

Tumor célzásra alkalmas módosított fág- bemutató peptid-daunomicin konjugátumok szintézise

Szakdolgozat
Kémia Alapszak

KAPOSVÖLGYI ANNA MÁRTA

Dr. Dókus Endre Levente

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest
Természettudományi Kar
Kémiai Intézet
Szerves Kémiai Tanszék
2019

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Dókus Endre Levente tudományos segédmunkatársnak (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport), akinek a segítségére mindig számíthattam a gyakorlati munkám és a szakdolgozatom írása során. Köszönöm, hogy idejét szánta rám, lehetőséget adott e munka elvégzésére és természetesen azt is, hogy elvégezte a munkámhoz szükséges ESI-MS méréseket.

Köszönettel tartozom Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak, amiért lehetővé tette munkámat az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban.

Köszönetemet szeretném kifejezni a labor illetve a kutatócsoport tagjainak, akik hozzájárultak ahhoz, hogy a gyakorlati munkámat egy kellemes, nyugodt környezetben végezhettem.

Köszönetet szeretnék mondani, hogy munkámat az NVKP_16-1- 2016-0036 pályázat keretében folytathattam.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás.....	2
Tartalomjegyzék	3
Rövidítésjegyzék.....	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. Rákbetegségek főbb kezelési módszerei	8
2.2. Kemoterápia	8
2.2.1. Kemoterápiás hatóanyagok	9
2.2.2. Daunomicin (daunorubicin)	9
2.3. Célzott tumorterápia	11
2.3.1. Irányító peptidek	11
2.3.2. Fág bemutatásos peptidek (fág-display technika)	12
2.3.3. A hatóanyag és az irányító peptid összekapcsolása	12
2.3.4. A célzott tumorterápiás konjugátumok részei	15
2.4. Szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS)	16
2.4.1. A szilárd fázisú peptidszintézis menete	16
2.4.2. A gyantával kapcsolatos követelmények	17
2.4.3. A szilárd fázisú peptidszintézis leggyakrabban alkalmazott stratégiái	19
2.4.4. Ninhidrin teszt	22
3. Céltitűzés	24
4. Kísérleti rész	25
4.1. A peptidek szintézise	25
4.1.1. A peptidszintézis általános menete	25
4.1.2. Az <i>Aoa</i> -KSKAAKN- <i>OH</i> , <i>Aoa</i> -GFLG-KSKAAKN- <i>OH</i> , és az <i>Aoa</i> -GFLG-K(<i>Aoa</i> -GFLG)SKAAKN- <i>OH</i> peptidszármazékok szintézise	27
4.1.3. Az <i>Aoa</i> -GFLG-K(<i>Aoa</i>)SKAAKN- <i>OH</i> peptidszármazék szintézise	30
4.2. Az izopropilidén védőcsoport hasítása, és a daunomicinnel való konjugálás	31
4.2.1. Izopropilidén védőcsoport hasítása	31
4.2.2. A peptidszármazékok konjugálása daunomicinnel	32
4.3. A peptidszármazékok és a konjugátumok tisztítása	32
4.3.1. Az izopropilidén hasított peptidszármazékok tisztítása	32
4.3.2. A konjugátumok tisztítása	33

4.4. Az előállított peptidszármazékok és konjugátumok analitikai jellemzése	33
4.4.1. Tömegspektrometriás vizsgálatok	33
4.4.2. A konjugátumok tisztaságának jellemzése	34
5. Eredmények	35
5.1. Az aminooxiecetsavat tartalmazó peptidszármazékok előállítása és tisztítása	35
5.2. Az aminooxiecetsavat tartalmazó peptidszármazékok tömegspektrometriás vizsgálata	35
5.3. A daunomicin konjugátumok előállítása és tisztítása	36
5.4. A konjugátumok tömegspektrometriai vizsgálata	36
5.5. A konjugátumok vizsgálata analitikai RP-HPLC-vel	36
5.6. Az elkészült konjugátumok tömege	38
Szakdolgozat összefoglaló	39
Summary	40
Hivatkozások	41

Rövidítésjegyzék

A, Ala	Alanin
Aoa	Aminooxiecetsav
Boc	<i>Terc</i> -butil-oxikarbonil
Bzl	Benzil
C, Cys	Cisztein
CPG	Controlled Pore Glass (Kontrollált pórusú üveg)
Dau	Daunomicin (Daunorubicin)
DBU	1,8-diazabiciklo(5,4,0)undec-7-én
DCM	Diklórmétán
DIC	Diizopropil-karbodiimid
DIEA	Diizopropil-etilamin
DMAP	4-dimetilamino-piridin
DMF	Dimetilformamid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
Dts	Ditioszukcinil
DVB	Divinil-benzol
ekv.	Ekvivalens
ESI	Electrospray Ionization (Elektroporlasztásos ionizáció)
F, Phe	Fenil-alanin
Fmoc	9-fluorenil-metil-oxikarbonil
G, Gly	Glicin
HMPA	4-(hidroxi-metil)-fenoxi-ecetsav
HOBt	1-hidroxibenztriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)
ip	Izopropilidén

K, Lys	Lizin
L, Leu	Leucin
MS	Mass Spectrometry (Tömegspektrometria)
Mtt	4-metiltritol-
N, Asn	Aszparagin
NH ₄ OAc	Ammónium-acetát
Nps	<i>o</i> -nitrofenil-szulfenil
PAL	Peptid amid linker
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PEG	Polietilén-glikol
PEGA	Polietilén-glikol /dimetil-akrilamid kopolimert
PHB	4-hidroxibenzil-alkohol
PS	Polisztirol
RNS	Ribonukleinsav
RP	Reversed-Phase (Fordított fázisú)
S, Ser	Szerin
SPPS	Szilárd fázisú peptidszintézis
^t Bu	Tercier-butil-
TEA	Trietil-amin
TFA	Trifluorecetsav
TFMSA	Trifluor-metánszulfonsav
TIS	Triizopropil-szilán
Trt	Tritil-

1. Bevezetés

A rákbetegségek világszerte a vezető halálokok között szerepelnek. Az utóbbi években a rákos betegek számának szignifikáns növekedése figyelhető meg. Globálisan 18,1 millió új beteget regisztráltak, és 9,6 millióan veszítették életüket daganatos betegségek miatt 2018-ban. A leggyakoribb rákos betegségek a tüdőrák, a női mellrák, és a végbélrák. A legtöbb halálesetet a tüdőrák okozza, ezt követi a végbélrák, a gyomorrák és a májrák [1].

A rákos elváltozások kezelése ma is nagy kihívást jelent az orvostudomány számára. A rákos betegségek rendkívül sokrétűek lehetnek, éppen ezért nem létezik olyan általános kezelési mód, amellyel mindegyiket lehetne gyógyítani. A leggyakrabban alkalmazott kezelések, mint a sugárterápia és a sebészeti beavatkozás csak azokban az esetekben igazán hatékonyak, melyekben a rák még kezdeti stádiumban van, és a rákos sejtek még egyetlen helyre koncentrálódnak, nem képeztek metasztázisokat. A kemoterápia a daganatos betegségek gyógyszerekkel történő kezelése. Legfőbb hátránya, hogy számos súlyos mellékhatással rendelkezik, mert az alkalmazott antitumor gyógyszerek nem csak a rákos sejtekre képesek kifejteni citotoxikus hatásukat.

A célzott tumorterápia új lehetőségeket nyithat meg a rákos betegségek kezelésben. Lényege, hogy a hatóanyagot egy megfelelő hordozó segítségével szelektíven a rákos sejtekbe juttatjuk, ezáltal drasztikusan csökkenthető a mellékhatások súlyossága, illetve növelhető a hatóanyag terápiai indexe. Szaklaboratóriumi munkám során olyan peptid-daunomicin konjugátumokat állítottam elő, melyek alkalmasak lehetnek daganatos sejtek célzott tumorterápiás kezelésére.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Rákbetegségek főbb kezelési módszerei

Napjainkban a rákbetegségek legjellemzőbb kezelési módszerei a sebészeti beavatkozás, a sugárterápia és a kemoterápia, de számos egyéb módszer is létezik, mint például az immunterápia [2], az őssejt-terápia [3] vagy a bioterápia [4]. Sok esetben több módszert együttesen alkalmaznak a kezelésnél. Az, hogy milyen terápiát alkalmaznak a betegség kezelésénél egyénenként függhet a betegektől, a rák típusától és a rák kiterjedésétől. Abban az esetben ha a daganat még nem terjedt rá más szervekre, nem képzett áttéteket, és a daganat olyan helyen van ahol műtéti úton hozzáférhető, akkor leggyakrabban sebészeti úton kimetszik a daganatot a környező szövet egy részével együtt. A sebészeti beavatkozás gyakran egyedül is elegendő gyógyuláshoz vezető módszer. Számos esetben kiterjedt tumorok kezelése esetén is alkalmazzák, ilyenkor a cél a rákos sejtek mennyiségének csökkentése. A sugárterápia használható a rákos sejtek elpusztítására, vagy lassítható vele a daganat növekedése. Leghatékonyabban ez a módszer is akkor alkalmazható, ha a rákos sejtek még csak egyetlen helyre koncentrálnak. A sugárterápia a kemoterápiához hasonlóan sajnos nem teljes mértékben szelektív módszer, azonban a rákos sejtek érzékenyebbek a besugárzás hatására, mint az egészséges sejtek, akárcsak a kemoterápiás szerek alkalmazásakor.

2.2. Kemoterápia

A kemoterápia során a betegeket antitumor hatású gyógyszerekkel kezelik. A hatóanyagok gátolják a rákos sejtek szaporodását, vagy el is pusztítják azokat. A hatóanyagot legtöbbször intravénásan juttatják a szervezetbe, de fecskendezhetik a bőr alá vagy az izomzatba, illetve léteznek szájon át bevehető kapszulák és tabletták is. A kemoterápia előnye, hogy olyan esetekben is alkalmazható, amelyeknél a rákos sejtek szétterjedtek a szervezetben és nem egyetlen helyre koncentrálnak. Gyakran a sebészeti beavatkozás vagy a sugárterápia kiegészítő kezelésekként alkalmazzák. Kemoterápiát alkalmazhatnak a rák teljes megszüntetése céljából, de sok esetben a beteg élethosszának növelése, vagy életminőségének javítása a cél. A kemoterápiában használt hatóanyagok nem csak a rákos sejteket károsítják, az egészséges sejtekre is káros hatással lehetnek, így számos súlyos mellékhatása lehet ezeknek a kezeléseknak, melyek fennállhatnak a kezelés alatt, és kialakulhatnak a kezelés után is.

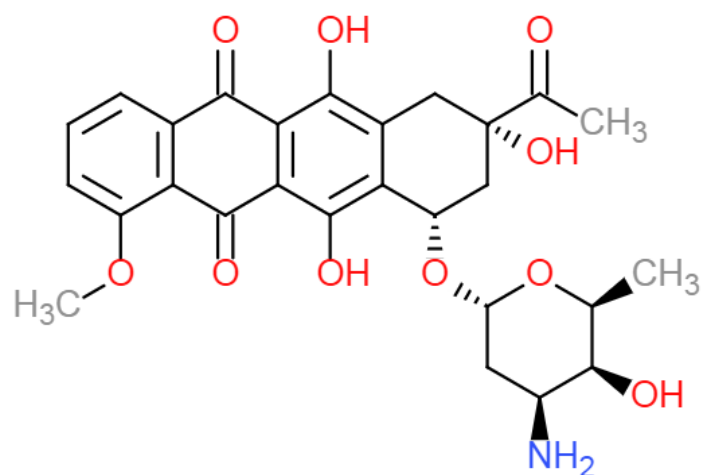
2.2.1. Kemoterápiás hatóanyagok

A kemoterápia során használt hatóanyagokat főként a hatásmechanizmusuk alapján szokták csoportosítani. Ennek megfelelően alkilezőszereket, antibiotikumokat, antimetabolitokat, topoizomeráz inhibitorokat, mitózis inhibitorokat, és egyéb típusú hatóanyagokat különböztetünk meg [5].

- Az alkilezőszerek keresztkötéseket képesek létrehozni (interkaláció) a DNS szálai között, ezzel károsítva a DNS-t. (pl. ciklofoszfamid, ciszplatin, karboplatin)
- Az antimetabolitok akadályozzák a sejtek anyagcseréjét, vagy a DNS szintézisét elősegítő enzimek működését gátolják. (pl.: gemcitabin, merkaptopurin)
- A topoizomeráz inhibitorok gátolják a topoizomeráz I és II enzimek működését, amely a DNS sérülését okozza. (pl.: topotekán, irinotekán)
- A mitózis inhibitorok gátolják a rákos sejtek osztódását. (pl.: paklitaxel, vinblasztin)
- A különböző antibiotikumok hatásmechanizmusa eltérő lehet. Néhány antibiotikum alkilálószerként viselkedik, és léteznek olyanok is, amelyek a topoizomeráz II működését gátolják, vagy interkalációt tudnak létrehozni a DNS szálai között. (pl.: mitomicin, doxorubicin, daunomicin)

2.2.2. Daunomicin (daunorubicin)

A daunomicin, vagy más néven daunorubicin, az antraciklinek családjába tartozó antibiotikum. Az antraciklinek közül elsőként a daunomicint fedezték fel, melyet a *Steroptomyces peucetius* baktériumból izoláltak. A különböző antraciklineket, mint például a daunomicint, doxorubicint, epirubicint erős citotoxicitásuknak köszönhetően különböző daganatos betegségek kemoterápiás kezelésére alkalmazzák [6]. A daunomicint elsősorban akut leukémia, és különböző szarkómák [7] kezelésére használják, a véráramba történő injektálással [8].



1. Ábra: A daunomicin szerkezeti képlete

A daunomicin szerkezete az 1. ábrán látható. A daunomicin egyik részét egy többszörösen szubsztituált tetraciklusos gyűrűrendszer képezi, és ehhez kapcsolódik egy L-daunózamin nevű cukorrész.

A daunomicin hatását a sejtmagon belül fejti ki. Gátolja az RNS és a DNS szintézisét [9], és ez által a sejt életfolyamatait és osztódását. A hatásmechanizmusban szerepet játszik a szabad gyökképződés, gátolja a topoizimeráz II enzim működését, és ez által a DNS sérülését okozza, továbbá a daunomicin adduktot tud képezni a DNS szálaival, amely eredményeképp interkaláció jön létre a DNS szálai között, károsítva ezzel a DNS-t [10].

A daunomicin, mint minden kemoterápiás hatóanyag, számos súlyos mellékhatással rendelkezik. A daunomicinre ugyan a rákos sejtek érzékenyebbek mint az egészségesek, de a hatása nem teljesen szelektív, ezért képes károsítani az egészséges sejteket is. A legjellemzőbb mellékhatásai a csontvelőritkulás és a kardiotoxicitás. Ezen kívül a daunomicin károsíthatja a nyálkahártyát, szájgyulladást, lázat, hányást, hasmenést, hasfájást, fejfájást és hajhullást okozhat. A fejbőrön kiütések jelenhetnek meg, az injekálás helyén pedig csalánkiütés keletkezhet, illetve a legtöbb antibiotikumhoz hasonlóan gyengíti az immunrendszert. Néhány esetben a pácienseknél hiperszenzitív reakciót is megfigyeltek a daunomicinre [11] [12] [13].

Az antraciklinek legsajátosabb mellékhatása a kardiotoxicitás, amely akár végzetes is lehet, így nagymértékben korlátozza ezen anyagok használatát [8]. Megfigyelték, hogy a kardiotoxicitás dózisfüggő, ezért a kemoterápiás kezeléseket inkább időszakosan alkalmazzák a betegeknél, és nem pedig mindennaposan. A kardiotoxicitás gyakrabban fordul elő a nőknél,

az időseknél, a magas testsúllyal rendelkező betegeknél, a cukorbetegyeknél, a magas vérnyomásban szenvedőknél, illetve olyan pácienseknél, akiknél sugárterápiát, vagy más kemoterápiás szert is alkalmaztak [14]. Ezen kívül a kardiotoxicitás nagyon gyakran fordul elő a daunomicinnel kezelt gyerekeknél [7] és akár évekkel a kezelés után is kialakulhat [15] [16].

2.3. Célzott tumorterápia

Ha az antitumor hatóanyagot sikerül a szervezetben szelektíven a tumorsejtekbe juttatni, azzal egyrészt drasztikusan csökken a kialakuló mellékhatások súlyossága, másrészt éppen ezért növelhető a tumorelles hatóanyag alkalmazott mennyisége és a kezelés időtartama. Ehhez a daunomicint egy olyan hordozóhoz kötjük, mellyel együtt a szervezet más egészséges részein áthaladva stabil marad, az egészséges sejtekbe nem jut be, és nem tud felszabadulni belőle a hatóanyag, így nem tud nem kívánt mellékhatást kifejteni az egészséges sejtekre. A cél tehát olyan hatóanyagok előállítása, melyek a szervezet biológiai környezetében stabilak, egészséges sejtekre nincsenek hatással, így szelektív citotoxikus hatással bírnak a rákos sejtekre nézve.

Ahhoz, hogy a hatóanyag-felszabadulást szabályozni lehessen, a daunomicint egy olyan célzó részhez konjugáljuk, amely felismeri a tumorsejteket azáltal, hogy szelektíven képes kötődni azokhoz. A célzott tumorterápiában azt használjuk ki, hogy a rákos sejtek különböznek a normális sejtektől. A rákos sejtek felszínén olyan receptorok vagy fehérjék találhatóak nagy mennyiségben, amelyek az egészséges sejteken nem, vagy csak kisebb mennyiségben fordulnak elő. Egy ilyen kiválasztott receptort, vagy felszíni fehérjét érdemes tehát megcélzni egy irányító szegmenssel, amely a hatóanyaghoz van kapcsolva. Az irányító résznek specifikusan kell tudnia kapcsolódni a kiválasztott receptorhoz a célzó peptid-hatóanyag konjugátum internalizációját kiváltva [17].

2.3.1. Irányító peptidek

Irányító hordozóanyagnak alkalmasak lehetnek például az antitestek, a poliszaharidok, a lektinek, a DNS, a folsav, a hialuronsav, vagy a peptidek [18] [19] [20]. Ezek közül a munkám során peptid típusú irányító molekulákkal foglalkoztam. Számos különböző peptid alkalmazható irányító hordozóként, amelyek között léteznek lineárisak és ciklusosak is. A peptidek használata azért is lehet jó választás, mert a peptidszekvenciák széles körben választhatók ki a kívánt fizikai-kémiai tulajdonságok alapján, mint például az oldhatóság, a

stabilitás, az össz-töltés, vagy például a megfelelő funkciós csoport alapján, ami a konjugációhoz szükséges [17].

Ha a kiválasztott receptorokat egy olyan peptiddel célozzuk meg, amely a daunomicinhez (vagy más hatóanyaghoz) van konjugálva, akkor a hatóanyag specifikusan juttatható a rákos sejtekbe [19]. A rákos sejtekben így nagyobb lesz a daunomicin koncentrációja, és javarészt elkerülhetjük az egészséges sejtek károsítását.

2.3.2. Fág bemutatásos peptidek (fág-display technika)

A fág bemutatás-technika lehetőséget nyújt arra, hogy azonosítsunk olyan peptideket, amelyek egy adott sejttípus felszíni fehérjéihez képesek kötni [21]. A technika segítségével szolgálhat olyan peptidek felkutatásában, amelyek alkalmasak lehetnek hatóanyagok irányított célba juttatására. Egy ilyen fág könyvtárból azonosított peptid például a CKAAKN is. Ezt a peptidet az alapján választották ki, hogy specifikusan tud kötődni a hasnyálmirigy tumorsejtekhez, mivel a WNT-2 mimikálására képes, ezért irányító szekvenciaként alkalmazható a hasnyálmirigyrák (PDAC) sejtek kezelésénél [22] [23] [24] [25].

A munkám során olyan peptid-daunomicin konjugátumokat készítettem, amelyeknél egy beépített SKAAKN szekvencia tölti be az irányító szerepet. A kiválasztott CKAAKN peptidet úgy módosítottuk, hogy a benne lévő ciszteint egy szerinre cseréltük. Erre azért volt szükség, mert oxidáció révén diszulfid híd keletkezhet két cisztein között, akár a konjugátum dimerizációját okozva. A szerin hidroxil-csoportot tartalmazó oldallánca ebből adódóan előnyösebb választás, mivel stabilabb a peptidszintézis és a konjugáció körülményei között, illetve a citotoxicitás vizsgálatok során a biológiai mátrixban. Az aminosav cseréje várhatóan kevésbé befolyásolja a peptid irányító képességét.

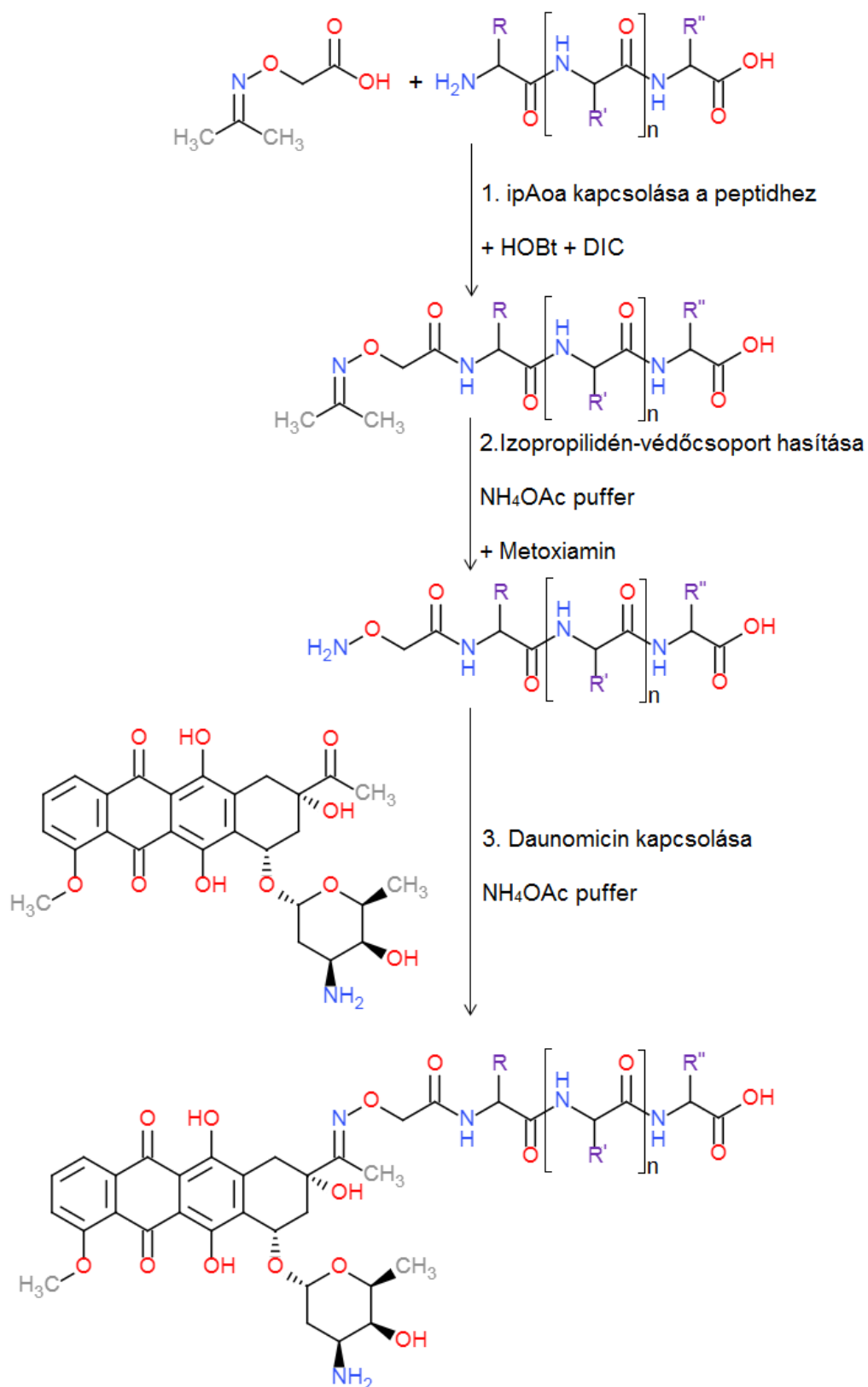
2.3.3. A hatóanyag és az irányító peptid összekapcsolása

Fontos, hogy a hatóanyag ne tudjon felszabadulni a konjugátumból, amíg el nem éri a tumorsejteket. A hatóanyag és az irányító peptid között olyan kapcsolatot kell biztosítani, amely megfelelő kémiai stabilitással bír, és stabil a véráram, valamint biológiai mátrix környezetében. Ehhez úgynevezett linkereket használunk, melyeket úgy választanak ki vagy terveznek meg, hogy azok és a peptid, illetve a hatóanyag közötti kötés stabil legyen a szervezetben. A konjugátum sejtbe jutását követően a linker elbomlásával felszabadul a hatóanyag, vagy a konjugátum aktív metabolitokra való hasadásával citotoxikus hatású vegyület(ek) generálódnak. A metabolitok egy vagy több aminosavat, valamint a linkeren

keresztül konjugált hatóanyagot tartalmazzák, de nem gátolják annak citotoxikus hatását. A hatóanyag felszabadulás így közvetlenül a rákos sejtekben történik. A linkerek kiválasztásánál figyelembe kell venni, hogy azok minél kevésbé befolyásolják a peptid receptorhoz való kötődését, illetve a citotoxikus anyag hatékonyságát [17]. Ilyen linker lehet például a hidrazon, amely a lizoszóma savas környezetének hatására hasad, a diszulfid linkerek, amelyek a tumor sejtekben hasadnak, illetve ilyenek lehetnek különböző peptidek is, amelyek enzimatikusan hidrolizálnak a lizoszómában [19].

A citotoxikus hatóanyagnak tartalmaznia kell legalább egy olyan funkciós csoportot, amelyen keresztül összeköthető az irányító elemmel. Az általam is használt daunomicinnel alapvetően oxim-, hidrazon- vagy amidkötés alakítható ki [20]. A hidrazon- és az oximkötést a daunomicin C-13-as szénén lévő oxocsoporttal alakítható ki, míg az amidkötés a daunomicin cukor részén lévő amidcsoporttal. A különböző kötéstípusokkal kapcsolt daunomicin konjugátumok közül az oximkötéssel keresztül kapcsoltak megfelelő aktivitást mutattak a rákos sejtekkel szemben, míg azok a konjugátumok, ahol az irányító peptid az L-daunozamin aminocsoportjához voltak konjugálva, elvesztették citotoxikus jellegüket [26].

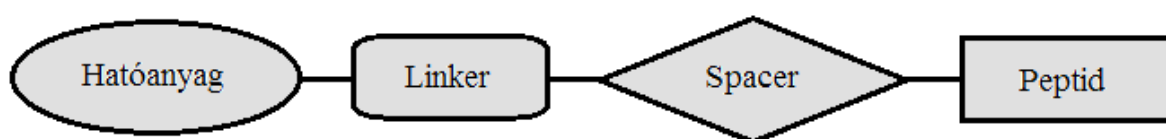
A munkám során olyan daunomicin-peptid konjugátumokat készítettem, amelyek peptid részletéhez linkerként funkcionáló aminosavakat kapcsoltam, amely oximkötés kialakítását teszi lehetővé a daunomicinnel. A aminosavakat izopropilidén védelemmel ellátva kapcsoltam a peptidhez. Az izopropilidén védőcsoportot a peptid gyantáról való hasítása után eltávolítottam, a daunomicin konjugálását pedig ezt követően végeztem el.



2. Ábra: ipAoa kapcsolása a peptidhez, izopropilidén védőcsoport hasítása, és daunomicin konjugálása

A linker és az irányító peptid közé egy spacer is beépíthető. A spacerok a rákos sejtek belsejében, például lizoszómájában lévő bontó enzimek (proteázok) hatására képesek hasadni, így segítve a célzott hatóanyag-felszabadulást. A -Gly-Phe-Leu-Gly- (GFLG) egy peptid típusú spacer, amely a katepszin B enzim hatására képes hidrolizálni. A katepszin B nagy mennyiségben van jelen a rákos sejtek lizoszómájában, és képes felismerni a GFLG peptidet [17] [19] [27]. A GFLG szekvenciát több általam készített konjugátumba is beépítettem, ahol spacer szerepet töltenek be.

2.3.4. A célzott tumorterápiás konjugátumok részei



3. Ábra: A célzott tumorterápiás konjugátumok sematikus felépítése

Összességében, a célzott tumorterápiára használt peptid-hatóanyag konjugátumok általánosságban három részből állhatnak: a citotoxikus hatóanyagból, amely elpusztítja a rákos sejteket (vagy legalábbis gátolja ezek szaporodását), az irányító elemből, amely specifikusan kötődik a rákos sejtek felszínén lévő receptorokhoz, és az ezeket összekötő ugyancsak peptid típusú spacerből, amely a rákos sejtek belsejében található enzimek hatására képes hasadni. Továbbá linker biztosítja a peptid és a hatóanyag összeköttetését.

2.4. Szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS)

A szilárd fázisú peptidszintézis módszerét Merrifield dolgozta ki 1963-ban. Az új technika forradalmi jelentőséggel bírt a peptidszintézis terén az azelőtt alkalmazott oldat fázisú szintézishez képest. Merrifield módszerénél a növekvő peptidlánc egy szilárd gyantához van kapcsolva kovalens kötéssel, az egyes újabb aminosavakat pedig lépésenként kapcsoljuk a láncához. Ez azért előnyös, mert ha a peptidlánc egy teljesen oldhatatlan fázishoz van kötve, akkor a reagensek illetve a melléktermékek könnyen eltávolíthatóak szűréssel és mosással. Ennek köszönhetően az oldat fázisú eljárással ellentétben nincs szükség az intermedier peptidek minden kapcsolási lépést követő izolálására, így az eljárás egyszerűbb, és lényegesen rövidebb időt vesz igénybe. További előnyei, hogy az összes reakció ugyanabban az egy edényben zajlik, és az eljárás könnyen automatizálható, mivel sok ismétlődő lépésből épül fel [28] [29].

Robert Bruce Merrifield 1984-ben a szilárdfázisú peptidszintézis kidolgozásáért kémiai Nobel-díjat kapott.

2.4.1. A szilárd fázisú peptidszintézis menete

A gyantához, illetve a növekvő peptidlánchoz olyan aminosav-származékokat kapcsolunk, melyeknek az α -aminocsoportja, illetve szükség esetén az oldallánca is védett. Ennek megfelelően a szabad karboxilcsoporton keresztül tudjuk majd kialakítani a kötést a már a szilárd hordozóhoz kapcsolt lánc részét képező aminosav aminocsoportjával.

Első lépésben egy alfa aminocsoportján és szükség szerint oldallánc-funkciós csoportján védett aminosav-származékot kapcsolunk egy funkcionizált felületű szilárd hordozóhoz. A kapcsolást egy linkerrel keresztül tudjuk létrehozni. Ezt követően el kell távolítanunk az aminosavról az N- α -védőcsoportot, szabaddá téve az aminocsoportot, amihez így hozzá tudjuk kapcsolni a következő védett aminosavat. A további α -N-védett aminosavakat többféleképpen is lehetséges kapcsolni. Az általam alkalmazott technika során *in situ* aktív észterre alakítottam a védett aminosavat HOBt segítségével, ami így reagálni tudott a láncvégi aminosav szabad α -aminocsoportjával. Más módszereknél az N- α -védett aminosavak aktiválása történhet például szimmetrikus anhidriddel, karbonsavaziddal, vagy karbodiimiddel.

Nem csak aminosav származékokat lehet egyesével kapcsolni a rendszerhez, hanem akár előre elkészített peptidek kapcsolása is lehetséges. Ezt nevezzük fragmentskondenzációnak [30]. Ez esetben természetesen olyan peptideket kell alkalmaznunk, melyek N és C-terminális vége, illetve oldalláncai is megfelelően védettek.

A kapcsolás-hasítás ciklust egészen addig ismételjük, amíg fel nem építjük a kívánt szekvenciát. Ezt követően a peptidet le kell hasítani a gyantáról. Az alkalmazott hasítószer (vagy hasítóelegy) azokat az oldallánc védőcsoportokat is eltávolítja, amelyek a szintézis során stabilak voltak az α -aminocsoportok védőcsoportjainak eltávolítására használt hasítószerrel szemben.

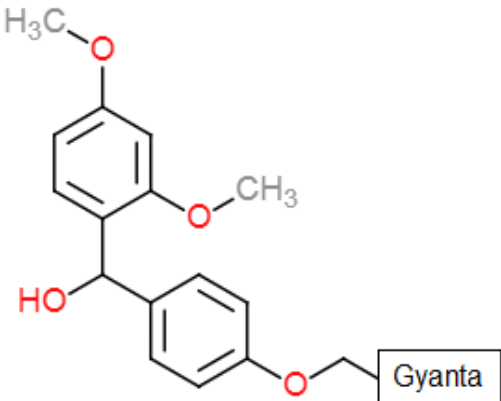
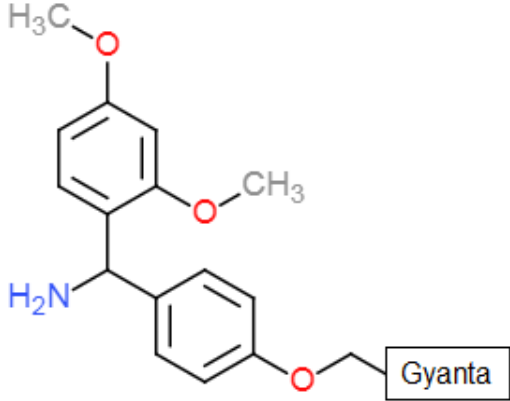
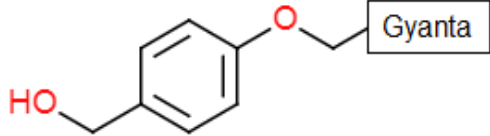
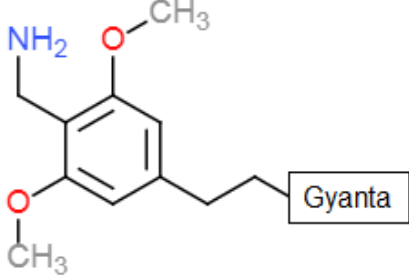
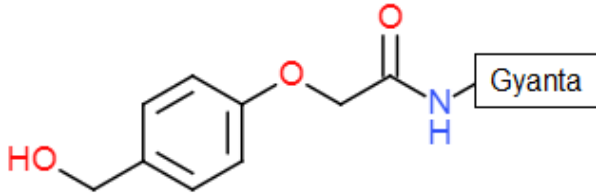
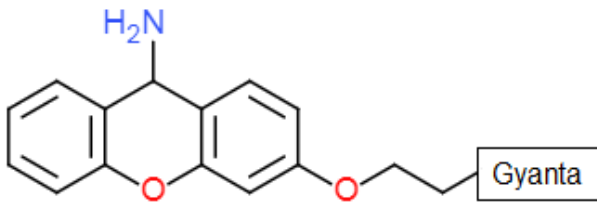
2.4.2. A gyantával kapcsolatos követelmények

A peptidszintézishez használt gyantára nézve fontos, hogy az stabil és oldhatatlan legyen minden felhasznált oldószerben. A porózus gél szerkezet lehetővé teszi, hogy a gyantát jól lehessen duzzasztani a felhasznált oldószerben, és hogy a reagensek könnyen át tudjanak hatolni a részek között, továbbá nagy hasznos felületet eredményez. Ezen kívül a gyantának tartalmaznia kell egy olyan funkciós csoportot is, amihez kovalensen lehet majd kötni az első aminosavat [29].

A peptid egy linkerén keresztül kapcsolódik a gyanta felületéhez. Ez a linker meghatározza a peptidszintézis és a gyantáról való hasítás szükséges körülményeit. A gyantán lévő linkerek kötődhetnek a C-terminális α -karboxilcsoporthoz, de léteznek amid linkerek is, amelyek a peptid N-terminális végéhez tudnak kapcsolódni. Ezekről a linkerekről tartalmaz néhány példát az *1. táblázat*. Éppen ezért a linkerek kiválasztásánál figyelembe kell venni, hogy milyen módszerrel szeretnénk végezni a peptidszintézist. A különböző stratégiák különböző típusú linkereket igényelnek, a megoldásokhoz sokféle gyanta és linker áll rendelkezésre. Szilárd hordozóként (gyantaként) legtöbbször polisztirol alapú kopolimereket használnak, például polisztirol / divinil-benzol (PS-DVB), vagy polisztirol / polietilén-glikol kopolimereket (PS-PEG), de alkalmaznak más típusú anyagokat is, például polietilén-glikol / dimetil-akrilamid kopolimert (PEGA), vagy kontrollált pórusú üveget (CPG) [31]. A különböző gyanták legtöbbször már a linkerrel funkcionálizálva elérhetőek.

A munkám során a peptidszintézishez Wang-gyantát használtam. A Wang gyanta 4-hidroxibenzil-alkohol (PHB) linkereket tartalmazó polisztirol és poli-1,4-divinilbenzol

kopolimere. A peptid ehhez a linkerhez a C terminálison lévő karboxilcsoporton keresztül észterkötést létesítve kapcsolódik.

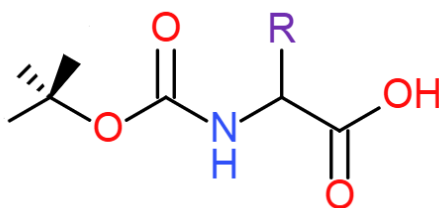
Peptidszintézishez használt gyanták linkerei	
Kapcsolódás a peptid karboxilcsoportján keresztül	Kapcsolódás a peptid α -aminocsoportján keresztül
	
Rink savas linker	Rink-amid linker
	
Wang / PHB linker	PAL linker
	
HMPA linker	Sieber linker

1. Táblázat: Példák a peptidszintézishez használt gyanták linkereiről

2.4.3. A szilárd fázisú peptidszintézis leggyakrabban alkalmazott stratégiái

2.4.3.1. Boc/Bzl stratégia

A szilárd fázisú peptidszintézis egyik még ma is széles körben használt stratégiája, ennél az eljárásnál a szintézis során olyan aminosavakat használunk, melyek N-terminálisa *tert*-butil-oxikarbonil (Boc) védőcsoporttal van ellátva. A kapcsolások után a savlabilis Boc védőcsoportokat TFA-oldat segítségével tudjuk eltávolítani. A hasítás után semlegesíteni kell az α -aminocsoportot, amit megtehetünk például DIEA-val vagy TEA-val [32] [33]. A Boc-védőcsoport hasításához, illetve a mosáshoz elsődlegesen DCM-et vagy DMF-et használunk oldószerként. A gyantáról való hasításhoz erős savat kell alkalmaznunk. Ehhez a legtöbb esetben hidrogén-fluoridot használnak, de használható még például trifluor-metánszulfonsav (TFMSA) vagy hidrogén-bromid és trifluorecetsav elegye is [32] [34]. A Boc/Bzl stratégiát széles körben alkalmazzák különböző peptidek és fehérjék előállítására. Ennek ellenére a stratégiának mégis van egy nagy hátránya: a védőcsoportok hasítása és a gyantáról való hasítás is erősen savas környezetet igényel. Több aminosav, illetve a peptid kötések is érzékenyek lehetnek a savas környezetre, illetve különféle nemkívánatos savkatalizált mellékreakciók is végbemehetnek a szintézis során [32]. A Boc-védőcsoport hasítására érzékenyek lehetnek az aminosavak oldallánc-védő csoportjai is [35].

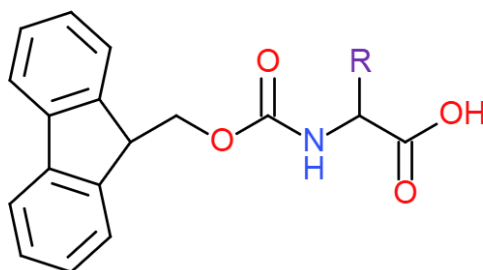


4. Ábra: Boc csoporttal védett aminosav

2.4.3.2. Fmoc/^tBu stratégia

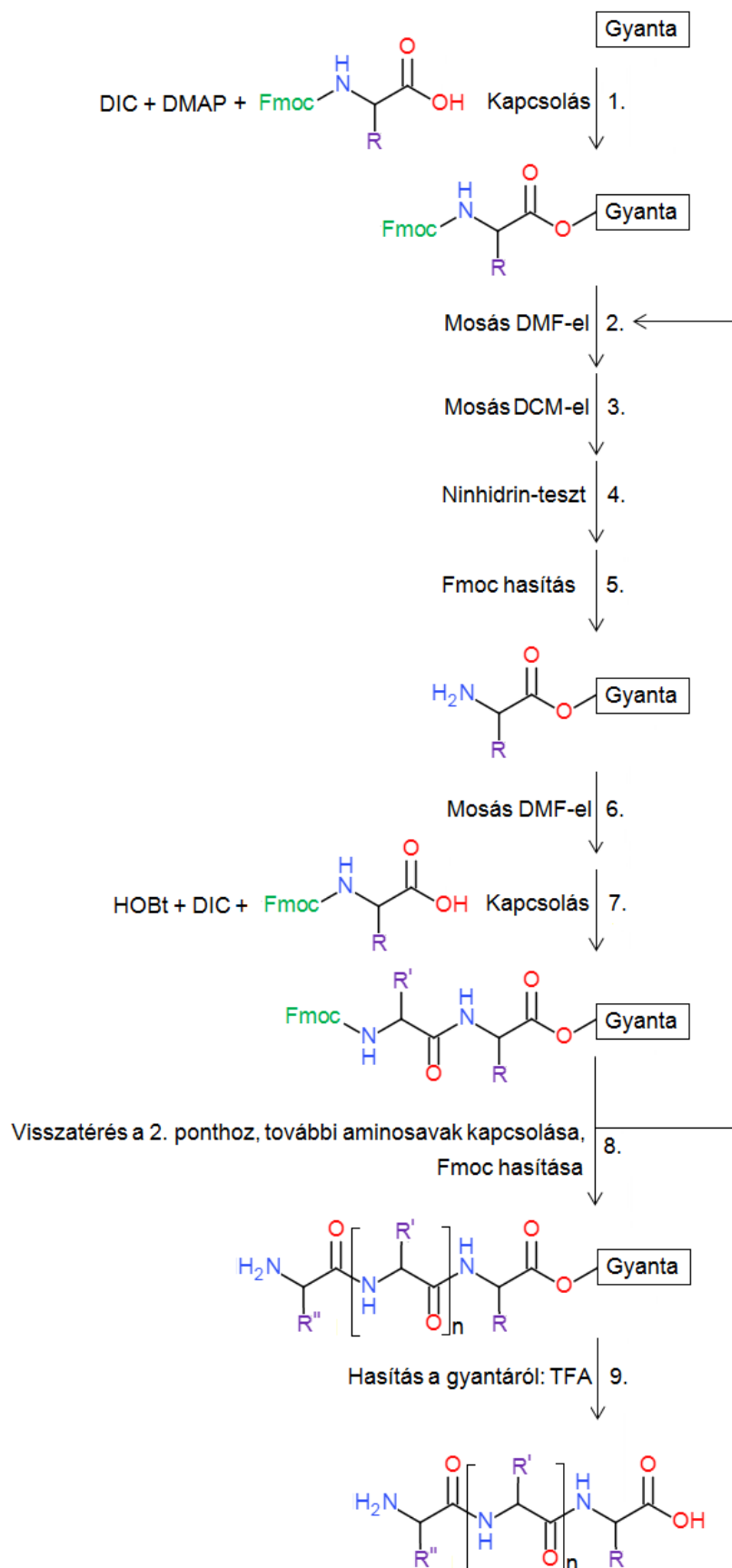
A Boc/Bzl technika hiányosságainak okán szükség volt egy olyan új védőcsoportra, amely kíméletesebb körülmények között hasítható. Alternatívaként többféle ortogonális megközelítés is felmerült, melyek során az α -amino-védőcsoport eltávolítása nem savas környezetben ment végbe. Ilyen alternatíva volt például az Nps védőcsoport, majd később a Dts védőcsoport, melyek hasítása tiolízissel történt [32]. Számos megoldás született, de a leghatékonyabb ortogonális alternatívaként az Fmoc/^tBu stratégia terjedt el világszerte.

A stratégia során olyan aminosav-származékokat használunk, melyek α -aminocsoportja 9-fluorenil-metil-oxokarbonil (Fmoc) csoporttal védett. Az új stratégia során a védőcsoport hasítása gyenge bázis segítségével, enyhén bázikus körülmények között megy végbe, kiválva ezzel a Boc-stratégia savas közegét [36].



5. Ábra: Fmoc védett aminosav

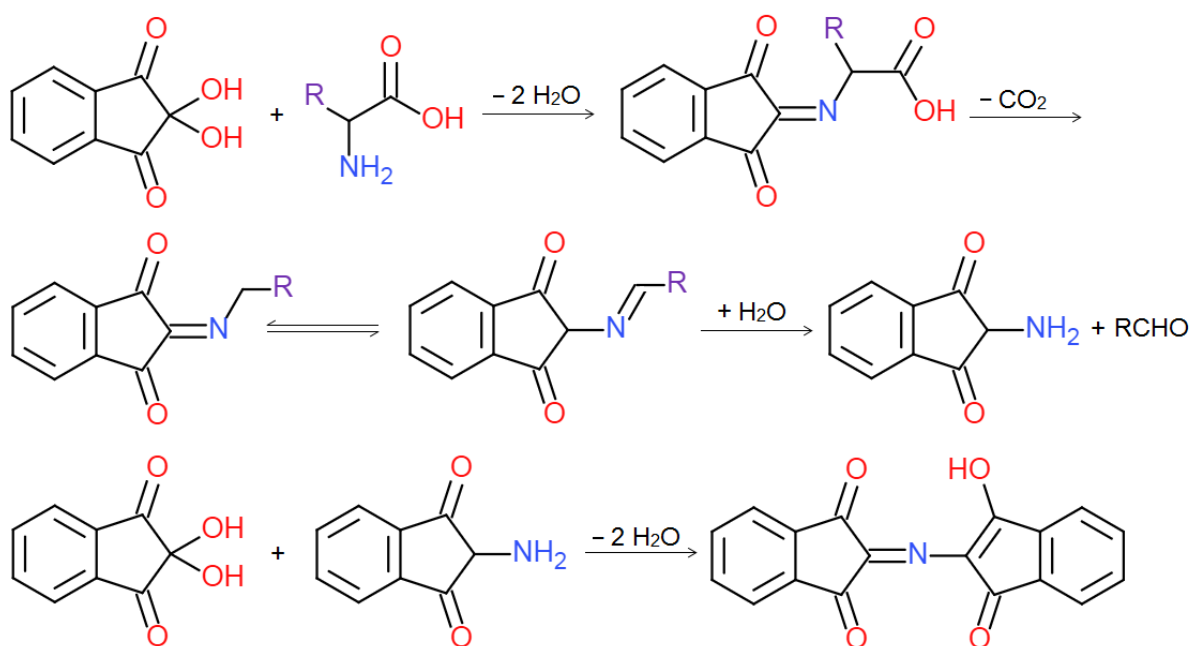
Az eljárás során a legelső Fmoc védett aminosavat egy linkerén keresztül kovalens kötéssel kapcsoljuk az oldhatatlan szilárd fázishoz. Ezt követően az Fmoc védőcsoportot gyenge bázis segítségével távolítjuk el, leggyakrabban pirimidinnel. A második és a további Fmoc védett aminosav kapcsolásánál többféleképpen járhatunk el, munkám során a már fentebb említett *in situ* aktív észteres technikát alkalmaztam. A kívánt szekvencia felépítése után a gyantáról sav segítségével (esetemben TFA-val) hasítjuk le a peptidet és az oldallánc védőcsoportokat, melyeknek Fmoc statégia alkalmazása esetén gyenge bázissal szemben kell stabilnak lenniük [32]. Az eljárás folyamatát a 6. ábra szemlélteti. Az Fmoc-stratégia lehetővé teszi, hogy olyan oldallánc védőcsoportokat alkalmazzunk, amelyek érzékenyek a savas környezetre [36], annak köszönhetően pedig, hogy nincs szükség korrozív TFA használatára a szintézis lépései közben, egyszerűbben automatizálható ez az eljárás [35].



6. Ábra: A szilárd fázisú peptidszintézis folyamata Fmoc stratégián keresztül

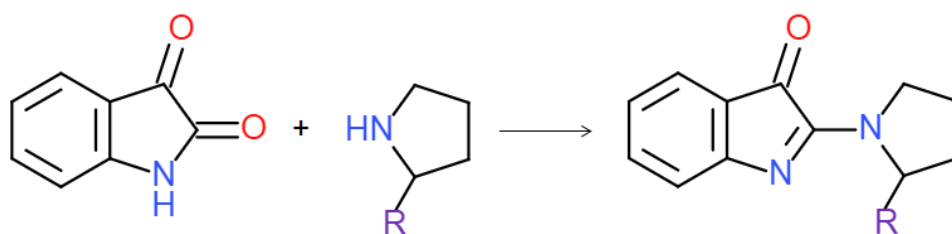
2.4.4. Ninhidrin teszt

Az aminosavak kapcsolásának, illetve az N-terminális védőcsoport hasításának sikerességét ninhidrin tesztel tudjuk ellenőrizni. A ninhidrin és a primer aminok között lejátszódó reakciót (7. ábra) elsőként Kaiser adaptálta a szilárd fázisú peptidszintézis előrehaladtának megfigyelésére [37]. A szabad N-terminálissal rendelkező aminosavak ninhidrinnel intenzív kék színváltozást mutatnak. Ez alól kivétel a prolin, amely ugyan reagál a ninhidrinnel, de enyhén sárga színt ad, ami szinte megkülönböztethetetlen a ninhidrin oldat eredeti színétől, vagyis nem látható egyértelmű különbség a teszt során, így nem detektálható ezzel a módszerrel. Amennyiben sikeres volt a kapcsolás, az utolsó aminosav α -aminocsoportja Fmoc (vagy más védőcsoporttal) védett, ezért nem láthatunk kék színváltozást. A módszer rendkívül érzékeny, ezen kívül előnye, hogy egyszerű és gyors kvalitatív meghatározást tesz lehetővé.



7. Ábra: α -aminosavak reakciója ninhidrinnel

Bár a ninhidrin teszt kiválóan alkalmas a kapcsolási reakciók ellenőrzésére, az előbb említett hiányosság miatt szükség volt egy olyan reagensre is, amely „láthatóvá teszi a prolint”. Ehhez az izatin egy jó megoldásnak bizonyult, mely reakciója a prolinnal jól látható sötétbarna színváltozást eredményez. Az izatin teszt lehetővé tette, hogy detektálni lehessen, ha nem volt sikeres a prolint követő aminosav kapcsolása.



8. Ábra: Prolin reakciója izatinnal

3. Célkitűzés

A munkám során hasnyálmirigy-tumor (PDAC) célzott tumorterápiás kezelésére tervezett peptid-daunomicin-konjugátumok előállítása volt a célom.

Az elkészített konjugátumokat biológiai vizsgálatokra használják fel, azok *in vitro* internalizációs képességét vizsgálják PDAC sejtekkel szemben.

Célom volt az

- *Aoa-KSKAAKN-OH*
- *Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH*
- *Aoa-GFLG-K(Aoa-GFLG)SKAAKN-OH*
- *Aoa-GFLG-K(Aoa)SKAAKN-OH*

peptidszármazékok szintézise és tisztítása.

Továbbá az elkészített peptidszármazékok felhasználásával célom volt a

- *Dau=Aoa-KSKAAKN-OH*
- *Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH*
- *Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa-GFLG)SKAAKN-OH*
- *Dau=Aoa-GFLG-K(Dau-Aoa)SKAAKN-OH*

peptid-daunomicin konjugátumok előállítása és tisztítása.

4. Kísérleti rész

4.1. A peptidek szintézise

A munkám során összesen négy peptidszármazék készítése volt a célom. Az *Aoa-KSKAAKN-OH*, *Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH*, és az *Aoa-GFLG-K(Aoa-GFLG)SKAAKN-OH* peptidszármazékokat párhuzamosan, egy időben készítettem, míg az *Aoa-GFLG-K(Aoa)SKAAKN-OH* peptid szintézisét az előbbieik elkészítése után végeztem.

4.1.1. A peptidszintézis általános menete

A peptideket szilárd fázisú peptidszintézissel készítettem, Fmoc stratégián keresztül. Ehhez első lépésben a legelső védett aminosav-származékot (ez minden esetben azparagin volt) Wang-gyantához kapcsoltam, hasítottam a védőcsoportot, majd a tervezett szekvencia által tartalmazott többi aminosavat egymás után kapcsoltam az épülő peptidáncához. Az aminosavak kapcsolását, illetve a védőcsoportok hasítását a következőképpen végeztem:

Az Fmoc védőcsoport hasítása:

A hasítást megelőzően a gyantát DMF-fel duzzasztottam. 3x1 percig. A hasításhoz egy olyan hasítóelegyet használtam, amely 2 V/V % piperidint és 2 V/V % DBU-t tartalmaz DMF-ben. A hasítást négy részletben végeztem. A hasító elegyből a peptidhez öntöttem, megkevertem, majd állni hagytam (2 perc, 2 perc, 5 perc, 10 perc). Az egyes lépések után vízlégszivattyúval leszívattam a hasítóelegyet. A gyantát 5x1 percig DMF-fel, 3x1 percig pedig DCM-mel mostam, végül szárazra szívtam. A ninhidrin teszt elvégzésével megbizonyosodtam róla, hogy sikeres volt a hasítás.

Védett aminosav-származékok kapcsolása:

A kapcsoláshoz először a gyantát 3x1 percig DMF-fel duzzasztottam. Ezután három ekvivalens aminosav-származékot és 3 ekvivalens HOBt-t adtam hozzá, amelyeket együttesen minimális mennyiségű DMF-ben oldottam, továbbá 3 ekvivalens DIC-et pipettáztam az oldatba, és gyors összekeverés után a gyantára vittem az elegyet. Az elegyet keverés után egy órán keresztül állni hagytam, miközben 30 perc elteltével még ugyanennyi DIC-et adtam hozzá. Egy óra elteltével 3x1 percig DMF-fel, és 3x1 percig DCM-mel mostam. Vízlégszivattyú segítségével szárazra szívtam, majd elvégeztem a ninhidrin tesztet. Ehhez egy üvegbot segítségével kivettem néhány szemcsét, és egy tesztcsőbe helyeztem őket. 4

csepp ninhidrin oldatot, 4 csepp fenolt és 4 csepp 0,05M KCN oldatot adtam hozzá, majd körülbelül 5 percig hevítettem. A szabad aminosavak jelenlétét jellegzetes kék színváltozás jelzi. Negatív teszt esetén megkezdhetjük a hasítást és a következő aminosav kapcsolását. Pozitív teszt esetén újra elvégeztem a kapcsolást. A hasítás-kapcsolás ciklus protokollját a 2.táblázat foglalja össze.

Művelet	Reagens	Idő
Gyanta duzzasztása	DMF	3x1 perc
Védőcsoport hasítása	2 V/V % piperidin, 2 V/V % DBU DMF-ben	2x2 perc
		5 perc
		10 perc
Mosás	DMF	5x1 perc
	DCM	3x1 perc
Ninhidrin teszt		
Gyanta duzzasztása	DMF	3x1 perc
Kapcsolás	3 ekv. aminosav-származék és 3 ekv. HOBt DMF-ben oldva, 3 ekv. DIC	60 perc
Mosás	DMF	3x1 perc
	DCM	3x1 perc
Ninhidrin teszt		

2. Táblázat: A peptidszintézis lépéseinek protokollja

Az aminosavak kapcsolása után ipAoa-t kapcsoltam a peptidekhez ugyanolyan módon, mint ahogyan az aminosav-származékok esetében is eljártam. Végül az elkészült peptidláncot hasítottam a gyantáról.

Hasítás a gyantáról:

A gyantáról való hasításhoz először elkészítettem a hasítóelegyet: 5 ml TFA, 125 μ l desztillált víz és 125 μ l TIS felhasználásával. Az elegyet 5 percig jéggel hűtöttem, hozzáadtam a gyantát, és ezt követően három órán át kevertettem. A hasítás során az aminosavak oldallánc védőcsoportjai is lehasadtak. A hasítás után elválasztottam a gyantát a peptidszármazékoktól.

A gyanta elválasztása a peptidszármazékoktól:

Egy Erlenmeyer lombikba két centrifugacsőnyi dietil-étert mértem, és hozzáadtam a peptidszármazékot és a gyantát tartalmazó elegyet. A kapott eleggyel körülbelül 4/5-ig töltöttem meg egy centrifugacsövet, egy másik centrifugacsőbe pedig ugyanannyi gramm vizet töltöttem. A kettőt kiegyensúlyoztam egy mérleg segítségével, majd ezt követően

elvégeztem a centrifugálást. Az elegyet és a vizet tartalmazó centrifugacsöveket egymással szemközt helyeztem el a készülékben. A centrifugálást 5 percig, 4400-as fordulaton végeztem. Összesen háromszor centrifugáltam, amíg el nem fogyott az összes elegy. Dekantálás után a szilárd anyaghoz 10 %-os ecetsavat adtam, majd egy szűrőpapír segítségével egy gömblombikba szűrtem át. Ezt követően 45°C-on, 4-5 fordulatszámon bepároltam az elegyet.

Feldolgozás:

A rotálást követően a lombikba kevés vizet töltöttem, és folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottam. Ez után egy éjszakán át liofilizáltam, majd ismét vízben oldottam a peptidszármazékot, újból lefagyasztottam, és még egy éjszakán át liofilizáltam.

4.1.2. Az Aoa-KSKAAKN-OH, Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH, és az Aoa-GFLG-K(Aoa-GFLG)SKAAKN-OH peptidszármazékok szintézise

4.1.2.1. A közös SKAAKN szekvencia szintézise

Az alábbi három peptidszármazék első 6 aminosava megegyezik, így az SKAAKN kezdő szekvenciát egyszerre, egy reakcióedényben állítottam elő, háromszoros mennyiségekkel dolgozva.

A felhasznált Wang-gyanta kapacitása 0,45 mmol/g volt, és ehhez számoltam a védett aminosav-származékok, illetve a DIC és a HOBt bemérni kívánt mennyiségét. Ez 1,0125 mmol mennyiségű reagenst jelentett lépésenként. Az első aminosav-származék kapcsolását 2x2 órán keresztül végeztem. A kapcsolat sikerességét az első hasítás után ninhidrin teszttel ellenőriztem. Pozitív teszt esetén sikeresnek mondható a kapcsolat. Az első aminosav-származék gyantához való kapcsolását követően a szintézishez a fentebb leírt protokolt alkalmaztam. A felhasznált reagensek mennyiségét a 3. táblázat mutatja.

Felhasznált anyagok	Moláris tömeg (g / mol)	Bemért mennyiség (mg)
HOBt x H ₂ O	153,12	155
DIC	156,60 (μl / mol)	158 (μl)
Fmoc-Asn(trt)-OH	596,67	604
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,53	474
Fmoc-Ala-OH x H ₂ O	311,32 x 18	333
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383,44	388

3. Táblázat: A szintéziséhez felhasznált reagensek és bemért mennyiségeik

Az SKAAKN szekvencia szintézisét követően a gyantát kiszárítottam, és kétharmad-egyharmad arányban kétfelé osztottam.

A soron következő aminosavat (lizint) azért nem kapcsoltam egyszerre a három peptidhez, mert az Aoa-GFLG-K(Aoa-GFLG)SKAAKN-OH peptid szintéziséhez az elágazás elkészítése miatt olyan lizint használtam, aminek az oldallánca Mtt-védőcsoporttal védett (Fmoc-Lys(Mtt)-OH). A másik két konjugátumhoz Boc oldallánc védelemmel ellátott lizint használtam (Fmoc-Lys(Boc)).

4.1.2.2. Fmoc-Lys(Boc) kapcsolása az Aoa-KSKAAKN-OH és az Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH peptidekhez.

A már meglévő SKAAKN-gyanta szekvenciához a két peptidszármazék esetén még együtt kapcsoltam hozzá a lizint, ugyanazon protokoll szerint eljárva. A felhasznált mennyiségeket és anyagokat a 4. táblázat tartalmazza.

Felhasznált anyagok	Moláris tömeg (g / mol)	Bemért mennyiség (mg)
HOBt x H ₂ O	153,12	103
DIC	156,60 (μl / mol)	106 (μl)
F-moc-Lys(Boc)-OH	468,53	316

4. Táblázat: A szintéziséhez felhasznált reagensek és bemért mennyiségeik

A kapcsolás után a gyantát kiszárítottam, és két egyenlő részre szedtem szét.

4.1.2.3. ipAoa kapcsolása az Aoa-KSKAAKN-OH peptid esetén

A peptidlánc végén lévő ipAoa-t pontosan ugyanúgy kapcsoltam a megszokott protokoll szerint, mint ahogyan az aminosav-származékok esetén is eljártam.

Felhasznált anyagok	Moláris tömeg (g / mol)	Bemért mennyiség (mg)
HOBt x H ₂ O	153,12	52
DIC	156,60 (μl / mol)	54 (μl)
ipAoa	131,05	44

5. Táblázat: A szintéziséhez felhasznált reagensek és bemért mennyiségeik

Az ipAoa kapcsolását követően a fent leírt módon TFA segítségével elvégeztem a gyantáról való hasítást.

4.1.2.4. GFLG és ipAoa kapcsolása az Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH peptid esetén

A lizin kapcsolása után felépítettem a GFLG spacer-t, illetve hozzákapcsoltam az ipAoa-t a peptidhez. A felhasznált mennyiségeket a 6. táblázat tartalmazza. Az ipAoa kapcsolását követően elvégeztem a gyantáról való hasítást.

Felhasznált anyagok	Moláris tömeg (g / mol)	Bemért mennyiség (mg)
HOBt x H ₂ O	153,12	52
DIC	156,60 (μl / mol)	54 (μl)
Fmoc-Gly-OH	297,31	100
Fmoc-Leu-OH	353,41	119
Fmoc-Phe-OH	387,43	131
ipAoa	131,05	44

6. Táblázat: A szintéziséhez felhasznált reagensek és bemért mennyiségek

4.1.2.5. Fmoc-Lys(Mtt)-OH kapcsolása, Mtt védőcsoport hasítása, GFLG és ipAoa kapcsolása Aoa-GFLG-K(Aoa -GFLG)SKAAKN-OH peptidszármazék esetén

Az Aoa-GFLG-K(Aoa-GFLG)SKAAKN-OH peptid egy elágazást tartalmaz, melyet egy Mtt oldallánc védelemmel ellátott lizin alkalmazásával valósítottam meg. Az Fmoc-Lys(Mtt)-OH kapcsolását követően (felhasznált reagensek és mennyiségek a 7. táblázatban) hasítottam az Mtt védőcsoportot, a további aminosav-származékokat pedig párhuzamosan kapcsoltam a két elágazó láncrészhez, a gyanta kapacitására vett 6 ekv. mennyiségben alkalmazva.

Az Mtt védőcsoport hasítása

Az Mtt védőcsoport szelektív hasítását 2 V/V % trifluorecetsavat (TFA) és 2 V/V % triizopropilszilánt (TIS) DCM oldatban tartalmazó hasítóelegy alkalmazásával kiviteleztem. Ebből összesen 50 ml-t készítettem, 1ml TFA, 1ml TIS és 48ml DCM felhasználásával. A hasítóelegyet apránként adagoltam a gyantához addig, amíg a gyantát körülvevő oldat meg nem sárgult. A sárga szín elérével a hasítóelegyet részletekben adtam a gyantához úgy, hogy az elegy ellepje azt (2x1 perc, 2x3 perc, 5 perc, 10 perc, 30 perc), eközben minden részlet után vízlégszivattyúval távolítottam el a gyantáról. Ezt követően 5x1 percg mostam DCM-mel, majd készítettem egy 10 V/V %-os DIEA/DCM-oldatot. Ebből összesen 20 ml-t készítettem, 2 ml DIEA és 18ml DCM felhasználásával. Az elegyet részletekben adtam a gyantához (3x1 perc) annak semlegesítésére, mivel a TFA által protonált állapotban lévő

aminocsoportok nem alkalmasak peptid kötés kialakítására. Végül ismét DCM-mel mostam a gyantát 5x1percig.

Az Mtt védőcsoport hasítását követően duzzasztottam a gyantát, és elvégeztem az Fmoc védőcsoport hasítását. Ezt követően párhuzamosan kapcsoltam mindkét oldalhoz a GFLG spacer, illetve az ipAoa-kat. A kapcsolás során így kétszeres mennyiségekkel (6 ekv.) dolgoztam. A szintézis befejeztével hasítottam a peptidet a gyantáról.

Felhasznált anyagok	Moláris tömeg (g / mol)	Bemért mennyiség (mg)
HOBt x H ₂ O	153,12	51,66
DIC	156,6 (μl / mol)	54 (μl)
Fmoc-Lys(Mtt)-OH	624,79	211
HOBt x H ₂ O	153,12	104
DIC	156,60 (μl / mol)	108 (μl)
Fmoc-Gly-OH	297,31	200
Fmoc-Leu-OH	353,41	238
Fmoc-Phe-OH	387,43	262
ipAoa	131,05	88

7. Táblázat: A szintéziséhez felhasznált reagensek és bemért mennyiségeik

4.1.3. Az Aoa-GFLG-K(Aoa)SKAAKN-OH peptidszármazék szintézise

A peptidszintézist szilárd fázisú peptidszintézissel, Fmoc stratégiával végeztem a fent leírt protokolnak megfelelően.

A szintézishez 0,5 g Wang-gyantát használtam, melynek kapacitása 0,45 mmol/g volt. Az első aminosav kapcsolásához a gyantát 15 percig duzzasztottam, és közben összemértem a kapcsoláshoz használt elegyet: 3 ekv.aminosav-származékot (Fmoc-Asn(trt)-OH), 0,3 ekv. dimetil-amino-piridint (DMAP), melyeket DMF-ben oldottam, majd utána 3 ekv. DIC-et adtam hozzá. A kapcsolást két órán át végeztem, majd újrakapcsoltam szintén két órán keresztül. A kapcsolást követő hasítás után ninhidrin teszttel ellenőriztem, hogy sikeres volt-e az aminosav kapcsolása a gyantához.

Az aminosav-származékokból 0,675 mmolt használtam fel kapcsolásonként az Fmoc-Lys(Mtt)-OH kapcsolásáig, utána pedig elvégeztem az Mtt védőcsoport hasítását. Az Aoa-GFLG-K(Aoa-GFLG)SKAAKN-OH peptidhez hasonlóan itt is olyan hasító elegyet alkalmaztam, amely 2 V/V % TFA-t és 2 V/V % TIS-t tartalmaz DMF-ben. Összesen 200 ml ilyen elegyet készítettem 4 ml TFA, 4 ml TIS és 192 ml DMF felhasználásával. A hasítás előtt a gyantát

DCM-mel mostam, a hasítási idők pedig a következők voltak: 2x20 másodperc, 2x1 perc, 5 perc, 10 perc és 30 perc. A hasítás után a peptidet 5x1 percig DCM-mel mostam. A semlegesítés 2 V/V %-os DIEA oldattal végeztem 3x1 percig, utána pedig ismét egy 5x1 perces DCM-es mosás következett.

Az Mtt védőcsoport hasítása után ipAoa-t kapcsoltam az elágazásra és elkészítettem a GFLG spacer, melynek végére egy újabb ipAoa került. Ezekhez a lépésekhez a reagensekből 0,3375 mmol-t használtam fel. Az elkészült peptidszármazékot a korábbiakban leírtaknak megfelelően hasítottam a gyantáról.

A peptidszintézishez felhasznált reagenseket, illetve azok bemért mennyiségeit az alábbi táblázat tartalmazza:

Felhasznált anyagok	Moláris tömeg (g / mol)	Bemért mennyiség (mg)
DMAP	122,17	8
HOBt x H ₂ O	153,12	103
DIC	156,60 (μl / mol)	106 (μl)
Fmoc-Asn(trt)-OH	596,67	403
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,53	316
Fmoc-Ala-OH x H ₂ O	311,32 x 18	210
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383,44	259
Fmoc-Lys(Mtt)-OH	624,79	422
HOBt x H ₂ O	153,12	51
DIC	156,60 (μl / mol)	53 (μl)
Fmoc-Gly-OH	297,31	99
Fmoc-Leu-OH	353,41	119
Fmoc-Phe-OH	387,43	131
ipAoa	131,05	44

8. Táblázat: A szintéziséhez felhasznált reagensek és bemért mennyiségeik

4.2. Az izopropilidén védőcsoport hasítása, és a daunomicinnel való konjugálás

4.2.1. Izopropilidén védőcsoport hasítása

Minden peptidlánc végére egy izopropilidén védett aminosav (ipAoa) került. Az izopropilidén védőcsoportot úgy távolítottam el, hogy liofilizálás után a peptideket kevés NH₄OAc pufferben oldottam fel (kb. 2 ml), és annyi metoxiamint adtam hozzá, hogy az oldat több, mint 1 mol / (dm³) koncentrációban tartalmazza a metoxiamint. A hasításhoz másfél

órán keresztül végeztem a kevertetést szobahőmérsékleten, végül 50°C-on nagyjából 2 milliliter térfogatúra pároltam be, rotációs vákuumbepárló segítségével.

4.2.2. A peptidszármazékok konjugálása daunomicinnel

A megtisztított peptidszármazékokat folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottam. A fagyasztást követően egy éjszakán át végeztem a liofilizációt. A liofilizált peptidszármazékokat 2 ml NH₄OAc pufferben oldottam, a daunomicint pedig az aminosó-csoportokra nézve két anyagmennyiség ekvivalens feleslegben adtam hozzá. Az így kapott elegyet szobahőmérsékleten egy éjszakán át kevertettem, végül 50°C-on 2 milliliter térfogatúra pároltam be.

4.3. A peptidszármazékok és a konjugátumok tisztítása

A tisztításhoz használt készülék és oszlop:

Készülék: Knauer HPLC rendszer

Oszlop: Phenomenex Luna C18, 10 μ m, 100 Å, 250x21,2 mm

Az elúcióhoz használt elegyek:

A eluens: 0,1 V/V % TFA/víz

B eluens: 0,1 V/V % TFA/(avetonitril-víz: 80:20 V/V)

4.3.1. Az izopropilidén hasított peptidszármazékok tisztítása

A peptidszármazékokat RP-HPLC segítségével választottam el a szennyezőktől. A tisztítandó termékeket az elválasztás előtt egy éjszakán át liofilizáltam. A peptidszármazékokat kevesebb, mint 2 ml eluensben oldottam: először 1 ml A eluenst adtam hozzájuk, majd oldhatóságtól függően A vagy B eluenssel egészítettem ki. A készülék ekvilibrálása után a feloldott peptideket egy fecskendő segítségével injektáltam az oszlopra. A detektálás hullámhossza $\lambda = 220$ nm volt.

A liofilizált Aoa-KSKAAKN-OH peptidszármazékot 1ml A-eluensben és 0,5ml B-eluensben oldottam fel, és a következő gradienseket alkalmaztam:

0. p	5 % B
10. p	5 % B
10,1. p	20 % B
50. p	80 % B

9. Táblázat: A peptidszármazékok elválasztásához használt gradiensek

Az Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH és az Aoa-GFLG-K(Aoa-GFLG)SKAAKN-OH peptidszármazékok HPLC-s tisztítását hasonlóképpen végeztem a 9. táblázatban szereplő gradiensekkel.

4.3.2. A konjugátumok tisztítása

A peptidszármazékokat a daunomicinnel való konjugálás után HPLC-vel választottam el a szennyezőktől, amely elsősorban a daunomicin feleslegét jelentette. Az elválasztások előtt a készüléket 20 %-ra ekvilibráltam (B eluens). Az oldatban lévő konjugátumokat egy fecskendő segítségével injektáltam az oszlopra, ügyelve, hogy ne kerüljön buborék a rendszerbe.

A konjugátumok tisztításához használt gradienseket a 10. táblázat tartalmazza.

0. p	20 % B
5. p	20 % B
50. p	80 % B

10. Táblázat: A konjugátumok elválasztásához használt gradiensek

4.4. Az előállított peptidszármazékok és konjugátumok analitikai jellemzése

Az előállított konjugátumok kémiai jellemzése ESI-MS és analitikai RP-HPLC módszerekkel történt.

4.4.1. Tömegspektrometriás vizsgálatok

A peptidszármazékok és a konjugátumok HPLC-s elválasztását követően a különböző frakciók vizsgálata tömegspektrometriával történt.

A vizsgálathoz felhasznált készülék és oldószerek:

Készülék: Bruker Esquire 3000

Oldószer: 50 V/V % AcN, 50 V/V % víz és 1 V/V % ecetsav elegye

A tömegspektrométerrel végzett vizsgálatok eredményei alapján határoztuk meg, hogy a kromatográfiás elválasztás során nyert egyes frakciók közül melyik tartalmazza a megfelelő terméket. A frakciókból 2 μ l-t mértem ki a vizsgálatokhoz automata pipettával. Az így kapott mintákat leadtam ESI-MS vizsgálatokra. Amennyiben több frakció is tartalmazta a terméket, egyesítettem őket a további műveletekre.

4.4.2. A konjugátumok tisztaságának jellemzése

A tömegspektrometriából származó eredmények alapján kiválasztottam azokat a konjugátum-frakciókat, amelyek tartalmazták a terméket, és ezek tisztaságát liofilizálást követően analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem.

A vizsgálathoz felhasznált készülék és oszlop:

Készülék: Knauer HPLC rendszer

Oszlop: Waters Symmetry C18, 5 η m, 100 Å, 150x4,6 mm

Az elúcióhoz használt elegyek:

A eluens: 0,1 V/V % TFA/víz

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

A tömegspektrometriás vizsgálat után a megtisztított konjugátumokat folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottam és liofilizáltam. Az így kapott termékből néhány apró szemcsét használtam fel az analitikai vizsgálatra. A szemcséket minimális mennyiségű eluensben oldottam, a kapott oldatot pedig az oszlopra injektáltam, végül pedig elvégeztem a vizsgálatot. A detektáláshoz használt hullámhossz $\lambda = 220$ nm volt.

5. Eredmények

5.1. Az aminosavtartalmú peptidszámvevők előállítása és tisztítása

Szilárd fázisú peptidszintézissel, Fmoc-stratégián keresztül előállítottam a következő peptidszámvevőket:

- *ipAoa-KSKAAKN-OH*
- *ipAoa-GFLG-KSKAAKN-OH*
- *ipAoa-GFLG-K(ipAoa)SKAAKN-OH*

Minden peptidlánc N-terminális végére egy izopropilidén védett aminosav (ipAoa) kapcsolom, amid kötés kialakításával. A peptidszámvevőket a szintézist követően lehasítom, majd elválasztom a gyantától. Az így szeparált peptidszámvevőkről a liofilizálást követően lehasítom az izopropilidén védőcsoportokat, majd tisztítom a reakcióelegyet. Az *Aoa-KSKAAKN-OH*, *Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH*, és *Aoa-GFLG-K(Aoa)SKAAKN-OH* peptidszámvevőket RP-HPLC segítségével izoláltam.

5.2. Az aminosavtartalmú peptidszámvevők tömegspektrometriás vizsgálata

A HPLC-vel megtisztított peptidszámvevők frakcióinak vizsgálata tömegspektrometria módszerével történt. Az eredmények alapján azonosítottuk azokat a frakciókat, amelyeket felhasználtam a daunomicin konjugálására. Az eredményeket a 11. táblázat tartalmazza.

Az eredmények alapján kiderült, hogy az *Aoa-GFLG-K(Aoa-GFLG)SKAAKN-OH* peptidszámvevőhöz tartozó frakciók közül egyik sem tartalmazza a várt anyagot, így a vegyület előállítása sikertelen volt.

Peptidszámvevők	Számított tömeg (g / mol)	Mért tömeg (g / mol)
<i>Aoa-KSKAAKN-OH</i>	819,0	818,9
<i>Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH</i>	1193,5	1193,4
<i>Aoa-GFLG-K(Aoa)SKAAKN-OH</i>	1267,5	1267,4

11. Táblázat: Az aminosavtartalmú peptidszámvevők számított és mért tömege

5.3. A daunomicin konjugátumok előállítása és tisztítása

Az ESI-MS eredmények alapján kiválasztott peptidszármazékok frakcióit daunomicinnel konjugáltam, elkészítve a *Dau=Aoa-KSKAAKN-OH*, *Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH*, és *Dau=Aoa-GFLG-K(Dau-Aoa)SKAAKN-OH* konjugátumokat. A konjugátumokat rotációs vákuumbepárló segítségével bepároltam és RP-HPLC segítségével választottam el a szennyezőktől.

5.4. A konjugátumok tömegspektrometriai vizsgálata

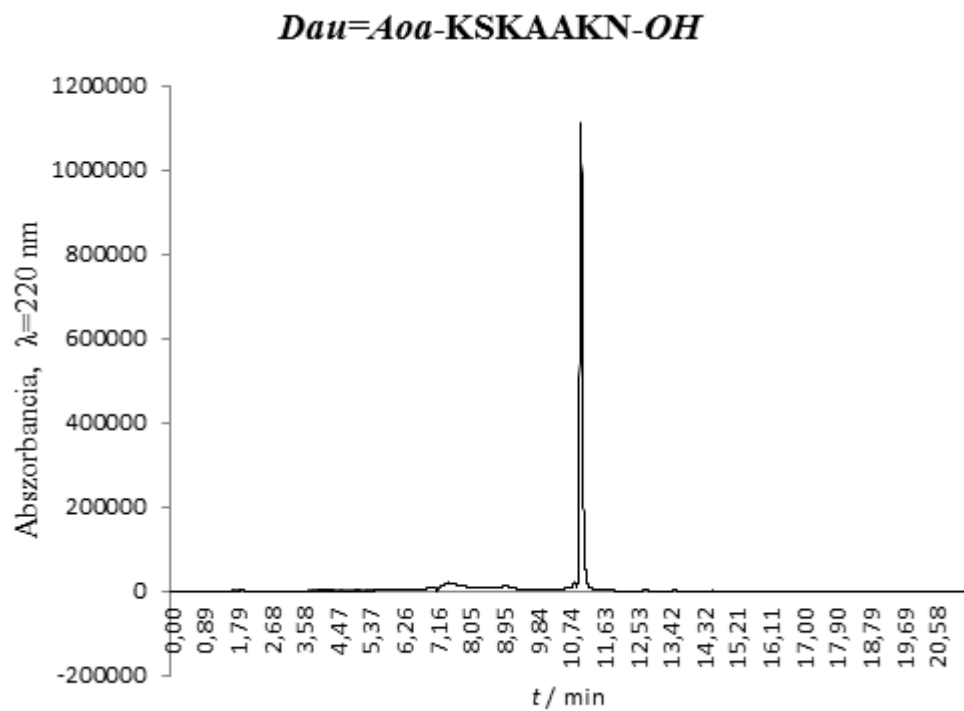
Az RP-HPLC-vel elválasztott konjugátumok frakcióinak azonosítása tömegspektrometriával történt. A konjugátumok számított és mért moláris tömegeit a 12. táblázat tartalmazza.

Konjugátumok	Számított tömeg (g / mol)	Mért tömeg (g / mol)
<i>Dau=Aoa-KSKAAKN-OH</i>	1328,5	1328,4
<i>Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH</i>	1703,0	1702,9
<i>Dau=Aoa-GFLG-K(Dau-Aoa)SKAAKN-OH</i>	2286,5	2286,4

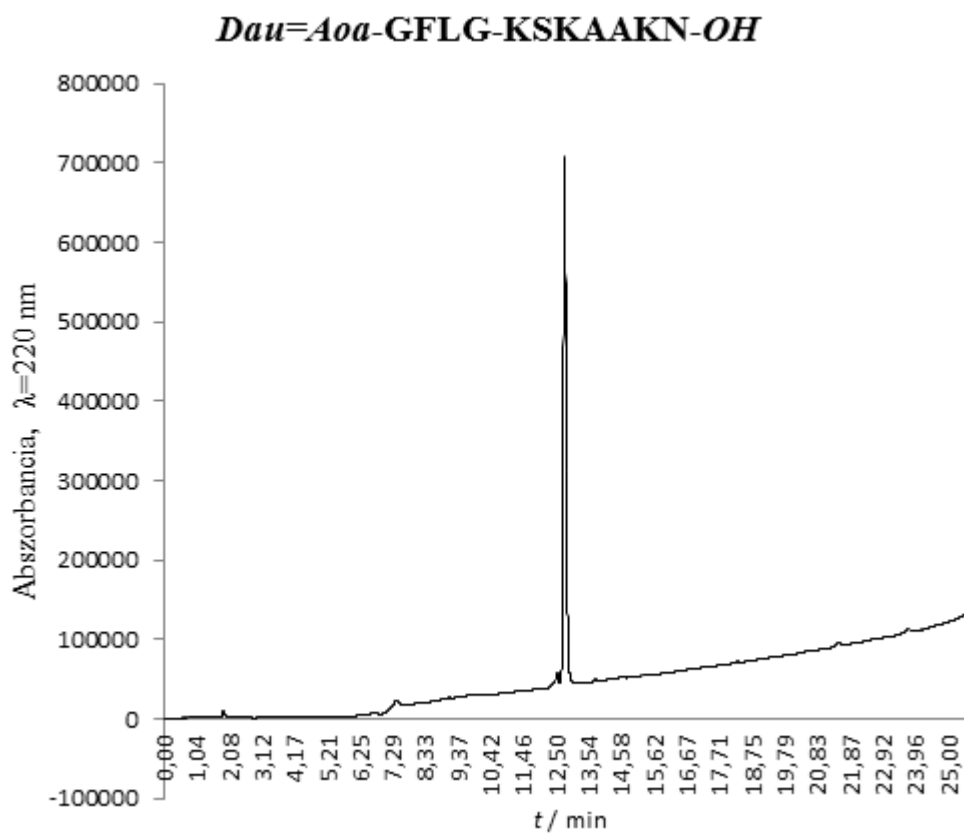
12. Táblázat: A konjugátumok számított és mért tömege

5.5. A konjugátumok vizsgálata analitikai RP-HPLC-vel

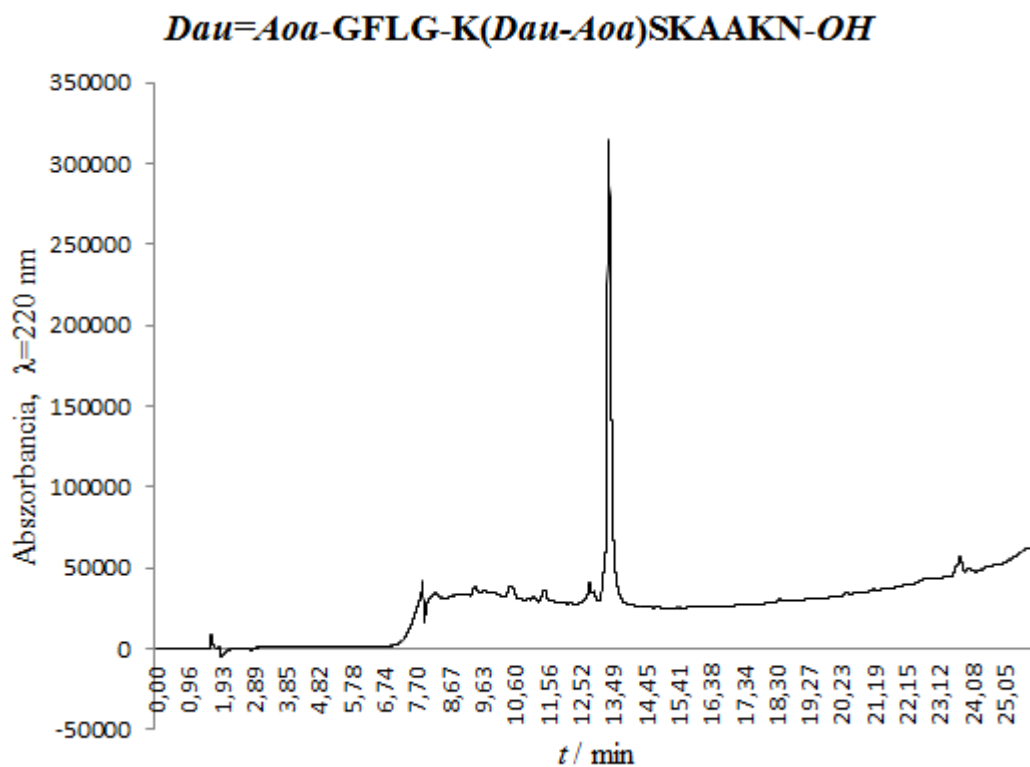
A tömegspektrometriai vizsgálattal azonosított frakciók tisztaságának ellenőrzése analitikai RP-HPLC-vel történt. Az analitikai RP-HPLC-vel felvett kromatogramok a 9. 10. és 11. ábrán láthatók. Az eredmények alapján elmondható, hogy egyik konjugátum sem tartalmaz peptid-típusú (vagy $\lambda = 220$ nm hullámhosszon abszorbanciával rendelkező) szennyezőket a kívánnál nagyobb mértékben.



9. Ábra: *Dau=Aoa-KSKAAKN-OH* konjugátum analitikai kromatogramja



10. Ábra: *Dau=Aoa-GFLG-K(Dau-Aoa)SKAAKN-OH* konjugátum analitikai kromatogramja



11. Ábra: *Dau=Aoa-KSKAAKN-OH* konjugátum analitikai kromatogramja

5.6. Az elkészült konjugátumok tömege

Az elkészített és megtisztított konjugátumok tömegét a 13. táblázat tartalmazza. A kitermelést az alkalmazott gyanta bemért tömegére és kapacitására számoltam.

Konjugátumok	Tömeg (mg)	Kitermelés (%)
<i>Dau=Aoa-KSKAAKN-OH</i>	20	13,38
<i>Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH</i>	26	13,57
<i>Dau=Aoa-GFLG-K(Dau-Aoa)SKAAKN-OH</i>	1	0,19

13. Táblázat: A tisztított konjugátumok tömegei és a kitermelés

Szakedolgozat összefoglaló

Tumor célzásra alkalmas módosított fág-bemutató peptid-daunomicin konjugátumok szintézise

Kaposvölgyi Anna Márta, kémia alapszakos hallgató

ELTE TTK Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

Témavezető: Dr. Dókus Endre Levente tudományos segédmunkatárs
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

A tumoros megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak, kezelésük nagy kihívást jelent az orvostudomány számára. A legfőbb kezelési módszerek közül a sebészeti beavatkozás és a sugárterápia csak akkor hatékonyak, ha a tumor még nem képzett metasztatizisokat. A kemoterápia, amely során a betegeket tumorellenes szerekkel kezelik, sajnos számos súlyos mellékhatással rendelkezik, mivel ezek a hatóanyagok az egészséges sejteket is pusztítják.

A célzott tumorterápia hatékony megoldás lehet a rákos megbetegedések kezelésére, drasztikusan csökkentve a mellékhatásokat. E stratégia lényege, hogy az antitumor hatóanyagot egy olyan, sok esetben peptid-típusú hordozóhoz kapcsolják, amely lehetővé teszi, hogy a citototoxikus hatóanyagot szelektíven a rákos sejtekbe juttassuk. Ennek köszönhetően drasztikusan csökkenthető a mellékhatások súlyossága, növelhető a tumorellenes hatóanyag alkalmazott mennyisége és a kezelés időtartama. A célzott tumorterápiában alkalmazott irányító peptidek képesek specifikusan kötődni a rákos sejtek felszínén található receptorokhoz vagy fehérjékhez. Az irányító peptidet egy olyan linkerrel keresztül kapcsolják a hatóanyaghoz, amely stabil a szervezetben, így nem engedi, hogy idő előtt szabaduljon fel a hatóanyag. A tumorellenes konjugátumok részét képezheti egy enzimstabil spacer is, amely a rákos sejtekben lévő bontó enzimek hatására képes hasadni, elérve ezzel a hatóanyag felszabadulását, illetve citotoxikus metabolitok kezelését a rákos sejten belül.

Szakedolgozati munkám során célom az volt, hogy olyan peptid-daunomicin konjugátumokat állítsak elő, amelyek alkalmasak lehetnek daganatos sejtek célzott tumorterápiás kezelésére. Az elkészített konjugátumokat biológiai vizsgálatokra használják fel, azok *in vitro* internalizációs képességét vizsgálják PDAC sejtekkel szemben.

A konjugátumok elkészítéséhez első lépésben előállítottam az *ipAoa-KSKAAKN-OH*, *ipAoa-GFLG-KSKAAKN-OH*, *ipAoa-GFLG-K(ipAoa-GFLG)SKAAKN-OH*, és *ipAoa-GFLG-K(ipAoa)SKAAKN-OH* peptidszármazékokat. A peptidszármazékok előállítását szilárdfázisú peptidszintézissel, Fmoc-stratégia alkalmazásával valósítottam meg. Minden peptidlánc N-terminális végére egy izopropilidén-védőcsoporttal ellátott aminooxiecetsav-részletet kapcsoltam, mely linker szerepét tölti be. Az izopropilidén védőcsoportokat eltávolítottam, majd a keletkezett peptidszármazékokat RP-HPLC-technika segítségével tisztítottam. A tisztítás során gyűjtött frakciók tömegspektrometriás analízissel azonosítottuk azokat, amelyek a várt tömegű peptidszármazékot tartalmazták, így felhasználtam a további műveletekre. Az *Aoa-GFLG-K(Aoa-GFLG)SKAAKN-OH* peptidszármazékot egyik frakció sem tartalmazta, így e vegyület szintézise sikertelen volt. A megtisztított peptidszármazékokat daunomicinnel konjugáltam. A daunomicint az aminooxiecetsav linkerrel keresztül oxim-kötéssel kapcsoltam a peptidekhez. A *Dau=Aoa-KSKAAKN-OH*, *Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH*, és *Dau=Aoa-GFLG-K(Dau-Aoa)SKAAKN-OH* konjugátumokat RP-HPLC segítségével tisztítottam, végül tömegspektrometriás analízis (ESI-MS) segítségével azonosítottuk azokat a frakciókat, melyek a várt moláris tömegű célterméket tartalmazták. A termékek tisztaságát analitikai RP-HPLC módszerrel jellemeztük.

Summary

Synthesis of phage display peptide-daunimycin conjugates for tumor targeting

Kaposvölgyi Anna Márta, BSc student in Chemistry

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

Place of defence: Organic Chemistry Department

Supervisors: **Dr. Dókus Endre Levente** research assistant professor
MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry

The cancerous diseases are one of the leading causes of death worldwide, therefore their treatment is a great challenge for medical science. Surgery and radiation therapy, two of the most generally used treatments are only effective if the tumor has not metastasized. Chemotherapy, during which clients are treated with antitumor agents give numerous serious side effects, because these agents damage the healthy cells also.

Targeted tumor therapy could be an effective solution for cancer treatment with drastically reducing side effects. The point of the strategy is the conjugation of several antitumor agents to various peptide-type homing molecules, which enables the cytotoxic agent to be dispatched selectively into the cancerous cells. This allows the drastic reduction of the side effects and the increase of the agent's dose and treatment duration. Targeting peptides used in the targeted cancer therapy are able to specifically bind to various receptors or proteins which are expressed on the surface by the cancerous cells. The linker is used for binding the targeting peptide to the antitumor drug is stable in the human organism, and is therefore unable to prematurely release the agent. An enzymatically labile spacer can also be part of the antitumor conjugates, which is degradable by the intracellular enzymes which can be found in the cancerous cells. This structure induces the release of free drug or active metabolites with cytotoxic properties inside of the malignant cells.

The aim of my work was to the synthesis and chemical characterization of peptide-daunomycin conjugates which could be used for targeted tumor therapy. The prepared conjugates will be investigated *in vitro* to determine their internalisation ability against PDAC cells.

The first step of the synthesis was to prepare the *ipAoa*-KSKAAKN-*OH*, *ipAoa*-GFLG-KSKAAKN-*OH*, *ipAoa*-GFLG-K(*ipAoa*-GFLG)SKAAKN-*OH*, and *ipAoa*-GFLG-K(*ipAoa*)SKAAKN-*OH* aminooxyacetic acid containing peptide-derivates. These peptide derivatives were prepared by solid phase peptide synthesis using Fmoc/^tBu-strategy. To the N-terminal end of the peptide-chains isopropylidene protected aminooxyacetic acid was bound as a linker. The isopropylidene protecting groups were removed and the peptide-derivates were purified by RP-HPLC technique. Fractions yielded by the purification were identified by mass spectrometry analysis. The fractions which contained the product of expected molecular mass were used for the further steps. No fraction contained the *Aoa*-GFLG-K(*Aoa*-GFLG)SKAAKN-*OH* peptide-derivate. Therefore unfortunately the synthesis of this compound was not successful. The purified peptide-derivates were conjugated to daunomycin. The daunomycin was bound to the peptide with the aminooxyacetic acid *via* oxime-bond. The *Dau*=*Aoa*-KSKAAKN-*OH*, *Dau*=*Aoa*-GFLG-KSKAAKN-*OH*, and *Dau*=*Aoa*-GFLG-K(*Dau*-*Aoa*)SKAAKN-*OH* conjugates were purified also by RP-HPLC technique, then finally fractions of expected mass were identified with mass spectrometry (ESI-MS). The purity of the compounds were characterized by analytical RP-HPLC.

Hivatkozások

- [1] <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>
- [2] Gattinoni, L., Powell, D. J., Rosenberg, S. A., Restifo, N. P. (2006). „Adoptive immunotherapy for cancer: building on success”, *Nature Reviews Immunology*, **6**(5), 383–393.
- [3] Tang, C., Ang, B. T., & Pervaiz, S. (2007). „Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy”, *The FASEB Journal*, **21**(14), 3777–3785.
- [4] Oldham, R. K. (1986). „Biotherapy: The fourth modality of cancer treatment”, *Journal of Cellular Physiology*, **129**(S4), 91–99.
- [5] Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., & González Barón, M. (2003). „Classification of anticancer drugs—a new system based on therapeutic targets”, *Cancer Treatment Reviews*, **29**(6), 515–523.
- [6] Müller, I., Niethammer, D., & Bruchelt, G. (1998). „Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review)”, *International Journal of Molecular Medicine*, **1**(2), 491–494
- [7] C. Gilladoga, C. Manuel, C. T. C. Tan, N. Wollner, S. S. Sternberg, M. L. Murphy.- 1976 „The cardiotoxicity of adriamycin and daunomycin in children,” *Cancer*, **37**(52), 1070-1078.
- [8] Zhou, Y.-L., Yao, Q.-M., Zhou, J., Chang, Y., Li, J.-L., Wang, Y.-Z., ... Ruan, G.-R. (2018). „Synergistic antitumoral efficacy of a novel replicative adenovirus SG611-PDCD5 and daunorubicin in human leukemic cells”, *OncoTargets and Therapy*, **11**, 5121–5132.
- [9] Pierre A. Stryckmans, Joseph Manaster, Françoise Lachapelle, and Mireille Socquet (1973). „Mode of Action of Chemotherapy In Vivo on Human Acute Leukemia. I. DAUNOMYCIN”, *The Journal of Clinical Investigations*, **52**, 126-133
- [10] Gewirtz, D. (1999). „A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin”, *Biochemical Pharmacology*, **57**(7), 727–741.
- [11] G. Minotti, A. F. Cavaliere, A. Mordente, M. Rossi, R. Schiavello, R. Zamparelli, G. Possati. (1995). „Secondary alcohol metabolites mediate iron delocalization in cytosolic fractions of myocardial biopsies exposed to anticancer anthracyclines,” *Journal of Clinical Investigation*, **95**(4), 1595–1605.

- [12] Holton, C. P., Lonsdale, C. D., Nora, A. H., Thurman, W. G., & Vietti, T. J. (1968). „Clinical study of daunomycin (NSC-82151) in children with acute leukemia” *Cancer*, **22**(5), 1014–1017.
- [13] Levine, N., & Greenwald, E. S. (1978). „Mucocutaneous side effects of cancer chemotherapy”, *Cancer Treatment Reviews*, **5**(2), 67–84.
- [14] Valcovici, M., Andrica, F., Serban, C., & Dragan, S. (2016). „Cardiotoxicity of anthracycline therapy: current perspectives”, *Archives of Medical Science*, **2**, 428–435.
- [15] Bassar, R. L., & Green, M. D. (1993). „Strategies for prevention of anthracycline cardiotoxicity” *Cancer Treatment Reviews*, **19**(1), 57–77.
- [16] Steinherz, L. J. (1991). „Cardiac Toxicity 4 to 20 Years After Completing Anthracycline Therapy” *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, **266**(12), 1672.
- [17] Vrettos, E. I., Mező, G., & Tzakos, A. G. (2018). „On the design principles of peptide–drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site”, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **14**, 930–954.
- [18] Gaál, D., & Hudecz, F. (1998). „Low toxicity and high antitumour activity of Daunomycin by conjugation to an immunopotential amphoteric branched polypeptide” *European Journal of Cancer*, **34**(1), 155–161.
- [19] Orbán, E., Mező, G., Schlage, P., Csík, G., Kulić, Ž., Ansorge, P., ... Manea, M. (2010). „In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin–GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin–amino acid metabolites”. *Amino Acids*, **41**(2), 469–483.
- [20] Szabó, I., Manea, M., Orbán, E., Csámpai, A., Bősze, S., Szabó, R., ... Mező, G. (2009). „Development of an Oxime Bond Containing Daunorubicin-Gonadotropin-Releasing Hormone-III Conjugate as a Potential Anticancer Drug”, *Bioconjugate Chemistry*, **20**(4), 656–665.
- [21] Erkki Koivunen, Wadih Arap, Daniel Rajotte, Johanna Lahdenranta and Renata Pasqualini (1999) „Identification of Receptor Ligands with Phage Display Peptide Libraries”, *The Journal of Nuclear Medicine*, **40**(5), 883–888.
- [22] Birhanu, G., Javar, H. A., Seyedjafari, E., & Zandi-Karimi, A. (2017). „Nanotechnology for delivery of gemcitabine to treat pancreatic cancer”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **88**, 635–643.

- [23] Joyce, J. A., Laakkonen, P., Bernasconi, M., Bergers, G., Ruoslahti, E., & Hanahan, D. (2003). „Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis”. *Cancer Cell*, **4**(5), 393–403.
- [24] Shen, Q., Yang, H., Peng, C., Zhu, H., Mei, J., Huang, S., ... Cao, S. (2018). „Capture and biological release of circulating tumor cells in pancreatic cancer based on peptide-functionalized silicon nanowire substrate”, *International Journal of Nanomedicine*, **14**, 205–214.
- [25] Valetti, S., Maione, F., Mura, S., Stella, B., Desmaële, D., Noiray, M., ... Couvreur, P. (2014). „Peptide-functionalized nanoparticles for selective targeting of pancreatic tumor”, *Journal of Controlled Release*, **192**, 29–39.
- [26] Mezo, G., Manea, M., Szabo, I., Vincze, B., & Kovacs, M. (2008). „New Derivatives of GnRH as Potential Anticancer Therapeutic Agents”, *Current Medicinal Chemistry*, **15**(23), 2366–2379.
- [27] Peterson, J. J., & Meares, C. F. (1998). „Cathepsin Substrates as Cleavable Peptide Linkers in Bioconjugates, Selected from a Fluorescence Quench Combinatorial Library”. *Bioconjugate Chemistry*, **9**(5), 618–626.
- [28] Amblard, M., Fehrentz, J.-A., Martinez, J., & Subra, G. (2006). „Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis”, *Molecular Biotechnology*, **33**(3), 239–254.
- [29] Merrifield, R. B. (1963). „Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide”, *Journal of the American Chemical Society*, **85**(14), 2149–2154.
- [30] Benz, H. (1994). „The Role of Solid-Phase Fragment Condensation (SPFC) in Peptide Synthesis”, *Synthesis*, **1994**(04), 337–358.
- [31] Fabrice Guillier, David Orain, Mark Bradley. (2000). „Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry”. *Chemical Reviews*, **100**(6) 2091–2159.
- [32] Fields, G. B., & Noble, R. L. (2009). „Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids”, *International Journal of Peptide and Protein Research*, **35**(3), 161–214.
- [33] Schnölzer, M., Alewood, P., Jones, A., Alewood, D., & Kent, S. B. H. (2007). „In Situ Neutralization in Boc-chemistry Solid Phase Peptide Synthesis”. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **13**(1-2), 31–44.
- [34] Merrifield, R. B. (1964). „Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin*”, *Biochemistry*, **3**(9), 1385–1390.

- [35] Behrendt, R., White, P., & Offer, J. (2016). „Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis”. *Journal of Peptide Science*, **22**(1), 4–27.
- [36] Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D., Logan, C. J., Sheppard, R. C., & Williams, B. J. (1978). „A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids”, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **13**(13), 537–539.
- [37] Kaiser, E., Bossinger, C. D., Colescott, R. L., & Olsen, D. B. (1980). „Color test for terminal prolyl residues in the solid-phase synthesis of peptides”, *Analytica Chimica Acta*, **118**(1), 149–151.

NYILATKOZAT

Név: Kaposvölgyi Anna Márta

ELTE Természettudományi Kar, szak: Kémia Alapszak

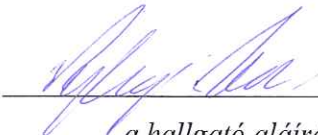
NEPTUN azonosító: IPDBAD

Szakdolgozat címe:

Tumor célzásra alkalmas módosított fág-bemutatós peptid-daunomicin konjugátumok szintézise

A **szakdolgozat** szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam, mások által írt részeket a megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

Budapest, 2019


a hallgató aláírása