

HER2 receptort célzó peptid és analógjainak szerkezet-hatás összefüggése a célzott tumorterápiában

Szakdolgozat
Kémia Alapszak

Adorján Afrodité Emese

Témavezető: Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadó

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest
Természettudományi Kar
Kémiai Intézet
A védés helye: Szerves Kémiai Tanszék
2019

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1 Daganatterápia.....	5
2.1.1 Sebészeti beavatkozás	5
2.1.2 Sugárterápia.....	5
2.1.3 Immunterápia	6
2.1.4 Kemoterápia	6
2.1.5 Irányított tumorterápia.....	7
2.1.6 Kombinált irányított tumorterápia.....	9
2.2 Humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa (HER2)	9
2.2.1 Fág könyvtárból kiválasztott peptid HER2 receptor célzására.....	10
2.2.2 A számítógépes kémia szerepe az irányító molekulák feltérképezésében	12
3. Alkalmazott módszer	14
3.1 Peptidszintézis	14
3.1.1 A gyanta	16
3.1.2 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái	17
3.1.3 A kapcsolási reakciók követése.....	19
4. Célkitűzések	21
5. Eredmények.....	23
5.1 A fág könyvtárból kiválasztott KCCYSL peptid és analógjainak szintézise.....	24
5.1.1 A CF-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ , a CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ , és a CF-Lys-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ szintézise	24
5.1.2 A CF-Lys-Cys-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ és a CF-Lys-Cys-Gly-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ szintézise	25
5.1.3 A CF-Lys-Ser-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ , a CF-Lys-Cys-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ és a CF-Lys-Ser-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ szintézise	25
5.2 A molekula dinamika szimulációkkal feltérképezett GYYNPT/GWWNPT peptidrészletek, illetve KCCYSL analóggal való kombinációk szintézise	26
5.2.1 A CF-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH ₂ peptid szintézise	26
5.2.2 A CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Trp-Trp-Asn-Pro-Thr-NH ₂ és a CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH ₂ szintézise	27
5.3 A referencia peptidek és azok analógjainak <i>in vitro</i> biológiai vizsgálata.....	28
5.3.1 A KCCYSL és variánsainak sejtfelvételi vizsgálata	28
5.3.2 A GYYNPT és a KAAYSL analóggal való kombinációk <i>in vitro</i> biológiai vizsgálata. 29	
5.3.3 A KCCYSL analógok és a kombinált GYYNPT/GWWNPT peptidek <i>in vitro</i> sejtfelvételi vizsgálata konfokális mikroszkóppal	30
6. Kísérleti rész.....	34
6.1 Tisztítás és analízis	35
6.2 Peptidek szintézise és analízise	36

6.2.1	A CF-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ , a CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ , a CF-Lys-Cys-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ , a CF-Lys-Cys-Gly-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ , valamint a CF-Lys-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ szintézise.....	36
6.2.2	A CF-Lys-Ser-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ , a CF-Lys-Ser-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ , és a CF-Lys-Cys-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH ₂ előállítás és analízise.....	37
6.2.3	A CF-GYYNPT-NH ₂ , a CF-KAAYSLGWWNPT-NH ₂ , valamint a CF-KAAYSLGYYNPT-NH ₂ szintézise és analízise.....	39
6.3	<i>In vitro</i> biológiai vizsgálatok.....	41
6.3.1	<i>In vitro</i> sejtbejutási vizsgálatok áramlási citometriával	41
6.3.2	<i>In vitro</i> sejtbejutás vizsgálata konfokális mikroszkóppal.....	42
	Összefoglalás.....	44
7.	Rövidítésjegyzék	46
8.	Irodalomjegyzék.....	48
9.	Függelék.....	

Köszönetnyilvánítás

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

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Mező Gábor* tudományos tanácsadónak, hogy segítségével, irányításával, tengernyi türelmével támogatta munkámat és dolgozatom létrejöttét.

Külön köszönettel tartozom *dr. Enyedi Kata Nóra* tudományos munkatársnak és *Pethő Lilla* tudományos segédmunkatársnak a tömegspektrometriai mérések elvégzéséért, illetve végtelen türelmükért, észrevételeikért, jó tanácsaikért.

Továbbá köszönettel tartozom *dr. Biri-Kovács Beátának*, *Dr. Szabó Ildikónak*, *Dr. Bősze Szilviának* és *Szedes Bálintnak* a biológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Végezetül pedig szeretnék külön köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, az ő támogatásuk nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

1. Bevezetés

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization) statisztikai adatai alapján kijelenthető, hogy a rákos megbetegedések globális szinten kiemelt helyen szerepelnek a halálozási okok között. 2012-es adatok alapján hozzávetőlegesen 14 millió új esetet regisztráltak, és több mint 8,2 millió ember halt meg rosszindulatú rákos megbetegedés következtében. Az új regisztrált esetek száma a következő két évtizedben akár az évi 22 milliót is elérheti. Globális szinten az ötödik legtöbb elhalálozásért a mellrákos megbetegedések tehetők felelőssé (521.000 haláleset) [1]. Az Európai Unióban az ischaemiás szívbetegségek, illetve a különböző keringési megbetegedések után a második legnagyobb halálozási ok között a különféle daganatos megbetegedések állnak. 2012-es adatok szerint a rosszindulatú rákos megbetegedések mindegyik uniós tagállamban a jelentős halálozási okok között szerepelnek: mintegy 267 halálozás függ össze daganatos megbetegedéssel 100.000 lakosra nézve. Ezen belül leggyakoribb formái közé sorolható a mell rosszindulatú, invazív daganata [2].

Az uniós tagállamok között Magyarország kiemelt helyen szerepel a különböző ráktípusok okozta halálozások számában, ugyanis százezer lakosból évente több mint 300-an hunynak el rákban [3]. Ezen belül hazánkban évente majdnem 6000 új emlőrákos esetet regisztrálnak, aminek egyharmada halálos kimenetelű annak ellenére, hogy kezelésének időben történő megkezdése esetén nagy hatékonysággal gyógyítható lenne. A nők körében ez a fajta ráktípus a leggyakrabban előforduló, ami napjainkban már nem csak az 50-60 év közötti korosztályt érinti fokozottan, hanem egyre fiatalabb nők körében is diagnosztizálják [4].

Mivel a különféle daganatos megbetegedések bármely szövettípusból kialakulhatnak, ezért nincs egy általánosan alkalmazható gyógymód. Így a mai napig fontos kutatási célpont a daganatos megbetegedések biológiai hátterének pontos megértése, illetve hatékony terápiás eljárások kifejlesztése.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Daganatterápia

A daganatos megbetegedésekre nincs általánosan alkalmazható gyógymód sokféleségük miatt. A megfelelő terápia alkalmazása függ a daganat előrehaladottsági szintjétől és annak elhelyezkedésétől. A daganatos megbetegedések kezelésére számos lehetőség nyílik: sebészeti beavatkozás, sugár-, kemo-, immuno- vagy irányított terápia, illetve ezek megfelelő együttes kombinációja.

Ahhoz, hogy a megfelelő terápiát kiválasszák, fel kell mérni a tumor fajtáját, illetve hogy a megbetegedés melyik stádiumban van (a tumor mérete, áttétek esetleges jelenléte) [5]. Az elsődleges cél minden esetben a rák teljes eltávolítása úgy, hogy a szervezet többi részét ne vagy csak minimálisan károsítsa. A dolgozatomban a továbbiakban az általam is vizsgált emlőrákra fókuszálok.

2.1.1 Sebészeti beavatkozás

A daganatterápiában a sebészeti beavatkozás a leggyakrabban alkalmazott módszer. Napjainkban például emlőrák esetében még mindig ez a legjobb kezelési mód. A rák kiterjedésétől függően többféle beavatkozás is alkalmazható. Legradikálisabb módszer a masztektómia, amely során nemcsak az emlőt, hanem magát a mellizomzatot és a környező nyirokcsomókat, zsírszöveteket is eltávolítják. Kevésbé radikális és napjainkban nagyon elterjedt sebészeti kezelés a kvadrantektómia, amikor csak egy részét távolítják el az emlőnek. Emellett alkalmazzák még a lumpektómiát is, amikor csak magát a rákos csomót és az azt körülvevő szöveteket műtik ki. A műtéti beavatkozást a legtöbb esetben sugár- vagy kemoterápia előzi meg, vagy követi attól függően, hogy a tumor méretét szeretnék csökkenteni a műtét előtt, vagy hogy megakadályozzák a későbbi kiújulást [4].

2.1.2 Sugárterápia

A sebészeti beavatkozást követően a sugárterápia a második leggyakrabban alkalmazott terápiás eljárás a daganatos megbetegedések kezelésére. Az eljárás során nagy energiájú,

ionizáló sugárzást használnak, amelyek a DNS-t károsítják, ezzel meggátolva a sejtosztódást. A kezelés során napjainkban ^{60}Co , ^{103}Pd , ^{125}I , sugárforrásokat alkalmaznak [6]. A terápia hátránya, hogy nem szelektív, mivel a tumorsejtek mellett az ép, egészséges sejtek DNS-ét is károsítja.

Az emlőrákos betegek esetében kiegészítő terápiaként használják, elsődlegesen a betegség kiújulásának megelőzéseként. A sugárkezelést minden olyan esetben alkalmazzák, amikor a betegen lumpektómiát hajtanak végre. Ekkor a sugárkezelést kemoterápia után, vagy a kemoterápiás kezelések közé ékelik be [4].

2.1.3 Immunterápia

Az immunterápia az immunreakcióban résztvevő fehérvérsejteket aktiválva serkenti a szervezet saját védekező rendszerét a rákos megbetegedés elleni küzdelemben. Kisebb tumorok esetében alkalmazható, más terápiák kombinációjával.

A páciens a daganatból készített vakcinával oltják be, ezzel aktiválva az immunrendszert, hogy az a daganatsejteket felismerje. A tumorsejtek működési mechanizmusainak felderítésének köszönhetően napjainkban már olyan szerek fejleszthetők, amelyek a természetes immunreakciót befolyásolják, így a sejtek növekedését kontrollálni képesek. Ezt a kezelési módszert nevezik passzív immunterápiának. Napjaink egyik legjobb és legígéretesebb immunterápiás kezelése a monoklonális antitest terápia, amelynek lényege, hogy az antitestek a tumorsejt felszínén található receptorokhoz kötődnek. Ezáltal olyan immunfolyamatok indulnak el, amelyek végül a sejt pusztulását okozzák. Továbbá gátolják a természetes ligandumok kötődését receptoraikhoz, amelyek a tumornövekedést fokozzák. Ilyen ígéretes monoklonális antitest például a trastuzumab (Herceptin), mely a mai napig az egyik legjobb immunterápiás szer mellrák ellen [7]. Ezek a célzott monoklonális terápiák egyben átvezetnek az irányított tumorterápiák területére is (lásd később).

2.1.4 Kemoterápia

Ezt a kezelési módot főleg limfóma és leukémia gyógyítására, valamint metasztázisok kialakulásának gátlására használják. Emellett az emlőrák sebészeti eltávolítása után javasolt ezen terápia alkalmazása, ha a daganat mérete túl nagy volt, vagy áttért a környező nyirokcsomókra is. A kezelés lényege, hogy a beteget olyan citosztatikumokkal kezelik,

amelyek a rákos sejteket elpusztítják, vagy azok osztódását gátolják. A tumorokban a normál szövetekhez képest jelentősen nagyobb az osztódó sejtek száma, így a kemoterápiás szerek elsődleges célpontjai az osztódó, illetve osztódás felé tartó (proliferáló) sejtek. Az alkalmazott szerek a DNS replikációt vagy a létrejött kromoszómák szétválását képesek meggátolni. Azonban az emberi szervezetben jelen vannak olyan szövetek (száj- és bélnyálkahártya, szőrtüsző, csontvelő), amelyek a normális élettani körülmények között is gyorsan és folyamatosan osztódnak, így ezen szöveteket is érinti a citosztatikumok hatása, ezzel számos, kellemetlen mellékhatást kiváltva [8]. Ilyen, szemmel látható mellékhatás például a hajhullás, de gyakran társul emellé hányinger, fáradékonyság. Mivel a terápia a csontvelőt is károsítja, ezáltal csökken a fehérvérsejt-szám, gyengül az immunrendszer védekező képessége, így a beteg fogékonyabb lesz a különböző fertőzésekre. Mindezek mellett szerzett vagy öröklött (multi)drog-rezisztencia is felléphet, amikor a rákos sejtek rezisztenssé válnak a velük szemben alkalmazott szerekre, így korlátozva a kezelés hatékonyságát.

A citosztatikumok hatásmechanizmusuk alapján több csoportba sorolhatóak:

- alkilezőszerek: gátolják a DNS replikációját azzal, hogy a DNS láncok között keresztkötéseket alakítanak ki (pl. melfalán, ciszplatin)
- antimitotikumok: gátolják a mitotikus orsó kialakulását (pl. vinkrisztin, vinblasztin)
- antibiotikumok: interkalációs komplexet hoznak létre a DNS-sel (pl. doxorubicin, daunomicin)
- antimetabolitok: a DNS szintéziséhez szükséges enzimek működését, vagy az anyagcsere-folyamatokat gátolják (pl. metotrexát)

Igaz, hogy az alkalmazott gyógyszerek mennyiségi növelése fokozza a hatékonyságot, de mivel a véráramból hamar kiürülnek, nagy dózisban kell őket alkalmazni, így ezzel fokozódnak a súlyos, toxikus mellékhatások. Eltérő hatásmechanizmusuk miatt a különböző citosztatikumok kombinált alkalmazása növelheti a hatékonyságot [9]. Ezt más néven kombinált terápiának nevezzük.

2.1.5 Irányított tumorterápia

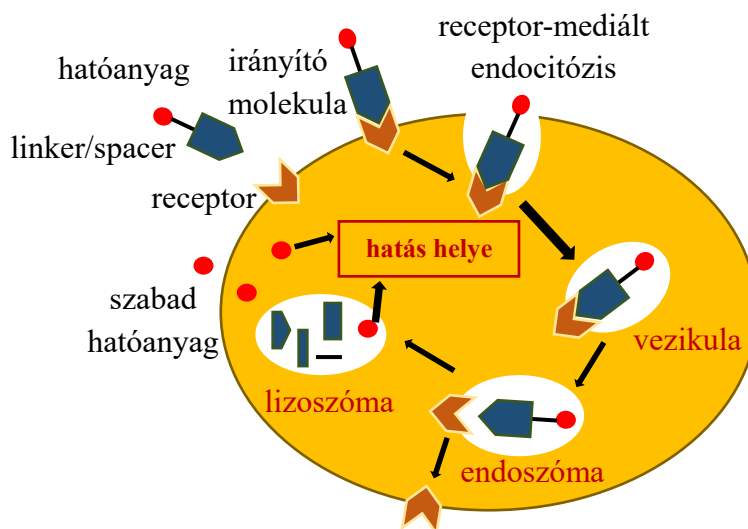
Mivel a kemoterápia során használt citosztatikumok nem szelektívek, károsítják az egészséges sejteket is, így számos súlyos mellékhatást váltanak ki. Emellett gyorsan ürülnek ki a véráramból, és rezisztencia léphet fel ellenük a tumorsejtekben. Ennek fényében megoldást jelenthet olyan gyógyszerek kifejlesztése, amelyek szelektíven csak a tumorsejtekre hatnak, az

egészséges sejteket nem károsítva. A '90-es években került előtérbe az irányított vagy más néven célzott tumorterápia, amelynek lényege, hogy a citosztatikumokat szelektíven juttatják a rákos sejtekbe, így csökkentve a kemoterápia súlyos mellékhatásait, ezzel javítva a betegek életminőségét.

A specifikus gyógyszerek kifejlesztéséhez szükséges ismerni a daganatos és az egészséges sejtek közötti funkcionális és szerkezeti különbségeket. Számos kutatás során azonosítottak olyan receptorokat, amelyek nagyobb mennyiségben termelődnek a tumorsejtekben, túlexpresszálnak a sejtfelszínen az egészséges sejtekhez képest. Ha a hatóanyagot olyan molekulákhoz kapcsolják, amelyek képesek ezeket a specifikus receptorokat felismerni, akkor nagy esély van arra, hogy a hatóanyagot szelektíven juttassák be a tumorsejtbe, és ott felszabadulva az csak ezekben fejtsse ki hatását [8].

Ilyen, irányított tumorterápiára alkalmasak a hatóanyag szállító rendszerek (drug delivery system), amelyek egy hordozóból, egy irányító egységből és a hatóanyagból épülnek fel. Hordozóként oligo- és polipeptideket, továbbá polietilénliglikolt alkalmazhatunk, míg irányító molekulaként cukrokat, lektineket, antitesteket vagy receptor-ligandumokat, például peptideket használhatunk. Nagyon sok esetben az irányító és hordozó szerepét ugyanaz a molekula tölti be [10].

A konjugátum a tumorsejt membránján található receptorhoz kötődik, majd annak segítségével receptor-mediált endocitózissal jut be a sejtbe, lebomlik, és így a felszabaduló hatóanyag vagy annak aktív metabolitja fogja kifejteni hatását (1.ábra) [11].



1. ábra. A célzott tumorterápia hatásmechanizmusa a rákos sejtben [11]

2.1.6 Kombinált irányított tumorterápia

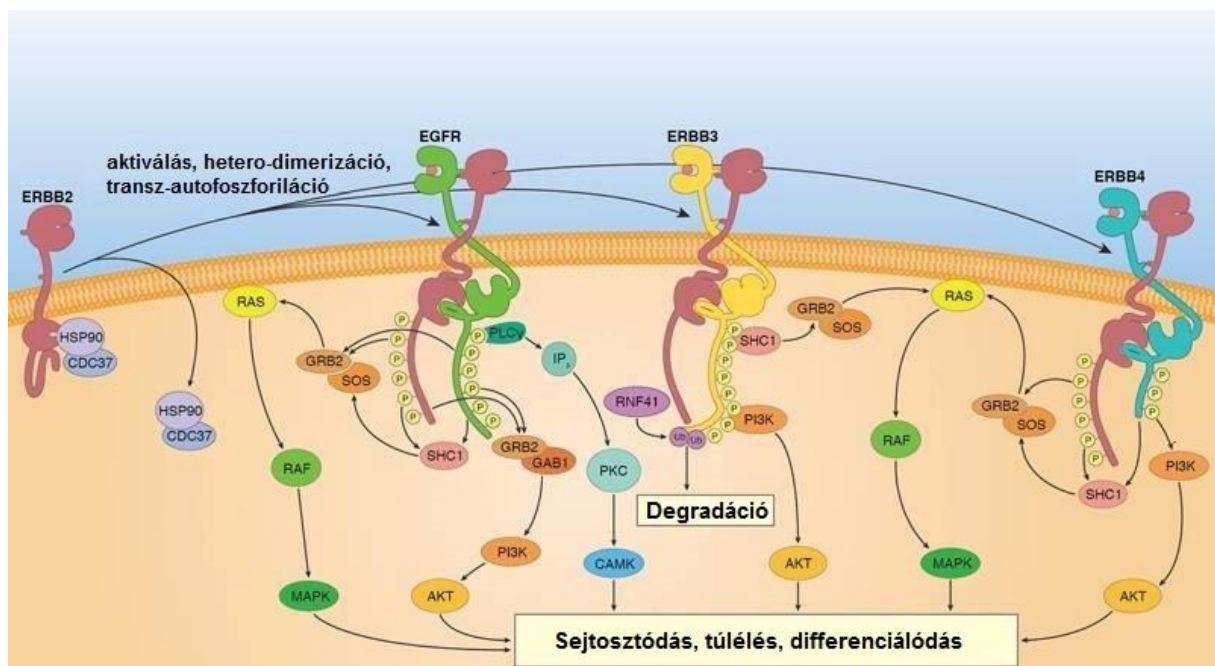
A receptorok száma a tumorsejteken korlátozott, függetlenül attól, hogy túlexpresszálnak-e, így a konjugátum mennyiségének növelése egy bizonyos határon túl a kezelést nem teszi hatékonyabbá. A kombinált kezelés az irányított tumorterápiában is megvalósítható, ha több hatóanyagot kombinálunk egy konjugátumban, vagy egyszerre több konjugátumot alkalmazunk. Ha egy irányító molekulához több hatóanyagot kapcsolunk, ügyelnünk kell arra, hogy a hatóanyag számának növelése miatt az irányító molekula ne veszítse el receptorfelismerő képességét, ne rontsa a receptorhoz való kötődés erősségét [12]. A különböző konjugátumok együttes alkalmazásánál figyelni kell arra, hogy eltérő receptorokat felismerő, különböző irányító molekulákat alkalmazzunk. Ezekhez azonos és különböző hatóanyag is kapcsolható. Így a sejtbe juttatott citosztatikumok a tumorelles hatást additív vagy szinergista módon fokozzák.

A kutatások során egyre több olyan, tumorsejtek által túlexpresszált receptort (GnRH-R, EGF-R, VEGF-R, HER2/ErbB2) fedeznek fel, amelyek az irányított tumorterápiában kiváló célpontok a szelektív célbajuttatáshoz. Ekkor figyelembe kell venni, hogy a célzott receptorok mindegyike megtalálható legyen az adott sejten, hogy az alkalmazott kombinált módszer sikeres legyen [13].

2.2 Humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa (HER2)

A HER2, vagy másik nevén ErbB2 receptor a humán tirozin kináz epidermális növekedési faktor receptorcsalád (HER) tagja. A receptorcsaládot négy transzmembrán receptor alkotja, ennek egyike maga a HER2 [14]. A HER családban az egyes tagok interakcióba lépnek egymással egy komplex szignalizációs hálózatot létrehozva, amelynek kulcsfontosságú szerepe van a sejtek növekedési és differenciálódási folyamatainak szabályozásában. A HER2 számos sejt- és szövettípuson kifejeződik. Normál körülmények között a HER2 fehérje sejt felszíni mennyiségét a sejt magban található két DNS szakasz (gén) határozza meg. Ha a sejt magon belül az egyik gén meghibásodik, és a proto-onkogén aktiválódik, sokszorozódni fog az adott, HER2 fehérjét szabályozó szakasz. A HER2 gén amplifikációja vezet végül a fehérje sejtmembránon való túlexpresszáldásához, felborítva a normál sejtosztódást, ami végül agresszív daganatsejtek képződését eredményezi [15].

A HER receptorcsalád négy tagja a HER1, ami epidermális növekedési faktor receptorként is ismert (EGF-R), a HER2, a HER3 és a HER4 [16]. A HER receptorok három részből tevődnek össze: egy ciszteingazdag extracelluláris ligandum-kötő részből, egy transzmembrán részből, továbbá egy intracelluláris tirozin kináz doménből. A HER2-nek kulcsfontosságú szerepe van az emberi fejlődésben, ugyanis felelős az idegrendszer, az izmok, a szív, a tüdő szöveteinek kialakulásáért és növekedéséért. A HER2 receptor a plazmamembránban általában monomer formában van jelen. Aktiválása függ a jelenlévő ligandumoktól, illetve a többi HER receptor jelenlététől. A különböző növekedési faktor receptorokkal képes interakcióba lépni, így attól függően, hogy önmagával (HER2-HER2) vagy más receptorral (pl. HER1-HER2) lép kölcsönhatásba, homodimer vagy heterodimer forma alakul ki. A dimerizáció hatására a receptorok transz-autofoszforylációra esnek át, és ezzel különböző szignalizációs folyamatokat aktiválnak, mint például a MAP kináz (MAPK), PI3K/ protein kináz B és a protein kináz C jelátviteli útvonalakat. Ezeknek végeredménye a túlzott, szabálytalan sejtosztódás, aminek következtében daganat alakul ki (2. ábra) [15,17].

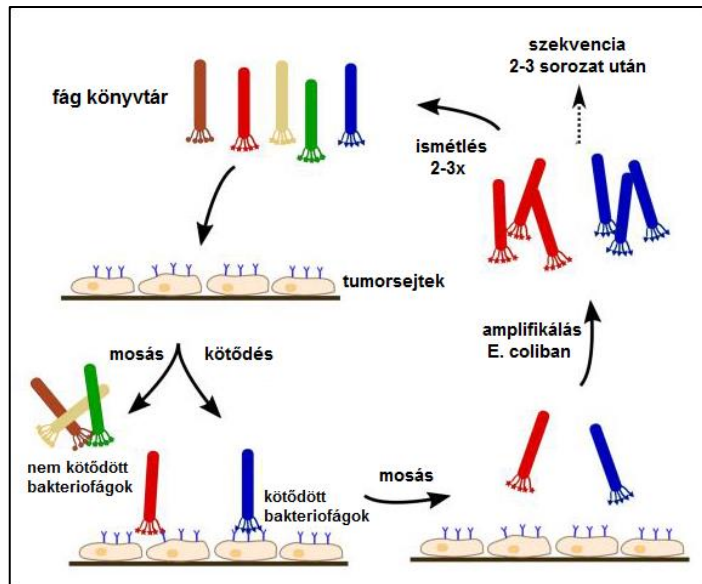


2. ábra. A HER2 (ErbB2) receptor biológiai hatásmechanizmusa

2.2.1 Fág könyvtárból kiválasztott peptid HER2 receptor célzására

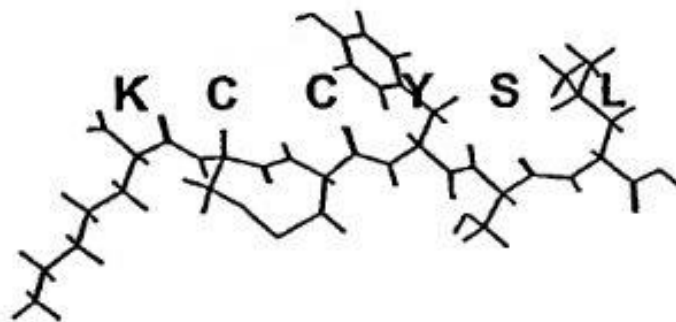
Az elmúlt években a fág könyvtárak egyre nagyobb szerephez jutottak. Ezekben a könyvtárakban olyan specifikus peptideket és fehérjéket állítanak elő, amelyek sejt vagy

szövet-specifikusak. Tetszőleges peptid könyvtárakat képesek előállítani és tesztelni, hogy kötődnek-e valamilyen receptorhoz vagy antigénhez (3. ábra). Az *in vitro* kísérletek után megállapítható azon peptidok szekvenciája, melyek specifikusan a kiválasztott receptorokhoz kötődnek [18]. Ilyen fágbemutatóval azonosították a p6.1 KCCYSL peptidet (4. ábra) is, amelyről kiderült, hogy specifikusan



3. ábra. A fágbemutató mint szelektív eljárás

kötődik a HER2 extracelluláris doménjéhez [19]. A kötődési vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy a p6.1 peptid potenciális irányító molekula lehet célzott kemo- és sugárterápiás kezeléseknél [20–22]. Emellett Ala-scan módszerrel vizsgálták, hogy mely aminosavak jelenléte nélkülözhetetlen a szekvenciában a receptorhoz való kötődés szempontjából. A vizsgálatból kiderült, hogy a ciszteinek külön-külön, illetve együttes kicserélése nem okoz jelentősebb változást a receptorhoz való kötődésben, a Tyr, Ser aminosavak cseréjekor jelentősen csökken a kötődés, míg a leucin kicserélésekor teljesen elveszik a kötődési képesség [20]. Egy tavalyi kutatás folyamán Larimer és munkatársai ugyanezen peptid *N*- és *C*-terminálisát hosszabbították meg öt-, illetve négy tetszőleges aminosavval, hogy növeljék a hatékonyságot (1-D03: MEGPSKCCYSLALSH, 3-G03: GTKSKCCYSLRRSS). Az *in vitro* kötődés vizsgálatból kiderült, hogy az *N*- és *C*-terminálison való hosszabbítás valóban jobb receptorkötődést eredményezett az eredeti peptidhez képest. A meghosszabbított peptideket több HER2+ sejtvonalon is tesztelték, köztük mell-, hasnyálmirigy- és prosztata tumorsejteken, ahol kiderült, hogy az 1-D03 csak az emlőrákos sejtvonalon mutatott kötődést (MDA-MB-435), míg a 3-G03 az összes tesztelt karcinómasejtet kötődött, bár az affinitás az MDA-MB-435 sejtvonalhoz képest alacsonyabb volt minden más esetben [23,24].



4. ábra. A KCCYSL peptid szerkezete [19]

2.2.2 A számítógépes kémia szerepe az irányító molekulák feltérképezésében

Az 1990-es évek elején a fág könyvtárak mellett a kombinatorikus kémia módszerével előállított „one bead, one compound” (OBOC; nyers, szó szerinti fordításban „egy szem, egy összetétel”) peptid könyvtárak is egyre nagyobb szerepet kaptak. A módszer lényege, hogy több millió „gyantaszemből” alkotják meg a könyvtárat, ahol minden „szem” egy peptidet jelent, így a teljes peptidvaráció jelenléte lehetséges a gyűjteményben. Világos, hogy a „one bead, one compound” könyvtár előállításához nem elég a peptidszintézis során az aktivált aminosavak tetszőleges keverékét alkalmazni, mivel a különböző aminosavak eltérő arányban lesznek jelen, és mert minden „szem” a különböző aminosavak keverékét fogja tartalmazni. Tehát a szintézis folyamán minden kapcsolás előtt a gyantát annyi részre osztják szét, amennyi tetszőleges aminosavat akarnak az adott pozícióba beépíteni. A tetszőleges aminosav felkapcsolása után a mintákat összekeverik a mosási, hasítási lépésekhez, majd újra osztják a kapcsolás előtt. Így minden gyantaszem csak egyféle peptidet fog tartalmazni (osztásos-keveréses módszer továbbfejlesztése) [26]. Végül ezeket célmolekulákhoz keverik, pl. enzimekhez, fehérjékhez, baktériumokhoz, vírusokhoz, és azon peptidek szerkezetét, amelyek interakcióba lépnek, szekvenálással határozzák meg [27]. Ez alapján tudják például receptorhoz való kötődésüket vizsgálni a későbbiekben ezeknek a peptideknek. Az ilyen OBOC peptid könyvtárak szkennelését ötvözik napjainkban különböző számítógépes kémiai módszerekkel. Ilyen módszer például a molekula dinamikai modellezés (MD), és a kötődési szabadenergia számítások. Egy tanulmányban ilyen módszerek alkalmazásával fedeztek fel 72 peptidet, amelyek specifikusan a HER2 receptorhoz kötődhetnek. Mivel jelenleg még nem ismert a HER2 receptornak sem a homo-, sem a heterodimer formájának kristályos szerkezete, így a szimulációkhoz kezdeti szerkezetként a HER1 homodimer formájának extracelluláris doménjét alkalmazták. Megtartva a HER1 monomerjének teljes szerkezetét szimulációkat végeztek, majd

maga a HER1 és a HER1 ligandum komplexeit összeolvasztották a teljes HER2 receptor szerkezetével, így megkapva a HER2 heterodimer modellt. A felfedezett 72 új peptidet 3 kategóriába lehetett csoportosítani a szekvenciájukban megtalálható egyforma motívumok alapján: **PYL***NP**, **YYL***NP**, és **PPL***NP**. A számítások alapján a 72 peptid közül 2 olyat találtak, amelyeknek a legerősebb volt a HER2-höz történő kötődési affinitása, ez a P51 (**CDTF**P**YLGWWNPNEYRY**) és a P25 (**CKTI**Y**YLGYYNPNEYRY**) volt. Az elméleti kémiai számítások mellett a két peptiddel biológiai vizsgálatokat is végeztek, amelyek korreláltak a számítási eredményekkel [28]. Ezek alapján kijelenthető, hogy alkalmasak lehetnek irányító molekulaként HER2+ daganatok terápiás kezelésében.

3. Alkalmazott módszer

3.1 Peptidszintézis

A peptidek előállításának két formája ismeretes, a napjainkban már ritkábban alkalmazott oldatfázisú, illetve a szilárdfázisú peptidszintézis.

A hagyományos, homogén oldatban végzett peptidszintézis során kisebb peptideket lépésenkénti szintézissel építenek fel, illetve nagyobb tagszámú peptideket ezek fragmentskondenzációjával alakítják ki. Minden lépés után izolálni kell a terméket, ami az oldatból való kicsapással történik. Az egyes kapcsolási reakciók kitermelése 60-90%-os, vagyis a reakciók anyagvesztéssel járnak. Amennyiben egy hosszabb szintézis során sok aminosavat vagy peptidfragmenst kell összekapcsolni egymás után, előfordulhat, hogy a szintézis végére kevés termék marad. Így elmondható, hogy az oldatban végzett peptidszintézis kevésbé hatékony módszer és emellett időigényes is. A peptidszintézis módszerét az 1960-as évek elején Merrifield fejlesztette tovább a szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS) bevezetésével. Ez az eljárás — amely forradalmasította a peptidszintézist — a peptidek előállítását hatékonyabbá, gyorsabbá és egyszerűbbé tette [29]. Az oldatban végzett szintézishez hasonlóan, a peptid felépítése történhet lépésenként, amikor az aminosavakat egyesével építjük be (stepwise) a *C*-terminális felől az *N*-terminális felé, vagy fragmentskondenzációval, amikor a gyantán hosszabb, védett vagy részlegesen védett peptidláncokat kapcsolnak össze (konvergens szilárdfázisú peptidszintézis) [30].

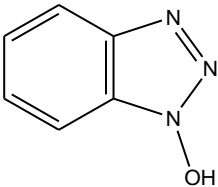
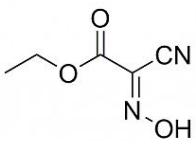
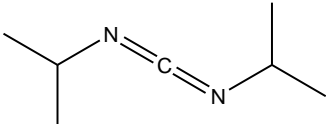
Ha két aminosavat össze akarunk kapcsolni, számos terméket kaphatunk a vízkilépés mellett. Ahhoz, hogy ezt elkerüljük, és egyértelmű reakcióval egy termékhez jussunk, a megfelelő aminosavak karboxil-, illetve aminocsoportját védeni kell. A lépésenkénti szilárdfázisú peptidszintézis során a peptid *C*-terminális védelmét egy oldhatatlan, szilárd hordozó, a gyanta látja el. Mivel a szilárdfázisú peptidszintézis folyamán a termékeket nem izoláljuk, tisztítjuk, így annak érdekében, hogy megfelelő tisztaságú nyersterméket kapjunk, nagy reagens felesleget kell alkalmaznunk. Ezért az aminosavak aminocsoportjának átmeneti védelme mellett az oldallánc funkciós csoportokat is védeni kell a szintézis befejezéséig állandó védőcsoportok alkalmazásával.

Az SPPS technika során a peptid egy oldhatatlan, szilárd hordozóhoz van rögzítve a szintézis befejezéséig. Szilárd hordozóként olyan polimereket használnak, amelyeken funkciós csoportok találhatóak. Ezen funkciós csoportokon keresztül képes kapcsolódni a peptid *C*-

terminálisán lévő első aminosav a hordozóhoz/gyantához. A lépésenkénti szintézis során először az oldalláncán védett peptid *N*-terminálisán lévő védőcsoportot el kell távolítani. Ezt követően a következő, megfelelően védett, és karboxilcsoportján aktivált aminosav-származékot hozzá kell kapcsolni a peptid szabad aminocsoportjához, így kialakítva a peptidkötést az aminosavak között. E két ismétlődő alaplépéssel könnyen előállítható a kívánt peptidlánc, ami a szintézis végéig rögzítve marad a gyantán. A kész peptidről ezután az állandó védőcsoportokat el kell távolítani, ami általában egy lépésben történik meg a gyantáról való lehasítással. A hasítás során kapott anyagkeverékben az előállítani kívánt termék mellett többnyire megtalálhatóak hibás, hiányos, nagyon hasonló szekvenciájú peptidek is. Ezért különböző tisztítási eljárásokat kell alkalmazni, hogy végül a kívánt tiszta peptidet megkapjuk [31]. A leghatékonyabb tisztítási eljárás a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), amelynek nagy szerepe volt a szilárdfázisú peptidszintézis elterjedésében.

Az SPPS módszer előnye, hogy az oldószerek, a képződött melléktermékek, illetve az elreagált kapcsoló reagensek minden lépés után szűréssel könnyen eltávolíthatóak, miközben a gyantához kötött peptid végig a szűrőn marad. Ezáltal a veszteség csökken, és emellett a szintézis egyetlen reakcióedényben elvégezhető. A szilárdfázisú peptidszintézis technika egyben gyorsítja a szintézist, mivel egy aminosav felkapcsolása kb. 2 órát igényel, míg oldatfázisú technika esetében ez akár egy nap is lehet. A hatékonyságot és gyorsaságot fokozhatja a folyamatos üzemmódú, automatizált peptidszintetizátorok alkalmazása. Ugyanakkor a technika hátránya, hogy bár a reagensek könnyen eltávolíthatók, de a termék izolálására csak a gyantáról való lehasítás után van mód, az intermedierek tisztítására nincs lehetőség. Ahhoz, hogy a hibás szekvenciák száma a lehető legminimálisabb legyen, az egyes kapcsolási reakcióknak és a hasításnak közel 100%-os konverzióval kell lejárniuk. Ennek eléréséhez az aktiváló reagensek és az aminosav-származékok gyantakapacitáshoz viszonyított 3-5 ekvivalens mennyiségét kell alkalmazni, ami a módszert elég költségessé teszi.

A védett aminosav-származékok karboxilcsoportját aktiválni kell a kapcsolási reakciók során. Így a kapcsolásokhoz aktiváló szereket használnak (*1.táblázat*), amiknek elege aktív észter képez, és *in situ* elreagál a peptid szabad aminocsoportjával, így kialakítva a peptidkötést (*5. ábra*). Ezt a módszert nevezzük *in situ* aktív észteres kapcsolásnak.

aktiváló reagensek	rövidítés	képlet
1-hidroxi-benzotriazol	HOBt	
etil-ciano(hidroxi-imino)-acetát	Oxyma Pure	
<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid	DIC	

1. táblázat. A peptidszintézis során általam alkalmazott aktiváló reagensek

3.1.1 A gyanta

A gyantán funkciós csoportok találhatóak, amelyekhez az előállítani kívánt peptid első (C-terminális) aminosavjának karboxilcsoportja hozzákapcsolható. A funkciós csoporttól függően vannak olyan hordozók, amelyekről a peptid hasítása után a peptid C-terminálisa szabad karboxilcsoporttal, vagy amidált formában kapható meg. A hordozókkal szemben alapvető elvárás, hogy mechanikailag stabilak, kémiaiilag inerteek legyenek, jól duzzadjanak az alkalmazott oldószerekben, szűrősebségük optimális legyen. A gyanta és peptid között kialakuló kovalens kötésnek stabilnak kell lennie a szintézis során, de a peptid a hasításkor könnyen eltávolítható kell legyen. Emellett a gyanták fontos jellemzője a gyantakapacitás. Kisebb peptidek szintézisére a nagy kapacitású (~ 1,0 mmol/g) gyanták alkalmasak, míg a nagyobb tagszámú, esetleg elágazó peptidek szintéziséhez alacsonyabb kapacitású hordozókat választanak a kialakuló térgátlás kiküszöbölésére.

Merrifield a szilárdfázisú módszer fejlesztése során többféle gyantát is alkalmazott, amelyek közül a klórmetil funkciós csoportokat tartalmazó polisztirol 1,4-divinilbenzol (1-2%) kopolimer bizonyult a legjobbnak. Ez a keresztkötésekkel (térhálós) rendelkező hordozó eléggé porózus szerkezetű, így a reagensek számára a gyanta kellőképpen átjárható [31].

Napjainkban a gyanták széles választéka áll rendelkezésre, amelyek különböző funkciós csoportokat vagy funkcionális linkereket tartalmaznak. Legelterjedtebbek a 4-metilbenzidril-amin (MBHA), a Rink Amid MBHA [4-(2',4'-dimetoxi-fenil-aminometil)-fenoxi acetamido-norleucil-MBHA] és a 4-benziloxi-benzilalkohol funkciós csoportot tartalmazó (Wang) gyanták. A Wang gyantát karboxil C-terminálisú peptidok, az MBHA típusú gyantákat pedig peptidamidok előállítására használják [32,33].

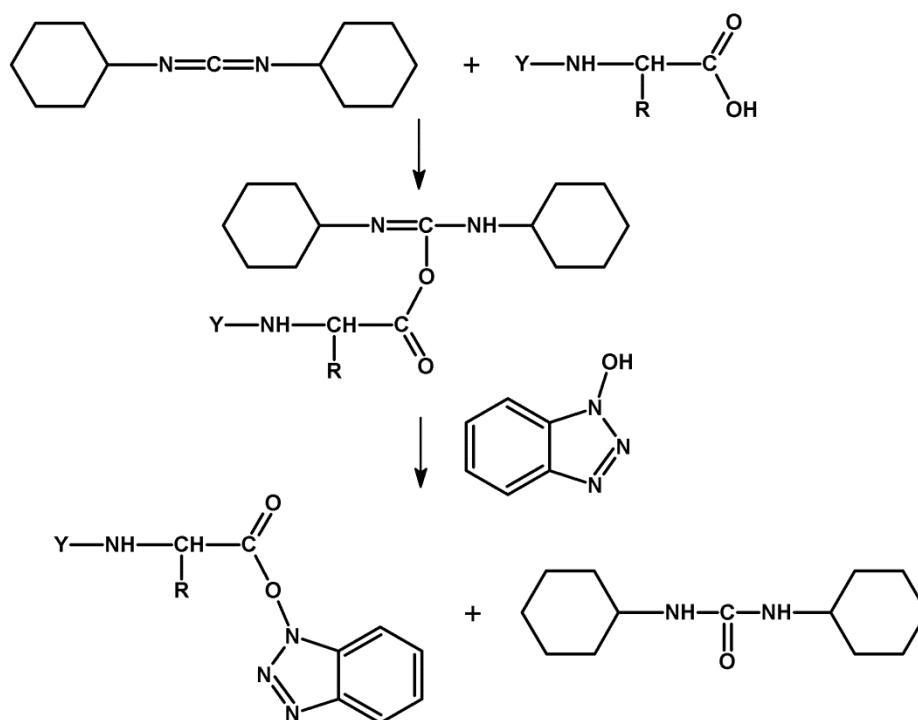
3.1.2 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái

A szilárdfázisú peptidszintézis két általánosan használt alapszabványát különíthetjük el:

- Boc/Bzl stratégia: az aminosav-származékok α -aminocsoportjának védelmére *tert*-butiloxikarbonil-csoportot használnak [34],
- Fmoc/^tBu stratégia: az aminosav-származékok α -aminocsoportot 9-fluorenil-metoxikarbonil-csoport védi [35].

Azt, hogy melyik stratégiát célszerű alkalmazni, a peptid szekvenciája határozza meg.

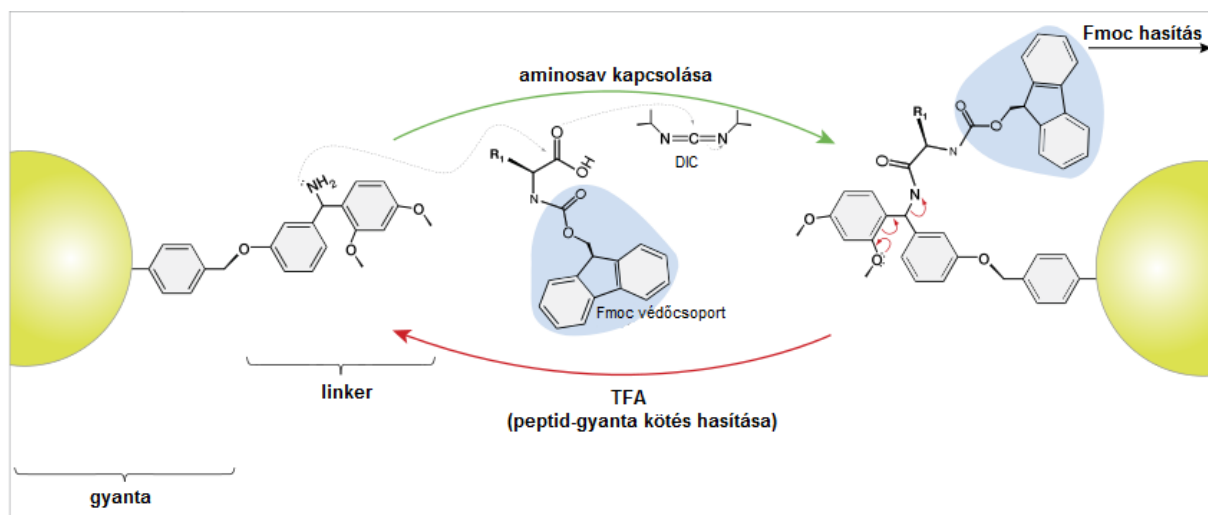
A Boc/Bzl stratégia során az α -aminocsoport védelmét a *tert*-butiloxikarbonil (Boc)-csoport látja el, az oldallánc védőcsoportok védelmére pedig főként benzil típusú csoportok szolgálnak. Az átmeneti védelmet biztosító Boc-csoport nukleofilekkel és lúgokkal szemben stabil, de rendkívül savérzékeny, ezért eltávolításához közép-erős savakat alkalmaznak. Lehasítását 30-50% TFA/DCM eleggyel végzik, 20-30 perces reakcióidőt alkalmazva. Mivel az átmeneti védőcsoport hasítása savas közegben történik, az érzékeny aminosavak (Trp, Cys, Met) könnyen alkileződnek a keletkező reaktív *tert*-butil kation miatt. Ezért, hogy a *tert*-butil kation koncentrációt csökkentsék, két lépésben szokták a hasítást végezni. A Boc-csoport hasítása után az α -aminocsoport trifluoracetát só formájában lesz jelen, emiatt semlegesíteni kell. A semlegesítéshez 5-10% DIEA/DCM elegyet alkalmaznak. A kapcsolási reakcióknál aktív észter alakítanak ki DCC és HOBt kapcsolószerek használatával (5. ábra).



5. ábra. Az *in situ* aktív észter kialakítása

Mivel a peptid – gyanta közötti kötésnek a szintézis végéig stabilnak kell maradnia, ebben az esetben olyan gyantákat alkalmaznak, amelyekről erős savakkal (HF, TFMSA, TMSOTf) hasítható a peptid. Ilyen körülmények között az aminosavak oldalláncát védő csoportok is lehasadnak. Ha a peptid savas körülmények között oxidációra és alkileződésre érzékeny aminosavakat is tartalmaz (Trp, Cys, Met, Tyr), akkor a hasításkor speciális gyökfogókat (kationfogókat) és redukálószerket is alkalmaznak, hogy a mellékreakciókat minimalizálják. Az Fmoc/^tBu stratégia előnye a Boc/Bzl módszerrel ellentétben, hogy olyan peptidok szintézisére alkalmasabb, amelyek a fenti körülmények között érzékenyek (Trp, Cys, Met, Tyr). Az α-aminocsoport átmeneti védelmét 9-fluorenilmetiloxikarbonil-csoporttal (Fmoc) védik, míg az oldalláncokon lévő funkciós csoportok védelmét *tert*-butil típusú védőcsoportokkal biztosítják. Az Fmoc-csoport stabil savakkal szemben, viszont bázisokra érzékeny, így hasítását 20 – 55%-os piperidin/DMF oldattal végzik. A hasítás során reaktív dibenzofulvén keletkezik, ami képes egyes aminosavakat alkilezni, de a piperidinnel stabil adduktot képez, ezzel elkerülve a mellékreakciókat. A legjobb hasítóelegynek a 2% piperidin – 2% 1,8-diazabiciklo[5.4.0]-undek-7-én (DBU) elegyét tartalmazó DMF oldat bizonyult. A hasítás ebben az esetben gyorsabb, illetve térgátlás esetén is hatékonyan hasítja le az átmeneti védőcsoportot, és az enantiomerizáció kialakulási valószínűsége is csökken [36].

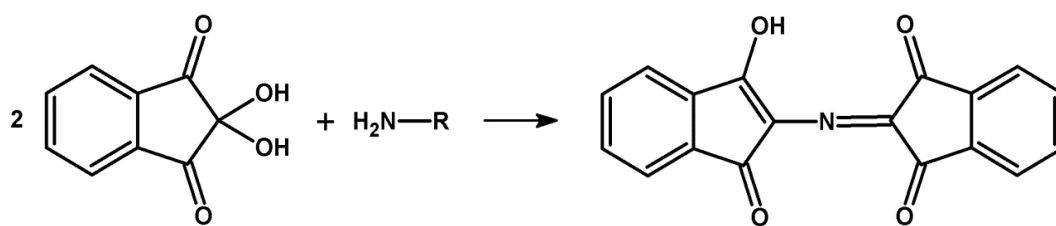
Az aminosav-származékok kapcsolásához HOBt és DIC aktiváló reagenseket alkalmaznak, 3-5 ekvivalens mennyiségben a gyantakapacitásra nézve. A gyantáról való hasítás és az állandó védőcsoportok eltávolítása egy lépésben történik. A hasítási reakciót 80 – 95% TFA oldattal végzik. A reakció során keletkező reaktív karbokationok miatt kation befogókat alkalmaznak. A leggyakrabban használt kation befogók a víz és a triizopropil-szilán (TIS) (6. ábra).



6. ábra. Szilárdfázisú peptidszintézis Fmoc/^tBu technika alkalmazásával Rink Amid MBHA gyantán

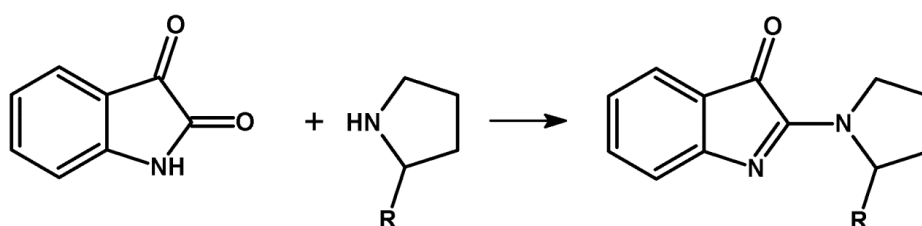
3.1.3 A kapcsolási reakciók követése

A szintézis során a hibás, hiányos szekvenciák elkerülése miatt kulcsfontosságú az egyes kapcsolási reakciók sikerességének követése. Ezt az ún. ninhidrin- vagy Kaiser-tesztel tudjuk ellenőrizni (7. ábra), amely során a gyantaszemekhez pár csepp ninhidrin-, KCN-, továbbá fenol-oldatot adunk, majd 3-5 percig 104 °C-on melegítjük. Ha az oldat színe nem változik (sárga marad), akkor sikeres volt a kapcsolási reakció, és nincsenek jelen szabad aminosocsoportok. A szabad aminosocsoporttal rendelkező peptidek ninhidrinnel való reakciójuk során jellegzetes kék színreakciót adnak, ezért abban az esetben, ha az oldat és/vagy a gyanta kékké válik, a kapcsolás sikertelen volt, és meg kell ismételni. A módszer rendkívül érzékeny, ugyanis már 1% szabad aminosocsoport jelenlétében is intenzív kék színreakciót ad [37].



7. ábra. Kaiser-teszt

A prolin kivételével a teszt minden aminosav esetében jól alkalmazható. Mivel a prolin egy szekunder aminosav, az aminocsoportja gyűrűbe van zárva, így attól függetlenül, hogy reagál ninhidrinnel, az oldat színe nem változik a kiindulási oldat színéhez képest még szabad aminos csoportok jelenlétében sem. Ezért a Kaiser-teszt reagensei mellett a gyantaszemekhez izatin-oldatot is adunk. Sikertelen kapcsolat esetén a gyantaszemek ekkor vörösesbarna színűvé válnak (8. ábra) [38].



8. ábra. Prolin reakciója izatinnal

4. Célkitűzések

Munkám célja olyan peptidanalógok szintézise volt, amelyek potenciális irányító molekulák lehetnek a célzott tumorterápiában.

Ezért a választásom egyrészt egy fág könyvtárból kiválasztott lineáris peptidre (KCCYSL) esett, amelyről a vizsgálatok során kiderült, hogy szelektíven képes kötődni a HER2 receptor extracelluláris doménjéhez. Továbbá egy olyan, molekula dinamikai (MD) szimuláció vizsgálatokkal felderített peptidrészletet (GYYNPT) választottam, amely a HER1 receptor mellett képes specifikusan HER2 receptorhoz is kötődni. Ennek jelentőségét az adja, hogy a HER2 képes kölcsönhatásba lépni a humán epidermális növekedési faktor receptorcsalád többi tagjával, köztük az említett HER1 receptorral is.

Céлом volt:

- Az 5,6-karboxifluoreszceinnel (CF) jelzett KCCYSL (*CF-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂*) és GYYNPT (*CF-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH₂*) peptidek szintézise Rink Amid MBHA gyantán.
- A KCCYSL peptidben található ciszteinek helyettesítése alanin és szerin aminosavakkal, illetve távolságuk növelése glicin(ek) beépítésével. Ezek alapján a következő analógokat terveztem előállítani: *CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH₂*, *CF-Lys-Ser-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH₂*, *CF-Lys-Ser-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂*, *CF-Lys-Cys-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH₂*, *CF-Lys-Cys-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂*, *CF-Lys-Cys-Gly-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂*. Az esetlegesen fellépő oxidáció gátlására Acm védőcsoporttal védett ciszteint tartalmazó (*CF-Lys-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr-Ser-Leu-NH₂*) variánst is elő kívántam állítani.
- Az MD szimuláció modellezés folyamán a P25 és P51 peptidek szekvenciájában szereplő GYYNPT/GWWNPT peptidrészlet *N*-terminálisán PLY illetve YYL motívum volt megtalálható. Mivel mindkét motívum hasonlít a fág könyvtárból kiválasztott KCCYSL szekvencia YSL részletéhez, így tanulmányozni szerettem volna a KAAAYSL és GYYNPT, illetve GWWNPT peptidek kombinációját, ezért céлом volt ezek szintézise és jelölésük 5,6-karboxifluoreszceinnel (*CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH₂*, *CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Trp-Trp-Asn-Pro-Thr-NH₂*).

- A fluoreszcensen jelzett fág könyvtárból származó peptid, az MD vizsgálat során felfedezett peptidrészlet, illetve ezek analógjainak *in vitro* sejtfelvételi vizsgálata MDA-MB-435 HER2 pozitív humán emlőkarcinóma sejteken.

5. Eredmények

Célkitűzéseimnek megfelelően munkám során különféle peptid analógokat állítottam elő, amelyek specifikusan kötődnek HER2 receptorhoz.

Az analógok előállítása és vizsgálata három részből tevődött össze:

- a fág könyvtárból kiválasztott, illetve az MD vizsgálat alapján feltérképezett két referencia peptid, majd ezt követően a variánsok megépítése és ezek fluoreszcens jelölése;
- a vegyületek tisztítása, azonosítása;
- a tiszta peptid-analógok *in vitro* sejtfelvételi vizsgálata.

A peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel (SPPS), manuálisan végeztem, Fmoc/^tBu stratégiát alkalmazva.

5.1 A fág könyvtárból kiválasztott KCCYSL peptid és analógjainak szintézise

5.1.1 A CF-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂, a CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH₂, és a CF-Lys-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr-Ser-Leu-NH₂ szintézise

A KCCYSL hexapeptid szintézisét Fmoc/^tBu stratégiát alkalmazva Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán manuálisan végeztem. Első lépésként a gyantán található Fmoc-védőcsoportot hasítottam 2% piperidin – 2% DBU/DMF elegyével, majd az aminosavakat lépésenként építettem be DIC/HOBt aktiváló reagensek felhasználásával. Az egyes kapcsolási reakciók folyamán az Fmoc-védett aminosavszármazékokból és a kapcsoló reagensekből gyantakapacitásra számolt három ekvivalens mennyiséget alkalmaztam. A szekvenciában található tirozin beépítése után a gyantát öt egyforma részre osztottam: kétötöd részt félreraktam a későbbi analógok szintéziséhez, egyötöd-egyötöd részén megépítettem az alanint és az Acm oldallánc-védőcsoporttal rendelkező cisztein tartalmú szekvenciát. A maradék egyötöd részen pedig folytattam a referencia peptid megépítését. A lizin felépítését követően, az Fmoc védőcsoport hasítása után, 5,6-karboxifluoreszceint (CF) kapcsoltam a fent említett DIC/HOBt kapcsolószerek elegyével. Ebben az esetben is az aktiváló reagensek és a karboxifluoreszcein a gyantakapacitásra nézve három ekvivalens mennyiségével dolgoztam. A szintézis befejeztével a két ciszteint tartalmazó peptideket 95% trifluorecetsav (TFA), 2,5% desztillált víz, 2,5% triizopropil-szilán (TIS) elegyével hasítottam a gyantáról, míg az alanin tartalmú peptid esetében hasító elegyként 95% TFA-t és 5% desztillált vizet alkalmaztam. Ezen elegyekkel sikeres volt az oldallánc védőcsoportok eltávolítása is az Acm védőcsoport kivételével (az Acm védőcsoportot szándékosan hagytuk rajta a cisztein oldalláncán az esetlegesen fellépő oxidáció gátlására). A hasítási reakció letelte után a peptideket éterben kicsaptam a hasító elegyből, majd a centrifugálást követően víz és acetonitril elegyében oldottam. A feloldott nyers peptid oldatokat folyékony nitrogénben fagyasztottam a liofilizáláshoz, majd az így kapott liofilizált, szilárd nyerstermékeket fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztítottam. A termékeket elektropray-ionizációs tömegspektrometriás (ESI-MS) méréssel azonosítottuk, tisztaságukat analitikai HPLC-vel ellenőriztem.

5.1.2 A CF-Lys-Cys-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂ és a CF-Lys-Cys-Gly-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂ szintézise

A félretett kétötöd rész gyanta-peptidet (Fmoc-Tyr(^tBu)-Ser(^tBu)-Leu-®) két egyenlő részre osztottam a két, glicin tartalmú analóg megépítéséhez. Az Fmoc-védőcsoport fent említett hasítási protokoll elvégzése után a peptid megépítését a gyantakapacitásra számolt három ekvivalens kapcsoló szerekkel és aminosav-származékokkal végeztem. Mindkét peptid esetében azt tapasztaltam, hogy az első cisztein beépítése után a fenti DIC/HOBT reagensek alkalmazása nem bizonyult megfelelőnek az egymást követő, többszöri sikertelen kapcsolásból ítélve. Így a peptidek megépítéséhez a HOBT helyett etil-ciano(hidroxi-imino)-acetátot, másnéven Oxyma Pure-t alkalmaztam mint erősebb aktiváló reagens. Az egyes kapcsolási reakciók folyamán a gyantakapacitásra számolt öt ekvivalens kapcsolószer-mennyiséggel dolgoztam. A kész peptideket ebben az esetben is TFA, desztillált víz, TIS 95:2,5:2,5 arányú elegyével hasítottam le a gyantáról, majd éterben csaptam a reakcióelegyből, és centrifugáltam. Végül a fent említett desztillált víz-acetonitril elegyével oldottam fel a peptideket, majd liofilizáltam az így kapott oldatokat. Az így kinyert, még nyers peptideket félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, majd a frakciók tisztaságát analitikai HPLC-vel, azonosításukat tömegspektrométerrel ellenőriztük.

5.1.3 A CF-Lys-Ser-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH₂, a CF-Lys-Cys-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH₂ és a CF-Lys-Ser-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂ szintézise

Ezen három peptid-analóg szintézisét hasonlóan végeztem, mint a fent említett KCCYSL szekvencia esetében. Ennél a szintézisnél is Fmoc-Rink Amid MBHA gyantát és Fmoc/^tBu technikát alkalmaztam. Az Fmoc-csoport lehasítása ebben az esetben is 2% piperidin – 2% DBU/DMF elegyével történt. A peptidet az Fmoc-Tyr(^tBu)-Ser(^tBu)-Leu-Rink Amid MBHA szekvenciárisig építettem, majd három egyenlő részre osztottam. Az egyes kívánt szekvenciákat külön-külön fejeztem be.

Ezen variánsok megépítése közben ugyanazzal a problémával szembesültem, mint a glicint tartalmazó analógok esetében, hogy az első Cys, illetve a második Ser felkapcsolása után a szintézisprobléma csak a gyantakapacitásra számolt öt ekvivalens mennyiségű Oxyma

Pure/DIC aktiváló reagensekkel küszöbölhető ki. A peptideket felépítésük után a fent említett 95:2,5:2,5 arányú TFA/desztillált víz/ TIS elegyével hasítottam a gyantáról, ekkor az oldallánc-védőcsoportok is lehasadtak. Ezt követően a peptideket dietil-éterben csaptam ki a hasító elegyből, majd desztillált vízben sikeresen oldottam. A peptidek oldatát folyékony nitrogénnel való fagyasztás után liofilizáltam. A liofilizálás után kapott szilárd nyerstermékeket félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. A végtermékek tisztaságát analitikai HPLC-vel ellenőriztem, azonosításukat pedig ESI-MS segítségével végeztük (2. táblázat).

vegyület	R_t (perc)	$M_{számolt}$ (Da)	$M_{mért}$ (Da)
CF-KCCYSL-NH ₂	29,9	1072,9	1072,8
CF-KAAAYSL-NH ₂	28,8	1007,8	1008,4
CF-KCGCYSL-NH ₂	29,4	1129,9	1129,8
CF-KCGGCYSL-NH ₂	31,7	1186,0	1186,0
CF-KC(Acm)C(Acm)YSL-NH ₂	28,8	1214,5	1214,0
CF-KCSYSL-NH ₂	29,7	1056,7	1056,4
CF-KSCYSL-NH ₂	29,5	1056,7	1056,4
CF-KSSYSL-NH ₂	27,6	1040,8	1040,5

2. táblázat. A KCCYSL-NH₂ peptid és az analógok analitikai adatainak összefoglalása

A táblázat a Függelék 1–16. ábrái alapján készült.

5.2 A molekula dinamika szimulációkkal feltérképezett GYYNPT/GWWNPT peptidrészetek, illetve KCCYSL analóggal való kombinációk szintézise

5.2.1 A CF-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH₂ peptid szintézise

Mivel az MD szimulációkkal feltérképezett két peptidrészetben (GWWNPT, GYYNPT) található tirozin, illetve triptofán aminosav között nincs számottevő különbség, így a mellékreakciók tekintetében kevésbé problémás tirozint tartalmazó peptidet építettem meg manuálisan Fmoc/^tBu technikát alkalmazva Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán. Az első lépés itt is az Fmoc-védőcsoport eltávolítása volt a fent említett 2% piperidin – 2% DBU/DMF

elegyével. Ennél a szekvenciánál is a kapcsolási reakciók folyamán mind a védett aminosavszármazékokból, mind a HOBt/DIC aktiváló reagensekből a gyantakapacitásra számolt három ekvivalens mennyiséget alkalmaztam. A szintézis befejezése után a gyantáról való hasítást és a peptid oldallánc védőcsoportjainak eltávolítását TFA/fenol/H₂O/tioanizol/EDT elegyével végeztem. A hasítási reakcióidő letelte után éterben kicsaptam a peptidet, végül desztillált víz-acetonitril elegyében feloldottam. A peptid oldatot folyékony nitrogénben fagyasztottam a liofilizáláshoz. A nyersterméket preparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, majd tömegspektrométerrel azonosítottuk, a frakció tisztaságát pedig analitikai HPLC-vel ellenőriztem.

5.2.2 A CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Trp-Trp-Asn-Pro-Thr-NH₂ és a CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH₂ szintézise

A két különböző módon kiválasztott, HER2 receptort felismerő szekvenciából előállítottam két, azokat kombináló fluoreszcensen jelzett dodekapeptidet. A KCCYSL analógok *in vitro* sejtbejutási eredményeiből kiindulva választásunk a legegyszerűbb szekvenciájú (KAAYSL) peptidre esett, amelyet a GWWNPT és GYYNPT szekvenciariészletet tartalmazó peptidek *N*-terminálisán építettem fel. A két kombinált peptid szintéziséhez Fmoc-Rink Amid MBHA gyantát és Fmoc/^tBu technikát alkalmaztam. Az aszparagin beépítése után két egyenlő részre osztottam a gyantát, az egyik felére a KAAYSLGWW, a másikra a KAAYSLGYY peptidet építettem a megfelelő védett aminosavakat használva. Ezen peptidek esetén is a peptidek *N*-terminálisára 5,6-karboxifluoresceint kapcsoltam jelölőmolekulaként. Ezt követően a két felépített peptidet TFA/H₂O/TIS elegyével hasítottam a gyantáról, a rajtuk található védőcsoportok eltávolításával egyidejűleg. Az éterben való kicsapás, majd a desztillált víz-acetonitril elegyében való feloldás után a két peptid oldatot lefagyasztottam, és liofilizáltam. Ezt követően szemipreparatív fordított fázisú HPLC-vel tisztítottam, ESI-MS segítségével azonosítottuk, és analitikai HPLC-vel ellenőriztem tisztaságukat (3. táblázat).

vegyület	R _t (perc)	M _{számolt} (Da)	M _{mért} (Da)
CF-GYYNPT-NH ₂	30,0	1070,8	1070,4
CF-KAAYSLGWWNPT-NH ₂	33,1	1750,6	1750,6
CF-KAAYSLGYYNPT-NH ₂	29,7	1704,5	1704,4

3. táblázat. A referencia peptid és a kombinációk analitikai adatainak összefoglalása

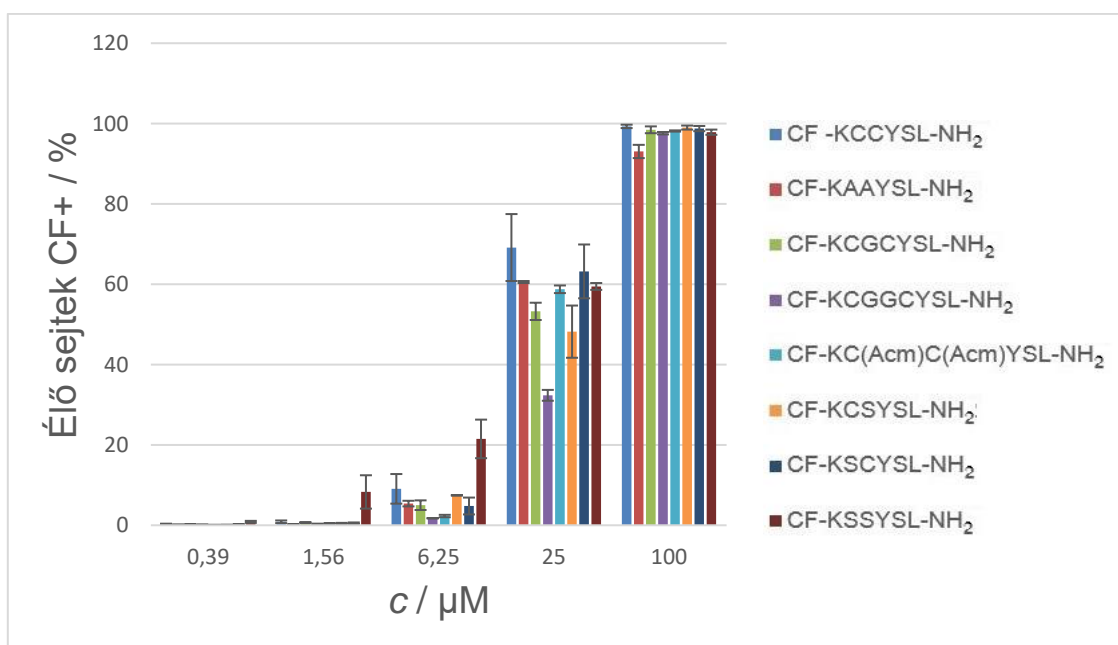
A táblázat a Függelék 17–22. ábrái alapján készült.

5.3 A referencia peptidek és azok analógjainak *in vitro* biológiai vizsgálata

5.3.1 A KCCYSL és variánsainak sejtbevételi vizsgálata

Az 5,6-karboxifluoreszceinnel jelzett KCCYSL referencia peptid és az előállított analógjainak *in vitro* sejtbevételi vizsgálatát áramlási citometria mérésel vizsgáltuk MDA-MB-453 HER2+ humán emlőkarcinóma sejtvonalon. Mivel a szerin tartalmú analógok kivételével minden peptidnek rossz volt az oldódása, így a hígítást dimetil-szulfoxidban (DMSO) végeztük (a kontroll sejtek médiuma a kezeltekével azonos térfogatú DMSO-t tartalmazott).

Az MDA-MB-453 sejteket egy órán keresztül inkubáltuk a jelzett peptidekkel. Az egy órás inkubációs idő lejárta után a humán emlőkarcinóma sejteket tripszinnel kezeltük, mely a sejtek lemezről történő tapadásának megszüntetése mellett eltávolítja azokat a sejtfelszínen megtalálható struktúrákat, amelyek nem specifikus kötődést tennének lehetővé. Ez a lépés a preparációs idő folyamán azért kulcsfontosságú, mert így a mérés folyamán csak azoknak az analógoknak a fluoreszcenciáját detektáljuk, amelyek valóban bejutnak a sejtbe. Az intenzitás eltolódásának nagyságából pedig következtetni tudunk az egyes variánsok *in vitro* sejtbejutási képességére.



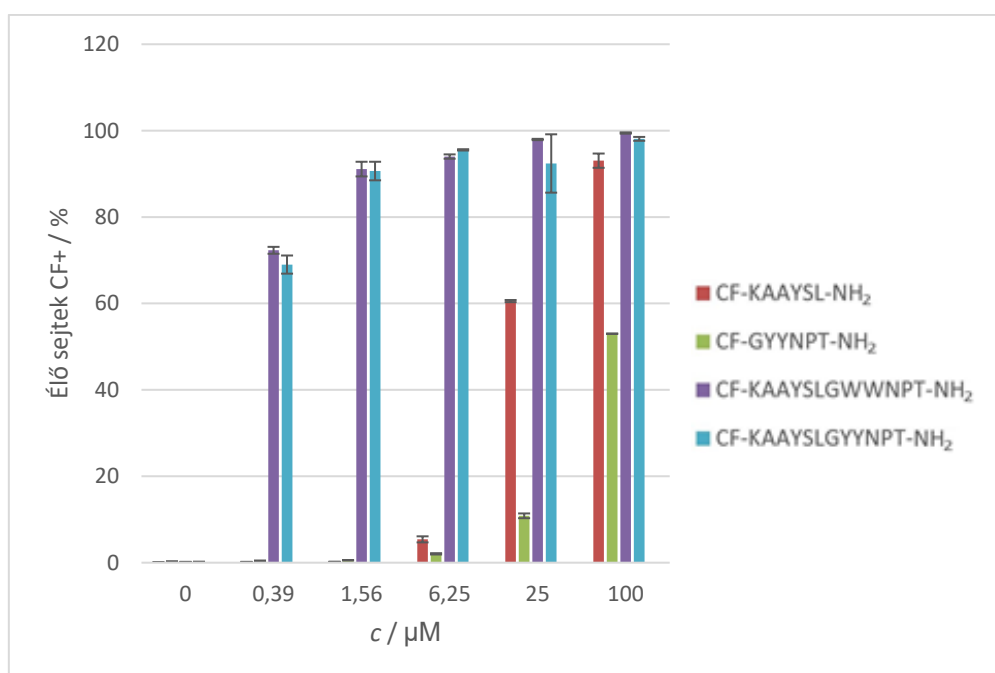
9. ábra. A KCCYSL peptid és analógjainak *in vitro* sejtbejutás koncentrációfüggése MDA-MB-453 HER2+ humán emlőkarcinóma sejteken

A kapott eredményekből látható, hogy minden variáns esetében koncentrációfüggő a sejtfelvétel mértéke (9. ábra). A 25 μM koncentráció esetén jól látható, hogy a glicint tartalmazó peptidek a sejtek 31-55%-ba jutottak be, továbbá a két cisztein távolságának növelése csökkentette a sejtbefutás mértékét. Ezzel szemben a többi analóg esetében a CF-KCSYSL-NH₂ kivételével a felvétel mértéke 60-71% körüli volt, vagyis közel azonos a referencia peptid bejutási százalékával azonos kezelési koncentráció mellett. A 100 μM koncentráció esetében az élő sejtek közel 100%-a tartalmazta mind a fág könyvtárból kiválasztott eredeti peptidet, mind a variánsait. Emellett a grafikonon az is jól látszik, hogy a szerin tartalmú variánsok esetében kisebb koncentráció értékeknél jobb volt a sejtfelvétel mértéke.

5.3.2 A GYYNPT és a KAAYSL analóggal való kombinációk *in vitro* biológiai vizsgálata

A referencia szekvencia és a kombinált peptidek *in vitro* sejtbefutási vizsgálatát ebben az esetben is áramlási citométerrel végeztük MDA-MB-453 HER2+ humán emlőkarcinóma sejteken. Itt is öt különböző kezelési koncentrációt alkalmaztunk, és a hígítási lépést DMSO-ban végeztük a peptidek rossz oldékonysága miatt.

A sejteket egy órán keresztül inkubáltuk a fluoreszcensen jelzett peptidekkel, majd ezt követően tripszinnel kezeltük őket.



10.ábra. A KAAAYSL, GYYNPT, és variánsaik *in vitro* sejtbejutási koncentrációfüggő profilja MDA-MB-453 HER2+ sejtvonalon

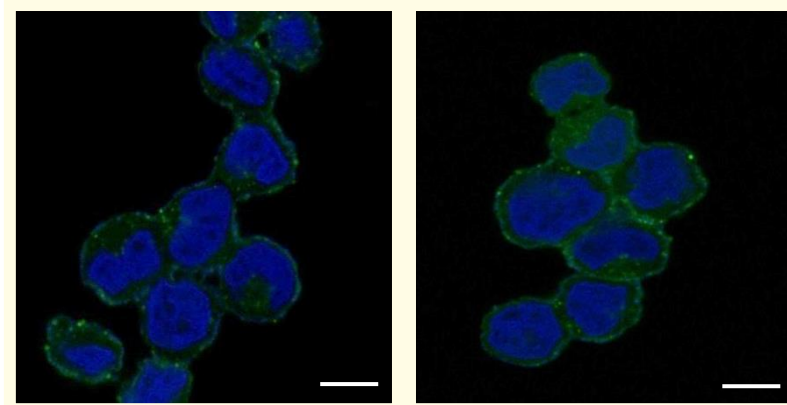
A KAAAYSL és GYYNPT hexapeptideknél látni, hogy önmagukban az *in vitro* sejt felvételük nem számottevő. A GYYNPT peptid esetében észrevehető, hogy még 100 μ M koncentráció értéknél is csak 53%, vagyis sejtbejutása elég csekély. Viszont ha a két peptidet kombináljuk, jól látható, hogy a sejtek 69-72%-ába bejutnak már 0,39 μ M koncentráció mellett, míg magasabb kezelési koncentráció értékeknél közel 100%-os a sejt felvétel (10. ábra).

Az *in vitro* sejt felvételi vizsgálati eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy akár a fág könyvtárból kiválasztott peptid alapján elkészített analógokat, akár az MD szimulációk alapján feltérképezett peptidrészleteket önmagukban vizsgálva vagy közel azonosak, vagy rosszabb mértékűek a mért sejtbejutások. Viszont ha egy közel azonos sejt felvételi értékű KCCYSL peptid-analógot kombinálunk a GYYNPT/GWWNPT peptiddel, akkor a sejtbejutás már nagyon kis kezelési koncentráció értéknél is kimagasló mértékű.

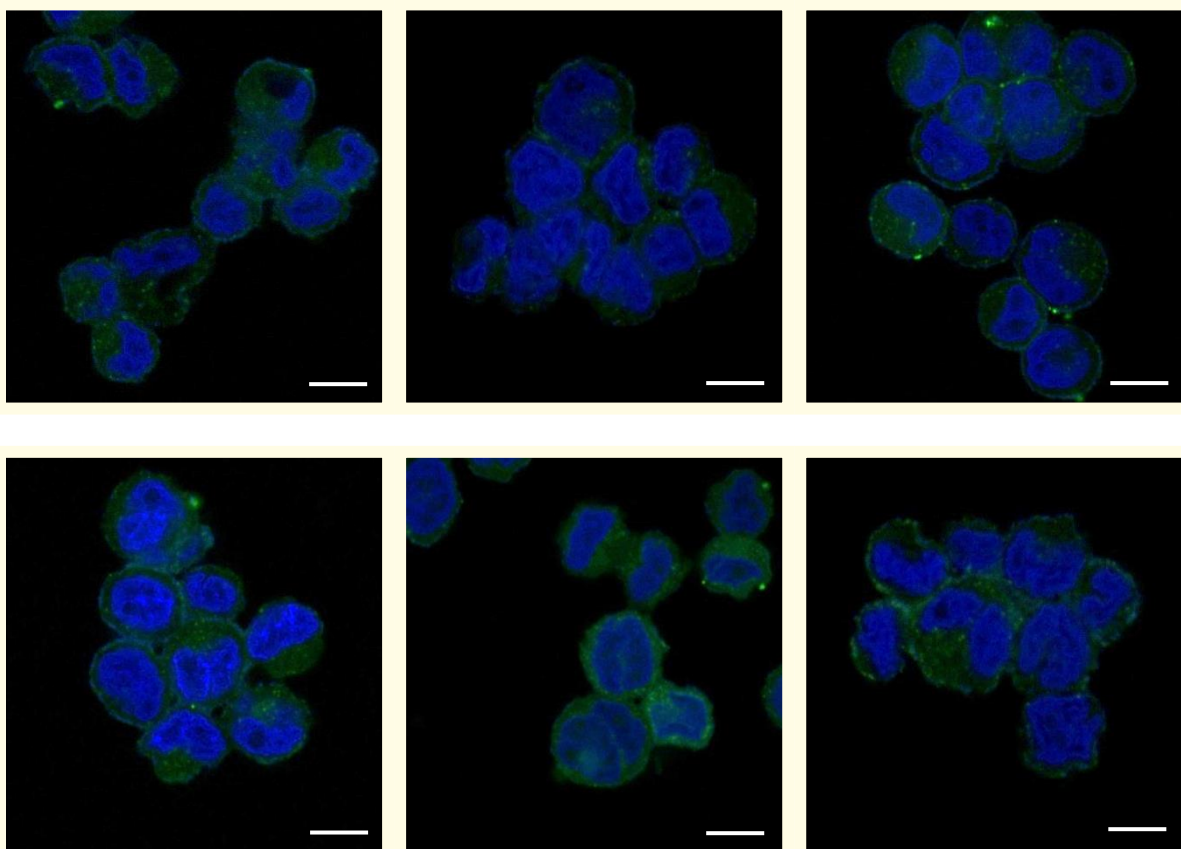
5.3.3 A KCCYSL analógok és a kombinált GYYNPT/GWWNPT peptidek *in vitro* sejt felvételi vizsgálata konfokális mikroszkóppal

Mivel tanulmányozni szerettem volna a peptid-analógok sorsát a sejtbejutás folyamán, a fág könyvtárból kiválasztott KCCYSL peptid mellett a szerint tartalmazó, illetve a KAAAYSLGYYNPT és KAAAYSLGWWNPT variánsokat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Azért alkalmaztuk ezt a mérési módszert, mert a konfokális mikroszkópos vizsgálat során lehetőség nyílik a sejtekbe jutott peptid lokalizációjának nagyobb felbontású vizsgálatára.

A mérést szintén MDA-MB-453 HER2+ sejtvonalon végeztük, 25 μ M kezelési koncentrációt alkalmazva. Előzetesen a szerint tartalmazó változatok esetében a sejteket 30, illetve 60 percig inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után 4% paraformaldehid (PFA) oldatot használtunk a sejtek fixálásához, majd sejtmagjukat 4'-6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) festettük meg. Végül a fedőlemezt, amelyen a kezelt sejtek találhatóak, tárgylemezre ragasztottuk. Ezeket a mintákat vizsgáltuk a későbbiekben konfokális mikroszkóppal, amelynek lényege, hogy a hagyományos mikroszkópokkal ellentétben jobb felbontású képeket ad, mivel a minta egyetlen szeletéről képes képet alkotni.



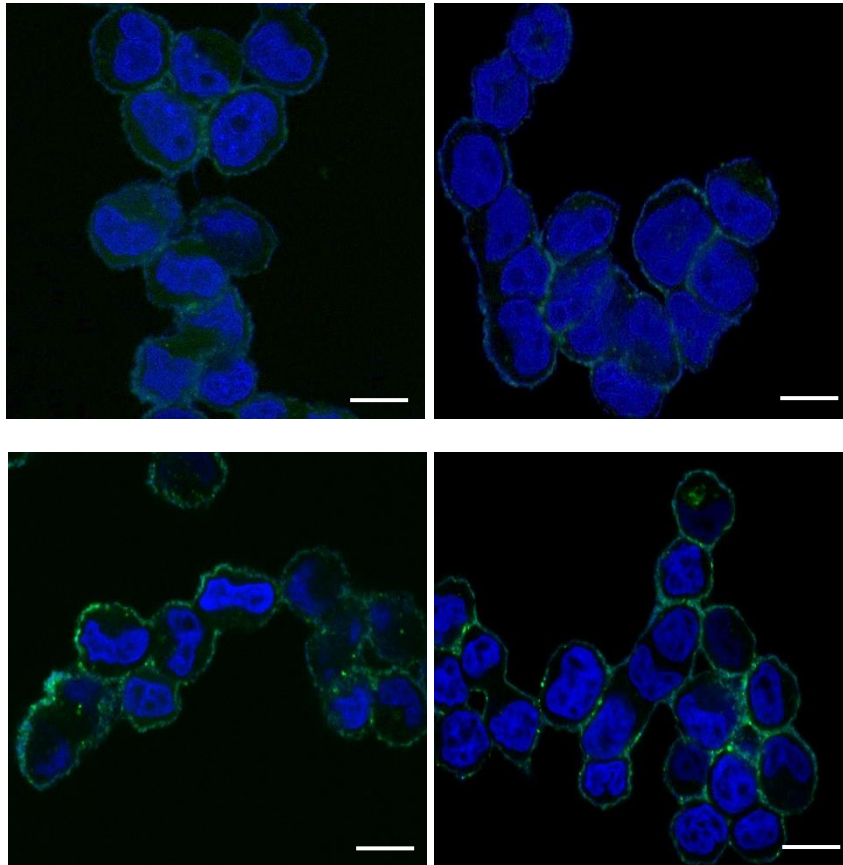
11. ábra. A CF-KCCYSL-NH₂ peptid sejtbejutása 30 perc (bal) és 60 perc (jobb) elteltével. A vonalas osztás 10 µm-t jelöl. Kék: sejtmagfestés, zöld: karboxifluoreszceinnel jelölt peptid.



12. ábra. A CF-KCSYSL-NH₂ (1), a CF-KSCYSL-NH₂ (2), és a CF-KSSYSL-NH₂ (3) variánsok sejtbejutása 30 perc (felső sor) és 60 perc (alsó sor) elteltével. A vonalas osztás 10 µm-t jelöl.

A képek alapján jól látni, hogy mind az eredeti CF-KCCYSL-NH₂, mind az analógokkal való 30 perces inkubációs kezelés után a peptidek a sejtfelszínen találhatóak. Egy órás inkubációs időnél a referencia peptidnél, illetve a CF-KSCYSL-NH₂ esetében már a sejt citoszol részébe is bejutnak a peptidek. A mikroszkópos vizsgálati eredményekből látni, hogy korrelálnak az áramlási citometria vizsgálat eredményeivel, hiszen a szerin-analógok között a legjobb *in vitro* sejtbejutása a CF-KSCYSL-NH₂ peptidnek volt.

A konfokális mikroszkópos vizsgálatot a CF-KAAYSLGWWNPT-NH₂ és CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂ peptid kombinációkon is elvégeztük, de ebben az esetben, mivel már kis kezelési koncentráció értékben magas volt a sejtbejutás mellett a fluoreszcencia intenzitás értéke, így inkubációs időnek 10 percet és 60 percet alkalmaztunk 25 μM koncentráció értékben. Az inkubációs idő letelte után a fent említett eljárás szerint fixáltuk a sejteket, illetve megfestettük azok sejtmagját a tárgylemezre ragasztás előtt.



13. ábra. A CF-KAAYSLGWWNPT-NH₂ (1), CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂ (2) sejtbejutása 10 perc (felső sor) és 60 perc (alsó sor) elteltével

A képek alapján megállapíthatjuk, hogy mind a 10 perces, mind a 60 perces inkubációs idő után mindkét peptid a sejtmembrán környékén halmozódik fel.

A sejtbejutási vizsgálatok eredményei azt vetítik előre, hogy a fág könyvtárból kiválasztott peptid változatai – a glicin tartalmú analógok kivételével – közel azonos mértékű sejtbejutást eredményeznek az eredeti szekvenciáéval, de a szerin tartalmú analógok esetében jobb oldékonyaságú peptideket sikerült előállítani (ezek kombinálása a GWWNPT/GYYNPT szekvenciájú peptidekkel folyamatban van). Emellett a CF-KAAYSLGWWNPT-NH₂ és CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂ változatok *in vitro* sejtbejutása már kis kezelési koncentrációnál is kimagasló. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a fág könyvtárból kiválasztott peptid szerin

tartalmú analógja (CF-KSCYSL-NH₂) és a MD szimuláció modellezés során feltérképezett peptidrészletek együttes kombinációi alkalmasak lehetnek tumorelles hatóanyagok célzott sejtbejuttatására.

6. Kísérleti rész

A dolgozatomban szereplő peptidek mindegyikét manuálisan, szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő Fmoc/^tBu stratégiát alkalmazva. Ennek protokollját az alábbi táblázat tartalmazza (4. táblázat).

Művelet	Reagens/oldószer	Időtartam (perc)	Ismétlések száma
Mosás	DMF	0,5-1	3
Fmoc-csoport hasítása	2% piperidin – 2% DBU/DMF	2+2+5+10	1+1+1+1
Mosás	DMF	0,5-1	8
Kapcsolás	3 ekv. aminosav-származék + 3 ekv. DIC + 3 ekv. HOBt/DMF	60	1
Mosás	DMF	0,5-1	3
	DCM	0,5-1	3
Kaiser-teszt	ninhidrin-oldat, KCN-oldat, fenol-oldat (izatin-oldat)	3-5	1

4. táblázat. Az Fmoc/^tBu stratégia protokollja

A Kaiser-teszt során a kivett gyantaszemekhez 3-4 csepp ninhidrin- (2,5 g ninhidrin/ 50 ml absz. EtOH), fenol- (40 g fenol/ 10 ml absz. EtOH) és KCN-oldatot (1 ml, 0,01 M KCN-oldat 49 ml piridinnel hígítva) adunk. Prolin utáni aminosav kapcsolása esetén az elegyhez izatin-oldatot (3% izatin és 5% Boc-Phe-OH benzilalkoholban oldva) is adunk. Az elegyek hozzáadása után 3-5 percig 104 °C-on melegítjük. Amennyiben a gyantaszemek színe sárga marad, akkor sikeres volt a kapcsolás, ha megkékül (izatin-oldat esetében megbarnul), akkor szabad aminos csoportok maradtak, ami a kapcsolás sikertelenségét jelzi, vagyis a DMF-es mosás után a kapcsolási lépést meg kell ismételni.

6.1 Tisztítás és analízis

A nyers peptidek tisztítását fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) végeztem. A tisztításhoz KNAUER HPLC rendszert (2 db K120 pumpa, nagy nyomású keverőegység, K2501 típusú monokromátoros UV detektor, adatgyűjtő szoftver) használtam. A nyerstermékeket szemipreparatív rendszerben tisztítottam, 4 ml/ perc áramlási sebesség alkalmazásával. A tisztítás folyamán minden esetben gradiens elúciót alkalmaztam (az alkalmazott gradiens az egyes peptidek tisztítási eljárásánál van feltüntetve). Az UV detektálás $\lambda = 220$ nm hullámhosszon történt.

Alkalmazott eluensek: A eluens: 0,1% TFA/desztillált víz
 B eluens: 0,1% TFA/ acetonitril és desztillált víz (80:20 V/V%)

A szemipreparatív oszlop típusa: Phenomenex Jupiter 10 μ m Proteo 90 Å
mérete: 250 x 10 mm

A tiszta peptidek analitikai vizsgálatához szintén KNAUER RP-HPLC rendszert használtam. A detektálási hullámhossz ebben az esetben is $\lambda = 220$ nm volt 1 ml/perc áramlási sebesség alkalmazása mellett.

Az analitikai oszlop típusa: Phenomenex AERIS Peptide 3,6 μ m XB-C18
mérete: 250 x 4,6 mm

Az analitikai vizsgálat során alkalmazott gradiens:	0. perc	0% B
	5. perc	0% B
	50. perc	90% B

A peptidek tömegspektrometriás azonosításához elektropray-ionizációs (ESI-MS) Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus típusú készüléket használtunk. A peptideket a méréshez 0,1% ecetsav tartalmú 50% acetonitril/víz elegyében oldottuk fel. A spektrumok felvétele pozitív módban, 4 μ l/perc sebességgel, folyamatos mintaadagolás mellett, 50-2000 m/z tartományban történt.

A kapott analitikai kromatogramok és a tömegspektrumok a Függelékben találhatóak.

6.2 Peptidek szintézise és analízise

6.2.1 A CF-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂, a CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH₂, a CF-Lys-Cys-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂, a CF-Lys-Cys-Gly-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂, valamint a CF-Lys-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr-Ser-Leu-NH₂ szintézise

A szintézist 1,0 g 0,73 mmol/g gyantakapacitású Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán végeztem. Az aminosavszármazékokból, az 5,6-karboxifluoreszceinből és az aktiváló reagensekből a gyantakapacitásra számolt 3 ekvivalensnyi (2,19 mmol) mennyiséget használtam fel. A szintézis megfelelő szakaszában (Fmoc-Tyr(^tBu)-Ser(^tBu)-Leu-gyanta) öt egyenlő részre osztottam, és a peptideket a szekvenciáknak megfelelően fejeztem be. A cisztein funkciós csoportjának védelmére tritil- (Trt), illetve acetamidometil-csoportot (Acm), a szerin, tirozin hidroxilcsoportjának védelmére *tert*-butil-csoportot (^tBu), a lizin oldalláncának védelmére pedig *tert*-butiloxikarbonil-csoportot (Boc) alkalmaztam. A glicint tartalmazó szekvenciák esetében az első Cys beépítése után a három ekvivalensnyi aktiválószer-mennyiség alkalmazása nem bizonyult elegendőnek, így erősebb aktiváló reagensként Oxyma Pure-t használtam a HOBt helyett. A kapcsoló reagensek mennyiségét öt ekvivalensre emeltem (0,730 mmol) a sikeres kapcsolási reakciók érdekében.

Reagensek	Molekulatömeg (g/mol)	Szükséges mennyiség (mg)
Fmoc-Leu-OH	353,42	774,0
Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	383,44	839,7
Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	459,54	1006,4
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585,72	256,5
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,55	205,2
Fmoc-Ala-OH	311,34	136,4
Fmoc-Gly-OH	297,31	130,2
Fmoc-Cys(Acm)-OH	414,47	181,5
5,6-karboxifluoreszcein (CF)	376,32	164,8
HOBt · H ₂ O	153,13	335,4
Oxyma Pure	142,41	104,0

DIC ($\rho = 0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,20	276,4 (339,1 μl), majd 89,6 (109,9 μl)
---------------------------------------	--------	--

5. táblázat. A szintézis folyamán felhasznált aminosavszármazékok, és kapcsoló szerek mennyisége

A kész peptideket a gyantáról 10-10 ml hasítóeleggyel távolítottam el. Azoknál a peptideknél, ahol az oldallánc védőcsoport csak Boc, Acn és ^tBu volt, a hasítóelegy összetétele 9,5 ml TFA és 0,5 ml desztillált víz volt, ahol Trt-csoport is jelen volt, ott 9,5 ml TFA, 0,25 ml desztillált víz és 0,25 ml TIS elegyét alkalmaztam. A reakcióelegyet minden esetben két órán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten, az első 25 percen jeges hűtést alkalmazva. A hasítási idő lejárta után a reakcióelegyet 50 ml, 0 °C-os dietil-éterbe szűrtem, és az így kicsapódott peptideket ezután 5 perces 4000/perc fordulatszámú centrifugálással üleptettem. Az étert dekantáltam, majd az üledéket még háromszor dietil-éterrel mostam. A nyerstermékeket, az alanin tartalmú analóg kivételével, desztillált víz és acetonitril keverékében oldottam fel, az alanin tartalmú változat esetében elegendő volt a desztillált víz a teljes mértékű feloldáshoz. Az így kapott peptid oldatokat folyékony nitrogénben fagyasztottam, majd liofilizáltam. A kapott nyerstermékeket szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam az általános tisztítási részben leírtak szerint.

Az alkalmazott gradiens:

0. perc	20% B
5. perc	20% B
50. perc	90% B

A peptidek tisztaságát analitikai HPLC-vel ellenőriztem, azonosításukat tömegspektrométerrel végeztük.

A tiszta analógok analitikai HPLC kromatogramjai és ESI-MS spektrumai a Függelékben találhatóak (Függelék: 1–10. ábra).

6.2.2 A CF-Lys-Ser-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH₂, a CF-Lys-Ser-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂, és a CF-Lys-Cys-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH₂ előállítása és analízise

A három peptid szintézisét Fmoc/^tBu technikával végeztem, 0,3 g, 0,71 mmol/g gyantakapacitású Fmoc-Rink Amid gyantán. Az Fmoc védett aminosavszármazékokból és a kapcsolási reagensekből a gyantakapacitásra számolt három ekvivalens mennyiséget használtam. Ez 0,639 mmol anyagmennyiséget jelent jelen esetben. A szintézis folyamán a tirozin beépítése után a gyantát három egyenlő részre osztottam szét, majd a szekvenciáknak

megfelelően fejeztem be a peptideket. A tirozin után fellépő korábbi szintézisproblémák kiküszöbölése miatt a HOBt reagenst erősebb aktiváló szerre, Oxyma Pure-ra cseréltem. Innentől mindhárom peptid felépítéséhez öt ekvivalens mennyiségű aktiváló és kapcsoló reagenst használtam az egyes kapcsolási reakciókhoz (1,065 mmol). A tirozin és szerin hidroxilcsoportját *terc*-butil csoporttal, a lizin és cisztein funkciós csoportját pedig *terc*-butiloxikarbonil-, illetve tritil csoporttal védtem. A leucin esetében nem volt szükség védelemre (6. táblázat).

Reagens	Molekulatömeg (g/mol)	Bemért mennyiség (mg)
Fmoc-Leu-OH	353,42	225,8
Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	383,44	245,0, majd 81,7
Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	459,54	293,6
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585,72	124,8
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,55	99,8
5,6-karboxifluoreszcein (CF)	376,32	80,2
HOBt · H ₂ O	153,13	97,9
Oxyma Pure	142,41	50,6
DIC ($\rho = 0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,20	80,6 (98,9 μl) majd 44,8 (55,0 μl)

6. táblázat. A KSSYSL-NH₂, a KCSYSL-NH₂, és a KSCYSL-NH₂ peptidok szintéziséhez felhasznált reagens mennyiségek

A felépített peptideket a gyantáról 10-10 ml hasítóeleggyel távolítottam el, amelynek tartalma a ciszteinmentes peptid kivételével 9,5 ml TFA, 0,25 ml desztillált víz és 0,25 ml TIS kation befogó volt. A ciszteint nem tartalmazó analóg esetében 9,5 ml TFA és 0,5 ml desztillált víz elegyét alkalmaztam a hasítási reakcióhoz. A reakcióelegyeket itt is két órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten, az első 25 percben jeges hűtést használva. A hasítás után az elegyeket 50-50 ml hideg dietil-éterbe szűrtem, a kicsapódott peptideket pedig 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam, majd az étert dekantáltam róluk. Az így kapott üledékeket ezután még háromszor mostam hideg éterral. Ezt követően a peptideket desztillált vízben oldottam, és az így kapott oldatokat folyékony nitrogénben fagyasztottam a liofilizáláshoz. A nyers peptidok tisztítását szemipreparatív RP-HPLC-vel végeztem az általános részben leírtak szerint.

Az alkalmazott gradiens:

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

A tiszta peptidek tisztaságát analitikai HPLC-vel ellenőriztem. Azonosításuk ESI-MS készülékkel történt.

A tiszta analógok analitikai HPLC kromatogramjai, illetve ESI-MS spektrumai a Függelékben találhatóak (Függelék 11–16. ábra).

6.2.3 A CF-GYYNPT-NH₂, a CF-KAAYSLGWWNPT-NH₂, valamint a CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂ szintézise és analízise

Elsőként a CF-KAAYSLGWWNPT-NH₂ és a CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂ peptidek szintézisét végeztem el 0,5 g, 0,71 mmol/g gyantakapacitású Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán. Az aminosav-származékokból és a kapcsolási reagensekből egyaránt a gyantakapacításra számolt három ekvivalens mennyiséget használtam fel (1,065 mmol). Az aszparagin funkciós csoportját tritil-csoporttal (Trt), a treonin, tirozin és szerin hidroxilcsoportját *terc*-butil-, a lizin ϵ -aminocsoportját pedig *terc*-butiloxikarbonil-csoporttal (Boc) védtem. Az aszparagin felkapcsolása után a gyantát két egyenlő részre osztottam, és a szekvenciának megfelelően fejeztem be a peptideket. A peptidek előállításához szükséges anyagok mennyiségét az alábbi táblázat tartalmazza (7. táblázat).

Reagensek	Molekulatömeg (g/mol)	Bemért mennyiség (g/mol)
Fmoc-Thr(^t Bu)-OH	397,46	423,3
Fmoc-Pro-OH	337,37	359,3
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,67	635,5
Fmoc-Trp-OH	426,46	227,1
Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	459,54	244,7
Fmoc-Gly-OH	297,31	158,3
Fmoc-Leu-OH	353,42	188,2
Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	383,44	204,2

Fmoc-Ala-OH	311,34	165,8
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,55	249,5
5,6-karboxifluoreszcein (CF)	376,32	200,4
HOBt · H ₂ O	153,13	163,1, majd 81,5
DIC ($\rho = 0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,20	134,4 (164,9 μl), majd 67,2 (82,5 μl)

7. táblázat. A szintézisek folyamán felhasznált reagensek mennyisége

A kész peptideket 9,5 ml TFA, 0,25 ml desztillált víz és 0,25 ml TIS elegyével hasítottam le a gyantáról. A reakciókat 25 percig jeges hűtés mellett, majd másfél órán keresztül szobahőmérsékleten végeztem. Ezt követően a reakcióelegyeket 0 °C-ra hűtött éterbe szűrtem, majd a kicsapódott peptideket 5 percig 4000 fordulat/perc sebességű centrifugálással üleptettem. A centrifugálás után az étert dekantáltam, majd az üledéket még háromszor mostam éterrel a fent említett módon. A peptideket desztillált víz és acetonitril elegyében feloldottam, majd az így kapott oldatokat folyékony nitrogénben fagyasztottam és liofilizáltam.

A két nyers peptidet RP-HPLC-vel félpreparatív oszlopon tisztítottam az általános tisztítás részben leírtak szerint.

Az alkalmazott gradiens:

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

A peptidek tisztaság-analízisét analitikai HPLC-vel, azonosítását elektropray-ionizációs tömegspektrométerrel végeztem.

Emellett párhuzamosan a referencia CF-GYYNPT-NH₂ peptid megépítését is elkezdtem 0,2 g 0,71 mmol/g gyantakapacitású Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán. A tirozin és treonin hidroxilcsoportját *tert*-butil, míg az aszparagin funkciós csoportját tritil védőcsoport védte. A prolin és glicin esetében nem volt szükség védelemre. A szintézishez ebben az esetben is a gyantakapacitásra számolt három ekvivalens mennyiségű Fmoc védett aminosavszármazékot és aktiváló reagenseket használtam fel (8. táblázat).

Reagensek	Molekulatömeg (g/mol)	Bemért mennyiség (mg)
Fmoc-Thr(^t Bu)-OH	397,46	169,3
Fmoc-Pro-OH	337,37	143,7

Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,67	254,2
Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	459,54	195,8
Fmoc-Gly-OH	297,31	126,7
5,6-karboxifluoreszcein (CF)	376,32	160,3
HOBt · H ₂ O	153,13	65,2
DIC ($\rho = 0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,20	53,8 (66,0 μl)

8. táblázat. A szintézis során használt aminosav-származékok és kapcsolószerek mennyisége

A teljes szekvencia megépítése után a peptidet 4,5 ml TFA, 0,25 ml desztillált víz és 0,25 ml TIS hozzáadása után lehasítottam a gyantáról. A reakcióelegyet 25 percig jeges hűtés mellett, majd másfél órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. Az elegyet 0 °C-ra hűtött éterbe szűrtem, majd az így kicsapódott peptidet 5 percen át 4000 fordulat/perc sebességű centrifugálással üleptettem. Az üledékről az étert dekantáltam, majd háromszor hideg éterrel mostam. A peptidet desztillált víz/acetonitril elegyében feloldottam, majd liofilizáltam a folyékony nitrogénben való fagyasztás után.

A nyersterméket RP-HPLC-vel, szemipreparatív oszlopon tisztítottam az általános részben leírtak szerint.

Az alkalmazott gradiens:

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

A tiszta frakciók tisztaság-analízisét analitikai HPLC-vel, azonosítását tömegspektrométerrel végeztem.

A tiszta anyagok analitikai HPLC kromatogramjai és ESI-MS spektrumai a függelékben találhatóak (Függelék: 17–22. ábra)

6.3 *In vitro* biológiai vizsgálatok

6.3.1 *In vitro* sejtbejutási vizsgálatok áramlási citometriával

A referencia CF-KCCYSL-NH₂, továbbá CF-GYYNPT-NH₂ peptidek, illetve az ezekhez tartozó analógok *in vitro* sejtbejutási mértékét áramlási citométerrel (BD LSR II, BD

Bioscience, San José, CA) vizsgáltuk MDA-MB-453 HER2+ humán emlőkarcinóma sejteken. Koncentrációnként két-két párhuzamos mérést végeztünk.

Előzetesen az MDA-MB-453 sejtek növesztése és sejt kultúrában tartása DMEM médiumban történt, amely 10% magzati borjú szérumot (FBS), és 160 µg/ml gentamicint tartalmazott. A mérést megelőző napon a sejteket 24 lyukú lemezre (10^5 sejt/lyuk) osztottuk ki. A vegyületeket szérummentes médiumban oldottuk olyan módon, hogy a sejtekre mért oldat 1% DMSO-t tartalmazott. A vizsgálatok során a sejteket a fluoreszcensen jelzett peptidekkel ($c = 0,39 - 100$ µM) egy órán keresztül 37 °C-on, 5% CO_2 atmoszférában inkubáltuk. Az inkubációs idő letele után az oldatot eltávolítottuk a sejtekről, ezt követően 800 µl szérummentes médiummal mostuk, centrifugáltuk. Ezt még kétszer megismételtük, viszont a harmadik mosást HPMI pufferrel végeztük (HPMI oldat tartalma: 100 µM NaCl, 5,4 µM KCl, 0,4 µM MgCl_2 , 0,04 µM CaCl_2 , 10 µM HEPES, 20 µM glükóz, 24 µM NaHCO_3 , 5 µM Na_2HPO_4 pH = 7,4). A centrifugálás után az oldatot eltávolítottuk a sejtekről, majd 100 µl tripszin oldatot pipettáztunk minden lyukba, és a sejteket 5 percig inkubáltuk 37 °C-on. Az inkubációs idő lejártá után inaktiváltuk a tripszint 800 µl 10% FBS-t tartalmazó HPMI oldattal. Ezt követően a sejteket FACS csövekbe pipettáztuk és centrifugáltuk őket 5 percen át 1000 rpm fordulatszámon. A centrifugálás után a felúszót eltávolítottuk, és a sejteket 500 µl tiszta HPMI oldatban szuszpendáltuk. Végezetül a sejtek fluoreszcencia intenzitásának mértékét áramlási citométer segítségével határoztuk meg.

6.3.2 *In vitro* sejtbejutás vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A fág könyvtárból kiválasztott fluoreszcensen jelzett CF-KCCYSL-NH₂, ennek szerin tartalmú változatait, valamint a CF-GYYNPT-NH₂, CF-KAAYSLGWWNPT-NH₂ és CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂ peptidek sejtbe jutásának mértékét konfokális mikroszkóppal is vizsgáltuk. A mérést ugyanúgy MDA-MB-453 sejteken végeztük 25 µM kezelési koncentráció mellett.

A CF-KCCYSL-NH₂ és szerin tartalmú analógokkal kezelt sejtek esetében 30, továbbá 60 perces, míg a CF-GYYNPT-NH₂ és azon változataival kezelt sejteknél 10 és 60 perces inkubációs időt alkalmaztunk. A kezelési idő lejártá után a kezelő oldatot eltávolítottuk a sejtekről, majd 250 µl PBS puffer-oldattal mostuk őket. A 24 lyukú lemez minden lyukába kerek fedőlemezt (Assistent, 13 mm átmérő, 1001/13) helyeztünk. Miután a sejtekről a szérummentes médiumot eltávolítottuk, 500 µl PBS puffer-oldattal mostuk, majd 4%

paraformaldehid (PFA) oldattal fixáltuk a sejteket 20 percig 37 °C-on. Ezután háromszor 500 µl PBS pufferrel való mosást végeztünk, majd a sejtmagokat 350 ng/ml DAPI (Sigma Aldrich; PBS-ben oldott) festékkel festettük meg 15 percen át, sötét helyen. Ezek után a sejteket tartalmazó fedőlemezeket felragasztottuk a tárgylemezre (Mowiol ragasztó segítségével), és egy napig száradni hagytuk őket.

A kész mintákat konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM 710) vizsgáltuk.

Összefoglalás

HER2 receptort célzó peptid és analógjainak szerkezet-hatás összefüggése a célzott tumorterápiában

Adorján Afrodité Emese, kémia alapszakos hallgató

ELTE TTK Kémia Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

Témavezető: **Dr. Mező Gábor** tudományos tanácsadó
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

A mellrák az egyik leggyakoribb daganatos megbetegedés világszerte. Az esetek 20%-ánál HER2/ErbB2 (humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa) pozitív rákot diagnosztizálnak, amelyre agresszív betegségfolyás jellemző a HER2 túlexpresszációja miatt. Napjainkban a célzott tumorterápia a kutatások rendkívül aktív részét képezi, amely azon alapul, hogy tumorsejt-specifikus receptorokat céloznak irányító molekulához kapcsolt tumorelleses hatóanyaggal. Egyre elterjedtebb ilyen célpontú peptidok feltérképezése fág könyvtárak, és molekula dinamikai (MD) modellezések által.

Munkám során egy fág könyvtárból kiválasztott peptid (KCCYSL) [1] analógjait állítottam elő és *in vitro* sejtbejutásukat vizsgáltuk. Két ciszteint helyettesítettem alaninnal, szerinnel, és az esetlegesen fellépő oxidáció gátlására Acm védőcsoporttal védett ciszteint építettem be. Két glicin tartalmú analógot is szintetizáltam, hogy megvizsgáljam, a ciszteinek közötti távolság növelése milyen hatással van a receptorcélzásra. Az analógok megépítése után egy tanulmány alapján kiválasztottam két olyan, MD szimulációs vizsgálat alapján feltérképezett peptidrészt (GWWNPT, GYYNPT), amelyről megállapították, hogy kötődnek HER2 receptorhoz [2]. Így ezeket kombináltam a fentebb említett alaninnal helyettesített analóggal. A variánsokhoz 5,6-karboxifluoreszcint kapcsoltam mint fluoreszcens jelölőmolekulát. Az *in vitro* sejtbejutást áramlási citometriával vizsgáltuk MDA-MB-453 HER2+ humán emlőkarcinóma sejteken.

Az eredményekből megállapítható, hogy a KCCYSL analógok esetében a ciszteinek közötti távolság növelése rontja a peptid *in vitro* internalizációját, míg a többi analógnál a sejtbevitel mértéke közel azonos volt az eredeti peptidével. A szerin tartalmú variánsoknál jobb oldékonyságot tapasztaltunk. A KAAAYSL és a GWWNPT/GYYNPT peptidok kombinációjának sejtbevitelére már kis koncentráció értéknél is kimagasló volt, az egyedi komponensekhez képest. Ezen eredmények alapján tervezzük a szerin tartalmú KCCYSL analógok és a GWWNPT/GYYNPT peptidok kombinációjának szintézisét, illetve tumorelleses hatóanyaggal való konjugátumok előállítását különböző enzimlabilis spaceren keresztül.

[1] Karasseva, N.G., et al.; J. Prot. Chem., 21, 287-296 (2002)

[2] Geng, L., et al.; Theranostics, 6, 1261-1273 (2016)

Summary

Structure-activity relationship of HER2 receptor targeting peptide and its derivatives in targeted tumor therapy

Afrodité Emese Adorján, BSc student in Chemistry

Place of thesis work: Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry,
Eötvös Loránd University, Budapest

Place of defence: Department of Organic Chemistry

Supervisor: **Gábor Mező D.Sc.** research professor
Research Group of Peptide Chemistry, Hung. Acad. Sci., Eötvös University

Breast cancer is one of the most leading causes of death worldwide. In 20% of all cases human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/ErbB2) is found on breast cancer tissues. The overexpression of HER2 leads to, aggressive course of disease. Recently, targeted tumor therapy is a promising research area that is based on the increased selectivity of antitumor drug attached to a targeting molecule, which binds to tumor-specific receptor. Since HER2 might be a good target to prevent tumor growth, current researches are directed to discover new HER2 targeting peptides by phage displays and molecular dynamic (MD) simulations.

In my research KCCYSL peptide selected by phage display [1] as well as two peptides (GYYNPT, GWWNPT) that bind selectively to HER2 according to MD modeling [2] were chosen to study their cellular uptake by HER2+ cancer cells. Furthermore, the role of cysteines in KCCYSL peptide were investigated. Cysteines were replaced by alanines, serines. In addition, thiol groups were protected with Ac group to prevent potential oxidation. Two glycine containing analogs were also developed to study the effect of the distance between the two cysteines on the selectivity. The two types of peptide sequence were combined (KAAYSLGXXNPT, where X = Y or W), too, to increase the biological activity All compounds were labeled with 5(6)-carboxyfluorescein on their *N*-terminus. The *in vitro* cellular uptake was measured by flow cytometry on MDA-MB-453 HER2+ human breast cancer cell line.

The results indicated that the increased distance between the Cys residues decreases the cellular uptake, while the amino acid replacements have no significant influence on it. However, the serine containing analogs had better solubility than the other derivatives. The *in vitro* internalization of the combined peptides was high also at low concentrations that exceeded significantly the uptake of the unique components. Based on these results we plan to synthesize the combination of the serine substituted KCCYSL analogs and the GYYNPT/GWWNPT peptide derivatives and the conjugation of these peptides with an antitumor agent *via* different enzyme labile spacers.

[1] Karasseva, N.G., et al.; J. Prot. Chem., 21, 287-296 (2002)

[2] Geng, L., et al.; Theranostics, 6, 1261-1273 (2016)

7. Rövidítésjegyzék

Acm	acetamidometil
Boc	<i>tert</i> -butiloxikarbonil
Bzl	benzil
CF	5,6-karboxifluoreszcein
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DBU	1,8-diazabiciklo[5,4,0]undek-7-én
DCM	diklórmétán
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropil- <i>N</i> -etilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
EGF-R	epidermális növekedési faktor receptor
ESI-MS	elektrospray-ionizációs tömegspektrométer
EtOH	etanol
FACS	fluorescence-activated cell sorter (áramlási citométer)
Fmoc	9-fluorenil-metoxikarbonil
GnRH-R	gonadotropin-releasing hormon receptor
HER/ErbB	humán epidermális növekedési faktor receptor
HER1	humán epidermális növekedési faktor receptor 1-es típusa
HER2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
KCN	kálium-cianid

MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MBHA	4-metil-benzilhidrilamin (gyanta)
MD	molekula dinamika
OBOC	one bead, one compound peptide library
P25	CKTIYYLGYYNPNEYRY kódja
P51	CDTFPYLGWWNPNEYRY kódja
p6.1	KCCYSL kódja a fág könyvtárban
PFA	paraformaldehid
RP-HPLC	fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis
^t Bu	<i>terc</i> -butil
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropil-szilán
Trt	tritol
UV	ultraibolya
VEGF-R	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

8. Irodalomjegyzék

- [1] <http://www.who.int/en/>
- [2] <http://ec.europa.eu/eurostat/>
- [3] <http://www.ksh.hu/>
- [4] <http://daganatok.hu>
- [5] Ludwig J. A., Weinstein J. N., Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection, *Nat. Rev. Cancer*, **2005**; 5, 845–856.
- [6] <http://oftankonyv.reak.bme.hu/tiki-index.php?page=Sug%C3%A1rter%C3%A1pia>
- [7] Waldmann T. A., Immunotherapy: past, present and future, *Nat. Med.*, **2003**; 9, 269–277.
- [8] Orosz Zs., Az immunhisztokémia szerepe a daganatterápiás célpontok azonosításában, *Biokémia*, **2004**; 28, 82–86.
- [9] Bodoky Gy., A rosszindulatú daganatok kemoterápiája, *Háziorvos Továbbképző Szemle*, **1996**; 1, 41–43.
- [10] Dharap S. S., Wang Y., Chandna P., Khandare J. J., Qiu B., Gunaseelan S., Sinko P. J., Stein S., Farmanfarmaian A., Minko T., Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide, *PNAS*, **2005**; 12, 12962–12967.
- [11] Mező G., Manea M., Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2010**; 7, 79–96.
- [12] Leurs U., Mező G., Orbán E., Öhlschläger P., Marquardt A., Manea M., Design, synthesis, *in vitro* stability and cytostatic effect of multifunctional anticancer drug-bio-conjugates containing GnRH-III as a targeting moiety, *Biopolymers*, **2012**; 98, 1–10.
- [13] Mező G., Hegedüs R., Szabó I., Célzott rákgyógyítás, *Természet Világa*, **2012**; 143, 448–451.
- [14] Hung M. C., Lau Y. K., Basic science of HER2/neu: a review, *Semin Oncol*, **1999**; 26, 51–59.
- [15] Yarden Y., Biology of HER2 and its importance in breast cancer, *Oncology*, **2001**; 61(suppl 2), 1–13.

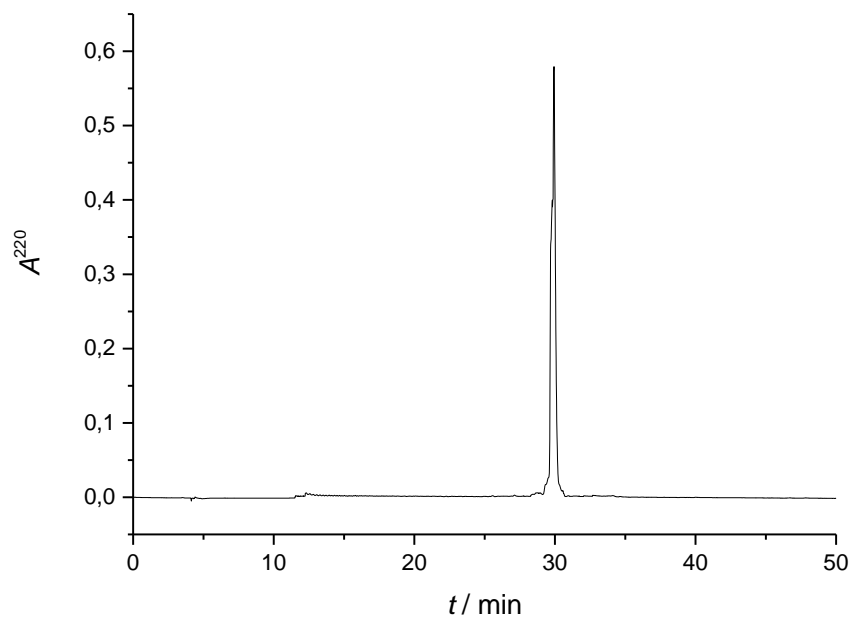
- [16] Lupu R, Cardillo M, Harris L, Hijazi M, Rosenberg K., Interaction between ERB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance, *Sem Cancer Biol*, **1995**; 6, 135–145.
- [17] Yarden Y., Sliwkowski M. X., Untangling the ErbB signalling network, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**; 2, 127–137.
- [18] Doorbar J., Winter G., Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display, *J. Mol. Biol.* **1994**; 244, 361–369.
- [19] Karasseva N. G., Glinsky V. V., Chen N. X., Komatireddy R., Quinn T. P., Identification and characterization of peptides that bind human ErbB-2 selected from a bacteriophage display library. *J Protein Chem*, **2002**; 21, 287–296.
- [20] Kumar S. R., Quinn T. P., Deutscher S. L., Evaluation of an ¹¹¹In-radiolabeled peptide as a targeting and imaging agent for ErbB-2 receptor expressing breast carcinomas, *Clin Cancer Res.*, **2007**; 13, 6070–6079.
- [21] Deutscher S. L., Figuero S. D., Kumar S. R., ¹¹¹In-labeled KCCYSL peptide as an imaging probe for ErbB-2-expressing ovarian carcinomas, *Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **2009**; 52, 583–590.
- [22] Tai W., Shukla R. S., Qin B., Li B., Cheng K., Development of a Peptide_Drug Conjugate for Prostate Cancer Therapy, *Mol. Pharmaceutics*, **2011**; 8, 901–912.
- [23] Larimer B. M., Thomas W. D., Smith G. P., Deutscher S. L., Affinity maturation of an ERBB2-targeted SPECT imaging peptide by in vivo phage display, *Mol. Imaging Biol.*, **2014**; 16, 449–458.
- [24] Larimer B. M., Quinn J. M., Kramer K., Komissarov A., Deutscher S. L., Multiple bacteriophage selection strategies for improved affinity of a peptide targeting ERBB2, *Int J. Pept. Res. Ther.*, **2015**; 21, 383–392.
- [25] Lam K. S., Salmon S. E., Hersh E. M., Hruby V. J., Kazmierski W. M., Knapp R. J., A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, *Nature*, **1991**; 354, 82–84.
- [26] Furka Á., Sebestyén F., Asgedom M., Dibó G., General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**; 37, 487–93.

- [27] Lam K. S., Lehman A. L., Song A., Doan N., Enstrom A. M., Maxwell J., Liu R., Synthesis and screening of „one bead one compound” combinatorial peptide libraries, *Methods in Enzymology*, **2003**; 369, 298–322.
- [28] Geng L., Wang Z., Jia X., Han Q., Xiang Z., Li D., Yang X., Zhang D., Bu X., Wang W., Hu Z., Fang Q., HER2 targeting peptides screening and applications in tumor imaging and drug delivery, *Theranostics*, **2016**; 6, 1261–1273.
- [29] Merrifield R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**; 85, 2149–2154.
- [30] Lloyd-Williams P., Albericio F., Giralt E., Convergent solid-phase peptide synthesis, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**; 37, 58–60.
- [31] Merrifield R. B., Life During a Golden Age of Peptide Chemistry, **1993**; (J. I. Seeman, Ed.) ACS, Washington, D.C.
- [32] Hruby V. J., Muscio F., Gronginsky C. M., Gitu P. M., Saba D., Chan W. Y., Solid-phase synthesis of (2-isoleucine, 4-leucine) oxytocin and (2-phenylalanine, 4-leucine) oxytocin and some their pharmacological properties, *J Med Chem.*, **1973**; 16, 624–629.
- [33] Rink H., Solid phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxydiphenylmethylester resin, *Tetrahedron Lett.*, **1987**; 28, 3787–3790.
- [34] Barany G., Merrifield R. B., The Peptides (E. Gross and J. Meienhofen Ed.), Academic Press, **1979**; 2, 1–284.
- [35] Carpino L. A., Han G. Y., The fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *J. Org. Chem.*, **1972**; 37, 3404–3409.
- [36] Fields G. B., Tian Z., Barany G., Synthetic peptides: A Users Guide, (Grant G. A. Ed.), W. H. Freeman and Co, New York, **1992**; 77–183.
- [37] 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.
- [38] 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.

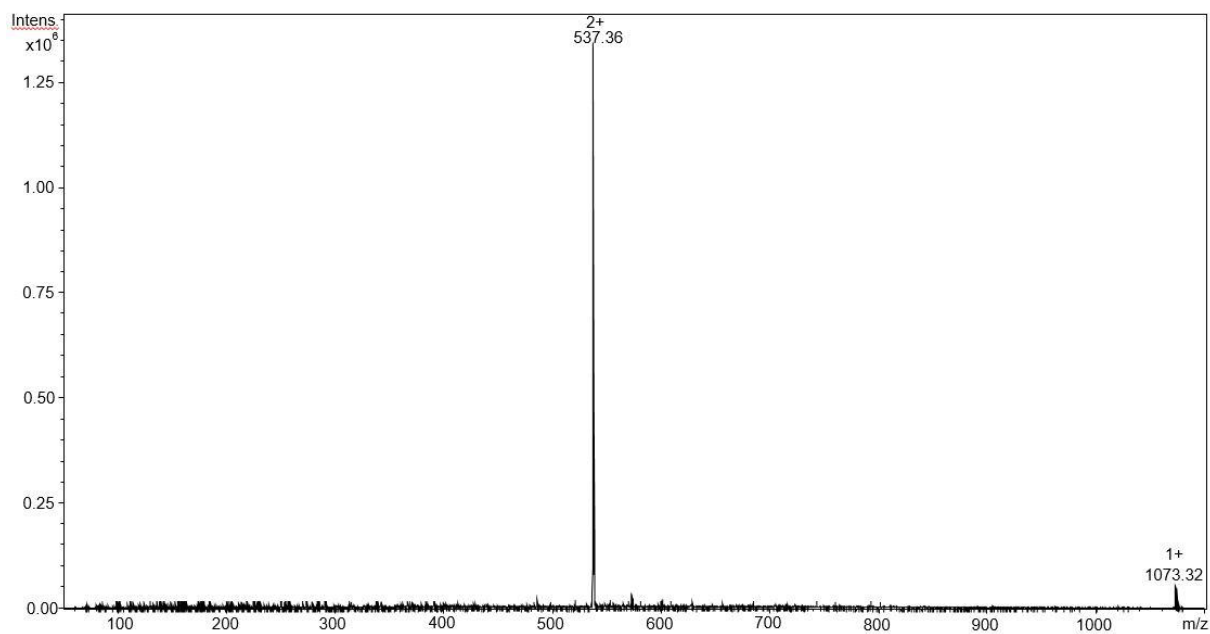
9. Függelék

Kromatogramok és spektrumok

CF-Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂



1. ábra. A tiszta CF-KCCYSL-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

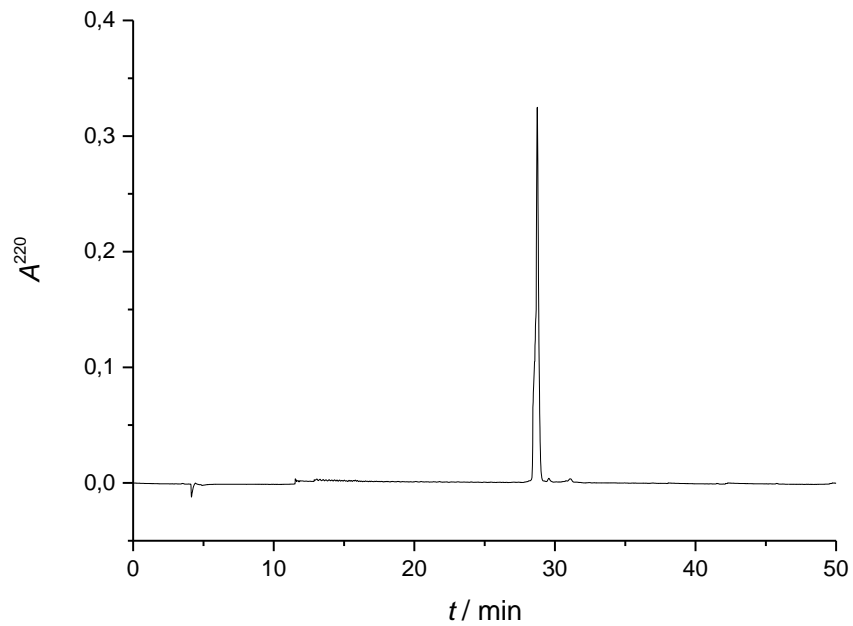


2. ábra. A tiszta CF-KCCYSL-NH₂ MS spektruma

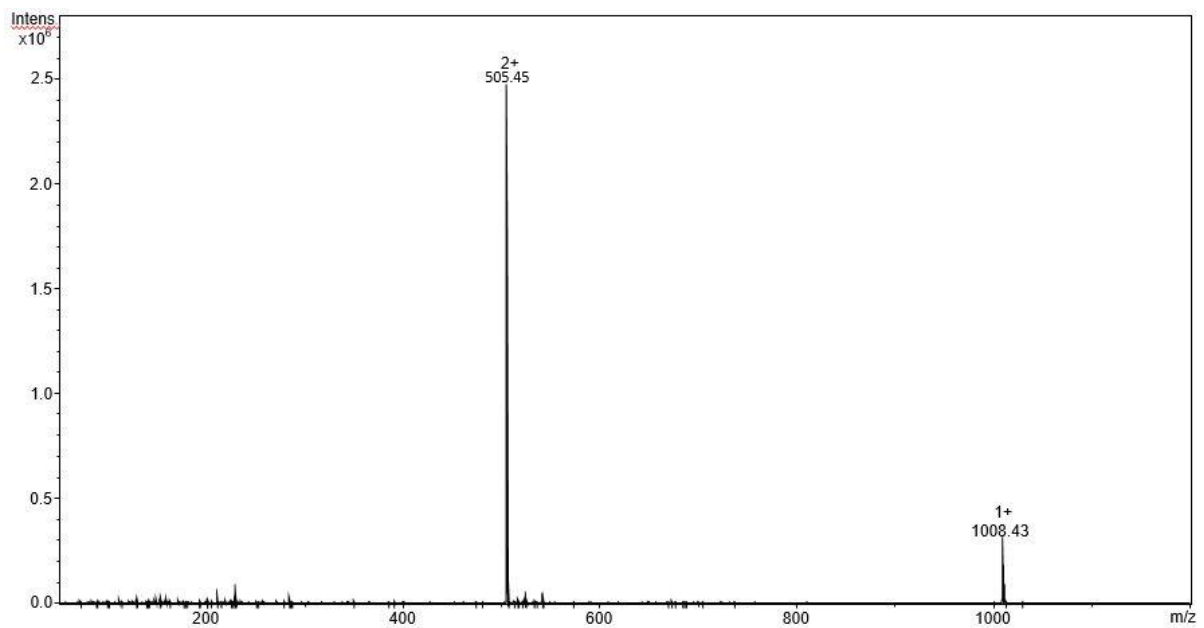
A molekula várt tömege: [M+H]⁺: 1072,9 Da

mért tömege: [M+H]⁺: 1072,8 Da

CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-NH₂



3. ábra. A tiszta CF-KAAYSL-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

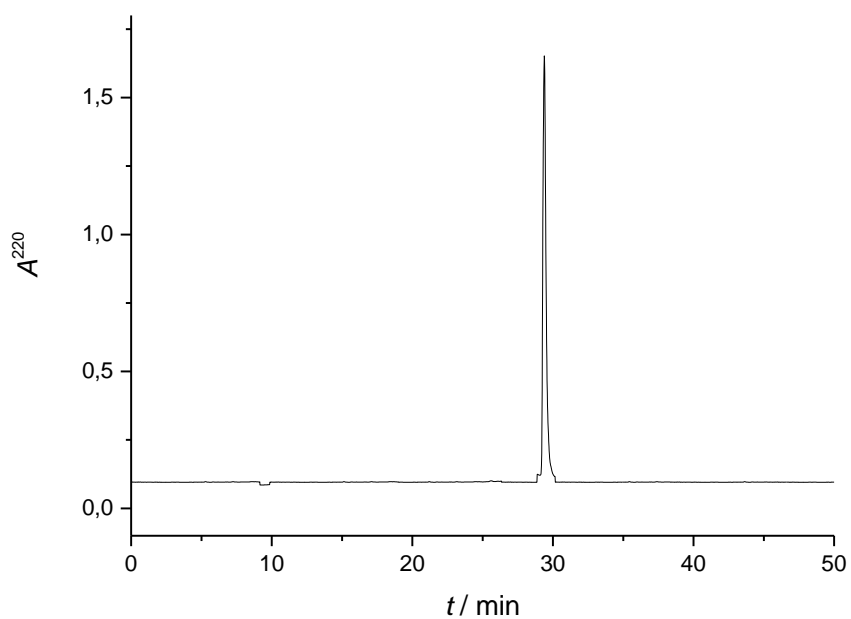


4. ábra. A tiszta CF-KAAYSL-NH₂ MS spektruma

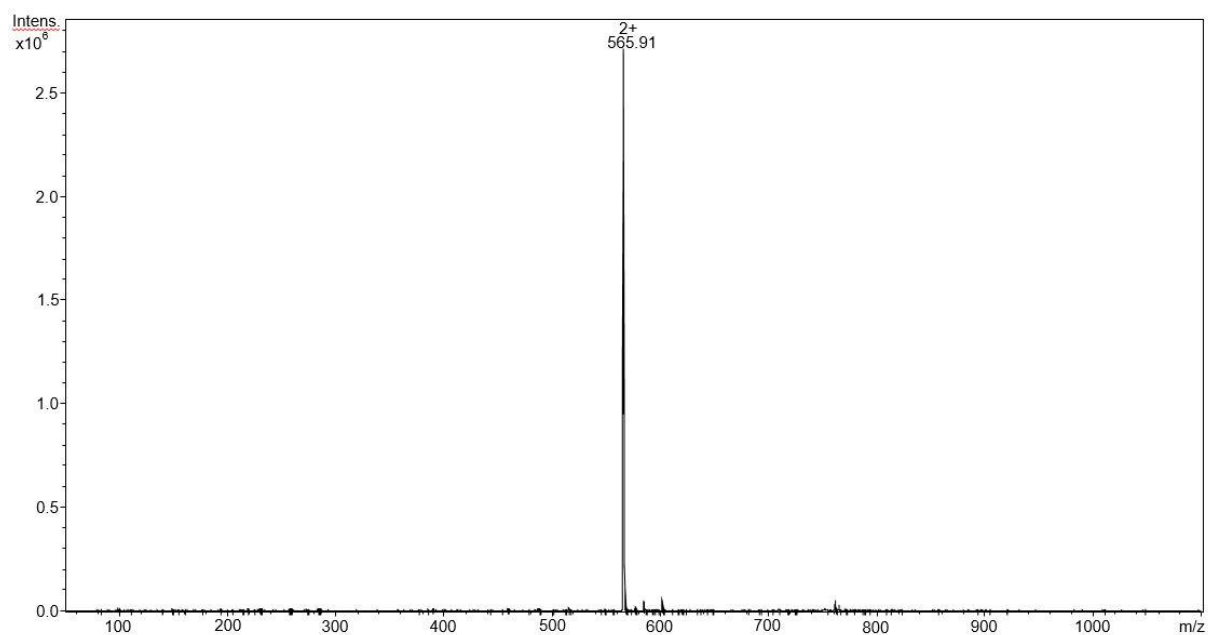
A molekula várt tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1007,8 Da

mért tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1008,4 Da

CF-Lys-Cys-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂



5. ábra. A tiszta CF-KCGCYSL-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

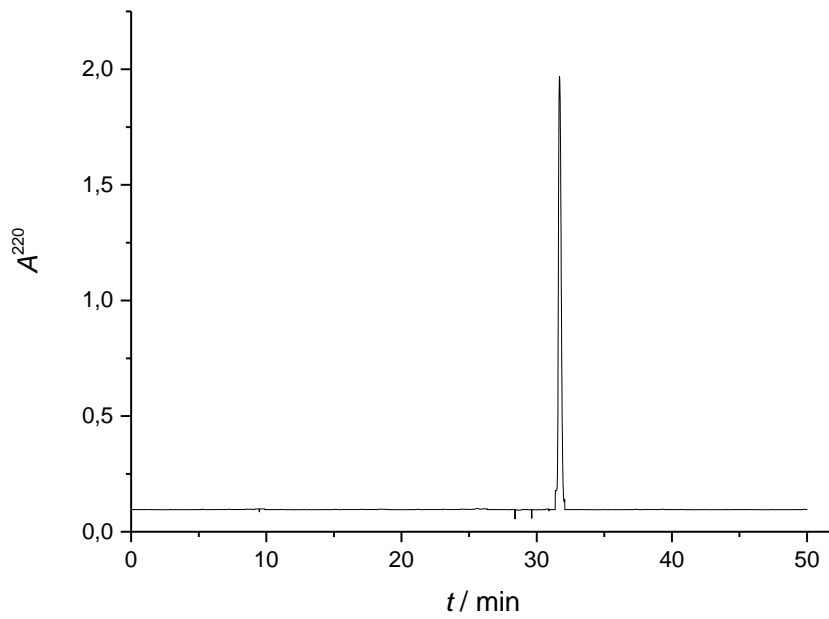


6. ábra. A tiszta CF-KCGCYSL-NH₂ MS spektruma

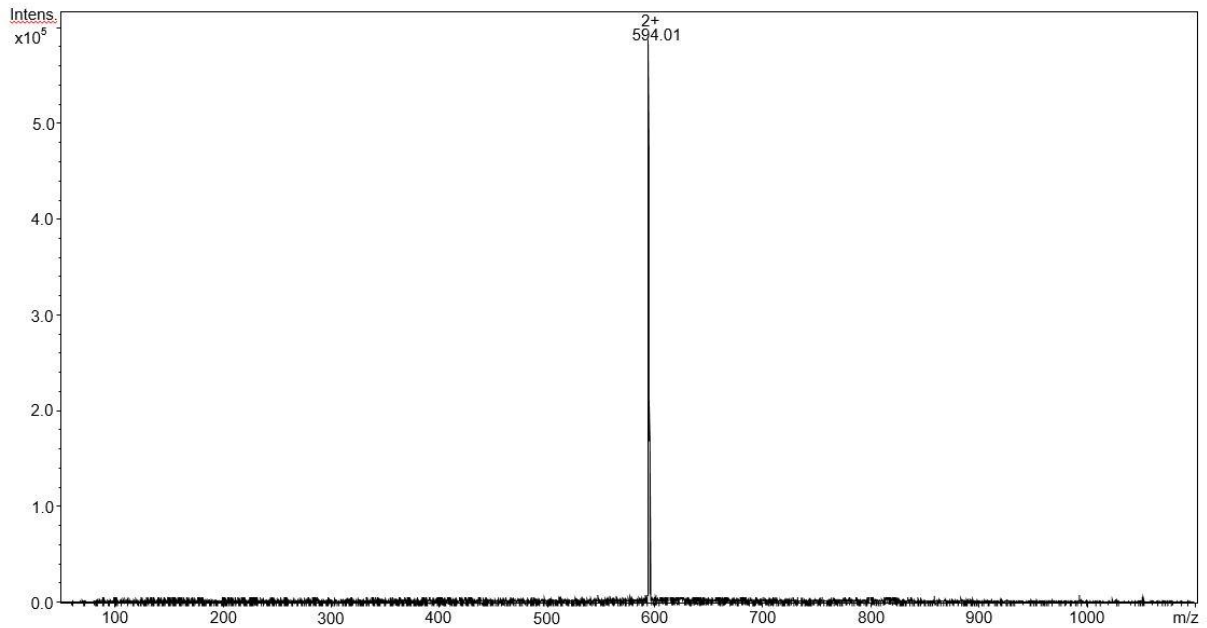
A molekula várt tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1129,9 Da

mért tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1129,8 Da

CF-Lys-Cys-Gly-Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂



7. ábra. A tiszta CF-KCGGCYSL-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

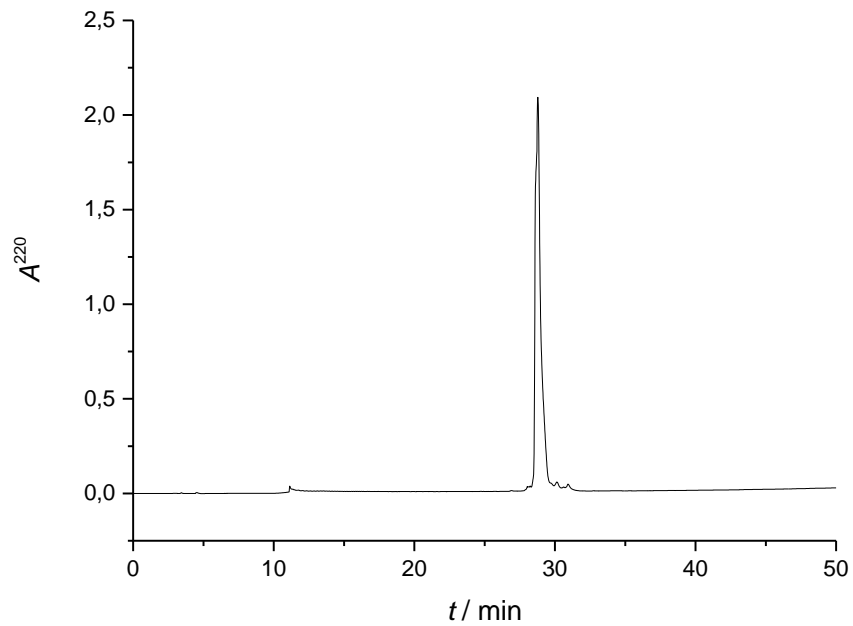


8. ábra. A tiszta CF-KCGGCYSL-NH₂ MS spektruma

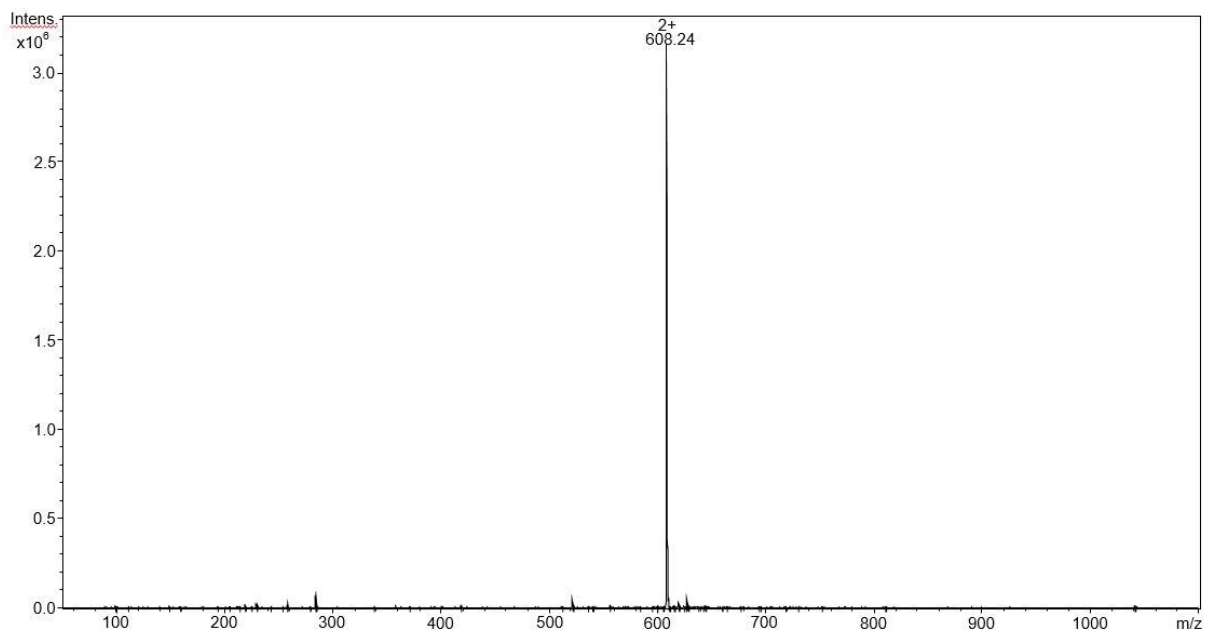
A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1186,0 Da

mért tömege: $[M+H]^+$: 1186,0 Da

CF-Lys-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr-Ser-Leu-NH₂



9. ábra. A tiszta CF-KC(Acm)C(Acm)YSL-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

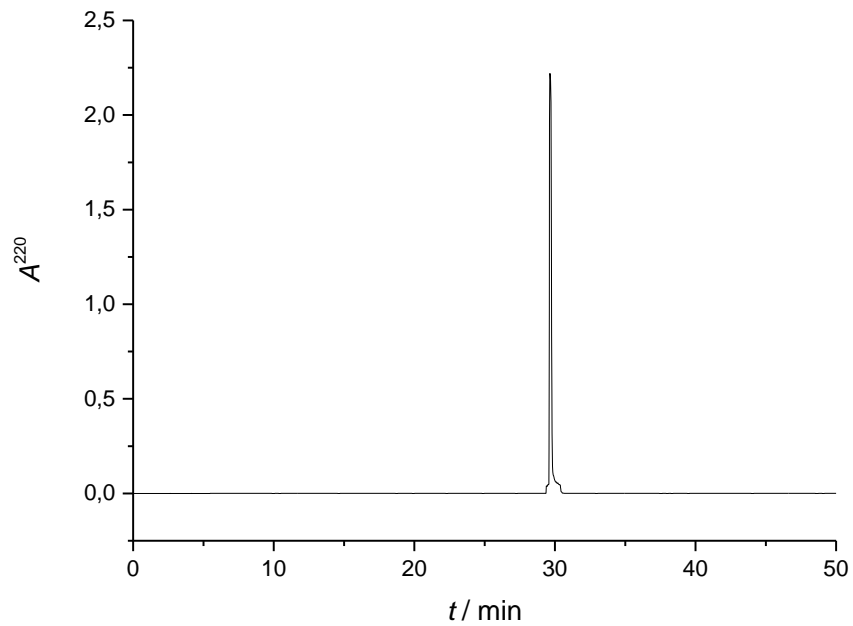


10. ábra. A tiszta CF-KC(Acm)C(Acm)YSL-NH₂ MS spektruma

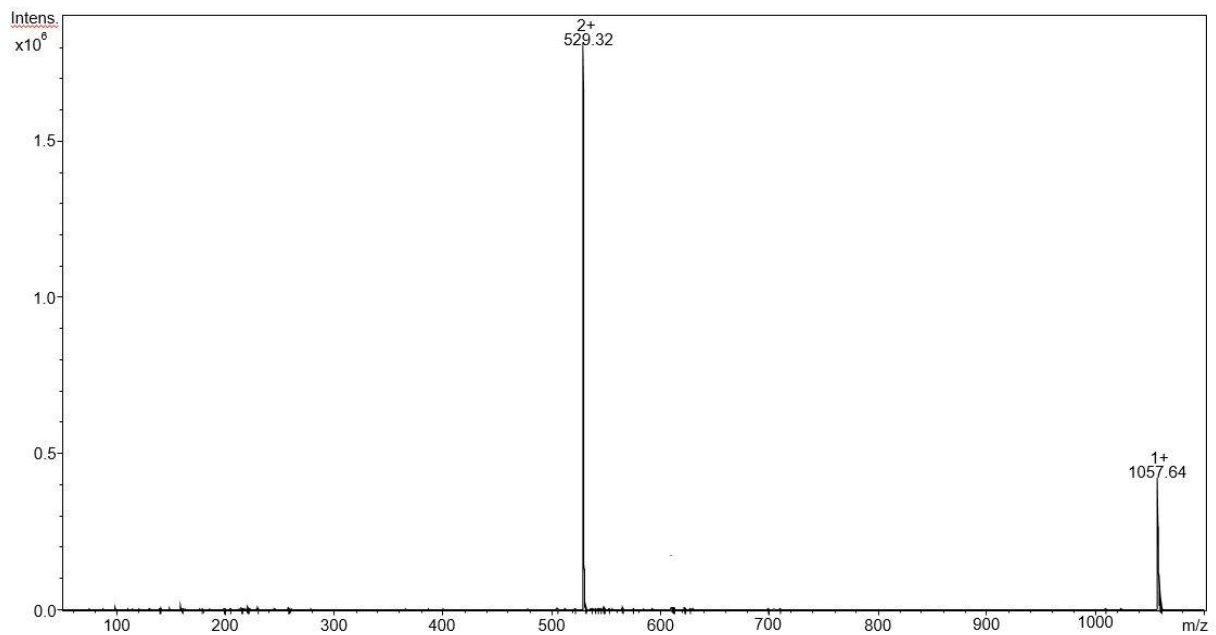
A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1214,5 Da

mért tömege: $[M+H]^+$: 1214,0 Da

CF-Lys-Cys-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH₂



11. ábra. A tiszta CF-KCSYSL-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

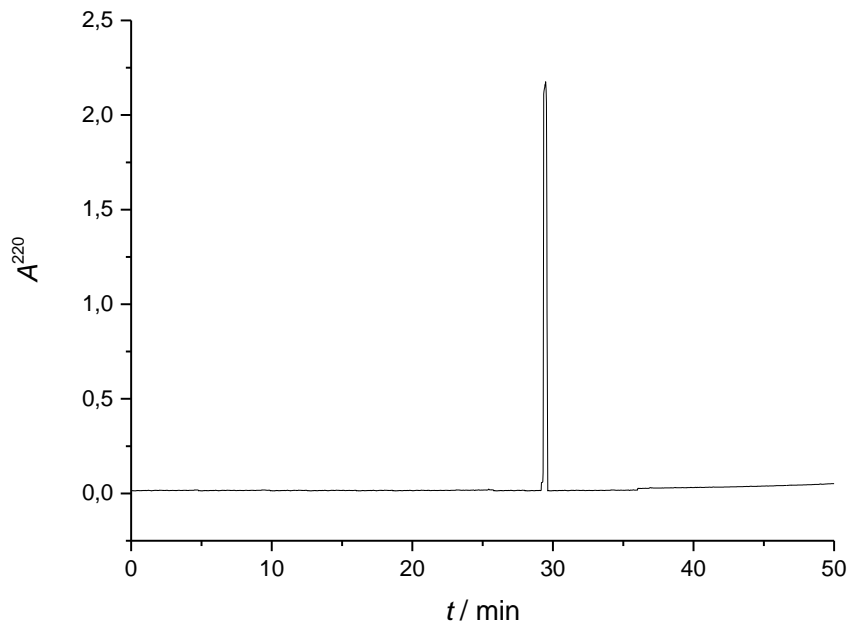


12. ábra. A tiszta CF-KCSYSL-NH₂ MS spektruma

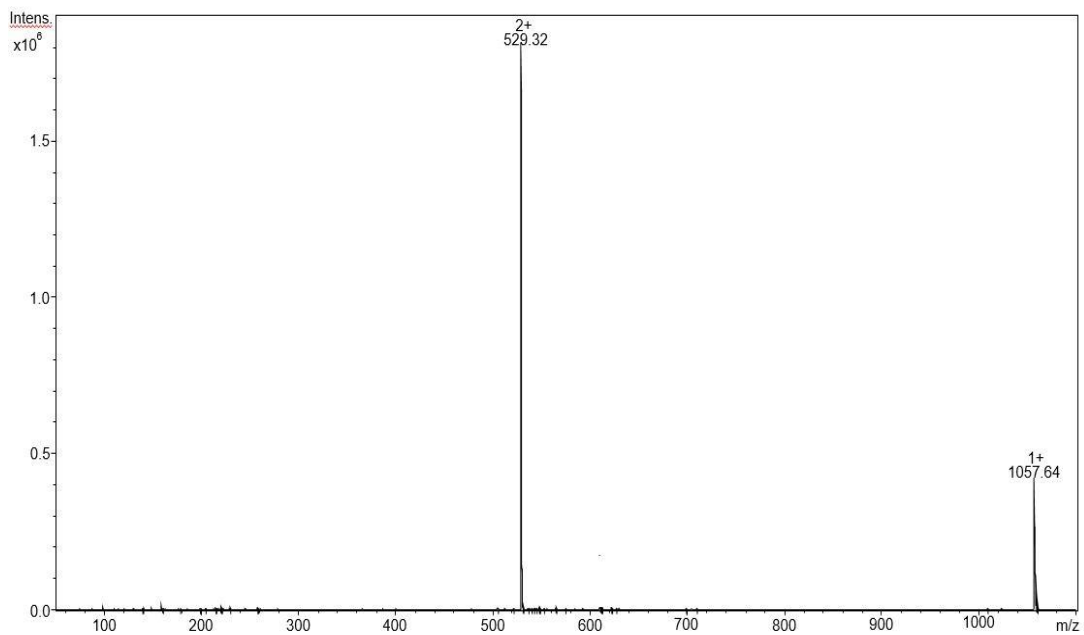
A molekula várt tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1056,7 Da

mért tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1056,4 Da

CF-Lys-Ser-Cys-Tyr-Ser-Leu-NH₂



13. ábra. A tiszta CF-KSCYSL-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

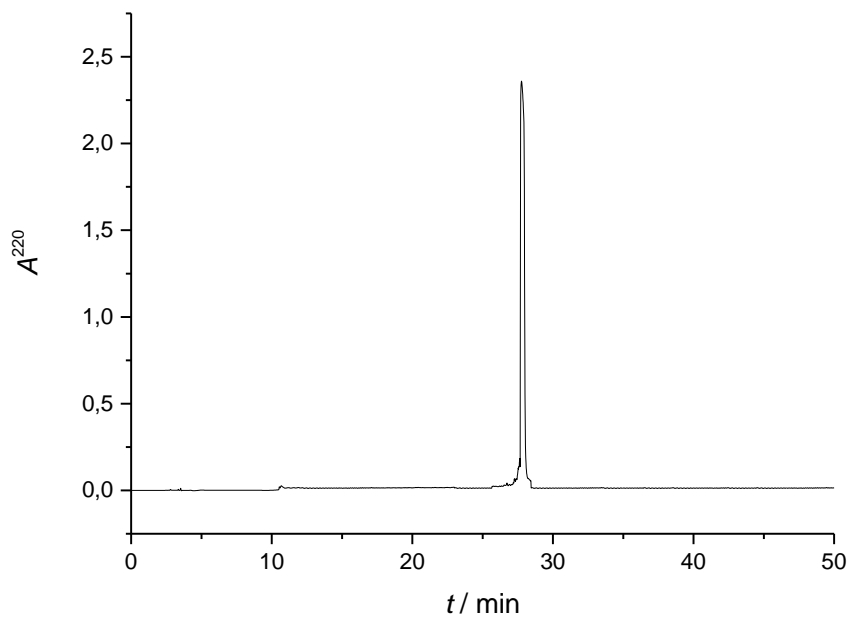


14. ábra. A tiszta CF-KSCYSL-NH₂ MS spektruma

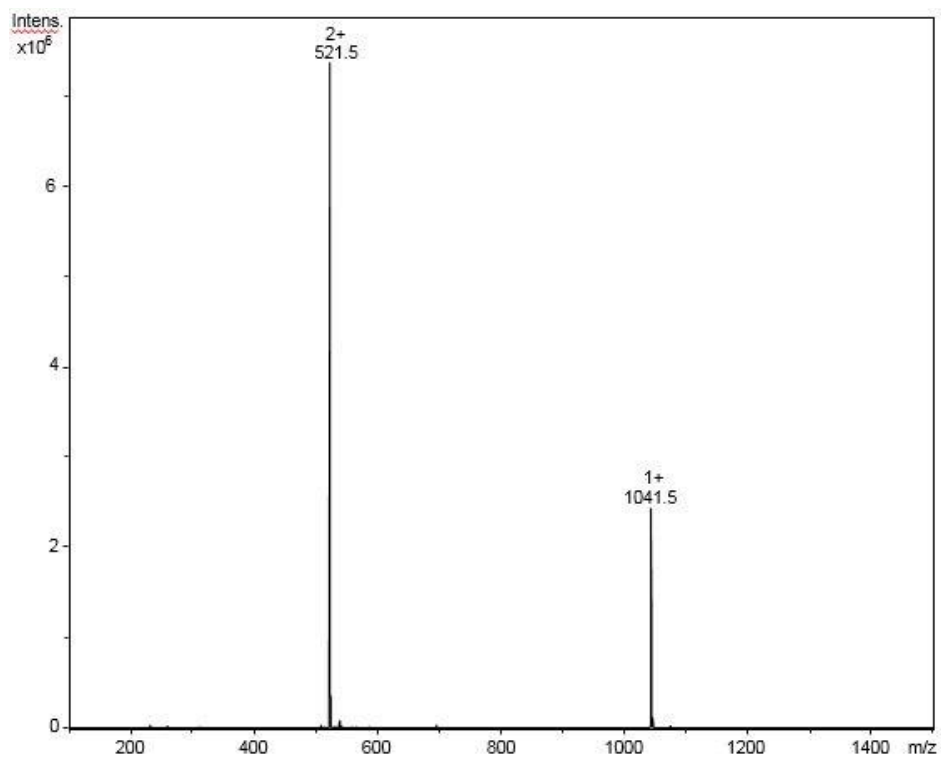
A molekula várt tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1056,7 Da

mért tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1056,4 Da

CF-Lys-Ser-Ser-Tyr-Ser-Leu-NH₂



15. ábra. A tiszta CF-KSSYSL-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

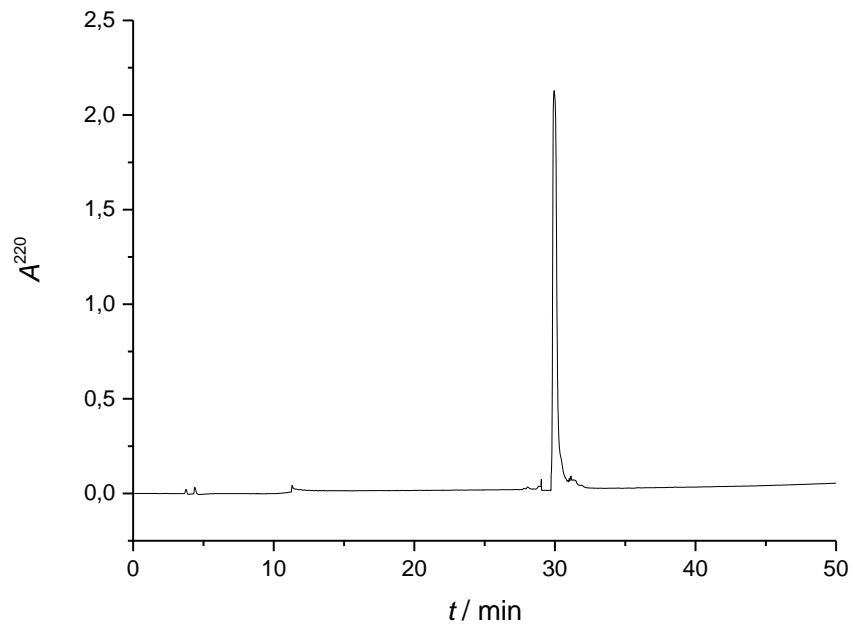


16. ábra. A tiszta CF-KSSYSL-NH₂ MS spektruma

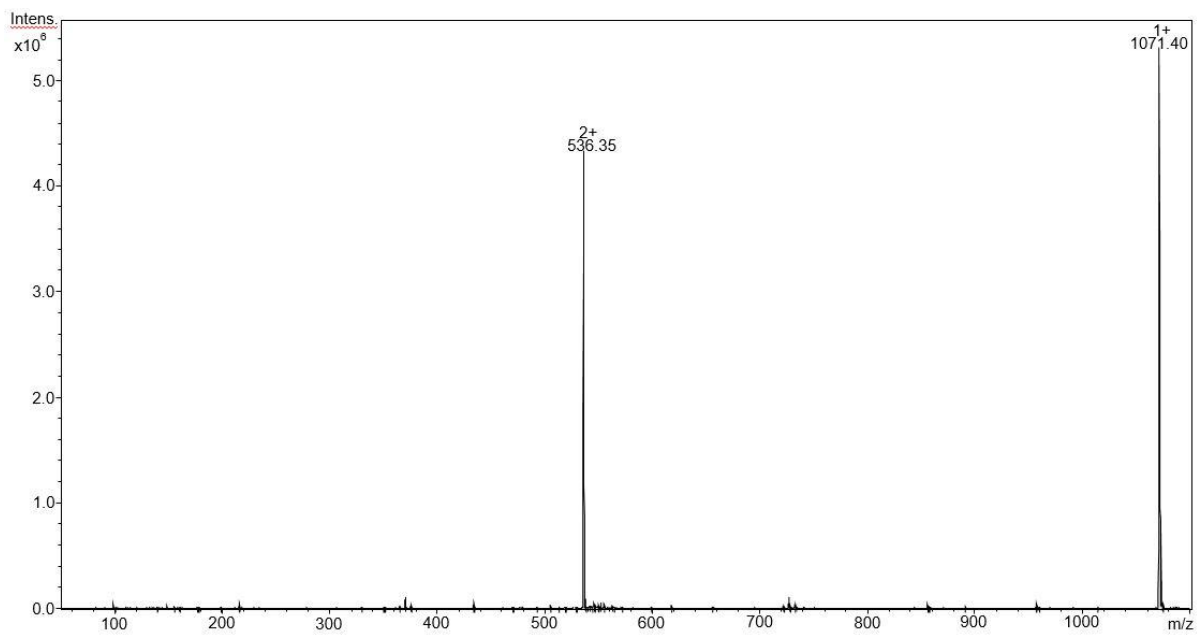
A molekula várt tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1040,8 Da

mért tömege: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1040,5 Da

CF-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH₂



17. ábra. A tiszta CF-GYYNPT-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

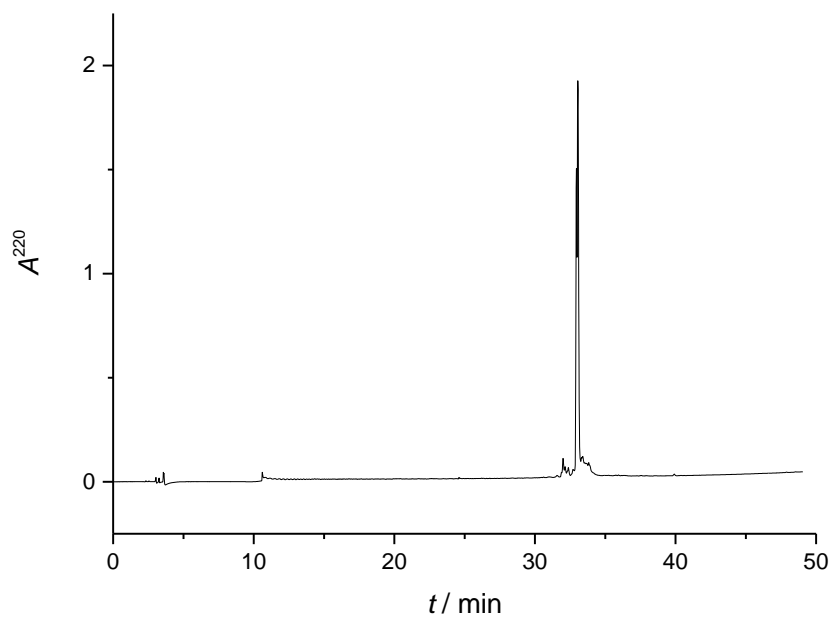


18. ábra. A tiszta CF-GYYNPT-NH₂ MS spektruma

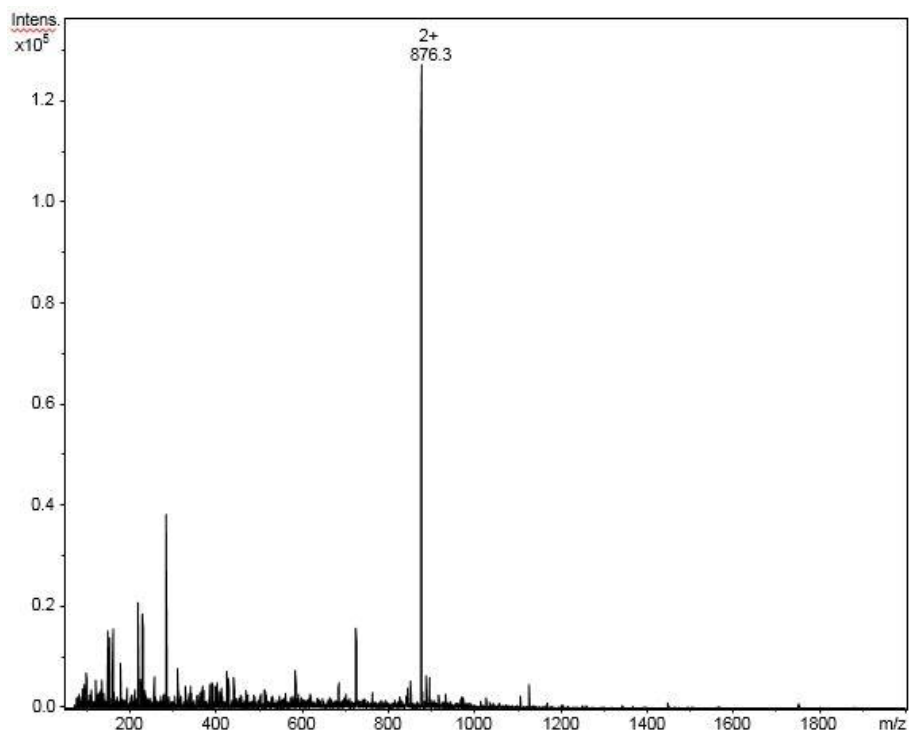
A molekula várt tömege: [M+H]⁺: 1070,8 Da

mért tömege: [M+H]⁺: 1070,4 Da

CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Trp-Trp-Asn-Pro-Thr-NH₂



19. ábra. A tiszta CF-KAAYSLGWWNPT-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja

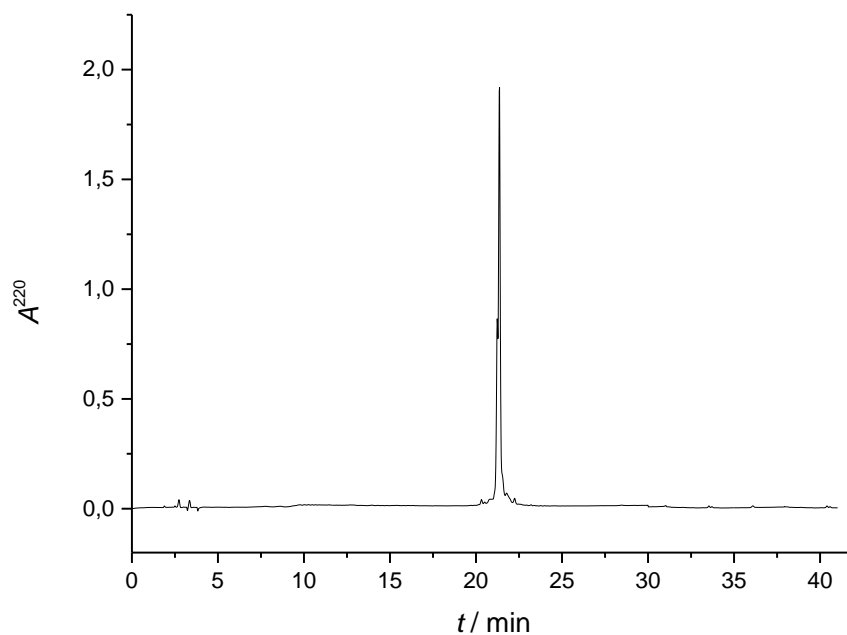


20. ábra. A tiszta CF-KAAYSLGWWNPT-NH₂ MS spektruma

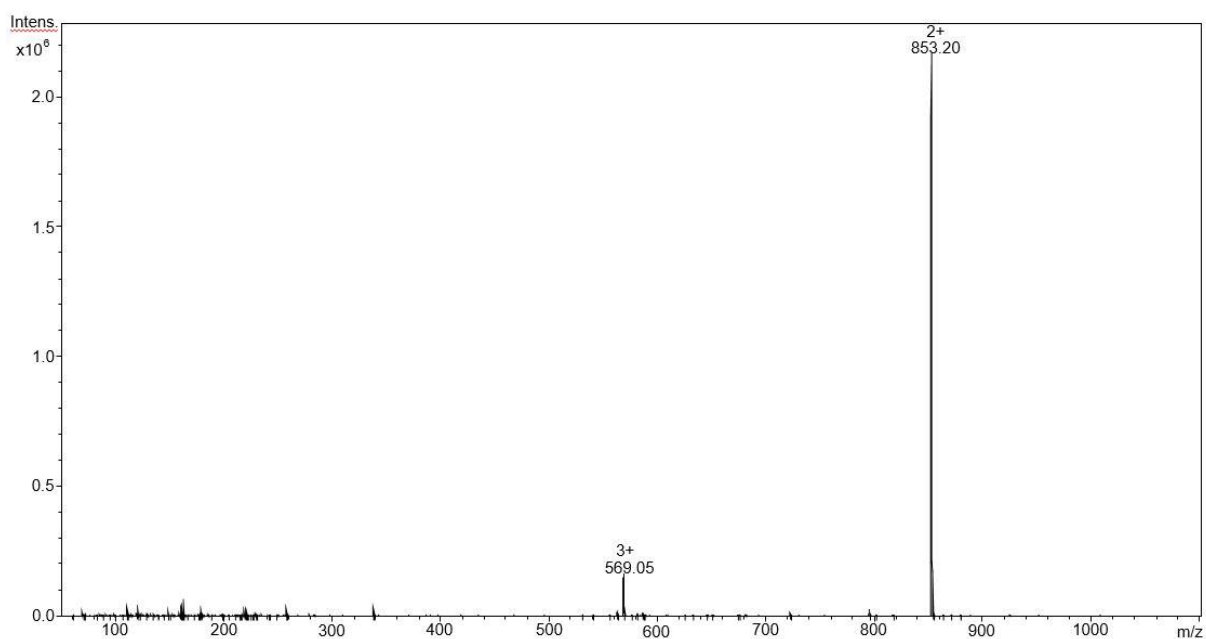
A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1750,6 Da

mért tömege: $[M+H]^+$: 1750,6 Da

CF-Lys-Ala-Ala-Tyr-Ser-Leu-Gly-Tyr-Tyr-Asn-Pro-Thr-NH₂



21. ábra. A tiszta CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂ analitikai HPLC-vel felvett kromatogramja



22. ábra. A tiszta CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂ MS spektruma

A molekula várt tömege: [M+H]⁺: 1704,5 Da

mért tömege: [M+H]⁺: 1704,4 Da