

Hatékony tumorellenes készítmények előállítása target és drug molekulák kombinációjával

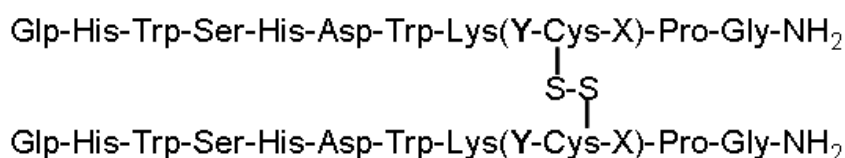
(Zárójelentés)

Prof. Dr. Mező Gábor
tudományos tanácsadó

Kutatásunk célja az volt, hogy olyan biokonjugátumokat készítsünk, amelyek segítségével növelhetjük a rákellenes hatóanyagok tumorszelektivitását. Ezért olyan molekulákhoz kívántuk kapcsolni a gyógyászatban is alkalmazott drogokat (pl. daunorubicin, doxorubicin, metotrexát), amelyek a tumorsejteken nagy mennyiségben megtalálható receptorokhoz kötődhetnek. Az egyik célreceptor a GnRH receptor volt, amely számos rákos sejten túltermelődik és expresszálódik a sejtmembránon, míg a normál sejtek többségén nem, vagy csak kis mennyiségben fordul elő. Ezen a különbségen alapulhat a GnRH molekulákhoz kapcsolt hatóanyagok fokozott szelektivitása, mivel a GnRH-hatóanyag konjugátum ily módon receptor közvetített endocitózissal tud bejutni az adott sejtekbe, míg a kisméretű hatóanyag diffúzióval más egészséges sejtekbe is bejutva, azokra is toxikus hatást fejthet ki. A másik típusú konjugátumunkkal mozgásra képes sejteket (makrofágok, monociták, metasztatizáló ráksejtek) kívántunk célba venni. Ezekkel a vegyületekkel a kemotaxis receptorokon illetve a nemrég neuropilinként azonosított tuftsin receptorokon keresztül terveztük a hatóanyagokat a rákos sejtekbe juttatni. Erre oligotuftsin alapú biokonjugátumokat készítettünk.

1. Gonadotropin-releasing hormon (GnRH) dimer peptidszármazékainak szintézise és vizsgálata:

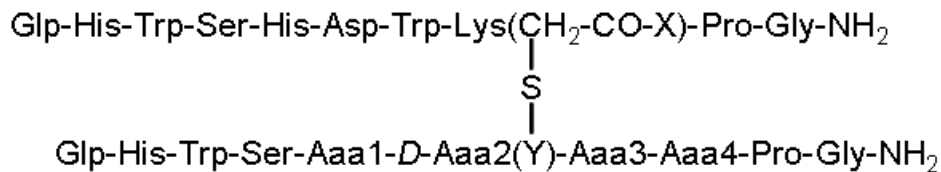
Ehhez a témakörhöz kapcsolódóan előállítottunk szimmetrikus és aszimmetrikus dimer vegyületeket. A dimer származékok tervezése azon a megfigyelésen alapult, hogy a GnRH-III oldalláncában ciszteint tartalmazó származékból (Pyr-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(H-Cys)-Pro-Gly-NH₂) konjugációs reakció során diszulfidhidat tartalmazó dimer vegyület, mint melléktermék keletkezett, és ez a származék az antiproliferációs vizsgálatokban hatékonyabbnak bizonyult, mint a natív GnRH-III. Ezután szisztematikusan tervezett GnRH dimer származékokat állítottunk elő, amelyek szerkezetének részletes bemutatásától eltekintenek, mivel a vegyületek szabadalmi bejelentése folyamatban van. Itt csak a szerkezetek taglalása nélkül mutatnám be az elért eredményeket. A GnRH-III vegyület mellett a 6-os pozícióban módosított GnRH-I (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-X-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) és GnRH-II (Pyr-His-Trp-Ser-His-X-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂) alkalmaztunk dimerek előállítására. A GnRH analógokat szilárdfázisú peptidszintézissel állítottuk elő, majd a szimmetrikus dimereket ciszteint tartalmazó származékokból diszulfidhíd kialakításával oldatban készítettük (1. ábra).



X és Y = különböző aminosavak, peptidek vagy acilcsoportok

1. ábra: GnRH-III diszulfidhidat tartalmazó szimmetrikus dimer származékai

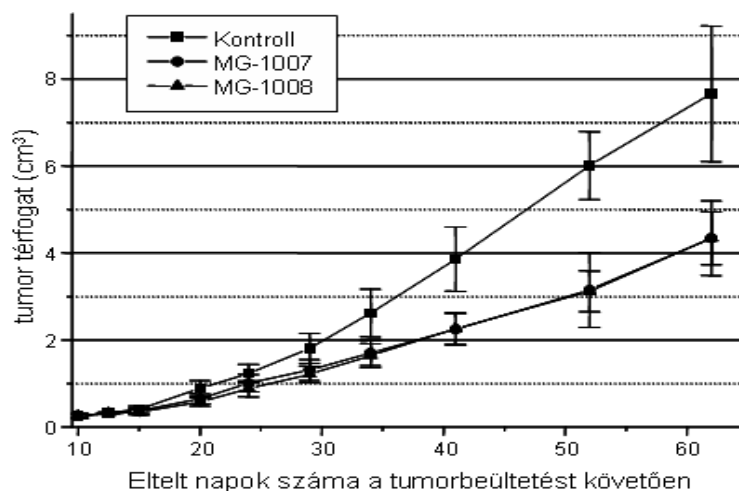
Az aszimmetrikus, vagy vegyes dimereket szelektív kémiai ligációval állítottuk elő oly módon, hogy az egyik komponenst klóracetilztük, és ezt reagáltattuk a ciszteint tartalmazó másik komponenssel (2. ábra). A tioéterkötés kialakítását az indokolta, hogy a diszulfidhidat tartalmazó vegyes dimer vegyületek kémiai és biológiai stabilitása kétséges, már enyhén bázisos és/vagy redukzív közegben átalakulhatnak a sokkal stabilabb szimmetrikus dimerekké. A vegyes dimerekben GnRH-III és GnRH-I vagy GnRH-II származékok kapcsolódtak össze különböző kombinációkban. Elkészítettünk olyan vegyületeket is, ahol a hormon peptid egységeket különböző távtartó egységekkel kapcsoltuk össze, hogy lássuk van-e a biológiai hatás szempontjából szerepe a hormon peptidok távolságának, ami befolyásolhatja, pl. a receptor kötődésüket. Összességében, eddig 15 dimer vegyületet állítottunk elő.



X és Y = különböző aminosavak, peptidok vagy acilcsoportok

2. ábra: Tioéterkötésű vegyes dimerek általános szerkezete

Vizsgáltuk az előállított dimer molekulák antiproliferatív hatását GnRH receptor pozitív MCF-7 és T-47D humán emlő és HT-29 vastagbél tumor sejt vonalakon. Több vegyület is mutatott 40-50% proliferáció gátlást a sejteken (50-100 μ M koncentrációban), de egy GnRH-III alapú szimmetrikus dimer 90% fölötti gátlást mutatott az emlő tumor sejt vonalakon, míg az egyik GnRH-III és GnRH-I kombinációjú vegyes dimer 80% fölött gátolta a T-47D emlőtumor proliferációját. Ezen vegyületekkel az *in vivo* vizsgálatok hamarosan megkezdődnek. A vastagbél tumoron a legjobb hatást mutató két GnRH-III alapú szimmetrikus dimert *in vivo* körülmények között is vizsgáltuk HT-29 tumort hordozó egereken. Ezek alapján elmondható, hogy napi egyszeri kezeléssel (~40mg/testsúly kg dózisban) kb. 50% tumornövekedésgátlást sikerült elérni a kezelés időtartama alatt (40. napig), de még 20 nappal a kezelése befejezése után is (60. nap) jobb, mint 40%-os gátlást regisztráltunk (3. ábra).



3. ábra: GnRH-III szimmetrikus dimerek hatása HT-29 vastagbél tumor beültetett egereken

Szuperfúziós kísérletekben patkány hipofízisen vizsgáltuk a dimerek endokrin hatását, vagyis a LH (luteinizáló hormon) szekrécióra gyakorolt hatásukat. A GnRH-III hormonnak eleve 500-1000-szer kisebb hatása van az LH és FSH szekrécióra mind *in vitro*, mind *in vivo*, mint a humán GnRH-nak (GnRH-I), de a dimerek még ennél is kisebb hatást mutattak (20-35%-a a monomer hatásának). Ezzel alátámasztottuk azokat a megfigyeléseket, hogy a GnRH-III endokrin hatásában a 8. pozícióban lévő lizin szabad ϵ -aminocsoportja szerepet játszik. Így tehát a GnRH-III szimmetrikus dimerek nagyobb tumorelles hatással és kisebb endokrin hatással rendelkeztek, mint a natív GnRH-III, ezáltal szelektívebb, tumorelles hatású vegyületeket tudunk előállítani. A vegyes dimerek ellenben még a GnRH-I illetve GnRH-II vegyületeknél tapasztalt endokrin hatásnál is jelentősebb mértékben serkentették az LH felszabadulást. Így ezek a vegyületek potenciális szuperagonisták lehetnek.

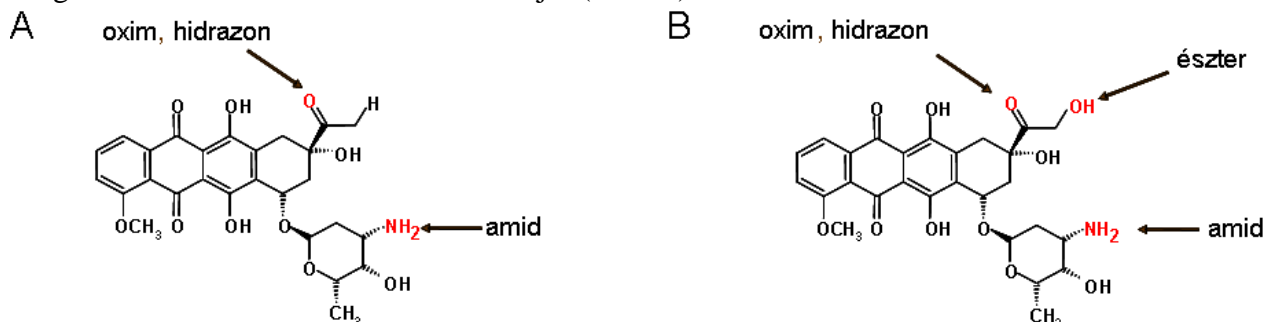
Néhány vegyülettel végeztünk CD, FTIR és NMR vizsgálatokat, hogy összehasonlítsuk a monomer és dimer vegyületek térszerkezetét, amely adatokkal szolgálhat a hatásbeli különbségekre. A monomerek és a dimerek között megfigyelt térszerkezeti különbségek nem szignifikánsak, így a térszerkezet önmagában nem valószínűsíti a hatásbeli különbségeket.

Vizsgáltuk a vegyületek enzimstabilitását tripszin, kimotripszin jelenlétében, továbbá humán szérumban és lizoszóma preparátumban, és az eredményeket összehasonlítottuk a monomer származékoknál kapottakkal. Általánosan megállapítható volt, hogy a dimerek enzimekkel szembeni stabilitása lényegesen nagyobb volt, mint a monomer vegyületeké, még azokon a hasítási helyeken is, amelyek távolabb estek a keresztkötést biztosító elágazásoktól. Így pl. a 3. pozícióban lévő Trp mellett a kimotripszin lassabban hasított dimer esetén, mint a monomer peptidnél.

Elkészítettünk a 9. pozícióban Pro helyett dehidro-prolint tartalmazó GnRH-II és GnRH-III származékokat, majd ezeket trícíáltuk. Az elkészült radioaktív származékokat kötődési vizsgálatokban kívánjuk felhasználni, amelyeket hamarosan megkezdenek az Országos Onkológiai Intézetben.

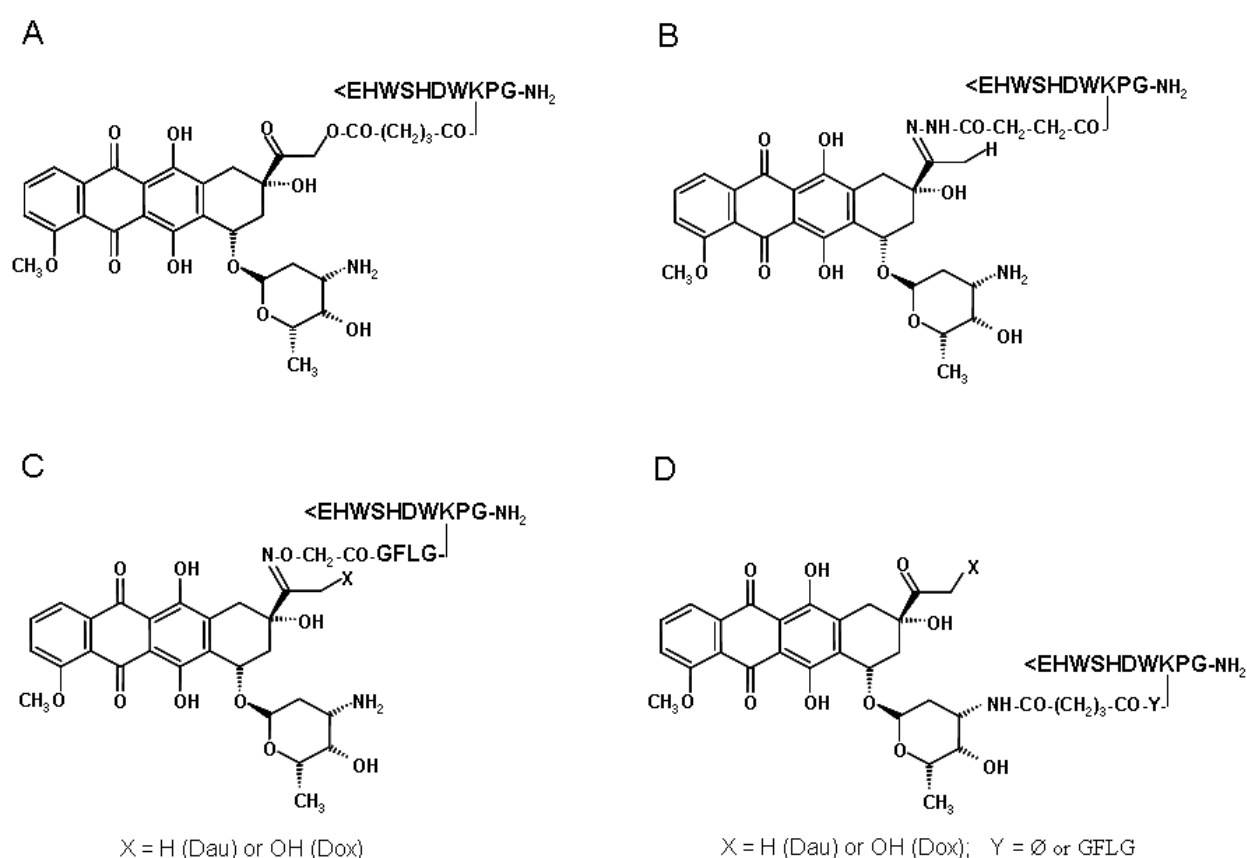
2. Tumorelles hatóanyagot tartalmazó GnRH konjugátumok szintézise és a vegyületek vizsgálata:

A GnRH-III hormon peptidet használtuk, mint irányító molekulát, peptid-drog konjugátumok előállítására. A daunorubicint és a doxorubicint különböző kötésekkel kapcsoljuk a peptidhez, hogy vizsgáljuk a konjugálás módjának hatását a vegyületek tumorelles hatására. A doxorubicin (Dox) tartalmaz egy OH csoportot a C14 pozícióban, amely alkalmassá teszi észterkötés kialakítására. A daunorubicin (Dau) esetében ez a funkciós csoport hiányzik, így vagy a 13-as C oxocsoportja használható konjugálásra oxim- vagy hidrazonkötés kialakításával, vagy a cukor rész (daunozamin) aminocsoportja, ami az esetek többségében a drog citotoxikus hatásának elvesztésével jár (4. ábra).



4. ábra: A daunorubicin (A) és a doxorubicin (B) lehetséges konjugációs helyei

Ezek alapján a daunorubicint oxim- (3) illetve hidrazonkötések (2) kapcsoltuk a módosított GnRH-III peptidhez, továbbá amidkötéssel (5) kapcsoltuk a cukorrészen keresztül. A doxorubicint észterkötéssel (1), oximkötéssel (4) és szintén a cukorrészen keresztül amidkötéssel (7) konjugáltuk a GnRH-III származékokhoz. Az észterkötést (5A. ábra) az észteráz enzimek bontják a sejtekben (részben a szérumban is), így tud a hatóanyag felszabadulni. A hidrazonkötés (5B. ábra) savas körülményekre érzékeny, így már pH 5 alatti közegben (pl. lizoszómákban) elbomlik, szintén a szabad hatóanyagot eredményezve. Az oximkötés azonban egy viszonylag stabil kémiai kötés, ezért a hatóanyag felszabadulása érdekében a drog és a hormon peptid közé egy, a lizoszómális enzimekre (pl. katepszin B) bomló távtartó peptidet (Gly-Phe-Leu-Gly) építettünk (5C. ábra). Ezt a spacer beépítettük abban az esetben is, amikor a cukorrészen keresztül konjugáltuk a daunorubicint (6) és a doxorubicint (8) a GnRH-III peptidhez (5D. ábra). A számok az 1. táblázatban használt jelöléseknek felelnek meg.



5. ábra: Az előállított GnRH-III-antraciklin (Dau és Dox) konjugátumok szerkezete

Az előállított konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását vizsgáltuk MCF-7 humán emlő, HT-29 humán vastagbél és C26 egér vastagbél tumor sejtvonalakon. Az eredmények azt mutatták, hogy az anyagok hatékonyabbak voltak az emlő tumorokon, mint a vastagbél tumorokon, ami összefüggésbe hozható azzal, hogy az MCF-7 tumorokon nagyobb mennyiségben található a GnRH receptorok. A kötés típus összehasonlításában azt állapítottuk meg, hogy a leghatékonyabb az észterkötéssel kapcsolt Dox konjugátum volt, valamivel kevésbé hatott a hidrazonkötésű vegyület, de még az oximkötést tartalmazó konjugátum is hatásos volt. A cukorrészen keresztül amidkötéssel kapcsolt konjugátum azonban nem mutatott jelentős antitumor hatást a vizsgált koncentráció tartományban (1. táblázat).

1. táblázat. A GnRH-III-antraciklin konjugátumok *in vitro* antitumor aktivitása

Sejtek \ Konjugátum	A	B	C/Dau	C/Dox	D/Dau	D/Dau spacer	D/Dox	D/Dox spacer
	IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ [µM]	C ₅₀ [µM]	IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ [µM]
MCF-7	0.8 ±0.5	1.5 ±0.2	3.9 ±1.2	5.4 ±1.9	>100	99.7 ±4.8	>100	84.2 ±5.5
C26	4.8 ±0.1	nt*	22.5 ±1.7	46.1 ±6.1	>100	>100	>100	>100
HT-29	3.0 ±0.5	nt	19.4 ±1.4	22.9 ±2.3	nt	nt	nt	nt

IC₅₀ értékeket MTT teszttel határoztuk meg; a szabad Dau és Dox IC₅₀ értékei 0.1-0.2 µM (MCF-7) és 2-5 µM (C26, HT-29) voltak. * nt = nem vizsgált

Áramlási citométer segítségével vizsgáltuk a konjugátumok sejt felvételét. Korrelációt figyeltünk meg az *in vitro* citosztatikus hatás és a konjugátum sejt által történt felvétele között (azonos típusú konjugátumok esetén). Az eredmények pontos értékeléséhez figyelembe vettük a daunorubicin és a konjugátumok fluoreszcencia intenzitásának változását mesterséges DNS jelenlétében. Ezen vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a konjugátumokban lévő Dau fluoreszcencia intenzitás változása hasonlóan változik, mint a szabad Dau esetén, ugyanakkor a Dau=Aoa nem mutat jelentős változást a DNS jelenlétében vagy hiányában. Tehát valószínű ez a származék nem interkallálódik a DNS láncok közé.

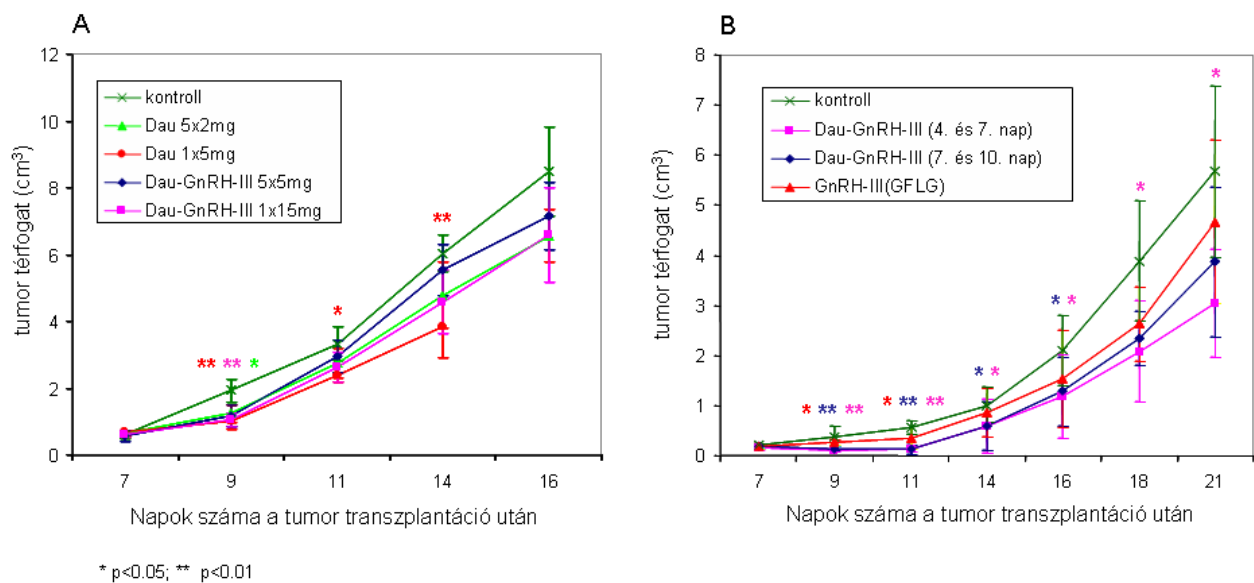
Kísérletet tettünk a sejt felvétel mechanizmusának tanulmányozására. Sem az MCF-7, sem a C26 sejteken nem tudtuk a Dau-GnRH-III (oxim) konjugátum felvételét gátolni GnRH-I receptor ellenanyaggal. Triptorelinnel, amely egy GnRH-I szuperagonista vegyület kis gátlást tudunk elérni nagy koncentráció alkalmazása mellett. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a a GnRH-III konjugátumok nem, vagy nem csak a GnRH-I receptoron keresztül juthatnak a sejtekbe. Ezért a sejt felvétel mechanizmusának további, alapos tanulmányozását tervezzük.

Az *in vivo* vizsgálatokhoz első körben a Dau-GnRH-III (oxim) konjugátumot választottuk, mivel ezt a konjugátumot könnyen és nagy mennyiségben tudtuk előállítani, továbbá a daunorubicin kardiotoxicitása kisebb, mint a doxorubiciné. Először egészséges nőstény BDF-1 egereken vizsgáltuk a konjugátum toxicitását. Míg a Daunorubicin 15 mg/testsúly kg koncentrációban erősen toxikus volt (az egerek elpusztultak 10-12 nappal a kezelést követően, addig a konjugátum, azonos Dau tartalom mellett nem okozott pusztulást, és az egerek súlya a kezeletlen kontroll állatokhoz hasonlóan növekedett. Egy újabb kísérlettel már azt is igazoltuk, hogy a konjugátum maximálisan tolerált dózisa (MTD) 30 mg/testsúly kg Dau tartalom fölött van, mert még ez a dózis sem mutatott toxikus mellékhatásokat.

Az *in vivo* tumorelles hatást Balb/c egereken vizsgáltuk, amelyekbe C26 egér vastagbél tumort ültettünk. A választás azért esett erre a tumor fajtára, mert ez igen agresszív, gyorsan növő tumorfajta, továbbá eddig viszonylag kevés, GnRH vegyülettel kapcsolatos *in vivo* tesztben alkalmaztak vastagbél tumort. Vizsgáltuk a dózis, a kezelések számának és idejének hatását a tumornövekedés gátlására és a túlélésre. Az eddigi adatok alapján a legjobb hatást akkor értük el, ha 15 mg/kg Dau tartalmú konjugátummal kétszer kezeltük az állatokat a 4. és 7. napon a tumorbeültetést követően. Ekkor a 10. napon még kb. 70-80%-os gátlás volt megfigyelhető, de még a 21. napon a tumorbeültetést követően is 45% körüli tumornövekedés gátlást regisztráltunk. Ebben az esetben az egerek átlagos túlélése a kezeletlen kontrollokhoz képest 41% volt. Egyszeri kezelés, a kezelések későbbi időpontban történő elkezdése, továbbá kisebb dózis alkalmazása kisebb gátlást és túlélést eredményezett. A szabad daunorubicin alkalmazása 2-5 mg/kg dózisban ugyan hatásos tumorgátlást eredményezett, de az egerek még a kezeletlen kontroll állatoknál is hamarabb elpusztultak. A kezelések további optimalizálása folyamatban van (6. ábra). Azt is megfigyeltük, hogy a

GnRH-III(GFLG) peptid önmagában is mutatott, bár nem szignifikáns, antitumor hatást a tumorsejteken és kismértékű túlélést is mutattak az állatok a csak peptiddel történt kezelés hatására.

Mivel az oximkötés körül E és Z izomer is megvalósulhat, ezért NMR spektroszkópia segítségével vizsgáltuk a Dau=Aoa (Aoa = aminosoxi-ecetsav) konjugátum térszerkezetét. Az eredmények kizárólag az E izomer jelenlétét mutatták. Feltételezhetőleg ez valósul meg a peptidkonjugátumban is, hisz nem tapasztaltuk izomerek megjelenését HPLC-n, szemben az exemesztám-oxim konjugátumokkal, amelyeknél analitikai HPLC-n az izomerek elválnak.



6. ábra: Dau-GnRH-III (oxim) konjugátum *in vivo* tumorelleses hatásának vizsgálata C26 vastagbél tumor xenograftot hordozó egereken. Összehasonlítások a szabad Dau és a GnRH-III származékkal.

Vizsgáltuk a Dau-GnRH-III (oxim) konjugátum stabilitását PBS oldatban, enzimek jelenlétében illetve egér, patkány és humán szérumban on-line és off-line HPLC-MS technikával. Elmondhatjuk, hogy PBS oldatban a konjugátum 72 óra elteltével sem mutatott bomlást és a konjugátum csak kisebb mértékű bomlást szenvedett a szérumban 24 óra alatt. Azonban katepszin B hatására a konjugátum bomlott elsősorban a spacer szekvenciában és jelentős mennyiségben keletkezett a Dau=Aoa-Gly-OH egység. Ez a vegyület katepszin B hatására tovább nem bomlott, ezért a hatóanyag felszabadulásának mechanizmusát tovább folytatjuk majd lizozóma preparátumban is. A konjugátum stabil volt tripszin jelenlétében, de kimotripszin hatására 3 óra alatt teljes mennyiségben elbomlott a 3-as pozícióban levő Trp mellett. Hosszabb idő elteltével részleges hasadást figyeltünk meg a spacer szekvenciában is a Phe és Leu aminosavak C-terminálisánál. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy ha a vegyületet orális adagolás irányába kívánjuk fejleszteni, ami a vastagbélrák és egyéb emésztő traktust érintő rák esetén előnyös lehet, akkor a Trp³-Ser⁴ kötés stabilitását kell fokozni, pl. N-Me-Ser beépítésével. Az új variánsok előállítását az új pályázat keretében kerülnek megvalósításra.

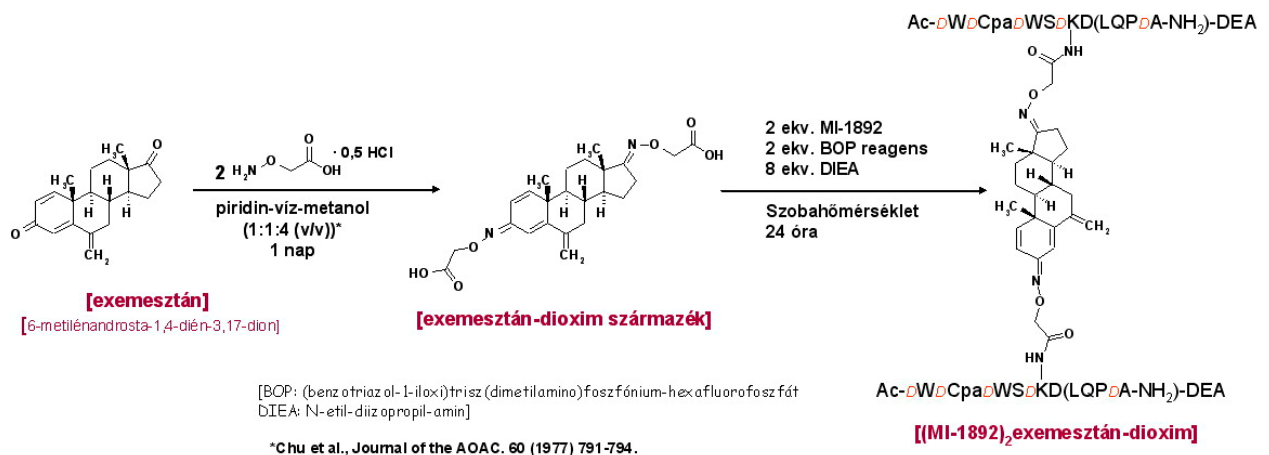
3. Az N-terminális felől rövidített szekvenciát tartalmazó GnRH-III vegyületek szintézise és sejtbejutásuk vizsgálata:

Mivel a kimotripszin hatására a Trp-Ser kötés hasad a GnRH-III dimer és konjugált származékaiban, vizsgáltuk, hogy a szekvencia N-terminális felől történő rövidítése milyen hatással van a vegyületek sejtfelvételére. Előállítottuk tehát a GnRH-III N-terminális felől rövidített szakaszait, amelyeket 5(6)-karboxifluoreszceinnel jelöltünk és vizsgáltuk, hogy ezek a peptidek is kötődnek-e és bejutnak-e HT-29 sejtekbe. Az előállított valamennyi rövidített peptid (Ac-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(CF)-Pro-Gly-NH₂, Ac-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(CF)-Pro-Gly-NH₂, Ac-Ser-His-Asp-Trp-Lys(CF)-Pro-Gly-NH₂) kötődött és bejutott a sejtekbe hasonlóan a teljes szekvenciát tartalmazó, jelzett natív peptidhez. Így ezek a szekvenciák is alkalmasak lehetnek a hatóanyagok targetálására. A rövidített peptidek tumorelles hatásának vizsgálata folyamatban van.

4. MI-1892 GnRH-II antagonistá származékainak szintézise:

Az MI-1892 GnRH-II antagonistá származék (Ac-D-Trp-D-Cpa-D-Trp-Ser-D-Lys-Asp(Leu-Gln-Pro-D-Ala-NH₂)-NEt₂) túl azon, hogy jelentős antiproliferatív hatást mutatott, immunstimuláló hatással is rendelkezett. Ezen hatások erősítése érdekében ennek a peptidnek a dimer származékát is elkészítettük. Ebben az esetben is a lizin aminosav oldalláncán építettünk ki Cys vagy CGFLG oldalláncot és diszulfidhíd kialakításával dimerizáltuk a peptideket. Sajnos a vegyületek, különösen a spaceret tartalmazó dimer oldékonyasága nagyon rossz volt, így a biológiai vizsgálatokban nem tudtuk megfelelően alkalmazni azokat. Jelenleg olyan peptid és nem peptidalapú spacer beépítésén dolgozunk, amelyek növelhetik a vegyületek oldékonyaságát, és így alkalmasak lehetnek a biológiai vizsgálatokra.

Ezt a vegyületet használtuk olyan előkísérletekhez, ahol egy exemesztán nevű aromatózsgátló hatóanyagot kapcsolunk két GnRH peptidlánc közé, mint a dimert összekötő kapcsolóstruktúrát (7. ábra). Itt is vízoldékonyabb szerkezetek kialakítása folyamatban van.

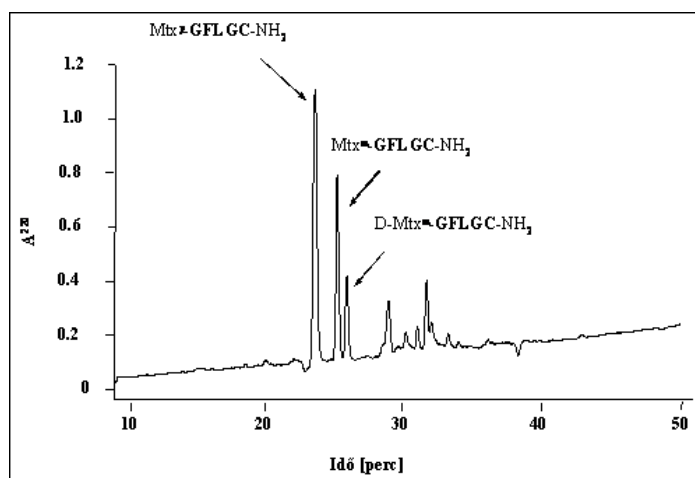


7. ábra: Az exemesztán átalakítása dioxim származékká, majd konjugálása GnRH peptidhez

5. Kemotaxison alapuló hatóanyag célbajuttatás oligotuftsin típusú hordozók segítségével:

Az e témakörbe tartozó vegyületek olyan molekulák, amelyek hordozóhoz kovalensen kötve tartalmaznak kemotaxison alapuló receptorfelismerő egységet és tumor ellenes hatású hatóanyagot. E háromkomponensű struktúrákban a hordozó molekula egy tetratuftsin származék (Ac-[TKPKG]₄-NH₂), amely biodegradábilis oligopeptid, nem toxikus és nem immunogén sajátosságú, ugyanakkor a tuftsinra (TKPR) jellemző biológiai tulajdonságokkal rendelkezik (immunstimuláló hatás, kemotaktikus aktivitás). A receptorfelismeréssel rendelkező és a sejtek kemotaxisára ható irányító (target) molekulák formil-tripeptidek (For-MLF, For-NleLF, For-MMM) illetve a tuftsin és származékai (For-TKPR, TKPKG, Ac-TKPKG) szolgáltak. Tumorelles hatóanyagként a folsav antagonistá metotrexátot (Mtx) használtuk a konjugátumban. Ez a vegyület a dehidrofolát reduktáz enzim gátlása alapján képes a tumorsejtek pusztulását előidézni.

Első lépésben szilárdfázisú peptidszintézissel előállítottuk a kemotaktikus peptideket tartalmazó konjugátumokat, hogy megvizsgáljuk mely konjugátumok mutatnak kemoattraktáns, vagyis sejt vonzó hatást. Ennek során előállítottunk hét konjugátumot. Ezek a következők: Ac-[TKPK(For-MLF)G]₄-NH₂, Ac-[TKPK(For-NleLF)G]₄-NH₂, Ac-[TKPK(For-MMM)G]₄-NH₂, Ac-[TKPK(H-TKPR)G]₄-NH₂, Ac-[TKPK(For-TKPR)G]₄-NH₂, Ac-[TKPK(H-TKPKG)G]₄-NH₂, Ac-[TKPK(Ac-TKPKG)G]₄-NH₂. A For-MMM oldalláncot tartalmazó vegyület kivételével valamennyi elágazó peptid mutatott kemoattraktáns hatást bizonyos koncentráció tartományokban *Tetrahymena pyriformis* csillós egységűn illetve THP-1 tumoros monocita sejten, így ezeket továbbfejlesztettük hatóanyagot tartalmazó konjugátumokká. Annak érdekében, hogy a metotrexátot egyértelmű reakcióban, hatékonyan tudjuk kapcsolni a konjugátumhoz oly módon, hogy a drug molekula a tumoros sejtben könnyen felszabaduljon, egy enzimlabilis spacer szekvenciát építettünk a hatóanyag és a hordozó molekula közé. Ez a spacer egy pentapeptid (GFLGC), amely lizoszomális enzimek hatására (pl. katepszin B) bomlik, így a hozzákapcsolt hatóanyag felszabadulhat. Ezt úgy valósítottuk meg, hogy először a Mtx-GFLGC-NH₂ peptidet felépítettük szilárd hordozón Fmoc-technikával (a Mtx érzékeny az erélyes savas behatásra, így a HF hasítást igénylő Boc technikát nem alkalmazhattuk). A metotrexátban a metil-pteroil gyűrű egy glutaminsavhoz kapcsolódik, így a Mtx amidkötés kialakításával kapcsolható a peptidlánchoz. Azonban a Glu egység mindkét karboxilcsoportja reagálhat, mint ahogy ez meg is történt, így Mtx^α-GFLGC-NH₂ és Mtx^γ-GFLGC-NH₂ terméket is kaptunk. Ezeket HPLC segítségével el tudtuk választani egymástól (8. ábra), és mindkét származékot használtuk a további konjugálási



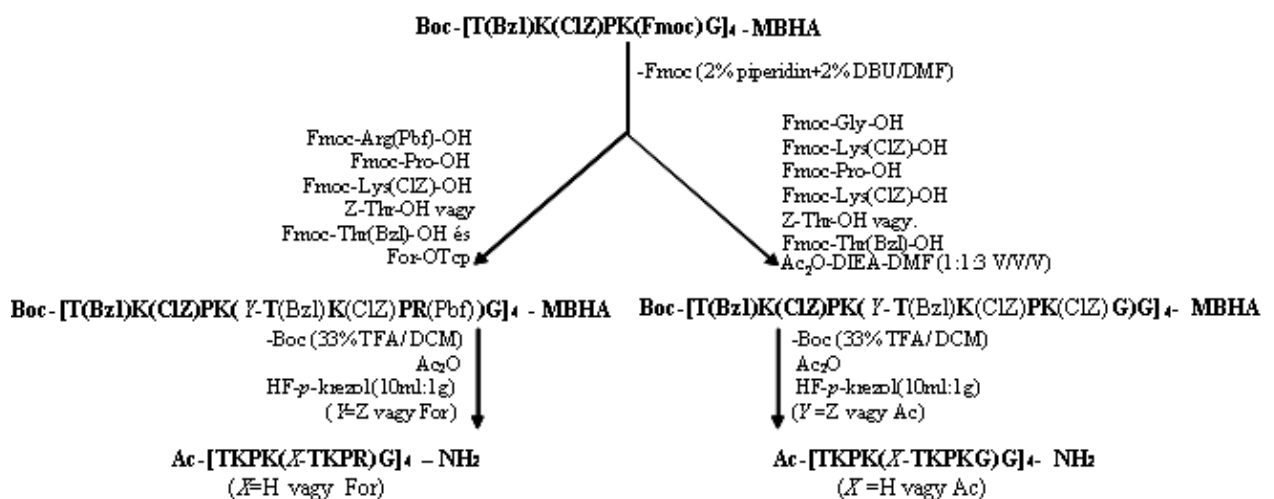
8. ábra: A Mtx-GFLGC konjugátum izomerjeinek elválása RP-HPLC-n

reakciókban. A kemotaktikus peptidet tartalmazó hordozót úgy alakítottuk át, hogy az N-terminálisára egy lizint kapcsoljunk, amelynek mindkét aminocsoportját klóracetileztük, mielőtt a gyantáról hasítottuk volna: ClAc-K(ClAc)-[TKPK(For-MLF)G]₄-NH₂ és ClAc-K(ClAc)-[TKPK(For-NleLF)G]₄-NH₂. A klóracetilcsoportok enyhén bázikus közegben reagálni képesek tiolcsoportokkal, így tioéter kötések keresztül a két komponens összekapcsolható. A konjugációkat 0.1M Tris-pufferben (pH 8) végeztük. HPLC-vel követtük a reakciót és a konjugátumoként két Mtx-GFLGC-NH₂ beépülése után, a reakciót leállítottuk és a konjugátumokat HPLC-vel izoláltuk.

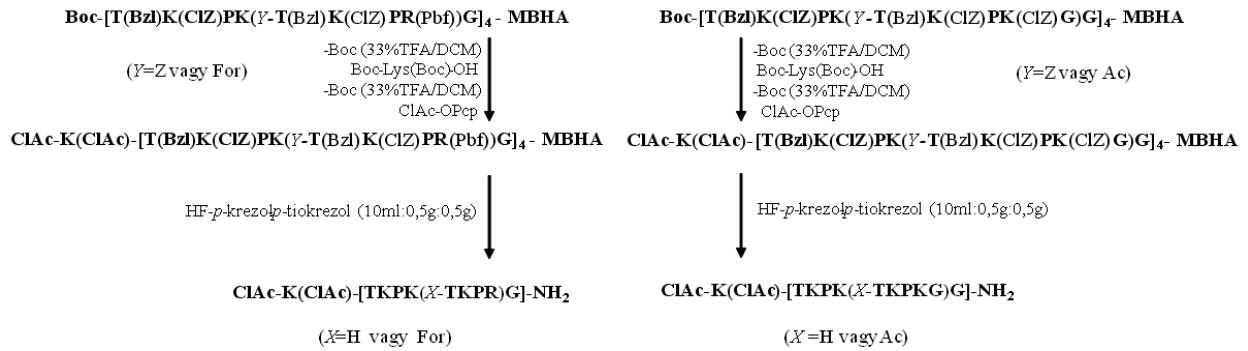
A kemotaxis vizsgálatok azt mutatták, hogy a konjugátumok attól függően, hogy a kemotaktikus peptid Met vagy Nle aminosavat tartalmaz, illetve, hogy a Mtx az γ - vagy α -karboxilcsoporton keresztül kapcsolódik a spacer peptidhez eltérő kemotaktikus aktivitást mutat. Más-más hatást tapasztaltunk a különböző sejteken is. Tetrahymena sejteken kemorepellens hatást mértünk kivéve a Nle-tartalmú vegyületet, amely ha γ -karboxilcsoporton keresztül kötött Mtx-ot tartalmazott, akkor enyhe kemoattraktáns hatást mutatott. Ellentétben a THP-1 sejteken 10⁻⁶M koncentrációban óriási kemoattraktáns hatást mutattak a vegyületek, de kimagaslóan a leghatékonyabb Met-tartalmú vegyület volt, amely α -karboxilcsoporton keresztül kötött Mtx-ot tartalmazott.

Ezután megvizsgáltuk a metotrexátot tartalmazó anyagok citotoxicitását a vizsgált sejteken MTT-teszttel. Azt tapasztaltuk, hogy bár nagyobb moláris Mtx mellett a konjugátumok ugyanolyan toxikusak voltak, mint a metotrexát önmagában. Az α -karboxilcsoporton keresztül kötött Mtx-ot tartalmazó vegyületek némileg hatásosabbak voltak, mint γ -peptidkötést tartalmazó származékok. Ez talán összefügghet azzal, hogy az α -peptidkötés gyorsabban bomlik, így a hatóanyag gyorsabban felszabadul. Vizsgáltuk a konjugátumok THP-1 sejtbe jutásának mechanizmusát is konfokális mikroszkóp segítségével. Ennek érdekében a konjugátumokban a Mtx helyére 5(6)-karboxi-fluoreszcint kapcsolunk. A fluorszcens-jelzett konjugátumokkal végzett kísérletek bizonyították, hogy a konjugátumok receptorhoz kötött állapotban veszik fel a sejtek.

A konjugátumokat előállítottuk tuftsins típusú irányító molekulák alkalmazásával is. Tehát az oligotuftsins hordozóra TKPR, For-TKPR, TKPKG és Ac-TKPKG oldalláncokat építettünk. A hatóanyag nélküli és hatóanyag kapcsolására alkalmas konstrukciók szintézisét mutatja be a 9. és 10. ábra.



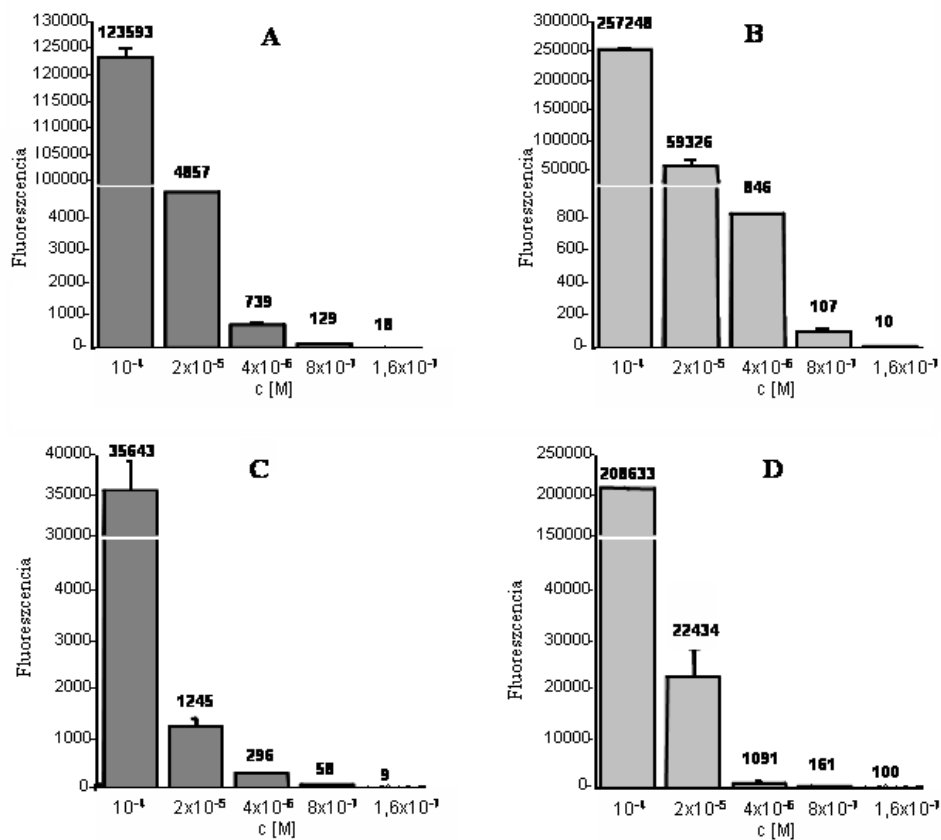
9. ábra: Hatóanyagot nem tartalmazó tuftsins típusú oldalláncot tartalmazó kemotaktikus hatású biokonjugátumok



10. ábra: A kemotaktikus hatású konjugátumok klóracetilezett változatának szintézise hatóanyag konjugálása céljából

A metotrexátot ebben az esetben is Mtx-GFLGC-NH₂ formában tioéterkötés kialakításával kötöttük a klóracetilezett elágazó peptidekhez.

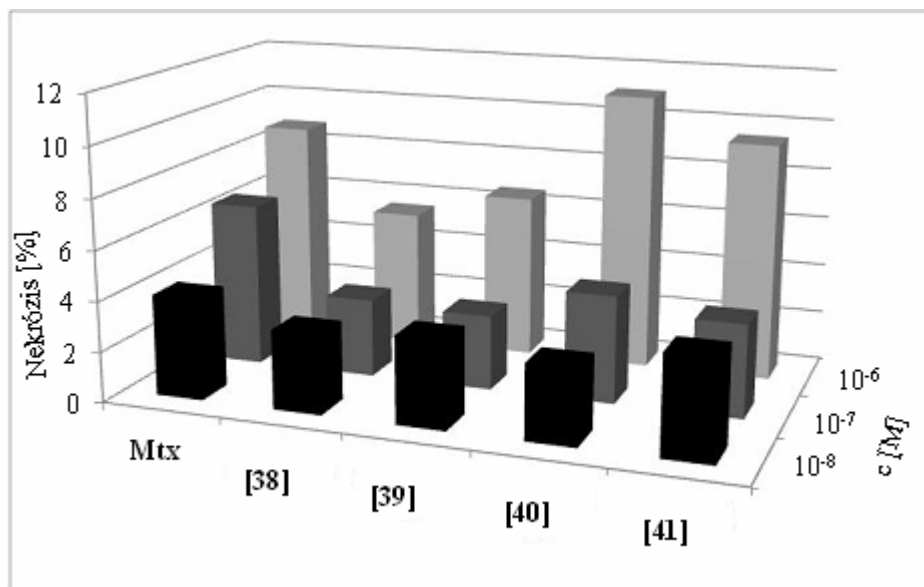
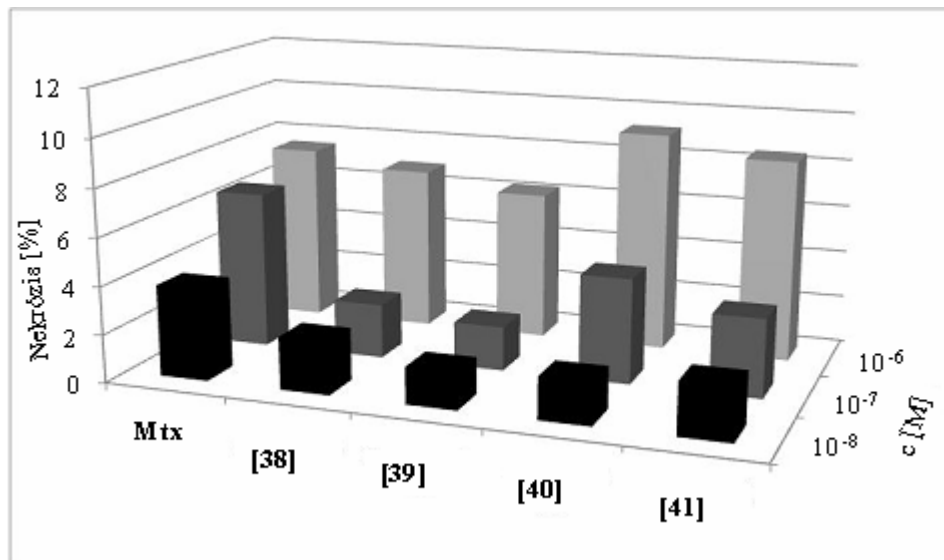
A tuftsin típusú oldalláncok jelentősebb mértékű kemoattraktáns hatást mutattak, mint a formil-tripeptidet tartalmazók, és a sejtekbe is nagyobb hatékonysággal jutottak be. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy az alacsonyabb koncentrációban (10⁻⁷-10⁻⁶M) és a nagyobb koncentrációk esetén (10⁻⁵-10⁻⁴M) más mechanizmussal jutnak be a konjugátumok a sejtekbe (11. ábra). A sejtfelvételt a Mtx helyett 5(6)-karboxifluoreszceint tartalmazó konjugátumokkal tanulmányoztuk.



11. ábra: H-TKPR (A), For-TKPR (B), H-TKPKG (C) vagy Ac-TKPKG (D) oldalláncú CF-jelölt konjugátumok bejutása MonoMac6 sejtekbe

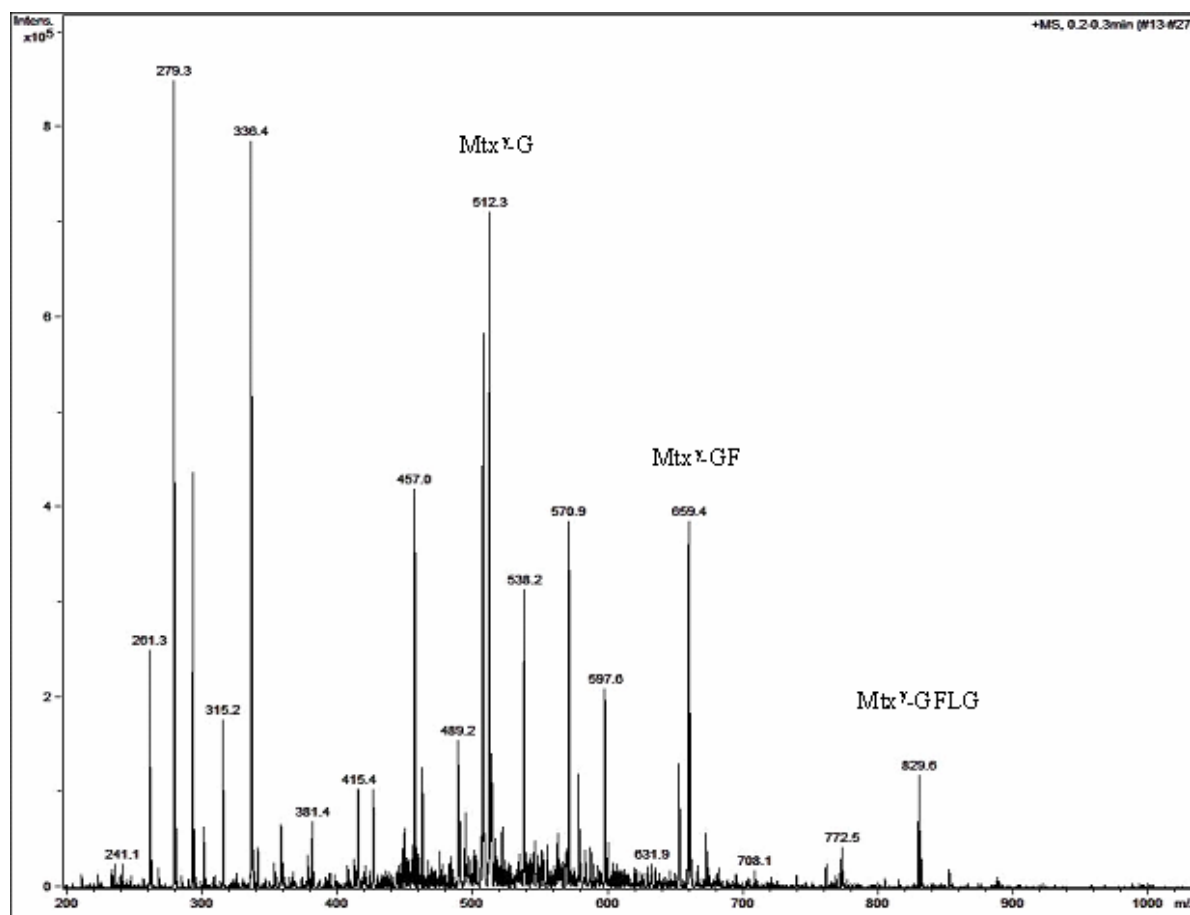
Kis koncentráció esetén feltehetőleg receptorközvetített endocitózissal, míg nagyobb koncentráció esetén érvényesülhet a tuftsin fagocitózist stimuláló hatása, ezért ugrásszerűen nő az anyagok sejtfelvétele. Ugyanakkor az sem zárható ki, hogy a polikationos konjugátumok sejtpenetráló peptidként funkcionálnak. A pontos sejtfelvételi mechanizmust tovább fogjuk tanulmányozni.

Megállapítottuk, hogy a konjugátumok hasonlóan a metotrexáthoz nekrotikus útvonalon keresztül pusztítják a MonoMac6 monocita sejteket. 10^{-6} M koncentrációban már bizonyos konjugátumok meghaladják a metotrexát citosztatikus hatását (12. ábra).



12. ábra: Mtx and Mtx-konjugátumok hatása MonoMac6 sejtekre 3 és 24 órás kezelést követően (H-TKPR (38), For-TKPR (39), H-TKPKG (40) vagy Ac-TKPKG (41) oldalláncot tartalmazó konjugátumok)

Az oligotuftsin hordozót tartalmazó konjugátumok esetén is tömegspektrometriával vizsgáltuk a hatóanyag felszabadulását katepszin B jelenlétében (13. ábra). Azt tapasztaltuk ebben az esetben is, hogy a fő hasadási hely a spacer láncon belül található és a metotrexát Mtx-Gly-OH formában hasad ki, amely tovább bomolhat endopeptidázok hatására. Feltehetőleg ez játszik szerepet abban, hogy az α -karboxilcsoportján kötött Mtx hatásosabb citosztatikumnak bizonyult. Az α -peptidkötés lényegesen könnyebben hasad, mint az izopeptidkötés. Erre további kísérleteket tervezünk lizoszóma preparátumban.



13. ábra: Mtx felszabadulásának követése tömegspektrometriával

A további kísérleteinkben egy új hordozót is bevezettünk, amely alapszekvenciája egy tuftsin antagonist pentapeptid (TKPPR). Ebből építettek fel egy tetramer peptidláncot, amelyek Lys oldalláncain tuftsin (TKPR) vagy maga az antagonist (TKPPR) oldallánccokat tartalmazott, míg az 20-mer amino terminálisához két molekula hatóanyagot (metotrexát vagy daunorubicin) kapsoltak enzim labilis GFLGC spacer szekvencián keresztül a korábbiakban leírtak szerint. Ezeknek a konjugátumok jelentősebb kemoattraktáns hatást fejtettek ki a monocita sejtekre. Szintén azt tapasztaltuk, hogy a konjugátumok többsége hasonló citosztatikus hatással rendelkezett, mint a szabad hatóanyag. Ezek után in vivo kísérleteket fogunk végezni, hogy megállapítsuk, hogy a konjugátumok kivédik-e a drogok toxikus

mellékhatásait, továbbá hogy *in vivo* körülmények között is tudják-e a szabad hatóanyag antitumor hatását produkálni azonos hatóanyag koncentrációban.

Ebben a kísérletsorozatban összesen 17 tumorellenes hatóanyagot tartalmazó és 7 karboxifluoreszceint tartalmazó konjugátumot állítottunk elő.

6. Peptidek kettős jelzése a sejtekben történő hasadás tanulmányozására a FRET jelenség alapján:

Kidolgoztunk egy olyan eljárást, amely kettős „klick”-reakción alapul és alkalmas arra, hogy két különböző festékanyagot beépítsünk peptidekbe. Az így kiépített vegyületek alkalmasak arra, hogy a FRET jelenséget kihasználva tanulmányozni tudjuk a peptidek hasadását a sejtekben. A megoldás azon alapszik, hogy különböző hármaskötést tartalmazó molekulák más-más reaktivitással kapcsolódnak azido-vegyületekhez. A ciklooktin-származékok pl. katalizátor nélkül is képesek a „klick”-reakcióra, míg a propargil-származékok csak réz(I) katalizátor jelenlétében. Így a peptidekbe beépített propargil-glicin és egy ciklooktin-származék segítségével kialakítható a kettős jelzés. Megállapítottuk, hogy a ciklooktin-származék nagy érzékeny savas körülmények között, így a peptid gyantáról történő hasításakor a jelenlévő gyökfogókat addicionálja. Ezért ezt a származékot utólag a peptid gyantáról történt eltávolítása után lehet csak a peptidre felkapcsolni. A módszer alkalmas lehet a fentiekben leírt vegyületeink jelzésére is, annak érdekében, hogy azok lebomlását, biodisztribúcióját kövessük.