptorkötődési vizsgálatok elvégzését. Köszönettel tartozom Dr. Lajkó Eszternek, Dr. Láng Orsolyának és Dr. Köhidai Lászlónak az impedimetriás mérésekben nyújtott segítségükért, illetve az inspiráló beszélgetésekért. Köszönöm Oláhné Dr. Szabó Ritának a biológiai vizsgálatokban, továbbá Vácziné Dr. Schlosser Gittának a tömegspektrometriás mérésekben nyújtott segítséget. Továbbá köszönet illeti Dr. Kasza Györgyöt a dinamikus fényszóródás és turbiditás mérések során nyújtott segítségéért. Mindannyiuknak hálás vagyok a munkám során nyújtott támogatásért és tanácsaikért. Ezenkívül szeretném köszönetemet kifejezni az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport valamennyi munkatársának.

Köszönöm továbbá munkám anyagi támogatását a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal Országos Tudományos Kutatási Alapprogramjának (OTKA K104045 és NKFIH K119552), a Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Programnak (NVKP_16-1-2016-0036), a Versenyképes Közép-Magyarország Operatív Programnak (VEKOP-2.3.3-15-2017-00020) és a Fehérjetudományi Kiválósági Együttműködési Programnak (MedInProt; Szinergia III).

Külön köszönettel tartozom páromnak, Dr. Kasza Györgynek, hogy mindvégig mellettem volt, támogatott, segített és bátorított.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a biztatást, és hogy végig hittek bennem.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	1
Tartalomjegyzék	2
Rövidítésjegyzék	5
1 Bevezetés.....	7
2 Irodalmi áttekintés.....	9
2.1 A rák: a gyógyíthatatlan betegség?.....	9
2.1.1 Tumoros megbetegedések kezelése	11
2.1.2 Kemoterápia.....	12
2.1.2.1 Kemoterápiában alkalmazott hatóanyagok.....	13
2.1.2.2 Daunomicin.....	14
2.1.2.3 A daunomicin fragmentációja tömegspektrometriás körülmények között.....	16
2.1.3 Fotodinamikus terápia	17
2.1.3.1 Fotodinamikus terápiában alkalmazott hatóanyagok.....	19
2.1.3.2 Protoporfirin IX	20
2.1.4 Irányított tumorterápia	21
2.2 Irányított terápiában alkalmazható célzó peptidek	24
2.2.1 Gonadotropin-releasing hormon.....	24
2.2.2 Angiopep-2	27
2.2.3 Epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) irányító peptidek	31
2.2.4 Tuftsin.....	33
2.3 Spacerek, oldékonyság növelő molekulák	35
3 Célkitűzések	38
4 Eredmények.....	40
4.1 Az irányító peptidek vizsgálata GnRH-PpIX konjugátumokban	41
4.1.1 GnRH-R expresszió fej-nyaki daganatos betegekből származó szövetmintákon.....	41
4.1.2 A GnRH származékok szintézise.....	44
4.1.3 A GnRH-PpIX konjugátumok előállítás.....	45
4.1.4 Az előállított peptidek és GnRH-PpIX konjugátumok receptorkötődési vizsgálata	46
4.1.5 Az előállított konjugátumok UV-Vis vizsgálata.....	47
4.1.6 GnRH receptor expresszió Detroit-562 humán garatrák sejteken	48
4.1.7 A besugárzási idő és az inkubációs idő optimalizálása	49
4.1.8 A GnRH-PpIX konjugátumok <i>in vitro</i> sejt viabilitás vizsgálata	51
4.1.9 Rövid összefoglalás	53
4.2 A hatóanyagok számának és pozíciójának fontossága daunomicin-Angiopep-2 konjugátumokban	54
4.2.1 A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok szintézise	54
4.2.2 A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok <i>in vitro</i> citosztázis vizsgálata.....	56
4.2.3 A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok <i>in vitro</i> sejtbejutási vizsgálata	58
4.2.4 A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok degradációjának vizsgálata patkány máj lizoszóma preparátumban	59

4.2.5	Enzim-labilis spacer tartalmazó konjugátumok előállítása	60
4.2.6	Az enzim-labilis spacer tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok <i>in vitro</i> citosztázis vizsgálata.....	61
4.2.7	Az enzim-labilis spacer tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok <i>in vitro</i> sejtbejutási vizsgálata	62
4.2.8	Az enzim-labilis spacer tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok degradációjának vizsgálata patkány máj lizoszóma preparátumban	63
4.2.9	Rövid összefoglalás	64
4.3	EGFR célzó hatóanyag-peptid konjugátumok oldhatóság növelése hidrofil polimerekkel	66
4.3.1	A daunomicin-peptid konjugátumok szintézise.....	66
4.3.2	A daunomicin-peptid konjugátumok oldhatóságának vizsgálata	67
4.3.3	A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok szintézise.....	68
4.3.4	A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok oldhatóságának vizsgálata	71
4.3.5	A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok <i>in vitro</i> sejtbejutásának vizsgálata	71
4.3.6	A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok <i>in vitro</i> sejt viabilitásra gyakorolt hatása	74
4.3.7	A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok amifil karakterének és aggregációs tulajdonságának vizsgálata	75
4.3.8	Rövid összefoglalás	78
4.4	Tuftsín-daunomicin konjugátumok tömegspektrometriás analízisének optimalizálása....	80
4.4.1	Tuftsín-alapú biokonjugátumok szintézise	80
4.4.2	A tuftsín-daunomicin konjugátumok ESI-MS vizsgálata az általánosan alkalmazott körülmények között	82
4.4.3	A tuftsín-daunomicin konjugátumok ESI-MS vizsgálata a módosított körülmények között	84
4.4.4	Rövid összefoglalás	87
5	Az alkalmazott módszerek	89
5.1	Peptidszintézis	89
5.2	Az <i>in vitro</i> biológiai vizsgálatok alapjai.....	94
5.2.1	<i>In vitro</i> sejt viabilitás vizsgálat	94
5.2.1.1	MTT-teszt	94
5.2.1.2	Impedimetriás vizsgálat	95
5.2.2	<i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálat áramlási citométerrel	96
6	Kísérleti rész.....	98
6.1	Felhasznált anyagok	98
6.2	Peptidszintézis	99
6.3	Tisztítás és analízis	100
6.4	Az irányító peptidek vizsgálata GnRH-PpIX konjugátumokban	102
6.4.1	<i>Ex vivo</i> GnRH-R vizsgálatok: immunhisztokémia szövettani mintákon.....	102
6.4.2	GnRH származékok szintézise	104

6.4.2.1	GnRH-I[⁶ D-Lys] előállítása (1).....	104
6.4.2.2	GnRH-I[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys] és GnRH-II[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys] előállítása (2 és 3) ..	104
6.4.2.3	GnRH-III[⁴ Lys(Bu), ⁶ Asp(OMe)] előállítása (4).....	105
6.4.3	Peptid-Protoporfirin IX konjugátumok előállítása (5-8)	105
6.4.4	Receptorkötődési vizsgálat	105
6.4.5	UV-Vis spektroszkópia.....	106
6.4.6	Detroit-562 sejtek fenntartása.....	106
6.4.7	Konfokális lézer scanning mikroszkópia.....	106
6.4.8	<i>In vitro</i> sejt viabilitási vizsgálatok	107
6.5	A hatóanyagok számának és pozíciójának fontossága daunomicin-Angiopep-2 konjugátumokban	108
6.5.1	Angiopep-2 származékok szintézise.....	108
6.5.2	Angiopep-2-daunomicin konjugátumok előállítása (10-19).....	109
6.5.3	U87 sejtek fenntartása.....	110
6.5.4	<i>In vitro</i> sejt viabilitási vizsgálatok	110
6.5.5	<i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálatok	110
6.5.6	Stabilitás vizsgálat patkány máj lizoszóma preparátumban	111
6.6	EGFR célzó hatóanyag-peptid konjugátumok oldhatóság növelése hidrofil polimerekkel	112
6.6.1	EGFR irányító peptidek szintézise	112
6.6.1.1	Peptidek szintézise a hatóanyag-peptid konjugátumokhoz	112
6.6.1.2	Peptidek szintézise a hatóanyag-peptid-polimer konjugátumokhoz.....	112
6.6.2	Peptid-polimer konjugátumok előállítása	113
6.6.3	Daunomicin konjugálása az aminooxiacetilezett peptidekhez és a peptid-polimer konjugátumokhoz (20-35)	113
6.6.4	A daunomicin-peptid és daunomicin-peptid-polimer konjugátumok oldhatóságának vizsgálata	113
6.6.5	HT-29 sejtek fenntartása.....	114
6.6.6	<i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálatok	114
6.6.7	<i>In vitro</i> sejt viabilitási vizsgálatok	115
6.6.8	Dinamikus fényszóródás mérés (DLS).....	115
6.7	Tuftsin-daunomicin konjugátumok tömegspektrometriás analízisének optimalizálása ..	117
6.7.1	Tuftsin származékok szintézise	117
6.7.2	Tuftsin-daunomicin konjugátumok szintézise (36-41).....	118
6.7.3	Tömegspektrometriás mérések	118
7	Összefoglalás.....	119
8	Summary	122
9	Irodalomjegyzék.....	125
10	Függelék.....	138

Rövidítésjegyzék

7TM	7-transzmembrán
ALA	δ -aminolevulinsav
Aoa	aminooxiacetsav
A β	β -amiloid peptid
BBB	vér-agy gát (blood-brain barrier)
Boc	<i>tert</i> -butiloxikarbonil
BOP	(benzotriazol-1-il-oxi)-trisz(dimetilamino)-foszfónium hexafluoro-foszfát
BSA	szarvasmarha szérum albumin
Bu	butiril
cac	kritikus aggregációs koncentráció
CI	sejtindex
cpm	percenkénti beütésszám
Dau	daunomicin
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én
DCM	diklórmetán
Dde	(4,4-dimetil-2,6-dioxociklohexilidén)etil
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid
DIPEA	diizopropil-etilamin
DLS	dinamikus fényszóródás mérés
DMAP	4-dimetilamino-piridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
DMSO	dimetilszulfoxid
EAK	poli-[Lys(Glu _i -DL-Ala _m)] (elágazó láncú polipeptid)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
EMEM	Eagle's minimum essential medium
ESI	elektrospray ionizáció
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
FBS	magzati borjú szérum
Fmoc	9-fluorenil-metiloxikarbonil
FSH	follikulus stimuláló hormon
Glp	piroglutaminsav
GnRH	gonadotropin-releasing hormon
GnRH-R	gonadotropin-releasing hormon receptor
HbPG	hiperelágazásos poliglicidol
HER-2	human epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa

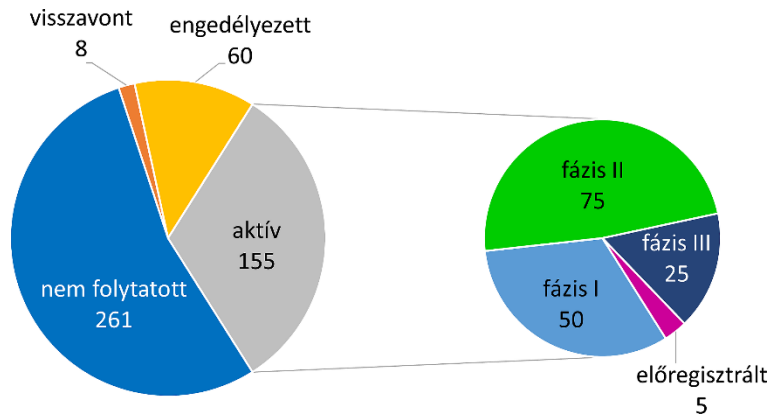
HNSCC	fej-nyaki laphámsejtes karcinóma
HOBt	1-hidroxi-benzotriazol
HPMA	N-(2-hidroxi-propil)metakrilamid
HSP	heat-shock protein
LDLR	alacsony sűrűségű lipoprotein-receptor
LH	luteinizáló hormon
LRP	alacsony sűrűségű lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje
MALDI	mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció
Mtt	4-metil-tritil
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NP	nanorészecske
NRP-1	neuropilin-1
NSCLC	nem-kissejtes tüdőkarcinóma
Oxyrna Pure	etil-2-ciano-2-(hidroxi-imino)-acetát
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-6-szulfonil
PBS	foszfát pufferes sóoldat
PDI	polidiszperzitás index
PDT	fotodinamikus terápia
PEG	poli(etilén glikol)
PpIX	protoporfirin IX
PS	fényérzékenyítő hatóanyag (photosensitizer)
PyBOP	(benzotriazol-1-il-oxi)-trisz(pirrolidino)-foszfónium hexafluoro-foszfát
PyOxim	[(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidén)amino]-oxitrisz(pirrolidino)-foszfónium hexafluoro-foszfát
RP-HPLC	fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
TBST	BSA-t és Tween-20-at tartalmazó 0,1 M Tris-puffer
^t Bu	<i>tert</i> -butil
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropilszilán
TMA	szöveti microarray
TNM	tumor, csomó és metasztázis
tPA	szöveti plazminogén aktivátor
Tris	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
Trt	tritil
UV	ultraibolya
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VEGF-R	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor
Vis	látható fény

1 Bevezetés

A XX. század gyógyszerkutatása nagyrészt kismolekulás hatóanyagok fejlesztésére irányult. Bár ezek előállításának költsége, membrán permeabilitása, kémiai és metabolikus stabilitása, illetve orális biohasznosulása az esetek többségében kedvező, a szelektivitás hiánya jelentős mellékhatásokat okozhat. Ezért a korábbi "klasszikus" szerves kémiai módszereken alapuló és a Lipinski-féle 5-ös szabályt (a molekulák móltömege 500 Da-nál kisebb, a hidrogénkötésre alkalmas donoratombok száma kisebb 5-nél, a hidrogénkötés-akceptorok száma kisebb 10-nél, illetve az oktanol-víz megoszlási hányados ($\log P$) kisebb 5-nél) figyelembe vevő hatóanyagkutatás helyébe az elmúlt néhány évtizedben egyre inkább a tudatosan tervezett, célspecifikus, szelektív megközelítés lépett, így a század végétől jelentősen fellendült a fehérje- és peptid-alapú gyógyszerek fejlesztése.^{1,2}

A peptid-alapú gyógyszerek 5-50 aminosavból álló biológiai hatással rendelkező vegyületek, melyek méretben a kismolekulák és a fehérjék közé esnek. Általában hatékonyságuk és szelektivitásuk lényegesen nagyobb, míg a legtöbb esetben toxicitásuk a kisebb szöveti akkumuláció miatt jelentősen alulmarad a kis molekulatömegű szerves hatóanyagokhoz képest. Továbbá az alacsonyabb előállításának költségük, nagyobb stabilitásuk, magasabb aktivitásuk, jobb szöveti penetrációjuk és kisebb immunogén hatásuk előnyösebbé teszik a peptideket az antigén típusú fehérjékkel szemben is. Hátrányuk azonban a rövid plazma felezési idő, az alacsony receptor szelektivitás és a rossz orális biohasznosulás, melyek kiküszöbölésére napjainkban már számos kutatás irányul. Az eredmények alapján ezen problémákra megoldást jelenthet a különböző molekulákkal (pl. poli(etilén-glikol)-lal, lipidekkel, fehérjékkel) való konjugáció.^{1,2}

A peptidek nagy kémiai és biológiai változatossága számos betegség, például anyagcserezavarok, szív- és érrendszeri betegségek vagy tumorok gyógyítását teheti lehetővé. Az aktív kutatások és fejlesztések hatására a természetben előforduló natív molekulák peptid analógjai már megtalálhatók a klinikumban alkalmazott gyógyszerek között. Mára már 60 peptid-alapú gyógyszer engedélyezett az Egyesült Államokban, Európában és Japánban, és jelenleg is több, mint 150 jelölt vesz részt aktív humán klinikai vizsgálatokban (*1. ábra*).²



1. ábra A terápiás célú peptidek száma a különböző gyógyszerkutatói fejlesztési fázisokban²

Doktori kutatásom során irányított tumorterápiában alkalmazható peptid-alapú hatóanyag-hordozó rendszerek tervezésével és szintézisével foglalkoztam. A munkám során különféle irányító peptidmolekulákat (GnRH, Angiopep-2, GE11, D4, tuftsin) és hatóanyagokat (protoporfirin IX, daunomicin), valamint egyes esetekben enzim-labilis spacerket (GFLG, VA, YRRL) tartalmazó konjugátumokat állítottam elő. Ezek révén tanulmányoztam az irányító molekula szerkezetének és a hatóanyagok számának és pozíciójának szerepét és fontosságát a konjugátumok biológiai hatékonyságára. Kutatásom kiterjedt ezen konjugátum rendszerek esetleges oldhatósági és tömegspektrometriás azonosíthatósági problémáinak feltérképezésére és azok megoldására is.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A rák: a gyógyíthatatlan betegség?

A régi mondás szerint a rák olyan régi, mint az emberiség. Ám paleopatológiai kutatások azt mutatják, hogy a daganatok már jóval azelőtt megjelentek állatokban, mielőtt az ember kifejlődött volna. Az orvostudomány legkorábbi írásos emléke a rákról az Edwin Smith-papiruszban található, amelyet i.e. 3000-ben írtak, és egy emlőrákot ír le. A szerző arra a következtetésre jutott, hogy a mell duzzadt daganata egy súlyos betegség, melyet nem lehet kezelni. Hippokratészt (i.e. 460-375) a daganatok egy mozgó rákra emlékeztették, ami később a karcinóma (karcinosz görögül rákot jelent) elnevezéshez vezetett. Ő különböző gyógymódokat alkalmazott a különböző tumoros elváltozások ellen, azonban a legtöbb daganatot gyógyíthatatlannak tartotta.³ Noha a betegséget már évezredek óta ismerjük, csak a XX. században sikerült áttörést elérni a gyógyításában és a diagnózisában. Ennek ellenére még a mai napig nem találtak igazán hatékony gyógymódot a rák gyógyítására, mely elsősorban a betegség sokféleségéből adódik.

A rák egy gyűjtőfogalom, amely száznál is több betegséget foglal magába. A daganat kialakulása minden esetben genetikai meghibásodásra vezethető vissza, mely során felborul a sejtnövekedést serkentő és gátló szabályozás, így az érintett sejtek kontrollálatlan osztódásba kezdenek. Ennek hatására egy sejtömeg alakul ki, amely átlépi a bazális laminát, megtámadja a környező szöveteket, végül elterjed az egész testben, úgynevezett áttéteket képezve. Ez az átalakulás egy többlépeses folyamat, melyet mind környezeti, mind örökletes tényezők befolyásolnak.

A rák kialakulásához vezető környezeti hatások különfélék lehetnek. Rákkeltő hatásúak például azok az ionizáló sugárzások (ultraibolya-, röntgen-, radioaktív béta- és gamma-sugárzás), amelyek elérik a kémiai kötések gerjesztéséhez, felszakításához szükséges küszöbenergiát, és így képesek közvetlenül vagy közvetve a DNS-ben molekuláris változást előidézni. A kémiai karcinogének (pl. epoxidok, aromás aminok, policiklusos aromás szénhidrogének) elsősorban elektrofilek, vagy a szervezetben azzá alakulnak, és így képesek a sejt fő összetevőit (DNS, RNS, fehérjék) módosítani. A rák kialakulásához továbbá hozzájárulhatnak különböző onkogén vírusok (pl. Hepatitis B és C, humán papillomavírus), melyek vagy közvetlenül károsíthatják a gazdasejt DNS-ét, vagy krónikus gyulladást váltanak ki, illetve további jelentős kockázatot jelent a hosszú ideig tartó stressz is.⁴

A legtöbb daganat monoklonális eredetű, azaz egyetlen sejtből alakul ki genetikai változások felhalmozódása és klonális növekedés eredményeként. A folyamat három lépésből áll: az első, irreverzibilis lépés az iniciáció, amely során a sejtben spontán módon, vagy külső hatásokra az osztódást, sejthalált és differenciálódást érintő mutációk keletkeznek. Az ezt követő, időben elhúzódó, reverzibilis folyamat a promóció, amely során a mutációkat tartalmazó sejtől osztódással klón jön létre. A harmadik lépés a progresszió, ami a sejtek invazívá (áttétképzésre hajlamosá) válását, és így rosszindulatú daganat, vagyis rák kialakulását eredményezi. A jóindulatú tumoroknak, melyek nem képesek elhagyni a keletkezésük helyét és áttéteket képezni, is lehet káros hatása, a potenciális letalitás azonban elsősorban a rosszindulatú daganatokhoz köthető.⁵

Az iniciáció során általában a DNS-javító mechanizmusok is sérülnek, tehát a mutációs ráta megnő, ami az osztódási ráta növekedésével együtt extrém mennyiségű mutáció kialakulásához vezet. A legtöbb tumorsejt több ezer pontmutációt és több száz kromoszómamutációt tartalmaz. A mutációk lehetnek a daganat kialakulásához érdemben hozzájáruló úgynevezett „driver”, és a tumorfejlődés szempontjából közömbös ún. „passenger” mutációk. A mutációk mellett epigenetikai folyamatok (metilációs mintázat- vagy kromatinszerkezet-változások) is közrejátszhatnak a rák kialakulásában.

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

A progresszió stádiumában megjelenhetnek a kariotípust érintő genetikai változások, például hiányzó és extra kromoszómák, nagyobb léptékű transzlokációk, vagy akár több sejtmagvúság is előfordulhat. Gyakori a sejt morfológia megváltozása és az adhézions kapcsolatok sérülése, ami kulcsfontosságú a rosszindulatú daganat kialakulásában, hiszen így a sejtek a vérárammal távoli szövetekbe is eljuthatnak, és ott áttéteket (metasztázisokat) képezhetnek.⁶

Hazánkban 2018-ban a különböző rákbetegségek a halálozások 25%-át okozták,⁷ és sajnos világviszonylatban is az elsők között található Magyarország. A népességszámot is figyelembe véve a nők a negyedik, míg a férfiak a második helyen állnak a halálozási listán.⁸

Általánosan elmondható, hogy a rákbetegségekre sokféleségük miatt nincs általános gyógymód. A terápia meghatározása a tumor fajtájától, elhelyezkedésétől és előrehaladottságától (a tumor mérete, nyirokcsomók közelsége és az áttétek jelenléte vagy hiánya), valamint a beteg általános állapotától is függ. A kezelés célja mindig a rák teljes eltávolítása a szervezet többi részének károsítása nélkül. Ha ez nem lehetséges, akkor a cél a beteg életének meghosszabbítása úgy, hogy a hátralévő életét elfogadható életminőségben tölthesse. A kezelés történhet sebészeti úton, sugár-, immun-, hormon-, kemo- vagy irányított terápiával, illetve ezek valamilyen kombinációjával.

2.1.1 Tumoros megbetegedések kezelése

A sebészi megoldás a leggyakrabban alkalmazott módszer a rákterápiában. Ha a daganat jól lokalizálható és jól hozzáférhető, akkor még ma is a műtét a legjobb választás a gyógyuláshoz. A beavatkozás során nem csak a látható daganatot távolítják el, hanem a környező ép szövetek egy részét is a tumor szóródásának elkerülése érdekében. Az adott szerv környékén lévő őrszem (sentinel) nyirokcsomókat is az esetek többségében eltávolítják, mivel metasztázis során itt keletkezhetnek először áttétek.⁹

A sugárterápia napjainkban a daganatos betegek kezelésében a második leggyakrabban alkalmazott terápiás eljárás. Wilhelm Conrad Röntgen 1895-ban fedezte fel a röntgen-sugárzást, amelyet 3 évvel később már rákgyógyításra is használtak. Napjainkban a kezeléshez gyorsított elektronokat, ⁶⁰Co, ¹²⁵I, ¹⁰³Pd vagy ¹⁰⁶Ru sugárforrásokat használnak. A nagy energiájú ionizáló sugárzás károsítja a DNS-t, ezáltal gátolja a sejtosztódást, így felhasználható a tumorsejtek elpusztítására vagy a daganat méretének csökkentésére. A radioterápia legeredményesebben – a sebészi terápiához hasonlóan – a jól körülhatárolható tumorok esetében használható; elsősorban méhnyak-, fej-nyaki-, gége- és tüdőrák esetében alkalmazzák, de a módszerrel leukémia vagy nyirokcsomórák is kezelhető. A terápia nem szelektív, tehát a hatás érinti az egészséges sejteket is, de a mai technikával a nagy dózisu besugárzás a mélyen fekvő rákos szövetekre is pontosan irányítható, a normál szövetek minimális roncsolása mellett.¹⁰

Az immunterápia a szervezet saját természetes védekező rendszerét serkentve, az immunreakciókban résztvevő fehérvérsejteket aktiválva vagy támogatva küzd a rákos

megbetegedések ellen. Elsősorban kis kiterjedésű tumorok esetén alkalmazható, általában a hagyományos kezelések kiegészítéseként alkalmazzák. Az aktív immunizáció során a beteget a daganatból készített vakcinával oltják be, így segítve az immunrendszert a daganatos sejtek felismerésében. A tumorsejtek biológiájának egyre jobb megértésével olyan szerek (pl. interferonok, interleukinek, más citokinek) fejleszthetők ki, melyek utánozzák vagy befolyásolják a természetes immunválaszt, ezáltal kontrollálva a sejt növekedését. Ezt a módszert passzív immunterápiának nevezik. Az immunterápia napjaink egyik legígéretesebb formája a monoklonális antitest terápia, ahol az antitestek a tumorsejt felszínén található receptorokhoz kapcsolódnak, ezáltal a sejt vagy elpusztul, vagy beindulnak olyan immunfolyamatok, amelyek a sejt pusztulását okozzák. Az első klinikumban is alkalmazott monoklonális antitestek a rituximab (Rituxan) és trastuzumab (Herceptin) voltak, melyeket az 1990-es évek vége felé fejlesztettek ki a non-Hodgkin limfóma illetve a HER-2 pozitív mellrák ellen.¹¹

A hormonterápia során, melynek alapjait a XIX. század végén Thomas Beatson fektette le, általában a szervezetben termelt hormonok hatásait gátolják. Beatson azt találta, hogy a mellrákban szenvedő betegeknél a petefészek eltávolítása javulást eredményez, így már a hormon felfedezése előtt felismerte a női petefészek hormon, az ösztrogén stimuláló hatását az emlőrákra.¹² A XX. század során megértették a hormonok daganatsejtekre gyakorolt hatás mechanizmusát, az új gyógyszerek (pl. aromatáz-gátlók, luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH) analógok és inhibitorok) pedig nagyban megváltoztatták a hormonfüggő daganatok (mell-, petefészek, prosztatarák) kezelését.

2.1.2 Kemoterápia

Kemoterápiát először több, mint 60 évvel ezelőtt használtak limfóma gyógyítására. A módszer lényege, hogy a beteget olyan hatóanyagokkal kezelik, amelyek a tumorsejteket elpusztítják (citotoxin), vagy szaporodásukat gátolják (citosztatikum). Az eljárást általában az előrehaladott vagy áttétes rákos megbetegedések gyógyítására használják.

A tumorokban a normál szövetekhez képest jelentősen nagyobb az osztódó sejtek aránya, ezért a hagyományos kemoterápiás eljárások célpontjai az osztódásban lévő, illetve az osztódás felé haladó (proliferálódó) sejtek. A kemoterápiás szerek vagy a DNS megkettőződését, vagy az újonnan létrejött kromoszómák szétválását gátolják. Ugyanakkor a szervezetben jelenlevő és élettani körülmények között is viszonylag gyorsan megújuló szövetek (pl. csontvelő, szőrtüsző,

száj- és bélnyálkahártya) is célpontot jelentenek a citotoxikus drogoknak, számos mellékhatást kiváltva. A hajhullás a leginkább szemmel látható ilyen hatás, de gyakran jelentkezik fáradékonyság, hányinger és hányás is. Mivel a kezelés károsítja a csontvelőt is, csökken a fehérvérsejt-szám, így könnyebben alakulhatnak ki különböző fertőzések, illetve gyógyszer-specifikus mellékhatások is felléphetnek, úgymint a kardiotoxicitás, a veseelégtelenség vagy a teratogén hatás.¹³ A módszer hatékonyságát korlátozza még, hogy a tumorsejtek rezisztenssé válhatnak az alkalmazott szerekkel szemben (multidrog rezisztencia).

Az alkalmazott gyógyszerek mennyiségének növelése fokozza a hatékonyságot, azonban a mellékhatások súlyosságát is növeli. A hatékonyságot a különböző támadáspontú szerek kombinált alkalmazása is növelheti. Ez a kombinált kemoterápia, melyet leggyakrabban leukémia és egyes limfómák esetén alkalmaznak.¹⁴

2.1.2.1 Kemoterápiában alkalmazott hatóanyagok

A daganatterápiában alkalmazott anyagok lehetnek az élővilág biológiailag aktív anyagai (pl. antraciklinek, kriptoficinek), melyek egy része a népi gyógyászatból is ismert hatóanyag (pl. Vinca-alkaloidok), azok félszintetikus származékai (pl. etopozid), sejtbiológiai ismeretek alapján szintetizált molekulák (pl. metotrexát, 5-fluoruracil), illetve hatásmechanizmus (pl. taxol) vagy kémiai reakció típusa alapján (alkilezőszerek, mustárnitrogének) választott vegyületek.

A hatóanyagok azonban nem csak eredetük, hanem hatásmechanizmusuk alapján is csoportosíthatók. Így az alábbi típusok különböztethetők meg:

- antimetabolitok: főként nukleotid bioszintézis gátlók, melyek a DNS szintézishez szükséges enzimeket vagy anyagcserét gátolják. Ilyen hatóanyagok pl. a metotrexát és az 5-fluoruracil.
- alkilezőszerek: keresztkötéseket hoznak létre a DNS-láncok között, mellyel gátolják a replikációt. Ilyen pl. a melfalán és a ciszplatin.
- topoizomeráz-gátlók: a DNS-sel interkalációs komplexet hoznak létre, mint pl. az antraciklinek és az etopozid.
- antimitotikumok: gátolják a mitotikus orsó kialakulását. Ilyen hatóanyagok pl. a Vinca-alkaloidok és a taxol.
- jelátviteli mechanizmust módosítók, melyek lehetnek sejtfelszíni receptor vagy kináz-gátlók. Ilyen pl. a trastuzumab, az imatinib vagy a flavopiridol.
- proteoszóma és HSP-gátlók, mint pl. a bortezomib és a geldanamycin.
- fehérjeszintézis szabályozását gátlók, pl. az aszparagináz vagy a rapamicin.

- hormonszármazékok: elsősorban aromatazsgátlók, LH-RH vegyületek, szomatosztatin származékok. Ilyenek pl. a letrozol, a triptorelin és az octreotid.
- citokinek, pl. az interferonok és az interleukinek
- antimetasztatikus gyógyszerek, mint pl. a biszfoszfonátok.
- egyéb biológiai hatóanyagok, melyek lehetnek pl. antitestek vagy vakcinák.

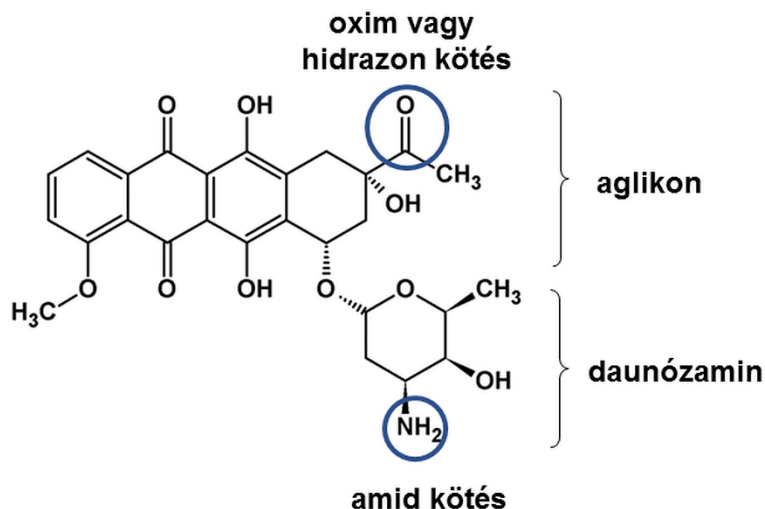
Citotoxikusnak nevezzük azokat a gyógyszereket, amelyek elpusztítják a rákos sejteket és szinte kizárólag a sejtproliferációt fenntartó molekuláris tényezőket károsítják. Ide sorolhatók az antimetabolitok, az alkilezőszerek, a topoizomeráz gátlók és az antimitotikumok. Ezzel szemben citosztatikusként nevezzük azokat az anyagokat, melyek a tumorsejtek szabályozási zavarát módosítják vagy a tumorprogressziót korlátozzák, ezáltal leállítva a sejtproliferációt. Ilyen hatóanyagok a jelátviteli mechanizmust módosítók, a proteozóma és HSP-gátlók, illetve a fehérjeszintézis szabályozását gátlók. Ez a felosztás természetesen nem kizárólagos, hiszen a citotoxikumok a kezelés korai szakaszában a koncentrációtól és a sejt típusától függően előbb leállítják a sejtosztódást, tehát citosztatikus hatást is mutatnak, míg egyes citosztatikumok a sejtszabályozás módosításának következményeként elpusztítják a sejtet.⁴

A doktori munkám során én daunomicint használtam a biokonjugátumok előállítására, ezért az alábbiakban ezt a hatóanyagot részletesebben is bemutatom.

2.1.2.2 Daunomicin

A daunomicin (daunorubicin, Dau) a doxorubicin, epirubicin és idarubicin mellett az antraciklinek családjába tartozik, a *Streptomyces peucetius* baktérium termeli antibiotikumként. Széles körben alkalmazzák a leukémia és egyes szarkómák kemoterápiás kezelése során.¹⁵

A daunomicin vörös színű kristályos anyag, a kereskedelemben hidroklorid sója kapható. Szerkezete a 2. ábra látható. A kondenzált tetraciklusos gyűrűrendszerhez (aglikon rész) egy cukor, az L-daunózamin kapcsolódik.¹⁶



2. ábra Daunomicin szerkezete és konjugációra alkalmas funkciós csoportjai

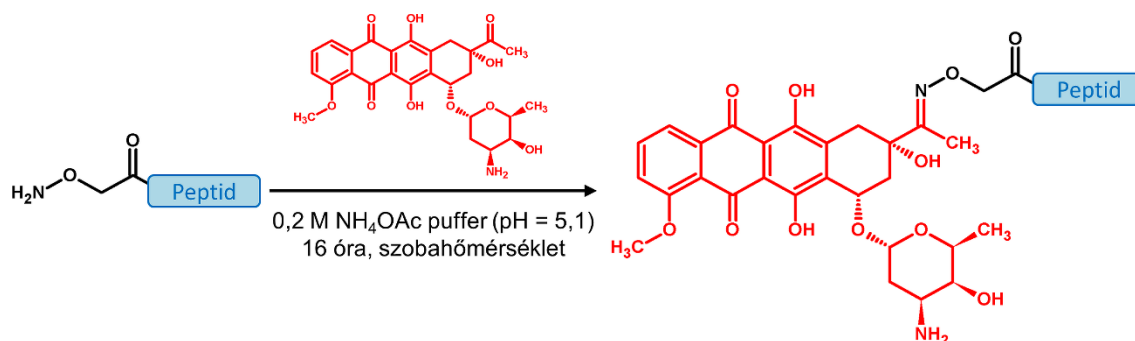
A daunomicin biológiai hatásait először 1964-ben írták le.¹⁷ Azt találták, hogy a Dau gátolja a DNS szintézisét, ezáltal a sejtek osztódását is. Későbbi kutatások kimutatták, hogy a kezelés során alkalmazott dózis befolyásolja a hatásmechanizmust is. A sejtben keletkezhetnek szabad gyökök, így szerepe lehet a lipidperoxidációban, interkalálódhat, alkilezheti a DNS-t, befolyásolhatja a DNS-szálak szétválását és a helikáz enzim aktivitását, valamint gátolhatja a topoizomeráz II enzimet, melynek fontos szerepe van a DNS transzkripcióban.¹⁵

Mivel a daunomicin nem csak a daganatos, hanem az egészséges sejtekre is hatással van, ezért számos nem kívánatos és bizonyos esetekben toxikus mellékhatással is bír, mint például a hányás, hasmenés, étvágytalanság, a hajhullás, a kardiotoxicitás és az immunszuppresszió. Ezen kívül a bőrrel érintkezve hólyaghúzó hatású, és allergiát is okoz. Ugyanakkor a kemoterápia során fellépő káros mellékhatások elkerülése és a terápiás dózis emelése érdekében a daunomicint különböző hordozókhoz, mint például polimerekhez (pl. HPMa¹⁸ és EAK¹⁹) vagy oligopeptidekhez^{20–23} kapcsolhatjuk vagy esetleg liposzómákba zárhatjuk (DaunoXome^{19,24}).

A hordozóhoz való konjugálásra több lehetőség van, hiszen a daunomicinnek két konjugációra alkalmas funkciós csoportja van: a daunózamin aminocsoportja és az aglikon rész 13-as C-atomján található oxocsoport (2. ábra). Ha hidrazonkötést alakítunk ki a konjugátumban, akkor a kötés pH érzékenysége (pH < 5 bomlik) miatt a tisztíthatóság nehézkessé válik,²⁵ míg ha a cukorrész aminocsoportján alakítjuk ki a kötést, akkor a konjugátum biológiai hasznosíthatósága jelentősen csökken.²⁶ Az aminocsoporton keresztül történő konjugáció a biológiai hatás elvesztése nélkül abban az esetben lehetséges, ha úgynevezett „self-immolative” linkereket használunk.²⁷ Ebben az

esetben egy biológiailag kevésbé hatékony úgynevezett „prodrug” formát alakítanak ki, ahol a „self-immolative” linker a hordozó molekulát és a hatóanyagot kapcsolja össze. A linker hasadását valamilyen külső körülmény (enzim hasítás, pH változás, redox reakció) okozza, mely elindít egy kaszkád eliminációs folyamatot, ami végül a szabad hatóanyag felszabadulásához vezet.^{28,29}

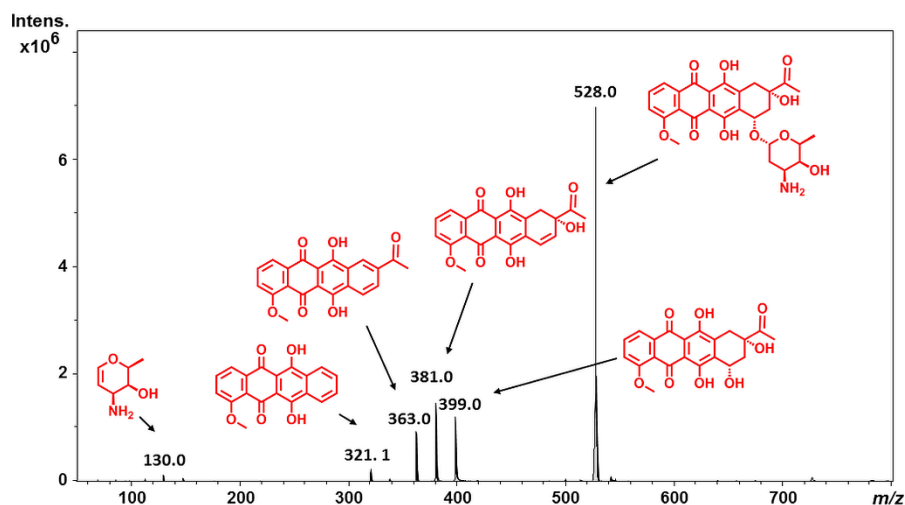
A munkám során a daunomicin peptidekhez történő kapcsolásához oximkötés kialakítását választottam. Ehhez a peptidekhez egy aminosavot kapcsoltam, amely alkalmas arra, hogy a daunomicin oxocsoportjával oximkötést alakítson ki egy kemoszelektív ligációs eljárásban (3. ábra).



3. ábra Az aminosavacétilezett peptid reakciója daunomicinnel

2.1.2.3 A daunomicin fragmentációja tömegspektrometriás körülmények között

Fehérjék, peptidek és biokonjugátumok tömegspektrometriás vizsgálata során elsősorban lágy ionizációs technikákat (elektrospray ionizáció (ESI), mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció (MALDI)) alkalmaznak. Ilyen körülmények között intakt protonált ionok keletkeznek, melyek segítik a spektrum értelmezését. Azonban egyes molekulák esetén a lágy ionizációs körülmények között nem csak az intakt molekulát detektáljuk, hanem különböző fragmensek is megjelennek a spektrumban. Ez a jelenség a daunomicin esetében is fellép, ami jól megfigyelhető a 4. ábra.



4. ábra A daunomicin fragmentációja az általánosan alkalmazott ESI-MS körülmények között. A szerkezetek a semleges, nem protonált molekuláknak felelnek meg.

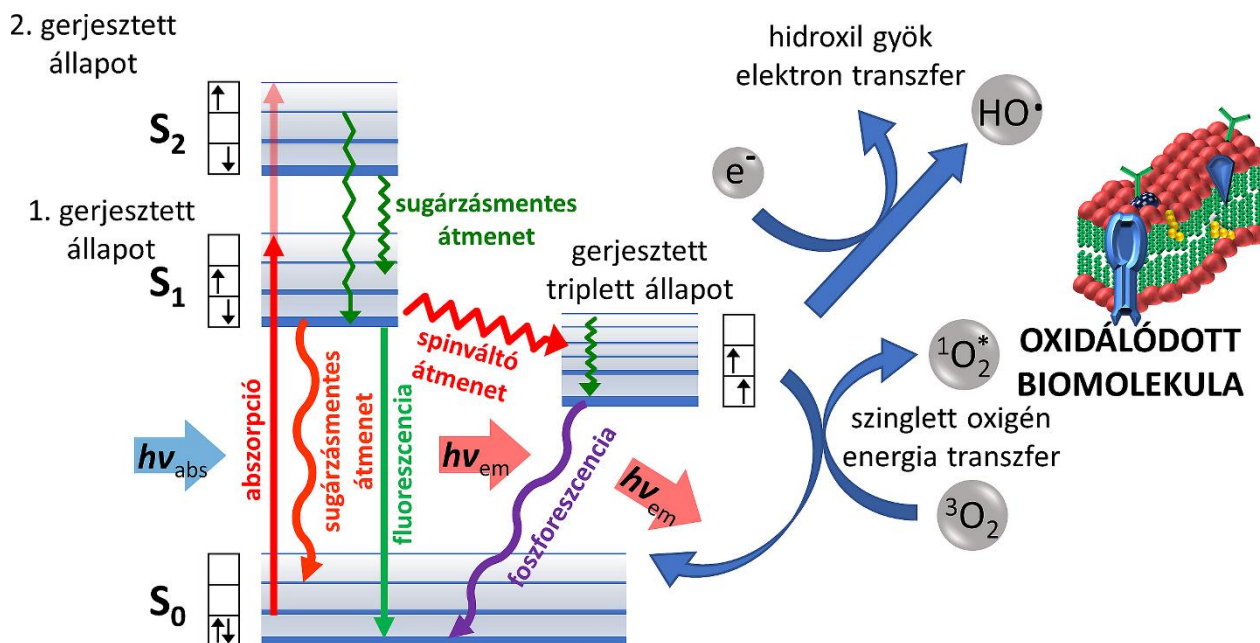
Ez a fragmentáció az ionforráson belül történik, és jellegzetes fragmens ion mintázatot ad. A fő fragmentációs útvonal a glikozidos kötés hasadása, a töltés pedig vagy az aglikon vagy a daunozamin fragmenszen marad.³⁰ A cukorrész (m/z 130,0) lehasadása hidroxil-funkciós aglikon részt (m/z 528,0-129,0 = 399,0) vagy telítetlen aglikont (m/z 528,0-147,0 = 381,0) eredményez.

Ez a jellegzetes fragmentáció megfigyelhető a daunomicin konjugátumainak vizsgálata során is, azonban a fragmentáció mértéke erősen függ a konjugátum szerkezetétől. Korábbi megfigyelések alapján kijelenthető, hogy a fragmentáció bázikus oldalláncot tartalmazó aminosavak (pl. lizin és arginin) jelenlétében fokozottabb. További problémát okoz, hogy a glikozidos kötés savas körülmények között, a konjugátumok szintézise és tisztítása során is hasadhat, és a cukorrész elvesztése jelentősen csökkenti a biológiai hatást.²⁶ Az így kapott melléktermék tömege pedig megegyezik a fragmentáció során keletkező fragmens tömegével. Ezek a körülmények pedig jelentősen megnehezítik a molekulák tömegspektrometriás azonosítását és tisztaságuk meghatározását.

2.1.3 Fotodinamikus terápia

A fotodinamikus terápia (PDT) egy a klinikumban is alkalmazott kezelési módszer fej-nyaki-³¹, bőr-³², mell-³³, illetve hólyagrák³⁴ esetén. A PDT a kemoterápia egy speciális változata, mely során önmagukban nem toxikus komponenseket, egy fényérzékenyítőt, fényt és oxigént alkalmaznak. A fényérzékenyítő hatóanyag (photosensitizer, PS) passzívan akkumulálódik a tumorsejtekben, majd

ha az abszorbanca maximumához közeli hullámhosszúságú fényvel oxigén jelenlétében besugározzuk, akkor a PS aktiválódik, ami az 5. ábra feltüntetett mechanizmus szerint a tumorsejt halálához vezet. A folyamat során elektron és energiáttranszfer hatására rendkívül reaktív gyökmolekulák és szinglett oxigén ($^1\text{O}_2$) keletkezik. Ezek nagyon gyorsan elreagálnak a körülöttük található biomolekulákkal, amely végül apoptózis vagy nekrozis útján a sejtek pusztulásához vezet. Az elpusztult terület hegesezés nélkül, esztétikai szempontból nagyon szépen gyógyul. A PDT hatásmechanizmusát elsőként Dougherty és munkatársai írták le 1978-ban, és azóta is számos kutatócsoport foglalkozik a témával.³⁵



5. ábra A fényérzékenyítő anyag besugárzás hatására bekövetkező elektronikus változásai és a hatásmechanizmus magyarázata Jablonski diagram segítségével.

A fényérzékenyítő anyag elektronjai fény hatására az alapállapotból (S_0) az első (S_1), majd a második gerjesztett állapotba (S_2) kerülnek, ahonnan különböző átmenetek (fluoreszcencia vagy sugárzásmentes átmenet) segítségével relaxálódnak az alapállapotba (5. ábra). Egyes esetekben spinváltó átmenet (tiltott átmenet) hatására a szinglett állapotból tripllett állapotba (T_1) kerül a molekula. Ez egy hosszabb élettartamú energiaállapot, mely foszforeszcenciával (tiltott átmenet) relaxálódhat az alapállapotba, vagy elektron transzfer hatására reaktív oxigén specicszek (ROS), vagy energia transzfer során egy alapállapotú oxigén molekulából ($^3\text{O}_2$) szinglett oxigén ($^1\text{O}_2$) keletkezik. Mind a ROS, mind a $^1\text{O}_2$ nagyon reaktívak (életidejük kb. 3 μs), és gyorsan, kizárólag

lokálisan oxidálják a különböző biomolekulákat, melyek végül a sejt halálát eredményezik. A mitokondriumban lokalizálódó fényérzékenyítők gyakran indukálnak apoptózist, míg a plazmamembránban lokalizálódók főleg nekrozist okoznak a besugárzó fény hatására.³⁶

A PDT szelektivitása a PS tumorban való akkumulációjából és az alkalmazott nem ionizáló jellegű fény pontos célzásából adódik. Azonban az alkalmazott PS-ek nagy része nem csak a tumorban lokalizálódik, hanem egészséges szövetekben is, mint a szemek vagy a bőr, melyek különösen ki vannak téve a napsugárzásnak, ez pedig súlyos mellékhatásokhoz vezethet.³⁶⁻³⁹ A terápia szelektivitásán jelentősen javíthatunk, ha a PS-t egy, a tumorsejteket szelektíven felismerő irányító molekulához kapcsoljuk. Ezt a lehetőséget napjainkban intenzíven vizsgálják.⁴⁰

A PDT-t jelenleg elsősorban bőrbetegségek, illetve könnyen hozzáférhető, vagy üreges szervek esetén alkalmazzák. Ennek egyik oka, hogy a legtöbb PS kifejezetten hidrofób, így a rossz felszívódás miatt csak a lokális felhasználásuk megoldott, másik oka pedig a besugárzó fény korlátozott penetrációs képessége. Általánosságban elmondható, hogy minél hosszabb az alkalmazott hullámhossz, annál mélyebbre képes a fény behatolni a szövetbe. A penetráció 400 nm (kék fény) esetén kisebb, mint 1 mm, 514 nm-nél (zöld fény) 0,5-2 mm, 630 nm (vörös fény) esetén 2-3 mm, míg a legnagyobb behatolási mélységet (4-4,5 mm) 870 nm-es hullámhosszúságú fény (közeli infravörös) alkalmazásával lehet elérni.⁴¹

2.1.3.1 Fotodinamikus terápiaiban alkalmazott hatóanyagok

A PDT-ben fényérzékenyítőként alkalmazható hatóanyagoknak többféle fotofizikai és fotokémiai követelménynek kell megfelelniük. Mivel a szövetek fényátersztése 700-900 nm közötti tartományban a legnagyobb (3-5 mm), ezért a hatóanyagoknak jelentős abszorpciót kell mutatniuk ebben a tartományban, illetve az alkalmazott erős fénysugár hatására csak kis mértékben bomolhatnak. Mindemellett a PS-nek nagy hatásfokkal kell triplet állapotba kerülnie, és ennek az állapotnak nagyobb energiával kell rendelkeznie, mint a $^1\text{O}_2$ gerjesztési energiája, továbbá a gerjesztett állapot élettartamának kellően hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy végbe mehessen az energia- és/vagy elektronátadás. Ezenkívül a fényérzékenyítő hatóanyagoknak bizonyos biológiai követelményeknek is meg kell felelniük, melyeket nagyrészt a fiziko-kémiai paramétereik, mint pl. a lipofilitás és a pH-függő sajátságok határoznak meg.⁴²

Az első generációs PS-ek a hematoporfirin és a fotofrin II. Ezek komplex összetétele azonban jelentősen nehezíti az előállítását, továbbá az igen alacsony abszorpciós hatékonyság és az

alkalmazott viszonylag alacsony hullámhossz (630 nm) miatt fellépő bőrérzékenység is nehezíti a felhasználást.

A második generációs fényérzékenyítők már jól definiált szerkezettel és összetétellel rendelkeznek, legnagyobb részük valamilyen porfirin származék (pl. benzoporfirin, ftalocianin, naftalocianin, protoporfirin). Ezek a PS-ek már hosszabb hullámhosszon nyelik el a fényt, így kevésbé okoznak fényérzékenységet, illetve egyes esetekben hordozó molekula nélkül is szelektíven akkumulálódhatnak a tumorsejtekben.

A harmadik generációs PS-ek esetében már speciális hordozó molekulák is segítik a szelektív akkumulációt. Napjainkban is intenzív kutatások irányulnak olyan PS-ek előállítására, melyek vízoldhatók, szelektívek, illetve nem okoznak súlyos mellékhatásokat (photo-bleaching).⁴³

Az FDA által eddig engedélyezett fényérzékenyítő hatóanyagok nagyrészt második generációs PS-ek, szerkezetileg pedig porfirin- (Photofrin®, Visudyn®), tetrapirrol- (Lutex®, Tookad®) vagy klorin-származékok (Purlytin®, Foscan®, Laserphyrin®). Klinikai vizsgálatokban további fényérzékenyítőket, például porficéneket, bakterio-klorinokat, ftalo- és naftalocianinokat, hipericin- és fenotiazin származékokat is tanulmányoznak.^{42,44}

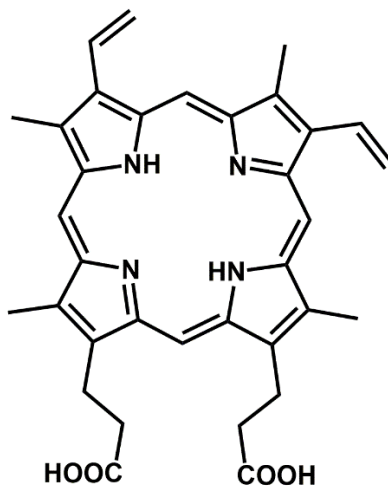
A doktori munkám során protoporfirin IX-et használtam a biokonjugátumok előállítására, ezért az alábbiakban ezzel részletesebben foglalkozom.

2.1.3.2 Protoporfirin IX

A protoporfirin IX (PpIX, 6. ábra) a gyűrűs tetrapirrolok családjába tartozó vegyület. Alapváza a porfirinváz, mely négy pirrolgyűrűből épül fel, a gyűrűk szubsztitúciójával pedig a molekula négy metil-, két propionsav- és két vinilcsoportot tartalmaz β, β' -pozícióban. A 22 π -elektronnak köszönhetően ez egy erősen delokalizált elektronrendszer, melyből csak 18 áll direkt konjugációban egymással.⁴⁵

A protoporfirin IX egy endogén fényérzékenyítő hatóanyag, ez a hem bioszintézis utolsó intermedierje. Egyszerűsége miatt már a klinikumban is elterjedt a hem-ciklus felhasználása a PpIX *in situ* előállítására. Ebben az esetben a szervezetbe orálisan vagy lokálisan juttatott δ -aminolevulinsav (ALA, a hem bioszintézis első intermedierje) hatására a kórosan felfokozott anyagcserével rendelkező sejtek (pl. tumorsejtek) protoporfirin IX-et termelnek. Ez egy kiváló fotoérzékenyítő, azonban a szervezet által termelt PpIX nem csak a rákos, hanem az egészséges sejtekben (pl. a csontvelőben, vörösvértestekben és a májban) is felhalmozódik, ezáltal pedig fényérzékenységet vagy májkárosodást okozhat. Ugyanakkor a PpIX nem halmozódik fel tartósan

a szervezetben, ezért az általános fényérzékenyítő hatása sokkal kisebb mértékű, mint más PS-ek esetében.^{42,46}



6. ábra Protoporfirin IX (PpIX)

A PpIX nemcsak endogén, hanem ún. exogén hatóanyagként (pl. irányított terápiában) is alkalmazható, hiszen két karboxilcsoportja alkalmas irányító molekulák konjugálására, ezáltal lehetőséget adva a szelektivitás növelésére. A PpIX-et felhasználták már peptidekhez,^{47,48} nanorészecskékhez,^{49–51} illetve kvantumpontokhoz való konjugálásra,⁵² valamint polimer dendrimerekben kapszulázva is.^{53,54}

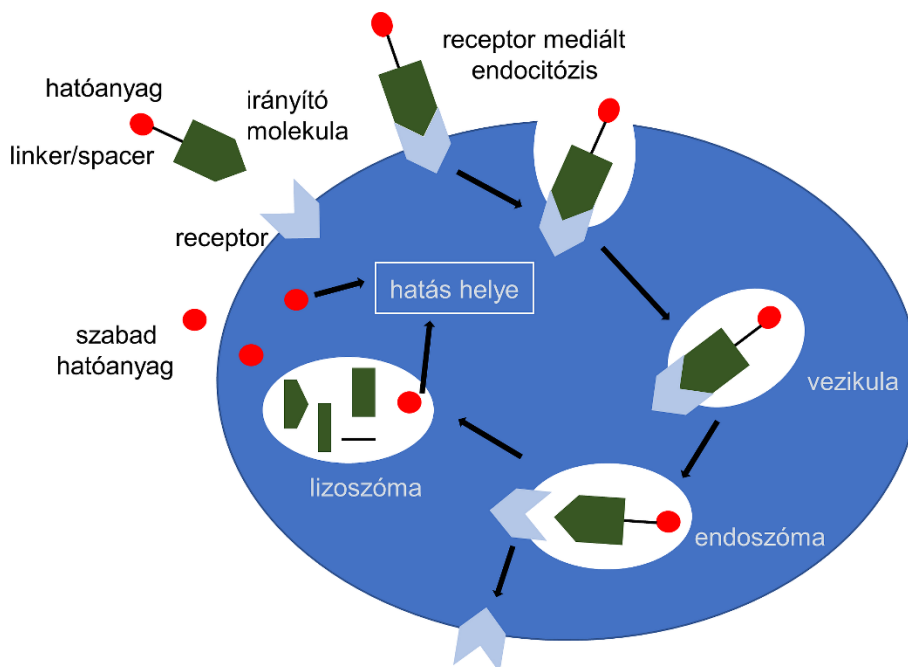
2.1.4 Irányított tumorterápia

Mivel a kemoterápiás szerek számos mellékhatást váltanak ki, nem szelektívek, gyorsan kiürülnek a véráramból és a tumorsejtekben rezisztencia alakulhat ki velük szemben, ezért kézenfekvő megoldást nyújthat olyan gyógyszerek kifejlesztése, amelyek csak a daganatsejtekre hatnak, ezáltal megkímélve az egészséges sejteket és szöveteket. Az 1990-es években fordult a kutatás az irányított tumorterápia felé, melynek segítségével a citosztatikus szerek szelektíven a tumorsejtekbe juttathatók, így egyidejűleg növelve a hatékonyságot és javítva a betegek életminőségét a kezelés alatt. Az alapgondolat, az ún. „magic bullet”, Paul Ehrlichtől származik, aki 1908-ban az immunológia területén végzett munkásságáért Nobel-díjat kapott.⁵⁵ Ez az elmélet olyan anyagokra vonatkozik, amelyek szelektíven hozzákötődnek a kórokozókhoz és a hozzájuk kapcsolt toxin segítségével specifikusan pusztítják el azt. A kötődés a sejt felszínén lévő „oldalláncok” segítségével történik, amely hatására a sejt további ilyen „oldalláncokat” termel.

Ezek a láncok a véráramba kerülnek, és antitestekként viselkedve megvédik a szervezet többi sejtjét a bekerült kórokozóktól.^{56,57} Ez az alapgondolat napjainkra számos új kutatási irányt inspirált.

A célsejt-specifikussághoz szükség van arra, hogy a tumorsejtek és az egészséges sejtek szerkezeti és funkcionális különbségét ismerjük. A kutatások során számos olyan receptort azonosítottak, melyeket a daganatsejtek sokkal nagyobb mennyiségben termelnek és expresszálnak a sejtmembránon, mint az egészséges sejtek. Ha a gyógyszermolekula olyan anyagokhoz kapcsolódik, amelyek ezeket a receptorokat ismerik fel, akkor van esély arra, hogy a hatóanyag nagy szelektivitással a tumorsejtbe jut, és ott felszabadulva csak a tumorsejtben fejt ki a hatását.

Irányított terápiára alkalmasak az úgynevezett hatóanyag szállító rendszerek (drug delivery systems), melyek egy hordozó és egy irányító egységből, illetve a hatóanyagból állnak. Irányítómolekulaként cukrokat, lektineket, antitesteket, receptor-ligandumokat (pl. hormon molekulákat), hordozóként pedig pl. poli(etilén-glikol)-t vagy oligo/polipeptideket lehet alkalmazni. Az irányító és hordozó egységet gyakran egy molekula alkotja, amely betölti mindkettőnek a szerepét.⁵⁸ Általában az irányító molekulákhoz kapcsolt citosztatikus szerek oldékonysága növekszik, specifikusak lesznek a daganatsejtekre, így szabályozottá válik azok felszívódása és szervezeten belüli eloszlása is.

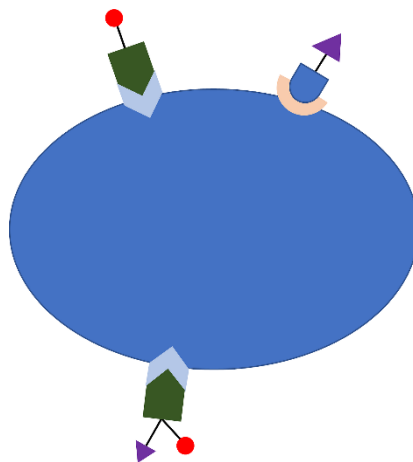


7. ábra Irányított terápia hatásmechanizmusa a tumorsejtben⁵⁹

Receptor-ligandumot irányító molekulaként választva az a tumorsejt felszínén található receptorhoz specifikusan kötődik, majd az egész receptor-konjugátum komplex receptor mediált endocitózissal jut be a sejtbe. Ott először az endoszómába kerül, ahol a receptor leválik a komplexről és így visszakerülhet a sejt felszínére, majd a konjugátum a lizoszómába jut, ahol lebomlik. Végül a felszabaduló hatóanyag vagy annak aktív metabolitja a sejten belül kifejti hatását.⁵⁹ Ezt a folyamatot szemlélteti a 7. ábra.

Azonban a receptorok száma a tumorsejteken korlátozott, illetve több lassan internalizálódik, ezért a hatóanyag – irányító molekula konjugátum mennyiségének növelése önmagában nem teszi hatékonyabbá a kezelést.

Ha több konjugátumot együttesen alkalmazunk, vagy több hatóanyagot egy konjugátumban kombinálunk, akkor megvalósítható a célzott tumorterápiában is a kombinált kezelés (8. ábra).



8. ábra Kombinált célzott tumorterápia lehetőségei

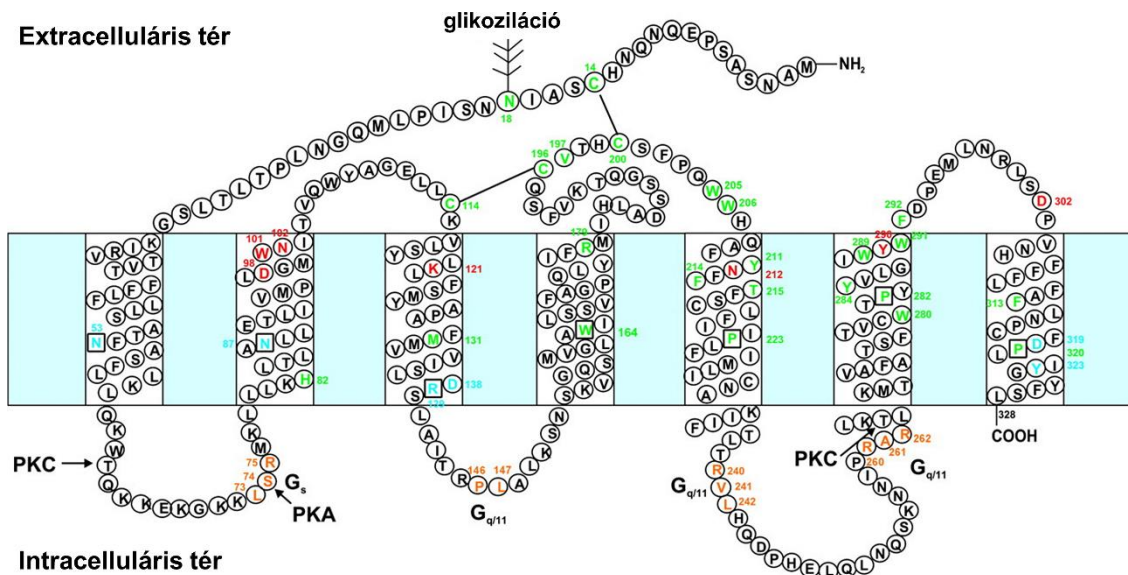
Több konjugátum együttes alkalmazása esetén eltérő receptorokat felismerő különböző irányító molekulákat alkalmaznak, melyekhez azonos vagy különböző hatóanyag kapcsolható. Így a sejtbe juttatott citosztatikus szerek additív vagy szinergista módon fokozzák a tumorellenes hatást. Több, tumorsejt által túlexpresszált receptort ismerünk (pl. GnRH-R, szomatosztatin receptorok, EGF-R, VEGF-R, tuftsin receptorok), melyek célozhatók irányított tumorterápiában, de ehhez a módszerhez olyan receptorokat kell választani, amelyek mindegyike megtalálható az adott sejten. Ezért minden esetben meg kell vizsgálni a választott tumorsejtvonalon a célozni kívánt receptorok jelenlétét.

Ha egy irányító molekulához több hatóanyagot kapcsolunk, akkor fontos megvizsgálni, hogy a hatóanyagok számának növelése rontja-e a receptorhoz való kötődés erősségét, és a receptorfelismerő képességet. A két hatóanyagot tartalmazó konjugátumok általában fokozott citotoxikus hatást mutatnak, továbbá korábbi kutatások igazolták, hogy ha különböző gyógyszermolekulákat kapcsolunk egy megfelelően megválasztott hordozóhoz, azok megőrzik a rájuk jellemző tumorelleses hatást.⁶⁰

2.2 Irányított terápiában alkalmazható célzó peptidok

2.2.1 Gonadotropin-releasing hormon

A gonadotropin-releasing hormon (GnRH) receptor egy G-protein kapcsolt 7TM receptor. Az *N*-terminálist hét α -helikális transzmembrán domén követi, melyeket három extracelluláris és három intracelluláris domén kapcsol egymáshoz. Az extracelluláris domén és a transzmembrán régiók felületi szegmensei felelősek a ligandumok kötődéséért, melyek hatására a receptor konformáció változás hatására aktiválódik, és az intracelluláris doméneken keresztül kölcsönhatásba lép G-fehérjékkel vagy egyéb, a jelátviteli folyamatokban résztvevő fehérjékkel (9. ábra). Emberekben GnRH I-es és II-es típusú receptor is előfordul, azonban ez utóbbi az eddigi ismeretek szerint nem funkcionális.⁶¹



9. ábra Az I-es típusú GnRH receptor két dimenziós ábrázolása.

(Zöld és piros: a szerkezetet meghatározó, illetve a ligandummal kötést kialakító aminosavak; kék: receptor aktiválásban részt vevő aminosavak; narancssárga: G-fehérjék kötődését biztosító aminosavak; PKA és PKC: a protein kinázok foszforilációs pontjai)⁶²

Az I-es típusú GnRH receptor egyik embereknél is megtalálható természetes liganduma a GnRH-I, melynek szerkezetének és hatásmechanizmusának meghatározásáért Roger Guillemin és Andrew V. Schally 1977-ben Nobel-díjat kapott.⁶³ Ez a hipotalamuszban kiválasztódó decapeptid (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, ahol Glp a piroglutaminsav) fontos szerepet játszik az emlősök szaporodásában. A GnRH-I szabályozza az ivarmirigyek aktivitását a luteinizáló hormon (LH) és follikulus stimuláló hormon (FSH) kiválasztásának serkentésével, ezáltal kontrollálva az ivarsejtképződést és a szexuális szteroidhormonok termelődését.⁶⁴ Az eredetileg csirkéből izolált GnRH-II (Glp-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂) egy másik izoforma, mely szintén megtalálható az emberi szervezetben. Elsősorban a perifériás szövetekben expresszálódik, megtalálható többek között a vesében, a csontvelőben, a prosztatában és a női szaporító szervekben is.⁶⁵ Pontos szerepét még nem sikerült tisztázni, azonban a kutatások eredményei azt mutatják, hogy neuromodulátor szerepet tölt be ezáltal befolyásolva a szexuális viselkedést.⁶⁶ A GnRH receptor (GnRH-R) a hipofízis mellett azonban nem csak a reprodukív rendszerhez (prosztata, emlő, méhnyálkahártya és petefészek) kapcsolódó szerveken fejeződik ki nagy mennyiségben, hanem számos tumorsejten is túlexpresszálódik. Megtalálható többek között fej-nyaki ráktípusokon, vese, máj, hasnyálmirigy és vastagbél karcinómákon, illetve megjelenik melanóma, agyi tumorok és non-Hodgkin limfóma esetén is.⁶⁷ Ezért a GnRH receptorok jó célpontjai lehetnek a célzott tumorterápiának.

Az eddig kifejlesztett GnRH-I és GnRH-II agonista és antagonisták mind hatással vannak a hormonrendszerre, azonban erős tumorellenes aktivitást is mutatnak.^{61,68} Ez a tumorellenes hatás lehet direkt vagy indirekt. A GnRH analógok a tumorsejt felszínén található receptorhoz kötődve direkt módon (sejtosztódás-, áttétképződés-, érzékelésgátlás), míg a hipotalamusz – hipofízis – ivarmirigy endokrin rendszert befolyásolva indirekt módon fejtik ki hatásukat. Az indirekt hatás következtében átmenetileg „kémiai kasztráció” jön létre: leáll a LH, FSH szekréció, illetve a petefészek- és here-funkciók, amelyek így nem termelnek szteroid hormonokat. Ezt a jelenséget széles körben alkalmazzák hormonfüggő tumoros megbetegedések kezelése során, ugyanis ennek eredményeként a daganat növekedése csökken. A kasztrációt előidéző molekula megvonásával a szabályozási folyamat visszaáll eredeti állapotába.^{69,70}

A GnRH-III (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂) egy gyenge GnRH agonista hatású, természetes GnRH analóg, melyet eredetileg a tengeri ingolából (*Petromyzon marinus*) izoláltak. Ez az analóg képes hatékonyan kötődni mind a GnRH-I, mind a GnRH-II receptorhoz,

továbbá a természetes analógok közül ez a forma gátolja a legnagyobb mértékben a sejtproliferációt, miközben az endokrin hatása emlősökben elhanyagolható.⁷⁰ Ez a tulajdonsága pozitív lehet a nem hormon függő tumorok kezelésében.

Ezen három GnRH hormonpeptid mellett már további 20 izoformát azonosítottak a természetből, melyek aminosav szekvenciája 70%-os egyezést mutat. Az *N*- és *C*-terminális régiók (1-4. és 9-10. aminosavak) felelősek a receptorkötődésért és aktiválásért, így az evolúció során konzerválódtak, eltérések csak az 5-8. aminosavakban vannak (1. táblázat). Ezek az aminosavak a peptidok szignifikáns hatékonyságvesztése nélkül lecserélhetők. A 8-as pozíciójú aminosav a legszélsőségesebben változtatható, szinte akármelyik aminosavra lecserélhető, azonban egyes kutatások azt mutatják, hogy ez a pozíció felelős a különböző GnRH receptorok ligand-specifitására.⁶¹

1. táblázat GnRH-I, GnRH-II és GnRH-III analógok szekvenciája.
(Bekereztetve a szekvenciában található konzervált aminosavak láthatóak.)

Peptid	Szekvencia
GnRH-I	Glp-His-Trp-Ser Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂
GnRH-II	Glp-His-Trp-Ser His-Gly-Trp- Tyr-Pro-Gly-NH ₂
GnRH-III	Glp-His-Trp-Ser His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH ₂

A GnRH-I és GnRH-II esetén a 6-os helyzetű glicin cseréje *D*-lizinre nem csak konjugálási pontként funkcionálhat, hanem növeli a peptid enzim stabilitását, illetve erősíti az agonista hatását is.⁷¹ Ez a módosítás megkönnyíti a β -II turn konformáció kialakulását, ezáltal elősegítve az *N*- és *C*-terminálisok jobb kötődését a receptorhoz, a hatást tízszeresére növelve.⁶¹ Ilyen *D*-lizinnel funkcionizált GnRH származékokat alkalmaztak már daunorubicin konjugálásra közvetlenül vagy egy enzim-labilis távtartón (spaceren) keresztül, és kimutatták, hogy ezen konjugátumok hosszútávú *in vivo* citotoxikus hatása összehasonlítható volt a szabad hatóanyag hatásával.²⁰ Schally és munkatársai fejlesztették ki az AN-152 konjugátumot, melyben a doxorubicin észterkötéssel egy glutársav linkerén keresztül kapcsolódik a GnRH-I-[⁶*D*-Lys] származékhoz.⁷² Ezt a vegyületet széleskörű *in vitro*^{73,74} és *in vivo*⁷⁵⁻⁷⁸ vizsgálatoknak vetették alá, ezek után pedig klinikumban is tesztelték.^{79,80} Azonban az ígéretes preklinikai eredmények ellenére nem tudta növelni a betegek túlélését és az állapotuk sem volt jobb a szabad doxorubicinnel kezelt csoporthoz képest méhnyálkahártyarák esetén. Így fázis III-ból már nem léphetett tovább.⁸¹ A számos tumor

típusra kiterjedő széles körű vizsgálatok igazolták, hogy az AN-152 hatékony GnRH-t expresszázó száj- (KB) és gége karcinóma (HEp-2) sejtek esetén is, továbbá sikerült a sejtek doxorubicin rezisztenciáját is legyőzni a segítségükkel.⁸² Rahimpour és munkatársai pedig protoporfirin IX-et, egy a fotodinamikus terápiában alkalmazott hatóanyagot kapcsoltak a GnRH-I[⁶D-Lys] peptidhez, mellyel szelektív receptor mediált fototoxicitást sikerült elérniük α T3-1 agyalapimirigy gonadotrop sejteken.⁴⁷ Ugyanezt a GnRH analógot felhasználták más fototoxikus hatóanyag kapcsolásához is. Ezen vizsgálatok során kárminsavat, egy hidroxiantrakinon származékot is konjugáltak a peptidhez és megállapították, hogy a hatóanyag konjugátum formában is megőrzi a hatékonyságát, illetve besugárzás hatására reaktív oxigén specieszek keletkeznek a sejtben belül, mely végül a sejt halálát okozza.⁸³

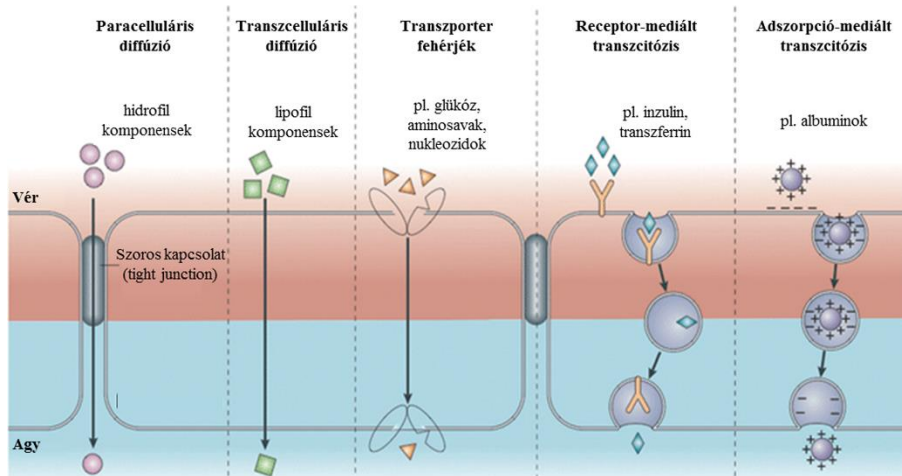
A GnRH-III esetében a szekvencia két konjugációra alkalmas oldallánc funkció csoportot is tartalmaz (⁶Asp és ⁸Lys). Korábbi kutatások kimutatták, hogy a nyolcas pozícióban található lizin oldalláncának funkcionálizálása nem befolyásolja jelentős mértékben az antiproliferatív hatást és a receptorkötődést,²¹ miközben jelentősen csökkenti a peptid endokrin hatását,²² így ez a pozíció a legalkalmasabb hatóanyagok kapcsolására. A négyes helyzetű szerin nem játszik szerepet a receptorhoz való kötődésében, így lizinre cserélve a lizin ϵ -aminocsoportja egy plusz konjugálási helyet biztosít a molekulában, továbbá ez a csere nem változtatja meg a peptid antiproliferatív és endokrin hatását sem.⁸⁴ A ⁴Lys oldalláncának vajsavval, egy rövid szénláncú zsírsavval történő módosítása (⁴Lys(Bu)) szignifikánsan növeli a peptid és a daunorubicint oximkötésen keresztül tartalmazó konjugátum enzimikus stabilitását,²³ illetve fokozza az *in vivo* antitumor hatását is.⁸⁵ Kutatócsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy a ⁴Ser \rightarrow ⁴Lys(Bu) csere a GnRH-II Dau konjugátuma esetében is szignifikánsan növeli a citosztatikus hatást, azonban csak kismértékű növekedést eredményez a GnRH-I analóg esetén.

Doktori munkám során vajsavval módosított GnRH-I, -II és -III származékokat állítottam elő, majd ezeket egy, a fotodinamikus terápiában alkalmazható protoporfirin IX fotoérzékenyítő hatóanyaggal konjugáltam. Az így előállított konjugátumok hatékonyságát Detroit-562 humán garatrák sejtvonalon vizsgáltuk.

2.2.2 Angiopep-2

Az agydaganatok kezelésében a vér-agy gát (blood-brain barrier, BBB) komoly kihívást jelent. A BBB a perifériás keringést és az agyi extracelluláris folyadékot elválasztó szemipermeabilis

rendszer. Feladata a központi idegrendszer tápanyag- és oxigénellátása, a megfelelő ionkoncentráció beállítása, illetve a hormonális szabályozás, továbbá az agy toxikus anyagokkal szembeni védelme. A tulajdonképpeni gátat az agyi kapillárisok falát alkotó endotélsejtek szokásosnál szorosabb illeszkedése (tight junction) képezi, ezzel elsősorban a hidrofíl vagy nagy molekulatömegű anyagok átjutását gátolva. Emiatt a hatóanyagok nagy részének csekély a vér-agy gáton keresztüli transzportja, ami megakadályozza, hogy azok ténylegesen eljussanak az agyi célsejtekig és ott kifejthessék terápiás hatásukat.⁸⁶

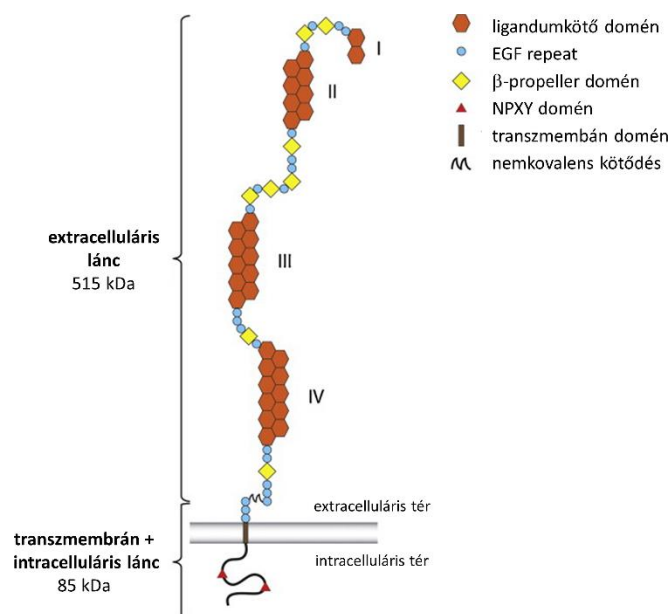


10. ábra A vér-agy gáton történő átjuttatás lehetőségei⁸⁷

Paracelluláris transzporttal kis hidrofíl molekulák, mint a víz és a kis ionok (pl. Na^+ , K^+ , Cl^- ionok), míg transzcelluláris transzporttal kis lipofíl molekulák, mint a szteroidhormonok, etanol, koffein, illetve légzési gázok (O_2 , CO_2) juthatnak át a BBB-n. Ez a két folyamat passzív diffúzióval megy végbe. Nagyobb és polárisabb molekulák BBB-n való átjuttatására különféle aktív folyamatokat használ a szervezet. Transzporter fehérjék segítségével jutnak át a sejt fenntartáshoz szükséges kisebb poláris építőelemek, mint a glükóz, nukleotidok, aminosavak, míg a nagy molekulatömegű vagy pozitív töltésű makromolekulák (pl. transzferrin, albumin) pedig vagy adszorpció mediált, vagy receptor mediált transzcitózissal juthatnak át a vér-agy gáton (10. ábra).⁸⁸

A 19 aminosavból álló Angiopep-2 peptidet (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY) 2008-ban publikálták először.⁸⁹ Igazolták, hogy ez a peptid az alacsony sűrűségű lipoprotein-receptorok (LDLR) családjába tartozó alacsony sűrűségű lipoprotein receptor-kapcsolt fehérjék (LRP1 és LRP2) ligandja.

Az LRP1 egy 515 kDa-os extracelluláris, illetve egy 85 kDa-os transzmembrán és intracelluláris láncból áll, melyek nemkovalensen kapcsolódnak egymáshoz (11. ábra). Az extracelluláris lánc négy ciszteinben gazdag ligandumkötő domént (I-IV klaszterek) tartalmaz, melyek közül a II. és IV. domének a fő LRP1 ligandumkötő régiók. Az intracelluláris domén felelős a gyors internalizálódásért (<0,5 s), illetve az NPXY motívumon való foszforilálódás után részt vesz a sejten belüli szignalizációban is. Bár az LRP1 feladata elsősorban a koleszterin szállítása és metabolizmusának szabályozása, számos egyéb liganduma is ismert, mint például az apolipoprotein E, a szöveti plazminogén aktivátor (tPA), különböző vérkoagulációs faktorok (pl. VIII faktor), a β -amiloid peptid ($A\beta$) és az aprotinin. Az LRP1 megtalálható a vér-agy gátat alkotó endotél sejteken, illetve túlexpresszálódik bizonyos típusú tumorsejteken is, így az LRP1 ligandumok először receptor-mediált transzcitózissal kerülnek az agyba, majd ott receptor-mediált endocitózissal szelektíven a tumorsejtekbe juthatnak.⁹⁰

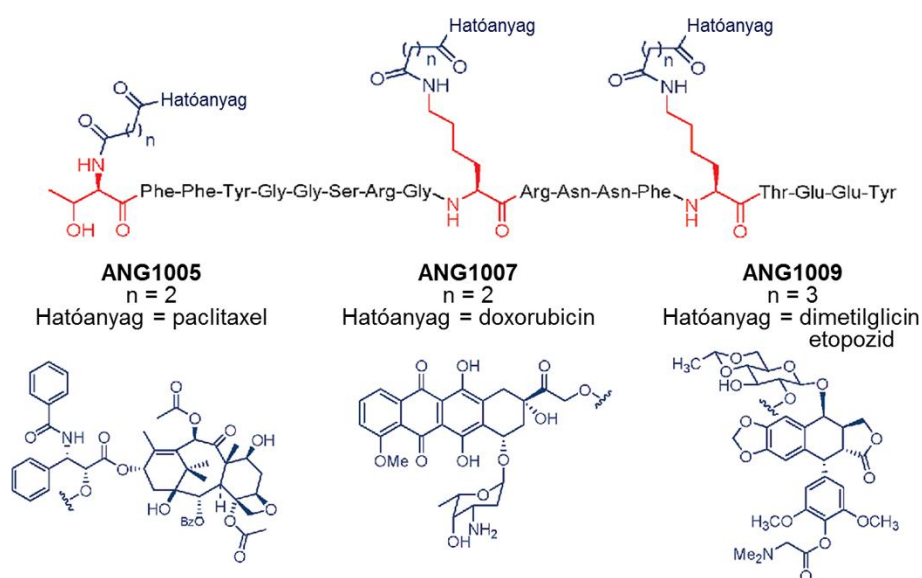


11. ábra Az LRP1 sematikus szerkezete⁹¹

Demeule és munkatársai kutatásaik során az aprotinin fehérje BBB-n való átjutását vizsgálták. Az aprotinin transzportért felelős doménjének azonosításához szekvencia homológia vizsgálatot végeztek a BLAST fehérje adatbázis segítségével, és azt találták, hogy a legnagyobb egyezést mutató humán fehérjék mind LRP1 ligandumok (bikunin, β -amiloid prekursor protein, Kunitz-típusú proteáz inhibitor-1 prekursor), a homológ szekvenciárészlet pedig a Kunitz-típusú proteáz

inhibitor domén. Az illesztés alapján tervezett 96 peptid közül az Angiopep-1 bizonyult a leghatékonyabbnak a BBB-n való átjutásban, majd ennek a további módosításával, azaz a szekvenciában szereplő cisztein szerinre történő cseréjével állították elő az Angiopep-2 peptidet.⁸⁹

Az Angiopep-2-t rövid időn belül konjugátumok előállítására is felhasználták. Az első ilyen származék az ANG1005 volt, mely gyógyszerhatóanyagként paclitaxelt tartalmazott. A peptidhez kapcsolva a hatóanyag sokkal nagyobb mennyiségben jutott át az agyba, és sikeresen demonstrálták a konjugátum glioblastoma elleni hatásosságát is.⁹² Az elkövetkező években még két hasonló szerkezetű irányított terápiára alkalmas konjugátumot állítottak elő: az ANG1007 doxorubicint, míg az ANG1009 etopozid hatóanyagot tartalmazott.⁹³ A konjugátumok mindegyikében három-három gyógyszermolekulát kapcsoltak a peptidhez a két lizin oldallánc és az *N*-terminális aminos csoportjait felhasználva, minden esetben észterkötést kialakítva a hordozó és a hatóanyag között. Az így előállított konjugátumok szerkezetei a 12. ábra láthatók.



12. ábra Az ANG1005, ANG1007 és ANG1009 konjugátumok szerkezete⁹³

Az ANG1005 szabadalmi jogait az Angiochem Inc. birtokolja, továbbfejlesztését is ez a cég koordinálja. A klinikai vizsgálatok I. fázisa 2010-re, II. fázisa pedig 2017-re fejeződött be, a konjugátum tolerálhatóságát és tumorellenes hatását glioblastomán és mellrák agyi metasztázisain tesztelték. Jelenleg az ANG1005 a klinikai vizsgálatok III. fázisának megkezdésére vár.⁹⁴

Az első sikeres próbálkozások óta az Angiopep-2-t több konjugátum előállítására is felhasználták. Az ANG2002 esetében a peptid *C*-terminálisára beépített ciszteinhez kapcsoltak egy

neurotenzint egy a központi idegrendszerben ható fájdalomcsillapító előállítására,⁹⁵ míg az ANG4043 esetében négy Angiopep-2 peptidet kapcsoltak az *N*-terminálisukon keresztül egy HER2 szelektív monoklonális antitesthez mellrák agyi metasztázisainak kezelésére.⁹⁶ Mindkét esetben a preklinikai stádium kísérletei zajlanak.⁹⁴

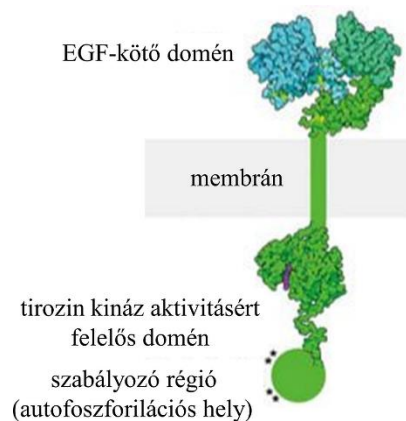
Előállították az Angiopep-2 retro-inverz izomerjét is (^DAngiopep), mely *in vitro* sejtbejutási képessége kisebb volt, mint az L-variánsé. Azonban a D- és L-Angiopep-2 peptidekkel módosított micellák hasonló hatékonysággal képesek célozni az agydaganatokat, ami valószínűleg a D-aminosavak proteolízissel szembeni stabilitásával magyarázható.⁹⁷ Ezen kívül számos egyéb publikáció született az Angiopep-2 nanorészecskékhez (NP) való kapcsolásáról, ehhez poli(amidoamin)-dendrimereket,^{98,99} polilizin dendrigrafttal módosított zselatin nanorészecskéket,¹⁰⁰ pegilált foszfolipid micellákat,¹⁰¹⁻¹⁰³ poli(etilén-glikol)-poli(ε-kaprolaktám) nanorészecskéket,^{104,105} elektro-reszponzív hidrogéleket,¹⁰⁶ szén nanocsöveket,¹⁰⁷ illetve arany nanorészecskéket¹⁰⁸ használták. A legtöbb esetben a peptid *C*-terminálisára beépített ciszteinen keresztül tioéterkötéssel kapcsolták a különböző NP-eket. A nanorészecskéket gyakran egy másik irányító molekulával is módosították (pl. sejtpenetráló peptiddel,^{109,110} szöveti faktor kötő fúziós fehérjével¹⁰⁴ vagy neuropilin-1 ligandummal¹⁰¹) a kettős irányítás (dual targeting) eléréséhez. Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok minden esetben azt mutatták, hogy az irányító peptidekkel módosított NP-k képesek szelektíven és jó hatékonysággal célozni az agyi daganatos sejteket.

Doktori munkám során az Angiopep-2 konjugátumok szintéziséhez a peptidben található mindhárom konjugációra alkalmas aminocsoportot (két lizin oldallánc és az *N*-terminális) felhasználtam, és előállítottam az összes egy, két, illetve három daunomicint tartalmazó származékot. Az így előállított konjugátumok hatékonyságát U87 humán glioblastoma sejtvonalon vizsgáltuk.

2.2.3 Epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) irányító peptidek

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és ligandumjai nem csak a normális sejtek folyamatait irányítják, hanem a rosszindulatú daganatok kialakulásában is kulcsfontosságú szerepet játszanak. Az EGFR a szolid tumorok (pl. tüdő-, máj-, emlő- és vastagbél karcinómák) nagy részében (> 60%) túlexpresszálódik, továbbá jelentősen nagyobb számban jelenik meg a tumorsejtek felszínén, mint az egészséges sejteken. Működésével többek között fokozza a sejtosztódást és az angiogenezist, serkenti a differenciálódást és fokozott sejt-vándorlást

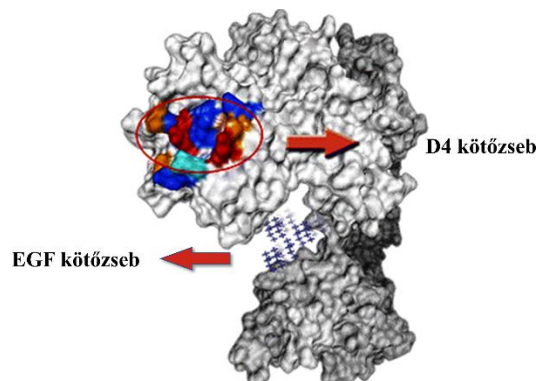
eredményez, ezáltal pedig növeli a metasztázisok kialakulásának valószínűségét. Mindezek mellett gátolja az apoptózist, amely növeli a tumorsejtek túlélési képességét is. Az EGFR a transzmembrán tirozin kináz receptorok ErbB/HER családjába tartozik. A fehérje egy a ligandumkötődésért felelős glikozilált és ciszteinekben gazdag extracelluláris domént, egy α -helikális transzmembrán domént, egy intracelluláris tirozin kináz domént és egy C-terminális szabályozó régiót tartalmaz (13. ábra). A ligandum kötődése aktiválja a tirozin kináz régiót, mely dimerizációhoz, autofoszforylációhoz, a szignalizációs útvonalak aktiválódásához és végül endocitózishoz vezet.^{111–114}



13. ábra Az EGFR sematikus szerkezete¹¹¹

Az EGFR célzására két stratégia létezik: az extracelluláris domént blokkoló ligandumok (monoklonális antitestek (pl. Cetuximab) vagy peptidek) alkalmazása, illetve a kináz aktivitást gátló ATP-kompetitív kismolekulák (pl. Gefitinib) használata.¹¹⁵ Az irányított tumorterápia szempontjából az első stratégiát könnyebb megvalósítani. Ehhez már számos különböző EGFR célzó peptidet sikerült azonosítani, melyek nagy részét már sikeresen alkalmazták az irányított terápiás kísérletekben.^{116–119} Li és munkatársai fágbemutatással azonosítottak egy szelektíven az EGFR-hez kapcsolódó dodekapeptidet, melyet GE11-nek (YHWYGYTPQNVI) neveztek el. Ez a peptid ligandum antagonistaként kötődik az EGF kötőzsebéhez ($K_d \approx 22$ nM), azonban az immunogenitása és mitogén hatása jóval kisebb a természetes EGF fehérjéhez képest.¹²⁰ További kutatások bebizonyították, hogy a GE11 klatrin függő receptor mediált endocitózissal jut be a sejtbe, az EGFR szignalizáció indukálása nélkül, ám ez a bejutás lassabb, mint a természetes ligandum (EGF) receptor mediált endocitózisa.¹²¹ A GE11-et már hatékonyan alkalmazták nanorészecskék^{122,123} és micellák¹²⁴ célba juttatására, gének,¹²⁵ adenovírus vektorok¹²⁶ és tumorelles microRNasek szállítására,¹²⁷ valamint fotodinamikus terápia során is.^{128–130}

Egy másik EGFR célzó peptid a D4 (LARLLT), melyet számítógépes tervezéssel azonosítottak. Kimutatták, hogy ez a hexapeptid specifikusan kötődik az EGF receptorhoz, ám a kötőzseb a receptor felszíne közelében található, amely különbözik az EGF kötőzsebtől (14. ábra).¹³¹



14. ábra A D4 kötőzsebének helye az EGF receptoron¹³¹

A D4 módosított liposzómába zárt doxorubicin *in vitro* célba juttatása sikeres volt EGFR-t túltermelő sejtvonalak (H1299 humán nem-kissejtes tüdőkarzinóma sejtek (NSCLC) és SPCA-1 humán tüdő adenokarcinóma) esetében. Valamint a konjugátumok *in vivo* körülmények között is hatékonyan a tumorba jutottak, ahol még több, mint 80 órával később is kimutathatók voltak.¹³¹ Azóta a D4 peptidet már sikeresen használták egy IR-közeli fluoreszkáló képalkotó anyag¹³² és különféle fényérzékenyítő hatóanyagok^{128,130} irányítására is.

Doktori munkám során GE11 és D4 irányító peptidet, daunomicint és enzim-labilis spacer (GFLG, YRRL) tartalmazó konjugátumokat állítottam elő. Mivel mindkét peptid számos hidrofób aminosavat tartalmaz, ezért vizsgáltam a konjugátumok oldhatóságának növelését vízoldható polimerrel való kapcsolás segítségével. Az így előállított konjugátumok hatékonyságát HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon vizsgáltuk.

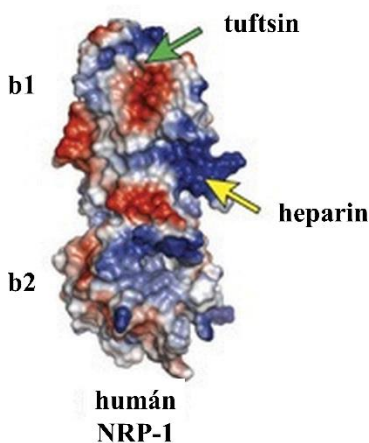
2.2.4 Tuftsin

A tuftsint, mely a nevét az egyesült államokbeli Tufts Egyetemről kapta, Najjar és Nishioka fedezték fel 1970-ben.¹³³ Kimutatták, hogy a leukokinin stimuláló hatását egy tetrapeptid (Thr-Lys-Pro-Arg) okozza, amit a leukokinináz és tuftsin endokarboxipeptidáz enzimek szabadítanak fel.^{133,134} Továbbá igazolták, hogy ez a hasítás elsődlegesen a lépben megy végbe. A humán tuftsin az immunglobulin G Fc nehéz lánc CH2 doménjének a 289-292-es szakasza. Felszabadulása után jelentős szerepet játszik az immunfolyamatokban, stimulálja a fagocitózist, a sejt migrációt és

antitumor hatása is van.¹³⁴⁻¹³⁶ A kedvező tulajdonságai miatt a tuftsin hordozómolekulaként is használható, növeli az immunsejtek kemotaktikus aktivitását, fagocitózist és fokozza az antigén prezentáló képességüket.^{135,137} Korábbi kutatások igazolták, hogy a polituftsinok ($[TKPR]_n$) és konjugátumaik megőrzik a tuftsin immunrendszerre gyakorolt hatását, miközben megnövelik a gyengén immunogén peptidek elleni immunválaszt.¹³⁸⁻¹⁴² Ezekben az esetekben az epitóp peptideket glutársavanhidrid segítségével kapcsolták a hordozó tuftsinhoz.

A tuftsin hatásmechanizmusát vizsgálva, csak 16 évvel a molekula felfedezése után, 1986-ban sikerült izolálni a receptorát.¹⁴³ További 20 évvel később von Wronski és munkatársai véletlenül fedezték fel, hogy a tuftsin a tumorsejteken túlexpresszált neuropilin-1-hez (NRP-1) is kötődhet.¹⁴⁴ A nem-tirozin kináz receptorok családjához tartozó NRP-1 a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor (VEGF-R) ko-receptora, ezáltal részt vesz a tumor növekedésének szabályozásában és fontos szerepet tölt be annak érépződésében (angiogenezisében). Azonban ha a tuftsin hozzákapcsolódik az NRP-1 receptorhoz, akkor megakadályozza a VEGF kötődését, ezáltal gátolva az érépződést, a sejt migrációt és a metasztázist.¹⁴⁴

A 120-130 kDa-os NRP-1 receptor öt doménből épül fel: a három extracelluláris domént (a1a2, b1b2 és c) egy transzmembrán régió és egy rövid citoplazmában található fark rész követ. A két első extracelluláris domén (a1a2 és b1b2) felelős a ligandumok kötődéséért (15. ábra), míg a harmadik (c) fontos szerepet játszik a homo- és heterodimerizáció során. A 42-44 aminosavat tartalmazó intracelluláris farknak önmagában nincs katalitikus aktivitása, de tartalmaz egy PDZ (fehérje-fehérje felismerésért felelős) régiót. Ez képes a különböző fehérjékkel kölcsönhatásba lépni, melyek a kötődést követően jelátviteli útvonalat indítanak be.¹⁴⁵



15. ábra A humán NRP-1 b1b2 doménjén található kötőhelyek¹⁴⁶

Az NRP-1 fág könyvtárból származó ligandjainak szisztematikus vizsgálata során fedezték fel, hogy a legtöbb jól kötődő ligandum argininre vagy esetleg lizinre végződik, illetve a C-terminális aminosav szekvenciájuk az R/KXXR/K mintázatot követi. Azt is tapasztalták, hogy ha az arginint lecserélik vagy akár a karboxilcsoportját elreagáltatják, a receptorkötődés jelentősen csökken. Ez a szabály az úgynevezett „C-terminális szabály” (C-end rule, CendR).¹⁴⁷ Ennek a tuftsin majdnem, azonban az antagonistá TKPPR tuftsin analóg teljesen megfelel, és magyarázza, hogy ez utóbbi miért képes négyszer nagyobb affinitással kötődni a receptorhoz.¹⁴⁴

Kutatócsoportunkban korábban kifejlesztettek egy tuftsin analógot (TKPKG), mely a kutyában előforduló tuftsin variáns glicinnel meghosszabbított formája. A szerkezet-hatás vizsgálatok alapján az Arg→Lys csere nincs jelentős hatással a biológiai tulajdonságokra,¹⁴⁸ míg a glicin beépítése a C-terminálisra jelentősen megnöveli a peptid immunstimuláló hatását.¹⁴⁹ A TKPKG oligomer formái nem toxikusak, nem immunogének, de megőrzik a tuftsin immunstimuláló hatását.¹⁵⁰

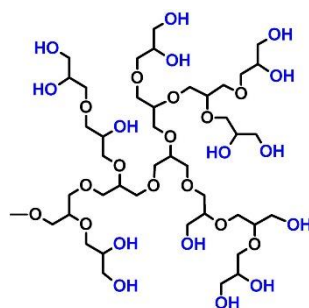
Mindhárom tuftsin analóg (TKPR, TKPPR, TKPKG) esetén a lizinek ε-aminocsoportjai lehetővé teszik egy biológiailag aktív molekula hozzákapsolását, az így izopeptid kötés révén kialakított elágazó szerkezet pedig megnöveli a molekula stabilitását.¹⁵¹ Mindegyik analóg és oligomerjei esetében felhasználták már ezt a konjugációs pontot hatóanyagok kapcsolására, TKPKG és TKPPR esetén metotrexátot és daunomicint,^{20–21} míg TKPR esetén akridin származékokat¹⁵⁴ alkalmaztak.

Doktori munkám során elágazó TKPR-daunomicin konjugátumokat állítottam elő. A daunomicin önmagában jellegzetes elektropray ionizációs tömegspektrumot mutat, ahol a cukor egység az MS körülmények között lehasad. Ez bázikus csoportok jelenlétében pl. lizin és arginin esetében (melyek megtalálhatók a TKPR szekvenciájában) fokozottabb, ezért az ilyen típusú konjugátumok tömegspektrometriás azonosítása problémába ütközik. A munkám során ennek a problémának a megoldását is vizsgáltam.

2.3 Spacerek, oldékonyság növelő molekulák

Az irányított terápiában alkalmazott biokonjugátumok klinikumban való alkalmazhatóságát gyakran akadályozza azok nem megfelelő oldhatósága. A hatóanyag hordozó rendszerek hidrofilitásának és vízben való oldhatóságának fokozása érdekében számos különböző stratégiából választhatunk. Alkalmazhatunk például ionos és/vagy hidrofil aminosavakat (β-szulfoalanin),¹⁵⁵

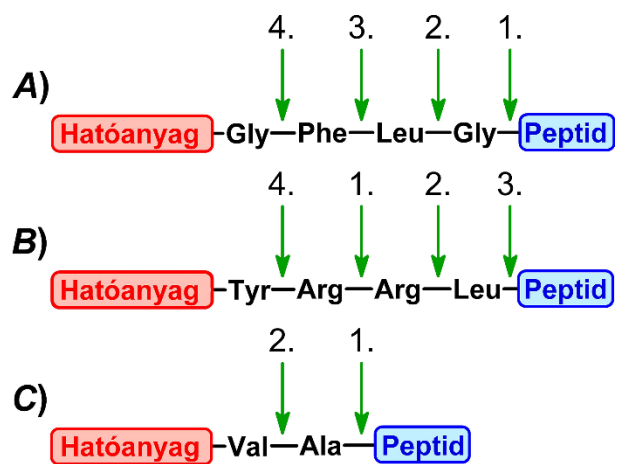
rövid peptidszekvenciákat (ismétlődő Gly és Ser egységeket¹⁵⁶ vagy polikationos/polianionos tageket¹⁵⁷) vagy vízoldható polimereket is. A legelterjedtebb és legnépszerűbb megoldás a poli(etilén-glikol) (PEG) konjugációja.¹⁵⁸ A kereskedelemben számos monofunkciós, illetve homo- vagy heterobifunkciós PEG-származék kapható. Ezeket különféle funkciócsoportokkal vagy funkciócsoport kombinációkkal állítják elő, például amino-, karboxil-, maleimido-, azido- vagy alkin csoportokat tartalmazó származékok is elérhetők, hogy a teljes szintetikus tárházat le tudják fedni. A PEG-nek azonban mára már számos hátránya ismert, például biológiai rendszerekben nem lebontható és túlérzékenységet is okozhat.¹⁵⁹ Ezért napjainkban mindinkább előtérbe kerülnek a PEG nemlineáris analógjai, mint a hiperelágazós poliglicidol (HbPG),¹⁶⁰ melyek hasonló kedvező tulajdonságokkal bírnak, mint a PEG, azonban kevesebb negatív hatásuk ismert. A HbPG kiemelkedő vízoldhatósággal és biokompatibilitással rendelkezik, továbbá szintézise és funkcionálizálása könnyen elvégezhető, így ez a poliéter-poliol az egyik legaktívabban tanulmányozott elágazó polimer a PEG helyettesítésére. A HbPG szerkezete a 16. ábra látható. Ezen polimer funkcionálizálására már kidolgoztak néhány eljárást, mellyel jól meghatározott számú és helyzetű funkciós csoportot (pl. aminot, karbonsavat, klór-acetamidot, maleimidet, alkin funkciós csoportot) lehet a HbPG-re beépíteni.^{161–163} Ezek a származékok jól használhatók hatóanyag hordozó rendszerek szintéziséhez, és segítségükkel javítható a különböző bioanyagok oldhatósága és biokompatibilitása is.



16. ábra A HbPG szerkezete

A biokonjugátumok hatékonysága egy speciális távtartó segítségével is növelhető. A hatóanyag és a peptid közé például egy olyan peptidlinker (spacer) építhető, amely érzékeny a tumorsejtekben nagy mennyiségben termelődő lizoszomális enzimekre (pl. katepszin B-re). Egy ilyen spacer növeli a konjugátumok szelektív hatását, hiszen a hatóanyag felszabadulás csak a sejten belül, a metabolizmus során történik meg. Ilyen ismert és széles körben alkalmazott katepszin B labilis

peptidszekvenciák például a GFLG,¹⁶⁴ a VA¹⁶⁵ és az YRRL.¹⁶⁶ Ezen szekvenciák hasítási pontjai a 17. ábra láthatók.



17. ábra Katepszin B labilis spacerok és hasítási pontjaik.
(A számok a hasítási pontok időbeli sorrendjét jelölik.)

3 Célkitűzések

Doktori munkám során az irányított tumorterápiában alkalmazható hatóanyag-peptid konjugátumok tervezésével és szintézisével foglalkoztam. A kutatás során célom volt vizsgálni az irányító peptid szerkezeti módosításának hatását, illetve a hatóanyagok számának és pozíciójának szerepét és fontosságát a konjugátumok *in vitro* biológiai hatékonyságára. Továbbá célom volt a munka során felmerült oldhatósági és analitikai problémákra a megfelelő módszerek kidolgozása és vizsgálata.

A kutatásom első részében az irányító molekula szerkezetére fókuszáltam. Ehhez célom volt olyan konjugátumok előállítása, melyek irányító molekulaként vajsavval módosított gonadotropin-releasing hormon származékokat (GnRH-I, -II és -III) tartalmaznak. Ezen GnRH analógok mindegyike különböző affinitással képes a GnRH-I receptorhoz kapcsolódni, így felhasználhatók GnRH-R-t túlexpresszáló tumorok célzására.⁶² Célom volt az előállított konjugátumok fotodinamikus terápiában való alkalmazása, ezért hatóanyagként a fényérzékenyítő protoporfirin IX-et terveztem konjugálni. A konjugátumok hatékonyságát egy megfelelő sejtes modellen terveztem vizsgálni, továbbá célul tűztem ki az alkalmazott kísérleti körülmények (koncentrációtartomány, inkubációs és besugárzási idő) optimalizálását is. Feltételezésem szerint, az így kapható eredményekből olyan következtetések vonhatók le, melyek hozzájárulhatnak ezen konjugátumok szerkezet-hatás összefüggéseinek jobb megértéséhez.

A munkám második részében a konjugátumban található hatóanyagok számának és pozíciójának szerepére és fontosságára koncentráltam. Ebben az esetben a vér-agy gáton átjutni képes és egyidejűleg glioblastoma célzására is alkalmas Angiopep-2 irányító peptidet és daunomicint mint hatóanyagot terveztem alkalmazni a különböző konjugátumok előállítására. Ez a peptid három aminocsoportot (két lizin oldallánc és az *N*-terminális) tartalmaz a szekvenciában, így szintetikus szempontból kényelmesen egyszerre három hatóanyag konjugálása lehetséges. Korábban előállítottak már különböző kismolekulás hatóanyagokat tartalmazó Angiopep-2 konjugátumokat, és mindegyik esetben mindhárom aminocsoportot felhasználták a konjugálásra.^{89,93} Azonban ezt a döntést nem indokolták részletesen. Ezért a munkám során célom volt az összes lehetséges egy, kettő, illetve három daunomicint tartalmazó konjugátum előállítása és a különböző szerkezetek *in vitro* biológiai aktivitásának vizsgálata. Terveztem az előállított vegyületek *in vitro* citosztatikus aktivitásának és sejtbejutásának vizsgálatát, továbbá a hatás teljes

körü feltérképezése érdekében degradációs kísérleteket is szerettem volna végezni patkány máj lizoszóma preparátumban. Az így kapott eredmények alapján komplex képet kaphatunk a hatóanyagok számának és elhelyezkedésének, vagyis a konjugátum szerkezetének a biológiai aktivitásra gyakorolt hatásáról.

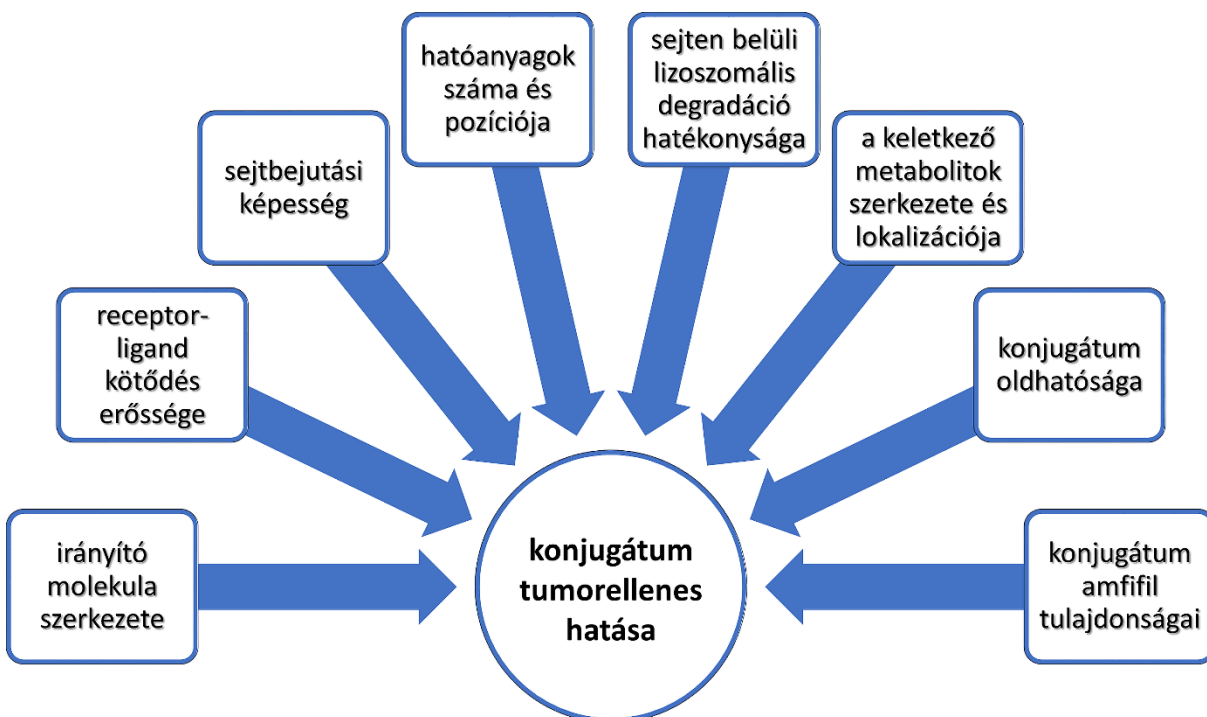
Doktori munkám harmadik részében daunomicin tartalmú epidermális növekedési faktor receptort (EGFR) célzó konjugátumokat terveztem előállítani. Céлом volt összehasonlítani két különböző EGFR irányító peptid (GE11 és D4) hatékonyságát, és vizsgálni, hogy egy enzim-labilis spacer (GFLG vagy YRRL) beépítése milyen hatással van az *in vitro* biológiai hatékonyságra. Mivel mindkét irányító peptidszekvencia számos hidrofób aminosavat tartalmaz, ezért további céлом volt a konjugátumok oldhatóságának növelése vízoldható polimerhez történő kapcsolás segítségével. Ehhez a kereskedelmi forgalomban is kapható poli(etilén-glikol)-t és ennek egy elágazó analógját, a hiperelágazós poliglicidolt szerettem volna használni. Céлом volt a konjugátumokban található polimerek oldhatóságra és *in vitro* biológiai aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata, majd a kapott adatokból a szerkezet-hatás összefüggés megállapítása a két különböző kémiai minőségű polimert és irányító molekulát tartalmazó konjugátumok esetében.

Kutatásom negyedik részében tuftsin-daunomicin konjugátumok egyértelmű tömegspektrometriás azonosítására fókuszáltam. Korábbi megfigyeléseim szerint egyes daunomicin-peptid konjugátumok esetében a szintézis és tárolás során lejátszódhat a hatóanyag cukorvesztése,¹⁶⁷ illetve az ESI-MS mérés során bekövetkező fragmentációkor is keletkezhet cukorvesztett termék. Mivel mind a két esetben ugyanolyan m/z értéknél jelentkezik a bomlott termék, ezért közvetlenül nem lehet a két jelenséget megkülönböztetni. Azonban a tényleges cukorvesztés a biológiai hatékonyság elvesztésével jár, ezért elengedhetetlen a pontos szerkezet minden kétséget kizáró megállapítása. Ehhez céлом volt a tömegspektrometriás körülmények (oldószerkelet összetétel, műszeres beállítások) szisztematikus vizsgálata és egy olyan vizsgálati körülmény kidolgozása, melynek segítségével egyszerűbb spektrumokat detektálhatunk, vagyis a konjugátum szerkezete egyértelműen meghatározható.

4 Eredmények

A hatóanyag-peptid konjugátumok tumorelles hatása erősen függ az irányító molekulától, a konjugátumból maximálisan felszabadulni képes hatóanyagok számától, a konjugátum sejtbejutási képességétől és a sejten belüli degradációjától. Azonban ezeken kívül számos egyéb tényező is szerepet játszhat a konjugátumok hatékonyságában (18. ábra). Például fontos a hatóanyag pozíciójának megfelelő megválasztása, mely akár sztérikus gátlás révén csökkentheti a receptorkötődést vagy megváltoztathatja a konjugátum térszerkezetét ezzel gátolva, vagy lassítva az aktív metabolitok felszabadulását. Mindezek mellett fontos szempont a konjugátumok oldhatósága is, hiszen a fiziológiás körülmények között rosszul oldódó vegyületek nem, vagy csak megfelelő formulázás révén alkalmazhatók biológiai rendszerben. Az amfifil tulajdonságú konjugátumok esetében pedig fontos a kolloidális önszerveződő viselkedés és annak a biológiai hatékonyságra gyakorolt hatásának feltérképezése, ismerete. A konjugátumok tervezése során pedig ezeket a szempontokat minden esetben figyelembe kell venni, hiszen ezen hatások összeadódnak, és együttesen akár negatív irányba is befolyásolhatják a tumorelles hatást.

Doktori munkám során ezeket a biológiai hatásra befolyással lévő tényezőket vizsgáltam, és az elért eredményeket az alábbiakban négy nagyobb témakörön belül szeretném részletesen tárgyalni.



18. ábra A hatóanyag-peptid konjugátumok *in vitro* biológiai hatását befolyásoló tényezők

4.1 Az irányító peptidek vizsgálata GnRH-PpIX konjugátumokban

A fotodinamikus terápia (PDT) szelektivitása függ a fényérzékenyítő anyag tumorban való feldúsulásától és az alkalmazott fény fókuszálásától. Azonban az alkalmazott vegyületek nem csupán a tumorba jutnak el, hanem a bőrben vagy a májban is nagy mennyiségben felhalmozódnak, ezáltal pedig súlyos mellékhatásokat (fényérzékenység, májtoxicitás) okozhatnak. A szelektivitást egy irányító molekula konjugálásával növelhetjük, melynek segítségével a fényérzékenyítő anyag célzottan a tumorban dúsul fel, a mellékhatások pedig kiküszöbölhetők, illetve jelentős mértékben csökkenthetők.⁴⁰

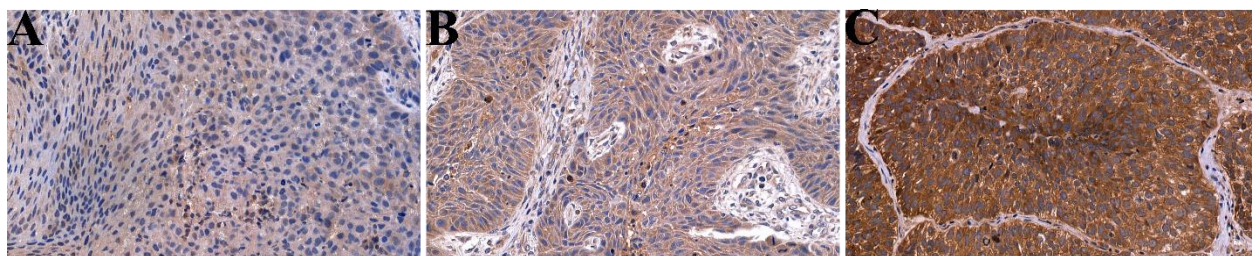
Doktori munkám ezen részében a protoporfirint (PpIX) mint fényérzékenyítő anyagot különböző vajsavval módosított GnRH analógokhoz – mint irányító molekulához – kapcsoltam. Kontrollként előállítottam a már ismert, GnRH-I agonistát tartalmazó GnRH-I[⁶D-Lys(PpIX)]⁴⁷ konjugátumot is. A munkám célja azt volt, hogy összehasonlítsam a különböző GnRH származékokat, és olyan konjugátumokat állítsak elő, melyek hatékonyabbak a szabad protoporfirinnél. A PDT-t jelenleg különböző bőrbetegségek (pl. bőrrák),³² illetve könnyen elérhető (pl. fej-nyaki rák),³¹ vagy üreges szervek (pl. hólyagrák)³⁴ esetén alkalmazzák a klinikumban. A jelen vizsgálat fej-nyaki laphámsejtes karcinómára (HNSCC) fókuszált, mely során betegekből származó tumorminták GnRH-R expresszióját vizsgáltuk.

A méréseket az MTA-SE Pathobiokémiai Kutatócsoporttal, a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetével és a Debreceni Egyetem Biofarmácia Tanszékével együttműködésben végeztük.

4.1.1 GnRH-R expresszió fej-nyaki daganatos betegekből származó szövetmintákon

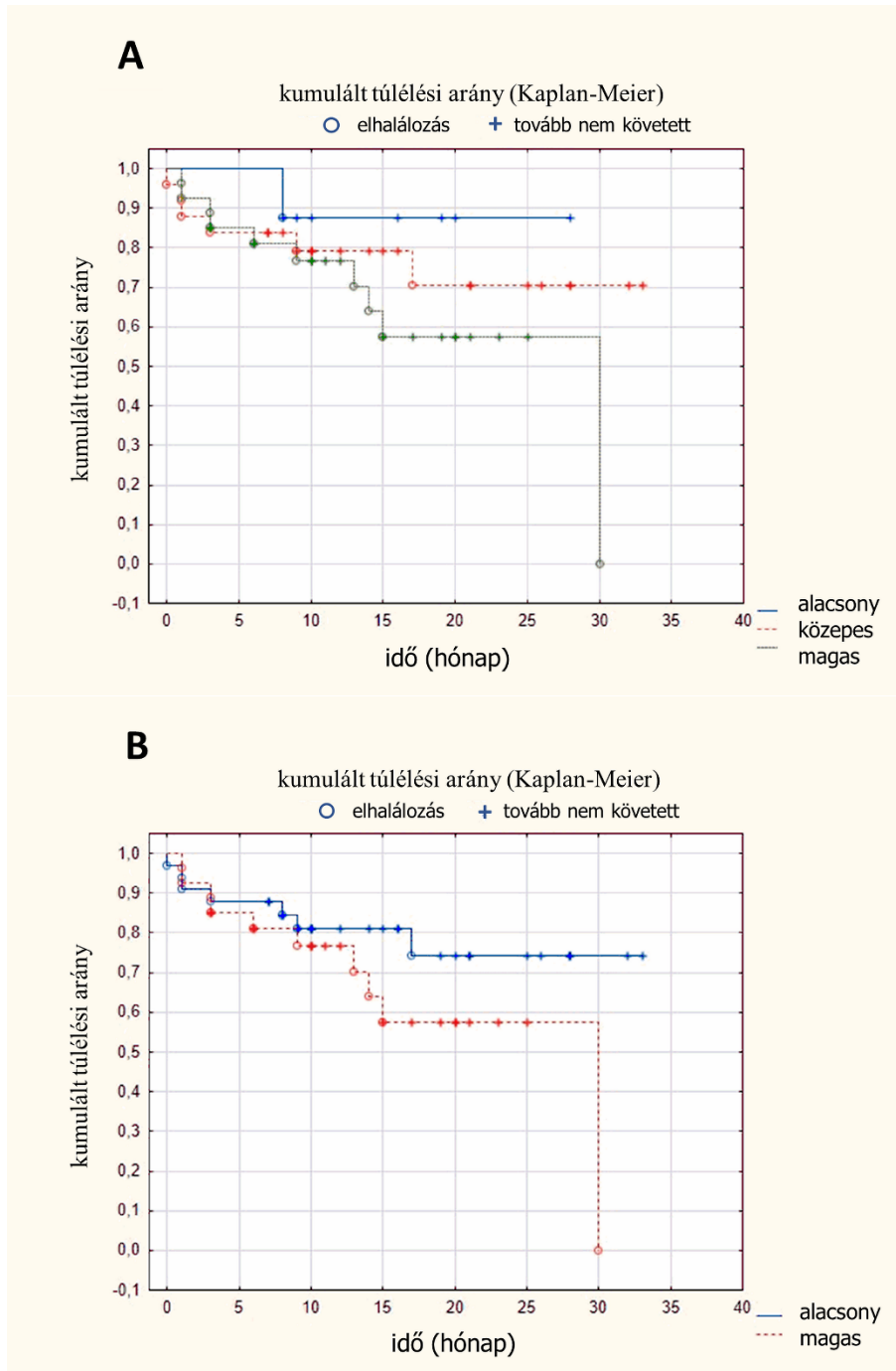
Eddigi ismereteink szerint még nem végeztek átfogó kutatást a GnRH-R expresszióról fej-nyaki laphámsejtes karcinóma (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) esetén, ezért munkánk során 60 betegből származó tumorminta GnRH-R immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. A tumormintákat Dr. Tamás László és Dr. Dános Kornél, a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikájának munkatársai biztosították a vizsgálatainkhoz, melyet a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük, és a Semmelweis Egyetem etikai bizottsága is jóváhagyott (etikai engedély szám: 105/2014). Az immunhisztokémiai vizsgálatok során Dr. Krenács Tibor, a Semmelweis Egyetem I. számú Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársa nyújtott segítséget.

Az elvégzett immunhisztokémiai festés vizsgálatokkal képet kaphattunk, hogy a GnRH-R-t célzó irányított terápia mennyire alkalmas ezen tumortípusok kezelésére. A minták értékelésére három fokozatú pontozási rendszert alkalmaztunk, mely a festett sejtek százalékát és a festés intenzitását (1 – negatív; 2 – gyenge; 3 – közepes; 4 – intenzív) vette figyelembe, így 0 és 400 közötti értéket kaptunk. A 0-200 közötti ponttal rendelkező mintákat alacsony, 201-300 között közepes, míg 301-400 között intenzív fehérje expressziót mutatónak tekintettük. A vizsgált 60 mintából 8 (13,3%) alacsony, 25 (41,7%) közepes és 27 (45,0%) magas GnRH receptor expressziót mutatott (19. ábra). Ezen eredmények alapján kijelenthető, hogy a GnRH-R egy ígéretes célpont lehet a HNSCC kezelésben.



19. ábra Reprezentatív mikroszkópos felvétel a GnRH-R immunhisztokémiai festésről betegekből származó fej-nyaki tumoros szövetmintákon. (A) Alacsony GnRH-R expresszió (0-200 pont); (B) Közepes GnRH-R expresszió (201-300 pont); (C) Magas GnRH-R expresszió (301-400 pont). (40x-es nagyítás)

A statisztikai elemzéshez az értékeket dichotomizáltuk. A legjobban reprodukálható küszöbértéket akkor kaptuk, ha az 1-es és 2-es csoportot együttesen alacsony (tehát negatív), míg a 3-as csoportot magas (azaz pozitív) fehérje expresszióval rendelkezőnek tekintettük. A GnRH-R expresszió nem mutatott összefüggést a tumor méretével ($p = 0,722$), a tumor lokalizációjával ($p = 0,527$), a nyirokcsomó áttétekkel ($p = 0,126$), a stádiummal ($p = 0,913$), illetve a betegség-specifikus túléléssel ($p = 0,423$). Ahogy azonban a 20. ábra látható eredmények is mutatják, a magasabb GnRH-R expresszió rosszabb prognózist jelent, hiszen ebben az esetben több beteg és rövidebb időn belül halálozott el, mint az alacsonyabb GnRH-R expressziót mutató tumorral rendelkező betegek.



20. ábra Kaplan-Meier túlélési görbék, a GnRH-R expresszió és a betegség-specifikus túlélés közötti összefüggés vizsgálata. (A) Az eredeti 3 csoport (alacsony, közepes, magas GnRH-R expresszió) összehasonlítása ($p = 0,556$); (B) A dichotomizált csoportok (alacsony, magas GnRH-R expresszió) összehasonlítása ($p = 0,423$).

4.1.2 A GnRH származékok szintézise

A GnRH-I és GnRH-II analógok esetén, ha a hatos pozícióban lévő glicint *D*-lizinre cseréljük, akkor nem csak egy konjugációra alkalmas funkciós csoportot nyerünk, hanem ezen származékok enzimestabilitása és receptorkötődése is jelentősen javul az eredeti szekvenciához képest.⁷¹ Továbbá, GnRH-III Dau konjugátuma esetén, ha a négyes helyzetben lévő szerint vajsavval módosított lizinre (Lys(Bu)) cseréljük, akkor ennek a származéknak megnövekszik az enzimestabilitása, *in vitro* sejtbejutása és *in vivo* antitumor hatása is. Munkám során feltételeztem, hogy ha ezt a két módosítást együttesen alkalmazom, akkor hatékonyabb irányító molekulákat tudok előállítani.

Ezért olyan GnRH-I és GnRH-II származékokat állítottam elő, melyek *D*-lizint, illetve négyes pozícióban Lys(Bu) módosítást is tartalmaztak (<EHWSYkLRPG-NH₂, **1**; <EHWK(Bu)YkLRPG-NH₂, **2**; <EHWK(Bu)HkWYPG-NH₂, **3**; ahol az <E a piroglutaminsavat jelöli). Ezen kívül szintetizáltam egy vajsavval módosított GnRH-III származékot (<EHWK(Bu)HD(OMe)WKPG-NH₂, **4**) is. Ebben az esetben az aszparaginsavat metilészter védőcsoporttal védtem, hiszen a későbbiekben az irányító molekulákat PpIX-nel terveztem konjugálni, és így biztosítottam, hogy a reakció során ne keletkezzen a GnRH-III két funkciós csoportja (az aszparaginsav karboxil- és a lizin aminocsoportja) között egy intramolekuláris amidkötés. Az Asp metilészter védelméről korábban kimutatták, hogy nem befolyásolja szignifikánsan a GnRH-III hatékonyságát és irányító képességét.¹⁶⁸

A vajsavval módosított származékok esetén a szintézis során a négyes pozícióba egy szelektíven hasítható védőcsoporttal ellátott lizin származékot kapcsoltam. A peptidgerinc megépítése után hasítottam ezt a védőcsoportot, majd a lizin oldalláncát vajsavanhidriddel reagáltattam. Az **1-3** analógok esetén ez egy Lys(Dde) aminosav származék volt. Ezzel szemben a GnRH-III származék (**4**) esetében nem választhattam a hidrazinnal hasítható védőcsoportot, hiszen a metilészter védőcsoport is képes hidrazinnal reagálni hidrazid képződés közben. Ezért ennél a szintézisnél Lys(Mtt)-t használtam. Ebben az esetben az Fmoc-Asp(OMe)-OH beépítése után Fmoc-hasítóelegyet is váltottam (2% piperidin, 2% DBU, 0,1 M HOBt / DMF), hiszen ez a (HOBt adalék miatt) kevésbé bázikus karakterű hasítóelegy segít meggátolni a metilészter védőcsoport lehasadását, továbbá az esetleges szukcinimid gyűrűzáródást is.

A szintézisek befejezése után a peptideket savas közegben, megfelelő kationfogók jelenlétében hasítottam a gyantáról, mely során az oldallánc védőcsoportok is lehasadtak (az Asp(OMe)

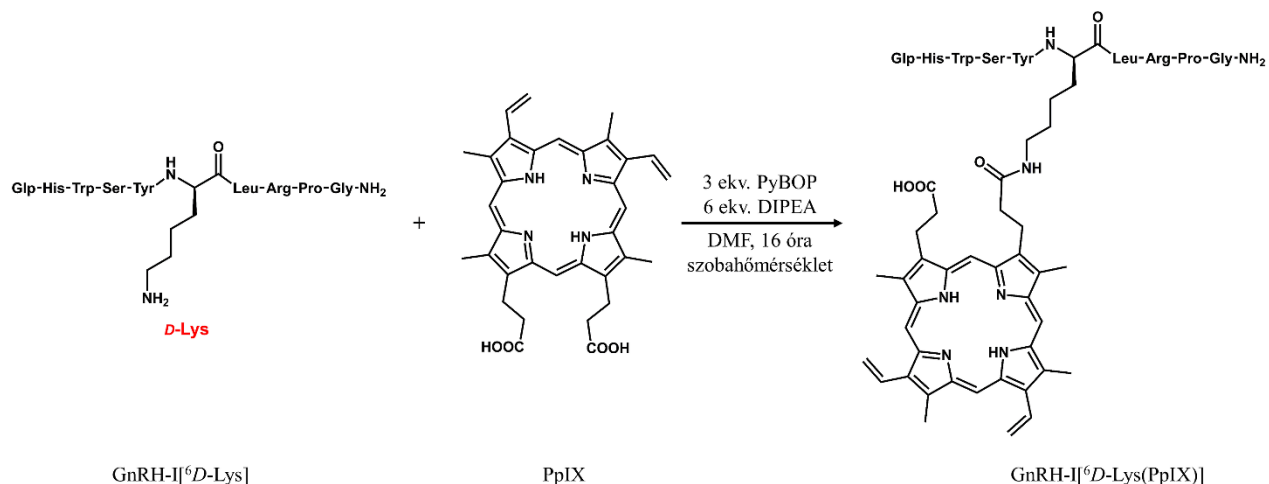
kivételével). A nyers peptideket RP-HPLC-vel tisztítottam, és ESI-MS-sel azonosítottam (2. táblázat). A GnRH analógok MS spektrumai és analitikai HPLC kromatogramjai a függelék *F1-F4. ábráján* láthatók.

2. táblázat Az előállított peptidek (1-4) és azok PpIX konjugátumai (5-8)

Kód	Peptid		Kód	Konjugátum
1	GnRH-I[⁶ D-Lys]	→	5	GnRH-I[⁶ D-Lys(PpIX)]
2	GnRH-I[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys]	→	6	GnRH-I[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys(PpIX)]
3	GnRH-II[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys]	→	7	GnRH-II[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys(PpIX)]
4	GnRH-III[⁴ Lys(Bu), ⁶ Asp(OMe)]	→	8	GnRH-III[⁴ Lys(Bu), ⁶ Asp(OMe), ⁸ Lys(PpIX)]

4.1.3 A GnRH-PpIX konjugátumok előállítása

A protoporfirin IX egyik karboxilcsoportja és a megfelelő lizin ε-aminocsoportja közötti amidkötést oldatfázisban alakítottam ki PyBOP kapcsolóreagens jelenlétében (21. ábra). Mivel a PpIX fényérzékeny hatóanyag, ezért a reakciókat minden esetben sötétben végeztem. A reakciók során csak az 1:1 arányú GnRH-PpIX konjugátumot kaptam terméknek (2. táblázat), dimer származékot (GnRH-PpIX 2:1) egyik esetben sem detektáltam. A GnRH-I származékok esetében kis mennyiségű vízvesztett mellékterméket is kaptam, melyet enyhén lúgos körülmények között a kívánt terméké tudtam hidrolizálni. Ebből arra következtettem, hogy a kapcsolóreagens magas aktivitása miatt egy észterkötés is kialakult a PpIX másik karboxilcsoportja és a szekvenciában található tirozin oldallánca között. Feltételezésemet alátámasztja, hogy a GnRH-II és a GnRH-III analógok esetén, melyek nem, vagy csak a lizintől távolabbi pozícióban tartalmaznak tirozint (illetve más hidroxilcsoportot tartalmazó aminosavat) ilyen melléktermék nem keletkezett.



21. ábra GnRH-PpIX konjugátumok szintézise a GnRH-I[⁶D-Lys] (1) és PpIX reakciójának példáján, mely a GnRH-I[⁶D-Lys(PpIX)] (5) terméket eredményezi

A reakcióelegyeket minden esetben RP-HPLC-vel tisztítottam, a termékeket ESI-MS-sel azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (3. táblázat). A GnRH-PpIX konjugátumok MS spektrumai és analitikai HPLC kromatogramjai a függelék F5-F8. ábráján láthatók.

3. táblázat Az előállított GnRH-PpIX konjugátumok analitikai jellemzői

Kód	Konjugátum	R_t / perc ^a	$MW_{\text{számolt}} / MW_{\text{mért}}^b$
5	GnRH-I[⁶ D-Lys(PpIX)]	24,2	1796,9 / 1797,4
6	GnRH-I[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys(PpIX)]	24,7	1908,0 / 1908,5
7	GnRH-II[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys(PpIX)]	24,9	1962,0 / 1962,7
8	GnRH-III[⁴ Lys(Bu), ⁶ Asp(OMe), ⁸ Lys(PpIX)]	25,1	1927,9 / 1928,6

^a Macherey-Nagel Nucleosil C18 oszlop (5 μm , 100 \AA , 250 \times 4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B; B eluens: 0,1% TFA / acetonitril

^b Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus ioncsapda analízátoros ESI-MS

4.1.4 Az előállított peptidek és GnRH-PpIX konjugátumok receptorkötődési vizsgálata

A szintetizált peptidek és konjugátumok receptorkötődési képességét GnRH receptort nagy mennyiségben expresszáló humán agyalapi mirigy- és humán prosztata tumorszövet modellen határoztuk meg egy direkt leszorításos vizsgálat során. A ligand kompetíciós assay során a GnRH-R-t tartalmazó membránhoz jól kötődő izotóp jelzett ¹²⁵I-triptorelin ([¹²⁵I]-GnRH-I[⁶D-Trp]) leszorítását vizsgáltuk a nem radioaktív peptidekkel és konjugátumokkal. A kapott eredmények azt

mutatták (4. táblázat), hogy a vajsavval módosított peptidok (2-4) GnRH receptorhoz való kötődése nagyon hasonló a csak *D*-lizinnel módosított származék (1) kötődéséhez, ami alapján feltételezhetjük, hogy mindegyik analóg irányítási képessége hasonló. Viszont a protoporfirinnel való konjugálás minden esetben csökkentette a kötődés erősségét, feltehetően a PpIX sztérikus gátlása miatt. A GnRH-I és GnRH-II peptideket tartalmazó konjugátumok (5-7) kötődése csak kisebb mértékben (egy nagyságrenddel) változott, azonban a GnRH-III – PpIX konjugátum (8) affinitása már két nagyságrenddel rosszabb volt a szabad peptidhez (4) képest. Az irodalomból ismert, hogy a GnRH-I és a GnRH-II térszerkezete U alakú,⁶¹ így a 6-os pozícióban lévő *D*-lizinhez kapcsolt protoporfirin nem zavarja számottevően a receptor felismerésében részt vevő aminosavak (a peptid *N*- és *C*-terminálisa) kötődését. Ezzel szemben a GnRH-III térszerkezete flexibilisebb, ezért a nagy térigényű protoporfirin ⁸Lys-hez történő konjugálása jelentősen csökkentheti a konjugátum receptorkötő képességét.¹⁶⁹ A szabad PpIX az alkalmazott legnagyobb koncentrációban (10⁻⁶ M) sem mutatott receptor kötődést.

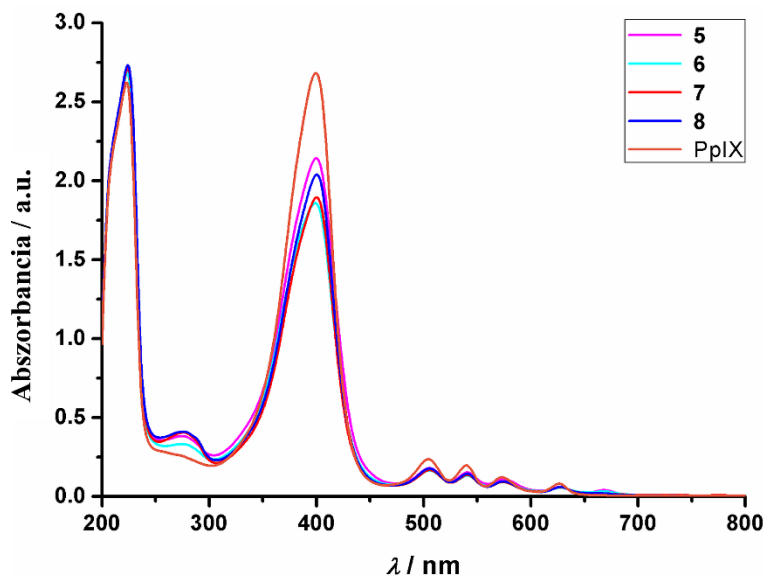
4. táblázat A GnRH analógok és a GnRH-PpIX konjugátumok GnRH receptorhoz való kötődése

Kód	Vegyület	IC ₅₀ / nM	
		Agyalapi mirigy	Prosztata tumor
1	GnRH-I[⁶ <i>D</i> -Lys]	6,44 ± 0,95	4,31 ± 0,83
2	GnRH-I[⁴ Lys(Bu), ⁶ <i>D</i> -Lys]	9,70 ± 1,07	8,61 ± 1,08
3	GnRH-II[⁴ Lys(Bu), ⁶ <i>D</i> -Lys]	5,56 ± 1,07	4,65 ± 0,31
4	GnRH-III[⁴ Lys(Bu), ⁶ Asp(OMe)]	7,27 ± 0,92	6,56 ± 1,11
5	GnRH-I[⁶ <i>D</i> -Lys(PpIX)]	36,29 ± 3,17	42,67 ± 7,04
6	GnRH-I[⁴ Lys(Bu), ⁶ <i>D</i> -Lys(PpIX)]	42,30 ± 4,27	41,80 ± 5,74
7	GnRH-II[⁴ Lys(Bu), ⁶ <i>D</i> -Lys(PpIX)]	79,40 ± 8,88	84,50 ± 10,30
8	GnRH-III[⁴ Lys(Bu), ⁶ Asp(OMe), ⁸ Lys(PpIX)]	288,6 ± 17,3	341,4 ± 21,1

4.1.5 Az előállított konjugátumok UV-Vis vizsgálata

Mivel a protoporfirin IX tartalmú vegyületek esetében a biológiai vizsgálatok során besugárzást kell alkalmazni a kívánt toxicitás eléréséhez, ezért kíváncsiak voltunk, hogy a peptidhez való konjugálás mennyire befolyásolja a kromofór UV-látható spektrumát. Az előállított vegyületek spektrumait PBS-acetonitril keverékben vettük fel. A kapott spektrumok összevetése alapján

megállapítható, hogy 300 nm fölötti hullámhossz tartományban nincs szignifikáns különbség a szabad PpIX és az előállított peptid-PpXI konjugátumok spektrumai között (22. ábra), tehát kijelenthető, hogy a peptidekhez történő konjugálás nem befolyásolja a kromofór PpIX spektrumának lefutását. (A PpIX nélküli GnRH analógok spektrumjai a függelék F9. ábráján láthatók.)

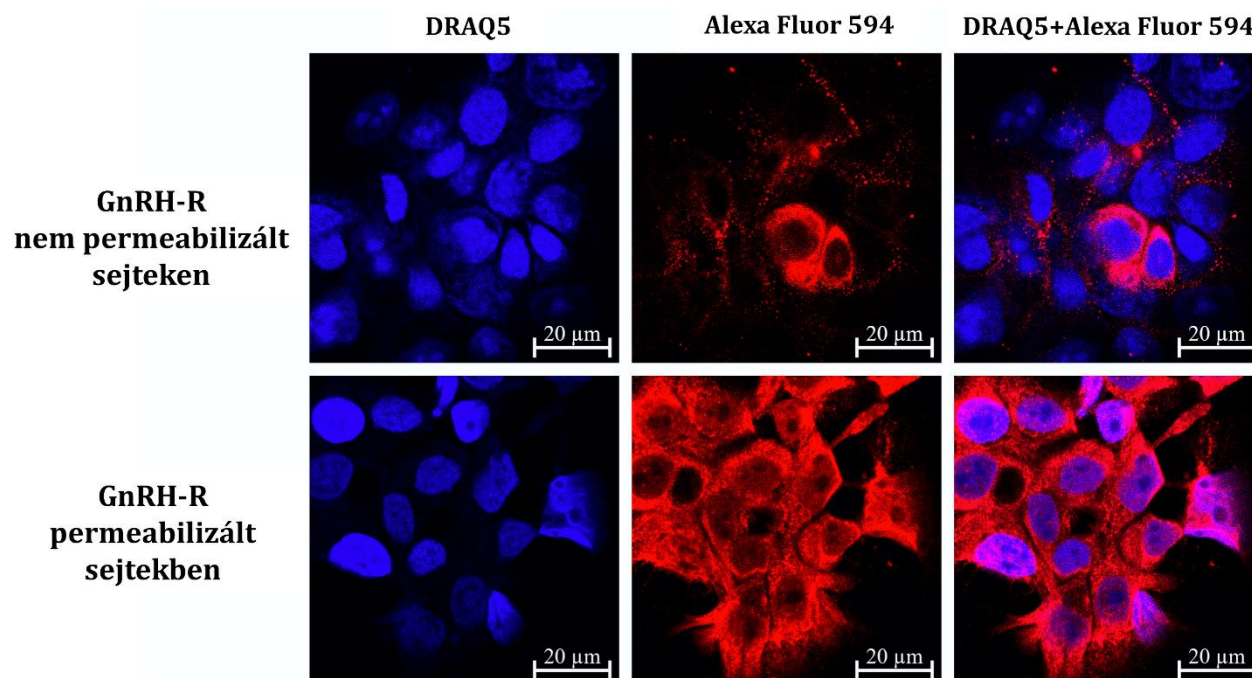


22. ábra A PpIX és a GnRH-PpIX konjugátumok UV-Vis spektruma

4.1.6 GnRH receptor expresszió Detroit-562 humán garatrák sejteken

A GnRH-PpIX konjugátumok hatékonyságának vizsgálatára *in vitro* modellnek a Detroit-562 humán garatrák sejt vonalat választottuk. Erről a sejt vonalról korábban már kimutatták, hogy nagy mennyiségben expresszál GnRH-R-t, illetve ezen daganatsejtek hatékonyan veszik fel a különböző GnRH analógokat.¹⁷⁰ Ezen korábbi eredményeket a konfokális lézermikroszkóppal végzett méréseink is megerősítették. A sejtek egy részének membránját permeabilizáltuk, vagyis a membránt a reagensek számára átjárhatóvá tettük, így lehetőségünk volt a sejtben expresszálódó teljes GnRH-R fehérje mennyiségének meghatározására (23. ábra, GnRH-R permeabilizált sejteken). Látható, hogy a receptorok jelentős mennyiségben vannak jelen a sejt plazmában. Ez azért fontos, mert ha ligandum kötődik a membránban lévő GnRH receptorokhoz, az indukálja az intracelluláris receptorok felszínre lökődését és ezáltal a sejt felszíni receptorszám növekedést. A kísérletet megismételtük nem permeabilizált sejtek esetében is (23. ábra, GnRH-R nem permeabilizált sejteken), és ekkor jelentős számú sejt felszíni GnRH receptort tudtunk detektálni,

ami egyértelműen a membránban található receptorok nagy mennyiségére utal. Ezek alapján kijelenthető, hogy a Detroit-562 sejtvonal megfelelő modell a GnRH-PpIX konjugátumok hatékonyságának *in vitro* vizsgálatára.



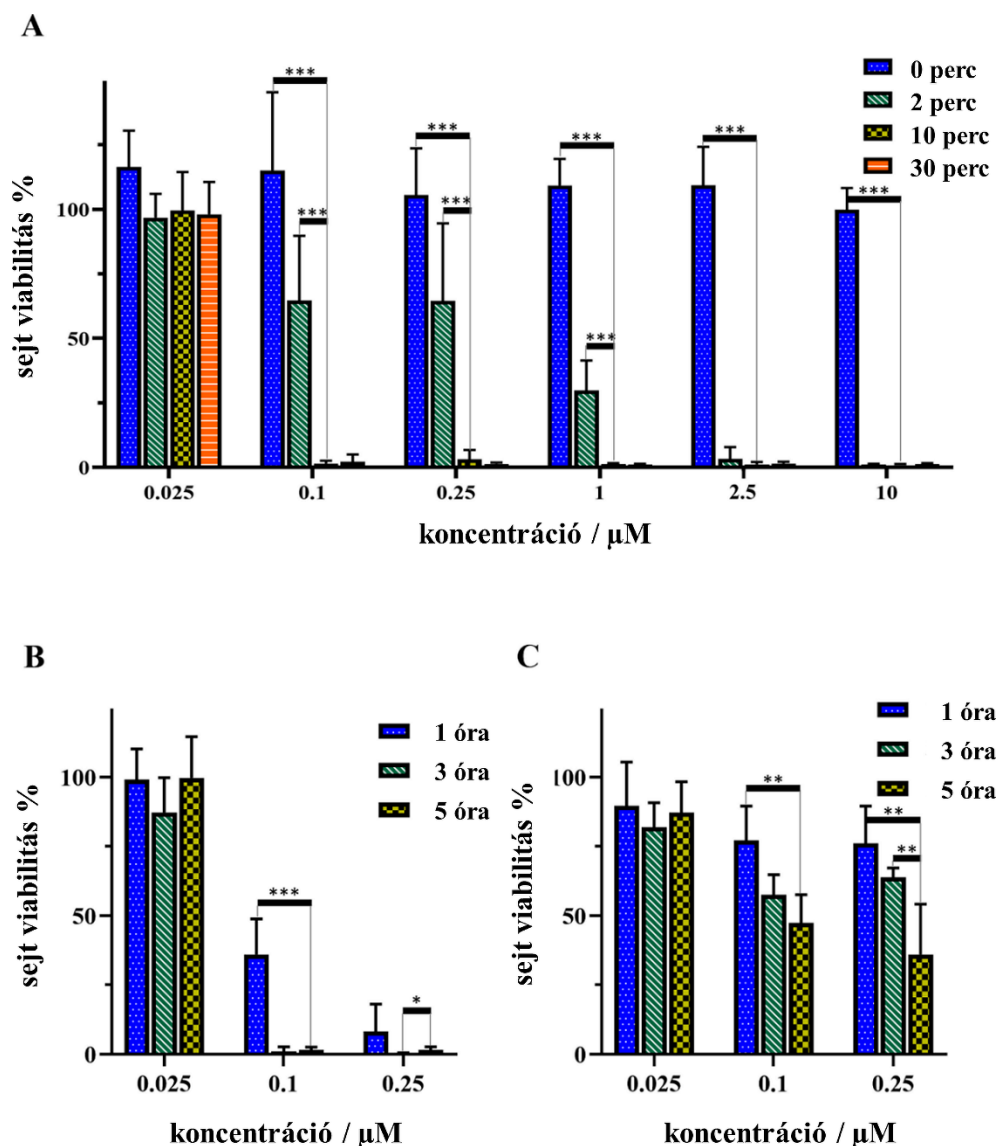
23. ábra GnRH-R Detroit-562 sejteken. A permeabilizált sejtek bizonyítják a nagymértékű GnRH-R expressziót, míg a nem permeabilizált sejteken a membránban található nagy mennyiségű GnRH-R látható. (magfestés: DRAQ5, kék; GnRH-R: Alexa Fluor 594, piros)

4.1.7 A besugárzási idő és az inkubációs idő optimalizálása

A sejt életképesség gátló hatás vizsgálatának optimalizálása során a kontroll GnRH-I[⁶D-Lys(PpIX)] (5) konjugátumot használtuk. Első lépésként a besugárzás optimális időtartamát vizsgáltuk. A Detroit-562 sejteket 5 órán keresztül inkubáltuk a konjugátummal, majd a kezelőszert mosással eltávolítottuk a sejtekről, és 0, 2, 10, illetve 30 perc besugárzás után 72 órán keresztül tovább inkubáltuk 37 °C-on. Az eredmények (24. ábra A) azt mutatták, hogy a konjugátum önmagában, besugárzás nélkül a vizsgált koncentráció tartományban nem toxikus, míg 2 perc besugárzási idő már 50%-os viabilitás csökkenést okozott 0,1-1 μM koncentrációk esetén. A 10 és 30 perces besugárzási idők között nem volt szignifikáns különbség, mindkettő esetén ~98%-os sejtpusztulást tapasztaltunk már 0,1 μM esetén is, ezért a további vizsgálatokhoz a 10 perces

besugárzási időt választottuk. Ez az időtartam még tolerálható egy állat vagy egy ember számára a kezelés során, így várhatóan kedvező lesz a későbbi vizsgálatok esetén is.

Ezután vizsgáltuk az inkubációs időnek a sejt életképességre gyakorolt hatását. A sejteket az 5-ös konjugátummal, illetve a szabad PpIX-vel 1, 3 vagy 5 órán keresztül kezeltük, majd a kezelőszert eltávolítottuk. Majd 10 perces besugárzást követően 72 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. Ahogy az 24. *ábra B* részén látható, a konjugátum esetében a rövidebb kezelési idő szignifikánsan kisebb hatást eredményezett. Ezzel szemben a protoporfirin IX esetén nem volt jelentős hatékonyság különbség az egyes kezelési időtartamok között, de 0,25 µM esetén a legnagyobb hatást az 5 órás kezeléssel értük el (24. *ábra C*). Az így kapott eredmények és a korábban a kutatócsoportban más GnRH-konjugátumokkal végzett mérések alapján a további kezelésekhöz az 5 órás inkubációs időt választottuk.

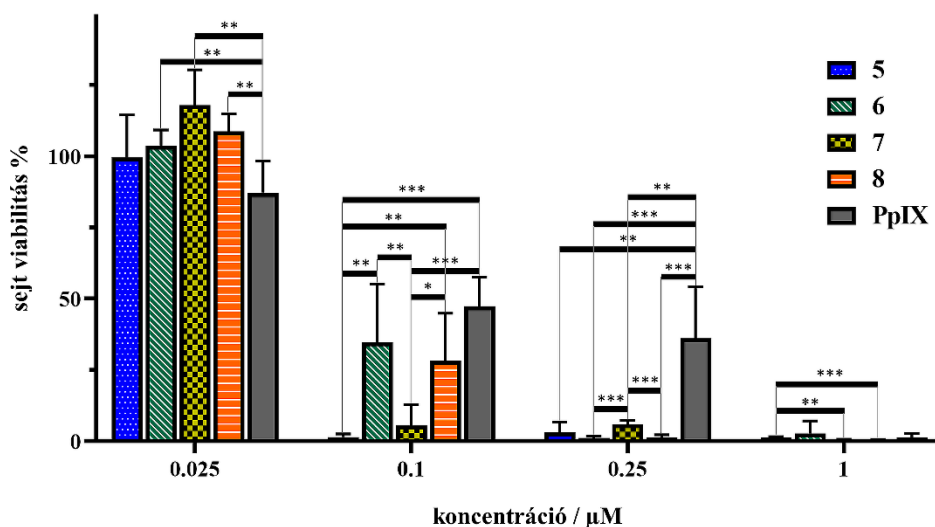


24. ábra Az *in vitro* sejt viabilitási vizsgálatok optimalizálása. (A) A különböző besugárzási idő hatása; (B) A különböző inkubálási idő hatása az 5-ös konjugátummal való kezelés során; (C) A különböző inkubálási idő hatása protoporfirinrel való kezelés során. A sejt viabilitási értékek a DMSO kontroll %-ában vannak kifejezve. Statisztikai szignifikanciát csak az optimalizált körülményekre (10 perc besugárzás, 5 óra kezelési idő) számoltunk (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.1.8 A GnRH-PpIX konjugátumok *in vitro* sejt viabilitás vizsgálata

A többi GnRH-PpIX konjugátum hatását a már általunk optimalizált körülmények között (5 óra inkubációs idő és 10 perces besugárzás) Detroit-562 sejteken vizsgáltuk. Ahogy az a 25. ábra is megfigyelhető, az összes újonnan előállított konjugátum hatása jobb volt a szabad PpIX hatásánál. 0,25 μM esetén már mindegyik vegyület 90-95%-os inhibíciót mutatott, miközben a PpIX csak

megközelítőleg 50% életképesség csökkenést eredményezett ugyanebben a koncentrációban. A leghatékonyabb konjugátumnak a GnRH-I[⁶D-Lys(PpIX)] (5) és GnRH-II[⁴Lys(Bu), ⁶D-Lys(PpIX)] (7) bizonyultak, mind a két vegyület már 0,1 μM koncentrációban is 90% fölötti sejt életképesség gátlást mutatott. A másik két konjugátum, GnRH-I[⁴Lys(Bu), ⁶D-Lys(PpIX)] (6) és GnRH-III[⁴Lys(Bu), ⁶Asp(OMe), ⁸Lys(PpIX)] (8) kevésbé volt hatékony, ezek 0,1 μM esetén csak 65-70%-os gátlást értek el. Ezt a sorrendet a számolt IC₅₀ értékek is alátámasztják (5. táblázat). Továbbá, a peptidek önmagukban (protoporfirin nélkül) nem mutattak sem citotoxikus, sem citosztatikus hatást még 10 μM koncentrációban sem (függelék F10. ábra).



25. ábra A GnRH-PpIX konjugátumok (5-8) és a PpIX *in vitro* sejt viabilitás gátlása 5 órás inkubációs idő és 10 perces besugárzás alkalmazásával. A sejt viabilitási értékek a DMSO kontroll %-ában vannak kifejezve. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5. táblázat Az előállított GnRH-PpIX konjugátumok és a PpIX számolt IC_{50} értéke

Kód	Vegyület	IC_{50} / nM
5	GnRH-I[⁶ D-Lys(PpIX)]	62,3 ± 5,9
6	GnRH-I[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys(PpIX)]	89,8 ± 19,4
7	GnRH-II[⁴ Lys(Bu), ⁶ D-Lys(PpIX)]	71,1 ± 6,2
8	GnRH-III[⁴ Lys(Bu), ⁶ Asp(OMe), ⁸ Lys(PpIX)]	81,8 ± 12,6
PpIX	Protoporfirin IX	209,3 ± 119,5

4.1.9 Rövid összefoglalás

A fej-nyaki laphámsejtes karcinóma (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) világszerte a daganatos megbetegedések csupán 4%-át okozza, azonban a halálozási aránya igen magas, ezért elengedhetetlenül fontos a megfelelő kezelés.¹⁷¹ Ez a betegség csoport gyakoribb férfiak körében és nagyobb mértékben érinti az 50 év felettieket.¹⁷² Számos lehetséges terápiás célpontot sikerült már azonosítani (pl. az EGFR) HNSCC kezelésére,^{173,174} azonban a célzott terápiát a kialakult rezisztencia miatt még nem sikerült megoldani.¹⁷⁵ A GnRH receptor jelenlétét igazolták már száj- (KB) és gége karcinóma (HEp-2) sejteken,⁸² illetve humán garat tumorsejteken (Detroit-562) is.¹⁷⁰

Doktori munkám ezen részében igazoltuk, hogy a GnRH-R a betegekből származó fej-nyaki tumorminták nagy százalékában túlexpresszálódik, ezért megfelelő célpont lehet a HNSCC klinikai kezelésben is. Továbbá eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy a magas GnRH-R expresszió rosszabb prognózist eredményez. A jövőbeli kezeléshez a célzott tumorterápiában alkalmazható négy különféle GnRH analóghoz kapcsolt PpIX konjugátumot szintetizáltam. Vizsgáltuk ezen konjugátumok receptorkötődését humán agyalapi mirigy és humán prosztatata tumorszöveteken, illetve *in vitro* sejt életképességre gyakorolt hatását Detroit-562 humán garat tumorsejteken. Az eredményeink szerint a PpIX konjugátumok közül a vajsavval módosított GnRH-II analóg (7) hasonló hatékonyságot mutatott, mint a kontroll GnRH-I analóg (5), míg a vajsavval módosított GnRH-I analóg (6) és a GnRH-III származék (8) csak kevésbé voltak hatásosak, azonban az összes konjugátum jelentősen hatékonyabbnak bizonyult, mint a szabad PpIX. Ezen eredmények jól mutatják a célzott terápia jelentőségét és előnyeit a fotodinamikus terápiában, valamint előre vetítik a benne rejlő számos további lehetőséget is.

4.2 A hatóanyagok számának és pozíciójának fontossága daunomicin-Angiopep-2 konjugátumokban

Az Angiopep-2 peptid (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY) az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) receptor-kapcsolt fehérje-1 (LRP1) ligandja, mely először receptor-mediált transzcitózissal az agyba, majd ott receptor-mediált endocitózissal szelektíven a tumorsejtekbe juthat.⁹⁰ Az Angiopep-2-t mint irányító molekulát már felhasználták különböző konjugátumok előállítására, melyekben három hatóanyagot kapcsoltak a peptidhez a két lizin oldallánc és az *N*-terminális aminocsoportokat felhasználva, észterkötést kialakítva a peptid és a hatóanyagok között.^{89,93} Szintézis szempontjából valóban egyszerűbb mindhárom csoporthoz hatóanyagot kapcsolni, mint szelektíven egyik vagy másik aminocsoportot felhasználni, illetve az esetek többségében több hatóanyag alkalmazása nagyobb tumorelleses hatást eredményezhet. Korábban azonban nem vizsgálták, hogy a hatóanyagok pozíciója befolyásolja-e a konjugátum hatásosságát. Ezért a doktori munkám ezen részében azt vizsgáltam, hogy az Angiopep-2 peptidhez kapcsolt hatóanyagok száma és pozíciója hogyan befolyásolja a konjugátumok biológiai aktivitását, ehhez pedig előállítottam az összes egy, két, illetve három daunomicint tartalmazó származékot. A daunomicint minden esetben oximkötésen keresztül kapcsoltam a megfelelő pozícióba, mely egy előnyösebb és stabilabb kötés, mint a korábban alkalmazott észterkötés.

4.2.1 A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok szintézise

A 19 aminosav hosszúságú Angiopep-2-alapú konjugátumok szintézisét Wang gyantán végeztem, így a *C*-terminálison karboxilcsoportot tartalmazó peptideket kaptam a gyantáról való hasítás után. Mivel a konjugátumok csak a hatóanyag pozíciójában és számában különböztek, ezért az eltérő számú és helyzetű aminooxiacetil linkerrel funkcionizált peptidek szintézise során gyantaosztásos technikát alkalmaztam. A szekvencia egy pontja (¹¹Arg) után a gyantát fokozatosan szétosztva, párhuzamosan építettem fel a szekvenciákat. Az első elágazásként használt, ötödik aminosavként felkapcsolt lizin (¹⁵Lys) esetén Fmoc-Lys(Mtt)-OH-t használtam. Az Mtt oldallánc védőcsoport híg savval (1-2% TFA/DCM) szelektíven hasítható a gyantán, ha az adott konjugátumban kapcsolódik hozzá hatóanyag, minden más esetben pedig a gyantáról való hasítás során a többi oldallánc védőcsoporttal együtt eltávolítható. A nyolcadik aminosavként kapcsolt aszparagin (¹²Asn) után a szukcinimid gyűrűzáródási reakció elkerülése érdekében az Fmoc-csoport eltávolításához 2% piperidin + 2% DBU + 0,1 M HOBt / DMF elegyet alkalmaztam. Ezzel

a HOBt-t is tartalmazó kevésbé bázikus karakterű hasítóeleggyel elkerülhető a szintézis során bekövetkező szukcinimid gyűrűzáródási reakció. A kilencedik aminosav (¹¹Arg) felkapcsolása után a gyantát két részre osztottam. A második elágazásként használt ¹⁰Lys esetében a szelektíven eltávolítható ortogonális oldallánc védőcsoportot tartalmazó Fmoc-Lys(Dde)-OH-t építettem be, ha a konjugátumban ehhez a lizinhez kapcsolódott hatóanyag (**12, 14-16**), ellenkező esetben a standard Fmoc-Lys(Boc)-OH-t használtam (**9-11, 13**). Ettől kezdve a két gyantát párhuzamosan építettem a tizennyolcadik aminosavig (²Phe), amely pontnál mindkét adag gyantát két részre osztottam. Utolsó aminosavként az *N*-terminálison hatóanyagot tartalmazó konjugátumok (**11, 13, 15, 16**) esetében Fmoc-Thr(^tBu)-OH-t, míg a szabad *N*-terminális aminocsoportot tartalmazó konjugátumok (**9, 10, 12, 14**) esetében Boc-Thr(^tBu)-OH-t használtam. Ezután a megfelelő *N*-terminális és/vagy lizin oldallánc védőcsoport(ka)t (Fmoc, Dde, Mtt) szelektíven hasítottam, és a megfelelő pozíció(k)ba felkapcsoltam a Boc-védett aminosavakat. A szintézisek befejezése után a peptideket savas közegben, megfelelő kationfogók jelenlétében hasítottam a gyantáról, mely során az oldallánc védőcsoportok is lehasadtak. A nyers peptideket RP-HPLC-vel tisztítottam, és ESI-MS-sel azonosítottam, majd az aminosav-derivált peptidek esetében a tiszta frakciókat közvetlenül, liofilizálás nélkül használtam a hatóanyaggal való reakcióhoz.

A tisztított aminosav-derivált peptidekhez a daunomicint oximkötéssel, enyhén savas körülmények között (NH₄OAc puffer, pH 5,1) konjugáltam. A reakcióelegyeket RP-HPLC-vel tisztítottam, a termékeket ESI-MS-sel azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (6. táblázat). Az Angiopep-2 peptid és a daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok analitikai HPLC kromatogramjai és MS spektrumjai a függelék *F11-F18. ábráján* láthatók.

6. táblázat Az előállított daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok analitikai jellemzői

Kód	Konjugátum	R_t / perc ^a	$MW_{számolt} / MW_{mért}^b$
9	H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH	18,6	2300,1 / 2300,2
10	H-TFFYGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	20,9	2882,3 / 2882,3
11	Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH	21,9	2882,3 / 2882,3
12	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH	21,2	2882,3 / 2882,3
13	Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	21,8	3464,5 / 3464,5
14	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	20,6	3464,5 / 3464,5
15	Dau=Aoa-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH	21,8	3464,5 / 3464,5
16	Dau=Aoa-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	21,6	4046,7 / 4046,6

^a Macherey-Nagel Nucleosil C18 oszlop (5 μ m, 100 Å, 250 \times 4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B

^b Thermo Fisher Scientific Q Exactive Focus hibrid kvadrupol-orbitrap analizátoros ESI-MS

A konjugátumok tisztítása során nyilvánvalóvá vált, hogy az egymás utáni kettő vagy három védőcsoport gyantán való hasítása számos mellékreakciót okoz, és a keletkező termék és melléktermékek mindkét alkalmazott HPLC oszlopról (C18 és C4) közel azonos retenciós idővel eluálódnak, így az elválasztásuk a gradiens módosításával sem megoldható. Ezért a két és három daunomicint tartalmazó származékok szintézisét megismételtem úgy, hogy a ¹⁵Lys esetében a korábban alkalmazott Fmoc-Lys(Mtt)-OH helyett Fmoc-Lys(Boc)-OH (**15**) vagy Fmoc-Lys(Dde)-OH (**13**, **14**, **16**) aminosavakat használtam. A szintézis többi része a korábbiakkal megegyező módon történt. Ez az aminosav származék csere lehetővé tette, hogy csak a Dde, illetve az Fmoc csoportokat kelljen a gyantán hasítani, és ezzel a módszerrel már a tervezett tiszta származékok előállítása sikeres volt.

4.2.2 A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok *in vitro* citosztázis vizsgálata

Az előállított peptid (**9**) és daunomicin-peptid konjugátumok (**10-16**) *in vitro* citosztatikus hatását U87 humán glioblastoma sejtvonalon vizsgáltuk. A sejteket a peptid és a konjugátumok különböző koncentrációjú oldatával (0,05-50 μ M) 24 órán keresztül kezeltük, majd egy mosási lépés után a sejteket további 48 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A vegyületek citosztatikus hatását MTT-teszt segítségével határoztuk meg. A mért IC_{50} értékek a 7. táblázatban láthatók.

7. táblázat Az Angiopep-2 peptid és a daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok mért IC_{50} értékei.

Kód	Konjugátum	IC_{50} / μ M
9	H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH	> 50
10	H-TFFYGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	30,2 \pm 6,4
11	Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH	10,9 \pm 2,8
12	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH	24,0 \pm 5,9
13	Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	32,3 \pm 8,1
14	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	21,6 \pm 5,4
15	Dau=Aoa-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH	7,8 \pm 6,3
16	Dau=Aoa-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	23,6 \pm 6,3

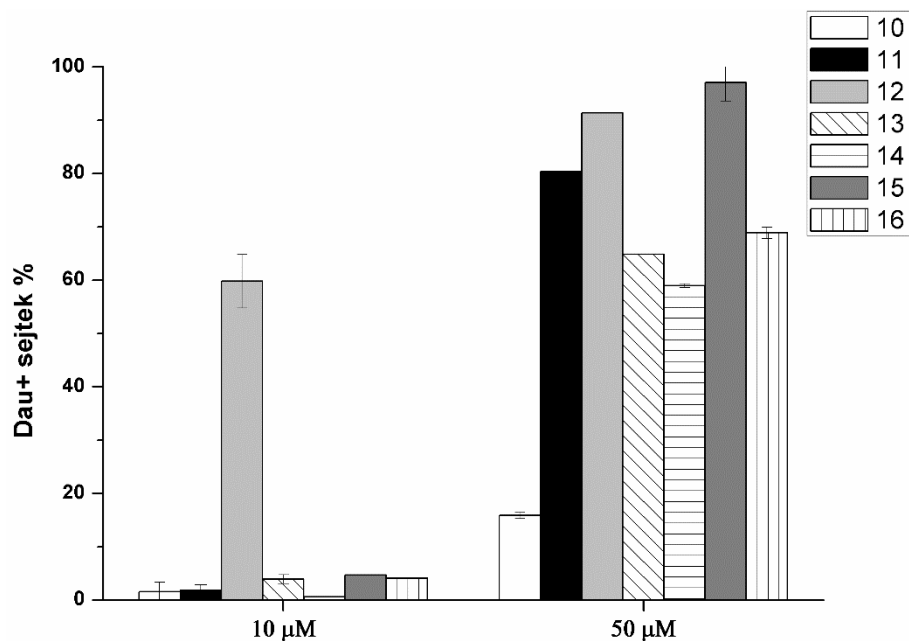
A natív peptid az alkalmazott koncentrációtartományban nem mutatott citosztatikus aktivitást. A kapott eredményekből látható, hogy nincs egyértelmű összefüggés a hatóanyagok száma és a citosztatikus hatékonyság között. Már az egy daunomicint tartalmazó konjugátumok esetében is nagy különbség látható: a hatóanyagot az *N*-terminálison tartalmazó származék (**11**) hatékonyabbnak bizonyult, mint a lizin oldalláncokon hatóanyaggal szubsztituált származékok (**10**, **12**). Ez utóbbiak közül pedig a *C*-terminálishoz közelebbi lizin (15 Lys) módosítása (**10**) eredményezte a kevésbé hatékony konjugátumot.

A két daunomicint tartalmazó konjugátumok esetében azt tapasztaltuk, hogy a hatóanyag számának növelése nem feltétlenül jár együtt a hatás növekedésével. A *C*-terminálishoz közelebbi lizinen is hatóanyagot tartalmazó konjugátumok (**13**, **14**) kevésbé voltak hatékonyak, mint az abban a pozícióban hatóanyagot nem tartalmazó származék (**15**). Ahogy az eredményekből látható, az eredetileg legjobb citosztatikus hatással rendelkező származék (**11**) 15 Lys oldalláncon való hatóanyag kapcsolás után (**13**) a tumorelleses hatás kifejezetten romlik. Azonban a többi két daunomicint tartalmazó származék esetében sem tapasztaltunk szignifikáns hatékonyság növekedést (**12**→**14** és **11**→**15**), amit a második hatóanyag beépítése miatt feltételeztünk volna. Sőt, a harmadik daunomicin konjugálása (**16**) sem tudta növelni a konjugátum hatékonyságát.

Ezek alapján elmondható, hogy a daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok hatékonysága elsősorban nem a hatóanyagok számától, hanem inkább a hatóanyag molekulán belüli pozíciójától függ. Mivel a 15 Lys oldalláncának módosítása minden esetben rontott a konjugátumok hatékonyságán, ezért ezt a jövőben érdemes lesz elkerülni.

4.2.3 A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok *in vitro* sejtbejutási vizsgálata

A konjugátumok citosztikus aktivitását sok különböző tényező együttesen határozza meg, melyek közül az egyik az internalizáció hatékonysága. Ezért a konjugátumok (**10-16**) *in vitro* sejtbejutását U87 sejteken áramlási citométerrel vizsgáltuk. A sejteket a konjugátumok oldataival (2, 10 és 50 μM) egy órán keresztül kezeltük, majd egy mosási lépést követően a sejteket tripszinnel kezeltük, hogy az aspecifikus kötődést lehetővé tevő sejtfelszíni struktúrákat is eltávolítsuk, így csak a sejtekbe ténylegesen bejutott konjugátumok mennyiségét detektáltuk. Korábbi eredményeink igazolták, hogy a konjugátumok 24 óra után még a legnagyobb alkalmazott koncentrációban (50 μM) sem mutattak citotoxikus hatást. A 10 és 50 μM koncentráció esetén kapott eredmények a 26. ábra láthatók. Az ábrán a daunomicin pozitív (Dau+) élő sejtek arányát tüntettük fel.



26. ábra A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok *in vitro* sejtbejutása

Az *in vitro* sejtbejutás vizsgálatok esetén is megfigyelhető, hogy jelentős különbségek vannak a különböző konjugátumok között. A leghatékonyabban internalizálódó konjugátum a daunomicint az *N*-terminálishoz közelebbi lizinen (^{10}Lys) tartalmazó származék (**12**), mely már 10 μM -ban a sejtek 60%-ába bejut. Az *N*-terminálison funkcionalizált konjugátum (**11**), illetve ennek a kettőnek a kombinációját tartalmazó két hatóanyag tartalmú származék (**15**) 50 μM koncentrációban szintén

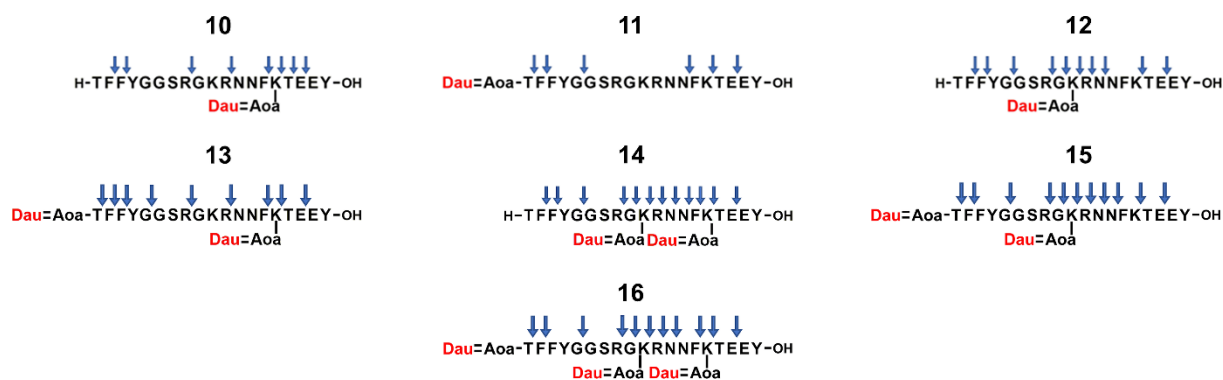
hatékonyan internalizálódott. Azonban a C-terminálshoz közelebbi lizinen (¹⁵Lys) daunomicint tartalmazó származékok (**10**, **13**, **14**, **16**) legfeljebb a sejtek 65%-ába jutottak be, még a legmagasabb 50 µM koncentrációban is. Feltehetően ennek a pozíciónak a hatóanyaggal történő módosítása jelentősen csökkenti a konjugátumok receptorkötődését, és ezáltal a sejtbejutását is. Továbbá ezen származékok alacsony internalizációs képessége megmagyarázza az alacsony *in vitro* tumorelles hatásukat is.

Ahogy a citosztatikus hatás esetében, úgy az internalizáció mértékében sem okoz egyértelmű pozitív vagy negatív változást a hatóanyagok számának növelése, míg a hatóanyag(ok) pozíciójának van inkább döntő szerepe.

4.2.4 A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok degradációjának vizsgálata patkány máj lizoszóma preparátumban

A **10**, **13**, **14**, **16** konjugátumok esetében a viszonylag a magas IC_{50} értékek okára már választ kaphattunk, hiszen ezen származékok alacsony sejtbejutási képessége megmagyarázza azt. A **11** és **15** konjugátumok esetében is a magasabb internalizációs képesség magyarázza az alacsony IC_{50} értékeket. Azonban a **12** konjugátum esetében a fokozott mértékű sejtbejutást a citosztázis adatok nem támasztják alá. Ezért ennek az ellentmondásnak a feloldása érdekében vizsgáltam a konjugátumok metabolizmusát patkány máj lizoszóma preparátumban.

A konjugátumok (**10-16**) ammónium-acetát pufferes oldatát elegyítettem a lizoszóma preparátummal. Az elegyeket kevertetés mellett 37 °C-on inkubáltam, majd 5 perc, 1, 6, 24 és 72 óra elteltével mintákat vettem. Az enzimatis reakciót hangyasavval állítottam le, és a mintákat HPLC-MS módszerrel vizsgáltam. Az azonosított hasítási pontok a 27. *ábra* láthatók, a detektált totál ion kromatogramok a függelék *F19-F25. ábráján*, az azonosított degradációs fragmensek pedig a függelék *F1-F7. táblázatában* láthatók.



27. ábra A daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok (**10-16**) lizoszomális degradációja során azonosított hasítási pontok

A detektált legkisebb metabolit az egy aminosavat és az aminooxiacetyl linkert tartalmazó daunomicin volt (Dau=Aoa-Thr-OH és H-Lys(Dau=Aoa)-OH).¹⁷⁶ Azonban míg az *N*-terminálisához vagy a ¹⁵Lys oldalláncához kapcsolódó daunomicin esetében a legkisebb metabolit már egy óra után megjelent a kromatogramokban és rövid időn belül (6-24 óra) csak ezt a hatóanyag tartalmú fragmenst lehetett detektálni, addig a ¹⁰Lys oldalláncához kapcsolódó daunomicin esetében csak hat óra után jelent meg a legkisebb metabolit, és még 72 óra után sem az volt a legintenzívebben detektálható fragmens. A domináns fragmensek ebben az esetben a H-GK(Dau=Aoa)R-OH és H-GK(Dau=Aoa)-OH metabolitok voltak. Valószínűleg ebben az esetben nagy sztérikus gátlás lép fel, ami miatt az enzimek nem férnek hozzá a környező peptidkötésekhez. Ez pedig már egyértelműen magyarázza, hogy a **12** konjugátumnak miért volt kisebb a tumorelles hatása a kiemelkedő sejtbejutás ellenére.

Tehát abban az esetben, ha nem hasadó linkeren keresztül kapcsoljuk a hatóanyagot, akkor különös tekintettel kell lenni a konjugációs hely megválasztására, hiszen a konjugátum lebomlásának mechanizmusa jelentősen befolyásolhatja annak biológiai hatását.

4.2.5 Enzim-labilis spacer tartalmazó konjugátumok előállítás

Mivel a **12** konjugátum sejtbejutási képessége kiemelkedő volt, viszont a hatóanyag felszabadulás problémákba ütközött, ezért olyan származékokat terveztem, melyekhez a daunomicin a ¹⁰Lys oldalláncán egy enzim-labilis spaceren (VA vagy GFLG) keresztül kapcsolódik. A Val-Ala szekvencia esetében a lizoszomális enzimek először az alanin után hasítanak, mely azonban ebben az esetben egy izopeptid kötéssel kapcsolódik a lizinhez, amit lehet,

hogy az enzimek nem képesek elhasítani, ezért terveztem egy olyan spacert is, mely távtartóként két glicint tartalmazott az alanin és az ϵ -aminocsoport között (VAGG).

A peptidek szintézise a fentebb ismertetett módon történt. Mindegyik származéknál a ^{15}Lys esetében Fmoc-Lys(Boc)-OH-t, míg a ^{10}Lys esetében Fmoc-Lys(Dde)-OH-t építettem be, utolsó aminosavként pedig Boc-Thr(^tBu)-OH-t kapcsoltam. A peptidgerinc szintézise után lehasítottam a Dde védőcsoportot híg hidrazin oldattal (2% $\text{N}_2\text{H}_4/\text{DMF}$), és Fmoc-technikával felépítettem az enzim-labilis spacereket a lizin oldalláncán, végül pedig felkapcsoltam a Boc-Aoa-OH-t. Ezt követően a peptideket hasítottam a gyantáról, majd RP-HPLC-s tisztítás után a tiszta terméket tartalmazó frakciót használtam a daunomicinnel való konjugáláshoz. A konjugátumokat ESI-MS-sel azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (8. táblázat). A spacert tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok analitikai HPLC kromatogramjai és MS spektrumai a függelék F26-F28. ábráján láthatók.

8. táblázat Az előállított spacert tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok analitikai jellemzői

Kód	Konjugátum	R_t / perc ^a	$MW_{számolt}$ / $MW_{mért}$ ^b
17	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RNNFKTEEY-OH	22,3	3256,5 / 3256,5
18	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VA)RNNFKTEEY-OH	21,5	3052,4 / 3052,4
19	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VAGG)RNNFKTEEY-OH	21,5	3166,4 / 3166,4

^a Macherey-Nagel Nucleosil C18 oszlop (5 μm , 100 \AA , 250 \times 4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B

^b Thermo Fisher Scientific Q Exactive Focus hibrid kvadrupol-orbitrap analízátoros ESI-MS

4.2.6 Az enzim-labilis spacert tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok *in vitro* citosztázis vizsgálata

A spacert tartalmazó daunomicin-peptid konjugátumok (17-19) *in vitro* citosztatikus hatását U87 humán glioblastoma sejtvonalon vizsgáltuk. A sejteket 24 órán keresztül kezeltük a konjugátumokkal (0,05-50 μM), majd mosás után további 48 órán keresztül inkubáltuk. A vegyületek citosztatikus hatását MTT-teszt segítségével határoztuk meg, a mért IC_{50} értékek a 9. táblázat láthatók.

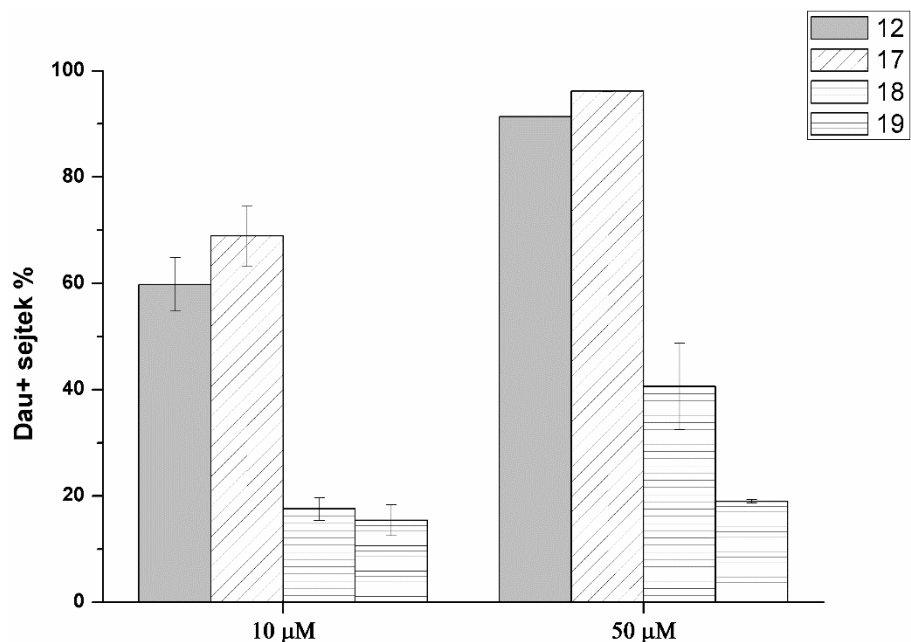
9. táblázat A ¹⁰Lys pozícióban spacer tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok (**17-19**) mért *IC*₅₀ értékei összehasonlítva a kiindulási konjugátummal (**12**).

Kód	Konjugátum	<i>IC</i> ₅₀ / μM
12	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH	24,0 ± 5,9
17	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RNNFKTEEY-OH	16,9 ± 5,6
18	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VA)RNNFKTEEY-OH	> 50
19	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VAGG)RNNFKTEEY-OH	20,2 ± 3,0

Ahogy az eredményekből is látható, a VA szekvencia önmagában (**18**) nem elegendő a hatás növelésére. A másik két spacer szekvenciát tartalmazó származék (**17** és **19**) pedig hasonló tumorelles hatást mutatott, mint az eredeti konjugátum (**12**), tehát a konjugátumok hatékonyságát a spacer beépítésével nem sikerült szignifikánsan javítani.

4.2.7 Az enzim-labilis spacer tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok *in vitro* sejtbejutási vizsgálata

Kíváncsiak voltunk, hogy a citosztatikus aktivitást miért nem sikerült növelni, hogy az enzim-labilis spacer beépítése csökkentette-e a sejtbejutási képességet a **12** konjugátumhoz képest. Ezért az új konjugátumok (**17-19**) *in vitro* sejtbejutását U87 sejteken vizsgáltuk. A sejteket az **4.2.3** részben bemutatott protokoll szerint kezeltük a konjugátumokkal, majd áramlási citometriával vizsgáltuk a sejtbejutási képességet. A 10 és 50 μM koncentráció esetén kapott eredmények a 28. *ábra* láthatók.

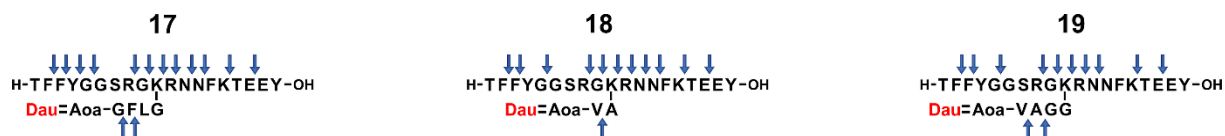


28. ábra A spaceret tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok *in vitro* sejtbejutása (17-19) összehasonlítva a kiindulási konjugátummal (12)

Ahogy a grafikonon is látszik, a VA (18) és a VAGG (19) spacerok beépítése jelentősen csökkentette a konjugátumok sejtbejutási képességét a kiindulási 12 konjugátumhoz képest. Ez magyarázhatja, hogy ezen konjugátumok esetében miért nem sikerült hatékonyan növelni a tumorelles hatást. Azonban a GFLG spaceret tartalmazó konjugátum (17) sejtbejutási képessége összemérhető volt a 12 konjugátuméval, így ebben az esetben nem az internalizációs képesség megváltozása miatt nem javult jelentős mértékben a citosztatikus hatás.

4.2.8 Az enzim-labilis spaceret tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok degradációjának vizsgálata patkány máj lizoszóma preparátumban

A konjugátumok *in vitro* biológiai viselkedésének teljesebb megértéséhez vizsgáltam a konjugátumok metabolizmusát patkány máj lizoszóma preparátumban. Ehhez a konjugátumokat lizoszóma preparátummal inkubáltam, majd a korábbiakhoz hasonlóan 5 perc, 1, 6, 24 és 72 óra elteltével mintákat vettem, melyeket HPLC-MS módszerrel vizsgáltam. Az azonosított hasítási pontok a 29. ábra láthatók, a detektált totál ion kromatogramok a függelék F29-F31. ábráján, az azonosított degradációs fragmensek pedig a függelék F8-F10. táblázatában láthatók.



29. ábra Az enzim-labilis spacer tartalmazó daunomicin-Angiopep-2 konjugátumok (**17-19**) lizoszomális degradációja során azonosított hasítási pontok

Az eredmények alapján elmondható, hogy a VA spacer esetén (**18**) az enzimek valóban nem képesek hasítani az alanin és a lizin közötti izopeptid kötést, így a várt metabolit (Dau=Aoa-Val-OH) csak elhanyagolható mennyiségben keletkezett a mérési időtartam alatt. Továbbá a H-K(Dau=Aoa-VA)-OH is csak nagyon kis mennyiségben keletkezett, valószínűleg sztérikus gátlás miatt, hiszen domináns fragmensként még 72 óránál is a H-GK(Dau=Aoa-VA)R-OH-t detektáltuk. Így a **18** konjugátum esetében nem csak a rossz sejtbejutási képesség, hanem a lassú metabolizáció is oka lehet az alacsony tumorelles hatásnak.

Ezzel szemben a VAGG spacer tartalmazó konjugátum (**19**) esetében a Dau=Aoa-VA-OH metabolit már egy óra után, a Dau=Aoa-V-OH metabolit pedig hat óra után detektálható volt. Ebben az esetben egyértelműen az alacsony internalizációs képesség okozta a **12** konjugátumhoz hasonló citosztatikus hatást.

A GFLG spacer tartalmazó konjugátum (**17**) esetében a Dau=Aoa-GF-OH metabolit csupán hat óra elteltével volt először detektálható, melynek a további degradációja Dau=Aoa-G-OH-vá kifejezetten lassúnak bizonyult. Ebben az esetben is valószínűsíthető, hogy sztérikus gátlás lépett fel, hiszen még 24 óra után is az egyik legintenzívebben detektálható fragmens a H-GK(Dau=Aoa-GFLG)R-OH metabolit volt. A lassú lizoszomális degradáció pedig megmagyarázza, hogy a **17** konjugátum esetében miért nem sikerült növelni a tumorelles hatást.

4.2.9 Rövid összefoglalás

A doktori munkám ezen részében a hatóanyagok számának és pozíciójának fontosságát vizsgáltam. Az Angiopep-2 peptid esetében a kismolekulás hatóanyagot tartalmazó konjugátumok előállításánál eddig mindhárom aminocsoportot (*N*-terminális, illetve ¹⁰Lys és ¹⁵Lys oldallánc aminocsoportok) felhasználták a konjugáláshoz.^{89,93} Azonban a három hatóanyag tényleges fontosságát korábbi kutatásokban nem vizsgálták. Ezért a munkám során először előállítottam az összes egy, kettő, illetve három daunomicint tartalmazó konjugátumot (7 konjugátum, **10-16**), optimáltam a szintézis körülményeket a tiszta konjugátumok előállítása érdekében és

tanulmányoztuk ezek *in vitro* citosztatikus hatását, sejtbejutási képességét, majd vizsgáltam a konjugátumok degradációját is patkány máj lizoszóma preparátum jelenlétében. Az eredmények azt mutatták, hogy a hatóanyagok számának a növelésével nem sikerült jelentősen javítani a konjugátumok hatékonyságát. A legjobb hatással az *N*-terminálison daunomicint tartalmazó konjugátum (**11**) rendelkezett, melynek sejtbejutási képessége és degradációs profilja is kedvező volt. A *C*-terminális közlebbi lizin (¹⁵Lys) módosításával (**10**) azonban a hatékonyság jelentősen romlott, mely visszavezethető az alacsony sejtbejutási képességre. Az *N*-terminális közlebbi lizin (¹⁰Lys) szubsztitúciójával (**12**) pedig egy kiemelkedő internalizációval rendelkező konjugátumot sikerült előállítani, melynek a tumorelles hatékonysága azonban nem volt kimagasló. A degradációs vizsgálatok eredményeiből nyilvánvalóvá vált, hogy ebben az esetben a lassú metabolizáció okozza az alacsony citosztatikus aktivitást. Ennek kiküszöbölésére ebbe a pozícióba egy enzim-labilis spacet (GFLG, VA vagy VAGG) építettem a hatóanyag és a lizin oldallánca közé. Ezek egy része azonban jelentősen rontotta a konjugátum sejtbejutási képességét (**18** és **19**), a megfelelő internalizációval rendelkező GFLG spacet tartalmazó konjugátum (**17**) pedig a kiindulási molekulához (**12**) hasonló lassú degradáció miatt nem tudta javítani a tumorelles hatást.

Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy egy konjugátum hatása rendkívül sok paramétertől függhet: a hatóanyag pozíciójától és számától, a sejtbejutási képességtől, és a metabolizmustól, és ezeket a konjugátumok tervezése során minden esetben figyelembe kell venni.

4.3 EGFR célzó hatóanyag-peptid konjugátumok oldhatóság növelése hidrofil polimerekkel

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) kulcsfontosságú szerepet játszik a rosszindulatú daganatok kialakulásában. Mivel az EGFR a szolid tumorok nagy részében túlexpresszálódik, ezért megfelelő célreceptor lehet az irányított tumor terápiában.^{112,113}

Doktori munkám ezen részében különböző EGFR célzó hatóanyag-peptid és hatóanyag-peptid-polimer konjugátumokat szintetizáltam a szerkezet-aktivitás összefüggés tanulmányozására. Ezeket a biokonjugátumokat az EGFR-hez szelektíven kötődő peptidek (GE11¹²⁰ és D4¹³¹) felhasználásával állítottam elő, hatóanyagként pedig daunomicint választottam, melyet oximkötéssel kapcsoltam az aminosavacétilézett peptidekhez. Mindegyik peptid esetében szintetizáltam olyan származékokat is, ahol egy enzim-labilis spacer (GFLG¹⁶⁴ vagy YRRL¹⁶⁶) építettem a hatóanyag és a peptid közé, hogy növeljem a hatóanyag lizoszómában való felszabadulásának mértékét. Azonban ezek a távtartók nagymértékben befolyásolták a konjugátumok oldhatóságát. A legrosszabbul oldódó GFLG spacer tartalmú származékokhoz egy hidrofil polimermolekulát (PEG vagy HbPG) kapcsoltam, hogy megnöveljem a konjugátumok oldhatóságát. Feltételeztük, hogy a polimerek bizonyos mértékben befolyásolják a konjugátumok receptorkötődését, ezért vizsgáltuk, hogy egy pentaglicin (G₅) spacer beépítése a polimer és a peptid közé hogyan befolyásolja a biológiai hatást. Ehhez a konjugátumok *in vitro* citotoxicitását és sejtbejutását az EGFR-t nagy mennyiségben expresszáló HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken¹⁷⁷ vizsgáltuk.

A méréseket a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet Kemotaxis Munkacsoportjával és a TTK AKI Polimerkémiai Kutatócsoporttal együttműködésben végeztük.

4.3.1 A daunomicin-peptid konjugátumok szintézise

A hatóanyag-peptid konjugátumok szintéziséhez először a két irányító molekulát, a GE11 (YHWYGYTPQNVI) és a D4 (LARLLT) peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő. Mindkét irányító peptid esetében szintetizáltam spacer nélküli (**21** és **25**) és az *N*-terminálison egy GFLG (**22** és **26**) vagy YRRL (**23** és **27**) enzim-labilis spacerrel meghosszabbított származékokat is, majd a Boc-aminooxiecetsavat az így elkészített peptidek *N*-terminálisára kapcsoltam még a gyantán. A kontroll peptidek (**20** és **24**) esetén az aminosavacétilézés helyett acetileztem az *N*-terminálist. A szintézisek befejezése után a peptideket savas közegben, a megfelelő

kationfogók jelenlétében hasítottam a gyantáról, majd a nyers peptideket RP-HPLC-vel tisztítottam és ESI-MS-sel azonosítottam. A tiszta aminosav-derivált peptideket tartalmazó frakciókat közvetlenül, bepárlás után használtam a daunomicinnel való konjugáláshoz.

A daunomicint minden esetben oximkötéssel kapcsoltam a peptidekhez, mely reakcióhoz enyhén savas közeget (ammónium-acetát puffer:DMF 1:1 (V/V); pH 5,1) alkalmaztam. Az elegyeket RP-HPLC-vel tisztítottam, a termékeket ESI-MS-sel azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (10. táblázat). Az acetilezett peptidek és a daunomicin-peptid konjugátumok analitikai HPLC kromatogramjai és ESI-MS spektrumjai a függelék F32-F39. ábráján láthatók.

10. táblázat Az előállított peptidek (20, 24) és konjugátumok (21-23, 25-27) analitikai jellemzői és turbiditása

Kód	Peptid/Konjugátum	R_t / perc ^a	$MW_{számolt}/MW_{mért}$ ^b	Turbiditás (100-T%) ^c
20	Ac-GE11	27,9	1581,7/1582,2	-
21	Dau=Aoa-GE11	30,2	2121,9/2122,1	18,2
22	Dau=Aoa-GFLG-GE11	33,6	2496,3/2496,5	36,8
23	Dau=Aoa-YRRL-GE11	29,5	2710,6/2710,8	25,9
24	Ac-D4	30,9	726,5/726,7	-
25	Dau=Aoa-D4	33,9	1267,1/1267,1	1,9
26	Dau=Aoa-GFLG-D4	39,0	1641,5/1641,6	18,7
27	Dau=Aoa-YRRL-D4	33,7	1855,8/1855,9	4,4

^a Phenomenex Aeris PEPTIDE XB-C18 oszlop (5 µm, 100 Å; 250×4,6 mm); gradiens 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 50 perc 90% B

^b Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus ioncsapda analízátoros ESI-MS

^c 100 µM, DMSO:sejttenyésztő médium (1:9, V/V) elegyben mérve

4.3.2 A daunomicin-peptid konjugátumok oldhatóságának vizsgálata

Mivel mindkét irányító molekula számos hidrofób aminosavat tartalmaz, és az egyik alkalmazott enzim-labilis spacer (GFLG) is tovább növeli a peptidek hidrofóbítását, ezért az *in vitro* mérések előtt a konjugátumok oldhatóságát turbiditás mérésekkel határoztuk meg. A

turbiditás (zavarosság) az oldat átlátszóságának (transzmittancia, T) csökkenését jelenti egy oldhatatlan anyag jelenléte miatt, melyet $100-T\%$ -ban fejezünk ki. A méréseket egy UV-Vis spektrofotométer segítségével végeztük, az oldatok fényáteresztő képességét 630 nm vizsgáltuk. Ezen a hullámhosszon a hatóanyag-peptid konjugátumoknak nincs abszorbanciája, ami zavarhatná a mérést (függelék *F40. ábra*). A mérések során azt tapasztaltuk, hogy a Dau-peptid konjugátumok nem oldódnak vízben, ezért DMSO-ban oldottuk elő a konjugátumokat (1 mM). Ezeket a tiszta DMSO-s törzsoldatokat közvetlenül a mérés előtt hígítottuk tízszeresére (100 μ M) RPMI-1640 sejttenyésztő médiummal. Ez a koncentráció (100 μ M) az általunk az *in vitro* mérések során általánosan alkalmazott és jelen esetben is a tervezett legmagasabb oldatkoncentráció. A kapott turbiditás értékek a *10. táblázat* láthatók. Fontos megjegyezni, hogy egy óra várakozási idő után az elegyek közel átlátszóvá váltak (a turbiditás 0-0,5 értékre változott), vagyis nem stabil kolloid rendszert kaptunk, hanem a kicsapódott konjugátumok idővel leülepedtek a kűvetta aljára.

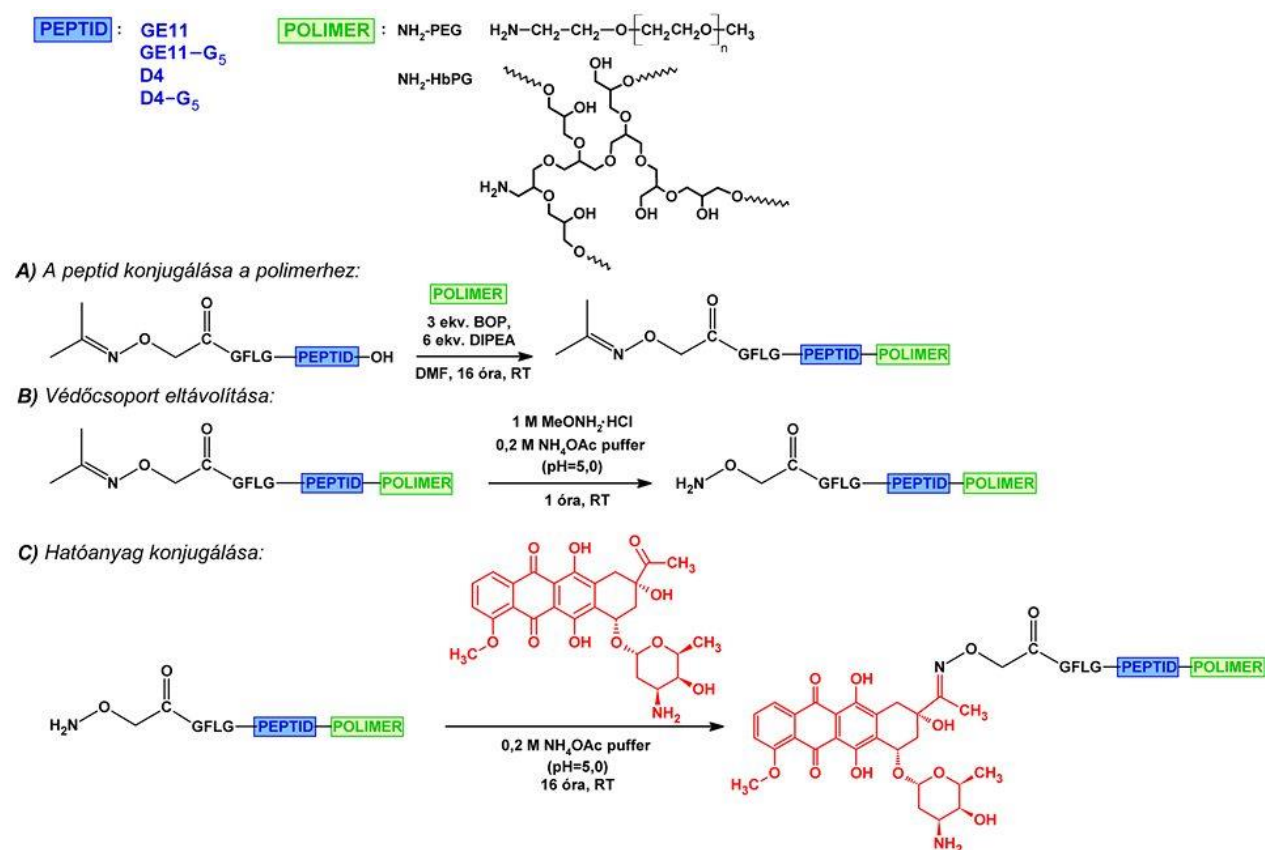
Ahogy az eredményekből látható, a Dau=Aoa-D4 kivételével (**25**, turbiditás: 1,9) az összes konjugátum a hígítás hatására részlegesen kicsapódott, még az ilyen nagy mennyiségű DMSO-t (10%) tartalmazó oldószerkelegetől is. Azonban mivel már ez a DMSO koncentráció is messze meghaladja a sejtek számára tolerálható, vagyis még nem toxikus mennyiséget, ezért ezek a konjugátumok jelen formában biztosan nem alkalmazhatók az irányított tumorterápiában. Emiatt ezekkel a konjugátumokkal *in vitro* vizsgálatokat nem végeztünk.

4.3.3 A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok szintézise

A felmerült oldhatósági problémát mindenképp szeretnénk volna kiküszöbölni, hogy az irányító molekulákat vizsgálni tudjuk, ezért új, vízoldható polimert is tartalmazó daunomicin-peptid-polimer konjugátumokat terveztem. Ilyen vízoldható polimer például a poli(etilén-glikol) (PEG), melynek gyógyszerekhez, peptidekhez és konjugátumokhoz való kapcsolása jól ismert módszer az oldhatóság növelésére,¹⁵⁸ azonban mára ennek a technikának a hátrányai is jól ismertek.¹⁵⁹ Emiatt a konjugátumok előállításához nem csak a kereskedelemben kapható amin-PEG-et, hanem egy amin-monofunkciós hiperelágazós poliglicidolt (HbPG) is választottam, mely egy kimagasló vízoldhatósággal és biokompatibilitással rendelkező nemlineáris PEG-analóg.¹⁶⁰ A két kiválasztott polimer szerkezete a *30. ábra* látható. A kiválasztott polimerek számátlag molekulatömege mindkét esetben 1000 g/mol volt. Mivel a polimerek sztérikusan gátolhatják a receptor-ligandum kötődést, ezért olyan analógokat is terveztem, melyek egy pentaglicin távtartót (G₅ spacer)

tartalmaztak a polimer és a peptid között. A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok szintéziséhez a GFLG spacer tartalmú peptideket választottam, mivel ezen származékoknak (22, 25) volt a legrosszabb az oldhatósága (10. táblázat).

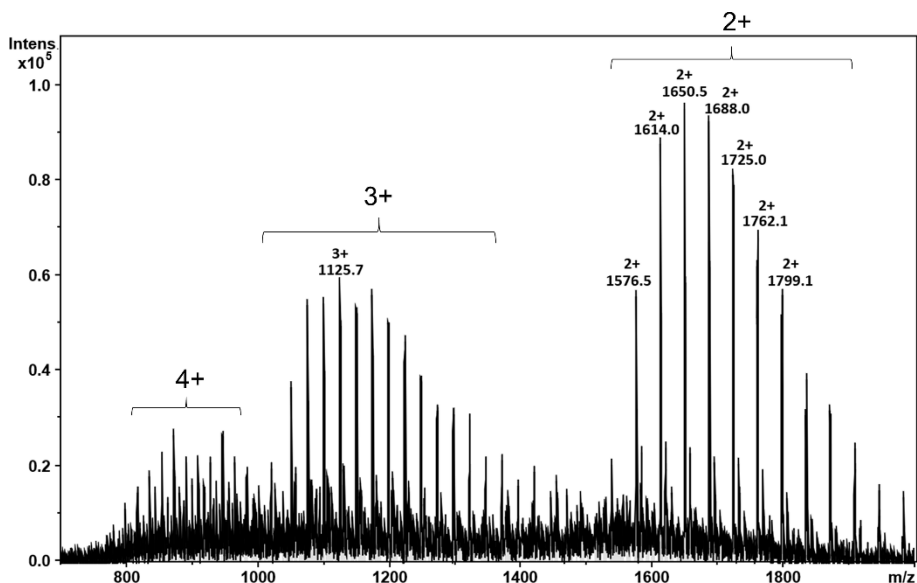
A konjugátumok előállításához először a GFLG spacert tartalmazó GE11 és D4 származékokat ismételten előállítottam, azonban ebben az esetben szabad karboxil C-terminálissal. A peptidlánc felépítése után minden peptid N-terminálisára egy izopropilidén védett aminosavakat kapcsoltam.¹⁷⁸ Előállítottam a C-terminálison pentaglicin spacert tartalmazó származékokat is. A szintézisek befejezése után a peptideket TFA-s közegben, megfelelő kationfogók jelenlétében hasítottam a gyantáról, majd a nyers peptideket RP-HPLC-vel tisztítottam és ESI-MS-sel azonosítottam.



30. ábra A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok szintézise. (A) Az izopropilidén védett aminosavakkal védett peptidek konjugálása a polimerrel; (B) Az izopropilidén védőcsoport eltávolítása; (C) A daunomicin konjugálása oximkötésén keresztül.

A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok szintézisének lépéseit a 30. ábra szemlélteti. A tisztított és liofilizált peptideket a C-terminális karboxilcsoportjukon keresztül oldatfázisban

konjugáltam az amin-funkciós polimerekhez (amin-PEG vagy amin-HbPG). Az amidkötés kialakításához BOP kapcsolószert, illetve HOBt és DIPEA reagenseket alkalmaztam (30. ábra A). A reakcióelegyet RP-HPLC-vel tisztítottam, majd a termékekről liofilizálás után az izopropilidén védőcsoportot metoxiamin 1 M-os puffer oldatával hasítottam (30. ábra B). Egy újabb HPLC-s tisztítást követően a szabad aminosavak peptid-polimer konjugátumokat tartalmazó frakciókat közvetlenül, az oldat bepárlása után használtam a hatóanyag konjugálásához, ahol a daunomicint ammónium-acetát pufferben oximkötéssel keresztül kapcsoltam (30. ábra C). Végül az elegyet ismét RP-HPLC-vel tisztítottam és a termékeket ESI-MS-sel azonosítottam (11. táblázat). Példaként a 31-es konjugátum tömegspektruma a 31. ábra látható. A spektrumban található mindegyik csúcs megfeleltethető a Dau-peptid-polimer konjugátumnak. Az eltérő tömegű csúcsok megjelenése a polimer molekulatömeg-eloszlásából adódik, és az egymás melletti csúcsok közötti különbség a makromolekulát alkotó ismétlődő egység tömegéből származtatható (2+ esetben $74/2 = 37$ Da). A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok analitikai HPLC kromatogramjai és ESI-MS spektrumai a függelék F41-F48. ábráján láthatók.



31. ábra A Dau=Aoa-GFLG-GE11-G₅-HbPG (31) tömegspektruma

11. táblázat Az előállított hatóanyag-peptid-polimer konjugátumok (28-35) analitikai jellemzői és turbiditása

Kód	Konjugátum	R_t / perc ^a	$MW_{\text{átlag}}^b$	Turbiditás (100-T%) ^c
28	Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG	35,6	3563,4	4,2
29	Dau=Aoa-GFLG-GE11-G ₅ -PEG	34,6	3632,4	3,3
30	Dau=Aoa-GFLG-GE11-HbPG	32,4	3163,3	2,7
31	Dau=Aoa-GFLG-GE11-G ₅ -HbPG	32,2	3447,3	2,1
32	Dau=Aoa-GFLG-D4-PEG	38,9	2757,2	3,7
33	Dau=Aoa-GFLG-D4-G ₅ -PEG	39,1	2954,0	3,5
34	Dau=Aoa-GFLG-D4-HbPG	35,0	2382,2	2,2
35	Dau=Aoa-GFLG-D4-G ₅ -HbPG	35,4	2666,9	2,9

^a Phenomenex Aeris PEPTIDE XB-C18 oszlop (5 μm , 100 \AA ; 250 \times 4,6 mm); gradiens 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 50 perc 90% B

^b Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus ioncsapda analizátoros ESI-MS; átlagos MW, az ESI-MS spektrumok legintenzívebb csúcsából meghatározva

^c 100 μM , desztillált víz:sejtenyésző médium (1:9, V/V) elegyben mérve

4.3.4 A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok oldhatóságának vizsgálata

Az újonnan előállított daunomicin-peptid-polimer konjugátumok oldhatóságát turbidimetriás mérésekkel vizsgáltuk. Ebben az esetben a konjugátumok már jól oldódtak desztillált vízben, ezért a törzsoldatokat desztillált vízben készítettük (1 mM), majd az így kapott oldatokat hígítottuk közvetlenül a mérés előtt szérum tartalmú RPMI-1640 médiummal (100 μM). A 630 nm-en végzett mérések során minden esetben csupán alacsony turbiditást tapasztaltunk (11. táblázat), mely idővel sem változott. Ez alátámasztja a korábbi feltételezésünket, miszerint a hidrofíil polimerek jelentősen megnövelik a konjugátumok oldhatóságát. A PEG tartalmú konjugátumok zavarossága azonban kis mértékben magasabb volt, mint a HbPG-alapú konjugátumoké.

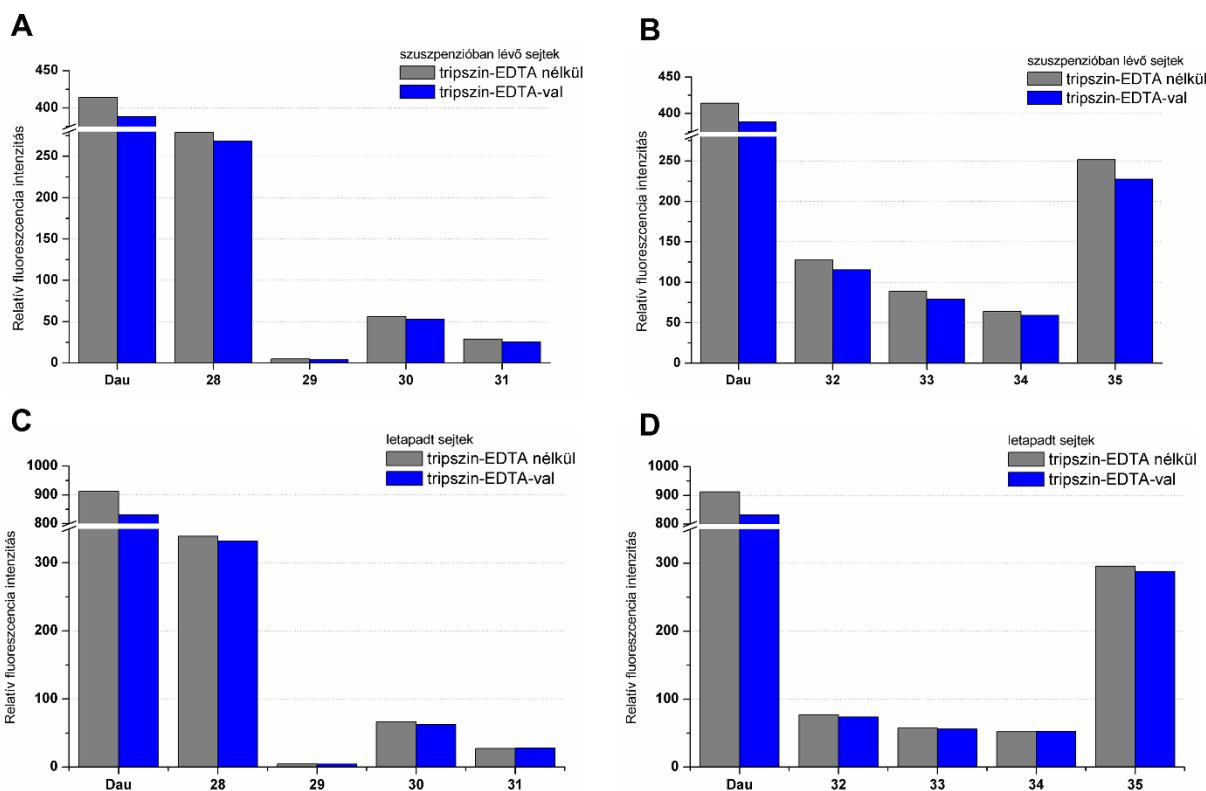
4.3.5 A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok *in vitro* sejtbefutásának vizsgálata

Feltételeztük, hogy a HbPG az elágazó szerkezete és ezáltal kisebb flexibilitása miatt kisebb sztérikus árnyékolást jelent majd a receptorkötődés és a sejtfelvétel során, mint a PEG, hiszen a

HbPG hidrodinamikai térfogata (V_h) kisebb, mint a hasonló molekulatömegű PEG V_h értéke. Ezen feltételezésünket különböző *in vitro* biológiai vizsgálatok elvégzésével próbáltuk igazolni.

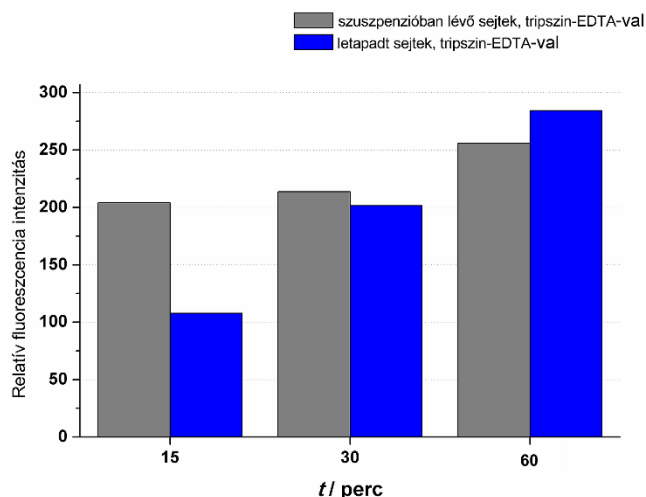
A **28-35** konjugátumok *in vitro* sejtbejutását HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken vizsgáltuk. A kezeléseket letapadt és szuszpenzióban lévő sejteken is elvégeztük. A sejteket a konjugátumok 10 μ M koncentrációjú oldatával 30 percen keresztül kezeltük, majd a sejteket áramlási citométerrel vizsgáltuk. A letapadt és a szuszpenzióban lévő sejtek esetében is a sejtek egy részét a mérés előtt tripszin-EDTA-val kezeltük. A tripszin eltávolítja a sejtek felületén, nem-specifikusan a membránhoz kötődött vegyületeket, így vizsgálható a ténylegesen internalizált konjugátumok mennyisége. A tripszin-EDTA kezelés nélküli minták esetén a kapott fluoreszcencia intenzitás értékek az internalizálódott és a sejt felszínén kötődött konjugátumok együtteséből adódik, míg membrán-kötött konjugátumok mennyiségére a tripszin-EDTA kezelt és kezeletlen minták közötti fluoreszcencia intenzitás utal. Ahogy a 32. *ábra* látható, a konjugátumok nagy része intracellulárisan található, illetve nem figyelhető meg szignifikáns különbség a szuszpenzióban levő (32. *ábra* A és B) és a letapadt (32. *ábra* C és 32. *ábra* D) sejtek internalizációja között. Mindkét csoportban (GE11 és D4 tartalmú konjugátumok) egy-egy vegyület mutatott kiemelkedő sejtbejutást: a Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG (**28**) és a Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-HbPG (**35**), továbbá egyedül a Dau=Aoa-GFLG-GE11-G₅-PEG (**29**) konjugátum esetén tapasztaltunk nagyon alacsony sejtbejutási értéket.

A pentaglicin spacer növelte a D4-HbPG-származék (**34** és **35**) sejtbevételét, hiszen valószínűleg a megnövekedett távolság a gömbszerű, globuláris HbPG és a nagyon rövid, hat aminosavból álló D4 peptidszekvencia között elősegítette a receptorkötődést. A G₅ spacer azonban minden más esetben csökkentette a konjugátumok sejtbejutását. A legjelentősebb különbséget a GE11-PEG esetében (**28** és **29**) figyeltük meg, ahol a G₅ spacer teljes mértékben lecsökkentette az internalizációt. Ebben az esetben valószínűleg a G₅ spacer tovább fokozta a PEG lánc flexibilitását, amely így gátolhatta a GE11 peptid receptorkötődését.



32. ábra A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok *in vitro* sejt felvétele HT-29 sejteken 30 perc inkubációs idő után. A sejtbejutást szuszpenzióban lévő (A: GE11 és B: D4 tartalmú konjugátumok) és letapadt (C: GE11 és D: D4 tartalmú konjugátumok) sejteken is vizsgáltuk.

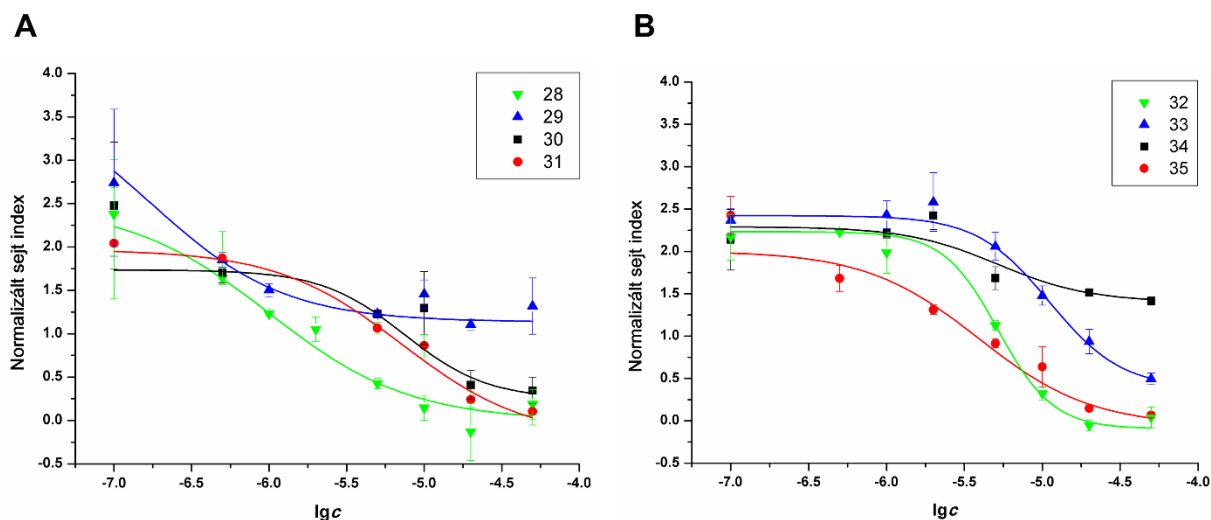
Kiválasztottuk sejtbejutás szempontjából az egyik legjobb konjugátumot, a Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-HbPG-t (**35**), majd annak az időfüggő sejt felvételét is megvizsgáltuk. A HT-29 sejteket 15, 30 vagy 60 percig kezeltük a **35** konjugátummal, ezután a szuszpenzióban lévő, illetve a letapadt sejteket tripszin-EDTA-val kezeltük, végül a sejteket áramlási citometriával vizsgáltuk. Ahogy a **33. ábra** látható, a fluoreszcencia intenzitás mindkét körülmény esetében az idő előrehaladtával növekedett. A letapadt sejtek 15 perc elteltével kisebb mértékben vették fel a **35** konjugátumot, mint a szuszpenzióban lévő sejtek, azonban látható, hogy ez 30 perc után már nagyjából azonos mértékű. Egy óra után pedig a konjugátum sejtbejutása a letapadt sejtek esetében már meghaladja a szuszpenzióban lévő sejtét.



33. ábra A Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-HbPG-t (**35**) időfüggő sejtbejutása HT-29 sejteken.

4.3.6 A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok *in vitro* sejt viabilitásra gyakorolt hatása

Az előállított daunomicin-peptid-polimer konjugátumok *in vitro* sejt életképességre gyakorolt hatását HT-29 sejteken xCELLigence készülékkel vizsgáltuk. A sejteket a konjugátumok különböző koncentrációjú oldatával (0,1-50 μ M) kezeltük, majd a sejteket 72 órán keresztül monitoroztuk. A 48 órás kezelés után kapott normalizált sejtindex értékeket a koncentráció függvényében ábrázoltuk (*34. ábra*), majd ezekből meghatároztuk az IC_{50} értékeket (*12. táblázat*). Ebben az esetben is mindkét csoportban (GE11 és D4 tartalmú konjugátumok) egy-egy vegyület mutatott kiemelkedő citotoxicitást: a Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG (**28**) és a Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-HbPG (**35**), amely jól korrelált az internalizációs vizsgálatokkal. Vizsgáltuk a kontroll acetilezett peptidek (**20**, **24**) sejt életképességre gyakorolt hatását is, azonban ezek a hatóanyag nélküli peptidek nem mutattak sem citotoxikus, sem citosztatikus hatást ezen körülmények között.



34. ábra A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok *in vitro* citotoxikus hatása HT-29 sejteken. (A) GE11 tartalmú és (B) D4 tartalmú konjugátumok eredményei.

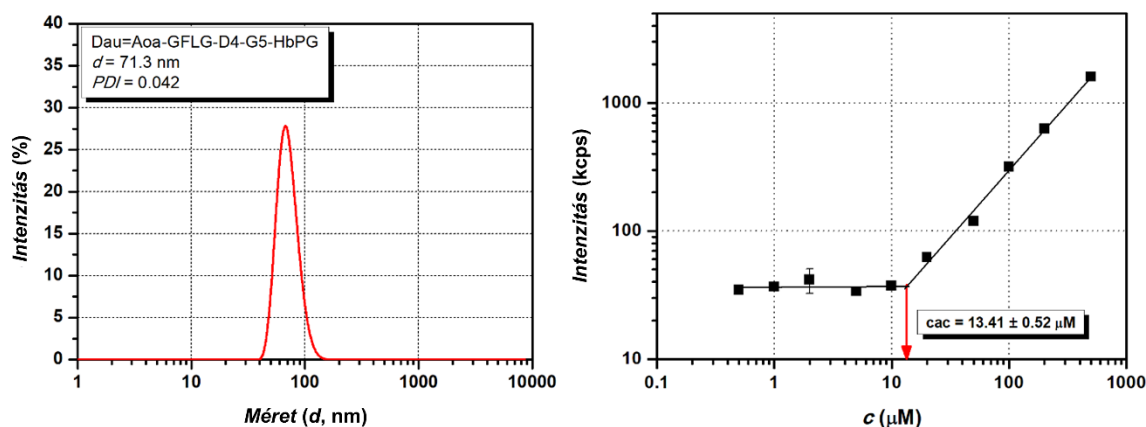
12. táblázat A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok számított IC_{50} értékei, valamint a konjugátumok kritikus aggregációs koncentrációja (cac), a nanorészecskék mérete (d) és polidiszperzitás indexe (PDI).

Kód	Konjugátum	$IC_{50} / \mu M$	d / nm	PDI	$cac / \mu M$
28	Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG	1,2	370,0	0,082	$28,6 \pm 4,4$
29	Dau=Aoa-GFLG-GE11-G ₅ -PEG	9,1	171,8	0,137	$9,3 \pm 0,9$
30	Dau=Aoa-GFLG-GE11-HbPG	9,3	83,8	0,144	$16,6 \pm 1,6$
31	Dau=Aoa-GFLG-GE11-G ₅ -HbPG	6,0	52,3	0,092	$20,2 \pm 2,9$
32	Dau=Aoa-GFLG-D4-PEG	5,1	189,3	0,130	$16,1 \pm 1,3$
33	Dau=Aoa-GFLG-D4-G ₅ -PEG	13,5	157,4	0,076	$56,9 \pm 3,2$
34	Dau=Aoa-GFLG-D4-HbPG	>50,0	76,5	0,057	$6,4 \pm 1,2$
35	Dau=Aoa-GFLG-D4-G ₅ -HbPG	3,8	71,3	0,042	$13,4 \pm 0,5$

4.3.7 A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok amifofil karakterének és aggregációs tulajdonságának vizsgálata

Ahogy a 34. ábra is megfigyelhető, néhány konjugátum még a legnagyobb koncentrációban sem pusztította el a sejtek nagy részét, ezekben az esetekben „telítési görbét” (platót) láthatunk (pl.

Dau=Aoa-GFLG-D4-HbPG (**34**) és Dau=Aoa-GFLG-GE11-G₅-PEG (**29**)). Ezt a jelenséget a peptid- és a polimer blokk eltérő tulajdonságaival (pl. filicitás) értelmezhetjük. Abban az esetben, ha a konjugátumok micelláris típusú aggregációra hajlamosak, megváltozhat a konjugátum sejtbejutásának hatékonysága vagy a hatóanyag felszabadulása. Mivel a konjugátumok egy erősen hidrofób GFLG spacer tartalmú peptidláncot és egy erősen hidrofil polimer blokkot tartalmaznak, ebből adódóan a konjugátum amfifil karakterű, ezért a konjugátumok egy kritikus aggregációs koncentráció (*cac*) felett ún. „önszerveződő” nanorészecskéket alkothatnak. Ez akadályozhatja az irányító peptid hozzáférhetőségét és a receptorkötődést, illetve ezáltal a hatást is. Ezt a feltételezést az oldhatóság mérési eredmények is megerősítik, mivel az alacsony turbiditás értékek nanoméretű aggregátumok, kolloidok képződésre is utalhatnak. Ennek igazolására dinamikus fényszóródás méréseket (DLS) végeztünk 100 μM -os konjugátum koncentrációban. Az aggregátumok mérete (*d*) és polidiszperzitás indexe (*PDI*) a 12. táblázat található, míg a Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-HbPG konjugátum (**35**) méreteloszlási görbéjét 35. ábra szemlélteti (a többi konjugátum méreteloszlási görbéje a függelék F49-F55. ábráján látható).



35. ábra A Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-HbPG konjugátum (**35**) DLS méreteloszlása 100 μM koncentrációban (*balra*), illetve a szórt intenzitás értékek a koncentráció függvényében (*jobbra*)

Minden konjugátumnál nanoméretű aggregátumok képződését figyeltük meg, melyek mérete 50-370 nm között változott. Az adatokból látható, hogy a PEG tartalmú konjugátumok mérete nagyobb (155-370 nm), mint a HbPG-alapú konjugátumoké (50-85 nm). Ez magyarázható a HbPG kompakt elágazó szerkezetével, illetve a PEG-nél jelentősen kisebb moláris hidrodinamikai térfogatával. Továbbá látható, hogy a pentaglicin spacer beépítése minden esetben csökkentette a képződött nanorészecskék méretét. Valamint az is megfigyelhető, hogy GE11-PEG konjugátumok

mérete nagyobb, mint a megfelelő D4-PEG analógok mérete (pl. Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG (**28**): 370 nm, Dau=Aoa-GFLG-D4-PEG (**32**): 189 nm).

A nanorészecskék kialakulása igazolja, hogy a konjugátumok két része közötti nagy filicitás különbség önaggregációt eredményez. Ez az aggregálódás azonban csak egy bizonyos koncentráció (*cac*) felett történik meg. Ez a koncentráció meghatározható DLS mérésel, ha a szórt fény intenzitását vizsgáljuk egy széles koncentrációtartományban (0,5-500 μ M). A Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-HbPG konjugátum (**35**) esetében a 35. ábra mutatja a szórt fény intenzitását a koncentráció függvényében ábrázolva. Mint ahogy látható, az intenzitás alacsonyabb koncentrációknál csaknem állandó és lineárisan növekszik egy adott koncentráció (a *cac*) felett. Ha erre a két szakaszra egyenest illesztünk, akkor ezek metszéspontja megadja a *cac* értékét. A konjugátumok így meghatározott *cac* értékeit a 12. táblázat tartalmazza (a többi konjugátum intenzitás-koncentráció görbéje a függelék F49-F55. ábráján látható).

Ahogy az adatokból látható, az összes konjugátum *cac* értéke a 6-60 μ M koncentráció tartományba esik. A HbPG-alapú konjugátumok esetében a G₅ spacer az irányító peptid és a polimer között kismértékben növeli a *cac*-t, valószínűleg a peptid hidrofóbitásának csökkentése miatt. Továbbá a GE11-et tartalmazó konjugátumok *cac* értékei kissé magasabbak a D4 peptid-alapú konjugátumok *cac* értékeinél. Ezt magyarázhatja a két peptid közötti hidrofóbitás különbség, hiszen a GE11 peptid hidrofílebb a D4 peptidnél.¹⁷⁹ A PEG-alapú konjugátumoknál azonban nem fedezhető fel ilyen egyértelmű tendencia. A GE11 peptid tartalmú konjugátumoknál a G₅ spacer beépítése valószínűleg növeli a hidrofób peptid rész hozzáférhetőségét, ami alacsonyabb *cac* értéket eredményez. A csupán hat aminosavból álló D4 esetében a pentaglicin spacer azonban valószínűleg jelentősen csökkenti a peptid rész hidrofóbitását, ezáltal pedig növeli a *cac* értékét.

A kapott DLS eredmények nagyban hozzájárulnak az *in vitro* biológiai mérések megértéséhez is. A GE11 tartalmú konjugátumok összehasonlításakor nagy különbséget tapasztalhatunk a sejtbejutás és a sejtviabilitásra gyakorolt hatás között. Noha a legnagyobb nanorészecske méretet a Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG (**28**) konjugátum esetében mértük 100 μ M koncentrációban (370 nm), ennek a konjugátumnak volt az egyik legalacsonyabb az *IC*₅₀ értéke (1,2 μ M), a *cac* értéke pedig 30 μ M körül található. Ez utóbbi jóval meghaladja a sejtbejutási mérésekhez használt koncentrációt (10 μ M), vagyis a mérés során a konjugátum nem aggregált formában volt megtalálható. A Dau=Aoa-GFLG-GE11-G₅-PEG (**29**) konjugátum csak 170 nm méretű nanorészecskéket alkotott, azonban a sejtfelvétele a vizsgálatok során a legalacsonyabbnak

bizonyult. Sőt, bár az IC_{50} 10 μM körül volt, a normalizált sejttindex változása nem a klasszikus szigmoid görbét követte, hanem a sejtvitalitás egy adott koncentráció fölött nem csökkent tovább a koncentráció növekedésével. Ebben az esetben a *cac* kicsivel 10 μM alatt volt, ezért a 10 μM koncentrációban mért sejtbefutási vizsgálatok során valószínűleg a konjugátum már a kezelő oldatban nanorészecske formában volt megtalálható. Ekkor az irányító peptid a nanorészecskék hidrofób magját alkotja, ami gátolja az receptorkötődést és így az internalizációt, és ezáltal a konjugátum toxikus hatásának elvesztését eredményezi.

A D4 tartalmú konjugátumok esetében az egyik HbPG-alapú konjugátum (**34**) *in vitro* hatékonysága volt a legrosszabb. Noha ennek a konjugátumnak a sejtvitalitási görbéje a klasszikus szigmoid mintázatot követi, az még a legmagasabb konjugátum koncentrációnál sem éri el az 50%-ot. A **34** konjugátum rendelkezik a legkisebb *cac* értékkel (kb. 6 μM), azaz a kis méretű aggregátumok (~76 nm) már a kifejezetten alacsony koncentrációban kialakulnak, így a konjugátum sejtbefutási képessége is csökken. Ez az érték (kb. 6 μM) egybeesik a sejtvitalitási görbe telítési részével is, vagyis előlött a koncentráció fölött a konjugátum nem képes nagyobb mennyiségben bejutni a sejtekbe, így a toxikus hatása sem növekszik. Ezzel szemben a D4 tartalmú konjugátumok közül a Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-HbPG (**35**) rendelkezik a legalacsonyabb IC_{50} értékkel (3,8 μM), továbbá a D4 tartalmú konjugátumok közül csak ez mutatott kiemelkedő sejtfelvételt. Itt a G₅ spacer csökkenti a D4 hidrofóbítását¹⁷⁹ és egyben növeli az irányító peptid hozzáférhetőségét is, míg a HbPG csupán kismértékű sztérikus gátló hatást fejt ki, melyek együttesen járulnak hozzá a konjugátum előnyös *in vitro* biológiai hatásához.

4.3.8 Rövid összefoglalás

Doktori munkám ezen részében EGF receptort célzó daunomicin-peptid konjugátumokat állítottam elő, melyekhez az irodalomból ismert GE11 és D4 szekvenciákat használtam. Mivel ezen konjugátumok oldhatósága nagyon alacsonynak bizonyult, az oldhatóság növelésére egy hidrophil polimer molekula kapcsolását választottam. A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok szintéziséhez poli(etilén-glikol) (PEG) és hiperelágazós poliglicidol (HbPG) származékokat használtam és vizsgáltam azt is, hogy egy pentaglicin távtartó beépítése a peptid és a polimer közé hogyan befolyásolja a biológiai hatást. A turbiditás mérések alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a választott hidrophil polimerekkel való konjugálás jelentősen javította a konjugátumok oldhatóságát. Ezután az előállított daunomicin-peptid-polimer konjugátumok *in vitro* sejtfelvételét

és sejtvitalitásra gyakorolt hatását HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken vizsgáltuk, majd a kapott eredmények értelmezéséhez dinamikus fényszóródás méréseket végeztünk. A DLS vizsgálatok során meghatároztuk a keletkezett nanorészecskék méretét, illetve a konjugátumok kritikus aggregációs koncentrációját. Az eredmények szerint a rövidebb D4 peptid esetén a G₅ spacer tartalmazó HbPG-alapú konjugátum (35), míg a GE11 peptid esetében a spacer nélküli PEG-alapú konjugátum (28) bizonyult a leghatásosabbnak. Továbbá azt is láttuk, hogy PEG alkalmazása esetén a G₅ spacer beépítése minden esetben csökkenti a biológiai hatékonyságot a célzó peptid típusától függetlenül. Összességében elmondható, hogy az ilyen típusú hatóanyag-peptid-polimer konjugátumok esetén a biológiai hatás csak az önszerveződő aggregációs viselkedés ismeretében magyarázható.

4.4 Tuftsin-daunomicin konjugátumok tömegspektrometriás analizisének optimalizálása

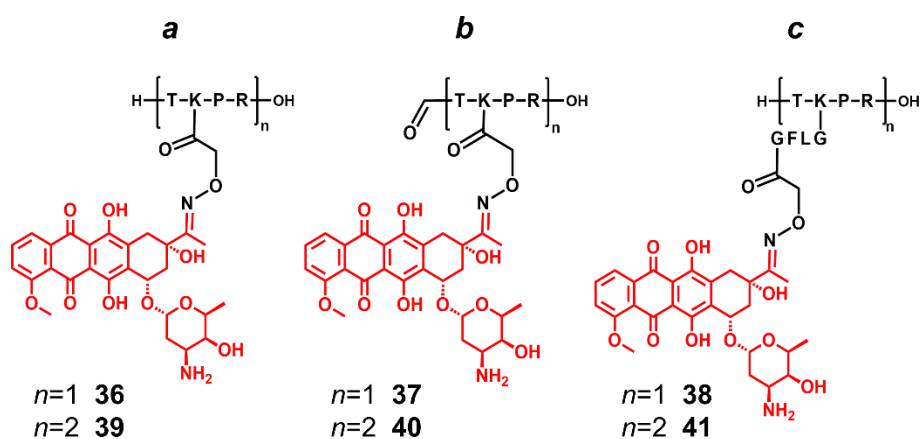
Többkomponensű biokonjugátumok szintézise általában egy többlépcsős folyamat, mely során a tömegspektrometria kulcsfontosságú a közti- és végtermékek azonosításában. Azonban antraciklinek és antraciklin konjugátumok esetében a termékek tisztaságának meghatározása nem egyszerű feladat a megszokottól eltérő tömegspektrometriás viselkedés miatt, ahogy ezt korábban a 4. ábra bemutattam. Korábbi megfigyeléseink azt mutatták, hogy a tömegspektrométer ionforrásában bekövetkező fragmentáció, vagyis a hatóanyag cukorvesztése szerkezetfüggő és bázikus oldalláncot tartalmazó aminosavak (pl. lizin és arginin) jelenlétében fokozottabb. Ilyen bázikus aminosavakat tartalmaz például a tuftsin, illetve a legtöbb sejtpenetráló peptid (oligoarginin, penetratin) is. Ezen peptidek daunomicin tartalmú konjugátumainak MS vizsgálata során a spektrumban nagyrészt fragmens ionok láthatók, és az intakt protonált molekulák csak kis mennyiségben jelennek meg. Ezért az optimális tömegspektrometriás körülmények meghatározására hat különböző, elágazó szerkezetű daunomicin-tuftsin konjugátumot állítottam elő. Vizsgáltam, hogy a különböző szerkezeti változtatások, azaz a bázikus funkciócsoportok csökkentése, a hatóanyag száma, illetve egy távtartó jelenléte a hatóanyag és a peptid között hogyan befolyásolják a fragmentációt. Továbbá vizsgáltam a tömegspektrometriás körülmények, vagyis az ionforrás beállításainak és az alkalmazott oldószerek cukorvesztésre gyakorolt hatását is.

4.4.1 Tuftsin-alapú biokonjugátumok szintézise

A TKPR szekvenciájú peptidek szintézisét Wang gyantán végeztem, mivel így a peptidek gyantáról való hasítása után a C-terminálison karboxilcsoport keletkezik, és így az előállított tuftsin származékok megfelelnek a C-terminális szabálynak (CendR) is.¹⁴⁷ Minden esetben előállítottam a monomer (TKPR, **36-38**) és a dimer (TKPRTKPR, **39-41**) származékokat is, így vizsgálni tudtam, hogy a szerkezeti módosítások hogyan befolyásolják az egy és a két daunomicint tartalmazó konjugátumok fragmentációját. A lizinek ϵ -aminocsoportjai pedig megfelelő konjugációs pontot biztosítanak a hatóanyag kapcsolására.¹⁵¹ Az előállított konjugátumok vázlatos szerkezetét a 36. ábra mutatja be. Az N-terminálison szabad aminocsoportot tartalmazó származékok esetében utolsó aminosavként Boc-Thr(^tBu)-OH használtam. A formilezett származékok előállítása esetében az utolsó Fmoc-csoport hasítása után a keletkezett szabad aminocsoportot For-OTcp (hangyasav 2,4,6-triklórfenilészter) reagenssel formileztem. Az elágazások kialakítására minden esetben Fmoc-Lys(Dde)-OH aminosavat építettem be a

szekvenciába, melynek oldallánc védőcsoportját a teljes peptidgerinc felépítése után szelektíven hasítottam. A Boc-védett aminosav (Boc-Aoa-OH) közvetlenül vagy egy GFLG távtartón keresztül kapcsolom a lizin ϵ -aminocsoportjához. A szintézisek befejezése után a peptideket savas közegben, megfelelő kationfogók jelenlétében hasítottam a gyantáról, mely során az oldallánc védőcsoportok is lehasadtak. A nyers peptideket RP-HPLC-vel tisztítottam, és ESI-MS-sel azonosítottam, majd a tiszta frakciókat közvetlenül, az oldat bepárlása után használtam a hatóanyaggal való reakcióhoz.

A daunomicint enyhén savas körülmények között ammónium-acetát pufferben (pH 5,1), oximkötéssel kapcsolom a tisztított aminosavacétilézett peptidekhez. A reakcióelegyetek RP-HPLC-vel tisztítottam, a termékeket (36. ábra) ESI-MS-sel azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (13. táblázat). A daunomicin-tuftsinnal konjugátumok analitikai HPLC kromatogramjai a függelék F56, F58, F60, F62, F64. és F66. ábráján láthatók.



36. ábra Tuftsinn-daunomicin konjugátumok sematikus szerkezete

13. táblázat Az előállított tuftsinn-daunomicin konjugátumok analitikai jellemzői

Kód	Konjugátum	R_t / perc ^a	$MW_{számolt} / MW_{mért}^b$
36	H-TK(Dau=Aoa)PR-OH	19,8	1082,5 / 1082,4
37	For-TK(Dau=Aoa)PR-OH	20,4	1110,5 / 1110,4
38	H-TK(Dau=Aoa-GFLG)PR-OH	21,8	1456,7 / 1456,7
39	H-[TK(Dau=Aoa)PR] ₂ -OH	19,1	2147,0 / 2147,1
40	For-[TK(Dau=Aoa)PR] ₂ -OH	19,5	2175,0 / 2175,1
41	H-[TK(Dau=Aoa-GFLG)PR] ₂ -OH	22,2	2895,4 / 2895,3

^a Macherey-Nagel Nucleosil C18 oszlop (5 μ m, 100 Å, 250 \times 4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B

^b Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus ioncsapda analízátoros ESI-MS

4.4.2 A tuftsin-daunomicin konjugátumok ESI-MS vizsgálata az általánosan alkalmazott körülmények között

A tiszta tuftsin-daunomicin konjugátumokat ESI-MS-sel vizsgáltam az általánosan alkalmazott körülmények (0,1% ecetsav / acetonitril:desztillált víz (1:1, V/V)) között. Minden esetben számos csúcs jelent meg a spektrumokban, melyek közül csupán a csúcsok hozzávetőlegesen 40%-a tartozott a protonált molekulákhoz, a többi különböző, elsősorban cukorvesztett fragmensekhez tartozott (ld. a függelék *F57, F59, F61, F63, F65. és F67. ábrái*). Ez az érdekes jelenség elég ritka peptidek és biokonjugátumok ESI-MS vizsgálata során. A cukorvesztés lejátszódhat a szintézis és tárolás,¹⁶⁷ illetve az ESI-MS mérés során bekövetkező fragmentációkor is. Mivel mind a két esetben ugyanolyan *m/z* értéknél jelentkeznek a bomlott termék, ezért közvetlenül nem lehet a két jelenséget megkülönböztetni.

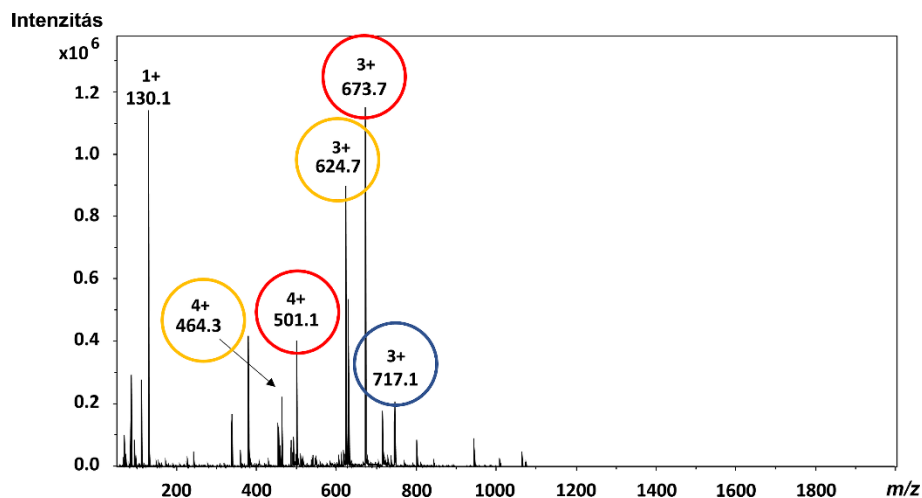
A cukorvesztés a **38** konjugátum szintézise során valóban bekövetkezett, ahol a cukorvesztett származékot (**42**) izolálni is lehetett. Az így előállított konjugátumok (**36-42**) *in vitro* citosztatikus hatását (6 + 66 órás kezelés után) korábban HL-60 humán mieloid leukémia sejteken vizsgáltuk. Ahogy a *14. táblázat* is látható, a cukorvesztett konjugátum teljesen elveszíti hatékonyságát, ezért kiemelten fontos, hogy a szintézis során bekövetkező cukorvesztést, illetve a tömegspektrometriás mérés során bekövetkező fragmentációt a mérés optimalizálásával egyértelműen, kétségek nélkül meg tudjuk különböztetni.

14. táblázat Tuftsin-daunomicin konjugátumok citosztatikus hatása HL-60 sejteken

Kód	Konjugátum	IC ₅₀ / μM
36	H-TK(Dau=Aoa)PR-OH	15,65 ± 0,5
37	For-TK(Dau=Aoa)PR-OH	15,95 ± 0,4
38	H-TK(Dau=Aoa-GFLG)PR-OH	1,65 ± 0,2
39	H-[TK(Dau=Aoa)PR] ₂ -OH	17,8 ± 2,1
40	For-[TK(Dau=Aoa)PR] ₂ -OH	18,1 ± 9,1
41	H-[TK(Dau=Aoa-GFLG)PR] ₂ -OH	1,58 ± 0,1
42	H-TK(Dau=Aoa-GFLG)PR-OH cukorvesztett	> 100

A két daunomicint tartalmazó dimer származékok esetén az általánosan alkalmazott körülmények közötti ESI-MS mérés során kifejezetten komplex spektrumokat kaphatunk, hiszen

ebben az esetben a két Dau glikozidos kötése egymástól függetlenül hasadhat, így a cukorvesztett termékek különféle kombinációja is megjelenik (37. ábra). Ez pedig még tovább nehezíti a konjugátumok egyértelmű szerkezetének meghatározását.



37. ábra Az **39** konjugátum ESI-MS spektruma az általánosan alkalmazott körülmények és ionforrás paraméterek mellett (136 V kapilláris kimeneti feszültség). (A kék körök a protonált molekulát, a piros és a sárga körök pedig az egy, illetve a két cukorvesztést jelölik.)

Korábbi megfigyeléseink alapján a bázikus aminosavakat tartalmazó peptidek esetén a konjugátumok fragmentációja jelentősebb. A tuftsin származékok számos bázikus protonálódási helyet tartalmaznak (*N*-terminális aminosoport, lizin és arginin oldalláncai), ezáltal az ESI-MS mérések során szokatlanul sok töltésű ionok keletkeznek. A pozitív töltések ezekben a peptidekben közelségük miatt erősen taszítják egymást, így a fragmentáció akár egy normál, általános körülmények között végzett MS mérés során is bekövetkezhet. Ezt a jelenséget „túlzott protonálódásnak” vagy „túlzott töltöttségnek” neveztük el.

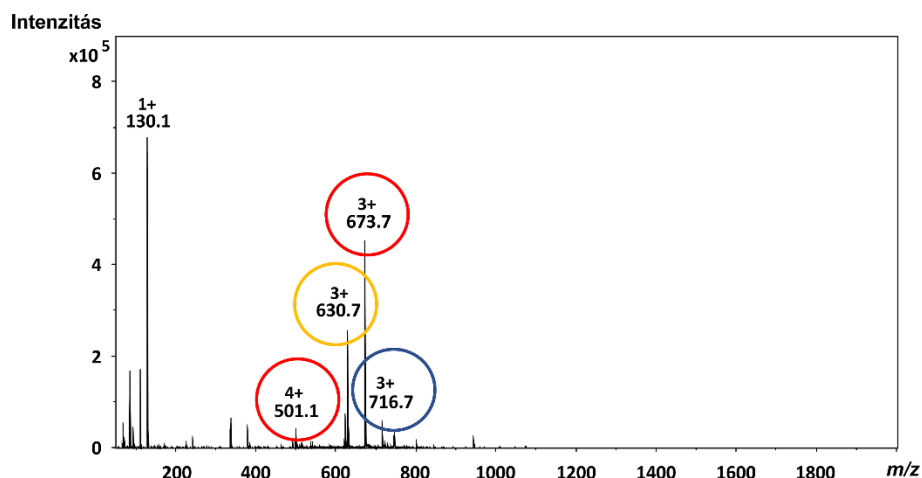
Ahogy a spektrumok alapján megállapítható, a szabad *N*-terminális elősegíti a glikozidos kötés hasadását (ld. függelék *F56F57*, *F61*, *F63*, *F67. ábra*), míg azoknál a konjugátumoknál, ahol ez a bázikus aminosoport formilezett (**37**, **40**), a cukorvesztés kisebb mértékű (ld. függelék *F59*, *F65. ábra*). Ez egyértelműen alátámasztja a fenti elméletet. Továbbá ez a jelenség elsősorban a monomer származék esetén jelentős, ahogy a *41. ábra* is látható. Ez azt bizonyítja, hogy a konjugátumban jelenlévő bázikus karakterű funkciócsoportok nagy mértékben befolyásolják a glikozidos kötés MS körülmények közötti stabilitását, és ezek számának csökkentése mérsékli a cukorvesztés arányát. Továbbá megállapítható, hogy önmagában a formilezés nem elegendő a fragmentáció gátlására, viszont jelentősen csökkenti ezt a jelenséget.

Ha a peptidgerinc és a Dau közé egy semleges töltésű GFLG spacer építettem be (**38, 41**), vagyis a daunomicin cukorrésze távolabb került a peptid bázikus karakterű funkcióscsoportjaitól, akkor az előzőekhez hasonló, vagyis kisebb mértékű fragmentációt tapasztaltam (ld. függelék *F61, F67. ábra*). Ez a módosítás csak kis mértékben képes csökkenteni a fragmentációt (*41. ábra*), valószínűleg a konjugátum flexibilis térszerkezete miatt.

4.4.3 A tuftsin-daunomicin konjugátumok ESI-MS vizsgálata a módosított körülmények között

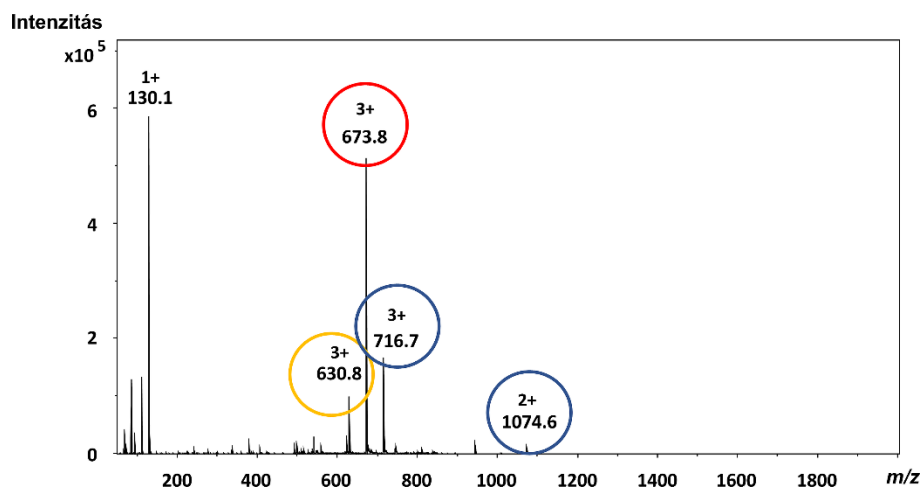
A méréseim célja az egyszerűbb, csak protonált molekulákat tartalmazó spektrum detektálása volt. Ezért a kísérleti körülményeket, például a kapilláris kimeneti feszültséget, valamint a minták ionizálásához használt oldószerek összetételét úgy választottuk meg, hogy gátoljuk a glikozidos kötés hasadását.

Az alapértelmezett kapilláris kimeneti feszültség minden esetben nagymértékű fragmentációt eredményezett, vagyis a tömegspektrumok fő csúcsai a fragmensionokhoz ([MW - 1 cukor] és / vagy [MW - 2 cukor]) tartoztak (*37. ábra*). A mérések során a kapilláris kimeneti feszültséget 200 V-ról fokozatosan 5 V-ra csökkentettem, és az eredmények azt mutatták, hogy a feszültség csökkentése kis mértékben növeli az intakt protonált molekulák intenzitását. Azonban a fragmensionok továbbra is dominánsak maradtak a szabad *N*-terminális aminocsoportot (**36, 38, 39, 41**) tartalmazó konjugátumok esetében (*38. ábra*). A feszültség csökkentése az *N*-terminálison formilezett konjugátumoknál (**37, 40**) jelentősen mérsékelte a cukorvesztést, különösen a két cukoregység egyidejű hasadását (**40**), ahogy azt a *41. ábra* is mutatja.



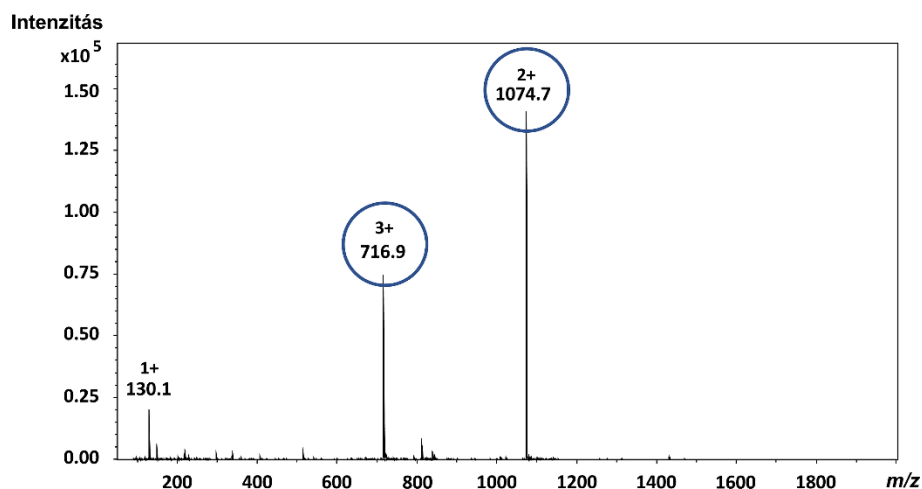
38. ábra Az **39** konjugátum ESI-MS spektruma csökkentett kapilláris kimeneti feszültség (5 V) alkalmazásával. (A kék kör az intakt protonált molekulát, a piros és a sárga körök pedig az egy, illetve a két cukorvesztést jelölik.)

Vizsgáltam továbbá a különböző, savas, savmentes, illetve illékony puffer tartalmú oldószerkeverékek ionizációra gyakorolt hatását, miközben a kapilláris feszültséget a korábbiakban optimalizált 5 V-on tartottam. Acetonitril-víz (1:1, V/V) keveréket, illetve ammónium-hidrogén-karbonát (NH_4HCO_3 , 50 mM, pH 7,8) vagy ammónium-acetát (NH_4OAc , 50 mM, pH 6,7) puffereket és acetonitrilt (1:1, V/V) tartalmazó oldatokat vizsgáltam. A savmentes acetonitril-víz keverék jelentősen csökkentette a fragmensionok mennyiségét a **36**, **37**, **38** és **40** konjugátumok esetében. Az **39** és **41** konjugátumoknál a savmentes közeg nem tudta hatékonyan gátolni a fragmentációt, bár a körülmények ilyen irányú változtatása jelentősen visszaszorította az egyidejűleg bekövetkező kétszeres cukorvesztést (*39. ábra* és *41. ábra*).



39. ábra Az **39** konjugátum ESI-MS spektruma savmentes oldószerkeletben (acetonitril-víz 1:1, V/V; 5 V kapilláris kimeneti feszültség) mérve. (A kék körök az intakt protonált molekulákat, a piros és a sárga körök pedig az egy, illetve a két cukorvesztést jelölik.)

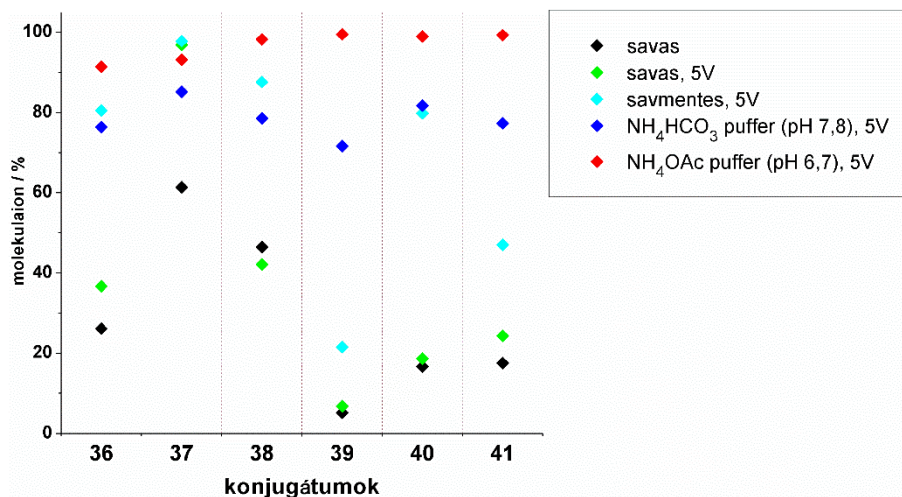
Az illékony pufferek használata esetén az összes biokonjugátumnál az intakt protonált molekulák voltak dominánsak a spektrumokban. Az NH_4HCO_3 puffer (50 mM, pH 7,8) képes volt hatékonyan visszaszorítani a fragmentációt, az intakt protonált molekulák mennyisége már ~80% volt, viszont alacsony intenzitású csúcsok és zajos spektrum jellemezte ezeket a méréseket. Ezzel szemben az NH_4OAc pufferben (50 mM, pH 6,7) való mérés tisztább spektrumot adott, és az intakt molekulák mennyisége is több, mint 95% volt (40. ábra és 41. ábra, illetve a függelék F57, F59, F61, F63, F65. és F67. ábrái). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a pH módosításával, illetve a protonált molekulák töltésszámának csökkentésével visszaszorítható az elektropray ionizáció során bekövetkező spontán fragmentáció.



40. ábra Az **39** konjugátum ESI-MS spektruma 50 mM NH₄OAc pufferben (pH 6,7, acetonitrillel hígítva (1:1, V/V); 5 V kapilláris kimeneti feszültség) mérve. (A kék körök az intakt protonált molekulákat jelölik.)

4.4.4 Rövid összefoglalás

A doktori munkám ezen részében azt vizsgáltam, hogy tuftsin-daunomicin konjugátumok esetében hogyan lehet visszaszorítani a tömegspektrometriás mérések során az ionforrásban bekövetkező spontán glikozidos kötés hasadást, mivel ez nagy mértékben megnehezíti az ilyen Dau tartalmú konjugátumok analízisét. Az általánosan alkalmazott körülmények között sokszoros töltésű ionok keletkeznek, a pozitív töltések taszítása pedig elősegíti a cukorrész hasadását, és komplex, túlnyomó részt fragmensionokat tartalmazó spektrumot adnak. Az ionizáció során a H⁺-ionok a molekula legbázikusabb pontjain lokalizálódnak, például a bázikus aminosavak (arginin, lizin és hisztidin) α-aminocsoportján vagy oldalláncán. A különböző protonált formák populációja a peptid belső energiájától és a protonálódási pontok gázfázisbeli bázicitásától függ. A képződött ionok stabilitását a töltések száma és elhelyezkedése határozza meg, az ezáltal fellépő túl nagy töltés taszítás pedig a molekula fragmentációjához vezet.^{180,181}



41. ábra Az intakt protonált molekulák intenzitása (%) a különböző szerkezetű tuftsín-daunomicin konjugátumok esetén különböző körülmények között vizsgálva. A kapilláris kimeneti feszültség, az oldószerek összetétele és a pH a mérések során szisztematikusan módosítva.

Az alacsonyabb töltöttségi állapot eléréséhez fokozatosan csökkentettem a kapilláris kimeneti feszültséget, illetve vizsgáltam az oldószer ionizációra gyakorolt hatását is. Az eredmények azt mutatták, hogy a legjobb minőségű spektrumokat alacsony kapilláris kimeneti feszültség (5 V) és NH₄OAc puffer kombinációjával lehet elérni. Ebben az esetben szinte kizárólag intakt molekulákat detektáltam a biokonjugátumok ESI-MS spektrumában. Ugyanakkor azt is megfigyeltem, hogy nem csak a tömegspektrométer beállításai, hanem a tuftsín-daunomicin konjugátumok szerkezete is nagy hatással volt az ESI-MS spektrumokra. A bázikus karakterű funkciócsoportok csökkentése (pl. az *N*-terminális formilezése), vagy egy semleges töltésű linker (GFLG spacer) beépítése a Dau és a peptidgerinc közé jelentősen csökkentette a fragmentációt. A szerkezeti változtatások azonban csak elősegítették a fragmentáció csökkenését, a túlzott protonálódást csak megfelelő oldószerekkel és tömegspektrometriás beállításokkal tudtam visszaszorítani. Ezzel sikerült azt is bizonyítanom, hogy a cukor hasadása nem a tárolás (vagy szintézis) során játszódott le, hanem csak a tömegspektrométer ionforrásban történt fragmentáció okozta. Ezek az eredmények hasznosak lehetnek az antraciklin tartalmú biokonjugátumok tömegspektrometriás elemzésében, a megfelelő és könnyen értékelhető spektrumok előállításában.

5 Az alkalmazott módszerek

5.1 Peptidszintézis

Peptidek előállításának két fő lehetséges módja az oldatfázisú, melyet napjainkban egyre ritkábban használnak laboratóriumi körülmények között, illetve a szilárdfázisú peptidszintézis. Az oldatfázisú szintézis nagy időigénye és alacsony kitermelése miatt Merrifield az 1960-as évek elején kidolgozott egy új eljárást, a szilárdfázisú peptidszintézist (SPPS), a peptidek egyszerűbb, gyorsabb és hatékonyabb előállítására.¹⁸² Az SPPS technika esetén a peptid egy szilárd, oldhatatlan hordozóhoz, gyantához van kapcsolva, amíg el nem készül a megfelelő hosszúságú peptidlánc. Merrifield ezen munkásságáért 1984-ben Nobel-díjat kapott („for his development of methodology for chemical synthesis on a solid matrix”).¹⁸³ A peptid felépítése, az oldatban végzett szintézishez hasonlóan, történhet aminosavanként (stepwise), vagy a konvergens szintézis módszerével, amikor is hosszabb, védett, vagy részlegesen védett peptidláncokat kapcsolnak össze a gyantán fragmentskondenzációval.¹⁸⁴

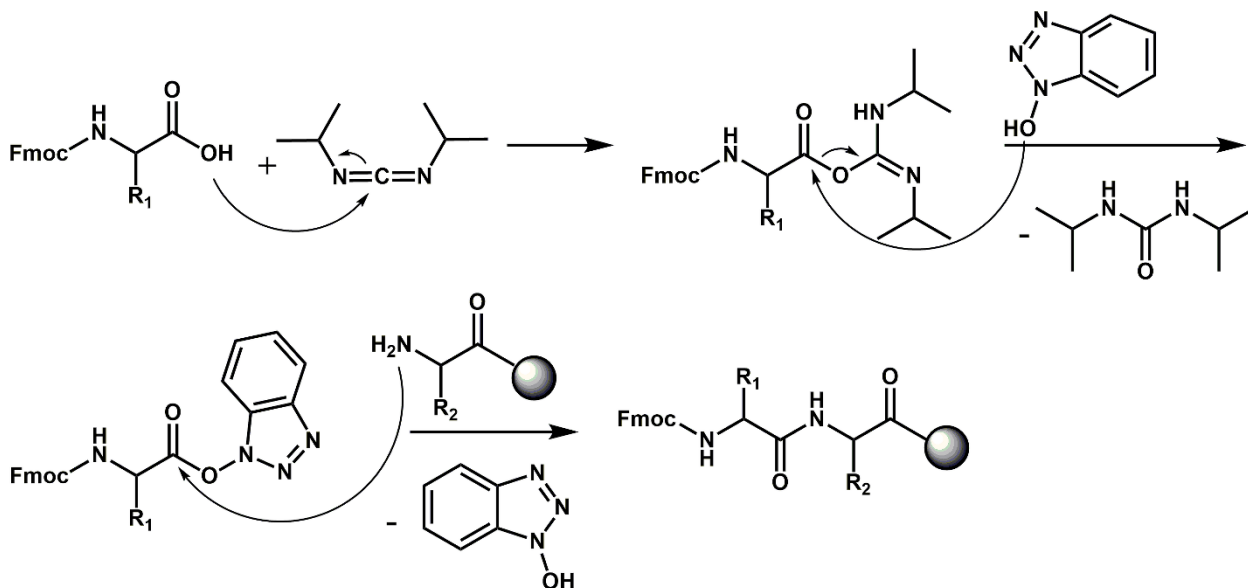
Merrifield úgy gondolta, hogy az alkalmas hordozó egy stabil, oldhatatlan polimer (gyanta) lehet, amelyen funkciós csoportok találhatóak. Ezek a csoportok keresztül kapcsolódhat a peptid C-terminális felőli első aminosava. Ezután az átmeneti amino-védőcsoport hasítását követően, a következő – megfelelő módon védett, és aktivált – aminosav-származék peptidkötéssel kapcsolható. Ezen egyszerű lépések ismétlésével előállítható az előre tervezett teljes peptidlánc. A kész láncról el kell távolítani a védőcsoportokat, amit többnyire egy lépésben végeznek a peptid gyantáról való hasításával, majd a megfelelő tisztítási lépések után megkapjuk a kívánt peptidet.¹⁸⁵

A gyanta felületén funkciós csoportok találhatóak, amikhez hozzákapcsolható az első aminosav karboxilcsoportja. Fontos, hogy a peptid – gyanta kötésnek a szintézis során stabilnak kell lennie, de a kész peptidláncot könnyen le kell tudni hasítani a gyantáról. A jó hordozó kémiaiailag inert és mechanikailag stabil, az alkalmazott oldószerekben jól duzzad, hogy az épülő peptidlánc a reagensek számára könnyen hozzáférhető legyen. Merrifield a módszer fejlesztése során több polimer hordozót is alkalmazott (cellulóz, polivinil-alkohol, ioncserélő gyanták). A vizsgáltak közül a legjobbnak a klór-metilezett sztírol – 1,4-divinilbenzol (1-2%) kopolimer bizonyult. Ez a keresztkötéses gyanta porózus szerkezetű, így lehetővé teszi a gyanta átjárhatóságát a reagensek számára a polimer duzzadását előidéző oldószerek jelenlétében.^{185,186} Napjainkban már többféle gyanta is kereskedelmi forgalomban van, melyek különböző funkciós csoportokat vagy

funkcionalizált linkereket tartalmaznak. A szintézishez mindig a választott módszerrel kompatibilis, megfelelő C-terminális véget (karboxil vagy amid) eredményező gyantát kell választani.

Az SPPS előnye, hogy a reakcióelegy minden lépés után szűrhető, így az elreagálatlan anyagok és a melléktermékek egyszerűen eltávolíthatók, míg a szilárd gyanta és a hozzá kovalens kötéssel kapcsolt növekvő peptidlánc pedig a szűrőn marad. Ezáltal az egész szintézis egyetlen reakcióedényben – például egy fecskendőben – végezhető. Az SPPS nem csak leegyszerűsíti, hanem lényegesen gyorsítja is a szintézist, továbbá akár automatizálásra is lehetőséget biztosít.

A módszer hátránya, hogy bár a felesleges reagensek könnyen eltávolíthatók, a peptid izolálása és vizsgálata csak a gyantáról való hasítás után lehetséges. A hibás szekvenciák elkerülése érdekében a szintetikus lépéseknek (kapcsolás, hasítás) közel 100%-os konverziójúnak kell lenniük. Ez az alkalmazott aminosav-származékok és az aktiváláshoz szükséges reagensek gyantakapacitáshoz viszonyított 3-5 ekvivalensnyi mennyiségének használatával valósítható meg, azonban a nagy felesleg elkerülhetetlenné teszi az oldallánc-funkciós csoportok védelmét.

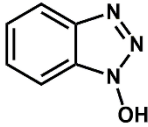
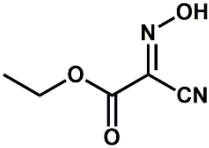
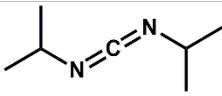
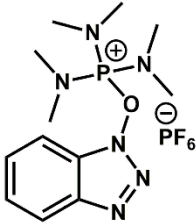
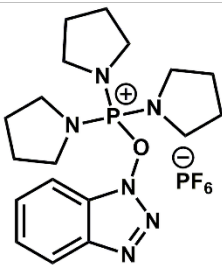
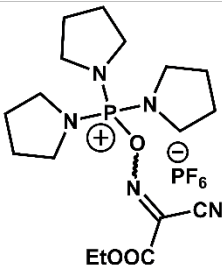


42. ábra Fmoc-védett aminosav *in situ* kapcsolása az épülő peptidlánchoz DIC és HOBt reagensekkel

Az aminosavak kapcsolásához aktiváló és kapcsoló reagenseket használnak, melyek aktiválják az aminosav karboxilcsoportját, elősegítve ezzel a peptidkötés létrejöttét (42. ábra). A reakcióelegyben így az aminosav aktív észtere keletkezik, amely *in situ* elreagál az épülő

peptidlánc szabad aminoszortjával.^{187,188} Az általam végzett peptidszintézisek során alkalmazott aktiváló és kapcsoló reagenseket az 15. táblázat foglaltam össze.

15. táblázat A peptidszintézisek során az általam használt aktiváló és kapcsoló reagensek

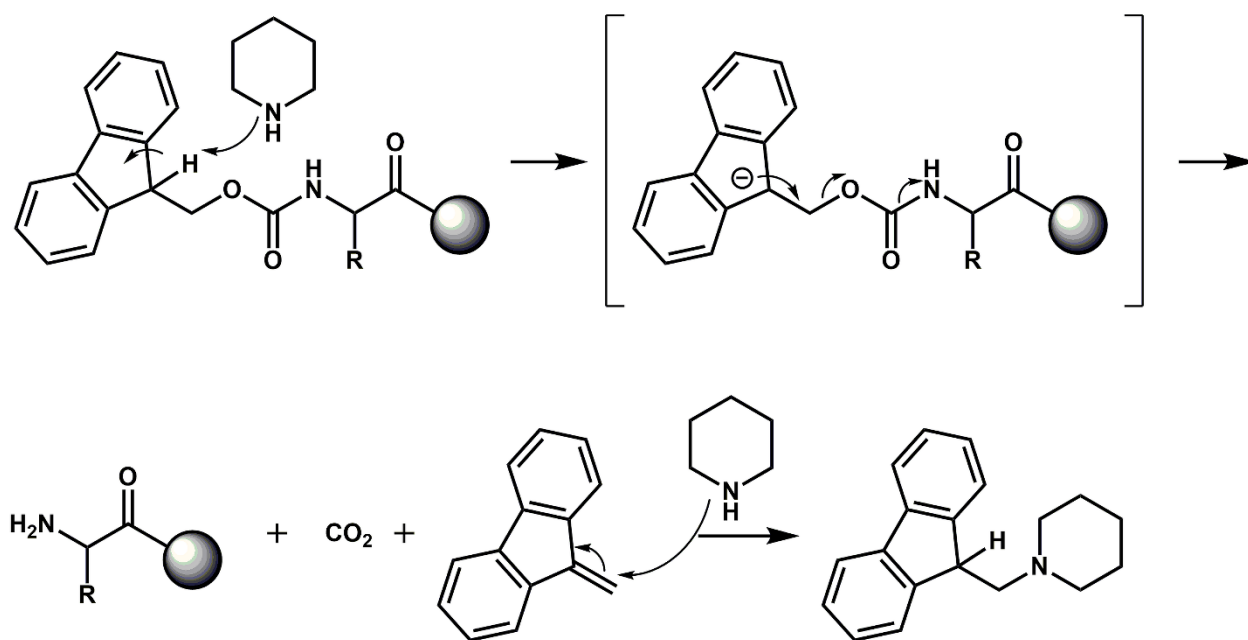
aktiváló reagensek	rövidítés	képlet
1-hidroxi-benzotriazol	HOBt	
etil-2-ciano-2-(hidroxi-imino)-acetát	Oxyma Pure	
<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid	DIC	
(benzotriazol-1-il-oxi)- tris(dimetilamino)-foszfónium hexafluoro-foszfát	BOP	
(benzotriazol-1-il-oxi)- tris(pirrolidino)-foszfónium hexafluoro-foszfát	PyBOP	
[(1-ciano-2-etoxi-2- oxoetilidén)amino]- oxitrisz(pirrolidino)- foszfónium hexafluoro-foszfát	PyOxim	

A szilárdfázisú peptidszintézisnek két általánosan használt stratégiáját különíthetjük el:

- Boc/Bzl stratégia: A módszer során az α -aminocsoportot *tert*-butiloxikarbonil-csoporttal, míg az oldallánc funkciós csoportokat főleg benzil-típusú csoportokkal védik.
- Fmoc/*t*Bu stratégia: az α -aminocsoport védelmét 9-fluorenil-metiloxikarbonil-csoport, az oldalláncok funkciós csoportjait pedig főleg *tert*-butil-típusú védőcsoportokkal látják el.¹⁸⁹

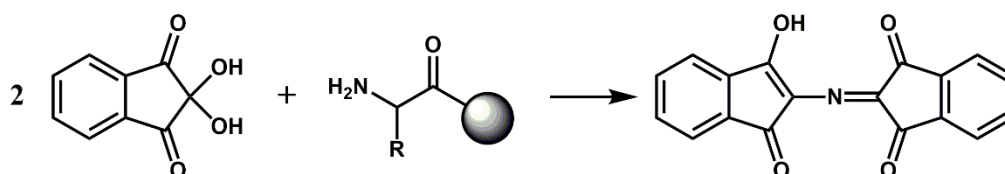
A Boc/Bzl stratégia alkalmas például könnyen aggregálódó peptidok szintézisére, mivel a trifluor-ecetsavas hasítás során az aggregátumok szétesnek, míg az Fmoc/*t*Bu módszer alkalmazása esetén a savakra érzékeny aminosavak (Trp, Met, Cys, Tyr) oxidációja és alkileződése elkerülhető. Ezek alapján az alkalmazott stratégiát a szintetizálandó peptid szekvenciája határozza meg, de természetesen a rendelkezésre álló eszközök (pl. HF készülék) megléte vagy hiánya is befolyásolhatja. Munkám során a peptidok előállításához az Fmoc/*t*Bu stratégiát alkalmaztam.

Az α -aminocsoportot védő Fmoc-csoport savakkal szemben stabil, de bázisokra érzékeny. Hasítása általában 20 – 55 tf%-os piperidin/DMF oldattal történik, ekkor dibenzofulvén keletkezik. Ez az átmeneti termék igen reaktív, de a piperidinnel stabil adduktot képez (43. ábra), így elkerülhető az érzékeny aminosavakon az alkilezési mellékreakciók. Kísérletek igazolták, hogy 2% piperidint és 2% 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undek-7-ént (DBU) tartalmazó DMF oldat gyorsan és hatékonyan lehasítja az átmeneti védőcsoportot. Ezzel a módszerrel térbeli gátlás esetén is sikerül a hasítás, illetve csökkenti az racemizáció valószínűségét.¹⁹⁰



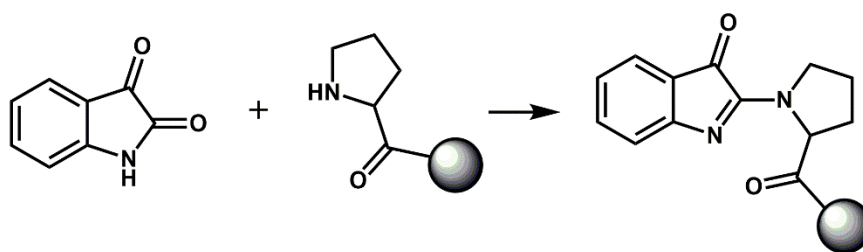
43. ábra Fmoc-védőcsoport hasítása piperidinnel

A hiányos szekvenciák elkerülése érdekében a szintézis során követni kell az egyes reakciók sikerességét. Az elreagálatlan, szabad aminos csoportokat tartalmazó peptidek reagálnak ninhidrinnel és jellegzetes kék színt mutatnak. Ez a Kaiser-teszt (44. ábra), mely során a gyantaszemekhez ninhidrin-, KCN- és fenol-oldatot adnak, majd 4-5 percen keresztül 104 °C-on tartják. Ha az oldat színe nem változik, vagyis sárga marad, akkor az a szabad aminos csoportok hiányát jelzi, tehát a kapcsolás (közel) kvantitatívan lejátszódott. Ha a gyantaszemek kékké válnak, akkor újrakapcsolásra, vagyis az aminosav-származék kapcsolásának megismétlésére van szükség. A teszt nagyon érzékeny, már 1% szabad aminos csoport jelenléte is intenzív kék színt ad.¹⁹¹ Azonban, Fmoc/*t*Bu stratégia esetén – az aminosav-származéktól függően – néha csak barnás színeződés figyelhető meg.



44. ábra Szabad aminos csoport kimutatása Kaiser-teszttel

A prolin egy szekunder aminos csoportot tartalmazó aminosav, mely szintén reagál ninhidrinnel, de az oldat színe nem változik még szabad szekunder aminos csoport esetén sem, ezért izatint (2,3-indolin-dion) is kell a reakcióelegyhez adni (45. ábra). Ekkor sikertelen kapcsolás esetén a gyantaszemek vöröses - sötétbarnás színűek lesznek.¹⁹²



45. ábra Szabad szekunder aminos csoport reakciója izatinnal

A teljes peptidlánc megépítése után az állandó oldallánc védőcsoportokat a gyantáról való hasítás során távolítják el. A hasítás 80 – 95%-os TFA oldattal történik, a keletkező reaktív karbokationok miatt pedig kationfogókat kell használni. A *tert*-butil kation legjobb semlegesítője a víz, a többi oldallánc védőcsoport befogására más kationfogókat, pl. TIS, tioanizol, etánditiol is a hasítóelegyhez kell adni. Megfelelő gyanta (pl. 2-klórtritol¹⁹³ vagy SASRIN¹⁹⁴ gyanták)

alkalmazása esetén védett peptidok is előállíthatók. Ezekről a gyantákról igen enyhe savas körülmények között (ecetsav/diklórmetán vagy hexafluoro-2-propanol/diklórmetán elegyekkel) is hasítható a peptid az alkalmazott védőcsoportok lehasadása nélkül.

Szabad peptidok előállítására számos polisztirol-1,4-divinilbenzol (1%) kopolimer-alapú gyanta áll rendelkezésre, melyeket különféle linkerekkel módosítottak a savérzékenység fokozása érdekében. A C-terminálison karboxil véget eredményez a Wang¹⁹⁵, a SASRIN és a 2-klórtritol gyanta, míg amid végű peptidok előállításához a Rink Amid típusú gyanták alkalmazhatók.¹⁹⁶ Ezeknek a gyantáknak a polietilén-glikol-alapú változata is ismert (ChemMatrix típusú gyanták¹⁹⁷), melyek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, mint a kitűnő nyomásstabilitás és a kiváló duzzadási képesség, még vizes oldatban is. Általában alacsony a gyantakapacitásuk (0,2 – 0,6 mmol/g), így alkalmasak aggregálódó vagy nehezen szintetizálható, hosszabb peptidok előállítására, fragmenskondenzációra, illetve gyantán történő ciklizálásra is.

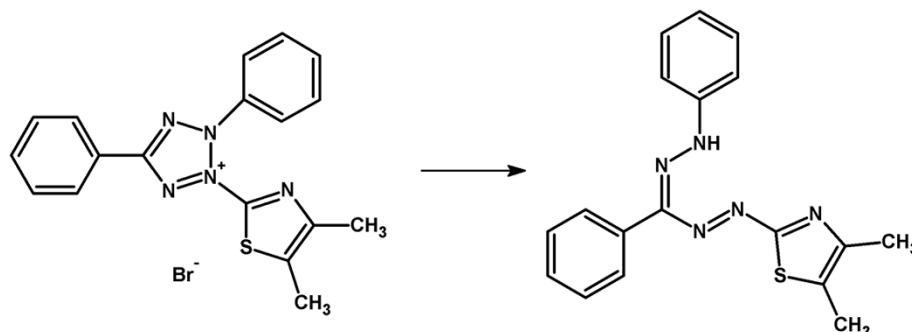
A peptidokat a gyantáról való hasítás és megfelelő tisztítási lépések után oldatfázisú reakciókban tovább reagáltathatjuk ezáltal bonyolultabb szerkezetek és különböző biokonjugátumok is előállíthatók.

5.2 Az *in vitro* biológiai vizsgálatok alapjai

5.2.1 *In vitro* sejt viabilitás vizsgálat

5.2.1.1 MTT-teszt

Az MTT-teszt az élő sejtek mitokondriális aktivitását mutatja ki és teszi kolorimetriásan mérhetővé. Az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid) egy vízoldható tetrazólium só, amit a mitokondriumban található dehidrogenáz enzimek redukcióval egy formazán származékká (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazánná) alakítanak (46. ábra). Ez a vízben nem oldódó lila kristályos anyag DMSO-ban feloldva kolorimetriásan vizsgálható, mennyisége pedig arányos az élő sejtek számával.



46. ábra Az MTT átalakulása az élő sejt mitokondriumában a dehidrogenáz enzim hatására

A citosztázis vagy citotoxicitás mértékét (%) az 540 nm-en mért abszorbancia értékek alapján (a 620 nm-en mért háttér értékével történő korrekció után) a következő képlettel határozhatjuk meg:

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

ahol $A_{\text{kezelt sejtek}}$ a kezelt sejtek, míg $A_{\text{kontroll sejtek}}$ a kontroll sejtek esetében mért abszorbancia. Ha a tesztet egy kémiai anyag esetén különböző koncentrációkban elvégezzük, akkor a citosztázis / citotoxicitás mértékét a koncentráció függvényében ábrázolva a kapott görbe segítségével meghatározható az a koncentráció érték, amely a sejtek felét gátolja az osztódásban (citosztázis) vagy a sejtek felének pusztulását okozza (citotoxicitás). Ez az érték az ún. IC_{50} . Minél kisebb ez az érték, annál nagyobb a vizsgált komponens citosztatikus vagy citotoxikus aktivitása.

5.2.1.2 Impedimetriás vizsgálat

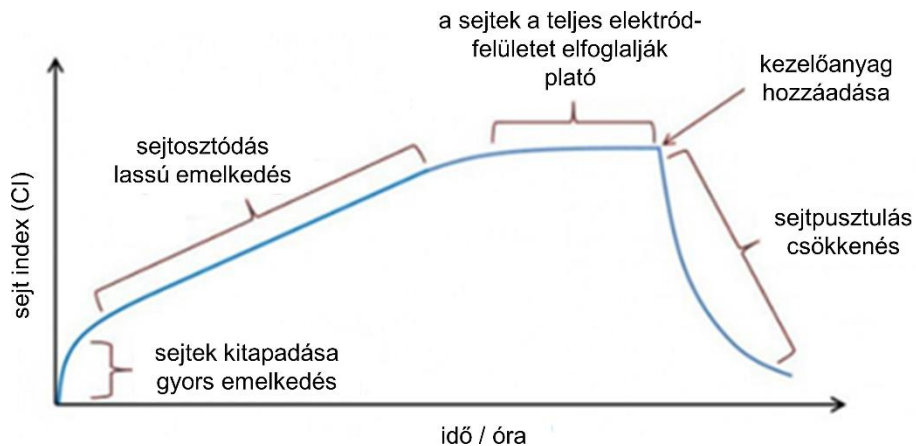
Az *in vitro* sejt viabilitás vizsgálatok külön jelző molekula hozzáadását nem igénylő, valós időben információt nyújtó berendezéssel, az xCELLigence SP rendszerrel (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) is történhetnek. Ez az eszköz megteremti annak a lehetőségét, hogy valós időben mérjük a sejtek adhézióját, szaporodását és a sejt morfológiai változásokat.

Egy 96 lyukú speciális lemez (E-Plate[®]) mélyedéseinek (well) alján aranyelektrodok találhatóak, melyek a felület 70-80 %-át fedik le. Az elektrodokon bekövetkező impedancia változást (váltakozó áramú ellenállást) regisztrálja a műszer, melyeket az RTCA 2.0 szoftver a következő egyenlet szerint számít át sejt indexre (CI):

$$CI = \frac{Z_i - Z_0}{F},$$

ahol Z_i a mérés egy adott idő pillanatában mért impedancia érték, Z_0 a mérés megkezdésekor mért impedancia érték, F pedig az alkalmazott frekvenciától függő konstans érték (ami az általunk végzett mérések során $F_{10\text{ kHz}} = 15$ volt).

Ahogy a sejtek kitapadnak és osztódnak, úgy növekszik fokozatosan az arany elektródokon az impedancia értéke. Az apoptotikus vagy elpusztult sejt lekerekedik és fragmentálódhat, így az impedancia érték csökken, ami a sejt index csökkenésben nyilvánul meg. Ez látható a 47. ábra.

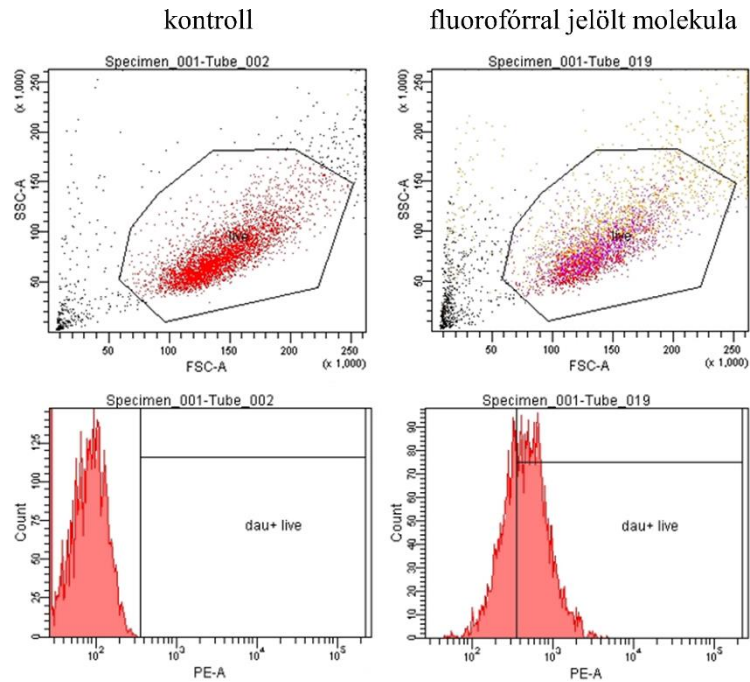


47. ábra Egy tipikus impedimetriás mérés

5.2.2 *In vitro* sejtbejutási vizsgálat áramlási citométerrel

Az áramlási citometria fluoreszcensen jelölt sejtek különböző jellemzőinek (sejtszám, méret, granuláltság, fluoreszcencia intenzitás) egymás melletti vizsgálatát teszi lehetővé. A sejteket szuszpenzió formájában mérjük, melyek a gerjesztő lézer előtt egyenként haladnak el. A fény a sejteken szóródik, az előre irányuló fényszórás (FSC) a sejt méretéről, míg az oldalra irányuló fényszórás (SSC) a granuláltságról ad információt. Ha jelen van olyan fluorofór, amelyet az adott gerjesztő lézer képes gerjeszteni, akkor emisszió is végbemegy a fluorofórra jellemző hullámhosszon.

Sejtbejutási vizsgálatoknál minden esetben szükség van egy fluorofórra, mely az én esetemben maga a konjugált hatóanyag, a daunomicin volt. Ennek a hatóanyagnak a saját fluoreszcenciája (további jelölés nélkül) közvetlenül felhasználható a mérésekben. A vizsgálatok során a detektálást $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm és $\lambda_{\text{em}} = 571$ nm hullámhosszakon (FL2-csatorna) végeztük. A kiértékeléshez a méret-granuláltság és a sejtszám-fluoreszcencia intenzitás grafikonokat használtuk fel, amelyekre egy példa a 48. ábra látható.



48. ábra Méret-granuláltság és a sejtszám-fluoreszcencia intenzitás grafikonok

A méret-granuláltság grafikonon kapuzással elkülöníthetők az élő sejtek, így információt kaphatunk arról, hogy a kísérlet folyamán a konjugátumnak van-e citotoxikus hatása. A sejtszám-fluoreszcencia intenzitás grafikonnál egy intenzitás küszöböt állapítunk meg, mely a kontroll sejtek esetén mért legnagyobb fluoreszcencia intenzitás. Az ennél a küszöbértéknél magasabb intenzitás értéket mutató sejteket tekintjük Dau pozitívnak. Ezáltal ebből a grafikonból kinyerhetők a tényleges sejtbejutásra vonatkozó információk, úgymint a daunomicin pozitív sejtek aránya és az átlagos fluoreszcencia-intenzitás.

6 Kísérleti rész

6.1 Felhasznált anyagok

Minden felhasznált aminosav-származékot, a gyantákat (Fmoc-Rink Amid MBHA gyanta, Wang gyanta), az *N,N'*-diizopropil-karbodiimidet (DIC) és a trifluoecetsavat az Iris Biotech GmbH-től (Marktredwitz, Németország) szereztük be. Az 1-hidroxi-benzotriazol hidrátot (HOBt), Boc-aminooxiecetsavat (Boc-Aoa-OH), 4-dimetilamino-piridint (DMAP), triizopropilszilánt (TIS), diizopropil-etilamint (DIPEA), vajsav-anhidridet, hidrazin-hidrátot és a protoporfirin IX-et (PpIX) a Sigma Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) vettük. Az aminooxiecetsavat (H-Aoa-OH·1/2HCl), *O*-metil-hidroxil-amin hidrokloridot és az 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-ént (DBU) a TCI Europe N.V.-től (Zwijndrecht, Belgium), a (benzotriazol-1-il-oxi)-trisz(pirrolidino)-foszfónium hexafluoro-foszfát (PyBOP) és a (benzotriazol-1-il-oxi)-trisz(dimetilamino)-foszfónium hexafluoro-foszfát (BOP) a Bachem AG-től (Bubendorf, Svájc), az etil-2-ciano-2-(hidroxil-imino)-acetát (Oxyma Pure) aktiváló reagenst a Novabiochem-től (Darmstadt, Németország), míg a piperidint a Molar Chemicals Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A metoxi-poli(etilén glikol) amint (amin-PEG; MW: 1000) az Alfa Aesar / Thermo Fisher Scientific-től (Ward Hill, MA, USA) vettük.

A daunomicin hidroklorid az IVAX (Budapest, Magyarország), az [(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidén)amino]-oxitrisz(pirrolidino)-foszfónium hexafluoro-foszfát (PyOxim) pedig a Luxembourg Bio Technologies (Ness Ziona, Izrael) ajándéka volt. Az amin-monofunkciós hiperelágazásos poliglicidolt (HbPG; MW: 1230, PDI: 1,3) az együttműködő partner (TTK AKI) biztosította.¹⁶³

A szintézis és tisztítás során használt oldószereket (*N,N*-dimetil-formamid (DMF), diklórmetán (DCM), metanol, etanol, dietil-éter, acetonitril, aceton, dioxán), illetve a pufferekhez felhasznált sókat (ammónium acetát, trisz-(hidroximetil)-amino-metán (Tris)) mind a VWR International Kft-től (Debrecen, Magyarország) szereztük be.

A hangyasav 2,4,6-triklórfenil-észtert (For-OTcp) hangyasav, triklórfenol és *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid (DCC) (Sigma termékek) reakciójából, míg az izopropilidén védett aminooxiecetsavat aminooxiecetsav és aceton reakciójával állítottam elő.¹⁷⁸

A tömegspektrometriás mérések során felhasznált oldószerek és sók (NH₄OAc, NH₄HCO₃) a Sigma Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) kerültek beszerzésre, ezek minden esetben

analitikai vagy az elérhető legmagasabb tisztaságúak voltak. A mintaelőkészítéshez minden esetben kétszer desztillált vizet használtunk.

6.2 Peptidszintézis

A dolgozatomban szereplő peptideket manuálisan, szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő az alábbi protokollt (16. táblázat) követve.

16. táblázat Fmoc/^tBu stratégia általános protokollja

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

Az ettől eltérő megoldásokat az adott peptid szintézisének leírásánál külön jelölöm.

A Kaiser-teszt esetén a gyantaszemekhez pár csepp ninhidrin (2,5 g ninhidrin 50 ml absz. EtOH-ban oldva), fenol (40 g fenol 10 ml absz. EtOH-ban oldva), és KCN (1 ml 0,01 M-os KCN oldat 50 ml piridinnel hígítva) oldatot adtam – Pro utáni aminosav sikeres kapcsolásának ellenőrzésére izatint (3% izatin + 5% Boc-Phe-OH benzilalkoholban oldva) is tettem az elegybe.

6.3 Tisztítás és analízis

A peptideket és konjugátumokat KNAUER RP-HPLC rendszerrel (Knauer GmbH, Bad Homburg, Németország; 2 db K120 típusú pumpa, nagynyomású keverőegység, K2501 típusú monokromátoros UV-detektor, adatgyűjtő egység) tisztítottam. A nyers peptidek és a konjugálási reakciók tisztításához egy preparatív Phenomenex (Torrence, CA, USA) Luna C18 (10 μ m, 100 Å, 250 \times 21,2 mm) típusú oszlopot, míg a konjugátumok végső tisztításához egy Phenomenex Luna C18 (10 μ m, 100 Å, 250 \times 10,0 mm) vagy Phenomenex Jupiter C4 (10 μ m, 300 Å, 250 \times 10,0 mm) oszlopot használtam. A preparatív elválasztások során 15 mL/perc, míg a szemipreparatív tisztítás esetén 4 mL/perc áramlási sebességet használtam. Az elválasztáshoz minden esetben a peptid vagy konjugátum minőségétől függő gradiens elúciót alkalmaztam, az UV detektálás $\lambda=220$ nm vagy $\lambda=280$ nm hullámhosszon történt, az anyag szerkezetétől függően.

Az alkalmazott eluensek: A eluens: 0,1% TFA/desztillált víz

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

A tisztított peptidek és konjugátumok analitikai vizsgálatához szintén egy KNAUER RP-HPLC rendszert használtam. Az analitikai kromatogramokat $\lambda=220$ nm detektálási hullámhosszon, 1 mL/perc áramlási sebességgel vettem fel, és minden esetben gradiens elúciót (0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B vagy 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 50 perc 90% B) és a korábban bemutatott eluenseket használtam. Az alkalmazott oszlopot az egyes anyagok analízis körülményei között tüntettem fel.

A tömegspektrometriás mérések egy részéhez elektropray ionizációs (ESI-MS) Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus (Bréma, Németország) típusú ioncsapdás készüléket használtam. A termékeket 0,1% ecetsavat tartalmazó acetonitril-víz (1:1, V/V) elegyében oldottam, majd a spektrumokat folyamatos mintaadagolás mellett (10 $\mu\text{L}/\text{perc}$ sebességgel) 50-2000 m/z tartományban, pozitív üzemmódban vettem fel. A spektrumok kiértékelése a Bruker Compass DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonic GmbH, Bréma, Németország) programmal történt.

A tömegspektrometriás mérések másik részéhez elektropray ionizációs Q Exactive Focus hibrid kvadrupol-orbitrap tömegspektrométert (Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország) használtam. A mintákat 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril-víz (1:1, V/V) elegyben oldottam, majd a nagy felbontású spektrumokat folyamatos mintaadagolás mellett (0,05 mL/perc) 200-1800 m/z tartományban, pozitív üzemmódban vettem fel. Az adatokat az Xcalibur program (Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország) segítségével elemeztem.

6.4 Az irányító peptidek vizsgálata GnRH-PpIX konjugátumokban

6.4.1 *Ex vivo* GnRH-R vizsgálatok: immunhisztokémia szövettani mintákon

Összesen 60, korábban nem kezelt fej-nyaki tumorral rendelkező beteget vizsgáltunk, akiket 2012 és 2014 között a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikáján szájgarat, gége és gégei garat karcinómával diagnosztizáltak (17. táblázat). Minden beteg beleegyezett a vizsgálatba, a vizsgálatokat a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük, és a Semmelweis Egyetem etikai bizottsága jóváhagyta a kísérletek elvégzését (etikai engedély szám: 105/2014).

17. táblázat A betegek jellemzői a diagnózis időpontjában

	Betegek száma
Összes beteg szám	60
Nem	
Férfi	51
Nő	9
Kor (év)	
Átlag	58.45 (41-77)
Lokalizáció	
Szájgarat	19
Gége	24
Gégei garat	16
Nyelv	1
TNM ¹ stádium	
I	6
II	11
III	15
IV A	20
IV B	3
IV C	5

¹ TNM: tumor, csomó és metasztázis,

A 2 mm átmérőjű formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövethengereket tartalmazó szöveti microarray (TMA) blokkokat TMA Master (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) műszerrel készítettük. Minden beteg esetén 3-5 szövethenger kiszúrása történt párhuzamosan, ezzel biztosítva az inhomogén minták minél pontosabb reprezentációját. A párhuzamos minták értékelésekor mindig a legmagasabb csoportbeosztást vettük figyelembe. Az elkészült blokkokból

4 µm vastag metszetek készültek, melyeket hematoxin-eozinnal (H&E festék) és GnRH receptor antitesttel (GnRH Polyclonal Antibody, Proteintech, Manchester, UK) festettünk.¹⁹⁸

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a TMA metszeten deparaffinálás és rehidratálás után végeztük el. A mintákat Tris-EDTA pufferben (pH 9,0) 58 percen át forraltuk, majd a peroxidáz aktivitást 3% H₂O₂ / metanol segítségével blokkoltuk (15 perc). Ezután a mintákat 15 percig 3% BSA-t és Tween-20-at tartalmazó 0,1 M Tris-pufferben (pH 7,4) (TBST) áztattuk, majd 16 órán keresztül a primer antitesttel (hígítás: 1: 100), végül pedig 40 percig HISTOLS-MR-T HRP polimer reagenssel inkubáltuk. A mintákat minden inkubálási lépés után 10 percig TBST oldattal mostuk. A peroxidáz aktivitást DAB Quanto (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) alkalmazásával, a sejtmagot pedig hematoxin-eozin felhasználásával festettük. A megfestett lemezeket Panoramic Scan készülékkel (3DHISTECH Kft, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk. A szövettani kiértékelést és az immunfestődés pontozását két független értékelő készítette el a Panoramic Viewer szoftver segítségével.

Három fokozatú pontozási rendszert alkalmaztunk a GnRH-R fehérje expressziójának kiértékelésére.^{199,200} Ennek során a festett sejtek százalékát megszoroztuk a festés intenzitásával (melyet négy osztályba soroltunk: 1 – negatív; 2 – gyenge; 3 – közepes; 4 – intenzív), ami így 0 és 400 közötti értéket eredményezett. A 0-200 közötti ponttal rendelkező mintákat alacsony, 201-300 között közepes, míg 301-400 között intenzív fehérje expressziót mutatónak tekintettük. A statisztikai elemzéshez a pontszámokat különféle küszöbértékek mentén dichotomizáltuk. A legjobban reprodukálható variációt akkor kaptuk, ha az 1-es és 2-es csoportot együttesen alacsony (tehát *negatív*), míg a 3-as csoportot magas (azaz *pozitív*) fehérje expresszióval rendelkezőnek tekintettük.

A betegek adatainak statisztikai elemzését a Statistica 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) program segítségével végeztük. A diszkrét változók közötti korrelációk vizsgálatára Pearson-féle χ^2 -próbát és a Fisher egzakt tesztet használtuk. A túlélési analízisnél a Kaplan-Meier becslést, illetve egy- és többváltozós regressziót alkalmaztunk. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az elemzés során a daganat lokalizációját, méretét, a stádiumot, a nyirokcsomó áttétet, a túlélést és a progressziót vettük figyelembe.

6.4.2 GnRH származékok szintézise

A peptideket minden esetben Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán (gyantakapacitás: 0,69 mmol/g gyanta) szintetizáltam. Az Fmoc-csoport eltávolításához a 2% piperidin + 2% DBU / DMF hasító elegyet használtam, az aminosavak kapcsolásához pedig DIC-et és HOBt-t (gyantakapacításra számolt 3-3 ekvivalens) alkalmaztam. A peptideket a gyantáról 95% TFA, 2,5% TIS és 2,5% desztillált víz elegyével hasítottam, a reakcióelegyeket 15 percig 0 °C-on, majd 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetem. A hasítás után az elegyet tízszeres feleslegű 0 °C-ra hűtött éterbe szűrtem, majd a kicsapódott peptideket 5 percig 4400 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam (Eppendorf 5702 centrifuga, Hamburg, Németország). Az étert dekantáltam, majd a kiülepedett terméket még kétszer, az előzőekkel azonos módon, hideg éterrel mostam. A nyers peptideket acetonitril és desztillált víz keverékében oldottam, majd liofilizáltam. A nyers peptideket RP-HPLC segítségével tisztítottam, a termékeket tömegspektrometria segítségével azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (Macherey-Nagel (Düren, Németország) Nucleosil C18 oszlop (5 µm, 100 Å, 250 × 4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B).

6.4.2.1 GnRH-I[⁶D-Lys] előállítása (1)

A hatos pozícióban *D*-lizinnel módosított GnRH-I (<EHWSYkLRPG-NH₂) analóg előállításához a következő aminosav-származékokat használtam: piroglutaminsav, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Pro-OH és Fmoc-Gly-OH. A szintézis befejezése után a decapeptidet a fentebb leírt eljárással hasítottam a gyantáról, majd tisztítottam és azonosítottam.

6.4.2.2 GnRH-I[⁴Lys(Bu),⁶D-Lys] és GnRH-II[⁴Lys(Bu),⁶D-Lys] előállítása (2 és 3)

A négyes helyzetben vajsavval módosított lizint és a hatos pozícióban *D*-lizint tartalmazó GnRH-I (<EHWK(Bu)YkLRPG-NH₂) és GnRH-II (<EHWK(Bu)HkWYPG-NH₂) analógokat az előzőhöz hasonló módon állítottam elő, azonban a szerin helyett Fmoc-Lys(Dde)-OH származékot építettem be a szekvenciába. A peptidgerinc megépítése után a Dde csoportot a gyantán szelektíven 2% N₂H₄·H₂O / DMF eleggyel hasítottam (8 x 5 perc), majd vajsav-anhidriddel acileztem a lizin ε-aminocsoportját DIPEA jelenlétében (3-3 ekv. a gyantakapacításra számolva) DMF oldószerben (2 óra, szobahőmérséklet). Ezután a peptideket hasítottam a gyantáról, majd tisztítottam és azonosítottam.

6.4.2.3 GnRH-III[⁴Lys(Bu),⁶Asp(OMe)] előállítása (4)

A négyes helyzetben Lys(Bu)-t és a hatos pozícióban aszparaginsav-metilésztert tartalmazó GnRH-III (<EHWK(Bu)HD(OMe)WKPG-NH₂) származék előállítása a többi GnRH analóggal azonos módon történt. Mivel a metil-észter védőcsoport bázikus körülmények között nem stabil, ezért a négyes pozícióba Fmoc-Lys(Mtt)-OH védett aminosavat építettem be, továbbá az Fmoc-Asp(OMe)-OH beépítése után az Fmoc hasítóelegyet 2% piperidin + 2% DBU + 0,1 M HOBT / DMF elegyre cseréltem. A peptidgerinc megépítése után az Mtt védőcsoportot a gyantán szelektíven 2% TFA + 2% TIS / DCM eleggyel hasítottam (2 + 2 + 5 + 10 + 30 perc), majd vajsav-anhidriddel, a korábbiakban leírt módon acileztem a lizin ε-aminocsoportját. Ezután a peptidet hasítottam a gyantáról, majd tisztítottam és azonosítottam.

6.4.3 Peptid-Protoporfirin IX konjugátumok előállítása (5-8)

A peptideket, a PpIX-et és a PyBOP-ot (1:1:3 ekv.) DMF-ben feloldottam, majd az oldatokhoz DIPEA-t (6 ekv.) adtam. A reakcióelegyeket 16 órán keresztül, szobahőmérsékleten, fénytől védett körülmények között kevertettem. A konjugátumokat preparatív RP-HPLC-vel előtisztítottam, majd a finomtisztítást szemipreparatív RP-HPLC-vel (C4 oszlop) végeztem. A tisztítás során mindkét esetben 0,1% TFA / acetonitril tartalmú B eluentet használtam. A tiszta biokonjugátumokat tömegspektrometria segítségével azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (Macherey-Nagel (Düren, Németország) Nucleosil C18 oszlop (5 μm, 100 Å, 250 × 4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B).

6.4.4 Receptorkötődési vizsgálat

A szintetizált peptidek és konjugátumok receptorkötődési képességét ¹²⁵I-jelzett triptorelinnel ([¹²⁵I]-GnRH-I[⁶D-Trp]) való direkt leszorításos vizsgálat során határoztuk meg humán agyalapi mirigy és humán prosztata tumorszövet mintákon. Az egészséges humán agyalapi mirigy (elülső lebeny) szövet boncolásból, míg a prosztata tumorszövet minták sebészi beavatkozás során eltávolított szövetekből származnak. A mintagyűjtést és azok felhasználását a Debreceni Egyetem etikai bizottsága engedélyezte a vizsgálatainkhoz.

A GnRH analógok és GnRH-PpIX konjugátumok GnRH-R-I-hez való kötődési affinitását *in vitro* ligand kompetíciós assay segítségével határoztuk meg.^{20,23,72,73,168,201} Az assay alapja a [¹²⁵I]-[⁶D-Trp]-GnRH-I ligand specifikus kötődése a membrán asszociált GnRH receptorokhoz. Az 50-160 μg fehérje tartalmú membrán homogenizátumokat 60-80000 percenkénti beütésszámú (cpm)

radioizotóposan jelzett [¹²⁵I]-GnRH-I[⁶D-Trp] analóggal kezeltük, majd a kötési helyekről a nem radioaktív peptidekkel/konjugátumokkal növekvő koncentrációban (10^{-12} - 10^{-6} M) szorítottuk le. A kísérletet kétszer ismételtük meg, 150 µL össztérfogatú kötő pufferben. Az inkubáció után 125 µL szuszpenziót 1 mL 1,5% BSA-t tartalmazó jéghideg kötő puffer felszínére pipettáztunk, majd a mintákat centrifugáltuk (3 perc, 12.000x g, 4 °C). A felülúszót eltávolítottuk, és a visszamaradó pellet aktivitását gamma számláló (Micromedic System, Huntsville, AL, USA) segítségével mértük. A fehérjekoncentrációt Bio-Rad protein assay kittel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a kiértékelést pedig LIGAND-PC számítógépes görbe illesztési program segítségével végeztük.

6.4.5 UV-Vis spektroszkópia

A peptidekből és konjugátumokból 1% DMSO-t tartalmazó PBS:acetonitril (1:1, V/V) elegyben 50 µM koncentrációjú oldatokat készítettünk, majd az UV-Vis spektrumokat 200-800 nm között vettük fel egy BioTek Synergy 2 Multi-Mode Reader segítségével (BioTek, Winooski, VT, USA).

6.4.6 Detroit-562 sejtek fenntartása

A Detroit-562 humán garat tumorsejteket az Amerikai Sejtkultúra Gyűjteményből (Manassas, VA, USA) szereztük be. A sejtek kultúrában tartása és növesztése 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszféra mellett 10% magzati borjú szérumot (FBS) (Gibco®/Invitrogen Corporation, New York, NY, USA), 1% nátrium piruvátot és 1% MycoZap-et tartalmazó EMEM médiumban (mind Lonza Group Ltd., Bázél, Svájc) történt.

6.4.7 Konfokális lézer scanning mikroszkópia

A sejteket Ibidi® µ-Slide 8 lyukú mikroszkópos lemezre osztottuk (10^4 sejt / lyuk) 48 órával a kezelés előtt. Közvetlenül a kezelés előtt a sejteket 10 percig 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, majd PBS-sel (Gibco®/Invitrogen Corporation, New York, NY, USA) mostuk. A sejtek permeabilizálása során 0,1% (V/V) Triton X-100-t tartalmazó PBS oldatot használtunk 10 percig. Ezt a lépést a membrán GnRH-R vizsgálat esetén kihagytuk. Ezt követően a sejteket 30 percig 5% BSA (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA) tartalmú PBS oldattal blokkoltuk. PBS-sel való mosást követően a sejteket egy órát *h*GnRH-I-R primer antitesttel (Proteintech™, Rosemont, IL, USA) (hígítás: 1:100), majd újabb PBS oldattal való mosást követően egy órát Alexa Fluor 594 jelzett másodlagos antitesttel (Jackson ImmunoResearch Inc., Ely, UK) (hígítás: 1:300) inkubáltuk 25 °C-on. A sejtekhez hozzáadtuk a Draq5™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

fluoreszcens festék PBS-es oldatát (10 μ M, 10 perc), majd háromszor mostuk PBS-sel, végül pár csepp fedőmédiomot (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA) adtunk a sejtekhez. A felvételeket konfokális lézermikroszkóppal készítettük (Zeiss Confocal LSM 710, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország; objektív: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27; rés: 1 AU; lézer hullámhossz: 543 nm 10,0%, 633 nm 4,0%; detektálási hullámhossz: 602-631 nm, 676-758 nm). A felvételek további feldolgozása ZEN 2.5 szoftverrel (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) történt, az ábrák elkészítéséhez a CorelDRAW Graphics Suite 2019 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) szoftvercsomagot használtuk.

6.4.8 *In vitro* sejt viabilitási vizsgálatok

A sejteket 96 lyukú lemezre osztottuk (6 \cdot 10³ sejt / lyuk) 48 órával a kezelés előtt. A peptidekből és konjugátumokból DMSO-ban (5 mM) törzsoldatot készítettünk, majd a sejtek kezelését mind a peptidekkel (10 μ M), mind a konjugátumokkal (0,025-10 μ M) szérumentes EMEM médiumban, közvetlen fénytől védve végeztük. Minden hígítási pont esetén a DMSO végkoncentrációja 0,2% (V/V) volt, a kontroll sejteket pedig 0,2% DMSO-t tartalmazó médiummal kezeltük. Az 1, 3 vagy 5 órás kezelés után a sejtekről a kezelőszert eltávolítottuk, a sejteket médiummal mostuk, majd szérumot, valamint antibiotikumot tartalmazó EMEM médiumot adtunk hozzájuk. Közvetlenül ezután egy Oriol típusú 250 W-os kvarc volfrám halogén lámpával (Newport Corporation, CA, USA) 0, 2, 10 vagy 30 percig történő besugárzás után további 72 órán keresztül inkubáltuk. Végül MTT teszt (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) segítségével értékeltük ki a vegyületek sejt-életképességre gyakorolt hatását. A kezeléseket három párhuzamos mérésben végeztük és kétszer ismételtük meg.

Az *in vitro* sejt viabilitási adatok statisztikai kiértékelését t-próbával, a GraphPad Prism 8.2.0 program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) segítségével végeztük. A statisztikai szignifikanciát a Holm-Sidak módszer szerint határoztuk meg, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.5 A hatóanyagok számának és pozíciójának fontossága daunomicin-Angiopep-2 konjugátumokban

6.5.1 Angiopep-2 származékok szintézise

Az Angiopep-2 származékokat Wang gyantán (gyantakapacitás: 0,45 mmol/g gyanta) szintetizáltam Fmoc/'Bu stratégiát alkalmazva. Az első aminosav (Fmoc-Tyr('Bu)-OH; 2 ekvivalens a gyantakapacitásra nézve) felkapcsolását 2 órán keresztül DIC kapcsolóreagenssel DMAP (2:0,2 ekv.) jelenlétében végeztem. A többi aminosav kapcsolásához DIC-et és HOBt-t (gyantakapacitásra számolt 3-3 ekvivalens) alkalmaztam, a kapcsolási idő ezekben az esetekben már egy óra volt. Az Fmoc-csoport eltávolításához 2% piperidin + 2% DBU / DMF hasító elegyet használtam, majd ezt a második aszparagin (¹²Asn) felkapcsolása után 2% piperidin + 2% DBU + 0,1 M HOBt / DMF elegyre cseréltem.

A **9-16** konjugátumok előállításához a peptidek szintézise gyantaosztásos technikával történt. Az ötödik aminosavként felkapcsolt lizin (¹⁵Lys) esetén a szelektíven hasítható oldallánc védőcsoportot tartalmazó Fmoc-Lys(Mtt)-OH-t használtam. A kilencedik aminosav (¹¹Arg) felkapcsolása után a gyantát két részre osztottam (1:1 arányban), és az egyik feléhez (**9-11, 13**) Fmoc-Lys(Boc)-OH-t, míg a másik feléhez (**12, 14-16**) Fmoc-Lys(Dde)-OH-t kapcsoltam. Ezután a két gyantát párhuzamosan építettem az utolsóelőtti aminosavig. A tizennyolcadik aminosav (²Phe) beépítése után a gyantákat ismét ketté osztottam (1:1 arányban), és az *N*-terminálison szabad aminocsoportot tartalmazó szekvenciák esetén (**9, 10, 12, 14**) Boc-Thr('Bu)-OH-t, míg a többi esetben (**11, 13, 15, 16**) Fmoc-Thr('Bu)-OH aminosav-származékot kapcsoltam a peptidlánchoz. A peptidgerinc felépítése után a megfelelő *N*-terminális és/vagy lizin oldallánc védőcsoportokat szelektíven hasítottam. Az Fmoc védőcsoportot az addig alkalmazott 2% piperidin + 2% DBU + 0,1 M HOBt / DMF eleggyel, a Dde védőcsoportot 2% N₂H₄·H₂O / DMF eleggyel (8 x 5 perc), míg az Mtt védőcsoportot 1% TFA / DCM eleggyel (10 x 2 perc + 10 x 5 perc + 2 x 10 perc) távolítottam el. Ezután a Boc-védett aminosavakat (Boc-Aoa-OH) PyBOP kapcsolószerrel, Oxyma Pure és DIPEA jelenlétében (szabad aminocsoportra számolt 5:5:5:10 ekv.) kapcsoltam. A peptideket a gyantáról 95% TFA, 2,5% TIS és 2,5% desztillált víz eleggyel 10 ekvivalens szabad aminosav jelenlétében hasítottam, mely során a reakcióelegyeket 15 percig 0 °C-on, majd 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetem. A hasítás után az elegyet tízszeres feleslegű 0 °C-ra hűtött éterbe szűrtem, majd a kicsapódott peptideket 5 percig 4400 fordulat/perc sebességgel

centrifugáltam (Eppendorf 5702 centrifuga, Hamburg, Németország). Az étert dekantáltam, majd a kiülepedett terméket még kétszer, az fentebb leírtakkal azonos módon, hideg éterral mostam. A nyers peptideket acetonitril és desztillált víz keverékében oldottam, majd liofilizáltam. A nyers peptideket RP-HPLC segítségével tisztítottam, a termékeket tömegspektrometria segítségével azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (Macherey-Nagel (Düren, Németország) Nucleosil C18 oszlop (5 μm , 100 \AA , 250 \times 4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B).

A **13-16** konjugátumok előállításához szükséges peptidek szintézise során az Mtt és Dde védőcsoportok hasítása számos mellékterméket eredményezett, melyek tisztítása során elválasztási problémát tapasztaltam elsősorban a különböző számú hatóanyagot tartalmazó konjugátumok együtt eluálódása miatt (ld. 6. táblázat). Ezért ezeknek a peptideknek a szintézisét egyenként külön megismételtem, mely során a tizenötös pozícióban lévő lizin esetében a korábban alkalmazott Fmoc-Lys(Mtt)-OH helyett Fmoc-Lys(Boc)-OH (**15**) vagy Fmoc-Lys(Dde)-OH (**13**, **14**, **16**) aminosavakat használtam. A szintézis többi része a korábbiakkal megegyező módon végeztem. A változtatások után a kívánt tiszta származékok előállítása sikeres volt.

A **17-19** konjugátumokhoz tartozó peptidek szintézise az előzőekhez hasonló módon történt, azonban itt minden esetben a ^{15}Lys pozícióba Fmoc-Lys(Boc)-OH-t, a ^{10}Lys pozícióba Fmoc-Lys(Dde)-OH aminosavat, míg az ^1Thr pozícióba Boc-Thr(^tBu)-OH-t kapcsoltam. A peptidgerinc felépítése után a Dde oldallánc védőcsoportot lehasítottam (2% $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / DMF elegy; 8 x 5 perc), és az ϵ -aminocsoporthoz kapcsolódó első Fmoc-aminosavat PyOxim kapcsolószerrel DIPEA jelenlétében (5:5:10 ekv.) kapcsoltam. Az oldalláncokat Fmoc technikával építettem meg, majd utolsó egységként Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam minden származékhoz. A peptidek gyantáról való hasítása és feldolgozása a korábbiakban ismertetett módon történt.

6.5.2 Angiopep-2-daunomicin konjugátumok előállítása (10-19)

A tiszta peptidet tartalmazó HPLC frakciót közvetlenül, liofilizálás nélkül használtam fel a daunomicinhez való konjugálásához. Ehhez az oldószert rotációs vákuumbepárlóval koncentráltam, az Aoa-csoportokra számolva 1,5 ekvivalens daunomicin \cdot HCl-t adtam hozzá, majd ammónium-acetát pufferben (0,2 M, pH 5,1; 10 mg/mL peptid koncentráció) oldottam. A reakciókat szobahőmérsékleten 5-16 órán keresztül kevertettem, majd az így kapott konjugátumokat RP-HPLC-vel tisztítottam. A termékeket tömegspektrometria segítségével

azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (Macherey-Nagel (Düren, Németország) Nucleosil C18 oszlop (5 µm, 100 Å, 250 × 4,6 mm) vagy HiChrom (Lutterworth, UK) Vydac C4 oszlop (5 µm, 300 Å, 250 × 4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B).

6.5.3 U87 sejtek fenntartása

Az U87 humán glioblastoma sejtek tenyésztése 37 °C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában, 10% magzati borjú szérumot (FBS), 2 mM L-glutamint, 50 µg/mL penicillin/streptomycint tartalmazó RPMI-1640 médiumban (mind Lonza Group Ltd., Bázél, Svájc) történt.

6.5.4 *In vitro* sejt viabilitási vizsgálatok

A sejteket a kezelést megelőző napon 96 lyukú lemezre (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) osztottuk komplett médiumban ($5 \cdot 10^3$ sejt / lyuk). Az előállított hatóanyagot nem tartalmazó peptidből (**9**) és a konjugátumokból (**10-19**) 1% (V/V) DMSO tartalmú szérummentes médiumban törzsoldatot készítettünk (100 µM), majd a sejteket 24 órán keresztül kezeltük a vegyületekkel (0,05-50 µM). A kontroll sejteket 1% (V/V) DMSO-t tartalmazó szérummentes médiummal kezeltük. Az inkubációs idő lejárta után a sejtekről eltávolítottuk a kezelő oldatot, minden lyukat kétszer szérummentes médiummal mostunk, majd szérum tartalmú RPMI-1640 médium hozzáadása után a sejteket további 48 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően MTT-teszttel értékeltük ki a vegyületek sejt viabilitásra gyakorolt hatását, mely során az abszorbanciát egy ELISAreader (Labsystems MS Reader, Finnország) segítségével határoztuk meg. Az ebből számolt értékeket a koncentráció függvényében OriginPro8 program (OriginLab Co., Northampton, MA, USA) segítségével ábrázoltunk, majd a pontokra szigmoid görbét illesztettünk. Az illesztett görbe $y = 50\%$ értéke közvetlenül megadja az IC₅₀ értéket. A kezeléseket négy párhuzamos mérésben végeztük és legalább kétszer megismételtük.

6.5.5 *In vitro* sejtbejutási vizsgálatok

A sejteket a kezelést megelőző napon 24 lyukú lemezre osztottuk ($5 \cdot 10^4$ sejt / lyuk). A konjugátumokból (**10-19**) 1% (V/V) DMSO tartalmú szérummentes médiumban törzsoldatot készítettünk (100 µM), majd a sejteket 2, 10 és 50 µM koncentrációjú oldatokkal egy órán keresztül kezeltük. A kontroll sejtek kezelése szérummentes médiummal történt. Ezután a kezelő oldatot eltávolítottuk és a sejteket HPMI oldattal (pH=7,4) mostuk. A sejteket 10 percig 37 °C-on tripszin

oldattal inkubáltuk, majd az enzimet 10% FBS-t tartalmazó HPMI oldattal inaktiváltuk. A lyukak tartalmát FACS-csővekbe pipettáztuk, a sejteket centrifugáltuk (5 perc, 1000 fordulat/perc), majd eltávolítottuk a felülúszót és a sejteket friss HPMI oldatban szuszpendáltuk. A konjugátumok sejtbejutásának mértékét egy BD LSR II áramlási citométerrel (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) vizsgáltuk, és FACSDiva szoftvert (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) használtunk a kiértékeléshez. A kezeléseket két párhuzamos mérésben végeztük és legalább kétszer megismételtük.

6.5.6 Stabilitás vizsgálat patkány máj lizoszóma preparátumban

A konjugátumokból desztillált vízben 2,5 µg/µL töménységű törzsoldatot készítettem, majd ezt 0,2 M nátrium acetát pufferrel (pH = 5,03) százszorosára hígítottam (25 pg/µL). A patkány máj lizoszóma preparátumot (16,6 µg/µL) ugyanezzel a pufferrel hússzorosára hígítottam, majd a két oldatot 1:1 (fehérje:peptid, m/m) arányban elegyítettem. Minden esetben kontroll méréseket is végeztem, ekkor a lizoszóma preparátum helyett puffert adtam az elegyhez. Az oldatokat 37 °C-on, 600 rpm kevertetés mellett fűthető rázótermosztátban (ThermoMixer, Eppendorf AG, Hamburg, Németország) inkubáltam, majd 5 perc, 1, 6, 24 és 72 óra elteltével 50 µL térfogatú mintákat vettem. A kivett mintákhoz 5 µL hangyasavat adtam, mely leállította a degradációs reakciót, és a mintákat az analízisig fagyasztva tároltam.

A minták HPLC-MS vizsgálatát egy Dionex 3000 HPLC - Q Exactive Focus hibrid kvadrupol-orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország) végeztem. Az elválasztáshoz Supelco (Merck, Darmstadt, Németország) Ascentis C18 oszlopot (3 µm, 100 Å, 150 × 2,1 mm) és gradiens elúciót (0 perc 2% B, 1 perc 2% B, 17 perc 90% B; A eluens: 0,1% hangyasav/desztillált víz, B eluens: 0,1% hangyasav/acetonitril + desztillált víz (80:20, V/V), 0,2 mL/perc áramlási sebesség, 40 °C) használtam, és a nagy felbontású tömegspektrumokat 200-1800 *m/z* tartományban vettem fel. Az adatokat az Xcalibur program (Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország) segítségével elemeztem.

6.6 EGFR célzó hatóanyag-peptid konjugátumok oldhatóság növelése hidrofil polimerekkel

6.6.1 EGFR irányító peptidek szintézise

A GE11 és D4 peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel manuálisan Fmoc/^tBu stratégiát alkalmazva szintetizáltam. Az Fmoc-csoport eltávolításához 2% piperidin + 2% DBU / DMF hasító elegyet, az Fmoc-aminosav-származékok kapcsolásához DIC-et és HOBt-t (gyantakapacitásra számolt 3-3 ekvivalens) használtam.

6.6.1.1 Peptidek szintézise a hatóanyag-peptid konjugátumokhoz

A peptidek szintézisét Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán (gyantakapacitás: 0,63 mmol/g gyanta) végeztem. A peptidgerinc megépítése után a kontroll peptideket (**20** és **24**) acetilezést követően hasítottam a gyantáról. A többi peptid esetében (**21-23** és **25-27**) egy Boc-Aoa-OH-t közvetlenül a peptidek *N*-terminálisához, vagy az *N*-terminálison felépített enzim-labilis spacerhez (GFLG vagy YRRL) kapcsoltam, majd az így kapott peptideket is hasítottam a gyantáról. A hasításhoz 95% TFA, 2,5% TIS és 2,5% desztillált víz elegyet használtam, illetve az aminosavtartalmú származékok esetében 10 ekvivalens szabad Aoa·1/2HCl-t is adtam a hasító elegyhez a nem kívánt oxim melléktermékek keletkezésének elkerülésére. A reakcióelegyet 15 percig 0 °C-on, majd 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetem. A hasítás után az elegyet tízszeres feleslegű 0 °C-ra hűtött éterbe szűrtem, majd a kicsapódott peptideket 5 percig 4400 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam (Eppendorf 5702 centrifuga, Hamburg, Németország). Az étert dekantáltam, majd a kiülepedett terméket még kétszer, az előzőekkel azonos módon, hideg éterrel mostam. A nyers peptideket acetonitril és desztillált víz keverékében oldottam, majd liofilizáltam. A peptideket RP-HPLC segítségével tisztítottam és tömegspektrometria segítségével azonosítottam. Az acetilezett peptidek tisztaságát analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (Phenomenex (Torrence, CA, USA) Aeris PEPTIDE XB-C18 oszlop (5 µm, 100 Å; 250×4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 50 perc 90% B). A tiszta aminosavtartalmú peptideket liofilizálás nélkül közvetlenül használtam a daunomicin konjugációhoz.

6.6.1.2 Peptidek szintézise a hatóanyag-peptid-polimer konjugátumokhoz

A GFLG spacer tartalmazó peptideket Wang gyantán (gyantakapacitás: 0,6 mmol/g gyanta) szintetizáltam. Az első aminosav felkapcsolását DIC kapcsolóreagenssel DMAP (a

gyantakapacitásra számolt 2:2:0,2 ekv.) jelenlétében végeztem 3 órán keresztül. A peptidgerinc megépítése után az *N*-terminálishoz egy izopropilidén védett aminosav (ipd=Aoa)¹⁷⁸ kapcsolom, majd a peptideket a gyantáról 95% TFA, 2,5% TIS és 2,5% desztillált víz eleggyel hasítottam. A nyers peptidek feldolgozása az előző pontban ismertetett módon történt.

6.6.2 Peptid-polimer konjugátumok előállítása

A polimert (amin-PEG vagy amin-HbPG¹⁶³), a peptidet, valamint a számított mennyiségű BOP és HOBt reagenseket (1:1,1:3:3 ekv.) DMF-ben feloldottam, majd a teljes oldódást követően 6 ekvivalens DIPEA-t adtam a reakcióelegyhez, és az oldatokat 16 órán át szobahőmérsékleten kevertettem. A konjugátumokat RP-HPLC-vel tisztítottam, majd liofilizáltam.

Az izopropilidén védőcsoportot 3 ekvivalens *O*-metil-hidroxil-amin hidroklorid (MeONH₂·HCl) segítségével távolítottam el DMF / 0,2 M NH₄OAc pufferben (pH 5,1; 1:1, V/V).¹⁷⁸ A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy órán keresztül kevertettem, majd RP-HPLC-vel tisztítottam. Az így kapott peptid-polimer konjugátumokat liofilizálás nélkül közvetlenül használtam a daunomicin konjugációjához.

6.6.3 Daunomicin konjugálása az aminosavacétozott peptidekhez és a peptid-polimer konjugátumokhoz (20-35)

A tiszta aminosavacétozott peptidet vagy peptid-polimer konjugátumot tartalmazó HPLC frakciót rotációs vákuumbepárlóval koncentráltam, majd DMF / 0,2 M ammónium-acetát pufferben (pH 5,1; 1:1, V/V; 10 mg/mL peptid/peptid-polimer konjugátum koncentráció) oldottam és 1,3 ekvivalens daunomicin·HCl-t adtam hozzá. A reakciókat szobahőmérsékleten 16 órán keresztül kevertettem, majd a konjugátumokat RP-HPLC-vel tisztítottam. A termékeket (28-35) tömegspektrometria segítségével azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (Phenomenex Aeris PEPTIDE XB-C18 oszlop (5 μm, 100 Å; 250×4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 50 perc 90% B).

6.6.4 A daunomicin-peptid és daunomicin-peptid-polimer konjugátumok oldhatóságának vizsgálata

A hatóanyag-peptid és hatóanyag-peptid-polimer konjugátumok oldhatóságát turbiditás mérésekkel vizsgáltuk. A daunomicin-peptid konjugátumokat (1 mM DMSO-ban oldva) és a daunomicin-peptid-polimer konjugátumokat (1 mM desztillált vízben oldva) RPMI-1640

médiумmal tízszeresére hígítottuk, homogenizáltuk, majd szobahőmérsékleten 15 percig állni hagytuk. A minták transzmittanciáját (T%) 630 nm-en 2 mm-es kvarcküvetében 25 °C-on mértük egy JASCO V-650 spektrofotométerrel (ABL&E-JASCO Magyarország Kft, Budapest, Magyarország). Referenciaként DMSO-RPMI-1640 (1:9, V/V) vagy desztillált víz-RPMI-1640 médium (1:9, V/V) keverékeket használtuk, és a minták turbiditását 100-T%-ban fejeztük ki.

6.6.5 HT-29 sejtek fenntartása

A HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejtek (European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECCAC), Salisbury, UK) tenyésztése 37 °C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában, 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 µg/mL penicillin/streptomycint tartalmazó RPMI-1640 médiumban (mind Lonza Group Ltd., Bázél, Svájc) történt.

6.6.6 *In vitro* sejtbejutási vizsgálatok

A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok *in vitro* sejtbejutását letapadt, illetve szuszpenzióban lévő HT-29 sejteken is vizsgáltuk. Az előbbi esetben a sejteket a kezelést megelőző napon 12 lyukú lemezre osztottuk (10⁵ sejt / lyuk). A sejteket a 10 µM végkoncentrációjú oldatokkal 15, 30 vagy 60 percen keresztül 37 °C-on kezeltük, majd PBS oldattal (pH 7,2) mostuk, végül tripszin-EDTA-val vagy TrypLE-lel (rekombináns, sejt-disszociációt elősegítő enzimek, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 5 percig 37 °C-on kezeltük. Ezután a disszociációs reagenset friss szérum tartalmú médiummal inaktiváltuk, és a sejteket FACS-csővekbe pipettáztuk. Egy centrifugálási (5 perc, 1000 fordulat/perc) és PBS-sel való mosási lépés után a sejteket FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton–Dickinson, San Jose, CA, USA) vizsgáltuk.

A szuszpenzióban levő sejteken végzett kísérletek esetén először a letapadt, sejttenyésztő flakában lévő sejteket felpasszáztuk TrypLE reagens segítségével, melynek aktivitását 5 perc elteltével friss médium hozzáadásával állítottuk le. Ezután a sejteket FACS-csővekbe (10⁵ sejt / FACS-cső) pipettáztuk, majd centrifugáltuk és friss médiummal mostuk. A sejteket a daunomicin-peptid-polimer konjugátumok 10 µM végkoncentrációjú oldatával 30 percen keresztül 37 °C-on kezeltük. A konjugátumok eltávolításához a csöveket újra centrifugáltuk és PBS-sel mostuk. Ezt követően a kezelt sejtek egy részét egy újabb PBS-sel való mosási lépés után közvetlenül vizsgáltuk az áramlási citométerrel, míg a sejtek másik részénél beiktattunk egy tripszin-EDTA-val való kezelést (5 perc, 37 °C) is, majd egy centrifugálás és egy PBS-sel való mosás után történt az áramlási citometriai mérés.

Minden minta esetén 10000 sejtet vizsgáltunk. A membránhoz kötött vagy az intracelluláris daunomicin-peptid-polimer konjugátumoktól származó átlagos fluoreszcencia intenzitás (mértékegység nélküli paraméter) adatok elemzésére CellQuest Pro programot (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) használtunk. A kezeléseket kétszer ismételtük meg hasonló eredménnyel, így csak az egyik kísérlet reprezentatív eredményét ábrázoltuk. Az áramlási citometriás hisztogramok statisztikai elemzése Kolmogorov-Smirnov teszttel történt.

6.6.7 *In vitro* sejt viabilitási vizsgálatok

A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok *in vitro* sejt viabilitásra gyakorolt hatását valós időben információt nyújtó impedimetriás vizsgálatokkal határoztuk meg xCELLigence SP berendezés (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) alkalmazásával. A háttér (1 óra alatt 1 perces intervallummal mért adatsor) felvételéhez csak sejttenyésztő médiumot használtunk. Majd a HT-29 sejteket a mérőelektródokkal fedett lemez (E-plate) kamráiba osztottuk (10^4 sejt / lyuk) és 24 órán át $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. Ezt követően a sejtekhez pipettáztuk a daunomicin-peptid-polimer konjugátumok különböző koncentrációjú oldatait ($0,1\text{ }\mu\text{M}$ - $50\text{ }\mu\text{M}$) és az impedancia változást 72 órán keresztül 20 másodpercenként rögzítettük. A kontroll mérések során a sejteket sejttenyésztő médiummal kezeltünk. A kezelés hatására bekövetkező impedancia változást a készülék egy mértékegység nélküli mutatószám, a sejtindex formájában fejezi ki. A kiértékelés során a normalizált sejtindex értéket használtuk, ami a kezelés egy adott időpontjában mért sejt index és a kezelést megelőző, hatóanyag mentes sejtekre jellemző sejtindex hányadosa. A normalizált sejtindex értékekre illesztett (OriginPro 9.0, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) szigmoid dózis-hatás görbéket alapul véve az IC_{50} értékeket azon koncentrációként határoztuk meg, amely a normalizált sejtindex 50%-ra történő csökkenését eredményezi. A kezeléseket három párhuzamos mérésben végeztük.

6.6.8 Dinamikus fényszóródás mérés (DLS)

Az előállított daunomicin-peptid-polimer konjugátumok ($100\text{ }\mu\text{M}$ vizes oldatok) méretét és eloszlását DLS-sel határoztuk meg. A méretet az intenzitás szerinti átlagos átmérővel (d), az eloszlást pedig a polidiszperzitás indexszel (PDI) jellemeztük. A kritikus aggregációs koncentráció (cac) meghatározásához a DLS-sel mért szórt intenzitást a koncentráció függvényében ($0,5$ - $500\text{ }\mu\text{M}$) ábrázoltuk.²⁰² A méréseket 633 nm -en $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on végeztük egy 4 MW -os He-Ne lézerrel

rendelkező Malvern Zetasizer, NANO ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) műszer alkalmazásával. A méréseket minden esetben háromszor ismételtük meg.

6.7 Tuftsin-daunomicin konjugátumok tömegspektrometriás analizisének optimalizálása

6.7.1 Tuftsin származékok szintézise

A peptideket minden esetben Wang gyantán (gyantakapacitás: 0,6 mmol/g gyanta) szintetizáltam Fmoc/^tBu stratégiát alkalmazva. Az első aminosav (Fmoc-Arg(Pbf)-OH; 2 ekvivalens a gyantakapacitásra nézve) felkapcsolását DIC (2 ekv.) kapcsolóreagenssel, DMAP (0,2 ekv.) jelenlétében végeztem 2 órán keresztül. A többi aminosav kapcsolásához DIC-et és HOBt-t (gyantakapacitásra számolt 3-3 ekvivalens) alkalmaztam, a kapcsolási idő ezekben az esetekben egy óra volt. Az Fmoc-csoport eltávolításához a 2% piperidin + 2% DBU / DMF hasító elegyet használtam.

A szintézis során összesen hat elágazó láncú aminosavacétilézett tuftsin analógot állítottam elő. Ezekből három monomer (TKPR) és három dimer (TKPRTKPR) származék volt. Az elágazásokat minden esetben a lizin(ek) oldalláncán alakítottam ki, ezért Fmoc-Lys(Dde)-OH-t használtam a peptidek előállításához. Az *N*-terminálison formilezett származékok (**37**, **40**) előállításához az utolsó aminosav, a treonin Fmoc védőcsoportjának hasítását követően az aminocsoportot hangyasav 2,4,6-triklórfenil-észterrel (For-OTcp, 5 ekv.) reagáltattam. A szabad *N*-terminálissal rendelkező peptidek (**36**, **38**, **39**, **41**) szintézisének Boc-Thr(^tBu)-OH-t választottam a peptidgerinc utolsó aminosavának. Ezt követően az elágazások kiépítéséhez a szelektíven hasítható Dde lizin oldallánc védőcsoport(ka)t 2% N₂H₄·H₂O / DMF eleggyel (8 x 5 perc) távolítottam el. A Boc-védett aminosavacétsavat (Boc-Aoa-OH) közvetlenül az ε-aminocsoport(ok)hoz vagy egy GFLG spacerhez (melyet előbb Fmoc technikával felépítettem a lizin oldallánc(ok)on) kapcsoltam. A peptideket a gyantáról 95% TFA, 2,5% TIS és 2,5% desztillált víz eleggyével 10 ekvivalens szabad aminosav jelenlétében hasítottam, a reakcióelegyeket 30 percig 0 °C-on, majd 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. Az elegyeket tízszeres feleslegű jéghideg éterbe szűrtem, majd a kicsapódott peptideket 5 percig 4400 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam (Eppendorf 5702 centrifuga, Hamburg, Németország). Az étert dekantáltam, majd a kiülepedett termékeket még kétszer, az előzőekkel azonos módon, hideg éterrel mostam. A nyers peptideket desztillált vízben oldottam, liofilizáltam, majd RP-HPLC segítségével tisztítottam.

6.7.2 Tuftsin-daunomicin konjugátumok szintézise (36-41)

A tiszta peptidet tartalmazó HPLC frakciót közvetlenül, liofilizálás nélkül használtam a hatóanyag konjugálásához. Ehhez az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam, majd ammónium-acetát pufferben (0,2 M, pH 5,1; 10 mg/mL peptid koncentráció) oldottam és 1,2 ekvivalens daunomicin·HCl-t adtam hozzá. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 16 órán keresztül kevertetem, majd a konjugátumokat RP-HPLC-vel tisztítottam. A termékeket tömegspektrometria segítségével azonosítottam, tisztaságukat pedig analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (Macherey-Nagel (Düren, Németország) Nucleosil C18 oszlop (5 μ m, 100 Å, 250 \times 4,6 mm); gradiens: 0 perc 2% B, 5 perc 2% B, 30 perc 90% B).

A 38 konjugátum előállításánál cukorvesztés is bekövetkezett, ezért izoláltam a cukorvesztett konjugátumot (42) is.

6.7.3 Tömegspektrometriás mérések

A tömegspektrometriás mérésekhez egy elektropray ionizációs (ESI-MS) Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus (Bréma, Németország) típusú ioncsapdás készüléket használtam. A konjugátumokból kétszer desztillált vízben törzsoldatot készítettem ($c_{\text{törzs}} = 1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$), majd ezt hígítottam a megfelelő oldószer keverékekkel. A mintákat 0,1% ecetsav / acetonitril:víz (1:1, V/V) elegyben savas körülmények között ($c_{\text{konj.savas}} = 10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$), acetonitril:víz (1:1, V/V) elegyben savmentes körülmények között ($c_{\text{konj.savmentes}} = 20 \text{ pmol}/\mu\text{L}$), NH_4HCO_3 (pH 7,8):acetonitril (1:1, V/V) elegyben enyhén lúgos pufferezt közegben (végső puffer koncentráció 50 mM, $c_{\text{konj.puffer}} = 50 \text{ pmol}/\mu\text{L}$), illetve NH_4OAc (pH 6,7):acetonitril (1:1, V/V) elegyben enyhén semleges/savas pufferezt közegben (végső puffer koncentráció 50 mM, $c_{\text{konj.puffer}} = 50 \text{ pmol}/\mu\text{L}$) vizsgáltam. A kapilláris kimeneti feszültséget minden vizsgált közeg esetében 5-200 V között szisztematikusan változtattam.

7 Összefoglalás

Doktori munkám során az irányított tumorterápiában alkalmazható hatóanyag-peptid konjugátumok szintézisével és vizsgálatával foglalkoztam. Tanulmányoztam az irányító molekula szerkezetének hatását a fotodinamikus terápiában alkalmazható GnRH-protoporfirin konjugátumok esetében, majd vizsgáltam a hatóanyagok számának és pozíciójának fontosságát daunomicin-Angiopep-2 konjugátumokban és elemeztem a szerkezeti változtatások biológiai hatékonyságra gyakorolt hatását. Ezután daunomicin-EGFR irányító peptid konjugátumok esetén fellépő oldhatósági problémák miatt tanulmányoztam vízoldható polimerek konjugálásának biológiai aktivitásra gyakorolt hatását, végül pedig kidolgoztam egy megfelelő vizsgálati körülményt daunomicin-tuftsin konjugátumok egyértelmű tömegspektrometriás azonosítására.

A kutatás első részében különböző GnRH-protoporfirin konjugátumokat állítottam elő, melyhez a célzott tumorterápiában alkalmazható GnRH-I szuperagonistát és három vajsavval módosított GnRH analógot használtam. A kapott eredmények igazolták, hogy mindegyik peptid és GnRH-PpIX konjugátum hatékonyan kötődik a humán agyalapi mirigy és humán prosztatata tumorszöveteken nagy mennyiségben jelenlévő GnRH-I receptorhoz. A konjugátumok *in vitro* sejt viabilitásra gyakorolt hatását a GnRH-R-t nagy mennyiségben expresszáló Detroit-562 humán garatrák sejteken vizsgáltuk. Első lépésként optimalizáltuk a kísérleti körülményeket, mely során az öt órás kezelési időtartam és a 10 perces besugárzás bizonyult a legjobbnak. A konjugátumok hatását az optimalizált körülmények között vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy az összes általam előállított konjugátum jelentősen hatékonyabb, mint a szabad PpIX. A leghatásosabb konjugátumok a vajsavval módosított GnRH-II analógot (7) és a GnRH-I szuperagonistát (5) tartalmazó származékok voltak. Ezenkívül igazoltuk, hogy a GnRH-R megfelelő célpont lehet a fej-nyaki daganatos betegek kezelése során.²⁰³

A munkám második részében a hatóanyagok számának és pozíciójának szerepére fókuszáltam, melyhez a vér-agy gáton is átjutni képes Angiopep-2 peptidet használtam. Ebben a peptidben három konjugációra is alkalmas aminosoport található, nevezetesen az *N*-terminális, illetve a két lizin (¹⁰Lys és ¹⁵Lys) oldallánca. Korábbi kutatások során mindegyik aminosoportot felhasználták kismolekulás hatóanyagok kapcsolására,^{89,93} azonban az egyes pozíciók szerepét és fontosságát eddig még nem vizsgálták. Ezért előállítottam az összes egy, kettő, illetve három daunomicint tartalmazó konjugátumot (7 konjugátum, **10-16**), majd ezek *in vitro* citosztatikus hatását és

sejtbejutási képességét U87 humán glioblastoma sejteken vizsgáltuk. Az eredmények alapján a hatóanyagok számának növelése nem növeli a konjugátumok hatékonyságát, sőt a legjobb hatással az egy daunomicint az *N*-terminálison tartalmazó konjugátum (**11**) rendelkezett. A legrosszabb hatást azon konjugátumok mutatták, melyek *C*-terminálishoz közelebbi lizinjéhez (¹⁵Lys) kapcsolódott daunomicin. Ez a pozíció valószínűleg fontos szerepet tölt be a receptorhoz való kötődésben, hiszen ezekben az esetekben alacsony sejtbejutást is tapasztaltunk. Az *N*-terminálishoz közelebbi lizin (¹⁰Lys) szubsztituálásával (**12**) egy kiemelkedő internalizációval rendelkező konjugátumot sikerült előállítani, melynek tumorellenes hatékonysága azonban nem volt kimagasló. A patkány máj lizoszóma preparátumban való degradációs vizsgálatok eredményeiből nyilvánvalóvá vált, hogy ebben az esetben a lassú metabolizáció okozza az alacsony citosztatikus aktivitást. Egy enzim-labilis spacer (GFLG, VA vagy VAGG) beépítése a hatóanyag és a lizin oldallánca közé sem javított jelentősen a konjugátum hatékonyságán, mert az esetek egy részében (**18** és **19**) a spacer hatására romlott a sejtbejutási képesség, míg a megfelelő internalizációval rendelkező származék (**17**) esetében a hatóanyagot tartalmazó metabolit felszabadulása volt lassú. Az így megszerzett ismereteket a tervezéshez felhasználva a jövőben várhatóan sikerrel előállítható lesz a megfelelő hatékonysággal rendelkező daunomicin-Angiopep-2 konjugátum.

Doktori munkám harmadik részében EGF receptort célzó GE11 és D4 peptidet és enzim-labilis spacert (GFLG, YRRL) is tartalmazó daunomicin-peptid konjugátumokat vizsgáltam. Azonban ezen konjugátumok oldhatósága nagyon alacsonynak bizonyult, így a biológiai hatásukat nem sikerült összehasonlítanom. A vizsgálatok folytatásához az oldhatóság növelésére hidrophil polimer molekulát kapcsoltam a legrosszabbul oldódó GFLG spacert tartalmazó konjugátumokhoz. A daunomicin-peptid-polimer konjugátumok szintéziséhez poli(etilén-glikol) (PEG) és hiperelágazásos poliglicidol (HbPG) származékokat választottam és a polimerek árnyékoló hatásának kiküszöbölésére egy pentaglicin távtartót is beépítettem a peptid és a polimer közé. A turbiditás mérések igazolták, hogy a választott hidrophil polimerekkel való konjugálás jelentősen javította a konjugátumok oldhatóságát. A konjugátumok összehasonlítására *in vitro* citotoxicitás és sejtbejutási vizsgálatokat végeztünk HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken. A kapott eredményekből azonban nem tudtunk egyértelmű szerkezet-hatás összefüggéseket kimutatni, ezért feltételeztük, hogy a konjugátumok amfifil jellege miatt oldatban nanorészecskék alakulnak ki. Az adatok értelmezéséhez dinamikus fényszóródás méréssel meghatároztuk a keletkezett nanorészecskék méretét, illetve a konjugátumok kritikus aggregációs koncentrációját. A hosszabb

GE11 peptid esetében a spacer nélküli PEG-alapú konjugátum (**28**), míg a rövidebb D4 peptid esetén a G₅ spacer tartalmazó HbPG-alapú konjugátum (**35**) bizonyult a leghatásosabbnak. Ez utóbbi esetben a G₅ spacer csökkenti a D4 hidrofóbítását és egyben növeli az irányító peptid hozzáférhetőségét is, míg a HbPG csupán kismértékű sztérikus gátló hatást fejt ki. Fontos tapasztalat, hogy az ilyen típusú amfifil karakterű hatóanyag-peptid-polimer konjugátumok esetén a biológia hatás csak az önszerveződő aggregációs viselkedés ismeretében magyarázható.

A munkám negyedik részében tuftsin-daunomicin konjugátumok egyértelmű tömegspektrometriás azonosítására alkalmas vizsgálati körülményeket kerestem. A több bázikus aminosavat tartalmazó tuftsin-daunomicin konjugátumok az általánosan alkalmazott tömegspektrometriás körülmények között magas töltöttségi állapotba kerülnek, és a daunomicin glikozidos kötésének spontán hasadása miatt komplex, túlnyomó részt fragmentumokat tartalmazó spektrumokat adnak. Ez a cukorvesztés azonban a szintézis és a tárolás alatt is bekövetkezhet, mely csökkent biológiai hatékonysághoz vezet. Emiatt a szerkezet egyértelmű meghatározására a konjugátumok alacsonyabb töltöttségi állapotát igyekeztem elérni. Ehhez olyan szisztematikus kísérletsorozatot végeztem, mely során fokozatosan csökkentettem a kapilláris feszültséget, illetve vizsgáltam az oldószer ionizációra gyakorolt hatását is. Az eredmények alapján látható volt, hogy a tuftsin-daunomicin konjugátumok szerkezete nagy hatással van az ESI-MS spektrumokra. A bázikus karakterű funkcióscsoportok csökkentése (pl. az *N*-terminális formilezése), vagy a semleges töltésű GFLG spacer beépítése a hatóanyag és a peptidgerinc közé jelentősen csökkentette a fragmentációt, azonban a túlzott protonálódást csak megfelelő oldószerekkel és tömegspektrometriás beállításokkal sikerült visszaszorítani. A legjobb minőségű spektrumokat, ahol szinte kizárólag intakt protonált molekulákat detektáltam, alacsony kapilláris kimeneti feszültség (5 V) és NH₄OAc puffer kombinációjával sikerült elérni. Ezek az eredmények hasznosak lehetnek az antraciklin tartalmú biokonjugátumok tömegspektrometriás elemzésében, a megfelelő és könnyen értékelhető spektrumok előállításában.²⁰⁴

8 Summary

The topic of my research was the synthesis and investigation of drug-peptide conjugates for targeted tumor therapy. The effect of the targeting peptide's structure on GnRH-protoporphyrin conjugates, which may be used in photodynamic therapy in the future was studied, then the importance of the number and position of the drug molecule in daunomycin-Angiopep-2 conjugates was investigated and the effect of the structural changes on the biological efficiency was analyzed. Afterwards, due to solubility problems of daunomycin-EGFR targeting peptide conjugates, the effect of the conjugation of water-soluble polymers on the biological activity was studied, and finally appropriate conditions for the unambiguous mass spectrometric identification of daunomycin-tuftsins conjugates was developed.

In the first part of my work GnRH-protoporphyrin conjugates containing the GnRH-I superagonist and three butyrylated GnRH analogs were synthesized for photodynamic therapy. Each peptide and GnRH-PpIX conjugate showed efficient binding to human pituitary and human prostate tumor tissues that overexpress GnRH-R receptor. The high level of GnRH-R expression has already been demonstrated on Detroit-562 human pharyngeal cells,¹⁷⁰ so the effect of the novel conjugates on the *in vitro* cell viability was investigated on this cell line. The first step was the optimization of the experimental conditions, and the effect of the GnRH-PpIX conjugates was studied using these optimized conditions (5 hours of treatment time and 10 minutes of irradiation). All conjugates were found to be significantly more effective than free PpIX, and the most potent conjugates were the derivatives containing the butyrylated GnRH-II analogue (**7**) and the GnRH-I superagonist (**5**). Moreover, we could demonstrate that GnRH-R may be an appropriate target for the treatment of head and neck cancer patients.²⁰³

In the second part of my work, the number and the position of the drug molecules in Angiopep-2 peptide-based conjugates were in the focus. This peptide contains three amino groups suitable for drug conjugation, namely the *N*-terminal and the side chains of the two lysines (¹⁰Lys and ¹⁵Lys). Previous studies conjugated drug molecules to all three amino groups,^{89,93} but the role and importance of each position have not yet been investigated. Therefore, conjugates containing one, two, and three daunomycin molecules (7 conjugates, **10-16**) were prepared, and their *in vitro* cytostatic effect and cellular uptake was investigated on U87 human glioblastoma cells. We could demonstrate that the increasing number of the drug molecule does not necessarily increase the

efficacy of the conjugates, moreover the best conjugate was the one containing only one daunomycin on the *N*-terminal (**11**). In contrast, conjugates containing daunomycin on the side chain of ¹⁵Lys showed the worst cytostatic effect. This position is likely to play an important role in receptor binding, since low internalization was observed in all these cases. The substitution of ¹⁰Lys (**12**) resulted in outstanding cellular uptake, though the antitumor efficacy was only moderate. Lysosomal degradation studies confirmed that the low cytostatic activity is caused by the slow release of the active metabolite. The incorporation of an enzyme-labile spacer (GFLG, VA, or VAGG) between the drug and the lysine side chain could not significantly improve the efficacy of the conjugate, since in cases of VA and VAGG (**18** and **19**) decreased cellular uptake was observed, while the GFLG derivative (**17**) showed slow degradation. However, using this obtained knowledge in the future may help with the design and synthesis of a more effective daunomycin-Angiopep-2 conjugate.

In the third part of my PhD work daunomycin-peptide conjugates containing EGFR targeting GE11 and D4 peptides and an enzyme-labile spacer (GFLG, YRRL) were investigated. Since the solubility of these conjugates was poor, their biological activity could not be studied. Therefore, hydrophilic polymer molecules were attached to the GFLG spacer containing analogs having the worst solubility. Polyethylene glycol (PEG) and hyperbranched polyglycerol (HbPG) derivatives were selected for the synthesis of the novel daunomycin-peptide-polymer conjugates and a pentaglycine spacer was incorporated between the peptide chain and the polymer to eliminate the shading effect of the polymers. Turbidity measurements confirmed that conjugation of the selected hydrophilic polymers significantly improved the solubility of the conjugates. Then, *in vitro* cytotoxicity and cell uptake studies were performed on HT-29 human colon adenocarcinoma cells to compare the effect of the conjugates. However, no clear structure-activity relationship could be detected, hence we assumed that the amphiphilic character of the conjugates led to nanoparticle formation. Therefore, the size of the formed nanoparticles and the critical aggregation concentration of the conjugates were determined by dynamic light scattering. In case of the longer GE11 peptide the PEG-based conjugate missing the pentaglycine spacer (**28**), while in case of the shorter D4 peptide the HbPG-based conjugate containing the G₅ spacer (**35**) were proved to be the most effective compounds. In the latter case, probably the G₅ spacer reduces the hydrophobicity and at the same time increases the accessibility of the D4 targeting peptide, while the HbPG shows

only a slight shading effect. Importantly, the biological effect of such drug-peptide-polymer conjugates can only be explained by considering their self-assembling behavior.

In the fourth part of my work, the appropriate conditions for the unambiguous mass spectrometric identification of tuftsin-daunomycin conjugates were studied. Tuftsin-daunomycin conjugates bearing several basic amino acids show complex mass spectra containing mainly fragment ions under the commonly used mass spectrometry conditions. This happens due to the spontaneous cleavage of the glycosidic bond caused by excessive protonation of the compound; however, this sugar loss can also occur during the synthesis or storage of these compounds leading to reduced biological efficiency. Therefore, it is a crucial problem to unambiguously distinguish these two phenomena and clearly determine the structure of the conjugates. For this reason, the capillary exit potential was gradually reduced and the effect of the eluent on the ionization was also investigated. The results showed that the structure of the tuftsin-daunomycin conjugates also influenced the ESI-MS spectra. The reduction of the basic functional groups (e.g, formylation of the *N*-terminal) or the incorporation of a neutral GFLG spacer between the drug moiety and the peptide backbone significantly reduced the fragmentation, though the excessive protonation could only be suppressed by appropriate eluents and device settings. The best quality spectra, where almost exclusively intact molecules were detected, were achieved by the combination of low capillary exit potential (5 V) and NH₄OAc buffer. These results may later be useful in the mass spectrometric analysis of anthracycline-containing bioconjugates.²⁰⁴

9 Irodalomjegyzék

- (1) Mező, G. Peptide and Protein Based Pharmaceuticals. *Amino Acids, Pept. Proteins* **2013**, 38, 203–252.
- (2) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, 26, 2700–2707.
- (3) Hajdu, S. I. A Note from History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. *Cancer* **2011**, 8 (805), 1097–1102.
- (4) *Onkofarmakológia*; Jeney, A., Kralovánszky, J., Eds.; Medicina Könyvkiadó Zrt.: Budapest, **2009**.
- (5) Plošnik, A.; Vračko, M.; Dolenc, M. S. Mutagenic and Carcinogenic Structural Alerts and Their Mechanisms of Action. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **2016**, 67, 169–182.
- (6) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, 100, 57–70.
- (7) STADAT – 1.5. Halálózások a gyakoribb halálokok szerint (1990–) https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html (accessed Oct 29, 2019).
- (8) Cancer Today https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D (accessed Oct 29, 2019).
- (9) Figueras, J.; Torras, J.; Valls, C.; Llado, L.; Ramos, E.; Marti-Ragué, J.; Serrano, T.; Fabregat, J. Surgical Resection of Colorectal Liver Metastases in Patients with Expanded Indications: A Single-Center Experience with 501 Patients. *Dis. Colon Rectum* **2007**, 50, 478–488.
- (10) Baskar, R.; Lee, K. A.; Yeo, R.; Yeoh, K. W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int. J. Med. Sci.* **2012**, 9, 193–199.
- (11) Waldmann, T. A. Immunotherapy: Past, Present and Future. *Nat. Med.* **2003**, 9, 269–277.
- (12) Beatson, G. T. On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a New Method of Treatment, with Illustrative Cases. *Lancet* **1896**, 15, 153–179.
- (13) Sharma, R.; Tobin, P.; Clarke, S. J. Management of Chemotherapy-Induced Nausea, Vomiting, Oral Mucositis, and Diarrhoea. *Lancet Oncol.* **2005**, 6, 93–102.
- (14) Frei, E.; Eder, J. P. *Principles of Dose, Schedule, and Combination Therapy*. In *Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition*; Kufe, D.W.; Pollock, R. E.; Weichselbaum, R.R.; *et al.*, Ed.; BC Decker: Hamilton (ON), **2003**.
- (15) Gewirtz, D. A. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 727–741.
- (16) Hortobágyi, G. N. Anthracyclines in the Treatment of Cancer. An Overview. *Drugs* **1997**, 54, 1–7.
- (17) Dimarco, A.; Soldati, M.; Fioretti, A.; Dasdia, T. Activity of Daunomycin, a New Antitumor Antibiotic, on Normal and Neoplastic Cells Grown In Vitro. *Cancer Chemother. Rep.* **1964**, 38, 39–47.
- (18) Flanagan, P. A.; Duncan, R.; Šubr, V.; Ulbrich, K.; Kopečková, P.; Kopeček, J. Evaluation

- of Protein-*N*-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide Copolymer Conjugates as Targetable Drug-Carriers. 2. Body Distribution of Conjugates Containing Transferrin, Antitransferrin Receptor Antibody or Anti-Thy 1.2 Antibody and Effectiveness of Transferrin-Containing Daunomycin Conjugates against Mouse L1210 Leukaemia in Vivo. *J. Control. Release* **1992**, *18*, 25–37.
- (19) Hudecz, F.; Clegg, J. A.; Kajtar, J.; Embleton, M. J.; Szekerke, M.; Baldwin, R. W. Synthesis, Conformation, Biodistribution and in Vitro Cytotoxicity of Daunomycin-Branched Polypeptide Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 49–57.
- (20) Szabó, I.; Bősze, S.; Orbán, E.; Sipos, É.; Halmos, G.; Kovács, M.; Mező, G. Comparative in Vitro Biological Evaluation of Daunorubicin Containing GnRH-I and GnRH-II Conjugates Developed for Tumor Targeting. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 426–435.
- (21) Mező, G.; Czajlik, A.; Manea, M.; Jakab, A.; Farkas, V.; Majer, Z.; Vass, E.; Bodor, A.; Kapuvári, B.; Boldizsár, M.; et al. Structure, Enzymatic Stability and Antitumor Activity of Sea Lamprey GnRH-III and Its Dimer Derivatives. *Peptides* **2007**, *28*, 806–820.
- (22) Kovács, M.; Vincze, B.; Horváth, J. E.; Sepródi, J. Structure-Activity Study on the LH- and FSH-Releasing and Anticancer Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-III Analogs. *Peptides* **2007**, *28*, 821–829.
- (23) Hegedüs, R.; Manea, M.; Orbán, E.; Szabó, I.; Kiss, É.; Sipos, É.; Halmos, G.; Mező, G. Enhanced Cellular Uptake and in Vitro Antitumor Activity of Short-Chain Fatty Acid Acylated Daunorubicin-GnRH-III Bioconjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *56*, 155–165.
- (24) Forssen, E. A.; Coulter, D. M.; Proffitt, R. T. Selective in Vivo Localization of Daunorubicin Small Unilamellar Vesicles in Solid Tumors. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3255–3261.
- (25) Shao, J.; Tam, J. P. Unprotected Peptides as Building Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893–3899.
- (26) Gao, Y. G.; Liaw, Y. C.; Li, Y. K.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Wang, A. H. J. Facile Formation of a Crosslinked Adduct between DNA and the Daunorubicin Derivative MAR70 Mediated by Formaldehyde: Molecular Structure of the MAR70-d(CGT(n)ACG) Covalent Adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 4845–4849.
- (27) Alouane, A.; Labruère, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure-Property Relationships, and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 7492–7509.
- (28) Senter, P. D. Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy. *FASEB J.* **1990**, *4*, 188–193.
- (29) Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A.; Padilla, L.; Willner, D.; Hofstead, S. J.; Mosure, K.; Knipe, J. O.; Lasch, S. J.; Trail, P. A. Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from Internalizing Immunoconjugates: Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 855–869.
- (30) Sleno, L.; Campagna-Slater, V.; Volmer, D. A. Dissociation Reactions of Protonated Anthracycline Antibiotics Following Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *255–256*, 130–138.
- (31) Biel, M. A. *Photodynamic Therapy*. In *Methods in Molecular Biology*; Gomer, C. J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **2010**.
- (32) Braathen, L. R.; Szeimies, R.-M.; Basset-Seguín, N.; Bissonnette, R.; Foley, P.; Pariser, D.; Roelandts, R.; Wennberg, A.-M.; Morton, C. A. Guidelines on the Use of Photodynamic Therapy for Nonmelanoma Skin Cancer: An International Consensus. *J. Am. Acad.*

- Dermatol.* **2007**, *56*, 125–143.
- (33) Lamberti, M. J.; Vittar, N. B. R.; Rivarola, V. A. Breast Cancer as Photodynamic Therapy Target: Enhanced Therapeutic Efficiency by Overview of Tumor Complexity. *World J. Clin. Oncol.* **2014**, *5*, 901–907.
 - (34) Railkar, R.; Agarwal, P. K. Photodynamic Therapy in the Treatment of Bladder Cancer: Past Challenges and Current Innovations. *Eur. Urol. Focus* **2018**, *4*, 509–511.
 - (35) Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D.; Mittleman, A. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Res.* **1978**, *38*, 2628–2635.
 - (36) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889–905.
 - (37) Dolmans, D. E.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380–387.
 - (38) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250–281.
 - (39) Nomoto, T.; Nishiyama, N. Photodynamic Therapy. In *Photochemistry for Biomedical Applications*; Springer Singapore: Singapore, **2018**; 301–313.
 - (40) Williams, T. M.; Sibrian-Vazquez, M.; Vicente, M. G. H. Design and Synthesis of Photosensitizer-Peptide Conjugates for PDT. In *Handbook of Photodynamic Therapy. Update on Recent Applications of Porphyrin-Based Compounds* **2016**, 45–94.
 - (41) Barolet, D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **2008**, *27*, 227–238.
 - (42) Miklós, K.; Tamás, V. A Fotodinamiás Terápia Hatóanyagainak Fotofizikai Tulajdonságai. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2007**, *113*, 44–48.
 - (43) Kou, J.; Dou, D.; Yang, L. Porphyrin Photosensitizers in Photodynamic Therapy and Its Applications. *Oncotarget* **2017**, *8*, 81591–81603.
 - (44) Baskaran, R.; Lee, J.; Yang, S.-G. Clinical Development of Photodynamic Agents and Therapeutic Applications. *Biomater. Res.* **2018**, *22*, 1–8.
 - (45) O'Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053–1074.
 - (46) Sachar, M.; Anderson, K. E.; Ma, X. Protoporphyrin IX: The Good, the Bad, and the Ugly. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2016**, *356*, 267–275.
 - (47) Rahimipour, S.; Ben-Aroya, N.; Ziv, K.; Chen, A.; Fridkin, M.; Koch, Y. Receptor-Mediated Targeting of a Photosensitizer by Its Conjugation to Gonadotropin-Releasing Hormone Analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3965–3974.
 - (48) Azad, B. B.; Cho, C. F.; Lewis, J. D.; Luyt, L. G. Synthesis, Radiometal Labeling and in Vitro Evaluation of a Targeted PPIX Derivative. *Appl. Radiat. Isot.* **2012**, *70*, 505–511.
 - (49) Eshghi, H.; Sazgarnia, A.; Rahimizadeh, M.; Attaran, N.; Bakavoli, M.; Soudmand, S. Protoporphyrin IX-Gold Nanoparticle Conjugates as an Efficient Photosensitizer in Cervical Cancer Therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2013**, *10*, 304–312.
 - (50) Ashjari, M.; Dehfuly, S.; Fatehi, D.; Shabani, R.; Koruji, M. Efficient Functionalization of Gold Nanoparticles Using Cysteine Conjugated Protoporphyrin IX for Singlet Oxygen Production In Vitro. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 104621–104628.
 - (51) Ai, J.; Li, J.; Ga, L.; Yun, G.; Xu, L.; Wang, E. G-Quadruplex/Protoporphyrin IX-Functionalized Silver Nanoconjugates for Targeted Cancer Cell Photodynamic Therapy.

- RSC Adv.* **2016**, *6*, 96942–96945.
- (52) Singh, S.; Jha, P.; Singh, V.; Sinha, K.; Hussain, S.; Singh, M. K.; Das, P. A Quantum Dot-MUC1 Aptamer Conjugate for Targeted Delivery of Protoporphyrin IX and Specific Photokilling of Cancer Cells through ROS Generation. *Integr. Biol.* **2016**, *8*, 1040–1048.
- (53) Kojima, C.; Toi, Y.; Harada, A.; Kono, K. Preparation of Poly (Ethylene Glycol)-Attached Dendrimers Encapsulating Photosensitizers for Application to Photodynamic Therapy. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 663–670.
- (54) Kumar, M. S.; Aruna, P.; Ganesan, S. Influence of Protoporphyrin IX Loaded Phloroglucinol Succinic Acid Dendrimer in Photodynamic Therapy. *Mater. Res. Express* **2018**, *5*, 34004.
- (55) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908 <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/summary/> (accessed Oct 30, 2019).
- (56) Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 473–480.
- (57) Bosch, F.; Rosich, L. The Contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: A Tribute on the Occasion of the Centenary of His Nobel Prize. *Pharmacology* **2008**, *82*, 171–179.
- (58) Vrettos, E. I.; Mező, G.; Tzakos, A. G. On the Design Principles of Peptide–Drug Conjugates for Targeted Drug Delivery to the Malignant Tumor Site. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 930–954.
- (59) Mező, G.; Manea, M. Receptor-Mediated Tumor Targeting Based on Peptide Hormones. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 79–96.
- (60) Mező, G.; Hegedüs, R.; Szabó, I. Célzott Rákgyógyítás. *Természet Világa* **2012**, *143*, 448–451.
- (61) Millar, R. P. GnRHs and GnRH Receptors. *Anim. Reprod. Sci.* **2005**, *88*, 5–28.
- (62) Millar, R. P.; Lu, Z.; Pawson, A. J.; Flanagan, C. A.; Morgan, K.; Maudsley, S. R. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 235–275.
- (63) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1977 - NobelPrize.org <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1977/summary/> (accessed Oct 3, 2019).
- (64) Mező, G.; Manea, M.; Szabó, I.; Vincze, B.; Kovács, M. New Derivatives of GnRH as Potential Anticancer Therapeutic Agents. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2366–2379.
- (65) White, R. B.; Eisen, J. A.; Kasten, T. L.; Fernald, R. D. Second Gene for Gonadotropin-Releasing Hormone in Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 305–309.
- (66) Millar, R. P. GnRH II and Type II GnRH Receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **2003**, *14*, 35–43.
- (67) Nagy, A.; Schally, A. V. Targeting of Cytotoxic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogs to Breast, Ovarian, Endometrial, and Prostate Cancers. *Biol. Reprod.* **2005**, *73*, 851–859.
- (68) Limonta, P.; Marelli, M. M.; Mai, S.; Motta, M.; Martini, L.; Moretti, R. M. GnRH Receptors in Cancer: From Cell Biology to Novel Targeted Therapeutic Strategies. *Endocr. Rev.* **2012**, *33*, 784–811.
- (69) Mező, G.; Manea, M. Receptor-Mediated Tumor Targeting Based on Peptide Hormones. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 79–96.
- (70) Lovas, S.; Pályi, I.; Vincze, B.; Horváth, J.; Kovács, M.; Mező, I.; Tóth, G.; Teplán, I.; Murphy, R. F. Direct Anticancer Activity of Gonadotropin-Releasing Hormone-III. *J. Pept. Res.* **1998**, *52*, 384–389.
- (71) Janáky, T.; Juhász, A.; Bajusz, S.; Csernus, V.; Srkalovic, G.; Bokser, L.; Milovanovic, S.; Redding, T. W.; Rékási, Z.; Nagy, A.; et al. Analogues of Luteinizing Hormone-Releasing

- Hormone Containing Cytotoxic Groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 972–976.
- (72) Nagy, A.; Schally, A. V.; Armatis, P.; Szepesházi, K.; Halmos, G.; Kovács, M.; Zarándi, M.; Groot, K.; Miyazaki, M.; Jungwirth, A.; et al. Cytotoxic Analogs of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Containing Doxorubicin or 2-Pyrrolinodoxorubicin, a Derivative 500-1000 Times More Potent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 7269–7273.
- (73) Halmos, G.; Nagy, A.; Lamharzi, N.; Schally, A. V. Cytotoxic Analogs of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Bind with High Affinity to Human Breast Cancers. *Cancer Lett.* **1999**, *136*, 129–136.
- (74) Westphalen, S.; Kotulla, G.; Kaiser, F.; Krauss, W.; Werning, G.; Elsasser, H. P.; Nagy, A.; Schulz, K. D.; Grundker, C.; Schally, A. V.; et al. Receptor Mediated Antiproliferative Effects of the Cytotoxic LHRH Agonist AN-152 in Human Ovarian and Endometrial Cancer Cell Lines. *Int. J. Oncol.* **2000**, *17*, 1063–1069.
- (75) Szepesházi, K.; Schally, A. V.; Nagy, A. Effective Treatment of Advanced Estrogen-Independent MXT Mouse Mammary Cancers with Targeted Cytotoxic LH-RH Analogs. *Breast Cancer Res. Treat.* **1999**, *56*, 267–276.
- (76) Chatzistamou, I.; Schally, A. V.; Nagy, A.; Armatis, P.; Szepesházi, K.; Halmos, G. Effective Treatment of Metastatic MDA-MB-435 Human Estrogen-Independent Breast Carcinomas with a Targeted Cytotoxic Analogue of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone AN-207. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 4158–4165.
- (77) Gründker, C.; Völker, P.; Griesinger, F.; Ramaswamy, A.; Nagy, A.; Schally, A. V.; Emons, G. Antitumor Effects of the Cytotoxic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analog AN-152 on Human Endometrial and Ovarian Cancers Xenografted into Nude Mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2002**, *187*, 528–537.
- (78) Bajo, A. M.; Schally, A. V.; Halmos, G.; Nagy, A. Targeted Doxorubicin-Containing Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue AN-152 Inhibits the Growth of Doxorubicin-Resistant MX-1 Human Breast Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 3742–3748.
- (79) Emons, G.; Kaufmann, M.; Gorchev, G.; Tsekova, V.; Gründker, C.; Günthert, A. R.; Hanker, L. C.; Velikova, M.; Sindermann, H.; Engel, J.; et al. Dose Escalation and Pharmacokinetic Study of AEZS-108 (AN-152), an LHRH Agonist Linked to Doxorubicin, in Women with LHRH Receptor-Positive Tumors. *Gynecol. Oncol.* **2010**, *119*, 457–461.
- (80) Engel, J.; Emons, G.; Pinski, J.; Schally, A. V. AEZS-108: A Targeted Cytotoxic Analog of LHRH for the Treatment of Cancers Positive for LHRH Receptors. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21*, 891–899.
- (81) Miller, D. S.; Scambia, G.; Bondarenko, I.; Westermann, A. M.; Oaknin, A.; Oza, A. M.; Lisyanskaya, A. S.; Vergote, I.; Wenham, R. M.; Temkin, S. M.; et al. ZoptEC: Phase III Randomized Controlled Study Comparing Zoptarelin with Doxorubicin as Second Line Therapy for Locally Advanced, Recurrent, or Metastatic Endometrial Cancer (NCT01767155). *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 5503–5503.
- (82) Krebs, L. J.; Wang, X.; Nagy, A.; Schally, A. V.; Prasad, P. N.; Liebow, C. A Conjugate of Doxorubicin and an Analog of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Shows Increased Efficacy against Oral and Laryngeal Cancers. *Oral Oncol.* **2002**, *38*, 657–663.
- (83) Lev-Goldman, V.; Mester, B.; Ben-Aroya, N.; Hanoch, T.; Rupp, B.; Stanoeva, T.; Gescheidt, G.; Seger, R.; Koch, Y.; Weiner, L.; et al. Conjugates of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) with Carminic Acid: Synthesis, Generation of Reactive Oxygen Species (ROS) and Biological Evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6789–6798.

- (84) Mező, I.; Lovas, S.; Pályi, I.; Vincze, B.; Kálnay, A.; Turi, G.; Vadász, Z.; Seprődi, J.; Idei, M.; Tóth, G.; et al. Synthesis of Gonadotropin-Releasing Hormone III Analogs. Structure-Antitumor Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3353–3358.
- (85) Kapuvári, B.; Hegedüs, R.; Schulcz, Á.; Manea, M.; Tóvári, J.; Gacs, A.; Vincze, B.; Mező, G. Improved in Vivo Antitumor Effect of a Daunorubicin - GnRH-III Bioconjugate Modified by Apoptosis Inducing Agent Butyric Acid on Colorectal Carcinoma Bearing Mice. *Invest. New Drugs* **2016**, *34*, 416–423.
- (86) Oller-Salvia, B.; Sánchez-Navarro, M.; Giralt, E.; Teixidó, M. Blood-Brain Barrier Shuttle Peptides: An Emerging Paradigm for Brain Delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4690–4707.
- (87) Abbott, N. J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Astrocyte-Endothelial Interactions at the Blood-Brain Barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 41–53.
- (88) Abbott, N. J.; Patabendige, A. A. K.; Dolman, D. E. M.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and Function of the Blood–Brain Barrier. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13–25.
- (89) Demeule, M.; Régina, A.; Ché, C.; Poirier, J.; Nguyen, T.; Gabathuler, R.; Castaigne, J.-P.; Béliveau, R. Identification and Design of Peptides as a New Drug Delivery System for the Brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324*, 1064–1072.
- (90) Zlokovic, B. V.; Deane, R.; Sagare, A. P.; Bell, R. D.; Winkler, E. A. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1: A Serial Clearance Homeostatic Mechanism Controlling Alzheimer’s Amyloid β -Peptide Elimination from the Brain. *J. Neurochem.* **2010**, *115*, 1077–1089.
- (91) Emonard, H.; Théret, L.; Bennasroune, A. H.; Dedieu, S. Regulation of LRP-1 Expression: Make the Point. *Pathol. Biol.* **2014**, *62*, 84–90..
- (92) Régina, A.; Demeule, M.; Ché, C.; Lavallée, I.; Poirier, J.; Gabathuler, R.; Béliveau, R.; Castaigne, J. P. Antitumour Activity of ANG1005, a Conjugate between Paclitaxel and the New Brain Delivery Vector Angiopep-2. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 185–197.
- (93) Ché, C.; Yang, G.; Thiot, C.; Lacoste, M. C.; Currie, J. C.; Demeule, M.; Régina, A.; Béliveau, R.; Castaigne, J. P. New Angiopep-Modified Doxorubicin (ANG1007) and Etoposide (ANG1009) Chemotherapeutics with Increased Brain Penetration. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2814–2824.
- (94) Pipeline | Angiochem: Peptide-Antibody Conjugates that Cross the Blood Brain Barrier <http://angiochem.com/pipeline> (accessed Nov 5, 2019).
- (95) Demeule, M.; Beaudet, N.; Régina, A.; Besserer-Offroy, É.; Murza, A.; Tétreault, P.; Belleville, K.; Ché, C.; Larocque, A.; Thiot, C.; et al. Conjugation of a Brain-Penetrant Peptide with Neurotensin Provides Antinociceptive Properties. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 1199–1213.
- (96) Régina, A.; Demeule, M.; Tripathy, S.; Lord-Dufour, S.; Currie, J. C.; Iddir, M.; Annabi, B.; Castaigne, J. P.; Lachowicz, J. E. ANG4043, a Novel Brain-Penetrant Peptide-MAb Conjugate, Is Efficacious against HER2-Positive Intracranial Tumors in Mice. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 129–140.
- (97) Wei, X.; Zhan, C.; Chen, X.; Hou, J.; Xie, C.; Lu, W. Retro-Inverso Isomer of Angiopep-2: A Stable D-Peptide Ligand Inspires Brain-Targeted Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 3261–3268.
- (98) Ke, W.; Shao, K.; Huang, R.; Han, L.; Liu, Y.; Li, J.; Kuang, Y.; Ye, L.; Lou, J.; Jiang, C. Gene Delivery Targeted to the Brain Using an Angiopep-Conjugated Polyethyleneglycol-Modified Polyamidoamine Dendrimer. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6976–6985.
- (99) Huang, S.; Li, J.; Han, L.; Liu, S.; Ma, H.; Huang, R.; Jiang, C. Dual Targeting Effect of Angiopep-2-Modified, DNA-Loaded Nanoparticles for Glioma. *Biomaterials* **2011**, *32*,

- 6832–6838.
- (100) Hu, G.; Chun, X.; Wang, Y.; He, Q.; Gao, H. Peptide Mediated Active Targeting and Intelligent Particle Size Reduction-Mediated Enhanced Penetrating of Fabricated Nanoparticles for Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *Oncotarget* **2015**, *6*, 41258–41274.
 - (101) Yang, Z. Z.; Li, J. Q.; Wang, Z. Z.; Dong, D. W.; Qi, X. R. Tumor-Targeting Dual Peptides-Modified Cationic Liposomes for Delivery of siRNA and Docetaxel to Gliomas. *Biomaterials* **2014**, *35*, 5226–5239.
 - (102) Shao, K.; Huang, R.; Li, J.; Han, L.; Ye, L.; Lou, J.; Jiang, C. Angiopep-2 Modified PE-PEG Based Polymeric Micelles for Amphotericin B Delivery Targeted to the Brain. *J. Control. Release* **2010**, *147*, 118–126.
 - (103) Sun, X.; Pang, Z.; Ye, H.; Qiu, B.; Guo, L.; Li, J.; Ren, J.; Qian, Y.; Zhang, Q.; Chen, J.; et al. Co-Delivery of PEGFP-HTRAIL and Paclitaxel to Brain Glioma Mediated by an Angiopep-Conjugated Liposome. *Biomaterials* **2012**, *33*, 916–924.
 - (104) Huile, G.; Shuaiqi, P.; Zhi, Y.; Shijie, C.; Chen, C.; Xinguo, J.; Shun, S.; Zhiqing, P.; Yu, H. A Cascade Targeting Strategy for Brain Neuroglial Cells Employing Nanoparticles Modified with Angiopep-2 Peptide and EGFP-EGF1 Protein. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8669–8675.
 - (105) Xin, H.; Jiang, X.; Gu, J.; Sha, X.; Chen, L.; Law, K.; Chen, Y.; Wang, X.; Jiang, Y.; Fang, X. Angiopep-Conjugated Poly(Ethylene Glycol)-Co-Poly(ϵ -Caprolactone) Nanoparticles as Dual-Targeting Drug Delivery System for Brain Glioma. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4293–4305.
 - (106) Ying, X.; Wang, Y.; Liang, J.; Yue, J.; Xu, C.; Lu, L.; Xu, Z.; Gao, J.; Du, Y.; Chen, Z. Angiopep-Conjugated Electro-Responsive Hydrogel Nanoparticles: Therapeutic Potential for Epilepsy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 12436–12440.
 - (107) Ren, J.; Shen, S.; Wang, D.; Xi, Z.; Guo, L.; Pang, Z.; Qian, Y.; Sun, X.; Jiang, X. The Targeted Delivery of Anticancer Drugs to Brain Glioma by PEGylated Oxidized Multi-Walled Carbon Nanotubes Modified with Angiopep-2. *Biomaterials* **2012**, *33*, 3324–3333.
 - (108) Ruan, S.; Yuan, M.; Zhang, L.; Hu, G.; Chen, J.; Cun, X.; Zhang, Q.; Yang, Y.; He, Q.; Gao, H. Tumor Microenvironment Sensitive Doxorubicin Delivery and Release to Glioma Using Angiopep-2 Decorated Gold Nanoparticles. *Biomaterials* **2015**, *37*, 425–435.
 - (109) Gao, H.; Zhang, S.; Cao, S.; Yang, Z.; Pang, Z.; Jiang, X. Angiopep-2 and Activatable Cell-Penetrating Peptide Dual-Functionalized Nanoparticles for Systemic Glioma-Targeting Delivery. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 2755–2763.
 - (110) Mei, L.; Zhang, Q.; Yang, Y.; He, Q.; Gao, H. Angiopep-2 and Activatable Cell Penetrating Peptide Dual Modified Nanoparticles for Enhanced Tumor Targeting and Penetrating. *Int. J. Pharm.* **2014**, *474*, 95–102.
 - (111) Saba, N. F.; Khuri, F. R.; Shin, D. M. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor. Trials in Head and Neck and Lung Cancer. *Oncology* **2006**, *20*, 153–161.
 - (112) Rowinsky, E. K. The ErbB Family: Targets for Therapeutic Development Against Cancer and Therapeutic Strategies Using Monoclonal Antibodies and Tyrosine Kinase Inhibitors. *Annu. Rev. Med.* **2004**, *55*, 433–457.
 - (113) Roskoski, R. The ErbB/HER Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 1–11.
 - (114) Bianco, R.; Gelardi, T.; Damiano, V.; Ciardiello, F.; Tortora, G. Rational Bases for the Development of EGFR Inhibitors for Cancer Treatment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 1416–1431.

- (115) Jimeno, A.; Hidalgo, M. Blockade of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Activity. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, *53*, 179–192.
- (116) Hamzeh-Mivehroud, M.; Mahmoudpour, A.; Dastmalchi, S. Identification of New Peptide Ligands for Epidermal Growth Factor Receptor Using Phage Display and Computationally Modeling Their Mode of Binding. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79*, 246–259.
- (117) Han C. Y., Yue L. L., Tai L. Y., Zhou L., Li X. Y., Xing G. H., Yang X. G., Sun M. S., Pan W. S. A Novel Small Peptide as an Epidermal Growth Factor Receptor Targeting Ligand for Nanodelivery in Vitro. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 1541–1549.
- (118) Han, C.; Li, Y.; Sun, M.; Liu, C.; Ma, X.; Yang, X.; Yuan, Y.; Pan, W. Small Peptide-Modified Nanostructured Lipid Carriers Distribution and Targeting to EGFR-Overexpressing Tumor in Vivo. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2014**, *42*, 161–166.
- (119) Sachdeva, S.; Joo, H.; Tsai, J.; Jasti, B.; Li, X. A Rational Approach for Creating Peptides Mimicking Antibody Binding. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 997.
- (120) Li, Z.; Zhao, R.; Wu, X.; Sun, Y.; Yao, M.; Li, J.; Xu, Y.; Gu, J. Identification and Characterization of a Novel Peptide Ligand of Epidermal Growth Factor Receptor for Targeted Delivery of Therapeutics. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1978–1985.
- (121) Mickler, F. M.; Möckl, L.; Ruthardt, N.; Ogris, M.; Wagner, E.; Bräuchle, C. Tuning Nanoparticle Uptake: Live-Cell Imaging Reveals Two Distinct Endocytosis Mechanisms Mediated by Natural and Artificial EGFR Targeting Ligand. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 3417–3423.
- (122) Milane, L.; Duan, Z.; Amiji, M. Pharmacokinetics and Biodistribution of Lonidamine / Paclitaxel Loaded , EGFR-Targeted Nanoparticles in an Orthotopic Animal Model of Multi-Drug Resistant Breast Cancer. *Nanomedicine* **2011**, *7*, 435–444.
- (123) Kopansky, E.; Shamay, Y.; David, A. Peptide-Directed HPMA Copolymer-Doxorubicin Conjugates as Targeted Therapeutics for Colorectal Cancer. *J. Drug Target.* **2011**, *19*, 933–943.
- (124) Ren, H.; Gao, C.; Zhou, L.; Liu, M.; Xie, C.; Lu, W. EGFR-Targeted Poly(Ethylene Glycol)-Distearoylphosphatidylethanolamine Micelle Loaded with Paclitaxel for Laryngeal Cancer: Preparation, Characterization and in Vitro Evaluation. *Drug Deliv.* **2015**, *22*, 785–794.
- (125) Ren, H.; Zhou, L.; Liu, M.; Lu, W.; Gao, C. Peptide GE11 – Polyethylene Glycol – Polyethylenimine for Targeted Gene Delivery in Laryngeal Cancer. *Med. Oncol.* **2015**, *32*, 185.
- (126) Vetter, A.; Viridi, K. S.; Espenlaub, S.; Rödl, W.; Wagner, E.; Holm, P. S.; Scheu, C.; Kreppel, F.; Spitzweg, C.; Ogris, M. Adenoviral Vectors Coated with PAMAM Dendrimer Conjugates Allow CAR Independent Virus Uptake and Targeting to the EGF Receptor. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 606–618.
- (127) Ohno, S. I.; Takanashi, M.; Sudo, K.; Ueda, S.; Ishikawa, A.; Matsuyama, N.; Fujita, K.; Mizutani, T.; Ohgi, T.; Ochiya, T.; et al. Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor Microrna to Breast Cancer Cells. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 185–191.
- (128) Ongarora, B. G.; Fontenot, K. R.; Hu, X.; Sehgal, I.; Satyanarayana-Jois, S. D.; Vicente, M. G. H. Phthalocyanine–Peptide Conjugates for Epidermal Growth Factor Receptor Targeting. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3725–3738.
- (129) Dixit, S.; Miller, K.; Zhu, Y.; McKinnon, E.; Novak, T.; Kenney, M. E.; Broome, A. M. Dual Receptor-Targeted Theranostic Nanoparticles for Localized Delivery and Activation of Photodynamic Therapy Drug in Glioblastomas. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 3250–3260.
- (130) Fontenot, K. R.; Ongarora, B. G.; LeBlanc, L. E.; Zhou, Z.; Jois, S. D.; Vicente, M. G. Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor with Mesoporphyrin IX-Peptide

- Conjugates. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2016**, *20*, 352–366.
- (131) Song, S.; Liu, D.; Peng, J.; Deng, H.; Guo, Y.; Xu, L. X.; Miller, A. D.; Xu, Y. Novel Peptide Ligand Directs Liposomes toward EGF-R High-Expressing Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *FASEB J.* **2009**, *23*, 1396–1404.
- (132) Kaufman, N. E. M.; Meng, Q.; Griffin, K. E.; Singh, S. S.; Dahal, A.; Zhou, Z.; Fronczek, F. R.; Mathis, J. M.; Jois, S. D.; Vicente, M. G. H. Synthesis, Characterization, and Evaluation of Near-IR Boron Dipyrromethene Bioconjugates for Labeling of Adenocarcinomas by Selectively Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 3323–3335.
- (133) Najjar, V. A.; Nishioka, K. ‘Tuftsin’: A Natural Phagocytosis Stimulating Peptide. *Nature* **1970**, *228*, 672–673.
- (134) Najjar, V. A. Tuftsin, A Natural Activator of Phagocyte Cells: An Overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1983**, *419*, 1–11.
- (135) Siemion, I. Z.; Kluczyk, A. Tuftsin: On the 30-Year Anniversary of Victor Najjar’s Discovery. *Peptides* **1999**, *20*, 645–674.
- (136) Najjar, V. A.; Lineman, L.; Konopińska, D. The Antineoplastic Effects of Tuftsin and Tuftsinyltuftsin on B16/5B Melanoma and L1210 Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1983**, *419*, 261–267.
- (137) Lukács, K.; Szabó, G.; Sonkoly, I.; Végh, É.; Gács, J.; Szekerke, M.; Szegedi, G. Stimulating Effect of Tuftsin and Its Analogues on the Defective Monocyte Chemotaxis in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunopharmacology* **1984**, *7*, 171–178.
- (138) Najjar, V. A.; Konopinska, D.; Chaudhuri, M. K.; Schmidt, D. E.; Linehan, L. Tuftsin, a Natural Activator of Phagocytic Functions Including Tumoricidal Activity. *Mol. Cell. Biochem.* **1981**, *41*, 3–12.
- (139) Gokulan, K.; Khare, S.; Rao, D. N. Increase in the Immunogenicity of HIV Peptide Antigens by Chemical Linkage to Polytuftsin (TKPR40). *DNA Cell Biol.* **1999**, *18*, 623–630.
- (140) Kumar, P.; Biswas, S.; Rao, D. N. Potentiation of Immune Response against the RESA Peptides of Plasmodium Falciparum by Incorporating a Universal T-Cell Epitope (CS.T3) and an Immunomodulator (Polytuftsin), and Delivery through Liposomes. *Microbiol. Immunol.* **1999**, *43*, 567–576.
- (141) Pawan, K.; Ivanov, B. B.; Kabilan, L.; Rao, D. N. Construction of a Synthetic Immunogen: Use of the Natural Immunomodulator Polytuftsin in Malaria Vaccines against RESA Antigen of Plasmodium Falciparum. *Vaccine* **1994**, *12*, 819–824.
- (142) Trudelle, Y.; Brack, A.; Delmas, A.; Pedoussaut, S.; Rivaille, P. Synthesis of a New Carrier for Immunization: Polytuftsin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30*, 54–60.
- (143) Bump, N. J.; Lee, J.; Wleklík, M.; Reichler, J.; Najjar, V. A. Isolation and Subunit Composition of Tuftsin Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 7187–7191.
- (144) von Wronski, M. A.; Raju, N.; Pillai, R.; Bogdan, N. J.; Marinelli, E. R.; Nanjappan, P.; Ramalingam, K.; Arunachalam, T.; Eaton, S.; Linder, K. E.; et al. Tuftsin Binds Neuropilin-1 through a Sequence Similar to That Encoded by Exon 8 of Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 5702–5710.
- (145) Ellis, L. M. The Role of Neuropilins in Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1099–1107.
- (146) Appleton, B. A.; Wu, P.; Maloney, J.; Yin, J.; Liang, W.; Stawicki, S.; Mortara, K.; Bowman, K. K.; Elliott, J. M.; Desmarais, W.; Bazan, J. F.; et al. Structural Studies of Neuropilin / Antibody Complexes Provide Insights into Semaphorin and VEGF Binding. *EMBO J.* **2007**, *26*, 4902–4912.
- (147) Teesalu, T.; Sugahara, K. N.; Kotamraju, V. R.; Ruoslahti, E. C-End Rule Peptides Mediate

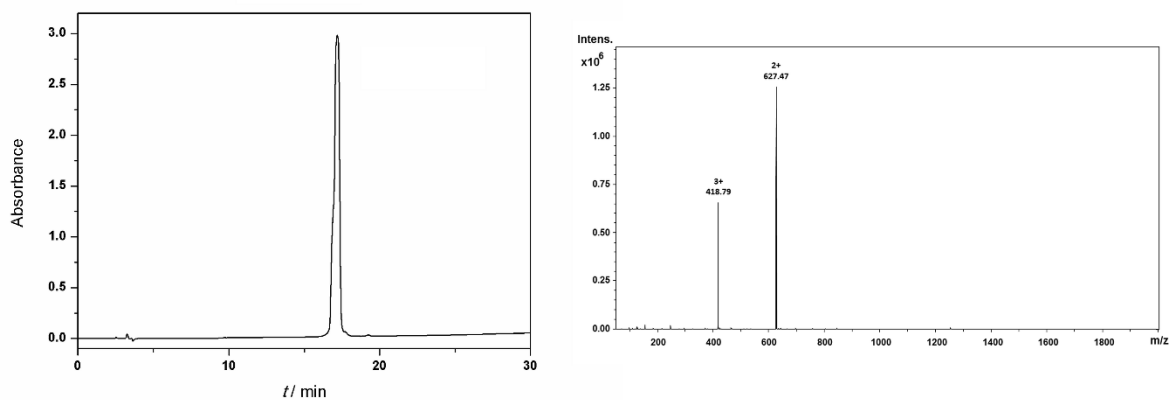
- Neuropilin-1-Dependent Cell , Vascular , and Tissue Penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 16157–16162.
- (148) Tzehoval, E.; Segal, S.; Stabinsky, Y.; Fridkin, M.; Spirer, Z.; Feldman, M. Tuftsin (an Ig-Associated Tetrapeptide) Triggers the Immunogenic Function of Macrophages : Implications for Activation of Programmed Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 3400–3404.
- (149) Fridkin, M. Najjar, V. A. Tuftsin: Its Chemistry, Biology, and Clinical Potential. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1989**, *24*, 1–40.
- (150) Mező, G.; Kalászi, A.; Reményi, J.; Majer, Z.; Hilbert, Á.; Láng, O.; Kőhidai, L.; Barna, K.; Gaál, D.; Hudecz, F. Synthesis, Conformation, and Immunoreactivity of New Carrier Molecules Based on Repeated Tuftsin-like Sequence. *Biopolymers* **2004**, *73*, 645–656.
- (151) Mező, G.; Szekerke, M.; Sármay, G.; Gergely, J. Synthesis and Functional Studies of Tuftsin Analogs Containing Isopeptide Bond. *Peptides* **1990**, *11*, 405–415.
- (152) Bai, K. B. Hatóanyagok Irányított Célbajuttatására Alkalmazott Biokonjugátumok Szintézise És Vizsgálata, PhD disszertáció, ELTE Budapest, **2009**.
- (153) Bai, K. B.; Láng, O.; Orbán, E.; Szabó, R.; Kőhidai, L.; Hudecz, F.; Mező, G. Design, Synthesis, and in Vitro Activity of Novel Drug Delivery Systems Containing Tuftsin Derivatives and Methotrexate. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2260–2269.
- (154) Kukowska-Kaszuba, M.; Dzierzbicka, K.; Serocki, M.; Skladanowski, A. Solid Phase Synthesis and Biological Activity of Tuftsin Conjugates. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2447–2454.
- (155) Romieu, A.; Bruckdorfer, T.; Clavé, G.; Grandclaude, V.; Massif, C.; Renard, P.-Y. N-Fmoc- α -Sulfo- β -Alanine: A Versatile Building Block for the Water Solubilisation of Chromophores and Fluorophores by Solid-Phase Strategy. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5337–5342.
- (156) Evers, T. H.; van Dongen, E. M.; Faesen, A. C.; Meijer, E. W.; Merckx, M. Quantitative Understanding of the Energy Transfer between Fluorescent Proteins Connected via Flexible Peptide Linkers. *Biochemistry* **2006**, *45*, 13183–13192.
- (157) Paraskevopoulou, V.; Falcone, F. H. Polyionic Tags as Enhancers of Protein Solubility in Recombinant Protein Expression. *Microorganisms* **2018**, *6*, 47.
- (158) Veronese, F. M.; Mero, A. The Impact of PEGylation on Biological Therapies. *BioDrugs* **2008**, *22*, 315–329.
- (159) Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 6288–6308.
- (160) Abbina, S.; Vappala, S.; Kumar, P.; Siren, E. M. J.; La, C. C.; Abbasi, U.; Brooks, D. E.; Kizhakkedathu, J. N. Hyperbranched Polyglycerols: Recent Advances in Synthesis, Biocompatibility and Biomedical Applications. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 9249–9277.
- (161) Moore, E.; Zill, A. T.; Anderson, C. A.; Jochem, A. R.; Zimmerman, S. C.; Bonder, C. S.; Kraus, T.; Thissen, H.; Voelcker, N. H. Synthesis and Conjugation of Alkyne-Functional Hyperbranched Polyglycerols. *Macromol. Chem. Phys.* **2016**, *217*, 2252–2261.
- (162) Beezer, D. B.; Harth, E. Post-Polymerization Modification of Branched Polyglycidol with N-Hydroxy Phthalimide to Give Ratio-Controlled Amino-Oxy Functionalized Species. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2016**, *54*, 2820–2825.
- (163) Kasza, G.; Kali, G.; Domján, A.; Pethő, L.; Szarka, G.; Iván, B. Synthesis of Well-Defined Phthalimide Monofunctional Hyperbranched Polyglycerols and Its Transformation to Various Conjugation Relevant Functionalities. *Macromolecules* **2017**, *50*, 3078–3088.

- (164) Rejmanová, P.; Kopeček, J.; Pohl, J.; Baudyš, M.; Kostka, V. Polymers Containing Enzymatically Degradable Bonds 8. Degradation of Oligopeptide Sequences in *N*-(2-hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers by Bovine Spleen Cathepsin B. *Makromol. Chem.* **1983**, *184*, 2009–2020.
- (165) Peterson, J. J.; Meares, C. F. Cathepsin Substrates as Cleavable Peptide Linkers in Bioconjugates, Selected from a Fluorescence Quench Combinatorial Library. *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9*, 618–626.
- (166) Orbán, E.; Mező, G.; Schlage, P.; Csík, G.; Kulić, Ž.; Ansorge, P.; Fellingner, E.; Möller, H. M.; Manea, M. In Vitro Degradation and Antitumor Activity of Oxime Bond-Linked Daunorubicin-GnRH-III Bioconjugates and DNA-Binding Properties of Daunorubicin-Amino Acid Metabolites. *Amino Acids* **2011**, *41*, 469–483.
- (167) Rypa, C.; Mann-Steinberg, H.; Fichtner, I.; Weber, H.; Satchi-Fainaro, R.; Biniossek, M. L.; Kratz, F. In Vitro and in Vivo Evaluation of Doxorubicin Conjugates with the Divalent Peptide E-[c(RGDfK)₂] That Targets Integrin $\alpha_v\beta_3$. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1414–1422.
- (168) Schuster, S.; Biri-Kovács, B.; Szeder, B.; Buday, L.; Gardi, J.; Szabó, Z.; Halmos, G.; Mező, G. Enhanced in Vitro Antitumor Activity of GnRH-III-Daunorubicin Bioconjugates Influenced by Sequence Modification. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 223.
- (169) Pappa, E. V.; Zompra, A. A.; Diamantopoulou, Z.; Spyrali, Z.; Pairas, G.; Lamari, F. N.; Katsoris, P.; Spyroulias, G. A.; Cordopatis, P. Structure-Activity Studies of LGnRH-III through Rational Amino Acid Substitution and NMR Conformational Studies. *Biopolymers* **2012**, *98*, 525–534.
- (170) Murányi, J.; Gyulavári, P.; Varga, A.; Bökönyi, G.; Tanai, H.; Vántus, T.; Pap, D.; Ludányi, K.; Mező, G.; Kéri, G. Synthesis, Characterization and Systematic Comparison of FITC-Labelled GnRH-I, -II and -III Analogues on Various Tumour Cells. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 552–560.
- (171) WHO, Cancer Country Profiles, 2014 https://www.who.int/cancer/country-profiles/hun_en.pdf (accessed Oct 29, 2019).
- (172) Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 1941–1953.
- (173) Grandis, J. R.; Tweardy, D. J. Elevated Levels of Transforming Growth Factor α and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3579–3584.
- (174) Kuang, J.; Zhao, M.; Li, H.; Dang, W.; Li, W. Identification of Potential Therapeutic Target Genes and Mechanisms in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Bioinformatics Analysis. *Oncol. Lett.* **2016**, *11*, 3009–3014.
- (175) Brand, T. M.; Iida, M.; Wheeler, D. L. Molecular Mechanisms of Resistance to the EGFR Monoclonal Antibody Cetuximab. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *11* (9), 777–792. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.9.15050>.
- (176) Orbán, E.; Mező, G.; Schlage, P.; Csík, G.; Kulić, Ž.; Ansorge, P.; Fellingner, E.; Möller, H. M.; Manea, M. In Vitro Degradation and Antitumor Activity of Oxime Bond-Linked Daunorubicin-GnRH-III Bioconjugates and DNA-Binding Properties of Daunorubicin-Amino Acid Metabolites. *Amino Acids* **2011**, *41*, 469–483.
- (177) Yun, M.; Kim, D. Y.; Lee, J.; Kim, H. S.; Kim, H. S.; Pyo, A.; Ryu, Y.; Kim, T. Y.; Zheng, J. H.; Yoo, S. W.; et al. A High-Affinity Repebody for Molecular Imaging of EGFR-Expressing Malignant Tumors. *Theranostics* **2017**, *7*, 2620–2633.
- (178) Enyedi, K. N.; Tóth, S.; Szakács, G.; Mező, G. NGR-Peptide-Drug Conjugates with Dual

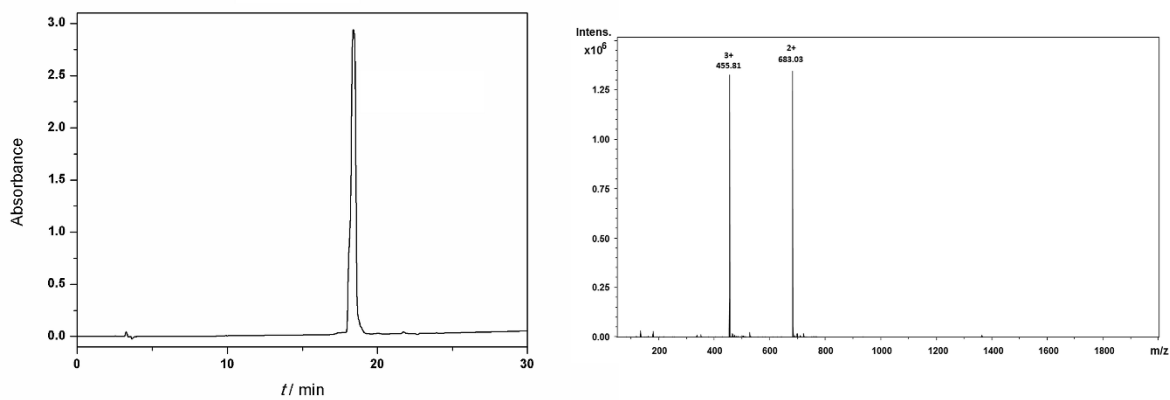
- Targeting Properties. *PLoS One* **2017**, *12*, e0178632.
- (179) ExPASy - ProtParam tool <https://web.expasy.org/protparam/> (accessed Nov 13, 2019).
- (180) Wysocki, V. H.; Tsaprailis, G.; Smith, L. L.; Breci, L. A. Mobile and Localized Protons: A Framework for Understanding Peptide Dissociation. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1399–1406.
- (181) Boyd, R.; Somogyi, Á. The Mobile Proton Hypothesis in Fragmentation of Protonated Peptides: A Perspective. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 1275–1278.
- (182) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- (183) The Nobel Prize in Chemistry 1984 - NobelPrize.org <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1984/summary/> (accessed Oct 7, 2019).
- (184) Albericio, F.; Lloyd-Williams, P.; Giralt, E. Convergent Solid-Phase Peptide Synthesis. *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 313–336.
- (185) Merrifield, B. *Life during a Golden Age of Peptide Chemistry: The Concept and Development of Solid-Phase Peptide Synthesis*; J.I., S., Ed.; ACS: Washington, D.C., **1993**.
- (186) Stawikowski, M.; Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2012**, *69*, 1–13.
- (187) Han, S. Y.; Kim, Y. A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467.
- (188) Subirós-Funosas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. PyOxP and PyOxB: The Oxyma-Based Novel Family of Phosphonium Salts. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3665–3673.
- (189) Carpino, L. A.; Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. **1972**, *37*, 3404–3409.
- (190) Fields, G. B. Methods for Removing the Finoc Group. In *Peptide Synthesis Protocols*; Humana Press: New Jersey, 1994; Vol. 35, 17–28.
- (191) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- (192) Kaiser, E.; Bossinger, C. D.; Colescott, R. L.; Olsen, D. B. Color Test for Terminal Prolyl Residues in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Chim. Acta* **1980**, *118*, 149–151.
- (193) Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Stavropoulos, G. 2-Chlorotriyl Chloride Resin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 513–520.
- (194) Mergler, M.; Tanner, R.; Gosteli, J.; Grogg, P. Peptide Synthesis by a Combination of Solid-Phase and Solution Methods I: A New Very Acid-Labile Anchor Group for the Solid Phase Synthesis of Fully Protected Fragments. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005–4008.
- (195) Wang, S.-S. *p*-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and *p*-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328–1333.
- (196) Bernatowicz, M. S.; Daniels, S. B.; Köster, H. A Comparison of Acid Labile Linkage Agents for the Synthesis of Peptide C-Terminal Amides. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645–4648.
- (197) Renil, M.; Meldal, M. POEPOP and POEPS: Inert Polyethylene Glycol Crosslinked Polymeric Supports for Solid Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6185–6188.
- (198) Dános, K.; Brauswetter, D.; Birtalan, E.; Pató, A.; Bencsik, G.; Krenács, T.; Peták, I.; Tamás, L. The Potential Prognostic Value of Connexin 43 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2016**, *24*, 476–481.
- (199) Cappuzzo, F.; Hirsch, F. R.; Rossi, E.; Bartolini, S.; Ceresoli, G. L.; Bemis, L.; Haney, J.; Witta, S.; Danenberg, K.; Domenichini, I.; et al. Epidermal Growth Factor Receptor Gene

- and Protein and Gefitinib Sensitivity in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 643–655.
- (200) Hirsch, F. R.; Varella-Garcia, M.; Bunn, P. A.; Di Maria, M. V.; Veve, R.; Bremnes, R. M.; Barón, A. E.; Zeng, C.; Franklin, W. A. Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 3798–3807.
- (201) Halmos, G.; Arencibia, J. M.; Schally, A. V.; Davis, R.; Bostwick, D. G. High Incidence of Receptors for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) and LHRH Receptor Gene Expression in Human Prostate Cancers. *J. Urol.* **2000**, *163*, 623–629.
- (202) Topel, Ö.; Çakir, B. A.; Budama, L.; Hoda, N. Determination of Critical Micelle Concentration of Polybutadiene-Block-Poly(Ethyleneoxide) Diblock Copolymer by Fluorescence Spectroscopy and Dynamic Light Scattering. *J. Mol. Liq.* **2013**, *177*, 40–43.
- (203) Pethő, L.; Murányi, J.; Péntzes, K.; Gurbi, B.; Brauswetter, D.; Halmos, G.; Csik, G.; Mező, G. Suitability of GnRH Receptors for Targeted Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5027.
- (204) Pethő, L.; Mező, G.; Schlosser, G. Overcharging Effect in Electrospray Ionization Mass Spectra of Daunomycin-Tuftsinn Bioconjugates. *Molecules* **2019**, *24*, 2981.

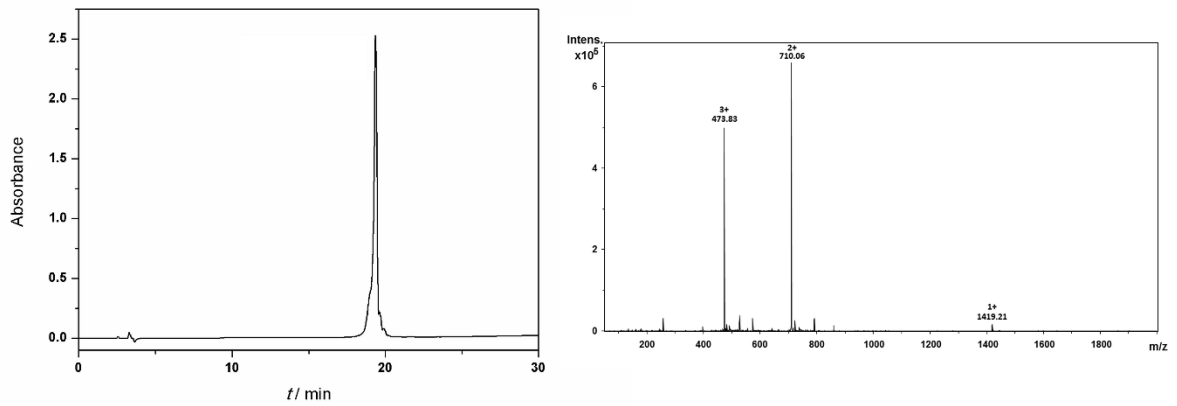
10 Függelék



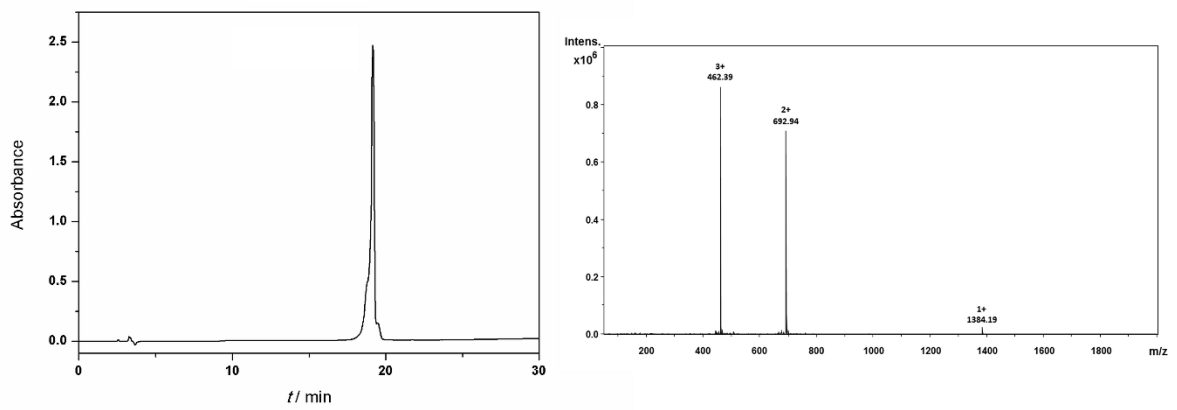
F1. ábra GnRH-I-[6D -Lys] (1) analitikai kromatogramja és MS spektruma



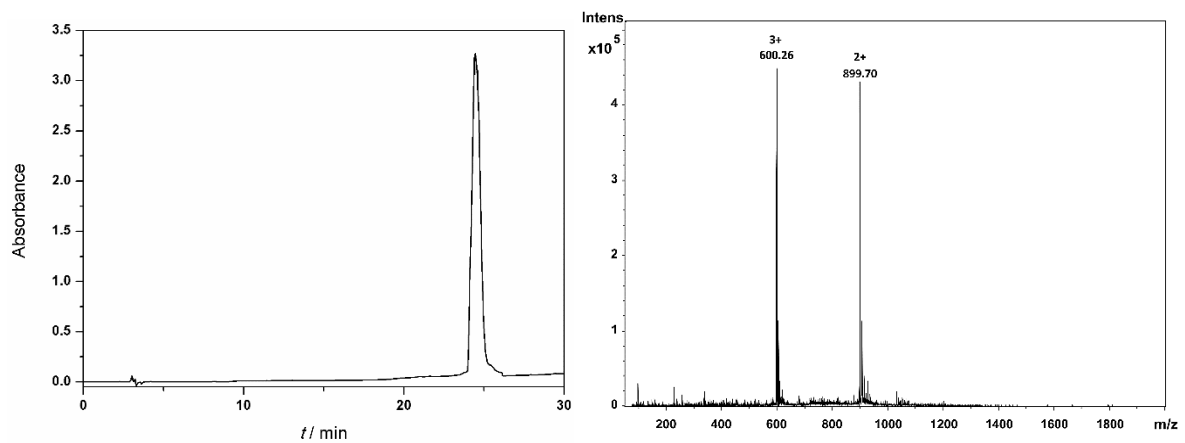
F2. ábra GnRH-I-[$^4\text{Lys}(\text{Bu})$, 6D -Lys] (2) analitikai kromatogramja és MS spektruma



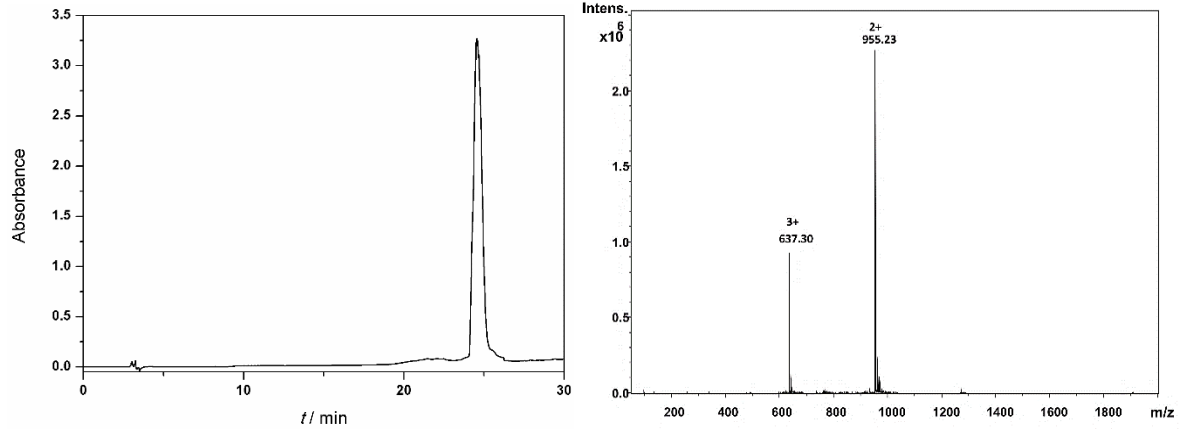
F3. ábra GnRH-II[⁴Lys(Bu), ⁶D-Lys] (**3**) analitikai kromatogramja és MS spektruma



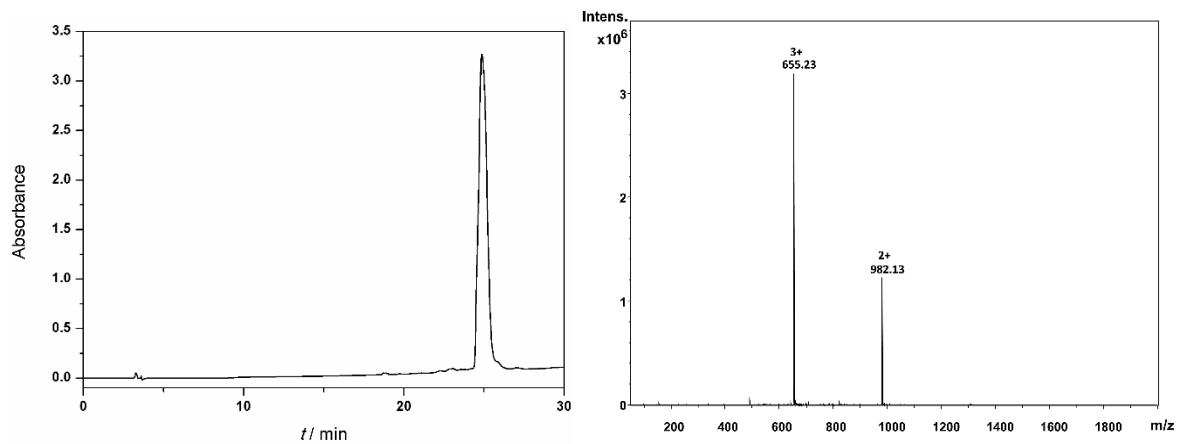
F4. ábra GnRH-III[⁴Lys(Bu), ⁶Asp(OMe)] (**4**) analitikai kromatogramja és MS spektruma



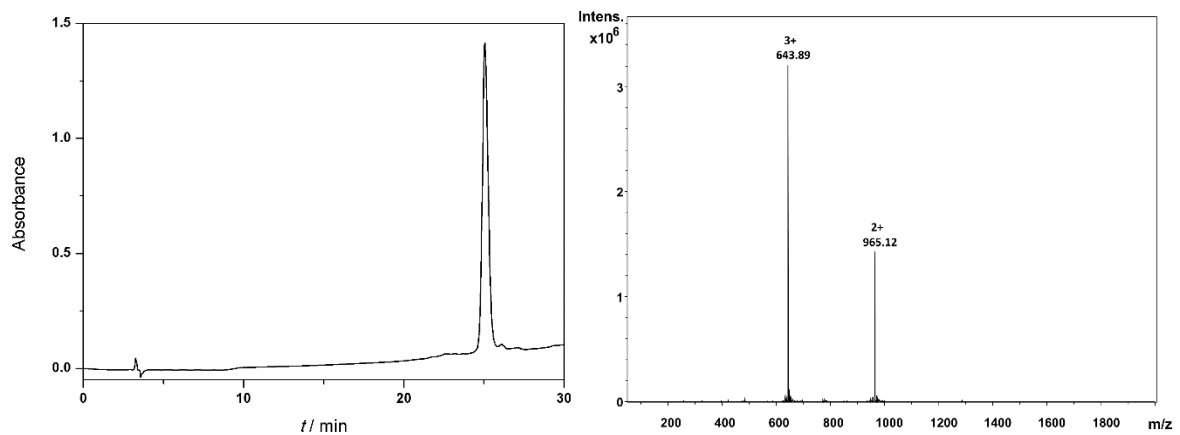
F5. ábra GnRH-I[⁶D-Lys(PpIX)] (**5**) analitikai kromatogramja és MS spektruma



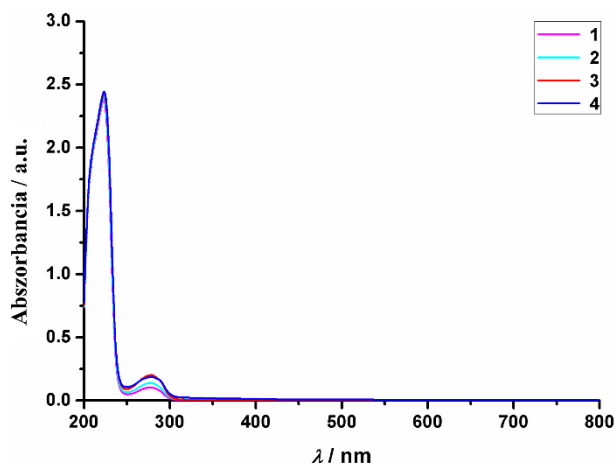
F6. ábra GnRH-I[⁴Lys(Bu), ⁶D-Lys(PpIX)] (**6**) analitikai kromatogramja és MS spektruma



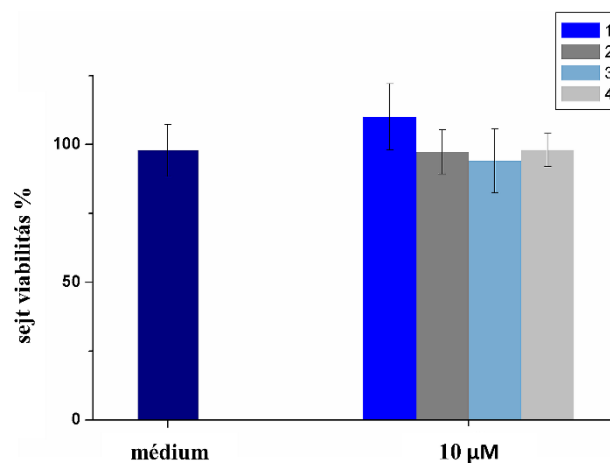
F7. ábra GnRH-II[⁴Lys(Bu), ⁶D-Lys(PpIX)] (**7**) analitikai kromatogramja és MS spektruma



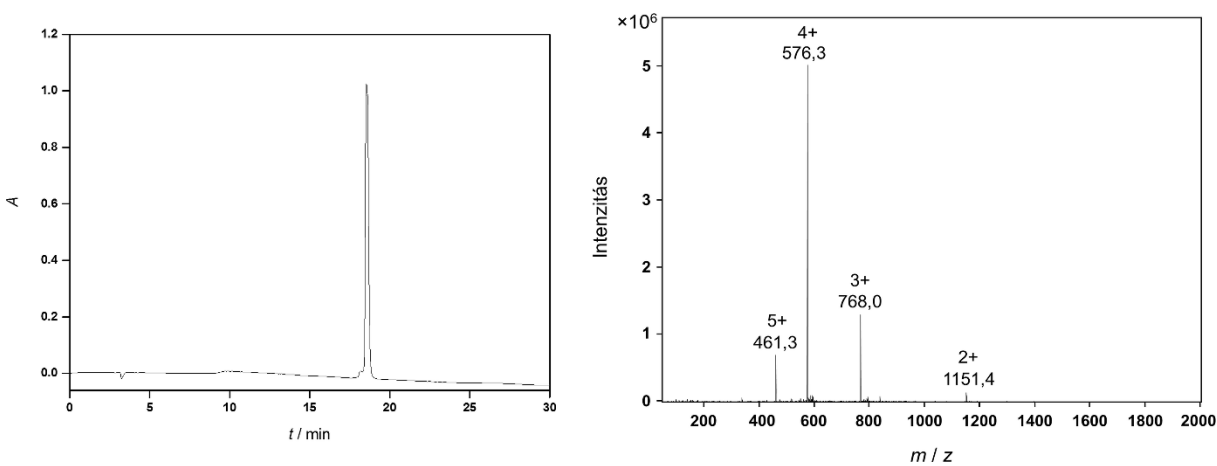
F8. ábra GnRH-III[⁴Lys(Bu), ⁶Asp(OMe), ⁸Lys(PpIX)] (**8**) analitikai kromatogramja és MS spektruma



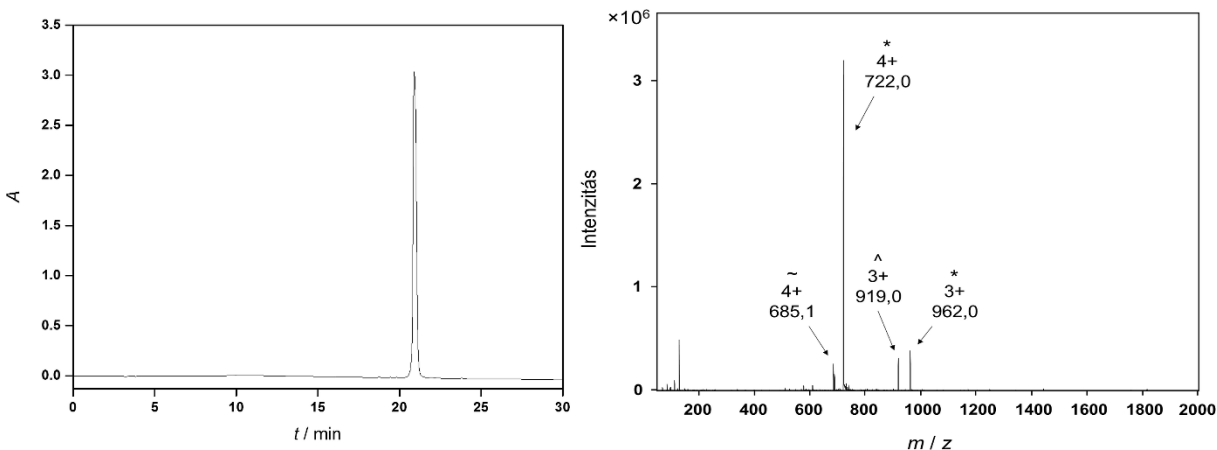
F9. ábra A GnRH analógok (1-4) UV-Vis spektrumai 200-800 nm között mérve



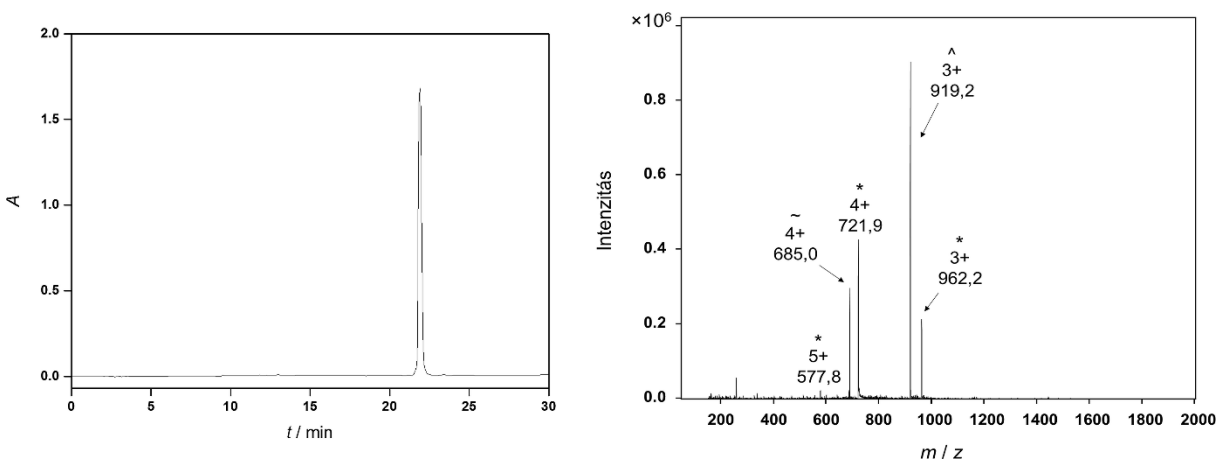
F10. ábra A sejtenyészítő médium és a GnRH analógok (1-4) *in vitro* sejt viabilitás gátlása. A sejt viabilitási értékek a DMSO kontroll %-ában vannak kifejezve.



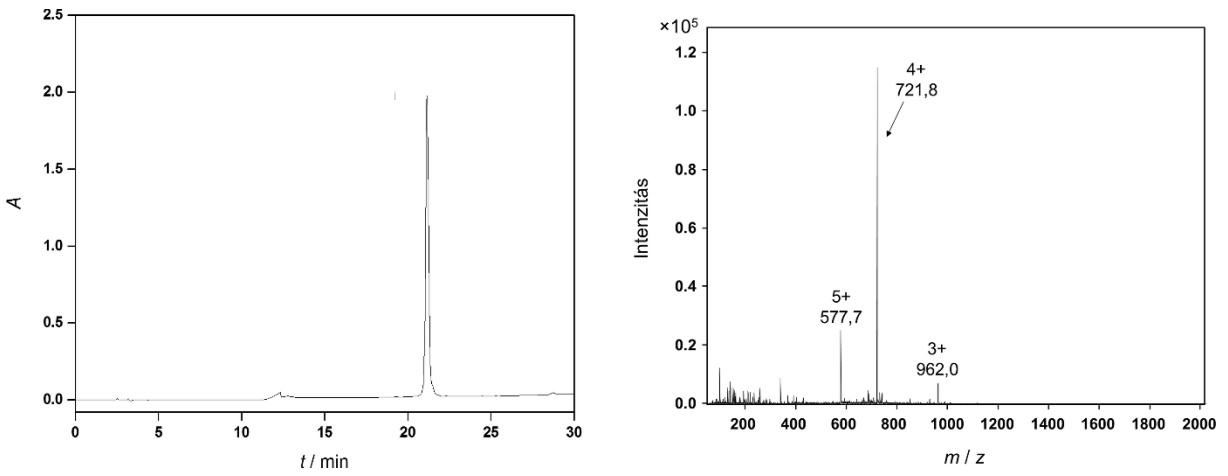
F11. ábra Angiopep-2 (9) analitikai kromatogramja és MS spektruma



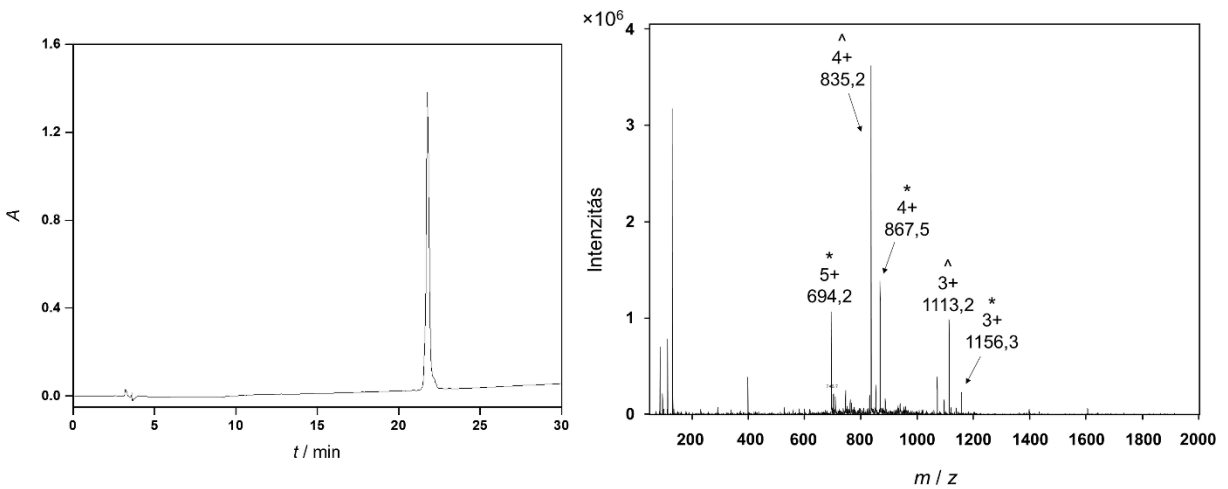
F12. ábra H-TFFYGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH (**10**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A⁻ és [^] jelekkel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmensekhez tartoznak.



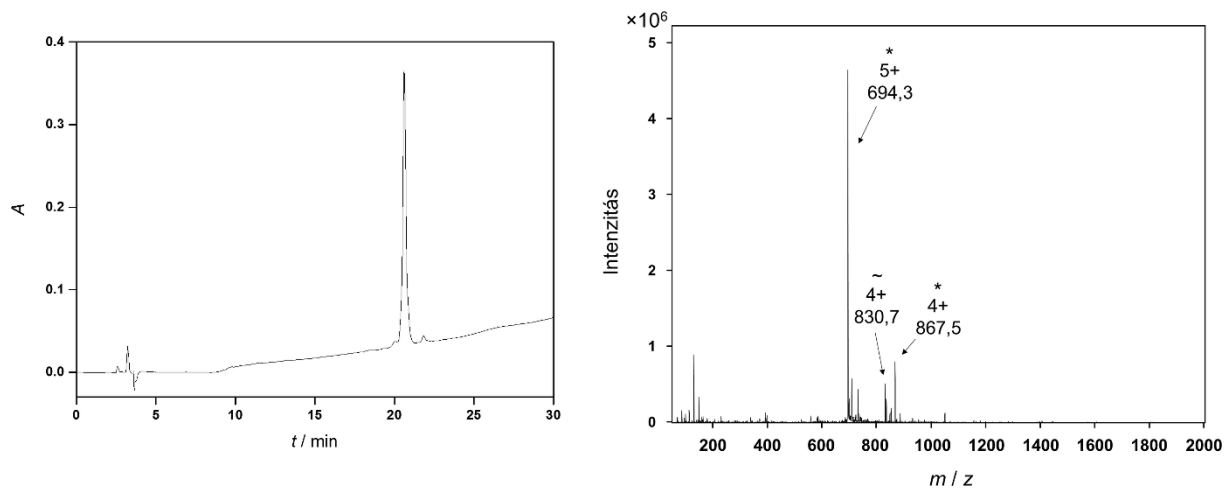
F13. ábra Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH (**11**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A⁻ és [^] jelekkel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmensekhez tartoznak.



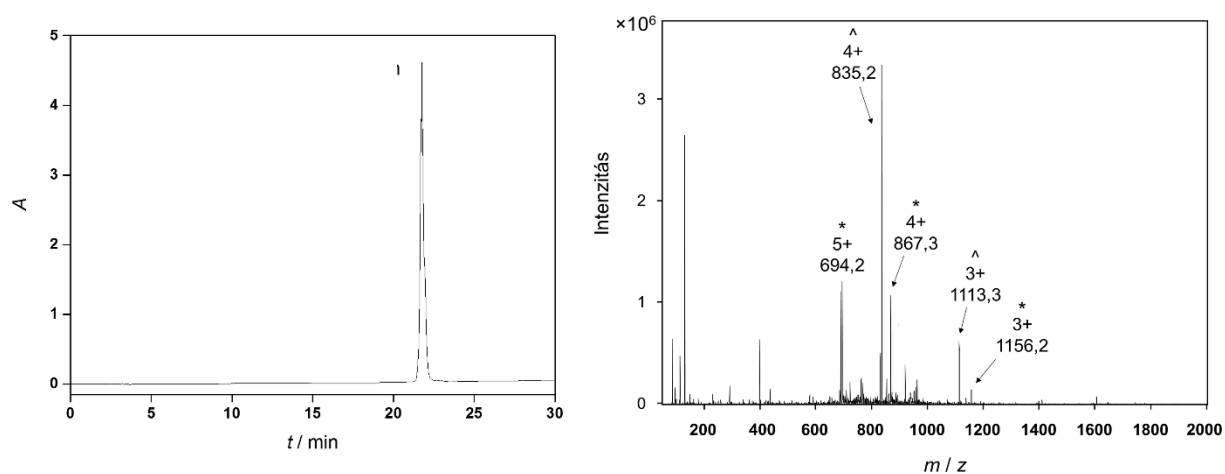
F14. ábra H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH (**12**) analitikai kromatogramja és MS spektruma



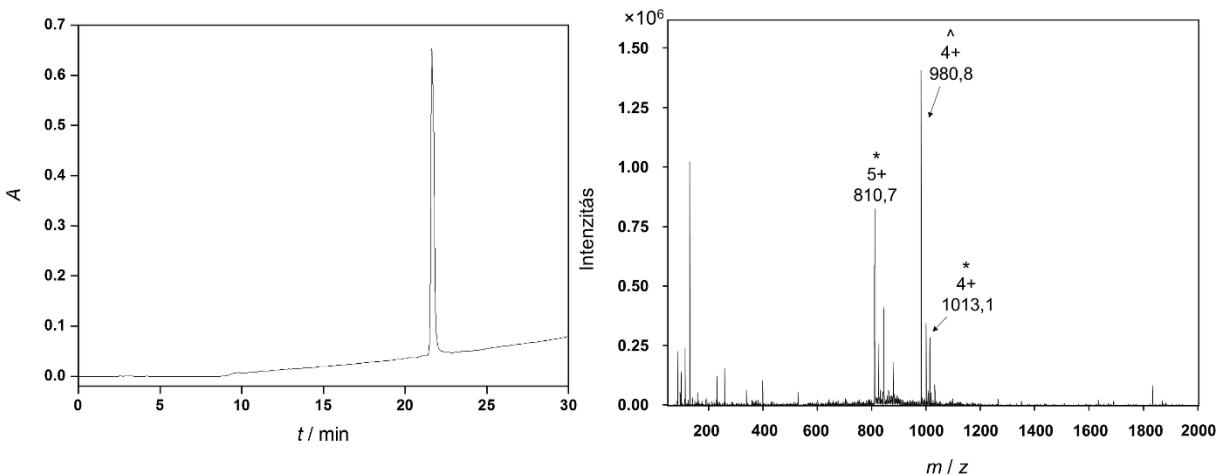
F15. ábra Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH (**13**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A ^ jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



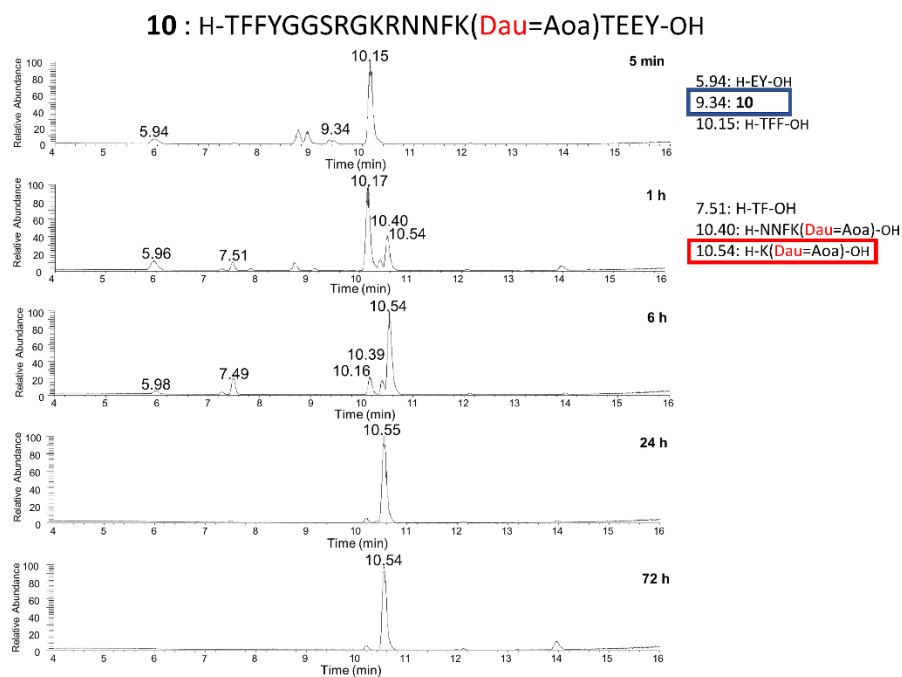
F16. ábra H-TFFYGGSRG(Dau=Aoa)KRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH (**14**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A \sim jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



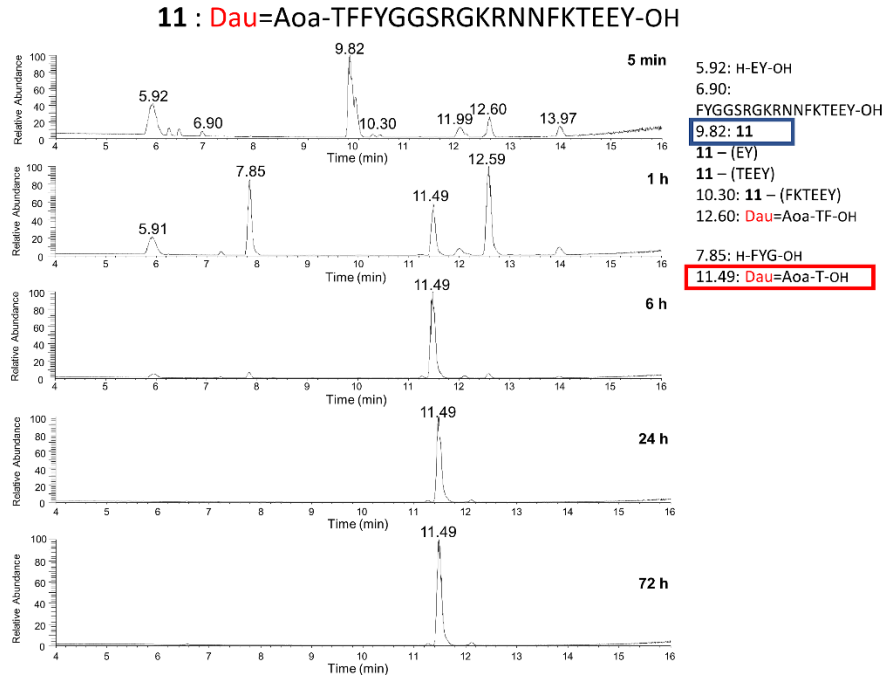
F17. ábra Dau=Aoa-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH (**15**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A \wedge jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



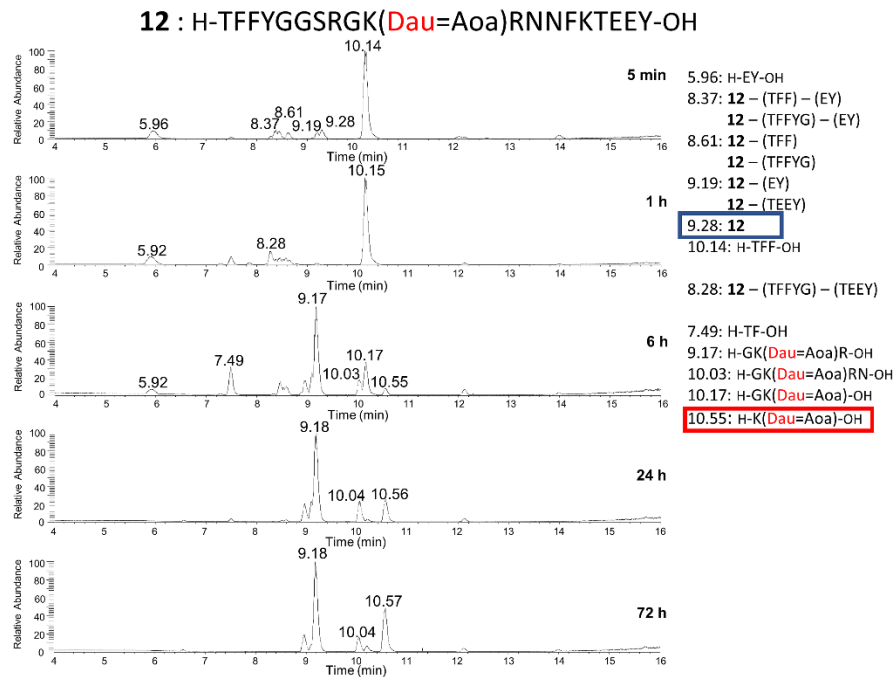
F18. ábra Dau=Aoa-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH (**16**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A ^ jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragszerekhez tartoznak.



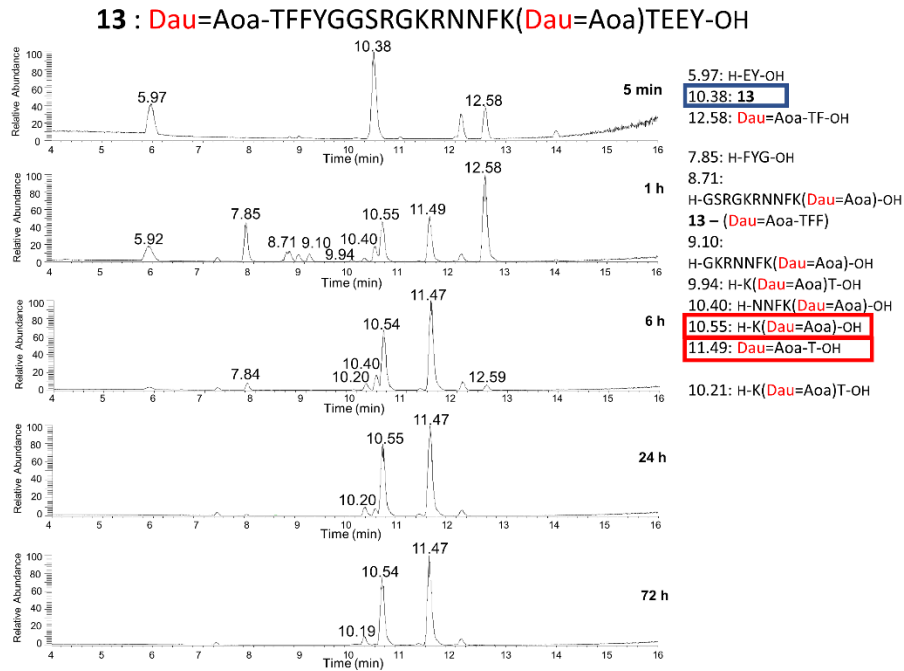
F19. ábra 10 konjugátum lizoszóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai



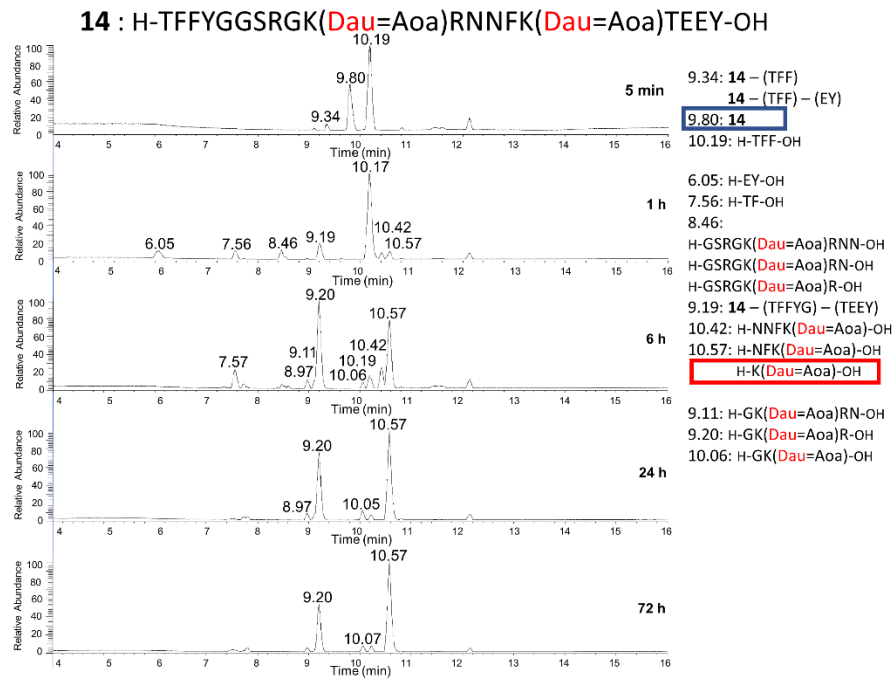
F20. ábra 11 konjugátum lizoszóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai



F21. ábra 12 konjugátum lizoszóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai

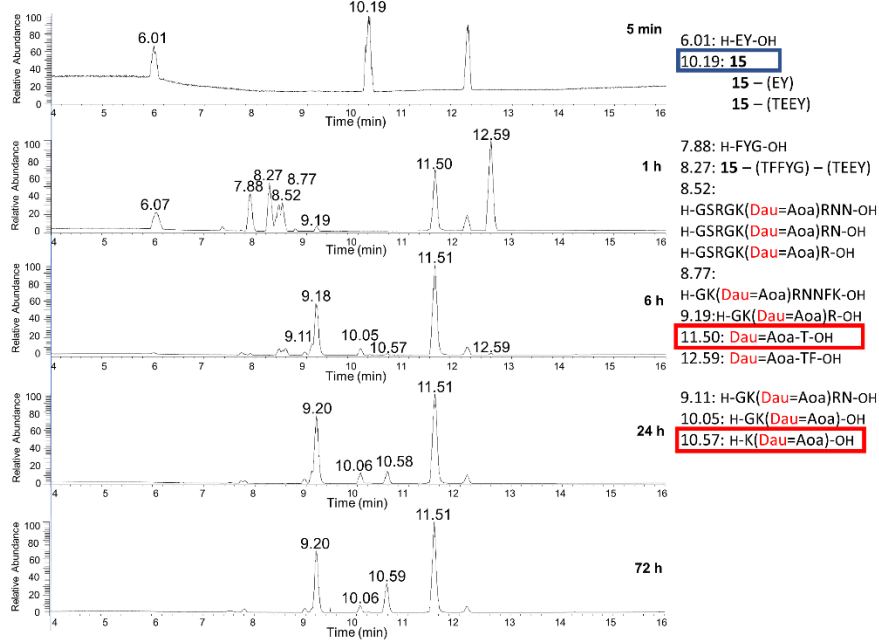


F22. ábra 13 konjugátum lizoszóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai



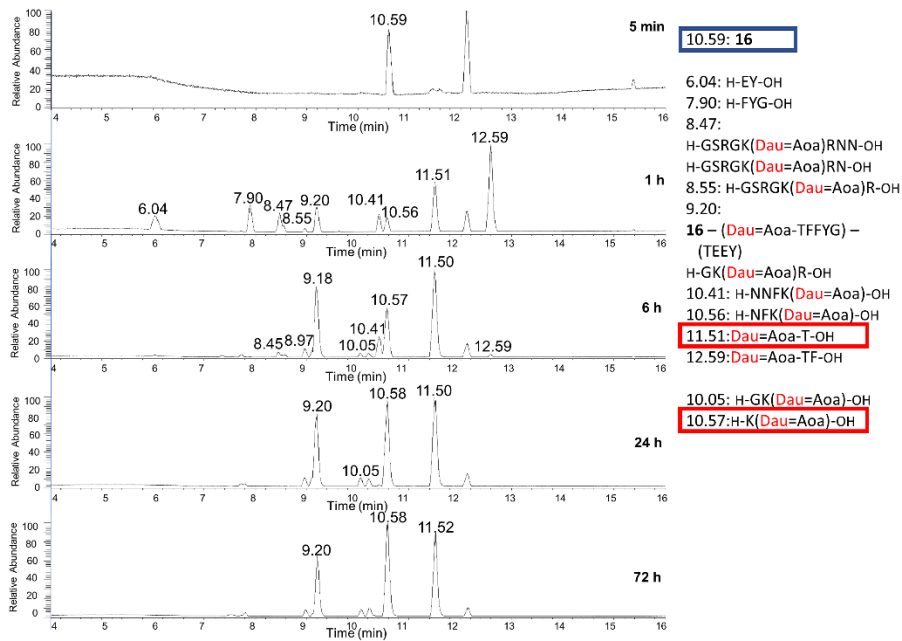
F23. ábra 14 konjugátum lizoszóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai

15 : Dau=Aoa-TFFYGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH



F24. ábra 15 konjugátum lizoszóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai

16 : Dau=Aoa-TFFYGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH



F25. ábra 16 konjugátum lizoszóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai

F1. táblázat 10 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

	Fragmens	Összegképlet	MW_{számolt}	MW_{mért}	Δ ppm
1	H-TFFYGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	C ₁₃₃ H ₁₇₉ N ₃₁ O ₄₂	2882.2824	2882.2761	-2.19
2	H-TFFYGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TE-OH	C ₁₁₉ H ₁₆₃ N ₂₉ O ₃₇	2590.1765	2590.1682	-3.20
3	H-YGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	C ₁₁₁ H ₁₅₄ N ₂₈ O ₃₈	2487.0979	2487.0928	-2.05
4	H-YGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TE-OH	C ₉₇ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₃₃	2194.9920	2194.9866	-2.46
5	H-YGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₈₈ H ₁₂₄ N ₂₄ O ₂₈	1964.9017	1964.8953	-3.26
6	H-GKRNNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₆₆ H ₉₂ N ₁₆ O ₂₁	1444.6623	1444.6582	-2.84
7	H-NNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₅₂ H ₆₅ N ₉ O ₁₈	1103.4448	1103.4420	-2.54
8	H-K(Dau=Aoa)T-OH	C ₃₉ H ₅₁ N ₅ O ₁₅	829.3382	829.3358	-2.89
9	H-K(Dau=Aoa)-OH	C ₃₅ H ₄₄ N ₄ O ₁₃	728.2905	728.2878	-3.71
10	H-TFF-OH	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₅	413.1951	413.1937	-3.39
11	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1151	-4.51
12	H-TF-OH	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄	266.1267	266.1254	-4.88

F2. táblázat 11 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

	Fragmens	Összegképlet	MW_{számolt}	MW_{mért}	Δ ppm
1	Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH	C ₁₃₃ H ₁₇₉ N ₃₁ O ₄₂	2882.2824	2882.2767	-1.98
2	Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFKTE-OH	C ₁₁₉ H ₁₆₃ N ₂₉ O ₃₇	2590.1765	2590.1716	-1.89
3	Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFK-OH	C ₁₁₀ H ₁₄₉ N ₂₇ O ₃₂	2360.0862	2360.0796	-2.80
4	Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNN-OH	C ₉₅ H ₁₂₈ N ₂₄ O ₃₀	2084.9228	2084.9196	-1.53
5	H-FYGGSRGKRNNFKTEEY-OH	C ₉₁ H ₁₃₃ N ₂₇ O ₂₈	2051.9813	2051.9760	-2.58
6	Dau=Aoa-TF-OH	C ₄₂ H ₄₈ N ₄ O ₁₅	848.3116	848.3095	-2.48
7	Dau=Aoa-T-OH	C ₃₃ H ₃₉ N ₃ O ₁₄	701.2432	701.2408	-3.42
8	H-FYG-OH	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₅	385.1638	385.1624	-3.63
9	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1152	-4.19

F3. táblázat 12 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

	Fragmens	Összegképlet	MW_{számolt}	MW_{mért}	Δ ppm
1	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH	C ₁₃₃ H ₁₇₉ N ₃₁ O ₄₂	2882.2824	2882.2764	-2.08
2	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTE-OH	C ₁₁₉ H ₁₆₃ N ₂₉ O ₃₇	2590.1765	2590.1694	-2.74
3	H-YGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH	C ₁₁₁ H ₁₅₄ N ₂₈ O ₃₈	2487.0979	2487.0903	-3.06
4	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK-OH	C ₁₁₀ H ₁₄₉ N ₂₇ O ₃₂	2360.0862	2360.0793	-2.92
5	H-GSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH	C ₁₀₀ H ₁₄₂ N ₂₆ O ₃₅	2267.0131	2267.0070	-2.69
6	H-YGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTE-OH	C ₉₇ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₃₃	2194.9920	2194.9876	-2.00
7	H-YGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK-OH	C ₈₈ H ₁₂₄ N ₂₄ O ₂₈	1964.9017	1964.8970	-2.39
8	H-GSRGK(Dau=Aoa)RNNFK-OH	C ₇₇ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₂₅	1744.8169	1744.8122	-2.69
9	H-GK(Dau=Aoa)RN-OH	C ₄₇ H ₆₅ N ₁₁ O ₁₇	1055.4560	1055.4530	-2.84
10	H-GK(Dau=Aoa)R-OH	C ₄₃ H ₅₉ N ₉ O ₁₅	941.4131	941.4102	-3.08
11	H-GK(Dau=Aoa)-OH	C ₃₇ H ₄₇ N ₅ O ₁₄	785.3120	785.3096	-3.06
12	H-K(Dau=Aoa)-OH	C ₃₅ H ₄₄ N ₄ O ₁₃	728.2905	728.2887	-2.47
13	H-TFF-OH	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₅	413.1951	413.1937	-3.39
14	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1152	-4.19
15	H-TF-OH	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄	266.1267	266.1255	-4.51

F4. táblázat 13 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

	Fragmens	Összegképlet	MW_{számolt}	MW_{mért}	Δ ppm
1	Dau=Aoa-TFFYGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	C ₁₆₂ H ₂₀₉ N ₃₃ O ₅₃	3464.4673	3464.4582	-2.63
2	H-YGGSRGKRNNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₈₈ H ₁₂₄ N ₂₄ O ₂₈	1964.9017	1964.8962	-2.80
3	H-GSRGKRNNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₇₇ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₂₅	1744.8169	1744.8106	-3.61
4	H-GKRNNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₆₆ H ₉₂ N ₁₆ O ₂₁	1444.6623	1444.6576	-3.25
5	H-NNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₅₂ H ₆₅ N ₉ O ₁₈	1103.4448	1103.4419	-2.63
6	Dau=Aoa-TF-OH	C ₄₂ H ₄₈ N ₄ O ₁₅	848.3116	848.3092	-2.83
7	H-K(Dau=Aoa)T-OH	C ₃₉ H ₅₁ N ₅ O ₁₅	829.3382	829.3361	-2.53
8	H-K(Dau=Aoa)-OH	C ₃₅ H ₄₄ N ₄ O ₁₃	728.2905	728.2876	-3.98
9	Dau=Aoa-T-OH	C ₃₃ H ₃₉ N ₃ O ₁₄	701.2432	701.2411	-2.99
10	H-FYG-OH	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₅	385.1638	385.1623	-3.89
11	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1151	-4.51

F5. táblázat 14 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

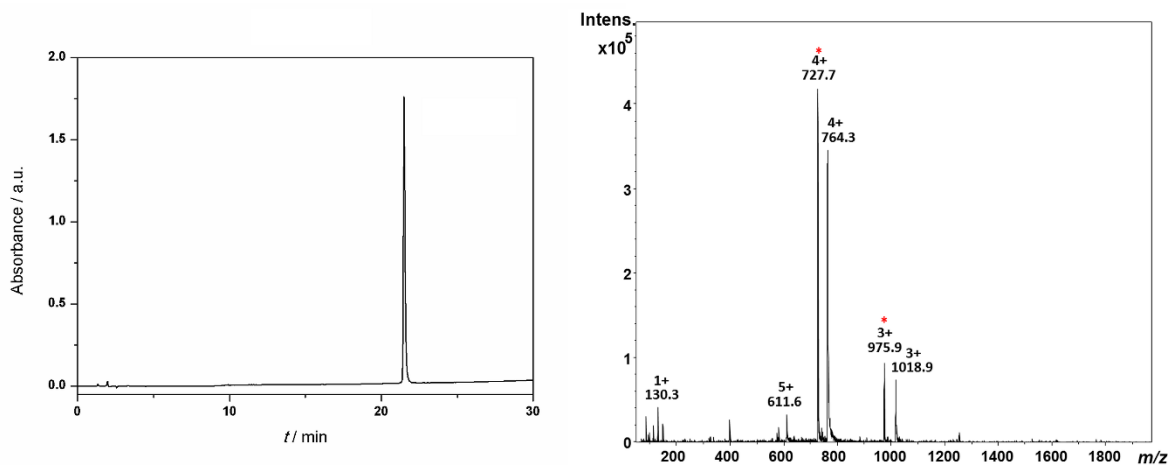
	Fragmens	Összegképlet	MW_{számolt}	MW_{mért}	Δ ppm
1	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	C ₁₆₂ H ₂₀₉ N ₃₃ O ₅₃	3464.4673	3464.4564	-3.15
2	H-YGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	C ₁₄₀ H ₁₈₄ N ₃₀ O ₄₉	3069.2828	3069.2739	-2.90
3	H-YGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TE-OH	C ₁₂₆ H ₁₆₈ N ₂₈ O ₄₄	2777.1769	2777.1666	-3.71
4	H-GSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₁₀₆ H ₁₄₂ N ₂₄ O ₃₆	2327.0019	2326.9952	-2.88
5	H-GSRGK(Dau=Aoa)RNN-OH	C ₆₂ H ₉₁ N ₁₉ O ₂₃	1469.6535	1469.6480	-3.74
6	H-GSRGK(Dau=Aoa)RN-OH	C ₅₈ H ₈₅ N ₁₇ O ₂₁	1355.6106	1355.6060	-3.39
7	H-GSRGK(Dau=Aoa)R-OH	C ₅₄ H ₇₉ N ₁₅ O ₁₉	1241.5677	1241.5640	-2.98
8	H-NNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₅₂ H ₆₅ N ₉ O ₁₈	1103.4447	1103.4414	-2.99
9	H-GK(Dau=Aoa)RN-OH	C ₄₇ H ₆₅ N ₁₁ O ₁₇	1055.4560	1055.4522	-3.60
10	H-NFK(Dau=Aoa)-OH	C ₄₈ H ₅₉ N ₇ O ₁₆	989.4018	989.3988	-3.03
11	H-GK(Dau=Aoa)R-OH	C ₄₃ H ₅₉ N ₉ O ₁₅	941.4131	941.4094	-3.93
12	H-GK(Dau=Aoa)-OH	C ₃₇ H ₄₇ N ₅ O ₁₄	785.3120	785.3088	-4.07
13	H-K(Dau=Aoa)-OH	C ₃₅ H ₄₄ N ₄ O ₁₃	728.2905	728.2880	-3.43
14	H-TFF-OH	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₅	413.1951	413.1930	-5.08
15	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1149	-5.16
16	H-TF-OH	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄	266.1267	266.1253	-5.26

F6. táblázat 15 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

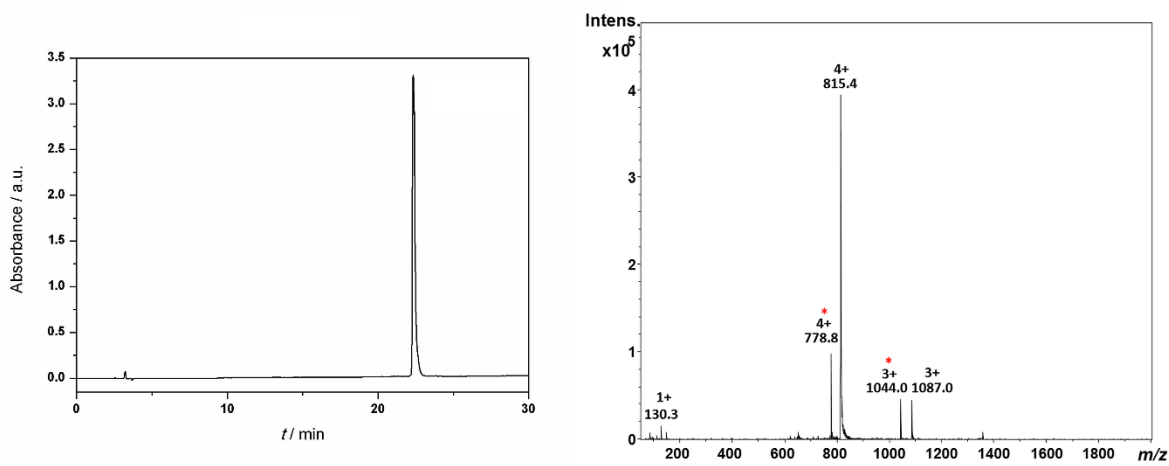
	Fragmens	Összegképlet	MW_{számolt}	MW_{mért}	Δ ppm
1	Dau=Aoa-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTEEY-OH	C ₁₆₂ H ₂₀₉ N ₃₃ O ₅₃	3464.4673	3464.4546	-3.67
2	Dau=Aoa-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFKTE-OH	C ₁₄₈ H ₁₉₃ N ₃₁ O ₄₈	3172.3614	3172.3488	-3.97
3	Dau=Aoa-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK-OH	C ₁₃₉ H ₁₇₉ N ₂₉ O ₄₃	2942.2712	2942.2614	-3.33
4	H-GSRGK(Dau=Aoa)RNNFK-OH	C ₇₇ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₂₅	1744.8169	1744.8093	-4.36
5	H-GSRGK(Dau=Aoa)RNN-OH	C ₆₂ H ₉₁ N ₁₉ O ₂₃	1469.6535	1469.6476	-4.01
6	H-GK(Dau=Aoa)RNNFK-OH	C ₆₆ H ₉₂ N ₁₆ O ₂₁	1444.6623	1444.6576	-3.25
7	H-GSRGK(Dau=Aoa)RN-OH	C ₅₈ H ₈₅ N ₁₇ O ₂₁	1355.6106	1355.6052	-3.98
8	H-GSRGK(Dau=Aoa)R-OH	C ₅₄ H ₇₉ N ₁₅ O ₁₉	1241.5677	1241.5628	-3.95
9	H-GK(Dau=Aoa)RN-OH	C ₄₇ H ₆₅ N ₁₁ O ₁₇	1055.4560	1055.4522	-3.60
10	H-GK(Dau=Aoa)R-OH	C ₄₃ H ₅₉ N ₉ O ₁₅	941.4131	941.4101	-3.19
11	H-GK(Dau=Aoa)-OH	C ₃₇ H ₄₇ N ₅ O ₁₄	785.3120	785.3090	-3.82
12	Dau=Aoa-TF-OH	C ₄₂ H ₄₈ N ₄ O ₁₅	848.3116	848.3084	-3.77
13	H-K(Dau=Aoa)-OH	C ₃₅ H ₄₄ N ₄ O ₁₃	728.2905	728.2880	-3.43
14	Dau=Aoa-T-OH	C ₃₃ H ₃₉ N ₃ O ₁₄	701.2432	701.2402	-4.28
15	H-FYG-OH	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₅	385.1638	385.1619	-4.93
16	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1148	-5.48

F7. táblázat 16 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

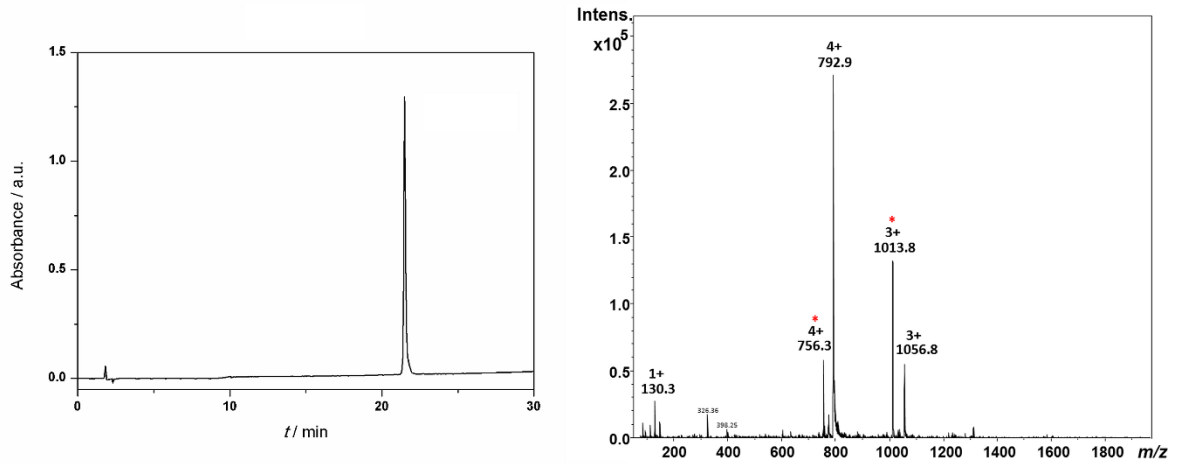
	Fragmens	Összegképlet	MW_{számolt}	MW_{mért}	Δ ppm
1	Dau=Aoa-TFFYGSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)TEEY-OH	C₁₉₁H₂₃₉N₃₅O₆₄	4046.6523	4046.6460	-1.56
2	H-GSRGK(Dau=Aoa)RNNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₁₀₆ H ₁₄₂ N ₂₄ O ₃₆	2327.0019	2326.9950	-2.97
3	H-GSRGK(Dau=Aoa)RNN-OH	C ₆₂ H ₉₁ N ₁₉ O ₂₃	1469.6535	1469.6478	-3.88
4	H-GSRGK(Dau=Aoa)RN-OH	C ₅₈ H ₈₅ N ₁₇ O ₂₁	1355.6106	1355.6058	-3.54
5	H-GSRGK(Dau=Aoa)R-OH	C ₅₄ H ₇₉ N ₁₅ O ₁₉	1241.5677	1241.5634	-3.46
6	H-NNFK(Dau=Aoa)-OH	C ₅₂ H ₆₅ N ₉ O ₁₈	1103.4447	1103.4409	-3.44
7	H-NFK(Dau=Aoa)-OH	C ₄₈ H ₅₉ N ₇ O ₁₆	989.4018	989.3984	-3.44
8	H-GK(Dau=Aoa)R-OH	C ₄₃ H ₅₉ N ₉ O ₁₅	941.4131	941.4094	-3.93
9	Dau=Aoa-TF-OH	C₄₂H₄₈N₄O₁₅	848.3116	848.3082	-4.01
10	H-GK(Dau=Aoa)-OH	C ₃₇ H ₄₇ N ₅ O ₁₄	785.3120	785.3090	-3.82
11	H-K(Dau=Aoa)-OH	C ₃₅ H ₄₄ N ₄ O ₁₃	728.2905	728.2877	-3.84
12	Dau=Aoa-T-OH	C₃₃H₃₉N₃O₁₄	701.2432	701.2401	-4.42
13	H-FYG-OH	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₅	385.1638	385.1619	-4.93
14	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1149	-5.16



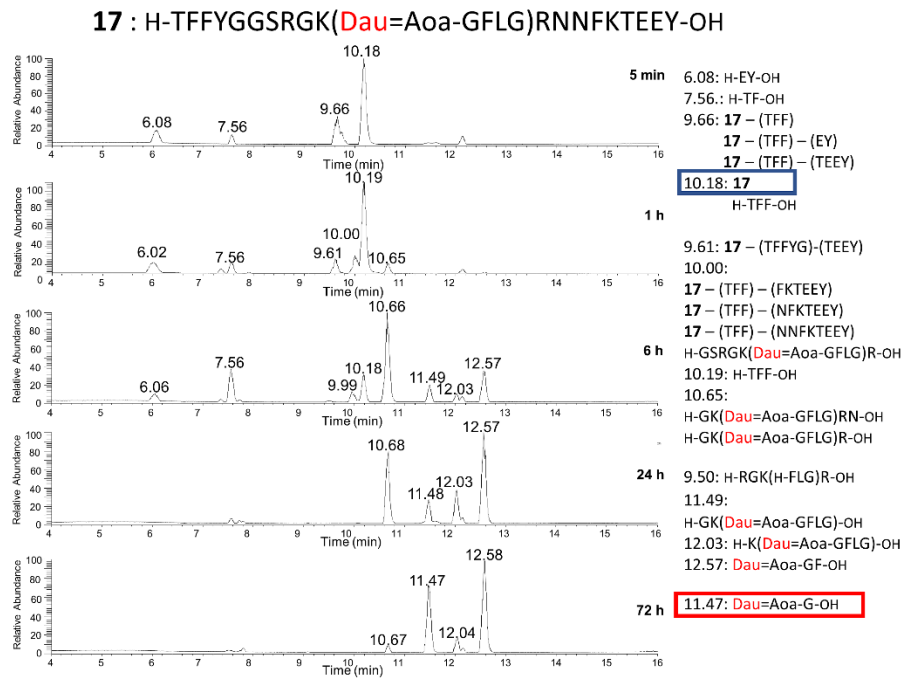
F26. ábra H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RNNFKTEEY-OH (**17**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A * jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



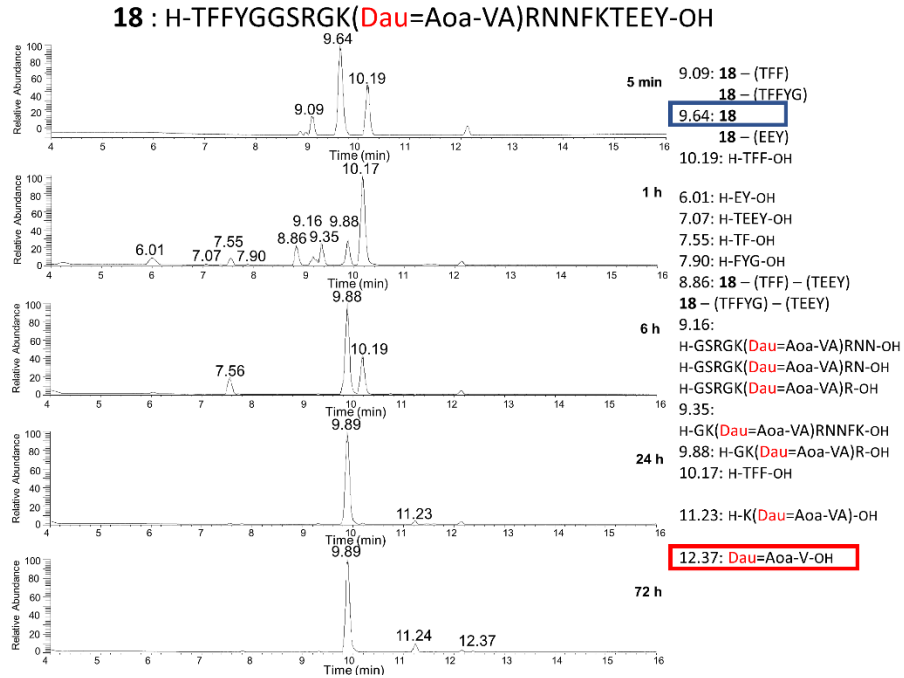
F27. ábra H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VA)RNNFKTEEY-OH (**18**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A * jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



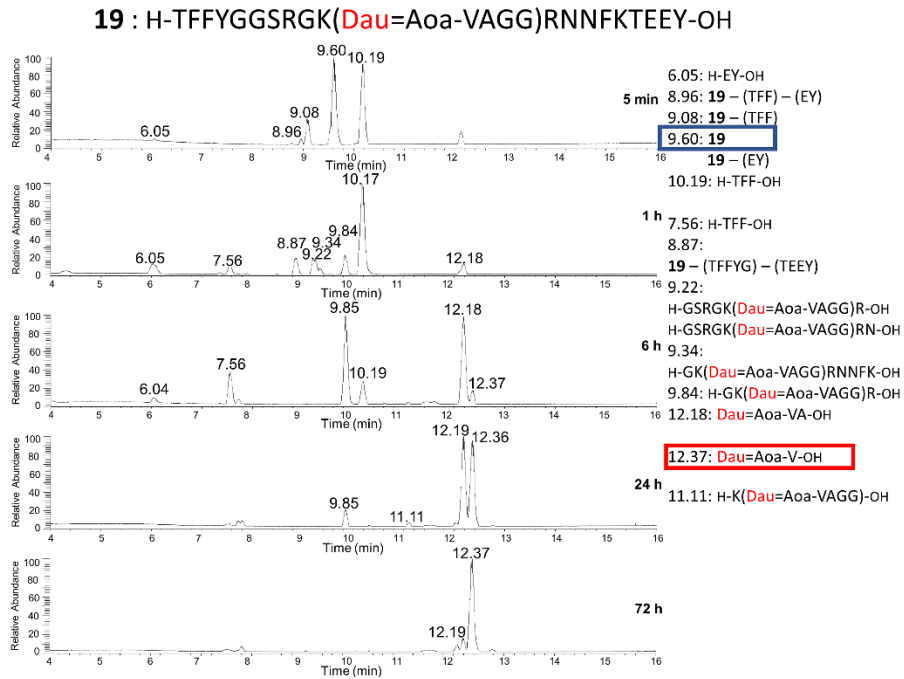
F28. ábra H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VAGG)RNNFKTEEY-OH (**19**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A * jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



F29. ábra 17 konjugátum lizozóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai



F30. ábra 18 konjugátum lizoszóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai



F31. ábra 19 konjugátum lizoszóma degradáció során detektált totál ion kromatogramjai

F8. táblázat 17 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

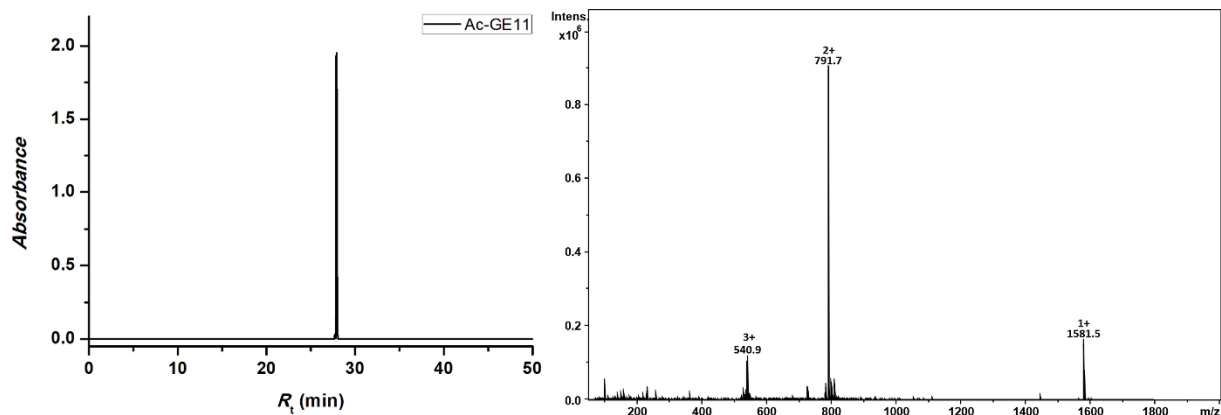
	Fragmens	Összegképlet	MW _{számolt}	MW _{mért}	Δ ppm
1	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RNNFKTEEY-OH	C ₁₅₂ H ₂₀₅ N ₃₅ O ₄₆	3256.4778	3256.4668	-3.38
2	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RNNFKTEEY-OH	C ₁₃₀ H ₁₈₀ N ₃₂ O ₄₂	2861.2933	2861.2815	-4.12
3	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RNNFKTE-OH	C ₁₁₆ H ₁₆₄ N ₃₀ O ₃₇	2569.1874	2569.1775	-3.85
4	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RNNFK-OH	C ₁₀₇ H ₁₅₀ N ₂₈ O ₃₂	2339.0971	2339.0868	-4.40
5	H-GSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RNNFK-OH	C ₉₆ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₂₉	2119.0123	2119.0026	-4.58
6	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RNN-OH	C ₉₂ H ₁₂₉ N ₂₅ O ₃₀	2063.9337	2063.9258	-3.83
7	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RN-OH	C ₈₈ H ₁₂₃ N ₂₃ O ₂₈	1949.8908	1949.8828	-4.10
8	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)R-OH	C ₈₄ H ₁₁₇ N ₂₁ O ₂₆	1835.8479	1835.8404	-4.09
9	H-GGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)RN-OH	C ₇₉ H ₁₁₄ N ₂₂ O ₂₆	1786.8275	1786.8196	-4.42
10	H-GGSRGK(Dau=Aoa-GFLG)R-OH	C ₇₅ H ₁₀₈ N ₂₀ O ₂₄	1672.7845	1672.7776	-4.12
11	H-GSRGK(Dau=Aoa-GFLG)R-OH	C ₇₃ H ₁₀₅ N ₁₉ O ₂₃	1615.7631	1615.7556	-4.64
12	H-GK(Dau=Aoa-GFLG)RN-OH	C ₆₆ H ₉₁ N ₁₅ O ₂₁	1429.6514	1429.6454	-4.20
13	H-GK(Dau=Aoa-GFLG)R-OH	C ₆₂ H ₈₅ N ₁₃ O ₁₉	1315.6085	1315.6038	-3.57
14	H-GK(Dau=Aoa-GFLG)-OH	C ₅₆ H ₇₃ N ₉ O ₁₈	1159.5074	1159.5041	-2.85
15	H-K(Dau=Aoa-GFLG)-OH	C ₅₄ H ₇₀ N ₈ O ₁₇	1102.4859	1102.4827	-2.90
16	Dau=Aoa-GF-OH	C ₄₀ H ₄₄ N ₄ O ₁₄	804.2854	804.2826	-3.48
17	Dau=Aoa-G-OH	C ₃₁ H ₃₅ N ₃ O ₁₃	657.2170	657.2145	-3.80
18	H-TFF-OH	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₅	413.1951	413.1931	-4.84
19	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1148	-5.48
20	H-TF-OH	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄	266.1267	266.1253	-5.26

F9. táblázat 18 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

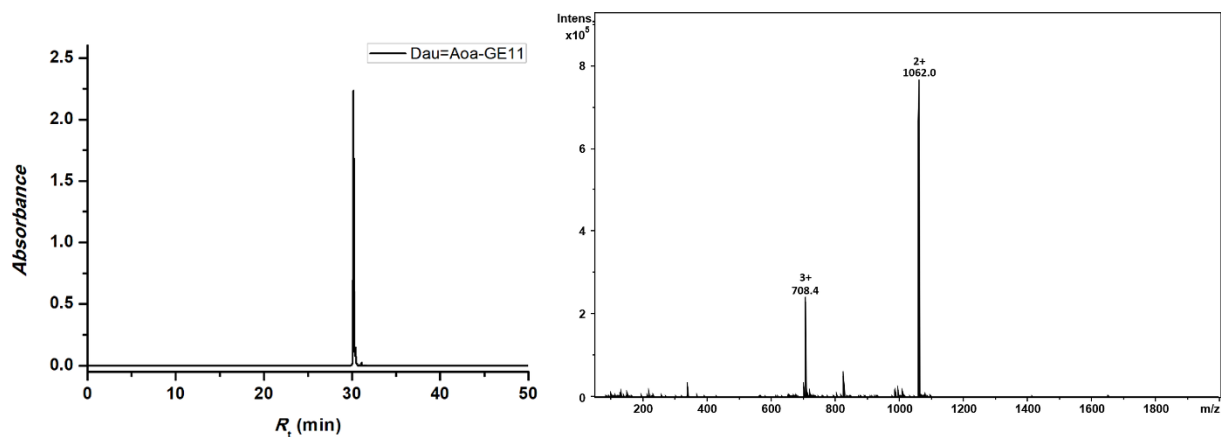
	Fragmens	Összegképlet	MW_{számolt}	MW_{mért}	Δ ppm
1	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VA)RNNFKTEEY-OH	C ₁₄₁ H ₁₉₃ N ₃₃ O ₄₄	3052.3879	3052.3761	-3.87
2	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VA)RNNFKTE-OH	C ₁₂₇ H ₁₇₇ N ₃₁ O ₃₉	2760.2820	2760.2706	-4.13
3	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-VA)RNNFKTEEY-OH	C ₁₁₉ H ₁₆₈ N ₃₀ O ₄₀	2657.2034	2657.1939	-3.58
4	H-GSRGK(Dau=Aoa-VA)RNNFKTEEY-OH	C ₁₀₈ H ₁₅₆ N ₂₈ O ₃₇	2437.1186	2437.1088	-4.02
5	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-VA)RNNFK-OH	C ₉₆ H ₁₃₈ N ₂₆ O ₃₀	2135.0072	2134.9980	-4.31
6	H-GSRGK(Dau=Aoa-VA)RNNFK-OH	C ₈₅ H ₁₂₆ N ₂₄ O ₂₇	1914.9224	1914.9144	-4.18
7	H-GSRGK(Dau=Aoa-VA)RNN-OH	C ₇₀ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₂₅	1639.7590	1639.7522	-4.15
8	H-GK(Dau=Aoa-VA)RNNFK-OH	C ₇₄ H ₁₀₆ N ₁₈ O ₂₃	1614.7678	1614.7622	-3.47
9	H-GSRGK(Dau=Aoa-VA)RN-OH	C ₆₆ H ₉₉ N ₁₉ O ₂₃	1525.7161	1525.7100	-4.00
10	H-GSRGK(Dau=Aoa-VA)R-OH	C ₆₂ H ₉₃ N ₁₇ O ₂₁	1411.6732	1411.6678	-3.83
11	H-GK(Dau=Aoa-VA)R-OH	C ₅₁ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₇	1111.5186	1111.5147	-3.51
12	H-K(Dau=Aoa-VA)-OH	C ₄₃ H ₅₈ N ₆ O ₁₅	898.3960	898.3929	-3.45
13	Dau=Aoa-V-OH	C ₃₄ H ₄₁ N ₃ O ₁₃	699.2639	699.2615	-3.43
14	H-TEEY-OH	C ₂₃ H ₃₂ N ₄ O ₁₁	540.2068	540.2051	-3.15
15	H-TFF-OH	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₅	413.1951	413.1931	-4.84
16	H-FYG-OH	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₅	385.1638	385.1624	-3.63
17	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1149	-5.16
18	H-TF-OH	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄	266.1267	266.1253	-5.26

F10. táblázat 19 konjugátum degradációja során azonosított fragmensek

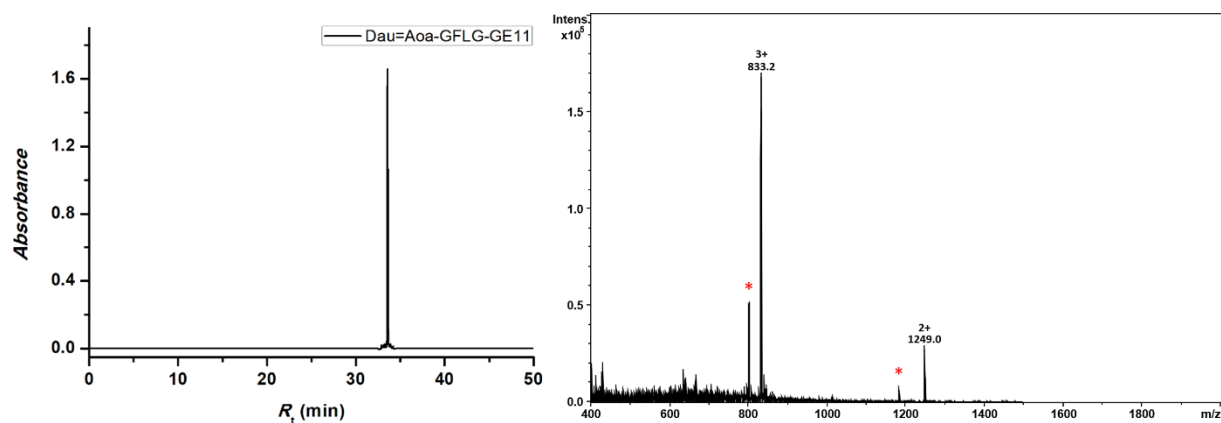
	Fragmens	Összegképlet	MW_{számolt}	MW_{mért}	Δ ppm
1	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VAGG)RNNFKTEEY-OH	C ₁₄₅ H ₁₉₉ N ₃₅ O ₄₆	3166.4308	3166.4211	-3.06
2	H-TFFYGGSRGK(Dau=Aoa-VAGG)RNNFKTE-OH	C ₁₃₁ H ₁₈₃ N ₃₃ O ₄₁	2874.3249	2874.3138	-3.86
3	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-VAGG)RNNFKTEEY-OH	C ₁₂₃ H ₁₇₄ N ₃₂ O ₄₂	2771.2463	2771.2365	-3.54
4	H-YGGSRGK(Dau=Aoa-VAGG)RNNFKTE-OH	C ₁₀₉ H ₁₅₈ N ₃₀ O ₃₇	2479.1404	2479.1313	-3.67
5	H-GSRGK(Dau=Aoa-VAGG)RNNFK-OH	C ₈₉ H ₁₃₂ N ₂₆ O ₂₉	2028.9654	2028.9580	-3.65
6	H-GK(Dau=Aoa-VAGG)RNNFK-OH	C ₇₈ H ₁₁₂ N ₂₀ O ₂₅	1728.8107	1728.8036	-4.11
7	H-GSRGK(Dau=Aoa-VAGG)RN-OH	C ₇₀ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₂₅	1639.7590	1639.7516	-4.51
8	H-GSRGK(Dau=Aoa-VAGG)R-OH	C ₆₆ H ₉₉ N ₁₉ O ₂₃	1525.7161	1525.7096	-4.26
9	H-GK(Dau=Aoa-VAGG)R-OH	C ₅₅ H ₇₉ N ₁₃ O ₁₉	1225.5615	1225.5562	-4.32
10	H-GK(Dau=Aoa-VAGG)-OH	C ₄₉ H ₆₇ N ₉ O ₁₈	1069.4604	1069.4572	-2.99
11	H-K(Dau=Aoa-VAGG)-OH	C ₄₇ H ₆₄ N ₈ O ₁₇	1012.4389	1012.4358	-3.06
12	Dau=Aoa-VA-OH	C ₃₇ H ₄₆ N ₄ O ₁₄	770.3011	770.2986	-3.25
13	Dau=Aoa-V-OH	C ₃₄ H ₄₁ N ₃ O ₁₃	699.2639	699.2613	-3.72
14	H-TFF-OH	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₅	413.1951	413.1931	-4.84
15	H-EY-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	310.1165	310.1150	-4.84
16	H-TF-OH	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄	266.1267	266.1252	-5.64



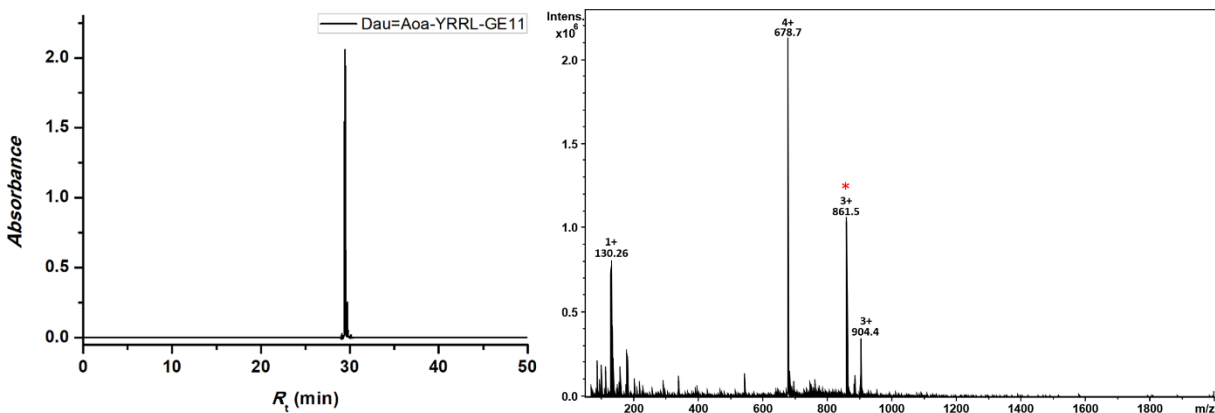
F32. ábra Ac-GE11 (20) analitikai kromatogramja és MS spektruma



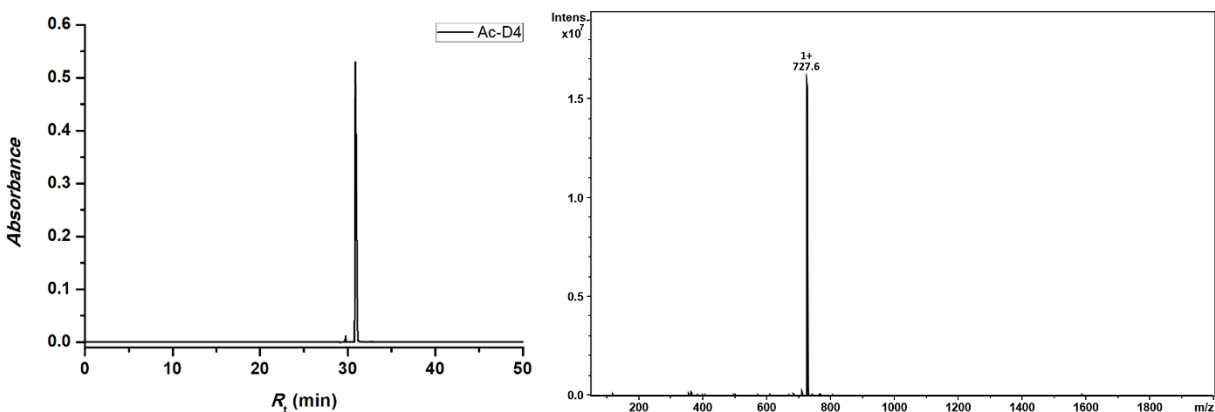
F33. ábra Dau=Aoa-GE11 (21) analitikai kromatogramja és MS spektruma



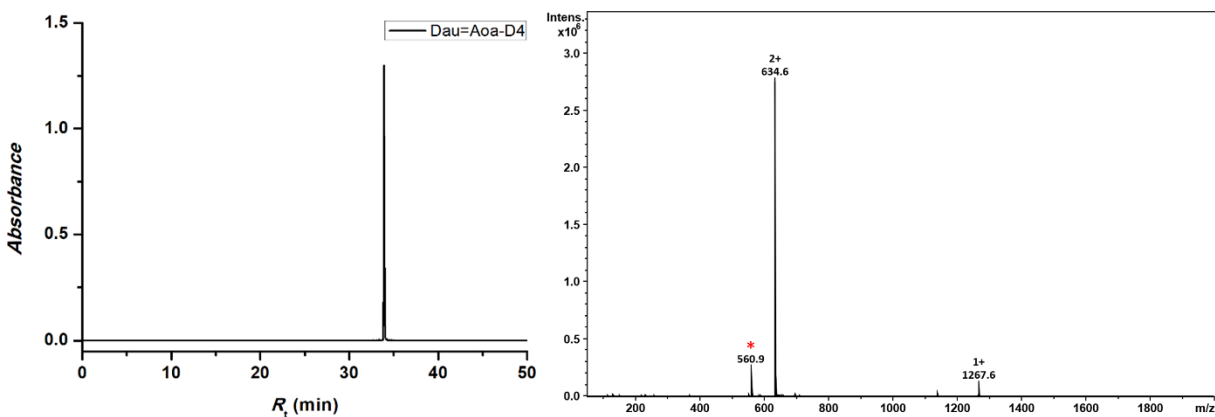
F34. ábra Dau=Aoa-GFLG-GE11 (22) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A * jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



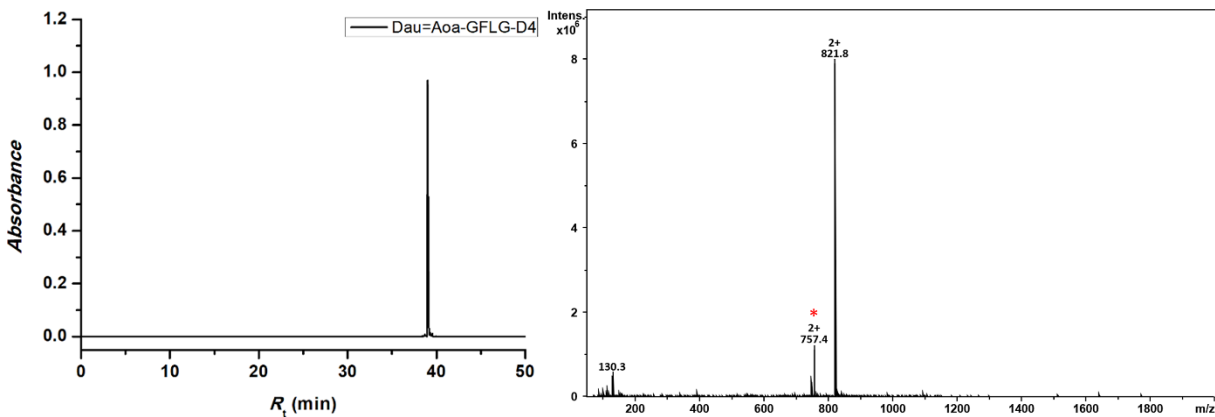
F35. ábra Dau=Aoa-YRRL-GE11 (**23**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A * jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



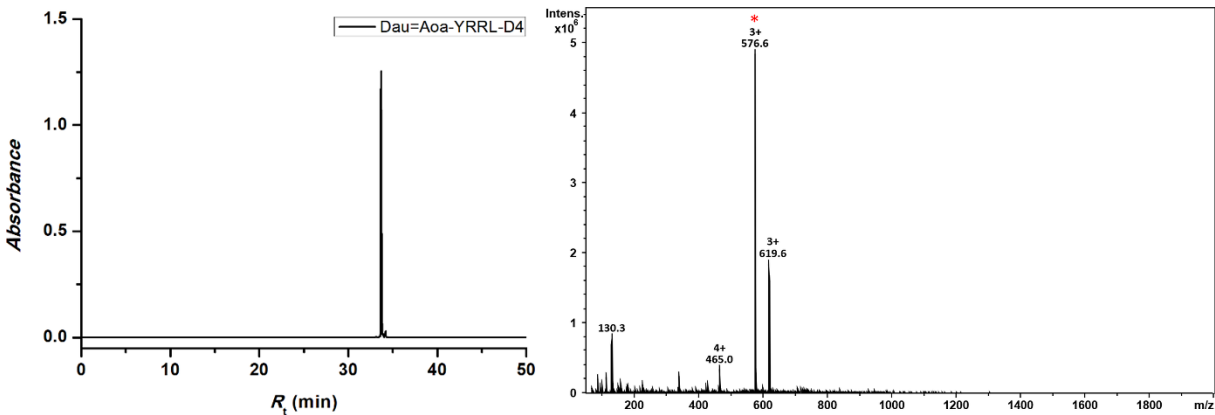
F36. ábra Ac-D4 (**24**) analitikai kromatogramja és MS spektruma



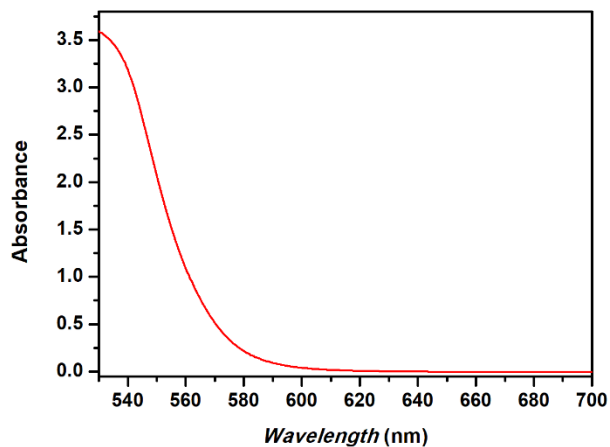
F37. ábra Dau=Aoa-D4 (**25**) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A * jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



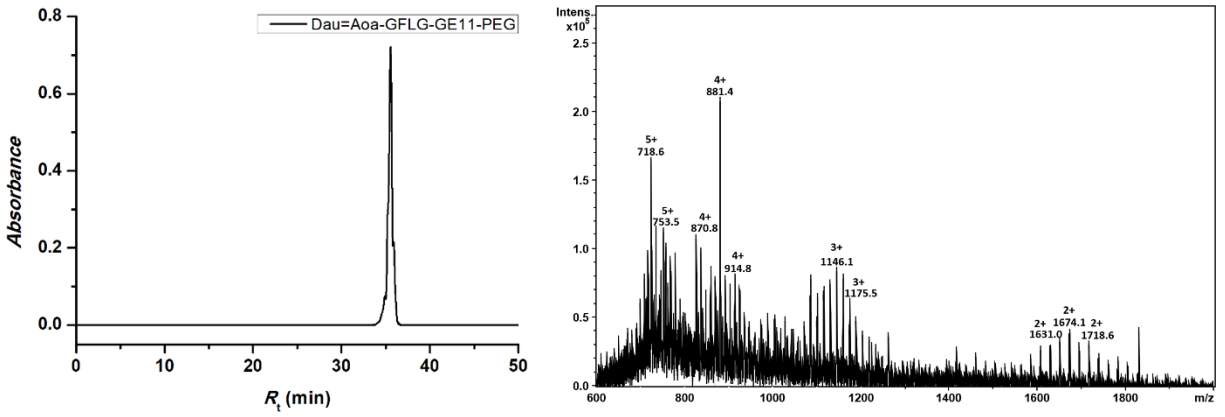
F38. ábra Dau=Aoa-GFLG-D4 (26) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A * jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



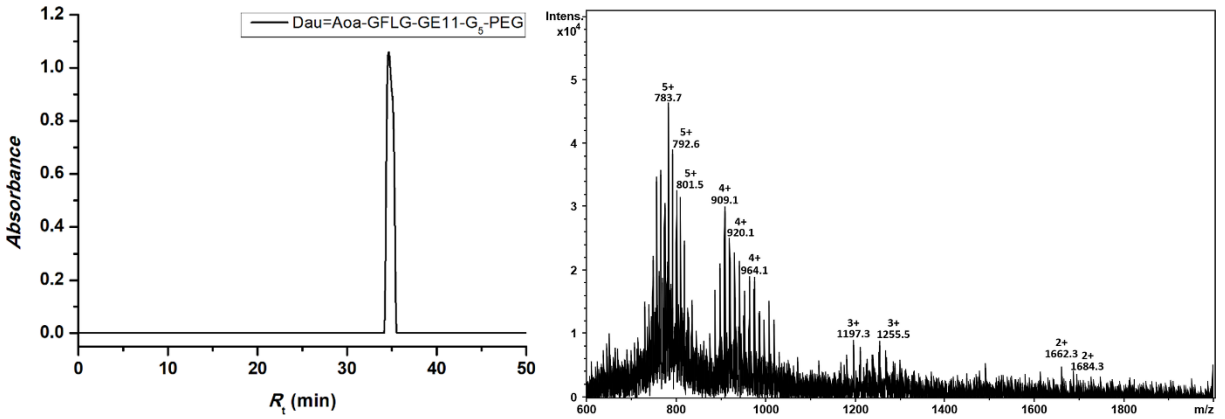
F39. ábra Dau=Aoa-YRRL-D4 (27) analitikai kromatogramja és MS spektruma. A * jellel jelölt csúcsok a daunomicin tömegspektrometriás körülmények között bekövetkező cukorvesztéséből származó fragmenshez tartoznak.



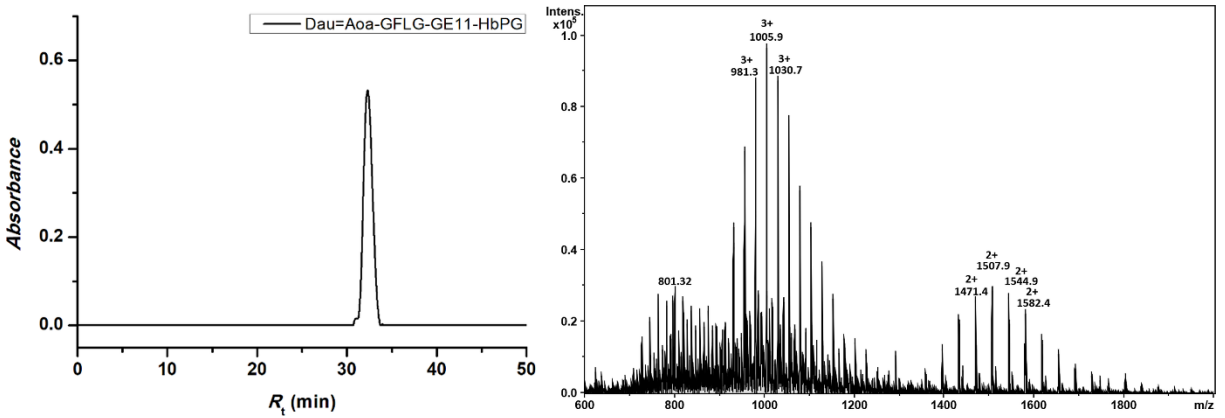
F40. ábra A daunomicin UV-Vis spektruma 530-700 nm között 100 μ M koncentrációban mérve



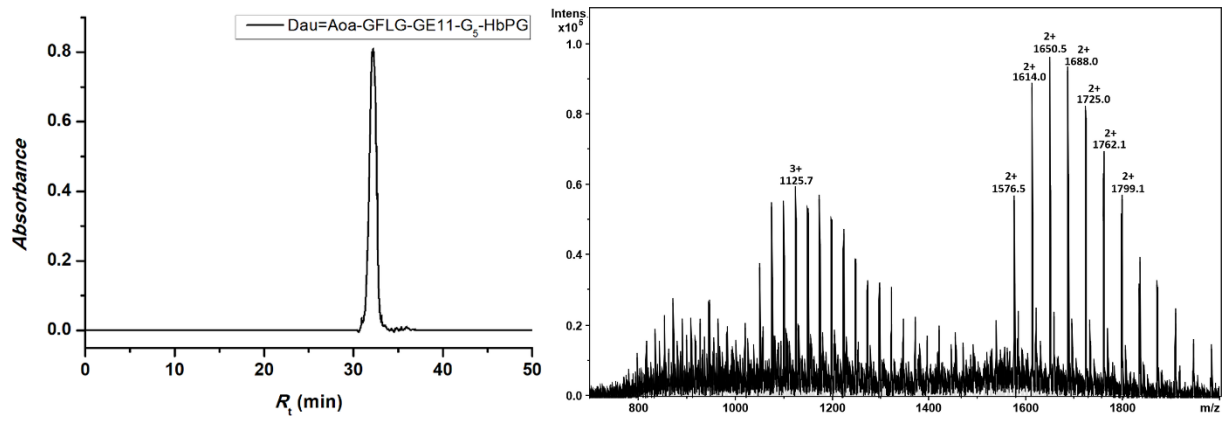
F41. ábra Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG (28) analitikai kromatogramja és MS spektruma



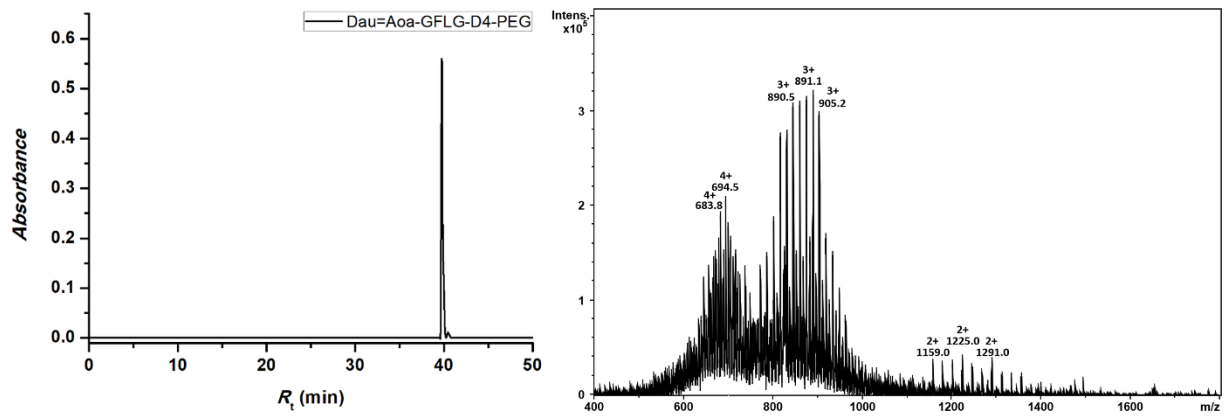
F42. ábra Dau=Aoa-GFLG-GE11-G₅-PEG (29) analitikai kromatogramja és MS spektruma



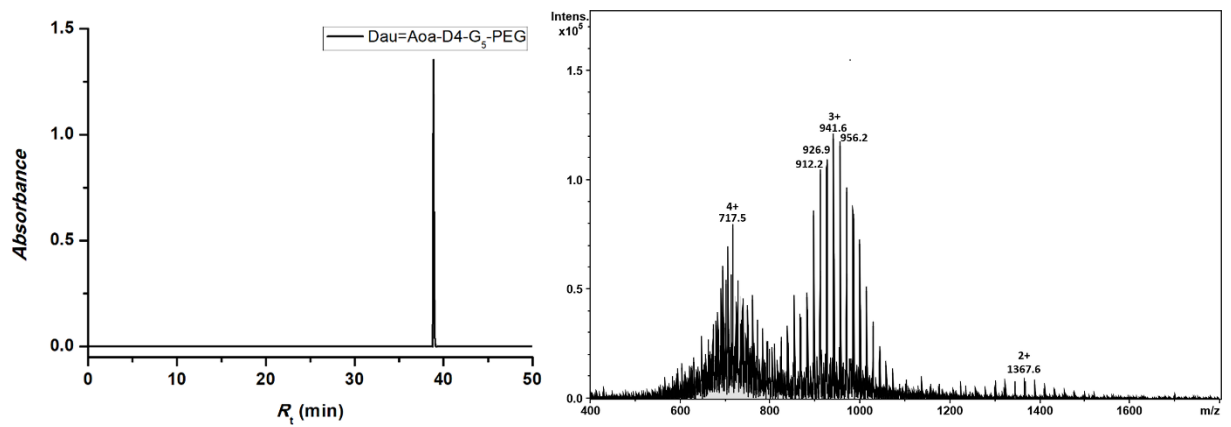
F43. ábra Dau=Aoa-GFLG-GE11-HbPG (30) analitikai kromatogramja és MS spektruma



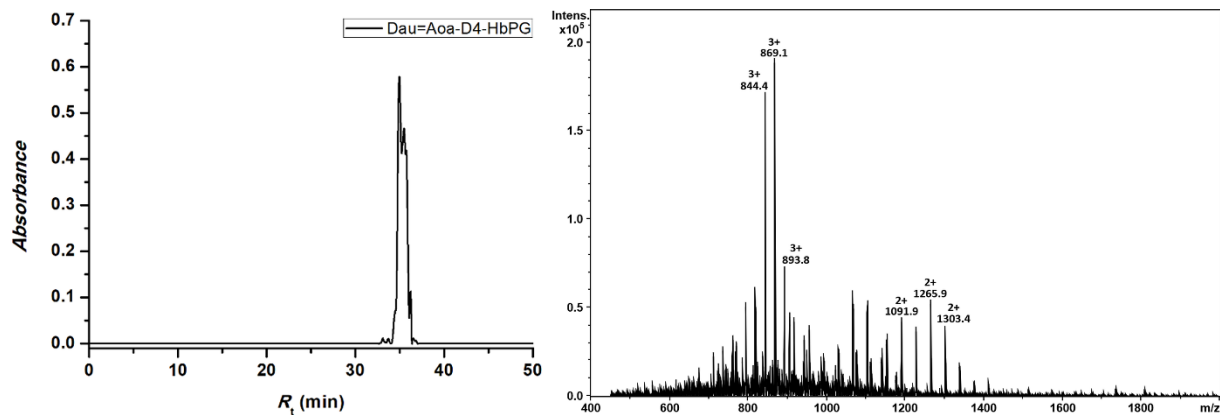
F44. ábra Dau=Aoa-GFLG-GE11-G₅-HbPG (31) analitikai kromatogramja és MS spektruma



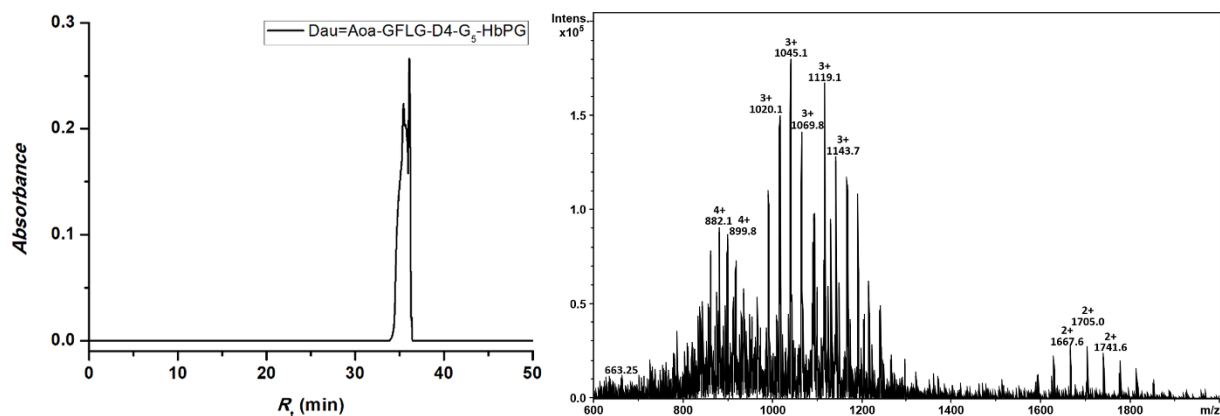
F45. ábra Dau=Aoa-GFLG-D4-PEG (32) analitikai kromatogramja és MS spektruma



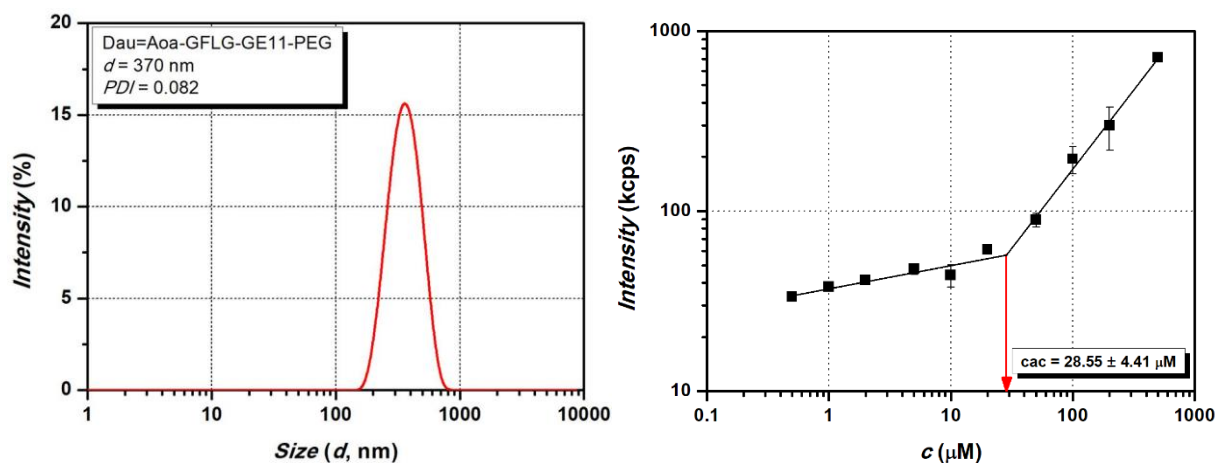
F46. ábra Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-PEG (33) analitikai kromatogramja és MS spektruma



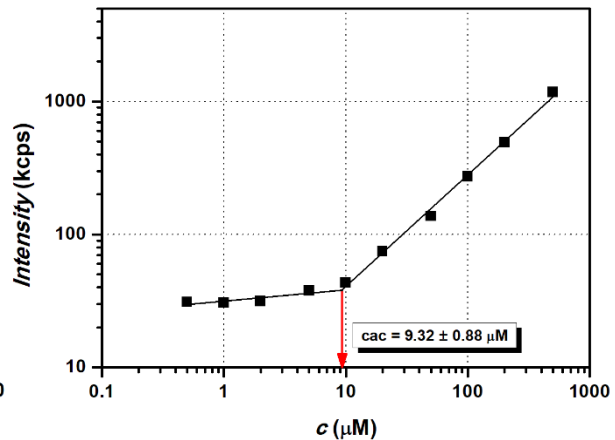
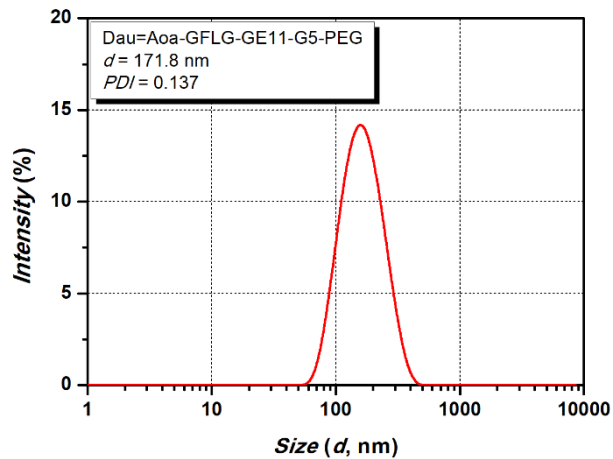
F47. ábra Dau=Aoa-GFLG-D4-HbPG (34) analitikai kromatogramja és MS spektruma



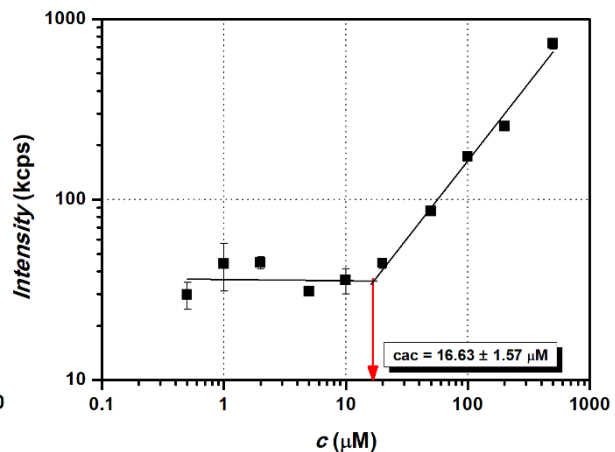
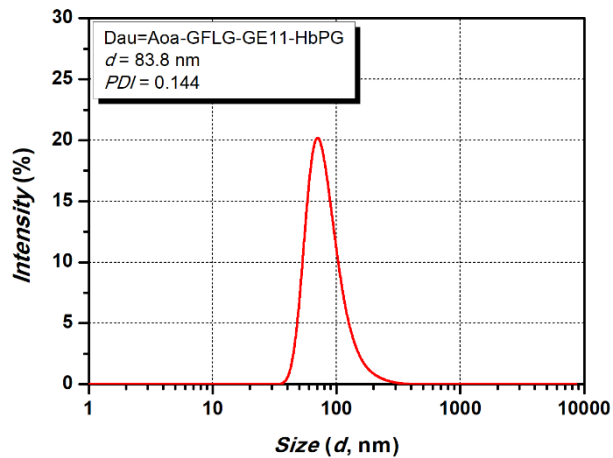
F48. ábra Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-HbPG (35) analitikai kromatogramja és MS spektruma



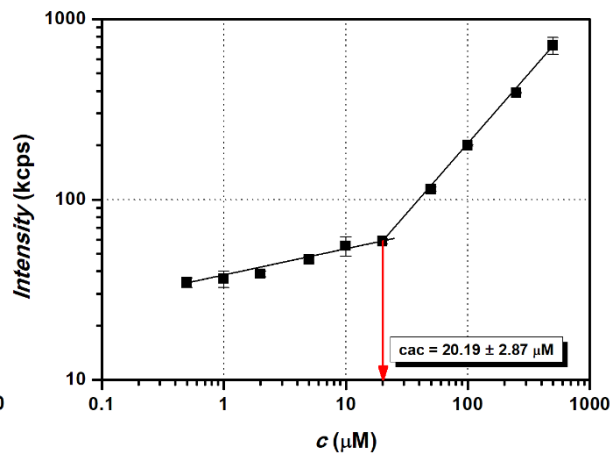
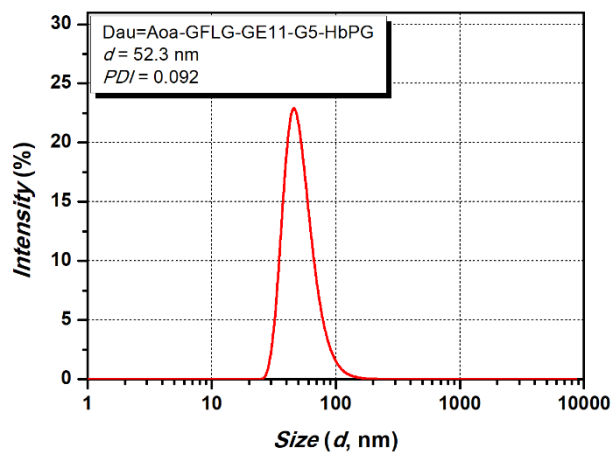
F49. ábra A Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG konjugátum (28) DLS méreteloszlása 100 μM koncentrációban (balra), illetve a szórt intenzitás értékek a koncentráció függvényében (jobbra)



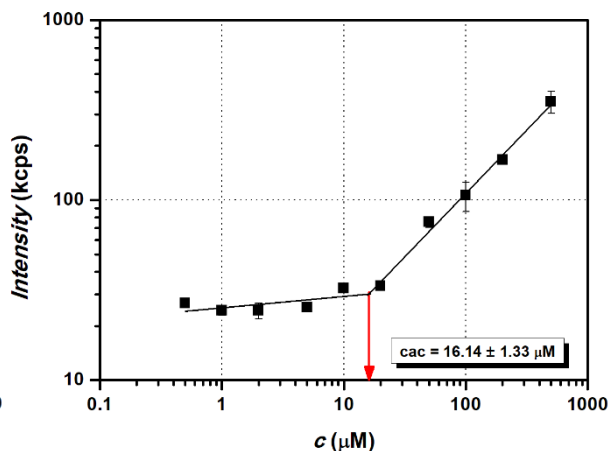
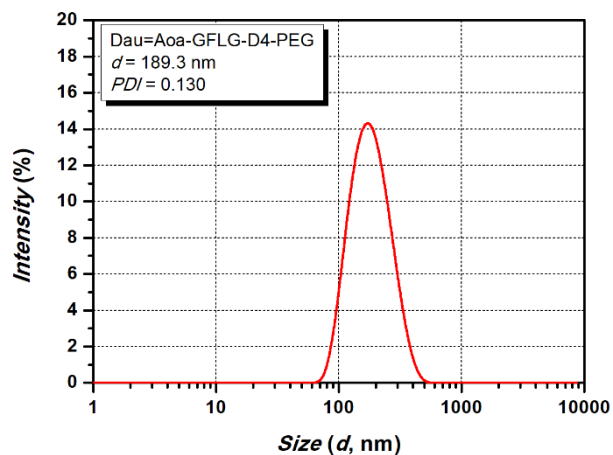
F50. ábra A Dau=Aoa-GFLG-GE11-G₅-PEG konjugátum (29) DLS méreteloszlása 100 μM koncentrációban (balra), illetve a szórt intenzitás értékek a koncentráció függvényében (jobbra)



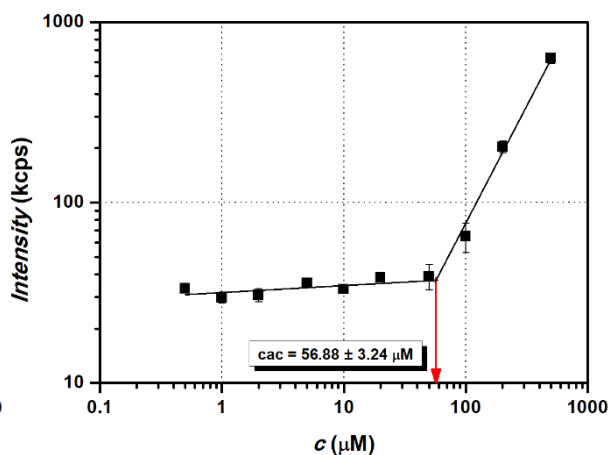
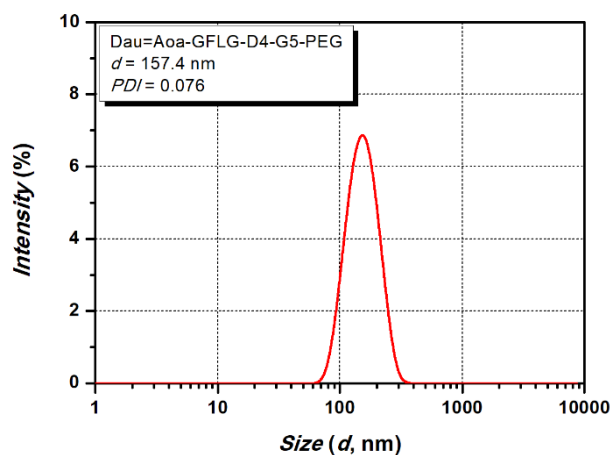
F51. ábra A Dau=Aoa-GFLG-GE11-HbPG konjugátum (30) DLS méreteloszlása 100 μM koncentrációban (balra), illetve a szórt intenzitás értékek a koncentráció függvényében (jobbra)



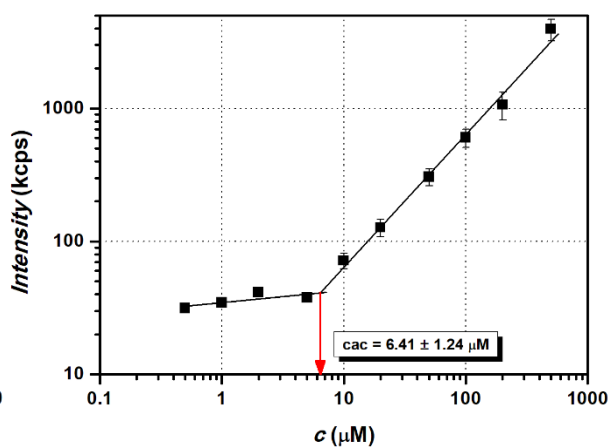
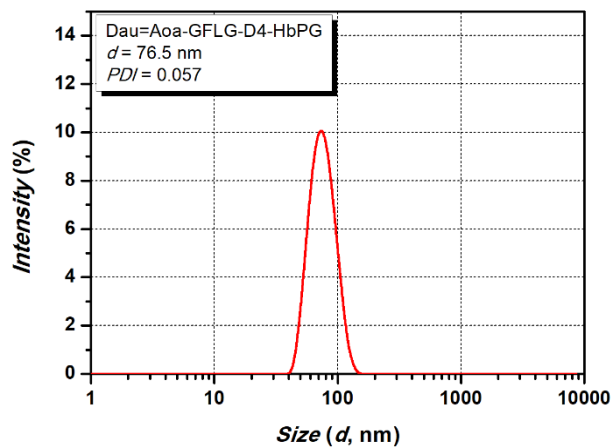
F52. ábra A Dau=Aoa-GFLG-GE11-G₅-HbPG konjugátum (31) DLS méreteloszlása 100 μM koncentrációban (balra), illetve a szórt intenzitás értékek a koncentráció függvényében (jobbra)



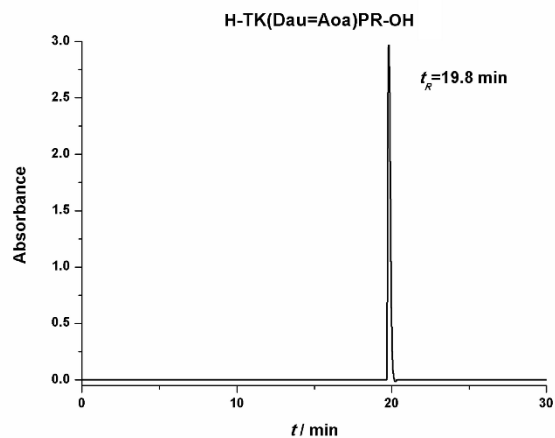
F53. ábra A Dau=Aoa-GFLG-D4-PEG konjugátum (32) DLS méreteloszlása 100 μM koncentrációban (balra), illetve a szórt intenzitás értékek a koncentráció függvényében (jobbra)



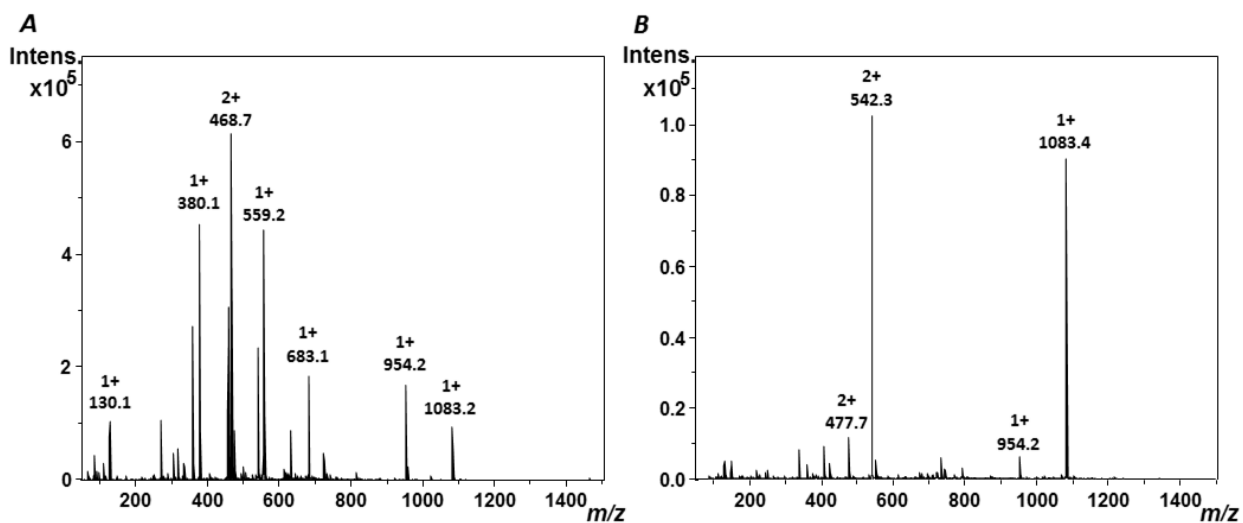
F54. ábra A Dau=Aoa-GFLG-D4-G₅-PEG konjugátum (33) DLS méreteloszlása 100 μM koncentrációban (balra), illetve a szórt intenzitás értékek a koncentráció függvényében (jobbra)



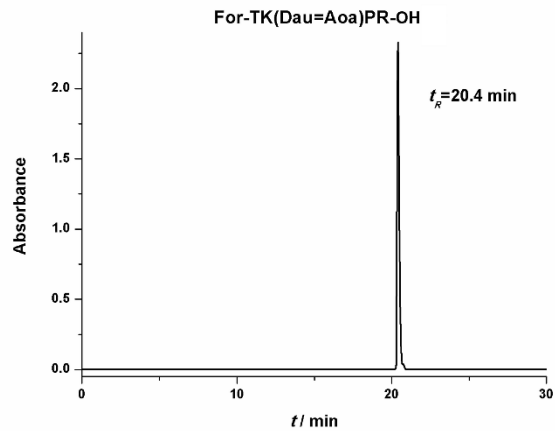
F55. ábra A Dau=Aoa-GFLG-D4-HbPG konjugátum (34) DLS méreteloszlása 100 μM koncentrációban (balra), illetve a szórt intenzitás értékek a koncentráció függvényében (jobbra)



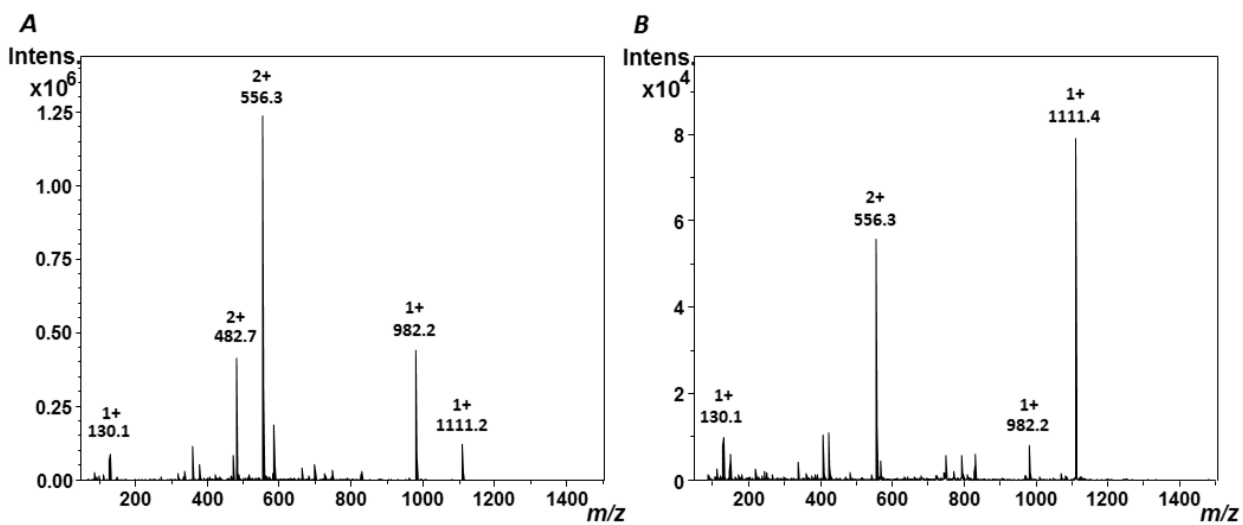
F56. ábra H-TK(Dau=Aoa)PR-OH (**36**) analitikai RP-HPLC kromatogramja



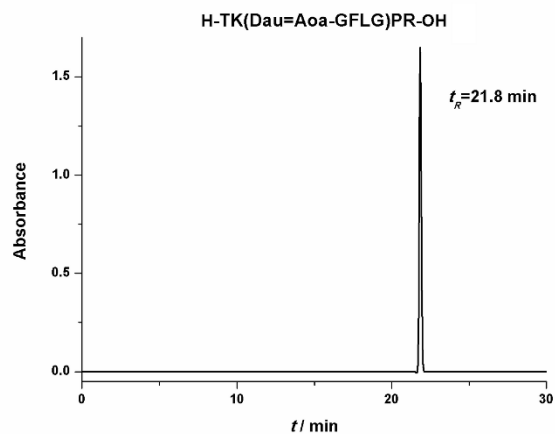
F57. ábra **36** ESI-MS spektruma (A) az általánosan alkalmazott körülmények (0,1% ecetsav / acetonitril:víz (1:1, V/V)) és (B) az optimalizált körülmények (NH_4OAc (pH 6,7):acetonitril (1:1, V/V)) között



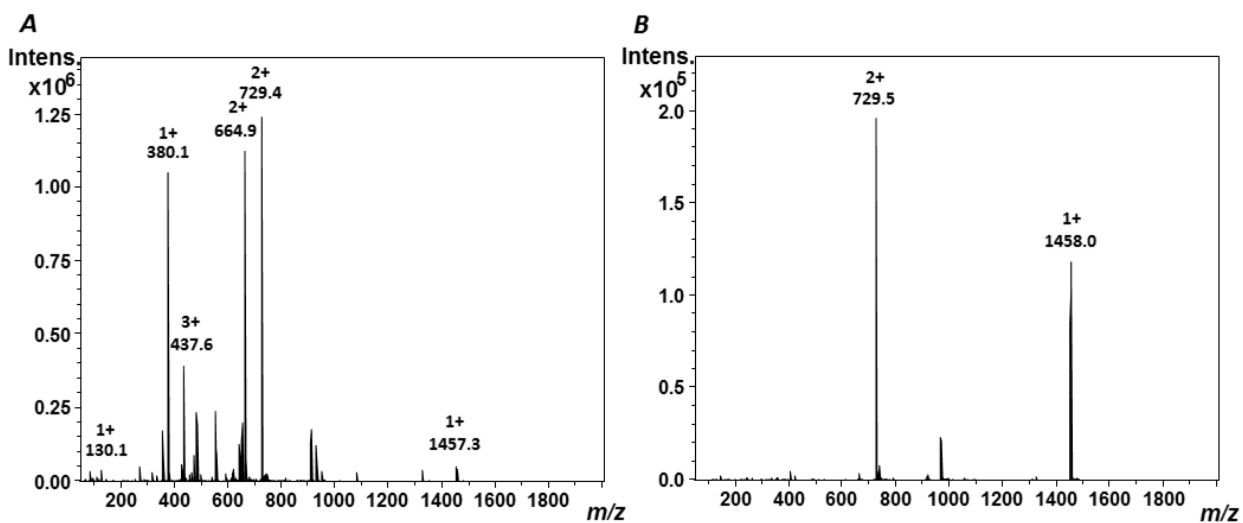
F58. ábra For-TK(Dau=Aoa)PR-OH (37) analitikai RP-HPLC kromatogramja



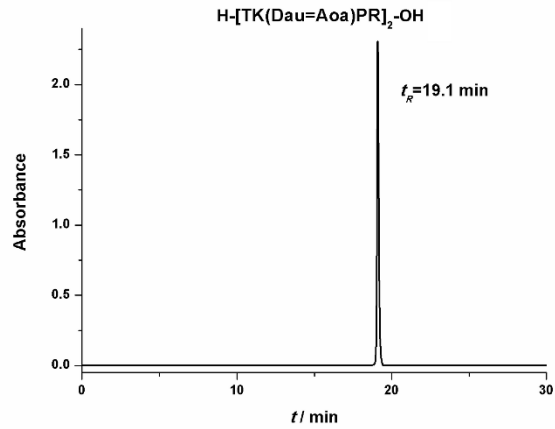
F59. ábra 37 ESI-MS spektruma (A) az általánosan alkalmazott körülmények (0,1% ecetsav / acetonitril:víz (1:1, V/V)) és (B) az optimalizált körülmények (NH_4OAc (pH 6,7):acetonitril (1:1, V/V)) között



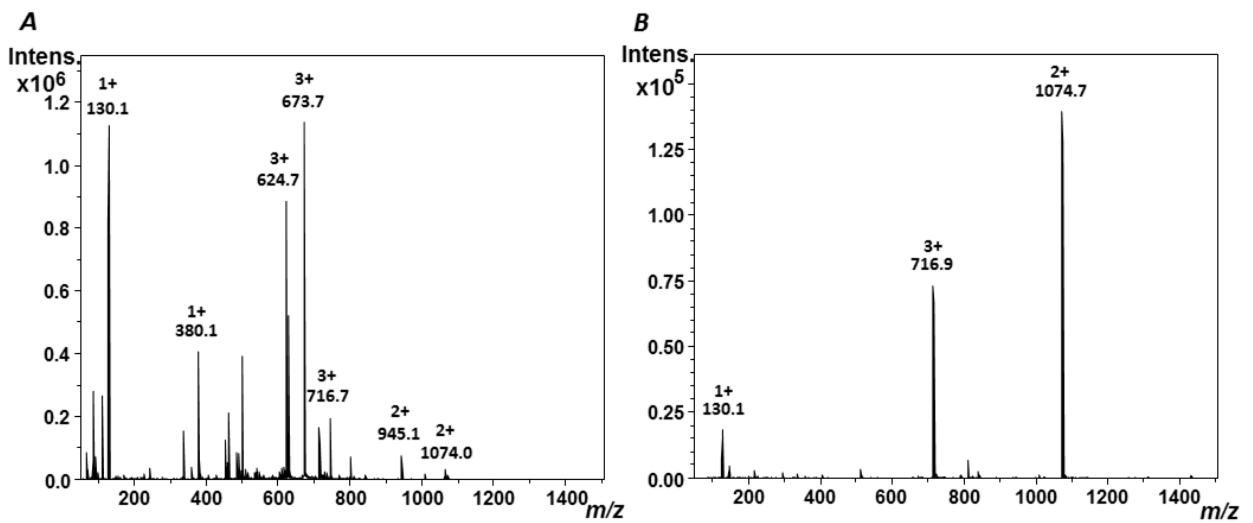
F60. ábra H-TK(Dau=Aoa-GFLG)PR-OH (**38**) analitikai RP-HPLC kromatogramja



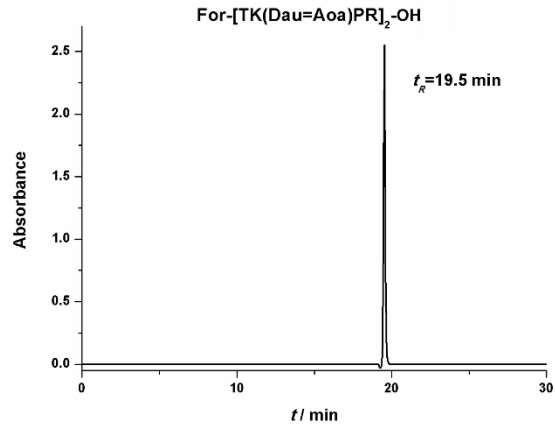
F61. ábra **38** ESI-MS spektruma (A) az általánosan alkalmazott körülmények (0,1% ecetsav / acetonitril:víz (1:1, V/V)) és (B) az optimalizált körülmények (NH_4OAc (pH 6,7):acetonitril (1:1, V/V)) között



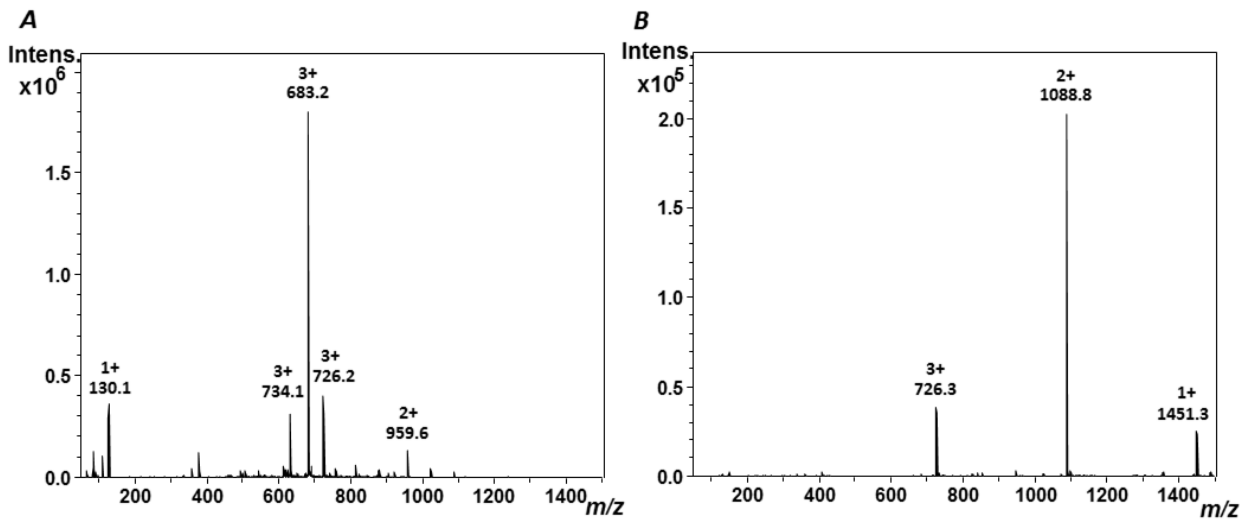
F62. ábra H-[TK(Dau=Aoa)PR]₂-OH (**39**) analitikai RP-HPLC kromatogramja



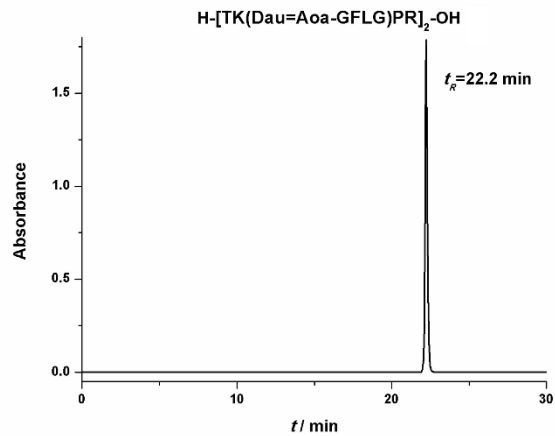
F63. ábra **39** ESI-MS spektruma (A) az általánosan alkalmazott körülmények (0,1% ecetsav / acetonitril:víz (1:1, V/V)) és (B) az optimalizált körülmények (NH₄OAc (pH 6,7):acetonitril (1:1, V/V)) között



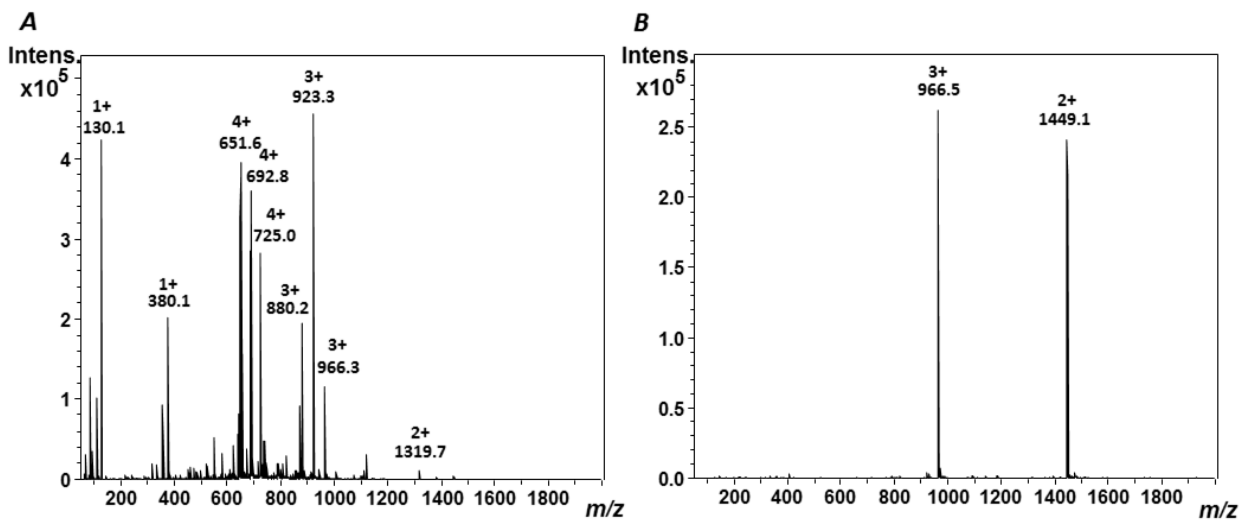
F64. ábra For-[TK(Dau=Aoa)PR]₂-OH (**40**) analitikai RP-HPLC kromatogramja



F65. ábra **40** ESI-MS spektruma (A) az általánosan alkalmazott körülmények (0,1% ecetsav / acetonitril:víz (1:1, V/V)) és (B) az optimalizált körülmények (NH₄OAc (pH 6,7):acetonitril (1:1, V/V)) között



F66. ábra H-[TK(Dau=Aoa-GFLG)PR]₂-OH (**41**) analitikai RP-HPLC kromatogramja



F67. ábra **41** ESI-MS spektruma (A) az általánosan alkalmazott körülmények (0,1% ecetsav / acetonitril:víz (1:1, V/V)) és (B) az optimalizált körülmények (NH₄OAc (pH 6,7):acetonitril (1:1, V/V)) között

ADATLAP
a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Pethő Lilla.....
MTMT-azonosító: 10046429.....
A doktori értekezés címe és alcíme: Irányított tumorterápiában alkalmazható hatóanyag-peptid konjugátumok hatását befolyásoló tényezők vizsgálata
DOI-azonosító⁴⁶: 10.15476/ELTE.2019.277.....
A doktori iskola neve: ELTE Kémia Doktori Iskola.....
A doktori iskolán belüli doktori program neve: Szintetikus kémia, szerves és biomolekuláris kémia
A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Mező Gábor, D.Sc.....
A témavezető munkahelye: ELTE Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék.....

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (dátum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2019.11.29.

.....
Pethő Lilla

**ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet*