

Sejtadhéziós peptidszarmazékok szintézise daganatgátlás céljából

Szakmai beszámoló

Bevezetés

Az adhéziós kölcsönhatások, amelyek a sejtek között, illetve a sejtek és az őket körülvevő extracelluláris mátrix (ECM) között alakulnak ki, fontos élettani szerepet játszanak, mind az egészséges, mind a kóros biológiai folyamatokban. Az adhéziós kölcsönhatásokat a sejtek felszínén levő ún. sejtadhéziós molekulacsaldók, az immunoglobulinok, cadherineek, szelektinek és integrinek közvetítik (1).

A sejtadhéziós molekulák egyik legnagyobb csoportját az integrin receptorok alkotják, amelyek különböző α és β alegység asszociációjával kialakult heterodimer glikoprotein szerkezettel rendelkeznek. Csoptosításuk a β alegység alapján történik, de mindkét alegység hozzájárul a ligand specificitásához. A sejtadhéziós kölcsönhatások jelentősége akkor vált nyilvánvalóvá, amikor kiderült, hogy a legtöbb esetben a kölcsönhatás során nemcsak egyszerű fizikai adhézió, hanem emellett jelátvitel is történik. Így magyarázhatóvá vált számos olyan - integrinek által közvetített - bonyolult biológiai esemény is, mint pl. az immunválasz bekövetkezése, a szöveti rendeződés, a rosszindulatú folyamatok előrehaladása, stb.

A daganatáttétel kialakulásában két fizikai folyamat játszik döntő szerepet, az egyik az adhézió, a másik a migráció. A daganatos sejtnak először oda kell jutnia és meg kell tapadnia a primer daganat, ill. a daganatos szervet körülvevő extracelluláris mátrixon, majd le kell bontania ezt az akadályt, hogy kijuthasson a környező szövetekbe és eljusson az erekhez. Az érfal külső részén újra meg kell tapadnia, majd át kell rágnia magát azon, hogy bejuthasson a keringésbe. Ahhoz, hogy a rákos sejt egy új helyen ismét daganatot képezzen, ki kell jutnia a keringésből, ami hasonló adhéziós és enzimes lépéseken keresztül történik meg, mint a bejutás.

Ahhoz, hogy a primer daganat, valamint az áttét növekedhessen, nem elég a rákos sejt szaporodásának beindulása, hanem az új daganat növekedéséhez szükséges tápanyagok szállításához érrendszernek is ki kell alakulnia. Ez utóbbi folyamat az angiogenezis. Az újonnan kialakult véreerek azon kívül, hogy a primer daganatot táplálják, utat nyitnak a daganatos sejtek számára, hogy eljuthassanak a szervezet más helyeire is, és ott megtelepedjenek. Az angiogenezis folyamatában a növekedési faktorok, citokínek és proteinázok mellett, a szaporodásnak indult endotél sejtek falán kifejeződik az $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor, ami a sejteknek az ECM-hez való kötődését biztosítja. Az angiogenezis gátlásának egyik lehetséges módja az újonnan képződött véredények falán levő endotél sejtek és az ECM közötti kölcsönhatás megszüntetése az integrin receptorok blokkolásával, aminek következtében az endotél sejtek apoptózisa, majd az érrendszer elpusztulása következik be, meggátolva ily módon a daganat további növekedését, ill. az áttétel kialakulását.

Nem csak az $\alpha_v\beta_3$, hanem az $\alpha_5\beta_1$ integrin receptor is fontos szerepet játszik a sejtek vándorlásában, a metasztázisok kialakulásában, így pl. humán melanoma sejtek inváziójában is [2]. Következésképpen ez a receptor is támadási pontot jelent a melanoma sejteken, ami szelektív $\alpha_5\beta_1$ receptor ligandum, ill. megfelelő származéka segítségével célzottan támadható.

Úgy véljük, hogy az integrin receptor antagonistákkal elérhető citosztatikus hatás fokozható oly módon, hogy az antagonista sejtadhéziós peptidet már ismert, hatékony citosztatikummal konjugáljuk.

A pályázati szerződés munkatervében vállalt program

Az integrin receptorok ligandumai többségükben az arginil-glicil-aszparaginsav (RGD) sejtadhéziós szekvenciát tartalmazzák, de az újabb kutatások során egyéb sejtadhéziós kis peptideket is felfedeztek.

RGD-tartalmú lineáris és ciklusos peptidek szerkezete és receptor szelektivitása közötti összefüggéseket részletesen tanulmányozták. Ezeknek vizsgálatoknak a során fény derült arra, hogy az RGD-peptideknek a különböző integrin receptorokhoz való affinitását az arginin bázikus és az aszparaginsav savas oldallánca közötti távolság szabja meg, ami jelentős mértékben változik különböző tagszámú ciklopeptidek esetében. Az irodalmi előzményeknek az ismeretében pályázati munkánk általános célkitűzése, integrin receptorszelektív ligandumok, származékaik és mimetikumaik szintézise volt daganatgátlás céljából az alábbi felbontásban:

1. RGD szekvenciát tartalmazó lineáris és ciklusos peptidek szintézise
2. RGD szekvenciát tartalmazó lineáris és ciklusos peptidek citosztatikummal képezett konjugátumainak szintézise
3. Egyéb sejtadhéziós szekvenciát tartalmazó peptidek és származékaik szintézise
4. RGD-mimetikumok tervezése és szintézise
5. A sejtadhéziós peptidek és származékaik biológiai vizsgálata külső partnerekkel kooperációban.

A kutatás eredményei

1. RGD szekvenciát tartalmazó lineáris és ciklusos peptidek szintézise

$\alpha_v\beta_3$ integrin receptorszelektív ligandumként ill. a citosztatikum hordozójaként lineáris és ciklikus RGD-peptideket választottunk [3].

Lineáris peptidek közül az $\alpha_v\beta_3$ integrin receptorszelektív H-VRGDf-NH₂ szekvenciát vettük alapul és előállítottuk acetilezett származékát is (AcVRGDf-NH₂), hogy megvizsgálhassuk vajon a szabad aminocsoport szubsztitúciója megváltoztatja-e az eredeti peptid integrin receptorfelismerő sajátosságát, illetve az $\alpha_v\beta_3$ szelektivitást. Kontrollként nem $\alpha_v\beta_3$ -receptorspecifikus RGD-peptidet (RGDLG-NH₂) és annak acetilezett származékát (Ac-RGDLG-NH₂) is elkészítettük.

Ciklopeptidek közül kiindulásul a jól bevált c(RGDfV) peptidet választottuk. Ahhoz, hogy a ciklopeptidhez bármit, a mi esetünkben citotoxikus hatócsoporthoz, hozzákapcsoljunk egy funkciócsoportot tartalmazó oldallánccal bíró aminosavat kell beépíteni. Ez jelen esetben a receptorszelektivitást legkevésbé befolyásoló valin cseréjével oldható meg. Ennek a megfontolásnak az alapján az oldalláncban aminocsoporttal rendelkező lizint illetve diaminopropionsavat (Dap) tartalmazó c(RGDfK) és c(RGDfDap) már ismert ciklopeptid analógokat szintetizáltuk.

További szerkezet és biológiai aktivitás közötti összefüggések vizsgálatának céljaira a *D*-fenilalanint többféleképpen módosítottuk. *p*-Fluor-fenilalanin választását egyrészt az indokolta, hogy az aromás fluorvegyületek könnyebben átjutnak a lipid membránra, másrészt pedig a *p*-fluor-fenilalanin antimetabolitként önmagában is rendelkezik citosztatikus hatással. Egy elektronszívó illetve egy elektrondonor csoport hatása vizsgálható *p*-nitro-fenilalanin illetve *p*-amino-fenilalanin beépítésével, ráadásul ez utóbbi aminocsoportján tovább derivatizálható. Előállítottuk tehát a c(VRGD*p*NO₂f) [*p*NO₂f: *p*-nitro-*D*-fenilalanin], a c(VRGD*p*NH₂f) [*p*NH₂f: *p*-amino-*D*-fenilalanin] és a c(VRGD*p*FF) [*p*FF: *p*-fluor-*D,L*-fenilalanin] ciklopeptideket. A c(VRGD*p*FF) származék epimer peptidpár volt, mert racém *p*-

fluor-fenilalanint használtunk a szintézis során, a keletkező epimer peptideket HPLC segítségével elválasztottuk.

Az RGD-peptidek angiogenezist gátló hatásának mechanizmusára többféle elképzelés létezik, nevezetesen nem biztos, hogy a direkt adhéziógátlás a felelős egyértelműen a sejtek apoptózisáért, hanem az is elképzelhető, hogy az RGD-peptidek a sejten belül a kaszpáz-3 enzim aktiválásán keresztül fejtik ki hatásukat [4]. Ezért, és a továbbiakban a citotoxikus hatás mechanizmusának megismeréséhez is szükséges tudni, hogy a vegyületek bejutnak-e a vizsgált sejtekbe. Ezt a kérdést jelzett peptidek vizsgálatával lehet eldönteni. Erre a célra többféle peptidszármazékot szintetizáltunk, ügyelve arra, hogy a fluoreszcens jelzést lehetőleg a molekula azon részén hajtsunk végre, amely kevésbé fontos a receptorfelismerő sajátság szempontjából. Első közelítésben a c(DapRGDf) aminocsoportján danzilezett származékát készítettük el, amely azonban nem bizonyult megfelelőnek a mikroszkópos vizsgálatokhoz. A továbbiakban két irányba haladtunk, egyfelől a ciklopeptidet 5,6-karboxi-fluoreszcenccel jelöltük, másfelől pedig előállítottuk a rádioaktív jelzésre alkalmas c(YRGDf)-t.

A lineáris peptidek előállítása szilárdfázisú peptidszintetikus módszerrel, a szekvenciának megfelelően Boc vagy Fmoc technikával, a peptidek ciklizálása, pedig oldatfázisban történt. A termékek tisztaságának vizsgálatát HPLC analízissel, azonosítással pedig tömegspektrometriával végeztük.

2. RGD szekvenciát tartalmazó lineáris és ciklusos peptidek citosztatikummal képezett konjugátumainak szintézise

A konjugátumok elkészítéséhez olyan citosztatikumot kellett választani, amelyik egyszerűen kapcsolható a hordozóként tervezett peptidek amino funkciós csoportjához. Korábbi tapasztalataink alapján erre a célra a Melfalán (*p*-bisz(2-klóretilamino)-fenilalanin), a Klorambucil (4-[*p*-bisz(2-klóretilamino)fenil]-vajsav), és a BCNU (N,N'-bisz(2-klóretil)-N-nitrozó-karbamid) N-(2-klóretil)-N-nitrozó-karbamoil hatócsoportha alkalmas.

A Melfalán (Mel) és a Klorambucil (Clb) karboxilcsoportja révén többféle peptidszintetikus módszerrel is kapcsolható peptidek α - vagy oldallánc-aminocsoportjához. Mi a Mel és a Clb pentafluorfenilészterét készítettük el és segítségével szintetizáltuk a lineáris Clb-VRGDf-NH₂ és Mel-RGDLG-NH₂ származékokat, valamint a gyűrűs c[Dap(Cl b)RGDf] és c[K(Cl b)RGDf] származékokat.

A BCNU konjugátumot - c[Dap(Q)RGDf] (Q: ClCH₂CH₂N(NO)-) - a ciklopeptidnek N-(2-klóretil)-N-nitrozó-karbaminsav pentafluorfenilészterrel történő acilezésével állítottuk elő.

3. Egyéb sejtadhéziós szekvenciát tartalmazó peptidek és származékaik szintézise

3.1. NGR-peptidek; szerkezet- és bomlásvizsgálat

Az RGD-n kívül egyéb sejtadhéziós peptidek is ismeretesek. Különösen említésre méltó az elsősorban $\alpha_5\beta_1$ integrin receptorokhoz gyakran kötődő NGR motívum, amelyet peptid fágterek segítségével először a lineáris NGRAHA szekvenciában fedeztek fel. A lineáris NGR szekvencia három nagyságrenddel kisebb affinitással kötődik az integrin receptorokhoz, mint az RGD szekvencia, az IC₅₀ értéke 10⁻⁵ M $\alpha_v\beta_3$ és $\alpha_5\beta_1$ esetében is. A CVLNGRMEC ciklopeptid azonban már lényegesen jobban kötődik az $\alpha_5\beta_1$ -hez, IC₅₀ 10⁻⁷ M, vagyis úgy tűnik, hogy az RGD-peptidekhez hasonlóan a ciklizálás során ez a peptid is olyan konformációt vesz fel, ami kedvező elrendezésben tartalmazza a receptorral kölcsönható aminosav oldalláncokat [5].

Ennek a megfigyelésnek az alapján kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a ciklus további szűkítése fokozza-e az NGR-peptidek affinitását az $\alpha_5\beta_1$ integrin receptorhoz? Ennek a kérdésnek a vizsgálata számunkra azért is érdekes, mert peptideink citosztatikus hatásának vizsgálatát humán melanoma sejteken terveztük, és az $\alpha_5\beta_1$ receptor éppen a melanoma sejtek inváziójában, és a metasztázisok kialakulásában, játszik fontos szerepet.

Lineáris szekvenciaként az Ac-LNGRV-OH-t, gyűrűs peptidként diszulfidhidas H-CNGRCV-NH₂-ot, valamint c(LNGRV)-t és c(LNGRv)-t szintetizáltunk. Az utóbbi peptidbe az NGR adhéziós szekvencia után a D-valint a c(RGDfV) analógiájára építettük be, amelyben az RGD adhéziós szekvenciát szintén egy D-aminosav követi. Általában L-aminosavak D-aminosavakra történő cseréje konformációváltozást idéz elő a peptidekben. Kontrollként előállítottuk a c(LDGRV)-t, amiben a DGR az RGD retropeptidjének tekinthető.

A c(LNGRV) és c(LNGRv) NMR-rel és MD-val, szemiempírikus és *ab initio* módszerekkel való szerkezet meghatározása során kiderült, hogy oldatban mindkét peptid nagyon flexibilis és számos konformációt képes felvenni, ezért esetükben különösebb receptorselektivitás nem várható.

Közismert, hogy peptidekben és proteinekben az aszparagin dezamidálódása – és a peptidkötés hasadása – már enyhe körülmények között, vagy akár állás közben is spontán lejátszódik. Tekintettel arra, hogy az ismételt receptorkötődési vizsgálatok eredményei nem voltak egyértelműek, arra gondoltunk, hogy a peptidek oldatában a biológiai vizsgálatok során dezamidálódás játszódik le. A két ciklopeptid stabilitását pH 7.4-en ammónium-acetát pufferben vizsgáltuk szobahőmérsékleten HPLC analízissel. Az oldat tömegspektrometriás vizsgálata a várt molekulatömeg mellett eggyel nagyobb tömegszámú komponens jelenlétét is kimutatta, ami a hidrolízis lejátszódását utalt. A c(LNGRV) bomlása során keletkező aszpartil-peptidet a kontrollként előállított c(LDGRV) segítségével azonosítottuk a HPLC diagramon. Furcsának tűnt azonban, hogy a HPLC képen nem észleltük az izoaszpartil-peptidet, holott ennek a képződése a tapasztalat szerint nagyobb arányú, mint az aszpartil-peptidé. Részletes HPLC-MS analízis segítségével rátaláltunk egy, a kiindulási ciklopeptiddel majdnem azonos retenciós idővel jelentkező csúcsra, amely tömege alapján c(Leu- β -Asp-Gly-Arg-Val)-nak felelt meg. MS mérés szerint a hidrolizált komponens kimutatható a mélyhűtőben tárolt, HPLC-n egyetlen csúcsot adó, liofilizált mintában is.

Ennek a bomlásvizsgálatnak az eredményei arra hívják fel a figyelmet, hogy az NGR szekvenciát tartalmazó peptidek tisztaságának ellenőrzésére nem elegendő a HPLC analízis, hanem ezt tömegspektrometriával is ki kell egészíteni, mert előfordulhat, hogy az egyik hidrolízis termék, jelen esetben az izoaszpartil-peptid a kiindulási aszparaginil-peptiddel együtt eluálódik.

A bomlásvizsgálatok eredményeit azért is érdekesnek tartjuk, mert az NGR motívum nemcsak integrin receptor ligandumként működik, hanem hajlamos bizonyos tumorokban történő “letelepedésre” is és ez a sajátága különösen vonzóvá teszi hordozó szerep betöltésére is. Tekintettel arra, hogy ezek a biológiai mérések, különösen *in vivo* körülmények között, viszonylag hosszú ideig tartanak, a fenti eredmények kapcsán úgy gondoljuk, jogosan vetődik fel a kérdés, hogy valójában mi is a hatékony molekulaszervezet?

3.2. Obtustatin szekvenciák szintézise

A kígyómérgek családjába tartozó disintegrinek bizonyos integrin receptorok hatékony antagonistái. A 2003-ban izolált obtustatin mindössze 41 aminosavból áll és az integrinhez kötődő szerkezeti részletében nem található meg az általános sejtadhéziós RGD peptid. A szerkezetvizsgálatok eredményei alapján ennek a szekvenciának a szerepét a KTS motívum játssza. Az obtustatin az $\alpha_1\beta_1$ integrin receptor szelektív antagonistának bizonyult és *in vivo*

körülmények között angiogenezisgátló hatással rendelkeznek [6]. Ez a felfedezés azért érdekes, mert egy új megközelítést kínál az angiogenezis inhibitorok tervezéséhez.

Első közelítésben előállítottuk az Ac-KTS-NH₂-t, valamint két ciklopeptidet, nevezetesen c(KTSLG)-t és c(KTSIG)-t. Az *L*-*D*-aminosavcserét a ciklusos NGR-peptideknél alkalmazott megfontolást követve hajtottuk végre.

4. RGD-mimetikumok tervezése és szintézise

A peptidmimetikumok olyan nem peptidjellegű vegyületek, amelyek valamilyen biológiailag aktív peptid receptorához képesek kötődni és ott antagonistá vagy agonista hatást fejtenek ki. A velük szemben támasztott legfontosabb követelmények a metabolikus stabilitás és az orális felszívódás. Számos szerkezeti lehetőség közül, mi az RGD farmakofórájainak elhelyezésére templátként a diketopiperazinvázat választottuk, amely egy viszonylag merev, enzimrezisztens, hidrogénhidás kölcsönhatások kialakítására képes, aránylag könnyen előállítható molekula.

Ennek alapján az RGD szekvencia potenciális mimetikumaiként, a glicin kihagyásával, az irodalomban tudomásunk szerint eddig még le nem írt Arg-Asp, Arg-Glu és c[Arg-Asp(Phe-OH)] diketopiperazinok szintézisét kívántuk megvalósítani. Ezekkel a vegyületekkel az integrin receptorokhoz való kötődésben alapvető szerepet játszó guanidino és karboxil csoportok közötti távolság növelésének katasát vizsgálhatjuk.

Az Arg-Asp ill. az Arg-Glu diketopiperazinok oldatfázisú szintéziséhez előállítottuk a Boc-Arg(Tos)-Glu(OBzl)-OMe-t és a Boc-Arg(Tos)-Asp(OBzl)-OMe-t, amelyekről a Boc-védőcsoportot sósavas dioxánnal hasítottuk le, majd az így kapott H-Arg(Tos)-Glu(OBzl)-OMe.HCl és a H-Arg(Tos)-Asp(OBzl)-OMe.HCl gyűrűzárását végeztük el az általánosan használt NH₃/metanol módszer segítségével [7]. Meglepetésünkre a tömegspektrometriás mérés adatai mindkét esetben diketopiperazin metilészter keletkezését jelezték. A mért értékek alapján úgy tűnt, hogy a gyűrűzáródás a glutaminsav γ -, illetve az aszparaginsav β -karboxilcsoportján keresztül történt nyolctagú, illetve héttagú ciklus képződésével. A gyűrűk szerkezetének megállapítására mindkét esetben nmr vizsgálatokat végeztünk.

Miután az nmr vizsgálatok eredményei alapján egyértelművé vált, hogy az aminosavak oldalláncának benzilésztere metilészterre alakul át, arra voltunk kíváncsiak, hogy az átésztereződés a dipeptidészterek ciklizálása előtt vagy után játszódik-e le? A H-Arg(Tos)-Asp(OBzl)-OMexHCl-t ammóniás metanolban oldottuk és a reakcióelegyből időközönként mintákat vettünk, amelyeket vékonyrétegekromatográfiás analízisnek vetettünk alá. Ebből arra következtettünk, hogy az átésztereződés döntő mértékben a gyűrűzáródás után játszódik le. Ezt a megfigyelést a ciklizálási reakció 1 óra után történő megszakítása után mért nmr spektrum is alátámasztotta.

Az ammónia/metanolos ciklizálást más oldallánc védőcsoport jelenlétében is elvégeztük, így H-Arg(Tos)-Glu(OBu¹)-OMexHCl és H-Arg(Tos)-Glu(OcHex)-OMexHCl esetében, de átésztereződést egyik esetben sem tapasztaltunk, .

Diketopiperazinok előállíthatók ecetsavkatalízissel is oly módon, hogy a dipeptidészter hidrokloridot ekvivalens *N*-methylmorfolin jelenlétében 0.1 M ecetsav-2-butanol elegyében forralják [8]. A fent vázolt átésztereződés elkerülésére a H-Arg(Tos)-Asp(OBzl)-OMe.HCl ciklizálására mi is kipróbáltuk ezt az eljárást, esetünkben azonban a VRK tanúsága szerint 3 órás forralás után is volt még a reakcióelegyben számottevő mennyiségű dipeptidészter, az oldat pedig megbarnult.

A bázis alkalmazásának elkerülésére a Boc-Arg(Tos)-Asp(OBzl)-OMe-ről a Boc védőcsoportot hangyasavas kezeléssel távolítottuk el, majd a hangyasav ledesztillálása után a H-Arg(Tos)-Asp(OBzl)-OMexHCOOH-t toluol-szek. butanol elegyében forraltuk [9]. A termék szerkezete az nmr adatok és a tömegspektrum szerint c[Arg(Tos)-Asp(OBzl)]. A HPLC segítségével elválasztott komponensek tömegspektrometriás vizsgálataival

szennyeződésként H-Arg(Tos)-Asp(OBzl)-OMe-t H-Arg(Tos)-Asp-OMe-t és For-Arg(Tos)-Asp(OBzl)-OMe-t azonosítottunk.

Az oldatfázisú szintéziseknél tapasztalt nehézségek miatt végül a szilárd fázison előállított dipeptidek - H-Arg(Tos)-Asp(OBu^t)-O-PAM és H-Arg(Tos)-Glu(OBu^t)-O-PAM] - 0.1 M ecetsav/diklórometánnal történő kezelésével egy lépésben értük el a gyantáról történő lehasadást és a diketopiperzinná történő gyűrűzáródást. A c[Arg(Tos)-Asp(OBu^t)] és a c[Arg(Tos)-Asp(OBu^t)] védőcsoportjait hidrogénfluoriddal távolítottuk el.

A c[Arg-Asp(Phe-OH)] előállítása során a c[Arg(Tos)-Asp(OBu^t)]-ról lehasítottuk a *terc*-butilészter védőcsoportot, majd az így kapott termékkel acileztük a H-Phe-OBzl-t. Az összes védőcsoport eltávolítása ebben az esetben is HF-dal történt.

5. A sejtadhéziós peptidek és származékaik biológiai vizsgálata külső partnerekkel kooperációban

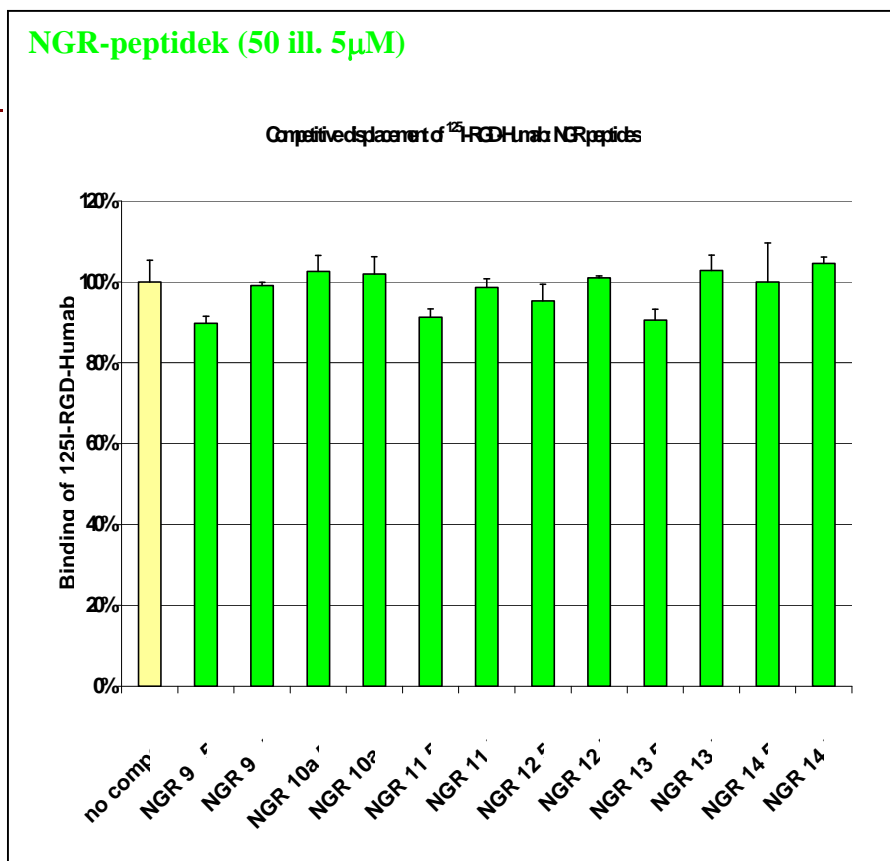
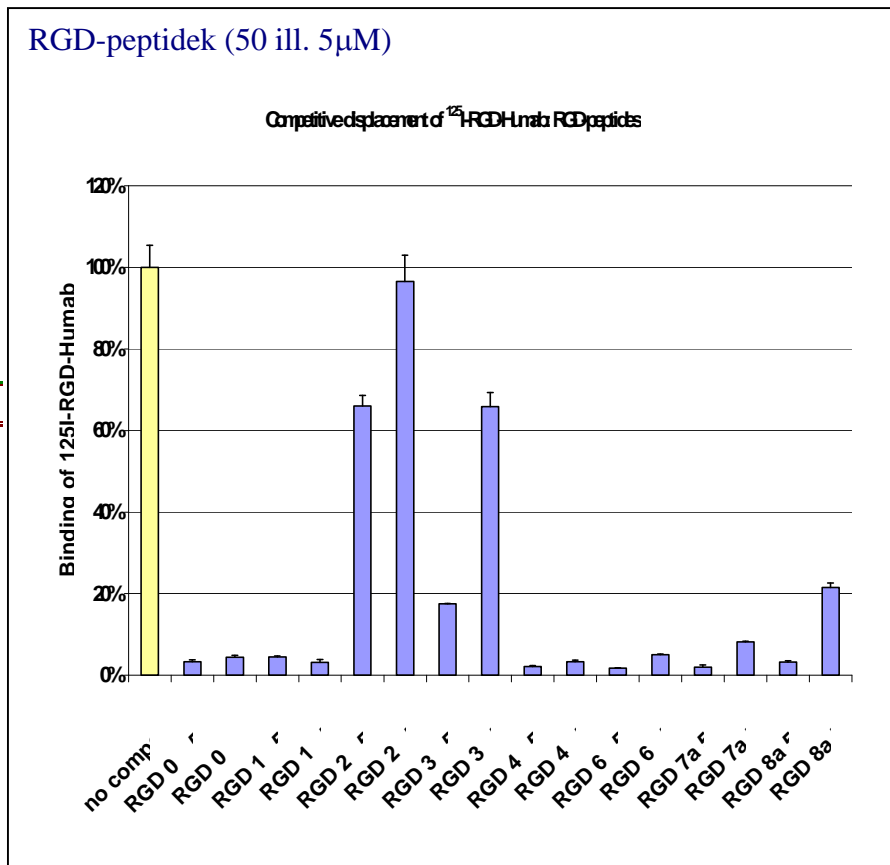
1. ábra. RGD- és NGR-peptidek és származékaik kötődése $\alpha_v\beta_3$ integrin receptorhoz ^{125}I -dal jelzett ligandum (RGD-protein) kompetitív leszorításával (partner: Kok RJ, Groningen University, Hollandia)

Code	Compounds
RGD 0	c(K(ata)RGDf) (control)
RGD 1	c(VRGDf)*TFA
RGD 2	c(FDGRV)*TFA
RGD 3	c(VRGD(pF-F))*TFA
RGD 4	c(VRGD(pF-f))*TFA
RGD 6	c(DapRGDf)*2HCl
RGD 7.a	c(K(Cl)b)RGDf)*HCl
RGD 8.a	c(Dap(Cl)b)RGDf)*HCl
NGR 9	Ac-LNGRV-OH*TFA
NGR 10.a	Clb-LNGRV-OH*HCl
NGR 11	H-CNGRVC-NH2*TFA
NGR 12	c(LNGRV)*TFA
NGR 13	c(LNGRv)*TFA
NGR 14	c(KNGRV)*2TFA

Következtetés

A ciklikus RGD-peptidek –az RGD 2 „retro szekvencia” és az RGD 3, feltehetően L-p-fluor- fenilalanint tartalmazó analóg kivételével - várakozásunknak megfelelően a természetes ligandummal megegyező mértékben kötődnek az $\alpha_v\beta_3$ receptorhoz.

Az NGR-peptidek nem mutatnak affinitást az $\alpha_v\beta_3$ receptorhoz és az eredmények arra utalnak, hogy az NGR szekvencia pentapeptid gyűrűbe való zárásakor kialakult, az nmr vizsgálatok szerint flexibilis térszerkezet sem felel meg a receptor által preferált konformációnak.



1. táblázat. RGD-peptidek és származékaik hatása humán köldökvéna sejtek (HUVEC) proliferációjára és vitronektinhez történő adhéziójára (partner: Giavazzi R. Mario Negri Institute, Bergamo, Olaszország)

Peptid	HUVEC proliferáció		HUVEC adhéziója vitronektinhez ($\alpha_v\beta_3$)	
	0.001..100 μ M (72 h assay)		0.1..300 μ M (90 min assay)	
	Gátlás (%)	IC ₅₀ (μ M)	gátlás (%)	IC ₅₀ (μ M)
Clb (Chlorambucyl)	68	35		
Mel (Melfalan)	88	29		
Ac-RGDLG-NH ₂ ×TFA*	24	-	28	-
Mel-RGDLG-NH ₂ ×HCl	37	-	n.d.	
Ac-VRGDf-NH ₂ ×TFA	10	-	24	-
Clb-VRGDf -NH ₂ ×HF	38	-	n.d.	
c(DapRGDf) ×TFA	n.d.		n.d.	
c[Dap(Cl b)RGDf] ×HCl	80	18	n.d.	
c(KRGDf)×2TFA	38	-	95	33
c[K(Cl b)RGDf] ×HCl	39	-	n.d.	
c(VRGDf) ×TFA (Kontroll peptid)	90	19	89	20

Következtetés

A lineáris peptidek nem befolyásolják a HUVEC vitronektinhez történő adhézióját. A gyűrűs RGD-peptidek, illetve származékaik viszont a c(RGDfV) vezérmolekulához hasonlóan, gátolják az adhéziót, vagyis az alkilezőszerrel történő kombinálás nem befolyásolja a hordozó peptid integrin receptorhoz való kötődését.

A ciklopeptidek és alkilező származékaik fokozottabb sejtproliferáció gátlással rendelkeznek, mint a lineáris peptidek. A ciklopeptidek adatainak összehasonlításakor viszont az derül ki, hogy a c[Dap(Cl b)RGDf] ugyanolyan hatással bír mint a c(RGDfV), tehát úgy tűnik, hogy, az alkilező csoport nem fokozza a hordozó molekula citotoxicitását. A ciklopeptidek proliferációgátlása HUVEC esetében nem meglepő, hiszen egészséges sejtekről van szó, amelyek a sejt-ECM közötti kapcsolat megszüntekor apoptózist szenvednek. Az a megfigyelés, hogy az alkilezőszerrel kombinált peptidek nem fokozzák a sejtek pusztulásának mértékét többféleképpen magyarázható, pl. úgy, hogy valamilyen oknál fogva az alkilező molekularész el sem jut a DNS-hez, illetve erre nincs is szükség, hiszen az adhéziós kölcsönhatás megszűnése már előidézte a sejtpusztulást.

RGD-peptidek és származékaik vizsgálata tumorsejteken

A következő kísérletsorozatban a ciklopeptidek és klorambucil származékaik sejtproliferáció gátlását kétféle, egy lassabban (LND1) és egy gyorsabban (HBL) szaporodó humán melanoma sejtvonalon vizsgálták. Ebben a kísérleti elrendezésben is megfigyelhető a ciklopeptidek sejszaporodást gátló hatása, főleg a HBL sejtvonalon. Érdekesnek tartjuk, és pillanatnyilag még nincs kísérleti adatunk arra vonatkozóan, hogy a ciklopeptidek önmagukban miért gátolják a melanoma sejtek szaporodását? Az általunk feltételezett mechanizmus vizsgálata jelenleg is folyik (partner Ghanem, G. Free University of Bruxelles, Belgium).

A BCNU-konjugátum citosztatikus hatását 12 különböző tumor sejtvonalon vizsgálták. Az in vitro kísérletekben a BCNU általában jobban gátolta a sejszaporodást mint a konjugátum, amely leghatékonyabbnak melanoma sejteken bizonyult (partner: Smith, V. Oncotest GmbH Freiburg, Németország).

2. táblázat. Természetes integrin receptor ligandumok receptorkötődésének gátlása diketopiperazinokkal

Vegyületek	IC ₅₀ (μ M) fibrinogén/ $\alpha_{IIb}\beta_3$	IC ₅₀ (μ M) Vitronectin/ $\alpha_v\beta_3$
c(Arg-Asp)	-	42
c(Arg-Glu)	-	480
c[Arg-Asp(Phe-OH)]	159	0.7

Következtetés

A vitronectin receptorhoz már az egyszerű c(Arg-Asp) is kötődik, a c(Arg-Glu) egy nagyságrenddel kevésbé, míg a c[Arg-Asp(Phe-OH)] két nagyságrenddel erősebben kötődik.

A különböző RGD-peptidek integrin receptor szelektivitását, mint azt a bevezetőben írtuk az arginin guanidino és az aszparaginsav karboxilcsoportja közötti távolság szabja meg. Az $\alpha_v\beta_3$ receptort c(RGDfV)-vel kristályosították és a röntgenkrisztallográfiával meghatározott szerkezetből megállapítható a funkciócsoportok egymástól való távolsága. Szemiempírikus geometriai optimalizálás segítségével kiszámítottuk, hogy nyújtott konformáció esetén a c(Arg-Asp)-ban is kialakulhat ez a távolság, ami a ligandum és a receptor közötti hidrogénhidás kölcsönhatást biztosítja, így érthető, hogy ez a nagyon leegyszerűsített mimetikum is kötődik. Még kedvezőbb a helyzet a flexibilisebb fenilalanin származéknál, míg a c(Arg-Glu)-ban éppen rossz helyzetbe kerülnek a karbonil és a guanidino csoportok.

A fibrinogén receptorhoz való gyenge kötődés arra utal, hogy ezek a mimetikumok nem felelnek meg ezen receptor által támasztott követelményeknek.

Záró megjegyzések

Az RGD-mimetikumok terén végzett munkánkat összefoglaló közleményt a Journal of Peptide Science-be elküldtük (Nikolett Mihala, Janez Ilaš, Robert Kiss, Antal Csámpai^b and Helga Süli-Vargha: The synthesis of alternative diketopiperazines as potential RGD mimetics)

Az RGD-származékok sejtszaporodást gátló hatásának vizsgálatai a biológus partnerek késlekedése - különböző, rajtunk kívülálló okok - miatt még nincsenek publikálás alatt.

Irodalomjegyzék

1. Albelda SM, Buck CA.: Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB J. 4, 2868 (1990).
2. Seftro REB, Seftor EA, Stetler-Stevenson WG, Hendrix MJC. The 72 kDa type IV collagenase is modulated via differential expression of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins during human melanoma cell invasion. Cancer Res. 53, 3411 (1993).
3. Haubner R, Finsinger D, Kessler, H.: Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ integrin for a new cancer therapy. Angew. Chem. Int. Ed. 36, 1374 (1997).
4. Buckley DC, Pilling D, Henriquez NV et al.: RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. Nature 397, 534 (1999).

5. Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E.: Isolation of a highly specific ligand for the $\alpha_5\beta_1$ integrin from a phage display library. *J. Cell. Biol.* 124, 373 (1994).
6. Marcinkiewicz C, Weinreb PH, Calvete JJ, et al. Obtustatin: a potent selective inhibitor of $\alpha_1\beta_1$ integrin in vitro and angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 63, 2020 (2003).
7. Fischer E.: Synthese von Polypeptiden.XV. *Chem. Ber.* 39, 2893 (1906).
8. Suzuki K, Sasaki Y, Endo N, Mihara Y.: Acetic acid-catalyzed diketopiperazine synthesis. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 233 (1981).
9. Nitecki DE, Halpern B, Westley JW. J.: A simple route to sterically pure diketopiperazines. *Org.Chem.* 33, 864 (1968).