

Tüdőtumorra specifikus irányító peptidek szerkezet-hatás összefüggésének tanulmányozása peptid-hatóanyag konjugátumok segítségével

Szakdolgozat
Kémia Alapszak

Hapka Nikoletta

Témavezető:

Dr. Mező Gábor, tudományos tanácsadó
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest
Természettudományi Kar
Kémiai Intézet
Szerves Kémiai Tanszék
2018

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani *Dr. Perczel Andrásnak*, a Szerves Kémia Tanszék vezetőjének, valamint *Dr. Hudecz Ferenc* egyetemi tanárnak és *Dr. Mező Gábor* tudományos tanácsadónak, hogy munkámat az ELTE Szerves Kémia tanszékén, illetve az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban lehetővé tették.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Mező Gábor* tudományos tanácsadónak, a kísérleti munkában és a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségével, a sok türelméért és az átadott ismeretekért.

Külön köszönettel tartozom *Adorján Afrodité Emese* BSc hallgatónak a segítségével, a sok hasznos tanácsért és támogatásért, amit tőle kaptam, hogy végtelen türelmével támogatta munkámat, illetve hogy bármikor fordulhattam hozzá, ha segísége volt szükségem.

Továbbá szeretném megköszönni *Dr. Enyedi Kata Nóra* tudományos segédmunkatársnak, valamint *Pethő Lilla* PhD. hallgatónak a türelmüket, észrevételeiket.

A kutatásokat a Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Program NVKP_16-1-2016-0036 pályázata támogatta.

Végül, de nem utolsó sorban köszönök minden támogatást, amit a családomtól, barátaimtól kaptam, nélkülük ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

TARTALOMJEGYZÉK

Köszönetnyilvánítás	2
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1 Daganatterápiák	6
2.1.1 Sebészeti beavatkozás	6
2.1.2 Sugárterápia	6
2.1.3 Immunterápia.....	7
2.1.4 Kemoterápia	7
2.2 Daunomicin	8
2.3 Célzott tumorterápia	10
2.4 Fág könyvtár	11
3. Peptidszintézis	13
3.1 A szilárdfázisú peptidszintézis elve.....	13
3.1.1 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái, a védőcsoportok szerepe	13
3.1.2 A gyanta.....	14
3.1.3 A peptidkötés.....	16
3.1.4 A kapcsolási reakciók követése.....	17
4. Célkitűzések	19
5. Eredmények.....	20
5.1 Fág könyvtárból kiválasztott WPLHTSVYPPSP peptid és analógjainak szintézise, konjugálása	20
5.1.1 Az Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH ₂ , az Aoa-LRRY-VYPPSP-NH ₂ , az Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH ₂ , és az Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH ₂ peptidek szintézise.....	20
5.1.2 Az aminooxiacetilezett peptidek konjugálása daunomicinnel	21
6. Kísérleti rész.....	23
6.1 Tisztítás és analízis	24
6.2 A peptidek szintézise, konjugálása és analízise.....	25
6.2.1 Az $\geq$ Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH ₂ , az $\geq$ Aoa-LRRY-VYPPSP-NH ₂ , az $\geq$ Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH ₂ , valamint az $\geq$ Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH ₂ szintézise és analízise	25
6.2.2 Az Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH ₂ , az Aoa-LRRY-VYPPSP-NH ₂ , az Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH ₂ , valamint az Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH ₂ konjugálása és analízise	26
7. Összefoglalás.....	28

Szakdolgozati összefoglaló	28
Summary.....	29
8. Rövidítésjegyzék	30
9. Függelék.....	31
10. Irodalomjegyzék.....	35

1. Bevezetés

A várható élettartam növekedésével a krónikus betegségek előfordulása és így az ezek okozta halálozási gyakoriság is emelkedett. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization – WHO) adatai szerint 2016-ban a világon 17,2 millió új daganatos beteget regisztráltak, ebből 8,9 millió ember halt meg rosszindulatú daganatos megbetegedés következtében. Egyes kutatások szerint a daganatos megbetegedések következtében bekövetkező halálozások száma 2030-ra elérheti akár az évi 11,5 milliót is. Az Európai Unióban az ischaemiás szívbetegségek után a második legtöbb halálozást a daganatos megbetegedések okozzák. Magyarországon is fokozatosan emelkedett a daganatos betegek száma, bár az ebből eredő halálozások száma az elmúlt években stagnált [1].

A daganatok kialakulását nemenként és életkoronként is különböző tényezők befolyásolják. A világon a legtöbb halált okozó rákos megbetegedés a tüdőtumor. Második helyen áll a kolorektális (vastagbél-, végbél-) daganat, majd ezt követi az emlőrák, gyomorrák és a hasnyálmirigyrák [2].

Mint minden daganatos megbetegedésnél, a tüdőráknál is valamely sejttípus rendellenes osztódása figyelhető meg. A folyamat hosszú időn át tart, és kezdetben nem jár tünetekkel. A tüdő tumorok 85-87%-a az aktív, 3-5%-a pedig a passzív dohányzással hozható összefüggésbe [3]. A tüdőrákos halálozások mintegy 25%-a levegő szennyezettségének tulajdonítható.

A daganatos megbetegedések bármely szövettípusból kialakulhatnak, ezért nincs egy általánosan alkalmazható gyógymód ellenük. A terápia kiválasztása a tumor elhelyezkedésétől, méretétől és a beteg állapotától is függ. Csak az utóbbi néhány évben vált lehetővé, hogy a daganatokat ne csak kemoterápiával, hanem célzottan ható készítményekkel kezeljék. Ezeket a készítményeket azért nevezik célzottak, mert a tumorsejt valamilyen sejtfelszíni struktúráján, receptorán keresztül fejtik ki hatásukat, ezzel megváltoztatva a sejten belüli jelátviteli folyamatokat, így megállítva a daganat további osztódását, növekedését [4]. Várhatóan a célzott tumorterápia hozhat nagy áttörést a daganatos megbetegedések gyógyításában.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Daganatterápiák

A daganatos megbetegedésekre nincsen általánosan alkalmazható gyógymód, mivel bármely szövettípusból kialakulhatnak. Megkülönböztetünk jó- és rosszindulatú daganatokat: az utóbbiak létrehozhatnak áttéteket a szervezet különféle pontjain. Ezeket *malignus* elváltozásoknak nevezzük, szemben a jóindulatú *benignus* tumorokkal, amelyek nem adnak áttéteket.

A megfelelő kezelés kiválasztása függ a daganat fajtájától, méretétől, és hogy milyen stádiumban van [5]. A daganatos megbetegedések kezelése történhet: sebészeti beavatkozással, sugár-, kemo-, vagy immunterápiával.

2.1.1 A sebészeti beavatkozás

A daganatterápiában a sebészeti beavatkozás a leggyakrabban alkalmazott módszer. Mint minden orvosi tevékenységnek, így egy műtéti beavatkozásnak is kellően megalapozottnak kell lennie. Figyelembe kell venni a diagnózist, a tüneteket, a beteg műtéti toleranciáját. Maga a műtét során nem csak a látható rákos szövetet távolítják el, hanem azzal együtt bizonyos mennyiségű ép szövetet is a feltételezhető mikrotumorok jelenléte miatt. A műtéti beavatkozást legtöbbször sugár-, és/vagy kemoterápia előzi meg, vagy követi attól függően, hogy a tumor méretének a csökkentése-e a cél, vagy hogy megakadályozzák az újabb kialakulást [3].

2.1.2 Sugárterápia

A sugárterápia a második leggyakrabban alkalmazott terápiás eljárás. A kezelés alatt nagy energiájú, ionizáló sugárzást használnak. A sugárzás az örökítő anyag (DNS) károsítása révén gátolja a sejtosztódást. Ez a folyamat azonban nem szelektív, az ép és a daganatos sejtek DNS-ét is egyaránt károsítja. Napjainkban általában ^{60}Co , ^{103}Pd , ^{125}I sugárforrást alkalmaznak [6]. A besugárzás történhet külső sugárforrásokból, de történhet a beteg szervezetében, amikor a szövetekbe szúrt tűbe helyezik el a sugárforrást. A tüdőrákos betegek esetében kiegészítő terápiaként használják, hogy megelőzzék a betegség kiújulását.

2.1.3 Immunterápia

Az immunterápia a fehérvérsejteket aktiválva serkenti a szervezet saját természetes védekező rendszerét a daganatos megbetegedés elleni küzdelemben. Célja a fehérvérsejtek aktiválása, segítése.

Az immunterápia egyik irányzata az *aktív vagy specifikus* immunizáció. Ennek lényege, hogy a beteget a saját daganatából készített vakcinával oltják be, így próbálják „megtanítani” az immunrendszert a tumorsejtek felismerésére. Ma már olyan szerek fejleszthetők, amelyek a természetes immunreakciót befolyásolják, így szabályozni képesek a sejtek növekedését. Ezt a módszert nevezik *passzív* immunterápiának. Napjaink egyik legelterjedtebb és leghatékonyabb kezelése a monoklonális antitest terápia. Lényege, hogy az antitestek a tumorsejt felszínén található receptorhoz kötődnek, így olyan folyamatok indulnak el vagy éppen gátlódnak, amelyek a sejt pusztulásához vezetnek. Az immunterápiát a hagyományos kezelések kiegészítéseként szokták alkalmazni.

2.1.4 Kemoterápia

A kemoterápiát főleg limfóma és leukémia gyógyítására használják. A beteget olyan gyógyszerekkel (citosztatikumokkal) kezelik, amelyek a daganatos sejtek szaporodását gátolják, vagy azokat elpusztítják. A kemoterápiás szerek hatása nem csak a tumorsejteket érinti, hiszen a szervezetben jelen vannak olyan szövetek (száj-, és bélnyálkahártya, csontvelő), amelyek normál élettani körülmények között is gyorsan és folyamatosan osztódnak. A leggyakoribb mellékhatások: hányinger, hányás, étvágytalanság, gyengeség, hasmenés, hajhullás. További mellékhatás lehet a vérzékenységre, fertőzésekre való fokozott hajlam, hiszen a terápiás szerek a csontvelőt is károsítják. Sokszor jobb eredmény érhető el, ha több, különböző tumorelleses szert együtt alkalmaznak. Ezt az eljárást kombinált kemoterápiás kezelésnek nevezik.

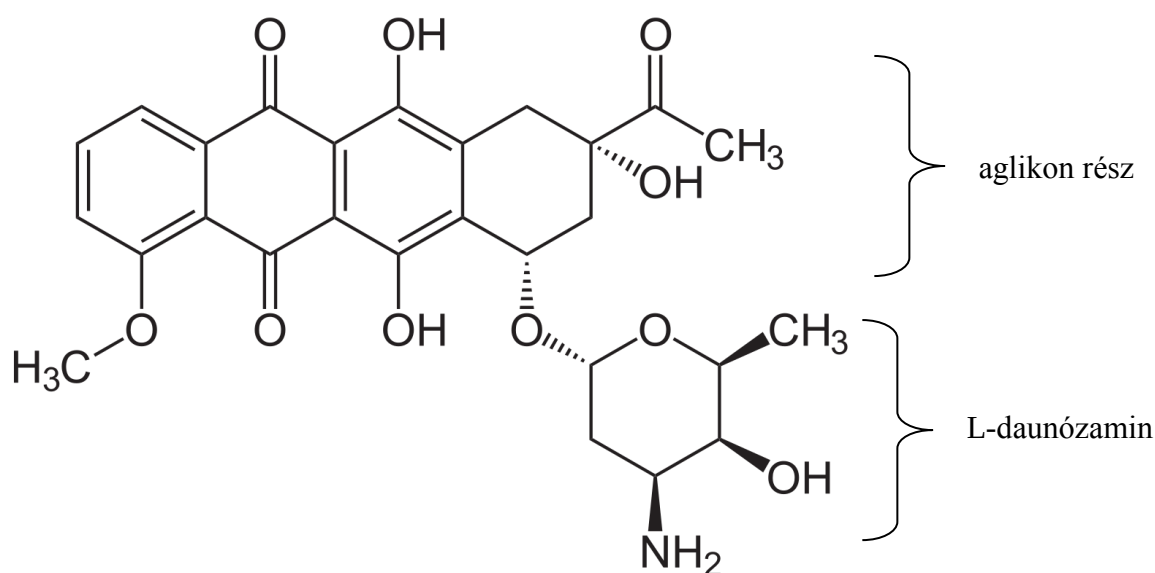
A citosztatikumok hatásmechanizmusuk alapján a következő csoportokba sorolhatóak:

- alkilezőszerek: a DNS replikációt gátolják úgy, hogy a DNS láncok között keresztkötéseket alakítanak ki (pl: ciszplatin, melfalán)
- antimetabolitok: A DNS szintézishez szükséges enzimek működését, vagy az anyagcserefolyamatokat gátolják (pl: metotrexát)
- antibiotikumok: interkalációs komplexet képeznek a DNS-sel (pl: daunomicin, doxorubicin)
- antimitotikumok: gátolják a mitotikus orsó kialakulását (pl: vinkrisztin, vinblasztin)

Eltérő hatásmechanizmusuk miatt gyakran alkalmazzák ezeket a citosztatikumokat kombinálva, így növelve a hatékonyságot. Mivel a véráramból hamar kiürülnek, ezért nagy dózisban kell őket alkalmazni, ezzel fokozódnak a toxikus mellékhatások.

2.2 Daunomicin

A daunomicin (Dau) az antraciklinek családjába tartozó hatóanyag: {(7S,9S)-9-acetil-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hidroxi-6-metiloxán-2-il]oxi-6,9,11-trihidroxi-4-metoxi-8,10-dihidro-7H-tetracén-5,12-dion} (1.ábra). Az antibiotikumok családjába sorolható citotoxikus gyógyszerek közé tartozó vegyület.



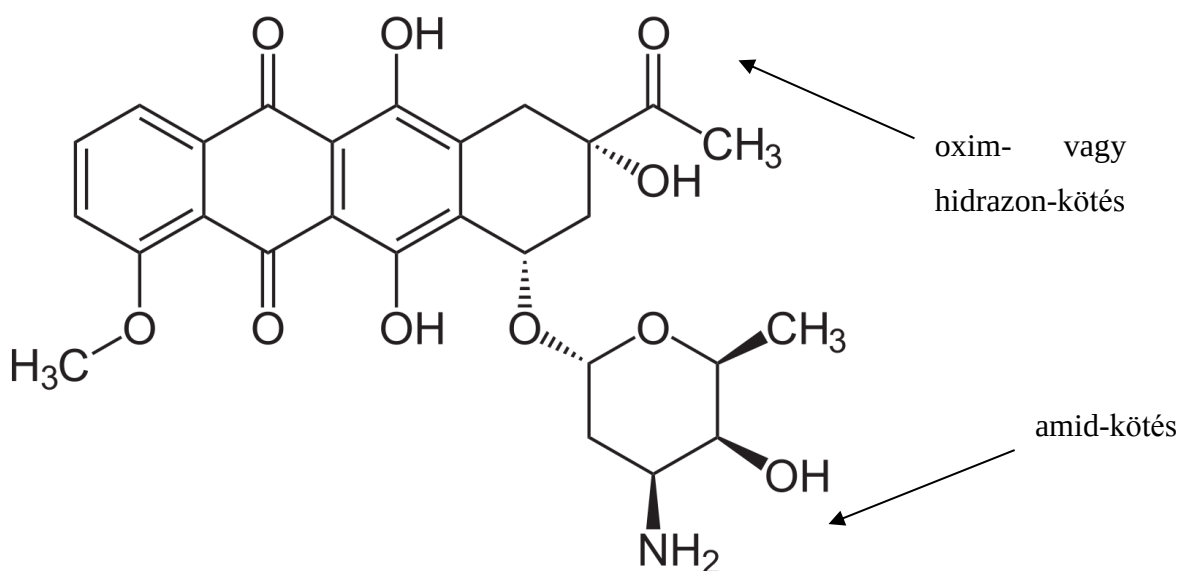
1.ábra A daunomicin szerkezeti képlete

Az antraciklinek kémiai szerkezete: tetraciklusos gyűrűs váz, amihez aminocukor és egy alkil-oldallánc kapcsolódik. A két középső gyűrűn kinon/hidrokinon csoport található, ezeknek elektronküldő szerepük van, illetve aktív gyökök (pl. hidroxil-gyök) képzését teszik lehetővé [7]. A sugárgombák közé tartozó *Streptomyces peucetius* baktériumból nyerik ki a daunomicint [8]. Fizikai tulajdonságai a következők: vörös, szagtalan, maró hatású, kristályos anyag, hidroklorid só formájában hozzák forgalomba. A daunomicin kölcsönhatásba lép a DNS-sel és interkaláció útján fejti ki hatását. Főleg guanin-citozin nukleobázisok közé ékelődik, megakadályozva a transzkripciót. A DNS replikációban szerepet játszó helikáz enzim

aktivitását is befolyásolja, és a topoizomeráz-II enzimmel stabil komplexet képezhet. Ennek eredményeképp, a DNS szintézisét, ezzel együtt pedig a sejtek osztódását is gátolja.

Orvosi alkalmazása: 60-90 mg/m² háromhetente, intravénásan, főleg az akut limfoid leukémiában szenvedő betegeknél. A kezelések során alkalmazott dózis befolyásolja a hatásmechanizmust is.

A daunomicin az egészséges sejtekre is hatással van, mellékhatásai lehetnek például a hajhullás, hányinger, hányás, hasmenés, étvágytalanság, kardiotoxicitás. Annak érdekében, hogy a káros mellékhatásokat elkerüljék és növeljék a tumorspecifitást, a daunomicint oligopeptidekhez (pl: GnRH) [9] és polimerekhez (pl: HPMa) [10] konjugálják. A daunomicinnak két konjugálásra alkalmas funkciós csoportja van: az oxim- vagy hidrazon-kötés kialakítására a 13-as C-atomján található oxocsoport; és az amid-kötés kialakítására a daunózamin cukorgyűrűn található aminocsoportja (2.ábra)



2. ábra A daunomicin konjugálásra alkalmas funkciós csoportjai

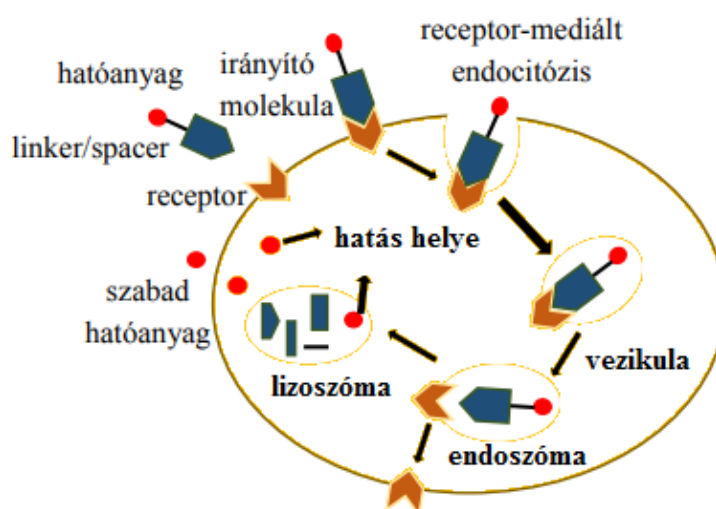
A cukorrész aminocsoportján létrehozott konjugáció nem kedvező (amennyiben abból a szabad hatóanyag nem szabadul fel), mivel ebben az esetben a konjugátum biológiai hasznosíthatósága lecsökken. A hidrazon-kötés bázisokkal szemben stabil (pH<5 esetén bomlik), ezért a szabad daunomicin a lizoszómákban könnyen felszabadul, ott ugyanis enyhén savas környezet van (pH ~ 4,5). A savlabilitása a konjugátumok előállítását megnehezíti szemben oxim-kötéssel, ami stabil és könnyen kialakítható [11]. A kötés kialakítása érdekében a peptidlánchoz aminosavakat (Aoa) kapcsolnak, amely alkalmas arra, hogy a daunomicinnal kemoszelektív ligációs eljárásban oxim-kötést alakítson ki. Ez a kötés kialakítás, illetve a

keletkezett konjugátumok tisztítása könnyen megvalósítható. A lizoszómában a konjugátumból felszabaduló aktív metabolit (a $\text{Dau}=\text{Aoa}-\text{Xxx}-\text{OH}$, ahol Xxx az az aminosav, amelyhez az aminooxiecetsav kapcsolódik) kevésbé hatékony biológiai vizsgálatokban, mint a szabad hatóanyag, de alkalmas arra, hogy a megfelelő peptidet kiválasszuk, amelyek szerkezete tovább módosítható hatékonyabb konjugátumok előállítására érdekében. Így a munkám során a daunomicint oxim-kötéssel konjugáltam peptidhez.

2.3 Célzott tumorterápia

A célzott daganatterápia az 1990-es években került előtérbe. A célzott – más néven irányított – tumorterápia lényege, hogy a citosztatikumokat szelektíven juttatják a daganatos sejtbe, ezzel csökkentve az egészséges sejtekben a toxicitást, a kemoterápia súlyos mellékhatásait, javítva ezzel a betegek életminőségét. Kutatások során számos olyan receptort találtak, amelyek a tumorsejtek felszínén nagyobb mennyiségben termelődnek, túlexpresszálódnak. Ha a hatóanyagot olyan molekulákhoz kapcsolják, amelyek specifikusan ezekhez a receptorokhoz kötődnek, akkor szelektíven juttathatják be azokat a tumorsejtbe. Sejtfelszíni molekulák lehetnek például a sejtek működésében szabályozó szerepet játszó peptidok vagy fehérjék receptorai [12].

Írányított tumorterápiára alkalmasak a hatóanyag szállító rendszerek (3. ábra). Ezek egy hordozóból, egy irányító egységből és a hatóanyagból állnak. A hordozó általában oligo-, és polipeptid, irányító molekulák lehetnek cukrok, antitestek vagy receptor ligandumok, például peptidok. Néha az irányító és a hordozó szerepét ugyanaz a molekula tölti be [13].

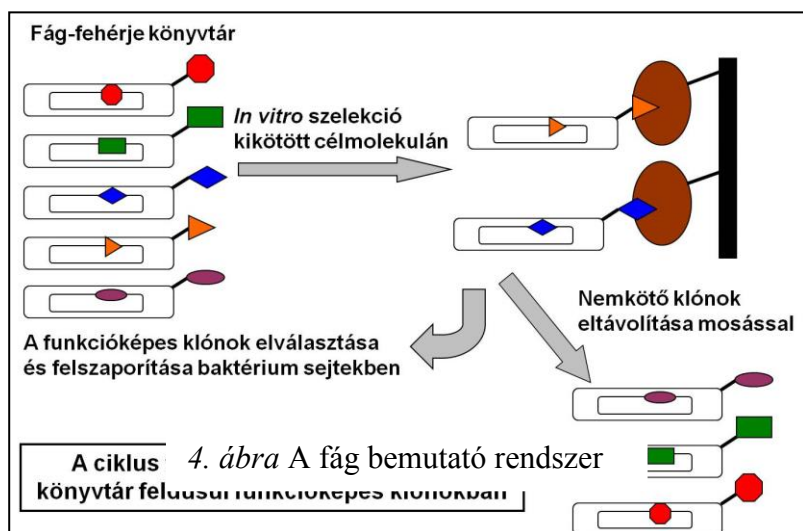


3. ábra A célzott tumorterápia hatásmechanizmusa a tumorsejtben [9]

Több olyan sejtfelszíni receptor létezik, ami a tumorsejtekben túltermelődik és nagy mennyiségben jelennek meg a sejtek felszínén. Ezeknek a receptoroknak a ligandumai alkalmasak tumorelles hatóanyagok célzott sejtbemutatására. A hatóanyag és a peptid olyan kémiai kötéssel kapcsolódik egymáshoz, amely biztosítja egy aktív metabolit vagy a szabad hatóanyag felszabadulását [12]. A konjugátum a tumorsejtek felszínén található receptorhoz kötődik, meggátolva ezzel, hogy a receptorok saját szubsztátjukhoz kötődve a sejt osztódását fokozzák. A konjugátumok a receptorhoz kötődve receptor-mediált endocitózissal jutnak be a sejtbe, a lizoszómában degradálódnak, és a felszabaduló hatóanyag vagy annak aktív metabolitja fejt ki hatását [9]. Előny, ha az irányító molekula egyben tumorelles hatással is rendelkezik.

2.4 Fág könyvtár

Manapság a fág könyvtárak egyre nagyobb jelentőséggel bírnak, hiszen az ún. fág bemutató rendszer olyan *in vitro* vagy *in vivo* molekuláris biológiai technika, amelynek során a fág felszínén olyan peptidek illetve fehérjék állíthatók elő, amelyek sejt-, vagy szövetspecifikusak (4. ábra). Legtöbb esetben helyspecifikus mutagenézisen alapuló eljárással peptid könyvtárakat hoznak létre és tesztelik, hogy kötődnek-e receptorhoz vagy antigénhez.



A módszer antitestek termelésére alkalmas, hiszen a fág könyvtárakkal elérhető lehetséges kombinációk száma közel azonos az élő szervezetben előforduló kombinációk számával. A fág könyvtár lehetőséget biztosít a különböző tulajdonságokkal és kötődési képességekkel rendelkező antitestek létrehozására és termelésére. A fág felszíni fehérjéjének génjéhez egy szekvenciát kapcsolnak, így az egyes fágok felszínein más aminosavsorrendű peptid jelenik meg. Minden fág csak egyfajta fehérjevariáns génjét hordozza. Biológiai hatás szempontjából megfelelő fág-fehérje variánsokat, a megfelelő gén szekvenálásával azonosítják.

A PC5-54 (WPLHTSVYPPSP) peptidet a CL1-5 tüdő-tumorsejtre való specifikusság alapján fedezték fel. A PC5-54 szekvenciát mutató fágokat tüdő- és szájrák-xenograftokból izolálták *in*

vivo fágbemutatással. Kutatások során kimutatták, hogy ez a peptid specifikusan kötődik a tüdőrák tumorsejtjeihez. A kötődési vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy a PC5-54 peptid potenciális irányító molekula lehet célzott tumorterápiás kezelésekben [14].

3. Peptidszintézis

3.1 A szilárdfázisú peptidszintézis elve

A peptidek előállításának két formája ismert: az oldatfázisú szintézis, amit napjainkban egyre ritkábban alkalmaznak, és a szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS).

Ez utóbbi módszert Robert Bruce Merrifield dolgozta ki az 1960-as években [15]. Lényege, hogy egy szilárd hordozóra közvetlenül kapcsolunk aminosavszármazékokat. A peptid felépítéskor a C-terminális felől haladunk az N-terminális felé. Ez történhet lépésenként (stepwise), amikor az aminosavakat egyesével építjük be a peptidláncba, illetve fragmentskondenzációval, amikor kisebb védett vagy részlegesen védett láncokat kapcsolunk össze a gyantán [16].

A szilárdfázisú peptidszintézis során a peptid egy szilárd, oldhatatlan hordozóhoz van kapcsolva addig, amíg be nem fejeződik a szintézise. A szilárd hordozó egy stabil, oldhatatlan polimer, amin funkciós csoportok találhatóak. A funkciós csoporton keresztül tud kapcsolódni a C-terminális felőli első aminosav a gyantához. Az átmeneti védőcsoport eltávolítása után a következő védett és karboxilcsoportján aktivált aminosav-származék hozzákapcsolható a peptid szabad aminocsoportjához. Ezeket a lépéseket ismételve gyorsan felépíthető az adott peptidlánc. A kész peptidről el kell távolítani az állandó védőcsoportokat, amit egy lépésben hajtanak végre a gyantáról való lehasítással. A hasítás során a főtermék mellett több-kevesebb melléktermék (pl. hibás, hiányos szekvenciák) is megtalálható, ezért különféle tisztítási eljárásokat kell alkalmazni a tiszta peptid előállítása érdekében [17]. A leghatékonyabb tisztítási eljárás a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC).

Az SPPS nagy előnye az oldatfázisú szintézissel szemben, hogy gyorsabb, mert nem kell minden szintézis lépés után tisztítani, illetve automatizálható az eljárás. Hátránya viszont, hogy a szintézis sikerességéhez minden aminosav kapcsolásának legalább 99,5%-os konverzióval kell lezajlania, vagyis a védett aminosav-származékokat nagy feleslegben kell alkalmazni, hogy viszonylag jó minőségű nyerstehermékhez jussunk.

3.1.1 A szilárdfázisú peptidszintézis stratégiái, védőcsoportok szerepe

A szilárdfázisú peptidszintézisnek két stratégiáját különböztetjük meg: a Boc/Bzl és az Fmoc/^tBu stratégiát. Az, hogy melyik módszer előnyösebb, nagyban függ a peptid szekvenciájától.

Boc/Bzl stratégia: az aminosavak α -aminocsoportjának védelmét *tert*-butiloxikarbonil (Boc)-csoport látja el, az oldalláncok védőcsoportja pedig általában benzil típusú (Bzl) védőcsoport, illetve annak származékai.

A Boc védőcsoport már középerős savakkal is lehasítható, de nukleofilekkel és lúgokkal szemben stabil. Lehasítása 30-50% trifluorecetsav (TFA)/diklórmétán (DCM) hasítóeleggyel történik, körülbelül 30 perces reakcióidővel. A Boc-csoport lehasításakor az α -aminocsoport sőt képez a trifluoracetáttal, ezért semlegesíteni kell. A semlegesítés 5-10%-os *N*,*N*-diizopropiletilamin (DIEA)/DCM eleggyével történik. A szintézis befejezésével a peptidet a gyantáról erős savakkal (pl: HF, TFMSA) lehet eltávolítani, így az állandó oldallánc-védőcsoportok is lehasadnak. Savas környezetben, oxidációra és alkileződésre hajlamos aminosavakat (Trp, Cys, Met, Tyr) tartalmazó peptidek esetében speciális gyökfogót és redukálószerket is alkalmaznak, hogy a mellékreakciókat csökkentsék.

Fmoc/^tBu stratégia: az átmeneti védőcsoport szerepét a 9-fluorenilmetoxikarbonil (Fmoc) tölti be, az oldalláncok védelmét pedig *tert*-butil (^tBu) típusú csoportok látják el. Az Fmoc védőcsoport bázisokra (elsősorban szerves szekunder aminokra) érzékeny, így hasítására 20-55%-os piperidin/DMF oldatot alkalmaznak. A hasítás közben dibenzofulvén keletkezik, ami igen reaktív, azonban a piperidinnel stabil vegyületet képez.

Kísérletek bebizonyították, hogy a 2% piperidin, 2% 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-undek-7-ént (DBU) tartalmazó DMF oldat a leghatékonyabb elegy az Fmoc-csoport eltávolítására. Ebben az esetben a hasítás gyorsabbnak bizonyult, illetve térgátlás esetén is hatékonyan hasítja le az átmeneti védőcsoportot, és az enantiomerizáció valószínűségét is csökkenti [16]. A módszer előnye a Boc/Bzl stratégiával szemben, hogy a savakra érzékeny aminosavak (Trp, Cys, Met, Tyr) oxidációja és alkileződése jelentősen csökkenthető.

A ^tBu típusú oldallánc védőcsoport eltávolítása a gyantáról való hasítással egyidejűleg történik trifluorecetsavval. A hasítási reakció során ebben az esetben is karbokationok keletkeznek, ezért kation befogókat és redukálószerket alkalmaznak, ilyen a víz, illetve a triizopropil-szilán (TIS).

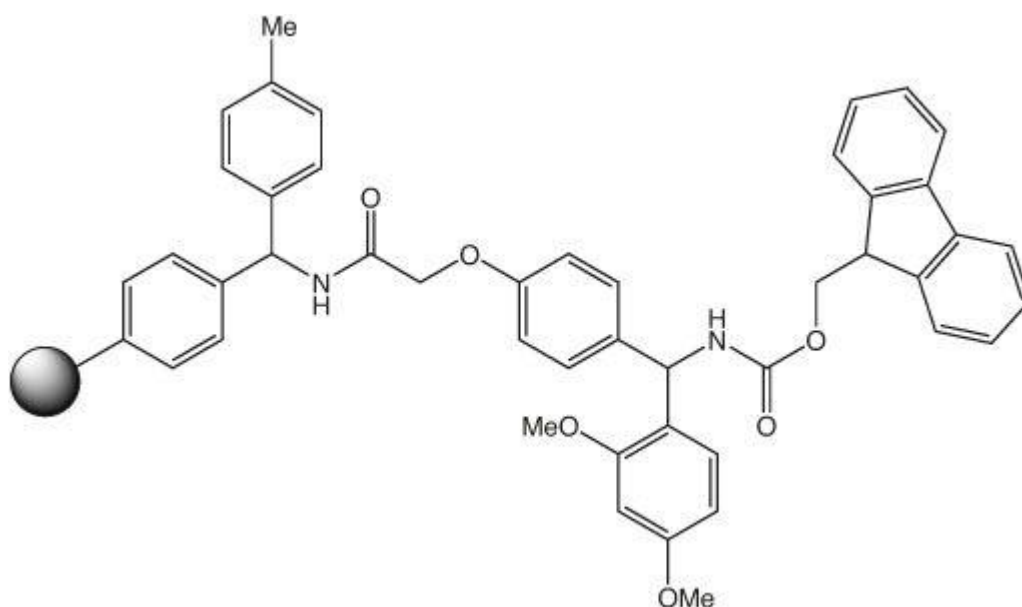
3.1.2 A gyanta

A gyantán olyan funkciós csoportok találhatók, amikhez hozzákapcsolható az előállítandó peptid C-terminális felőli első aminosavjának karboxilcsoportja. Az első gyanta klórmetil

funkciós csoportokat tartalmazó polisztrén 1,4-divinilbenzol kopolimer volt, amit Merrifield fejlesztett ki [18].

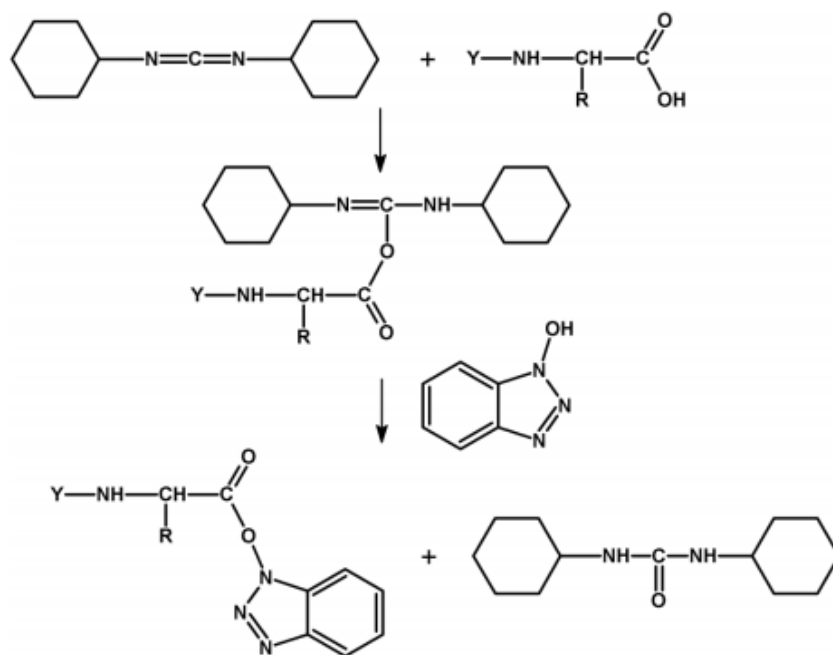
A gyanta kiválasztásakor számos szempontot kell figyelembe venni, ilyen például a szemcseméret, mechanikai stabilitás, továbbá fontos, hogy ne lépjen reakcióba a szintézis során alkalmazott reagensekkel és oldószerekkel, szűrhető legyen, illetve jól duzzadjon az oldószerekben. Ma már többféle gyantát lehet megkülönböztetni, például peptid-amidot, peptid-észtert, peptid-alkoholt, peptid-tioésztert, peptid-aldehydet eredményező gyantát aszerint, hogy a peptid hasítása után a peptid C-terminálisán milyen funkciós csoport kialakítása a cél. Biológiai kutatásokhoz általában peptid-amidokat használnak, mert ezeknek a legjobb a stabilitása.

Emellett a gyanták fontos jellemzője még a kapacitásuk. Nagy kapacitású gyantát alkalmaznak kisebb, lineáris peptidek felépítéséhez, míg kis kapacitásút a hosszabb elágazó peptidek szintéziséhez használnak. Napjainkban a legelterjedtebb gyanták: 4-metil-benzhidril-amin (MBHA), Rink Amide MBHA [4-(2,4-dimetoxi-fenil-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-MBHA], és Wang (4-alkoxibenzilalkohol) gyanta.



3.1.3 A peptidkötés

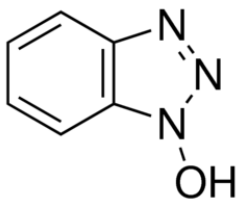
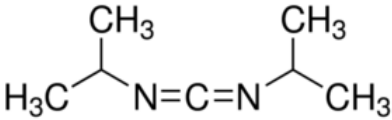
A peptidkötés kialakításakor a gyantához kötött szabad *N*-terminálisú és a védett, karboxilcsoportján aktivált aminosav-származék lép reakcióba egymással. Az aktiválás előállítható a reakció előtt is, vagy *in situ* a reakcióelegyben. Ilyenkor aktív észter alakul ki, ez az úgynevezett *in situ* aktív-észteres kapcsolat (6. ábra).



6. ábra. Az *in situ* észter képződése

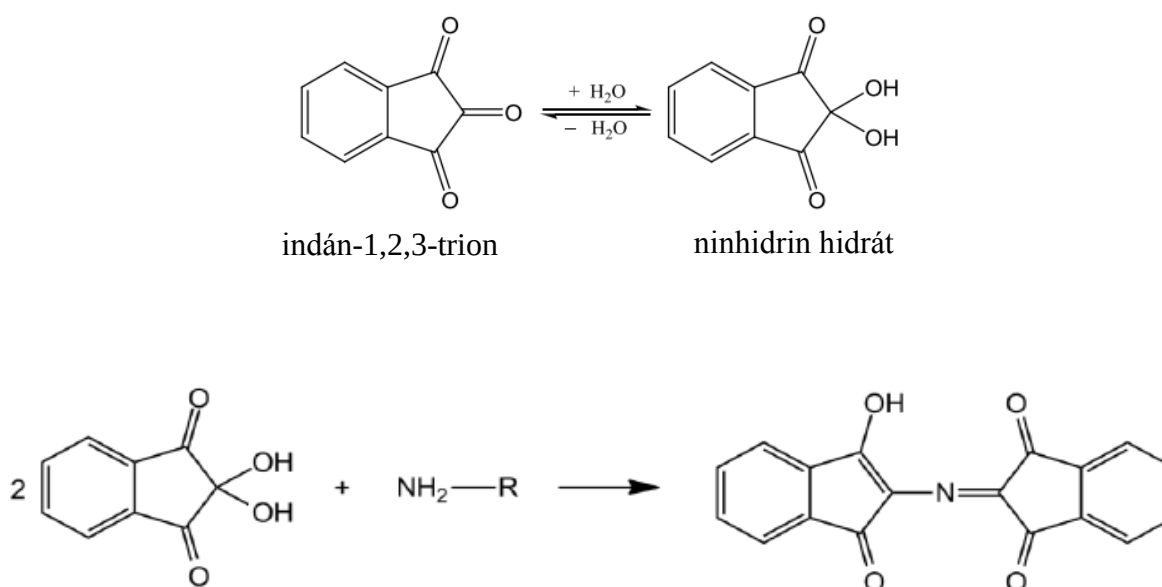
Az aminosav-származékok felkapcsolása történhet karbodiimidekkel, például *N,N'*-diizopropilkarbodiimiddel (DIC) vagy *N,N'*-diciklohexilkarbodiimiddel (DCC), illetve 1-hidroxi-benzotriazollal (HOBt) *N*-metil-pirrolidon (NMP), vagy DMF oldószerben oldva (1.táblázat) [19]. Előbbit az Fmoc/^tBu technikánál alkalmazzák, míg a DCC a Boc/Bzl stratégia fő kapcsolószere. A reakciókor az aminosav 1-hidroxi-benzotriazol aktív észtere keletkezik, ami acilezi a szabad *N*-terminálist. Melléktermékként *N,N'*-diciklohexilurea (DCU), illetve *N,N'*-diizopropilurea (DIU) jöhet létre. A DIC vagy a DCC és a védett aminosavszármazék között O-acilizourea keletkezik, ami gyors reakcióban reagál a HOBt aktív észter képzővel.

1.táblázat. A peptidszintézis során használt kapcsolószerek

Kapcsolószer	Képlet
HOBt	
DIC	

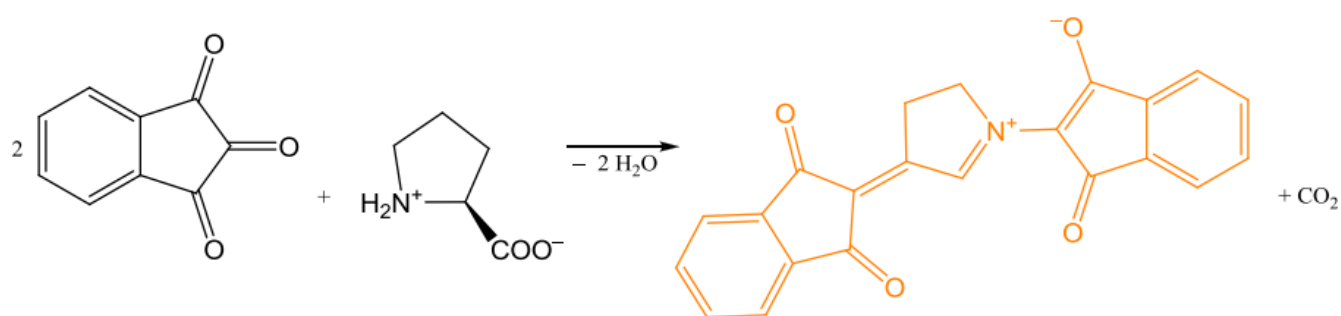
3.1.4 A kapcsolási reakciók követése

A szintézis során a kapcsolási reakciók sikerességét mindig nyomon kell követni annak érdekében, hogy elkerüljük a hiányos szekvenciákat. Ezt ninhidrin-, vagy más néven Kaiser-teszttel tehetjük meg oly módon, hogy a gyantaszemekhez pár csepp ninhidrin-, KCN-, és fenol-oldatot csepegtetünk, majd 3-5 percig melegítjük 104 °C-on. Amennyiben sikeres volt a kapcsolás, akkor a gyantaszemek sárgák maradnak, tehát nincs jelen szabad aminocsoport. Ha viszont a teszt kék színt eredményez, az szabad aminocsoport jelenlétére utal, vagyis a kapcsolás sikertelennek számít (7. ábra) [20]. A módszer nagyon érzékeny, hiszen már 1% szabad aminocsoportnál is intenzív kék színreakciót mutat.

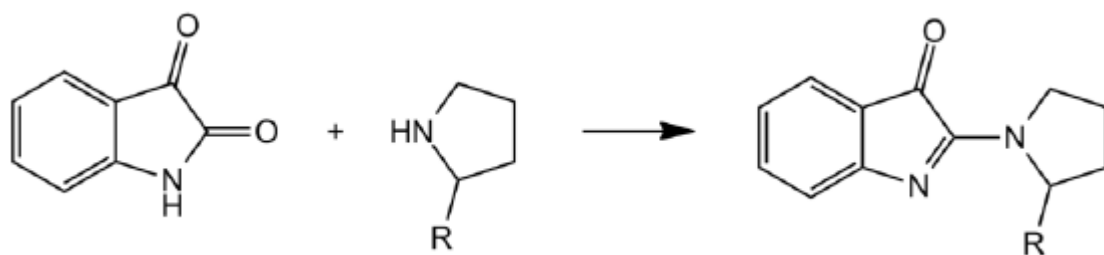


7. ábra Kaiser-teszt

Ha prolinhoz kapcsolunk aminosavat, akkor a teszt elvégzéséhez használt reakcióelegy mellé a gyantaszemekhez 1 csepp izatin-oldatot is kell adnunk. Ezt azért alkalmazzuk, mert a prolin egy iminosav, aminocsoportja gyűrűbe záródik, így a termék színe ugyanolyan sárga, mint a gyanta, hiába reagál ninhidrinnel (8. ábra). Sikertelen kapcsolásnál a gyantaszemek vörösesbarnára színeződnek az izatin hatására (9 ábra) [21].



8.ábra Prolin reakciója ninhidrinnel



9.ábra Prolin reakciója izatinnal

4. Célkitűzések

Munkám célja olyan peptidanalógok szintézise és konjugálása volt, amelyek potenciális irányító molekulák lehetnek a célzott tumorterápiában. A konjugátumokkal végzett vizsgálatok hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a jövőben tüdő tumor elleni gyógyszereket állítsanak elő. A különböző hosszúságú peptidek segítségével tanulmányozni kívánjuk az optimális irányításhoz szükséges lánchosszat.

Céljaim közt szerepelt:

- Négy különböző hosszúságú aminooxiacetilezett peptidszármazék előállítása Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán Fmoc/^tBu stratégiával, Katepszin B enzimlabilis spacer (LRRY) hozzáépítésével.
 - $\geq$ Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH₂
 - $\geq$ Aoa-LRRY-VYPPSP-NH₂
 - $\geq$ Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH₂
 - $\geq$ Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH₂
- Az előállított peptidszármazékok lehasítása gyantáról.
- A nyers peptidek tisztítása.
- Az enzimlabilis spacer tartalmazó peptidszármazékok konjugálása daunomicinnel.
- A konjugátumok tisztítása, azonosítása.

5. Eredmények

Célkitűzéseimnek megfelelően kísérleti munkám során különféle peptidkonjugátumok szintézisével foglalkoztam. Ezek a konjugátumok hatóanyag irányított célbajuttatására alkalmazhatóak. Tüdőtumorra specifikus fágbemutatással kiválasztott peptid és annak rövidített változatainak konjugátumait állítottam elő. Először az aminooxiacetilezett peptid-származékokat építettem fel szilárdfázisú peptidszintézissel majd ezt követően a peptidszármazékokhoz oxim-kötésen keresztül daunomicint konjugáltam oldatban.

Tehát az előállítás három részből tevődik össze:

1. A fág könyvtárból kiválasztott peptid és származékainak felépítése
2. A nyers peptidek tisztítása, azonosítása
3. A peptidek konjugálása daunomicinnel
4. A konjugátumok tisztítása és azonosítása

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

5.1. A fág könyvtárból kiválasztott WPLHTSVYPPSP peptid és analógjainak szintézise, konjugálása

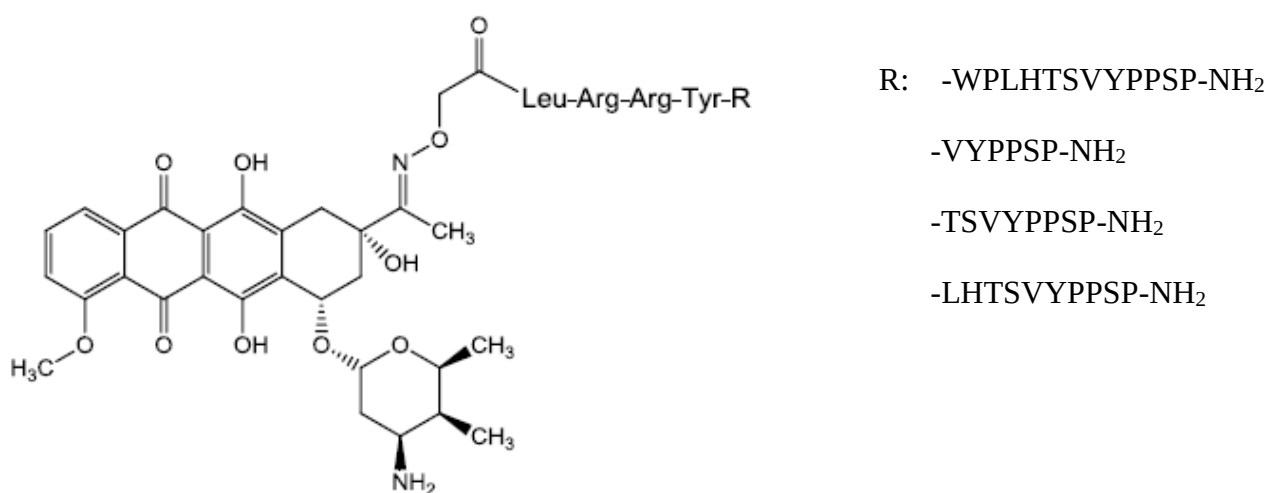
5.1.1 Az Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH₂, az Aoa-LRRY-VYPPSP-NH₂, az Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH₂, és az Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH₂ peptidek szintézise

A peptidek szintézisét Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán végeztem manuálisan, Fmoc/^tBu stratégiával. Első lépésként a gyantán található Fmoc-védőcsoportot távolítottam el 2% piperidin – 2% DBU/DMF elegyével, majd lépésenként építettem be a védett aminosav-származékokat DIC/HOBt aktiváló reagensek felhasználásával. A kapcsolási reakciókban az aminosavszármazékokból és a kapcsoló reagensekből a gyantakapacitásra számolt három ekvivalens mennyiséget alkalmaztam. A kapcsolat, illetve a hasítás sikerességét minden esetben Kaiser-tesztel ellenőriztem. A szekvenciában található Fmoc-Val-OH beépítése után a gyantát négy egyforma részre osztottam: háromnegyed részt félreraktam későbbi továbbépítésre, egy negyed részén pedig megépítettem a fágbemutatással kiválasztott szekvencián alapuló referencia peptidet. A félretett háromnegyed részt a rövidített

szekvenciáknak megfelelően megépítettem, hozzáépítve az LRRY tetrapeptid spacert és az izopropilidén védett aminooxiacetsavat. A kész peptideket 95% trifluorecetsav (TFA), 2,5% desztillált víz és 2,5% triizopropil-szilán (TIS) elegyével hasítottam a gyantáról. A hasítóelegy hatására a védőcsoportok is lehasadtak. A hasítási reakció letelte után a peptideket éterben kicsaptam a hasító elegyből, majd a centrifugálást követően acetonitril/víz elegyében feloldottam. A kapott nyersterméket folyékony nitrogénben lefagyasztottam liofilizáláshoz. Az így kapott szilárd liofilizált nyers termékeket fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztítottam,

5.1.2 Az aminooxiacetilezett peptidek konjugálása daunomicinnel

A tisztított peptideket liofilizálás után 0,2 M NH₄OAc pufferben (pH = 5,5) oldva 4 ekvivalens mennyiségű metoxiaminnal reagáltattam, így eltávolítottam az aminooxiacetsavról az izopropilidén csoportot. Ezután félpuritatív RP-HPLC-n tisztítottam és a tiszta peptidekhez két ekvivalens mennyiségű daunomicint adtam. A konjugálás szobahőmérsékleten, állandó kevertetés mellett egy éjszaka alatt lejátszódott. Nem minden esetben volt sikeres a konjugálás, ezért meta-feniléndiamin-dihidroklorid katalizátort adtam az elegyhez, így elég volt 3 órát kevertetni és a reakciónál közel 100%-os konverzióval lejátszódott. A reakció során oxim-kötés alakult ki a szabad aminooxiacetyl-csoport és a daunomicin 13-as C-atomja között (10. ábra).



10. ábra Az előállított konjugátumok

A konjugálás teljes lejátszódása után a termékeket fordított fázisú RP-HPLC-vel tisztítottam, majd tömegspektrometriával azonosítottuk, tisztaságukat analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem (2. táblázat).

2. táblázat A konjugátumok analitikai adatainak összefoglalása

Vegyület	R_t (perc)	M_{számolt} (Da)	M_{mért} (Da)
Dau=Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH ₂	23,8	2549,78	2550,21
Dau=Aoa-LRRY-VYPPSP-NH ₂	21,6	1828,43	1827,99
Dau=Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH ₂	21,4	2017,22	2016,51
Dau=Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH ₂	21,4	2266,65	2266,84

A táblázat a Függelék 1-8. ábrái alapján készült.

6. Kísérleti rész

Szakdolgozati munkám során a peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel, manuálisan, Fmoc/^tBu stratégiával állítottam elő. Ennek a protokollját az alábbi táblázatban foglaltam össze (3. táblázat).

3. táblázat. Az Fmoc/^tBu stratégia protokollja

Művelet	Művelethez használt reagens/oldószer	Időtartam (perc)
Mosás	DMF	3x1
Fmoc-csoport hasítása	2% piperidin-2% DBU/DMF	2+2+5+10
Mosás	DMF	3x1
	DCM	2x1
Hasítás ellenőrzése	Kaiser teszt	3
Mosás	DMF	3x1
Kapcsolás	3 ekv. aminosav-származék + 3 ekv. HOBt/DMF + 3 ekv. DIC	60
Mosás	DMF	3x1
	DCM	3x1
Kapcsolás ellenőrzése	Kaiser-teszt	3

A Kaiser-teszt során a 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 után izatin-oldatot (3% izatin és 5% Boc-Phe-OH benzilalkoholban oldva) is adunk az elegyhez, majd 104 °C-on melegítjük 3-5 percig. Ha a gyantaszemek színe sárga marad, akkor sikeres a kapcsolás, ha viszont bekékül (izatin-oldat esetében bebarnul), akkor maradt szabad aminocsoport, ami a kapcsolás sikertelenségét jelzi, tehát meg kell ismételni a kapcsolást.

6.1 Tisztítás és analízis

A nyers peptideket és a konjugátumokat fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) végeztem, gradiens elúciós módszerrel. A tisztításhoz KNAUER HPLC rendszert használtam (2 db K120 pumpa, nagy nyomású keverőegység, K2501 típusú monokromátoros UV detektor, adatgyűjtő szoftver). A nyersterméket félpreparatív rendszerben tisztítottam 4 ml/ perc áramlási sebességgel. A 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 adatai:

- Típus: Phenomenex Jupiter C18, 10 μ m Proteo 90 Å
- Hossza: 250 x 10 mm

A tiszta peptidek és konjugátumok analitikai vizsgálatához szintén KNAUER RP-HPLC rendszert használtam. A detektálás hullámhossza itt is $\lambda=220$ nm volt 1ml/perc áramlási sebesség mellett.

Az analitikai oszlop adatai:

- Típus: Phenomenex AERIS Peptide 3,6 μ m XB-C18
- Hossza: 250 x 4,6 mm

A tisztítás során alkalmazott gradiens:

0. perc	2 % B
5. perc	2 % B
50. perc	90 % B

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

A kapott analitikai kromatogramok, illetve a tömegspektrumok a Függelékben találhatóak.

6.2 A peptidek szintézise, konjugálása és analízise

6.2.1 Az $\geq$ Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH₂, az $\geq$ Aoa-LRRY-VYPPSP-NH₂, az $\geq$ Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH₂, valamint az $\geq$ Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH₂ szintézise és analízise

A szintézist 1,0 g Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán (gyantakapacitás: 0,71 mmol/g) végeztem. A védett aminosav-származékokból és aktiváló reagensekből a gyantakapacításra számolt 3 ekvivalens mennyiséget használtam (2,13 mmol). A szekvenciában található Fmoc-Val-OH beépítése után a gyantát négy részre osztottam és a peptideket a szekvenciáknak megfelelően fejeztem be.

4. táblázat A szintézis során használt aminosav-származékok, reagensek

Reagensek	Molekulatömeg (g/mol)	Szükséges mennyiség (mg)
Fmoc-Pro-OH	337,38	718,6
Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	383,44	816,7
Fmoc-Pro-OH	337,38	718,6
Fmoc-Pro-OH	337,38	718,6
Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	459,54	978,8
Fmoc-Val-OH	339,39	722,9
Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	383,44	204,2
Fmoc-Thr(^t Bu)-OH	397,47	211,7
Fmoc-His(Trt)-OH	619,72	330,0
Fmoc-Leu-OH	353,42	188,2
Fmoc-Pro-OH	337,38	179,7
Fmoc-Trp-OH	426,47	227,1
Fmoc-Tyr(^t Bu)-OH	459,54	978,8
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,78	1381,9
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,78	1381,9
Fmoc-Leu-OH	353,42	752,8
$\geq$ Aoa	131,20	279,5

HOBt x H ₂ O	152,00	323,8, majd 80,9
DIC ($\rho=0,815 \text{ g/cm}^3$)	126,20	329,8 μl , majd 82,5 μl

A szintézis befejeztével a peptideket lehasítottam a gyantáról 10 ml hasítóeleggyel, amelynek a tartalma 9,5 ml TFA, 250 μl desztillált víz, 250 μl TIS kationbefogó volt. A reakcióelegyet 3 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten, majd 0 °C-os dietil-éterbe szűrtem. A kicsapódott peptideket 5 percig centrifugáltam 4000 fordulat/perc sebességgel. Ezután az étert dekantáltam, és ezt még háromszor megismételtem. A nyers peptideket acetonitril-víz elegyében feloldottam, rotációs vákuumbepárló segítségével az illékony oldószermaradékot eltávolítottam az oldatból, és ezt az oldatot folyékony nitrogénben lefagyasztottam majd liofilizáltam. A liofilizált szilárd nyersterméket szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam az általános részben leírtak alapján.

Az alkalmazott gradiens:

0.perc	2% B
5. perc	2% B
50. perc	90% B

A peptidek azonosítását tömegspektrométerrel végeztük.

6.2.2 Az Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH₂, az Aoa-LRRY-VYPPSP-NH₂, az Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH₂, valamint az Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH₂ konjugálása és analízise

A kapott termékeket 0,2 M NH₄OAc pufferben (pH= 5,5) oldottam, majd 4 ekvivalens mennyiségű metoxiamint adagoltam hozzá. Az elegyet szobahőmérsékleten 1 órán át kevertettem, majd liofilizálás nélkül szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. A tiszta anyagot tartalmazó frakciókat rotációs vákuumbepárlóval egy lombikban szárazra pároltam, majd ezeket használtam fel a daunomicinhez való konjugációra.

Az alkalmazott oszlop: Phenomenex Jupiter C18, 10 μm Proteo 90 Å

Az alkalmazott gradiens:

0. perc	0% B
10. perc	0% B
15. perc	35% B
50. perc	90% B

A tiszta peptideket szintén 0,2 M NH₄OAc pufferben oldottam, majd daunomicint adtam hozzájuk (5. táblázat). A reakció állandó kevertetés mellett szobahőmérsékleten egy éjszaka alatt lejátszódott. Nem minden alkalommal volt sikeres a reakció, ezért a pufferben való oldást követően 4 ekvivalens mennyiségű m-feniléndiamin-dihidroklorid katalizátort adagoltam az elegyhez, és csak azután adtam hozzá a daunomicint. A katalizátor alkalmazásával elég volt 3 órát kevertetni az elegyet, mert a reakció ennyi idő alatt is lejátszódott.

5. táblázat A konjugáláshoz felhasznált reagens mennyiségek

Felhasznált anyag	Moláris tömeg (g/mol)	Bemért mennyiség (mg)
Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH ₂	2081,51	10,0
Daunomicin	527,54	5,1
Aoa-LRRY-VYPPSP-HN ₂	1359,68	10,0
Daunomicin	527,54	7,8
Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH ₂	1547,87	10,0
Daunomicin	527,54	6,8
Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH ₂	1798,17	10,0
Daunomicin	527,54	5,9

A kapott termékeket szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam.

Az alkalmazott gradiens:

0. perc	2% B
5. perc	2% B
50. perc	90% B

A reakciók sikerességét analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem, azonosításuk tömegspektrométerrel történt. A tiszta konjugátumok analitikai RP-HPLC kromatogramjai és az ESI-MS spektrumjai a Függelékben találhatóak.

7. Összefoglalás

Szakdolgozat összefoglaló

Tüdőtumorra specifikus irányító peptidek szerkezet-hatás összefüggésének tanulmányozása peptid-hatóanyag konjugátumok segítségével

Hapka Nikoletta, kémia alapszakos hallgató

ELTE TTK Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

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

A célzott tumorterápia lényege, hogy a hatóanyagot olyan irányító molekulához kapcsolják, amely nagy szelektivitással képes a tumorsejteket felismerni, így a hozzájuk kapcsolt hatóanyag az egészséges sejtek és szövetek károsítása nélkül, csak a tumorsejteken fejt ki hatását.

Dolgozatom célja egy fág könyvtárból kiválasztott tüdőtumorra specifikus peptid (WPLHTSVYPPSP) és analógjainak előállítása és azok tumorelles hatóanyaggal való konjugálása volt. Munkám során szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő ezeket a peptideket, meghosszabbítva a láncokat egy Katepszin B enzimlabilis spacerrel. A peptidek *N*-terminálisára izopropilidén védett aminooxiacetsavat építettem, annak érdekében, hogy a daunomicin tumorelles hatóanyagot oxim-kötéssel tudjam hozzákapcsolni a peptidekhez. Az így előállított konjugátumokat (Dau=Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH₂, Dau=Aoa-LRRY-VYPPSP-NH₂, Dau=Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH₂, Dau=Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH₂) fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztítottam, gradiens elúcióval. A tiszta konjugátumok tisztaságát analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem, majd tömegspektrometriás módszerrel azonosítottuk.

További vizsgálatként tervezzük az így előállított négy konjugátumnak az *in vitro* citosztázis vizsgálatát valamint a szerkezet optimalizálását más aminosavak beépítésével.

Summary

Structure-activity relationship study of lung specific homing peptides using peptide-drug conjugates

Nikoletta Hapka, 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 PhD, DSc** Research Professor
MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry

Targeted tumor therapy is based on drug conjugates that can recognize tumor cells with high selectivity, therefore the associated drug can act only on tumor cells without damaging healthy cells and tissues.

The aim of my thesis was to prepare a peptide conjugates based on WPLHTSVYPPSP peptide selected from a phage library for lung cancer and their conjugates with antitumor agent. During my work, these peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis, extending the chains with a cathepsin B enzyme-labile spacer. Isopropylidene protected aminooxyacetic acid was attached to the *N*-terminus of the peptides in order to bind daunomycin as anti-tumor drug to the peptides via oxime linkage. The conjugates produced (Dau=Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH₂, Dau=Aoa-LRRY-VYPPSP-NH₂, Dau=Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH₂, Dau=Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH₂) were purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using gradient elution. The purity of the conjugates was checked by analytical HPLC and then identified by mass spectrometry.

In the future *in vitro* cytostasis study of the conjugates will be investigated and their structure will be further optimized.

8. Rövidítésjegyzék

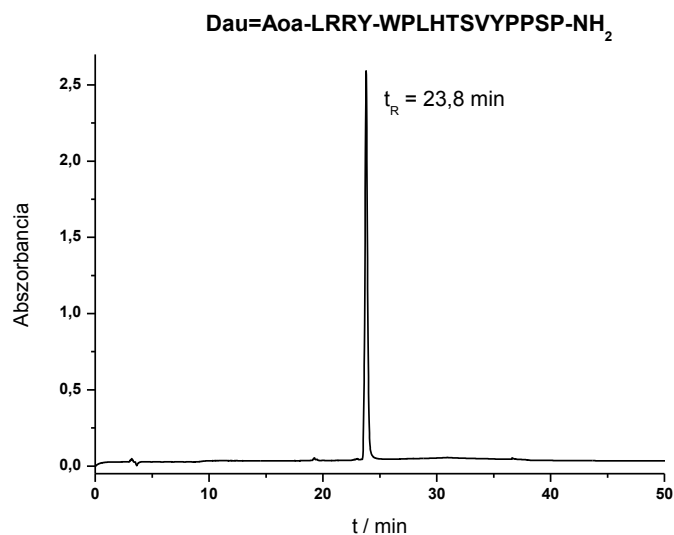
Boc	<i>tert</i> -butoxikarbonil
Bzl	benzil
Dau	daunomicin
DBU	1,8-diazabiciklo[5,4,0]-undek-7-én
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid
DCU	<i>N,N'</i> -diciklohexilurea
DCM	diklórmétán
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropil-karbodiimid
DIU	<i>N,N'</i> -diizopropilurea
DIEA	<i>N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
ESI-MS	elektrospray-ionizációs tömegspektrométer
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
KCN	kálium-cianid
MBHA	4-metil-benzhidril-amin
NH ₄ OAc	ammónium-acetát
NMP	<i>N</i> -metil-pirrolidon
Rink Amid MBHA	[4-(2,4-dimetoxi-fenil-aminometil)- fenoxiacetamido-norleucil-MBHA]
RP-HPLC	fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis
^t Bu	<i>tert</i> -butil
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropil-szilán
Wang	4-alkoxibenzilalkohol

Az aminosavak rövidítésére az IUPAC által elfogadott 1 és 3 betűs rövidítéseket használtam.

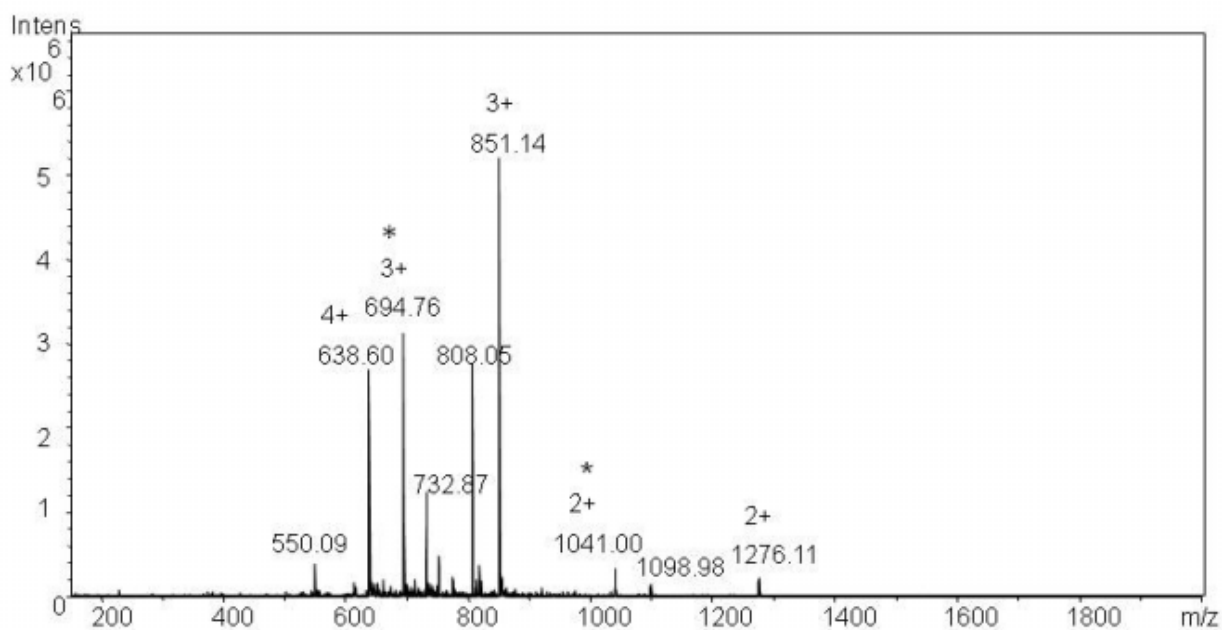
9. Függelék

Kromatogrammok és spektrumok

Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Trp-Pro-Leu-His-Thr-Ser-Val-Tyr-Pro-Pro-Ser-Pro-NH₂



1. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH₂ analitikai RP-HPLC-vel felvett kromatogramja



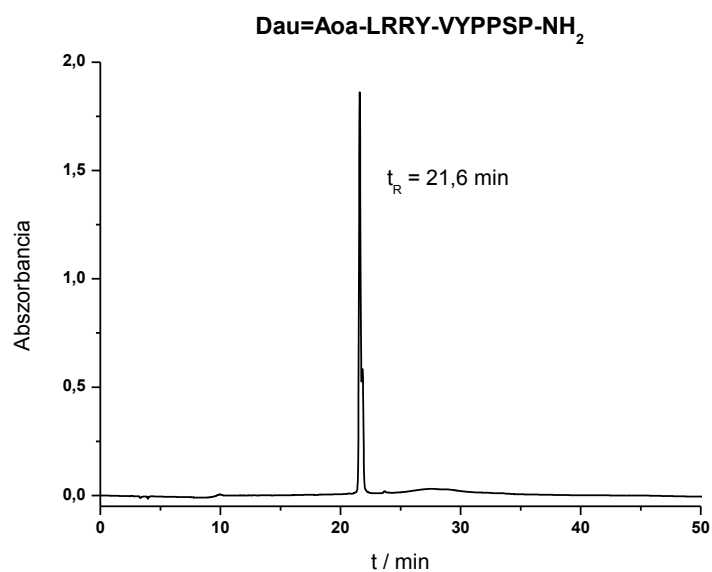
2. ábra A Dau=Aoa-LRRY-WPLHTSVYPPSP-NH₂ MS spektrumja

A molekula várt tömege: [M+H]⁺: 2549,78 Da

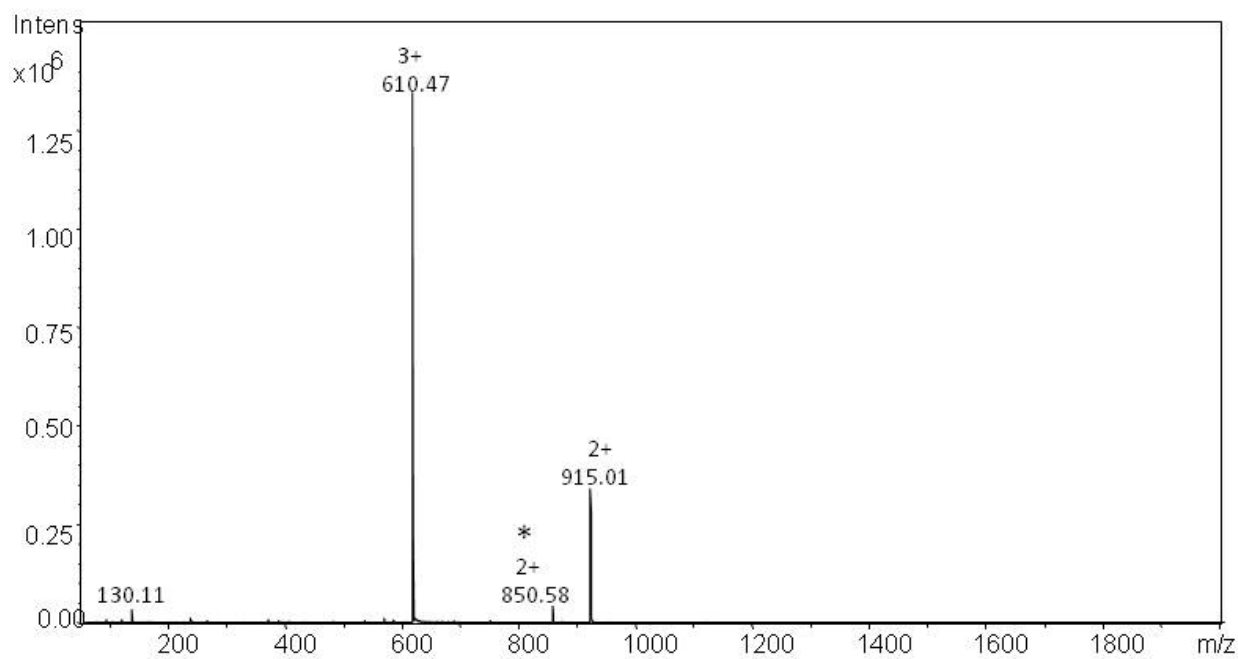
mért tömege: [M+H]⁺: 2550,21 Da

mért tömege: M+H]⁺: 2079,98 Da (kiindulási peptid) (*)

Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Val-Tyr-Pro-Pro-Ser-Pro-NH₂



3. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-VYPPSP-NH₂ analitikai RP-HPLC-vel felvett kromatogramja



4. ábra A Dau=Aoa-LRRY-VYPPSP-NH₂ MS spektruma

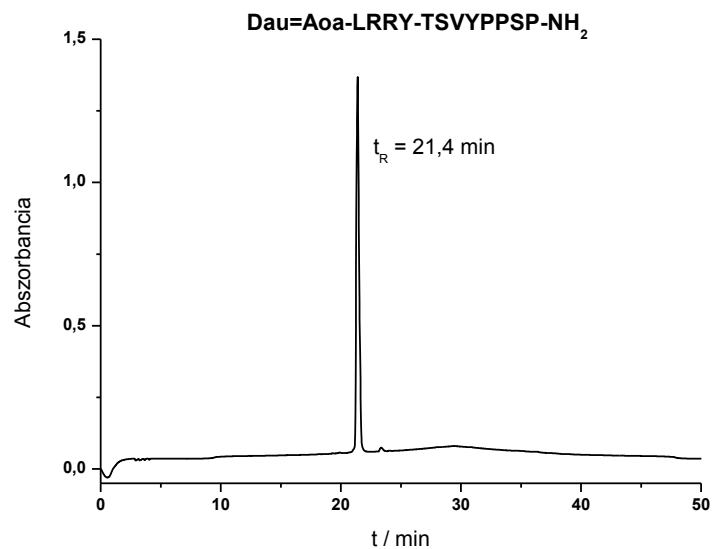
A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 1828,43 Da

mért tömege: $[M+H]^+$: 1827,99 Da

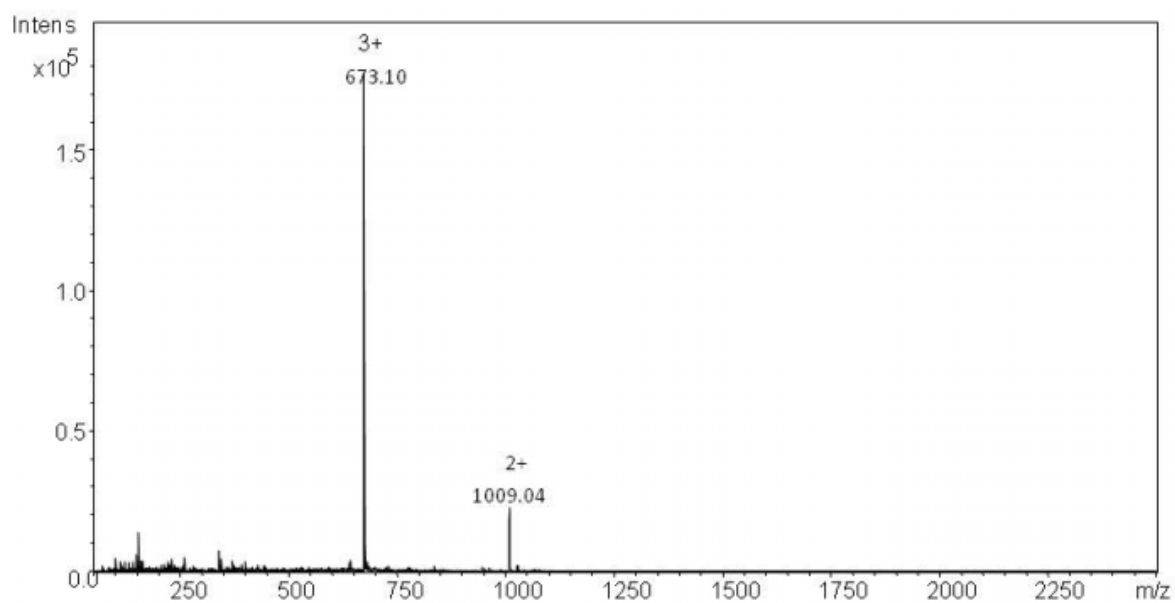
mért tömeg: $[M+H]^+$: 1698,33 Da (M-129 g/mol) (*)

A tömegspektrométerben leszakadt a mérés során a daunomicin aminocukor részlete.

Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Thr-Ser-Val-Tyr-Pro-Pro-Ser-Pro-NH₂



5. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH₂ analitikai RP-HPLC-vel felvett kromatogramja

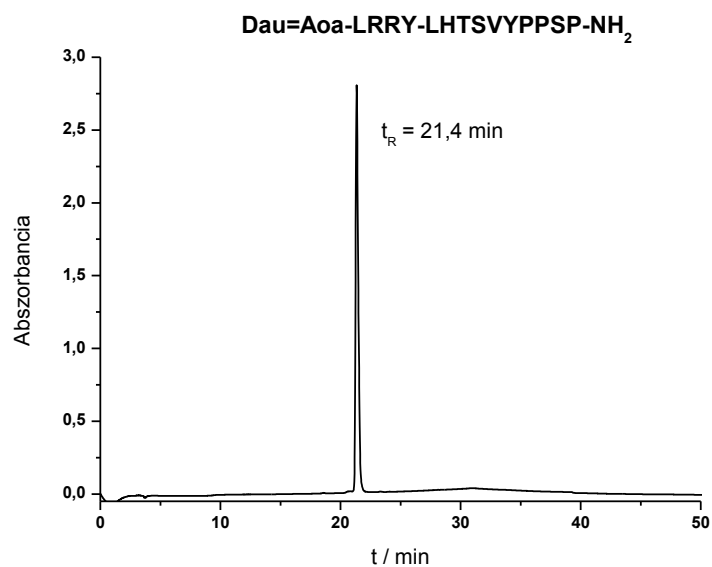


6. ábra A Dau=Aoa-LRRY-TSVYPPSP-NH₂ MS spektruma

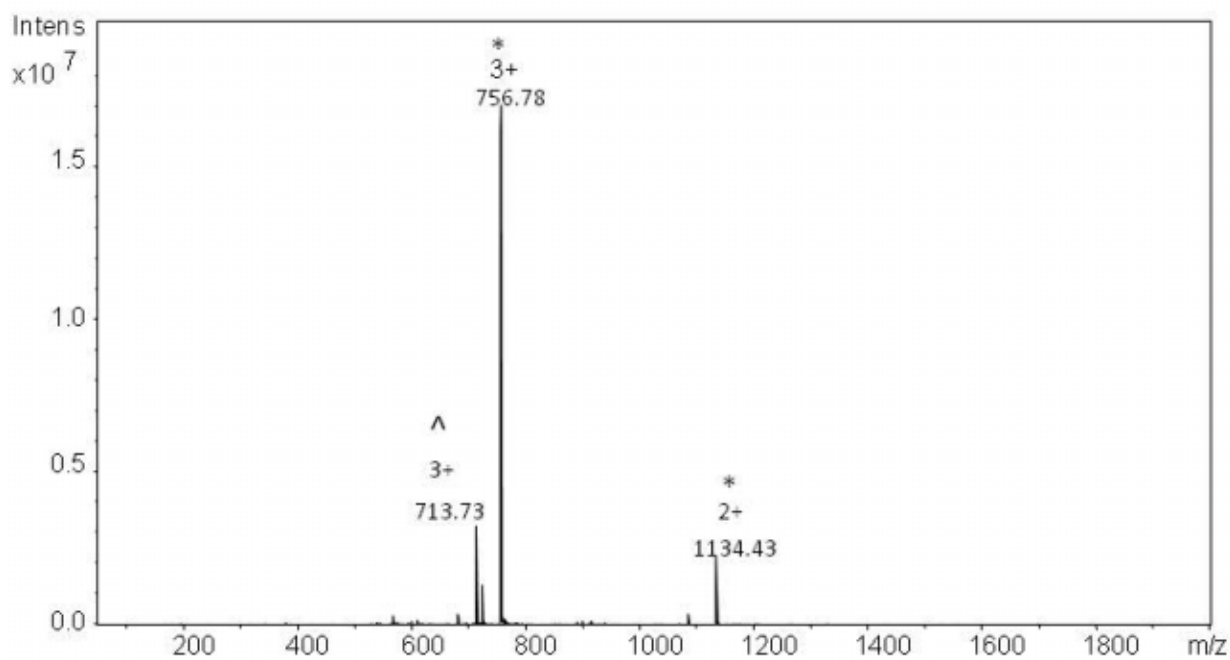
A molekula várt tömege: [M+H]⁺: 2017,22 Da

mért tömege: [M+H]⁺: 2016,51 Da

Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-Leu-His-Thr-Ser-Val-Tyr-Pro-Pro-Ser-Pro-NH₂



7. ábra A tiszta Dau=Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH₂ analitikai RP-HPLC-vel felvett kromatogramja



8. ábra A Dau=Aoa-LRRY-LHTSVYPPSP-NH₂ MS spektrumja

A molekula várt tömege: $[M+H]^+$: 2266,65 Da

mért tömege: $[M+H]^+$: 2266,84 Da (*)

mért tömeg: $[M+H]^+$: 2137,99 Da (M-129 g/mol) (^)

A tömegspektrométerben leszakadt a mérés során a daunomicin aminocukor részlete.

10. Irodalomjegyzék

- [1] https://www.ksh.hu/statszemle_archive/2012/2012_06/2012_06_544.pdf
- [2] <http://www.matud.iif.hu>
- [3] <http://www.daganatok.hu>
- [4] <http://molekularis-diagnosztika.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] Hortobágyi G. N., Anthracyclines in the treatment of cancer, *Drugs*, **1997**; 54, 1-7.
- [8] Gyires K., Fürst Zs., Farmakológia – farmakológia és farmakoterápia I., Medicina Könyvkiadó, Budapest, **2007**., 965-968.
- [9] Mező G., Manea M., Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2010**; 7, 79-96.
- [10] Flanagan P. A., Duncan R., Šubr V., Ulbrich K., Kopečková P., Kopeček J., Evaluation of protein-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer conjugates as targetable drug-carriers. 2. Body distribution of conjugates containing transferrin receptor antibody or anti-Thy 1.2 antibody and effectiveness of transferrin-containing daunomicin conjugates against mouse L1210 leukemia in vivo, *J. Contr. Rel.*, **1992**; 18, 25-37.
- [11] Szabó, I., Manea, M., Orbán, E., Csámpai, A., Bösze, Sz., Szabó, R., Tejeda, M., Gaál, D., Kapuvári, B., Radnai, L., Pryzbylski, M., Hudecz, F., Mező, G.: Development of an oxime bond containing daunorubicin-gonadotropin-releasing-hormone-III conjugate as a potential multivalent anticancer drug. *Bioconjugate Chemistry*, **2009**, 20, 656-665.
- [12] Mező G., Hegedüs R., Szabó I., Célzott rákgyógyítás, *Természet Világa*, **2012**., 143, 448-451.
- [13] Dharap S. S., Wang Y., Chandna P., Khandare J. J., Qiu B., Gunaseelan S., Sinko P. J., Stein S., Farmanfarman A., Minko T., Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide, *PNAS*, **2005**; 12, 12962–12967.
- [14] Lee TY., Lin CT., Kuo SY., Chang DK., Wu HC., Peptide-Mediated Targeting to Tumor Blood Vessels of Lung Cancer for Drug Delivery. *Cancer Res*, **2007**; 67, 10958-10965.

- [15] Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**; 85, 2149-2154.
- [16] Lloyd-Williams P., Albericio F., Giralt E., Convergent solid-phase peptide synthesis, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**; 37, 58–60.
- [17] 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.
- [18] Merrifield R. B., Life During a Golden Age of Peptide Chemistry, **1993**; (J. I. Seeman, Ed.) ACS, Washington, D.C.
- [19] Gregory A. G., Synthetic Peptides – A User’s Guide, W. H. Freeman and Company, **1992**.
- [20] 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.
- [21] Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger, C. D., Olser D. B., Color test for terminal propyl residues in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Chim. Acta*, **1980**; 118, 149-151.