

BARANYAI ZSUZSA

**Antimikobakteriális hatóanyagok és konjugátumok
szintézise és biológiai aktivitásának vizsgálata**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Témavezető:

Dr. Bősze Szilvia tudományos főmunkatárs

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



ELTE TTK Kémia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Császár Attila egyetemi tanár

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program

Programvezető: Dr. Perczel András egyetemi tanár

Budapest, 2017

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	6
Rövidítésjegyzék.....	8
1. BEVEZETÉS	11
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
2.1. A tuberkulózis	12
2.2. A <i>Mycobacterium tuberculosis</i> és a <i>Mycobacterium abscessus</i> baktériumok	14
2.3. A tuberkulózis kezelésében alkalmazott legfontosabb antituberkulotikumok és jellemzőik.....	17
2.4. Új antituberkulotikumok, antimikobakteriális hatóanyagok keresése	19
2.4.1. Szalicilanilid származékok mint antimikobakteriális hatóanyagok	19
2.4.2. Pirazinkarbonsav származékok.....	21
2.4.3. Szalicilanilid származékok pirazinkarbonsavval alkotott észterei	22
2.4.4. Új antituberkulotikumok meghatározása <i>in silico</i> módszer alkalmazásával.....	23
2.5. A hatóanyagok célbajuttatása a gazdasejtbe konjugátumok alkalmazásával	25
2.5.1. A tuftsinszármazékok mint célbajuttató és hordozó peptidek	27
2.5.2. Az antimikrobiális anyagok, konjugátumok módosítása zsírsavakkal.....	29
2.5.3. Antituberkulotikum-tuftsinszármazék konjugátumok	29
2.5.4. A hatóanyag-célbajuttató egység, illetve hordozó közötti kötés és távolságtartó egység szerepe	30
2.6. Antituberkulotikumok polimer típusú nanorészecske származékainak előállítás.....	31
2.7. A kísérleti módszerek elméleti alapjainak rövid áttekintése	33
2.7.1. A szilárdfázisú peptidszintézis	33
2.7.1.1. A Boc/Bzl módszer	34
2.7.1.2. Az Fmoc/tBu módszer	34
2.7.1.3. A peptidkötés kialakítása a szintézis során.....	35
2.7.1.4. A kapcsolási reakciók követése.....	35
2.7.2. Membrán affinitás vizsgálata lipid monoréteg és kettősréteg modellek segítségével.....	36
2.7.3. Az <i>in vitro</i> antimikobakteriális hatás meghatározása extracelluláris és intracelluláris modellen	37
2.7.4. Az <i>in vitro</i> citotoxikus és citosztikus hatás meghatározása kolorimetriás tetrazólium (MTT) teszt alkalmazásával	39
2.7.5. Fluoreszcens vegyületek <i>in vitro</i> sejtbejutásának vizsgálata áramlási citometriával	39
3. CÉLKITŰZÉSEK	41
4. EREDMÉNYEK	44
4.1. Új szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok előállítása, kémiai és <i>in vitro</i> biológiai jellemzése	44
4.1.1. Szubsztituált szalicilanilidek (Sal1-9) előállítása	44
4.1.2. Az 5-klórpirazin-2-karbonsav (Pyr) előállítása.....	45
4.1.3. Szalicilanilid-5-klórpirazinoátok (SalPyr1-4) előállítása.....	46
4.1.4. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok (SalBenz1-3) előállítása.....	46
4.1.5. Szalicilanilid-karbamátok (SalCarb1-14) előállítása	47
4.1.6. A szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok kémiai jellemzése.....	47

4.1.6.1. A szalicilanilid származékok stabilitásának vizsgálata	49
4.1.7. A szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok MIC értékének meghatározása	51
4.1.8. A szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok <i>in vitro</i> citotoxikus és citosztatikus hatása.....	56
4.1.9. Szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecskék előállítása.....	61
4.1.9.1. A szabad szalicilanilid származékok és a szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecskék <i>in vitro</i> sejtbejutása	61
4.1.9.2. A szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecskék <i>in vitro</i> antimikobakteriális hatása fertőzött MonoMac6 sejteken	63
4.1.10. Az új szalicilanilid származékokkal, szalicilanilid-észterekkel és szalicilanilid-karbamátokkal kapcsolatos eredmények összefoglalása és értékelése	64
4.2. Tuftsin típusú hordozópeptidek tervezése, előállítása, kémiai és <i>in vitro</i> biológiai jellemzése.....	65
4.2.1. A tuftsinszármazékok típusai.....	65
4.2.2. Az oldallánc módosítást nem tartalmazó tuftsinszármazékok előállítása	66
4.2.3. Az oldallánc módosítást tartalmazó tuftsinszármazékok előállítása	68
4.2.4. Az aminosavszármazékok előállítása.....	70
4.2.5. A tuftsinszármazékok kémiai jellemzése.....	70
4.2.5.1. A fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok fluoreszcencia intenzitásának vizsgálata a pH függvényében	72
4.2.6. A fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok <i>in vitro</i> sejtbejutása.....	75
4.2.7. Az acetilezett hordozópeptidek <i>in vitro</i> citosztatikus hatása	80
4.2.8. Membrán integritás vizsgálata propídium-jodidos festéssel MonoMac6 sejteken	82
4.2.9. A tuftsin típusú hordozópeptidekkel kapcsolatos eredmények összefoglalása és értékelése ..	84
4.3. Szalicilanilid származékok peptidkonjugátumainak előállítása, kémiai és <i>in vitro</i> biológiai jellemzése.....	86
4.3.1. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak előállítása, kémiai és <i>in vitro</i> biológiai jellemzése	86
4.3.1.1. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak stabilitásvizsgálata.....	87
4.3.1.2. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak MIC értékének meghatározása .	88
4.3.1.3. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak <i>in vitro</i> citotoxikus és citosztatikus hatása	89
4.3.2. Szalicilanilid-peptid konjugátumok előállítása, kémiai és <i>in vitro</i> biológiai jellemzése.....	91
4.3.2.1. A lizoszomális emésztés során keletkező legkisebb metabolitok, a szalicilanilid- aminosav származékok előállítása és kémiai jellemzése	92
4.3.2.2. Szalicilanilid-peptid konjugátumok stabilitásának vizsgálata	93
4.3.2.3. Szalicilanilid-peptid konjugátumok MIC értékének meghatározása	93
4.3.2.4. Szalicilanilid-peptid konjugátumok <i>in vitro</i> citotoxikus és citosztatikus hatása	98
4.3.2.5. Szalicilanilid-peptid konjugátumok <i>in vitro</i> antimikobakteriális hatása fertőzött MonoMac6 sejteken	104
4.3.2.6. Szalicilanilid-peptid konjugátumok lizoszomális degradációjának modellezése	106
4.3.3. A szalicilanilid származékok peptidkonjugátumaival kapcsolatos eredmények összefoglalása és értékelése	109
4.4. Az <i>in silico</i> azonosított hatóanyagok peptidkonjugátumainak előállítása, kémiai és <i>in vitro</i> biológiai jellemzése.....	112
4.4.1. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak fluoreszcencia tulajdonságai	113
4.4.2. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak MIC értékének meghatározása	115

4.4.3. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak <i>in vitro</i> citosztatikus hatása	116
4.4.4. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak <i>in vitro</i> sejtbejutása	117
4.4.5. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak <i>in vitro</i> antimikobakteriális hatása fertőzött MonoMac6 sejteken	118
4.4.6. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak membrán affinitása.....	119
4.4.6.1. Membrán affinitás vizsgálata lipid monoréteg modell segítségével	119
4.4.6.2. Membrán affinitás vizsgálata lipid kettősréteg modell segítségével.....	120
4.4.7. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumaival kapcsolatos eredmények összefoglalása és értékelése	122
4.5. A dolgozat új tudományos eredményei és kitekintés	123
5. KÍSÉRLETI RÉSZ	124
5.1. Kémiai kísérletek	124
5.1.1. A szalicilanilid származékok és az 5-klórpirazin-2-karbonsav szintézise.....	124
5.1.1.1. Szubsztituált szalicilanilidek (Sal1-9) előállítása	124
5.1.1.2. Az 5-klórpirazin-2-karbonsav (Pyr) előállítása.....	125
5.1.1.3. Szalicilanilid-5-klórpirazinoátok (SalPyr1-4) előállítása	125
5.1.1.4. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok (SalBenz1-3) előállítása.....	125
5.1.1.5. Szalicilanilid-karbamátok (SalCarb1-14) előállítása	125
5.1.1.6. A szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok kémiai jellemzése.....	126
5.1.1.6.1. Vékonyréteg kromatográfia.....	126
5.1.1.6.2. Olvadáspont meghatározás	126
5.1.1.6.3. NMR spektroszkópia	126
5.1.1.6.4. IR spektroszkópia.....	126
5.1.1.6.5. Tömegspektrometria	127
5.1.1.6.6. Elemanalízis.....	127
5.1.1.6.7. A szalicilanilid származékok stabilitásának vizsgálata analitikai RP-HPLC-vel és ESI-MS-sel.....	127
5.1.1.7. A szalicilanilid származékok PLGA nanorészecskékbe való csomagolása	127
5.1.2. A tuftsinszármazékok szintézise.....	128
5.1.2.1. A peptidek szintézise Fmoc/tBu módszerrel	128
5.1.2.2. A peptidek szintézise Boc/Bzl módszerrel	130
5.1.2.3. A hasítási és kapcsolási reakciók követése	131
5.1.2.4. Az oldallánc módosítást nem tartalmazó tuftsinszármazékok szintézise	132
5.1.2.5. Az oldallánc módosítást tartalmazó tuftsinszármazékok szintézise	133
5.1.2.6. A lizoszomális emésztés során keletkező legkisebb metabolitok előállítása	134
5.1.3. Hatóanyag-peptidkonjugátumok szintézise	134
5.1.3.1. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak előállítása.....	134
5.1.3.2. Szalicilanilid-peptid konjugátumok előállítása	135
5.1.3.3. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak előállítása	135
5.1.4. A peptidek és a hatóanyag-peptid konjugátumok tisztítása	135
5.1.5. A peptidek és a hatóanyag-peptid konjugátumok kémiai jellemzése.....	135
5.1.5.1. Analitikai RP-HPLC.....	135
5.1.5.2. Aminosavanalízis.....	136
5.1.5.3. Tömegspektrometria.....	136

5.1.5.4. A szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak és a szalicilanilid-peptid konjugátumok stabilitásának vizsgálata analitikai RP-HPLC-vel és ESI-MS-sel	136
5.1.5.5. Spektrofluorimetria – a fluoreszcens vegyületek fluoreszcencia intenzitásának vizsgálata a pH függvényében spektrofluoriméter alkalmazásával	136
5.1.5.6. A vegyületek membrán affinitásnak és penetrációs sajátságainak jellemzése	137
5.1.5.6.1. Membrán affinitás vizsgálata lipid monoréteg modell segítségével.....	137
5.1.5.6.2. Membrán affinitás vizsgálata lipid kettősréteg modell segítségével	138
5.2. <i>In vitro</i> kísérletek	139
5.2.1. Minimális gátló koncentráció (MIC) és telepszám (CFU) meghatározása	139
5.2.2. <i>In vitro</i> antituberkulotikus hatás meghatározása <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv baktériummal fertőzött MonoMac6 humán monocita sejtvonalon.....	140
5.2.3. A vegyületek <i>in vitro</i> citotoxikus és citosztatikus hatásának meghatározása	140
5.2.3.1. A vegyületek citotoxikus és citosztatikus hatásának meghatározása MonoMac6 és HepG2 sejteken	140
5.2.3.2. A vegyületek citotoxikus hatásának meghatározása BMM Φ sejteken.....	141
5.2.3.3. A vegyületek citotoxikus hatásának meghatározása HUVEC sejteken	141
5.2.4. Sejtbejutás vizsgálat MonoMac6, BMM Φ és HepG2 sejteken.....	142
5.2.5. Membrán integritás vizsgálata propídium-jodidos festéssel.....	143
5.2.7. A hatóanyag-peptid konjugátumok lebomlásának jellemzése patkány máj lizoszóma preparátumban	144
5.2.8. A vegyületek sejtbejutásának vizsgálata LC-MS módszerrel metanol-acetonitril-víz extrakciót követően.....	145
Összefoglalás.....	147
Summary	148
FÜGGELÉK.....	151
Irodalomjegyzék.....	201

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bősze Szilvia tudományos főmunkatársnak (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) a munkám során nyújtott rengeteg segítségével, tanácsáért, támogatásáért. Köszönöm, hogy bevezetett a munkám során alkalmazott kémiai és biológiai módszerek használatába, biztosította a kutatómunka feltételeit, támogatta részvételemet számos hazai és külföldi konferencián és lehetővé tette, hogy külföldi szakmai tapasztalattal is bővíthessem tudásomat.

Köszönetet mondok Dr. Hudecz Ferenc és Dr. Perczel András tanszékvezető egyetemi tanároknak, hogy lehetővé tették, hogy munkámat az ELTE Kémiai Intézetének Szerves Kémiai Tanszékén végezhessem. Továbbá köszönöm Dr. Hudecz Ferencnek, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport vezetőjének, hogy lehetővé tette, hogy a Kutatócsoportban folyó munkába bekapcsolódjak.

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport minden volt és jelenlegi tagjának köszönöm a támogatását és segítségét. Külön köszönettel tartozom Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak, akihez többek között szintetikus és technikai problémáimmal bármikor fordulhattam. Köszönöm Dr. Horváti Kata tudományos munkatársnak, hogy a kezdetektől fogva segítségemre volt a szintetikus munkában. Köszönöm Dr. Schlosser Gitta tudományos munkatársnak, hogy segített elsajátítani a tömegspektrometriai készülék használatát. Köszönöm Dr. Medzihradzky-Schweiger Hedvignek a különböző mikroanalitikai mérések elvégzését. Köszönöm Dr. Bánóczy Zoltán egyetemi adjunktus tanácsait és az izgalmas szakmai beszélgetéseket. Köszönöm Kiskó Mária és Heinrich Vera rengeteg technikai segítségét a szintetikus és biológiai kísérletek során.

Köszönöm együttműködő partnereinknek a munkám során nyújtott segítséget. Köszönöm Dr. Szabó Nóra, Senoner Zsuzsanna és Dávid Sándor, az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet Bakteriológiai Laboratóriuma munkatársainak a bakteriológiai mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönetet mondok Dr. Jarmila Vinšovánek, a Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Inorganic and Organic Chemistry (Hradec Králové, Csehország) munkatársának, hogy lehetővé tette, hogy tanulmányi utam során a csoportjában dolgozhassak és végig segítette munkámat. Köszönöm Dr. Martin Krátký szintetikus munkában nyújtott segítségét. Továbbá köszönöm Dr. Jiřina Stolaříková (Laboratory for Mycobacterial Diagnostics and Tuberculosis, Regional Institute of Public Health in Ostrava, Ostrava, Csehország) bakteriológiai vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Kiss Éva egyetemi tanár, Dr. Gyulai Gergő tudományos munkatárs és Dr. Ábrahám Ágnes tudományos munkatárs, az ELTE Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratórium munkatársainak a membrán affinitás kísérletek elvégzését, valamint a vegyületek nanorészecskébe való csomagolását és jellemzését.

Köszönöm Dr. Cervenák László tudományos főmunkatárs és Debreczeni Márta PhD hallgató, a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriuma munkatársainak az endotél sejteken végzett kísérleteket.

Köszönöm Dr. Szoboszlai Norbert egyetemi adjunktusnak (ELTE TTK, Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszék) a sejtextraktumok LC-MS mérésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Heinner Guionak, a National Institutes of Health (Lima, Peru) munkatársának, hogy tanulmányi utam során csoportjában dolgozhattam, továbbá köszönöm Dr. César Sáncheznek az ott nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Kele Péter tudományos főmunkatárs és Dr. Cserép Gergely tudományos munkatárs, az MTA Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet, Kémiai Biológia Kutatócsoport munkatársainak segítségét és a közös publikáció létrejöttét.

Köszönöm Dr. Csík Gabriella egyetemi docens (Semmelweis Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet) segítségét a fluoreszcencia mérések eredményeinek értékelésében.

Köszönöm Budai Johanna és Gyarmati Nikoletta volt BSc hallgatók munkáját.

Köszönöm az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért, a Pázmány-Eötvös Természettudományi Információs Alapítvány, a Richter Gedeon Centenáriumi Alapítvány, a Campus Hungary Ösztöndíj és az OTKA K104275 támogatását, melyet konferencia részvételekhez, tanulmányi utak létrejöttéhez és a doktori munkám befejezéséhez nyújtottak. Köszönetet mondok Dr. Kiss Éva OTKA K104928 pályázatának támogatásáért is.

Nagyon köszönöm a családomnak és a barátaimnak, hogy mindvégig mellettem álltak és támogattak.

Rövidítésjegyzék

A dolgozatban szereplő kémiai elnevezések helyesírásában az 1998-ban kiadott „Útmutató a szerves vegyületek IUPAC-nevezéktanához” című kiadvány ajánlásait követtem [1]. A peptidkémiaiában használatos rövidítéseket a Journal of Peptide Science kiadvány ajánlása [2] szerint alkalmaztam. Az aminosavak jelölésére az egy- és hárombetűs rövidítéseket is használtam. A baktériumok nevének rövidítése a rendszertani szabályoknak megfelelően történt, mely szerint a nemzettség neve rövidíthető. Az általam előállított vegyületek kódjai nem szerepelnek a rövidítésjegyzékben.

Ac	acetil
AcOH	ecetsav
AFM	atomic force microscopy, atomi erő mikroszkóp
AIDS	acquired immune deficiency syndrome, szerzett immunhiányos tünetegyüttes
Aoa	aminooxiacetil
a.u.	arbitrary unit, nem meghatározott mértékegység
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacillus Calmette-Guèrin (vakcina)
Boc	<i>tert</i> -butiloxikarbonil
BSA	bovine serum albumin, marha szérum albumin
but	butanoil
Bzl	benzil
Cf	5(6)-karboxifluoreszcein
CFU	colony forming unit, telepszám
CIZ	2-klórbenziloxikarbonil
CM	szérumot tartalmazó RPMI-1640 médium
CS	cikloszerin
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid
DCM	diklórmétán
Dde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociklohex-1-ilidén)etil
dek	dekanoil
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIEA	<i>N,N'</i> -diizopropiletilamin
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfatidilkolin
DPPG	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszforiglicerin (nátrium só)
DUTPáz	dezoxiuridin-5'-trifoszfát-nukleotidhidroláz (EC 3.6.1.23)
EDT	1,2-etánditiol
ESI-MS	electrospray ionisation mass spectrometry, elektropray ionizációs tömegspektrometria
EMB	etambutol

FACS	fluorescent-activated cell sorter, áramlási citométer
FCS	foetal calf serum, magzati borjú szérúm
Fmoc	9-fluorenilmetiloxikarbonil
HIV	human immunodeficiency virus, humán immundeficiencia vírus
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell, köldökzsinór véna endotélsejt
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration, koncentrációérték, mely a sejtek 50%-ának pusztulását, életképességének megváltozását okozza
ICM	szérúmmentes RPMI-1640 médium
IgG	immunoglobulin G
INH	izoniazid
IR	infrared spectroscopy, infravörös spektroszkópia
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry, kapcsolt folyadékkromatográfia-tömegspektrometria
M _{av}	átlagos molekulatömeg
M _{mo}	monoizotópos molekulatömeg
MBHA	4-metilbenzidrilamin
MBSA	maleilated bovine serum albumin, maleilezett marha szérúm albumin
MDR	multi-drug resistant, multirezisztens
4-MeBzl	4-metilbenzil
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MIC	minimal inhibitory concentration, minimális gátló koncentráció
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium)-bromid (kolorimetriás teszt)
Mtt	4-metiltritol (védőcsoport)
NaOAc	nátrium-acetát
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance, mágneses magrezonancia
Op	olvadáspont
OT10	[TKPKG] ₂ , dituftsin származék
OT20	[TKPKG] ₄ , tetratuftsin származék
pal	palmitoil
PAS	<i>p</i> -aminoszalicilsav
PBS	phosphate buffered saline, foszfát puffer fiziológiás sóoldat
PDB	protein data bank, fehérje adat bank
Ph-Cl	klórbenzol
PI	propídiám-jodid
POA	pirazinkarbonsav
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfatidilkolin
PZA	pirazinamid
QCM	quartz crystal microbalance, kvarckristály mikromérleg
RIF	rifampicin
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography, fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium, sejtenyésztő oldat

Rt	retention time, retenciós idő
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SM	sztreptomycin
SLB	supported lipid bilayer, felületasszociált lipid kettősréteg
T5	TKPKG, monotuftsín származék
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butil
TEA	triethylamin
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropilszilán
TRIS	2-amino-2-hidroxi-metil-propán-1,3-diol
Trt	tritol
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
XDR	extensively drug resistant, extenzíven rezisztens

1. BEVEZETÉS

A tuberkulózis, a *Mycobacterium tuberculosis* (továbbiakban *M. tuberculosis*) baktérium által okozott megbetegedés, világszerte az egyik fő közegészségügyi probléma. A betegség kezelése 6-12 hónapot vesz igénybe, és a jelenleg alkalmazott antituberkulotikumok többségének számos mellékhatása ismert. A baktérium évtizedekig megtalálható a szervezetben a tünetek jelentkezése nélkül. Ebben az esetben látens fertőzöttségről beszélünk. A látens fertőzöttek (a Föld lakosságának egyharmada ide sorolható) 10%-ánál kialakul az aktív betegség. A multirezisztens törzsek terjedése miatt egyre nagyobb szükség van új típusú antituberkulotikumokra [3]. A szintén a mikobaktériumok közé tartozó *Mycobacterium abscessus* (továbbiakban *M. abscessus*) is jelentős humán patogén, mely a legtöbb antibakteriális hatóanyagra rezisztens [4].

Új hatóanyagok keresése történhet egyrészt a már meglévő hatóanyagok kémiai módosításával, mely során a molekula aktivitásának és szelektivitásának növelése a cél. Hatóanyagok keresése történhet másrészt az ún. *in silico* módszer alkalmazásával, mely során számítógép segítségével több millió kismolekulát dokkolnak a baktérium anyagcseréjében létfontosságú szerepet játszó, ismert szerkezetű fehérjéihez, így ki lehet választani a legjobban kötődő molekulákat, melyek potenciálisan gátolhatják ezeket a bakteriális fehérjéket.

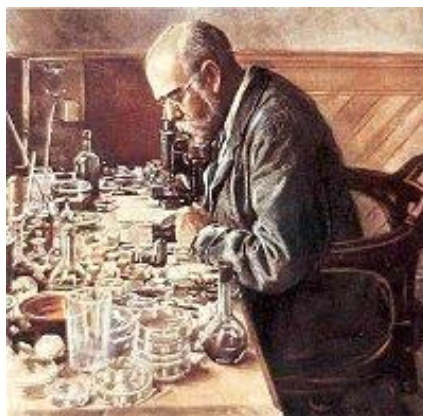
A kis molekulatömegű hatóanyagok többsége csak korlátozott mértékben jut be a sejtekbe. A *M. tuberculosis* és a *M. abscessus* baktériumok intracelluláris kórokozók, ezért nagy jelentőségű lehet a hatóanyagok bejuttatása a fertőzött gazdasejtekbe, melyek főként makrofágok. Hordozók és célbajuttató rendszerek alkalmazásával növelhető a makrofágok hatóanyag felvétele, javítható a hatóanyagok biodisztribúciója. Ennek egyik módja lehet a hatóanyagot tartalmazó polimer nanorészecskék alkalmazása, melyeket a makrofágok hatékonyan fagocitálnak [5]. A hatóanyagok specifikus célbajuttatása valósítható meg peptid típusú hordozókkal, melyek irányító egységként is funkcionálhatnak a makrofágok receptorait célozva [6, 7]. A makrofágok hatóanyag felvételének növelésének hosszú távú előnye, hogy lehetőség nyílik kisebb dózis, rövidebb terápia alkalmazására, és a terápiás szerek mellékhatása is csökkenthető.

Doktori munkám során antimikobakteriális hatású anyagokat, hatóanyagtartalmú nanorészecskéket és specifikus célbajuttatásra alkalmazható hatóanyag-peptid konjugátumokat terveztem, állítottam elő és vizsgáltam ezek biológiai aktivitását. Dolgozatomban bemutatom a tuberkulózis jelenlegi helyzetét és a kemoterápiájával kapcsolatos problémákat. Bemutatom továbbá az általam alkalmazott új antimikobakteriális hatású anyagok irodalmi előzményét, valamint a makrofágok hatóanyag felvételének növelésére irányuló kutatások irodalmát. Ismertetem a munkám során előállított antimikobakteriális vegyületekkel, hatóanyagtartalmú nanorészecskékkel és hatóanyag-peptid konjugátumokkal kapcsolatos kísérleti munkát és az eredményeket.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A tuberkulózis

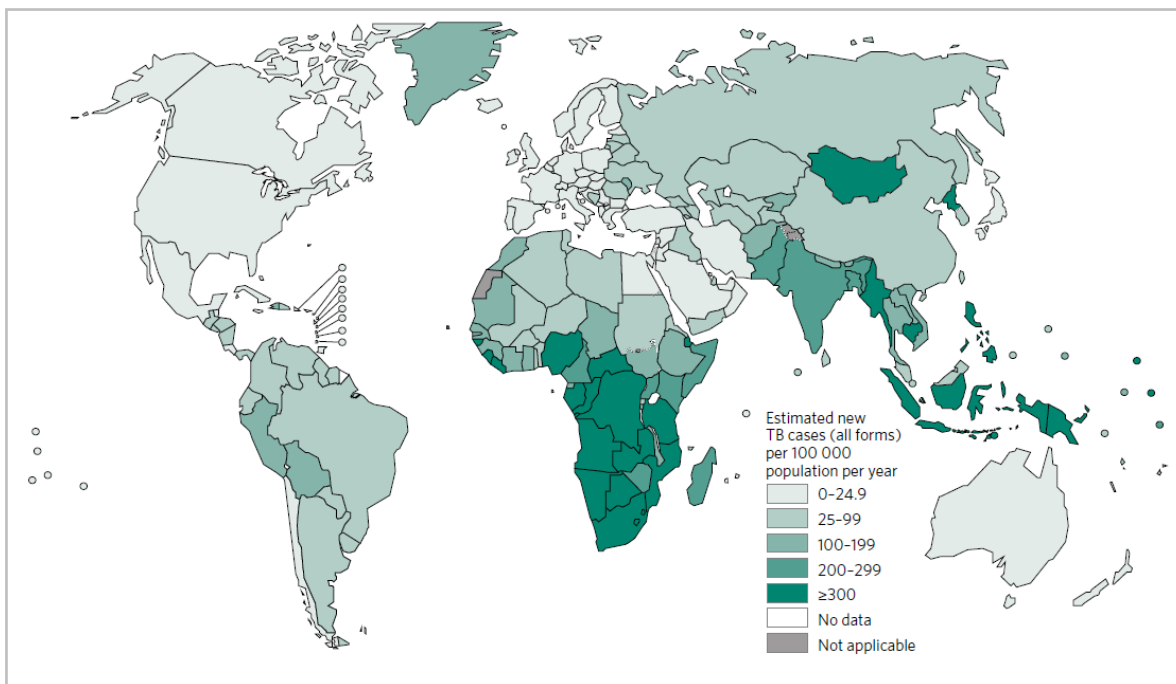
A tuberkulózis egy fertőző betegség, melyet a *M. tuberculosis* baktérium okoz. A tuberkulózist okozó baktériumot Robert Koch fedezte fel 1882-ben, kutatásaiért 1905-ben Nobel-díjat kapott (1. ábra) [8]. A betegség elsősorban a tüdő szöveteit érinti (pulmonáris tuberkulózis), a beteg tüdejében rögök keletkeznek, innen a betegség magyar neve: gümőkór. A baktérium megtámadhatja a központi idegrendszert (meningitisz), a nyirokrendszert, a keringési rendszert (miliáris tuberkulózis), az ivarszerveket, a húgyutakat, a csontokat és az ízületeket is [9].



1. ábra: Robert Koch, a tuberkulózist okozó baktérium felfedezője

Látens fertőzöttség esetén a baktérium dormans állapotban évekig képes túlélni a szervezetben. Legyengült immunrendszer esetén kialakulhat az aktív betegség. A veszélyeztetettek közé tartoznak az újszülöttek, idősek, immunszuppresszált transzplantáltak, HIV fertőzöttek, rossz higiénias viszonyok közt élők, alkoholisták, illetve azok, akiknek a környezetében tuberkulózisos beteg előfordult. Az aktív tuberkulózis tünetei nem specifikusak, a pulmonáris tuberkulózis során a következő tünetek jelentkezhetnek: hosszú ideig tartó, gyakran véres köpettel járó köhögés, mellkasi fájdalom, fogyás, étvágytalanság, fáradtság, láz, hőemelkedés, éjszakai izzadás [3].

A tuberkulózis a történelem során a legtöbb halálesetet okozó fertőző betegségek egyike. A betegség gyógyítható, de napjainkban a becslések szerint több mint 2 milliárd ember fertőzött a baktériummal, ez a Föld lakosságának majdnem az egyharmada. A látens fertőzöttek élete során közel 10%-uknál kialakul az aktív betegség. Egy tuberkulózisban szenvedő, kezeletlen személy évente kb. 10-15 embert fertőzhet meg. A betegség előfordulása nagymértékű földrajzi eltérést mutat, főként a fejlődő országok érintettek (2. ábra). 2015-ben 10,4 millió új fertőzést és 1,8 millió halálesetet jelentettek. Az új esetek 60%-át Ázsia és Afrika 6 országából jelentették (India, Indonézia, Kína, Pakisztán, Nigéria, Dél-Afrika). A HIV fertőzöttek körében háromszor gyakrabban fordul elő a tuberkulózis és ez a leggyakoribb halálok az AIDS-ben szenvedő betegeknél [3].



2. ábra: Új tuberkulózisos megbetegedések aránya a Földön 2015-ben [3]

A rezisztens, vagyis a gyógyszeres kezelésnek ellenálló baktériumtörzsek okozta megbetegedések száma évről évre növekedést mutat. 2015-ben a megbetegedések kb. 5%-a multirezisztens (multidrug-resistant, MDR) tuberkulózis volt (480 000 eset). Az MDR megbetegedés a két leghatékonyabb gyógyszerrel, az izoniaziddal és rifampicinnel szemben ellenállóvá vált *M. tuberculosis* törzsek megjelenését jelenti. Egyre nagyobb fenyegetést jelent az extenzíven rezisztens (extensively drug resistant, XDR) törzsek megjelenése is, mely az MDR esetek 9,5%-át teszi ki (évente 46 000 eset). Az XDR tuberkulózis esetén a baktérium már nemcsak az elsővonalbeli izoniaziddal és rifampicinnel szemben ellenálló, hanem a második vonalbeli gyógyszerek közül valamelyik fluorokinolon-típusú hatóanyaggal szemben és legalább egy injekcióban adható hatóanyaggal (amikacin, kapreomicin, kanamicin) szemben is ellenálló [3].

Magyarországon a tuberkulózisos megbetegedések száma folyamatosan csökken. Az 1970-es években közel 10 000 megbetegedést jelentettek, 2015-ben pedig 900 esetet (9,2 megbetegedés 100 000 lakosra). A legtöbb esetet az ország észak-keleti megyéiben (Szabolcs-Szatmár-Bereg, Borsod-Abaúj-Zemplén és Hajdú-Bihar megye) és Budapesten észlelték. A lazuló szűrési fegyver és a kockázati tényezők miatt ma sem elhanyagolható a tuberkulózis kockázata [10].

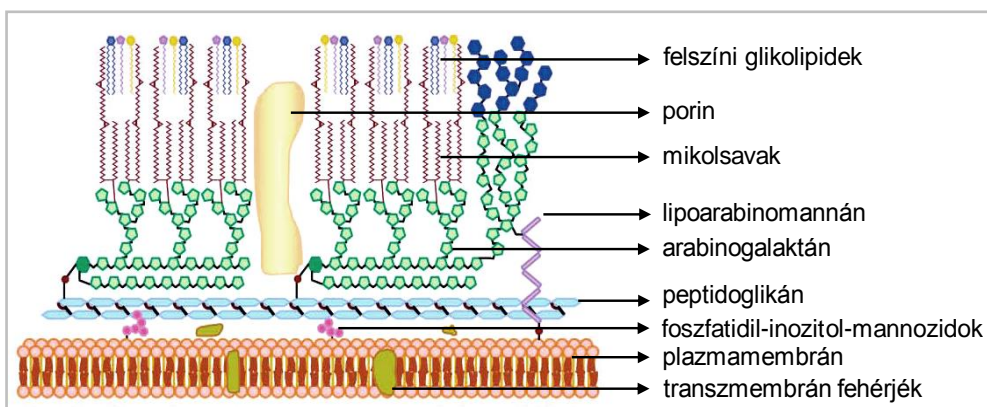
A betegség elleni küzdelemben az első nagy áttörést Albert Calmette és Camille Guèrin érte el, akik elsőként fejlesztettek ki legyengített *Mycobacterium bovis* baktériumot tartalmazó vakcinát. A BCG (Bacillus Calmette-Guèrin) oltáshoz használt vakcinatörzset 13 éven át tartó *in vitro* passzálással gyengítették le és először 1921-ben próbálták ki emberen. Viszont a BCG oltás nem nyújt egész életen át tartó védelmet a betegséggel szemben, leginkább a gyermekkori mikobaktériumok okozta meningitis ellen hatékony. Napjainkra számos országban megszüntették már a kötelező BCG oltást [3].

A tuberkulózis diagnosztikája és a baktérium azonosítása történhet radiológiai kép (mellkasi röntgen, CT), testnedvekből történő bakteriológiai vizsgálat, nukleinsav amplifikációs módszerek, mikolsavak HPLC analízise, immundiagnosztikai módszerek (tuberkulin bőrpróba, termelt interferon-gamma mennyiségének mérése) segítségével [11, 12, 13].

2.2. A *Mycobacterium tuberculosis* és a *Mycobacterium abscessus* baktériumok

A *Mycobacterium* nemzetséghez több mint száz faj tartozik, ezek közös jellemzője az összetett sejtfa, mely a baktérium ellenállóképességéért felelős és a virulenciában is fontos szerepet játszik. A mikobaktériumok közül sok faj előfordul a felszíni vizekben és a talajban, ahol hasznos lebontó, szaprofita életmódot folytatnak és nem patogének. Azonban a mikobaktériumok közt sok kórokozó faj is található, ilyenek például a tuberkulózist okozó *M. tuberculosis*, vagy a leprát okozó *M. lepreae*. Emberi kórképek kialakulásáért az ún. atípusos (nem a *M. tuberculosis* komplexbe tartozó fajok), opportunista mikobaktériumok (pl. *M. avium* komplex, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*) is felelősek lehetnek [14, 15, 16].

A mikobaktériumok sejtfa komplexebb, mint a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumoké (3. ábra) (a mikobaktériumokat a Gram-pozitív baktériumok közé sorolják a külső sejtmembrán hiánya miatt, de valójában Gram-féle festéssel nem osztályozhatóak). A sejtfalban a peptidoglikánvázhoz az arabinogalaktán poliszacharid (D-arabinóz és D-galaktóz alkotja) részen keresztül kovalens kötéssel mikolsavak kapcsolódnak. A mikolsavak 60-90 szénatomból álló zsírsavak, melyek ciklopropán gyűrűt is tartalmaznak, és ezek alkotják a sejtfa 50%-át vastag hidrofób burkot képezve a baktérium körül. A sejtfa külső rétegében lévő peptidláncok (a sejtfa tömegének 15%-a) biológiailag fontos antigének és ezek felelősek a celluláris immunválasz kiváltásáért. A komplex sejtfalnak köszönhető, hogy a baktérium létképes extrém körülmények között is, számos antibiotikumnak ellenáll, sejtfa megvédi a baktériumot a kationos antibakteriális fehérjéktől és az oxigén gyököktől [14, 17, 18].



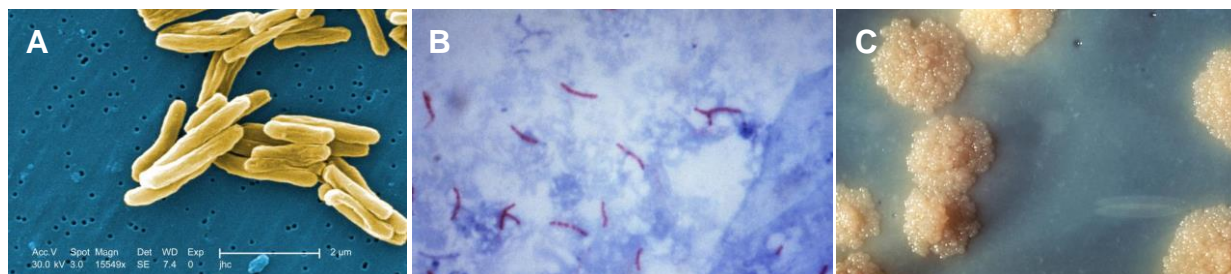
3. ábra: A mikobakteriális sejtfa vázlatos felépítése [17]

A mikobaktériumok közt lassan és gyorsan növekvő fajokat különböztetünk meg. A lassan növekvő fajok osztódási ideje 12-24 óra közötti, kolóniákat 15-28 napon belül alakítanak ki. A gyorsan növekvő fajok átlagos osztódási ideje 2-6 óra, a kolóniákat pedig már 2-7 napon belül kialakítják [15].

Doktori munkám során a lassan növekvő kemoterápia szenzitív *M. tuberculosis* H₃₇Rv standard törzs, a multirezisztens *M. tuberculosis* A8 MDR törzs, továbbá két klinikai izolátum, a multirezisztens *M. tuberculosis* 9449/2006 és az extenzíven rezisztens *M. tuberculosis* Praha 131 törzs tenyésztésének gátlása volt a célom. A gyorsan növekvő, patogén mikobaktériumok közül a *M. abscessus* gátlását terveztük. Így a *M. tuberculosis* és a *M. abscessus* törzsek irodalmát mutatom be részletesen.

A lassan szaporodó *M. tuberculosis* egy intracelluláris, obligát aerob 1-2 µm hosszú, 0,2 µm átmérőjű, pálcika alakú saválló baktérium (4. ábra), mely 16-20 óránként osztódik. Összehasonlításként

az *Escherichia coli* 20 percnként osztódik, de a szintén mikobaktériumok közé tartozó *M. leprae* 14 naponként. A *M. tuberculosis* a gazdaszervezeten kívül szélsőséges körülmények között is túlél (pl. ellenáll a gyengébb fertőtlenítőknek, hetekig tűri a szárazságot), osztódni viszont csak a gazdaszervezeten belül képes. *In vitro* tenyészetet csak hosszú idő után sikerült a baktériumból létrehozni és fenntartani. A baktérium növekedése szempontjából az optimális pH 5,8 és 6,5 között van [9].



4. ábra: A *M. tuberculosis* baktérium (A) pásztázó elektronmikroszkópos képe (15 000-szeres nagyítás), (B) Ziehl-Neelsen festést követő fénymikroszkópos képe (1 000-szeres nagyítás), és (C) a telepek fénymikroszkóp alatt. Forrás: Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Public Health Image Library, <https://phil.cdc.gov/phil/home.asp>

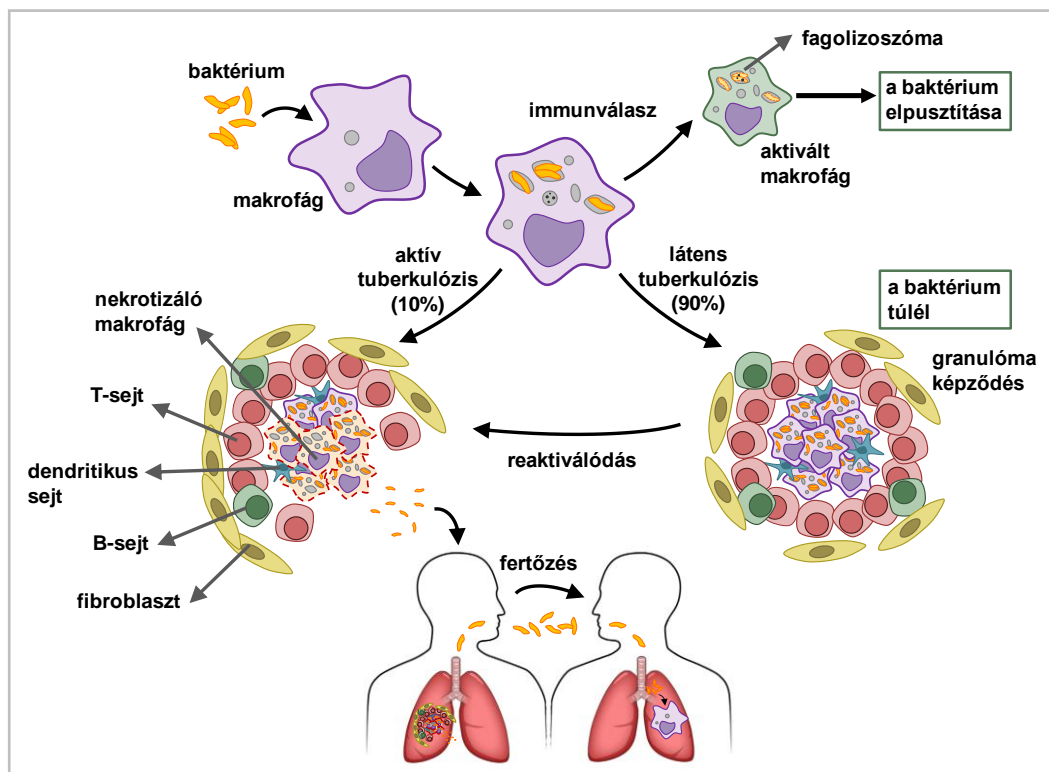
A *M. tuberculosis* H₃₇Rv virulens baktériumtörzs teljes genomjának szekvenciáját Stewart Cole és munkatársai 1998-ban közzétették [19]. A projekt során kapott információkat az interneten hozzáférhető TubercuList adatbázisban gyűjtik [20]. A frissített adatok szerint a teljes genom ~4,4 millió bázispárból áll és összesen 4111 gént tartalmaz. Ebből 4018 fehérje kódoló gén, 80 gén RNS-t kódol, és a genom még 13 pszeudogént tartalmaz [20, 21]. A fehérjéket kódoló gének elnevezése Rv kóddal kezdődik (pl. Rv2654), ami a H₃₇Rv törzsre utal.

A *M. tuberculosis* intracelluláris patogén. A szervezetbe kerülve a makrofágok (főként az alveoláris makrofágok), illetve a dendritikus sejtek bekebelezik a baktériumot (5. ábra) [22]. A fagocitózis specifikus receptorokon keresztül történik (pl. mannóz receptor, scavenger receptor, toll-like receptor (TLR), komplement receptorok) [23]. Az aktiválódott makrofágok képesek elpusztítani a baktériumot (pl. reaktív oxigén és nitrogén intermedierek, fagolizoszóma képződés útján) [18, 24]. A fagocitózis azonban nem minden esetben vezet a baktérium elpusztításához. A *M. tuberculosis* olyan védekezőmechanizmusokkal rendelkezik, melyekkel számos ponton képes gátolni a gazdasejt működését és így megakadályozza az immunrendszer által irányított eliminációt: gátolja a makrofág aktivációt, a fagoszóma érését, a fagoszóma – lizoszóma fúziót, ammónia termelésével semlegesíti a lizoszóma kémhatását, így csökkentve a lizoszomális enzimek aktivitását, és anyagcseretermékei hatástalanítják a reaktív intermediereket [25].

A fertőzött makrofágokban a *M. tuberculosis* dormans állapotban igen hosszú ideig életképes. A dormans fázisban a baktérium csökkentett mértékű anyagcserét folytat az alacsony oxigén tenzió mellett, vagy az aktivált immunsejtek által termelt szénmonoxid és nitrogénmonoxid hatására. A baktérium genomjában azonosították az ún. DosR régiót (dormancy regulon, 48 gén), amelyben található gének által kódolt fehérjéket dormans állapotban nagyobb mértékben expresszálja a baktérium. Ezek a fehérjék feltehetően a dormans állapot létrehozásában és fenntartásában játszanak fontos szerepet [26, 27, 28].

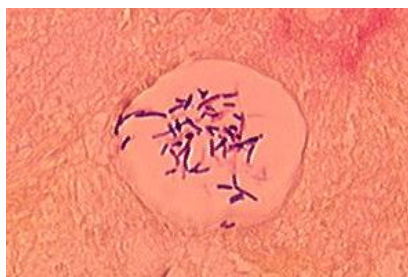
A tüdőben granulómák (gümők) alakulnak ki a szervezet védekező folyamatainak sajátos krónikus következményeként. A granulóma az immunrendszer számára „láthatatlan”, mert a fertőzött makrofágokat intakt T-sejtek veszik körül. A granulómában egyensúly alakul ki a baktérium és a szervezet

immunrendszere közt. A nekrotizáló granulóma belsejében ún. elsajtosodó szövettörmelék található [29]. A granulóma gyógyulása hegesedéssel és meszesedéssel történhet, ezek a gócok a röntgenfelvételen is láthatóak. A granulómákból az immunrendszer legyengülése esetén kiszabaduló baktériumok által új fertőzés jöhet létre [30, 31]



5. ábra: Az immunrendszer reakciója a baktériummal, a tuberkulózis kialakulása ([30, 31] alapján)

A *M. abscessus* (6. ábra) vízben és talajban is előforduló, gyorsan növekvő mikobaktérium, mely 7 napon belül szabad szemmel látható kolóniákat alakít ki szilárd táptalajon [15, 32]. A *M. abscessus* komplexet (*M. abscessus sensu lato*) 3 törzs alkotja: *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* és *M. bolletii*. Jelentős humán patogén, olyan betegségekkel hozható összefüggésbe, mint a cisztás fibrózisban szenvedők krónikus tüdőbetegsége, poszttraumás sebfertőzések, légyszövet fertőzések és disszeminált bőrbetegségek (az abscessus tályogszerű képződményt jelent). Főleg immunszuppresszált betegekre veszélyes. A *M. abscessus* az egyik legvirulensebb törzs, mely jelentős kemoterápia-rezisztenciával rendelkezik. Az *M. abscessus* fertőzések kezelése bonyolult, mert magas a baktérium meglévő (intrinsic, nem szerzett) rezisztenciája, többféle mechanizmussal kikerüli a legtöbb antibiotikum gátló hatását [15, 33, 34, 35]. Kezelése hosszú időt igényel, a megfelelő gyógyszer kiválasztásához *in vitro* szuszceptibilitási tesztek elvégzése szükséges. A jelenleg ajánlott terápia több gyógyszer egyidejű kombinált alkalmazása, mint egy makrolid antibiotikum (klaritromicin vagy azitromicin), egy aminoglikozid származék (pl. amikacin) és a moxifloxacin, linezolid, tigeciklin, cefoxitin vagy imipenem egyike [34, 36].



6. ábra: A *M. abscessus* fénymikroszkópos képe Gram-festés után, szövetmetszetben
(forrás: <http://www.pathologyoutlines.com/>)

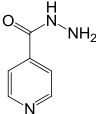
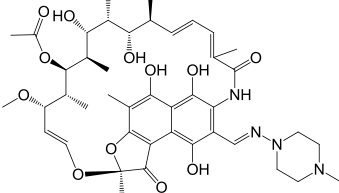
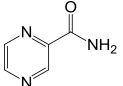
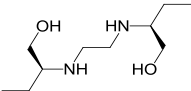
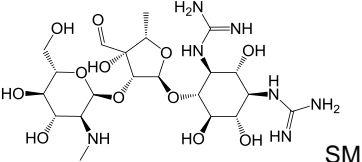
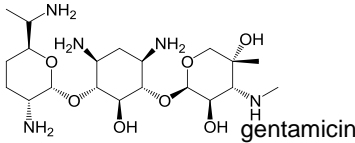
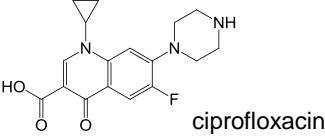
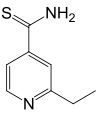
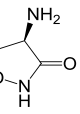
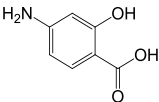
2.3. A tuberkulózis kezelésében alkalmazott legfontosabb antituberkulotikumok és jellemzőik

A tuberkulózist ún. antituberkulotikumokkal kezelik, a többféle mikobaktérium ellen is hatásos anyagokat összefoglalóan antimikobakteriális szereknek nevezik. A ma alkalmazott alapvető hatóanyagokat nagyrészt még az 1950-es években fejlesztették ki. A megfelelően megválasztott kezelés az esetek döntő többségében teljes gyógyulást eredményez. A legelterjedtebben használt antituberkulotikumok a következők [37]:

- elsővonalbeli antituberkulotikumok: izoniazid (INH), rifampicin (RIF), pirazinamid (PZA), etambutol (EMB), sztreptomycin (SM)
- második vonalbeli antituberkulotikumok: aminoglikozidok, polipeptidek, fluorokinolonok, tioamidok, cikloserin (CS), *p*-aminoszalicilsav (PAS).

Az antituberkulotikumok többféle feltételezett hatásmechanizmussal gátolják a baktériumot (pl. zsírsavak, fehérjék, nukleinsavak bioszintézisének gátlása), az 1. táblázat a hatásmechanizmus kiderítésére irányuló kutatások eredményeit mutatja be vázlatosan. A *M. tuberculosis* baktérium szaporodását döntően befolyásolja a környezet oxigén szintje és kémhatása, így az antituberkulotikumok különböző baktériumpopulációkra hatnak. A neutrális és enyhén lúgos közegben, a gyorsan szaporodó extracelluláris baktérium populációkkal szemben az INH a leghatékonyabb, bár a RIF és a SM is hatásosnak bizonyult. A RIF a semleges pH-jú sajtos góccokban lassan, időszakosan szaporodó intracelluláris baktériumokkal szemben is kimagasló aktivitással rendelkezik. A PZA intracellulárisan, savas kémhatásnál fejt ki hatását [38, 39, 40].

1. táblázat: A főbb antituberkulotikumok irodalomban leírt hatásmechanizmusa [37]

	antituberkulotikum	szerkezet	hatásmechanizmus
elsővonalbeli antituberkulotikumok	izoniazid (INH)		prodrug, a KatG enzim aktiválja, zsírsav bioszintézis inhibitor (mikolsav szintézist gátolja)
	rifampicin (RIF)		DNS alapú folyamatok inhibitora, az RNS szintézist gátolja
	pirazinamid (PZA)		prodrug, zsírsav bioszintézis inhibitor (zsírsavszintézist gátolja)
	etambutol (EMB)		arabinogalaktán és peptidoglikán bioszintézis inhibitor
	sztreptomycin (aminoglikozid)		fehérje szintézis inhibitor, szelektíven a baktérium riboszómájának 30S alegységéhez kötődik
második vonalbeli antituberkulotikumok	egyébb aminoglikozidok (pl. gentamicin, amikacin)		fehérje szintézis inhibitorok
	fluorokinolonok (pl. ciprofloxacín, levofloxacín)		DNS alapú folyamatok inhibitorai
	tioamidok (pl. etionamid, protionamid)		prodrug, zsírsav bioszintézis inhibitorok
	cikloszerin (CS)		arabinogalaktán és peptidoglikán bioszintézis inhibitor
	p-aminosalicilsav (PAS)		dihidrofolátreduktáz inhibitor

Napjainkban az antituberkulotikus terápia előírása a következő: kombinált INH, RIF, PZA, és EMB kezelés 2 hónapon keresztül, majd INH és RIF a következő 4 hónapban [3]. Az antituberkulotikumoknak komoly mellékhatásai lehetnek, pl. hepatotoxicitás, neurotoxicitás, vesetoxicitás, bőrkütiés, hányinger, hányás, halláscsökkenés [41]. Ha a beteg már jobban érzi magát és idő előtt abbahagyja a gyógyszeres kezelést, vagy időnként elfelejti bevenni az előírt adagot, vagy nem megfelelő dózist szed, kialakulhat a rezisztencia [42]. Az is előfordulhat, hogy valaki már rezisztens tuberkulózissal fertőződik meg.

A multirezisztens (MDR) tuberkulózis legalább az INH-dal és RIF-nel szemben ellenállóvá vált *M. tuberculosis* törzsek megjelenését jelenti. A MDR törzsek csoportján belül pedig már megjelent az extenzív rezisztens (XDR) forma (rezisztencia INH-ra, RIF-re, fluorokinolon-típusú hatóanyagra és az amikacin, kapreomicin, kanamicin egyikére) [3]. A rezisztens törzsek többsége genetikai változások és utólagos szelekció útján jön létre. A spontán létrejött ellenálló mutációk szelekcióját a hatóanyag jelenléte biztosítja. A rezisztencia kialakulhat a hatóanyag aktiválásáért felelős génekben történő véletlen pontmutációk miatt [42]. A lipidben gazdag bakteriális sejtfalon átjutott antituberkulotikumokat a baktérium többféleképpen inaktívalhatja. Kémiai detoxifikáció történhet enzimatis inaktíválással (pl. acetiláció, adeniláció, foszforiláció). A baktérium megváltoztathatja a célpont fehérje szerkezetét is [43]. Membrán asszociált transzport fehérjék és efflux pumpák segítségével képes lehet a hatóanyagok kipumpálására a sejtől [44].

2.4. Új antituberkulotikumok, antimikobakteriális hatóanyagok keresése

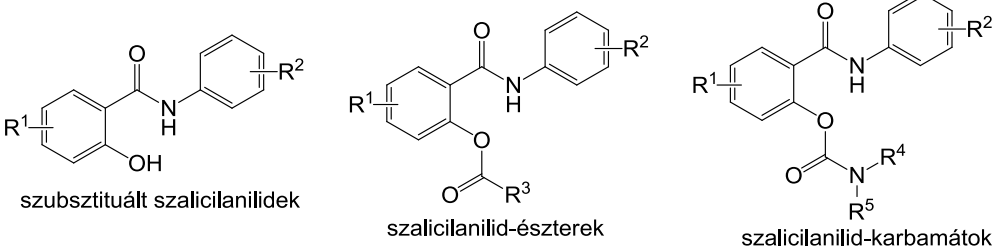
A rezisztens törzsek terjedése miatt egyre nagyobb szükség van új antituberkulotikumokra, antimikobakteriális szerekre. Új hatóanyagok keresése történhet a már meglévő hatóanyagok kémiai módosításával, ennek keretében doktori munkám során különböző szalicilanilid származékok és az 5-klórpirazon-2-karbonsav vizsgálatával foglalkoztam. Az ún. *in silico* módszer segítségével is lehetséges az új hatóanyagok keresése, munkám során *in silico* azonosított majd optimalizált hatóanyagjelölteket is vizsgáltam. A következő fejezetekben ezen vegyületek irodalmát mutatom be.

2.4.1. Szalicilanilid származékok mint antimikobakteriális hatóanyagok

A szalicilanilid (2-hidroxi-*N*-fenilbenzamid) származékok sokféle biológiai aktivitással rendelkeznek. Antimikrobiális hatásuk kiemelkedő; antibakteriális, antifungális, antivirális és parazitaellenes hatásuk is van [45, 46, 47]. Jelenleg a klinikumban féreg ellenes szerként alkalmazott szalicilanilid származékok pl. a niclosamid, és a oxyclozanide [48]. A szalicilanilid származékok a baktériumok közül hatnak a Gram-pozitív patogének ellen, a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* és a vankomicin-rezisztens *Enterococcus faecium* ellen [49, 50]. Ezen felül antimikobakteriális hatásuk van nemcsak a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzse ellen, hanem a hagyományos antituberkulotikumokkal szemben ellenállóbb lassan növekvő atípusos törzsek ellen is, mint a *M. avium*, *M. fortuitum* és *M. kansasii* [51]. Bizonyos szalicilanilid származékok aktívnak bizonyultak MDR és XDR *M. tuberculosis* törzsek ellen is [52, 53].

A szalicilanilid származékok hatásmechanizmusa összetett. A gyulladásos folyamatok kialakulásában szerepet játszó interleukin-12p40 képződésének szelektív inhibitorai [54, 55]. A szalicilanilid származékok proton transzporterként funkcionálva a sejt proton gradiensének megzavarásával pusztíthatják el a sejteket, mely a humán sejteken való citotoxicitásért is felelős lehet [56]. Gátolják a bakteriális kétkomponensű szabályozó rendszert [57], mely a baktériumoknál általánosan előforduló jelző-átviteli út, melyet a *M. tuberculosis*-nál is részletesen tanulmányoztak [58, 59]. Számos bakteriális enzim inhibitorai, pl. transzglykoziláz [60], *D*-alanin-*D*-alanin-ligáz [61], szortáz A [62], mikobakteriális izocitrát-liáz [63, 64, 65, 66, 67], metionin-aminopeptidáz [67], L-alanin dehidrogenáz [66]. A 2. táblázat az eddig publikált, antimikobakteriális szempontból legaktívabb szubsztituált szalicilanilid származékokat mutatja be.

2. táblázat: Az eddig publikált kiemelkedő aktivitással rendelkező szubsztituált szalicilanilidek, szalicilanilid észterek és szalicilanilid karbamátok (az R csoportok jelölése az idézett referenciáknak megfelelően történt)

						
R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Ref.	In vitro aktivitás
4-Cl	4-Cl	-	-	-	51	kiemelkedő antimikobakteriális hatás <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. avium</i> ellen (MIC > 0,5 µM)
4-Cl	4-CF ₃	-	-	-		
4-Cl	3,4-diCl	-	-	-		
5-Cl	4-CF ₃	-	-	-		
5-Cl	3,4-diCl	-	-	-		
5-Br	4-CF ₃	-	-	-		
5-Br	3,4-diCl	-	-	-		
4-Cl	4-CF ₃	2-pirazinil (pirazinoát)	-	-	63	kiemelkedő antimikobakteriális hatás MDR és XDR <i>M. tuberculosis</i> ellen (MIC > 0,125 µM)
4-Br	4-CF ₃	2-pirazinil (pirazinoát)	-	-	63	
5-Br	4-CF ₃	4-nitrofenil (nitrobenzoát)	-	-	53	
5-Cl	4-Cl	-	CH ₃	CH ₃	64	
5-Cl	3,4-diCl	-	C ₂ H ₅	H	71	
5-Cl	3,4-diCl	-	C ₆ H ₁₃	H	71	
4-Cl	3,4-diCl	2-pirazinil (pirazinoát)	-	-	63	
5-Cl	3,4-diCl	2-pirazinil (pirazinoát)	-	-	63	
5-Br	4-CF ₃	4-nitrofenil (nitrobenzoát)	-	-	53	
5-Cl	3,4-diCl	4-nitrofenil (nitrobenzoát)	-	-	53	
5-Cl	3,4-diCl	4-brómfenil (brómbenzoát)	-	-	71	
5-Cl	3,4-diCl	-	C ₅ H ₁₁	H	71	
5-Cl	4-CF ₃	-	-	-	67	mikobakteriális izocitrát-liáz (ICL1) enzim gátlása
5-Cl	3,4-diCl	2-pirazinil (pirazinoát)	-	-	63	
4-Cl	4-CF ₃	2-pirazinil (pirazinoát)	-	-	67	
4-Cl	3,4-diCl	fenil (benzoát)	-	-	67	
5-Cl	5-F	-	fenil	fenil	64	mikobakteriális metionin-aminopeptidáz gátlása
5-Br	4-CF ₃	-	-	-	67	
4-Br	4-CF ₃	2-pirazinil (pirazinoát)	-	-		
4-Cl	4-CF ₃	2-pirazinil (pirazinoát)	-	-		
4-Cl	4-CF ₃	fenil (benzoát)	-	-	67	

A szerkezet-hatás összefüggés felderítésére irányuló vizsgálatok igazolták, hogy a szalicilanilid származékok aktivitásához elektronakceptor szubsztituens jelenléte szükséges a molekula szalicilsav-gyűrűjén és hidrofób csoport az anilin-gyűrűn [56]. A fenolos hidroxilcsoport jelenléte is szükséges az aktivitáshoz, viszont valószínűleg ez felelős a humán mitokondriumokban az oxidatív foszforilációs folyamatokban okozott zavaró hatásért [56, 68].

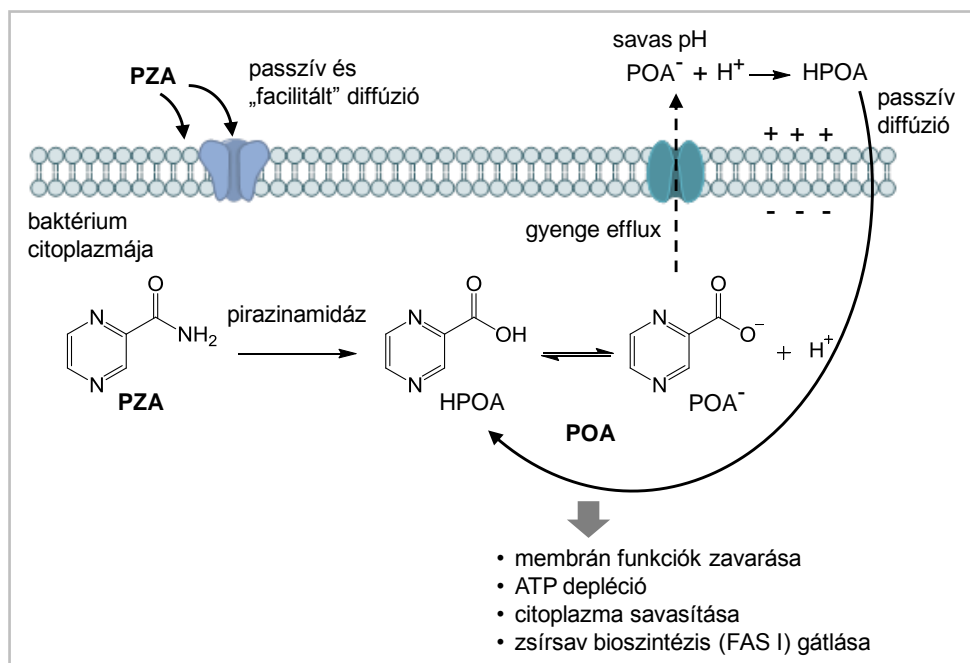
Előnyös lehet a fenolos hidroxilcsoportok átmeneti maszkírozása. Ezáltal kedvezőbb fizikai-kémiai tulajdonságok, jobb biohasznosulás, jobb membrán permeabilitás, jobb aktivitás és alacsonyabb toxicitás

érhető el. Szalicilanilid-észterek esetén (pl. szalicilanilidek pirazinkarbonsavval, benzoésav származékokkal, aminosavakkal alkotott észterei) jobb antimikrobiális aktivitást tapasztaltak a szabad fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó származékhoz képest [63, 69, 52, 53]. A szalicilanilid származékok aminosav észterei és szalicilanilid-benzoátok MDR és XDR *M. tuberculosis* törzsekkel szemben is aktívnak bizonyultak [52, 53].

A szalicilanilidek fenolos hidroxilcsoportjának karbamáttá alakítása megvédheti a molekulát az ún. „first-pass” metabolizmustól (vérkeringésbe kerülés előtt a májon át történő metabolizmus), valamint szélesítheti aktivitási spektrumát [70, 71]. Szalicilanilid-*N*-monoalkil-karbamátok kimagasló *in vitro* aktivitást mutattak *M. tuberculosis*, atípusos mikobaktériumok (*M. kansasii*, *M. avium*) és több rezisztens törzs ellen alacsony MIC (minimális gátló koncentráció) mellett (0,5-2 μ M). Ezen felül kevésbé voltak citotoxikus hatásúak, mint a kiindulási szalicilanilidek és hidrolízissel szemben stabilnak bizonyultak [71]. Szalicilanilid-*N,N*-dialkil/aryl-karbamátok szintén többféle mikobaktérium növekedését gátolták, bár hatásuk nem bizonyult jobbnak a kiindulási szalicilanilidekéénél [64].

2.4.2. Pirazinkarbonsav származékok

A pirazinamid (PZA) elsővonalbeli antituberkulotikum a lassú anyagcseréjű, dormans állapothoz közeli, savas környezetben lévő, intracelluláris *M. tuberculosis* ellen hatásos [72]. Habár a PZA *in vivo* aktivitása kiemelkedő, a „normál” tenyésztési körülmények közt, semleges pH közelében nem gátolja a baktériumot [73]. A PZA prodrugból kialakuló aktív pirazinkarbonsav (POA) létrejöttéhez szükséges az alacsony pH [74]. A PZA-t a baktérium nikotinamidáz/pirazinamidáz enzime alakítja át az aktív POA-vá (7. ábra), az enzimet kódoló gén (*pncA*) mutációjával alakulhat ki rezisztencia a PZA ellen [75]. A PZA passzív és aktív diffúzióval juthat be a baktériumba, ahol a citoplazmában a pirazinamidáz enzim hidrolizálja. Az intracellulárisan ionos formában jelen lévő POA ('POA') a feltételezett mechanizmus szerint efflux segítségével kilép a sejtől. Ha a sejten kívül savas (pH~5,5) környezet van (pl. fertőzött makrofág fagolizoszómája) a POA részben protonálódik. A protonált POA ('HPOA') lipofilebb molekula és könnyen átjut a baktérium sejtjén. A POA hatásmechanizmusa többféle lehet, gátolja a baktérium zsírsav bioszintézisét (fatty acid synthase I, FAS I inhibíciója), savasítja a baktérium citoplazmáját, megzavarja a baktérium membránpotenciálját és membrán transzportját, csökkenti a baktérium ATP szintjét, valamint gátolja a baktérium fehérje-transzlációját [72, 76, 77, 78, 79].



7. ábra: A PZA aktivációja és feltételezett hatásmechanizmusa (a baktérium sejtfaa nincs ábrázolva) ([72] alapján)

A pirazinkarbonsav módosításával, mint például anilidszármazék [80, 81], benzoilszármazék kialakítása [82], sikerült növelni a pirazinkarbonsav aktivitását. Az 5-klórpirazinamid, az 5-klórpirazin-2-karbonsav és észterei hatásosak voltak *M. tuberculosis* ellen, a PZA-rezisztens baktérium ellen, *M. bovis* és néhány atípusos mikobaktérium ellen is. Klórszubsztituenst tartalmazva is gátolták a mikobakteriális zsírsav-szintáz I-et (FAS I) [83, 84, 85].

Tanulmányozták a klinikumban alkalmazott hatóanyagok könnyen felbontható kötésen keresztül történő összekapcsolását. A vizsgált vegyületek a PZA-n kívül az INH, EMB, PAS és a fluorokinolonok családjába tartozó ciprofloxacín származékai voltak. Ezek a kettős hatóanyagú molekulák prodrugként alkalmazhatóak, valószínűsíthetően elnyújtott felszabadulást és szinergizmust segíthetnek elő [86, 87, 88]. A szinergizmus során két különböző hatóanyag egymás hatását támogatja és erősíti [89].

2.4.3. Szalicilanilid származékok pirazinkarbonsavval alkotott észterei

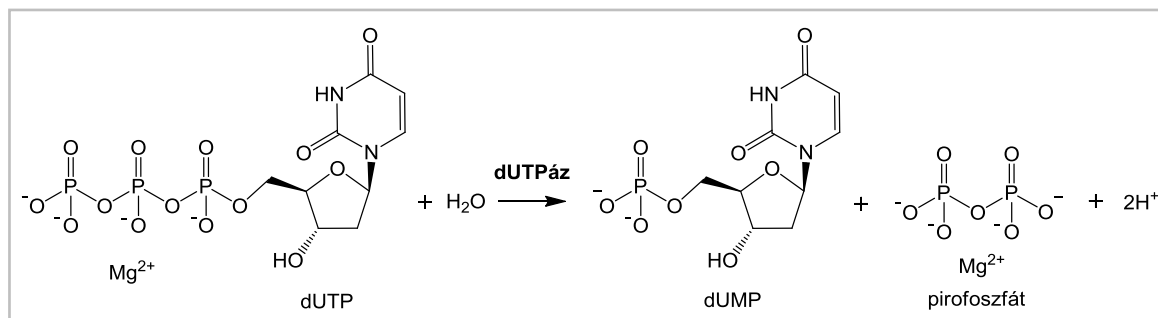
Vizsgáltak szalicilanilid-pirazinoátokat, melyekben az észterkötés valószínűleg a nikotinamidáz/pirazinamidáz enzim nélkül is hidrolizál, így felszabadul az aktív szalicilanilid származék és a POA. Észterként nő a POA lipofilitása, ezáltal nőhet a baktérium sejtfaán keresztüli transzportja. A legaktívabb szalicilanilid-pirazinoátok (2. táblázat) 0,125-2 μM minimális gátló koncentráció értéknel hatásosak voltak MDR és XDR törzsek ellen is, aktívak voltak PZA-rezisztens atípusos mikobaktériumok ellen (*M. avium*, *M. kansasii*) és nem alakult ki keresztrezisztencia a klinikumban alkalmazott antituberkulotikumokkal. A szalicilanilid-észterek közül ezek bizonyultak eddig a leghatásosabbaknak és szelektivitást mutattak a baktériumok felé, azonban citotoxicitásuk nem elhanyagolható. A hepatotoxicitás tanulmányozására alkalmazott modellen (HepG2 humán hepatokarcinóma sejtek) kapott citotoxicitásuk (5 μM körüli IC_{50}) kisebb, mint a kiindulási szalicilanilideké (1 μM körüli IC_{50}) (IC_{50} : a sejtek 50%-ának pusztulását, életképességének megváltozását okozó koncentráció). A POA nem bizonyult citotoxikusnak (IC_{50} : 2240 μM) [63, 67].

2.4.4. Új antituberkulotikumok meghatározása *in silico* módszer alkalmazásával

Új hatóanyagok keresése történhet az ún. *in silico* módszer segítségével. Az *in silico* módszer lényege, hogy ismert háromdimenziós szerkezettel (NMR, röntgenkristallográfia) rendelkező fehérjékhez dokkolják egy több millió molekulából álló vegyülettár elemeit. Kis molekulatömegű vegyületek a baktérium anyagcseréjében létfontosságú enzimekhez való kötődését, és ezen keresztül közvetve ezen enzimek gátlását dokkolóalgoritmusok alkalmazásával lehet jósolni. A kísérletekben használt molekulatár a nyilvános Zinc adatbázis, mely mára már több mint 100 millió kereskedelemben kapható vegyületet tartalmaz 3D formátumban (Zinc – a free database of commercially-available compounds for virtual screening, <http://zinc15.docking.org/>) [90, 91, 92]. A *M. tuberculosis* túléléséhez fontos enzimekhez kötődő vegyületeket egy újonnan kifejlesztett dokkolási algoritmus segítségével az ELTE Számítógéptudomány Tanszékén Grolmusz Vince kutatócsoportjában határozták meg [6, 93].

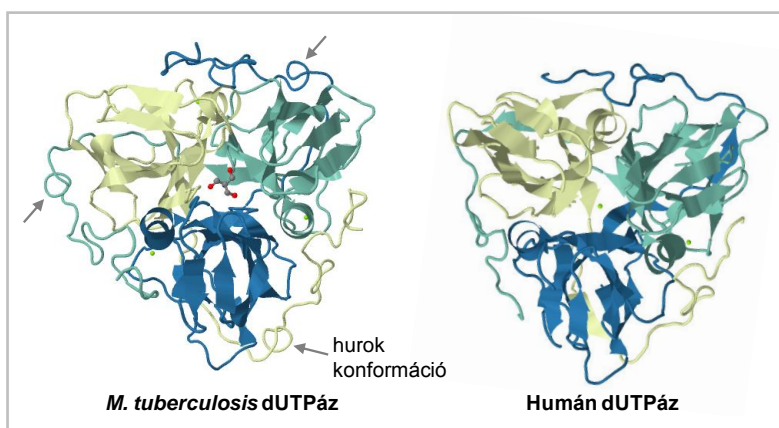
A dokkoláshoz a 2005-ben közel 12 millió vegyületet tartalmazó Zinc adatbázisból [90] kiválasztottak kb. 2 millió molekulát, melyek a Lipinski-féle ötös szabály alapján gyógyszereszerű tulajdonságokkal rendelkeztek (móltömeg kisebb, mint 500 Da; a lipofilitást jellemző logP oktanol-víz megoszlási hányados nagyobb, mint 5; a molekula maximálisan 5 hidrogénkötésben vehet részt mint donor és maximum 10-ben mint akceptor) [94]. A ligandumok dokkolása a baktérium anyagcseréjében kulcsfontosságú szerepet játszó enzimekhez történt, mint pl. a dUTPáz enzim [95, 96]. A dokkoláshoz egy saját fejlesztésű algoritmust, a FRIGATE programot használták. A program által generált dokkolási energiák alapján a legjobb 1 000 jelöltet a logP értékek, a várható oldhatósági tulajdonságok és a kötődései jellemzők alapján tovább szűkítették 20 molekulára. A 20 vegyületből 1 nem bizonyult vízoldhatóknak, a maradék 19 vegyületnek meghatározták az *in vitro* antimikobakteriális hatását *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön. 10 vegyület esetében (TB1-TB10) 100 µg/mL alatti MIC értéket kaptak. Ezen vegyületek alapváza piridopirimidin, kumaranon, piperazin, vagy triazaantracén volt [6, 93]. A vegyületek hatékonysága ezután szintetikus optimalizálási lépések sorozatával javítható, így az eredeti kiindulási vegyületek lehetséges gyógyszerjelölt molekulákká alakíthatóak.

A dUTPáz a nukleotid metabolizmusban vesz részt, a dUTP hidrolízisét katalizálja, ami által dUMP és pirofoszfát keletkezik (8. ábra). A dUMP a dTTP nukleotid bioszintéziséhez szükséges prekursor molekula. Az enzim aktivitása révén csökkenti a DNS-be a timidin helyett hibaként beépülő uracil mennyiségét, hozzájárulva így a nukleinsav integritásának megőrzéséhez. Az enzimműködés hiánya ún. timinmentes sejthalálhoz vezet [97].



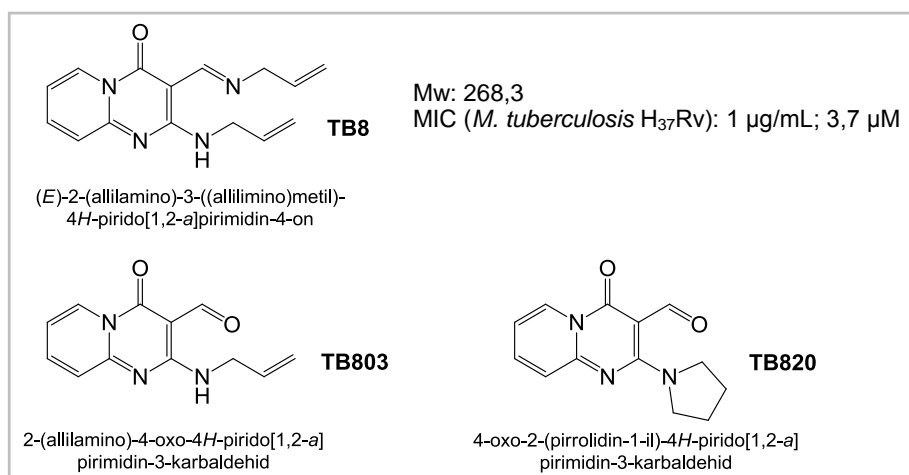
8. ábra: A dUTPáz katalitikus reakciója: dUTP hidrolízise dUMP-re és pirofoszfátra

A *M. tuberculosis* és a humán dUTPázok (deoxiuridin-5'-trifoszfát-nukleotidohidroláz; EC 3.6.1.23; Rv2697; PDB kód: *M. tuberculosis* 2PY4; humán 3EHW) homotrimer szerkezettel rendelkeznek (három azonos polipeptidlánc) és három aktív hely található bennük (9. ábra). Azonban a két enzim szerkezete eltérő, a mikobakteriális dUTPáz szerkezetében a humán enzimmel ellentétben a monomer egységek felszínén egy hurok konformáció található, ezt a helyet célozva az enzimből feltehetőleg szelektivitás érhető el [96, 98, 99].



9. ábra: A *M. tuberculosis* és a humán dUTPáz 3D szerkezete (dUTPáz - α,β -imido-dUTP - Mg^{2+} komplexek), a nyilak a mikobakteriális hurok konformációt szemléltetik (<http://www.rcsb.org/>)

A Kutatócsoportunkban alkalmazott, *in silico* azonosított TB8 piridopirimidin származék kiemelkedő *in vitro* aktivitást mutatott *M. tuberculosis* H₃₇Rv ellen (MIC: 1 μ g/mL, 3,7 μ M), IC₅₀ értéke pedig MonoMac6 humán monocita sejtvonalon (gazdasejt makrofág modell) négy nagyságrenddel nagyobb volt, mint a MIC értéke. A TB8 szerkezeti optimalizálása folyamán több mint 100 származékot szintetizáltak, a vegyületek *in vitro* aktivitását meghatározták és vizsgálták a szerkezet-hatás összefüggéseket. Olyan TB8 származékokat állítottak elő, melyek funkciócsoporton keresztül peptid típusú horodozókhoz konjugálhatók. Doktori munkám során olyan TB8 származékokat alkalmaztam, melyek karbonilcsoportot tartalmaznak, így aminosav-csoportot tartalmazó peptidekkel konjugálhatók oximkötést kialakítva. A TB8 kiindulási molekula és az általam alkalmazott két származéka (TB803 és TB820) látható a 10. ábrán [7, 100, 101, 102].



10. ábra: Az *in silico* meghatározott kiindulási TB8 piridopirimidin származék és két konjugálható származéka

2.5. A hatóanyagok célbajuttatása a gazdasejtbe konjugátumok alkalmazásával

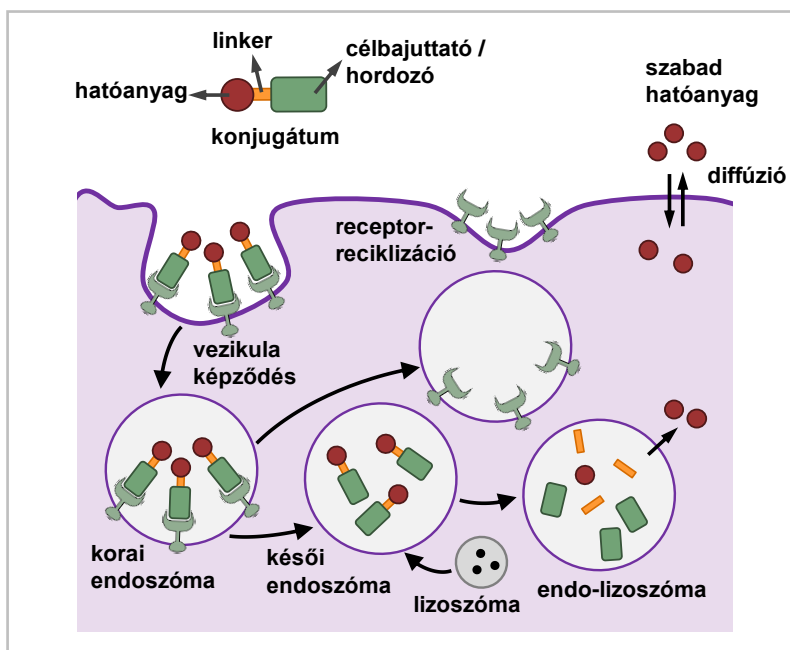
A tuberkulózis kezelése során alkalmazott hatóanyagok többsége csak kismértékben hat az intracelluláris (dormans) baktériumpopuláció ellen. A hatóanyagok fertőzött sejtekbe történő bejutása főként diffúzió révén történik, mely korlátozott mértékű lehet, de a szelektivitás hiánya miatt bármilyen típusú sejtbe bejuthatnak. Ezért a hosszú kezelési idő miatt számolni kell az antituberkulotikumok mellékhatásaival, így a szervezet egészét érintő nem specifikus toxicitással. Továbbá a szervezet kiválasztórendszere gyorsan kiürítheti a gyógyszert a véráramból [103].

Konjugátumok alkalmazásával megvalósítható az antituberkulotikumok szelektív célbajuttatása a fertőzött sejtekbe, melyek főként makrofág, illetve monocita típusú sejtek [6]. A konjugálás kedvezően befolyásolhatja a vegyületek fiziko-kémiai tulajdonságait (pl. vízdékonyság) és biológiai sajátságait (pl. biodisztribúció) is, valamint csökkenthető a hatóanyagok nem kívánt toxicitása. Továbbá a hatóanyag fokozatos felszabadulása a konjugátumokból retard (elnyújtott) hatást eredményezhet és ezáltal a hatóanyag lassabban ürülhet ki a szervezetből [104].

Gyógyszerhordozóként alkalmazhatók például fehérjék, peptidok, poliszacharidok, polimerek, nanorészecskék és liposzómák. A természetes eredetű fehérjék esetében (pl. marha szérum albumin (BSA), keyhole limpet hemocyanin (KLH), ovalbumin (OVA), tetanus toxoid (TT)) hordozóspecifikus immunválasz alakulhat ki. Ezekkel a hordozókkal ellentétben a szintetikus polimereknek és oligopeptideknek általában nincs immunogén hatása [104, 105].

A hordozóhoz konjugált hatóanyagok szelektív sejtbejuttatása a makrofágokba történhet receptor mediált endocitózis révén. A konjugátumnak tartalmaznia kell célbajuttató egységet (pl. receptor ligandum), amely specifikusan a makrofágok sejt felszínén található receptorhoz kötődik. A célbajuttató egység egyben betöltheti a hordozóegység szerepét is. A kötődés után internalizáció és lizoszomális degradáció következik be (11. ábra) [104]. Bizonyos molekulák internalizációja az endocitózis más típusaihoz pl. a fagocitózishoz vagy pinocitózishoz köthető, mely mechanizmusok nem feltétlenül receptor mediáltak.

A liposzómák fontos szerepet játszanak a konjugátumok degradációjában és így a hatóanyag felszabadulásában. A liposzómák olyan membránnal határolt sejtorganelumok, melyek pH-ja savas (pH 4,5-5,0) és több mint 40 féle enzimet tartalmaznak. Ezek az enzimek képesek lebontani a biológiai fontos molekulák nagy részét, mint például fehérjéket, zsírokat, szénhidrátokat. Különböző észterázokat, foszfatázokat, glikozidázokat, nukleázokat, proteázokat, endo- és exopeptidázokat azonosítottak a liposzómákban [106, 107].



11. ábra: Konjugátumok célzott sejfbejutása receptor mediált endocitózissal ([104] alapján)

A makrofágok mintázatfelismerő scavenger receptora egy alkalmas célpont lehet a hatóanyagok specifikus sejtbefuttatására. Kutatócsoportunkban ilyen scavenger receptoron keresztül történő fokozott sejtbefuttatást tapasztaltak polilizin gerincű, elágazó láncú anionos molekulák esetében, mint az ún. EAK származékok: poli[Lys(Succ-Glu_i-DL-Ala_m)], poli[Lys(Mal-Glu_i-DL-Ala_m)] (ahol i: 1, m: 3-4, Succ: szukcinil, Mal: maleil) [108]. Hasonló hordozó metotrexát konjugátumával (Mtx-ALK konjugátum, ahol ALK: poli[Lys(DL-Ala_m-Leu_i)], (i: 1, m: 3-4)) a szintén makrofágokban élősködő *Leishmania donovani* kórokozó hatékonyabb gátlását érték el *in vitro* és *in vivo* kísérletekben [109].

A makrofágokon található scavenger receptor típusú MBSA kötőhelyek segítségével receptor mediált endocitózis útján hatékonyan bejutott a sejtekbe a maleilezett marha szérum albuminhoz (MBSA) konjugált PAS antituberkulotikum. A lizoszómában hidrolízis útján felszabadult a hatóanyag aktív formája. A kísérleteket egérből származó fertőzött peritoneális makrofágokon végezték. A konjugátum százszor hatékonyabban pusztította el az intracelluláris *M. tuberculosis* baktériumokat, mint a szabad PAS [110]. A PAS-MBSA konjugátum *in vivo* modellen, fertőzött tengerimalacokon is hatásosabb volt a szabad hatóanyagénál [111].

A természetes eredetű kitozán-származékokkal (lineáris poliszacharid) konjugált antituberkulotikumok (INH, PZA, etionamid) megőrizték *in vitro* aktivitásukat a konjugátumban *M. tuberculosis* ellen, citotoxicitásuk pedig jelentősen csökkent [112].

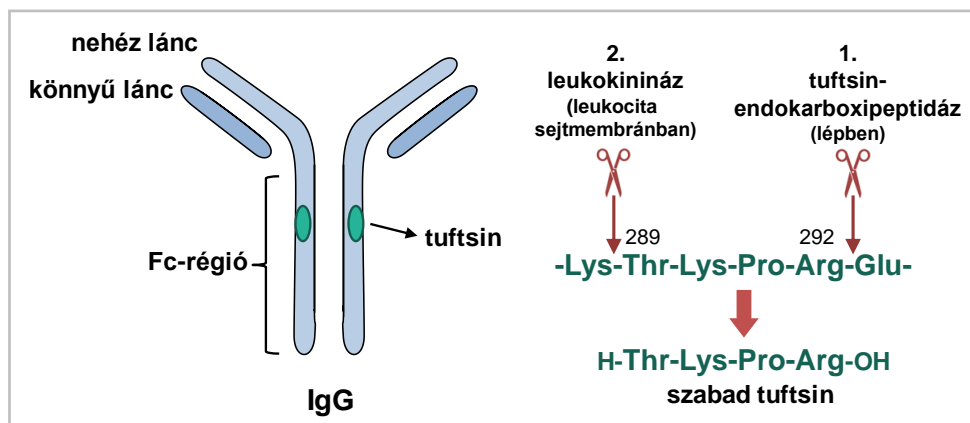
A polimer alapú konjugátumokkal szemben a hatóanyag-peptid konjugátumok előállítását jól reprodukálható és a termék kémiaiailag pontosan jellemezhető. Hordozó és célbajuttató egységként alkalmasak a doktori munkám során alkalmazott ún. tuftsinszármazékok, melyek irodalmát a következő fejezetben tárgyalom részletesen.

2.5.1. A tuftsinszármazékok mint célbajuttató és hordozó peptidek

A makrofágok, monociták és polimorfonukleáris (PMN) leukociták felszínén megtalálható tuftsin receptor is alkalmas hatóanyagok célzott sejtbejuttatására [113, 114, 115]. A fagocita sejtek felszínén számos tuftsin-kötőhely található, ezért a tuftsin peptid és származékai ígéretes jelöltek a makrofágokba történő célzott sejtbejuttatásra [116, 117]. A tuftsin egy természetes eredetű tetrapeptid, melynek szekvenciája embernél: Thr-Lys-Pro-Arg (TKPR), kutyánál: Thr-Lys-Pro-Lys (TKPK). Az 1970-es évek elején Victor Najjar és munkatársai azonosították az amerikai Tufts Egyetemen, innen ered a peptid neve [118].

A tuftsin receptorát 1986-ban szintén Victor Najjar és munkatársai azonosították és izolálták nyúl peritoneális granulociták membránjából [119], bár a tuftsin hatásmechanizmusa és szignalizációs útvonala még máig sem teljesen tisztázott. Megállapították, hogy a tuftsin nem csak az immunsejteken található tuftsin receptorhoz kötődik, hanem a neuropilinek családjába tartozó 120 kDa tömegű neuropilin-1 receptorhoz is, mely egy nem tirozin-kinázokhoz tartozó ko-receptor. A neuropilinek a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptoroknak (VEGFR) ko-receptorai ezért szerepük van a keringési rendszer fejlődésében, és az angiogenezisben játszott szerepük kapcsán a tumorképződés folyamatában is. A tuftsin verseng a VEGF jelfehérjével a receptorhoz való kötődésben, mivel a VEGF C-terminálisa a tuftsinnal homológ szekvenciát tartalmaz. A tuftsin neuropilin-1 receptorhoz való kötődését endotélsejteken (HAEC humán aorta és HUVEC humán köldökzsínór véna endotélsejtek) történő vizsgálattal azonosították [120, 121].

A szervezetben a tuftsin enzimatis hasítás során keletkezik, az immunoglobulin G (IgG) nehéz lánc Fc-régiójának (CH2 domén, kristályosítható régió) 289-292 fragmense. A tuftsin csak szabad tetrapeptid formájában aktív, ennek elérése érdekében két enzim hasítja ki az immunoglobulin G-ből. Először a lépben jelen lévő tuftsin-endokarboxipeptidáz hasítja el az ²⁹²Arg-²⁹³Glu kötést. Ezután a fagocita sejtek plazmamembránjának külső felületén a leukokinináz enzim elhasítja a ²⁸⁸Lys-²⁸⁹Thr közötti kötést, ezzel felszabadítva a biológiailag aktív, szabad H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH tetrapeptidet (12. ábra) [118, 122, 123, 124].



12. ábra: A tuftsin enzimatis hasadása az immunoglobulin G-ből ([123] alapján)

A tuftsin immunfolyamatokban játszik szerepet, stimulálja a fagocitózist és a kemotaxist, képes aktiválni a granulocitákat és a makrofágokat (antigén prezentálás, reaktív oxigén gyökök termelése). Továbbá a tuftsinnak antimikrobiális (pl. a tuftsin által aktivált makrofág már képes az intracelluláris

kórokozókat elpusztítani) és daganatellenes hatása is van [118, 122, 125]. A tuftsin fontosságát mutatja, hogy a tuftsin hiánya (genetikai ok vagy lépeltávolítás miatti) súlyos fertőzőes megbetegedésekhez vezethet [126]. A tuftsin idegrendszerre kifejtett hatását is leírták (pl. fájdalomcsillapító hatás) [124]. Egyéb természetes eredetű tuftsinanalóg tetrapeptidok (TRPR, TKPK, TRPK) is a tuftsinhoz hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek [123, 127]. A TKPPR tuftsin-szerű peptid tuftsin antagonistaként nagyobb affinitással kötődik a tuftsin receptorhoz, mint a TKPR peptid [119].

Monociták esetében megfigyelték, hogy az internalizált tuftsin transzlokációval bejuthat a sejtmagba, ahol kölcsönhatásba léphet a DNS-sel és szabályozhatja a monociták növekedését [128, 129].

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban Szekerke Mária kutatásai alapján Mező Gábor fejlesztette ki és vezette be a hordozóként és célbajuttató egységként alkalmazható szekvenciális oligopeptidok egy új csoportját, az ismétlődő pentapeptid egységet tartalmazó oligotuftsin származékokat: [TKPKG]_n (n=2, 4, 6, 8) [130, 131, 132, 133]. Ezeknek a származékoknak a kutyából izolált tuftsin (TKPK) az alapja, mely a humán tuftsintól abban tér el, hogy arginin helyett a szintén bázikus oldallánccal rendelkező lizin található benne. Ez a változás nincs jelentős hatással a peptid biológiai aktivitására. A szekvenciában szereplő, szelektív oldalláncvédelemmel ellátott két lizin felhasználható további módosításokhoz (akár két különböző molekula is hozzákapcsolható). A C-terminálisához kapcsolt Gly fragmenskondenzációval történő szintézis esetén megakadályozza a peptid racemizációját, sőt a TKPRG molekulánál fokozottabb immunstimuláló hatást tapasztaltak, mint a TKPR esetében [134]. Ezek az oligotuftsin származékok jól jellemezhetőek, nem toxikusak, biodegradábilisak és tuftsinszerű biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint pl. kemotaxis és fagocitózis stimuláló hatás. Az oligotuftsinok közül az OT20 ([TKPKG]₄) tetrauftsin származék mutatta a legnagyobb immunstimuláló aktivitást [131]. Molekulamodelllezési vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy az OT20 molekula flexibilis szerkezetű és a lizinek ε-aminocsoportja oldószer által jól hozzáférhető. A 8 lizin oldalláncból a 4-es pozícióban lévő hozzáférhetősége a legnagyobb, ezt követi a 2-es és a 14-es pozícióban lévő lizinek oldalláncának hozzáférhetősége [131].

A tuftsin és származékai monocita, makrofág sejtekbe irányuló célbajuttató egységként, illetve hordozóként való alkalmazásáról számos publikáció számol be. HIV fertőzött makrofágok esetében több mint 30-szor nagyobb hatóanyag felvételt mértek antiretrovirális hatóanyaggal töltött (efavirenz), tuftsinnal konjugált polipropilén-imin-dendrimerek esetében a szabad hatóanyaghoz képest [135]. Előállítottak olyan rifampicin tartalmú liposzómát, mely a felszínén TKPR tetrapeptidet tartalmazott. A TKPR peptid C-terminálisához etiléndiamin linkerrel keresztül palmitinsavat kapcsoltak, mely horgonyként funkcionálva beépült a liposzómába. A palmitoil-tuftsint tartalmazó liposzómák bejutottak a monocitákba, a makrofágokba és a polimorfonukleáris (PMN) leukocitákba. Fertőzött állatokon végzett *in vivo* tesztekben a rifampicin tartalmú tuftsin nélküli liposzómákhoz képest hatékonyabb gátlást tapasztaltak a tuftsint is tartalmazó rifampicin-liposzóma rendszer esetében [136]. MonoMac6 sejteket alkalmaztak akut monociták leukémia modelként, melyekbe a metotrexát tumorelles hatóanyag hatékonyabb bejutását érték el a metotrexátot elágazó láncú OT20 oligotuftsin származékhoz konjugálva [133].

Az antituberkulotikus hatású anyagok tuftsin konjugátumainak aktivitását külön fejezetben mutatom be.

2.5.2. Az antimikrobiális anyagok, konjugátumok módosítása zsírsavakkal

A hatóanyag-peptid konjugátumok zsírsavval történő módosítása, ún. lipopeptid-konjugátumok kialakítása ígéretes lehetőség az aktivitás növelése felé. A hidrofób zsírsav jelenléte növelheti a konjugátum lipofilitását, valamint az egész konjugátumot amfipatikus tulajdonságúvá teheti, így elősegítheti a membrán affinitás növekedését. Ez azért fontos, mert a hatóanyagnak több membránon is át kell jutnia, mire eléri a fertőzött sejtben a baktériumot [137]. A hidrofób zsírsav rész a molekula bizonyos típusú nanorészecskébe történő csomagolását is elősegítheti [138].

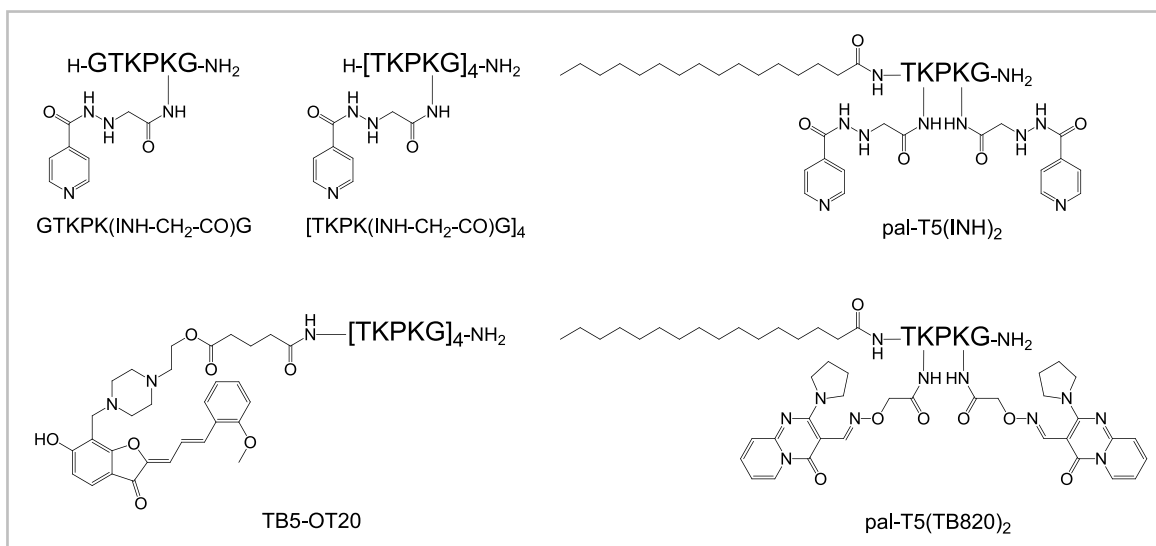
Az irodalomban találunk példát a zsírsavláncot tartalmazó antimikrobiális vegyületek hatásának vizsgálatára. A különböző hosszúságú zsírsavakkal (C10 – dekánsav (kaprinsav), C12 – dodekánsav (laurinsav), C14 – tetradekánsav (mirisztinsav), C16 – hexadekánsav (palmitinsav)) konjugált kationos, eredetileg inaktív peptideknél a zsírsav jelenléte antibakteriális hatást eredményezett [139]. Szintetikus, ciklikus lipopeptid származékok, melyek dekanoil, vagy dodekanoil láncot tartalmaztak, jelentős aktivitással rendelkeztek Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok ellen [140]. A daptomicin egy dekánsavat tartalmazó lipopeptid antibiotikum (a *Streptomyces roseosporus* baktériumból izolálták), amely gyors baktericid aktivitással rendelkezik számos Gram-pozitív patogén ellen, mint például a streptococcusok, a meticillin-rezisztens *S. aureus* és a vankomicin-rezisztens enterococcusok. Ezek a lipopeptidek megzavarják a baktériumok sejtmembránjának működését és áteresztőképességét [140, 141, 142].

A mikobaktériumok foszfolipidjeinek fő zsírsav alkotói a mikolsavakon kívül a palmitinsav, hexadekánsavak, oktadekánsavak és a tuberkulosztearinsav (10-metiloktadekánsav) [143, 144].

Az irodalmi előzmények alapján doktori munkám során háromféle zsírsavat alkalmaztam a konjugátumok előállításánál oldallánc módosításra: a rövid szénláncú vajsavat (C4), a közepes hosszúságú dekánsavat (C10) és a hosszabb szénláncú palmitinsavat (C16).

2.5.3. Antituberkulotikum-tuftsinszármazék konjugátumok

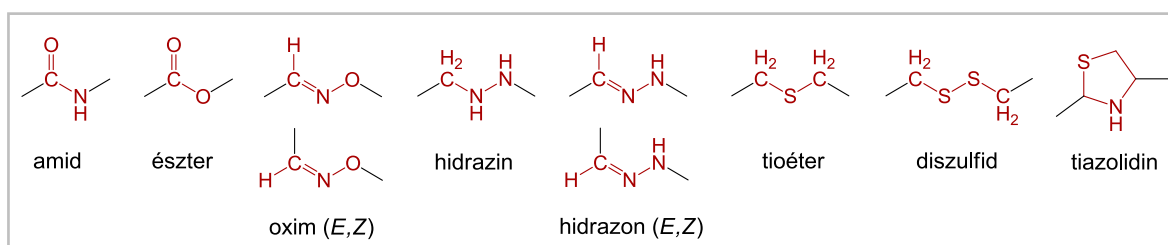
Korábban Kutatócsoportunkban Horváti Kata doktori munkája során antiuberkulotikum-tuftsinszármazék konjugátumok szintézisével és vizsgálatával foglalkozott (13. ábra) [101]. Hatóanyagként INH-t és *in silico* azonosított és kémiaiilag optimált hatóanyagjelölteket (TB5 kumaron származék és TB820 piridopirimidin származék) alkalmazott. Palmitinsavval módosított konjugátumokat is előállított. A hidrazinkötést tartalmazó INH-tuftsin konjugátumok, GTKPK(INH-CH₂-CO)G (monotuftsin származék) és [TKPK(INH-CH₂-CO)G]₄ (tetratuftsin származék) a szabad INH-hoz hasonló koncentrációban gátolták a *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumot [6]. A kumaron származék tetratuftsin konjugátumánál (TB5-OT20) monocitákba történő megnövekedett sejtbejutást és a fertőzött monocitákban az intracelluláris baktérium gátlását érték el [7]. Az N-terminálison palmitinsav módosítást tartalmazó INH-monotuftsin konjugátum, a pal-T5(INH)₂, ahol T5 = TKPKG, és a TB820 piridopirimidin származék oximkötést tartalmazó monotuftsin konjugátuma, a pal-T5(TB820)₂ *in vitro* hatásos volt szenzitív és MDR *M. tuberculosis* törzsek ellen is, magas szelektivitással. A konjugátumok membrán affinitása is megnövekedett a szabad hatóanyaghoz képest [100, 138]. A szabad INH-val ellentétben a pal-T5(INH)₂ konjugátum jelentősen gátolta az intracelluláris baktériumot is [145].



13. ábra: Antituberkulotikum-tuftsinszármazék konjugátumok [6, 7, 100, 138, 145]

2.5.4. A hatóanyag-célbajuttató egység, illetve hordozó közötti kötés és távolságtartó egység szerepe

A konjugátum biológiai tulajdonságait a hatóanyag és a célbajuttató molekula közötti kötés, illetve a távtartó egység (spacer, linker) is befolyásolja. A hatóanyag tulajdonságai előnytelenül változhatnak, ha a molekula nem funkcionálisan aktív kémiai szerkezettel szabadul fel a konjugátumból. A konjugációnál leggyakrabban amid, észter, éter, oxim, hidrazin, hidrazon, tioéter, diszulfid és tiazolidin jellegű kötések alkalmaznak (14. ábra).



14. ábra: A hatóanyag és a hordozó között kialakítható kötéstípusok a konjugálás során

A hatóanyag a konjugátumból felszabadulhat enzimatis hidrolízissel vagy pH kontrollált reakcióval [146]. Kemoszelektív ligációval hozhatók létre a hidrazon-, tiazolidin- és oximkötések, melyek kialakítása során egy aldehidcsoport és egy gyengén bázikus tulajdonságú oldallánc (pl. aminosavcsoport, hidrazincsoport) között megy végbe reakció, enyhén savas közegben (pH=4-6) [147]. Tam és munkatársai hidrazon-, tiazolidin- és oximkötést tartalmazó peptid dendrimerek stabilitásának pH-függését vizsgálták. A tiazolidinkötésű vegyület stabil pH=3-9 kémhatású oldatban; az oximkötést tartalmazó származék savas és semleges pH-n stabil (pH=3-7), míg a hidrazonkötésű vegyület pH=5-7 között stabil [148, 149].

Doktori munkám során oximkötés kialakításával konjugáltam a karbonilcsoportot tartalmazó hatóanyagokat az aminosavacetil-csoportot tartalmazó tuftsinszármazékokkal. Az aminosavacetil-csoport kialakítása során mellékreakciók is felléphetnek. Az egyik ilyen reakció a többszörös acileződés [150]. Megoldás lehet az etoxietilidén védőcsoport használata, mely átmeneti oximkötést hoz létre, mely könnyen eltávolítható (hasítás: 5% TFA, 47,5% MeCN, 47,5% víz, V/V, 1 óra) [151]. Az oximkötés

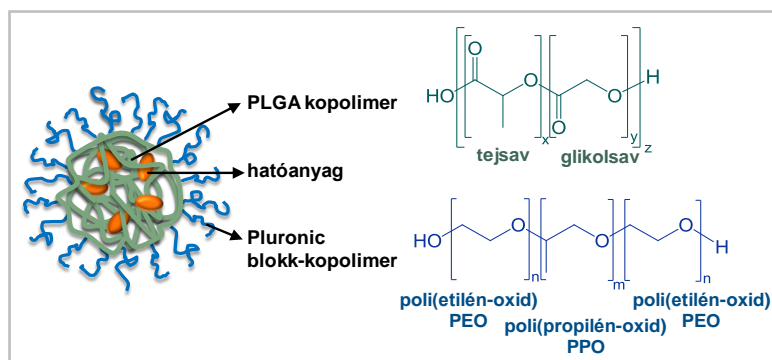
létrejöttét gyorsítja a poláris aprotikus oldószerek (DMF, DMSO) jelenléte a vizes reakcióelegyben. Az aminosxiacetil-csoport stabil oximot képezhet a laboratóriumban jelen lévő aldehidek és ketonok gőzével, mint például az aceton, ezért ezen vegyületek jelenlétét igyekeznünk kell kerülni a reakció alatt [152]. Az oximkötést tartalmazó konjugátumok patkány máj lizoszóma preparátumban vizsgált lizoszomális hidrolízise alapján az oximkötés legtöbbször stabil marad, a legkisebb, hatóanyagot tartalmazó metabolit a hatóanyag és a hozzá oximkötéssel kapcsolódó aminosav [153, 154].

A konjugátumokban enzimlabilis távtartó egységek beépítésével specifikus felszabadulás mehet végbe. A hatóanyagot pl. peptid spaceren keresztül kapcsolhatjuk a hordozóhoz. Irodalmi adatok alapján spacerként alkalmazhatóak az alábbi peptidok (az alkotó aminosavakat egybetűs kódokkal jelöltem): GG, GFG, GFF, GLG, GVA, GFA, GLF, GLA, AVA, GFLG, GFFL, GLLG, GFYA, GFGF, AGVF, GFFG, GFLGF, GGFLGF [155]. A lizoszómában jelen lévő katepszin-B enzimre specifikus tetrapeptid, a GFLG alkalmazásával a spacer gyors lizoszomális hidrolízise által a hatóanyag, vagy annak aktív metabolitja felszabadulhat a lizoszómában. Korábban Kutatócsoportunkban igazolták, hogy a GFLG spacer tartalmazó, tumorellenes hatású daunomicin-peptidhormon konjugátumnál (GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)) a konjugátumban katepszin-B hatására a távtartó egység a G-F, F-L és L-G szekvenciájánál hasad. A konjugálás eredményességét is növelheti a GFLG spacer alkalmazása [132, 133, 156, 157]. Doktori munkám során én is a GFLG szekvenciájú spacer alkalmaztam.

2.6. Antituberkulotikumok polimer típusú nanorészecske származékainak előállítása

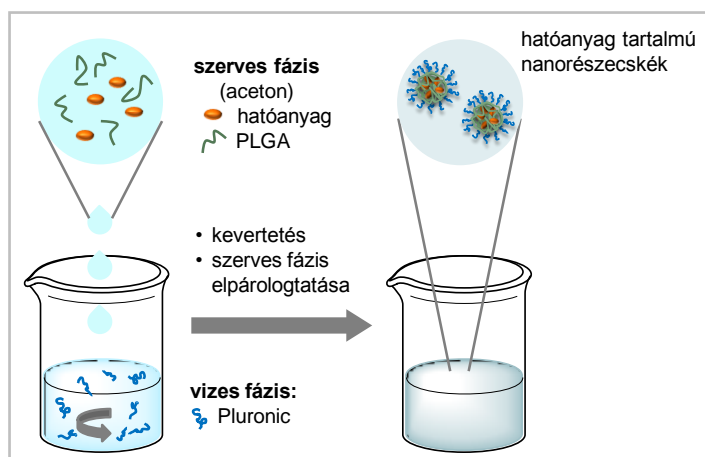
Az antituberkulotikumok kolloidális hatóanyag-hordozók alkalmazásával, (pl. mikro- vagy nanorészecskékbe történő adszorbeálással, csomagolással) a makrofágok hatóanyag felvétele növelhető [5]. Ezek a rendszerek biokompatibilisek, megvédik a hatóanyagot az idő előtti metabolizmustól és segítségükkel a hatóanyag elnyújtott felszabadulása érhető el. A kolloidális hatóanyag-hordozók felületi struktúráinak funkcionálásával, targetáló molekulák beépítésével akár az irányított sejbejuttatás is megvalósítható. A kolloidális hatóanyag-hordozók alkalmazásakor lehetőség nyílna a különböző úton való adagolásra, például intravénásan, szájon, orron, szemén, bőrön keresztül. Ezek a tulajdonságok lehetővé tehetik a gyógyszeres terápiák kevesebb mellékhatással járó alkalmazását. A módszer egyik hátránya, hogy az előállítás során nehezen szabályozható és reprodukálható a hatóanyag-tartalom [158, 159].

A nanorészecskék olyan anyagok, amelyek mérete a IUPAC definíciója szerint 1 és 500 nm közötti tartományba esik [160], alakjuk közel gömbszerű. A nanorészecskék szerves polimerekből épülhetnek fel. A hatóanyag általában a polimer mátrixban van szétoszlatva (fizikai adszorpció). Napjainkban kiemelt szerepű a biodegradábilis PLGA tejsav-glikolsav kopolimer nanorészecskék alkalmazása, melyből a szervezetben a degradáció hatására fokozatosan szabadul fel a polimer mátrixba bezárt hatóanyag (15. ábra). A PLGA nanorészecskék degradációs sebessége a tejsav:glikolsav aránnyal változtatható [161, 162]. Amfipatikus polimerekkel tovább növelhető a PLGA részecskék felületi biokompatibilitása és sztérikus stabilitása. Ilyen polimerek pl. a Pluronic márkaneven kapható vízoldható poli(etilén-oxid)-poli(propilén-oxid)-poli(etilén-oxid) (PEO-PPO-PEO) blokk-kopolimerek, melyek jelentős felületaktivitással rendelkeznek. A PEO blokkok alkotják a molekula hidrofil részét, a PPO lánc pedig a hidrofób részét, mely elősegíti a hidrofób felületen való megkötődést [163]. A Pluronic, illetve a PLGA az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) és az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) által gyógyászati termékekben való felhasználásra engedélyezett anyagok [161, 163].



15. ábra: A Pluronic-kal stabilizált PLGA nanorészecskék sematikus ábrája

A hatóanyagot tartalmazó PLGA nanorészecskék előállítása történhet nanoprecipitáció segítségével (16. ábra). A nanoprecipitáció során oldószercsere következtében valósul meg a kicsapódás, a hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék létrejötte. A PLGA polimert és a hatóanyagot egy vízzel elegyedni képes, illékony szerves oldószerben oldják fel (pl. aceton). A szerves oldatot ezután egy stabilizátort (pl. Pluronic) tartalmazó vizes oldathoz adagolják enyhe kevertetés mellett. Komplex határfelületi, hidrodinamikai folyamatok hatására spontán képződnek a nanométeres mérettartományba eső, szűk méreteloszlású részecskék [164, 165].



16. ábra: Hatóanyag tartalmú PLGA nanorészecskék előállítása nanoprecipitáció módszerével

Antituberkulotikumok (RIF, INH, PZA) PLGA nanorészecskékbe csomagolásával növelték a hatóanyag bihasznosulását és sikeresen gátolták a baktériumot a fertőzött tengerimalacokban [166]. Kimutatták, hogy az antituberkulotikumot tartalmazó nanorészecskék az endoszóma-rendszerbe kerülve találkoznak a baktériumokkal [167]. A Kutatócsoportunkban alkalmazott Pluronic polimerrel stabilizált, hatóanyagtartalmú PLGA nanorészecskék alkalmazásával magasabb intracelluláris hatóanyag koncentrációt értek el, a nanorészecskék *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is gátolták a baktériumot [100, 138, 145, 168]. A palmitinsav módosítást tartalmazó pal-T5(INH)₂ és pal-T5(TB820)₂ tuftsinszármazék konjugátumokat sikeresen PLGA nanorészecskékbe csomagolták és a kapszulázott konjugátumok kiemelkedő *in vivo* aktivitása mellett nem lépett fel jelentős toxicitás a fertőzött tengerimalacokon [100, 145].

Doktori munkám során együttműködés keretében készítettünk hatóanyagot tartalmazó Pluronic-kal stabilizált PLGA nanorészecskéket.

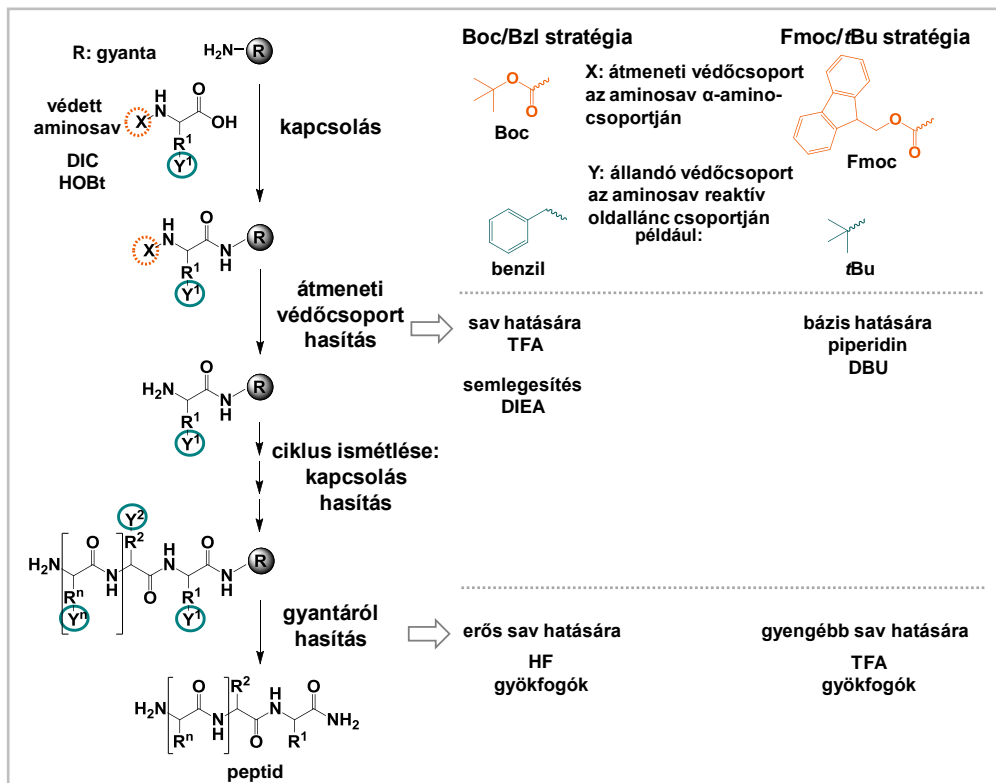
2.7. A kísérleti módszerek elméleti alapjainak rövid áttekintése

2.7.1. A szilárfázisú peptidszintézis

A szintetikus munka során a peptideket szilárfázisú peptidszintézissel állítottam elő. A szilárfázisú peptidszintézis módszerét Robert Bruce Merrifield dolgozta ki 1963-ban, ezért az eljárásért, mely forradalmasította a peptidek szintézisét 1984-ben Nobel-díjat kapott [169]. A módszer lényege, hogy az első aminosavat hozzákapcsoljuk egy szilárd hordozóhoz, majd újabb aminosavat kapcsolunk az előzőhöz, és az egyenkénti kapcsolást a kívánt lánchossz eléréséig folytatjuk. A szintézis C-terminális – N-terminális irányban halad. A szintézis során olyan aminosavszármazékokat használunk, melyek nukleofil oldalláncaikon állandó védőcsoportokkal, az α -NH₂-csoportjaikon pedig átmeneti védőcsoporttal vannak ellátva. Egy aminosav kapcsolása előtt az előző aminosavszármazékról az átmeneti N^α-védőcsoportot eltávolítjuk és a kapcsolni kívánt aminosavszármazék karboxilcsoportját aktiváljuk, így létrejöhöz az amidkötés. A kész peptidet lehasítjuk a hordozóról, és ezzel egy időben távolítjuk el az állandó oldallánc védőcsoportokat is. A szilárfázisú módszer nagy előnye, hogy a nem reagált aminosavszármazékokat és egyéb reagenseket a reakció végén egyszerű szűréssel el lehet távolítani a peptid-gyanta mellől. A lehasított peptid oldatát szintén szűréssel lehet megkapni. A nyers peptidet ezután megtisztítjuk, általában nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével.

A szilárd hordozó (gyanta, pl. sztirol-divinilbenzol kopolimer vagy poletilén-glikol alapú) funkcionálizálható részt tartalmaz, a kialakított peptid-gyanta kötés a szintézis körülményei közt nem hasad, viszont a szintézis végén hatékonyan hasítható.

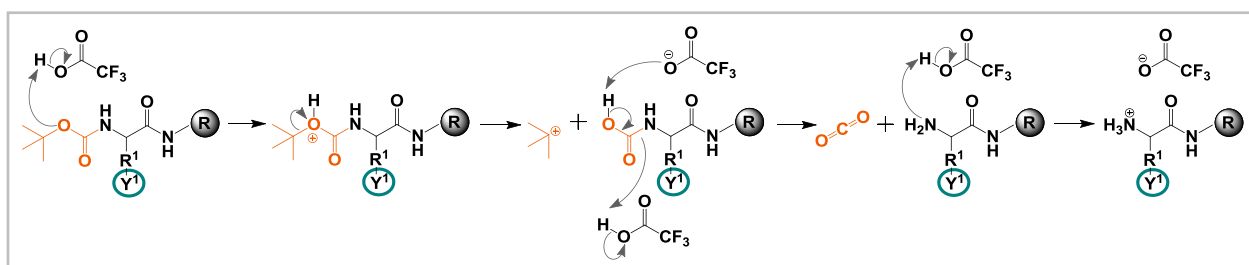
A szilárfázisú peptidszintézisnek két, széles körben elterjedt stratégiája van, a *tert*-butiloxikarbonil/benzil (Boc/Bzl) módszer és a 9-fluorenilmetiloxikarbonil/*tert*-butil (Fmoc/*t*Bu) módszer (17. ábra).



17. ábra: A Boc/Bzl és az Fmoc/*t*Bu stratégiával végzett szilárfázisú peptidszintézis vázlatos áttekintése

2.7.1.1. A Boc/Bzl módszer

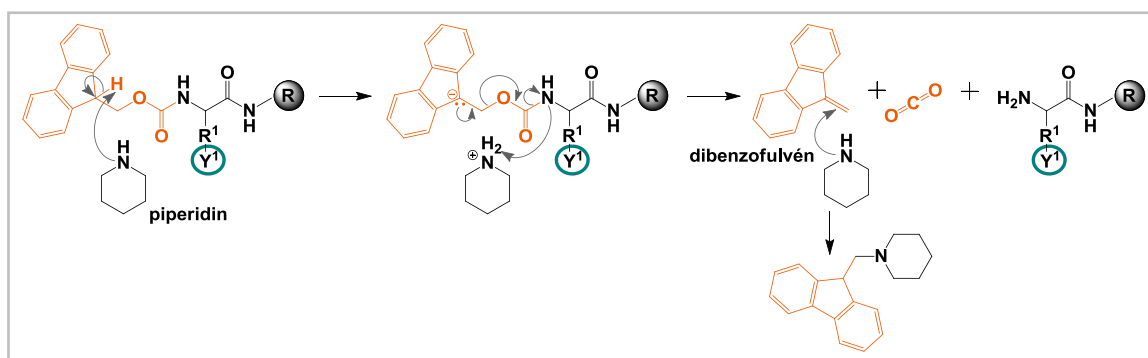
A Boc/Bzl módszer a különböző erősségű savakra érzékeny (átmeneti) és kevésbé érzékeny (állandó) védőcsoportokon alapul (17. ábra). A *tert*-butiloxikarbonil (Boc) védőcsoport bázisokkal és nukleofil reagensekkel szemben stabil, de szervesen vagy szervetlen savakkal eltávolítható [170]. Az átmeneti Boc-védőcsoport eltávolítására trifluoecetsavat tartalmazó hasítóelegyet alkalmazunk (33% TFA, 67% DCM, V/V) (18. ábra). Az acidolízis során az N^α-aminocsoport trifluoracetát sója jön létre, ezért a hasítás után semlegesítenünk kell. Ekkor tercier-amin hatására (10% diizopropiletilamin (DIEA), 90% DCM, V/V elegye) jön létre a szabad N^α-aminocsoport. A Boc/Bzl módszernél az oldallánc védőcsoportok általában a benzilalkohol éter-, észter- ill. uretánszármazékai [171]. Ezek az oldallánc védőcsoportok csak erős savak jelenlétében hasíthatóak, tehát a Boc-csoport lehasítása során stabilak maradnak. A szilárd hordozóról a peptidet és az oldallánc védőcsoportokat hidrogén-fluorid (HF) segítségével távolítjuk el, teflon készülékben, gyökfogók (kationfogók) jelenlétében.



18. ábra: A Boc-védőcsoport hasításának mechanizmusa

2.7.1.2. Az Fmoc/tBu módszer

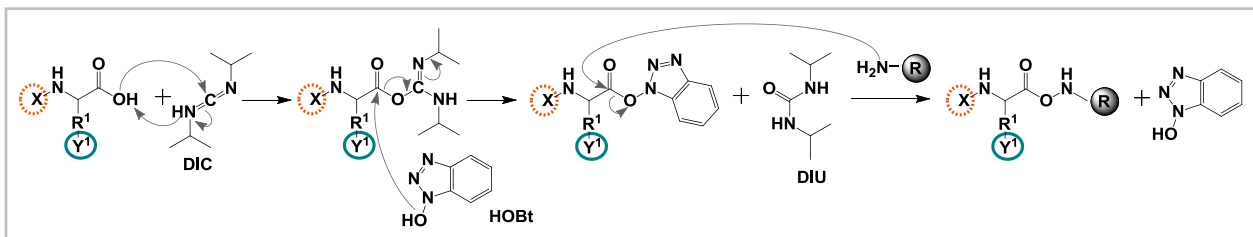
Az Fmoc/tBu szintézis stratégia kiküszöböli a Boc/Bzl stratégia hátrányait (az állandó és átmeneti védőcsoportok is savérzékenyek, semlegesítési lépés alkalmazása a Boc-csoport hasítása után, speciális készüléket igénylő HF alkalmazása) [172]. Ezen módszer esetében az aminosavszármazékok átmeneti védőcsoportja a 9-fluorenilmetiloxikarbonil-csoport (Fmoc), mely savakkal szemben stabil, bázisokkal szemben viszont labilis (2% piperidin, 2% DBU, 96% DMF, V/V hasítóelegy) (17. ábra). A hasítás során dibenzofulvén átmeneti termék keletkezik, mely reaktív, de a piperidinnel stabil adduktot képez, ezáltal elkerülhetőek az alkileződési mellékreakciók (19. ábra). Az állandó oldallánc védőcsoportok (tBu, OtBu, Boc, Trt, stb.) hasítása és a peptidek gyantáról való eltávolítása általában TFA-val történik [171]. Mivel a hasítás során reaktív karbokationok keletkeznek, itt is gyökfogók (kationfogók) használata szükséges.



19. ábra: Az Fmoc-védőcsoport hasításának mechanizmusa

2.7.1.3. A peptidkötés kialakítása a szintézis során

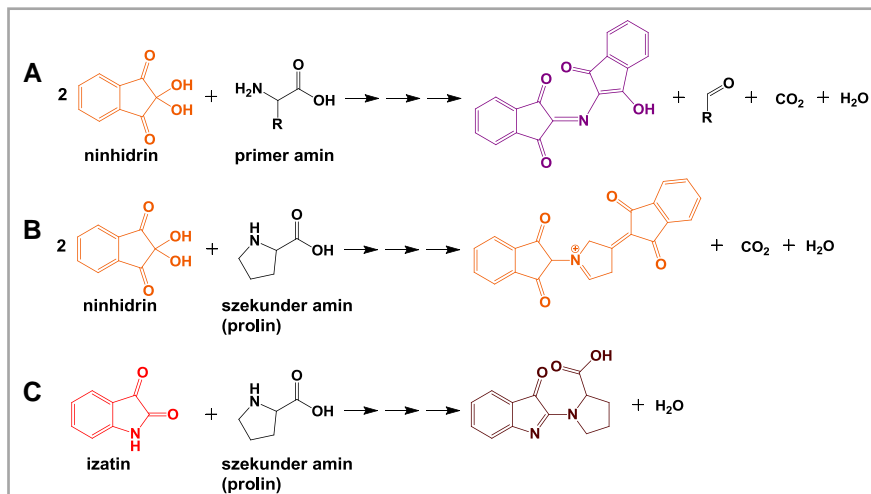
A peptidkötést a gyantához kötött szabad N-terminálisú aminosav vagy peptid és a karboxilcsoportján aktivált és aminocsoportján védett aminosavszármazék között alakítjuk ki. A kapcsolás történhet *in situ* aktív észter kialakításával, amelynél a használt kapcsolószerkezetek az *N,N*-diizopropilkarbodiimid (DIC) és az 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). A DIC *O*-acil-izourea származékot képez az aminosavszármazék karboxilcsoportjával és ez acilezi a HOBt hidroxilcsoportját, így kialakul az *in situ* aktív észter *N,N*-diizopropil-urea képződése mellett (20. ábra). Ezután az aktív észter acilezi a szabad aminocsoportot. Ezzel a módszerrel gyors kapcsolás érhető el, kiküszöbölhető az *O-N* acilvándorlás során az inaktív *N*-acil-izourea származék képződése, valamint az aszparagin és glutamin esetében az oldallánc dehidratációja megelőzhető [173, 174].



20. ábra: Kapcsolás *in situ* aktív észter segítségével

2.7.1.4. A kapcsolási reakciók követése

A kapcsolás és védőcsoport eltávolítás végbemenetelét ninhidrin-próba és izatin-próba segítségével ellenőrizzük (21. ábra). A ninhidrin-próba a szabad amino-terminállal rendelkező (primer aminocsoport) aminosav- és peptidszármazékok kimutatására alkalmas. A keletkező vegyület sötét ibolya színű primer aminocsoportot tartalmazó α -aminosavak esetén [175]. A szekunder aminocsoportot tartalmazó prolin esetében a keletkező vegyület sárga színű, ezért a szilárdfázisú peptidszintézisnél alkalmazott gyanták szintén sárga színe miatt nem érzékelhető. Az izatin-próba a szabad szekunder aminocsoportok jelenlétét jelzi, ezt alkalmazzuk a prolin N-terminálisának védőcsoport eltávolításának ellenőrzésére, valamint a prolin utáni aminosav kapcsolás sikerességének ellenőrzésére. Az izatin a prolin szabad szekunder aminocsoportjával sötétbarna színű vegyületet képez [176].



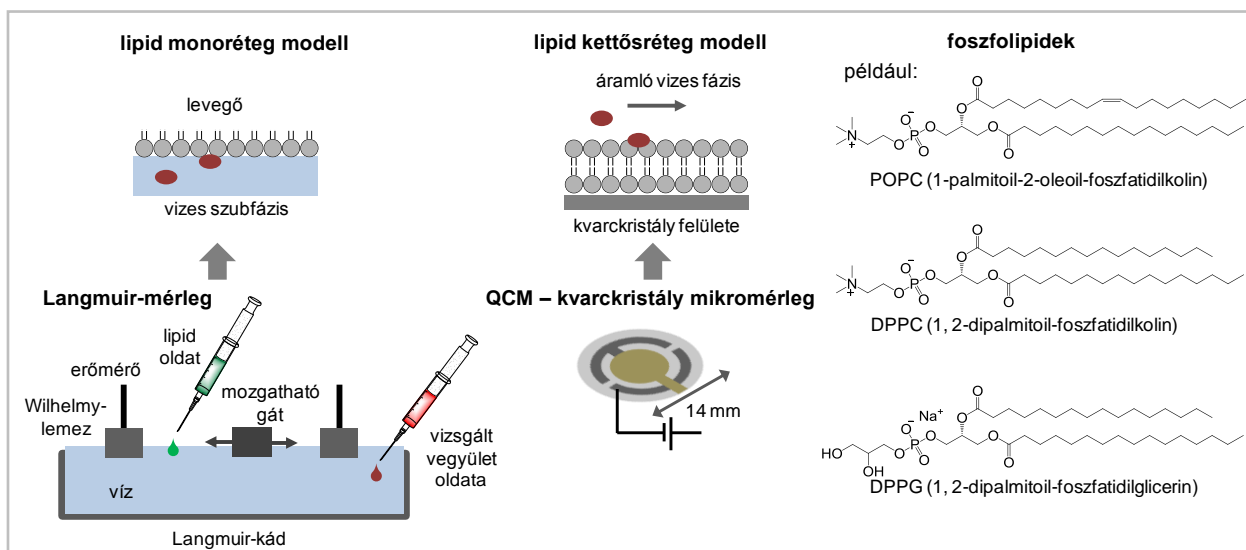
21. ábra: Ninhidrin reakciója (A) primer és (B) szekunder aminocsoporttal, és (C) izatin reakciója prolinnal

2.7.2. Membrán affinitás vizsgálata lipid monoréteg és kettősréteg modellek segítségével

A hatóanyagoknak általában több sejtmembránon (pl. eukarióta sejtek membránja, bakteriális membrán) kell átjutniuk ahhoz, hogy elérjék a rendeltetési helyüket, ahol kiválthatják terápiás hatásukat. A sejtmembránnal való kölcsönhatás, a membrán affinitás mértéke modell lipidrétegek segítségével tanulmányozható. A membránnal való kölcsönhatás lehet nem specifikus, így létrejöhet a lipid alkil láncsaival kialakuló hidrofób kölcsönhatás és a fejcsoportokkal létesített dipól-dipól, vagy elektrosztatikus kölcsönhatások révén, ezért a membrán affinitás a nem specifikus sejtbejutást is jellemezheti. A lipid összetétel változtatásával befolyásolhatjuk a modell membrán tulajdonságait [177].

A sejtmembránok egyik egyszerűsített modellje a víz-levegő határfelületen létrehozott lipid molekulák rendezett monorétege. Ilyen rendszerek előállítására és vizsgálatára az ún. Langmuir-mérlegek segítségével lehetséges (22. ábra). A módszer lényege, hogy a lipid molekulák szerves oldószeres oldatát szétterítjük egy kádban lévő vizes fázis felületén. A szerves oldószer elpárolgása után az amfipatikus lipidek irányítottan helyezkednek el (poláris fejcsoport a vizes közegben, apoláris alkilcsoportok a levegő felé orientálódva), így létrehozva a rendezett monoréteget [178]. A Langmuir-mérleg mozgatható gátjával szabályozható a lipid rétegek tömörsége. A lipid réteg kívánt tömörségének elérése után a hatóanyagot tartalmazó vizes oldatot a lipid réteg alá injektáljuk. A hatóanyagok adszorpciója, penetrációja hatására a lipid membránban bekövetkező szerkezeti változásokat állandó gátpozíció mellett az oldalnyomás változások detektálásával lehet vizsgálni [179, 180, 181].

A lipid kettősrétegek modellezésének egyik lehetősége a szilárd hordozóra felvitt membránok alkalmazása (supported lipid bilayer, SLB). Ezt általában úgy hozzuk létre, hogy a szilárd hordozón kiterítünk egy liposzóma rendszert [182]. A kettősréteg létrehozható ún. kvarckristály mikromérleg (quartz crystal microbalance, QCM) felületén is (22. ábra). A QCM egy rendkívül érzékeny, piezoelektromos effektus alapján működő tömegmérő rendszer. A kvarckristály érzékelő mindkét oldalán arannyal van bevonva, váltóárammal magas frekvenciájú rezgésbe hozható és ennek az oszcillációnak a tömegváltozás hatására történő változását detektáljuk. Ha tömeg rakódik a kristályra, akkor a vastagsága növekszik és így a rezonancia frekvenciája csökken (érzékenység $<0,1 \text{ ng/cm}^2$). A vizsgálandó anyagot a kvarckristály felületén létrehozott lipid kettősréteg feletti közegbe juttatjuk. A kölcsönhatások következtében fellépő tömegváltozás miatt nemcsak a kvarckristály szenzor rezonancia frekvenciája változik, hanem a mozgási ellenállása is, ezekből következtetni lehet a lipid réteghez való kötődésre, illetve a réteg szerkezetváltozásaira [183]. A kölcsönhatások következtében a rétegben fellépő morfológiai változásokat atomi erő mikroszkóppal (AFM) is lehet vizsgálni, így a felületek nm-es felbontású, 3 dimenziós leképezése valósítható meg [184].

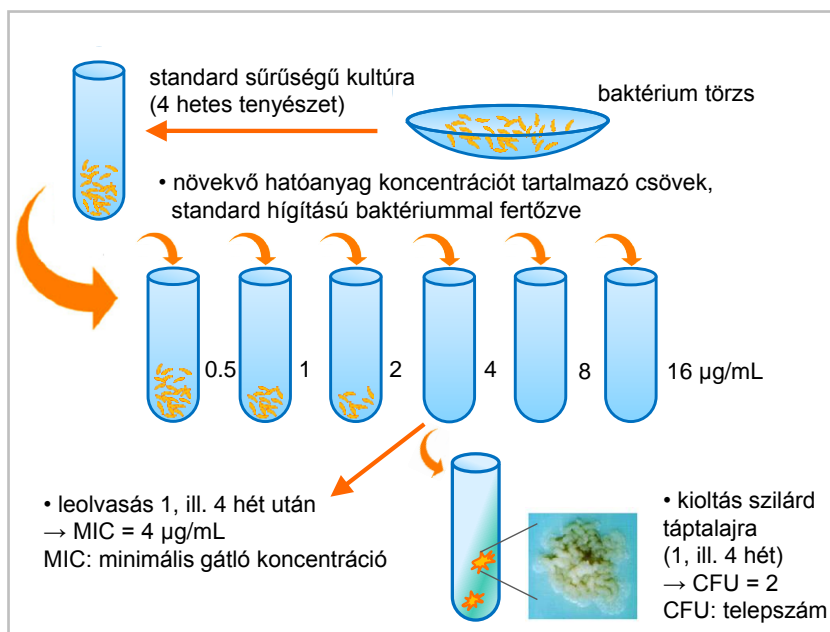


22. ábra: Lipid monoréteg és kettősréteg modell rendszerek, a Langmuir-mérleg és a kvarckristály mikromérleg vázlatos felépítése

2.7.3. Az *in vitro* antimikobakteriális hatás meghatározása extracelluláris és intracelluláris modellen

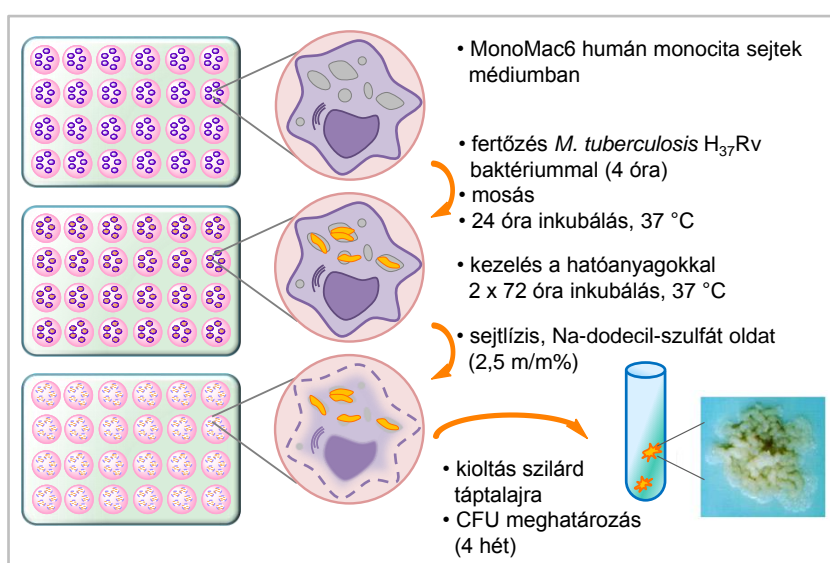
Az antimikobakteriális anyagok hatásának kvantitatív jellemzésére a minimális gátló koncentráció (minimal inhibitory concentration, MIC) meghatározása szolgál [9]. A MIC az a legkisebb hatóanyag koncentráció, amely gátolja a baktériumtörzs szaporodását. A MIC érték meghatározását folyékony táptalajban ún. hígítási módszerrel végezzük, ahol az adott hatóanyagra nézve csökkenő koncentrációjú oldatokat fertőzzük a baktérium megfelelő sűrűségű szuszpenziójával. A minimális gátló értéket annak a csőnek a vegyület koncentrációja jelenti, amelyben a kellő időtartamú inkubálás után szabad szemmel még nem észleltünk növekedést (zavarosodást). A minimális gátló koncentráció értéke függ az alkalmazott táptalajtól, a táptalaj pH értékétől, az inokulum (az oltáshoz felhasznált mikroba-sejttömeg) kolónia számától, az inkubáció hőmérsékletétől, atmoszférájától és időtartamától.

A MIC leolvasást követően a baktériumnövekedést nem mutató csövekből szilárd táptalajra való kioltással meghatározható a telepszám (colony forming unit, CFU). A telepszámlálási módszerek alkalmazhatóságának alapfeltétele, hogy a táptalajokon kinőtt telepek egyetlen sejt szaporodásából származzanak, és a telepek számolhatók legyenek, vagyis a cél olyan tenyészetek előállítása, amelyen az egyedülálló telepek száma 10-300 közötti. A CFU/mL érték megadja, az adott minta esetében, az egységnyi térfogatban jelenlévő életképes sejtek közelítő számát, amelyekből a számolható telepek kifejlődtek. A módszer lényegét a 23. ábra foglalja össze. Ez a kísérlet az extracelluláris, intenzíven proliferáló, aktív metabolizmusú baktérium populációt modellezi.



23. ábra: Az *in vitro* antimikobakteriális hatás meghatározása extracelluláris baktérium modellen; a minimális gátló koncentráció (MIC) és a telepszám (CFU) meghatározásának sematikus vázlata (adott kísérleti leírás körülményeivel)

A *M. tuberculosis* intracelluláris kórokozó, így szükséges a vegyületek hatásának vizsgálata fertőzött gazdasejteken (intracelluláris baktérium modell). A gazdasejt makrofágok fagocitikus potenciálját „kihasználva” azokat a baktériummal fertőzzük, így modellezve az intracelluláris baktérium populációt [7, 100, 168]. Gazdasejt modellként alkalmazhatjuk a MonoMac6 humán monocita sejteket, mivel fenotípusos és funkcionális tulajdonságai hasonlítanak az emberi vérben található érett monociták jellemzőihez [185, 186, 187]. A MonoMac6 sejtek kezelés nélkül letapadnak a szövettenyésztő lemez felületére homogén sejtpopulációként, továbbá ezek a sejtek képesek a baktériumot nagy mértékben fagocitálni. A fertőzött sejteket kezeljük a hatóanyaggal, majd a sejtek lizálása után a lizátumból szilárd táptalajra oltunk ki és meghatározzuk a telepszámot. A módszer lényegét a 24. ábra foglalja össze.

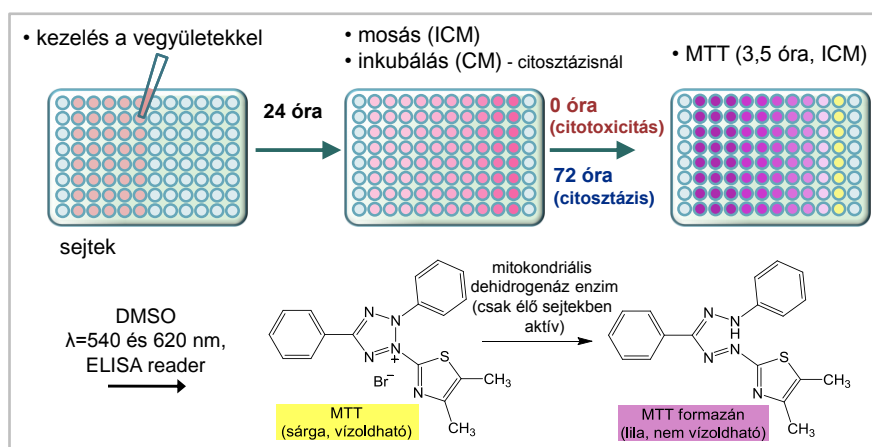


24. ábra: Az *in vitro* antituberkulotikus hatás meghatározása *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériummal fertőzött MonoMac6 humán monocita sejteken (adott kísérleti leírás körülményeivel)

2.7.4. Az *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatás meghatározása kolorimetriás tetrazólium (MTT) teszt alkalmazásával

A vegyületek *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatását a sejtek életképességének vizsgálatával, kolorimetriás tetrazólium (MTT) módszer [188] segítségével határozhatjuk meg. A citotoxikus és citosztatikus hatást az 50%-os inhibíciós koncentrációval, az IC_{50} értékekkel jellemezzük. A citotoxikus hatás vizsgálatánál azt határozzuk meg, hogy mi az a vegyület koncentráció, mely közvetlenül elpusztítja a sejtek 50%-át. A citosztatikus hatás vizsgálatánál az IC_{50} érték azt a vegyület koncentrációt jelöli, amelyek hatására a vegyülettel kezelt, majd tovább inkubált sejtek 50%-a nem szaporodik, nem proliferál, a sejtek életképessége megváltozik, illetve elpusztulnak. A citotoxicitás és a citosztatikusság ténye önmagában nem jellemzi a vegyület által kiváltott sejthalál mechanizmusát.

Az MTT egy tetrazólium só (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium)-bromid, sárga, vízoldható), amelyet az élő, metabolikusan aktív sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzime képes formázán származékká (lila, vízben nem oldódó kristályok) alakítani [189]. Ez a származék mutatható ki kolorimetriásan, az élő sejtek számával korreláltható mértékben. Az MTT-teszt viszonylag gyors, gazdaságos, nagy áteresztőképességű és könnyen kivitelezhető, valamint az egyelőre nem ismert hatásmechanizmusú vegyületek esetében megbízható, reprodukálható [190, 191, 192]. A citotoxicitás és citosztázis MTT-teszttel történő meghatározását a 25. ábra mutatja be vázlatosan.



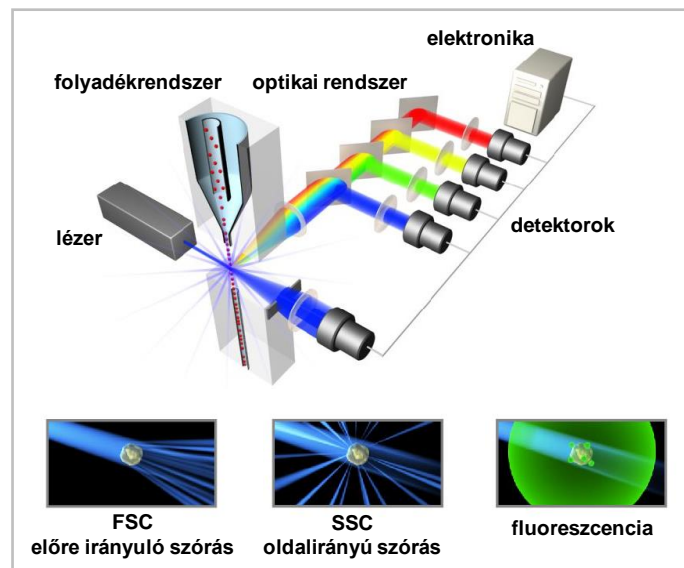
25. ábra: Az *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatás meghatározása sejteken MTT-teszttel (adott kísérleti leírás körülményeivel)

2.7.5. Fluoreszcens vegyületek *in vitro* sejtbejutásának vizsgálata áramlási citometriával

Az áramlási citometria [193] alkalmazásával egyszerre mérhető önálló részecskék és sejtek fényszórási és fluoreszcens tulajdonsága. A mérhető sejtek vagy részecskék átmérője körülbelül 0,2 μm és 150 μm közé esik. Az áramlási citométer vázlatos felépítését mutatja be a 26. ábra. Az áramlási citométer több lézert is tartalmazhat. Ezek lehetnek szilárdtest lézerek (λ_{ex} : 355 nm, 405 nm, 488 nm) és gázlézerek (635 nm). A készülékben folyadékáram továbbítja a sejteket. A hidrodinamikai fókuszálás biztosítja, hogy a sejtek vékony sugárban, egymás után haladjanak és a lézersugár egyenként világítsa meg őket. A sejteken a lézersugár fénye részben szóródik, részben a sejtek fluoreszcens tulajdonságú molekuláiból fénykibocsátást vált ki. Az ún. előre irányuló fényszórás (forward scatter, FSC) a sejt relatív méretéről, míg az oldalra irányuló fényszórás (side scatter, SSC) a relatív granuláltságáról, belső

komplexitásáról ad információt. A fluoreszcencia intenzitásból fluoreszcens anyagok, vagy fluoreszcens jelzéssel ellátott vegyületek sejtbejutásáról kapunk információt. A sejtekben jelen vannak fluoreszcens sajátosságú molekulák (aminosavak, porfirinvas vegyületek, nukleinsavak, stb.), ezek adják a sejtek autofluoreszcenciáját, melyet az áramlási citométerrel detektálni lehet.

A megfelelő fluoreszcens jelzőmolekula (fluorofór) kiválasztása függ az alkalmazott megvilágítás hullámhosszától, a fluorofórok abszorpciós és emissziós tulajdonságától. A sejtek és a lézertény kölcsönhatása következtében emittálódó fényt az optikai rendszer segítségével továbbítják a megfelelő detektorok felé. A sejtek autofluoreszcenciájához viszonyítva a fluoreszcensen jelölt vegyületek felvételének mértéke detektálható, mivel megváltozik a sejtek intracelluláris fluoreszcencia intenzitása.



26. ábra: Az áramlási citométer vázlatos felépítése és egy sejt kölcsönhatása a lézertárárral
(forrás: <http://probes.invitrogen.com>)

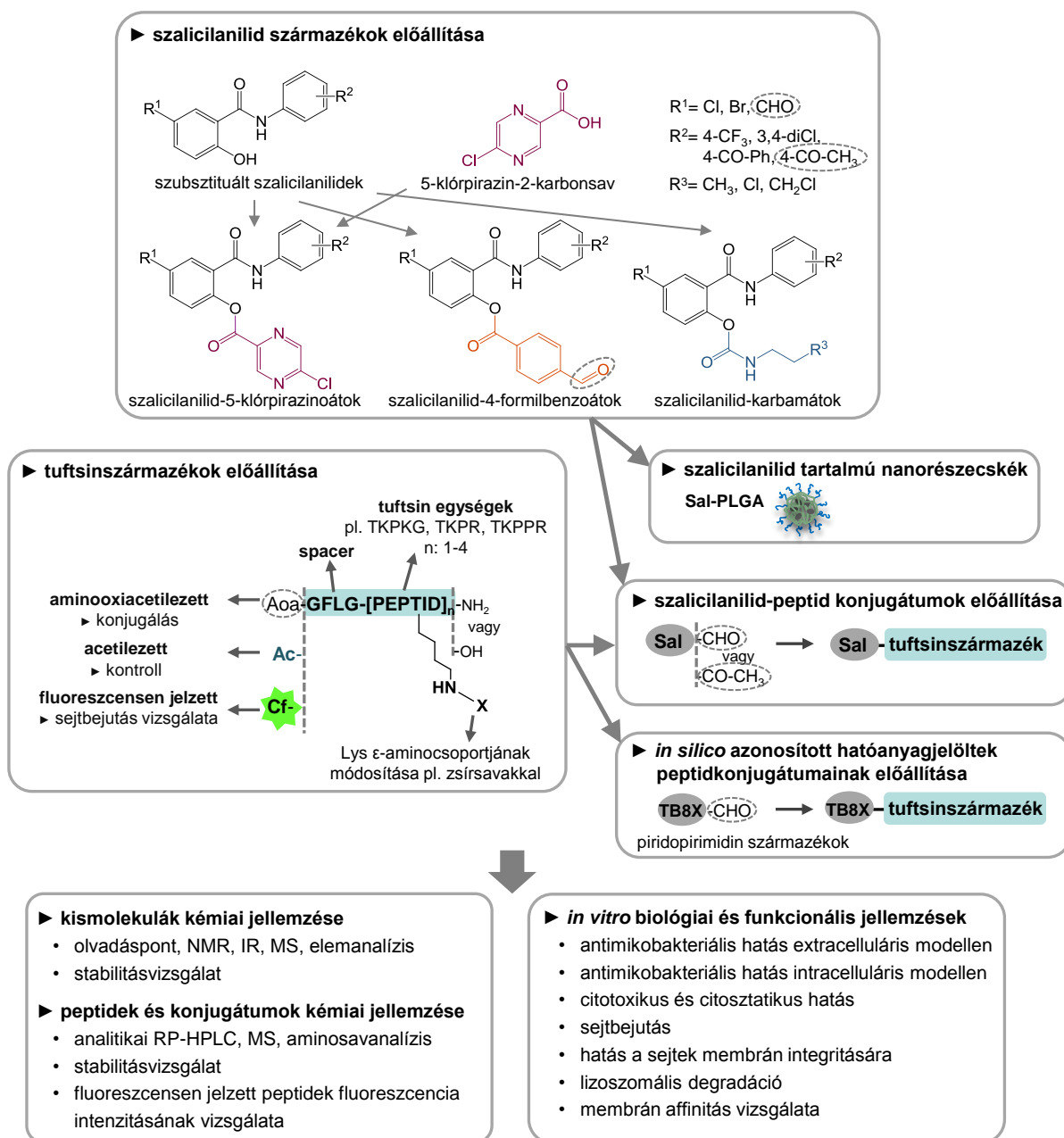
Fluoreszcens jelölésre sokféle fluorofór használatos. A doktori munkám során alkalmazott készülék (BD LSR II áramlási citométer) 488 nm-en sugárzó szilárdtest lézert és 635 nm-en sugárzó gázlézert tartalmaz. A karboxifluorescein és származékainak gerjesztési maximuma 492 nm-nél van, így ez a fluorofór a szilárdtest lézertel gerjeszthető, így megfelelő az általunk alkalmazott készülékhez [194].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám célja antimikobakteriális hatóanyagok, hatóanyag tartalmú nanorészecskék, peptid típusú hordozó, illetve célbajuttató molekulák és hatóanyag-peptid konjugátumok szintézise, kémiai jellemzése és *in vitro* biológiai aktivitásának vizsgálata.

A rezisztens baktériumok terjedése miatt szükség van új antimikobakteriális hatóanyagokra. A *M. tuberculosis* és a *M. abscessus* intracelluláris kórokozó, ezért nagy jelentőségű lehet a hatóanyagok szelektív bejuttatása a fertőzött gazdasejtekbe, melyek főként monociták, makrofágok. Hordozópeptidek, célbajuttató rendszerek alkalmazásával és nanorészecskékbe való csomagolással lehetőség nyílik a gazdasejtek hatóanyag felvételének növelésére, ezáltal a hatóanyagok jobb biohasznosulásának elérésére. Továbbá a peptid típusú hordozók, irányító molekulák alkalmazásával a hatóanyagok sejt-specifikus célbajuttatása valósítható meg, és nem specifikus toxicitásuk csökkenthető.

A következő folyamatábrán összefoglaltam a céljaim megvalósításához alkalmazott stratégiát:



1. Szalicilanilid származékok

▶ A meglévő hatóanyagok kémiai módosításának keretében célul tűztük ki a kiemelkedő antimikrobiális hatással rendelkező szalicilanilid típusú molekulák különböző származékainak előállítását:

- szubsztituált szalicilanilidek, köztük konjugálásra alkalmas csoportot tartalmazó változatok
- 5-klórpirazin-2-karbonsav és a szalicilanilidek 5-klórpirazin-2-karbonsavval alkotott észterei
- szalicilanilidek 4-formilbenzoesavval alkotott észterei, melyek konjugálásra alkalmasak
- szalicilanilid-karbamátok

▶ Célunk volt a vegyületek kémiai jellemzése:

- homogenitás vizsgálat, szerkezet azonosítás
- stabilitásvizsgálat az alkalmazott *in vitro* biológiai kísérletek körülményei között

▶ Terveztük a vegyületek *in vitro* biológiai aktivitásának vizsgálatát, szerkezet-hatás összefüggések megállapítását:

- antimikobakteriális hatás extracelluláris baktérium modellen
- citotoxikus és citosztatikus hatás gazdasejtet modellező sejteken, hepatotoxicitás tanulmányozására alkalmazott modellen

▶ Terveztük a szalicilanilid származékok PLGA nanorészecskékbe való csomagolását és a hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék *in vitro* biológiai jellemzését:

- gazdasejt modellbe történő bejutás
- antimikobakteriális hatás intracelluláris modellen (baktériummal fertőzött gazdasejt modell)

2. Tuftsin típusú hordozópeptidek

▶ Hordozóként, illetve célbajuttató egységként a makrofágok, monociták felszínén nagy számban megtalálható tuftsin receptorokhoz kötődni képes tuftsinszármazékokat terveztünk alkalmazni. Célunk volt kontroll, fluoreszcensen jelzett, valamint konjugálható származékok előállítása:

- különböző szekvenciájú, hosszúságú, 1-4 tuftsin egységből felépülő származékok
- karboxil- vagy amid C-terminálisú származékok
- enzimlabilis távolságtartó egységet (spacert) tartalmazó származékok
- a tuftsinszármazékok lizinjének oldalláncon történő módosítása különböző hosszúságú zsírsavakkal, mellyel befolyásolható a vegyületek lipofilitása, változtathatók a penetrációs sajátságok és enzimekkel szembeni stabilitásuk

▶ Terveztük a peptidek kémiai jellemzését:

- homogenitás vizsgálat, szerkezet azonosítás
- a fluoreszcensen jelzett peptidek fluoreszcencia intenzitásának vizsgálata

▶ Célul tűztük ki a peptidek *in vitro* biológiai jellemzését, szerkezet-hatás összefüggések megállapítását:

- az acetilezett kontroll peptidek citosztatikus hatása modell sejteken
- a fluoreszcensen jelzett peptidek sejtbefutása modell sejteken
- az acetilezett kontroll tuftsinszármazékoknál a zsírsav oldalláncok membrán integritásra gyakorolt hatása

3. Szalicilanilid származékok peptidkonjugátumai

- ▶ Célunk volt a konjugálható szalicilanilid származékokat tuftsinszármazékokhoz konjugálni oximkötéssel keresztül.
- ▶ Terveztük a konjugátumok kémiai jellemzését:
 - homogenitás vizsgálat, szerkezet azonosítás
 - stabilitásvizsgálat az alkalmazott *in vitro* biológiai kísérletek körülményei között
- ▶ Célul tűztük ki a konjugátumok *in vitro* biológiai vizsgálatát:
 - antimikobakteriális hatás extracelluláris baktérium modellen
 - citotoxikus és citosztatikus hatás modell sejteken
 - antimikobakteriális hatás intracelluláris baktérium modellen
 - stabilitás vizsgálat lizoszomális enzimekkel szemben, a képződő legkisebb, hatóanyagot tartalmazó metabolitok azonosítása, a metabolitok vizsgálata

4. *In silico* azonosított hatóanyagok peptidkonjugátumai

- ▶ Az *in silico* azonosított és kémiaileg optimált piridopirimidin származékokat szintén tuftsin típusú peptidokhoz terveztük konjugálni oximkötéssel keresztül.
- ▶ Terveztük a konjugátumok kémiai jellemzését:
 - homogenitás vizsgálat, szerkezet azonosítás
 - a fluoreszcencia intenzitásának vizsgálata
- ▶ Célunk volt a konjugátumok *in vitro* biológiai aktivitásának meghatározása, funkcionális vizsgálata:
 - antimikobakteriális hatás extracelluláris baktérium modellen
 - citosztatikus hatás modell sejteken
 - sejtbejutás gazdasejt modellen
 - antimikobakteriális hatás intracelluláris baktérium modellen
 - membrán affinitás vizsgálat

A hatóanyag-peptid konjugátumok esetében arra kerestük a választ, hogy a hatóanyagok oximkötés kialakítása mellett megőrzik-e antimikobakteriális hatásukat. Olyan konjugátumokat kerestünk, amelyek a sejtbejutás, intracelluláris gátló hatás és a citotoxikus, citosztatikus hatás szempontjából a legoptimálisabb tulajdonságokkal rendelkeznek.

4. EREDMÉNYEK

Doktori munkám során szalicilanilid származékokat mint új antimikobakteriális hatóanyagokat állítottam elő (4.1. fejezet). Tuftsin típusú peptideket szintetizáltam, melyek hordozóként, illetve célbajuttatóként funkcionálhatnak (4.2. fejezet). Előállítottam a konjugálható szalicilanilid származékok (4.3. fejezet), valamint *in silico* meghatározott hatóanyagjelöltek, a piridopirimidin származékok tuftsinszármazékokkal alkotott konjugátumait (4.4. fejezet). Vizsgáltam a hatóanyagok, a hatóanyagot tartalmazó PLGA nanorészecskék és a hatóanyag-peptid konjugátumok *in vitro* biológiai aktivitását. Az itt bemutatott eredmények egy részét eddig két publikációban foglaltuk össze. A szalicilanilid származékokkal kapcsolatos eredmények a [195]-ös publikációban találhatóak, az *in silico* meghatározott hatóanyagjelöltek és peptidkonjugátumainak jellemzése a [102]-es publikációban olvasható. A szalicilanilid-tuftsinszármazék konjugátumok vizsgálatával kapcsolatos publikációt pedig közlésre elfogadták [196].

4.1. Új szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok előállítása, kémiai és *in vitro* biológiai jellemzése

Új antimikobakteriális hatású kismolekulák keresése történhet a már meglévő hatóanyagok kémiai módosításával. Ennek keretében szubsztituált szalicilanilid származékokat, 5-klórpirazin-2-karbonsavat, valamint ezek észterét, illetve szalicilanilid-karbamátokat állítottam elő és vizsgáltam a vegyületek szerkezet-hatás összefüggését.

Céлом volt olyan szalicilanilid származékokat előállítani, melyek kiemelkedően képesek gátolni a gyorsan növvő, széleskörű antibiotikum rezisztenciával rendelkező *M. abscessus* baktériumtörzset, valamint a *M. tuberculosis* szenzitív és rezisztens törzseit is. A szalicilanilid származékok PLGA nanorészecskébe csomagolásával a sejtbejutás növelése, ezáltal az intracelluláris baktérium gátlása volt a céлом.

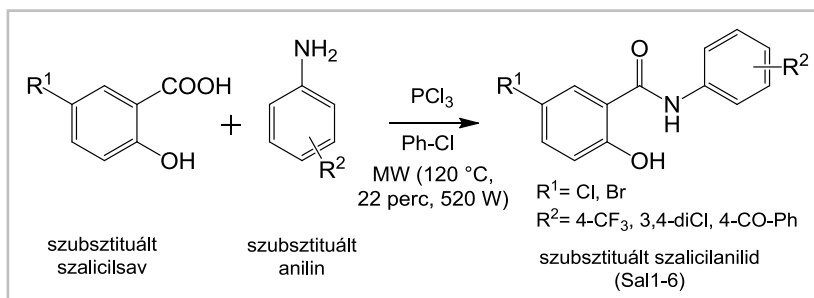
Olyan szalicilanilid származékokat is terveztünk és állítottunk elő, melyek peptidekhez való konjugálásra is alkalmasak, de a módosítás hatására nem veszítik el antimikobakteriális hatásukat. A konjugálással szintén a sejtbejutás növelése, az intracelluláris baktérium gátlása volt a céлом (4.3. fejezet).

4.1.1. Szubsztituált szalicilanilidek (Sal1-9) előállítása

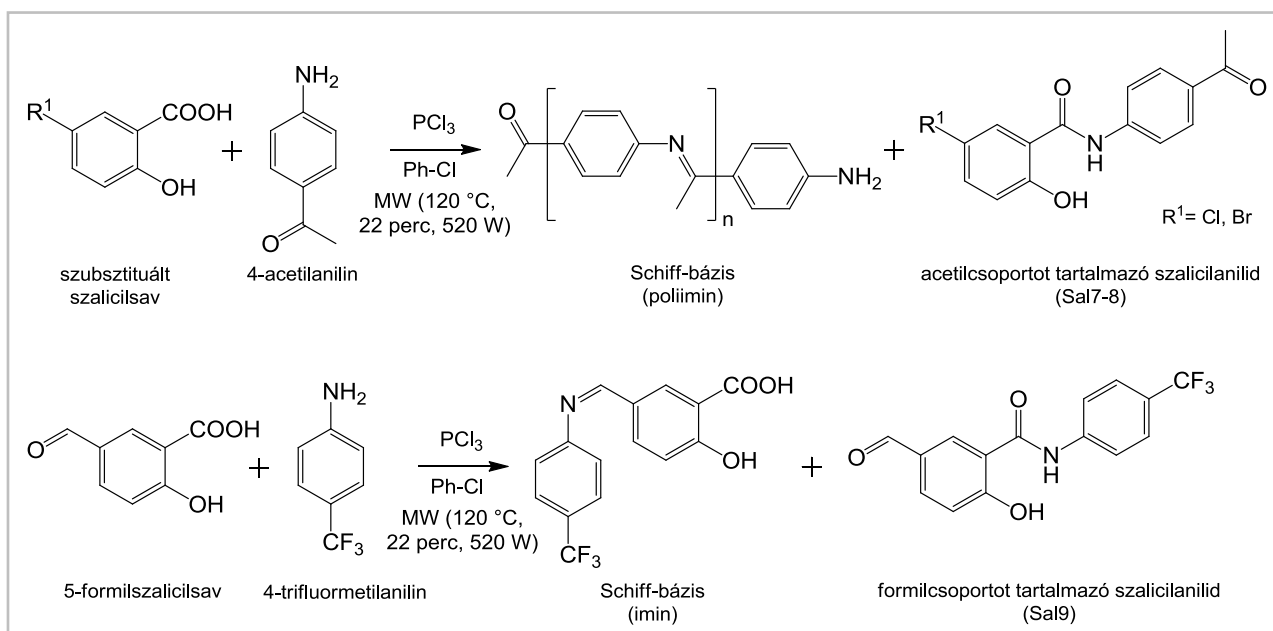
Négy kiindulási szalicilanilid származékot a korábban publikált kimagasló antimikobakteriális hatásuk alapján választottunk ki (Sal1-4) [51, 52]. Öt új, karbonilcsoportot tartalmazó szalicilanilid származékot (Sal5-9) is előállítottunk, melyből három peptidekkel való konjugálásra is alkalmas molekula (Sal7-9). Az előállított szalicilanilid származékok szerkezete a Függelék F1. ábráján látható.

A megfelelő szubsztituált szalicilsavat (5-klórszalicilsav, 5-brómszalicilsav, 5-formilszalicilsav) és a megfelelő szubsztituált anilint (4-trifluorometilanilin, 3,4-diklóranilin, 4-benzoilanilin, 4-acetilanilin) klórbenzol oldószerben, foszfor-triklorid jelenlétében reagáltattam mikrohullámú reaktorban, előállítva a szalicilanilid származékokat (27. és 28. ábra). Mikrohullámú reaktor segítségével a reakcióidő több órától percekre csökkenthető és a kitermelés növelhető. Azok a szalicilanilidek, melyek benzoilcsoportot tartalmaztak az

anilin-gyűrűn kisebb kitermelést adtak (Sal5-6, 26-44%), mint azok, melyek halogénnel voltak szubsztituálva az anilin-gyűrűn is (Sal1-4, 78-93%). A karbonilcsoporton keresztül konjugálható szalicilanilid származékokat (Sal7-9) javaslatom alapján Dr. Martin Krátký (Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Hradec Králové, Csehország) állította elő és bocsátotta rendelkezésemre. Ezen vegyületek esetében a kitermelés nagyon alacsony volt (6-7%), mert a kívánt amid képződése helyett Schiff-bázis képződése volt a kedvezményezett. A Sal7 és Sal8 szintézise esetében a keletkező Schiff-bázis tovább reagálhat a 4-acetil-anilinnel kialakítva. A reakció további optimalizálása szükséges.



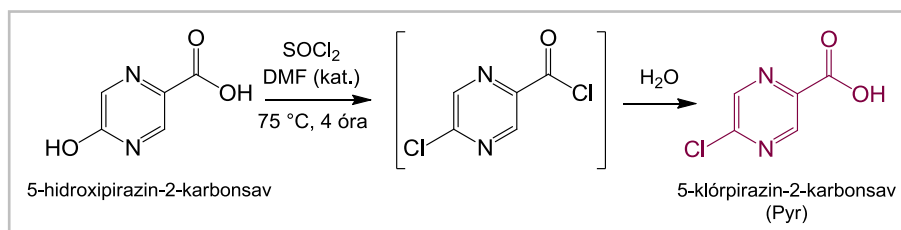
27. ábra: Szubsztituált szalicilanilidek (Sal1-6) előállítása [195]



28. ábra: Konjugálható szubsztituált szalicilanilidek (Sal7-9) előállítása [196]

4.1.2. Az 5-klórpirazin-2-karbonsav (Pyr) előállítása

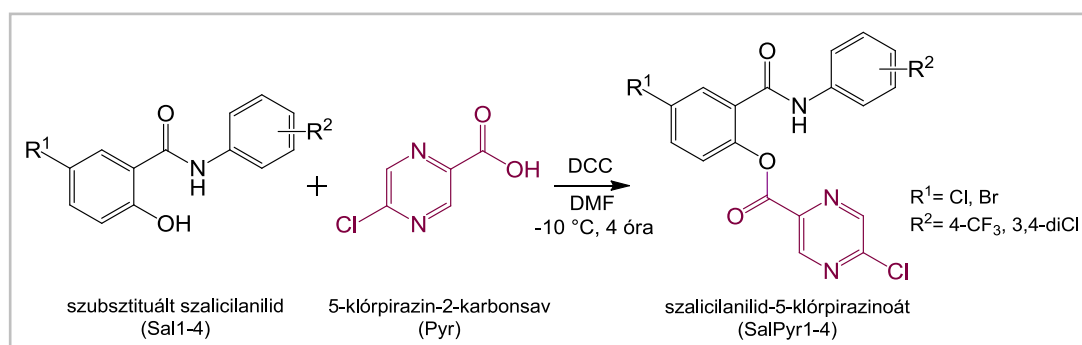
Előállítottam az 5-klórpirazin-2-karbonsavat (Pyr) az 5-hidrokipirazin-2-karbonsav és tionilklorid reakciójából (26. ábra) [197]. A reakciót DMF mint katalizátor segítette [198], a savklorid intermedier hidrolízisével kaptuk a kívánt terméket 75%-os kitermeléssel.



29. ábra: Az 5-klórpirazin-2-karbonsav előállítása

4.1.3. Szalicilanilid-5-klórpirazinoátok (SalPyr1-4) előállítása

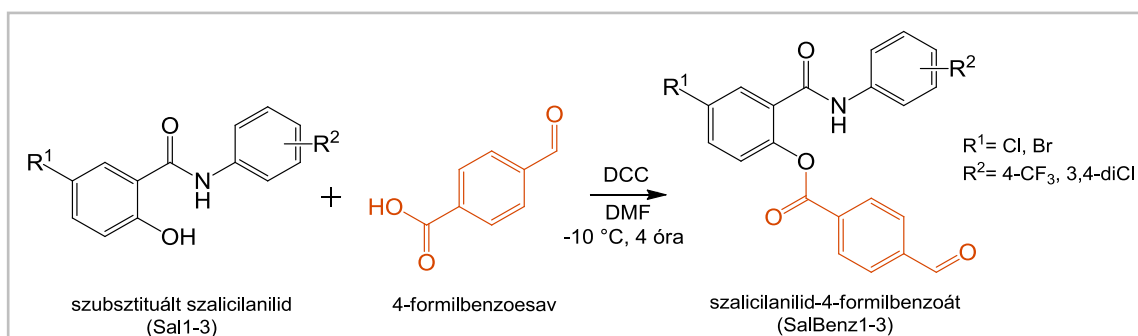
A szalicilanilid származékok 5-klórpirazin-2-karbonsavval alkotott észtereinek (SalPyr1-4) előállítása során a megfelelő szubsztituált szalicilanilidet (Sal1-4) reagáltattam 5-klórpirazin-2-karbonsavval DMF-ban, *N,N*-diciklohexilkarbodiimid (DCC) hozzáadagolása mellett észterkötést kialakítva (30. ábra) [63]. A kitermelés 29-60% között volt. Az előállított szalicilanilid-5-klórpirazinoátok szerkezete a Függelék F2. ábráján látható.



30. ábra: Szubsztituált szalicilanilidek 5-klórpirazin-2-karbonsavval alkotott észtereinek előállítása [195]

4.1.4. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok (SalBenz1-3) előállítása

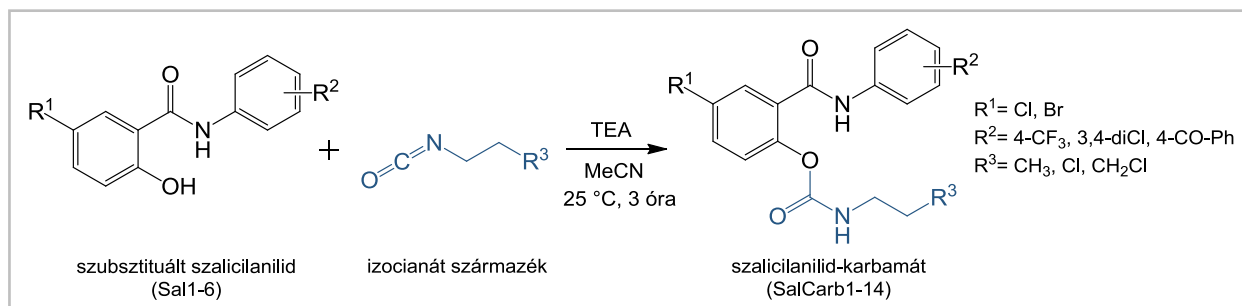
A szalicilanilid származékok 4-formilbenzoésavval alkotott észtereinek (SalBenz1-3) előállítása a szalicilanilid-5-klórpirazinoátok előállításához hasonlóan történt, a megfelelő szubsztituált szalicilanilidet (Sal1-3) reagáltattuk 4-formilbenzoésavval DMF-ban, DCC hozzáadagolása mellett észterkötést kialakítva (31. ábra). A kitermelés 59-71% között volt. Ezeket a formilcsoporton keresztül peptidekhez való konjugálásra alkalmas szalicilanilid-észtereket javaslatom alapján szintén Dr. Martin Krátký (Charles University, Hradec Králové, Csehország) állította elő és bocsátotta rendelkezésemre. Az előállított szalicilanilid-4-formilbenzoátok szerkezete a Függelék F3. ábráján látható.



31. ábra: Szubsztituált szalicilanilidek 4-formilbenzoésavval alkotott észtereinek előállítása

4.1.5. Szalicilanilid-karbamátok (SalCarb1-14) előállítása

A szalicilanilid-karbamátok (SalCarb1-14) előállítása során a megfelelő szubsztituált szalicilanilid származékot (Sal1-6) szuszpendáltam acetonitrilben, tiretilamint adtam hozzá, így az oldat kitisztult (fenolát-só képződött). Ezután reagáltattam a megfelelő izocianát származékokkal (2-klóretil-izocianát, 3-klórpropil-izocianát, *n*-propil-izocianát), kialakítva a szalicilanilid-karbamátokat (32. ábra) [71]. A kitermelés 20-64% között volt. Az előállított szalicilanilid-karbamátok szerkezete a Függelék F4. ábráján látható. A klóralkil részt tartalmazó molekula beépítésével cisztein tartalmú peptidekhez való konjugálás valósítható meg tioéterkötésen keresztül.

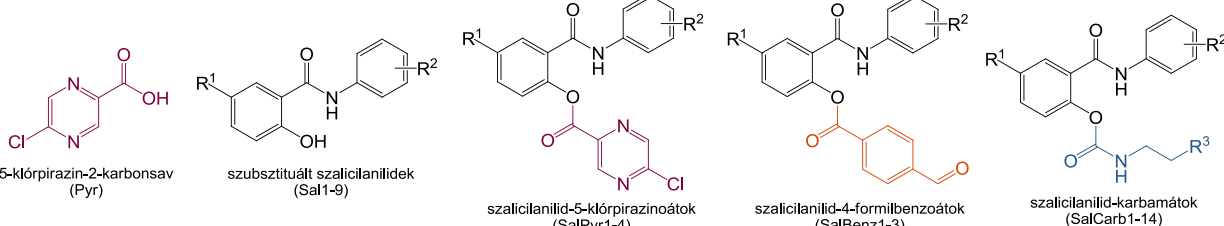


32. ábra: A szubsztituált szalicilanilid-karbamátok előállítása

4.1.6. A szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok kémiai jellemzése

A reakciókat vékonyrétegekromatográfiával követtük. Meghatároztuk a vegyületek olvadáspontját. A vegyületeket IR, NMR, MS, elemanalízis segítségével jellemeztük, és megadtuk a számolt LogP értéket (CS ChemOffice Ultra ver. 11.0 program, CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA). Az 3. táblázatban foglaltam össze a vegyületek számolt és mért molekulatömegét és a számolt LogP adatokat. A további jellemzések (kitermelések, IR, NMR, elemanalízis adatok) a Függelék F1. fejezetében található.

3. táblázat: Az 5-klórpirazin-2-karbonsav, a szubsztituált szalicilanilidek, a szalicilanilid-észterek és karbamátok fizikokémiai tulajdonságai

					
kód	R ¹	R ²	R ³	M _{mo} számolt / M _{mo} mért ^a	LogP számolt ^b
Pyr	-	-	-	158,0 / 158,0	0,24
Sal1	Cl	4-CF ₃	-	315,0 / 315,1	3,93
Sal2	Cl	3,4-diCl	-	315,0 / 315,0	4,12
Sal3	Br	4-CF ₃	-	359,0 / 359,1	4,20
Sal4	Br	3,4-diCl	-	358,9 / 359,0	4,40
Sal5	Cl	4-CO-Ph	-	351,1 / 351,3	4,22
Sal6	Br	4-CO-Ph	-	395,0 / 395,2	4,49
Sal7	Cl	4-CO-CH ₃	-	289,1 / 289,1	2,32
Sal8	Br	4-CO-CH ₃	-	333,0 / 333,1	2,59
Sal9	HCO	4-CF ₃	-	309,1 / 309,1	3,12
SalPyr1	Cl	4-CF ₃	-	455,0 / 455,2	4,45
SalPyr2	Cl	3,4-diCl	-	454,9 / 455,0	4,65
SalPyr3	Br	4-CF ₃	-	499,0 / 499,1	4,72
SalPyr4	Br	3,4-diCl	-	499,0 / 499,0	4,92
SalBenz1	Cl	4-CF ₃	-	447,0 / 447,1	5,55
SalBenz2	Cl	3,4-diCl	-	447,0 / 447,2	5,74
SalBenz3	Br	4-CF ₃	-	491,0 / 491,1	5,82
SalCarb1	Cl	4-CF ₃	Cl	420,0 / 420,2	4,52
SalCarb2	Cl	4-CF ₃	CH ₂ Cl	434,0 / 434,2	4,63
SalCarb3	Cl	3,4-diCl	Cl	420,0 / 420,1	4,72
SalCarb4	Cl	3,4-diCl	CH ₂ Cl	434,0 / 434,1	4,82
SalCarb5	Cl	3,4-diCl	CH ₃	400,0 / 400,2	4,83
SalCarb6	Br	4-CF ₃	Cl	464,0 / 464,1	4,79
SalCarb7	Br	4-CF ₃	CH ₂ Cl	478,0 / 478,1	4,90
SalCarb8	Br	3,4-diCl	Cl	463,9 / 464,1	4,99
SalCarb9	Br	3,4-diCl	CH ₂ Cl	477,9 / 478,1	5,09
SalCarb10	Cl	4-CO-Ph	Cl	456,1/456,2	4,81
SalCarb11	Cl	4-CO-Ph	CH ₂ Cl	470,1 / 470,2	4,92
SalCarb12	Cl	4-CO-Ph	CH ₃	436,1 / 436,3	4,93
SalCarb13	Br	4-CO-Ph	Cl	500,0 / 500,1	5,08
SalCarb14	Br	4-CO-Ph	CH ₂ Cl	514,0 / 514,2	5,19

^a Számolt és mért monoizotópos molekulatömeg (Bruker Esquire 3000+ ESI-MS)

^b A számolt LogP értékeket a CS ChemOffice Ultra ver. 11.0 program segítségével számoltam.

4.1.6.1. A szalicilanilid származékok stabilitásának vizsgálata

Fontos ismernünk a vegyületek stabilitását az *in vitro* kísérletek körülményei között. A szalicilanilid származékok gyenge vízoldhatósága miatt a vegyületeket DMSO-ban oldjuk. Az *in vitro* antimikobakteriális hatás meghatározásánál a vegyületek DMSO-ban készült oldatát Sula félszintetikus médiummal [199, 200] elegyítjük és a baktériumokkal együtt 4 hétig inkubáljuk 37 °C-on. A médium maximális DMSO tartalma 2% (V/V), melyet a baktériumok tolerálnak. Az *in vitro* citotoxicitás és citosztázis meghatározásánál a vegyületek DMSO-ban készült oldatát hígítjuk szérummentes RPMI-1640 médiummal. A sejteket a vegyületekkel 24 órán át inkubáljuk 37 °C-on, 1%-os maximális DMSO tartalom mellett, melyet a sejtek még tolerálnak.

A szalicilanilid származékok stabilitását DMSO-ban és az *in vitro* kísérletek körülményei között analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével vizsgáltam. A stabilitásokat DMSO-ban 4 °C-on 7 napig, 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban 37 °C-on 28 napig, és 10% DMSO-t tartalmazó szérummentes RPMI-1640 médiumban 37 °C-on 24 óráig követtem. Az analitikai HPLC során a kimutathatóság érdekében nagyobb töménységű oldatot kell alkalmazni, mint az *in vitro* kísérleteknél, az oldatok vegyület koncentrációja 0,5 mg/mL volt. A vizsgált anyagok gyenge vízoldhatósága miatt 10%-ra növeltem a DMSO koncentrációját. Figyelembe kell venni, hogy a szalicilanilid-észterek és karbamátok nem stabilak az alkalmazott tömegspektrometriás körülmények között, egy részük elbomlik és a keletkező szalicilanilid is detektálható.

A stabilitásvizsgálatokat egy kiválasztott kiindulási szalicilanilid, a Sal3 és a Sal3 származékain végeztem és mutatom be. Ezek a származékok a SalPyr3 szalicilanilid-5-klórpirazinoát, a SalBenz3 szalicilanilid-4-formilbenzoát és a SalCarb7 szalicilanilid-karbamát voltak.

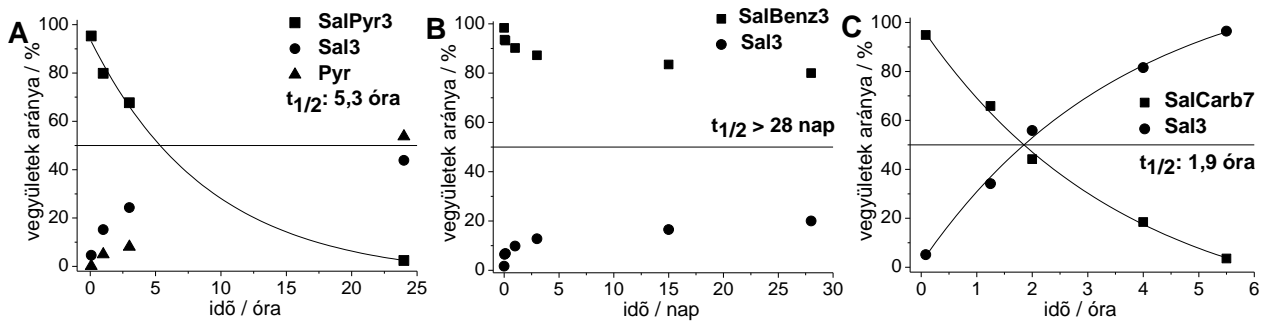
DMSO-ban a Sal3 szalicilanilid és a SalCarb7 szalicilanilid-karbamát stabilnak bizonyult legalább 7 napig, a HPLC kromatogramokban csak az intakt vegyületeket azonosítottam (Függelék F5. és F8. ábra). A szalicilanilid-észterek (SalPyr3 és SalBenz3) esetében a vegyületek 10%-a elbomlott a kiindulási szalicilanilidre (Sal3) 7 nap alatt (Függelék F6.és F7. ábra).

A kiindulási Sal3 szalicilanilid esetén nem észleltem bomlást sem a 10% DMSO tartalmú Sula médiumban 4 hét inkubálás után, sem a 10% DMSO tartalmú szérummentes médiumban 24 óra inkubálás után (Függelék F9. és F13. ábra).

A SalPyr3 szalicilanilid-5-klórpirazinoát esetében bomlást tapasztaltam, a vegyület 24 óra után elbomlott a 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban (Függelék F10. ábra). A keletkező Sal3 szalicilanilid és a keletkező 5-klórpirazin-2-karbonsav (Pyr) megjelenése utal az észter hidrolízisére. A SalPyr3 felezési idejét, mely 5,3 óra, a SalPyr3 mennyiségéből határoztam meg (33.A. ábra).

A SalBenz3 szalicilanilid-4-formilbenzoát vegyületnek nagyobb stabilitása van 10% DMSO tartalmú Sula médiumban (Függelék F11. ábra), 28 nap után a SalBenz3 20%-a bomlott el Sal3 szalicilanilidre (33.B. ábra).

A SalCarb7 szalicilanilid-karbamát 5,5 óra után elbomlott a 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban (Függelék F12. ábra). A kiindulási SalCarb7 karbamát mennyiségének csökkenéséből és a keletkező Sal3 szalicilanilid mennyiségének növekedéséből határoztam meg a SalCarb7 felezési idejét, mely 1,9 óra lett (33.C. ábra).

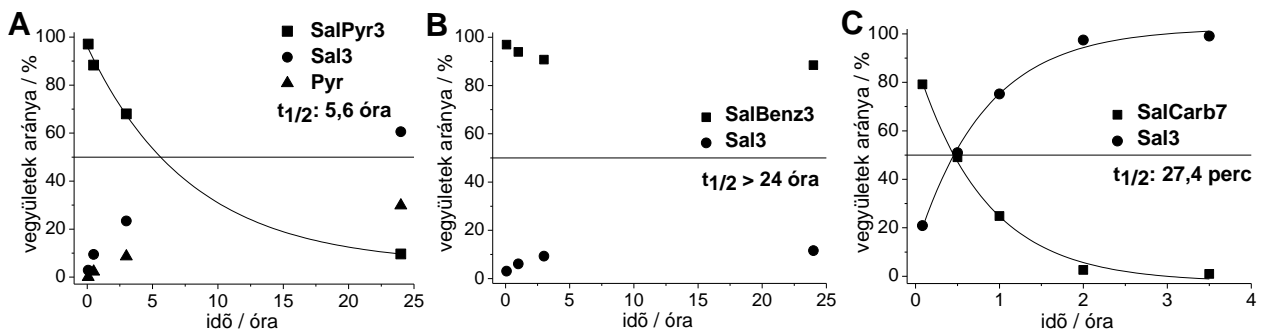


33. ábra: (A) A SalPyr3 szalicilanilid-5-klórpirazinoát, (B) a SalBenz3 szalicilanilid-4-formilbenzoát és (C) a SalCarb7 szalicilanilid-karbamát stabilitása 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban, a felezési idők meghatározása

A SalPyr3 szalicilanilid-5-klórpirazinoát esetében bomlás tapasztalható 10% DMSO tartalmú szérumbmentes médiumban, a SalPyr3 vegyület 90%-a elbomlott 24 óra után (Függelék F14. ábra). Sal3 és Pyr megjelenése bizonyítja az észterkötés hidrolízisét. A SalPyr3 mennyiségének csökkenése alapján a vegyület felezési ideje 5,6 óra (34.A. ábra).

10% DMSO tartalmú szérumbmentes médiumban a SalBenz3-nak ez esetben is nagyobb a stabilitása (Függelék F15. ábra), a vegyület 12%-a hidrolizált el Sal3 szalicilaniliddé, így felezési ideje több mint 24 óra (34.B. ábra).

A szalicilanilid-karbamát SalCarb7 6 óra után elbomlott a 10% DMSO-t tartalmazó szérumbmentes RPMI-1640 médiumban (Függelék F16. ábra). A SalCarb7 karbamát mennyiségének csökkenéséből és a keletkező Sal3 szalicilanilid mennyiségének növekedéséből határozható meg a SalCarb7 felezési ideje, mely 27,4 perc lett (34.C. ábra).



34. ábra: (A) A SalPyr3 szalicilanilid-5-klórpirazinoát, (B) a SalBenz3 szalicilanilid-4-formilbenzoát és (C) a SalCarb7 szalicilanilid-karbamát stabilitása 10% DMSO-t tartalmazó szérumbmentes RPMI-1640 médiumban, a felezési idők meghatározása

A kiválasztott vegyületek stabilitás meghatározása alapján az a következtetés vonható le, hogy a szalicilanilid-5-klórpirazinoátok és a szalicilanilid-karbamátok különböző felezési idővel hidrolizálnak a kiindulási szalicilanilidekké az *in vitro* kísérletek körülményei közt. Mivel a hidrolízis egyik esetben sem volt pillanatszerű (Sal3-származékok esetén $t_{1/2} > 27,4$ perc), ezért az *in vitro* aktivitások meghatározásának eredményeit (MIC és IC_{50} értékek) az intakt vegyülethez rendeltem.

4.1.7. A szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok MIC értékének meghatározása

A vegyületek antimikobakteriális hatását vizsgáltuk a gyorsan nöövő *M. abscessus* baktériumtörzsön, a lassan nöövő *M. tuberculosis* H₃₇Rv szenzitív törzsön és a lassan nöövő *M. tuberculosis* A8 MDR multirezisztens törzsön (rezisztens INH-ra és RIF-re). A szerkezet-hatás összefüggések alapján megkívántuk határozni az aktivitáshoz szükséges szerkezeti elemeket.

Az antimikobakteriális hatás jellemzéséhez meghatároztuk a vegyületek minimális gátló koncentrációját (MIC), amely azt a legkisebb hatóanyag koncentrációt jelenti, mely gátolja a baktériumok szaporodását. Adott vegyület növekvő koncentrációjú oldatát fertőztük a baktérium adott koncentrációjú szuszpenziójával. A minimális gátló szintet annak az oldatnak a vegyület koncentrációja jelentette, amelyben a 4 hétig tartó inkubálás után szabad szemmel még nem észleltünk növekedést. A növekedésgátlást szilárd táptalajra történő kioltással ellenőriztük és újabb 4 hét elteltével meghatároztuk a telepszámot (CFU). A CFU az életképes baktériumokból kifejlődött telepek számát jelenti. Ez a vizsgálat az aktívan osztódó, aktív metabolizmusú, extracelluláris baktériumpopulációt modellezi. A kísérleteket az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet Bakteriológiai Laboratóriumában végeztük Dr. Szabó Nóra és Dávid Sándor segítségével.

Az eredményeket a 4. táblázatban foglaltam össze [195]. A minimális gátló koncentrációt általában µg/mL-ben adják meg, dolgozatomban a jobb összehasonlíthatóság kedvéért a µM-ban megadott moláris minimális gátló koncentrációt is használom.

Az 5-klórpirazin-2-karbonsav (Pyr) nem volt hatásos egyik baktériumtörzsön sem. Ez a vegyület ilyen kísérleti körülmények között (táptalaj, pH) nem aktív, az intracelluláris baktériumra fejt ki gátló hatását alacsonyabb pH-n, protonált állapotban [72].

A *M. abscessus* gyorsan nöövő, vizeket szennyező mikobaktérium, képes ellenállni több alkalmazott antibakteriális hatóanyagoknak [33]. A *M. abscessus* esetében alkalmazott kontroll vegyületeknél a következő MIC értékeket kaptuk: INH 40 µg/mL (291,8 µM); ciprofloxacín (CIPX) 1 µg/mL (3,0 µM); gentamicin (GEN) 5 µg/mL (10,5 µM). A legtöbb általunk alkalmazott szalicilanilid származék kimagasló gátló hatással rendelkezett ez ellen a törzs ellen, a mért MIC értékek 0,1 és 20 µg/mL (0,2-43,6 µM) között voltak.

Általánosságban elmondható, hogy az 5-klórszalicilsav származékok jobb aktivitást mutattak, mint az 5-brómszalicilsav származékok *M. abscessus* törzsön. Három kiindulási szalicilanilid (Sal1, Sal2 és Sal4) jobb hatással rendelkezett, mint a klinikumban alkalmazott gentamicin *in vitro* hatása. A szalicilanilidek közt azok a vegyületek, melyek az anilin-gyűrűn halogén szubsztituenszt tartalmaznak (Sal1-4) kimagaslóan jobb aktivitással rendelkeztek (MIC: 3,2-13,9 µM), mint azok, amelyek benzoil- (Sal5 és Sal6) vagy acetilcsoportot (Sal7 és Sal8) tartalmaznak (MIC: 25,3-59,8 µM). A szalicilsav-gyűrűn a halogénatom lecserélése formilcsoportra szintén éles csökkenést eredményezett a Sal9 formil-szalicilanilid származék aktivitásában (129,4 µM).

A szalicilanilid-észterek gátló hatása hasonló a kiindulási szalicilanilidekéhez. A szalicilanilid-5-klórpirazinoátoknál a 3,4-diklóranilin fragmenst tartalmazó SalPyr2 és SalPyr4 alacsonyabb MIC értékeket eredményezett *M. abscessus* esetében (1,1 ill. 1,0 µM), mint a 4-CF₃-anilint tartalmazó származékok (SalPyr1 – 5,5 µM és SalPyr3 – 5,0 µM). Ráadásul a SalPyr2 és SalPyr4 észterek alacsonyabb

koncentrációnál hatottak, mint a klinikumban alkalmazott ciprofloxacín. A szalicilanilid-4-formilbenzoátok (SalBenz1-3) pedig alacsonyabb MIC értékekkel rendelkeztek (5,6-10,2 μM), mint a gentamicin.

A Sal1-4 szalicilanilidek karbamát származékai (SalCarb1-9) rendelkeztek a legjobb aktivitással, a kiindulási szalicilanilideknél is alacsonyabb MIC értékeknél (0,2-4,3 μM) gátolták a *M. abscessust*. A SalCarb2, SalCarb7 és SalCarb8 MIC értéke (0,2 μM) 15-ször kisebb, mint a ciprofloxacíné (3 μM) és több mint 50-szer kisebb, mint a gentamiciné (10,5 μM). A karbamátok esetében is elmondható, hogy az anilin-gyűrűn a halogénatom lecserélése benzoilcsoportra jelentős aktivitás csökkenést eredményezett (SalCarb10-14, MIC 10-20 $\mu\text{g/mL}$; 22,9-43,6 μM).

Minden szalicilanilid származék kimagasló aktivitással rendelkezett *M. tuberculosis* H₃₇Rv szenzitív törzs ellen is. A kiindulási, a szalicilsav- és anilin-gyűrűn is halogénatomokkal rendelkező származékok (Sal1-4) alacsony MIC értéknél hatottak (0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,4-1,6 μM), körülbelül tízszer jobb aktivitással rendelkeztek, mint a 4-benzoilanilin származékok (Sal5 és Sal6, MIC 5 $\mu\text{g/mL}$; 12,7-14,2 μM) és ötször jobb aktivitással, mint a 4-acetilanilin származékok (Sal7 és Sal8, MIC 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 7,5-8,6 μM). A Sal9 szalicilsav-gyűrűn formilcsoportot tartalmazó szalicilanilid származék mutatta a legkisebb aktivitást (MIC 8 $\mu\text{g/mL}$; 25,9 μM), de hatása még megfelelőnek mondható.

A szalicilanilid-észterek közül az 5-klórpirazinoátok (SalPyr1-4, MIC 1,0-2,0 μM) enyhén jobb hatást mutattak, mint a kiindulási Sal1-4. A 4-formilbenzoátok (SalBenz1-3, MIC 2,2-11,2 μM) esetén viszont magasabb MIC értékeket kaptunk, mint a kiindulási Sal1-3 MIC értékei.

A szalicilanilid-karbamátok közül az anilin-gyűrűn is halogénatomot tartalmazó SalCarb1-9 vegyületek kiváló aktivitással rendelkeztek *M. tuberculosis* H₃₇Rv ellen (0,2-2,3 μM). SalCarb4 kivételével jobb hatást mutattak, mint a kiindulási szalicilanilidek és hatásuk hasonló vagy jobb volt, mint a klinikumban alkalmazott izoniazidé (1,17 μM). Szintén elmondható, hogy a halogén helyett benzoilcsoportot tartalmazó karbamátok (SalCarb10-14) enyhén magasabb MIC értékeknél (4 $\mu\text{g/mL}$; 8,0-9,2 μM) gátolták a baktérium tenyészet növekedését.

A vegyületek hasonló koncentrációnál voltak hatásosak a multirezisztens *M. tuberculosis* A8 MDR törzs ellen, mint a szenzitív H₃₇Rv törzs ellen. A hatásukban lévő különbségek is a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsnél megfigyelt tendenciát követték. A legtöbb vegyület MIC értéke az A8 MDR törzs ellen 0,5-10 $\mu\text{g/mL}$ (1,0-21,3 μM) volt. Itt is a benzoil-, acetyl- és formilcsoport jelenléte csökkentette az aktivitást és szintén a Sal9 szalicilsav-gyűrűn formilcsoportot tartalmazó szalicilanilid származék mutatta a legkisebb hatást (MIC 20 $\mu\text{g/mL}$; 64,7 μM). A szalicilsav- és anilin-gyűrűn is halogénatomot tartalmazó szalicilanilidek (Sal1-4), szalicilanilid-5-klórpirazinoátok (SalPyr1-4) és karbamátok (SalCarb1-9) kimagasló gátló hatást mutattak, MIC értékeik (1,0-4,4 μM) alacsonyabbak voltak, mint az INH gátló koncentrációja (7,3 μM).

4. táblázat: Az 5-klórpirazin-2-karbonsav, a szubsztituált szalicilanilidek, a szalicilanilid-észterek és karbamátok *in vitro* antimikobakteriális hatása *M. abscessus*, *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR törzseken

kód	R ¹	R ²	R ³	<i>M. abscessus</i>			<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv			<i>M. tuberculosis</i> A8 MDR		
				MIC ^a Y (µg/mL)	MIC (µM)	CFU ^b	MIC ^a Y (µg/mL)	MIC (µM)	CFU ^b	MIC ^a Y (µg/mL)	MIC (µM)	CFU ^b
kontroll ^c	-	-	-	nincs gátlás	-	+++ ^d	nincs gátlás	-	+++ ^d	nincs gátlás	-	+++ ^d
INH ^{e, f}	-	-	-	40	291,8	26	0,16	1,17	0	1	7,3	12
Pyr	-	-	-	>100	>632,9	+++ ^d	>100	>632,9	+++ ^d	>100	>632,9	+++ ^d
Sal1	Cl	4-CF ₃	-	1	3,2	0	0,5	1,6	0	0,5	1,6	0
Sal2	Cl	3,4-diCl	-	1	3,2	0	0,5	1,6	2	0,5	1,6	8
Sal3	Br	4-CF ₃	-	5	13,9	0	0,5	1,4	2	1	2,8	0
Sal4	Br	3,4-diCl	-	2,5	7,0	0	0,5	1,4	2	1	2,8	0
Sal5	Cl	4-CO-Ph	-	10	28,5	0	5	14,2	3	5	14,2	50
Sal6	Br	4-CO-Ph	-	10	25,3	0	5	12,7	2	5	12,7	1
Sal7	Cl	4-CO-CH ₃	-	10	34,5	0	2,5	8,6	1	5	17,3	0
Sal8	Br	4-CO-CH ₃	-	20	59,8	0	2,5	7,5	10	5	15,0	0
Sal9	HCO	4-CF ₃	-	40	129,4	0	8	25,9	40	20	64,7	2
SalPyr1	Cl	4-CF ₃	-	2,5	5,5	0	0,5	1,1	3	0,5	1,1	1
SalPyr2	Cl	3,4-diCl	-	0,5	1,1	0	0,5	1,1	10	2	4,4	0
SalPyr3	Br	4-CF ₃	-	2,5	5,0	0	0,5	1,0	0	1	2,0	22
SalPyr4	Br	3,4-diCl	-	0,5	1,0	0	1	2,0	1	1	2,0	11
SalBenz1	Cl	4-CF ₃	-	2,5	5,6	0	1	2,2	0	nd ^g	-	-
SalBenz2	Cl	3,4-diCl	-	2,5	5,6	0	5	11,2	0	nd	-	-
SalBenz3	Br	4-CF ₃	-	5	10,2	0	5	10,2	0	nd	-	-
SalCarb1	Cl	4-CF ₃	Cl	0,5	1,2	0	0,2	0,5	1	0,5	1,2	0
SalCarb2	Cl	4-CF ₃	CH ₂ Cl	0,1	0,2	0	0,2	0,5	1	0,5	1,2	0
SalCarb3	Cl	3,4-diCl	Cl	0,5	1,2	0	0,5	1,2	2	1	2,4	0
SalCarb4	Cl	3,4-diCl	CH ₂ Cl	0,5	1,2	0	1	2,3	0	0,5	1,2	1
SalCarb5	Cl	3,4-diCl	CH ₃	0,5	1,3	0	0,1	0,2	0	0,5	1,3	2
SalCarb6	Br	4-CF ₃	Cl	2	4,3	0	0,2	0,4	0	0,5	1,1	9
SalCarb7	Br	4-CF ₃	CH ₂ Cl	0,1	0,2	0	0,5	1,0	8	0,5	1,0	0
SalCarb8	Br	3,4-diCl	Cl	0,1	0,2	0	0,1	0,2	2	1	2,2	0
SalCarb9	Br	3,4-diCl	CH ₂ Cl	1	2,1	0	0,2	0,4	2	0,5	1,0	2
SalCarb10	Cl	4-CO-Ph	Cl	20	43,6	0	4	8,7	2	5	10,9	21
SalCarb11	Cl	4-CO-Ph	CH ₂ Cl	20	42,5	0	4	8,5	3	10	21,3	0
SalCarb12	Cl	4-CO-Ph	CH ₃	10	22,9	0	4	9,2	3	5	11,5	6
SalCarb13	Br	4-CO-Ph	Cl	20	40,0	0	4	8,0	2	10	20,0	0
SalCarb14	Br	4-CO-Ph	CH ₂ Cl	20	38,9	0	4	8,7	2	1	1,9	1

^a MIC (minimális gátló koncentráció) meghatározása Sula félszintetikus médiumban (pH 6,5) *M. abscessus* esetén 1 hét, *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR esetén 4 hét inkubálás után

^b CFU (telepszám) meghatározása Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon *M. abscessus* esetén 1 hét, *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR esetén 4 hét további inkubálás után

^c pozitív kontroll, hatóanyag nélkül inkubált baktérium

^d +++: egybefüggő telepek

^e izoniazid

^f *M. abscessus* esetén alkalmazott kontroll vegyületek és MIC értékeik: ciprofloxacín, 1 µg/mL (3,0 µM); gentamicin, 5 µg/mL (10,5 µM)

^g nd: nem határoztuk meg

További vizsgálatra kiválasztottunk tíz vegyületet, melyek a legjobb aktivitással rendelkeztek a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzs ellen, MIC értékük 1,1 µM alatt volt (SalPyr1, SalPyr2, SalPyr3, SalCarb1, SalCarb2, SalCarb5, SalCarb6, SalCarb7, SalCarb8, SalCarb9). Ezeknél a kiemelkedő hatású szalicilanilid-észtereknél és karbamátoknál az *in vitro* antimikobakteriális hatást két különböző rezisztencia mintával rendelkező MDR törzsön is megvizsgáltuk, melyek klinikai izolátumokból származtak: *M. tuberculosis* 9449/2006 (MDR törzs) és *M. tuberculosis* Praha 131 (XDR törzs) (5. táblázat) [195]. Mindkét törzs rezisztens INH-ra, RIF-ra, rifabutinra és sztreptomycinre. A *M. tuberculosis* Praha 131 törzs ezeken kívül etambutolra, ofloxacinra, gentamicinre és amikacinra is rezisztens, ezért ez a törzs extenzíven rezisztens törzsnek (XDR) tekinthető. A *M. tuberculosis* 9449/2006 és Praha 131 törzseken történő MIC meghatározásokat Jiřina Stolařiková végezte (Laboratory for Mycobacterial Diagnostics and Tuberculosis, Regional Institute of Public Health in Ostrava, Ostrava, Csehország).

A szalicilanilid-5-klórpirazinoátok és karbamátok is kiváló aktivitást mutattak az MDR és XDR törzsek ellen 0,5-2 µM közötti MIC értékekkel 14 nap inkubálás után. A különböző rezisztencia mintázat ellenére a két törzs hasonló érzékenységet mutatott a vegyületek felé. A legalacsonyabb MIC értéket az *M. tuberculosis* 9449/2006 MDR törzs ellen 21 nap inkubálás után SalCarb1 és SalCarb5 (1 µM) mutatta. A *M. tuberculosis* Praha 131 XDR törzs ellen 21 nap inkubálást követően SalPyr1 észter, valamint SalCarb5 és SalCarb9 karbamátok bizonyultak a leghatásosabbaknak (MIC: 1 µM).

A szalicilanilid-5-klórpirazinoátok hatását összehasonlítottam a korábban Martin Krátký és munkatársai által leírt, a pirazin-gyűrűn klóratomot nem tartalmazó szalicilanilid-pirazinoátok (SalPyr-1o, SalPyr-1e és SalPyr-1r, ahol 1o, 1e és 1r a [63]-as referenciabeli kódokat jelöli) hatásával az *M. tuberculosis* 9449/2006 MDR és *M. tuberculosis* Praha 131 XDR törzsek ellen. A szalicilanilid-pirazinoátok a szalicilanilid-5-klórpirazinoátoknál alacsonyabb koncentrációnál mutattak aktivitást mind az MDR (MIC 21 nap után 0,25-0,5 µM) mind az XDR törzs esetében (MIC 21 nap után 0,125-1 µM). Ezek alapján a klóratom jelenléte a pirazin-gyűrűn nem javította a szalicilanilid-észterek *in vitro* antimikobakteriális hatását.

5. táblázat: A kiválasztott szalicilanilid származékok *in vitro* aktivitása MDR és XDR törzsek ellen és a kiválasztott szalicilanilid-5-klórpirazinoátok aktivitásának összehasonlítása az irodalomban már leírt szalicilanilid pirazinoát analógokkal

kód	R ¹	R ²	R ³	<i>M. tuberculosis</i> 9449/2006 ^a				<i>M. tuberculosis</i> Praha 131 ^b			
				14 nap ^c		21 nap ^c		14 nap ^c		21 nap ^c	
				MIC γ (µg/mL)	MIC (µM)	MIC γ (µg/mL)	MIC (µM)	MIC γ (µg/mL)	MIC (µM)	MIC γ (µg/mL)	MIC (µM)
				szalicilanilid-5-klórpirazinoátok (SalPyr1-4)				szalicilanilid-pirazinoátok (SalPyr-1o, 1e, 1r)			
SalPyr1	Cl	4-CF ₃	-	0,5	1	0,9	2	0,5	1	0,5	1
SalPyr2	Cl	3,4-diCl	-	0,5	1	0,9	2	0,5	1	0,9	2
SalPyr3	Br	4-CF ₃	-	0,5	1	1,0	2	1,0	2	1,0	2
SalPyr-1o*	Cl	4-CF ₃	-	0,05*	0,125*	0,1*	0,25*	0,05*	0,125*	0,05*	0,125*
SalPyr-1e*	Cl	3,4-diCl	-	0,2*	0,5*	0,2*	0,5*	0,2*	0,5*	0,4*	1*
SalPyr-1r*	Br	4-CF ₃	-	0,2*	0,5*	0,2*	0,5*	0,1*	0,25*	0,2*	0,5*
SalCarb1	Cl	4-CF ₃	Cl	0,2	0,5	0,4	1	0,4	1	0,8	2
SalCarb2	Cl	4-CF ₃	CH ₂ Cl	0,4	1	0,9	2	0,4	1	0,9	2
SalCarb5	Cl	3,4-diCl	CH ₃	0,4	1	0,4	1	0,4	1	0,4	1
SalCarb6	Br	4-CF ₃	Cl	0,5	1	0,9	2	0,5	1	0,9	2
SalCarb7	Br	4-CF ₃	CH ₂ Cl	0,5	1	1,0	2	0,5	1	1,0	2
SalCarb8	Br	3,4-diCl	Cl	0,5	1	0,9	2	0,5	1	0,9	2
SalCarb9	Br	3,4-diCl	CH ₂ Cl	0,5	1	1,0	2	0,5	1	0,5	1

^a Az MDR 9449/2006 törzs INH-ra, RIF-re, rifabutinnra és sztreptomycinre rezisztens

^b Az XDR Praha 131 törzs INH-ra, RIF-re, rifabutinnra, sztreptomycinre, etambutolra, ofloxacinra, gentamicinre és amikacinra rezisztens

^c A MIC értékek 14 nap és 21 nap inkubációs idő után lettek meghatározva (Sula félszintetikus médium, pH 6,5)

* A jelölt vegyületek és MIC értékek a [63] referenciában található meg, kódjuk 1o, 1e és 1r

A szerkezet-hatás összefüggések alapján elmondható, hogy a legtöbb esetben a halogén szubsztituens fajtája a szalicilsav-gyűrűn (4-Cl vagy 4-Br), illetve az anilin-gyűrűn (4-CF₃ vagy 3,4-diCl) nincs jelentős befolyással az *in vitro* antimikobakteriális aktivitásokra. Azonban a halogénatom lecserélése az anilin-gyűrűn bezoil- vagy acetilcsoportra csökkenést eredményez az antimikobakteriális hatásban. Ez az aktivitás csökkenés még jelentősebb, ha a szalicilsav-gyűrűn cseréljük le a halogénatomot formilcsoportra. Az acetil- és formilcsoporttal rendelkező szalicilanilidek lipofilitása is kisebb a számolt logP értékek alapján, mint a halogénezett analógoké. Ennek ellenére az így nyert acetil- és formilcsoportot tartalmazó szalicilanilid származékok (Sal7-9) aktivitása még mindig megfelelőnek mondható és nagy előnyük, hogy ezeken a csoportokon keresztül megvalósítható peptid típusú hordozókhoz való konjugálásuk. A szalicilanilid-5-klórpirazinoát és 4-formilbenzoát észterek hatása többnyire a kiindulási szalicilanilid származékok aktivitásához hasonló, számolt logP értékük alapján lipofilebb vegyületeknek mutatkoznak. A szalicilanilid-4-formilbenzoát észterek a formilcsoporton keresztül szintén peptidokhoz konjugálhatók. Általában a szalicilanilidek karbamáttá alakítása az aktivitás és lipofilitás növekedését

eredményezi. A karbamátok *N*-szubsztituens csoport típusának (2-klóretil, 3-klórpropil, propil) nincs jelentős hatása az aktivitásra.

Elmondható, hogy a szalicilanilid származékok többsége nagyon alacsony koncentrációtartományban képes gátolni a gyorsan növő, kemoterápia rezisztens *M. abscessus* baktériumot, ezért ezen vegyületek ígéretes hatóanyagjelöltek lehetnek. A legtöbb szalicilanilid származék kimagasló aktivitást mutat mind a *M. tuberculosis* H₃₇Rv szenzitív törzs ellen, mind az A8 MDR multirezisztens törzs ellen, sőt a szenzitív törzs ellen leghatásosabb vegyületek egy további MDR törzs (*M. tuberculosis* 9449/2006) és egy XDR törzs (*M. tuberculosis* Praha 131) ellen is hatásosnak bizonyultak. Ezek a vegyületek potenciális hatóanyagjelöltek lehetnek az egyre nagyobb veszélyt jelentő MDR és XDR törzsek ellen.

4.1.8. A szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatása

Különböző sejteken vizsgáltuk a szalicilanilid származékok *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatását. Optimális esetben a vegyületek nem citotoxikusak, vagy citosztatikusak a sejtekre, vagy a káros hatásuk jóval a baktériumot gátló koncentrációjuk felett jelentkezik, így szelektívnek mondhatók a baktériumok felé.

A makrofágok, monociták a mikobaktériumok legfőbb gazdasejtjei. Ezért a vegyületek citotoxikus és citosztatikus hatását a gazdasejt makrofágok és monociták *in vitro* modelljének tekinthető MonoMac6 humán monocita (akut monocitás leukémia eredetű) sejtvonalon vizsgáltuk. Meghatároztuk néhány kiválasztott vegyület citotoxikus hatását egér csontvelői makrofág (BMM Φ) sejteken is, ezek a primer, nem tumoros sejtek szintén gazdasejt modellnek tekinthetők. Vizsgáltuk még néhány kiválasztott vegyület citosztatikus hatását HepG2 humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonalon, mely a hepatotoxicitás tanulmányozására alkalmazható sejtvonal. A MonoMac6 és a HepG2 is tumoros eredetű sejtvonal, de esetünkben alkalmazhatóak az egészséges sejtek modellezésére.

A vegyületek citotoxikus és citosztatikus hatását a sejtek életképességének vizsgálatával, a kolorimetriás tetrazólium (MTT) módszer segítségével határoztuk meg, melyet az IC₅₀ értékekkel (50%-os gátló koncentráció) jellemeztünk. A citotoxikus hatás meghatározásánál a sejteket 24 óráig kezeltük a vegyületekkel, majd MTT-oldatot adtunk a sejtekhez és kolorimetriásan meghatároztuk az élő és halott sejtek arányát. A citosztatikus hatás meghatározásánál a sejteket szintén 24 óráig kezeltük a vegyületekkel, majd mosást követően még további 72 órán át inkubáltuk a sejteket és ezután következett az MTT hozzáadása és a kolorimetriás kiértékelés.

Meghatároztuk a vegyületek szelektivitási indexét (SI) is, mely a kapott IC₅₀ értékek és a *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzsön mért MIC értékek hányadosa, vagyis minél nagyobb a szelektivitási index, a vegyület annál szelektívebb a baktériumra, és nem vagy kevésbé citotoxikus, illetve citosztatikus a vizsgált sejtekre.

A MonoMac6 sejteken mért eredményeket a 6. táblázatban foglaltam össze [195]. Az 5-klórpirazin-2-karbonsav (Pyr) nem mutatott citotoxikus és citosztatikus hatást MonoMac6 sejteken a vizsgált legmagasabb koncentrációnál (250 μ M) sem. A szubsztituált szalicilanilidek, szalicilanilid-észterek és karbamátok citotoxikus és citosztatikus hatást mutattak különböző IC₅₀ értékeknél (1,0-75,3 μ M) a MonoMac6 sejteken. A szalicilanilid váz mindkét gyűrűjén halogént tartalmazó szalicilanilidek (Sal1-4)

nagyon alacsony IC_{50} értékkel rendelkeztek (IC_{50} citotoxicitás: 3,5-7,6 μM , IC_{50} citosztázis: 1,4-3,8 μM). Ezt a citotoxikus és citosztatikus hatásukat megőrizték az észterekben és a karbamátokban is. Az észterek közt találunk kevésbé citotoxikus hatású vegyületeket is (SalPyr1, SalBenz1, SalBenz3, IC_{50} 10,1-30,1 μM), de a citosztatikus hatás szempontjából ezek a vegyületek is alacsony IC_{50} értéket mutattak (0,3-5,3 μM). A halogénezett szalicilanilid-karbamátok esetén (SalCarb1-9, IC_{50} citotoxicitás: 2,5-9,5 μM , IC_{50} citosztázis: 1,0-3,7 μM) az alacsonyabb IC_{50} értékek ellenére találunk több vegyületet, melyeknek a szelektivitási indexe 15 feletti (SI 15,2-35,0). A halogénatom helyett benzoil-, acetyl- vagy formilcsoportot tartalmazó szalicilanilidek és karbamátjaik nagyobb IC_{50} értékeket mutattak, mint a halogént tartalmazó analógjaik (citotoxicitás: 12,6-48,0 μM , citosztázis: 5,9-75,3 μM). Ezek alapján a szalicilanilid származékokban a halogéncsoport lecserélése benzoil-, acetyl- vagy formilcsoportra az antimikobakteriális hatással párhuzamosan a MonoMac6 sejteken mért citotoxikus és citosztatikus hatást is csökkentette, így szelektivitási indexük sem nőtt jelentős mértékben.

A várttal ellentétben, a szalicilanilid származékok fenolos hidroxilcsoportjának észter vagy karbamát formában történő maszkírozásával nem értünk el jelentős citotoxikus, illetve citosztatikus hatás csökkenést. Az az eredmény, hogy a szalicilanilid-észterek és karbamátok citotoxikus és citosztatikus hatása a kiindulási szalicilanilidekéhez hasonló kapcsolatban lehet a vegyületek instabilitásával az alkalmazott körülmények között.

6. táblázat: Az 5-klórpirazin-2-karbonsav, a szubsztituált szalicilanilidek, a szalicilanilid észterek és karbamátok *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatása MonoMac6 humán monocita sejteken (24 órás kezelés) és szelektivitási indexük a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyítva

kód	R ¹	R ²	R ³	citotoxicitás 24 óra ^a		citosztázis 24 óra ^b	
				MonoMac6 IC ₅₀ (µM)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^c	MonoMac6 IC ₅₀ (µM)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^c
Pyr	-	-	-	>250	nd ^d	>250	nd
Sal1	Cl	4-CF ₃	-	5,3±0,8	3,3	2,2±1,2	1,4
Sal2	Cl	3,4-diCl	-	3,6±1,4	2,3	3,8±0,5	2,4
Sal3	Br	4-CF ₃	-	7,6±2,2	5,4	2,0±0,4	1,4
Sal4	Br	3,4-diCl	-	3,5±2,4	2,5	1,4±0,5	1,0
Sal5	Cl	4-CO-Ph	-	48,0±3,7	3,4	75,3±18,0	5,3
Sal6	Br	4-CO-Ph	-	21,8±4,3	1,7	40,3±7,7	3,2
Sal7	Cl	4-CO-CH ₃	-	nd	nd	16,1±4,9	1,9
Sal8	Br	4-CO-CH ₃	-	nd	nd	18,6±2,5	2,5
Sal9	HCO	4-CF ₃	-	nd	nd	21,5±7,1	0,8
SalPyr1	Cl	4-CF ₃	-	1,1±1,6	1,0	1,3±0,5	1,2
SalPyr2	Cl	3,4-diCl	-	10,1±0,5	9,2	5,8±1,0	5,3
SalPyr3	Br	4-CF ₃	-	1,1±0,5	1,1	4,9±1,2	4,9
SalPyr4	Br	3,4-diCl	-	5,7±4,9	2,9	8,0±0,3	4,0
SalBenz1	Cl	4-CF ₃	-	11,4±3,0	5,2	3,0±2,9	1,4
SalBenz2	Cl	3,4-diCl	-	1,5±0,5	0,1	1,6±0,4	0,1
SalBenz3	Br	4-CF ₃	-	30,1±9,0	3,0	2,7±1,5	0,3
SalCarb1	Cl	4-CF ₃	Cl	7,6±5,6	15,2	1,8±1,1	3,6
SalCarb2	Cl	4-CF ₃	CH ₂ Cl	8,8±6,0	17,6	1,0±0,2	2,0
SalCarb3	Cl	3,4-diCl	Cl	4,6±0,2	3,8	2,3±0,6	1,9
SalCarb4	Cl	3,4-diCl	CH ₂ Cl	2,5±2,3	1,1	1,4±0,5	0,6
SalCarb5	Cl	3,4-diCl	CH ₃	7,0±6,3	35,0	1,2±0,3	6,0
SalCarb6	Br	4-CF ₃	Cl	9,3±1,7	23,3	2,0±0,6	5,0
SalCarb7	Br	4-CF ₃	CH ₂ Cl	5,7±0,1	5,7	1,3±0,1	1,3
SalCarb8	Br	3,4-diCl	Cl	6,9±4,5	34,5	3,7±3,5	18,5
SalCarb9	Br	3,4-diCl	CH ₂ Cl	9,5±6,1	23,8	1,5±0,7	3,8
SalCarb10	Cl	4-CO-Ph	Cl	37,8±4,3	4,3	9,9±1,0	1,1
SalCarb11	Cl	4-CO-Ph	CH ₂ Cl	16,1±6,6	1,9	5,9±0,7	0,7
SalCarb12	Cl	4-CO-Ph	CH ₃	18,7±4,5	2,0	9,6±0,9	1,0
SalCarb13	Br	4-CO-Ph	Cl	24,9±4,5	3,1	15,1±6,8	1,9
SalCarb14	Br	4-CO-Ph	CH ₂ Cl	12,6±0,1	1,4	8,9±1,1	1,0

^a Citotoxikus hatás meghatározása 24 órás kezelést követően MTT-tesztel

^b Citosztatikus hatás meghatározása 24 órás kezelést, majd 72 órás továbbtenyésztést követően MTT-tesztel

^c Szelektivitási index, SI = IC₅₀ (µM)/MIC (µM), félkövér: kiemelkedő SI értékek

^d nd: nem határoztuk meg

A különböző szalicilanilid származékok közül kiválasztottunk egy-egy vegyületet, melyek a Sal1 kiindulási szalicilanilidből származtathatóak (Sal1, Sal5, Sal7, SalPyr1, SalBenz1, SalCarb1). Ezek citotoxikus hatását vizsgáltuk 24 órás kezelést követően egér csontvelői makrofágokon (BMMΦ) (7. táblázat). (Az egér csontvelői makrofágok esetén igyekeztünk az állatvédelmi szabályoknak megfelelően a feláldozott egerek számát minimalizálni, ezért a vegyületek citotoxikus hatását csak a reprezentatív vegyületeken vizsgáltuk.) A Sal1 kiindulási szalicilanilid közepes citotoxicitást mutatott (IC₅₀ 49,2 μM) kimagasló szelektivitási indexszel (SI: 30,8). Az anilin-gyűrűn CF₃-csoport helyett benzoil- (Sal5) vagy acetylcsoportot (Sal7) tartalmazó szalicilanilidek IC₅₀ értéke a vártnak megfelelően nagyobb volt (200,0, illetve 85,8 μM), mint a Sal1 IC₅₀ értéke. Az észterek esetében (SalPyr1, SalBenz1) jelentős citotoxikus hatást tapasztaltunk (IC₅₀ 19,5, illetve 19,0 μM). A karbamát (SalCarb1) közepes citotoxikus hatással rendelkezett a BMMΦ sejteken, alacsony MIC értékének köszönhetően ez a vegyület rendelkezett a legjobb szelektivitási indexszel (SI: 65,8). BMMΦ sejteken a Sal1 fenolos hidroxilcsoportjának maszkírozása észtert, illetve karbamátot kialakítva, a várttal ellentétben növelte a vegyületek citotoxikus hatását.

7. táblázat: A Sal1 kiindulási szubsztituált szalicilanilid és a belőle származtatható vegyületek *in vitro* citotoxikus hatása egér csontvelői makrofág (BMMΦ) sejteken (24 óra kezelés) és szelektivitási indexük a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyítva

kód	R ¹	R ²	R ³	citotoxicitás 24 óra ^a	
				BMMΦ IC ₅₀ (μM)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^b
Sal1	Cl	4-CF ₃	-	49,2±2,3	30,8
Sal5	Cl	4-CO-Ph	-	200,0*	14,1
Sal7	Cl	4-CO-CH ₃	-	85,8±4,2	10,0
SalPyr1	Cl	4-CF ₃	-	19,5±0,3	17,7
SalBenz1	Cl	4-CF ₃	-	19,0±8,5	8,6
SalCarb1	Cl	4-CF ₃	Cl	32,9*	65,8

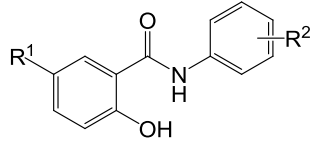
^a Citotoxikus hatás meghatározása 24 órás kezelést követően MTT-teszttel

^b Szelektivitási index, SI = IC₅₀ (μM)/MIC (μM)

* egy mérés eredménye

A hepatotoxicitás modellezésére alkalmazott HepG2 sejtvonalon a kiindulási szalicilanilidek (Sal1-4) és a konjugálható szalicilanilidek (Sal7-9) citosztatikus hatását hasonlítottuk össze 24 órás kezelés és 72 órás továbbtenyésztés után (8. táblázat). Azért ezeket a vegyületeket választottuk ki, mert a szalicilanilid-peptid konjugátumok HepG2 sejtvonalon mért citosztatikus hatásával kívántuk összehasonlítani a kiindulási és a konjugálható szalicilanilidek hatását. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy konjugálással csökkenthető-e a vegyületek citosztatikus hatása. A szalicilanilid váz mindkét gyűrűjén halogénatomot tartalmazó szalicilanilidek (Sal1-4) jelentős citosztatikus hatást mutattak (IC_{50} 2,4-5,8 μ M). A konjugálható változatokban a halogének lecserélése acetyl- vagy formilcsoportra csak enyhén csökkentette a citosztatikus hatást (Sal7-8, IC_{50} 7,9-17,6 μ M). Mind a Sal1-4 és a Sal7-9 vegyületek szelektivitási indexe alacsony (SI: 0,7-3,9). A konjugátumokkal történő összehasonlítást a 4.3.2.4. fejezetben ismertetem.

8. táblázat: A kiindulási és a konjugálható szubsztituált szalicilanilidek *in vitro* citosztatikus hatása HepG2 humán hepatokarcinóma sejteken (24 órás kezelés) és szelektivitási indexük a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyítva

 szubsztituált szalicilanilidek (Sal1-9)				
kód	R ¹	R ²	citosztázis 24 órá ^a	
			HepG2 IC ₅₀ (μM)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^b
Sal1	Cl	4-CF ₃	5,8±1,9	3,6
Sal2	Cl	3,4-diCl	2,4±1,0	1,5
Sal3	Br	4-CF ₃	5,5±2,1	3,9
Sal4	Br	3,4-diCl	4,1±1,9	2,9
Sal7	Cl	4-CO-CH ₃	7,9±1,4	0,9
Sal8	Br	4-CO-CH ₃	15,9±0,0	2,1
Sal9	HCO	4-CF ₃	17,6±1,6	0,7

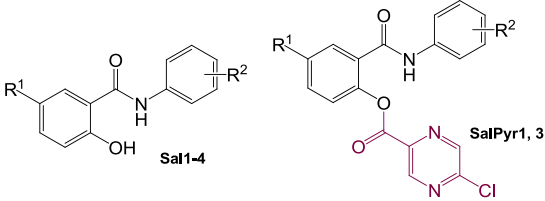
^a Citosztatikus hatás meghatározása 24 órás kezelést, majd 72 órás továbbtenyésztést követően MTT-teszttel

^b Szelektivitási index, SI = IC_{50} (μM)/MIC (μM)

4.1.9. Szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecskék előállítása

A rossz vízoldhatóságú szalicilanilid származékokat együttműködés keretében PLGA nanorészecskékbe (tejsav/glikolsav kopolimer) csomagoltuk, hogy növeljük a sejtek hatóanyag felvételét és jobb gátló hatást érjünk el az intracelluláris baktériumok ellen. A szalicilanilid származékok PLGA mátrixba való bezárását és a nanorészecskék jellemzését (méreteloszlás, hatóanyagtartalom és kapszulázási hatékonyság meghatározása) Dr. Kiss Éva csoportjában, az ELTE Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriumában Dr. Gyulai Gergő végezte. A vegyületek csomagolása PLGA50 (50:50 tejsav:glikolsav arány) nanorészecskékbe történt Pluronic F127 stabilizátor (poli(etilén-oxid)-poli(propilén-oxid)-poli(etilén-oxid) blokk kopolimer) alkalmazásával. A kimagasló antimikobakteriális aktivitású Sal1-4 kiindulási szalicilanilideket és két szintén kimagasló aktivitású szalicilanilid-5-klórpirazinoátot választottunk ki a csomagolásra. A 9. táblázatban látható a szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecskék hatóanyagtartalma és kapszulázási hatékonysága. A nanorészecskék átlagos mérete 150 nm [201].

9. táblázat: A szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecskék hatóanyag tartalma és a kapszulázási hatékonysága [201]

				
kód	R ¹	R ²	hatóanyag tartalom (%)	kapszulázási hatékonyság (%)
Sal1	Cl	4-CF ₃	1,0	0,5
Sal2	Cl	3,4-diCl	0,3	0,5
Sal3	Br	4-CF ₃	1,5	2,3
Sal4	Br	3,4-diCl	0,4	0,5
SalPyr1	Cl	4-CF ₃	1,0	0,5
SalPyr3	Br	4-CF ₃	0,3	0,5

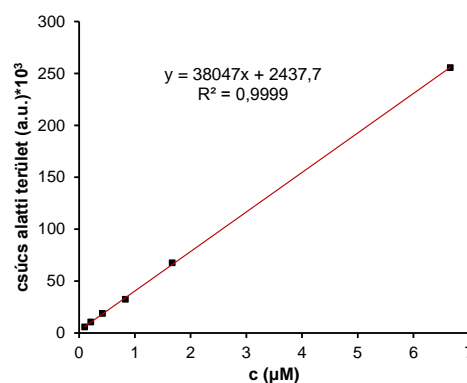
4.1.9.1. A szabad szalicilanilid származékok és a szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecskék *in vitro* sejtbejutása

Összehasonlítottuk egy szabad szalicilanilid származék (Sal3) és szalicilanilid származékot tartalmazó PLGA nanorészecske (Sal3-PLGA) sejtbejutását a gazdasejt modellként alkalmazott MonoMac6 humán monocita sejteken. A sejteket kezeltük a Sal3 szalicilanilid származékkal és a Sal3-PLGA nanorészecske rendszerrel. Az alkalmazott koncentrációk: 4, 20 és 100 µM voltak, a Sal3-PLGA nanorészecske esetében ez a hatóanyagtartalomra számított koncentrációt jelentette. A kezelési térfogat 2 mL volt, így a Sal3 kezelési anyagmennyisége: 8, 40 és 200 nmol volt. A kezelt sejteket 3 óra inkubálás után mostuk, majd metanol-acetonitril-víz elegyét adtuk hozzájuk, hogy a sejtekbe bejutott hatóanyagot extraháljuk. Az extraktumok végtérfogata 300 µL volt. Az extraktumokból LC-MS (kapcsolt folyadékkromatográfia-tömegspektrometria) segítségével meghatároztuk a sejtekbe jutott hatóanyag mennyiségét. Ezzel a módszerrel a nem fluoreszcens anyagok sejtbejutását tudjuk vizsgálni.

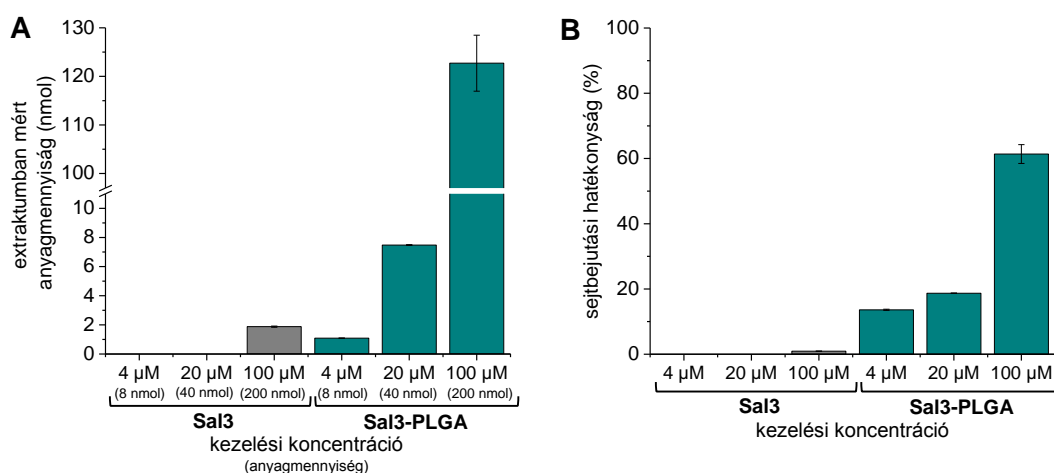
Az LC-MS méréseket Dr. Szoboszlai Norbert egyetemi adjunktus (ELTE TTK, Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszék) segítségével végeztem. Az elválasztást Waters Acquity UPLC rendszeren, Phenomex Kinetex XB-C18 oszloppal (2,6 µm, 100 Å, 2,1 x 100 mm) végeztük szobahőmérsékleten, 0,2 mL/perc folyássebességgel. Az alkalmazott eluensek a következők voltak: A eluens: desztillált víz, B eluens: acetonitril. A gradiens a következő volt: 0-1 perc 1% B, 1-10 perc 1-95% B. Waters Quattro Micro API tömegspektrométert alkalmaztunk atmoszférikus nyomású ionizálással és hármass kvadrupol analizátorral, negatív ionizálási módban.

A Sal3 ismert koncentrációjú oldatából kalibrációs sorot készítettünk 0,1-6,7 µM közötti tartományban. Az LC-MS mérési adatokból kapott egyenes egyenlete alapján (35. ábra) meghatároztuk az extraktumokban található Sal3 mennyiségét, valamint az elméleti maximális mennyiséghez viszonyítva a bejutás mértékét (36. ábra).

A szabad szalicilanolid esetében csak a legmagasabb, 100 µM-os kezelési koncentráció esetében tapasztaltunk 1% körüli sejtbejutást. A szalicilanolid tartalmazó PLGA nanorészecske esetében jelentős Sal3 mennyiséget mértünk mindhárom kezelési koncentráció esetében. A Sal3-PLGA sejtbejutásának mértéke a koncentráció növekedésével nőtt, a vizsgált legnagyobb koncentrációnál több mint 60% volt a sejtbejutási hatékonyság. Megállapíthatjuk, hogy a MonoMac6 sejtek hatóanyag felvételét a PLGA nanorészecskebe csomagolással sikeresen és jelentősen növeltük.



35. ábra: A Sal3 mennyiségi meghatározására felhasznált kalibrációs egyenes



36. ábra: A Sal3 és Sal3-PLGA sejtbejutásának összehasonlítása MonoMac6 sejteken (10⁶ sejt számra vonatkoztatva), 3 órás kezelést követően. (A) A Sal3 mért anyagmennyisége az extraktumban és (B) a sejtbejutás hatékonysága.

4.1.9.2. A szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecskék *in vitro* antimikobakteriális hatása fertőzött MonoMac6 sejteken

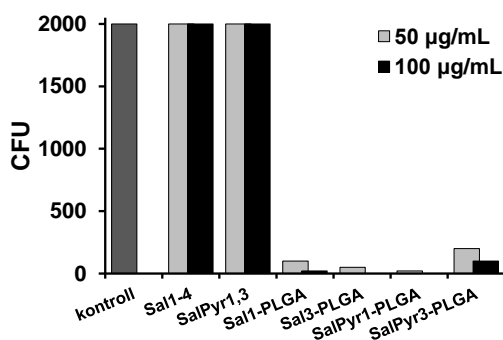
Fontos, hogy a vegyületek hatásosak legyenek az extracelluláris baktériumok ellen, de az is szükséges, hogy képesek legyenek gátolni az intracelluláris baktériumokat is. A MonoMac6 sejtvonal fenotípusos és funkcionális tulajdonságai hasonlítanak az emberi vérben található érett monociták jellemzőihez [185, 186, 187], és kezelés nélkül letapadnak a szövettenyésztő lemez felületére homogén sejtpopulációként, valamint ezek a sejtek képesek a baktériumot nagy mértékben fagocitálni. Ezért a fertőzött MonoMac6 sejtvonalat gyakran használják gazdasejt modellként az antituberkulotikumok fagocitált baktériumok elleni intracelluláris hatásának meghatározásához [7, 145].

Összehasonlítottuk a szalicilanilid származékok és a szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecskék *in vitro* antimikobakteriális hatását az intracelluláris modellen. A MonoMac6 sejteket *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzsszel fertőztük, a fertőzött sejteket a szabad szalicilanilid és szalicilanilid-PLGA rendszerek 50 µg/mL és 100 µg/mL hatóanyagtartalmú oldatával kezeltük. Friss oldatokkal megismételtük a kezelést 3 nap után. Újabb 3 nap eltelte után a sejteket lizáltuk, szilárd táptalajra oltottuk a lizátumot és újabb 4 hét eltelte után meghatároztuk a telepszámot (CFU). A kísérleteket az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet Bakteriológiai Laboratóriumában végeztük Dr. Szabó Nóra és Dávid Sándor segítségével.

A szalicilanilid származékok és a szalicilanilid-PLGA rendszerek gátló hatását az intracelluláris baktériumok ellen a 37. ábrán foglaltam össze. Negatív kontrollként kezeletlen fertőzött sejteket alkalmaztunk. Vizsgáltuk az INH hatását is, mely nem mutatott *in vitro* gátló hatást ezen a modellen 365 µM kezelési koncentrációnál sem [7]. Az INH a főként az extracelluláris baktérium populáció ellen aktív a szervezetben.

A szabad hatóanyagok önmagukban nem gátolták az intracelluláris baktériumot. A szalicilanilid tartalmú PLGA nanorészecskék esetén kimagasló gátló hatást értünk el az intracelluláris baktériummal szemben mindkét kezelési koncentrációnál. A Sal3-PLGA és a SalPyr1-PLGA esetén 100 µg/mL hatóanyagtartalmú kezelési koncentráció esetén nem nőtt ki baktérium a kezelés után, a kapott CFU 0 volt. A különböző típusú hatóanyagok közt (szalicilanilid, illetve szalicilanilid-5-klórpirazinoát) nincs jelentős különbség az *in vitro* hatás szempontjából.

A szalicilanilid önmagukban csak kis mértékben jutnak be a sejtekbe, ez magyarázhatja, azt, hogy a szabad szalicilanilid nem hatásos az intracelluláris baktériumok ellen. Nanorészecskébe csomagolva jobb sejtbefutást értünk el, így jelentősen növekedett az intracelluláris baktériumok elleni gátló hatás.



37. ábra: A szalicilanilid származékok és a szalicilanilid származékokat tartalmazó PLGA nanorészecske rendszerek *in vitro* antimikobakteriális hatása *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériummal fertőzött MonoMac6 sejteken

4.1.10. Az új szalicilanilid származékokkal, szalicilanilid-észterekkel és szalicilanilid-karbamátokkal kapcsolatos eredmények összefoglalása és értékelése

Szubsztituált szalicilanilid származékokat, 5-klórpirazin-2-karbonsavat, szalicilanilidek 5-klórpirazin-2-karbonsavval alkotott észtereit, szalicilanilid-4-formilbenzoátokat, valamint szalicilanilid-karbamátokat állítottunk elő, a vegyületeket kémiaiailag jellemeztük. A vizsgált, reprezentatív szalicilanilid stabil volt az *in vitro* kísérletek körülményei közt, a szalicilanilid-5-klórpirazinoát és a szalicilanilid-karbamát viszont elbomlott a kiindulási szalicilaniliddé az alkalmazott körülmények között (felezési idő 27,4 perc és 5,6 óra között). A szalicilanilid-4-formilbenzoát stabilabbnak bizonyult, mint az 5-klórpirazinoát, illetve karbamát, de némi bomlás ez esetben is megfigyelhető volt. Mivel a hidrolízis egyik esetben sem volt pillanatszerű, ezért az *in vitro* aktivitások meghatározásának eredményeit az intakt vegyületekhez rendeltem.

Vizsgáltuk a vegyületek *in vitro* antimikobakteriális hatását extracelluláris baktérium modellen, a gyorsan növéző *M. abscessus* törzsön, valamint a lassan növéző *M. tuberculosis* H₃₇Rv szenzitív és A8 MDR multirezisztens törzsön. A vegyületek többsége jelentős gátló hatással rendelkezett ezen törzsek ellen alacsony gátló koncentráció értékkel (MIC értékek 0,2 µM-tól). A legaktívabb vegyületek a szalicilanilid-karbamátok közül kerültek ki. Nagy jelentőségű, hogy a vegyületek többsége alacsony MIC értéknél képes volt gátolni a legtöbb klinikumban alkalmazott antibiotikumnak ellenálló *M. abscessus* törzset. A *M. tuberculosis* H₃₇Rv ellen legaktívabb vegyületek egy másik multirezisztens törzs (*M. tuberculosis* 9449/2006) és egy extenzíven rezisztens törzs (*M. tuberculosis* Praha 131) ellen is kimagaslóan aktívnak bizonyultak.

A vegyületek aktivitásához nagyban hozzájárul a halogénszubsztituensek jelenléte a szalicilanilid vázonon. Azokban az esetekben, mikor a szalicilsav- vagy anilin-gyűrű halogén szubsztituensét formil-, acetyl-, vagy benzoilcsoportra cseréltük, aktivitáscsökkenés volt megfigyelhető.

A szalicilanilid származékok kiváló *in vitro* antimikobakteriális hatását beárnyékolja az az eredmény, hogy a vegyületek többsége citotoxikus, illetve citosztatikus hatású humán monocita, hepatocita és egér csontvelői makrofág sejteken. Mivel a magas citotoxikus és citosztatikus hatást tumoros eredetű humán sejtvonalakon mértük (MonoMac6 – akut monociták leukémia eredetű sejtvonal, HepG2 – hepatokarcinóma eredetű sejtvonal), a vegyületek hatása ezeken a sejteken utat nyithat a tumorterápiában való alkalmazásuk felé is. Továbbá a peptid típusú hordozókhoz való konjugálás segíthet a szelektivitás növelésében.

A kiválasztott szalicilanilid származékok PLGA nanorészecskébe való csomagolásával jelentős gátló hatást értünk el az intracelluláris baktérium ellen, a *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériummal fertőzött gazdasejt modellen (MonoMac6 monociták), melyet a szabad kismolekula esetében nem tapasztaltunk. Ezt az eredményt támasztja alá, az, hogy a szalicilanilidek nanorészecskébe csomagolásával kimagasló sejtbefutást tapasztaltunk a MonoMac6 sejteken, míg a szabad szalicilanilid önmagában csak kis mértékben volt képes bejutni a sejtekbe. A hatóanyag tartalmú PLGA nanorészecskék valószínűleg fagocitózis útján sikeresen bejutnak a monocitákba.

4.2. Tuftsin típusú hordozópeptidek tervezése, előállítása, kémiai és *in vitro* biológiai jellemzése

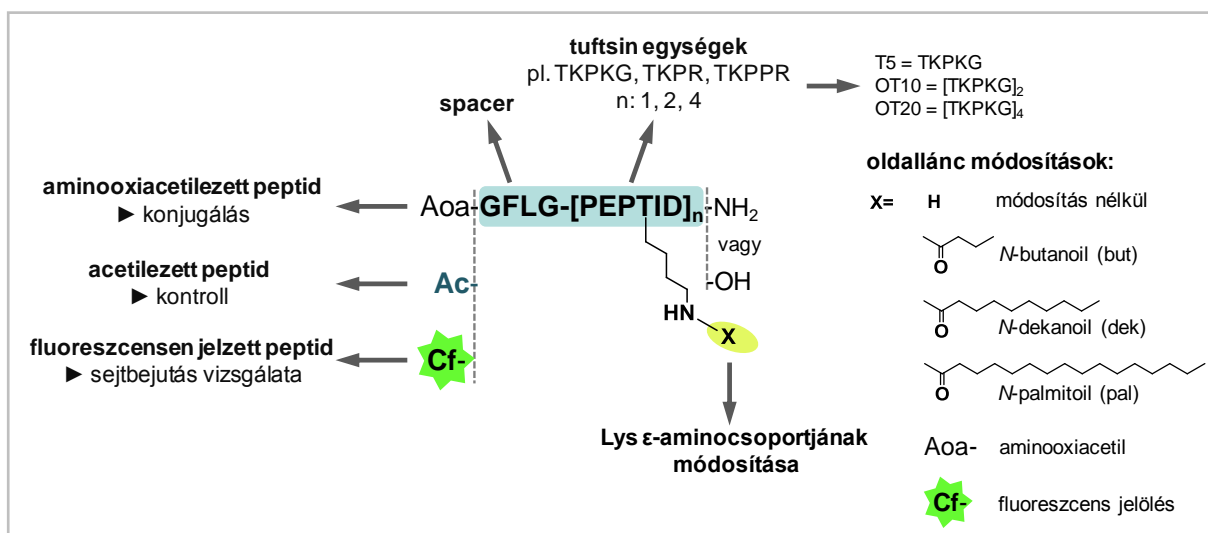
A *M. tuberculosis* és *M. abscessus* baktérium intracelluláris patogén, ezért nagy jelentősége van a hatóanyagok szelektív bejuttatásának a fertőzött gazdasejtekbe, melyek főként makrofágok, monociták. Az antituberkulotikumok sejtekbe történő bejutása főként diffúzió révén történik, korlátozott mértékben. Peptid típusú hordozók, illetve célbajuttató egységek alkalmazásával lehetőség nyílik a hatóanyagok célbajuttatására, szelektivitásuk növelésére. A konjugátumok szelektív sejtbejuttatása történhet receptor mediált endocitózis révén. Hordozóként és egyben irányító egységként a monociták, makrofágok felszínén nagy számban megtalálható tuftsin receptorra specifikus tuftsin- és oligotuftsin származékokat alkalmaztam. A tuftsinszármazékokat különböző zsírsavláncokkal módosítottam, melyek növelhetik a konjugátumok lipofilitását, sejtbejutását és lehetőséget adhatnak a konjugátumok nanorészecskékbe való hatékonyabb csomagolására is. A tetra tuftsin származékok esetén a módosításra azokat a lizin ϵ -aminocsoportokat választottam ki, melyek oldószer általi relatív elérhetősége a legnagyobb (^4Lys , ^{14}Lys) [131]. A ^2Lys oldalláncának elérhetősége is kiemelkedő, de ez esetben a módosítás túl közel lett volna az N-terminálishoz kapcsolt hatóanyaghoz, sztérikus gátlás léphetett volna fel. A hatóanyag – hordozómolekula közti kötésen kívül a távtartó egység (spacer) is befolyásolhatja a konjugátum biológiai tulajdonságait, így az enzimlabilis GFLG spaceret tartalmazó tuftsinszármazékokat is előállítottam. A biológiai aktivitás (pl. sejtbejutás, intracelluláris gátló hatás) szempontjából kerestem a leoptimálisabb tuftsinszármazékokat.

Ebben a fejezetben a konjugálásra alkalmas tuftsinszármazékok szintézise mellett bemutatom a fluoreszcensen jelzett tuftsinszármazékok és a hordozópeptidek kontrolljaként alkalmazott acetilezett tuftsinszármazékok szintézisét és biológiai aktivitásának vizsgálatát. Ahhoz, hogy a tuftsinszármazékok sejtbejutásáról információt nyerjünk fluoreszcensen jelölt peptideket is előállítottam és áramlási citometriával vizsgáltam a sejtbejutásukat modell sejteken. A későbbiekben bemutatott szalicilanilid-tuftsinszármazék konjugátumok nem fluoreszcens tulajdonságúak, így a konjugátumok sejtbejutása közvetlenül, áramlási citometriával nem vizsgálható, viszont a fluoreszcens hordozók sejtbejutása alapján következtetéseket vonhatunk le a konjugátumok sejtbejutásáról is. A hatóanyagok szelektivitásának eléréséhez fontos, hogy a hordozó önmagában ne legyen jelentős mértékben citosztatikus hatású a modell sejteken, ezért vizsgáltuk az acetilezett kontroll peptidek citosztatikus hatását.

4.2.1. A tuftsinszármazékok típusai

Különböző szekvenciájú (TKPKG, TKPR, TKPPR) és hosszúságú tuftsinszármazékokat állítottam elő, melyek C-terminálisa amid vagy karboxil formájú volt. A TKPKG szekvencia részletet tartalmazó peptidek jelölése: T5 = TKPKG, monotuftsin; OT10 = [TKPKG]₂ dituftsin; OT20 = [TKPKG]₄ tetra tuftsin származékok. A peptidek kódjában az amid formájú C-terminálist nem jelöltem külön, hogy a jelölések összhangban legyenek korábbi publikációkkal [6, 7, 100, 131]. A C-terminálison karboxilcsoportot tartalmazó peptideknél minden esetben '-OH'-val jelöltem a terminálist (pl. Ac-T5: amid formájú C-terminális, míg Ac-T5-OH: karboxil formájú C-terminális). Szintetizáltam enzimlabilis távtartó egységet (GFLG spacer) is tartalmazó tuftsinszármazékokat. Olyan származékokat is előállítottam, melyek különböző hosszúságú zsírsav oldalláncot tartalmaztak, ezek jelölése: vajsav = but (C4), dekánsav = dek

(C10), palmitinsav = pal (C16) oldalláncok. A hatóanyagokhoz történő konjugálás érdekében a tuftsinszármazékok az N-terminálison és/vagy a lizin ϵ -aminocsoportján aminooxiacetsavat (Aoa) tartalmaztak. Kontroll peptidként acetilezett (Ac) analógokat szintetizáltam. A sejtbejutás vizsgálata érdekében fluoreszcensen jelölt, 5(6)-karboxifluoreszceint (Cf) tartalmazó változatokat is előállítottam. A 38. ábrán látható a tuftsinszármazékok összefoglaló, sematikus ábrája [196]. Az acetilezett és fluoreszcensen jelölt peptidok sematikus rajza a Függelék F17., és F18. ábráján látható.



38. ábra: A tuftsinszármazékok sematikus ábrája (Aoa: aminooxiacetyl, Ac: acetyl, Cf: 5(6)-karboxifluoreszcein) [196]

4.2.2. Az oldallánc módosítást nem tartalmazó tuftsinszármazékok előállítása

A peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel, Fmoc/*t*Bu stratégiát alkalmazva állítottam elő, a standard kapcsolószereket (gyantakapacitásra számított 3 ekvivalens DIC és HOBt, a 3 ekvivalens aminosavszármazék mellett) és hasítóelegyet (2% piperidin, 2% DBU, 96% DMF, V/V) használtam. A C-terminálison karboxilcsoportot tartalmazó peptideket Wang gyantán, az amidcsoportot tartalmazókat pedig Rink-Amid MBHA gyantán állítottam elő. Az oldallánc módosítást nem tartalmazó peptideknél az N-terminálison felkapcsolt utolsó aminosav Fmoc-csoportjának hasítása után három részre osztottam a gyantát, hogy előállítsam a három analóg tuftsinszármazékot, a konjugálható peptidet, a kontroll peptidet, valamint a fluoreszcensen jelzett peptidet (39. ábra) [196]. Az így előállított peptidek a következők voltak: Aoa/Ac/Cf-OT20, Aoa/Ac/Cf-GFLG-OT20, Aoa/Ac/Cf-OT10, Aoa/Ac/Cf-T5, Aoa/Ac/Cf-GFLG-T5, Aoa/Ac/Cf-T5-OH, Aoa/Ac/Cf-GFLG-T5-OH, Aoa/Ac/Cf-TKPR-OH, Aoa/Ac/Cf-GFLG-TKPR-OH, Aoa/Ac/Cf-TKPPR-OH, Aoa/Ac/Cf-GFLG-TKPPR-OH.

A peptid-gyanta egyik részéhez a hatóanyag molekulához való konjugálás érdekében a peptid szabad N-terminális aminocsoportjára Boc-aminooxiacetsavat (Boc-Aoa-OH) kapcsoltam DIC, HOBt kapcsolószerek segítségével, NMP-ban oldva.

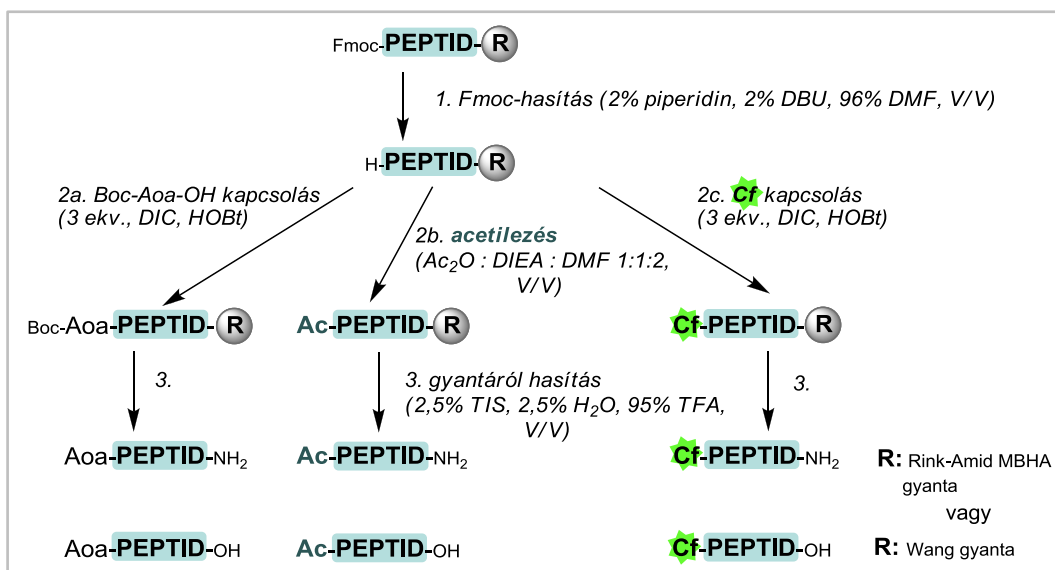
A peptid-gyanta másik részének N-terminális aminocsoportját acetileztem ecetsavanhidrid segítségével, DIEA bázis jelenlétében, DMF-ban oldva, így előállítva a kontrollként szolgáló peptideket.

A peptid-gyanta harmadik részéhez fluoreszcens jelölőmolekulát, az 5(6)-karboxifluoreszceint (Cf) kapcsoltam szintén DIC, HOBt kapcsolószerek segítségével, NMP-ban oldva. Az 5(6)-karboxifluoreszceinnel jelölt peptidek esetében melléktermék képződését tapasztaltam. A várt Cf-peptid mellett két vagy több 5(6)-karboxifluoreszcein molekulát tartalmazó peptid is keletkezett. Az 5(6)-

karboxifluoreszcein fenolos hidroxilcsoportja acileződhet egy másik, *in situ* aktivált (DIC, HOBt jelenléte) Cf molekula által észterkötést kialakítva. Ez az észterkötés bázissal hidrolizálható, 20% piperidin, 80% DMF, V/V eleggyel történő kezeléssel el lehet távolítani az észterkötéssel kapcsolódott felesleges Cf-t [202]. Ezért a Cf-nel jelölt peptideknél a Cf felkapcsolása után a gyantát 20% piperidin, 80% DMF, V/V eleggyel kezeltem. A piperidines kezelés során a gyanta sárga színből vörösre váltott, a szűrlet is vörös színű lett, jelezve a távozó Cf-t. A piperidines kezelés hatására a nyers peptid nem tartalmazott duplán felkapcsolódott Cf-t, csak a kívánt Cf-peptidet, és a kitermelés jelentősen nőtt [196].

A Függelék F19. ábráján látható a piperidinnel nem kezelt nyers Cf-T5 peptid és a piperidinnel kezelt Cf-T5 peptid analitikai kromatogramja és a csúcsokhoz tartozó tömegspektrumok. A piperidinnel nem kezelt peptidnél a kétszeresen jelölt peptid csúcsa is látható a kívánt egyszeresen jelölt mellett, míg a piperidinnel kezelt peptidnél csak a kívánt egyszeresen jelölt termék van jelen.

Mindhárom peptidszármazék (Aoa, Ac, Cf-peptidek) esetében a peptidet a gyantáról, valamint az oldallánc védőcsoportokat a peptidekről TFA-s hasítóelegy segítségével távolítottam el. A nyers aminosavacetilezett peptideket tisztítás nélkül használtam a hatóanyaggal való konjugálási reakciókban. A nyers acetilezett és fluoreszcensen jelölt peptideket RP-HPLC segítségével tisztítottam. A peptideket analitikai RP-HPLC, ESI-MS (10. táblázat) és aminosavanalízis segítségével jellemeztem. Ezek alapján elmondható, hogy a kívánt peptideket állítottam elő megfelelő tisztasággal.



39. ábra: A gyantaosztással készült oldallánc módosítást nem tartalmazó tuftsinszármazékok előállításának sematikus ábrája [196]

4.2.3. Az oldallánc módosítást tartalmazó tuftsinszármazékok előállítása

Az oldallánc módosítást tartalmazó peptideknél a szekvencia megfelelő pozíciójába olyan oldallánc védőcsoportot tartalmazó lizint építettem, mely szelektíven hasítható. Erre a célra az Fmoc-Lys(Mtt)-OH, valamint az Fmoc-Lys(Dde)-OH aminosavszármazékokat alkalmaztam. A többi, módosítani nem kívánt lizin esetében Fmoc-Lys(Boc)-OH származékot alkalmaztam, melynek Boc-védőcsoportjának eltávolítása a peptid gyantáról való hasításával egy időben megy végbe a TFA-s hasítóelegy segítségével. A kívánt szekvencia elérése után az N-terminális Fmoc-védőcsoportot lehasítottam, a gyantát három részre osztottam (40. ábra) [196]. A N-terminálisra Boc-Aoa-OH-t, acetilcsoportot vagy Cf-t kapcsoltam. A következő lépés mindhárom esetben a szelektíven hasítható oldallánc védőcsoportot tartalmazó lizinről a védőcsoport eltávolítása volt. Az Mtt-védőcsoport szelektíven hasítható 2% TFA, 2% TIS, 96% DCM, V/V elegyével. A 2%-os TFA-s elegyben a peptid-gyanta kötés kellően stabil, így az Mtt-csoport a peptid gyantáról történő hasadása nélkül megvalósítható. Az Mtt-csoport hasítása után a szabad ϵ -aminocsoport acilezése és a peptidszármazék gyantáról történő hasítása következett. A hasított peptidben többszörösen acilezett melléktermékek is azonosíthatók voltak. Feltételezhetően a Boc oldallánc védőcsoportot tartalmazó lizinekről az Mtt-védőcsoport hasítása során a Boc oldallánc védőcsoport egy része is lehasadt 2% TFA-s elegy hatására, (a Boc-csoport 33% TFA, 67% DCM, V/V elegyével hasítható). Így a vártnál több szabad lizin ϵ -aminocsoport keletkezett, melyek acileződtek a következő lépésben. Ennek elkerülése érdekében a továbbiakban az Fmoc-Lys(Dde)-OH használatát részesítettem előnyben. A Dde védőcsoport szelektíven hasítható 2% hidrazin-hidrát, 98% DMF, V/V elegyével. Ebben az esetben a gyantáról lehasított peptidben nem keletkezett többszörösen acilezett termék.

A még gyantán lévő peptiden, a lizin oldallánc védőcsoport szelektív hasításával szabaddá vált ϵ -aminocsoportokra különböző hosszúságú zsírsavakat kapcsoltam: vajsavat (vajsavanhidrid és DIEA segítségével, DMF-ban), dekánsavat (dekánsav, DIC, HOBt segítségével NMP-ban) és palmitinsavat (palmitinsav, DIC, HOBt segítségével NMP-ban). Az így előállított származékok a következők voltak: Aoa/Ac/Cf-OT20(4-but), Aoa/Ac/Cf-OT20(4-dek), Aoa/Ac/Cf-OT20(4-pal), Aoa/Ac/Cf-OT20(14-pal), Ac-OT10(9-but), Ac-OT10(9-dek), Ac-OT10(9-pal), Aoa/Ac/Cf-T5(4-dek), Aoa/Ac/Cf-T5(4-pal). (A konjugálásra alkalmas aminooxiacetilezett és fluoreszcensen jelzett, zsírsavval módosított OT10 származékok előállítása és jellemzése folyamatban van.)

Olyan peptideket is előállítottam, melyek két aminooxiacetil-csoportot tartalmaztak, ezek az Aoa-OT20(4-Aoa) és a TKPR-OT10(8-Aoa; 13-Aoa) peptidek. Az Aoa-OT20(4-Aoa) peptidnél az egyik aminooxiacetil-csoport a peptid N-terminálisán van, a másik a 4 Lys ϵ -aminocsoportján. A peptid szintézisének az N-terminálisra felkapcsolt utolsó aminosav Fmoc-védőcsoportjának lehasítása után eltávolítottam a Dde-védőcsoportot a 4-es pozícióban lévő lizinről. A peptid két szabad aminocsoportjára (N-terminális és 4 Lys ϵ -aminocsoport) egy lépésben kapcsoltam a Boc-Aoa-OH-t.

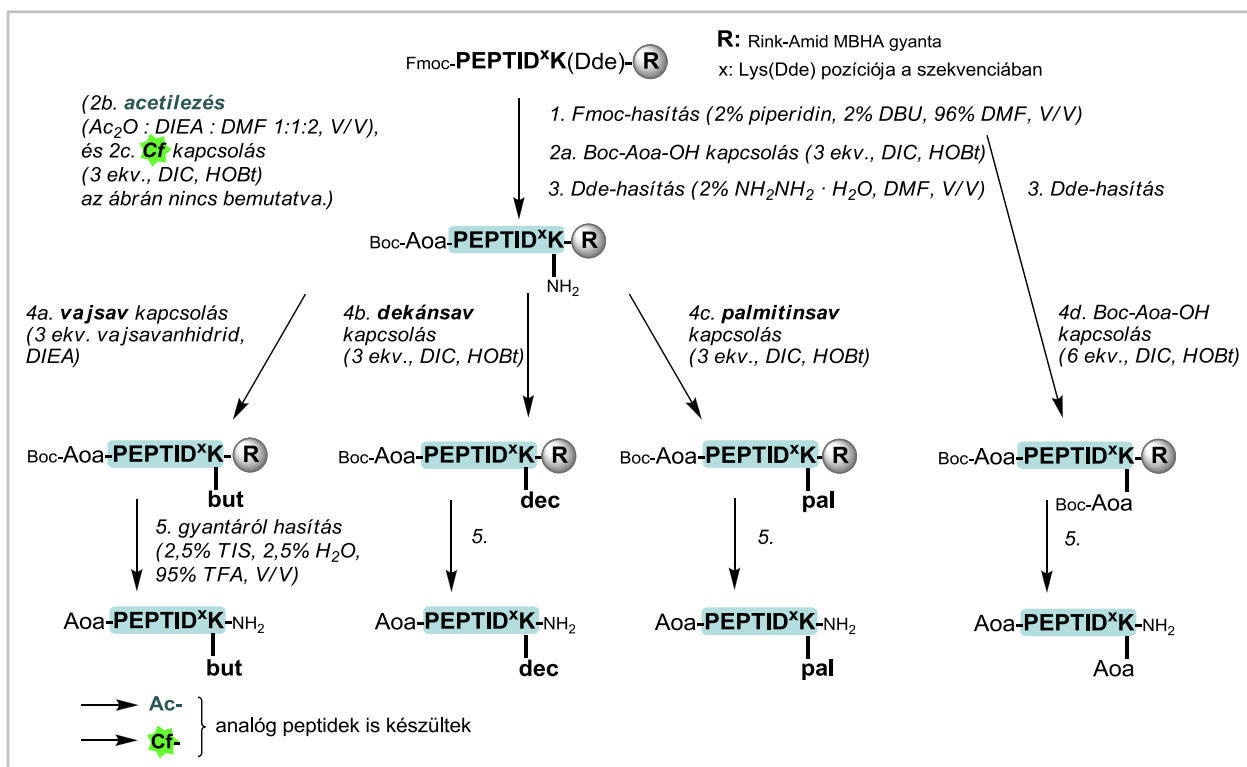
A TKPR-OT10(8-Aoa; 13-Aoa) peptidnél az aminooxiacetil-csoportokat a 8 Lys és 13 Lys ϵ -aminocsoportján alakítottam ki. Ezt a peptidszármazékot Boc/Bzl módszerrel állítottam elő, mely módszernél az alkalmazott aminosavszármazékok olcsóbbak, viszont a gyantáról való hasítás HF-készülékkel igényel. Ennél a módszernél az aminosavak kapcsolása szintén DIC és HOBt kapcsolószerek segítségével ment végbe. Az átmeneti N-terminális Boc-védőcsoportot 33% TFA, 67% DCM, V/V elegyével hasítottam, ezután semlegesítési lépés következett (10% DIEA, 90% DCM, V/V). A módosítani nem kívánt lizinek 2-CIZ állandó oldallánc védőcsoportot tartalmaztak ϵ -aminocsoportjukon (Boc-Lys(2-CIZ)-OH). A 8-as és 13-as lizinek, melyeket módosítani kívántam Fmoc-védőcsoportot tartalmaztak ϵ -

aminocsoportjukon (Boc-Lys(Fmoc)-OH). Az N-terminálisa felkapcsolt utolsó aminosav Boc-védőcsoportjának lehasítása előtt távolítottam el szelektíven az Fmoc-védőcsoportokat 2% piperidin, 2% DBU, 96% DMF, V/V elegyével, majd az így kapott két szabad ε-aminocsoporthoz kapcsoltam a Boc-Aoa-OH-t. Ezután hasítottam le a Boc-védőcsoportokat az N-terminális aminosavról és az aminoacetyl-csoportokról. Végül a peptidet a gyantáról HF és gyökfogók segítségével lehasítottam.

Hatóanyaghoz konjugálható és egyben fluoreszcensen jelzett peptidet is előállítottam Fmoc/tBu stratégiával. Az Aoa-OT20(4-Cf) esetében a fent leírtakhoz hasonlóan eltávolítottam az N-terminálison lévő aminosav Fmoc-védőcsoportját, az így szabaddá vált N-terminálisa Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam. Ezután eltávolítottam a szelektíven védett 4-es lizin Dde-védőcsoportját és a szabad ε-aminocsoporthoz Cf-t kapcsoltam.

Előállítottam olyan OT20-származékokat, melyeknél a 14-es lizin ε-aminocsoportjához 5(6)-karboxifluoreszceint kapcsoltam azért, hogy vizsgáljam a fluoreszcens jelölő pozíciójának hatását (Ac-OT20(14-Cf)), illetve két jelölő jelenlétének hatását (Cf-OT20(14-Cf)) a fluoreszcencia tulajdonságokra. Ezeket a származékokat szintén Fmoc/tBu stratégiával, Dde szelektív oldalláncvédelem alkalmazásával állítottam elő.

A gyantáról lehasított Aoa-peptideket tisztítás nélkül használtam a hatóanyaggal való konjugálási reakciókban. A nyers acetilezett és fluoreszcensen jelölt peptideket RP-HPLC segítségével tisztítottam. A peptideket analitikai RP-HPLC, ESI-MS (10. táblázat) és aminosavanalízis segítségével jellemeztem. Ezek alapján elmondható, hogy a kívánt peptideket állítottam elő megfelelő tisztasággal.



40. ábra: A gyantaosztással készült oldallánc módosítást tartalmazó tuftsinszármazékok előállításának sematikus ábrája [196]

4.2.4. Az aminosavszármazékok előállítása

A lizoszomális emésztés során (4.3.2.6. fejezet) a konjugátumokból keletkező legkisebb, hatóanyagot tartalmazó metabolitok biológiai aktivitását is vizsgálni kívántam. Ezért előállítottam az Aoa-Thr-OH és Aoa-Gly-OH és H-Lys(Aoa)-OH aminosavszármazékokat (10. táblázat), melyeket hatóanyaggal való konjugálásra használtam fel. A szintézis során nem volt célom a reakció optimalizálása, így a reakcióidő szempontjából a gyorsabb módszert választva, szilárdfázisú szintézissel állítottam őket elő a több hasítási és elválasztási lépést igénylő, de gazdaságosabb oldatban végzett szintézis helyett. Wang gyantára kapcsoltam a kívánt aminosavszármazékot (Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Gly-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH), majd eltávolítottam az Fmoc-védőcsoportot. Az Fmoc-védőcsoport a treonin és glicin esetében az N-terminálison volt, lizin esetében pedig az ϵ -aminocsoporton. Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam az aminosavak szabad aminocsoportjára és lehasítottam a gyantáról TFA és gyökfogók segítségével. Az így nyert nyers Aoa-aminosavakat tisztítás nélkül használtam a konjugálási lépésben, a nyers aminosavszármazékokat szennyező gyökfogók nem zavartak a konjugálásban.

4.2.5. A tuftsinszármazékok kémiai jellemzése

Az előállított nyers aminosavszármazékok, a tisztított acetilezett kontroll peptidok és a tisztított fluoreszcensen jelölt származékok analitikai jellemzésének eredményei (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) a 10. táblázatban találhatóak. Az aminosavanalízis eredménye minden esetben jó egyezést mutatott a vizsgált peptid elméleti aminosavösszetételével, ezek az eredmények nem szerepelnek a dolgozatban.

10. táblázat: Az aminoszármazékos tuftsinszármazékok, az acetilezett kontroll peptidek és a fluoreszcensen jelölt peptidek kémiai jellemzése

Ac-PEPTID			Aoa-PEPTID			Cf-PEPTID		
Aoa-tuftsinszármazék ^a	Rt / perc ^b	M _{av} szám / M _{av} mért ^c	Ac-tuftsinszármazék ^a	Rt / perc ^b	M _{av} szám / M _{av} mért ^c	Cf-tuftsinszármazék ^a	Rt / perc ^b	M _{av} szám / M _{av} mért ^c
Aoa-OT20	10,9	2136,5 / 2137,2	Ac-OT20	11,2	2105,5 / 2105,7	Cf-OT20	12,9	2421,8 / 2422,3
Aoa-GFLG-OT20	31,0	2511,0 / 2511,8	Ac-GFLG-OT20	12,7	2480,0 / 2480,3	Cf-GFLG-OT20	14,1	2796,2 / 2796,8
Aoa-OT20(4-but)	12,0	2206,6 / 2207,0	Ac-OT20(4-but)	11,5	2175,6 / 2176,1	Cf-OT20(4-but)	13,3	2491,9 / 2492,7
Aoa-OT20(4-dek)	14,0	2290,8 / 2291,1	Ac-OT20(4-dek)	14,2	2259,8 / 2160,2	Cf-OT20(4-dek)	15,1	2576,0 / 2576,5
Aoa-OT20(4-pal)	17,3	2375,0 / 2375,3	Ac-OT20(4-pal)	16,7	2343,9 / 2344,2	Cf-OT20(4-pal)	17,6	2660,2 / 2660,6
Aoa-OT20(14-pal)	16,2	2375,0 / 2375,3	Ac-OT20(14-pal)	16,2	2343,9 / 2344,3	Cf-OT20(14-pal)	16,6	2660,2 / 2660,8
Aoa-OT20(4-Aoa)	11,2	2209,6 / 2210,0	-	-	-	-	-	-
Aoa-OT20(4-Cf)	13,5	2494,8 / 2495,4	-	-	-	SAL8-Aoa-OT20(4-Cf)*	15,2	2811,0 / 2810,9
-	-	-	-	-	-	Ac-OT20(14-Cf)**	11,6	2463,9 / 2464,1
-	-	-	-	-	-	Cf-OT20(14-Cf)**	13,2	2780,1 / 2780,6
Aoa-OT10	11,4	1113,3 / 1112,9	Ac-OT10	10,8	1082,3 / 1082,5	Cf-OT10	13,7	1398,6 / 1398,9
-	-	-	Ac-OT10(9-but)	11,6	1152,4 / 1152,3	-	-	-
-	-	-	Ac-OT10(9-dek)	14,9	1236,6 / 1236,3	-	-	-
-	-	-	Ac-OT10(9-pal)	18,0	1320,7 / 1320,5	-	-	-
TKPR-OT10(8-Aoa; 13-Aoa)	11,7	1668,9 / 1669,1	TKPR-OT10	11,0	1522,8 / 1523,3	Cf-TKPR-OT10	13,2	1881,1 / 1881,7
Aoa-T5	10,5	601,7 / 601,9	Ac-T5	10,5	570,7 / 570,7	Cf-T5	13,5	887,0 / 887,0
Aoa-GFLG-T5	12,9	976,1 / 976,1	Ac-GFLG-T5	13,3	945,1 / 945,0	Cf-GFLG-T5	14,9	1261,4 / 1261,6
Aoa-T5(4-dek)	15,5	756,0 / 755,8	Ac-T5(4-dek)	16,0	724,9 / 724,8	Cf-T5(4-dek)	17,2	1041,2 / 1041,0
Aoa-T5(4-pal)	19,2	840,1 / 839,9	Ac-T5(4-pal)	20,8	809,1 / 808,9	Cf-T5(4-pal)	22,1	1125,4 / 1125,2
Aoa-T5-OH	10,6	602,7 / 602,5	Ac-T5-OH	10,7	571,7 / 571,5	Cf-T5-OH	13,3	887,9 / 887,8
Aoa-GFLG-T5-OH	12,9	977,1 / 976,8	Ac-GFLG-T5-OH	13,5	946,1 / 945,9	Cf-GFLG-T5-OH	15,1	1262,4 / 1262,3
Aoa-TKPR-OH	11,4	573,6 / 573,5	Ac-TKPR-OH	10,7	542,6 / 542,4	Cf-TKPR-OH	13,9	858,9 / 858,8
Aoa-GFLG-TKPR-OH	13,0	948,1 / 947,9	Ac-GFLG-TKPR-OH	13,5	917,1 / 916,9	Cf-GFLG-TKPR-OH	15,1	1233,3 / 1233,3
Aoa-TKPPR-OH	11,8	670,8 / 670,7	Ac-TKPPR-OH	11,3	639,7 / 639,4	Cf-TKPPR-OH	13,8	956,0 / 956,1
Aoa-GFLG-TKPPR-OH	13,1	1045,2 / 1044,9	Ac-GFLG-TKPPR-OH	13,7	1014,2 / 1014,4	Cf-GFLG-TKPPR-OH	15,1	1330,4 / 1330,4
Aoa-Thr-OH	na ^d	192,1 / 192,2	-	-	-	-	-	-
Aoa-Gly-OH	na	148,1 / 148,1	-	-	-	-	-	-
H-Lys(Aoa)-OH	na	219,2 / 219,2	-	-	-	-	-	-

^a Az amid C-terminálisú peptidek kódjában nem jelöltem az amid formát. A karboxil C-terminálisú peptideknél '-OH'-val jelöltem a karboxil formát. Aoa = aminoszármazékos, Ac = acetil, Cf = 5(6)-carboxyfluoreszcein

^b Retenciósi idő (Exformma HPLC; Agilent Zorbax SB-C18 oszlop (5 µm, 100 Å, 4,6 mm x 150 mm); gradiens: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B; eluensek: A: 0,1% TFA, víz (V/V), B: 0,1% TFA, acetonitril/víz 80:20 (V/V); folyássebesség: 1 mL/perc; detektálás: 220 nm)

^c számolt és mért átlagos (M>600) vagy monoizotópos (M<600) molekulatömeg (Bruker Esquire 3000+ ESI-MS)

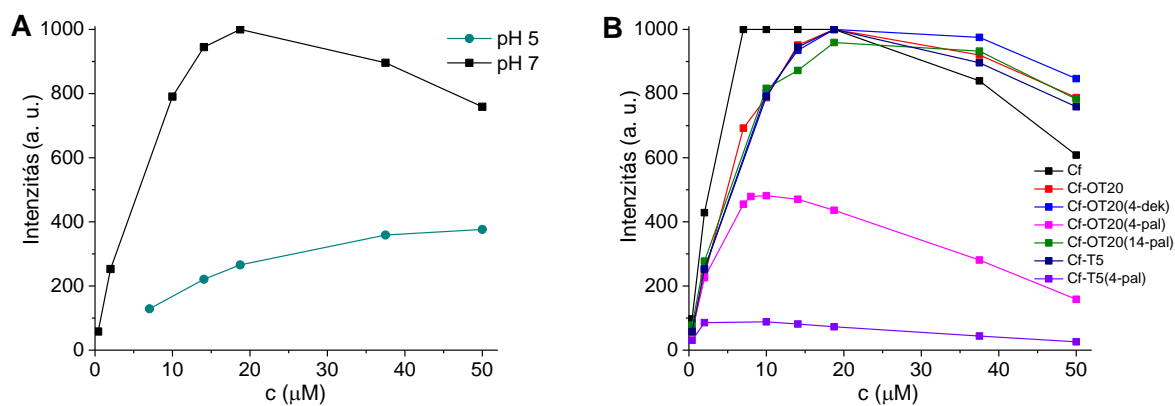
* Sal8-Aoa-OT20(4-Cf) fluoreszcensen jelölt konjugátum előállítását az 4.3.2. fejezetben találhatók

** Retenciósi idő, a fentebb leírtaktól eltérő gradienssel: 0-2 perc 0% B, 2-22 perc 0-90% B

4.2.5.1. A fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok fluoreszcencia intenzitásának vizsgálata a pH függvényében

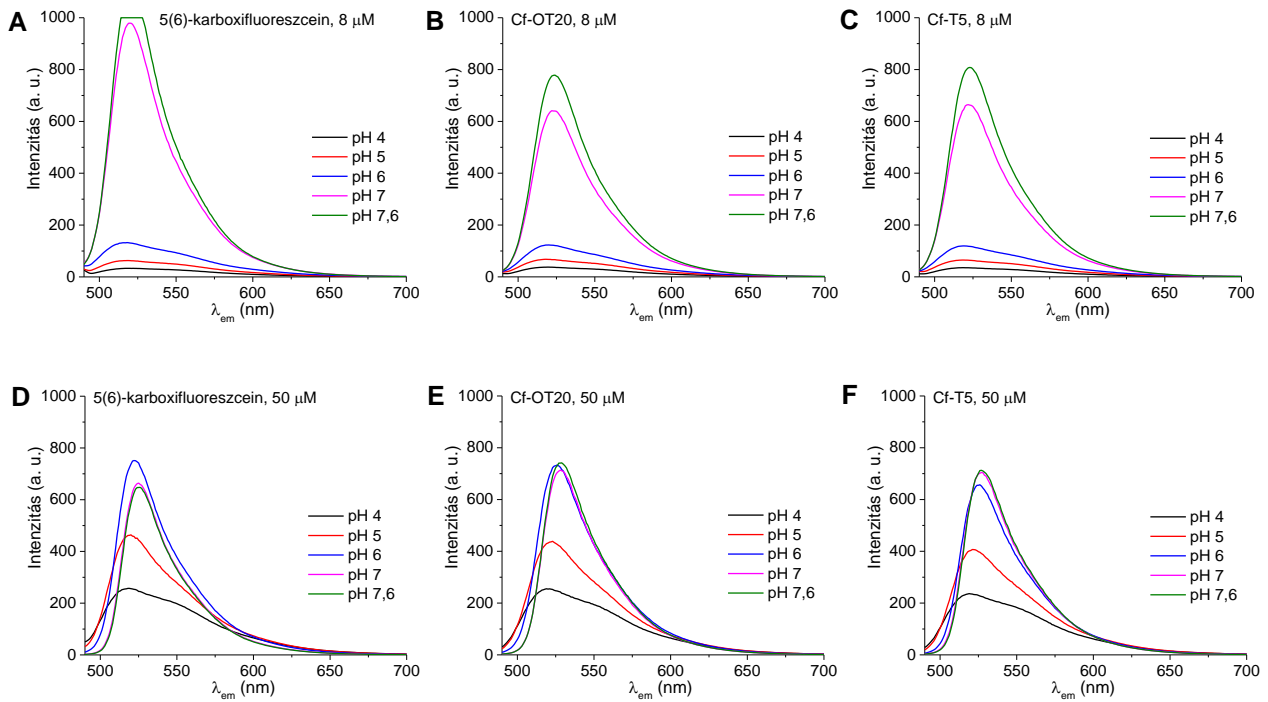
Fontos ismerni a fluoreszcensen jelölt peptideknél a fluoreszcencia tulajdonságokat, azért hogy a sejtbefutási eredményeket összehasonlíthassuk, és helyes következtetéseket vonjunk le azokból. Ezért a sejtbefutási vizsgálatokat megelőzően vizsgáltam a fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok fluoreszcencia intenzitásának pH-függését. Az 5(6)-karboxifluoreszceinnel jelölt tuftsinszármazékok sematikus szerkezete a Függelék F18. ábráján látható. Az *in vitro* kísérletekben a fluoreszcensen jelölt peptideket 7,5 pH-jú sejtenyészítő médiumban alkalmazzuk, viszont a sejtekben alacsonyabb pH értékű környezetbe is kerülhetnek (pl. lizoszómák, pH: 4,5-5,0 [106]). Ezért a következő pH értékeknél vizsgáltam a peptidek fluoreszcenciáját: pH 4, 5, 6, 7 és 7,6. A méréseket Varian Cary Eclipse spektrofluoriméter segítségével végeztem. Az anyagok fluoreszcencia intenzitását és a maximális emisszió hullámhosszát $\lambda_{ex} = 488$ nm gerjesztés mellett hasonlítottam össze, mivel az áramlási citometriával végzett vizsgálat során ezt a gerjesztő hullámhosszt alkalmazzuk. Az alkalmazott detektor feszültség 450 V volt.

Először megvizsgáltam néhány reprezentatív peptid fluoreszcenciájának koncentrációfüggését, hogy kiválaszthassam a legalkalmasabb koncentrációt. A kiválasztott peptidek közt voltak különböző számú tuftsinegységet tartalmazó, zsírsav nélküli, vagy zsírsavat tartalmazó, illetve a zsírsavat különböző pozíciókban tartalmazó peptidek. A Cf-T5 monotuftsinszármazéknál pH 5 és pH 7 értékeknél az emissziós maximumnál ($\lambda_{em\ max}$) mért intenzitás változását vizsgáltam (41.A. ábra). A vegyület fluoreszcencia intenzitása pH 5-nél a koncentráció növekedésével növekszik a vizsgált legmagasabb koncentrációig, viszont pH 7-nél 20 μ M-nál maximummal rendelkező görbét kaptam, ezután a koncentráció növekedésével csökken a fluoreszcencia intenzitása feltehetően a „self-quenching” (önabszorpció miatti fluoreszcencia csökkenés) miatt. A 41.B. ábrán a kiválasztott Cf-tuftsinszármazékok és a szabad 5(6)-karboxifluoreszcein pH 7-nél mért emissziós maximumánál ($\lambda_{em\ max} = 527$ nm) az intenzitás koncentrációfüggése látható. Az 5(6)-karboxifluoreszcein intenzitása az alkalmazott alacsony detektor feszültségnél is a méréshatáron kívül esik, így a legmagasabb koncentráció, melynél „self-quenching” még nem észlelhető 7 és 20 μ M között van. A Cf-OT20(4-pal) és a Cf-T5(4-pal) kivételével a „self-quenching” 20 μ M-os koncentráció felett tapasztalható. A Cf-OT20(4-pal) és a Cf-T5(4-pal) esetében a fluoreszcencia intenzitások jóval alacsonyabbak, mint a többi peptidnél, melyet valószínűleg a palmitinsav fluorofórhoz való közelsége okozhat, a palmitinsav valószínűleg csökkenti, kioltja („quenching”) az 5(6)-karboxifluoreszcein fluoreszcenciáját. Ezeknél a peptideknél a „self-quenching” már 10 μ M felett megjelenik. Az is megfigyelhető, hogy 2 μ M-nál nincs jelentős különbség a palmitinsavas Cf-OT20(4-pal) és a zsírsav nélküli Cf-OT20 peptid fluoreszcencia intenzitásában. Ezen eredmények alapján a 8 μ M-os koncentrációt választottam a fluoreszcencia intenzitás pH-függésének vizsgálatára, ennél a koncentrációnál nem tapasztalható „self-quenching”, és ez az egyik vizsgált koncentráció a sejtbefutásnál. A peptidek fluoreszcencia intenzitásának pH-függését egy magasabb, 50 μ M-os koncentrációnál is vizsgáltam, ahol a koncentráció – intenzitás görbe linearitása megszűnik, valószínűleg molekuláris kölcsönhatások, aggregálódás fellépése miatt.



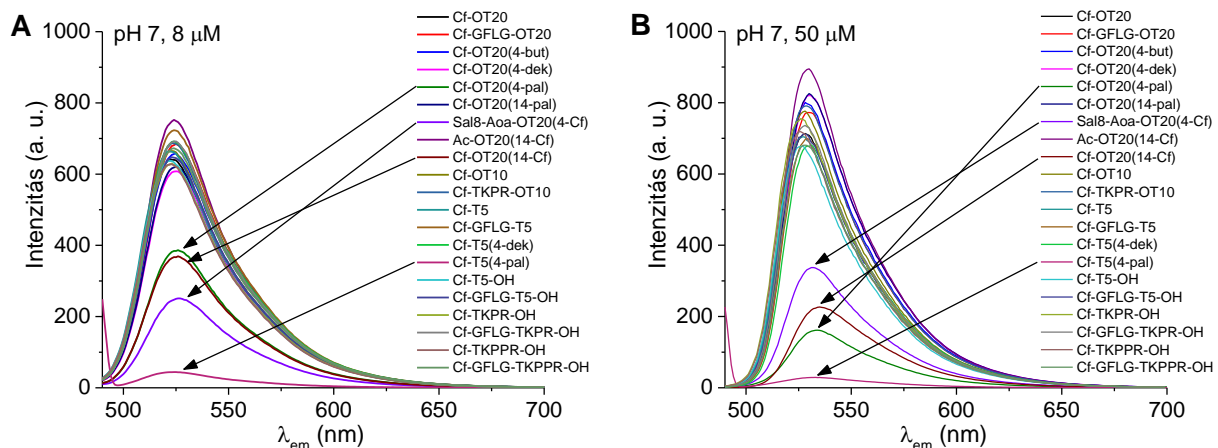
41. ábra: (A) A Cf-T5 fluoreszcencia intenzitás – koncentráció függése pH 5 és pH 7 értékeknél. (B) A kiválasztott reprezentatív peptidek fluoreszcencia intenzitás – koncentráció függésének összehasonlítása pH 7-nél ($\lambda_{\text{ex}}=488$ nm, $U_{\text{det}}=450$ V).

Az 5(6)-karboxifluoreszcein, és példaként a Cf-OT20 és a Cf-T5 fluoreszcencia intenzitásának pH-függése 8 és 50 μM koncentrációnál a 42. ábrán látható. Az 5(6)-karboxifluoreszcein fluoreszcencia intenzitása a peptidekhez való kapcsolás hatására csökkenést mutat 8 μM -nál (42.A-C. ábra). Az 50 μM -os koncentrációnál a szabad 5(6)-karboxifluoreszcein és a peptidhez kapcsolt 5(6)-karboxifluoreszcein fluoreszcencia intenzitása közel azonos (42.D-F. ábra). A 8 μM -os koncentrációnál a pH csökkenésével csökken az 5(6)-karboxifluoreszcein és a Cf-peptidek fluoreszcencia intenzitása és az emissziós maximum ($\lambda_{\text{em max}}$) értékében is enyhe eltolódás figyelhető meg a kisebb hullámhossz felé. A fluoreszcencia intenzitás jelentősen alacsonyabb pH 4 és 6 között, mint pH 7 és 7,6 esetén. Az 50 μM -os koncentrációnál pH 4 és pH 5 esetében jelentősen csökken a vegyületek fluoreszcencia intenzitása. A 8 μM -os koncentrációhoz hasonlóan $\lambda_{\text{em max}}$ értékében is csökkenés figyelhető meg a pH csökkenésével párhuzamosan. A pH 5 alatti kémhatásnál a molekulák többféle protonáltsági állapotban lehetnek jelen, a kapott görbe ezeknek az állapotoknak a fluoreszcencia intenzitásának a szuperpozíciója lehet. Az 50 μM -os koncentrációnál a magasabb pH értéknél, pH 6 és 7,6 között nem mutatkozik jelentős különbség a fluoreszcencia intenzitásában és az emissziós maximum hullámhosszában, ezeken a pH értékeken a legmagasabb a fluoreszcencia intenzitás és az emissziós hullámhossz maximuma.



42. ábra: (A) Az 5(6)-karboxifluoreszcein, (B) a Cf-OT20 és (C) a Cf-T5 fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok fluoreszcencia intenzitásának vizsgálata a pH függvényében 8 μ M koncentrációnál. (D) Az 5(6)-karboxifluoreszcein, (E) a Cf-OT20 és (F) a Cf-T5 fluoreszcencia intenzitásának vizsgálata a pH függvényében 50 μ M koncentrációnál, ($\lambda_{ex}=488$ nm, $U_{det}=450$ V).

Az összes Cf-tuftsinszármazék emissziós spektrumát a 43. ábrán mutatom be pH 7 értéknél 8 μ M és 50 μ M koncentrációnál. A legtöbb peptid egymáshoz hasonló emissziós profilt mutat a vizsgált koncentrációknál. A mérési eredményekből megállapítható, hogy a szekvencia, a tuftsinegységek száma, a GFLG spacer jelenléte, az 5(6)-karboxifluoreszcein helyzete a molekulában (N-terminálison, vagy Lys ϵ -aminocsoportján), valamint a vajsav és dekánsav oldallánc módosítások nem befolyásolják jelentősen a molekula fluoreszcencia tulajdonságait. Ezek alapján feltételezhető, hogy ezen peptidok esetében az intracelluláris fluoreszcencia intenzitások alapján a vegyületek sejtbejutása összehasonlítható. Ellenben a 4-es pozícióban palmitinsavat tartalmazó peptidok (Cf-OT20(4-pal), Cf-T5(4-pal)) esetében a fluoreszcencia intenzitásának jelentős csökkenése tapasztalható minden pH értéknél 8 és 50 μ M koncentrációnál is. Ilyen távolságban a palmitinsavnak fluoreszcencia tompító hatása lehet, viszont a Cf-OT20(14-pal) esetében, ahol a palmitinsav a fluorofórtól távolabb, a 14-es pozícióban helyezkedik el, nem figyelhető meg a fluoreszcencia intenzitásának csökkenése, fluoreszcencia profilja megegyezik a zsírsav nélküli Cf-OT20 peptidével. A szalicilanilid származékot tartalmazó peptid, a Sal8-Aoa-OT20(4-Cf) esetében arra voltam kíváncsi, hogy a hatóanyag jelenléte hogyan befolyásolja a Cf fluoreszcenciáját. Ennél a peptidszármazéknál szintén megfigyelhető csökkenés a fluoreszcencia intenzitásában mindkét koncentrációnál, a szalicilanilid molekulának is lehet tompító hatása ilyen távolságban (a szalicilanilidek önmagukban nem fluoreszcensek, a szabad Sal8 nem befolyásolta a Cf-OT20 fluoreszcens tulajdonságait a fizikai keverékben). A Cf-OT20(14-Cf) esetében is fluoreszcencia intenzitás csökkenés tapasztalható, valószínűleg a két fluorofór tompító hatással van egymásra. Ezen peptidok esetében a sejtbejutási vizsgálatok során mért intracelluláris fluoreszcencia intenzitás összehasonlításánál ezeket az eredményeket figyelembe kell venni.



43. ábra: A fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok pH 7-nél mért fluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása (A) 8 μM és (B) 50 μM koncentrációjánál ($\lambda_{\text{ex}}=488 \text{ nm}$, $U_{\text{det}}=450 \text{ V}$). A nyilak az átlagosnál alacsonyabb fluoreszcencia intenzitással rendelkező peptidszármazékokat jelzik.

4.2.6. A fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok *in vitro* sejtbejutása

Összehasonlítottuk a fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok *in vitro* sejtbejutását a gazdasejtet modellező MonoMac6 humán monocita sejtvonalon és az egér csontvelői eredetű makrofágokon (BMM Φ), melyek felszínén tuftsin receptorok találhatóak. Arra kerestük a választ, hogy a hatékony sejtbejutáshoz milyen tulajdonságok szükségesek, pl. a peptidhossz, zsírsav oldalláncok jelenléte szempontjából. A legnagyobb sejtbejutással rendelkező hordozópeptideket kerestük, melyek nem mutatnak citotoxicitást a vizsgált sejteken. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy a szalicilanilid származék jelenléte, a fluoreszcens jelölő pozíciója és száma a peptidben hogyan befolyásolja a sejtbejutást. Meghatároztuk a peptidszármazékok sejtbejutását HepG2 humán hepatokarcinóma sejteken is, azért, hogy vizsgáljuk a peptidek szelektivitását a monocita és makrofág típusú sejtek felé.

Az 5(6)-karboxifluoresceinnel jelölt tuftsinszármazékok sejtbejutását áramlási citométer (BD LSRII) és fluoreszcens mikroszkóp (Olympus CKX41) segítségével vizsgáltuk a MonoMac6, BMM Φ és HepG2 sejteken. A sejteket 3 óráig inkubáltuk a peptidekkel (c: 0,32-200 μM), mosás után a sejteket tripszinnel kezeltük, hogy a sejtek felszínéhez kötődött, nem internalizálódott peptideket eltávolítsuk. A tripszines kezelés után a sejteket áttettük áramlási citometriás csövekbe és megmértük az intracelluláris fluoreszcencia intenzitásukat, mely a sejtbejutással arányos.

MonoMac6 humán monocita sejteken a peptidek sejtbejutása koncentrációfüggő. A Függelék F20. ábráján látható néhány kiválasztott peptid koncentrációfüggő sejtbejutása. A 44.A. ábrán látható az élő, Cf pozitív sejtek fluoreszcencia intenzitás átlaga 200 μM -os kezelési koncentrációnál. Megállapítható, hogy a sejtbejutás függ a tuftsinegységek számától, minél több tuftsinegységet tartalmaz a peptid, annál nagyobb az internalizációjuk. A következő sejtbejutási sorrendet állíthatjuk fel: Cf-OT20>Cf-OT10>Cf-T5. Az egy tuftsinegységet tartalmazó peptidek (Cf-T5, Cf-T5-OH, Cf-TKPR-OH és Cf-TKPPR-OH) sejtbejutásának mértéke nagyon hasonló. A C-terminális formája nem befolyásolja a sejtbejutást (amid, vagy karboxil terminális, Cf-T5 és Cf-T5-OH). A GLFG spacer jelenléte kissé csökkentette az internalizációt.

Az 5(6)-karboxifluorescein helyzete is befolyásolja az intracelluláris fluoreszcencia intenzitását. Az Ac-OT20(14-Cf) esetében, ahol a Cf a 14-es lizin ϵ -aminocsoportján van, majdnem háromszor nagyobb intracelluláris fluoreszcencia intenzitást mértünk, mint a Cf-OT20 esetében, ahol a Cf a peptid N-

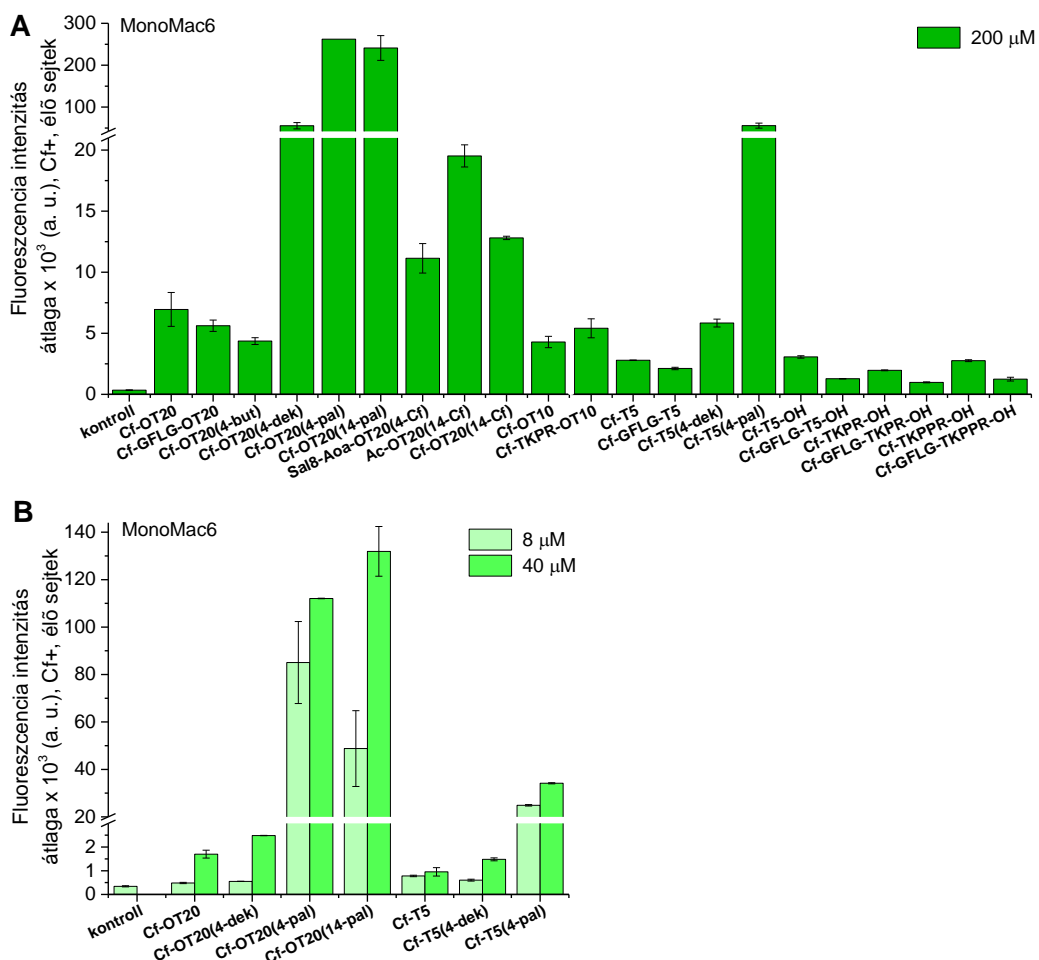
terminálisán található. A két jelölőt is tartalmazó peptid esetén (Cf-OT20(14-Cf)) majdnem kétszer nagyobb az intracelluláris fluoreszcencia intenzitás, mint a Cf-OT20 esetében.

A palmitinsavat tartalmazó OT20 származékokkal (Cf-OT20(4-pal) és Cf-OT20(14-pal)) kezelt sejteknél kimagaslóan nagy sejtbejutást tapasztaltunk. Ezekkel a palmitinsavas peptidekkel kezelt sejteknél az intracelluláris fluoreszcencia intenzitás a mérési körülmények között 36-szor nagyobb volt, mint a palmitinsav nélküli Cf-OT20 peptidnél 200 μM -os kezelési koncentráció esetén. Feltételezhetően a palmitinsav pozíciójának (^4Lys vagy ^{14}Lys) nincs hatása az intracelluláris fluoreszcencia intenzitásra. A rövidebb, palmitinsavat tartalmazó tuftsinszármazék, a Cf-T5(4-pal) esetében is kimagasló internalizációt kaptunk, de sejtbejutása négyszer kisebb, mint a palmitinsavat tartalmazó hosszabb peptideké (Cf-OT20(4-pal) és Cf-OT20(14-pal)). Sajnos ezek a palmitinsavval módosított peptidszármazékok 200 μM -os kezelési koncentrációnál erősen citotoxikus hatásúak a 3 órás kezelés után. A 11. táblázatban láthatók a 3 órás kezelés után számolt IC_{50} értékek, melyeket az áramlási citométer által meghatározott élő sejtek arányából kaptunk a sejtek mérete és granuláltsága alapján a különböző kezelési koncentrációknál. A palmitinsavat tartalmazó peptidek kivételével a többi Cf-tuftsinszármazék nem volt citotoxikus hatású.

A dekánsav oldallánc módosítást tartalmazó peptidek esetén a tetratuftsinszármazék Cf-OT20(4-dek) jelentős sejtbejutást mutatott, a kezelt sejtek intracelluláris fluoreszcencia intenzitása a mérési körülmények között 8-szor nagyobb volt a zsírsav nélküli Cf-OT20 peptidhez képest, és majdnem 10-szer nagyobb volt a dekánsavas monotuftsinszármazékhoz, a Cf-T5(4-dek)-hez képest. A Cf-T5(4-dek) sejtbejutása viszont kétszer nagyobb volt, mint a zsírsav nélküli monotuftsinszármazéké (Cf-T5). A palmitinsavval módosított Cf-OT20(4-pal) sejtbejutása majdnem 5-ször nagyobb volt, mint a dekánsavval módosított Cf-OT20(4-dek) peptidé. A dekánsav oldallánc módosítás alkalmazásának az az előnye, hogy a dekánsavval módosított tuftsinszármazékoknak nincs citotoxikus aktivitása a 3 órás kezelés alatt. A vajsav oldalláncnak (Cf-OT20(4-but)) nincs jelentős sejtbejutást befolyásoló hatása.

A szalicilanilid molekulát is tartalmazó, fluoreszcensen jelölt Sal8-Aoa-OT20(4-Cf) konjugátum esetében majdnem kétszer nagyobb internalizációt tapasztaltunk, mint a szalicilanilid molekula nélküli Cf-OT20 esetében. Az apoláros szalicilanilid jelenléte növeli a molekula lipofilitását, ami nagyobb sejtbejutást eredményezett.

Az 44.B. ábrán látható néhány kiválasztott peptid (zsírsavat tartalmazó, illetve zsírsav nélküli analógok) sejtbejutásának összehasonlítása 8 és 40 μM kezelési koncentrációnál. 8 μM -nál a palmitinsavat tartalmazó peptideknél sem tapasztalható citotoxikus hatás. Ennél a koncentrációnál a dekánsavat tartalmazó tuftsinszármazékokkal (Cf-OT20(4-dek) és Cf-T5(4-dek)) és a zsírsav nélküli származékokkal (Cf-OT20 és Cf-T5) kezelt sejtek intracelluláris fluoreszcencia intenzitása csak enyhén nagyobb, mint a kezeletlen kontroll sejteké. Viszont a palmitinsavat tartalmazó származékok (Cf-OT20(4-pal), Cf-OT20(14-pal) és Cf-T5(4-pal)) sejtbejutása ennél a koncentrációnál is kimagasló.



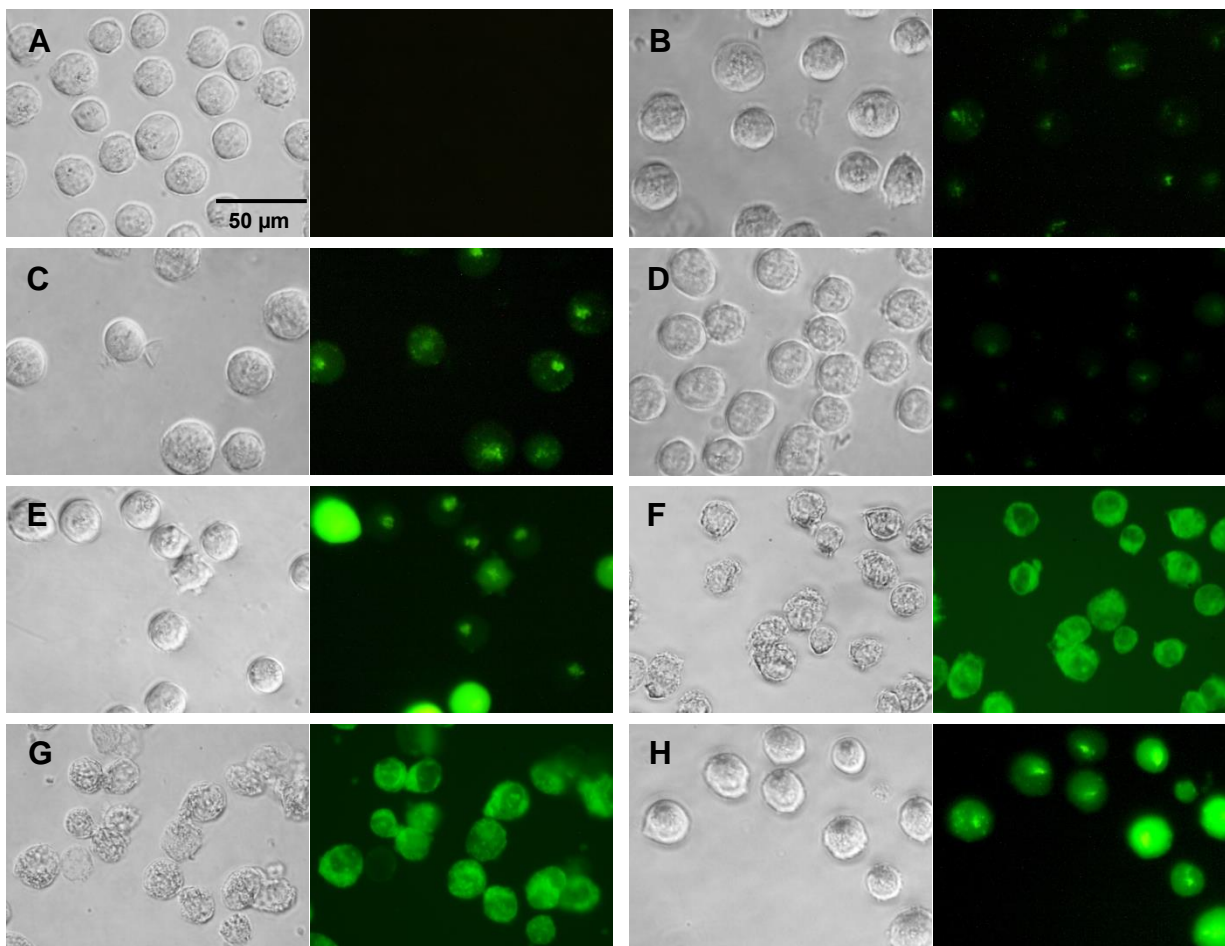
44. ábra: (A) A fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok sejtbejutásának összehasonlítása MonoMac6 sejtvonalon 200 μM kezelési koncentrációnál 3 órás kezelés után. (B) A kiválasztott fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok sejtbejutásának összehasonlítása MonoMac6 sejtvonalon 8 és 40 μM kezelési koncentrációnál 3 órás kezelés után.

11. táblázat: A fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok áramlási citométerrel meghatározott citotoxicitása MonoMac6 sejteken 3 órás kezelés után

Cf-PEPTID	
Cf-tuftsinszármazék^a	MonoMac6 citotoxicitás 3 óra IC₅₀ (μM)
a legtöbb Cf-tuftsin	>200
Cf-OT20(4-pal)	13,3
Cf-OT20(14-pal)	14,3
Cf-T5(4-pal)	109,2

^a Az amid C-terminálisú peptidek kódjában nem jelöltem az amid formát. A karboxil C-terminálisú peptideknél '-OH'-val jelöltem a karboxil formát.

A 45. ábrán látható a kiválasztott fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékokkal kezelt sejtek áteső fényben készült és fluoreszcens mikroszkópos képe. A sejtek morfológiája a legtöbb peptid esetében normális, a kontroll sejtekhez hasonló. A palmitinsavat tartalmazó peptidok esetében a sejtek morfológiája megváltozott 40 és 200 μM koncentrációjú oldattal való kezelés után, 8 μM -os kezelésnél viszont a sejtek morfológiája normális. A 45.F-H. ábrákon látható a Cf-OT20(4-pal) tuftsinszármazékkal kezelt MonoMac6 sejtek mikroszkópos képe különböző kezelési koncentrációknál.



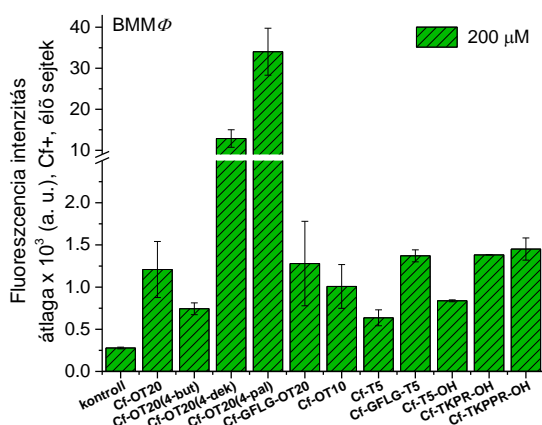
45. ábra: A kiválasztott fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok sejtbejutásának összehasonlítása MonoMac6 sejteken (3 óra kezelés) fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Áteső fényben készült és fluoreszcens mikroszkópos képek láthatók. (A) Kezeletlen, kontroll sejtek, sejtek (B) Cf-OT20, 200 μM , (C) Sal8-Aoa-OT20(4-Cf), 200 μM , (D) Cf-T5, 200 μM , (E) Cf-OT20(4-dek), 200 μM , (F) Cf-OT20(4-pal), 200 μM , (G) Cf-OT20(4-pal), 40 μM , (H) Cf-OT20(4-pal), 8 μM kezelési koncentrációnál.

Az élő sejtek átlagos intracelluláris fluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása azoknál a peptideknél megfelelő, melyek fluoreszcencia intenzitása hasonló pH-függést mutatott. A Cf-OT20(4-pal), Cf-T5(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(4-Cf) és Cf-OT20(14-Cf) esetében a peptidek fluoreszcencia intenzitása feltételezhetően a „self-quenching” miatt alacsonyabb volt, mint az átlagé. Ezeknél a peptideknél viszont nagyobb intracelluláris fluoreszcenciát mértünk, mint az analóg peptideknél. Ez az eredmény arra utal, hogy a peptidek a sejtbe kerülve degradálódhatnak, így a fluoroforra ható tompító, kioltó hatások megszűnnek. Ez alapján nem tudjuk, hogy a Cf-OT20 és a Cf-OT20(14-Cf) peptidek közül a Cf-OT20(14-Cf) valóban nagyobb mértékben jutott-e be, mint, ahogy azt a nagyobb intracelluláris fluoreszcencia

intenzitásból következtetjük. Lehetséges, hogy a két peptid közel azonos mértékben jutott be, viszont a Cf-OT20(14-Cf) esetén kétszer annyi fluoreszcens molekula van jelen, melyre a degradáció miatt már nem érvényesül a két fluorofór közelségéből adódott tompító hatás („quenching”), így nagyobb intracelluláris fluoreszcenciát kapunk. A Cf-OT20(4-pal) és a Cf-OT20(14-pal) esetében a citromsav- Na_2HPO_4 pufferekben a vizsgált pH értékeknél a Cf-OT20(14-pal) fluoreszcencia intenzitása jóval nagyobb, mint a Cf-OT20(4-pal) származéké, ahol a palmitinsav közelebb helyezkedik el a fluorofórhoz. Viszont az áramlási citometriával végzett mérések alapján azt állapíthatjuk meg, hogy nincs jelentős különbség a két származék mért intracelluláris fluoreszcencia intenzitásában. A palmitinsav helyzete a szekvenciában valószínűleg nem befolyásolta a sejtbejutás mértékét a Cf-OT20(4-pal) és a Cf-OT20(14-pal) esetében, a sejtben mindkét peptid degradálódik, így nem érvényesül a palmitinsav tompító hatása és hasonló intracelluláris fluoreszcenciát eredményeznek.

Néhány kiválasztott fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazék sejtbejutását vizsgáltuk egér csontvelői makrofág (BMM Φ) primer sejteken, melyek felszínén szintén találhatóak tuftsin receptorok [203]. A reprezentatív peptideket az alapján választottuk ki, hogy össze tudjuk hasonlítani a peptid hosszának, szekvenciájának, a spacer és különböző hosszúságú zsírsav oldalláncok jelenlétének hatását, az amid, vagy karboxil formájú C-terminális hatását a sejtbejutásra. A sejteket szintén 3 órán át kezeltük a vegyületekkel (0,32-200 μM kezelési koncentráció).

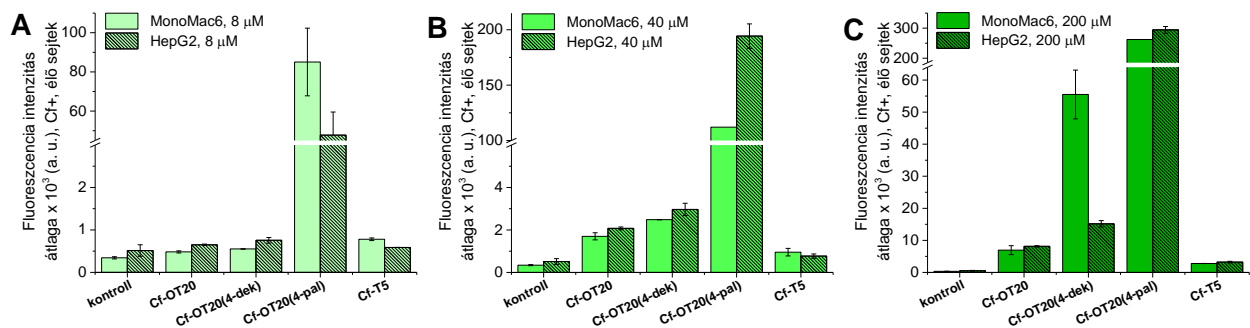
A kiválasztott vegyületek sejtbejutását 200 μM kezelési koncentrációnál a 46. ábrán mutatom be. A fluoreszcensen jelölt peptidek hasonló sejtbejutási profilt mutattak, mint a MonoMac6 sejtek esetében, néhány különbséggel. A több tuftsinegységet tartalmazó származékok sejtbejutása ebben az esetben is nagyobb, mint a kevesebb tuftsinegységet tartalmazóké. Viszont nincs jelentős különbség a Cf-OT20 és a spacer tartalmazó Cf-GFLG-OT20 sejtbejutása között. A rövid Cf-TKPR-OH és Cf-TKPPR-OH peptidek internalizációja nagyobb, mint a Cf-T5 peptidé, sejtbejutásuk hasonló a Cf-OT20 peptid sejtbejutásához. A Cf-OT20(4-pal) palmitinsavat tartalmazó és Cf-OT20(4-dek) dekánsavat tartalmazó tetra tuftsin származékok sejtbejutása a MonoMac6 sejtek esetében mérthez hasonlóan ezeknél a sejteknél is kimagasló.



46. ábra: A kiválasztott fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok sejtbejutásának összehasonlítása egér csontvelői makrofág (BMM Φ) sejteken 200 μM kezelési koncentrációnál 3 órás kezelés után

Vizsgáltuk a kiválasztott fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok (Cf-OT20, CfOT20(4-dek), Cf-OT20(4-pal), Cf-T5) sejtbejutását HepG2 humán hepatokarcinóma sejtvonalon is, hogy következtetéseket vonhassunk le a peptidek sejtbejutásának szelektivásáról. A peptideket az alapján választottuk ki, hogy össze lehessen hasonlítani a peptidek hosszának, a dekánsav és palmitinsav oldallánc módosítás jelenlétének hatását az internalizációra. A sejtek intracelluláris fluoreszcencia intenzitását szintén 3 órás kezelést követően (0,32-200 μM kezelési koncentráció) vizsgáltuk áramlási citométer segítségével. A 47. ábrán látható a HepG2 sejteken és a MonoMac6 sejteken mért intracelluláris fluoreszcencia intenzitás értékek összehasonlítása. A HepG2 sejtek esetén is az tapasztalható, hogy a tetra tuftsin származék (Cf-OT20) hatékonyabban jutott be, mint a monotuftsin származék (Cf-T5), valamint a palmitoil oldallánc jelenléte (Cf-OT20(4-pal)) ez esetben is jelentősen növelte a sejtbejutás mértékét minden koncentrációnál. A dekanoil oldallánc jelenléte is növelte a sejtbejutás mértékét, viszont a Cf-OT20(4-dek) peptid 200 μM kezelési koncentrációjánál a HepG2 sejtek esetén az intracelluláris fluoreszcencia kisebb mértékben növekedet a zsírsav nélküli Cf-OT20 peptid esetében mérthez képest, mint, ahogy a MonoMac6 sejtek esetén tapasztaltuk.

Mivel a két sejtípus esetén kapott sejtbejutási eredmények nem térnek el jelentősen egymástól, azt állapíthatjuk meg, hogy a tuftsinszármazékok nem kellően szelektívek a MonoMac6 humán monocita sejtekre. A tuftsinszármazékok magas kezelési koncentráció esetén (40 μM felett) HepG2 sejtekbe történő bejutásának egyik magyarázata lehet az, hogy a tuftsinszármazékok kötődhetnek a tumoros HepG2 sejtek felszínén túlexpresszáldó neuropilin-VEGF receptor komplexhez [204, 205], valamint membránon való átjutás révén is internalizálódhatnak [102]. Ennek igazolásához további vizsgálatok szükségesek.



47. ábra: A kiválasztott fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok sejtbejutásának összehasonlítása MonoMac6 humán monocita és HepG2 humán hepatokarcinóma sejtvonalon 3 órás kezelés után, (A) 8 μM , (B) 40 μM és (C) 200 μM kezelési koncentrációnál

4.2.7. Az acetilezett hordozópeptidek *in vitro* citosztatikus hatása

A konjugátumok kialakításakor a megfelelő peptid típusú hordozó kiválasztásakor fontos szempont, hogy az alkalmazni kívánt hordozó önmagában ne legyen jelentős mértékben citosztatikus hatású a modell sejteken. Az acetilezett tuftsinszármazékokat a különböző mérésekben hordozó kontrollként alkalmazzuk. Ezért célszerű volt meghatározni a peptidek citosztatikus hatását a gazdasejt modellként alkalmazott MonoMac6 humán monocita sejtvonalon és a hepatotoxicitás modellezésére alkalmazott HepG2 humán hepatokarcinóma sejtvonalon.

Vizsgáltuk az acetilezett tuftsinszármazékok *in vitro* citosztatikus hatását 24 órás kezelés, majd mosás utáni 72 órás továbbtenyésztést követően MTT-teszt alkalmazásával. A kapott eredményeket a 12. táblázatban foglaltam össze. Az acetilezett kontroll tuftsinszármazékok többségének nem volt citosztatikus hatása egyik sejtvonalon sem a vizsgált legmagasabb koncentrációnál (200 μM), így ezek a származékok alkalmazhatóak hordozópeptidként. Viszont a palmitinsav oldalláncot tartalmazó kontroll peptidnek mind citosztatikusnak bizonyultak. MonoMac6 sejteken az Ac-OT20(4-pal) rendelkezett a legalacsonyabb IC_{50} értékkel (26,6 μM). Az ezzel izomer vegyületnek, az Ac-OT20(14-pal) peptidnek, ahol a palmitinsav a 14-es pozícióban lévő lizinen van, több mint kétszer nagyobb IC_{50} értéke volt (62,8 μM). HepG2 sejtek esetében ez fordítva volt, az Ac-OT20(14-pal) nagyobb citosztatikus hatást (35,2 μM) mutatott, mint az Ac-OT20(4-pal) (77,0 μM). A palmitoil oldalláncot tartalmazó dituftsinszármazék Ac-OT10(9-pal) az Ac-OT20(4-pal) származékhoz hasonló hatást mutatott mindkét sejttípuson. A rövidebb szekvenciájú peptid, az Ac-T5(4-pal) hatása pedig az Ac-OT20(14-pal) hatásához volt hasonló mindkét sejttípuson. Vizsgáltam a dekánsav és a palmitinsav citosztatikus hatását is MonoMac6 sejteken. A dekánsav nem mutatott citosztatikus hatást a vizsgált legmagasabb koncentrációnál (200 μM). A palmitinsav kis mértékben citosztatikus hatású volt, IC_{50} értéke 178,1 μM , mely kb. 7-szer nagyobb, mint az Ac-OT20(4-pal) IC_{50} értéke. A palmitinsav és a zsírsav nélküli kontroll peptid, az Ac-OT20 fizikai keverékének esetében is a palmitinsavra jellemző IC_{50} értéket mértem. A palmitinsav kovalens kapcsolása a peptidhez a citosztatikus hatás növekedését eredményezte a szabad palmitinsavéhoz képest. A palmitinsav oldalláncot tartalmazó tuftsinszármazékok konjugátumokban való alkalmazásánál figyelembe kell venni ezt az eredményt.

12. táblázat: Az acetilezett kontroll tuftsinszármazékok *in vitro* citosztatikus hatása MonoMac6 humán monocita és HepG2 humán hepatokarcinóma sejteken (24 órás kezelés)

Ac-PEPTID		
Ac-tuftsinszármazék ^a	citosztázis 24 óra ^b	
	MonoMac6 IC_{50} (μM)	HepG2 IC_{50} (μM)
a legtöbb acetilezett kontroll tuftsins	>200	>200
Ac-OT20(4-pal)	26,6 \pm 2,2	77,0 \pm 7,1
Ac-OT20(14-pal)	62,8 \pm 4,5	35,2 \pm 5,2
Ac-OT10(9-pal)	37,0 \pm 1,4	71,6 \pm 12,2
Ac-T5(4-pal)	64,0 \pm 0,6	43,5 \pm 7,9
dekánsav	>200	nd ^c
palmitinsav	178,1 \pm 11,2	nd
palmitinsav + Ac-OT20 (1:1 n/n) fizikai keverék	175,8 \pm 14,0	nd

^a Az amid C-terminálisú peptid kódjában nem jelöltem az amid terminálist. A karboxil C-terminálisú peptidnél '-OH'-val jelöltem a karboxil terminálist, Ac = acetyl

^b Citosztatikus hatás meghatározása 24 órás kezelést, majd 72 órás továbbtenyésztést követően MTT-tesztel

^c nd: nem határoztuk meg

4.2.8. Membrán integritás vizsgálata propídiium-jodidos festéssel MonoMac6 sejteken

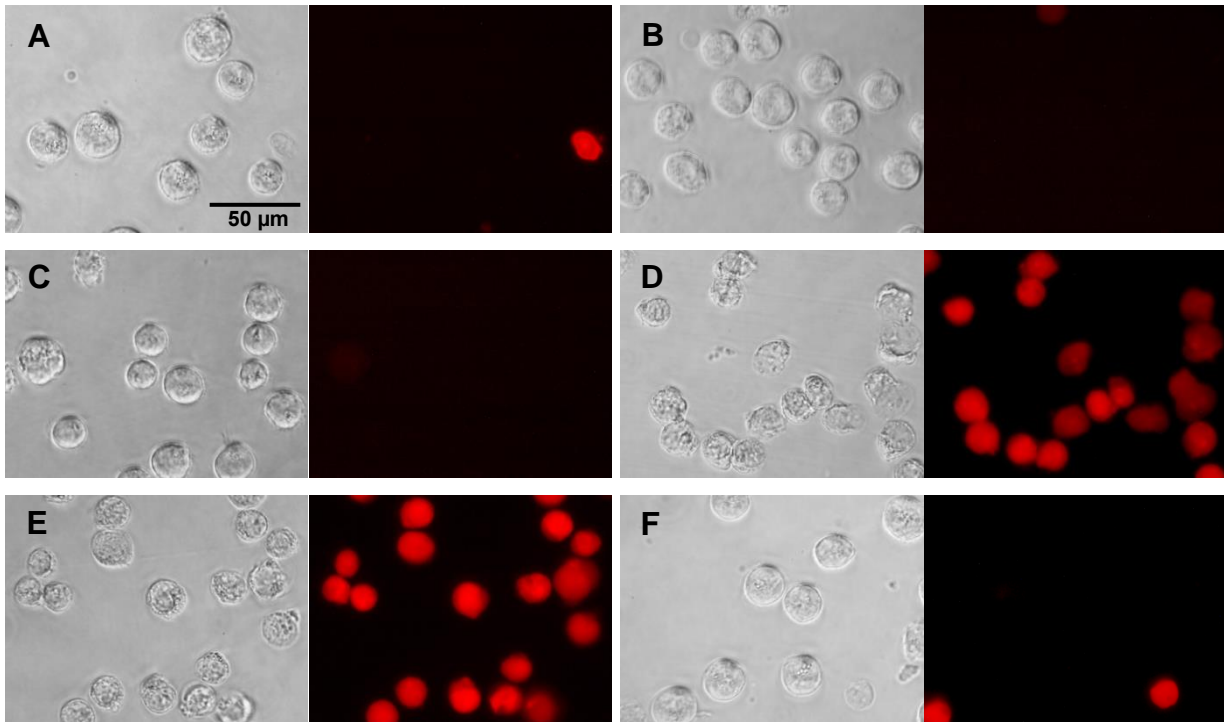
A palmitoil oldalláncot tartalmazó tuftsinszármazékok citosztatikusként bizonyultak a MonoMac6 sejteken alacsonyabb IC₅₀ értékeknél, mint a palmitinsav IC₅₀ értéke önmagában. Azt feltételezzük, hogy, a kationos peptidet, mint a tuftsinszármazékok és az apoláros zsírsav oldalláncot tartalmazó molekulák károsíthatják a sejtek membránját, és ennek a hatásnak tulajdonítható a peptidek citotoxikus és citosztatikus aktivitása. A sejtek membrán integritásának vizsgálatára alkalmas a fluoreszcens tulajdonságú propídiium-jodid (PI). A PI csak a sérült membránú sejtekbe jut be, a sejtmagot pirosra festve jelzi a membrán integritásának elvesztését, mely sejtek halottnak, vagy megváltozott életképességűeknek tekinthetők [206]. PI festéssel hasonlítottuk össze az acetilezett zsírsav nélküli, a dekánsavat és a palmitinsavat tartalmazó kontroll tetra tuftsin származékok hatását MonoMac6 sejtekre. Azt is vizsgáltuk, hogy jelent-e különbséget a palmitinsav oldallánc különböző pozíciója (4-es, vagy 14-es lizinen) a peptidek hatásában.

A MonoMac6 sejteket 3 óráig kezeltük a peptidekkel 8, 40 és 200 µM kezelési koncentrációknál. A kezelési idő lejártá után a sejteket mostuk, tripszinnel kezeltük, áramlási citometriás csövekbe vittük át, majd PI-oldatot (10 µL, 50 µg/mL) adtunk hozzájuk. Majd vizsgáltuk a sejtek intracelluláris fluoreszcencia intenzitását áramlási citométer és fluoreszcens mikroszkóp segítségével.

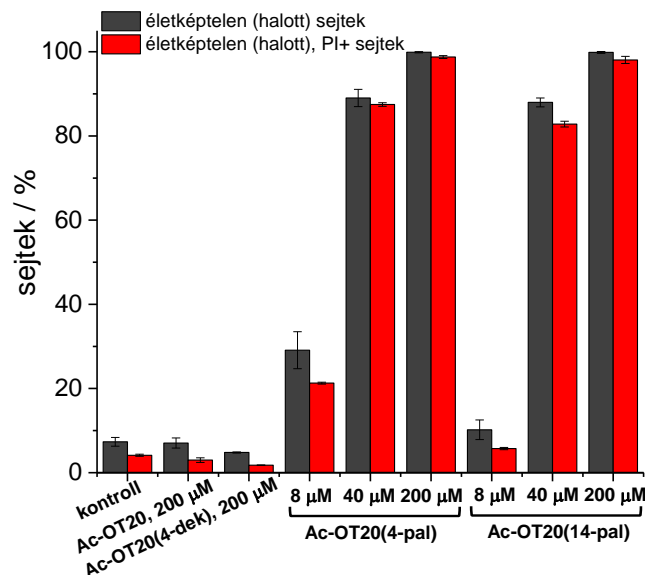
A 48. ábrán látható a 200 µM-os koncentrációjú peptidekkel kezelt, majd PI-dal festett sejtek mikroszkópos képe. A zsírsav nélküli Ac-OT20 peptidnek és a dekánsavat tartalmazó Ac-OT20(4-dek) peptidnek nincs káros hatása a sejtek membrán integritására a vizsgált legmagasabb koncentrációnál sem. A PI jelenléte a sejtekben csak a palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó peptidekkel, az Ac-OT20(4-pal) és az Ac-OT20(14-pal) peptiddel történő kezelés hatására figyelhető meg. Ezeknek a sejteknek megváltozott a morfológiája és az életképessége is. A palmitinsavas peptideknek ugyanilyen hatása van 40 µM-os koncentrációnál is (a képek nem szerepelnek a dolgozatban), viszont 8 µM-os kezelési koncentrációnál a sérült sejtek aránya jóval alacsonyabb.

Az életképtelen sejtek százalékos aránya és az életképtelen, PI-t tartalmazó (PI+) sejtek százalékos aránya az összes sejthez viszonyítva látható a 49. ábrán. Ezek az eredmények összhangban vannak a mikroszkópos képek eredményeivel. A kezeletlen kontroll sejtek 7%-a halott, a halott sejtek 60%-a PI pozitív, ezeknek a sejteknek sérült a membránja, ez az arány az összes sejthez viszonyítva mindössze 4%. Az Ac-OT10 és az Ac-OT10(4-dek) esetében 200 µM-os kezelési koncentrációnál, a halott sejtek aránya 7, illetve 5% az összes sejthez képest, vagyis nincs jelentős eltérés a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva. Ezen peptideknél a halott, PI-t tartalmazó sejtek aránya a kontroll sejtekhez képest kicsivel alacsonyabb, a halott sejtek 40%-a PI pozitív, ami az összes sejthez viszonyítva 2-3%-ot jelent. A palmitinsavat tartalmazó peptideknél a halott sejtek aránya az összes sejthez képest a koncentrációval növekszik, 8 µM-nál csak 10-30%, 40 és 200 µM-nál 87% feletti. A palmitinsavas peptidekkel kezelt sejteknél 40 és 200 µM kezelési koncentrációnál szinte az összes halott sejt membránja sérült. Ezeknél a koncentrációknál a halott sejtek 95-99%-a PI pozitív, ez az érték az összes sejtre viszonyítva 82% feletti. Az Ac-OT20(4-pal) és az Ac-OT20(14-pal) hatása között csak a 8 µM-os koncentrációnál látható enyhe különbség. Az Ac-OT20(4-pal) esetében, ahol a palmitoil oldallánc a 4-es pozícióban van a halott sejtek aránya közel 3-szor nagyobb 8 µM-nál, mint az Ac-OT20(14-pal) esetében, ahol a palmitoil oldallánc a 14-es pozícióban van, vagyis az Ac-OT20(4-pal) peptid membránkárosító hatása nagyobb. A citosztázis

meghatározásánál is azt az eredményt kaptuk, hogy az Ac-OT20(4-pal) peptid a MonoMac6 sejteken citosztatikusabb hatású, mint az Ac-OT20(14-pal) peptid.



48. ábra: Acetilezett tuftsinszármazékokkal kezelt MonoMac6 sejtek membrán integritás vizsgálata propídium-jodid festéssel, 3 órás kezelés után, 200 μM kezelési koncentrációnál, fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Áteső fényben készült és fluoreszcens mikroszkópos képek láthatók. (A) Kezeletlen kontroll sejtek, sejtek (B) Ac-OT20, 200 μM , (C) Ac-OT20(4-dek), 200 μM , (D) Ac-OT20(4-pal), 200 μM , (E) Ac-OT20(14-pal), 200 μM , (F) Ac-OT20(4-pal), 8 μM kezelési koncentrációnál.



49. ábra: Zsírsvav nélküli és zsírsvav oldallánc módosítást tartalmazó acetilezett tuftsinszármazékok MonoMac6 sejtek membrán integritására gyakorolt hatásának összehasonlítása áramlási citométerrel 3 órás kezelést és PI festést követően

4.2.9. A tuftsín típusú hordozópeptidekkel kapcsolatos eredmények összefoglalása és értékelése

Különböző tuftsinszármazékokat állítottam elő és kémiaiailag jellemeztem, melyek eltértek a tuftsinegységek számának és típusának tekintetében. Továbbá tartalmazhattak GFLG enzimlabilis távolságtartó egységet vagy különböző hosszúságú zsírsav oldallánc módosítást. A peptidek C-terminális amid vagy karboxil terminálisú volt. A peptideket hordozóként, illetve célbajuttató egységként kívánjuk alkalmazni, ezért tartalmaztak konjugálásra alkalmas funkciócsoportot, az aminosavacetilcsoportot. Kontroll peptideket is előállítottam, melyek N-terminálisát acetileztem, illetve 5(6)-karboxifluoreszceinnel jelölt analógok is készültek a sejtbejutás vizsgálatára.

A fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok nagy részében az 5(6)-karboxifluoreszcein fluoreszcencia intenzitása hasonló mind koncentrációfüggés, mind pH-függés szempontjából. Néhány peptidszármazék esetében a palmitinsav (Cf-OT20(4-pal), Cf-T5(4-pal)), a szalicilanilid származék (Sal8-Aoa-OT20(4-Cf)) és egyszerre két fluoreszcens molekula jelenléte (Cf-OT20(14-Cf)) tompító hatásának bizonyult a fluoreszcencia intenzitására. A peptidek sejtbejutása során kapott intracelluláris fluoreszcencia intenzitások alapján arra következtetünk, hogy ezek tompító hatások a sejten belül valószínűleg megszűnnek a peptidek degradációja miatt.

A fluoreszcens tuftsinszármazékok sejtbejutásának összehasonlítása során azt az eredményt kaptuk MonoMac6 gazdasejt modellen, hogy a hosszabb tuftsinszármazékok sejtbejutási mértéke nagyobb, mint a rövidebbeké. A palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó peptidek sejtbejutása volt a legnagyobb, viszont magasabb koncentrációknál ezek a peptidek citotoxikus hatásúak voltak. A dekánsav oldallánc módosítást tartalmazó peptidek internalizációja szintén kiemelkedő volt és ezek a peptidek nem bizonyultak citotoxikusnak. A szintén gazdasejt modell egér csontvelői makrofág sejteken is hasonló sejtbejutási profilt mutattak a peptidek, azzal a különbséggel, hogy a Cf-TKPR-OH és Cf-TKPPR-OH monotuftsín származékok sejtbejutása a Cf-OT20 tetra tuftsín származékéhoz hasonló mértékű volt. A tuftsinszármazékok feltételezhetően tuftsín receptorokon keresztül receptor mediált endocitózissal, valamint a tuftsín fagocitózist stimuláló hatása révén fagocitózissal juthatnak a monocitákba, makrofágokba. Emellett kis mértékben bejuthatnak passzív transzport által, mely nem szelektív sejtbejutási mód. A dekánsav és palmitinsav oldalláncok jelenléte a molekulát lipofilebbé teszi így valószínűleg nő a diffúzió általi bejutás mértéke.

A vizsgált fluoreszcens tuftsinszármazékok a májsejt modellnek tekinthető HepG2 humán hepatóma sejtekbe is jelentős mértékben bejutottak, így azt állapíthatjuk meg, hogy a tuftsinszármazékok nem kellően szelektívek a monocita és makrofág típusú sejtekre az alkalmazott modell sejtek közül. Viszont a HepG2 egy tumoros sejtvonal, melyek nagy számú neuropilin-VEGF receptor komplexet tartalmazhatnak, melyhez a tuftsinszármazékok kötődhetnek.

Az acetilezett tuftsinszármazékok nem mutattak citosztatikus hatást MonoMac6 gazdasejt modell és HepG2 májsejt modell sejteken a palmitinsav oldalláncot tartalmazó származékokon kívül. A palmitinsav oldalláncot tartalmazó kontroll peptidek IC_{50} értéke (26,6-77,0 μ M) jóval alacsonyabb, mint a palmitinsav IC_{50} értéke (178,1 μ M) MonoMac6 sejteken. Ez az eredmény összhangban van a fluoreszcensen jelölt, palmitinsavat tartalmazó peptidszármazékok esetén tapasztalt citotoxicitással. A membrán integritás vizsgálatok is alátámasztják a palmitinsav oldallánc citotoxicitást okozó hatását, ezen vizsgálatok alapján elmondható, hogy a palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó peptidek károsítják a sejtmembránt. A

hidrofób palmitinsavat és hidrofil, kationos peptidet tartalmazó molekula amfipatikus karakterűvé válik, és így képes a sejtmembrán károsítására.

A sejtbejutás és a citotoxikus, illetve citosztatikus hatás alapján az a következtetés vonható le, hogy a dekánsav oldallánc módosítást tartalmazó peptidek, mint a Aoa-OT20(4-dek) és Aoa-T5(4-pal) a legígéretesebbek hordozójelöltnek.

4.3. Szalicilanilid származékok peptidkonjugátumainak előállítása, kémiai és *in vitro* biológiai jellemzése

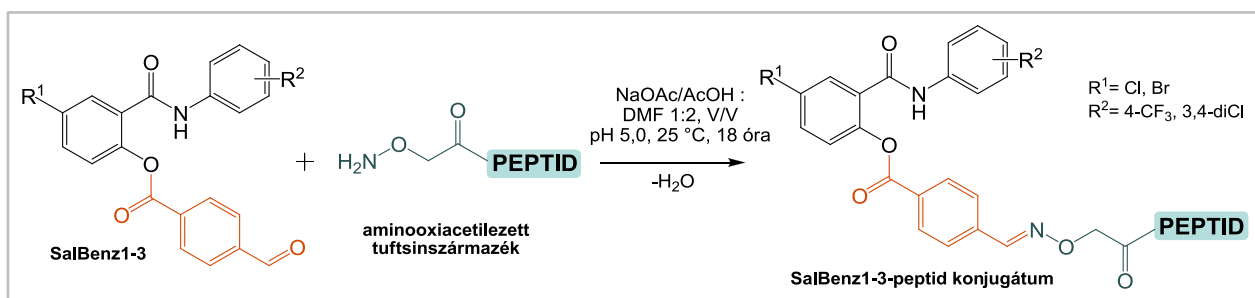
A szalicilanilid származékok citotoxikus, citosztikus hatásának csökkentése, sejtbejutásának és intracelluláris gátló hatásának növelése érdekében ígéretes lehet a vegyületek peptid típusú hordozómolekulákhoz való konjugálása. Fontos, hogy a konjugátumok kialakítása során a hatóanyagok megőrizzék *in vitro* antimikobakteriális hatásukat.

A szalicilanilid származékokat oximkötésen keresztül konjugáltam tuftsin típusú peptidekhez. A konjugálhatóság érdekében a kiindulási szalicilanilid származékokat módosítottuk, karbonilcsoportot építettünk a molekulákba. A szalicilanilid-4-formilbenzoátok (SalBenz1-3) esetében a szalicilanilideket a formilcsoportot tartalmazó 4-formilbenzoesavval észterestítettük. Olyan szalicilanilid származékokat is előállítottunk (Sal7-9), ahol a szalicilanilid molekula anilin- vagy szalicilsav-gyűrűjén a halogén szubsztituentet karbonilcsoportot tartalmazó csoportra (acetil- vagy formilcsoport) cseréltük.

4.3.1. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak előállítása, kémiai és *in vitro* biológiai jellemzése

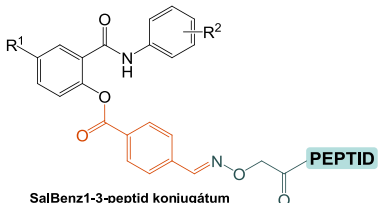
A szalicilanilid-4-formilbenzoátok részleges hidrolízist mutattak az alkalmazott *in vitro* körülmények között, ezért először csak az észterszármazékok OT20 konjugátumait kívántam előállítani és vizsgálni.

A szalicilanilid-4-formilbenzoátok 4-formilbenzoesavval alkotott észtereit (SalBenz1-3) az aldehidcsoportjukon keresztül konjugáltam aminoszármazékokhoz (Aoa-OT20) oximkötésen keresztül, NaOAc/AcOH puffer és DMF elegyében (pH 5,0) (50. ábra). A reakciót szobahőmérsékleten, 18 órán át kevertettem, analitikai RP-HPLC-vel követtem a reakció előrehaladását. A konjugátumokat félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, majd analitikai RP-HPLC-vel és tömegspektrométerrel analizáltam. Az előállított konjugátumok sematikus szerkezete a Függlék F21. ábráján látható.



A 13. táblázatban foglaltam össze az előállított SalBenz-peptid konjugátumok analitikai jellemzésének eredményét. Minden tisztított konjugátum az analitikai RP-HPLC alapján megfelelően tisztának bizonyult, egy csúccsal rendelkezett, a tömegspektrometriai méréseknél a várt és a mért tömegek megegyeztek.

13. táblázat: Az SalBenz-peptid konjugátumok kémiai jellemzése

 SalBenz1-3-peptid konjugátum				
konjugátum ^a	R ¹	R ²	Rt / perc ^b	M _{av} szám / M _{av} mért ^c
SalBenz1-Aoa-OT20	Cl	4-CF ₃	15,0	2566,3 / 2566,8
SalBenz2-Aoa-OT20	Cl	3,4-diCl	15,1	2567,2 / 2567,5
SalBenz3-Aoa-OT20	Br	4-CF ₃	16,8	2610,8 / 2611,3

^a A konjugátumok C-terminálisa amid formájú

^b Retenciósi idő (Exformma HPLC; Agilent Zorbax SB-C18 oszlop (5 µm, 100 Å, 4,6 mm x 150 mm); gradiens: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B; eluensek: A: 0,1% TFA, víz (V/V), B: 0,1% TFA, acetonitril/víz 80:20 (V/V); folyássebesség: 1 mL/perc; detektálás: 220 nm)

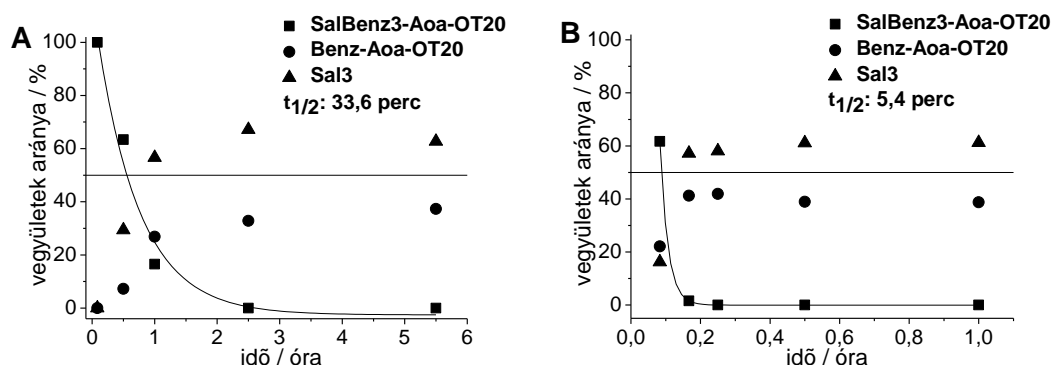
^c számolt és mért átlagos molekulatömeg (Bruker Esquire 3000+ ESI-MS)

4.3.1.1. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak stabilitásvizsgálata

Az 4.1.6.1. fejezetben bemutattam a Sal3 és származékainak példáján a vegyületek stabilitásának vizsgálatát az *in vitro* kísérletek körülményei közt. Az észterkötést és oximkötés is tartalmazó szalicilanilid-4-formilbenzoát konjugátumoknál is fontos a konjugátumok stabilitását ismerni ezen körülmények között. Vizsgáltam a Sal3 észterszármazékának, a SalBenz3-Aoa-OT20 konjugátum stabilitását DMSO-ban 4 °C-on, 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban és 10% DMSO-t tartalmazó szérumbmentes RPMI-1640 médiumban analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével. Az oldatok vegyület koncentrációja 0,5 mg/mL volt.

A SalBenz3-Aoa-OT20 konjugátum DMSO-ban stabil legalább 7 napig (Függelék F22. ábra), viszont már 2,5 óra után elbomlott 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban (Függelék F23. ábra). A konjugátumban az észterkötés hidrolízise tapasztalható, Sal3 szalicilanilid szabadul fel és Benz-Aoa-OT20 keletkezik (Függelék F25. ábra). Az oximkötés stabil marad. A kiindulási konjugátum mennyiségének csökkenéséből határoztam meg a konjugátum felezési idejét, mely 33,6 perc lett (51.A. ábra). A konjugátum 10% DMSO-t tartalmazó szérumbmentes RPMI-1640 médiumban sem stabil, szintén az észterkötés hidrolízise tapasztalható (Függelék F24. ábra). A konjugátum bomlása gyorsabb, mint Sula médiumban, 15 perc után nem detektálható a konjugátum, felezési ideje 5,4 perc (51.B. ábra). A vizsgált médiumokban a SalBenz3 molekuláris részben az észterkötés hidrolízise jelentősen felgyorsul a konjugátumban, míg a szabad SalBenz3-ban jóval lassabb a hidrolízis (4.1.6.1. fejezet).

Ez alapján azt a következtetést lehet levonni, hogy a SalBenz-konjugátumok valószínűleg nem stabilak az alkalmazott körülmények között, az *in vitro* vizsgálatok eredményeinek értelmezésekor ezt a gyors hidrolízist figyelembe kell venni.



51. ábra: A SalBenz3-Aoa-OT20 konjugátum stabilitása (A) 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban és (B) 10% DMSO-t tartalmazó szérumban RPMI-1640 médiumban, a felezési idők meghatározása

4.3.1.2. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak MIC értékének meghatározása

A SalBenz-konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatását vizsgáltuk *M. abscessus* és *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktérium törzseken az extracelluláris baktérium modellezésére alkalmazott kísérletben. A kapott MIC értékeket a 14. táblázatban tüntettem fel.

A konjugátumok hatásosnak bizonyultak a gyorsan növekvő *M. abscessus* baktériumtörzssel szemben, a SalBenz1-Aoa-OT20 15,6 µM koncentrációjánál, a SalBenz2-Aoa-OT20 és SalBenz3-Aoa-OT20 7,8 ill. 7,7 µM koncentrációjánál hatott. Ezek az értékek kicsit magasabbak, mint a Sal1 és Sal2 szalicilanilidek (3,2 µM), és a SalBenz1 és SalBenz2 szalicilanilid észterek (5,6 µM) esetében kapott értékek. Ha a konjugátumok hatóanyagtartalomra számolt MIC értékeit vesszük figyelembe, akkor a konjugátumok és a szabad hatóanyagok közti különbség még kisebb. Érdekes módon a SalBenz3-Aoa-OT20 konjugátum viszont alacsonyabb koncentrációjánál hatott, mint a kiindulási Sal3 (13,9 µM) és a SalBenz3 (10,2 µM).

M. tuberculosis H₃₇Rv törzs esetén a konjugátumok mind alacsonyabb koncentrációjánál hatottak, mint a szabad hatóanyagok. A konjugátumok MIC értéke nagyon alacsony, 0,8 és 1,9 µM között gátolták a baktériumot, a szabad hatóanyagok 1,4 és 11,2 µM között hatottak.

Ezek az eredmények valószínűleg a konjugátumból az észterkötés gyors hidrolízisével felszabaduló szalicilanilideknek tulajdoníthatók, mivel a konjugátumok nem stabilak a kísérleti körülmények közt, Sula médiumban (felezési idő: 33,6 perc).

14. táblázat: A szalicilanilid-4-formilbenzoát észter konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatása *M. abscessus* és *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzseken

SalBenz1-3-peptid konjugátum

vegyület, konjugátum ^{a, b}	R ¹	R ²	<i>M. abscessus</i>				<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv			
			MIC ^c Y (µg/mL)	MIC _{HT} ^d (µg/mL)	MIC (µM)	CFU ^e	MIC ^c Y (µg/mL)	MIC _{HT} ^d (µg/mL)	MIC (µM)	CFU ^e
Sal1	Cl	4-CF ₃	1	1	3,2	0	0,5	0,5	1,6	0
Sal2	Cl	3,4-diCl	1	1	3,2	0	0,5	0,5	1,6	2
Sal3	Br	4-CF ₃	5	5	13,9	0	0,5	0,5	1,4	2
SalBenz1	Cl	4-CF ₃	2,5	2,5	5,6	0	1	1	2,2	0
SalBenz2	Cl	3,4-diCl	2,5	2,5	5,6	0	5	5	11,2	0
SalBenz3	Br	4-CF ₃	5	5	10,2	0	5	5	10,2	0
SalBenz1-Aoa-OT20	Cl	4-CF ₃	40	4,9	15,6	0	2	0,2	0,8	1
SalBenz2-Aoa-OT20	Cl	3,4-diCl	20	2,5	7,8	0	5	0,6	1,9	0
SalBenz3-Aoa-OT20	Br	4-CF ₃	20	2,8	7,7	0	5	0,7	1,9	0

^a A Sal1-3 és SalBenz1-3 antimikobakteriális hatását a 4. táblázatban mutattam be, itt a konjugátumokkal való összehasonlítás miatt szerepelnek újra.

^b A peptidok C-terminálisa amid formájú

^c MIC (minimális gátló koncentráció) meghatározása Sula félszintetikus médiumban (pH 6,5) *M. abscessus* esetén 1 hét, *M. tuberculosis* H₃₇Rv esetén 4 hét inkubálás után

^d MIC_{HT}: a konjugátumok esetén a hatóanyagtartalomra számolt MIC értékek, MIC_{HT} (µg/mL) = (MIC (µM) × M_{av}Sal (g/mol) × n) / 1000, ahol M_{av}Sal: szalicilanilid moláris tömege; n: szalicilanilid molekulák száma a konjugátumban

^e CFU (telepszám) meghatározása Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon *M. abscessus* esetén 1 hét, *M. tuberculosis* H₃₇Rv esetén 4 hét további inkubálás után

4.3.1.3. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatása

Vizsgáltuk a szalicilanilid-4-formilbenzoátok konjugátumainak *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatását a gazdasejt modell MonoMac6 humán monocita sejteken (15. táblázat). A konjugátumok citotoxicitás szempontjából a kismolekuláknál alacsonyabb IC₅₀ értékekkel rendelkeztek (1,9-4,4 µM). A konjugátumok citosztatikus hatása egy nagyságrendbe esik a szabad szalicilanilidekével (2,9-8,6 µM). Tehát a konjugátumok a kismolekulákhoz hasonlóan jelentős citotoxikus és citosztatikus hatással és alacsony szelektivitási indexszel rendelkeznek.

A konjugátumok a kísérletben alkalmazott szérumentes RPMI-1640 médiumban nem stabilak (felezési idő: 5,4 perc), az alacsony IC₅₀ értékek az észterkötés hidrolízisével felszabaduló szalicilanilid molekuláknak tulajdoníthatók.

15. táblázat: A szalicilanilid-4-formilbenzoát észter konjugátumok *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatása MonoMac6 humán monocita sejteken (24 órás kezelés) és szelektivitási indexük a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyítva

SalBenz1-3-peptid konjugátum

vegyület, konjugátum ^{a, b}	R ¹	R ²	citotoxicitás 24 óra ^c		citosztázis 24 óra ^d	
			MonoMac6 IC ₅₀ (μM)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^e	MonoMac6 IC ₅₀ (μM)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^e
Sal1	Cl	4-CF ₃	5,3±0,8	3,3	2,2±1,2	1,4
Sal2	Cl	3,4-diCl	3,6±1,4	2,3	3,8±0,5	2,4
Sal3	Br	4-CF ₃	7,6±2,2	5,4	2,0±0,4	1,4
SalBenz1	Cl	4-CF ₃	11,4±3,0	5,2	3,0±2,9	1,4
SalBenz2	Cl	3,4-diCl	1,5±0,5	0,1	1,6±0,4	0,1
SalBenz3	Br	4-CF ₃	30,1±9,0	3,0	2,7±1,5	0,3
SalBenz1-Aoa-OT20	Cl	4-CF ₃	1,9±0,4	2,4	2,9±0,6	3,6
SalBenz2-Aoa-OT20	Cl	3,4-diCl	2,3±0,7	1,2	3,0±0,3	1,6
SalBenz3-Aoa-OT20	Br	4-CF ₃	4,4±0,9	2,3	8,6±1,3	4,5

^a A Sal1-3 és SalBenz1-3 citotoxikus és citosztatikus hatását az 6. táblázatban mutattam be, itt a konjugátumokkal való összehasonlítás miatt szerepelnek újra.

^b A peptidek C-terminálisa amid formájú

^c Citotoxikus hatás meghatározása 24 órás kezelést követően MTT-teszttel

^d Citosztatikus hatás meghatározása 24 órás kezelést, majd 72 órás továbbtenyésztést követően MTT-teszttel

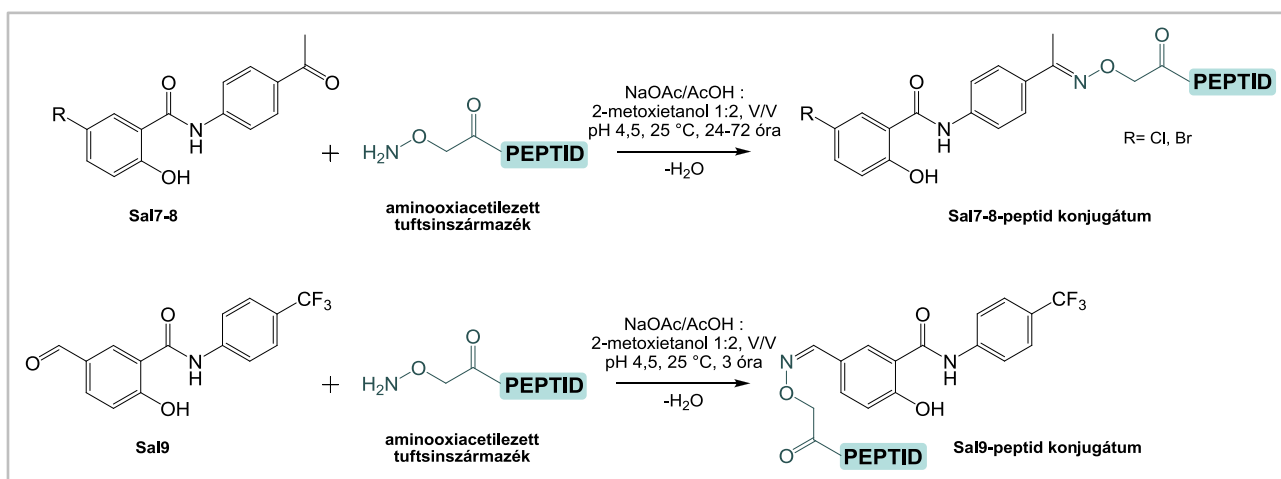
^e Szelektivitási index, SI = IC₅₀ (μM)/MIC (μM)

A szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumai kiváló *in vitro* antimikobakteriális aktivitással rendelkeztek az extracelluláris baktériumok ellen, viszont jelentős citotoxikus és citosztatikus hatást mutattak a gazdasejt modell MonoMac6 sejteken. Mivel a konjugátumokból az észterkötés gyors hidrolízisével felszabadulnak a kiindulási szalicilanilid származékok, ezért a konjugátumok aktivitása ezeknek a származékoknak tulajdonítható. A konjugátumok alacsony stabilitása miatt további kísérleteket nem végeztünk rajtuk. A konjugálás előnye az lehetett, hogy a konjugátumok a szalicilanilid származékokkal ellentétben jól oldódnak vizes közegben.

4.3.2. Szalicilanilid-peptid konjugátumok előállítása, kémiai és *in vitro* biológiai jellemzése

A Sal7-9 szalicilanilid származékokat, melyek anilin- vagy szalicilsav-gyűrűjükön karbonilcsoportot tartalmaznak, közvetlenül lehet konjugálni aminosav- vagy aminosav-vezetkeztetett peptidekhez. A Sal8 szalicilanilid származékot választottam ki arra, hogy az 4.2. fejezetben bemutatott tuftsinszármazékokkal konjugáljam, mivel ennek a vegyületnek volt a 3 konjugálható származék közül a legalacsonyabb MIC értéke a szenzitív és rezisztens *M. tuberculosis* törzsek ellen, és *M. abscessus* ellen is hatásos volt. A Sal7 és Sal9 származékot Aoa-OT20 tuftsinszármazékhoz, a Sal7-et továbbá Aoa-OT20(4-pal) származékhoz is konjugáljam, hogy összehasonlíthassam a különböző kismolekulát, de azonos hordozópeptidet tartalmazó konjugátumok aktivitását is.

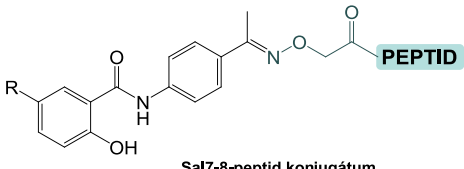
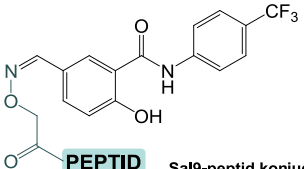
A Sal7-9 szalicilanilid származékokat oximkötéssel keresztül konjugáltam az aminosav-vezetkeztetett tuftsinszármazékokhoz. A reakciót NaOAc/AcOH puffer (pH 4,5) és 2-metoxietanol elegyében szobahőmérsékleten, 3-72 órán át kevertettem (52. ábra), és analitikai RP-HPLC-vel vizsgáltam a reakció előrehaladását (Függelék F26. ábra). A 2-metoxietanol az apoláris szalicilanilid jó oldószerének bizonyult, és nem tartalmazott a reakciót gátló szennyezőket a néha nem megfelelő tisztaságú DMF-dal ellentétben. A Sal7 és Sal8 esetében, melyek anilin-gyűrűn acetilcsoportot tartalmaznak, a reakció lassabb volt, mint a Sal9 esetében, mely a szalicilsav-gyűrűn aldehidcsoportot tartalmaz. A konjugátumokat félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, majd analitikai RP-HPLC-vel és tömegspektrométerrel analizáltam. A konjugátumok sematikus szerkezete egyenként a Függelék F27. ábráján látható. A konjugátumok közt vannak különböző hosszúságú, illetve különböző típusú tuftsinszármazékot tartalmazók. Továbbá tartalmazhatnak GFLG enzimlabilis távolságtartó egységet a szalicilanilid és a tuftsinszármazék közt. Vannak különböző hosszúságú zsírsav oldallánc módosítást tartalmazó konjugátumok is. A peptidek C-terminálisa amid vagy karboxil formájú.



52. ábra: Szalicilanilid konjugálása tuftsinszármazékokhoz

A 16. táblázatban foglaltam össze az előállított Sal7-9-tuftsinszármazék konjugátumok analitikai jellemzésének eredményét. Minden tisztított konjugátum az analitikai RP-HPLC alapján megfelelően tisztának bizonyult, egy csúccsal rendelkezett, a tömegspektrometriai méréseknél a várt és a mért tömegek megegyeztek. A konjugátumokat aminosavanalízissel is jellemeztük, melynek eredménye minden esetben jó egyezést mutatott a vizsgált peptid elméleti aminosavösszetételével.

16. táblázat: A szalicilanilid-peptid konjugátumok kémiai jellemzése

			
konjugátum ^a	R	Rt / perc ^b	M _{av} /mo szám / M _{av} /mo mért ^c
Sal7-Aoa-OT20	Cl	14,3	2408,2 / 2408,8
Sal8-Aoa-OT20	Br	14,3	2452,7 / 2453,5
Sal9-Aoa-OT20	-	14,7	2427,8 / 2428,5
Sal8-Aoa-GFLG-OT20	Br	15,7	2827,1 / 2827,9
Sal8-Aoa-OT20(4-but)	Br	14,7	2522,8 / 2523,3
Sal8-Aoa-OT20(4-dek)	Br	16,4	2606,9 / 2607,5
Sal7-Aoa-OT20(4-pal)	Cl	18,3	2646,7 / 2647,1
Sal8-Aoa-OT20(4-pal)	Br	18,4	2691,1 / 2691,5
Sal8-Aoa-OT20(14-pal)	Br	17,3	2691,1 / 2691,7
Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa)	Br	16,3	2841,9 / 2842,2
Sal8-Aoa-OT10	Br	14,9	1429,5 / 1429,8
TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa)	Br	16,3	2301,2 / 2301,4
Sal8-Aoa-T5	Br	15,6	917,9 / 918,4
Sal8-Aoa-GFLG-T5	Br	17,1	1292,3 / 1292,7
Sal8-Aoa-T5(4-dek)	Br	19,8	1072,1 / 1072,6
Sal8-Aoa-T5(4-pal)	Br	28,1	1155,3 / 1155,0
Sal8-Aoa-T5-OH	Br	15,7	918,8 / 919,4
Sal8-Aoa-GFLG-T5-OH	Br	17,1	1293,3 / 1293,4
Sal8-Aoa-TKPR-OH	Br	15,7	889,8 / 890,3
Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH	Br	17,2	1264,2 / 1264,6
Sal8-Aoa-TKPPR-OH	Br	15,8	986,9 / 987,4
Sal8-Aoa-GFLG-TKPPR-OH	Br	17,2	1361,3 / 1361,5
Sal8-Aoa-Thr-OH	Br	18,8	507,1 / 507,1
Sal8-Aoa-Gly-OH	Br	18,9	463,0 / 463,1
H-Lys(Sal8-Aoa)-OH	Br	17,4	534,1 / 534,2

^a Az amid C-terminálisú konjugátumok kódjában nem jelöltem az amid formát. A karboxil C-terminálisú konjugátumoknál '-OH'-val jelöltem a karboxil formát.

^b Retenció idő (Exformma HPLC; Agilent Zorbax SB-C18 oszlop (5 µm, 100 Å, 4,6 mm x 150 mm); gradiens: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B; eluensek: A: 0,1% TFA, víz (V/V), B: 0,1% TFA, acetonitril/víz 80:20 (V/V); folyássebesség: 1 mL/perc; detektálás: 220 nm)

^c számolt és mért átlagos (M>600) vagy monoizotópos (M<600) molekulatömeg (Bruker Esquire 3000+ ESI-MS)

4.3.2.1. A lizoszomális emésztés során keletkező legkisebb metabolitok, a szalicilanilid-aminosav származékok előállításának kémiai jellemzése

Vizsgálni kívántam a lizoszomális emésztés során (4.3.2.6. fejezet) a konjugátumokból keletkező legkisebb metabolitok biológiai aktivitását is. Ezért előállítottam a Sal8-Aoa-Thr-OH, Sal8-Aoa-Gly-OH és H-Lys(Sal8-Aoa)-OH szalicilanilid-aminosav származékokat. A Sal8 szalicilanilid származékot a 4.3.2. fejezetben leírtaknak megfelelően konjugáltam aminosavakhoz, az Aoa-Thr-OH-hoz, az Aoa-Gly-OH-hoz és a H-Lys(Aoa)-OH-hoz. A szalicilanilid-aminosav származékokat félpreparatív RP-

HPLC-vel tisztítottam, majd analitikai RP-HPLC-vel és tömegspektrométerrel analizáltam, a vegyületek jellemzésének eredménye szintén a 16. táblázatban található. Az oximkötést tartalmazó szalicilanilid-aminosav származékok esetén az oximkötés miatti *E* és *Z* izomerek az analitikai és a félpreparatív RP-HPLC körülmények között elváltak. Az egyik izomer nagyobb mennyiségben keletkezett, mint a másik, az izomerek azonosításához további vizsgálatok (pl. NMR) szükségesek.

A H-Lys(Sal8-Aoa)-OH származék *in vitro* biológiai aktivitásának jellemzése folyamatban van.

4.3.2.2. Szalicilanilid-peptid konjugátumok stabilitásának vizsgálata

Az oximkötést tartalmazó szalicilanilid-tuftsín konjugátumok stabilitását is vizsgáltam az *in vitro* kísérletek körülményei között (4.1.6.1. fejezet). A konjugátumok stabilitását DMSO-ban 4 °C-on 3 hétig, 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban 37 °C-on 4 hétig, és 10% DMSO-t tartalmazó szérumentes RPMI-1640 médiumban 37 °C-on 1 hétig analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével vizsgáltam. Az *in vitro* citosztatikus hatás vizsgálatánál a vegyületekkel való 24 órás kezelés után a sejteket 72 órán át továbbtenyésztjük szérumot tartalmazó RPMI-1640 médiumban, ezért kiegészítő vizsgálatként a konjugátumok stabilitását 10% DMSO-t és szérumot tartalmazó RPMI-1640 médiumban is vizsgáltam 37 °C-on 24 óráig. A legtöbb konjugátum stabilitását vizsgáltam, mivel az eredmények hasonlóak a vizsgálatok eredményét a Sal8-Aoa-OT20, Sal8-Aoa-GFLG-OT20 és Sal8-Aoa-OT20(4-dek) konjugátumokon mutatom be.

A Sal8-Aoa-OT20(4-dek) konjugátum DMSO-ban 4 °C-on stabil volt legalább 3 hétig, a kromatogramban csak az intakt konjugátumot azonosítottam (Függelék F28. ábra).

A Sal8-Aoa-OT20 és a spacer tartalmazó Sal8-Aoa-GFLG-OT20 esetében a konjugátumok többnyire stabilak Sula médiumban, a konjugátumok kb. 5%-ában az oximkötés elhidrolizált a szabad Sal8 szalicilanilidre és 2-hidroxiacetyl-tuftsín származékokra (Függelék F29. és F30. ábra). A spacer nélküli és a spacer tartalmazó konjugátum stabilitásában nincs jelentős különbség.

A Sal8-Aoa-OT20(4-dek) konjugátum stabil szérumentes médiumban 37 °C-on, 1 hét inkubálás után sem figyelhető meg bomlás (Függelék F31. ábra).

A Sal8-Aoa-OT20 konjugátum stabilnak bizonyult szérumot tartalmazó RPMI-1640 médiumban 24 óra inkubálást követően (Függelék F32. ábra).

Összességében elmondható, hogy a konjugátumok stabilak az *in vitro* kísérletek körülményei között, az oximkötés kis mértékű hidrolízise volt csak észlelhető Sula médiumban. A konjugátumok szükség esetén DMSO-ban oldva törzsoldatként 4 °C-on tárolhatók.

4.3.2.3. Szalicilanilid-peptid konjugátumok MIC értékének meghatározása

A szalicilanilid-peptid konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatását is vizsgáltuk *M. tuberculosis* H₃₇Rv, A8 MDR és *M. abscessus* baktérium törzseken, hogy megtudjuk, hogy a szalicilanilidek a konjugátumokban megőrzik-e antimikobakteriális hatásukat, és hogy szerkezet-hatás összefüggéseket vonhassunk le. Ez a kísérlet az extracelluláris baktériumokat modellezi. Az eredményeket a 17. és 18. táblázatban foglaltam össze.

Az 4.1.7. fejezetben ismertettem, hogy a kiindulási kismolekulák (Sal1-4) rendkívül alacsony koncentrációnál hatottak a vizsgált mikobaktérium törzsek ellen. *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR ellen 1,4-2,8 µM koncentrációnál, *M. abscessus* ellen 3,2-13,9 µM koncentrációnál voltak hatásosak. A

konjugálható szalicilanilid származékoknál már nagyobb koncentrációra volt szükség a gátláshoz. A Sal7-8 molekulák 7,5 és 17,3 μM között hatottak *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR ellen, *M. abscessus* ellen pedig 34,5 és 59,8 μM között hatottak. A Sal9 molekula MIC értékei a legmagasabbak, 25,9 és 129,4 μM közötti értékeket kaptunk a vizsgált baktériumtörzsek ellen.

A konjugálható szalicilanilid származékok megőrizték antimikobakteriális tulajdonságukat a konjugátumokban *M. tuberculosis* H₃₇Rv ellen (17. táblázat). A konjugátumok esetén kapott MIC értékek (20,3-186,5 μM) nagyobbak, mint a szabad szalicilanilidek, Sal7-9 esetén (7,5-25,9 μM). Nem volt jelentős különbség a különböző szalicilanilideket tartalmazó OT20 és OT20(4-pal) konjugátumok hatása között. A peptid hosszúsága szempontjából a Sal8-Aoa-OT20 tetratuftsin konjugátum jobb hatással rendelkezett, mint a Sal8-Aoa-OT10 dituftsin származék konjugátum, és a legrövidebb, Sal8-Aoa-T5 monotuftsin származék konjugátum mutatta a legkiemelkedőbb hatást a három közül, MIC értéke 21,8 μM . Az enzimlabilis GFLG spacer jelenlétének nincs jelentős előnye az *in vitro* antimikobakteriális hatás szempontjából. Az egy tuftsinegységet tartalmazó konjugátumok esetén a spacerrel rendelkező és a spacer nélküli konjugátumok hatása közel azonos volt. Az OT20 tetratuftsin származék konjugátum esetében a GFLG spacer jelenléte csökkentette az aktivitást (Sal8-Aoa-OT20 MIC: 81,5 μM , Sal8-Aoa-GFLG-OT20 MIC: 141,5 μM). Az összes konjugátum közül az egy tuftsinegységet tartalmazók (Sal8-Aoa-T5, Sal8-Aoa-T5-OH, Sal8-Aoa-TKPR-OH, Sal8-Aoa-TKPPR-OH), és ezek GFLG spacer tartalmazó változatai rendelkeztek a legkiemelkedőbb aktivitással *M. tuberculosis* H₃₇Rv ellen. A Sal8-Aoa-T5 konjugátum, melynek C-terminálisa amid formájú háromszor hatásosabb volt, mint a Sal8-Aoa-T5-OH konjugátum, melynek C-terminálisa szabad karboxilcsoport. A legaktívabb, vagyis a legkisebb MIC értékkel rendelkező konjugátumok a Sal8-Aoa-TKPPR-OH (MIC: 20,3 μM) és a Sal8-Aoa-T5 (MIC: 21,8 μM) konjugátumok voltak. Ennek a két konjugátumnak a MIC értéke csak háromszor nagyobb, mint a szabad Sal8 szalicilanilidé. A két hatóanyagot tartalmazó konjugátumok, a Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa) és a TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa) szintén nagy aktivitással rendelkeztek a *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktérium ellen, MIC értékük 42,2, ill. 34,8 μM .

A zsírsav oldallánc hosszúság szempontjából a vajsav és a dekánsav oldallánc módosítás a Sal8-Aoa-OT20(4-but) (MIC: 63,4 μM) és a Sal8-Aoa-OT20(4-dek) (MIC: 76,7 μM) esetén enyhén növelte az aktivitást a zsírsav nélküli Sal8-Aoa-OT20 konjugátumhoz (MIC 81,5 μM) képest. A palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó konjugátumok esetén a zsírsav oldallánc helyzete (4-es vagy 14-es pozíció) enyhén befolyásolta a konjugátum hatását. A Sal8-Aoa-OT20(4-pal) nagyobb MIC értékkel rendelkezett (92,9 μM), mint zsírsavat nem tartalmazó Sal8-Aoa-OT20, ezzel ellentétben a Sal8-Aoa-OT20(14-pal) MIC értéke (74,3 μM) alacsonyabb volt, mint a Sal8-Aoa-OT20 konjugátumé. A zsírsav jelenlétének jelentősebb hatása van a monotuftsin származék konjugátumok esetében. A Sal8-Aoa-T5(4-dek) (MIC: 186,5 μM) és a Sal8-Aoa-T5(4-pal) (MIC: 173,1 μM) esetében a zsírsavak jelenléte jelentősen csökkentette a konjugátumok aktivitását a zsírsav nélküli Sal8-Aoa-T5 konjugátumhoz (MIC: 21,8 μM) képest.

A lizoszomális emésztés során keletkező legkisebb metabolitok (4.3.2.6. fejezet), a Sal8-Aoa-Thr-OH (MIC: 393,5 μM) és a Sal8-Aoa-Gly-OH (MIC: 215,4 μM) gyenge *in vitro* antimikobakteriális aktivitással rendelkeztek, MIC értékük 52-szer, ill. 29-szer nagyobb, mint a szabad Sal8 vegyületé (MIC: 7,5 μM).

Ha a hatóanyagtartalomra számolt MIC értékek alapján hasonlítjuk össze a szabad szalicilanilid származékokat és a szalicilanilid-peptid konjugátumokat, azt az eredményt kapjuk, hogy az OT20

tetratuftsín konjugátumok 25 µg/mL koncentráció körül hatottak, ami csak 10-szer nagyobb, mint a szabad Sal7 és Sal8 MIC értéke (2,5 µg/mL). A rövid, egy tuftsinegységet tartalmazó konjugátumok esetében a konjugátumok nagy részének hatóanyagtartalomra számolt MIC értéke még alacsonyabb, 6,8 és 10,6 µg/mL közötti (Sal8-Aoa-T5, Sal8-Aoa-GFLG-T5, Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH, Sal8-Aoa-TKPPR-OH és Sal8-Aoa-GFLG-TKPPR-OH).

Vizsgáltuk az egy tuftsinegységet tartalmazó, *M. tuberculosis* H₃₇Rv ellen kimagasló aktivitással rendelkező konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatását *M. tuberculosis* A8 MDR multirezisztens törzs ellen is (17. táblázat). Ezek a konjugátumok csak a legmagasabb vizsgált koncentrációnál, 100 µg/mL-nél (73,5-112,4 µM) tudták gátolni a rezisztens baktériumot. Ezek a MIC értékek 2-5-ször nagyobbak, mint a szenzitív törzsen mért MIC értékeik. A hatóanyagtartalomra számolt MIC értékek szempontjából az átlagos MIC értékük 31,0 µg/mL, ami csak 6-szor nagyobb, mint a szabad Sal8 MIC értéke (5,0 µg/mL).

A konjugátumok többsége hatásosnak bizonyult *M. abscessus* ellen is, MIC értékük 40,8 és 224,8 µM között volt (18. táblázat). A szalicilanilid-OT20 konjugátumok voltak a leghatásosabbak *M. abscessus* ellen. A Sal7-Aoa-OT20 (MIC: 41,5 µM) és a Sal8-Aoa-OT20 (MIC: 40,8 µM) aktivitása a szabad Sal7 (MIC: 34,5 µM) és Sal8 (MIC: 59,8 µM) vegyületekhez hasonló. Érdekes módon a Sal9-Aoa-OT20 konjugátum (MIC: 41,2 µM) háromszor aktívabb volt, mint a Sal9 szabad szalicilanilid származék (MIC: 129,4 µM).

A spacer, zsírsav oldalláncot vagy két szalicilanilidet is tartalmazó OT20 konjugátumok (Sal8-Aoa-GFLG-OT20, Sal8-Aoa-OT20(4-but), Sal8-Aoa-OT20(4-dek), Sal7-Aoa-OT20(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(14-pal) és Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa)) hasonló hatással rendelkeztek *M. abscessus* ellen, MIC értékük 70,4 és 79,3 µM között volt. Nem volt jelentős előnye annak, hogy a konjugátum két szalicilanilid molekulát tartalmazott. A Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa) MIC értéke (70,4 µM) kissé alacsonyabb, mint a TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa) konjugátum MIC értéke (86,9 µM). A Sal8-Aoa-OT10 dituftsín származékot tartalmazó konjugátum szintén jó aktivitást mutatott (MIC: 56,0 µM) *M. abscessus* ellen.

A *M. tuberculosis* H₃₇Rv esetén kapott eredményekkel ellentétben a monotuftsín származékok voltak a legkevésbé hatékonyak *M. abscessus* ellen, MIC értékük 146,9-224,8 µM között volt. A GFLG spacer beépítése a konjugátumba enyhén csökkentette MIC értéküket. A zsírsav oldalláncok jelenlétének a T5 konjugátumban nem volt jelentős hatása az aktivitás szempontjából.

A hatóanyagtartalomra számított MIC értékek szempontjából a Sal7-9-Aoa-OT20 konjugátumok (13 µg/mL körül) legalább olyan hatásosak voltak, vagy még hatásosabbak, mint a szabad Sal7-9 szalicilanilid molekulák (MIC: 10-40 µg/mL) *M. abscessus* ellen. A spacer vagy zsírsav oldalláncot tartalmazó OT20 származékok hatóanyagtartalomra számított MIC értéke 25 µg/mL érték körül volt, az egy tuftsinegységet tartalmazó konjugátumoknál pedig 60 µg/mL körül volt.

17. táblázat: A szalicilanilid-peptid konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatása *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR törzseken

vegyület, konjugátum ^{a, b}	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv				<i>M. tuberculosis</i> A8 MDR			
	MIC ^c γ (μg/mL)	MIC _{HT} ^d (μg/mL)	MIC (μM)	CFU ^e	MIC ^c γ (μg/mL)	MIC _{HT} ^d (μg/mL)	MIC (μM)	CFU ^e
<i>Sal7</i>	2,5	2,5	8,6	1	5	5	17,3	0
<i>Sal8</i>	2,5	2,5	7,5	10	5	5	15,0	0
<i>Sal9</i>	8	8	25,9	40	20	20	64,7	2
Sal7-Aoa-OT20	200	24,1	83,0	4	nd ⁱ	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-OT20	200	27,3	81,5	40	nd	nd	nd	nd
Sal9-Aoa-OT20	200 ^f	25,5	82,4	nd	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-GFLG-OT20	400	47,3	141,5	nd	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-OT20(4-but)	160	21,2	63,4	0	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-OT20(4-dek)	200 ^f	25,6	76,7	nd	nd	nd	nd	nd
Sal7-Aoa-OT20(4-pal)	>250 ^g	27,4	94,5	++ ^h	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-OT20(4-pal)	250	31,0	92,9	15	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-OT20(14-pal)	200 ^f	24,8	74,3	nd	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa)	120	28,2	42,2	20	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-OT10	250	58,4	174,9	25	nd	nd	nd	nd
TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa)	80	23,2	34,8	0	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-T5	20	7,3	21,8	4	100	36,4	108,9	+
Sal8-Aoa-GFLG-T5	40	10,3	31,0	15	100	25,9	77,4	10
Sal8-Aoa-T5(4-dek)	200 ^f	62,3	186,5	nd	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-T5(4-pal)	200 ^f	57,9	173,1	nd	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-T5-OH	60	21,8	65,3	60	100	36,4	108,8	+
Sal8-Aoa-GFLG-T5-OH	60	15,5	46,4	0	100	25,8	77,3	+
Sal8-Aoa-TKPR-OH	40	15,0	45,0	60	100	37,6	112,4	++
Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH	40	10,6	31,6	10	100	26,4	79,1	++
Sal8-Aoa-TKPPR-OH	20	6,8	20,3	1	100	33,9	101,3	++
Sal8-Aoa-GFLG-TKPPR-OH	40	9,8	29,4	11	100	24,6	73,5	0
Sal8-Aoa-Thr-OH	200 ^f	131,5	393,5	nd	nd	nd	nd	nd
Sal8-Aoa-Gly-OH	100 ^f	72,0	215,4	nd	nd	nd	nd	nd

^a A Sal7-9 antimikobakteriális hatását a 4. táblázatban mutattam be, itt a konjugátumokkal való összehasonlítás miatt szerepelnek újra.

^b Az amid C-terminálisú konjugátumok kódjában nem jelöltem az amid formát. A karboxil C-terminálisú konjugátumoknál '-OH'-val jelöltem a karboxil formát.

^c MIC meghatározása Sula félszintetikus médiumban (pH 6,5) *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR esetén 4 hét inkubálás után

^d MIC_{HT}: a konjugátumok esetén a hatóanyagtartalomra számolt MIC értékek, MIC_{HT} (μg/mL) = (MIC (μM) × M_{av}Sal (g/mol) × n) / 1000, ahol M_{av}Sal: szalicilanilid moláris tömege; n: szalicilanilid molekulák száma a konjugátumban

^e CFU meghatározása Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR esetén 4 hét további inkubálás után

^f Az adatok a 21 napos inkubálási idő után meghatározott értékekből extrapoláltak

^g Ennél a koncentrációnál a konjugátumok csökkentették a CFU-t, de a MIC értékük valószínűleg nagyobb, mint a vizsgált legmagasabb koncentráció.

^h +++, ++, +: egybefüggő kolóniák

ⁱ nd: nem határoztuk meg

18. táblázat: A szalicilanilid-peptid konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatása *M. abscessus* törzsön

vegyület, konjugátum ^{a, b}	<i>M. abscessus</i>			
	MIC ^c γ (μg/mL)	MIC _{HT} ^d (μg/mL)	MIC (μM)	CFU ^e
Sal7	10	10	34,5	0
Sal8	20	20	59,8	0
Sal9	40	40	129,4	0
Sal7-Aoa-OT20	100	12,0	41,5	60
Sal8-Aoa-OT20	100	13,6	40,8	1
Sal9-Aoa-OT20	100	12,7	41,2	0
Sal8-Aoa-GFLG-OT20	200	23,6	70,7	21
Sal8-Aoa-OT20(4-but)	200	26,5	79,3	11
Sal8-Aoa-OT20(4-dek)	200	25,6	76,7	20
Sal7-Aoa-OT20(4-pal)	>200 ^f	21,9	75,6	+ ^g
Sal8-Aoa-OT20(4-pal)	>200 ^f	24,8	74,3	+
Sal8-Aoa-OT20(14-pal)	200	24,8	74,3	15
Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa)	200	47,0	70,4	0
Sal8-Aoa-OT10	80	18,7	56,0	0
TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa)	200	58,1	86,9	8
Sal8-Aoa-T5	160	58,3	174,3	12
Sal8-Aoa-GFLG-T5	200	51,7	154,8	50
Sal8-Aoa-T5(4-dek)	200	62,3	186,5	0
Sal8-Aoa-T5(4-pal)	200	57,9	173,1	5
Sal8-Aoa-T5-OH	200	72,7	217,7	10
Sal8-Aoa-GFLG-T5-OH	200	51,7	154,6	60
Sal8-Aoa-TKPR-OH	200	75,1	224,8	1
Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH	200	52,9	158,2	22
Sal8-Aoa-TKPPR-OH	200	67,7	202,7	13
Sal8-Aoa-GFLG-TKPPR-OH	200	49,1	146,9	15

^a A Sal7-9 antimikobakteriális hatását a 4. táblázatban mutattam be, itt a konjugátumokkal való összehasonlítás miatt szerepelnek újra.

^b Az amid C-terminálisú konjugátumok kódjában nem jelöltem az amid formát. A karboxil C-terminálisú konjugátumoknál '-OH'-val jelöltem a karboxil formát.

^c MIC meghatározása Sula félszintetikus médiumban (pH 6.5) *M. abscessus* esetén 1 hét inkubálás után

^d MIC_{HT}: a konjugátumok esetén a hatóanyagtartalomra számolt MIC értékek, MIC_{HT} (μg/mL) = (MIC (μM) × M_{av}Sal (g/mol) × n) / 1000, ahol M_{av}Sal: szalicilanilid moláris tömege; n: szalicilanilid molekulák száma a konjugátumban

^e CFU meghatározása Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon *M. abscessus* esetén 1 hét további inkubálás után

^f Ennél a koncentrációnál a konjugátumok csökkentették a CFU-t, de a MIC értékük valószínűleg nagyobb, mint a vizsgált legmagasabb koncentráció.

^g +++, ++, +: egybefüggő kolóniák

4.3.2.4. Szalicilanilid-peptid konjugátumok *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatása

A konjugátumok alkalmazása során egyik célunk, hogy a konjugátumok szelektívek legyenek a baktérium felé, vagyis lehetőleg úgy legyenek képesek elpusztítani a baktériumokat, hogy a gazdasejt, illetve a szervezet többi sejtjére ne legyenek káros hatásúak. Ezért vizsgáltuk a szalicilanilid-peptid konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását gazdasejt modell MonoMac6 humán monocita sejteken és a hepatotoxicitás tanulmányozására szolgáló HepG2 humán hepatóma sejteken. Meghatároztuk néhány kiválasztott vegyület citotoxikus hatását a szintén gazdasejt modell egér csontvelői makrofág (BMM Φ) sejteken. Továbbá vizsgáltuk a kiválasztott vegyületek *in vitro* citotoxikus hatását emberi köldökzsinór vénából preparált endotélsejteken (HUVEC). Meghatároztuk a vegyületek szelektivitási indexét (SI) a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyítva.

Az 4.1.8. fejezetben bemutatott négy kiindulási szalicilanilid származék (Sal1-4) citosztatikus hatású volt alacsony IC₅₀ értékekkel MonoMac6 és HepG2 sejteken (IC₅₀: 1,4-5,8 μ M). A három konjugálható szalicilanilid származék (Sal7-9) is citosztatikus hatásúnak bizonyult magasabb IC₅₀ értékekkel mindkét sejtvonalon (MonoMac6 – IC₅₀: 16,1-21,5 μ M; HepG2 – IC₅₀: 7,9-17,6 μ M).

A szalicilanilid-peptid konjugátumok esetében az eredmények változatosak (19. táblázat). Az egy tuftsinegységet tartalmazó konjugátumok (Sal8-Aoa-T5, Sal8-Aoa-T5-OH, Sal8-Aoa-TKPR-OH, Sal8-Aoa-TKPPR-OH) és a GFLG spacer tartalmazó változatuk nem voltak citosztatikus hatásúak a MonoMac6 sejteken a vizsgált legmagasabb koncentrációnál (200 μ M). Az oldallánc módosítás nélküli dituftsinnel és tetra-tuftsinnel származék konjugátumok (Sal8-Aoa-OT10, Sal7-Aoa-OT20, Sal8-Aoa-OT20, Sal9-Aoa-OT20) sem mutattak citosztatikus hatást a vizsgált legmagasabb koncentrációnál ezen a sejt típuson. A GFLG spacer tartalmazó tetra-tuftsinnel konjugátum (Sal8-Aoa-GFLG-OT20) enyhén citosztatikus hatású volt 86,6 μ M-os IC₅₀ értékkel MonoMac6 sejteken. Két szalicilanilid molekula jelenléte a konjugátumban szintén citosztatikus hatás megjelenéséhez vezetett, a Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa) IC₅₀ értéke 39,1 μ M, a TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa) IC₅₀ értéke 101,4 μ M.

A zsírsav oldallánc módosítást tartalmazó konjugátumok jelentős citosztatikus hatással rendelkeztek a MonoMac6 sejteken a vajsavval módosított konjugátum kivételével, a Sal8-Aoa-OT20(4-but) nem volt citosztatikus hatású a vizsgált legmagasabb koncentrációnál sem. A palmitoil oldalláncot tartalmazó OT20 konjugátumok (Sal7-Aoa-OT20(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(14-pal)) IC₅₀ értéke nagyon alacsony (16,5-20,9 μ M), a szabad szalicilanilid származékokéhoz hasonló. A palmitoil-csoportot tartalmazó monotuftsinnel származék konjugátum, a Sal8-Aoa-T5(4-pal) IC₅₀ értéke (53,8 μ M) magasabb, mint a tetra-tuftsinnel származék konjugátumoké, de citosztatikus hatása még mindig jelentős. A dekánsav oldallánc módosítást tartalmazó konjugátumok is citosztatikus hatásúak voltak. A Sal8-Aoa-OT20(4-dek) IC₅₀ értéke (24,9 μ M) a palmitinsavas analógjához hasonló volt (Sal8-Aoa-OT20(4-pal), IC₅₀: 16,8 μ M). A T5 monotuftsinnel származék Sal8-Aoa-T5(4-dek) IC₅₀ értéke (72,6 μ M) magasabb, mint a Sal8-Aoa-T5(4-pal) IC₅₀ értéke (53,8 μ M). Nem várt eredmény az, hogy a dekánsavat tartalmazó konjugátumok citosztatikus hatással rendelkeznek, mivel az acetilézett kontroll peptidek (Ac-OT20(4-dek), Ac-T5(4-dek), 4.2.7. fejezet) és a dekánsav esetében nem tapasztaltunk citosztatikus aktivitást. A palmitinsavat tartalmazó kontroll peptidek is citosztatikus hatásúak, így a palmitinsavat tartalmazó konjugátumok citosztatikus hatása várható volt.

HepG2 sejteken (19. táblázat) az egyik OT20 konjugátum, a Sal8-Aoa-OT20 enyhén citosztatikusnak bizonyult (IC₅₀: 81,9 μ M), a többi tetra-tuftsinnel és a dituftsinnel származék konjugátum

(Sal7-Aoa-OT20, Sal9-Aoa-OT20, Sal8-Aoa-OT10) nem mutatott citosztatikus hatást a vizsgált legmagasabb koncentrációnál. Az egy tuftsinszármazékot tartalmazó konjugátumok (Sal8-Aoa-T5, Sal8-Aoa-TKPR-OH, Sal8-Aoa-TKPPR-OH) sem mutattak citosztatikus aktivitást HepG2 sejteken, kivéve a Sal8-Aoa-T5-OH, mely enyhén citosztatikus hatásúnak bizonyult (IC_{50} : 191,3 μ M). Érdekes módon a GFLG spacer jelenléte a konjugátumokat (Sal8-Aoa-GFLG-OT20, Sal8-Aoa-GFLG-T5, Sal8-Aoa-GFLG-T5-OH, Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH, Sal8-Aoa-GFLG-TKPPR-OH) enyhén citosztatikus hatásúvá tette 58,0 és 162,6 μ M közötti IC_{50} értékekkel. A két szalicilanilid molekulát tartalmazó konjugátumok citosztatikus hatása a Sal8-Aoa-OT20 hatásához hasonló, a Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa) IC_{50} értéke 79,7 μ M és a TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa) IC_{50} értéke 95,2 μ M.

A palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó konjugátumok HepG2 sejteken is jelentős citosztatikus aktivitást mutattak. A palmitoil-csoportot tartalmazó OT20 konjugátumok alacsony IC_{50} értékekkel rendelkeztek (37,6-42,9 μ M). Érdekes módon a monotuftsin konjugátum (Sal8-Aoa-T5(4-pal)) rendelkezett a legkisebb IC_{50} értékkel (23,2 μ M) az összes konjugátum közül a HepG2 sejteken. A Sal8-Aoa-OT20 konjugátum és a butanoil-csoportot tartalmazó analógja, a Sal8-Aoa-OT20(4-but) hasonló hatást mutattak (IC_{50} : 81,9, ill. 81,6 μ M). A MonoMac6 sejtek esetében tapasztaltakkal ellentétben a dekánsav módosítást tartalmazó Sal8-Aoa-OT20(4-dek) konjugátum citosztatikus hatása kisebb (IC_{50} : 113,3 μ M), mint a zsírsav nélküli Sal8-Aoa-OT20 konjugátumé. Viszont a T5 analóg Sal8-Aoa-T5(4-dek) citosztatikus hatása nagyobb (IC_{50} : 55,8 μ M), mint a zsírsav nélküli konjugátumé, de kevésbé citosztatikus, mint a palmitinsavat tartalmazó változat (Sal8-Aoa-T5(4-pal)).

A lizoszomális emésztés során keletkező legkisebb metabolitok, a Sal8-Aoa-Thr-OH és a Sal8-Aoa-Gly-OH nem rendelkezett *in vitro* citosztatikus hatással a vizsgált legnagyobb koncentrációig sem MonoMac6 sejteken, sem HepG2 sejteken. A szalicilanilid származékokhoz oximkötésen keresztül kapcsolódó aminosav megszünteti a szalicilanilid citosztatikus hatását, melynek oka az lehet, hogy a legkisebb metabolitok nem jutnak be a sejtekbe, vagy a szabad szalicilanilidekhez képest is csak kisebb mértékben jutnak be. Valószínűsíthető, hogy a kis mértékben sejtbe jutott legkisebb metabolitok nem ugyanazokba a sejt-kompartimentumokba kerülnek, mint a konjugátumok, melyek közül néhány citosztatikus hatással rendelkezik.

A kiindulási szalicilanilid származékok (Sal1-4) *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyított szelektivitási indexe 1,0 és 3,9 között van MonoMac6 és HepG2 sejtek esetében. A konjugálható szalicilanilidek (Sal7-9) szelektivitási indexe 0,7 és 2,5 között van ezen sejtek esetében. Habár a konjugátumok többsége nem volt citosztatikus hatású vagy csak enyhe citosztatikus aktivitást mutatott a humán sejteken, szelektivitási indexük alacsony a baktérium elleni magas minimális gátló koncentrációjuk miatt. A dekánsav vagy palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó konjugátumok szelektivitási indexe nagyon alacsony (SI: 0,1-1,5). A két szalicilanilid molekulát tartalmazó konjugátumok közül a Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa) SI értéke 1,9 alatti a két sejt típusra vonatkoztatva, a TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa) SI értéke viszont magasabb (SI: 2,7-2,9). A citosztatikus aktivitással egyik sejt típuson sem rendelkező konjugátumok (Sal7-Aoa-OT20, Sal9-Aoa-OT20, Sal8-Aoa-T5, Sal8-Aoa-T5-OH, Sal8-Aoa-TKPR-OH, Sal8-Aoa-TKPPR-OH) optimális szelektivitást mutattak a baktérium felé, ezen konjugátumok SI értéke 2,4 felett van. A Sal8-Aoa-T5 és a Sal8-Aoa-TKPPR-OH szelektivitási indexe a legnagyobb, 9,2, ill. 9,9 feletti. Ezekben az esetekben levonható az a következtetés, hogy a szalicilanilid származékok tuftsin típusú hordozókhoz való konjugálása növelte a vegyületek szelektivitását. Érdemes megjegyezni, hogy jelentős különbségek lehetnek a vegyületek *in vitro* és *in vivo* toxicitása között. Az,

hogy egy vegyület citosztatikus hatású az alkalmazott modell sejteken, nem feltétlenül jelenti azt, hogy *in vivo* is jelentkezik toxikus hatás, és ez fordítva is igaz lehet.

19. táblázat: A szalicilanilid-peptid konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatása MonoMac6 humán monocita és HepG2 humán hepatokarcinóma sejtvonalon (24 órás kezelés) és szelektivitási indexük a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyítva

vegyület, konjugátum ^{a, b}	MonoMac6 – citosztázis 24 óra ^c		HepG2 – citosztázis 24 óra ^c	
	IC ₅₀ (µM)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^d	IC ₅₀ (µM)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^d
<i>Sal7</i>	16,1±4,9	1,9	7,9±1,4	0,9
<i>Sal8</i>	18,6±2,5	2,5	15,9±0,0	2,1
<i>Sal9</i>	21,5±7,1	0,8	17,6±1,6	0,7
Sal7-Aoa-OT20	>200	>2,4	>200	>2,4
Sal8-Aoa-OT20	>200	>2,5	81,9±4,2	1,0
Sal9-Aoa-OT20	>200	>2,4	>200	>2,4
Sal8-Aoa-GFLG-OT20	86,6±2,8	0,6	112,4±20,0	0,8
Sal8-Aoa-OT20(4-but)	>200	>3,2	81,6±2,4	1,3
Sal8-Aoa-OT20(4-dek)	24,9±6,2	0,3	113,3±15,3	1,5
Sal7-Aoa-OT20(4-pal)	16,8±3,1	0,2	42,9±8,9	0,5
Sal8-Aoa-OT20(4-pal)	16,5±0,8	0,2	37,6±10,3	0,4
Sal8-Aoa-OT20(14-pal)	20,9±4,0	0,3	40,4±17,7	0,5
Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa)	39,1±1,6	0,9	79,7±16,7	1,9
Sal8-Aoa-OT10	>200	>1,1	>200	>1,1
TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa)	101,4±5,6	2,9	95,2±4,2	2,7
Sal8-Aoa-T5	>200	>9,2	>200	>9,2
Sal8-Aoa-GFLG-T5	>200	>6,5	162,6±17,3	5,3
Sal8-Aoa-T5(4-dek)	72,6±6,7	0,4	55,8±3,0	0,3
Sal8-Aoa-T5(4-pal)	53,8±1,1	0,3	23,2±3,7	0,1
Sal8-Aoa-T5-OH	>200	>3,1	191,3±12,4	2,9
Sal8-Aoa-GFLG-T5-OH	>200	>4,3	58,0±0,1	1,3
Sal8-Aoa-TKPR-OH	>200	>4,4	>200	>4,4
Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH	>200	>6,3	112,6±26,9	3,6
Sal8-Aoa-TKPPR-OH	>200	>9,9	>200	>9,9
Sal8-Aoa-GFLG-TKPPR-OH	>200	>6,8	155,6±14,8	5,3
Sal8-Aoa-Thr-OH	>200	>0,5	>200	>0,5
Sal8-Aoa-Gly-OH	>200	>0,9	>200	>0,9
dekánsav	>200	-	nd ^e	-
palmitinsav	178,1±11,2	-	nd	-
palmitinsav + Sal8-Aoa-OT20 (1:1 n/n) fizikai keverék	169,0±1,7	-	nd	-

^a A Sal7-9 citosztatikus hatását az 6. és 8. táblázatban mutattam be, itt a konjugátumokkal való összehasonlítás miatt szerepelnek újra.

^b Az amid C-terminálisú konjugátumok kódjában nem jelöltem az amid formát, a karboxil C-terminálíst '-OH'-val jelöltem.

^c Citosztatikus hatás meghatározása 24 órás kezelést, majd 72 órás továbbtenyésztést követően MTT-tesztel

^d Szelektivitási index, SI = IC₅₀ (µM)/MIC (µM)

^e nd: nem határoztuk meg

A Sal8 szalicilanilid származék és a palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó tetratuftsinn származék konjugátumok citosztatikus hatása 24 órás kezelés után MonoMac6 sejteken közel azonos, HepG2 sejteken a konjugátumok IC₅₀ értéke enyhén magasabb, mint a szabad szalicilanilidé. Kíváncsiak voltunk arra, hogy rövidebb kezelési idő alatt is egymáshoz hasonló koncentrációnál fejti ki citotoxikus, vagy citosztatikus hatásukat a Sal8 és a palmitoil oldalláncot tartalmazó tetratuftsinn származék konjugátumok. Ezért vizsgáltuk a Sal8 szalicilanilid és egy kiválasztott palmitinsav oldalláncot tartalmazó konjugátum, a Sal8-Aoa-OT20(4-pal) *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatását 3 órás kezelést követően is MonoMac6 és HepG2 sejteken (20. táblázat). Az egyes vegyületek esetében a citotoxikus és citosztatikus hatáshoz tartozó IC₅₀ értékek közel azonosak. A korábban bemutatott eredmények alapján a 24 órás kezelést követően a Sal8 és a Sal8-Aoa-OT20(4-pal) IC₅₀ értékei hasonlóak (Sal8 MonoMac6 – IC₅₀: 18,6 µM, HepG2 – IC₅₀: 15,9 µM és Sal8-Aoa-OT20(4-pal) MonoMac6 – IC₅₀: 16,5 µM, HepG2 – IC₅₀: 37,6 µM). A 3 órás citosztázis eredmények alapján látható, hogy a Sal8 szalicilanilid (MonoMac6 – IC₅₀: 184,3 µM, HepG2 – IC₅₀: 177,5 µM) lassabban fejti ki citosztatikus hatását, mint a Sal8-Aoa-OT20(4-pal) konjugátum, melynél már 3 óra után is jelentős citosztatikus aktivitás tapasztalható (MonoMac6 – IC₅₀: 19,8 µM, HepG2 – IC₅₀: 78,4 µM). A Sal8 3 órás IC₅₀ értéke több mint 10-szer nagyobb, mint a 24 óra után kapott IC₅₀ értékek mindkét sejt típuson. A konjugátumnál már 3 óra után a 24 órás kezeléshez hasonló IC₅₀ értékeket kapunk. Ezen eredmények és a hordozópeptid membrán integritásra gyakorolt hatásának vizsgálata során kapott eredmények alapján (4.2.8. fejezet) arra lehet következtetni, hogy a palmitinsavat tartalmazó konjugátum a sejttel találkozáskor gyorsan kifejti membránkárosító hatását. A Sal8 szalicilanilid valószínűleg más ponton gátolja a sejteket, citotoxikus és citosztatikus hatásának jelentkezéséhez több idő szükséges, feltételezhetően a korlátozott mértékű, lassabb sejtbejutása miatt.

20. táblázat: A Sal8 szalicilanilid és a Sal8-Aoa-OT20(4-pal) konjugátum *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatása (3 órás kezelés) MonoMac6 humán monocita és HepG2 humán hepatokarcinóma sejt vonalon

vegyület, konjugátum	MonoMac6 IC ₅₀ (µM) 3 óra		HepG2 IC ₅₀ (µM) 3 óra	
	citotoxicitás ^a	citosztázis ^b	citotoxicitás ^a	citosztázis ^b
Sal8	178,9 ± 15,8	184,3 ± 1,5	150,3*	177,5*
Sal8-Aoa-OT20(4-pal)	19,5 ± 0,8	19,8 ± 6,7	68,3 ± 4,2	78,4 ± 1,7

^a Citotoxikus hatás meghatározása 24 órás kezelést követően MTT-teszttel

^b Citosztatikus hatás meghatározása 24 órás kezelést, majd 72 órás továbbtenyésztést követően MTT-teszttel

* egy mérés eredménye

Vizsgáltuk a kiválasztott vegyületek *in vitro* citotoxikus hatását egér csontvelői makrofág sejteken (BMMΦ) 48 óra kezelést követően (21. táblázat). Ezek a primer sejtek is gazdasejt makrofág modellnek tekinthetők, tuftsinn receptorokkal a felszínükön [203]. A kiválasztott vegyületeknél az volt a szempont, hogy legyen köztük tetratuftsinn és monotuftsinn származék konjugátum, valamint spacer, illetve dekánsavat és palmitinsavat tartalmazó tetratuftsinn származék, hogy összehasonlíthassuk a

tuftsinegységek számának hatását, a spacer jelenlétének hatását, és a zsírsav oldallánc módosítás hatását. A szabad Sal8 szalicilanilid származék közepes citotoxikus hatást mutatott ezeken a sejteken (IC_{50} : 76,5 μ M), magas szelektivitási indexszel (10,2) a baktérium felé. A monotuftsin és a tetratuftsin származék konjugátumok (Sal8-Aoa-T5 és Sal8-Aoa-OT20) nem mutattak citotoxikus hatást a vizsgált legmagasabb koncentrációban (100 μ M), szelektivitási indexük 4,6, ill. 1,2 feletti. A GFLG spacer jelenléte enyhe citotoxikus hatás megjelenéséhez vezetett (IC_{50} : 92,1 μ M). A zsírsav oldallánc jelenléte szintén citotoxikus hatás megjelenéséhez vezetett, a Sal8-Aoa-OT20(4-dek) konjugátum közepes (IC_{50} : 71,9 μ M), a Sal8-Aoa-OT20(4-pal) konjugátum jelentős (IC_{50} : 20,4 μ M) citotoxikus hatást mutatott egér csontvelői makrofág sejteken. Így a szelektivitási indexük kedvezőtlen, 1 alatti.

21. táblázat: A Sal8 szalicilanilid és kiválasztott Sal8-tuftsin konjugátumok *in vitro* citotoxikus hatása egér csontvelői makrofág (BMM Φ) sejteken (48 órás kezelés) és szelektivitási indexük a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsen mért MIC értékekhez viszonyítva

vegyület, konjugátum ^a	citotoxicitás 48 óra ^b	
	BMM Φ IC_{50} (μ M)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^c
Sal8	76,5 \pm 5,1	10,2
Sal8-Aoa-OT20	>100	>1,2
Sal8-Aoa-GFLG-OT20	92,1 \pm 0,2	0,7
Sal8-Aoa-OT20(4-dek)	71,9 \pm 6,9	0,9
Sal8-Aoa-OT20(4-pal)	20,4 \pm 0,1	0,2
Sal8-Aoa-T5	>100	>4,6

^a A peptidek C-terminálisa amid formájú

^b Citotoxikus hatás meghatározása 48 órás kezelést követően MTT-tesztrel

^d Szelektivitási index, SI = IC_{50} (μ M)/MIC (μ M)

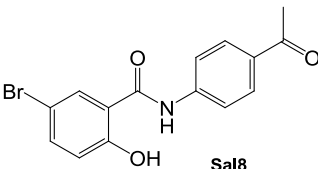
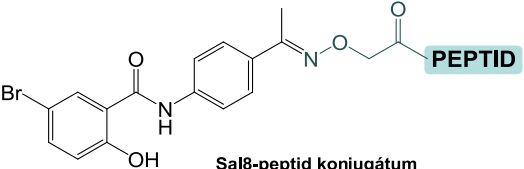
Vizsgáltuk a kiválasztott vegyületek *in vitro* citotoxikus hatását emberi köldökzsinór vénából preparált endotélsejteken (HUVEC, human umbilical vein endothelial cell), melyek nem tumoros, egészséges sejtek. Az endotélsejtek a vérerek belső falának alkotói, ha a hatóanyagokat intravénásan juttatjuk a szervezetbe, az endotélsejtekkel is kapcsolatba kerülhetnek. Továbbá a tuftsin kötődhet az endotélsejtek felszínén nagy számban előforduló neuropilin-1 receptorhoz [120, 121]. Ezért a vegyületek endotélsejtekre gyakorolt hatásának modellezésére HUVEC sejteket alkalmaztunk. A vegyületek kiválasztásának szempontja az volt, hogy össze tudjuk hasonlítani a tuftsinszármazékok hosszának és eltérő szekvenciájának, a spacer jelenlétének, a különböző hosszúságú zsírsav oldallánc módosításoknak, valamint egy konjugátumban két molekula hatóanyag jelenlétének hatását.

A HUVEC sejteken történő citotoxicitás meghatározást Dr. Cervenák László tudományos főmunkatárs és Debreczeni Márta Lídia PhD hallgató, a Semmelweis Egyetem, III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumának munkatársai végezték. A sejteket 24 órán át inkubálták a vegyületekkel, a

kezelést követően SYBR-Greenel [207] festették a sejteket és fluoreszcens mikroszkóp használatával a CellP program segítségével megszámlálták a sejtmagokat, mely adatokból az IC₅₀ értékek számolhatók. A citotoxicitás pontos megítélését nehezítette, hogy a vegyületek egy része kicsapódott az MCDB sejtenyésző médiumba, amely a kémiai tulajdonságaiban (a fehérjekoncentrációt kivéve) a vérplazmához hasonlít.

A kapott eredményeket a 22. táblázat tartalmazza. A Sal8 szalicilanilid származék enyhe citotoxikus hatást mutatott 119,0 µM IC₅₀ értékkel, szelektivitási indexe jó (SI: 15,9). A konjugátumok többsége és az Ac-OT20 kontroll peptid nem volt citosztatikus hatású a vizsgált legmagasabb koncentrációnál, 200 µM-nál sem. A Sal8-Aoa-OT20(4-pal) konjugátum esetében gyenge citotoxicitás volt tapasztalható 200 µM-nál, extrapolációval számolt IC₅₀ értéke 227,8 µM. Kezdődő citotoxicitás figyelhető meg a Sal8-Aoa-OT20(4-dek), a Sal8-Aoa-TKPPR-OH és a TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa) konjugátumok esetében. Összességében elmondható, hogy ez a sejttípus kevésbé érzékeny a szalicilanilidre és vizsgált konjugátumaira, mint a korábban bemutatott MonoMac6, BMMΦ és HepG2 sejtek.

22. táblázat: A Sal8 szalicilanilid és kiválasztott Sal8-peptid konjugátumok *in vitro* citotoxikus hatása emberi köldökzsínór vénából preparált endotélsejteken (HUVEC) (24 óra kezelés) és szelektivitási indexük a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyítva

vegyület, konjugátum ^a	HUVEC citotoxicitás 24 óra		
	IC ₅₀ (µM), morfológia ^b	IC ₅₀ (µM), fluoreszcens képanalízis ^c	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^d
 Sal8	100*	119,0 ± 29,0 ^f	15,9
 Sal8-peptid konjugátum			
Sal8-Aoa-OT20	>200**	>200	>2,5
Sal8-Aoa-GFLG-OT20	>200**	>200	>1,4
Sal8-Aoa-OT20(4-but)	>200**	>200	>3,2
Sal8-Aoa-OT20(4-dek)	>200**	>200 ^e	>2,6
Sal8-Aoa-OT20(4-pal)	200**	227,8 ± 32,9 ^f	2,5
TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa)	>200 ^{e**}	>200 ^e	>5,7
Sal8-Aoa-T5	>200	>200	>9,2
Sal8-Aoa-GFLG-T5	>200*	>200	>6,5
Sal8-Aoa-TKPPR-OH	>200	>200	>9,9
Sal8-Aoa-GFLG-TKPPR-OH	>200 ^{e*}	>200 ^e	>6,8
Ac-OT20	>200	>200	-

^a Az amid C-terminálisú konjugátumok kódjában nem jelöltem az amid formát. A karboxil C-terminálisú konjugátumoknál '-OH'-val jelöltem a karboxil formát

^b A sejtek állapotának fénymikroszkóppal történő értékelése alapján megállapított IC₅₀ érték

^c A rögzített képeken a SYBR-Greenel megfestett sejtmagok CellP programmal történő megszámlálása alapján megállapított IC₅₀ érték

^d Szelektivitási index, SI = IC₅₀ (µM)/MIC (µM)

^e Kezdődő citotoxicitás észlelhető

^f Extrapolációval számolt értékek

*, **: legkisebb kicsapódó koncentráció 100-200 µM között, ill. 7,4-22,4 µM között

4.3.2.5. Szalicilanilid-peptid konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatása fertőzött MonoMac6 sejteken

A konjugátumok extracelluláris baktériumok elleni aktivitása szükséges, de az is fontos, hogy sikeresen gátolni tudják az intracelluláris baktériumokat is, mivel a vizsgált mikobaktériumok intracelluláris patogének. Ahogy azt a 4.1.9.2. fejezetben bemutattam, a MonoMac6 sejteket fertőzhetjük a *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériummal, és az így kapott rendszer alkalmas, arra, hogy vizsgáljuk a konjugátumok aktivitását a monociták által fagocitált, intracelluláris baktériumok ellen. A szerkezet-hatás összefüggések alapján az intracelluláris baktériumot legeredményesebben gátló konjugátumokat kerestük.

A *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzsszel fertőzött MonoMac6 sejteket a szabad szalicilanilidek és a konjugátumok 125 µM-os és 250 µM-os oldatával kezeltük, 3 nap után friss oldatokkal megismételtük a kezelést. Újabb 3 nap eltelte után a sejteket lizáltuk, szilárd táptalajra oltottuk a lizátumot és újabb 4 hét eltelte után meghatároztuk a telepszámot (CFU).

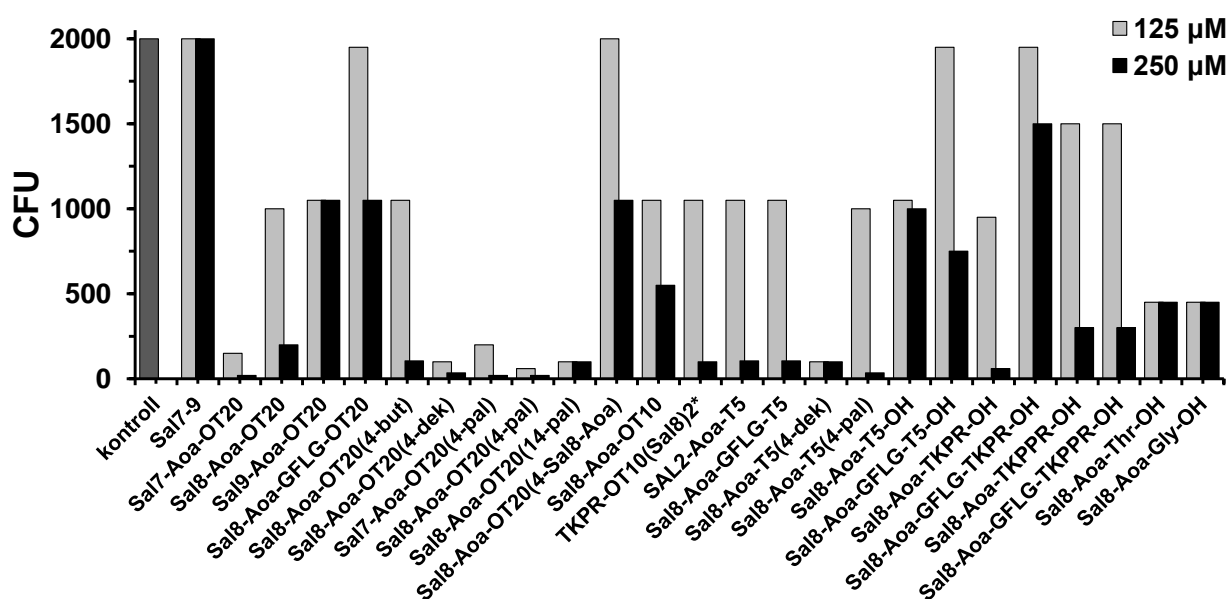
A szalicilanilidek és konjugátumaik gátló hatását az intracelluláris baktériumok ellen az 53. ábrán foglaltam össze. Negatív kontrollként kezeletlen fertőzött sejteket alkalmaztunk. Vizsgáltuk az INH hatását is, mely nem mutatott *in vitro* gátló hatást ezen a modellen 365 µM kezelési koncentrációnál sem [7].

Ahogy azt a 4.1.9.2. fejezetben bemutattam a szabad szalicilanilid származékok (Sal1-4, kezelési koncentráció: 140-300 µM) nem mutattak gátló hatást az intracelluláris baktériumok ellen. A konjugálható szalicilanilidek (Sal7-9) sem gátolták az intracelluláris baktériumot egyik vizsgált koncentrációnál sem. Ezzel ellentétben, mindegyik szalicilanilid-peptid konjugátum csökkentette a baktérium telepszámát a kezeletlen kontrollhoz képest, koncentrációfüggést mutatva.

Az OT20 konjugátumok közül a Sal7-Aoa-OT20 kiemelkedő aktivitást mutatott, mindkét kezelési koncentrációnál hatásosabb volt, mint a Sal8-Aoa-OT20 és a Sal9-Aoa-OT20. Viszont a Sal7-Aoa-OT20(4-pal) és a Sal8-Aoa-OT20(4-pal) esetében a gátló hatás nagyon hasonló volt. A tuftsinszármazékok hosszának szempontjából 125 µM kezelési koncentráció esetén nincs jelentős különbség a konjugátumok közt. A 250 µM-os koncentrációnál a monotuftsin Sal8-Aoa-T5 konjugátum volt a leghatásosabb, ezt követte a tetratuftsin Sal8-Aoa-OT20 konjugátum. A dituftsin Sal8-Aoa-OT10 esetén 5-ször nagyobb CFU értéket kaptunk, mint a Sal8-Aoa-T5 esetén. A legtöbb konjugátum esetén a GFLG spacer jelenlétének nem volt jelentős hatása az aktivitásra, viszont a Sal8-Aoa-TKPR-OH esetében a GFLG spacer jelenléte jelentősen csökkentette a Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH gátló hatását, 250 µM-nál 25-ször nagyobb CFU értéket kaptunk, mint a spacer nélküli változat esetében. 250 µM-nál a Sal8-Aoa-T5, melynek C-terminálisa amid formájú, 10-szer hatásosabb volt, mint a C-terminálison szabad karboxilcsoporttal rendelkező analógja, a Sal8-Aoa-T5-OH. Ugyanez a tendencia figyelhető meg ezen konjugátumok GFLG spaceret tartalmazó analógjai esetén is. A két szalicilanilid molekulát tartalmazó Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa) konjugátum kisebb aktivitást mutatott, mint a csak egy szalicilanilid molekulát tartalmazó Sal8-Aoa-OT20 konjugátum. A TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa), mely szintén két szalicilanilid molekulát tartalmaz, jobb gátló hatást mutatott, mint a Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa), és 250 µM koncentrációnál hatásosabb volt, mint a Sal8-Aoa-OT20 és a Sal8-Aoa-OT10 konjugátumok, viszont a Sal8-Aoa-TKPR-OH konjugátumnál gyengébben gátolta a baktériumokat.

A vajsav oldallánc módosítást tartalmazó Sal8-Aoa-OT20(4-but) konjugátum kissé hatásosabb volt, mint a zsírsav nélküli Sal8-Aoa-OT20 konjugátum. A dekánsav és palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó OT20 konjugátumok (Sal8-Aoa-OT20(4-dek), Sal7-Aoa-OT20(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(14-pal)) kimagasló aktivitást mutattak az intracelluláris baktériumok ellen mindkét vizsgált koncentrációnál. 250 μM kezelési koncentrációnál a Sal8-Aoa-OT20(4-pal) 5-ször kisebb CFU értéket eredményezett, mint a 14-es lizinen palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó izomerje, a Sal8-Aoa-OT20(14-pal). A T5 származékok esetében a zsírsavat tartalmazó konjugátumok, a Sal8-Aoa-T5(4-dek) és a Sal8-Aoa-T5(4-pal) szintén jobb aktivitást mutattak, mint a zsírsav nélküli Sal8-Aoa-T5 konjugátum. 125 μM koncentrációnál a dekanoil oldalláncot tartalmazó Sal8-Aoa-T5(4-dek) jobban gátolta a baktériumot, mint a palmitoil oldalláncot tartalmazó analógja, de 250 μM -nál ez az eredmény fordított. A Sal8-Aoa-OT20(4-dek) és Sal8-Aoa-OT20(4-pal) enyhén jobban gátolták az intracelluláris baktériumokat, mint a monotuftsint tartalmazó változataik, a Sal8-Aoa-T5(4-dek) és a Sal8-Aoa-T5(4-pal).

Érdekes módon, a lizoszomális emésztés során keletkező legkisebb metabolitok, a Sal8-Aoa-Thr-OH és a Sal8-Aoa-Gly-OH (4.3.2.6. fejezet) is gátló hatást mutattak az intracelluláris baktérium ellen. Mindkét koncentrációnál hasonlóan csökkentették a CFU-t, a kapott CFU értékek hasonlóak pl. a Sal8-Aoa-OT10, Sal8-Aoa-TKPPR-OH és Sal8-Aoa-GFLG-TKPPR-OH konjugátumok esetében kapottakkal (250 μM esetén).



53. ábra: A szalicilanilid származékok (Sal7-9) és a szalicilanilid-peptid konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatása *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériummal fertőzött MonoMac6 sejteken (intracelluláris modell)

* TKPR-OT10(Sal8)2 = TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa)

Ha összevetjük a vegyületek *in vitro* gátló hatását az intracelluláris baktériumok ellen és a vegyületek citosztatikus hatását a gazdasejt modell MonoMac6 sejteken, megállapíthatjuk, hogy azok a konjugátumok, melyek IC₅₀ értéke alacsonyabb, mint 125 μM , citosztatikusak lehetnek a fertőzött MonoMac6 sejteken az alkalmazott kezelési koncentrációnál (125 μM és 250 μM). A kezelés utáni mosási lépésnél a halott vagy csökkent életképességű sejteket, melyek baktériumot is tartalmazhatnak, eltávolíthatjuk, mely végül kisebb telepszámot eredményezhet. Viszont a szabad szalicilanilidek esetén, melyek erősen citosztatikusak a MonoMac6 sejtekre, IC₅₀ értékük 19 μM körüli, mégsem tapasztalunk

csökkenést a telepszámban. A szalicilanilid származékok elpusztíthatják a gazdasejtet, de a baktérium mégis életben marad. Ezért a konjugátumok aktivitása az intracelluláris baktériumok ellen nem tulajdonítható a gazdasejten tapasztalt citosztatikus hatásuk következményének. A konjugátumok gátló aktivitása valószínűleg a jobb intracelluláris hasznosulásuknak köszönhető, mely a jobb sejtbejutásuk eredménye a szabad hatóanyagokhoz képest.

4.3.2.6. Szalicilanilid-peptid konjugátumok lizoszomális degradációjának modellezése

A hatóanyag-peptid konjugátumok biológiai aktivitása kapcsolatban állhat a konjugátumok degradációjával, a hatóanyag intracelluláris felszabadulásával. A konjugátumok a sejtekbe bejutva az endoszóma-lizoszóma rendszerbe, majd lizoszómákba kerülve a savas környezetben (a lizoszómák kémhatása pH 4,5-5,0 körüli [106]) hidrolitikus enzimek hatására degradálódhatnak, kisebb metabolitok keletkezhetnek belőlük. Ezért vizsgáltam a szalicilanilid-peptid konjugátumok degradációját, illetve stabilitását lizoszóma modellezésére szolgáló patkány máj lizoszóma preparátumban, mely számos hidrolitikus enzimet tartalmaz. Arra voltam kíváncsi, hogy a hatóanyag milyen formában szabadul fel a konjugátumból, illetve a legkisebb, hatóanyagot tartalmazó metabolit milyen sebességgel keletkezik a különböző konjugátumok esetén, milyen szerkezeti elemek befolyásolják a konjugátum stabilitását. Ahogy ez a korábbi fejezetekben kiderült, a legkisebb metabolitok *in vitro* aktivitását a konjugátumok és a szabad szalicilanilid hatásával is össze kívántam hasonlítani.

A szalicilanilid-tuftsinszármazék konjugátumok stabilitását patkány máj lizoszóma preparátumban vizsgáltam HPLC-MS segítségével. A konjugátum – lizoszóma preparátum keverékekből 5 perc, 1, 2, 4, 8 és 24 óra után mintát vettem. Az LC-MS kromatogramok, tömegspektrumok és az azonosított fragmensek a Függelékben találhatóak (F33-48. ábrák). Az azonosított hasítási helyeket az 54. ábra mutatja be. Az azonosítás során segítséget jelentett, hogy a kisebb fragmensekből keletkező egyszeresen vagy kétszeresen töltött ionoknál megfigyelhető volt a brómra jellemző izotópeloszlás. A kisebb fragmenseknél az oximkötés miatti *E* és *Z* izomerek elváltak az alkalmazott kromatográfiás körülmények közt, dupla csúcsot eredményezve.

A legkisebb metabolit, mely tartalmazta a Sal8 szalicilanilid hatóanyagot egy aminosavból és a hozzá oximkötéssel kapcsolódó szalicilanilidből állt (55. ábra). Sal8-Aoa-Thr-OH szabadult fel a spacer nélküli konjugátumokból (Sal8-Aoa-OT20, Sal8-Aoa-OT20(4-dek), Sal8-Aoa-OT20(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(14-pal), Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa), Sal8-Aoa-OT10, Sal8-Aoa-T5, Sal8-Aoa-T5(4-dek), Sal8-Aoa-T5(4-pal), Sal8-Aoa-T5-OH, Sal8-Aoa-TKPR-OH, Sal8-Aoa-TKPPR-OH), Sal8-Aoa-Gly-OH szabadult fel a GFLG spacer tartalmazó konjugátumokból (Sal8-Aoa-GFLG-OT20, Sal8-Aoa-GFLG-T5), és H-Lys(Sal8-Aoa)-OH szabadult fel azokból a konjugátumokból, melyeknél a hatóanyag a lizin ϵ -aminocsoportján keresztül kapcsolódott (Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa), TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa)). A Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa) konjugátumból Sal8-Aoa-Thr-OH és H-Lys(Sal8-Aoa)-OH is keletkezett. Az oximkötés stabilnak bizonyult ilyen lizoszomális körülmények között, nem azonosítottam az oximkötés hidrolízisével felszabaduló Sal8 szalicilanilidet.

A spacer nélküli TKPKG származékok esetében (Sal8-Aoa-OT20, Sal8-Aoa-OT20(4-dek), Sal8-Aoa-OT20(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(14-pal), Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa), Sal8-Aoa-OT10, Sal8-Aoa-T5, Sal8-Aoa-T5(4-dek), Sal8-Aoa-T5-OH) az első hasítási helyek 5 perc után megfigyelhetőek voltak a Gly mellett, a -Lys-Gly- és a -Gly-Thr- peptidkötések hasadtak. Egy óra elteltével a hidrolízis tovább

folytatódott, az OT20 származékok esetében az intakt konjugátumnak már csak egy kis része volt észlelhető, és 2 óra után már nem volt intakt konjugátum a mintában a Sal8-Aoa-OT20(4-pal) kivételével. A Sal8-Aoa-OT20(4-pal) esetében a degradáció jóval lassabban történt, így több hasítási hely is megfigyelhető volt. Az intakt Sal8-Aoa-OT20(4-pal) konjugátum még 24 óra után is megtalálható volt kis mennyiségben. A palmitinsav oldallánc a 4-es helyzetben lassította a konjugátum hidrolízisét, míg abban az esetben, amikor a palmitinsav oldallánc a 14-es lizinen található, az oldalláncnak nem volt jelentős hatása a hidrolízis sebességére. A két szalicilanilid molekulát tartalmazó Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa) esetében a H-Lys(Sal8-Aoa)-OH fragmenset alkotó 4-es lizin és a hozzá kapcsolódó Sal8 hamarabb felszabadult, mint az N-terminális aminosav hidrolízisével keletkező Sal8-Aoa-Thr-OH fragmens.

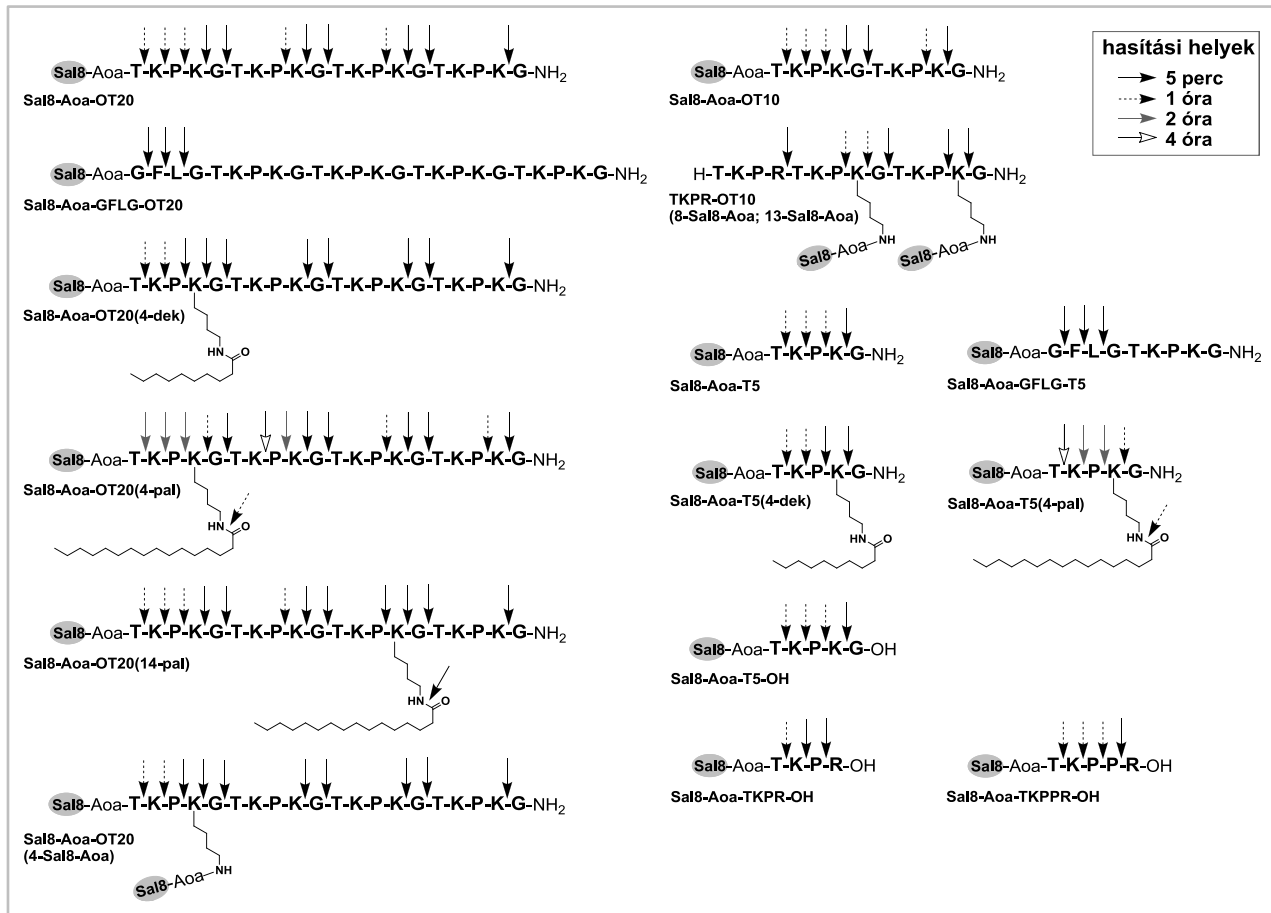
A Sal8-Aoa-OT10 dituftsin konjugátum lebomlása lassabban történt, mint a Sal8-Aoa-OT20 tetra tuftsin konjugátumé, az intakt Sal8-Aoa-OT10 konjugátum még 24 óra után is megfigyelhető, a legintenzívebb fragmens 24 óra után pedig a Sal8-Aoa-T5-OH fragmens volt. A Sal8-Aoa-T5 és a Sal8-Aoa-T5-OH monotuftsin konjugátumok esetén a lebomlási folyamat megegyezik, a hidrolízis sebessége lassú, mindkét esetben 24 óra után az intakt konjugátum a legintenzívebben megjelenő komponens. A palmitoil oldallánccal rendelkező Sal8-Aoa-T5(4-pal) esetében is hasonlóan lassú a hidrolízis, mint a zsírsav oldallánc nélküli Sal8-Aoa-T5 konjugátumnál. A dekanoil oldallánc jelenléte okozta a legszembetűnőbb különbséget a T5 monotuftsin konjugátumok degradációja között. A Sal8-Aoa-T5 és Sal8-Aoa-T5(4-pal) konjugátumokkal ellentétben a dekánsav oldallánc módosítást tartalmazó Sal8-Aoa-T5(4-dek) esetében a konjugátum teljesen elhidrolizált 2 óra után. A Sal8-Aoa-OT20(4-dek) és Sal8-Aoa-T5(4-dek) esetében a ⁻³Pro-⁻⁴Lys(dek)- kötés hidrolízise már 5 perc után bekövetkezett. A dekánsav tartalmú konjugátumok degradációja gyorsabb volt, mint az analóg konjugátumoké, vagyis a dekánsav jelenléte felgyorsította a konjugátum hidrolízisét. Palmitinsav vesztés (a Lys ε-aminocsoportja és a palmitinsav karboxilcsoportja között kialakított amidkötés hidrolízise) megfigyelhető a palmitinsav oldallánccal rendelkező konjugátumoknál, viszont dekánsav vesztés nem volt tapasztalható.

A két hatóanyagot tartalmazó TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa) konjugátum esetében a szalicilanilidet tartalmazó elméletileg lehetséges fragmensek száma igen nagy. A legkisebb fragmens (H-Lys(Sal8-Aoa)-OH) kis mennyiségben már 5 perc után detektálható, ez a fragmens a 13-as lizin és a hozzá konjugált szalicilanilidből származik. Szintén 5 perc után detektálható még a treonin melletti ⁻⁴Arg-⁻⁵Thr- és ⁻⁹Gly-⁻¹⁰Thr- kötések hidrolízise. Ezután a legkisebb fragmens mennyisége folyamatosan nő, 24 óra után egyéb fragmenseket már csak nagyon kis mennyiségben tartalmazott a minta.

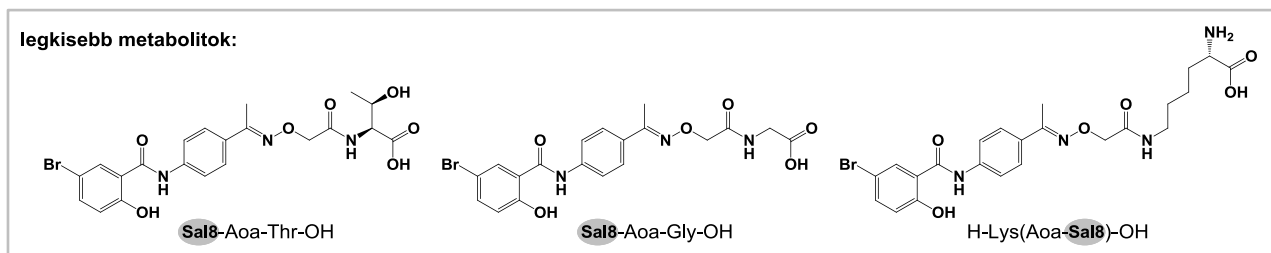
A Sal8-Aoa-TKPR-OH konjugátumok esetén az 5 perc után észlelhető hasítási helyek a ⁻³Pro-⁻⁴Arg- és a ⁻²Lys-⁻³Pro- peptidkötések hidrolízise. 24 óra után az intakt konjugátum kis mennyiségben még megtalálható volt, a fő fragmensek a Sal8-Aoa-TK-OH és a Sal8-Aoa-Thr-OH metabolitok voltak. A konjugátum két prolint tartalmazó analógja, a Sal8-Aoa-TKPPR-OH esetében az 5 perc után észlelhető hasítási hely a ⁻⁴Pro-⁻⁵Arg- közötti peptidkötés hidrolízise. Az így keletkező Sal8-Aoa-TKPP-OH fragmens meglehetősen stabilnak bizonyult a lizoszomális enzimekkel szemben, 24 óra után is ez a legintenzívebb fragmens, ennek csak egy kis része hidrolizált el kisebb metabolitokra.

A GFLG spacer tartalmazó konjugátumok esetében (Sal8-Aoa-GFLG-OT20, Sal8-Aoa-GFLG-T5) a lizoszomális enzimek hatására elsősorban a távtartó egység hasadása következett be, 5 perc után a ⁻¹Gly-⁻²Phe-, ⁻²Phe-⁻³Leu- és ⁻³Leu-⁻⁴Gly- peptidkötések hasadása volt észlelhető. Két óra elteltével már nem volt intakt konjugátum, 5 perc és 8 óra között a Sal8-Aoa-GF-OH fragmens kis mennyiségben még észlelhető volt, 24 óra után már csak a legkisebb metabolit, a Sal8-Aoa-Gly-OH volt detektálható. A

várnak megfelelően [153] az enzimlabilis GFLG spacer jelenléte jelentősen növelte a konjugátumok degradációjának sebességét.



54. ábra: A Sal8-peptid konjugátumok lizoszomális degradációja során megfigyelt hasítási helyek



55. ábra: A Sal8-peptid konjugátumok lizoszomális degradációja során keletkező legkisebb, hatóanyagot tartalmazó metabolitok

4.3.3. A szalicilanilid származékok peptidkonjugátumaival kapcsolatos eredmények összefoglalása és értékelése

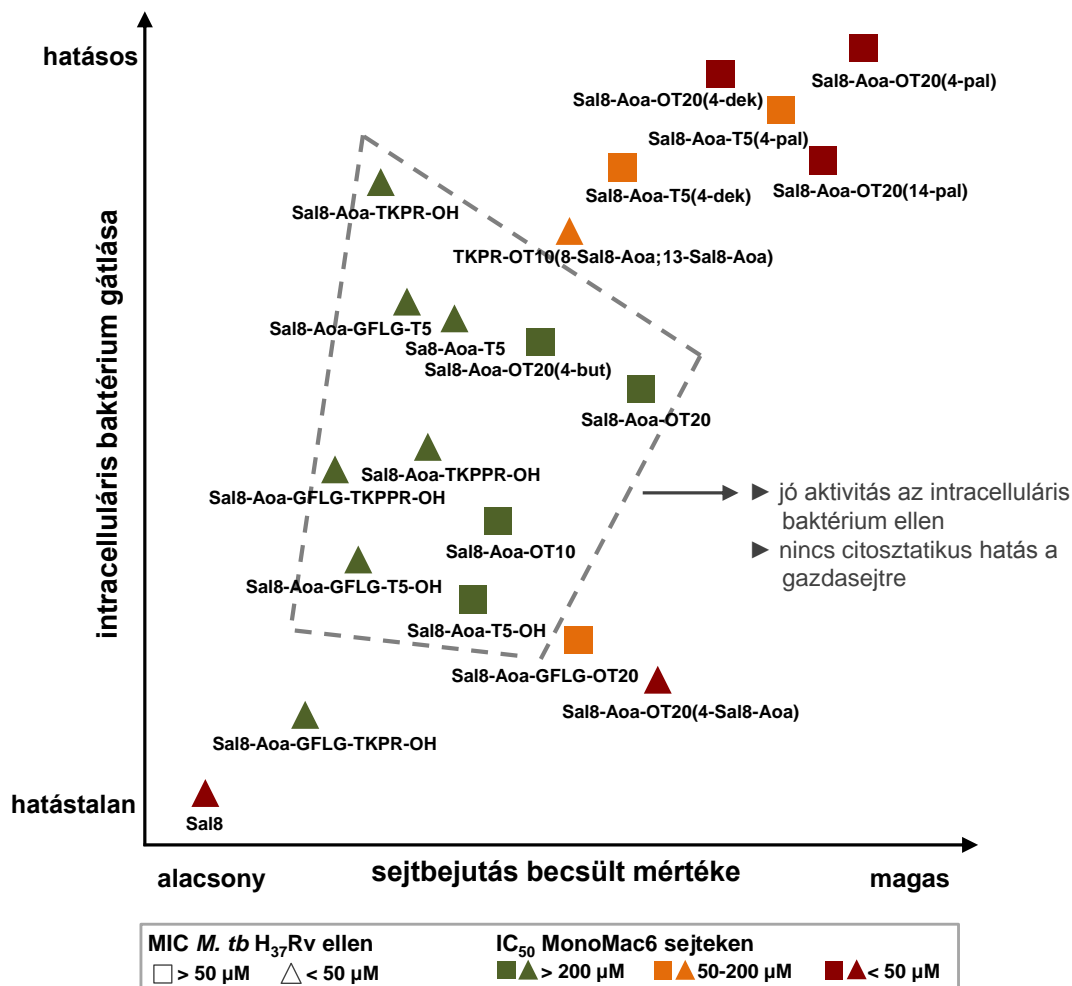
A szalicilanilid-4-formilbenzoát észterek peptidkonjugátumai (SalBenz1-3-Aoa-OT20 konjugátumok) kiváló *in vitro* antimikobakteriális aktivitással rendelkeztek az extracelluláris baktériumok ellen, MIC értékük *M. abscessus* ellen 7,7-15,6 μM közötti, *M. tuberculosis* H₃₇Rv ellen pedig 0,8-1,9 μM közötti. Viszont ezek a konjugátumok jelentős citotoxikus és citosztatikus hatást mutattak a gazdasejt modell MonoMac6 sejteken. Az *in vitro* antimikobakteriális aktivitás és a citotoxikus ill. citosztatikus hatás a konjugátumból az észterkötés gyors hidrolízisével felszabaduló szalicilanilideknek tulajdonítható, mivel a konjugátumok nem stabilak a kísérleti körülmények között, ezért ezeket a vegyületeket nem vizsgáltuk tovább.

A szalicilanilid-peptid konjugátumokban (Sal7-9 peptidkonjugátumai) a szalicilanilidek *in vitro* antimikobakteriális hatása többnyire megőrződik oximkötés kialakítása mellett. Gátolták az extracelluláris *M. tuberculosis* H₃₇Rv (MIC 20,3 μM -tól), a *M. tuberculosis* A8 MDR (MIC 73,5 μM -tól) és a *M. abscessus* (MIC 40,8 μM -tól) baktériumtörzseket.

A Sal8-peptid konjugátumok *in vitro* aktivitását hasonlítottam össze az 56. ábrán. A konjugátumokat a becsült sejtbejutási mértékük és az intracelluláris baktérium elleni gátló hatásuk eredményessége alapján ábrázoltam, továbbá jeleztem az extracelluláris *M. tuberculosis* H₃₇Rv elleni hatékonyságukat és a gazdasejten mért citosztatikus hatásukat is. A konjugátumok közt vannak olyanok, melyek minimális gátló koncentrációja csak kissé volt magasabb, mint a szabad szalicilanilidé, és ezeknek a konjugátumoknak nem volt citosztatikus hatása a gazdasejt modell MonoMac6 sejteken. Közös jellemzője ezeknek a konjugátumoknak, hogy egy tuftsinegységet tartalmaznak, spacerrel vagy anélkül: Sal8-Aoa-T5, Sal8-Aoa-GFLG-T5, Sal8-Aoa-T5-OH, Sal8-Aoa-GFLG-T5-OH, Sal8-Aoa-TKPR-OH, Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH, Sal8-Aoa-TKPPR-OH, és Sal8-Aoa-GFLG-TKPPR-OH (56. ábra, zöld háromszög).

A *M. tuberculosis* intracelluláris baktérium, ezért jelentős az az eredmény, hogy mindegyik konjugátum képes volt gátolni a baktériumot a fertőzött monocitákon, míg a szabad szalicilanilid származékok nem mutattak gátló hatást. A konjugátumok intracelluláris gátló hatása valószínűleg a jobb sejten belüli hasznosulásuknak köszönhető, mely a nagyobb internalizációjuk eredménye a szabad hatóanyagokhoz képest. A konjugátumok sejtbejutásának mértékére a fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok sejtbejutási eredményeiből (4.2.6. fejezet) lehet következtetni. A legtöbb konjugátum esetében az intracelluláris baktérium elleni gátló hatás növekszik a becsült internalizációs képesség növekedésével (56. ábra). Sajnálatos módon azok a konjugátumok, melyeknek a sejtbejutása és az intracelluláris gátló hatása a legnagyobb lehet, erős vagy közepes citosztatikus hatással rendelkeztek. Ezekben a konjugátumokban közös, hogy dekánsav vagy palmitinsav oldallánc módosítást tartalmaznak, mely lipofilebbé teszi a molekulát (Sal8-Aoa-OT20(4-dek), Sal8-Aoa-OT20(4-pal), Sal8-Aoa-OT20(14-pal), Sal8-Aoa-T5(4-dek), Sal8-Aoa-T5(4-pal)). Ezeknél a vegyületeknél érdemes lehet megpróbálni a konjugátumok nanorészecskébe csomagolását. A hidrofób rész jelenléte a molekulában segíthet növelni a csomagolás hatékonyságát, illetve a nanorészecskébe csomagolással lehet, hogy csökkenthető a palmitinsavas konjugátumok sejtmembrán károsító hatása. A Sal8-Aoa-T5(4-dek) dekánsavat tartalmazó monotuftsinszármazék konjugátumnak közepes citosztatikus hatása van, viszont kimagasló gátló hatással rendelkezik az intracelluláris baktérium ellen és a becsült sejtbejutása is jelentős, így ez a konjugátum kedvező jelölt lehet a további vizsgálatokban. A legtöbb konjugátum, mely nem mutatott

citosztatikus hatást és kimagasló, vagy megfelelő *in vitro* antimikobakteriális hatása volt az extracelluláris baktérium ellen, jó gátló hatással rendelkezett az intracelluláris baktérium ellen is (56. ábra, bekeretezett konjugátumok). Ezek a konjugátumok szelektívnek tekinthetők a baktérium felé, közülük a legígéretesebbek a Sal8-Aoa-T5, Sal8-Aoa-GFLG-T5 és a Sal8-Aoa-TKPR-OH monotuftsinn származékok, melyek leghatásosabban gátolták az intracelluláris baktériumot.



56. ábra: A Sal8 és a Sal8-peptid konjugátumok *in vitro* aktivitásának „térképe”: a sejtbejutás becsült mértéke MonoMac6 sejtekbe és az intracelluláris baktérium elleni gátló hatás korrelációja, az extracelluláris *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktérium elleni aktivitással és a MonoMac6 gazdasejt modellen való citosztatikus hatással együtt ábrázolva

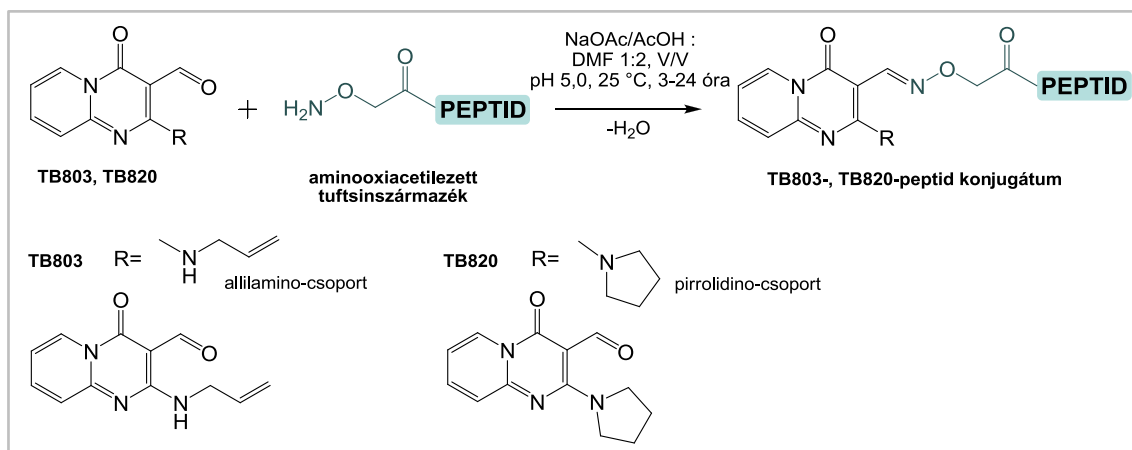
A patkány máj lizoszóma preparátumban a GFLG spacer tartalmazó konjugátumok esetén képződött a leggyorsabban a legkisebb, hatóanyagot tartalmazó metabolit a vártan megfelelően (1 óra alatt közel teljes hidrolízis). Valószínűleg ezzel magyarázható a GFLG spacer tartalmazó szalicilanilid-peptid konjugátumok citosztatikus hatása HepG2 humán hepatóma sejteken, a spacer nem tartalmazó analóg konjugátumokkal szemben, melyek nem mutattak citosztatikus hatást 24 óra kezelési idő mellett. Feltételezhető továbbá, hogy a legkisebb, szalicilanilidet tartalmazó metabolitnak a sejten belül kell felszabadulnia a citosztatikus hatás kifejtéséhez, mivel a legkisebb metabolitok nem voltak citosztatikus hatásúak a sejteken a közvetlen, 24 órás kezelést követően. Valószínűsíthető, hogy ezek a fragmensek önmagukban csak kis mértékben jutnak be a sejtekbe, vagy más sejt-kompartimentumba kerülnek, mint a konjugátumok. Viszont mind az extracelluláris, mind az intracelluláris *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumot

képesek voltak gátolni közepes hatékonysággal. Ennek a jelenségnek a magyarázatához érdemes lehet a jövőben a szabad szalicilanilid, a fragmensek, és a konjugátumok sejtbejutását vizsgálni extrahálást követő LC-MS módszerrel (5.2.8. fejezet).

A konjugátumban a dekánsav jelenléte növelte, míg a palmitinsav jelenléte (4-es pozícióban) csökkentette a hidrolízis sebességét a lizoszóma preparátumban. A rövidebb peptidet tartalmazó konjugátumok stabilitása nagyobb volt, mint a hosszabbat tartalmazóké. A konjugátumok lizoszomális emésztése során tapasztalt stabilitási különbségekkel és a legkisebb metabolit felszabadulásának sebességével nem áll kapcsolatban a konjugátumok intracelluláris gátló hatásának különbsége. Ez az alkalmazott intracelluláris modell rendszer nem elég érzékeny ahhoz, hogy lássuk a lizoszomális degradációban észlelt különbségek hatását.

4.4. Az *in silico* azonosított hatóanyagok peptidkonjugátumainak előállítása, kémiai és *in vitro* biológiai jellemzése

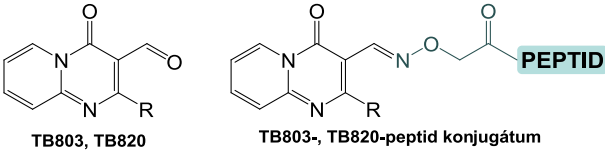
Az *in silico* azonosított, majd kémiailag optimált hatóanyagjelöltek, a piridopirimidin származékok (kódjuk: TB803 és TB820) *in vitro* antituberkulotikus hatással rendelkeznek *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön [100]. A TB803 és TB820 olyan piridopirimidin származékok, melyek aldehidcsoportot tartalmaznak, melyen keresztül oximkötéssel valósítható meg a konjugálás az aminoszárnyalozott tuftsinszármazékokhoz. A konjugálási reakciót NaOAc/AcOH puffer (pH 5,0) és DMF elegyében szobahőmérsékleten végeztem, a reakcióelegyet 3-24 órán át kevertetem, és analitikai RP-HPLC-vel követtem a reakció előrehaladását (57. ábra). A konjugátumokat félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, majd analitikai RP-HPLC-vel és tömegspektrométerrel analizáltam. A konjugátumok sematikus szerkezete a Függelék F49. ábráján látható. A konjugálásra használt peptideket a 4.2. fejezetben bemutatott tuftsinszármazékok közül választottam, melyek közt van tetra tuftsin származék (Aoa-OT20), és ennek oldalláncon palmitinsavval acilezett változata (Aoa-OT20(4-pal)), dituftsin származék (Aoa-OT10), és heterotrimer tuftsinszármazék (TKPR-OT10(8-Aoa; 13-Aoa)), melynek két funkcionálizálható csoportja van két lizin ε-aminocsoportján. Vizsgálni kívántam a peptid hosszának, a palmitinsav, illetve két hatóanyagmolekula jelenlétének hatását.



57. ábra: A piridopirimidin származékok konjugálása tuftsinszármazékokhoz

A 23. táblázatban foglaltam össze az előállított TB803- és TB820-peptid konjugátumok analitikai jellemzését. Minden tisztított konjugátum az analitikai RP-HPLC alapján megfelelően tisztának bizonyult, egy csúccsal rendelkezett, a tömegspektrometriai méréseknél a várt és a mért tömegek megegyeztek. A konjugátumokat aminoszárnyalozással is jellemeztük, a kapott eredmények minden esetben jó egyezést mutattak a vizsgált peptid elméleti aminoszárnyalozással.

23. táblázat. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak kémiai jellemzése

			
vegyület, konjugátum ^a	R	Rt / perc ^b	M _{av/mo} szám / M _{av/mo} mért ^c
TB803	allilamino	24,5	229,2 / 229,2
TB820	pirrolidino	23,0	243,3 / 243,3
TB820-Aoa-OT20	pirrolidino	19,4	2361,8 / 2362,1
TB820-Aoa-OT20(4-pal)	pirrolidino	24,1	2600,2 / 2600,7
TB803-Aoa-OT10	allilamino	20,0	1324,5 / 1325,0
TB820-Aoa-OT10	pirrolidino	19,6	1338,6 / 1338,9
TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa)	allilamino	21,4	2091,4 / 2091,8
TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)	pirrolidino	21,2	2119,4 / 2119,6

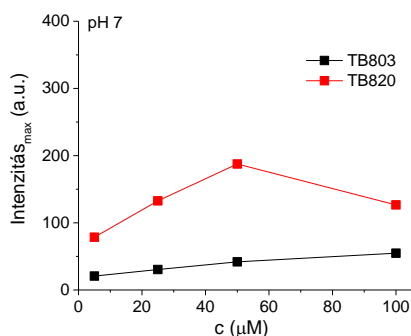
^a A konjugátumok C-terminálisa amid formájú

^b Retenciósi idő (Exformma HPLC, Zorbax SB-C18 oszlop (5 µm, 100 Å, 4,6 mm x 150 mm); gradiens: 0-10 perc 0% B, 10-30 perc 0-90% B, eluensek: A: 0,1% TFA, víz (V/V), B: 0,1% TFA, acetonitril/víz 80:20 (V/V); folyássebesség: 1 mL/perc; detektálás: 220 nm

^c Számolt és mért átlagos (M>600) vagy monoizotópos (M<600) molekulatömeg (Bruker Esquire 3000+ ESI-MS)

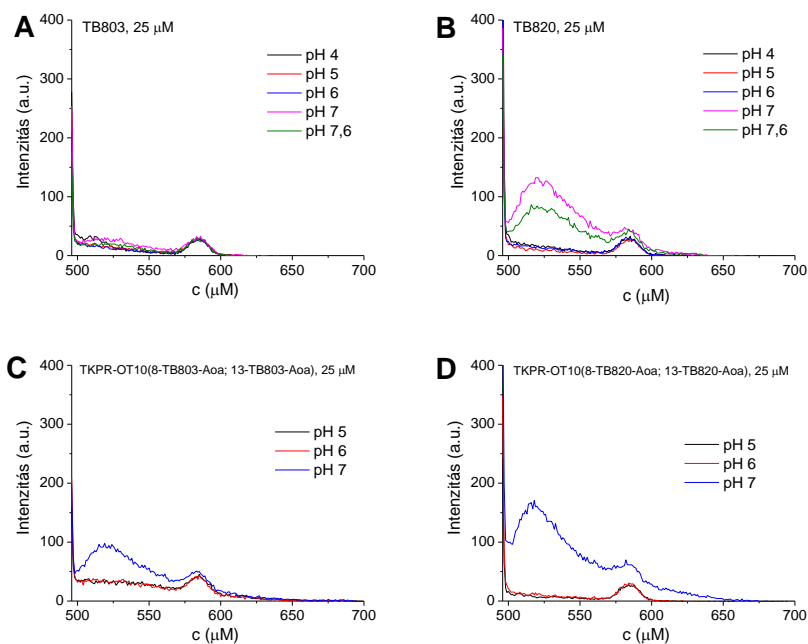
4.4.1. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak fluoreszcencia tulajdonságai

A sejtbejutási vizsgálatot megelőzően vizsgáltam a TB803, a TB820 és konjugátumaiknak fluoreszcencia tulajdonságait. Az áramlási citometriás mérés során alkalmazott 488 nm hullámhosszú gerjesztő fényt alkalmaztam. Ezeknek a piridopirimidin származékoknak ezen a hullámhosszon nagyon alacsony a fluoreszcenciája, így a mérések során magas detektorfeszültséget állítottam be (1000 V). Vizsgáltam a TB803 és a TB820 emissziós maximumánál a fluoreszcencia intenzitás koncentrációfüggését, hogy kiválaszthassam a legalkalmasabb koncentrációt a pH-függés vizsgálatokhoz. A kocentrációfüggést pH 5 és pH 7 értékeknél vizsgáltam, itt csak a pH 7-nél mért értékeket mutatom be, mivel pH 5-nél nincs jelentős fluoreszcenciája a vegyületeknek az alkalmazott koncentrációtartományban (5-100 µM). A vegyületeknek két emissziós maximuma van ($\lambda_{em\ max1}$: 520 nm, és $\lambda_{em\ max2}$: 585 nm). Az 520 nm-en mért fluoreszcencia intenzitás jelentősebb mértékben változott a körülmények változtatásával, ezért a fluoreszcencia intenzitásváltozást ennél a hullámhossznál vizsgáltam. A TB803 fluoreszcencia intenzitása 520 nm-en a vizsgált koncentrációtartományon belül a koncentráció növekedésével enyhén nőtt, nem tapasztaltam „self-quenching” általi intenzitás csökkenést. A TB820 esetén a legmagasabb koncentráció, ahol „self-quenching” még nem észlelhető 50 µM volt (58. ábra). Mivel a koncentráció növelésével csak kis mértékben nőtt a vegyületek fluoreszcencia intenzitása λ_{em} =520 nm-en, így gazdaságosabb volt alacsonyabb koncentrációt választani a pH-függés mérésére. Ezért a vegyületek és a konjugátumok fluoreszcencia intenzitásának pH-függését 25 µM-os koncentrációnál vizsgáltam.



58. ábra: A TB803 és TB820 fluoreszcencia intenzitásának változása ($\lambda_{em}=520$ nm) a koncentráció függvényében pH 7-nél ($\lambda_{ex}=488$ nm, $U_{det}=1000$ V)

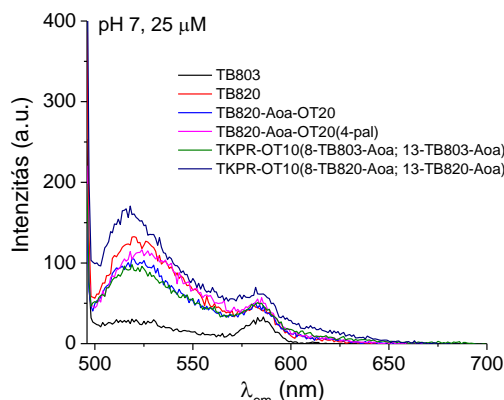
A TB803 esetében nem tapasztalható a fluoreszcencia intenzitásának pH-függése (59.A. ábra). A TB820 vegyületnél a legnagyobb fluoreszcencia intenzitás pH 7-nél detektálható, pH 7,6-nál az intenzitás csökkenése tapasztalható. Az 520 nm-nél tapasztalható fluoreszcencia intenzitás drasztikusan lecsökken pH 4 és 6 között (59.B. ábra). A konjugátumok esetén fluoreszcencia intenzitás szintén pH 7-nél figyelhető meg, ez alatti értéknél szintén jelentősen csökken az intenzitás (59.C. és D. ábra).



59. ábra: (A) A TB803, (B) a TB820, (C) a TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa), és (D) a TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa) konjugátum fluoreszcencia vizsgálata a pH függvényében 25 μM koncentrációnál, ($\lambda_{ex}=488$ nm, $U_{det}=450$ V)

A vegyületek és a konjugátumok fluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása pH 7-nél a 60. ábrán látható. A két molekula hatóanyagjelöltet tartalmazó konjugátumok (TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa), és TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)) fluoreszcencia intenzitása enyhén nagyobb, mint a szabad hatóanyagjelöltké. A TB820-Aoa-OT20 és a TB820-Aoa-OT20(4-pal) esetében a fluoreszcencia intenzitás a szabad TB820-hoz hasonló. A palmitinsavnak nincs fluoreszcencia-kioltó

hatása a TB820 molekulára. A vegyületek alacsony fluoreszcencia intenzitását az áramlási citométerrel történő sejtbejutási kísérletek értelmezésénél figyelembe kell venni.



60. ábra: A piridopirimidin származékok és konjugátumok pH 7-nél mért fluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása 25 μM koncentrációnál ($\lambda_{\text{ex}}=488 \text{ nm}$, $U_{\text{det}}=1000 \text{ V}$)

4.4.2. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak MIC értékének meghatározása

A piridopirimidin-peptid konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatását is vizsgáltuk *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzsön (extracelluláris modell), hogy kiderítsük, a hatóanyagjelöltek megőrzik-e antimikobakteriális hatásukat a konjugátumokban (24. táblázat).

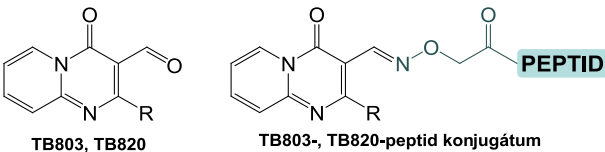
A TB803 és TB820 hatóanyagjelöltek alacsony MIC értéknél gátolták a baktériumot (4,4, ill. 4,1 μM). Ez a gátló hatásuk a konjugátumokban is megmaradt az oximkötés kialakítása mellett, viszont a konjugátumok a gátló hatást valamivel magasabb MIC értéknél fejtették ki (9,4-38,2 μM).

A TB803 konjugátumai, a TB803-Aoa-OT10 dituftsin származék és a két hatóanyagot tartalmazó TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) heterotrimer tuftsinszármazék MIC értékei közel azonosak voltak (30,2, ill. 38,2 μM), ezek az értékek 7-9-szer nagyobbak, mint a szabad TB803 vegyületé. Ha ezeknek a konjugátumoknak a hatását a hatóanyagtartalomra számított MIC értékek szempontjából vizsgáljuk, akkor azt állapíthatjuk meg, hogy az egy hatóanyagot tartalmazó TB803-Aoa-OT10 konjugátum 2,5-szer hatásosabb volt a két hatóanyagot tartalmazó TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) konjugátumnál, ebben az esetben nem volt előnye annak, hogy a konjugátum két hatóanyagot tartalmazott.

A TB820 konjugátumai esetén, a TB820-Aoa-OT20 tetratuftsin származék és a TB820-Aoa-OT10 dituftsin származék hasonló MIC értékeknél hatottak (33,9, ill. 29,9 μM), ezek az értékek körülbelül 8-szor nagyobbak, mint a TB820 vegyületé. A palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó OT20 származék, a TB820-Aoa-OT20(4-pal) a zsírsav nélküli analóghoz (TB820-Aoa-OT20) képest feleakkora koncentrációnál volt aktív a baktérium ellen, MIC értéke 15,4 μM . A TB820 konjugátumok közül a két hatóanyagot tartalmazó TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa) konjugátum kiemelkedő gátló hatással rendelkezett, az összes konjugátum közül e konjugátum MIC értéke a legalacsonyabb, 9,4 μM volt. Ha a konjugátumok hatását a hatóanyagtartalomra számított MIC értékek szempontjából vizsgáljuk, akkor azt kapjuk, hogy a TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa) konjugátumon kívül a TB820-Aoa-OT20(4-pal) konjugátum is kiemelkedő aktivitással rendelkezett, sőt ebből a szempontból ez a konjugátum volt a leghatásosabb (hatóanyagtartalomra számított MIC értéke: 3,7 $\mu\text{g/mL}$).

Az azonos peptidet, de különböző hatóanyagot tartalmazó konjugátumok összehasonlításánál megállapíthatjuk, hogy az OT10 származékok (TB803-Aoa-OT10 és TB820-Aoa-OT10) közt nem volt jelentős hatásbeli különbség. A két hatóanyagot tartalmazó heterotrimer származékoknál viszont szembeutóbb különbséget figyelhetünk meg. A TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa) konjugátum 4-szer hatásosabb volt a TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) analógnál.

24. táblázat: A piridopirimidin származékok és peptidkonjugátumaik *in vitro* antimikobakteriális hatása *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön

 TB803, TB820 TB803-, TB820-peptid konjugátum		<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv			
vegyület, konjugátum ^a	R	MIC ^b	MIC _{HT} ^c	MIC	CFU ^d
		γ (μg/mL)	(μg/mL)	(μM)	
TB803	allilamino	1,0	1,0	4,4	3
TB820	pirrolidino	1,0	1,0	4,1	7
TB820-Aoa-OT20	pirrolidino	80	8,2	33,9	8
TB820-Aoa-OT20(4-pal)	pirrolidino	40	3,7	15,4	3
TB803-Aoa-OT10	allilamino	40	6,9	30,2	10
TB820-Aoa-OT10	pirrolidino	40	7,3	29,9	1
TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa)	allilamino	80	17,5	38,2	2
TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)	pirrolidino	20	4,6	9,4	3

^a A konjugátumok C-terminálisa amid formájú

^b MIC meghatározása Sula félszintetikus médiumban (pH 6,5) 4 hét inkubálás után

^c MIC_{HT}: a konjugátumok esetén a hatóanyagtartalomra számolt MIC értékek, MIC_{HT} (μg/mL) = (MIC (μM) × M_{av}TB8X (g/mol) × n) / 1000, ahol M_{av}TB8X: piridopirimidin származék moláris tömege; n: piridopirimidin származék molekulák száma a konjugátumban

^d CFU meghatározása Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon 4 hét további inkubálás után

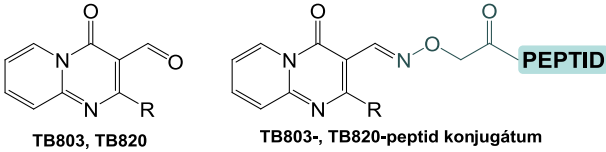
4.4.3. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak *in vitro* citosztatikus hatása

Vizsgáltuk a piridopirimidin-peptid konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását a gazdasejt modell MonoMac6 humán monocita sejteken 24 óra kezelést követően. Meghatároztuk a vegyületek szelektivitási indexét (SI) a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyítva (25. táblázat).

A vegyületek szelektívnek tekinthetők a baktérium felé, mivel sem a hatóanyagjelöltek, sem a konjugátumok nem voltak citosztatikus hatásúak a MonoMac6 sejtekre a vizsgált legmagasabb koncentrációig (200 μM) a palmitoil oldalláncot tartalmazó konjugátum (TB820-Aoa-OT20(4-pal)) kivételével. A TB820-Aoa-OT20(4-pal) rendkívül alacsony IC₅₀ értékkel rendelkezett (4,5 μM). A palmitinsav ebben az esetben is jelentősen módosította a konjugátum citosztatikus hatását, mint ahogy azt a kontroll peptid (Ac-OT20(4-pal), IC₅₀: 26,6 μM) és a szalicilanilid konjugátumok (pl. Sal8-Aoa-OT20(4-pal), IC₅₀: 16,5 μM) esetében is tapasztaltuk.

A hatóanyagjelöltek szelektivitási indexe 45 feletti, a konjugátumoké pedig 5 feletti, a palmitinsavas származék kivételével, melynek szelektivitási indexe 1 alatti.

25. táblázat: A piridopirimidin származékok és peptidkonjugátumaik *in vitro* citotoxikus hatása MonoMac6 humán monocita sejtvonalon (24 órás kezelés) és szelektivitási indexük a *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzsön mért MIC értékekhez viszonyítva

		MonoMac6 – citosztázis 24 óra ^b	
vegyület, konjugátum ^a	R	IC ₅₀ (µM)	SI <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv törzsre ^c
		TB803	allilamino
TB820	pirrolidino	>200	>48,8
TB820-Aoa-OT20	pirrolidino	>200	>5,9
TB820-Aoa-OT20(4-pal)	pirrolidino	4,5±0,5	0,3
TB803-Aoa-OT10	allilamino	>200	>6,6
TB820-Aoa-OT10	pirrolidino	>200	>6,7
TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa)	allilamino	>200	>5,2
TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)	pirrolidino	>200	>21,3

^a A konjugátumok C-terminálisa amid formájú

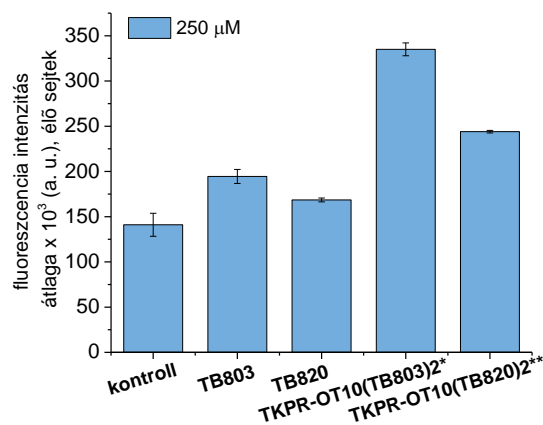
^b Citosztatikus hatás meghatározása 24 órás kezelést, majd 72 órás továbbtenyésztést követően MTT-tesztel

^c Szelektivitási index, SI = IC₅₀ (µM)/MIC (µM)

4.4.4. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak *in vitro* sejtbejutása

A TB803 és TB820 enyhén fluoreszcens tulajdonságúak, így összehasonlítottuk a szabad hatóanyagjelöltek, és a két molekula hatóanyagot tartalmazó konjugátumok (TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) és TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)) sejtbejutását áramlási citométerrel a gazdasejtet modellező MonoMac6 humán monocita sejtvonalon. Azért választottuk a két hatóanyagjelöltet tartalmazó konjugátumokat, mert ezeknél enyhén nagyobb fluoreszcencia intenzitást tapasztaltunk, mint az egy hatóanyagjelöltet tartalmazóknál (4.4.1. fejezet). A sejteket 1 óráig kezeltük a konjugátumokkal (c: 15,6-250 µM), majd mosás és tripszines kezelés után (a sejtek felszínéhez kötődött, nem internalizálódott konjugátumokat távolítjuk el a tripszinnel) a sejteket áttettük áramlási citometriás csövekbe és megmértük az intracelluláris fluoreszcencia intenzitásukat.

A 61. ábrán látható a szabad piridopirimidinek és a konjugátumok sejtbejutásának összehasonlítása a MonoMac6 sejteken 250 µM kezelési koncentrációnál. A vegyületek gyenge fluoreszcencia tulajdonsága ellenére látható, hogy a szabad TB803 és TB820 esetében az intracelluláris fluoreszcencia intenzitás a kezeletlen kontroll sejtek autofluoreszcenciájánál alig nagyobb. A konjugátumok esetében a nagyobb intracelluláris fluoreszcencia intenzitás értékek alapján megnövekedett sejtbejutásra következtethetünk. Bár a piridopirimidin származékok fluoreszcenciája nem a legmegfelelőbb a sejtbejutás áramlási citometriával történő követésére (488 nm-es gerjesztési hullámhosszal), ez az eredmény alátámasztja, hogy a hatóanyagjelöltek peptid típusú hordozókhoz való konjugálásával hatékonyabb sejtbejutás érhető el.



61. ábra: A piridopirimidin származékok és a konjugátumok sejtbejutásának összehasonlítása MonoMac6 sejtvonalon 250 μM kezelési koncentrációnál 1 órás kezelés után

* TKPR-OT10(TB803)2 = TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa)

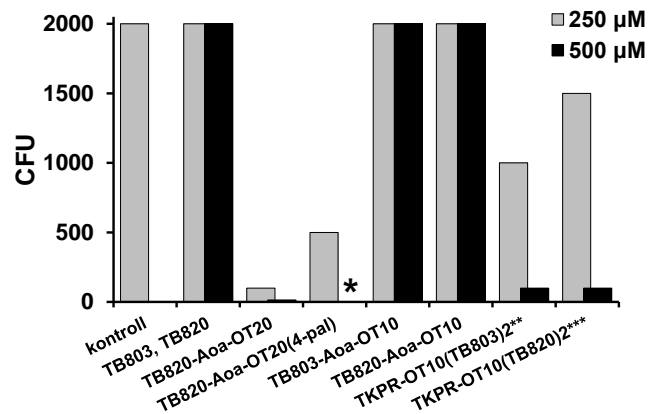
** TKPR-OT10(TB820)2 = TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)

4.4.5. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak *in vitro* antimikobakteriális hatása fertőzött MonoMac6 sejteken

Vizsgáltuk a piridopirimidin-tuftsinszármazék konjugátumok aktivitását is az intracelluláris baktérium modellen, *M. tuberculosis* H₃₇Rv törzssel fertőzött MonoMac6 sejteken a korábbiakban leírtakkal azonos módon (4.1.9.2. és 4.3.2.5. fejezetek). A vizsgált vegyület koncentráció 250 μM és 500 μM volt. A TB820-Aoa-OT20(4-pal) erős citosztatikus hatása miatt ennél a vegyületnél csak az alacsonyabb, 250 μM -os koncentrációval kezeltük a fertőzött sejteket.

A szabad piridopirimidin származékok és a konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatása az intracelluláris modellen a 62. ábrán látható. A TB803 és a TB820 nem gátolta az intracelluláris baktériumot, a konjugátumok közül a dituftsin származékok sem bizonyultak hatásosnak. A TB820-Aoa-OT20 tetratuftsin származék jelentősen csökkentette a telepszámot mindkét koncentrációnál, ez a konjugátum gátolta a legjobban az intracelluláris baktériumot. A palmitinsav oldallánc módosítást tartalmazó tetratuftsin származék, a TB820-Aoa-OT20(4-pal) 250 μM -os koncentrációnál kevésbé volt aktív, mint a zsírsav nélküli konjugátum. A heterotrimer tuftsinszármazékok mindkét koncentrációnál csökkentették a telepszámot, 500 μM -os koncentrációnál alkalmazva jelentősen gátolták az intracelluláris baktériumot.

A szabad hatóanyagjelöltek esetében az intracelluláris baktériumok gátlásának hiánya azzal magyarázható, hogy a vegyületek csak korlátozott mértékben jutnak a sejtekbe. A konjugátumok többségének gátló hatása a jobb sejtbejutásuknak, ezáltal jobb intracelluláris hasznosulásuknak köszönhető. A dituftsin származékok esetében, a gátló hatás hiányának kiderítésére további vizsgálatok szükségesek, lehetséges, hogy a sejtbejutás mértéke nem elegendő nagyságú a gátló aktivitás eléréséhez.



62. ábra: A piridopirimidin származékok és a piridopirimidin-peptid konjugátumok *in vitro* antimikobakteriális hatása *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériummal fertőzött MonoMac6 sejteken (intracelluláris modell)

* TB820-Aoa-OT20(4-pal) esetén 500 µM-nál nem vizsgáltuk a gátló hatást

** TKPR-OT10(TB803)2 = TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa)

*** TKPR-OT10(TB820)2 = TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)

4.4.6. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak membrán affinitása

Vizsgáltuk az *in silico* meghatározott hatóanyagjelöltek (TB803 és TB820), valamint két kiválasztott, eltérő *in vitro* antimikobakteriális hatással rendelkező konjugátum (4.4.2. fejezet) membrán affinitását lipid monoréteg és kettősréteg modell rendszerek segítségével, hogy információt kapjunk a hatóanyagok és a konjugátumok membránnal való kölcsönhatásáról. A konjugátumok a TB803 és a TB820 TKPR-OT10 tuftsinszármazékkal kialakított konjugátumai (TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) és TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)), melyek MonoMac6 sejtekbe történő bejutását is vizsgáltuk (4.4.4. fejezet). A membrán affinitás vizsgálatokat Dr. Kiss Éva egyetemi tanár csoportjában, az ELTE Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriumában, Dr. Ábrahám Ágnes tudományos munkatárs és Dr. Gyulai Gergő tudományos munkatárs végezték. Az eredményekről közös publikációban számoltunk be [102], ahol megtalálható a membrán affinitás eredmények részletes bemutatása. Dolgozatomban röviden összefoglalom ezeket az eredményeket.

4.4.6.1. Membrán affinitás vizsgálata lipid monoréteg modell segítségével

A vegyületek lipid monoréteg modellen történő membrán affinitásának meghatározását Langmuir-mérlegben végezték. Kétféle lipid monoréteget alakítottak ki, melyek az eukarióta és a bakteriális sejtmembrán modellezésére szolgálnak. Az egyik monoréteg egyféle foszfolipidet tartalmazott (POPC), a másik kétfélét (75% DPPC + 25% DPPG). A DPPG anionos karakterű, így fontos szerepe lehet a kationos vegyületekkel való kölcsönhatásban [177], mint amilyenek a vizsgált tuftsinszármazékok konjugátumai. Ez a negatív karakterű bakteriális sejtfa modellezésére is alkalmas lehet.

A membrán affinitás mértékére a vegyületek lipid monoréteg alá történő injektálása (koncentráció a szubfázisban: 2 µM) után a fellépő felületi feszültség idő függvényében történő változásából ($\Delta\pi$) lehet következtetni. A vegyületek 1 óra utáni membránpenetrációs képességét a 26. táblázat foglalja össze. A szabad hatóanyagok csak kis mértékben penetráltak a lipid monorétegekbe ($\Delta\pi$: 0,4-1,4 mN/m), míg a konjugátumok penetrációs képessége jelentősen nagyobb volt ($\Delta\pi$: 1,8-5,6 mN/m). A hatóanyag és a konjugátum penetrációs képessége közötti különbség szembetűnőbb a negatív töltéssel rendelkező DPPC + DPPG lipid monorétegnél, ahol elektrosztatikus kölcsönhatások is felléphetnek a hordozó peptid

kationos tulajdonsága miatt. A legmagasabb membrán affinitással a TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) konjugátum rendelkezik.

26. táblázat: A piridopirimidin származékok és peptidkonjugátumaik membrán affinitása lipid monoréteg modellen

vegyület, konjugátum ^a	R	felületi feszültség változás $\Delta\pi$ (mN/m)	
		POPC	DPPC + DPPG
TB803	allilamino	1,0±0,2	0,4±0,2
TB820	pirrolidino	0,8±0,2	1,4±0,2
TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa)	allilamino	2,7±0,2	5,6±0,2
TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)	pirrolidino	1,8±0,3	4,8±0,3

^a A konjugátumok C-terminálisa amid formájú

4.4.6.2. Membrán affinitás vizsgálata lipid kettősréteg modell segítségével

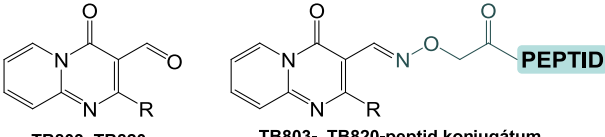
A piridopirimidin hatóanyagok és konjugátumok membrán affinitását felülethez asszociált foszfolipid kettősréteg (supported lipid bilayer, SLB) modell segítségével is meghatározták. A méréseket kvarckristály mikromérleg (QCM) rendszer segítségével végezték. A kettősréteg szilikával borított QCM szenzoron lett kialakítva POPC liposzómák kiterjesztésével. A vegyületek penetrációja során bekövetkező rezonancia frekvencia csökkenés (Δf) a kristály felületén történő tömegnövekedéssel arányos, míg a mozgási ellenállás változásokból (ΔR) a kialakuló réteg szerkezetéről, viszkoelasztikus tulajdonságairól lehet információt kapni.

A vegyületek vizsgált koncentrációja 200 és 1300 μM között volt. A frekvenciaváltozás a koncentráció függvényében változott. A hatóanyagok viselkedése jelentősen különbözött a konjugátumok viselkedésétől. A két hatóanyag esetében tömegcsökkenés volt megfigyelhető. A két konjugátum is egymástól különbözően viselkedett. A TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) konjugátum esetében a koncentráció növekedésével tömegnövekedés, a TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa) esetében enyhe tömegcsökkenés volt tapasztalható. Ezek alapján a TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) konjugátum jelentős membrán affinitást mutat.

A vegyületek oldatával (c: 430 μM , a legalacsonyabb koncentráció, ahol már jelentős különbség észlelhető a vegyületek Δf értékében) a lipid kettősréteg 40 percig érintkezett, majd 15 perces mosást követően meghatározták a frekvencia és mozgási ellenállás értékeket és az intakt lipid kettősréteg értékeivel összehasonlították. A kapott Δf és ΔR értékekből kiszámolták a tisztán tömegváltozásból adódó frekvenciaváltozást is (Δf_m), ezeket az értékeket a 27. táblázat tartalmazza. A megnövekedett ellenállás a kettősréteg kiterjedését jelenti, amely így lazább szerkezetű. A csökkenés az ellenállásban azt jelzi, hogy a kettősréteg tömörebb lett, szerkezete merevebb lett. A kismolekulák esetében nem volt jelentős változás a mozgási ellenállásban (ΔR : 0,0-0,2 Ω), vagyis a kettősréteg viszkozitási tulajdonságai nem változtak jelentősen. A konjugátumok viszont jelentősebb változást mutatnak a mozgási ellenállásban

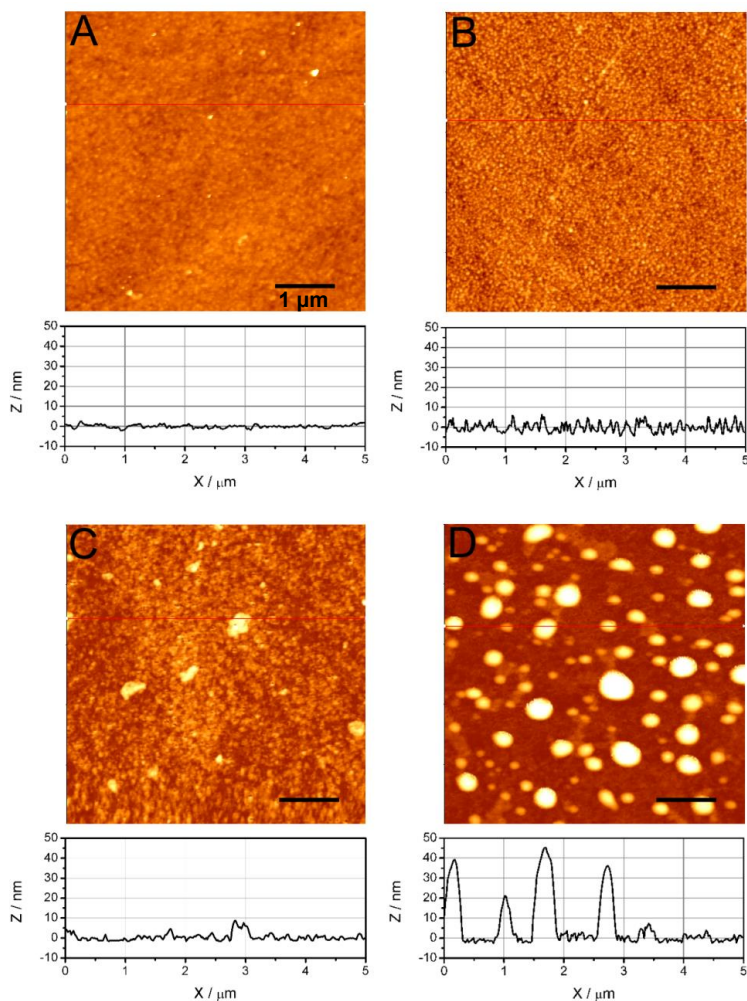
(ΔR : 0,8-1,6 Ω), ami azt jelzi, hogy a molekulák kettősréteggel való kölcsönhatása miatt megváltozott a réteg viszkoelasztikus tulajdonsága, a réteg lazább szerkezetű lett. A tömegváltozásból adódó frekvenciaváltozás a kismolekulák és a TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa) konjugátum esetében pozitív volt (Δf_m : 1,0-2,6 Hz), ez az enyhe tömegcsökkenés azt jelentheti, hogy a molekulák kevésbé hatottak kölcsön a kettősréteggel, a felülethez asszociált foszfolipid kettősréteg részleges elmozdulása is megtörténhetett. Ezzel ellentétben a TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) konjugátum tömegváltozásból adódó frekvenciaváltozása negatív értékű, ami a kettősréteg tömegnövekedését jelzi, ami a konjugátum jelentős membránpenetrációjának következménye. Ez az eredmény összhangban van azzal, hogy monorétegek esetében is a TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) konjugátum mutatta a legnagyobb membrán affinitást.

27. táblázat: A piridopirimidin származékok és a piridopirimidin-peptid konjugátumok membrán affinitásának összehasonlítása lipid kettősréteg modellen

					
		TB803, TB820	TB803-, TB820-peptid konjugátum		
vegyület, konjugátum ^a	R	rezonancia frekvencia változás Δf (Hz)	mozgási ellenállás változás ΔR (Ω)	tömegváltozásból adódó frekvenciaváltozás Δf_m (Hz)	
TB803	allilamino	1,0 \pm 0,3	0,0 \pm 0,3	1,0	
TB820	pirrolidino	2,2 \pm 0,4	0,2 \pm 0,1	2,6	
TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa)	allilamino	-4,0 \pm 0,6	0,8 \pm 0,1	-2,6	
TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa)	pirrolidino	-0,8 \pm 0,4	1,6 \pm 0,2	2,2	

^a A konjugátumok C-terminálisa amid formájú

A QCM mérések során a lipid kettősrétegben bekövetkező morfológiai változások megértésében a rétegek AFM-mel történő vizsgálata is segítségre lehet. A vegyületek és a kettősréteg kölcsönhatásáról készült reprezentatív AFM képek a 63. ábrán láthatók. Az AFM vizsgálatok igazolták, hogy a lipid kettősréteg többnyire intakt maradt a TB803 és TB820 esetében. A TB803-konjugátum esetében nőtt a réteg egyenetlensége, kisméretű aggregátumok (5-10 nm magas) voltak megfigyelhetők, ez okozhatta a negatív Δf_m értéket. A TB820-konjugátum esetében a kettősréteg szerkezete az AFM vizsgálat alapján jelentősen megváltozott, habár a QCM vizsgálatok során csak kismértékű tömegváltozást tapasztaltunk. A kettősréteg egyenetlensége megszűnt, felületén nagyméretű aggregátumok jelentek meg, ezzel magyarázható, hogy a TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa) esetében tapasztaltuk a legnagyobb változást a mozgási ellenállásban. A két konjugátum különböző viselkedése a kismolekulák különböző szerkezetének tulajdonítható. Az allilamino-csoportot tartalmazó TB803 molekula felszíne kisebb, mint a pirrolidino-csoportot tartalmazó TB820 molekuláé. A nagyobb felszínű TB820 molekulát tartalmazó konjugátum penetrációja a lipid membránba nagyobb változást okoz, a membrán integritását is megszüntetheti. A hordozó peptidnek a konjugátum és a membrán közti elektrosztatikus kölcsönhatásban lehet szerepe, mellyel csökkenti a membrán rendezettségét.



63. ábra: A POPC kettős membrán AFM-es képe: (A) a szabad membrán, kölcsönható molekula nélkül; a membrán képe a (B) TB820 molekulával, (C) TKPR-OT10(8-TB803-Aoa; 13-TB803-Aoa) konjugátummal és (D) TKPR-OT10(8-TB820-Aoa; 13-TB820-Aoa) konjugátummal való kölcsönhatás során

4.4.7. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumaival kapcsolatos eredmények összefoglalása és értékelése

Az *in silico* azonosított, majd kémiaiailag optimált hatóanyagjelöltek, a piridopirimidin származékok kimagasló *in vitro* antimikobakteriális hatása *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzs ellen (MIC: 4,1-4,4 μ M) megőrződik a konjugátumokban oximkötés kialakítása mellett. A konjugátumok MIC értéke 9,4 és 38,2 μ M között volt. A szabad hatóanyagjelöltek és a konjugátumok szelektívnek bizonyultak a baktériumokra, mivel nem mutattak citosztatikus aktivitást a gazdasejt modell MonoMac6 sejteken a vizsgált legmagasabb koncentrációban sem. Ez alól kivétel a palmitoil oldalláncot tartalmazó konjugátum (TB820-Aoa-OT20(4-pal)), melynél jelentős citosztatikus aktivitást tapasztaltunk (IC₅₀: 4,5 μ M). Ezt a citosztatikus hatást a palmitinsav jelenléte okozza, amit a kontroll peptid (Ac-OT20(4-pal)) esetében is tapasztaltunk.

A hatóanyagjelöltek tuftsinszármazékokhoz való konjugálásával megnövekedett membrán affinitást értünk el a modell lipid monoréteg és kettősréteg rendszeren. Továbbá a konjugálással a hatóanyagjelöltek MonoMac6 monocita sejtekbe való sejtbejutása is nőtt. A szabad piridopirimidin származékokkal ellentétben a konjugátumok többsége gátolta az intracelluláris baktériumot, ami valószínűleg a jobb intracelluláris hasznosulásuknak, valamint membrán affinitásuknak köszönhető.

4.5. A dolgozat új tudományos eredményei és kitekintés

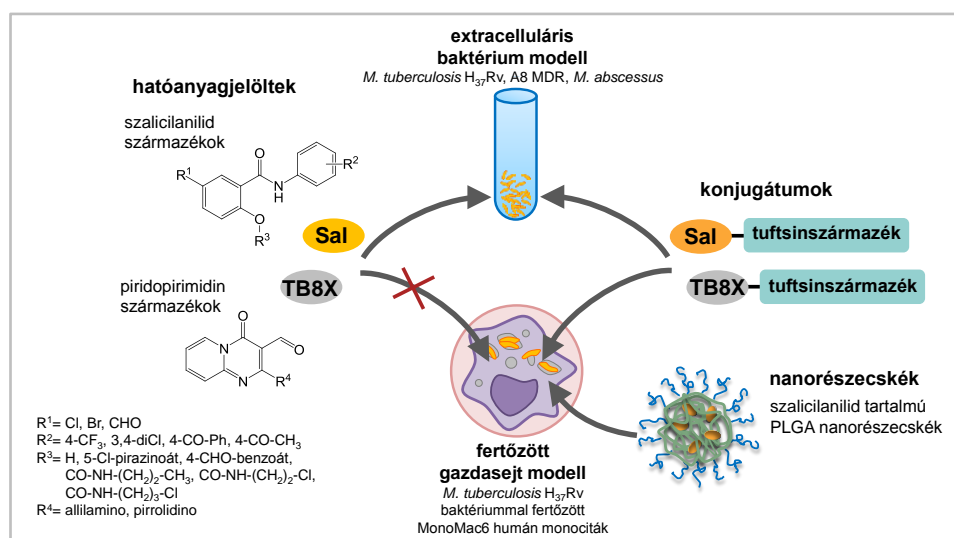
A doktori munkám során előállított szalicilanilid származékok, valamint az alkalmazott *in silico* azonosított és kémiaileg optimált hatóanyagjelöltek (piridopirimidin származékok) kimagasló *in vitro* antimikobakteriális hatással rendelkeztek extracelluláris mikobaktériumok ellen. A hatóanyagok tuftsin típusú hordozó, illetve célbajuttató molekulához történő konjugálásával a vegyületek *in vitro* antimikobakteriális hatása megőrződik a konjugátumokban. A szabad hatóanyagokkal ellentétben a konjugátumok, valamint a hatóanyagot tartalmazó PLGA nanorészecskék képesek voltak gátolni az intracelluláris baktériumot, mely modellezésére *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériummal fertőzött MonoMac6 humán monocita sejteket alkalmaztunk (64. ábra). Ez az eredmény a konjugátumok és nanorészecskék jobb sejtbejutásának köszönhető a szabad hatóanyagokhoz képest.

A piridopirimidin származékok és a konjugátumok nem mutattak citosztatikus hatást a gazdasejteken, szelektívnek bizonyultak a baktériumok felé, ezek a konjugátumok ígéretes jelöltek a további (pl. *in vivo*) vizsgálatokra.

A szalicilanilid származékoknak kiváló *in vitro* antimikobakteriális hatása van, viszont a vegyületek többsége citotoxikus, illetve citosztatikus hatású humán monocita és hepatocita sejteken. Mivel a magas citotoxikus és citosztatikus hatást tumoros eredetű humán sejtvonalakon mértük, a vegyületek hatása ezeken a sejteken utat nyithat a tumorterápiában való alkalmazásuk felé is.

A kiemelkedő *in vitro* sejtbejutást és intracelluláris gátló hatást mutató, viszont közepesen citosztatikus hatású zsírsav oldallánc módosítást tartalmazó szalicilanilid-peptid konjugátumok esetén, mint például a Sal8-Aoa-T5(4-dek) dekánsavat tartalmazó monotuftsin származék, érdemes lehet a konjugátumok PLGA nanorészecskékbe való csomagolása. Lehetséges, hogy a hidrofób zsírsav oldalláncot tartalmazó, amfilil karakterű konjugátumokat könnyebb PLGA nanorészecskékbe adszorbeálni, mint a zsírsav nélküli, erősen hidrophil konjugátumokat vagy a hidrofób szalicilanilid származékokat. A nanorészecskébe való csomagolással valószínűleg a konjugátum citosztatikus hatása csökkenthető.

A PLGA nanorészecskék esetében érdemes lehet a nanorészecskék felületét irányító molekulákkal (pl. a tuftsin típusú peptidszármazékokkal) módosítani a szelektivitás növelése érdekében.



64. ábra: A szabad hatóanyagok, hatóanyag-peptid konjugátumok, hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék *in vitro* antimikobakteriális hatásának sematikus összehasonlítása

5. KÍSÉRLETI RÉSZ

Ebben a fejezetben foglaltam össze a kémiai és *in vitro* biológiai módszerek leírásait, illetve a műszeres mérések körülményeit.

5.1. Kémiai kísérletek

A szintetikus munka során használt vegyszereket, műszereket a Függelék F1-4. táblázataiban foglaltam össze.

5.1.1. A szalicilanilid származékok és az 5-klórpirazin-2-karbonsav szintézise

A szubsztituált szalicilanilid származékok (Sal1-6), az 5-klórpirazin-2-karbonsav (Pyr), a szalicilanilid-2-klórpirazinoátok (SalPyr1-4) és a szalicilanilid-karbamátok (SalCarb1-14) szintézisét Hradec Královében (Csehország), a Károly Egyetem Gyógyszerészeti Kar Szervetlen és Szerves Kémia Tanszékén (Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Inorganic and Organic Chemistry), Dr. Jarmila Vinšová együttműködő partnerünk irányításával végeztem.

5.1.1.1. Szubsztituált szalicilanilidek (Sal1-9) előállítása

A Sal1-6 vegyületek szintéziséhez a megfelelő szubsztituált szalicilsavat (0,02 mol, 5-klórszalicilsav, 5-brómszalicilsav) és ekvivalens mennyiségű szubsztituált anilint (0,02 mol, 4-trifluorometilanilin, 3,4-diklóranilin, 4-benzoilanilin) 100 mL klórbenzolban feloldottam és a reakcióelegyhez 0,5 ekvivalens (0,01 mol) PCl_3 -ot adtam (27. ábra) [51]. A reakcióelegyet mikrohullámú reaktorban (120 °C, 520 W) 22 percig mágneses kevertetés mellett forraltam (MicroSYNTH MLS ETHOS 1600 URM microwave reactor, 2,45 GHz, Milestone Inc., Shelton, CT, USA). A mikrohullámú reaktor segítségével egyenletes melegítés érhető el, a reakcióidő több órától lerövidíthető 20-25 percre. A forró reakcióelegyet leszűrtem, hagytam szobahőmérsékletűre hűlni, majd 4 °C-on tároltam egy éjszakán át (legalább 18 órán keresztül). A kivált nyersterméket leszűrtem, majd forró etanolban átkristályosítottam a tiszta termék kinyerése érdekében. Az anyalúgban maradt nyerstermék kinyerése érdekében az anyalúgot részben elpárologtattam rotációs vákuumbepárló készülékkel, a kikristályosodott nyersterméket leszűrtem és szintén forró etanolban átkristályosítottam.

A konjugálható szubsztituált szalicilanilid származékok (Sal7-9) szintézise is a fent leírt módon zajlott (28. ábra). Ezen vegyületek szintézisét javaslatom alapján Dr. Martin Krátký (Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Hradec Králové, Csehország) végezte és bocsátotta rendelkezésünkre a vegyületeket. A megfelelő szubsztituált szalicilsavhoz (5 mmol, 5-klórszalicilsav, 5-brómszalicilsav, 5-formilszalicilsav) ekvivalens mennyiségű szubsztituált anilint (5 mmol, 4-trifluorometilanilin, 4-acetilanilin) adott 25 mL klórbenzolban oldva és a reakcióelegyhez 0,5 ekvivalens (2 mmol) PCl_3 -ot adott. A reakcióelegyet mikrohullámú reaktorban mágneses kevertetés mellett forralta (120 °C, 520 W, 22 perc). A forró reakcióelegyet szűrés után hagyta szobahőmérsékletűre hűlni, majd 4 °C-on tárolta egy éjszakán át. A nyerstermék leszűrése után forró etanolban való átkristályosítása következett. Az anyalúgban maradt nyerstermék kinyerése érdekében az anyalúgot részben elpárologtatta rotációs vákuumbepárló készülékkel, a kikristályosodott nyersterméket leszűrte és 5%-os

NaHCO₃ oldatban (25 mL) szuszpendálta és kevertette, míg a CO₂ fejlődés megfigyelhető volt. A nyersterméket szűrte, majd 0,1 M HCl oldatban (25 mL) szuszpendálta, hogy elbontsa a fő terméként keletkezett monomer, dimer, stb. Schiff-bázisokat. Ezután a terméket szűrte, desztillált vízzel mosta, a kinyert tiszta terméket szárította.

5.1.1.2. Az 5-klórpirazin-2-karbonsav (Pyr) előállítása

20 mL SOCl₂-hoz 14 mmol 5-hidroxipirazin-2-karbonsavat és 200 µL DMF-ot adtam, a DMF mint katalizátor segítette a reakciót (29. ábra). A reakcióelegyet 4 órán keresztül forraltam (75 °C). Ezután a SOCl₂ feleslegét desztillálással eltávolítottam (vízsugárszivattyú segítségével létrehozott vákuum), a nyers termékhez 20 g jeget adtam (a keletkezett –COCl csoport hidrolízise érdekében). A terméket kétszer 20 mL etilacetáttal extraháltam. Az egyesített szerves fázisokhoz néhány csepp hexánt adtam a kristályosodás elősegítése érdekében. Egy nap kristályosodás után (+4 °C-on) a keletkezett barna kristályokat szűréssel távolítottam el az anyalúgtól [197].

5.1.1.3. Szalicilanilid-5-klórpirazinoátok (SalPyr1-4) előállítása

A megfelelő szubsztituált szalicilanilidet (3,5 mmol, Sal1-4) és ekvivalens 5-klórpirazin-2-karbonsavat (3,5 mmol) 16 mL DMF-ban feloldottam és -10 °C-ra hűtöttem só (NaCl) és -20 °C-os etanol keverékével. Egy óra alatt három részletben hozzáadagoltam 1,1 ekvivalens, 3,85 mmol *N,N'*-diciklohexilkarbodiimidet (DCC) (30. ábra). A víz távoltartása érdekében CaCl₂-os csövet használtam. A reakcióelegyet 3 órán át kevertettem -10 °C-on, majd 20 órát állni hagytam +4 °C-on. A csapadékként kivált *N,N'*-diciklohexilureát szűréssel eltávolítottam. A DMF oldószert rotációs vákuumbepárló készülék segítségével eltávolítottam. A nyersterméket etil-acetátban, kevés hexán hozzáadásával átkristályosítottam [63].

5.1.1.4. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok (SalBenz1-3) előállítása

A karbonilcsoportot tartalmazó, konjugálható észterek (szubsztituált szalicilanilidek 4-formilbenzooesavval alkotott észterei) szintézise is a fent leírt módon történt (31. ábra). Ezen konjugálható észterek szintézisét Dr. Martin Krátký (Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Hradec Králové, Csehország) végezte és bocsátotta rendelkezésünkre a vegyületeket. A szintézis során a megfelelő szubsztituált szalicilanilidet (3,5 mmol, Sal1-3) és ekvivalens 4-formilbenzooesavat (3,5 mmol) 16 mL DMF-ban reagáltatta DCC jelenlétében. A szintézis lépései megegyeznek a 5.1.1.3. fejezetben ismertetett lépésekkel.

5.1.1.5. Szalicilanilid-karbamátok (SalCarb1-14) előállítása

A megfelelő szalicilanilid (1 mmol, Sal1-6) acetonitriles szuszpenziójához (6 mL) 1 ekvivalens (1 mmol) trietilamint adtam és 5 percig kevertettem, míg a szuszpenzió kitisztult (a szalicilanilid fenolos hidroxilcsoportja deprotonálódott). Ezután hozzáadtam az ekvivalens mennyiségű megfelelő izocianátot (1 mmol, 2-klóretil-izocianát, 3-klórpropil-izocianát, *n*-propil-izocianát) (32. ábra) [71]. A reakcióelegyet három órán át kevertettem szobahőmérsékleten. Három óra után a keletkezett szalicilanilid-karbamát

csapadék formában kivált, a csapadékot szűrtem és kevés hideg metanollal (0 °C) kétszer mostam. A terméket etilacetát-hexán elegyből átkristályosítottam.

5.1.1.6. A szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok kémiai jellemzése

Az 5.1.1.1-5.1.1.5. fejezetben leírt reakciókat vékonyréteg kromatográfiával követtük, a termékek tisztaságát olvadáspont méréssel ellenőriztük. Az előállított vegyületeket mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR), infravörös spektroszkópia (IR), tömegspektrometria (MS) és elemanalízis segítségével jellemeztük.

5.1.1.6.1. Vékonyréteg kromatográfia

A vékonyréteg lapokat 0,2 mm szilika gél 60 F254 (Merck, Csehország) borította. Futtatóelegyként toluol : EtOAc 4:1 elegyét használtuk. A kromatográfiás foltok megjelenítése UV besugárzás (254 nm) segítségével történt.

5.1.1.6.2. Olvadáspont meghatározás

A vegyületek olvadáspontjának meghatározása B-545 (Büchi Labortechnik, Flawil, Svájc) típusú olvadáspont mérővel történt 0,5 °C/perc fűtési sebesség mellett (korrekció nélkül).

5.1.1.6.3. NMR spektroszkópia

Az NMR spektrumokat szobahőmérsékleten Varian Mercury-Vxbb 300 (300 MHz: ^1H és 75,5 MHz: ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) és Varian VNMR S500 (500 MHz: ^1H és 126 MHz: ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) készülékeken vettük fel. A mintákat deuterált dimetilszulfoxidban (DMSO- d_6 , szalicilanilid, 5-klórpirazin-2-karbonsav, szalicilanilid-karbamátok) és deuterio-kloroformban (CDCl_3 , szalicilanilid észterek) oldottuk. A kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben trimetilszilán belső standardhoz viszonyítva adtuk meg. A csatolási állandót (J) Hz-ben adtuk meg. A spektrumok felvételét a Charles University (Faculty of Pharmacy, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Hradec Králové, Csehország) munkatársai végezték. A spektrumok kiértékelését Dr. Martin Krátký és Dr. Jarmila Vinšová végezte (Charles University).

5.1.1.6.4. IR spektroszkópia

Az IR spektrumokat KBr-pasztillás módszerrel Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készüléken ATR technikával (gyengített teljes reflexió, attenuated total reflectance) vettük fel 400-4000 cm^{-1} tartományban. A spektrumok felvételét a Charles University (Faculty of Pharmacy, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Hradec Králové, Csehország) munkatársai végezték. A spektrumok kiértékelését Dr. Martin Krátký és Dr. Jarmila Vinšová végezte (Charles University).

5.1.1.6.5. Tömegspektrometria

A tömegspektrumokat elektro spray ionforrással (ESI), Bruker Daltonics Esquire 3000+ (Bruker, Bremen, Németország) típusú ioncsapdás készüléken vettem fel. A mintákat 0,1% AcOH-t tartalmazó MeCN / víz 1:1 V/V oldószerkeletben oldottam és 10 µL/perc áramlási sebességgel injektáltam. A porlasztógáz nyomása 10 psi, a szárítógáz sebessége 4 L/perc, a hőmérséklet 250 °C volt. A spektrumokat a vegyület ionizálhatóságától függően pozitív vagy negatív módban, 50-2000 *m/z* tartományban, 13 000 *m/z/sec* mintavételi sebességgel vettem fel. A vegyületekről MS/MS analízis is készült.

5.1.1.6.6. Elemanalízis

A vegyületek elemanalízisét (C, H, N) VARIO EL III automata elemanalizátor (Elementar Analysensysteme, Hanau, Németország) segítségével Dr. Medzihradsky-Schweiger Hedvig (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) végezte és Automatic Microanalyser CHNS-O CE instrument (FISONS EA 1110, Milano, Italy) elemanalizátor segítségével a Charles University (Faculty of Pharmacy, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Hradec Králové, Csehország) munkatársai végezték.

5.1.1.6.7. A szalicilanilid származékok stabilitásának vizsgálata analitikai RP-HPLC-vel és ESI-MS-sel

A kiválasztott, reprezentatív szalicilanilid származékok stabilitás vizsgálatát DMSO-ban 4 °C-on 7 napig, 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban 37 °C-on 28 napig, és 10% DMSO-t tartalmazó szérummentes RPMI-1640 médiumban 37 °C-on 24 óráig analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével végeztem. Exformma HPLC rendszert (Exformma Technology, ASIA Co., Limited, Hong Kong, Kína) használtam Nucleosil C18 RP-HPLC oszloppal (5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm) vagy Zorbax SB-CN RP-HPLC oszloppal (5 µm, 80 Å, 4,6 x 150 mm), szobahőmérsékleten. Az eluensek a következők voltak: A eluens: 0,1% TFA, víz (V/V), B eluens: 0,1% TFA, MeCN/víz 80:20 (V/V). A detektálás UV detektorral történt 280 nm-en. Az alkalmazott gradiens a következő volt: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B, a folyási sebesség 1 mL/perc volt. Az oldatok vegyület koncentrációja 0,5 mg/mL volt, az oldatokból adott időpontokban 20-20 µL-t injektáltam. A kívánt csúcsokat összegyűjtöttem, liofilizáltam és tömegspektrometriával jellemeztem (ESI-MS, 5.1.1.6.5. fejezet). A nem stabil vegyületek felezési idejét a megfelelő csúcs alatti területek alapján határoztam meg.

5.1.1.7. A szalicilanilid származékok PLGA nanorészecskébe való csomagolása

A szalicilanilid származékok PLGA nanorészecskébe való adszorbeálását és a nanorészecskék jellemzését (méreteloszlás, hatóanyagtartalom és kapszulázási hatékonyság meghatározása) Dr. Gyulai Gergő, az ELTE Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratórium munkatársa végezte. A módszer részletes leírása az ő doktori értekezésében található meg [201]. A PLGA nanorészecskét nanoprecipitációs eljárással állította elő, mely során oldószerkelet (aceton-víz) következtében valósul meg a kicsapódás, a hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék létrejötte. Az aceton szerves fázis a PLGA50 polimer (10 g/L, PLGA50: 50:50 tejsav:glikolsav arány, 40-75 kDa) mellett az adszorbeálható anyagokat (3,95 g/L) is tartalmazta. Stabilizátorként Pluronic F127-et használt (1 g/L), melynek EO/PO/EO

monomer aránya: 101/56/101, M_{monomer} : 12600 g/mol. A nanorészecskék tisztítása (nem kívánt aggregátumok, nem adszorbeálódott hatóanyagok, nem kötődött Pluronic eltávolítása) centrifugálással és ultracentrifugálással történt. Az előállított rendszereket liofilizálta és 4 °C-on tárolta. A PLGA részecskék átlagos hidrodinamikai átmérőjét és méreteloszlását dinamikus fényszóródás méréssel határozta meg. Meghatározta a hatóanyagtartalmat ($m_{\text{adszorbeált hatóanyag}}/m_{\text{készítmény}} \cdot 100$ (%)) és a kapszulázási hatékonyságot ($m_{\text{adszorbeált hatóanyag}}/m_{\text{összes, bemért hatóanyag}} \cdot 100$ (%)) a nanorészecskék NaOH hatására történő degradációját során felszabadult vegyületek spektrofotometriás mérésével.

5.1.2. A tuftsinszármazékok szintézise

A Függelék F8. táblázata foglalja össze a szilárdfázisú peptidszintézissel előállított peptidek kódját, szekvenciáját, az alkalmazott szintézismódszert és a gyanták típusát.

5.1.2.1. A peptidek szintézise Fmoc/tBu módszerrel

Fmoc/tBu stratégia alkalmazásával a peptideket manuálisan vagy automata peptidszintetizátorral (SYRO Multiple Peptide Synthesizer, MultiSynTech, Witten, Németország) állítottam elő. A manuális szintézis során ciklusonként ellenőrizhető a kapcsolás, míg az automata szintetizátorban végzett szintézis során erre nincs lehetőség. Az automata szintézis során ezért nagyobb feleslegben alkalmaztam az aminosavszármazékokat és a kapcsolóreagenseket, valamint a kapcsolást minden esetben megismételtem.

Azon peptidek szintézisének, melyeknél a C-terminálist amid formában kívántam megkapni, Rink-Amid MBHA gyantát alkalmaztam (kapacitás: 0,65-0,73 mmol/g). A gyantáról az Fmoc-védőcsoport eltávolítása érdekében a gyantát a DMF-ban történő 20 perces duzzasztás után 2% piperidin, 2% DBU, 96% DMF, V/V hasítóeleggyel négyszer (2 + 2 + 5 + 10 percig) kezeltem a manuális szintézisének, majd DMF-dal ötször mostam. Ezután következett a megfelelő aminosavak lépésenkénti felkapcsolása. A gyantakapacitásra számolva a manuális szintézisének háromszoros moláris feleslegben adtam az aminosavszármazékot és az *in situ* aktív észter kialakításához szükséges DIC és HOBt kapcsolószereket NMP-ban oldva (c: 0,5-0,6 M). Az egy órás kapcsolási idő lejártá után DMF-os mosási lépés következett. Ezután ninhidrin, illetve izatin-próbával ellenőriztem a kapcsolás sikerességét. Pozitív próba esetén a kapcsolást meg kellett ismételni. Az Fmoc-védőcsoportot minden esetben a gyanta előkezelésénél leírt hasítóeleggyel (2% piperidin, 2% DBU, 96% DMF, V/V) távolítottam el, majd DMF-dal mostam a gyantát.

Az automata peptidszintetizátor alkalmazása esetén az Fmoc-védőcsoport hasítása 20% piperidin, 80% DMF, V/V eleggyel történt (2 + 2 + 5 + 10 perc hasítási idővel). Az aminosavszármazékok kapcsolása során a gyantakapacitásra számított 4 ekvivalens aminosavszármazékot, DIC-et és HOBt-t alkalmaztam NMP-ban oldva (kapcsolási idő 2 x 1 óra).

A manuális és automata szintetizátorral végzett szintézis egy ciklusának menetét a 28. táblázat foglalja össze.

28. táblázat: Az Fmoc/*t*Bu stratégia szerinti szilárdfázisú manuális és automata szintetizátorral végzett peptidszintézis egy ciklusának menete

Művelet	Manuális szintézis		Automata szintetizátor	
	Reagens, oldószer	Időtartam (perc)	Reagens, oldószer	Időtartam (perc)
Fmoc-védőcsoport eltávolítása	4 x 2-4 mL hasítóelegy (2% piperidin, 2% DBU, 96% DMF, V/V)	2 + 2+ 5 + 10	4 x 1 mL hasítóelegy (20% piperidin, 80% DMF, V/V)	2 + 2+ 5 + 10
gyanta mosása	5 x 2-5 mL DMF	5 x 1	5 x 1 mL DMF	5 x 1
kapcsolás	3 ekvivalens (gyanta kapacitásra számított) Fmoc-aminosavszármazék / HOBt / DIC / NMP-ban oldva	60	4 ekvivalens (gyanta kapacitásra számított) Fmoc-aminosavszármazék / HOBt / DIC / NMP-ban oldva	2 x 60
gyanta mosása	5 x 2-5 mL DMF	5 x 1	5 x 1 mL DMF	5 x 1
kapcsolási reakció követése	ninhidrin-, izatin-próba	5	-	-

Azoknál a peptideknél, ahol a C-terminálist karboxil formában kívántam megkapni Wang gyantát alkalmaztam (kapacitás: 0,94 mmol/g, erre számoltam a kapcsolni kívánt aminosavszármazékok mennyiségét, külön kapacitásmeghatározás nem történt). A Wang gyanta duzzasztása után (20 perc) az első aminosav felkapcsolása következett 2 ekvivalens aminosavszármazék, 2 ekvivalens DIC, 0,2 ekvivalens DMAP NMP-os oldatával, 1 óra kapcsolási idővel. Ezután következett a további aminosavak lépésenkénti felkapcsolása a fent ismertetett lépésekkel.

Valamennyi aminosavat N^α-Fmoc-származék formájában használtam. Az Fmoc-aminosavszármazékok nukleofil oldalláncai a 29. táblázatban felsorolt savérzékeny védőcsoportokat tartalmazták. A lizin esetében olyan aminosavszármazékokat is alkalmaztam, melyek oldallánc védőcsoportjai (Mtt, Dde) szelektíven eltávolíthatóak.

29. táblázat: Az Fmoc/*t*Bu stratégia szerint végzett szintézishez használt Fmoc-aminosavszármazékok oldallánc védőcsoportjai

aminosav	funkciós csoport	védőcsoport	aminosavszármazék rövidítése
Lys (K)	amino	<i>tert</i> -butiloxikarbonil (Boc)	Fmoc-Lys(Boc)-OH
		4-metiltritol (Mtt)	Fmoc-Lys(Mtt)-OH
		1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociklohexilidén)etil (Dde)	Fmoc-Lys(Dde)-OH
Thr (T)	hidroxil	<i>tert</i> -butil (<i>t</i> Bu)	Fmoc-Thr(<i>t</i> Bu)-OH
Arg (R)	guanidino	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurán-5-szulfonil (Pbf)	Fmoc-Arg(Pbf)-OH
Gly (G)	-	oldallánc védőcsoport nélkül	Fmoc-Gly-OH
Phe (F)			Fmoc-Phe-OH
Leu (L)			Fmoc-Leu-OH
Pro (P)			Fmoc-Pro-OH

A peptidlánc felépítése után a peptid-gyantát DCM-nal mostam, majd szárítottam. A szilárd hordozóról a peptidet, illetve az oldallánc védőcsoportokat TFA segítségével manuálisan hasítottam le. A hasítás során keletkező reaktív karbokationok alkilezhetik az aminosavakat, ezért nukleofil reagenseket, ún. gyökfogókat alkalmaztam. A hasítóelegy összetételét a peptid szekvenciája, illetve az oldallánc védőcsoportok határozzák meg, így kétféle hasítóelegyet alkalmaztam attól függően, hogy a peptid tartalmazott-e arginint vagy sem. Ha a peptidben nem volt arginin a hasítóelegy összetétele TFA/víz/TIS 95 : 2,5 : 2,5 V/V volt. Arginint is tartalmazó szekvencia esetén a hasítóelegy összetétele TFA/tioanizol/víz /EDT/fenol 82,5 : 5 : 5 : 2,5 : 5 V/V/V/V/w volt. Átlagosan 10 mL hasítóelegyre volt szükség 0,5-1,0 g peptid-gyanta esetén. A hasítóelegyet jeges hűtés mellett adtam a peptid-gyantához és szobahőmérsékleten 2,5 órán át kevertettem. A Rink-Amid MBHA gyantáról való hasítás után a peptidek C-terminálisát amid formában, Wang gyantáról való hasítás után pedig karboxil formában kaptam. A hasítás után a keveréket szűrtem, a gyantát mostam 2 x 0,5 mL TFA-val, majd a peptidet hideg (0 °C) dietil-éterrel kicsaptam (kb. 30 mL). A kicsapódott peptidet centrifugálással ülepítettem (8 perc, 4400/perc fordulát). Az üledékről az étert dekantálással eltávolítottam, majd a peptidet az előzőekhez hasonlóan még kétszer hideg éterben mostam, centrifugáltam, dekantáltam. A kicsapódott peptidet vízben, illetve acetonitril/víz elegyben oldottam, rotációs vákumbepárlóval eltávolítottam a maradék étert, folyékony nitrogénben fagyasztottam, majd liofilizáltam.

5.1.2.2. A peptidek szintézise Boc/Bzl módszerrel

A peptidek egy részét Boc/Bzl stratégia alkalmazásával állítottam elő manuálisan. A szintézishez 4-metilbenzidrilamin gyantát (MBHA, kapacitása: 1,2 mmol/g) használtam. A peptidek C-terminálisát amid formában kapjuk az MBHA gyantáról való hasítás után. Az MBHA gyanta hidroklorid formában kerül kereskedelmi forgalomba, ezért a gyantát a DCM-ban történő duzzasztás után 33% TFA, 67% DCM, V/V hasítóelegyével kezeltem 5 + 30 percre, majd a DCM-nal való ötszöri mosást követően 10% DIEA, 90% DCM, V/V elegyével 5 x 1 percre semlegesítettem, ezután újból mostam ötször DCM-nal. A gyantához az előkezelés után kapcsoltam az első Boc-aminosav származékot. A gyantakapacitásra számolva háromszoros moláris feleslegben adtam az aminosavszármazékot, és az *in situ* aktív észter kialakításához szükséges kapcsolószereket (DIC, HOBt) NMP-ban oldva. Az egy órás kapcsolási idő lejártá után DCM-os mosási lépés következett. Ezután ninhidrin- vagy izatin-próbával ellenőriztem a kapcsolás sikerességét. Pozitív próba esetén a kapcsolást meg kell ismételni. A Boc-védőcsoportot minden esetben a gyanta előkezelésénél leírt hasítóeleggyel (33% TFA, 67% DCM, V/V) távolítottam el, majd a DCM-nal való mosást követően semlegesítettem 10% DIEA, 90% DCM, V/V eleggyel. A szintézis egy ciklusának menetét a 30. táblázat foglalja össze.

30. táblázat: A Boc/Bzl stratégia szerint végzett szilárdfázisú peptidszintézis egy ciklusának menete

Művelet	Reagens, oldószer	Időtartam (perc)
Boc-védőcsoport eltávolítása	2 x 2-4 mL hasítóelegy (33% TFA, 67% DCM, V/V)	5 + 30
gyanta mosása	5 x 2-5 mL DCM	5 x 1
semlegesítés	5 x 2-5 mL elegy (10% DIEA, 90% DCM, V/V)	5 x 1
gyanta mosása	5 x 2-5 mL DCM	5 x 1
kapcsolás	3 ekvivalens (gyanta kapacitásra számított) Boc-aminosav / ekvimoláris HOBt / ekvimoláris DIC / NMP	60
gyanta mosása	5 x 2-5 mL DCM	5 x 1
kapcsolási reakció követése	ninhidrin-, izatin-próba	5

Az aminosavakat N^α-Boc-származék formájában kapcsoltam. A Boc-aminosavszármazékok nukleofil oldalláncai a 31. táblázatban felsorolt savérzékeny védőcsoportokat tartalmazták. A lizin esetében olyan aminosavszármazékot is alkalmaztam, mely oldallánc védőcsoportja (Fmoc) szelektíven eltávolítható.

31. táblázat: A Boc/Bzl stratégia szerint végzett szintézishez használt Boc-aminosavszármazékok oldallánc védőcsoportjai

aminosav	funkciós csoport	védőcsoport	aminosavszármazék rövidítése
Lys (K)	amino	2-klórbenziloxikarbonil (2-ClZ)	Boc-Lys(2-ClZ)-OH
		9-fluorenilmetiloxikarbonil (Fmoc)	Boc-Lys(Fmoc)-OH
Thr (T)	hidroxil	benzil (Bzl)	Boc-Thr(Bzl)-OH
Arg (R)	guanidino	tozil (Tos)	Boc-Arg(Tos)-OH
Gly (G)	-	oldallánc védőcsoport nélkül	Boc-Gly-OH
Pro (P)			Boc-Pro-OH

A végső hasítás előtt a peptid-gyantát legalább egy napig vákuum exsikkátorban szárítottam. A szilárd hordozóról a peptidet és a peptidek oldallánc védőcsoportjait folyékony hidrogén-fluorid (HF) segítségével távolítottam el. A hasítást teflon készülékben végeztem, 0 °C-on 1,5 óráig, gyökfogók (*p*-krezol) jelenlétében. 0,5-1,0 g peptidre átlagosan 10 mL HF-ot számolva 0,5 g *p*-krezolra volt szükség. Hasítás után a HF-ot a gyanta – peptid elegyről ledesztilláltam, majd a hasítási terméket kicsaptam hideg dietil-éterrel (0 °C), ezután szűrtem, éterrel mostam. A szűrés után kevés A eluens (0,1% TFA, víz V/V) segítségével kioldottam a peptidet a szűrőn a gyantaszemek közül. Szűrés után az oldatot lefagyasztottam majd liofilizáltam.

5.1.2.3. A hasítási és kapcsolási reakciók követése

A peptidszintézisnél a hasítási és kapcsolási reakciók sikerességét ninhidrin-próbával ellenőriztem. A prolin N^α-védőcsoportjának eltávolítását és a prolin utáni kapcsolás sikerességét izatin-próbával ellenőriztem. A ninhidrin-próbához szükséges oldatok összetétele: 1. ninhidrin / etanol 10:1 (m/V), 2. fenol / etanol 4:1 (m/V), 3. piridin / víz 98:2 (V/V) 4 μmol/L KCN-dal. Egy kisebb kémcsőbe kevés gyantaszemet

raktam és erre a 3 reagensből 1.-3. sorrendben 2-2 cseppet adtam, majd a kémcsövet 105 °C-on tartottam 5 percig. Az izatin-próba kivitelezése hasonló a ninhidrin-próbához, de itt még van egy 4. reagens, melynek összetétele 3% izatin, 5% Boc-Phe-OH / benzilalkohol, melyet a ninhidrin-próba reagensei előtt csepegtetünk a gyantaszemekhez. A hasítás sikerességét (szabad primer, illetve szekunder aminocsoport jelenléte) pozitív próba jelezte, a gyantaszemek ninhidrin-próba esetén kék színűek, izatin-próba esetén vörösesbarna színűek. Sikeres kapcsolás esetén nincs színváltozás, a próba negatív (sárgás szín). Ha kapcsolás után pozitív próbát kaptam, a kapcsolást megismételtem.

5.1.2.4. Az oldallánc módosítást nem tartalmazó tuftsinszármazékok szintézise

Előállítottam különböző szekvenciájú és hosszúságú, oldallánc módosítás nélküli tuftsinszármazékokat (39. ábra). Az N-terminálison a tuftsinszármazékok egy része aminooxiacetsavat tartalmazott, melyen keresztül megvalósítható a konjugálás. Az N-terminálison acetilezett analóg peptideket is előállítottam kontroll peptideknek. Az N-terminálison 5(6)-karboxifluoreszcinnel fluoreszcensen jelölt változatokat is előállítottam a sejtbejutás vizsgálatához. Az analóg peptideket gyantaosztás módszerével állítottam elő. Az oldallánc módosítást nem tartalmazó peptideket Rink-Amid MBHA vagy Wang gyantán szintetizáltam, attól függően, hogy amid vagy karboxil végű peptidet kívántam előállítani. Az N-terminálisra felkapcsolt utolsó aminosav Fmoc-csoportjának hasítása és DCM-os szárítás után három részre osztottam a gyantát.

A peptid egyik részéhez a hatóanyag molekulához való konjugálás érdekében a peptid szabad N-terminális aminocsoportjára Boc-aminooxiacetsavat (Boc-Aoa-OH) kapcsoltam. A gyantán lévő peptidhez 3 ekvivalens Boc-Aoa-OH / HOBt / DIC NMP-ban oldott elegyét adtam, a kapcsolási idő 1 óra volt. Ezután DMF-dal mostam a gyantát és ninhidrin-próbával ellenőriztem a kapcsolás sikerességét. Az aminooxiacetyl-peptidek szintézise, feldolgozása és konjugálása során mindvégig kerültem az aceton és egyéb illékony ketonok, aldehidek jelenlétét.

A peptid második részének N-terminális aminocsoportját acetileztem így előállítva a kontrollként szolgáló peptideket. A gyantán lévő peptidhez ecetsavanhidrid : DIEA : DMF 1:1:2 V/V/V arányú elegyét adtam, a kapcsolási idő 1 óra volt. Ezután DMF-dal mostam a gyantát és ninhidrin-próbával ellenőriztem a kapcsolás sikerességét.

A peptid harmadik részéhez fluoreszcens jelölőmolekulát, az 5(6)-karboxifluoreszceint kapcsoltam. A gyantán lévő peptidhez 3 ekvivalens 5(6)-karboxifluoreszcein (Cf) / HOBt / DIC NMP-ban oldott elegyét adtam, a kapcsolási idő 1 óra volt. Ezután DMF-dal mostam a gyantát és ninhidrin-próbával ellenőriztem a kapcsolás sikerességét. A Cf többszörös felkapcsolódásának kiküszöbölése érdekében [202] a gyantát 20% piperidin, 80% DMF, V/V elegyével kezeltem (2+2+5+10 perc), majd DMF-dal mostam. A piperidines kezelés során a gyanta sárga színből vörösre váltott, a szűrlet is vörös színű lett, jelezve a távozó Cf-t.

Mindhárom peptidszármazék (Aoa-, Ac-, Cf-peptidek) esetében a peptidet a gyantáról, valamint az oldallánc védőcsoportokat a peptidekről TFA-s hasítóelegy segítségével távolítottam el a korábban ismertett protokoll szerint. Az acetilezett és fluoreszcensen jelzett nyers peptideket RP-HPLC segítségével tisztítottam, analitikai RP-HPLC-vel, tömegspektrometriával és aminosavanalízissel jellemeztem. A nyers Aoa-peptideket a tisztítási lépés kihagyásával konjugálási reakciókban használtam fel (5.1.3.2. fejezet).

5.1.2.5. Az oldallánc módosítást tartalmazó tuftsinszármazékok szintézise

Az oldallánc módosítást tartalmazó peptideknél (40. ábra) a szekvencia megfelelő pozíciójába olyan lizint építettem, mely szelektíven hasítható oldallánc védőcsoportot tartalmazott. Erre a célra az Fmoc-Lys(Mtt)-OH, valamint az Fmoc-Lys(Dde)-OH aminosavszármazékot alkalmaztam. A kívánt szekvencia elérése után az N-terminális Fmoc-védőcsoportot lehasítottam, a gyantát DCM-nal mostam, szárítottam és 3 részre osztottam. A korábban ismertetett módszerekkel az N-terminálisra Boc-Aoa-OH-t, acetylcsoportot vagy Cf-t kapcsoltam.

A következő lépés mindhárom esetben a szelektíven hasítható oldallánc védőcsoportot tartalmazó lizinről a védőcsoport eltávolítása volt. Az Mtt-védőcsoportot szelektíven hasítottam 2% TFA, 2% TIS, 96% DCM, V/V elegyével. A hasítóeleggyel 5 perces reakcióidővel a gyantát addig kezeltem, míg állandó, intenzív sárga színt nem kaptam (ez jelzi a lehasadt Mtt-csoportot). Ezután DCM-nal 3-szor mostam a gyantát. Ezután újra a hasítóeleggyel kezeltem (3 x 5 perc), majd DCM-nal mostam, ezt a ciklust addig folytattam, amíg a hasítóelegy el nem színtelenedett. A savas hasítás után semlegesítési lépés következett, amelyhez 10% DIEA, 90% DCM, V/V elegyét használtam (5 x 1 perc), majd a gyantát DCM-nal mostam. A hasítás sikerességét ninhidrin-próbával ellenőriztem.

Az Fmoc-Lys(Dde)-OH alkalmazása esetén a Dde-védőcsoport szelektíven hasítottam 2% hidrazinhidrát, 98% DMF, V/V elegyével, 5 x 2 perces kezeléssel. A Dde-csoport hasítása után a gyantát DMF-dal mostam, majd Kaiser próbával ellenőriztem a hasítás sikerességét.

A szelektív lizin oldallánc védőcsoport hasítással szabaddá vált ϵ -aminocsoportokra különböző hosszúságú zsírsavakat kapcsoltam. A vajsav kapcsolása gyantakapacitásra számított 3 ekvivalens vajsavanhidrid, 3 ekvivalens DIEA DMF-os elegyével történt 1 órás kapcsolási idővel. A dekánsav kapcsolása 3 ekvivalens dekánsav, 3 ekvivalens DIC, 3 ekvivalens HOBt NMP-os oldatának alkalmazásával történt 1 órás kapcsolási idővel. A palmitinsav kapcsolása 3 ekvivalens palmitinsav, 3 ekvivalens DIC, 3 ekvivalens HOBt NMP-os oldatának alkalmazásával történt szintén 1 órás kapcsolási idővel.

A két aminooxiacetyl-csoportot is tartalmazó Aoa-OT20(4-Aoa) esetében az N-terminálisra felkapcsolt utolsó aminosav Fmoc-védőcsoportjának lehasítása után eltávolítottam a Dde-védőcsoportot a 4-es pozícióban lévő lizinről. Így a peptidnek 2 szabad aminocsoportja keletkezett, az egyik az N-terminális aminocsoport, a másik a 4-es lizin ϵ -aminocsoportja. Erre a két csoportra egy lépésben kapcsoltam a Boc-Aoa-OH-t (6 ekvivalens Boc-Aoa-OH, 6 ekvivalens DIC, 6 ekvivalens HOBt NMP-os oldata, 1 óra kapcsolási idő).

A TKPR-OT10(8-Aoa; 13-Aoa) származékot Boc/Bzl módszerrel állítottam elő, a szelektíven módosítani kívánt lizinek Fmoc-védőcsoportot tartalmaztak ϵ -aminocsoportjukon (Boc-Lys(Fmoc)-OH beépítése). Az N-terminálisra felkapcsolt utolsó aminosav Boc-védőcsoportjának lehasítása előtt távolítottam el szelektíven az Fmoc-védőcsoportokat 2% piperidin, 2% DBU, 96% DMF, V/V elegyével, majd az így kapott két szabad ϵ -aminocsoporthoz kapcsoltam a Boc-Aoa-OH-t. Ezután hasítottam le a Boc-védőcsoportokat az N-terminális aminosavról és az aminooxiacetyl-csoportokról (33% TFA, 67% DCM, V/V). A peptidet a gyantáról HF és gyökfogók segítségével lehasítottam.

A konjugálható és egyben fluoreszcensen jelzett peptid az Aoa-OT20(4-Cf) esetében a fent leírtakhoz hasonlóan eltávolítottam az N-terminálisra felkapcsolt utolsó aminosav Fmoc-védőcsoportját, Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam a peptid N-terminálisára, majd a szelektíven védett 4-es lizin Dde-

védőcsoportját is eltávolítottam és a szabad ϵ -aminocsoporthoz Cf-t kapcsoltam (3 ekvivalens Cf / DIC / HOBt NMP-os oldata, 1 óra).

Az Ac-OT20(14-Cf) peptidnél az utolsó aminosav Fmoc-védőcsoportjának eltávolítása után a peptid N-terminálisát acetileztem, majd eltávolítottam a ^{14}Lys -ről a Dde-védőcsoportot és a ^{14}Lys ϵ -aminocsoportjára Cf-et kapcsoltam. A Cf-OT20(14-Cf) peptidnél az utolsó aminosav Fmoc-védőcsoportjának eltávolítása után a ^{14}Lys Dde-védőcsoportjának hasítása következett, majd az N-terminálisra és a ^{14}Lys ϵ -aminocsoportjára Cf-et kapcsoltam (6 ekvivalens Cf / DIC / HOBt NMP-os oldata, 1 óra).

Az Fmoc/*t*Bu stratégia alkalmazása esetén TFA-s hasítóeleggyel eltávolítottam a peptideket a gyantáról, illetve az oldallánc védőcsoportokat a peptidekről. Ezután az acetilezett és fluoreszcensen jelölt nyers peptideket feldolgoztam, tisztítottam, analitikai módszerekkel jellemeztem, illetve az aminosavacetilezett peptideket tisztítás nélkül használtam fel a konjugálási reakciókban (5.1.3.2. fejezet).

5.1.2.6. A lizoszomális emésztés során keletkező legkisebb metabolitok előállítása

A lizoszomális emésztés során a konjugátumokból keletkező legkisebb metabolitok előállításához előállítottam az Aoa-Thr-OH, Aoa-Gly-OH és H-Lys(Aoa)-OH aminosavszármazékokat szilárdfázisú szintézissel. Wang gyantára kapcsoltam a kívánt aminosavat (Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, illetve Boc-Lys(Fmoc)-OH, 2 ekvivalens aminosavszármazék, 2 ekvivalens DIC, 0,2 ekvivalens DMAP NMP-os oldata, 1 óra). Eltávolítottam az Fmoc-védőcsoportot, majd Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam a szabad α -aminocsoportra, illetve lizin esetén az ϵ -aminocsoportra (3 ekvivalens Boc-Aoa-OH, 3 ekvivalens DIC, 3 ekvivalens HOBt NMP-os oldata, 1 óra). A kapott származékokat lehasítottam a gyantáról 95% TFA, 2,5% TIS, 2,5% H_2O V/V segítségével. Mivel ezen aminosavszármazékok éterben nem csapódtak ki, az étert és a TFA nagy részét rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A bepárlási maradékhoz desztillált vizet adtam, fagyasztottam és liofilizáltam. Az így nyert Aoa-aminosavakat tisztítás nélkül használtam a konjugálási lépésben (5.1.3.2. fejezet).

5.1.3. Hatóanyag-peptidkonjugátumok szintézise

5.1.3.1. Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak előállítása

A szalicilanilidek 4-formilbenzoéssal alkotott észterei az aldehidcsoportjukon keresztül konjugálhatók aminosavacetilezett tuftsinszármazékokhoz oximkötésen keresztül (50. ábra). 10-30 mg peptidet feloldottam 1 mL 0,2 M NaOAc/AcOH pufferben (pH 5,0). 1,1 ekvivalens hatóanyagot (SalBenz1-3) feloldottam 2 mL DMF-ban, majd az oldatokat összeöntöttem (oldószerarány: NaOAc/AcOH puffer / DMF 1:2 V/V). Az oldatból adott időnként mintát vettem (4 μL) és analitikai RP-HPLC-vel követtem a reakció előrehaladását. A reakcióelegyet 18 óra elteltével félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, a megfelelő frakcióról az acetonitrilt rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam, a bepárlási maradékot liofilizáltam. A kívánt konjugátum frakcióját tömegspektrometriával azonosítottam, homogenitását analitikai RP-HPLC-vel jellemeztem.

5.1.3.2. Szalicilanilid-peptid konjugátumok előállítása

Az anilin-gyűrűn acetilcsoportot tartalmazó, konjugálható szalicilanilid származékokat oximkötésen keresztül kapcsoltam a különböző aminoszomszékolt tuftsinszármazékokhoz (52. ábra). 40-100 mg peptidet feloldottam 3 mL 0,2 M NaOAc/AcOH pufferben (pH 4,5). 1,1 ekvivalens hatóanyagot (Sal7-9) feloldottam 6 mL 2-metoxietanolban, majd az oldatokat összeöntöttem (oldószerarány: NaOAc/AcOH puffer / 2-metoxietanol 1:2 V/V). Az oldatból adott időnként mintát vettem (4 µL) és analitikai RP-HPLC-vel követtem a reakció előrehaladását. Ha kicsapódást tapasztaltam, a reakcióelegyet enyhén melegítettem vízfürdő segítségével (kb. 50 °C-os vízfürdő). A reakcióelegyet 24-72 óra elteltével félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. A kívánt konjugátum frakcióját tömegspektrometriával azonosítottam, homogenitását analitikai RP-HPLC-vel jellemeztem.

5.1.3.3. A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak előállítása

Az *in silico* meghatározott és kémiailag optimált vegyületeket, a piridopirimidin származékokat (TB803 és TB820, Ubichem Pharma Services, Magyarország) konjugáltam különböző tuftsinszármazékokhoz szintén oximkötés kialakításával (57. ábra). 20-50 mg peptidet feloldottam 2 mL 0,2 M NaOAc/AcOH pufferben (pH=5,0). 1,1 ekvivalens hatóanyagot feloldottam 2 mL DMF-ban, majd az oldatokat összeöntöttem (oldószerarány: NaOAc/AcOH puffer / DMF 1:1 V/V). Az oldatból adott időnként mintát vettem (4 µL) és analitikai RP-HPLC-vel követtem a reakció előrehaladását. A reakcióelegyet 24 óra elteltével félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. A kívánt konjugátum frakcióját tömegspektrometriával azonosítottam, homogenitását analitikai RP-HPLC-vel jellemeztem.

5.1.4. A peptidek és a hatóanyag-peptid konjugátumok tisztítása

A lehasított peptidszármazékokat és az előállított hatóanyag-peptid konjugátumokat RP-HPLC segítségével tisztítottam. Az elválasztást Knauer rendszeren (Knauer, Bad Homburg, Németország), szobahőmérsékleten, a következő RP-HPLC oszlopok alkalmazásával végeztem: Phenomenex Jupiter C18 (10 µm, 300 Å, 10 x 250 mm), Phenomenex Jupiter Proteo C18 (10 µm, 90 Å, 10 x 250 mm). Az elúcióhoz alkalmazott elegyek a következők voltak: A eluens: 0,1% TFA, víz (V/V); B eluens: 0,1% TFA, MeCN/víz 80:20 (V/V). A detektálás abszorbancia mérésével történt 220 nm-en, a folyási sebesség 4 mL/perc volt. Az alkalmazott gradienst a tisztítandó vegyület polaritása határozta meg (általában: 5 percig ekvilibrálás a kezdő B%-on, majd 1% B/perc emelkedés, pl. 0-5 perc 10% B, 5-85 perc 10-90% B). A főkomponenst tartalmazó elegyről vákuum alatt az acetonitrilt eltávolítottam, a bepárlási maradékot folyékony nitrogénben lefagyasztottam, majd liofilizáltam.

5.1.5. A peptidek és a hatóanyag-peptid konjugátumok kémiai jellemzése

5.1.5.1. Analitikai RP-HPLC

A konjugálás előremenetelét, a nyers és tisztított termékek homogenitását analitikai RP-HPLC vizsgálattal ellenőriztem. Az analitikai RP-HPLC vizsgálatokhoz Exformma HPLC rendszert használtam Zorbax SB-C18 oszloppal (5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm) vagy Nucleosil C18 oszloppal (5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm), a fentebb ismertetett A és B eluensek alkalmazásával. Az A eluensben oldott 0,5-2 mg/mL töménységű mintákból az oszlopra 20 µL mennyiségeket injektáltam. Az elválasztásokat

szobahőmérsékleten végeztem, a folyási sebesség 1 mL/perc volt. A detektálás UV detektorral, 220 nm-en történt. Az alkalmazott gradiens a következő volt: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B.

5.1.5.2. Aminosavanalízis

Az aminosavösszetétel meghatározását aminosavanalízissel végeztük. A peptidszármazékok 100-250 µg-nyi mennyiségét 6 M HCl-dal, 110 °C-on, 24 óra alatt hidrolizáltuk. A hidrolizátumból az aminosavösszetételt SYKAM 4300 automata aminosavanalizátor (SYKAM, Eresing, Németország) alkalmazásával határoztuk meg. Az aminosavanalíziseket az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban Dr. Medzihradzky-Schweiger Hedvig végezte.

5.1.5.3. Tömegspektrometria

A tömegspektrometriai mérések a peptidszármazékok és hatóanyag-peptid konjugátumok esetében is az 5.1.1.6.5. fejezetben ismertetett módon történtek.

5.1.5.4. A szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak és a szalicilanilid-peptid konjugátumok stabilitásának vizsgálata analitikai RP-HPLC-vel és ESI-MS-sel

A kiválasztott, reprezentatív konjugátumok stabilitás vizsgálatát DMSO-ban 4 °C-on 3 hétig, 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban 37 °C-on 4 hétig, 10% DMSO-t tartalmazó szérumentes RPMI-1640 médiumban (ICM) 37 °C-on 1 hétig és 10% DMSO-t és szérumot tartalmazó RPMI-1640 médiumban (CM) 24 óráig analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével végeztem. Exformma HPLC rendszert használtam Nucleosil C18 RP-HPLC oszloppal (5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm) vagy Phenomenex Jupiter C18 RP-HPLC oszloppal (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm), szobahőmérsékleten a már ismertetett A és B eluensek alkalmazásával. A detektálás UV detektorral történt 220 nm-en. Az alkalmazott gradiens a következő volt: Nucleosil C18 oszlopon 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B, Phenomenex Jupiter C18 oszlopon 0-5 perc 0% B, 5-55 perc 0-90% B. A folyási sebesség 1 mL/perc volt. Az oldatok vegyület koncentrációja 0,5 mg/mL volt, az oldatokból adott időpontokban 20-20 µL-t injektáltam. A kívánt csúcsokat összegyűjtöttem, liofilizáltam és tömegspektrometriával jellemeztem (ESI-MS, 5.1.1.6.5. fejezet). A nem stabil vegyületek felezési idejét a megfelelő csúcs alatti területek alapján határoztam meg.

5.1.5.5. Spektrofluorimetria – a fluoreszcens vegyületek fluoreszcencia intenzitásának vizsgálata a pH függvényében spektrofluoriméter alkalmazásával

Az 5(6)-karboxifluoresceinnel jelölt tuftsinszármazékok fluoreszcens spektrumát különböző koncentráció és pH értékeken Varian Cary Eclipse spektrofluoriméter (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével vettem fel. A minták gerjesztése Xe lámpával, a jelek detektálása fotoelektron-sokszorozó (PMT) alkalmazásával történt. A monokromátor felbontása 0,5 nm volt.

A vízdoldható peptidek 800 µM és 5 mM koncentrációjú, desztillált vízzel készült törzsoldatát 0,1 M citromsav oldatból és 0,2 M Na₂HPO₄ oldatból készült megfelelő pH-jú pufferrel 100-szorosára hígítottam (30 µL törzsoldat + 2970 µL puffer), az így kapott koncentráció: 8 µM és 50 µM. Az 5(6)-

karboxifluoreszcein és a Sal8 nem vízoldható, a Cf-T5(4-pal) rosszul oldódik vízben, ezekből DMSO-val készítettem 800 μM és 5 mM-os törzsoldatot, majd szintén 100-szorosára hígítottam a pufferekkel (1% DMSO végkoncentráció). A Sal8 és Cf-OT20 fizikai keverékénél mindkét törzsoldatból 30-30 μL -t adtam 2940 μL pufferhez, az így kapott oldat koncentrációja mindkét komponensre 50-50 μM . Azoknál a vegyületeknél, melyeknél koncentrációfüggést is vizsgáltam az 50 μM -os oldatot hígítottam tovább a megfelelő pufferrel. Az adott pH értékű pufferek (pH 4, 5, 6, 7 és 7,6) elkészítéséhez szükséges 0,1 M citromsav és 0,2 M Na_2HPO_4 oldatok térfogata a 32. táblázatban látható. A spektrumokat 1 cm-es kvarcküvetében, szobahőmérsékleten vettem fel. Az anyagok fluoreszcencia intenzitását és a maximális emisszió hullámhosszát $\lambda_{\text{ex}}=488$ nm gerjesztés mellett vizsgáltam meg a különböző pH értékű pufferekben. (Az áramlási citometria módszerrel történő vizsgálat során ezt a gerjesztő hullámhosszt alkalmazzuk.) Az összehasonlíthatóság érdekében minden mérést azonos műszer beállítási paraméterekkel végeztem (emisszió mérés $\lambda_{\text{em}}=490-700$ nm között, detektor feszültség =450 V).

A piridopirimidin származékok esetén 5 mM koncentrációjú, DMSO-val készült törzsoldatot, a piridopirimidin konjugátumok esetén 5 mM, desztillált vízzel készült törzsoldatot hígítottam pufferrel 50 μM -ra. A koncentrációfüggésnél ezt az oldatot hígítottam tovább. A mérési körülmények megegyeztek a fent leírtakkal, az alkalmazott detektorfeszültség 1000 V volt.

32. táblázat: Az adott pH értékű citromsav- Na_2HPO_4 puffer elkészítésekor elegyített térfogatok

pH	0,1 M citromsav (mL)	0,2 M Na_2HPO_4 (mL)
4	5,12	3,21
5	4,04	4,29
6	3,07	5,26
7	1,47	6,86
7,6	0,53	7,8

5.1.5.6. A vegyületek membrán affinitásnak és penetrációs sajátságainak jellemzése

A kiválasztott vegyületek membrán affinitásának és penetrációs sajátságainak meghatározását lipid monoréteg és kettősréteg modell rendszereken Dr. Kiss Éva egyetemi tanár csoportjában, az ELTE Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriumában, Dr. Ábrahám Ágnes tudományos munkatárs és Dr. Gyulai Gergő tudományos munkatárs végezték.

5.1.5.6.1. Membrán affinitás vizsgálata lipid monoréteg modell segítségével

A víz-levegő határfelületen létrehozott, rendezett lipid monorétegek kialakításához ikerionos 1,2-palmitoil-oleoil-foszfátidilkolint (POPC), valamint ikerionos 1,2-dipalmitoil-foszfátidilkolint (DPPC) és negatív töltésű 1,2-dipalmitoil-foszfátidil-glicerint (DPPG) 3:1 (n/n) elegyét használták. A monorétegeket KSV MiniMicro Langmuir-mérlegben (KSV Instruments, Finnország) állították elő. A mérleg egy teflonkádból és a felületére helyezett két polioximetilén mozgatható gátból állt, melyhez számítógéppel összekötött elektromérleg és Wilhelmy-lemez (kromatográfiás szűrőpapír, Whatman Chr1) csatlakozott. A méréseket $25 \pm 0,5$ °C-on végezték. A lipideket kloroformban oldották és 50 μL , 0,2 g/L koncentrációjú oldatot terítettek szét fecskendővel a víz szubfázis felületén (kétszer desztillált víz, vezetőképessége <5 mS, felületi feszültsége $25 \pm 0,5$ °C-on 72 mN/m). Az oldószer elpárolgását követően (15 perc) kialakuló

lipid réteget tömörítették, felületi feszültségét 20 mN/m-re állították be a gátak mozgatásával, stabilitását ellenőrizték. A hatóanyagok és a konjugátumok vizes oldatát fecskendővel a lipid réteg alá injektálták, a vegyületek koncentrációja a szubfázisban 2 μM volt. A felületi feszültség változásokat 1 óráig követték nyomon. A membrán affinitást a minta injektálását követően mért oldalnyomás értékek és a minta nélküli lipid réteg oldalnyomásának különbségeként határozták meg ($\Delta\pi$). Minden esetben két független mérést végeztek.

5.1.5.6.2. Membrán affinitás vizsgálata lipid kettősréteg modell segítségével

A lipid kettősrétegek vizsgálata kvarckristály mikromérleg (QCM) segítségével történt. A QCM mérésekhez a POPC kettősrétegek létrehozása a POPC vezikulák *in situ* kiterítésével történt. A vezikulák elkészítéséhez 10 mg POPC-t 1 mL metanol-kloroform (19:1, V/V) elegyében feloldottak gömblombikban. 30 perc rázatás után a szerves fázist rotációs vákuumbepárló segítségével 2 óra alatt eltávolították. A szárított lipidfilmet 10 mL TRIS-pufferben (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 kétszer desztillált vízben, pH=7,4) szuszpendálták. Egyfalú vezikulák előállításához az így kapott 1 g/L koncentrációjú szuszpenziót és a hígított 0,1 g/L koncentrációjú szuszpenziót 100 nm pórusátmérőjű polikarbonát membránszűrőn 31-szer 30 °C-on extrudálták Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) eszköz segítségével közvetlenül a QCM mérések előtt. A részecskék hidrodinamikai átmérőjét (104 \pm 7 nm) dinamikus fényszóródás méréssel határozták meg (Brookhaven BI-200SM goniométer, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA, BI-9000AT digitális autokorrelator, Coherent Genesis MX488-1000STM lézer-dióda rendszer, 488 nm-en, vertikálisan polarizált fény).

Az alkalmazott QCM200 (Stanford Research Systems, Sunnyvale, CA, USA) rendszerben SiO_2 bevonatú kristályon (5 MHz, AT-cut, 25,4 mm átmérő) terítették szét a POPC vezikulákat létrehozva a lipid kettősréteget. A készülék átfolyási cellát, oszcillátort és analizátort tartalmaz. Az átfolyási cella perisztaltikus pumpához kapcsolódik, az áramlási sebesség 0,2 mL/perc volt. A méréseket 25 \pm 0,1 °C-on végezték. A TRIS-puffer folyamatos áramoltatása révén stabil alapvonal elérése után 1 mL 0,1 g/L koncentrációjú frissen készített POPC vezikula szuszpenziót juttattak a kristályra. A lipid kettősréteg létrejötté és újabb pufferes mosás után injektálták az 1 mL hatóanyag, illetve konjugátum oldatát. A perisztaltikus pumpát leállították és 1 órán keresztül hagyták, hogy a vizsgált molekulák és a kettősréteg között végbemenjenek a kölcsönhatások. Végül a rendszert a pufferral mosták. Folyamatosan mérték az érzékelő kristály rezonancia frekvenciáját (f) és a mozgási ellenállást (R). A felületre adszorbeálódott tömeg (Δm) arányos a rezonancia frekvencia változásával (Δf), az összefüggés ideális esetben a Sauerbrey-egyenlettel [208] leírható lineáris összefüggésként: $\Delta f = - C_f * \Delta m$, ahol C_f a kristály érzékenységi faktora.

A QCM mérések után a lipid kettősréteg és a vizsgált molekulák kölcsönhatása miatt bekövetkező morfológiai változásokat atomi erő mikroszkóppal (AFM, Park System, XE-100, Dél-Korea) is tanulmányozták. A méréseket levegőn, 25 °C-on nem-kontakt módban végezték. A mérésekhez Si_3N_4 anyagú, hátoldalán alumínium reflektáló felülettel borított pásztázó tűt használtak (NSC15/AIBS, MicroMasch, 40 N/m erőállandó, 325 kHz rezonancia frekvencia, görbületi sugár < 10 nm). A leolvasási sebesség 1,0 Hz, a leolvasási ablak 5 x 5 μm^2 volt. A képeket a XEI 1.8 (Park System, Dél-Korea) programmal analizálták.

5.2. *In vitro* kísérletek

Az *in vitro* kísérletek során használt vegyszereket, eszközöket, műszereket a Függelék F5-7. táblázatai mutatják be.

5.2.1. Minimális gátló koncentráció (MIC) és telepszám (CFU) meghatározása

Kísérleteinket az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet területén található Bakteriológiai Laboratóriumban, Dr. Szabó Nóra és Dávid Sándor közreműködésével végeztük. A MIC és CFU meghatározásának menetét a 23. ábra mutatja be.

Meghatároztuk a vegyületek *in vitro* antimikobakteriális aktivitását *M. abscessus* (ATCC 19977, gyorsan növő), *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294, lassan növő, szenzitív törzs) és *M. tuberculosis* A8 MDR (ATCC 35822, lassan növő, multirezisztens, rezisztens INH-ra és RIF-re) baktérium törzseken. A baktériumtörzsek 4 hetes friss tenyészetéből golyós lombikban 0,5 McFarland (közelítőleg $1,5 \times 10^8$ baktériumszám/mL [209 , 210]) sűrűségű szuszpenzió készült Sauton táptalajban. A baktérium szuszpenziót ezután 10^3 -, illetve 10^4 -szeresére hígítottuk.

A vizsgálandó vegyületeket DMSO-ban oldottuk, sterilre szűrtük, majd DMSO-val sterilen 10 hígítást készítettünk (koncentrációtartomány: 0,05-250 µg/mL). A hatóanyagoldatokból 100 µL-t pipettáztunk az 5 mL Sula folyékony táptalajt (pH 6,5) [199, 200] tartalmazó csövekbe. A csöveket ezután inokuláltuk a hígított baktérium szuszpenzióval (100 µL) és a *M. abscessus* esetében 7 napig, *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR esetében 28 napig 37 °C-on inkubáltuk. A 7 nap, illetve a 28 nap elteltével meghatároztuk a minimális gátló koncentrációt (MIC), azt a legkisebb hatóanyag koncentrációt, ahol szabad szemmel a csövekben nem láttunk baktériumnövekedést (zavarosodást). Ezekből a csövekből szilárd Löwenstein-Jensen táptalajra [211, 212] oltottunk ki, és *M. abscessus* esetében 7 nap elteltével, *M. tuberculosis* H₃₇Rv és A8 MDR esetében 28 nap elteltével megszámláltuk a kinövekedett kolóniák számát (CFU). A telepszámnak a megfelelő baktérium szuszpenzió hígítással való szorzatát hasonlítottuk össze a kiindulásként alkalmazott 0,5 McFarland szuszpenzió telepszámával. A MIC és CFU értékeket legalább két független kísérletben határoztuk meg. Az izoniazidot (INH), gentamicint (GEN) és ciprofloxacint (CIPX) referenciavegyületekként alkalmaztuk.

A szalicilanilid származékok egy részének *in vitro* antimikobakteriális hatását két különböző rezisztencia mintával rendelkező klinikai izolátum MDR törzsön is megvizsgáltuk: *M. tuberculosis* 9449/2006 (MDR) és *M. tuberculosis* Praha 131 (XDR). Mindkét törzs rezisztens INH-ra, RIF-ra, rifabutinra és sztreptomycinre. A *M. tuberculosis* Praha 131 törzs ezeken kívül etambutolra, ofloxacinra, gentamicinre és amikacinre is rezisztens, ezért ez a törzs extenzíven rezisztens törzsnek (XDR) tekinthető. A *M. tuberculosis* 9449/2006 és Praha 131 törzseken történő MIC meghatározásokat Jiřina Stolaříková végezte (Laboratory for Mycobacterial Diagnostics and Tuberculosis, Regional Institute of Public Health in Ostrava, Ostrava, Csehország). A MIC értékek meghatározását „micromethod” módszerrel végezte, Sula félszintetikus táptalajon (SEVAC, Prága, Csehország). A vegyületek DMSO-ban készült oldatait adta a táptalajhoz (koncentrációtartomány: 0,03 µM-32 µM). A MIC értékek leolvasása 14 és 21 nap inkubációs idő (37 °C) után történt.

5.2.2. *In vitro* antituberkulotikus hatás meghatározása *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériummal fertőzött MonoMac6 humán monocita sejtvonalon

Az intracelluláris baktérium populációt *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumtörzzsel fertőzött MonoMac6 sejtekkel modelleztük [7]. A MonoMac6 sejtek a gazdasejt makrofágok modelljének tekinthetők, a letapadt MonoMac6 sejtek fagocitálják a baktériumot.

A kísérleteket szintén az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet területén található Bakteriológiai Laboratóriumban Dr. Szabó Nóra és Dávid Sándor közreműködésével, Dr. Bősze Szilvia végezte.

A MonoMac6 sejteket 24 lyukú szövettenyésztő lemezre osztották 1 mL RPMI-1640 teljes médiumban (2×10^5 sejt/lyuk) 24 órával a kísérlet megkezdése előtt. A letapadt sejteket 24 óra elteltével *M. tuberculosis* H₃₇Rv baktériumokkal inokulálták (adott mennyiségű baktérium hozzáadása). 4 óra inkubációs idő után a sejteket háromszor mosták szérumentes RPMI-1640 médiummal, így eltávolították a nem fagocitált baktériumokat. A fertőzött sejteket 24 órán át inkubálták 37 °C-on a hatóanyagokkal való kezelés előtt. Az inkubációs idő eltelté után a sejteket kezelték az adott vegyületek megfelelő koncentrációjú oldataival. A szabad hatóanyagok és a hatóanyag-peptid konjugátumok esetében a kezelő oldat koncentrációja és összetétele 125 és 250 μ M, 1% DMSO / szérumentes RPMI-1640 médium volt. A hatóanyagot tartalmazó PLGA nanorészecskék esetében 50 és 100 μ g/mL hatóanyag koncentrációt alkalmaztunk, az oldatokat szintén szérumentes RPMI-1640 médiumban készítették. 3 nap inkubációs idő után a kezelést azonos hatóanyag mennyiséggel megismételték, melyet újabb 3 nap inkubáció követett. Kontrollként szérumentes médiummal kezelt fertőzött sejteket alkalmaztak. A kontroll fertőzött sejtek egy részéből lizátumot készítettek, és szilárd táptalajra való kioltás után meghatározták a telepszámot (CFU). Az így mért CFU értékből következtethetünk a fertőzött sejtek kezdeti élő baktérium tartalmára. A kísérlet végén a sejtekről mosással eltávolították az extracelluláris térben maradt hatóanyagokat, majd a sejteket 2,5%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS) oldattal lizálták. A lizátumból kioltást végeztek szilárd Löwenstein-Jensen táptalajra, és 4 hét elteltével meghatározták a CFU értékeket. Minden vegyület és mindkét alkalmazott koncentráció esetén két független mérést végeztek. A módszer lényegét a 24. ábra mutatja be.

5.2.3. A vegyületek *in vitro* citotoxikus és citosztatikus hatásának meghatározása

5.2.3.1. A vegyületek citotoxikus és citosztatikus hatásának meghatározása MonoMac6 és HepG2 sejteken

A vegyületek citotoxikus és citosztatikus hatását vizsgáltuk MonoMac6 humán monocita sejtvonalon (gazdasejt modell) (DSMZ no.: ACC 124, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) és HepG2 humán májból izolált, hepatocelluláris karcinóma sejtvonalon (ATCC HB-8065) [213 , 214]. A logaritmusos növekedési szakaszban lévő sejteket 96 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottuk 100 μ L RPMI-1640 teljes médiumban (CM) (10% FCS, 2 mM glutamin, 160 μ g/mL gentamicin). A sejszám citotoxikus hatás meghatározásánál 10 000 sejt/lyuk, citosztatikus hatás meghatározásánál 5 000 sejt/lyuk. 24 óra inkubálást követően a sejtekről centrifugálás után (1000 rpm, 5 perc) eltávolítottunk 50 μ L felülúszót és 50 μ L friss szérumentes RPMI-1640 médiumot (ICM) adtunk hozzá. A vegyületek törzsoldataiból (2% DMSO, ICM) tova futó hígítással nyolc különböző koncentrációjú, híguló oldatot állítottunk elő, és ezekből adtunk 100-100 μ L-t a 100 μ L médiumban lévő

sejtekhez (4-4 párhuzamos). Negatív kontrollként 100 μL szérumentes médiumot adtunk a sejtekhez, DMSO-kontrollként 100 μL 2% DMSO-t tartalmazó szérumentes médiumot adtunk a sejtekhez. A sejteken a DMSO végkoncentrációja maximum 1% volt. 24 óra inkubálási idő (37 °C, 5% CO_2) elteltével a sejtekről háromszori mosással távolítottuk el a hatóanyagot (centrifugálás 1000 rpm, 5 perc, a mosás során 135 μL felülúszót távolítottunk el és ugyanennyi friss ICM-et adtunk a sejtekhez). Citotoxicitás meghatározásánál a kezelést és mosást követően a sejtekhez lyukanként 45 μL MTT-oldatot adtunk ($c=2$ mg/mL, szérumentes médiumban oldva, majd szűrve) és a sejteket 3,5 órán át inkubáltuk (37 °C, 5% CO_2). Citosztatikus hatás meghatározása esetében a kezelést követően a harmadik mosás után a sejteket szérumos médiumban (135 μL) további 3 napig inkubáltuk (37 °C, 5% CO_2). A 3 nap elteltével adtuk a lyukakhoz a 45 μL MTT-oldatot és szintén 3,5 óráig inkubáltuk. Az inkubálási idő letelte után a lemezeket centrifugáltuk (2000 rpm, 5 perc) és a felülúszót eltávolítottuk. A lila kristályokat 100 μL DMSO-ban oldottuk és 10 perc rázatás után ELISA lemez leolvasó spektrométer (Labsystem, Helsinki, Finnország) segítségével határoztuk meg az abszorbanciát $\lambda=540$ nm és 620 nm-en. A két hullámhosszon mért abszorbancia értékek különbségét átlagoltuk ($A=A_{540}-A_{620}$). A citotoxicitás és a citosztázis mértéke a mért abszorbancia értékek alapján a következő képlettel határozható meg: citotoxicitás vagy citosztázis (%) = $100 \cdot [1 - (A_{\text{kezelt sejtek}}/A_{\text{kontroll sejtek}})]$, ahol A_{kezelt} a kezelt sejtek, míg A_{kontroll} a kontroll sejtek esetében mért abszorbanciát jelenti. A citotoxicitás és a citosztázis mértékét a koncentráció függvényében ábrázolva a kapott görbék segítségével meghatározhatóak az IC_{50} értékek. A citotoxikus és citosztatikus hatás MTT-tesztel végzett meghatározásának módszerét az 25. ábrán foglaltam össze.

5.2.3.2. A vegyületek citotoxikus hatásának meghatározása BMM Φ sejteken

Vizsgáltuk a vegyületek citotoxikus hatását egér csontvelői makrofág primer sejteken (BMM Φ). Az egér csontvelői makrofágok preparálását Dr. Bősze Szilvia és Dr. Szabó Rita (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) végezte (Függelék F5.1. fejezete) [108]. Az engedély száma: XIV-I-001/2149-4/2012. A BMM Φ sejteken végzett citotoxikus hatás meghatározása a fent ismertetettekhez hasonlóan zajlott, szintén 96 lyukú szövettenyésztő lemezen, a sejttség 10 000 sejt/lyuk volt. A sejteket a szalicilanilid-származékokkal 24 óráig kezeltük, a szalicilanilid-peptid konjugátumokkal 48 óráig kezeltük, mosás után MTT-oldatot adtunk a sejtekhez, és 4 óra inkubálás után meghatároztuk az IC_{50} értékeket.

5.2.3.3. A vegyületek citotoxikus hatásának meghatározása HUVEC sejteken

Vizsgáltuk a vegyületek citotoxikus hatását emberi köldökzsinór vénából preparált endotélsejteken (HUVEC, human umbilical vein endothelial cell). Ezeket a kísérleteket Dr. Cervenák László (tudományos főmunkatárs) és Debreczeni Márta Lídia (PhD hallgató) a Semmelweis Egyetem, III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumának munkatársai végezték.

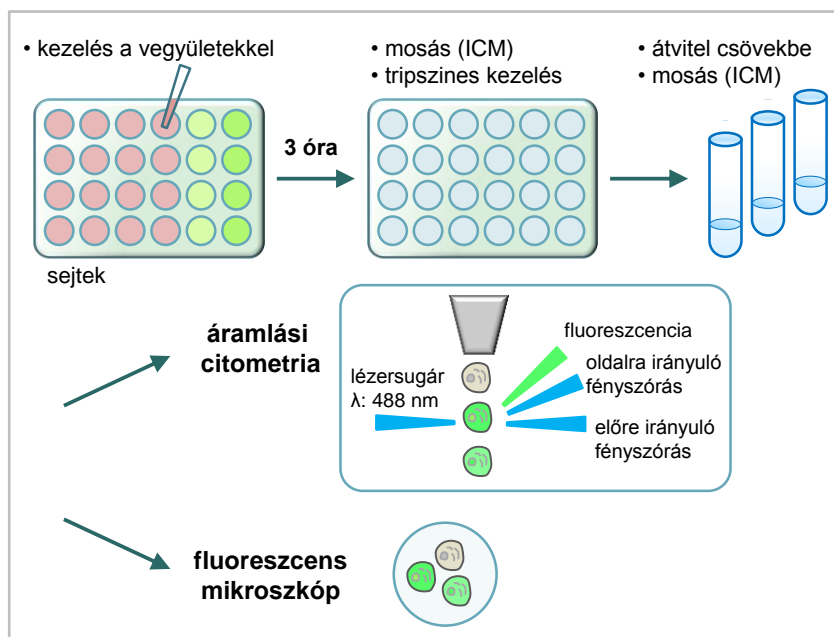
A kísérleteket minden anyag esetében két egyedi HUVEC vonalon végezték, melyeket a tenyésztés és a citotoxicitási kísérletek alatt végig MCDB médiumban tartottak. A kísérletekhez 0,5% zselatinnal bevont 96-lyukú sejttenyésztő lemezeket használtak, ezekre a sejtek a mérést megelőző napon kerültek rá konfluens állapotra számolva. A kísérlet napján a sejtek kezelése előtt a lemez minden lyukában fénymikroszkóp alatt ellenőrizték a sejtek konfluenciáját és morfológiáját. A kezeléseket 3 párhuzamosban végezték, minden anyagból 4 koncentrációt (Sal8 esetén 100 μM , 33,3 μM , 11,1 μM és 3,7 μM a gyenge vízoldhatóság miatt, a konjugátumok esetén 200 μM , 66,7 μM , 22,2 μM és 7,4 μM) vizsgáltak. A

kezeléskor a sejteken teljes médiumcsere történt. A kezelés után a kísérlet teljes időtartama alatt a sejteket 37 °C-on tartották 5%-os CO₂ koncentráció mellett. A sejtek állapotát fénymikroszkóp alatt 1, 4, és 24 óra elteltével vizsgálták minden lyukban, melyet egy 0-4-ig terjedő skálán értékelték (0: nincs letapadt sejt, 4: teljesen egészséges kinézetű konfluens sejtenyészet, 1-3: köztes értékek). Az esetleges precipitáció mértékét szintén minden lyuk esetében feljegyezték. 24 óra után a sejteket egyszer mosták PBS-sel fél percig annak érdekében, hogy a gyengén letapadt sejtek lejöjjenek. A sejteket jéghideg metanol/acetone (1:1 V/V) eleggyel fixálták 5 percen keresztül, majd egy mosási lépés után a sejtmagokat SYBR-Greenel [207] festették (1:5000, 15 perc), amit még 3 mosás követett. Az egyes lyukakról ezután fluoreszcens mikroszkóp használatával képeket készítettek, melyeken a CellP program segítségével megszámozták a sejtmagokat. Az IC₅₀ értékek megadása a sejtek állapotának fénymikroszkóppal történő értékelése alapján és a SYBR-Greenel megfestett sejtmagok CellP programmal történő megszámlálása alapján történt.

5.2.4. Sejtbejutás vizsgálat MonoMac6, BMM Φ és HepG2 sejteken

A fluoreszcens hordozópeptidek, illetve a piridopirimidin-peptid konjugátumok sejtbejutásának vizsgálatára az áramlási citometria módszerét választottuk. A kezelt sejteket BD LSR II áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA, lézer: 488 nm, Coherent Sapphire szilárdtest lézer, 22 mW, FL1 csatorna, szoftver: BD FACSDiva 5.0.3), és Olympus CKX41 fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán, Olympus U-RFLT50 higanygőz lámpa, WideBlue DM500 BP460-490 BA520 IF szűrő, objektív: 40X) analizáltuk.

A logaritikus növekedési fázisban lévő MonoMac6, HepG2 sejteket, valamint a BMM Φ sejteket 24 lyukú szuszpenziós lemezre osztottuk (1 × 10⁵ sejt / 1 mL RPMI-1640 teljes médium) és 24 órán át inkubáltuk (37 °C, 5% CO₂). A vizsgálandó Cf-peptidszármazékokat RPMI-1640 szérumentes médiumban oldottuk. A törzsoldatból 5-szörös tovaftó hígítással állítottuk elő a koncentrációsor (vizsgált koncentrációk: 200 μ M, 40 μ M, 8 μ M, 1,6 μ M és 0,32 μ M). A piridopirimidin származékok és konjugátumok esetén kétszeres tovaftó hígítással állítottuk elő a koncentrációsor (vizsgált koncentrációk: 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,2 μ M és 15,6 μ M). A sejtekről centrifugálás (1000 rpm, 5 perc) után eltávolítottunk 990 μ L médiumot, majd a kontrollokhoz 500 μ L szérumentes médiumot, a kezelendő sejtekhez 500 μ L vegyület-oldatot adtunk. Cf-peptidek esetén 3 óra inkubálás, piridopirimidin származékok és konjugátumok esetén 1 óra inkubálás után (37 °C, 5% CO₂) a sejteket tartalmazó lemezt centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc), majd RPMI-1640 szérumentes médiummal (985 μ L), majd HPMI médiummal mostuk (985 μ L). Újabb centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után a sejtekhez 100 μ L 0,25%-os (m/m) tripszint adtunk (MonoMac6: 1 perc, HepG2: 5 perc, BMM Φ : 8 perc inkubálás, 37 °C, 5% CO₂). A tripszint eltávolítja a sejtfelszínhez kötődő struktúrákat, így az aspecifikusan kötődött peptideket, konjugátumokat, valamint felszabadítja a letapadt sejteket. Ezután a sejtekhez 800 μ L 10% FCS-t tartalmazó HPMI médiumot adtunk, hogy a tripszint inaktiváljuk. Ezután a sejtuszuszpenziót a szövettenyésztő lemez mélyedéseiből áramlási citometriás csövekbe vittük át. A csöveket centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc), majd eltávolítottuk a médiumot. 500 μ L HPMI-t adtunk a sejtekhez, homogenizálás után 100-100 μ L-t 96 lyukú mikrotiter lemezekre pipettáltunk a mikroszkópos vizsgálatokhoz. A maradék 400-400 μ L-t áramlási citométerrel analizáltuk. A módszer lépéseit a 64. ábra mutatja be vázlatosan.



64. ábra: A fluoreszcens vegyületek sejtbejutásának meghatározása áramlási citométerrel és fluoreszcens mikroszkóppal

5.2.5. Membrán integritás vizsgálata propídium-jodidos festéssel

Propídium-jodidos (PI) festéssel vizsgáltuk az Ac-OT20, Ac-OT20(4-dek), Ac-OT20(4-pal) és Ac-OT20(14-pal) kontroll peptidek MonoMac6 sejtek membrán integritására gyakorolt hatását áramlási citométer (BD LSR II) és fluoreszcens mikroszkóp (Olympus CKX41 mikroszkóp, Olympus U-RFLT50 higanygőz lámpa, SuperWideGreen DM570 BP480-550 BA590 szűrő, objektív: 40X) segítségével.

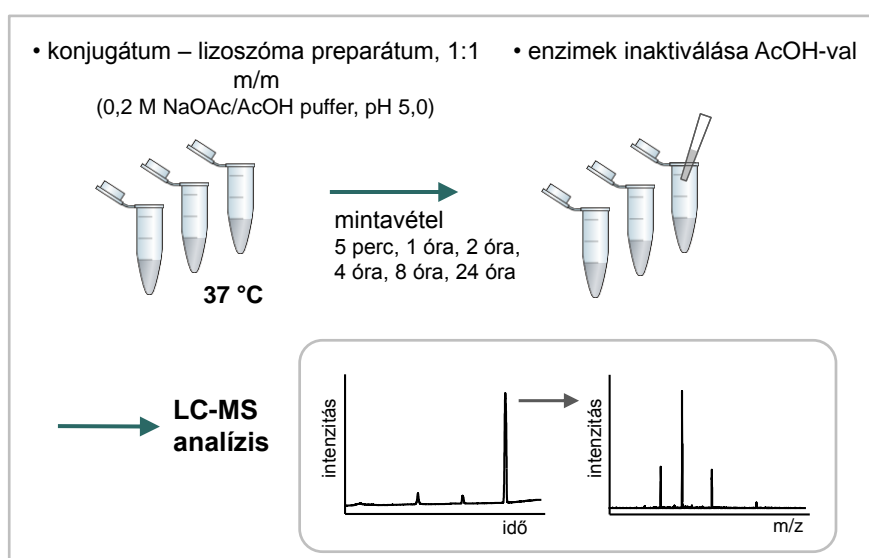
A logaritmusos növekedési fázisban lévő MonoMac6 sejteket 24 lyukú szuszpenziós lemezre osztottuk (10^5 sejt / 1 mL RPMI-1640 teljes médium) és 24 órán át inkubáltuk (37 °C, 5% CO₂). A vizsgálandó peptidszármazékokat RPMI-1640 szérumentes médiumban oldottuk. A törzsoldatból ötszörös tova futó hígítással állítottuk elő a koncentrációsorot (vizsgált koncentrációk: 200 μM, 40 μM és 8 μM). A sejtekről centrifugálás (1000 rpm, 5 perc) után eltávolítottunk 990 μL médiumot, majd a kontrollokhoz 500 μL szérumentes médiumot, a kezelendő sejtekhez 500 μL peptid-oldatot adtunk. 3 óra inkubálás után (37 °C, 5% CO₂) a sejteket tartalmazó lemezt centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc), majd RPMI-1640 szérumentes médiummal (985 μL), majd HPMI médiummal mostuk (985 μL). Újabb centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után a sejtekhez 100 μL 0,25%-os (m/m) tripszint adtunk (1 perc inkubálás, 37 °C, 5% CO₂), majd a tripszint inaktiváltuk 800 μL 10% FCS-t tartalmazó HPMI médiummal. Ezután a sejtuszuspenziót a szövettenyésztő lemez mélyedéseiből áramlási citometriás csövekbe vittük át. A csöveket centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc), majd eltávolítottuk a médiumot, ezután 500 μL HPMI-t adtunk a sejtekhez. A sejteket áramlási citométerrel analizáltuk először PI nélkül, majd közvetlenül a PI hozzáadása után (10 μL, 50 mg/mL PI-oldat). Ezután 100-100 μL-t 96 lyukú mikrotiter lemezre pipettáztunk a mikroszkópos vizsgálatokhoz.

5.2.7. A hatóanyag-peptid konjugátumok lebomlásának jellemzése patkány máj lizoszóma preparátumban

Vizsgáltuk a szalicilanilid-peptid konjugátumok stabilitását / degradációját patkány máj lizoszóma preparátumban. A lizoszóma preparálást Dr. Orbán Erika végezte (az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport volt, a Richter Gedeon Nyrt. jelenlegi munkatársa) [153]. A preparátum fehérje koncentrációját BCA-tesztel (bicinkoninsav) határozták meg, amely 16,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ volt.

A konjugátumokból 90 μL 50 μM (50 $\text{pmol}/\mu\text{L}$) koncentrációjú oldatot készítettem 0,2 M NaOAc/AcOH pufferrel (pH 5,0) tömegspektrometriai méréshez kompatibilis (low binding) Eppendorf csőbe (MS Eppendorf cső). A 16,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fehérje tartalmú lizoszóma preparátumot 4-szeresére, 4,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -re hígítottam 0,2 M NaOAc/AcOH pufferrel, ebből annyit adtam a konjugátumok oldatához, hogy a konjugátum – lizoszóma preparátum aránya 1:1, m/m legyen. Kontrollként a konjugátumok 0,2 M NaOAc/AcOH pufferben (pH 5,0) készült 50 μM -os lizoszóma preparátum nélküli oldatát használtam. Az így kapott reakcióelegyeket 37 °C-on inkubáltam. Adott időpontokban (5 perc, 1 óra, 2 óra, 4 óra, 8 óra és 24 óra után) 13 μL -es mintát vettem az elegyből és ahhoz a reakció leállítására céljából 2 μL AcOH-t adtam. A mintákat az analízisig -80 °C-on tároltam.

LC-MS segítségével meghatároztam a konjugátumokból képződött metabolitokat. A folyadékkromatográfiás rendszer Jasco LC-2000Plus HPLC system (Jasco Europe, Cremella, Italy) volt. Az elválasztásra Supelco Ascentis C18 oszlopot alkalmaztam (3 μm , 100 Å, 2,1 x 150 mm), szobahőmérsékleten, 0,2 mL/perc folyássebességgel. Az alkalmazott eluensek a következők voltak: A eluens: 0,1% hangyasav, kétszer desztillált víz (V/V), B eluens: 0,1% hangyasav, acetonitril/kétszer desztillált víz 80:20 (V/V). A gradiens a következő volt: 0-5 perc 2% B, 5-26 perc 2-90% B, 26-27 perc 90-100% B. A mintákból az oszlopra 5 μL -t injektáltam. Bruker Esquire 3000+ tömegspektrométert alkalmaztam, pozitív ionizálási módban. A porlasztógáz nyomása 30 psi, a szárítógáz sebessége 8 L/perc, a hőmérséklet 365 °C volt. A spektrumokat 150-1200 m/z tartományban vettem fel, 20 000 $m/z/\text{sec}$ mintavételi sebességgel, 500 m/z céltömeg beállítással. A módszer lépéseit a 65. ábrán foglaltam össze.



65. ábra: A konjugátumok stabilitásának vizsgálata patkány máj lizoszóma preparátumban LC-MS segítségével

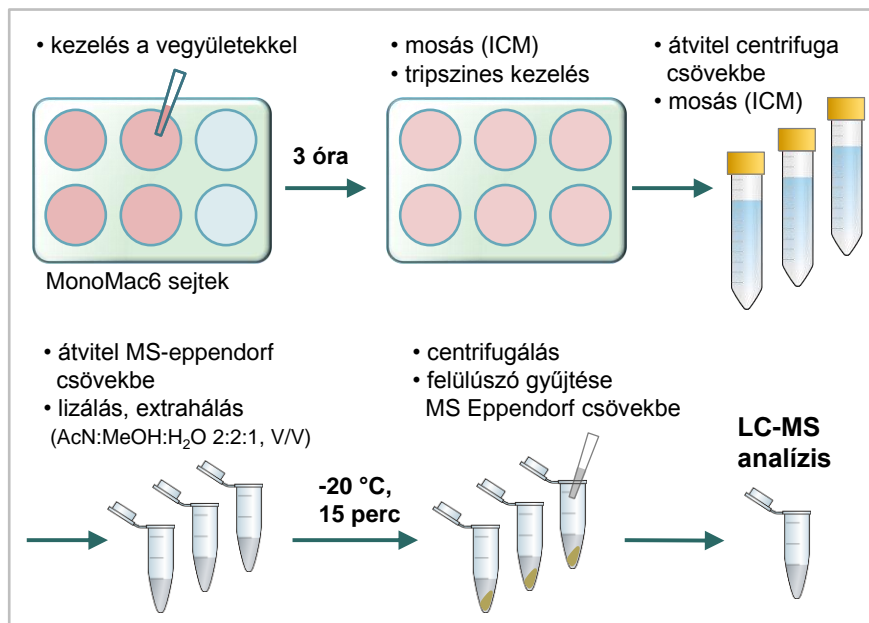
5.2.8. A vegyületek sejtbejutásának vizsgálata LC-MS módszerrel metanol-acetonitril-víz extrakciót követően

Vizsgáltuk a vegyületek sejtbejutását MonoMac6 sejtekbe metanol-acetonitril-víz extrakciót követően, az extraktum analizálását LC-MS módszerrel végeztük.

A logaritmusos növekedési fázisban lévő MonoMac6 sejteket 6 lyukú letapadó szövettenyésztő lemezre osztottuk (10^6 sejt/lyuk, 3 mL RPMI-1640 teljes médium). A 24 óra inkubálást követően a sejteket centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc) a felülúszót eltávolítottuk, és a hatóanyagok 2 mL-nyi megfelelő koncentrációjú oldataival kezeltük a sejteket. Az alkalmazott koncentrációk: 4, 20, és 100 μ M, a Sal3-PLGA nanorészecske esetében ez a hatóanyagtartalomra számított koncentrációt jelenti. A 3 órás inkubációs idő leteltét követően a sejteket centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc), 1,5 mL felülúszót eltávolítottunk, 1,5 mL friss médiumot adtunk a sejtekhez, majd ezeket a lépéseket (centrifugálás, felülúszó eltávolítás) még kétszer ismételtük. A harmadik centrifugálás után a teljes felülúszót eltávolítottuk. Ezután a sejteket 500 μ L 0,25%-os (m/m) tripszinnel kezeltük (1 perc, 37 °C, 5% CO₂), majd a tripszint inaktiváltuk 4 mL teljes médiummal. A sejtszuszpenziót 10 mL-es centrifugacsövekbe juttattuk, majd 4 mL szérummentes RPMI-1640 médiumot adtunk a sejtszuszpenzióhoz. A centrifugálási lépést (1000 rpm, 5 perc) követően eltávolítottuk a felülúszót, majd 8 mL szérummentes RPMI-1640 médiumot adtunk a csövekbe. Újabb centrifugálási lépést követően (1000 rpm, 5 perc) ismét eltávolítottuk a felülúszót, majd 1,2 mL PBS-t adtunk a sejtekhez (PBS összetétele: 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 8 g NaCl, 22 g Na₂HPO₄·7H₂O, desztillált vízzel 1 literre kiegészítve, pH 7,4). A sejtszuszpenzió sejt számát 0,4% tripánkék oldat alkalmazásával Bürker kamrában meghatároztuk. A sejteket 1,5 mL-es MS Eppendorf csövekbe juttattuk, majd a csöveket centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc). A felülúszó eltávolítása után a csövekben levő sejt pillethez 200 μ L extraháló elegyet adtunk (metanol : acetonitril : H₂O = 2:2:1 V/V/V). A lizálás/extrakció 15 percig -20 °C hőmérsékleten történt. Centrifugálást (10 000 rpm, 10 perc) követően a sejt lizátumot, illetve extraktumot tartalmazó felülúszót új MS Eppendorf csöbe pipettáztuk, a pillethez pedig újabb 100 μ L extraháló elegyet adtunk (ez a lépés a pellet átmosására szolgál). Újabb centrifugálási lépés (10 perc, 10 000 rpm) után a felülúszót az előző extraktumhoz adtuk, így összesen 300 μ L extraktumot kaptunk. A pelletet és extraktumot tartalmazó csöveket -80 °C-on tároltuk az LC-MS analízisig. A módszer lépéseit a 66. ábrán foglaltam össze.

Az extraktumok hatóanyagtartalmát és az ismert koncentrációjú standard oldatokat Dr. Szoboszlai Norbert egyetemi adjunktus (ELTE TTK, Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszék) segítségével LC-MS módszerrel vizsgáltuk az MTA Természettudományi Kutatóközpont Műszercentrumában, a Tömegspektrometriai Laboratóriumban. Az elválasztást Waters Acquity UPLC rendszeren (Waters Corp., Milford, MA, USA), Phenomenex Kinetex XB-C18 oszloppal (2,6 μ m, 100 Å, 2,1 x 100 mm) végeztük szobahőmérsékleten, 0,2 mL/perc folyássebességgel. Az alkalmazott eluensek a következők voltak: A eluens: desztillált víz, B eluens: acetonitril. A gradiens a következő volt: 0-1 perc 1% B, 1-10 perc 1-95% B. A mintákból az oszlopra 5 μ L-t injektáltunk. Waters Quattro Micro API tömegspektrométert (Waters Corp., Milford, MA, USA) alkalmaztunk atmoszférikus nyomású ionizálással és hármass kvadrupol analizátorral, negatív ionizálási módban. A spektrumokat 300-400 *m/z* tartományban vettük fel.

Meghatároztuk a Sal3 koncentrációját a felülúszókban és ez alapján kiszámoltuk a sejtbejutás hatékonyságát (sejtbejutási hatékonyság (%)) = $n_{\text{kezelési}}/n_{\text{extraktum}} * 100$, ahol $n_{\text{kezelési}}$ a Sal3 anyagmennyisége a 2 mL kezelési oldatban, $n_{\text{extraktum}}$ a Sal3 mennyisége a 300 μ L extraktumban).



66. ábra: A vegyületek sejtbejutásának vizsgálata LC-MS módszerrel metanol-acetonitril-víz extrahálást követően

Összefoglalás

A tuberkulózis, a *Mycobacterium tuberculosis* intracelluláris baktérium okozta megbetegedés, világszerte az egyik fő közegészségügyi probléma, melyet a multirezisztens törzsek terjedése súlyosbít. A szintén a mikobaktériumok közé tartozó *Mycobacterium abscessus* is jelentős humán patogén, mely a legtöbb antibakteriális hatóanyagra rezisztens.

A doktori munkám során előállított szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és karbamátok kimagasló *in vitro* antimikobakteriális hatással rendelkeztek a gyorsan növekvő *M. abscessus* törzsön, a szenzitív és több multirezisztens *M. tuberculosis* törzsön is. A szalicilanilid származékok kiváló *in vitro* antimikobakteriális hatását beárnyékolja a vegyületek citotoxikus, illetve citosztatikus hatása a gazdasejt makrofág modellen, illetve a hepatotoxicitás vizsgálatára alkalmazott modellen.

A makrofágok hatóanyag felvételének növekedését és kimagasló gátló hatást értünk el az intracelluláris baktérium ellen, a fertőzött gazdasejt modellen a szalicilanilidek PLGA nanorészecskébe való csomagolásával, melyet a szabad kismolekula esetében nem tapasztaltunk.

A célsejt hatóanyag felvétele hatóanyag-konjugátumok alkalmazásával is növelhető. Hordozóként, illetve célbajuttató egységként a makrofágok specifikus receptoraihoz kötődni képes peptideket, a tuftsin receptorra specifikus tuftsinszármazékokat alkalmaztunk. Fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékokkal tanulmányoztuk a hordozók sejtbejutását, mely során azt az eredményt kaptuk a gazdasejt modellen, hogy a hosszabb tuftsinszármazékok sejtbejutási mértéke nagyobb, mint a rövidebbeké. A palmitinsav és dekánsav oldallánc módosítást tartalmazó peptidok sejtbejutása a leghatékonyabb, viszont a palmitoil oldallánc a tuftsinszármazékokat citotoxikus és citosztatikus hatásúvá teszi, károsítja a sejtek membránját.

Szalicilanilid származékokat oximkötésen keresztül tuftsinszármazékokhoz konjugáltuk. A szalicilanilid-észterek konjugátumai az *in vitro* kísérletek körülményei közt nem voltak stabilak az észterkötés gyors hidrolízise miatt. A szalicil- vagy anilin-gyűrűn konjugálható csoportot tartalmazó szalicilanilidek peptidkonjugátumai megfelelően stabilak. Ezekben a konjugátumokban a szalicilanilidek *in vitro* antimikobakteriális hatása az extracelluláris baktériumok ellen megőrződött. A konjugátumok közt vannak olyanok, melyek minimális gátló koncentrációja csak kissé volt magasabb, mint a szabad szalicilanilidé, és ezeknek a konjugátumoknak nem volt citosztatikus hatása a gazdasejt modellen, ezek a konjugátumok szelektívek a baktérium felé. Kiemelkedő jelentőségű, hogy a szalicilanilid-konjugátumok a szabad hatóanyagokkal ellentétben gátolták az intracelluláris baktériumot a fertőzött makrofág modellen, mely hatás valószínűleg a szabad hatóanyagokénál jobb sejtbejutásuknak köszönhető.

Az *in silico* meghatározott és kémiailag optimált hatóanyagjelöltek, a piridopirimidin származékok extracelluláris baktériumok elleni kiváló *in vitro* antimikobakteriális aktivitása is megőrződött a tuftsinkonjugátumokban oximkötés mellett. A piridopirimidin származékok és a konjugátumaik szelektívnek bizonyultak a baktériumokra, mivel nem mutattak citosztatikus aktivitást a gazdasejt modell sejteken. A konjugátumok többsége az intracelluláris baktériumok ellen is hatásosnak bizonyult, míg a szabad piridopirimidin származékok nem mutattak gátló hatást. A konjugátumok intracelluláris aktivitása valószínűleg a nagyobb internalizációjuk és membrán affinitásuk eredménye a szabad hatóanyagokhoz képest.

Summary

Tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis*, a slow growing intracellular pathogen is still a major public health problem worldwide, and the spread of multidrug-resistant strains is threatening. The fast growing *Mycobacterium abscessus* also belonging to the *Mycobacterium* genus is a highly resistant emerging human pathogen.

The synthesized salicylanilide derivatives, salicylanilide esters and carbamates have outstanding *in vitro* antimycobacterial activity against *M. abscessus* strain, and also against sensitive and multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis*. The outstanding antimycobacterial activity of the salicylanilide derivatives is overshadowed by their cytotoxic and cytostatic activity on host cell macrophage model and hepatocyte model.

In contrast with the free salicylanilides, enhanced cellular uptake on host cell model and outstanding inhibition activity against the intracellular bacteria in infected host cell model were achieved by the encapsulation of the salicylanilide derivatives into PLGA nanoparticles.

Enhanced cellular uptake can be also obtained using drug-peptide conjugates. As carrier and targeting moiety tuftsin derivatives were used, these peptides can bind to the tuftsin receptors on the surface of the macrophages and monocytes. The cellular uptake of the fluorescently labelled tuftsin derivatives was studied and we can conclude that the internalization of the longer peptides is higher than internalization of the shorter ones. The presence of the palmitic or decanoic acid side chain in the tuftsin derivatives outstandingly enhanced the cellular uptake rate. However, peptides with palmitic acid side chain showed cytotoxic and cytostatic effect on human cells and they can cause damage in the cell membrane.

Salicylanilide derivatives were conjugated to tuftsin derivatives *via* oxime bond. The peptide conjugates of salicylanilide esters were not stable under the conditions of the *in vitro* experiments, fast hydrolysis of the ester bond occurred. The peptide conjugates of salicylanilides that contain conjugable group on the salicylic or aniline ring were stable. In these conjugates the *in vitro* antimycobacterial activity of the drugs against the extracellular bacteria is preserved with the conjugation to peptides by oxime bond. There are conjugates that have minimal inhibitory concentration only slightly higher than the free salicylanilides, and these conjugates did not show any cytostatic activity on the host cell model, therefore these conjugates are selective towards the bacteria. It is highly important that the salicylanilide-peptide conjugates were effective against the intracellular bacteria in contrast with the free drugs, probably due to the better internalization of the conjugates than the free drugs.

The *in silico* identified, chemically optimized drug candidates, the pyridopyrimidine derivatives also preserved their antimycobacterial activity in the drug-peptide conjugates with low minimal inhibitory concentrations. The free pyridopyrimidine derivatives and their conjugates proved to be selective towards the bacteria since they did not show cytostatic activity against the host cell model. Most of the drug-peptide conjugates were effective also against the intracellular bacteria, while the free pyridopyrimidine derivatives showed no inhibition. This better intracellular activity can be attributed to the enhanced internalization and better membrane affinity of the conjugates than the free drugs.

A dolgozat alapjául szolgáló saját közlemények

Baranyai, Zs., Krátký, M., Vinšová, J., Szabó, N., Senoner, Zs., Horváti, K., Stolaříková J., Dávid, S., Bősze, Sz., Combating highly resistant emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium tuberculosis* with novel salicylanilide esters and carbamates, **2015**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101, 692-704.

Ábrahám, Á.*, **Baranyai, Zs.***, Gyulai, G., Pári, E., Horváti, K., Bősze, Sz., Kiss, É., Comparative analysis of new peptide conjugates of antitubercular drug candidates – model membrane and *in vitro* studies, **2016**, *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 147, 106-115.

* megosztott első szerzők

A témában megjelent, a dolgozatban nem szereplő eredményeket tartalmazó közlemény

Krátký, M., Bősze, Sz., **Baranyai, Zs.**, Szabó, I., Stolaríková, J., Paraskevopoulos, G., Vinšová, J., Synthesis and *in vitro* biological evaluation of 2-(phenylcarbamoyl)phenyl 4-substituted benzoates, **2015**, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 868-875.

A témában bemutatott közlemények ISSN és ISBN kiadványban

Baranyai, Zs., Horváti, K., Mező, G., Bősze, Sz., Synthesis and *in vitro* functional characterisation of peptide conjugates that inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, 3rd International NanoBio Conference, Zürich, Switzerland, **2010**, *European Cells and Materials*, 20(3), 14, ISSN 1473-2262

Baranyai, Zs., Horváti, K., Szabó, N., Mező, G., Schnöller, D., Péntzes, Cs. B., Kiss, É., Hudecz, F., Bősze, Sz., Synthesis and *in vitro* characterization of peptide conjugates containing new drug candidates effective against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, In: *Peptides 2012*, Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium, Athens, Greece (Eds.: Kokotos, G., Constantinou-Kokotou, V., Matsoukas, J.), European Peptide Society, **2012**, 510-511, ISBN 978-960-466-121-3

Baranyai, Zs., Krátký, M., Vinšová, J., Szabó, N., Senoner, Zs., Bősze, Sz., Synthesis of salicylanilide-peptide conjugates and their *in vitro* antimycobacterial evaluation, In: *Peptides 2014*, Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, Sofia, Bulgaria, (Eds.: Naydenova, E., Pajpanova, T., Danalev, D.), European Peptide Society, **2014**, 280-281, ISBN 978-619-904-272-4

A témában bemutatott előadások, poszterek nemzetközi vagy hazai konferencián

Baranyai, Zs., Horváti, K., Bősze, Sz., *Mycobacterium tuberculosis* tenyészetének növekedését gátló vegyületek szintézise és funkcionális jellemzése (előadás), XXXIV. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2011. 11. 02. - 11. 04., ISBN 978-963-315-062-7, 42

Baranyai, Zs., Vinšová, J., Szabó, N., Bősze, Sz., *In vitro* antimycobacterial activity of substituted salicylanilides against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv and multidrug-resistant A8 cultures (poszter), 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award Conference, Szeged, Hungary, 2012. 03. 22. - 03. 25.

Baranyai, Zs., Vinšová, J., Kiss, É., Gyulai, G., Szabó, N., Bősze, Sz., *In vitro* antimycobacterial evaluation of substituted salicylanilide derivatives on *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv culture (poszter), 8th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Lublin, Poland, 2013. 06. 30. - 07. 04.

Baranyai, Zs., Vinšová, J., Krátký, M., Szabó, N., Senoner, Zs., Bősze, Sz., *In vitro* activity evaluation of substituted salicylanilide esters and carbamates (előadás), 4th Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Hradec Králové, Czech Republic, 2014. 06. 20. - 06. 22.

Baranyai, Zs., Krátký, M., Vinšová, J., Kiss, É., Gyulai, G., Szabó, N., Senoner, Zs., Dávid, S., Bősze, Sz., Preparation and *in vitro* antimycobacterial activity of encapsulated salicylanilide derivatives (poszter), From Cell-Penetrating Peptides to Nanoparticles for Cellular Delivery, CPP Paris, P43, Paris, France, 2015. 07. 01. - 07. 03.

Baranyai, Zs., Krátký, M., Vinšová, J., Szabó, N., Senoner, Zs., Bősze, Sz., Antituberkulotikus hatású vegyületek és konjugátumok szintézise és biológiai aktivitásának vizsgálata (előadás), Microtrade tudományos szimpózium, Budapest, 2015. 12. 02.

Baranyai, Zs., Krátký, M., Vinšová, J., Szabó, N., Senoner, Zs., Bősze, Sz., Synthesis and *in vitro* evaluation of antitubercular drug-peptide conjugates (poszter), 6th International Meeting on Antimicrobial Peptides, Leipzig, Germany, 2016. 08. 31. - 09. 03.

Előadások hazai munkabizottsági ülésen

Baranyai, Zs., Vinšová, J., Krátký, M., Szabó, N., Bősze, Sz., Szubsztituált szalicilanilid származékok antituberkulotikus hatása *in vitro Mycobacterium tuberculosis* tenyészeteken és intracelluláris modellen, MTA Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes, 2013. 05. 29. - 05. 31.

Baranyai, Zs., Vinšová, J., Krátký, M., Szabó, N., Bősze, Sz., Szalicilanilid származékok és szalicilanilid-peptid konjugátumok szintézise és biológiai aktivitása (előadás), MTA Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes, 2015. 05. 20. - 05. 22.

Baranyai, Zs., Krátký, M., Vosátka, R., Szabó, N., Senoner, Zs., Dávid, S., Vinšová, J., Bősze, Sz., Antituberkulotikus hatású peptidkonjugátumok szintézise és biológiai aktivitása (előadás), MTA Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, 2016. 05. 30. - 06. 01.

Egyéb közlemények

Lente, G., Kalmár, J., **Baranyai, Zs.**, Kun, A., Kék, I., Bajusz, D., Takács, M., Veres, L., Fábíán, I., One vs. two electron oxidation with peroxomonosulfate ion: reactions with iron(II), vanadium(IV), halide ions, and photoreaction with cerium(III), **2009**, *Inorganic Chemistry*, 48, 1763-1773.

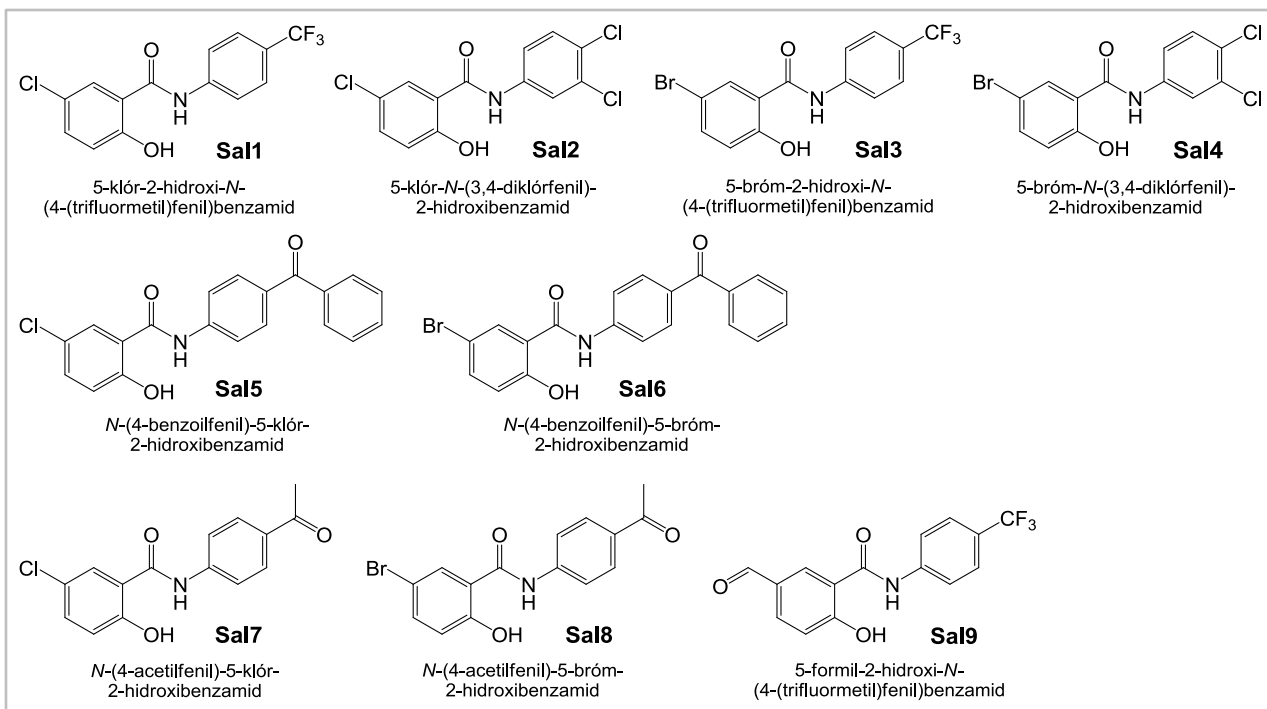
Manea, M., Leurs, U., Orbán, E., **Baranyai, Zs.**, Öhlschläger, P., Marquardt, A., Schulcz, Á., Tejeda, M., Kapuvári, B., Tóvári, J., Mező, G., Enhanced enzymatic stability and antitumor activity of daunorubicin-GnRH-III bioconjugates modified in position 4, **2011**, *Bioconjugate Chemistry*, 22, 1320-1329.

Cserép, G. B.* , **Baranyai, Zs.***, Komáromy, D., Horváti, K., Bősze, Sz., Kele, P., Fluorogenic tagging of peptides *via* Cys residues using thiol-specific vinyl sulfone affinity tags, **2014**, *Tetrahedron*, 70, 5961-5965.

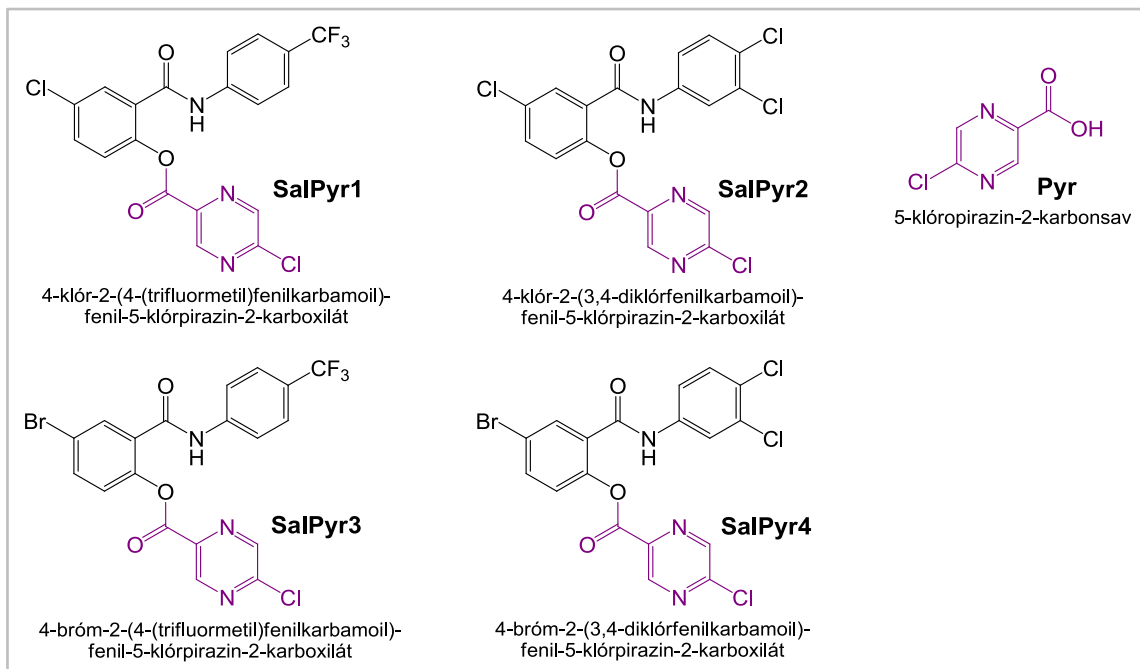
* megosztott első szerzők

FÜGGELÉK

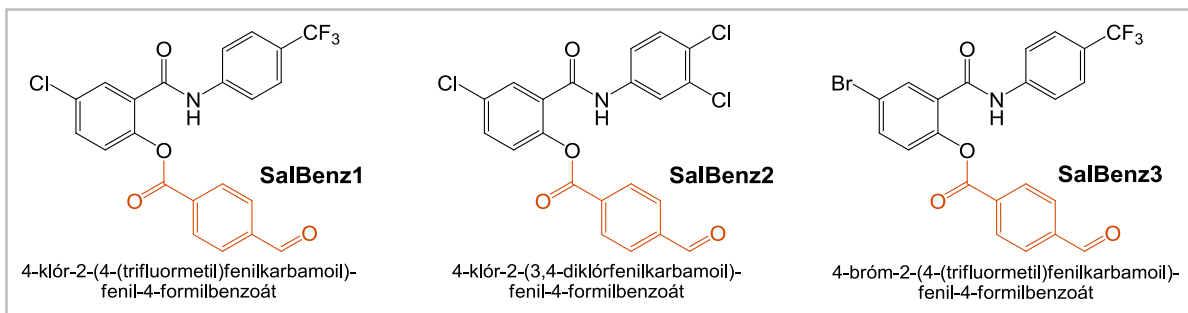
F1. Szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok



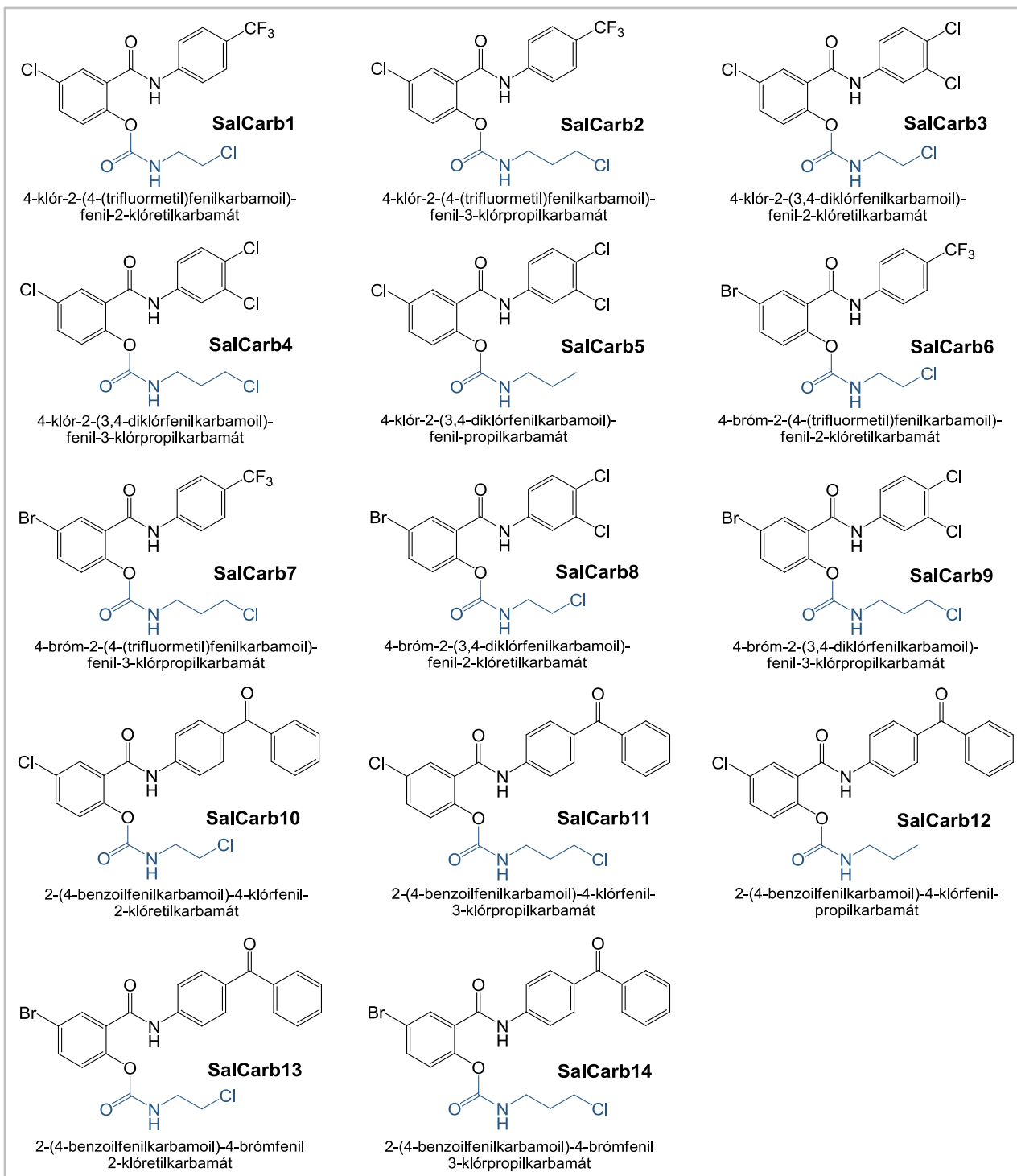
F1. ábra: A szubsztituált szalicilanilid származékok szerkezete



F2. ábra: A szalicilanilid-5-klórpirazinoátok szerkezete



F3. ábra: A szalicilanilid-4-formilbenzoátok szerkezete



F4. ábra: A szalicilanilid-karbamátok szerkezete

A szalicilanilid származékok, szalicilanilid-észterek és szalicilanilid-karbamátok kémiai jellemzése

Az előállított vegyületek kitermelése, olvadáspontja, IR, NMR és MS segítségével történő jellemzése, valamint az elemanalízis során kapott eredmények az alábbiakban találhatóak.

5-klórpirazin-2-karbonsav (**Pyr**) [197]

Barna szilárd; kitermelés: 75%; Op: 150 °C felett elbomlik

IR (ATR): 3408, 1708 (C=O), 1524, 1322, 1298, 1271, 1167, 1122, 1026, 920, 884, 800, 740, 720, 652

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 13,87 (1H, s, OH), 9,00 (1H, d, J = 1,3 Hz, H3), 8,90 (1H, d, J = 1,4 Hz, H6)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 164,54, 151,30, 145,64, 144,61, 142,66

M_{mo} (mért/számolt): 158,0 / 158,0

Elemanalízis, számolt C₅H₃ClN₂O₂ (158,54): C, 37,88; H, 1,91; N, 17,67; mért: C, 38,02; H, 1,88; N, 17,54

5-klór-2-hidroxi-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)benzamid (**Sal1**) [51]

Fehér szilárd; kitermelés: 63%; Op: 222,7-223,9 °C

IR (ATR): 1629 (C=O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 11,47 (bs, 1H, OH), 10,66 (bs, 1H, NH), 7,97–7,89 (m, 2H, H3', H5'), 7,88 (d, 1H, J = 2,7 Hz, H6), 7,75–7,68 (m, 2H, H2', H6'), 7,46 (dd, 1H, J = 8,8 Hz, J = 2,7 Hz, H4), 7,02 (d, 1H, J = 8,8 Hz, H3)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 165,3, 156,5, 142,1, 133,3, 128,8, 126,3, 126,2, 124,5 (q, J = 271,4 Hz), 124,3 (q, J = 32,1 Hz), 123,0, 120,6 (q, J = 6,9 Hz), 120,6

M_{mo} (mért/számolt): 315,0 / 315,1

Elemanalízis, számolt C₁₄H₉ClF₃NO₂ (315,68): C, 53,27; H, 2,87; N, 4,44, mért: C, 53,10; H, 3,01; N, 4,52

5-klór-*N*-(3,4-diklórfenil)-2-hidroxibenzamid (**Sal2**) [51]

Fehér szilárd; kitermelés: 69%; Op: 248,0-249,1 °C

IR (ATR): 1627 (C=O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 11,54 (bs, 1H, OH), 10,54 (s, 1H, NH), 8,09 (d, 1H, J = 2,3 Hz, H2'), 7,85 (d, 1H, J = 2,7 Hz, H6), 7,69-7,57 (m, 2H, H5', H6'), 7,45 (dd, 1H, J = 8,8 Hz, J = 2,7 Hz, H4), 7,01 (d, 1H, J = 8,8 Hz, H3)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 165,17, 156,50, 138,49, 133,25, 131,16, 130,81, 128,69, 125,84, 122,94, 121,94, 120,75, 120,27, 119,18

M_{mo} (mért/számolt): 315,0 / 315,10

Elemanalízis, számolt C₁₃H₆Cl₃NO₂ (316,56): C, 49,32; H, 2,55; N, 4,42, mért: C, 48,99; H, 2,50; N, 4,21

5-bróm-2-hidroxi-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)benzamid (**Sal3**) [51]

Fehér szilárd; kitermelés: 71%; Op: 217,0-218,0 °C

IR (ATR): 1635 (C=O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 11,58 (bs, 1H, OH), 10,59 (s, 1H, NH), 7,95 (d, 1H, J = 2,5 Hz, H6), 7,92–7,85 (m, 2H, H3', H5'), 7,71–7,65 (m, 2H, H2', H6'), 7,53 (dd, 1H, J = 8,8 Hz, J = 2,5 Hz, H4), 6,93 (d, 1H, J = 8,8 Hz, H3)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 165,2, 156,9, 142,0, 136,1, 131,7, 126,3 (q, J = 3,7 Hz), 124,5 (q, J = 271,7 Hz), 124,3 (q, J = 32,1 Hz), 121,1, 120,7, 119,6, 110,4

M_{mo} (mért/számolt): 359,0 / 359,1

Elemanalízis, számolt C₁₄H₉BrF₃NO₂ (360,13): C, 46,69; H, 2,52; N, 3,89, mért: C, 46,87; H, 2,44; N, 3,99

5-bróm-*N*-(3,4-diklórfenil)-2-hidroxibenzamid (**Sal4**) [51]

Fehér szilárd; kitermelés: 67%; Op: 239,9-240,6 °C

IR (ATR): 1624 (C=O)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,57 (bs, 1H, OH), 10,53 (s, 1H, NH), 8,08 (d, 1H, J = 2,4 Hz, H2'), 7,97 (d, 1H, J = 2,6 Hz, H6), 7,67–7,55 (m, 3H, H4, H5', H6'), 6,96 (dd, 1H, J = 8,7 Hz, J = 0,9 Hz, H3)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165,12, 156,97, 138,45, 136,06, 131,51, 131,15, 130,77, 125,85, 121,96, 120,75, 120,70, 119,60, 110,34

M_{mo} (mért/számolt): 359,0 / 359,1

Elemanalízis, számolt C₁₃H₈BrCl₂NO₂ (361,02): C, 43,25; H, 2,23; N, 3,88, mért: C, 43,36; H, 2,40; N, 3,69

N-(4-benzoilfenil)-5-klór-2-hidroxibenzamid (**Sal5**)

Fehér szilárd; kitermelés: 44%; Op: 218,0-218,8 °C

IR (ATR): 3314 (NH), 1644, 1621 (CONH-I), 1599 (CONH-II), 1222 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,63 (1H, s, OH), 10,67 (1H, bs, NH), 7,94-7,88 (3H, m, H6, H3', H5'), 7,81-7,76 (2H, m, H2', H6'), 7,75-7,70 (2H, m, H2'', H6''), 7,65 (1H, tt, J = 1,9 Hz, J = 7,4 Hz, H4''), 7,59-7,52 (2H, m, H3'', H5''), 7,46 (1H, dd, J = 2,7 Hz, J = 8,8 Hz, H4), 7,03 (1H, d, J = 8,8 Hz, H3)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 194,78, 165,14, 156,43, 142,52, 137,61, 133,23, 132,53, 132,35, 131,21, 129,61, 128,86, 128,69, 123,01, 120,56, 119,92, 119,18

M_{mo} (mért/számolt): 351,1 / 351,3

Elemanalízis, számolt C₂₀H₁₄ClNO₃ (351,07): C, 68,28; H, 4,01; N, 3,98; mért: C, 68,23; H, 3,88; N, 3,50

N-(4-benzoilfenil)-5-bróm-2-hidroxibenzamid (**Sal6**)

Fehér szilárd; kitermelés: 26 %; Op: 229,7-231,1 °C

IR (ATR): 3314 (NH), 1644, 1620 (CONH-I), 1599 (CONH-II), 1221 (C-O)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,64 (1H, s, OH), 10,66 (1H, bs, NH), 8,01 (1H, d, J = 2,6 Hz, H6), 7,92-7,88 (2H, m, H3', H5'), 7,80-7,76 (2H, m, H2', H6'), 7,74-7,71 (2H, m, H2'', H6''), 7,66 (1H, tt, J = 1,9 Hz, J = 7,4 Hz, H4''), 7,59-7,53 (3H, m, H4, H3'', H5''), 6,97 (1H, d, J = 8,8 Hz, H3)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 194,76, 165,07, 156,86, 142,49, 137,60, 136,03, 132,50, 132,35, 131,69, 131,18, 129,58, 128,67, 121,07, 119,93, 119,60, 110,41

M_{mo} (mért/számolt): 395,0 / 395,2

Elemanalízis, számolt C₂₀H₁₄BrNO₃ (396,23): C, 60,62; H, 3,56; N, 3,53; mért: C, 60,34; H, 3,54; N, 3,46

N-(4-acetilfenil)-5-klór-2-hidroxibenzamid (**Sal7**)

Halványsárga szilárd; kitermelés: 7 %; Op: 231-233 °C

IR (ATR): 3322, 1677, 1642, 1591, 1538, 1483, 1415, 1357, 1324, 1277, 1222, 1181, 1137, 1104, 967, 907, 843, 825, 700, 670, 652,

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,64 (1H, bs, OH), 10,62 (1H, bs, NH), 7,97 (2H, d, J = 8,6 Hz, H3', H5'), 7,89 (1H, d, J = 2,7 Hz, H6), 7,86 (2H, d, J = 8,7 Hz, H2', H6'), 7,46 (1H, dd, J = 8,8 Hz, J = 2,7 Hz, H4), 7,03 (1H, d, J = 8,8 Hz, H3), 2,55 (3H, s, CH₃)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 196,75, 165,09, 156,46, 142,71, 133,23, 132,60, 129,55, 129,36, 128,85, 123,01, 119,93, 119,19, 26,67

M_{mo} (mért/számolt): 289,1 / 289,1

Elemanalízis, számolt C₁₅H₁₂ClNO₃ (289,71): C, 62,19; H, 4,18; N, 4,83; mért: C, 62,02; H, 4,19; N, 4,74

N-(4-acetilfenil)-5-bróm-2-hidroxibenzamid (**Sal8**)

Halványsárga szilárd; kitermelés: 6 %; Op: 243-245 °C

IR (ATR): 3335, 1671, 1637, 1530, 1482, 1414, 1359, 1332, 1270, 1221, 1182, 1140, 1096, 962, 909, 820, 778, 658

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,64 (1H, bs, OH), 10,62 (1H, bs, NH), 8,01 (1H, d, J = 2,5 Hz, H6), 7,97 (2H, d, J = 8,6 Hz, H3', H5'), 7,85 (2H, d, J = 8,6 Hz, H2', H6'), 7,57 (1H, dd, J = 8,8 Hz, J = 2,6 Hz, H4), 6,97 (1H, d, J = 8,8 Hz, H3), 2,55 (3H, s, CH₃)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 196,75, 165,02, 156,86, 142,70, 136,03, 132,59, 131,69, 129,54, 121,02, 119,92, 119,60, 110,41, 26,67

M_{mo} (mért/számolt): 333,0 / 333,1

Elemanalízis, számolt C₁₅H₁₂BrNO₃ (334,16): C, 53,91; H, 3,62; N, 4,19; mért: C, 54,01; H, 3,59; N, 4,22

5-formil-2-hidroxi-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)benzamid (**Sal9**)

Halványsárga szilárd; kitermelés: 6 %; Op: 254,5-257 °C

IR (ATR): 3343, 1685, 1637, 1608, 1588, 1551, 1487, 1370, 1332, 1307, 1295, 1243, 1196, 1184, 1152, 1101, 1081, 1066, 1017, 964, 879, 852, 824, 678

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 12,29 (1H, bs, OH), 10,74 (1H, s, NH), 9,90 (1H, s, COH), 8,40 (1H, d, J = 2,1 Hz, H₆), 7,97-7,93 (3H, m, H₄, H_{3'}, H_{5'}), 7,74 (2H, d, J = 8,5 Hz, H_{2'}, H_{6'}), 7,17 (1H, d, J = 8,5 Hz, H₃)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 191,12, 165,60, 162,58, 142,13, 133,99, 132,86, 128,43, 126,26 (q, J = 3,8 Hz), 124,52 (q, J = 272,0 Hz), 124,24 (q, J = 32,1 Hz), 120,57, 120,27, 118,01

M_{mo} (mért/számolt): 309,1 / 309,1

Elemenálízis, számolt C₁₅H₁₀F₃NO₃ (309,24): C, 58,26; H, 3,26; N, 4,53; mért: C, 58,34; H, 3,40; N, 4,48

4-klór-2-(4-(trifluorometil)fenilkarbamoil)-fenil-5-klórpirazin-2-karboxilát (**SalPyr1**)

Fehér szilárd; kitermelés: 35%; Op: 163,4-165,0 °C

IR (ATR): 3372 (NH), 3081, 2934, 2857, 1751 (C=O észter), 1663, 1648, 1633, 1600, 1530, 1520, 1477, 1411, 1323, 1297, 1274, 1259, 1190, 1163, 1125, 1104, 1066, 1020, 879, 839, 826, 786, 715, 702, 668

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9,40 (1H, bs, NH), 9,23 (1H, d, J = 1,4 Hz, H_{3''}), 8,69 (1H, d, J = 1,4 Hz, H_{5''}), 8,13 (1H, d, J = 2,6 Hz, H₃), 7,78 (2H, d, J = 8,4 Hz, H_{3'}, H_{5'}), 7,61 (2H, d, J = 8,3 Hz, H_{2'}, H_{6'}), 7,57 (1H, dd, J = 2,5 Hz, J = 8,6 Hz, H₅), 7,52 (1H, d, J = 8,7 Hz, H₆)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 161,43, 160,35, 154,25, 146,70, 146,04, 144,31, 140,76, 139,71, 132,72, 131,40, 127,46, 126,66 (q, J = 32,8 Hz), 126,19 (q, J = 3,8 Hz), 123,93 (q, J = 272,6 Hz), 123,92, 120,45

M_{mo} (mért/számolt): 455,0 / 455,2

Elemenálízis, számolt C₁₉H₁₀ClF₃N₃O₃ (456,20): C, 50,02; H, 2,21; N, 9,21; mért: C, 50,34; H, 2,45; N, 9,43

4-klór-2-(3,4-diklórfenilkarbamoil)-fenil-5-klórpirazin-2-karboxilát (**SalPyr2**)

Fehér szilárd; kitermelés: 60%; Op: 172,5-174,8 °C

IR (ATR): 3365 (NH), 3093, 2931, 2860, 1757 (C=O észter), 1702, 1668, 1645, 1589, 1519, 1475, 1397, 1375, 1322, 1298, 1270, 1237, 1192, 1132, 1108, 1023, 911, 875, 860, 822, 709, 679, 663

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9,33 (1H, bs, NH), 9,23 (1H, d, J = 1,4 Hz, H_{3''}), 8,72 (1H, d, J = 1,4 Hz, H_{5''}), 8,16 (1H, d, J = 2,5 Hz, H_{2'}), 7,80 (1H, d, J = 2,4 Hz, H₃), 7,64 (1H, dd, J = 2,5 Hz, J = 8,8 Hz, H₅), 7,57-7,55 (2H, m, H₆, H_{6'}), 7,41 (1H, d, J = 8,8 Hz, H_{5'})

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 161,07, 160,22, 154,48, 146,75, 146,20, 144,32, 139,87, 137,45, 132,88, 132,68, 131,75, 130,65, 130,63, 128,20, 127,28, 123,77, 122,54, 120,07

M_{mo} (mért/számolt): 454,9 / 455,0

Elemenálízis, számolt C₁₈H₉Cl₄N₃O₃ (457,09): C, 47,30; H, 1,98; N, 9,19; mért: C, 47,07; H, 2,04; N, 9,03

4-bróm-2-(4-(trifluorometil)fenilkarbamoil)-fenil-5-klórpirazin-2-karboxilát (**SalPyr3**)

Fehér szilárd; kitermelés: 29%; Op: 159,7-161,3 °C

IR (ATR): 3356 (NH), 3076, 2937, 2858, 1759 (C=O észter), 1661, 1647, 1600, 1531, 1521, 1473, 1413, 1321, 1294, 1269, 1196, 1165, 1140, 1115, 1102, 1093, 1068, 1023, 874, 839, 820, 785, 711, 687, 653

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9,36 (1H, bs, NH), 9,24 (1H, d, J = 1,4 Hz, H_{3''}), 8,70 (1H, d, J = 1,3 Hz, H_{5''}), 8,30 (1H, d, J = 2,5 Hz, H₃), 7,79 (2H, d, J = 8,4 Hz, H_{3'}, H_{5'}), 7,73 (1H, dd, J = 2,5 Hz, J = 8,6 Hz, H₅), 7,62 (2H, d, J = 8,5 Hz, H_{2'}, H_{6'}), 7,46 (1H, d, J = 8,6 Hz, H₆)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161,26, 160,27, 154,29, 146,73, 146,59, 144,32, 140,76, 139,69, 135,73, 134,41, 127,67, 126,65 (q, J = 32,8 Hz), 126,21 (q, J = 3,7 Hz), 124,19, 123,93 (q, J = 269,3 Hz), 120,41

M_{mo} (mért/számolt): 499,0 / 499,1

Elemenálízis, számolt C₁₉H₁₀BrClF₃N₃O₃ (500,65): C, 45,58; H, 2,01; N, 8,39; mért: C, 45,48; H, 2,04; N, 8,42

4-bróm-2-(3,4-diklórfenilkarbamoil)-fenil-5-klórpirazin-2-karboxilát (**SalPyr4**)

Fehér szilárd; kitermelés: 53%; Op: 176,9-178,6 °C

IR (ATR): 3364 (NH), 3097, 2935, 2859, 1756 (C=O észter), 1702, 1667, 1645, 1587, 1519, 1475, 1394, 1374, 1321, 1298, 1269, 1235, 1190, 1133, 1096, 1023, 860, 827, 818, 709, 676

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9,43 (1H, bs, NH), 9,25 (1H, d, J = 1,3 Hz, H3''), 8,80 (1H, d, J = 1,4 Hz, H5''), 8,32 (1H, d, J = 2,5 Hz, H3), 7,82 (1H, d, J = 2,5 Hz, H2'), 7,73 (1H, dd, J = 2,6 Hz, J = 8,7 Hz, H5), 7,66 (1H, dd, J = 2,5 Hz, J = 8,7 Hz, H6'), 7,50 (1H, d, J = 8,7 Hz, H6), 7,42 (1H, d, J = 8,7 Hz, H5')

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 160,92, 160,05, 154,44, 146,80, 146,57, 144,30, 142,17, 139,65, 137,31, 135,74, 134,66, 132,57, 130,61, 127,27, 124,07, 122,39, 120,34, 119,94

M_{mo} (mért/számolt): 499,0 / 499,0

Elemanalízis, számolt C₁₈H₉BrCl₃N₃O₃ (501,55): C, 43,11; H, 1,81; N, 8,38; mért: C, 452,98; H, 1,74; N, 8,33

4-klór-2-(4-(trifluorometil)fenilkarbamoil)-fenil-4-formilbenzoát (**SalBenz1**)

Fehér szilárd; kitermelés 71%; mp 201,0-203,0 °C

IR (ATR): 3384, 3105, 2848, 1740 (CO észter), 1690 (CO), 1603, 1530, 1480, 1411, 1341, 1319, 1276, 1252, 1212, 1166, 1109, 1091, 1066, 1015, 852, 839, 819, 750, 679,

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,90 (1H, s, NH), 10,11 (1H, s, CO-H), 8,25 (2H, d, J = 8,2 Hz, H2'', H6''), 8,05 (2H, d, J = 8,2 Hz, H3'', H5''), 7,89 (1H, d, J = 2,6 Hz, H3), 7,83 (2H, d, J = 8,5 Hz, H3', H5'), 7,75 (1H, dd, J = 8,7 Hz, J = 2,6 Hz, H5), 7,64 (2H, d, J = 8,5 Hz, H2', H6'), 7,55 (1H, d, J = 8,7 Hz, H6)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 193,03, 163,68, 163,14, 146,98, 142,43, 139,79, 133,31, 131,97, 130,80, 130,68, 130,63, 129,90, 129,27, 126,22 (d, J=3,7 Hz), 125,63, 124,50 (q, J = 270,9 Hz), 124,10 (q, J = 31,8 Hz), 122,64, 119,91

M_{mo} (mért/számolt): 447,0 / 447,1

Elemanalízis, számolt C₂₂H₁₃BrClF₃NO₄ (447,79): C, 59,01; H, 2,93; N, 3,13, mért: C, 59,31; H, 2,64; N, 3,00

4-klór-2-(3,4-diklórfenilkarbamoil)-fenil-4-formilbenzoát (**SalBenz2**)

Fehér szilárd; kitermelés 59%; mp 228,5-230,0 °C

IR (ATR): 3365, 3095, 2842, 1736 (CO észter), 1688 (CO), 1597, 1528, 1479, 1377, 1311, 1277, 1241, 1207, 1142, 1107, 1092, 1014, 843, 833, 819, 751, 682

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10,80 (1H, s, NH), 10,12 (1H, s, CO-H), 8,25 (2H, d, J = 7,9 Hz, H2'', H6''), 8,06 (2H, d, J = 8,0 Hz, H3'', H5''), 7,91 (1H, s, H2'), 7,88 (1H, d, J = 2,6 Hz, H3), 7,75 (1H, dd, J = 8,7 Hz, J = 2,6 Hz, H5), 7,59-7,50 (3H, m, H6, H5', H6')

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 193,04, 163,64, 162,95, 146,95, 139,80, 138,88, 133,27, 132,03, 131,83, 131,08, 130,85, 130,68, 130,63, 129,89, 129,23, 125,68, 125,63, 121,17, 120,03

M_{mo} (mért/számolt): 447,9 / 447,2

Elemanalízis, számolt C₂₁H₁₂Cl₃NO₄ (448,68): C, 56,21; H, 2,70; N, 3,12, mért: C, 56,50; H, 3,02; N, 2,87

4-bróm-2-(4-(trifluorometil)fenilkarbamoil)-fenil-4-formilbenzoát (**SalBenz3**)

Fehér szilárd; kitermelés 69%; Op: 206,5-209,0 °C

IR (ATR): 3383, 3074, 2930, 2853, 1737 (CO észter), 1691 (COH), 1647, 1602, 1530, 1477, 1410, 1339, 1274, 1252, 1209, 1166, 1110, 1090, 1067, 1015, 838, 818, 751, 678

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10,89 (1H, bs, NH), 10,11 (1H, s, CO-H), 8,25 (2H, d, J = 7,9 Hz, H2'', H6''), 8,08-7,79 (6H, m, H3, H5, H3', H5', H3'', H5''), 7,64 (2H, d, J = 8,5 Hz, H2', H6'), 7,49 (1H, dd, J = 8,7 Hz, J = 1,3 Hz, H6)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ 192,97, 163,59, 163,02, 147,45, 142,42, 139,78, 137,02, 134,92, 133,29, 130,66, 129,88, 127,75, 126,17 (q, J = 3,8 Hz), 125,92, 124,42 (d, J = 271,4 Hz), 124,07 (q, J = 31,9 Hz), 119,91, 118,69

M_{mo} (mért/számolt): 491,0 / 4491,1

Elemanalízis, számolt C₂₂H₁₃BrF₃NO₄ (492,25): C, 53,68; H, 2,66; N, 2,85, mért: C, 53,41; H, 2,79; N, 2,66

4-klór-2-(4-(trifluorometil)fenilkarbamoil)-fenil-2-klóretilkarbamát (SalCarb1)

Fehér szilárd; kitermelés: 52%; Op: 191,3 °C felett elbomlik

IR (ATR): 3337 (NH), 3277 (NH), 1715 (O-CONH-), 1661 (CONH-I) 1219 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,71 (1H, bs, NH amid), 8,11 (1H, t, J = 5,7 Hz, NH karbamát), 7,93-7,87 (2H, m, H3', H5'), 7,74-7,67 (3H, m, H3, H2', H6'), 7,60 (1H, dd, J = 2,6 Hz, J = 8,6 Hz, H5), 7,29 (1H, d, J = 8,7 Hz, H6), 3,53 (2H, t, J = 6,1 Hz, CH₂-Cl), 3,30 (2H, q, J = 6,0 Hz, N-CH₂)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 163,57, 153,86, 147,19, 131,66, 131,25, 129,33, 128,59, 126,14 (q, J = 3,9 Hz), 125,36, 124,53 (q, J = 271,3 Hz), 123,92 (q, J = 31,9 Hz), 120,61, 119,83, 43,11, 42,76

M_{mo} (mért/számolt): 420,0 / 420,2

Elemanalízis, számolt C₁₇H₁₃Cl₂F₃N₂O₃ (421,20): C, 48,48; H, 3,11; N, 6,65; mért: C, 48,07; H, 3,14; N, 6,47

4-klór-2-(4-(trifluorometil)fenilkarbamoil)-fenil-3-klórpropilkarbamát (SalCarb2)

Fehér szilárd; kitermelés: 54%; Op: 197,0-220,1 °C

IR (ATR): 3335 (NH), 3277 (NH), 1716 (O-CONH-), 1659 (CONH-I), 1217 (C-O)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10,70 (1H, bs, NH amid), 7,95-7,87 (3H, m, NH karbamát, H3', H5'), 7,75-7,67 (3H, m, H3, H2', H6'), 7,59 (1H, dd, J = 2,7 Hz, J = 8,6 Hz, H5), 7,28 (1H, d, J = 8,7 Hz, H6), 3,55 (2H, t, J = 6,6 Hz, CH₂-Cl), 3,10 (2H, q, J = 6,3 Hz, N-CH₂), 1,79 (2H, p, J = 6,6 Hz, C-CH₂-C)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 163,67, 153,78, 147,36, 131,66, 131,25, 129,20, 128,56, 126,13 (q, J = 4,1 Hz), 125,39, 124,52 (q, J = 271,5 Hz), 123,90 (q, J = 32,0 Hz), 120,59, 119,76, 42,70, 38,00, 32,29

M_{mo} (mért/számolt): 434,0 / 434,2

Elemanalízis, számolt C₁₈H₁₅Cl₂F₃N₂O₃ (435,22): C, 49,67; H, 3,47; N, 6,44; mért: C, 49,54; H, 3,38; N, 6,21

4-klór-2-(3,4-diklórfenilkarbamoil)-fenil-2-klóretilkarbamát (SalCarb3)

Fehér szilárd; kitermelés: 30%; Op: 247,5-248,5 °C

IR (ATR): 3334 (NH), 3257 (NH), 1717 (O-CONH-), 1655 (CONH-I), 1218 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,63 (1H, bs, NH amid), 8,11 (1H, t, J = 5,8 Hz, NH karbamát), 8,06 (1H, d, J = 2,0 Hz, H2'), 7,70 (1H, d, J = 2,6 Hz, H3), 7,62-7,57 (3H, m, H5, H6, H6'), 7,26 (1H, d, J = 8,7 Hz, H5'), 3,55 (2H, t, J = 6,1 Hz, CH₂-Cl), 3,32 (2H, q, J = 5,9 Hz, N-CH₂)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 163,41, 153,83, 147,19, 139,20, 131,51, 131,32, 131,10, 130,83, 130,78, 129,35, 128,54, 125,39, 121,14, 119,98, 43,18, 42,78

M_{mo} (mért/számolt): 420,0 / 420,1

Elemanalízis, számolt C₁₆H₁₂Cl₄N₂O₃ (422,09): C, 45,43; H, 2,87; N, 6,64; mért: C, 45,15; H, 2,62; N, 6,62

4-klór-2-(3,4-diklórfenilkarbamoil)-fenil-3-klórpropilkarbamát (SalCarb4)

Fehér szilárd; kitermelés: 61%; Op: 245,0-247,2 °C

IR (ATR): 3334 (NH), 3262 (NH), 1715 (O-CONH-), 1659 (CONH-I), 1215 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,63 (1H, bs, NH amid), 8,06 (1H, d, J = 2,0 Hz, H2'), 7,92 (1H, t, J = 5,8 Hz, NH karbamát), 7,69 (1H, d, J = 2,7 Hz, H3), 7,61-7,56 (3H, m, H5, H6, H6'), 7,24 (1H, d, J = 8,7 Hz, H5'), 3,56 (2H, t, J = 6,3 Hz, CH₂-Cl), 3,10 (2H, q, J = 6,1 Hz, N-CH₂), 1,80 (2H, p, J = 6,5 Hz, C-CH₂-C)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 163,56, 153,79, 147,41, 139,24, 131,52, 131,37, 131,15, 130,82, 129,25, 128,56, 125,45, 125,40, 121,08, 119,92, 42,69, 38,01, 32,34

M_{mo} (mért/számolt): 434,0 / 434,1

Elemanalízis, számolt C₁₇H₁₄Cl₄N₂O₃ (436,12): C, 46,82; H, 3,24; N, 6,42; mért: C, 46,85; H, 3,18; N, 6,54

4-klór-2-(3,4-diklórfenilkarbamoi)-fenil-propilkarbamát (SalCarb5)

Fehér szilárd; kitermelés: 20%; Op: 247,6-248,9 °C

IR (ATR): 3330 (NH), 3268 (NH), 1714 (O-CONH-), 1662 (CONH-I), 1219 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,60 (1H, bs, NH amid), 8,06 (1H, s, H2'), 7,81 (1H, t, J = 5,9 Hz, NH karbamát), 7,68 (1H, d, J = 2,7 Hz, H3), 7,61-7,56 (3H, m, H5, H6, H6'), 7,26 (1H, d, J = 8,6 Hz, H5'), 2,92 (2H, q, J = 6,5 Hz, N-CH₂), 1,36 (2H, h, J = 7,0 Hz, C-CH₂-C), 0,77 (3H, t, J = 6,5 Hz, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 163,51, 153,68, 147,42, 139,26, 131,66, 131,26, 131,06, 130,77, 129,12, 128,46, 125,42, 125,31, 121,08, 119,94, 42,38, 22,51, 11,23

M_{mo} (mért/számolt): 400,0 / 400,2

Elemanalízis, számolt C₁₇H₁₅Cl₃N₂O₃ (401,67): C, 50,83; H, 3,76; N, 6,97; mért: C, 50,58; H, 3,55; N, 6,86

4-bróm-2-(4-(trifluormetil)fenilkarbamoi)-fenil-2-klóretilkarbamát (SalCarb6)

Fehér szilárd; kitermelés: 38%; Op: 187,5-215,0 °C

IR (ATR): 3339 (NH), 3276 (NH), 1715 (O-CONH-), 1659 (CONH-I), 1219 (C-O)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10,70 (1H, bs, NH amid), 8,10 (1H, t, J = 5,8 Hz, NH karbamát), 7,90 (2H, d, J = 8,5 Hz, H3', H5'), 7,82 (1H, d, J = 2,6 Hz, H3), 7,75-7,67 (3H, m, H5, H2', H6'), 7,23 (1H, d, J = 8,7 Hz, H6), 3,53 (2H, t, J = 6,1 Hz, CH₂-Cl), 3,30 (2H, q, J = 6,2 Hz, N-CH₂)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 163,44, 153,76, 147,65, 142,69, 134,19, 132,01, 131,37, 126,10 (q, J = 3,8 Hz), 125,67, 124,51 (q, J = 271,2 Hz), 123,90 (q, J = 32,0 Hz), 119,83, 117,30, 43,08, 42,75

M_{mo} (mért/számolt): 464,0 / 464,1

Elemanalízis, számolt C₁₇H₁₃BrClF₃N₂O₃ (465,65): C, 43,85; H, 2,81; N, 6,02; mért: C, 43,66; H, 3,01; N, 5,78

4-bróm-2-(4-(trifluormetil)fenilkarbamoi)-fenil-3-klórpropilkarbamát (SalCarb7)

Fehér szilárd; kitermelés: 43%; Op: 181,0-219,0 °C

IR (ATR): 3334 (NH), 3276 (NH), 1715 (O-CONH-), 1657 (CONH-I), 1218 (C-O)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10,69 (1H, bs, NH amid), 8,10 (1H, t, J = 5,8 Hz), 7,92-7,86 (3H, m, NH karbamát, H3', H5'), 7,80 (1H, d, J = 2,5 Hz, H3), 7,74-7,65 (3H, m, H5, H2', H6'), 7,21 (1H, d, J = 8,7 Hz, H6), 3,54 (2H, t, J = 6,6 Hz, CH₂-Cl), 3,08 (2H, q, J = 6,3 Hz, N-CH₂), 1,78 (2H, p, J = 6,6 Hz, C-CH₂-C)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 163,57, 153,71, 147,86, 142,72, 134,22, 132,04, 131,37, 126,13 (q, J = 3,9 Hz), 125,73, 124,52 (q, J = 271,3 Hz), 123,90 (q, J = 32,1 Hz), 119,77, 117,18, 42,70, 38,01, 32,29

M_{mo} (mért/számolt): 478,0 / 478,1

Elemanalízis, számolt C₁₈H₁₅BrClF₃N₂O₃ (479,68): C, 45,07; H, 3,15; N, 5,84; mért: C, 45,00; H, 3,11; N, 5,63

4-bróm-2-(3,4-diklórfenilkarbamoi)-fenil-2-klóretilkarbamát (SalCarb8)

Fehér szilárd; kitermelés: 22%; Op: 236,9 °C felett elbomlik

IR (ATR): 3319 (NH), 3256 (NH), 1721 (O-CONH-), 1655 (CONH-I), 1208 (C-O)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10,62 (1H, bs, NH amid), 8,11 (1H, t, J = 5,7 Hz, NH karbamát), 8,06 (1H, d, J = 2,0 Hz, H2'), 7,81 (1H, d, J = 1,9 Hz, H3), 7,72 (1H, dd, J = 1,9 Hz, J = 8,5 Hz, H5), 7,66-7,54 (2H, m, H6, H6'), 7,22 (1H, d, J = 8,7 Hz, H5'), 3,55 (2H, t, J = 6,1 Hz, CH₂-Cl), 3,31 (2H, q, J = 5,9 Hz, N-CH₂)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ 163,29, 153,74, 147,65, 139,18, 134,26, 131,86, 131,32, 131,07, 130,81, 130,75, 125,69, 121,15, 119,97, 117,32, 43,15, 42,76

M_{mo} (mért/számolt): 463,9 / 464,1

Elemanalízis, számolt C₁₆H₁₂BrCl₃N₂O₃ (466,54): C, 41,19; H, 2,59; N, 6,00; mért: C, 39,80; H, 2,27; N, 5,89

4-bróm-2-(3,4-diklórfenilkarbamoil)-fenil-3-klórpropilkarbamát (**SalCarb9**)

Fehér szilárd; kitermelés: 58%; Op: 237,0-238,3 °C

IR (ATR): 3332 (NH), 3261 (NH), 1715 (O-CONH-), 1655 (CONH-I), 1216 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,63 (1H, bs, NH amid), 8,05 (1H, d, J = 1,8 Hz, H2'), 7,92 (1H, t, J = 5,8 Hz, NH karbamát), 7,80 (1H, d, J = 2,4 Hz, H3), 7,72 (1H, dd, J = 2,5 Hz, J = 8,6 Hz, H5), 7,62-7,58 (2H, m, H6, H6'), 7,21 (1H, d, J = 8,6 Hz, H5'), 3,57 (2H, t, J = 6,5 Hz, CH₂-Cl), 3,10 (2H, q, J = 6,3 Hz, N-CH₂), 1,80 (2H, p, J = 6,6 Hz, C-CH₂-C)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 163,44, 153,70, 147,87, 139,22, 134,31, 131,88, 131,34, 131,13, 130,80, 125,77, 125,38, 121,06, 119,90, 117,22, 42,69, 38,00, 32,33

M_{mo} (mért/számolt): 477,9 / 478,1

Elemanalízis, számolt C₁₇H₁₄BrCl₃N₂O₃ (480,57): C, 42,49; H, 2,94; N, 5,83; mért: C, 42,35; H, 2,82; N, 5,69

2-(4-benzoilfenilkarbamoil)-4-klórfenil-2-klóretilkarbamát (**SalCarb10**)

Fehér szilárd; kitermelés: 38%; Op: 180,0-217,0 °C

IR (ATR): 3336 (NH), 3272 (NH), 1712 (O-CONH-), 1662 (CONH-I), 1211 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,74 (1H, bs, NH amid), 8,13 (1H, t, J = 5,8 Hz, NH karbamát), 7,91-7,84 (3H, m, H3, H3', H5'), 7,79-7,51 (8H, m, H5, H2', H6', H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 7,29 (1H, d, J = 8,6 Hz, H6), 3,54 (2H, t, J = 6,1 Hz, CH₂-Cl), 3,31 (2H, q, J = 5,9 Hz, N-CH₂)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 194,80, 163,55, 153,88, 147,21, 143,27, 137,66, 132,53, 132,02, 131,74, 131,26, 131,17, 129,61, 129,32, 128,69, 125,38, 119,21, 43,14, 42,77

M_{mo} (mért/számolt): 456,1/456,2

Elemanalízis, számolt C₂₃H₁₈Cl₂N₂O₄ (457,06): C, 60,41; H, 3,97; N, 6,13; mért: C, 60,25; H, 3,79; N, 5,84

2-(4-benzoilfenilkarbamoil)-4-klórfenil-3-klórpropilkarbamát (**SalCarb11**)

Fehér szilárd; kitermelés: 64%; Op: 220,0-222,6 °C

IR (ATR): 3336 (NH), 3289 (NH), 1708 (O-CONH-), 1655 (CONH-I), 1222 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,74 (1H, bs, NH amid), 7,96-7,84 (4H, m, NH karbamát, H3, H3', H5'), 7,80-7,51 (8H, m, H5, H2', H6', H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 7,29 (1H, d, J = 8,7 Hz, H6), 3,57 (2H, t, J = 6,5 Hz, CH₂-Cl), 3,31 (2H, q, J = 6,3 Hz, N-CH₂), 1,80 (2H, p, J = 6,6 Hz, C-CH₂-C)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 195,05, 163,93, 154,07, 147,67, 143,56, 137,92, 132,78, 132,26, 132,00, 131,53, 131,45, 129,87, 129,47, 128,94, 128,86, 125,69, 119,42, 43,06, 38,28, 32,59

M_{mo} (mért/számolt): 470,1 / 470,2

Elemanalízis, számolt C₂₄H₂₀Cl₂N₂O₄ (471,33): C, 61,16; H, 4,28; N, 5,94; mért: C, 60,97; H, 3,95; N, 5,77

2-(4-benzoilfenilkarbamoil)-4-klórfenil-propilkarbamát (**SalCarb12**)

Fehér szilárd; kitermelés: 23%; Op: 215,9-217,2 °C

IR (ATR): 3339 (NH), 3276 (NH), 1713(O-CONH-), 1662 (CONH-I), 1218 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,72 (1H, bs, NH), 7,94-7,51 (12H, m, NH karbamát, H3, H5, H2', H3', H5', H6', H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 7,27 (1H, d, J = 8,7 Hz, H6), 2,93 (2H, q, J = 6,6 Hz, N-CH₂), 1,36 (2H, h, J = 7,2 Hz, C-CH₂-C), 0,77 (3H, t, J = 7,3 Hz, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 194,78, 163,62, 153,73, 147,42, 143,32, 137,66, 132,52, 131,97, 131,91, 131,23, 131,14, 129,60, 129,11, 128,69, 128,54, 125,46, 119,16, 42,42, 22,52, 11,26

M_{mo} (mért/számolt): 436,1 / 436,3

Elemanalízis, számolt C₂₄H₂₁ClN₂O₄ (436,12): C, 65,98; H, 4,84; N, 6,41; mért: C, 65,74; H, 4,62; N, 6,21

2-(4-benzoilfenilkarbamoi)-4-brómfenil-2-klóretilkarbamát (**SalCarb13**)

Fehér szilárd; kitermelés: 35%; Op: 225,7-227,0 °C

IR (ATR): 3335 (NH), 3270 (NH), 1712 (O-CONH-), 1662 (CONH-I), 1221 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,74 (1H, bs, NH amid), 8,13 (1H, t, J = 5,7 Hz, NH karbamát), 7,92-7,51 (11H, m, H3, H5, H2', H3', H5', H6', H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 7,23 (1H, d, J = 8,7 Hz, H6), 3,54 (2H, t, J = 6,1 Hz, CH₂-Cl), 3,31 (2H, q, J = 5,9 Hz, N-CH₂)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 194,79, 163,45, 153,80, 147,68, 143,27, 137,66, 132,52, 132,10, 132,01, 131,41, 131,23, 131,16, 129,61, 128,69, 125,70, 119,22, 117,33, 43,14, 42,78

M_{mo} (mért/számolt): 500,0 / 500,1

Elemenálízis, számolt C₂₃H₁₈BrClN₂O₄ (501,76): C, 55,06; H, 3,62; N, 5,58; mért: C, 54,86; H, 3,54; N, 5,46

2-(4-benzoilfenilkarbamoi)-4-brómfenil-3-klórpropilkarbamát (**SalCarb14**)

Fehér szilárd; kitermelés: 54%; Op: 225,0-226,9 °C

IR (ATR): 3339 (NH), 3294 (NH), 1708 (O-CONH-), 1655 (CONH-I), 1220 (C-O)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10,74 (1H, bs, NH amid), 7,96-7,51 (12H, m, NH karbamát, H3, H5, H2', H3', H5', H6', H2'', H3'', H4'', H5'', H6''), 7,22 (1H, d, J = 8,6 Hz, H6), 3,57 (2H, t, J = 6,5 Hz, CH₂-Cl), 3,10 (2H, q, J = 6,3 Hz, N-CH₂), 1,80 (2H, p, J = 6,6 Hz, C-CH₂-C)

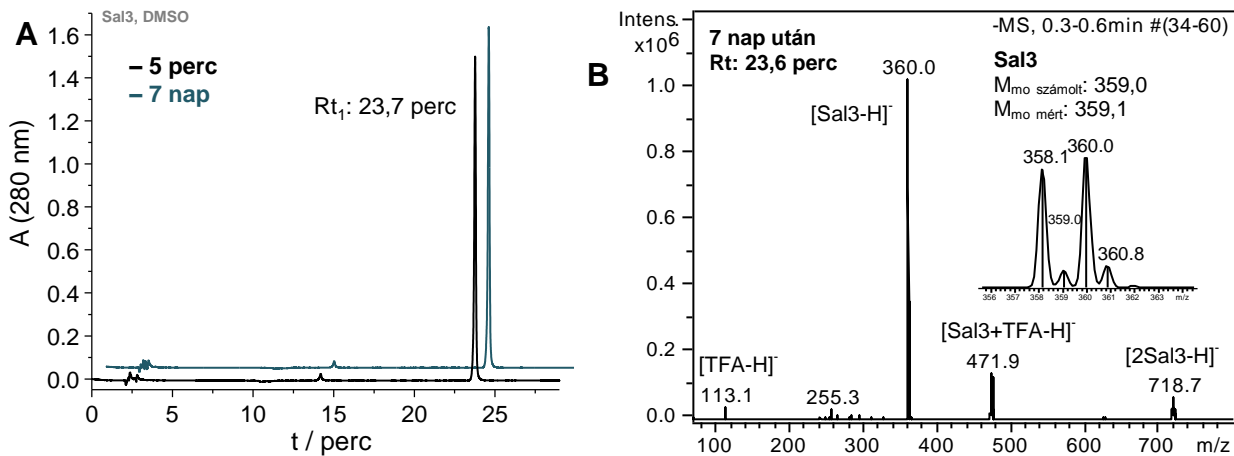
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 194,79, 163,57, 153,74, 147,89, 143,30, 137,66, 134,23, 132,52, 132,11, 131,99, 131,41, 131,19, 129,61, 128,68, 125,77, 119,16, 117,21, 42,80, 38,03, 32,32

M_{mo} (mért/számolt): 514,0 / 514,2

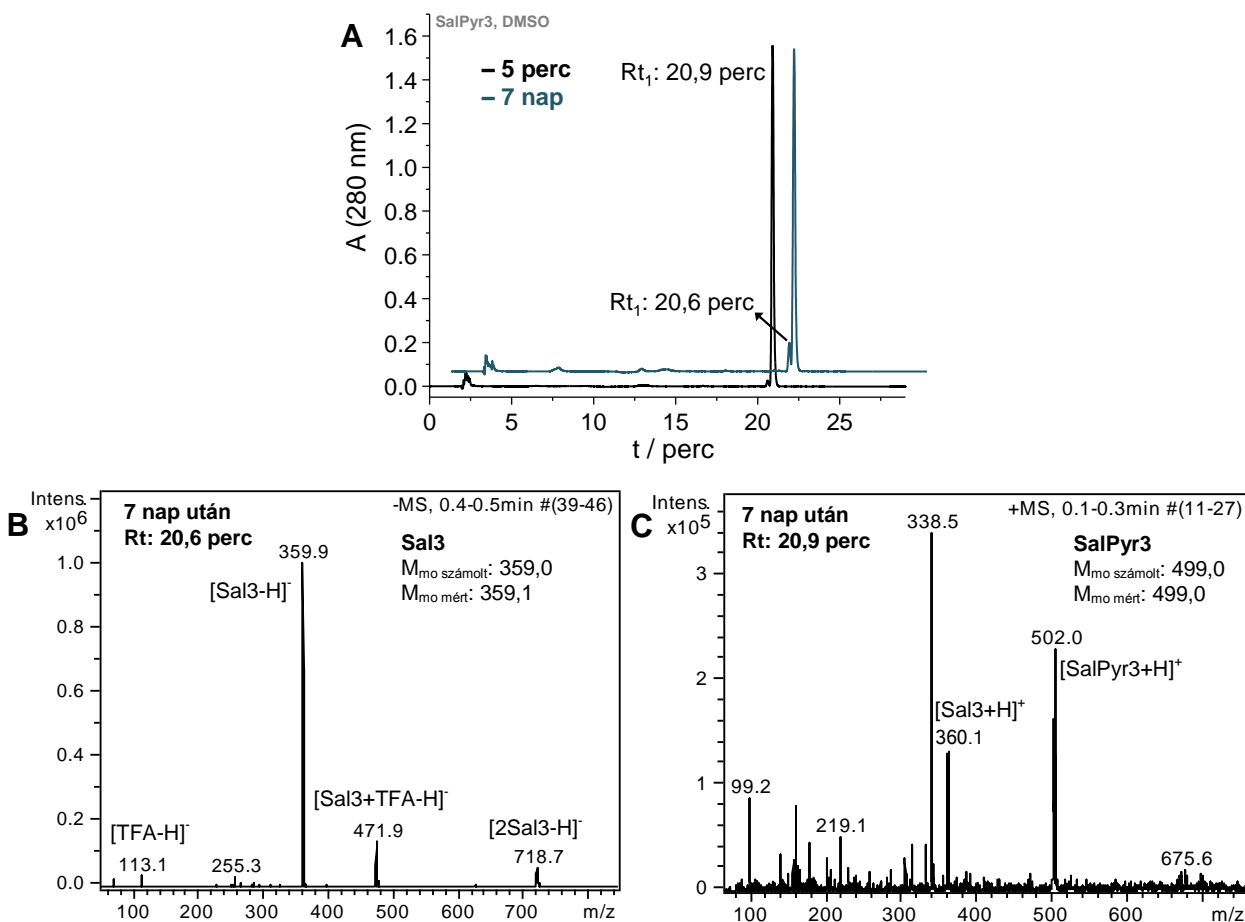
Elemenálízis, számolt C₂₄H₂₀BrClN₂O₄ (515,78): C, 55,89; H, 3,91; N, 5,43; mért: C, 55,64; H, 3,84; N, 5,36

A szalicilanilid származékok stabilitásvizsgálata

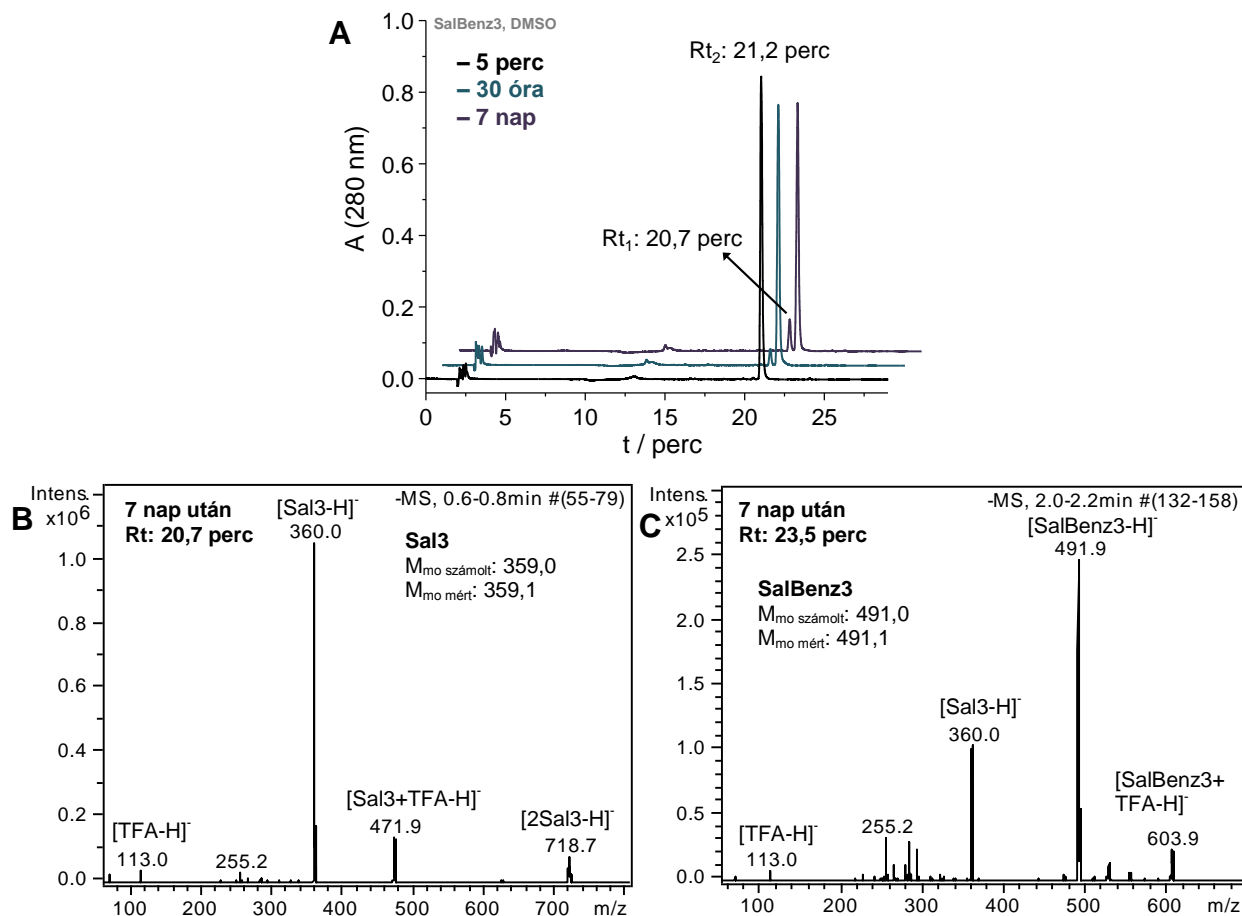
Körülmények (5.1.1.6.7. fejezet): Exformma HPLC rendszer, detektálás: 280 nm, gradiens: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B, folyási sebesség 1 mL/perc, oszlopok: Sal3, SalCarb7 esetén: Nucleosil C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm); SalPyr3, SalBenz3 esetén: Zorbax SB-CN (5 µm, 80 Å, 4,6 x 150 mm)



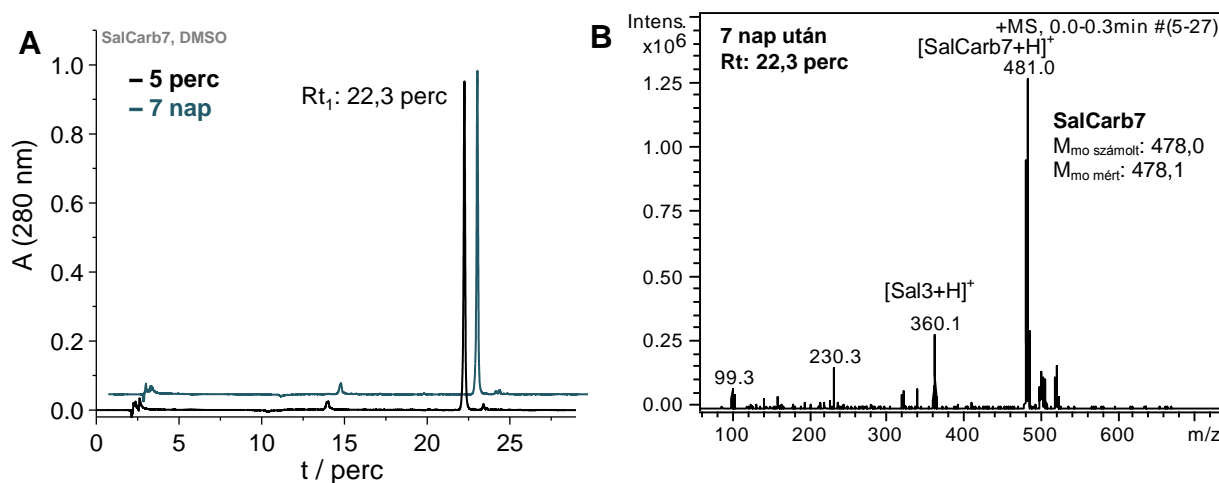
F5. ábra: (A) A Sal3 stabilitásának meghatározása DMSO-ban RP-HPLC segítségével. A 7 napos inkubálás után (B) Rt₁: 23,7 perc ESI-MS spektruma (Sal3 detektálása) (Nucleosil C18 oszlop).



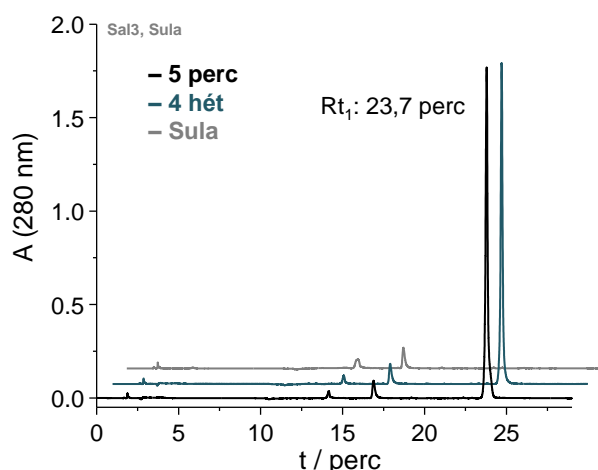
F6. ábra: (A) A SalPyr3 stabilitásának meghatározása DMSO-ban RP-HPLC segítségével. A 7 napos inkubálás után (B) Rt₁: 20,6 perc ESI-MS spektruma (Sal3 detektálása) és (C) Rt₂: 20,9 perc ESI-MS spektruma (SalPyr3 detektálása, mely MS körülmények közt nem stabil, ezért Sal3 is detektálható) (Zorbax SB-CN oszlop).



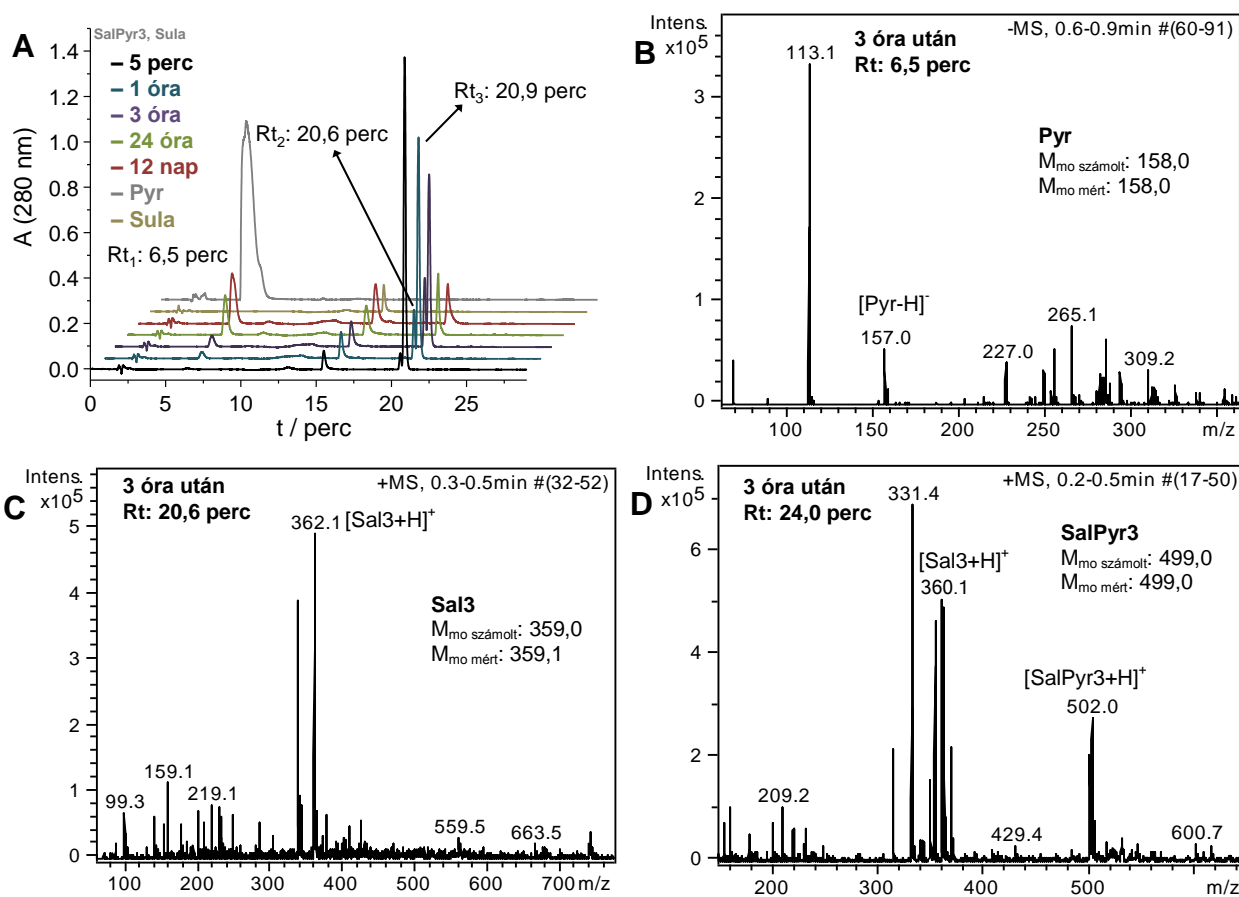
F7. ábra: (A) A SalBenz3 stabilitásának meghatározása DMSO-ban RP-HPLC segítségével. A 7 napos inkubálás után (B) Rt₁: 20,7 perc ESI-MS spektruma (Sal3 detektálása) és (C) Rt₂: 21,2 perc ESI-MS spektruma (SalBenz3 detektálása, mely MS körülmények közt nem stabil, ezért Sal3 is detektálható) (Zorbax SB-CN oszlop).



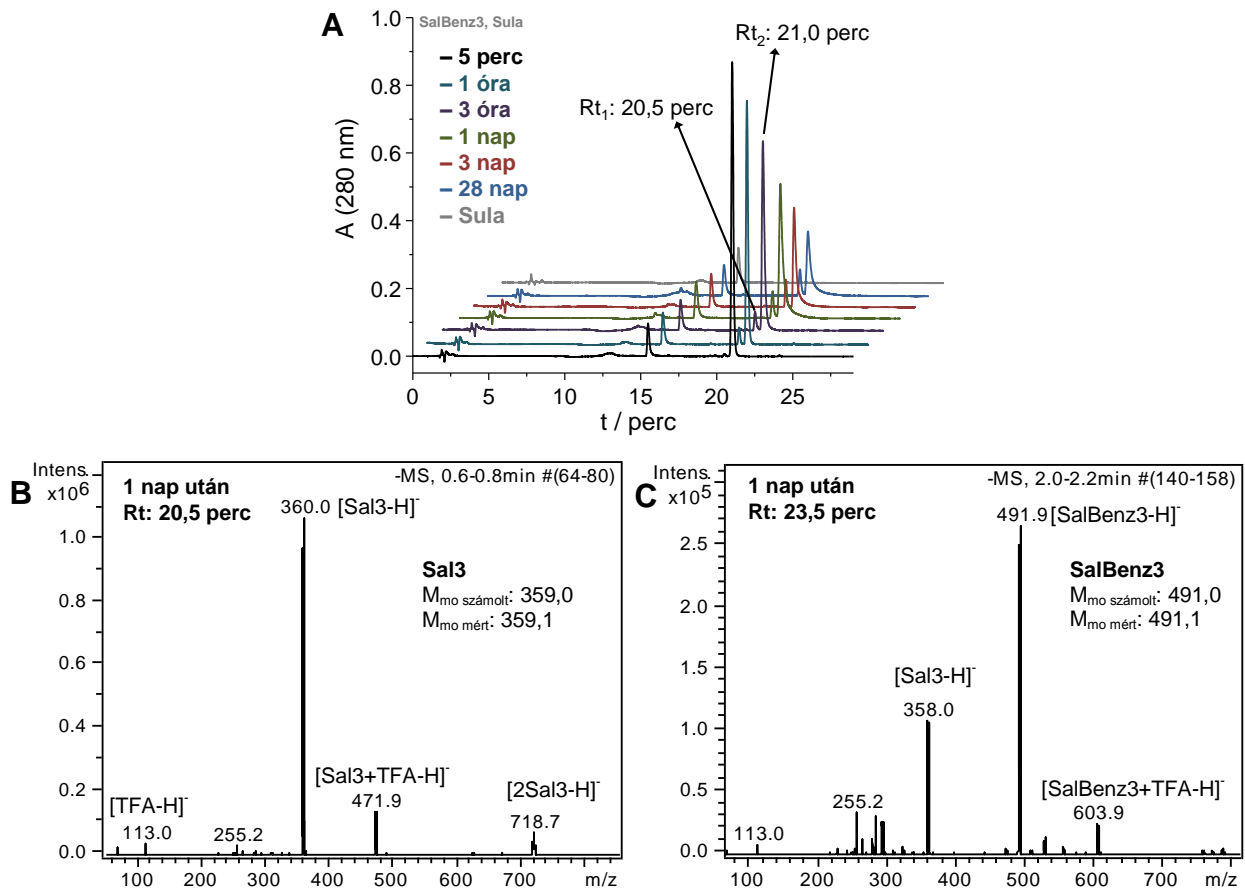
F8. ábra: (A) A SalCarb7 stabilitásának meghatározása DMSO-ban RP-HPLC segítségével. A 7 napos inkubálás után (B) Rt₁: 22,3 perc ESI-MS spektruma (SalCarb7 detektálása, mely MS körülmények közt nem stabil, ezért Sal3 is detektálható) (Nucleosil C18 oszlop).



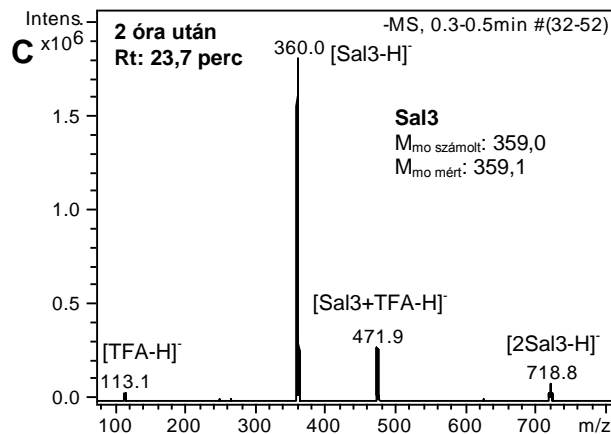
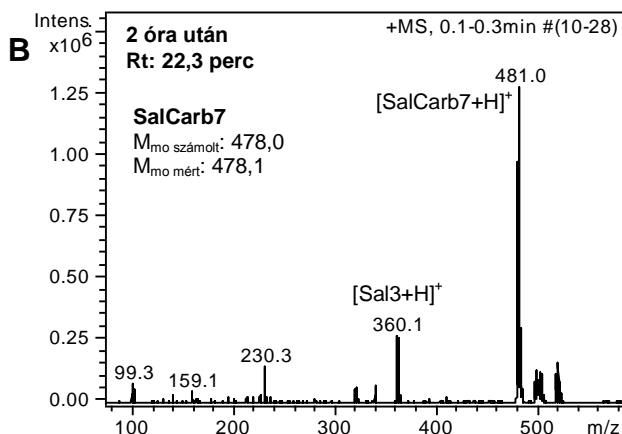
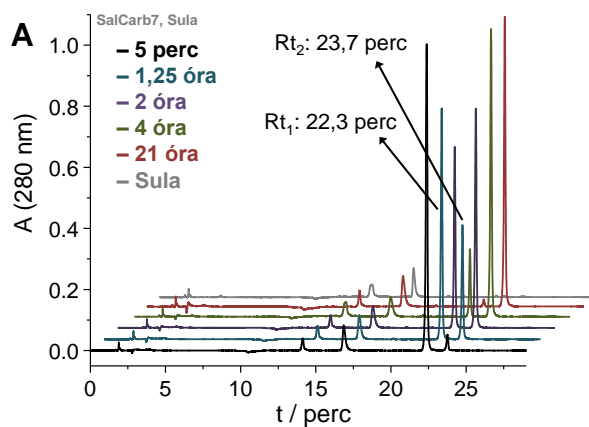
F9. ábra: A Sal3 stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban RP-HPLC segítségével (Rt_1 : 23,7 perc – Sal3, ESI-MS spektrum nincs bemutatva) (Nucleosil C18 oszlop).



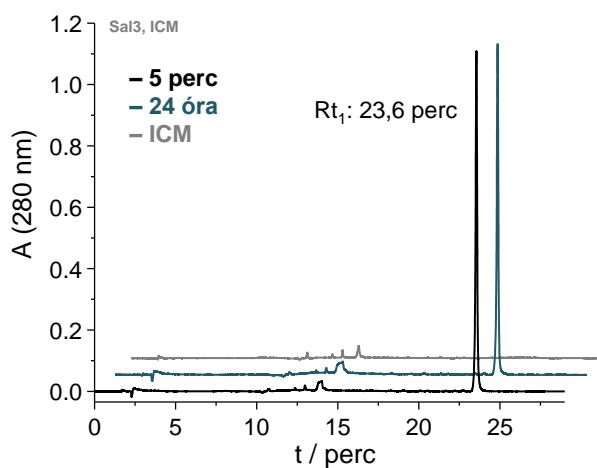
F10. ábra: (A) A SalPyr3 stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban RP-HPLC segítségével. A 3 órás inkubálás után (B) Rt_1 : 6,5 perc ESI-MS spektruma (Pyr detektálása), (C) Rt_2 : 20,6 perc ESI-MS spektruma (Sal3 detektálása) és (D) Rt_3 : 20,9 perc ESI-MS spektruma (SalPyr3 detektálása, mely MS körülmények közt nem stabil, ezért Sal3 is detektálható) (Zorbax SB-CN oszlop).



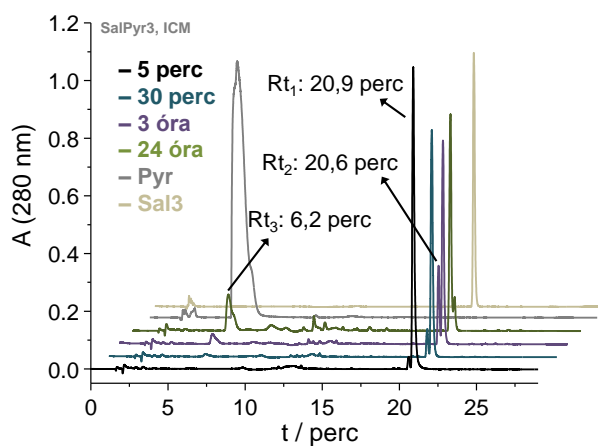
F11. ábra: (A) A SalBenz3 stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban RP-HPLC segítségével. A 3 órás inkubálás után (B) Rt₁: 20,5 perc ESI-MS spektruma (Sal3 detektálása), (C) Rt₂: 21,0 perc ESI-MS spektruma (SalBenz3 detektálása, mely MS körülmények közt nem stabil, ezért Sal3 is detektálható) (Zorbax SB-CN oszlop).



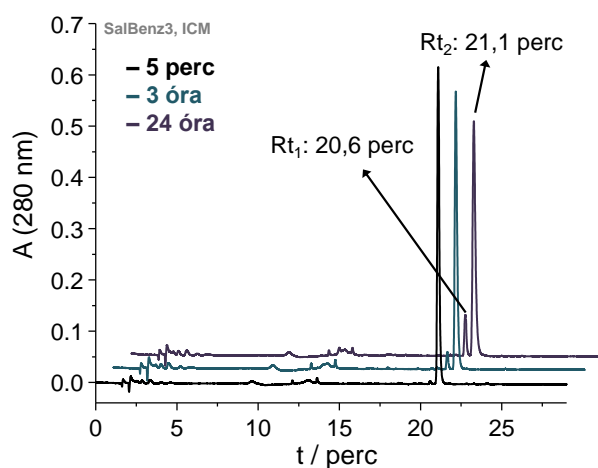
F12. ábra: (A) A SalCarb7 stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban RP-HPLC segítségével. A 2 órás inkubálás után (B) Rt_1 : 22,3 perc ESI-MS spektruma (SalCarb7 detektálása, mely MS körülmények közt nem stabil, ezért Sal3 is detektálható) és (C) Rt_2 : 23,7 perc (Sal3 detektálása) (Nucleosil C18 oszlop).



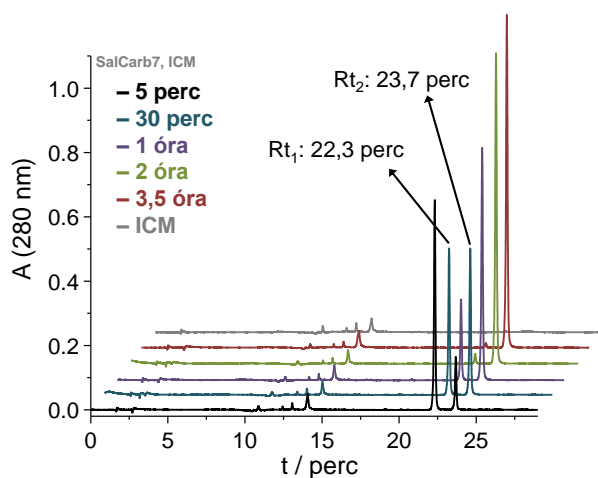
F13. ábra: A Sal3 stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó RPMI-1640 szérummentes médiumban (ICM) RP-HPLC segítségével (Rt_1 : 23,6 perc – Sal3, ESI-MS spektrum nincs bemutatva) (Nucleosil C18 oszlop).



F14. ábra: A SalPyr3 stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó RPMI-1640 szérumban (ICM) RP-HPLC segítségével (Rt₁: 6,2 perc – Pyr, Rt₂: 20,6 perc – Sal3, Rt₃: 20,9 perc – SalPyr3, ESI-MS spektrumok nincsenek bemutatva) (Zorbax SB-CN oszlop).

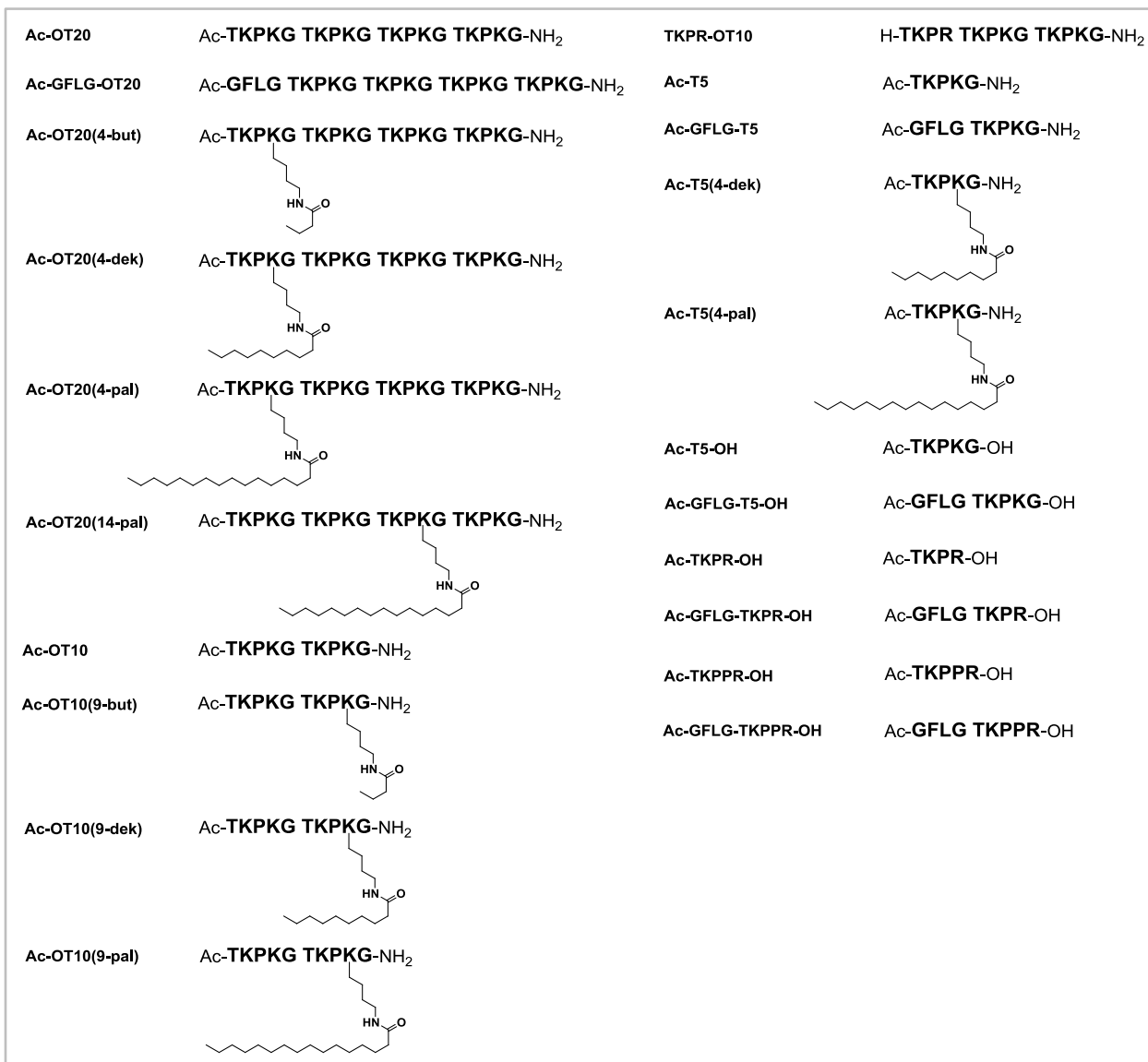


F15. ábra: A SalBenz3 stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó RPMI-1640 szérumban (ICM) RP-HPLC segítségével (Rt₁: 20,6 perc – Sal3, Rt₂: 21,1 perc – SalBenz3, ESI-MS spektrumok nincsenek bemutatva) (Zorbax SB-CN oszlop).

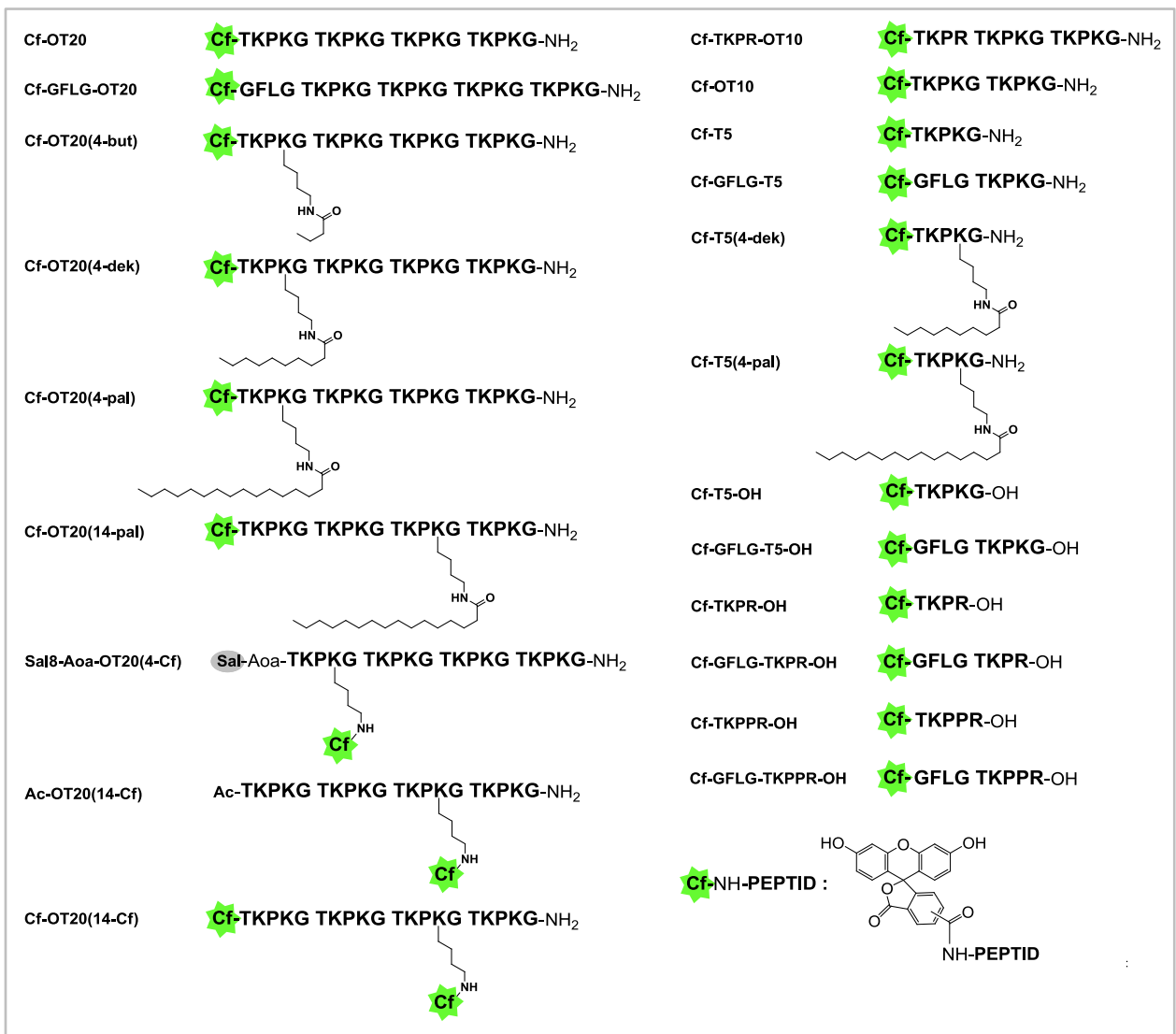


F16. ábra: A SalCarb7 stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó RPMI-1640 szérumban (ICM) RP-HPLC segítségével (Rt₁: 22,3 perc – SalCarb7, Rt₂: 23,7 perc – Sal3, ESI-MS spektrumok nincsenek bemutatva) (Nucleosil C18 oszlop).

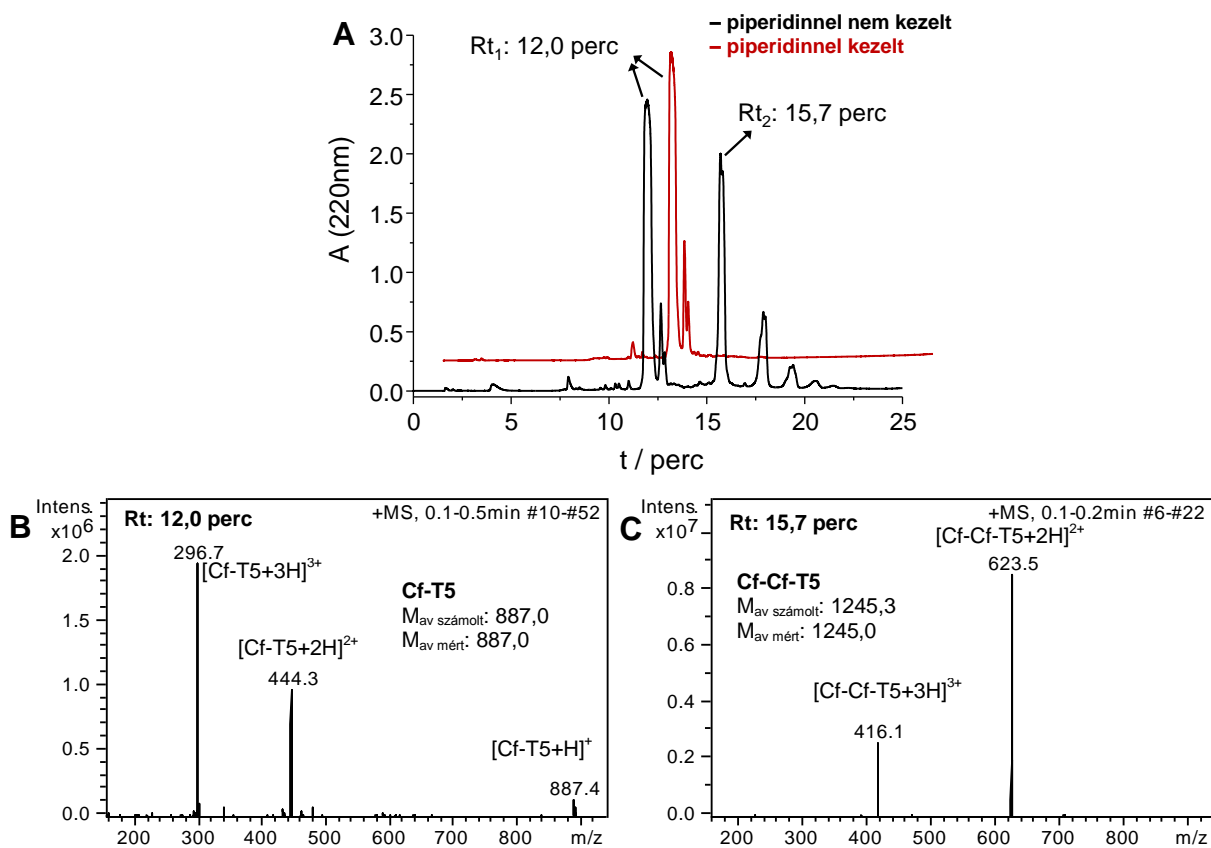
F2. Tuftsinszármazékok



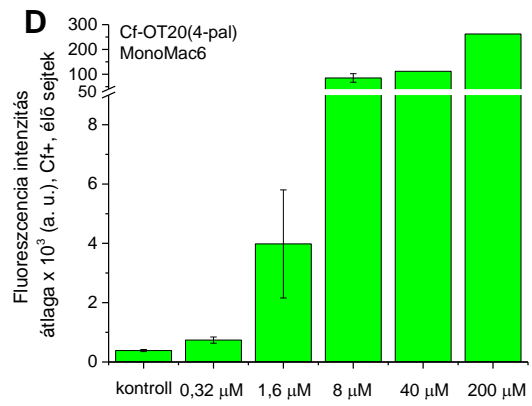
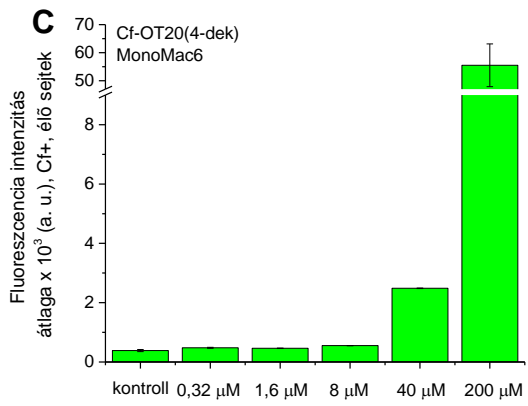
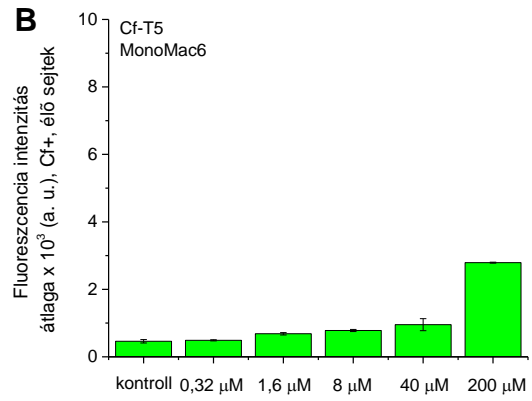
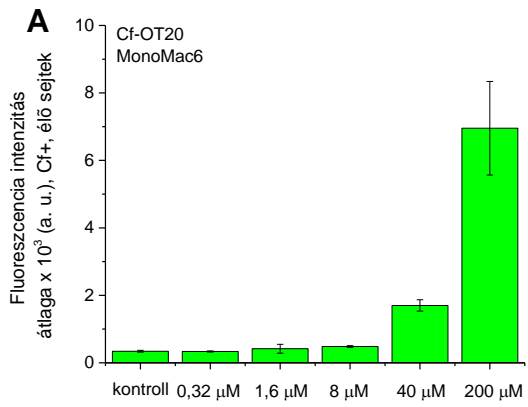
F17. ábra: Az acetilezett kontroll tuftsinszármazékok sematikus rajza



F18. ábra: Az 5(6)-karboxifluoreszcinnel fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok sematikus rajza



F19. ábra: (A) Az 5(6)-karboxifluoreszcein kapcsolása után piperidinnel nem kezelt Cf-T5 nyers peptid és a piperidinnel kezelt nyers peptid analitikai RP-HPLC kromatogramja (Exformma EX1600, Zorbax SB-C18 oszlop (5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm), gradiens: 0-2 perc 0% B, 2-22 perc 0-90% B). (B) Rt₁: 12,0 perc ESI-MS spektruma (Cf-T5, várt, egyszeresen jelölt peptid detektálása) és (C) Rt₂: 15,7 perc ESI-MS spektruma (Cf-Cf-T5: melléktermék, kétszeresen jelölt peptid detektálása).



F20. ábra: A kiválasztott fluoreszcensen jelölt tuftsinszármazékok sejtbejutásának koncentrációfüggése MonoMac6 sejteken (3 órás kezelési idő). (A) Cf-OT20, (B) Cf-T5, (C) Cf-OT20(4-dek), (D) Cf-OT20(4-pal).

F3. Szalicilanilid származékok peptidkonjugátumai

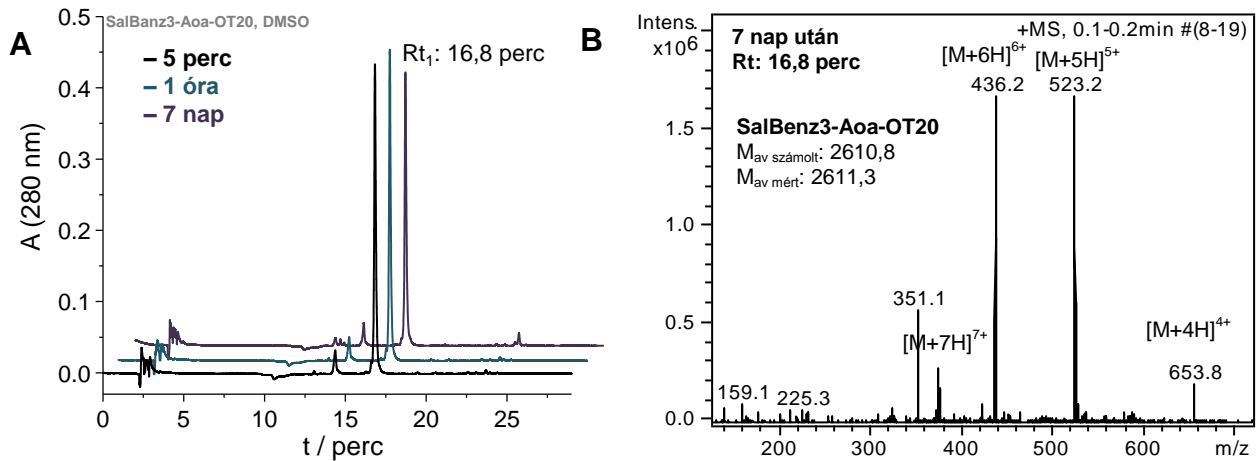
Szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumai



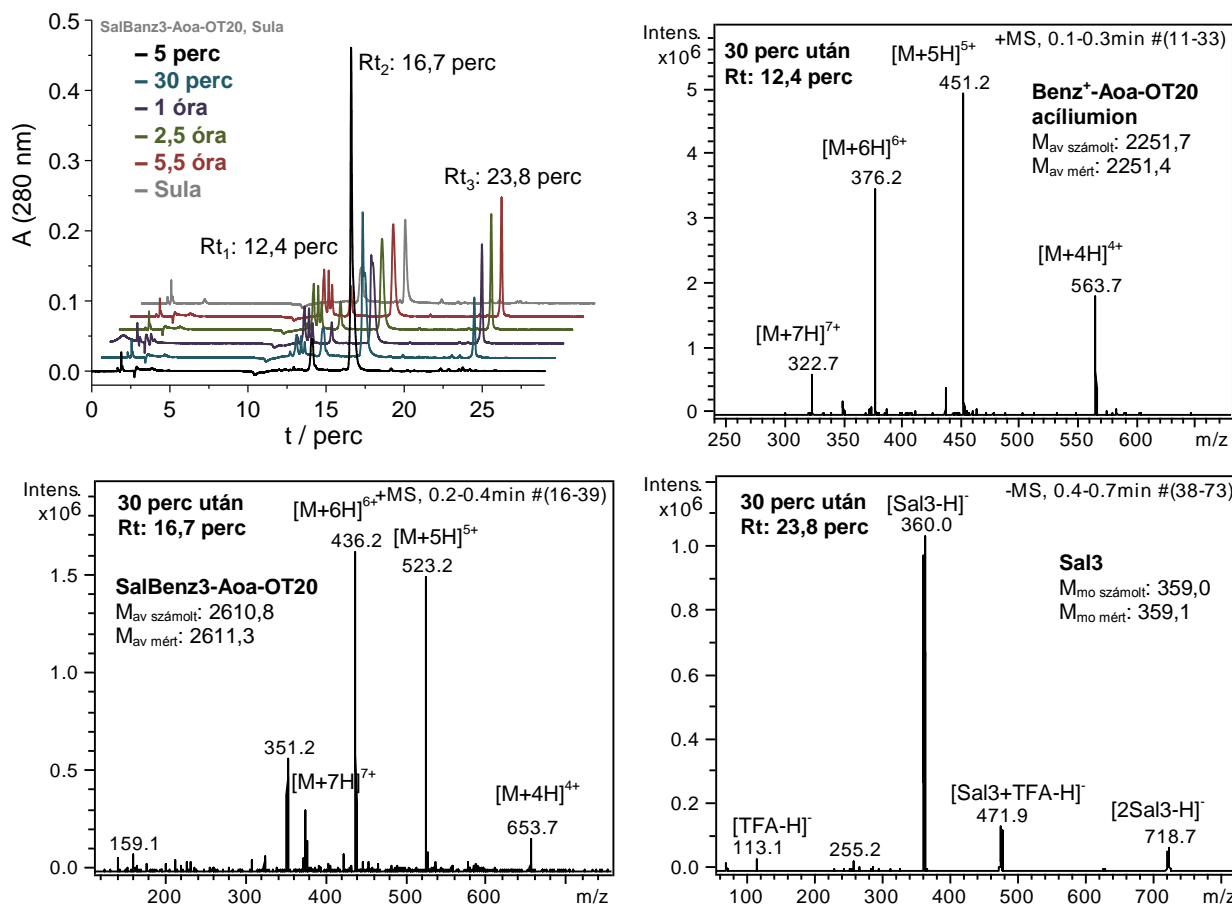
F21. ábra: A szalicilanilid-4-formilbenzoátok peptidkonjugátumainak sematikus rajza

Szalicilanilid-4-formilbenzoát peptidkonjugátum stabilitásvizsgálata

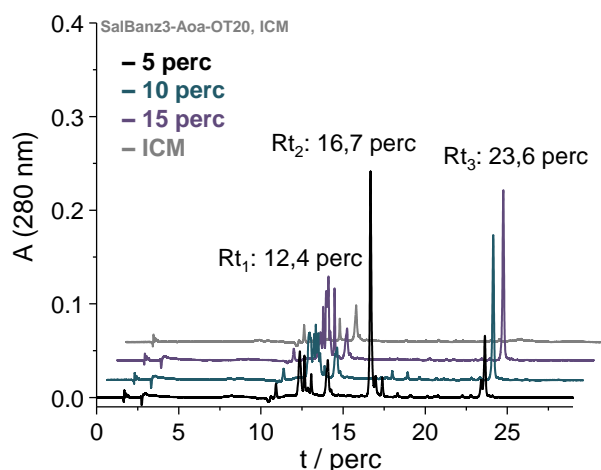
Körülmények (4.3.1.1. fejezet): Exformma HPLC rendszer, detektálás: 280 nm, gradiens: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B, folyási sebesség 1 mL/perc, oszlop: Nucleosil C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm)



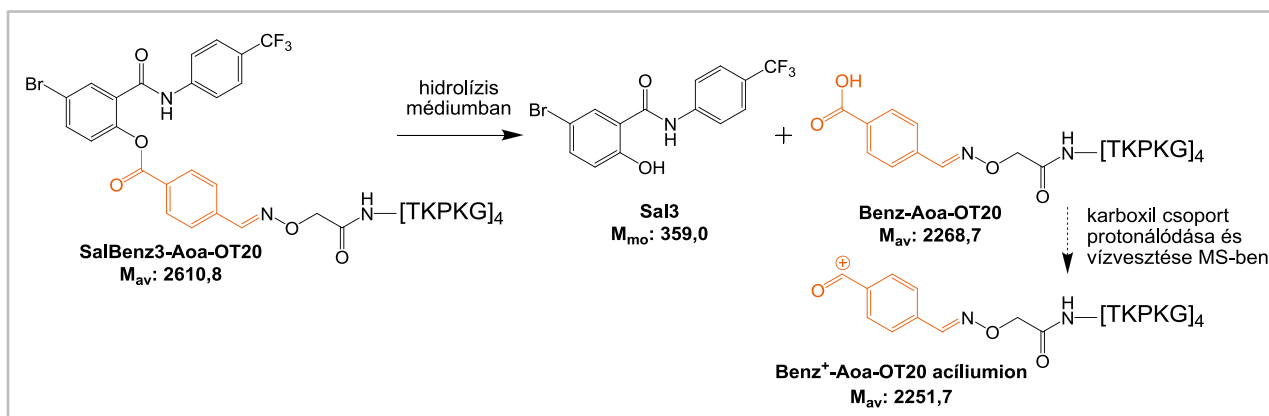
F22. ábra: (A) A SalBenz3-Aoa-OT20 konjugátum stabilitásának meghatározása DMSO-ban RP-HPLC segítségével. A 7 napos inkubálás után (B) Rt₁: 16,8 perc ESI-MS spektruma (SalBenz3-Aoa-OT20 detektálása) (Nucleosil C18 oszlop).



F23. ábra: (A) A SalBenz3-Aoa-OT20 konjugátum stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban RP-HPLC segítségével. A 30 perces inkubálás után (B) Rt_1 : 12,4 perc (Benz-Aoa-OT20 detektálása), (C) Rt_2 : 16,7 perc (SalBenz3-Aoa-OT20 detektálása), és (D) Rt_3 : 23,8 perc ESI-MS spektruma (Sal3 detektálása) (Nucleosil C18 oszlop).

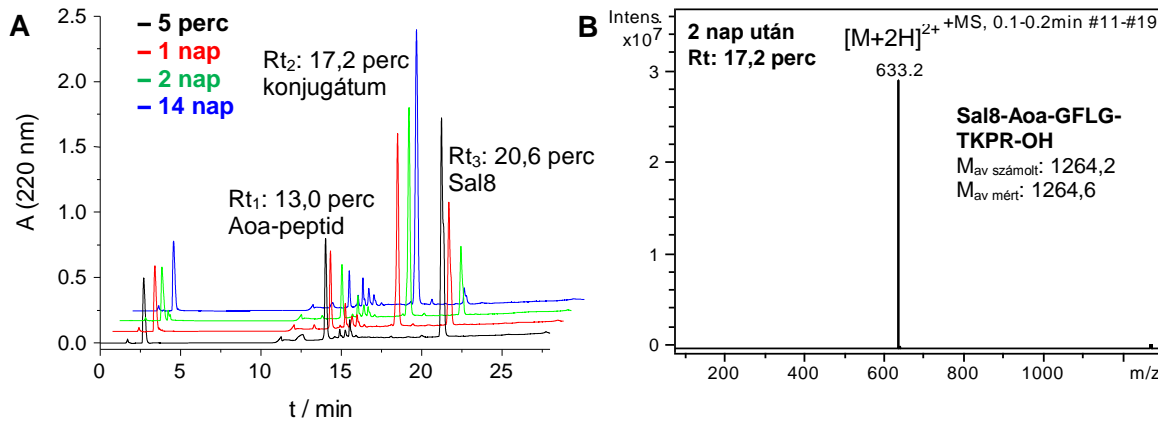


F24. ábra: A SalBenz3-Aoa-OT20 konjugátum stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó RPMI-1640 szérumban ICM RP-HPLC segítségével (10 perc inkubálás után Rt_1 : 12,4 perc – Benz-Aoa-OT20, Rt_2 : 16,7 perc – SalBenz3-Aoa-OT20, Rt_3 : 23,6 perc – Sal3, ESI-MS spektrumok nincsenek bemutatva) (Nucleosil C18 oszlop).

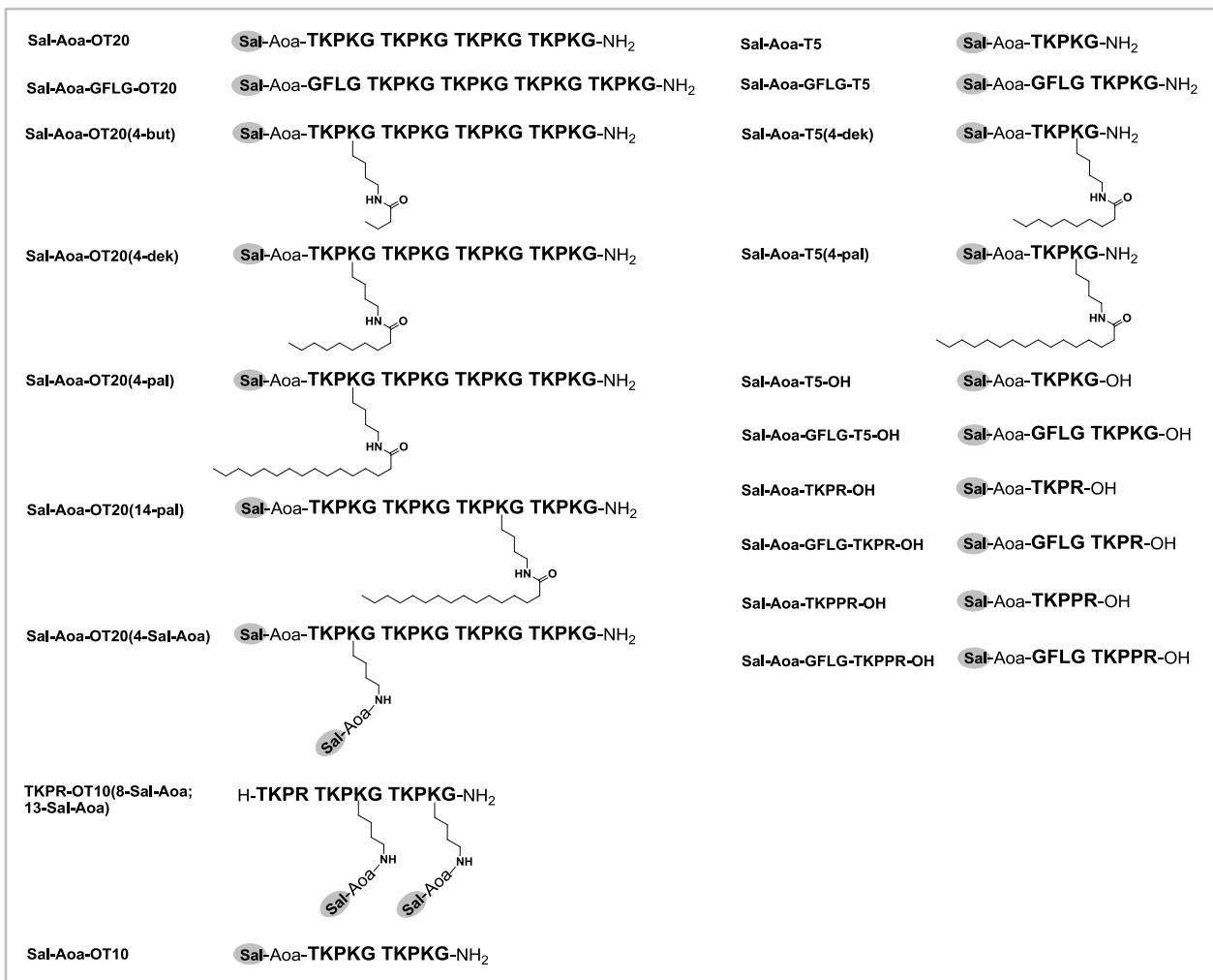


F25. ábra: A SalBenz3-Aoa-OT20 konjugátumban az észterkötés hidrolízise médiumban (Sula, ICM), a keletkezett Benz-Aoa-OT20 MS-ben csak kis mértékben volt detektálható, a Benz-Aoa-OT20-ból feltételezhetően acéliumion képződik ($\Delta m: 17,1$) az MS körülmények között

Szalicilanilid-peptid konjugátumok



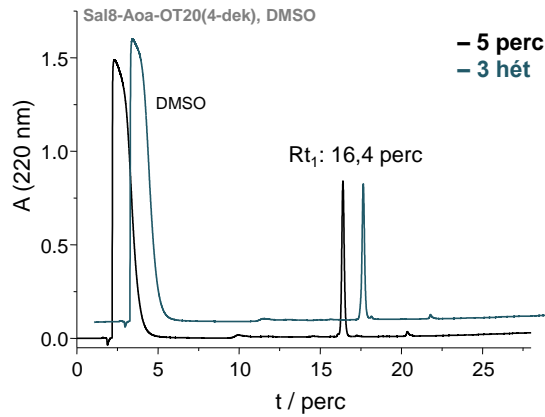
F26. ábra: A Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH konjugátum képződésének követése, (A) analitikai RP-HPLC kromatogramok 5 perc, 1 nap, 2 nap és 14 nap után. (B) Rt₂: 17,2 perc (2 nap követés után) ESI-MS spektruma (Sal8-Aoa-GFLG-TKPR-OH detektálása). Körülmények: Exformma HPLC rendszer, detektálás: 220 nm, gradiens: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B, folyási sebesség 1 mL/perc, oszlop: Zorbax SB-C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm).



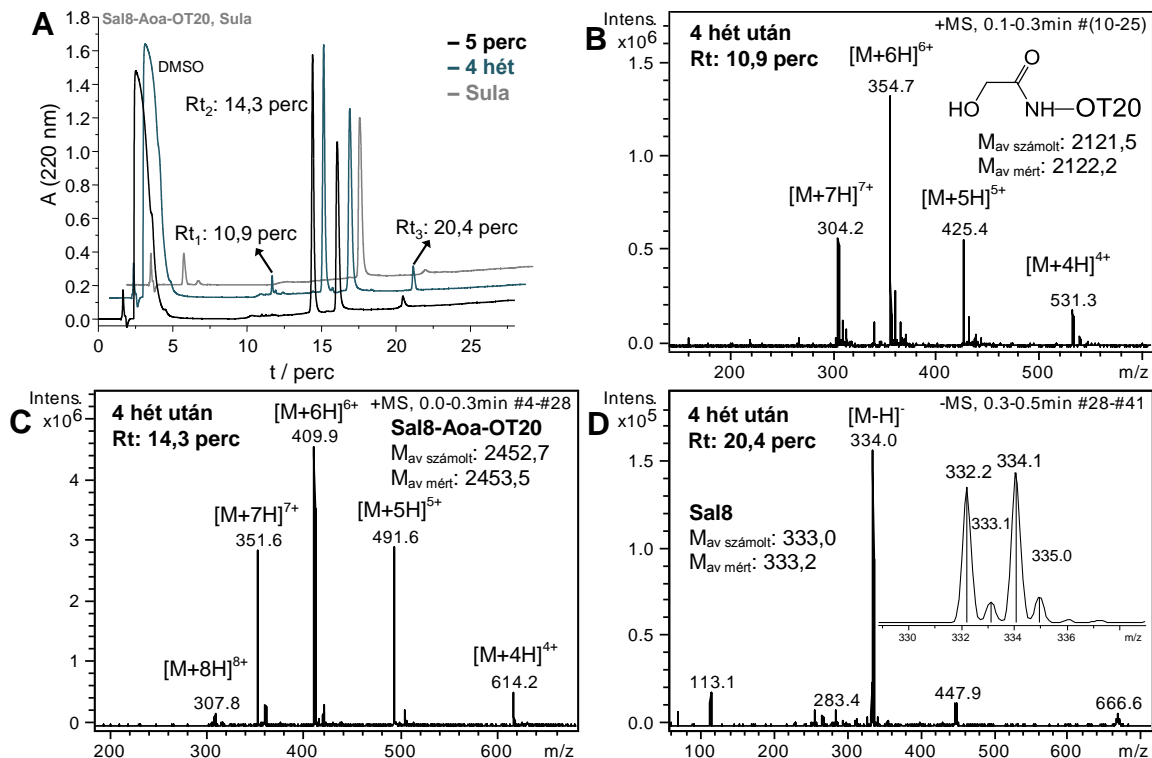
F27. ábra: A szalicilanilid-tuftsinszarmazék konjugátumok sematikus rajza (Sal7-9 konjugálható szalicilanilidek)

A szalicilanilid-peptid konjugátumok stabilitásvizsgálata

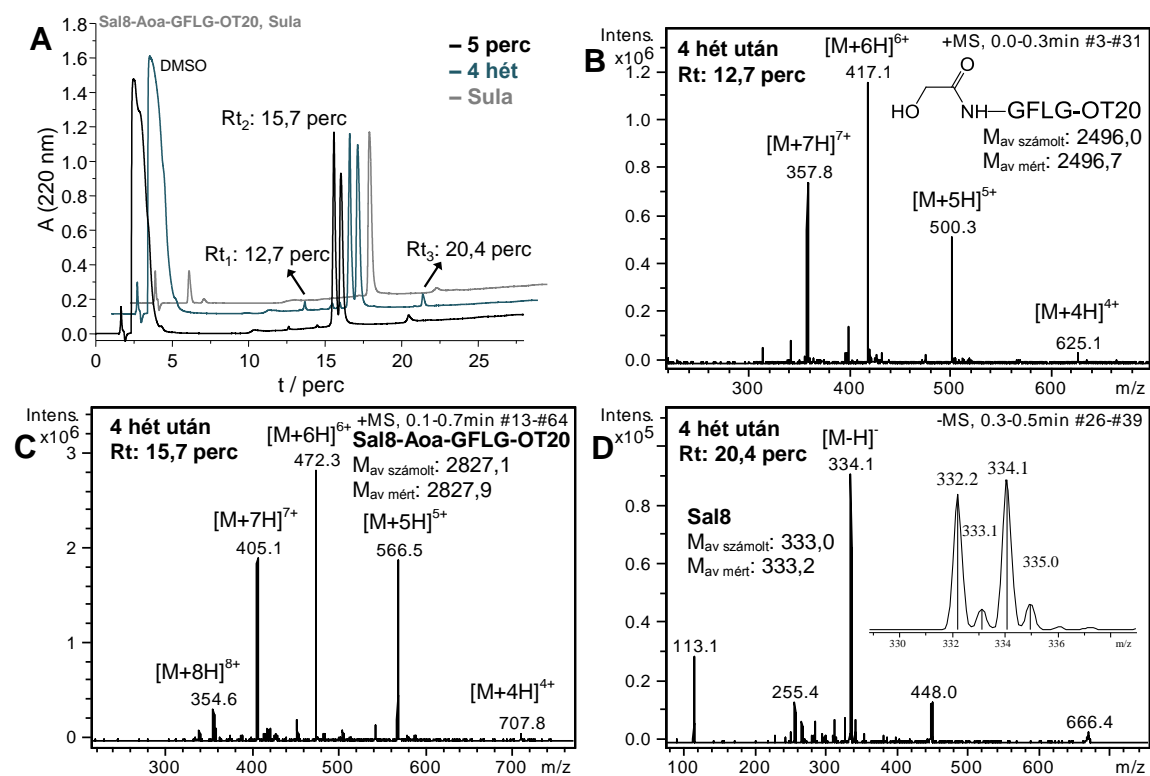
Körülmények (4.3.2.2. fejezet): Exformma HPLC rendszer, detektálás: 220 nm, gradiens Nucleosil C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm) oszlop esetén: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B, Phenomenex Jupiter C18 oszlop esetén (5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm): 0-5 perc 0% B, 5-55 perc 0-90% B, folyási sebesség 1 mL/perc



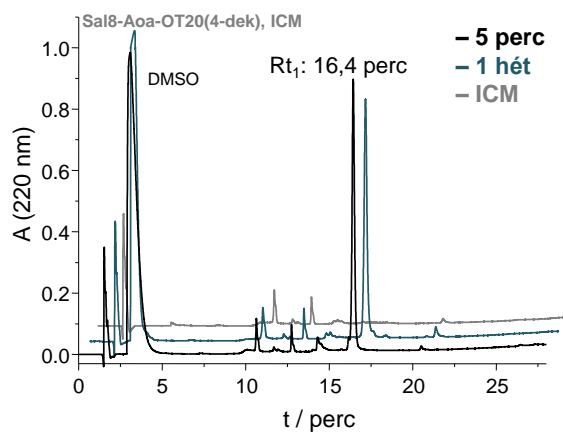
F28. ábra: (A) A Sal8-Aoa-OT20(4-dek) konjugátum stabilitásának meghatározása DMSO-ban RP-HPLC segítségével (3 hetes inkubálás után Rt_1 : 16,4 perc – Sal8-Aoa-OT20(4-dek) detektálása, MS spektrum nincs bemutatva) (Nucleosil C18 oszlop).



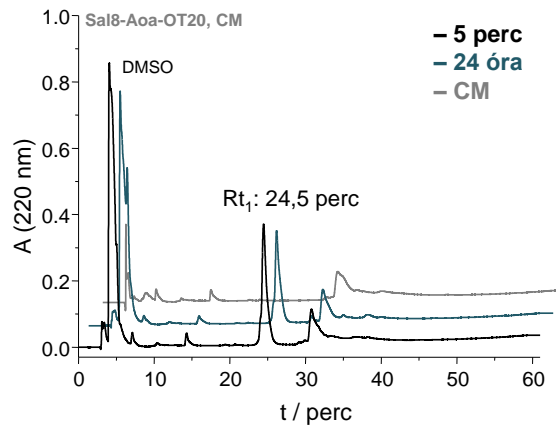
F29. ábra: (A) A Sal8-Aoa-OT20 konjugátum stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban RP-HPLC segítségével. 4 hét inkubálás után (B) Rt_1 : 10,9 perc (2-hidroxiacetyl-OT20 detektálása), (C) Rt_2 : 14,3 perc (Sal8-Aoa-OT20 detektálása), (D) Rt_3 : 20,4 perc (Sal8 detektálása) ESI-MS spektruma (Nucleosil C18 oszlop).



F30. ábra: (A) A Sal8-Aoa-GFLG-OT20 konjugátum stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó Sula médiumban RP-HPLC segítségével. 4 hét inkubálás után (B) Rt₁: 12,7 perc (2-hidroxiacetyl-GFLG-OT20 detektálása), (C) Rt₂: 15,7 perc (Sal8-Aoa-GFLG-OT20 detektálása), (D) Rt₃: 20,4 perc (Sal8 detektálása) ESI-MS spektruma (Nucleosil C18 oszlop).



F31. ábra: A Sal8-Aoa-OT20(4-dek) konjugátum stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t tartalmazó szérummentes médiumban RP-HPLC segítségével (1 hét inkubálás után Rt₁: 16,4 perc – Sal8-Aoa-OT20(4-dek), ESI-MS spektrum nincsen bemutatva) (Nucleosil C18 oszlop)



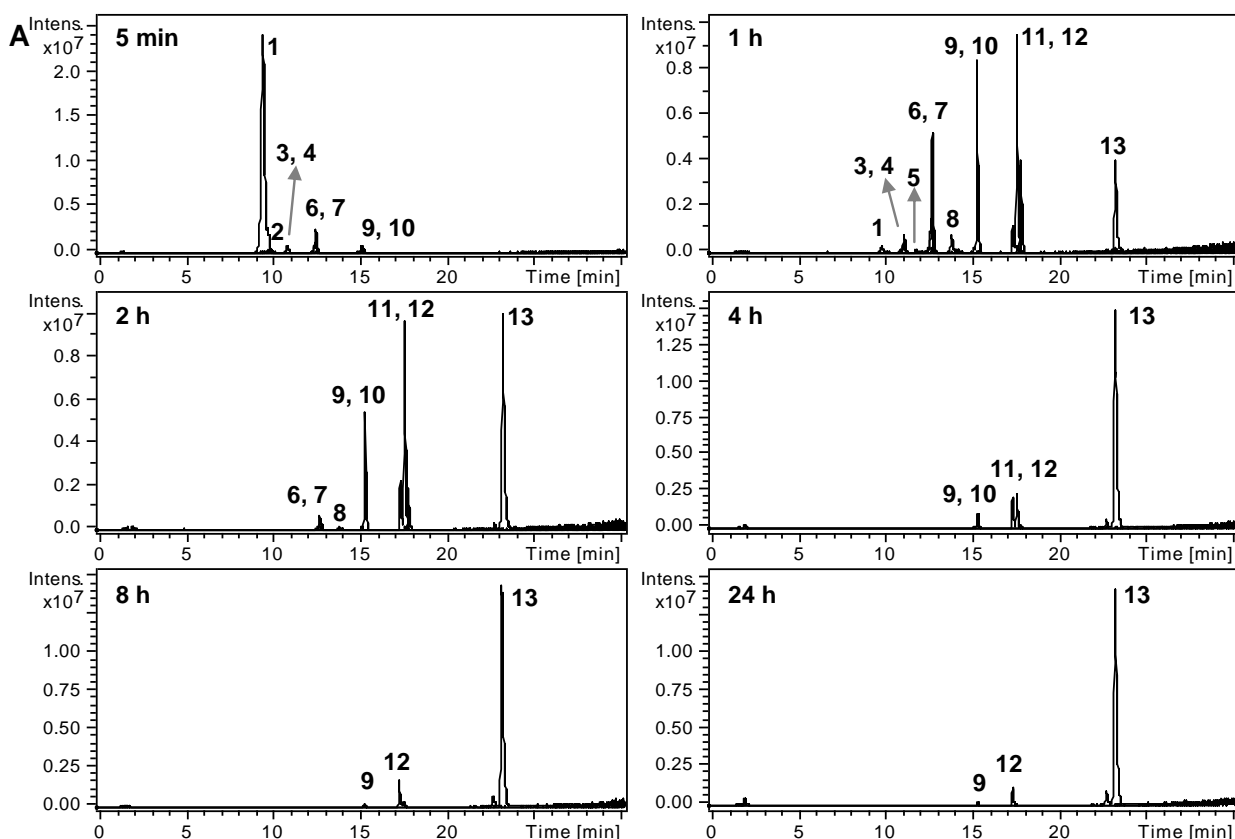
F32. ábra: A Sal8-Aoa-OT20 konjugátum stabilitásának meghatározása 10% DMSO-t és szérumot tartalmazó médiumban RP-HPLC segítségével (24 óra inkubálás után R_{t1} : 24,5 perc – Sal8-Aoa-OT20, ESI-MS spektrum nincs bemutatva) (Phenomenex Jupiter C18 oszlop).

A Sal8-peptid konjugátumok degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban

A konjugátumok lizoszomális degradációját a különböző mintavételi időkből a fragmensekre jellemző ionhoz tartozó kromatogramok összesítésével (EIC, extracted ion chromatogram), a fragmensekhez tartozó retenciós idővel, a számított és mért molekulatömeggel jellemeztem. Azoknál a fragmenseknél, melyeknél a bróm izotópeloszlása megfigyelhető EIC tartományt adtam meg. A kisebb fragmenseknél az oximkötés miatti *E* és *Z* izomerek elválnak, ezeknél mindkét izomer retenciós idejét megadtam. A legtöbb fragmensnél átlagos molekulatömeg szerepel (av), azoknál a fragmenseknél, ahol $[M+H]^+$ is megfigyelhető, a monoizotópos molekulatömeg szerepel. Rövidítések: OT20 = $[TKPKG]_4$, OT15 = $[TKPKG]_3$, OT10 = $[TKPKG]_2$ és T5 = TKPKG.

Körülmények: 5.2.7. fejezet.

A Sal8-Aoa-OT20 lizoszomális degradációja

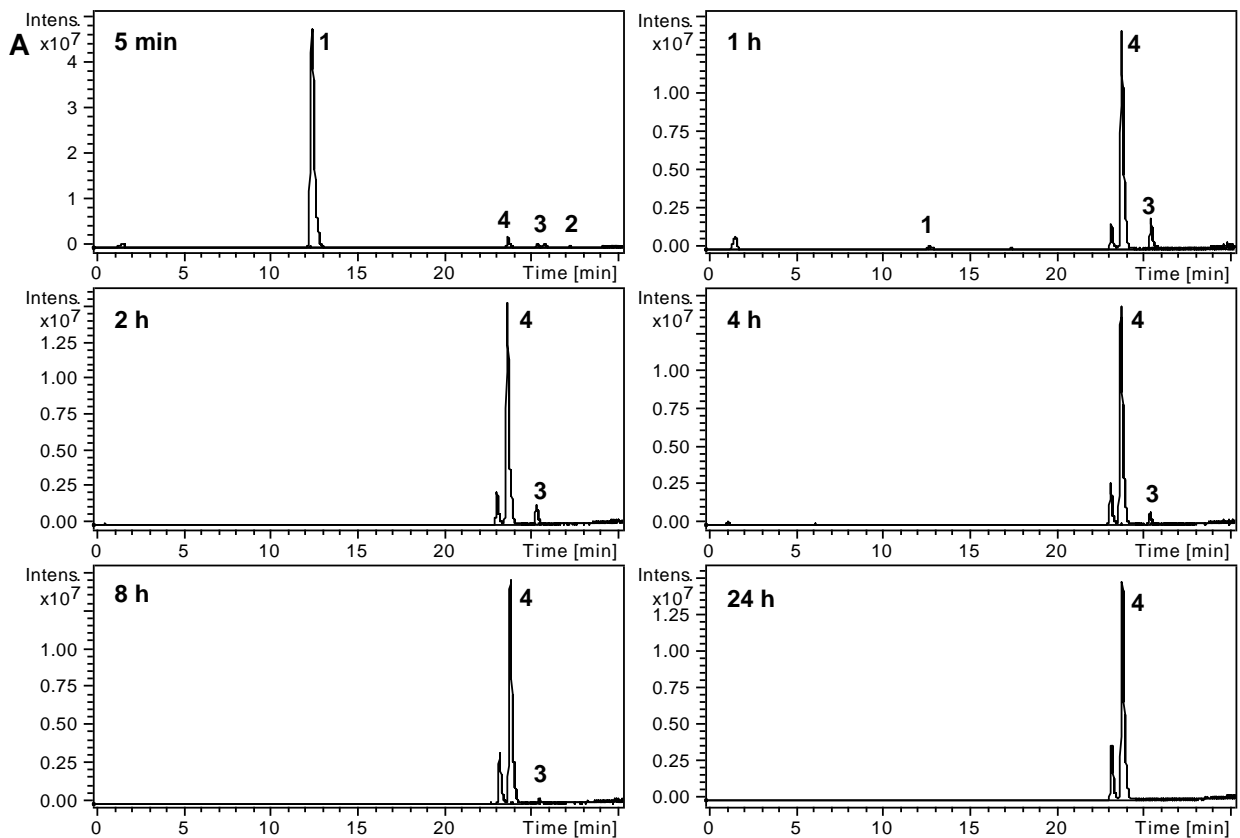


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-OT20	491,5	9,6	2452,7 / 2452,6 (av)
2	Sal8-Aoa-OT15-TKPK-OH	480,4	9,8	2396,6 / 2397,0 (av)
3	Sal8-Aoa-OT15-OH	486,6	11,0	1942,1 / 1942,2 (av)
4	Sal8-Aoa-OT10-TKPK-OH	472,3	11,0	1885,0 / 1885,0 (av)
5	Sal8-Aoa-OT10-TKP-OH	440,3	11,8	1756,8 / 1757,0 (av)
6	Sal8-Aoa-OT10-OH	477,5-478,0	12,6	1430,4 / 1430,6 (av)
7	Sal8-Aoa-T5-TKPK-OH	458,4-459,0	12,6	1373,4 / 1373,6 (av)
8	Sal8-Aoa-T5-TKP-OH	415,7-416,2	13,7	1245,2 / 1245,6 (av)
9	Sal8-Aoa-T5-OH	460,0-461,0	15,2	917,3 / 917,2 (mo)
10	Sal8-Aoa-TKPK-OH	431,3-432,6	15,2	860,3 / 860,2 (mo)
11	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
12	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
13	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)

F33. ábra: A Sal8-Aoa-OT20 degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-GFLG-OT20 lizoszomális degradációja

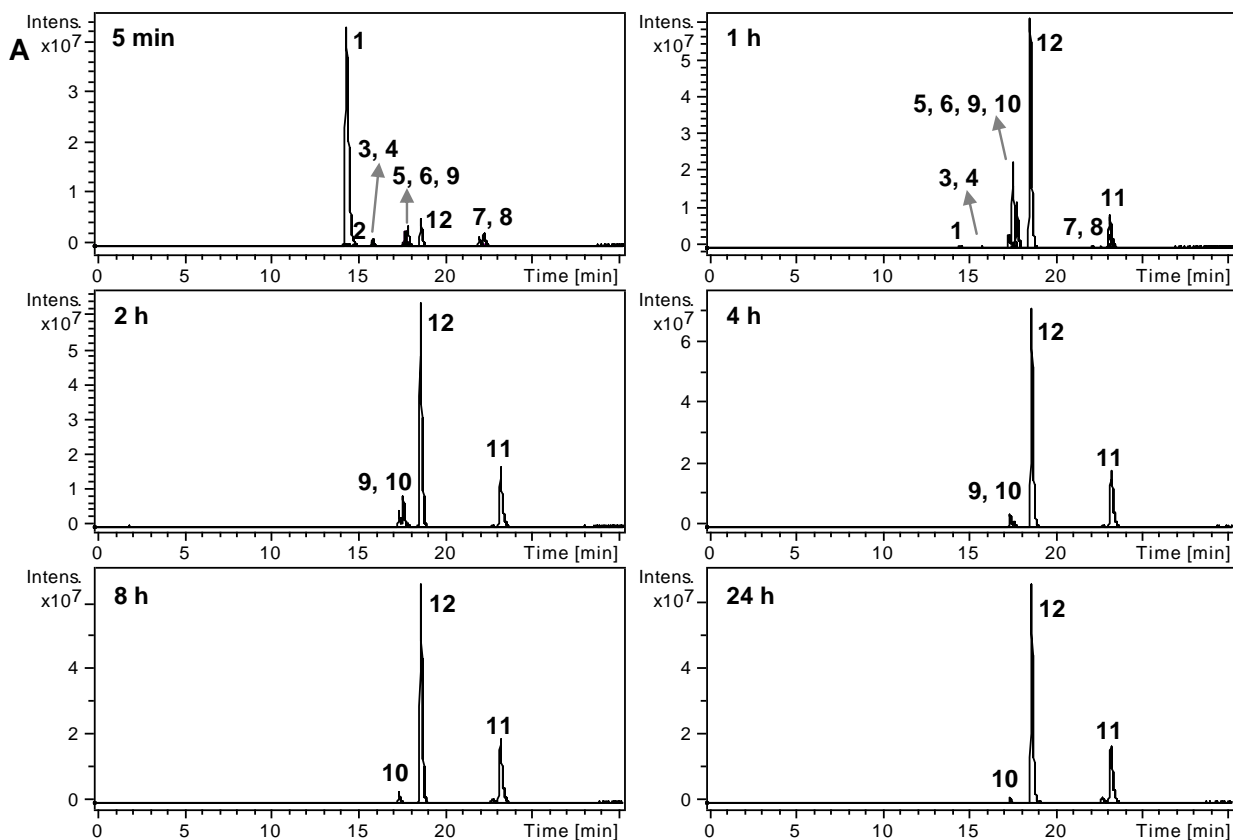


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számlolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-GFLG-OT20	472,3	12,6	2827,1 / 2827,8 (av)
2	Sal8-Aoa-GFL-OH	724,2-727,0	27,1	723,2 / 723,1 (mo)
3	Sal8-Aoa-GF-OH	611,2-614,0	25,2, 25,6 (izomerek)	610,1 / 610,2 (mo)
4	Sal8-Aoa-Gly-OH	464,1-467,0	23,0, 23,6 (izomerek)	463,0 / 463,1 (mo)

F34. ábra: A Sal8-Aoa-GFLG-OT20 degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-OT20(4-dek) lizoszomális degradációja

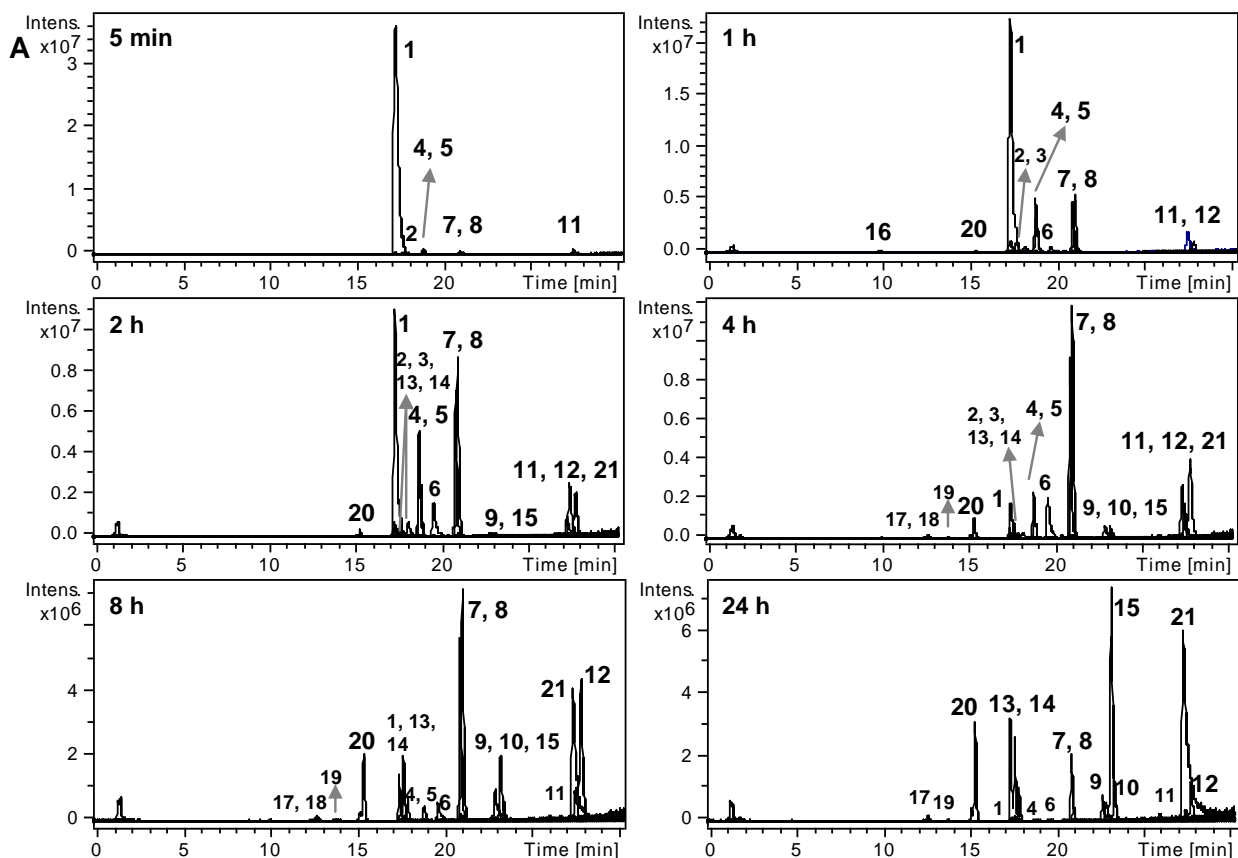


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-OT20(4-dek)	522,5	14,3	2606,9 / 2607,2 (av)
2	Sal8-Aoa-OT15(4-dek)-TKPK-OH	426,2	14,7	2550,9 / 2551,2 (av)
3	Sal8-Aoa-OT15(4-dek)-OH	525,1	15,8	2096,3 / 2096,5 (av)
4	Sal8-Aoa-OT10(4-dek)-TKPK-OH	510,9	15,8	2039,3 / 2039,5 (av)
5	Sal8-Aoa-OT10(4-dek)-OH	529,3	17,6	1584,7 / 1584,9 (av)
6	Sal8-Aoa-T5(4-dek)-TKPK-OH	510,3	17,6	1527,6 / 1527,9 (av)
7	Sal8-Aoa-T5(4-dek)-OH	536,8-538	21,8	1071,5 / 1071,4 (mo)
8	Sal8-Aoa-TKPK(dek)-OH	508,4-510	22,1	1014,4 / 1014,4 (mo)
9	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
10	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
11	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)
12	H-Lys(dek)-OH	301,3-302,3	18,4	300,2 / 300,3 (mo)

F35. ábra: A Sal8-Aoa-OT20(4-dek) degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-OT20(4-pal) lizoszomális degradációja

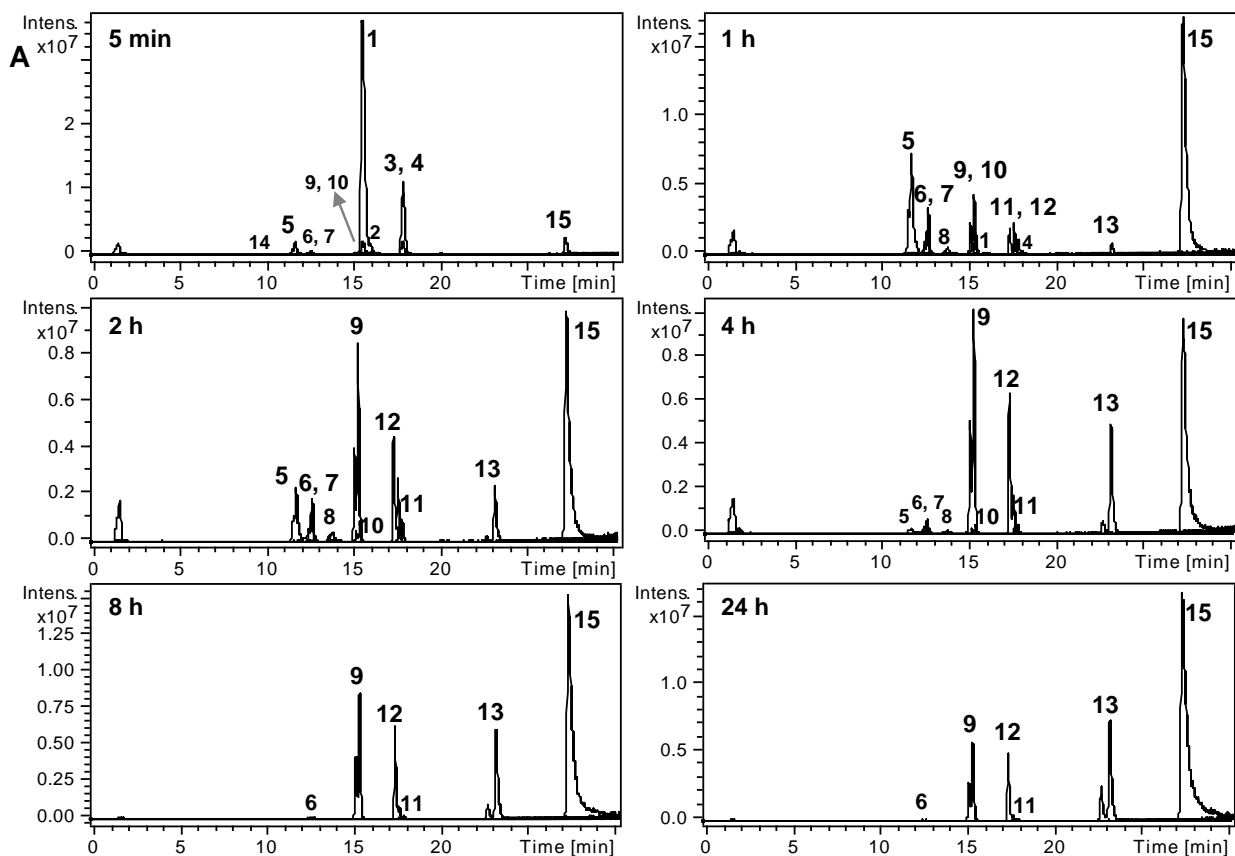


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-OT20(4-pal)	539,3	17,1	2691,1 / 2691,3 (av)
2	Sal8-Aoa-OT15(4-pal)-TKPK-OH	528,0	17,6	2635,0 / 2635,4 (av)
3	Sal8-Aoa-OT15(4-pal)-TKP-OH	502,4	18,0	2506,9 / 2507,1 (av)
4	Sal8-Aoa-OT15(4-pal)-OH	546,1	18,7	2180,5 / 2180,5 (av)
5	Sal8-Aoa-OT10(4-pal)-TKPK-OH	531,9	18,8	2123,4 / 2123,7 (av)
6	Sal8-Aoa-OT10(4-pal)-TKP-OH	499,8	19,5	1995,2 / 1995,5 (av)
7	Sal8-Aoa-OT10(4-pal)-OH	557,3	20,8	1668,9 / 1669,0 (av)
8	Sal8-Aoa-T5(4-pal)-TKPK-OH	538,3	20,9	1611,8 / 1611,9 (av)
9	Sal8-Aoa-T5(4-pal)-TKP-OH	741,9-743,0	22,7	1483,6 / 1483,8 (av)
10	Sal8-Aoa-T5(4-pal)-TK-OH	693,4-695,0	23,2	1386,5 / 1386,7 (av)
11	Sal8-Aoa-T5(4-pal)-OH	578,8-580,0	27,3	1157,2 / 1157,6 (av)
12	Sal8-Aoa-TKPK(pal)-OH	550,4-551,8	27,4	1098,5 / 1098,5 (mo)
13	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
14	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
15	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)
16	Sal8-Aoa-OT20	491,5	9,6	2452,7 / 2452,6 (av)
17	Sal8-Aoa-OT10-OH	477,5-478,0	12,6	1430,4 / 1430,6 (av)
18	Sal8-Aoa-T5-TKPK-OH	458,4-459,0	12,6	1373,4 / 1373,6 (av)
19	Sal8-Aoa-T5-TKP-OH	415,7-416,2	13,7	1245,2 / 1245,6 (av)
20	Sal8-Aoa-T5-OH	460,0-461,0	15,2	917,3 / 917,2 (mo)
21	H-Lys(pal)-OH	385,4-386,4	26,9	384,3 / 384,4 (mo)

F36. ábra: A Sal8-Aoa-OT20(4-pal) degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-OT20(14-pal) lizoszomális degradációja

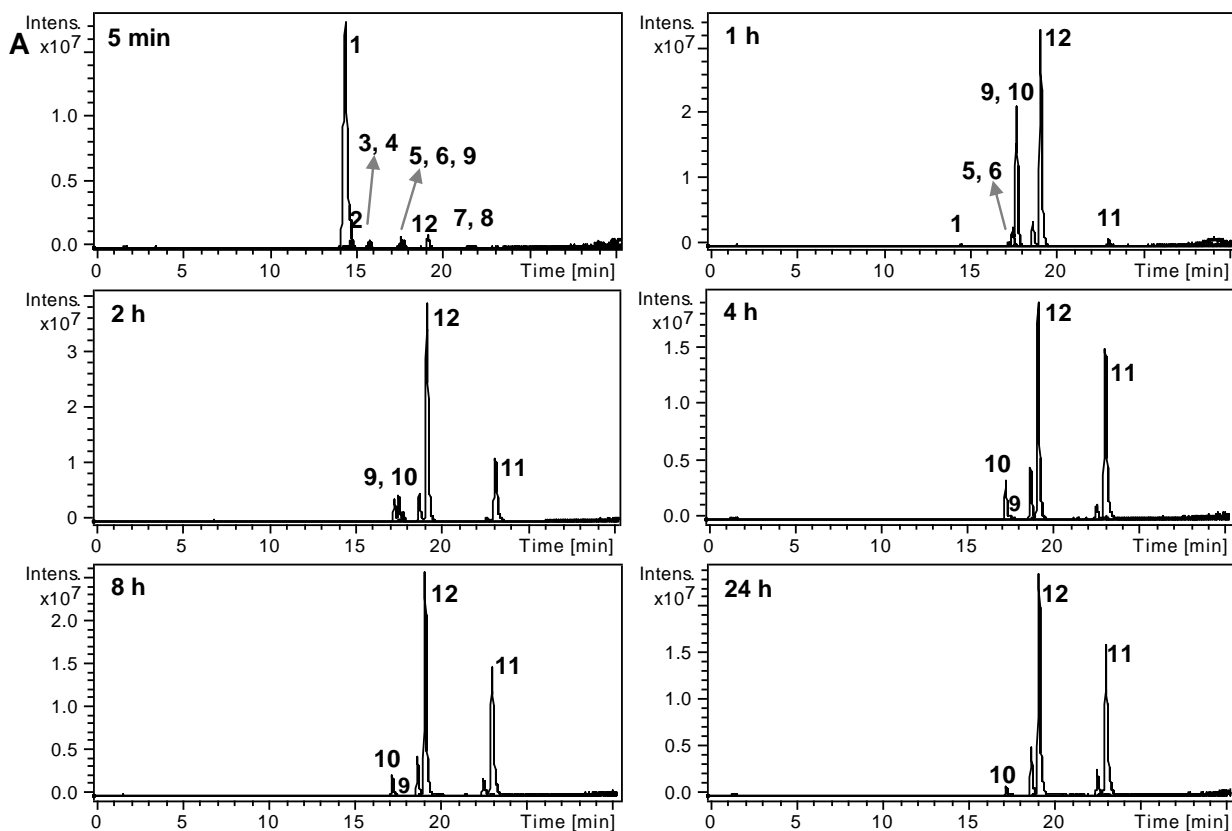


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-OT20(14-pal)	539,3	15,5	2691,1 / 2691,3 (av)
2	Sal8-Aoa-OT15(14-pal)-TKPK-OH	528,0	16,0	2635,0 / 2635,4 (av)
3	Sal8-Aoa-OT15(14-pal)-OH	546,1	17,7	2180,5 / 2180,3 (av)
4	Sal8-Aoa-OT10-TKPK(pal)-OH	531,9	17,8	2123,4 / 2123,6 (av)
5	Sal8-Aoa-OT10-TKP-OH	440,3	11,8	1756,8 / 1757,1 (av)
6	Sal8-Aoa-OT10-OH	477,5-478,0	12,6	1430,4 / 1430,6 (av)
7	Sal8-Aoa-T5-TKPK-OH	458,4-459,0	12,6	1373,4 / 1373,6 (av)
8	Sal8-Aoa-T5-TKP-OH	415,7-416,2	13,7	1245,2 / 1245,6 (av)
9	Sal8-Aoa-T5-OH	460,0-461,0	15,2	917,3 / 917,2 (mo)
10	Sal8-Aoa-TKPK-OH	431,3-432,6	15,1-15,2	860,3 / 860,2 (mo)
11	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
12	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
13	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)
14	Sal8-Aoa-OT20	491,5	9,6	2452,7 / 2452,6 (av)
15	H-Lys(pal)-OH	385,4-386,4	26,9	384,3 / 384,4 (mo)

F37. ábra: A Sal8-Aoa-OT20(14-pal) degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa) lizoszomális degradációja

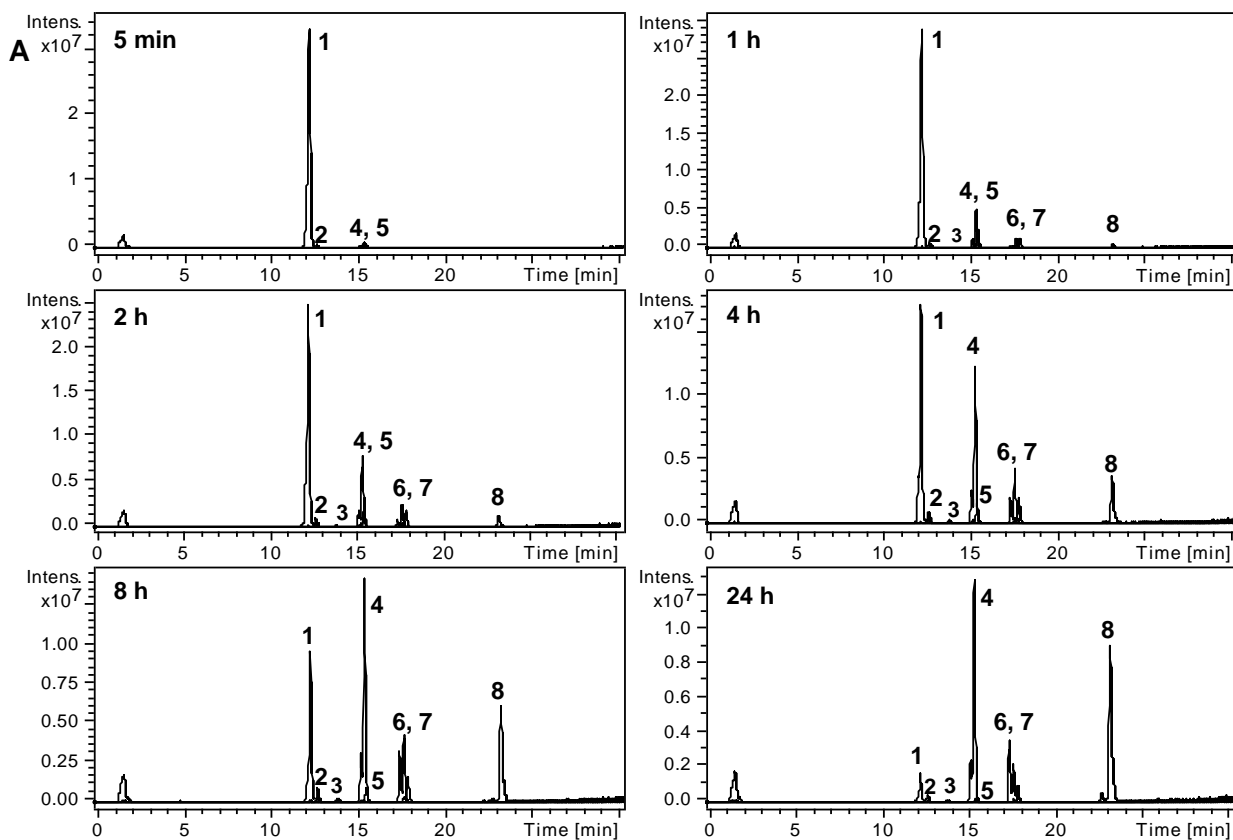


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-OT20(4-Sal8-Aoa)	569,5	14,4	2841,9 / 2842,2
2	Sal8-Aoa-OT15(4-Sal8-Aoa)-TKPK-OH	558,2	14,6	2785,8 / 2785,4 (av)
3	Sal8-Aoa-OT15(4-Sal8-Aoa)-OH	467,3	15,6	2331,3 / 2331,6 (av)
4	Sal8-Aoa-OT10(4-Sal8-Aoa)-TKPK-OH	455,9	15,6	2274,2 / 2274,2 (av)
5	Sal8-Aoa-OT10(4-Sal8-Aoa)-OH	607,5	17,3	1819,6 / 1819,5 (av)
6	Sal8-Aoa-T5(4-Sal8-Aoa)-TKPK-OH	588,5	17,4	1762,6 / 1762,4 (av)
7	Sal8-Aoa-T5(4-Sal8-Aoa)-OH	654,7	21,5	1305,3 / 1305,5 (mo)
8	Sal8-Aoa-TKPK(4-Sal8-Aoa)-OH	626,2-627,8	21,7	1248,3 / 1249,0 (mo)
9	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
10	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
11	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)
12	H-Lys(4-Sal8-Aoa)-OH	535,2-538,2	18,6, 19,0 (izomerek)	534,1 / 534,2 (mo)

F38. ábra: A Sal8-Aoa-OT20(4-Aoa) degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-OT10 lizoszomális degradációja

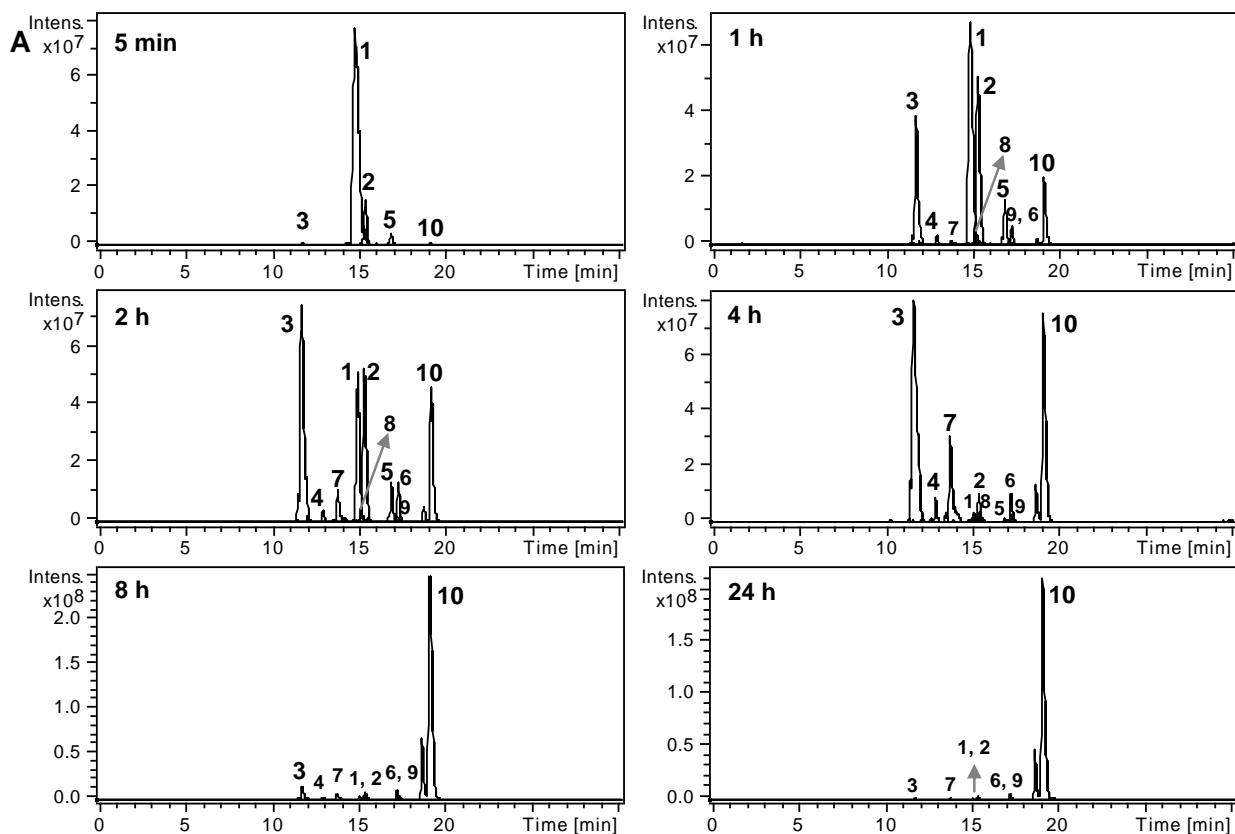


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-OT10	477,2-477,6	12,2	1429,5 / 1429,7 (av)
2	Sal8-Aoa-T5-TKPK-OH	458,4-459,0	12,6	1373,4 / 1373,6 (av)
3	Sal8-Aoa-T5-TKP-OH	415,7-416,2	13,7	1245,2 / 1245,6 (av)
4	Sal8-Aoa-T5-OH	460,0-461,0	15,2	917,3 / 917,2 (mo)
5	Sal8-Aoa-TKPK-OH	431,3-432,6	15,2	860,3 / 860,2 (mo)
6	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
7	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
8	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)

F39. ábra: A Sal8-Aoa-OT10 degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa) lizoszomális degradációja

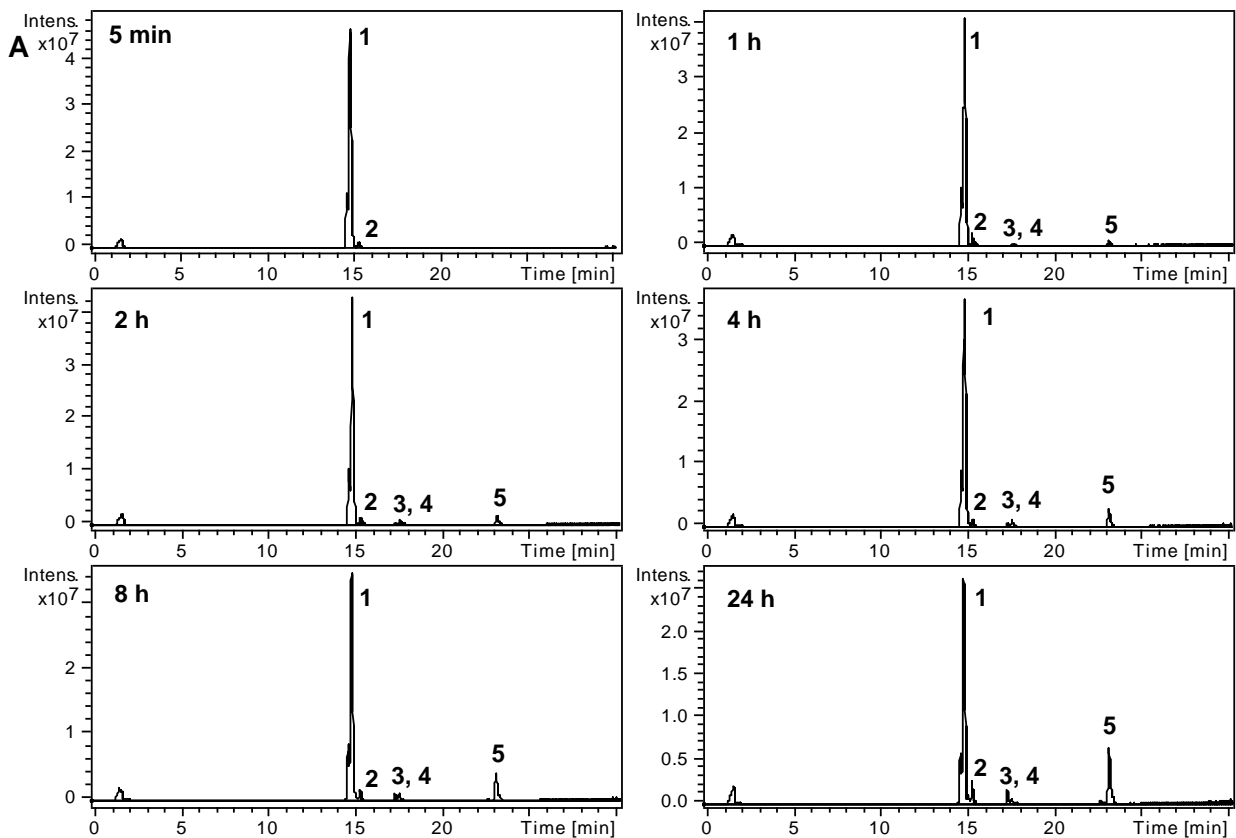


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa)	576,4	14,7	2301,2 / 2301,5 (av)
2	TKPR-TKPK(Sal8-Aoa)G-TKPK(Sal8-Aoa)-OH	562,5	15,3	2245,2 / 2245,5 (av)
3	TKPR-TKPK(Sal8-Aoa)G-TKP-OH	433,1	11,6	1727,8 / 1728,3 (av)
4	TKPR-TKPK(Sal8-Aoa)G-OH	468,3	12,9	1401,4 / 1402,0 (av)
5	OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa)	607,2	16,7	1818,7 / 1818,6 (av)
6	TKPK(Sal8-Aoa)G-TKPK(Sal8-Aoa)-OH	588,7	17,2	1762,6 / 1762,9 (av)
7	TKPK(Sal8-Aoa)G-TKP-OH	416,3	13,7	1245,2 / 1245,8 (av)
8	TKPK(Sal8-Aoa)G-OH	459,8-461,2	15,5	917,3 / 917,6 (mo)
9	K(Sal8-Aoa)G-OH / -NH ₂	591,3-594,3	16,9, 17,2 (izomerek)	591,1; 590,1 / 590,2 (mo)
10	H-Lys(Sal8-Aoa)-OH	535,2-538,2	18,6, 19,0 (izomerek)	534,1 / 534,2 (mo)

F40. ábra: A TKPR-OT10(8-Sal8-Aoa; 13-Sal8-Aoa) degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-T5 lizoszomális degradációja

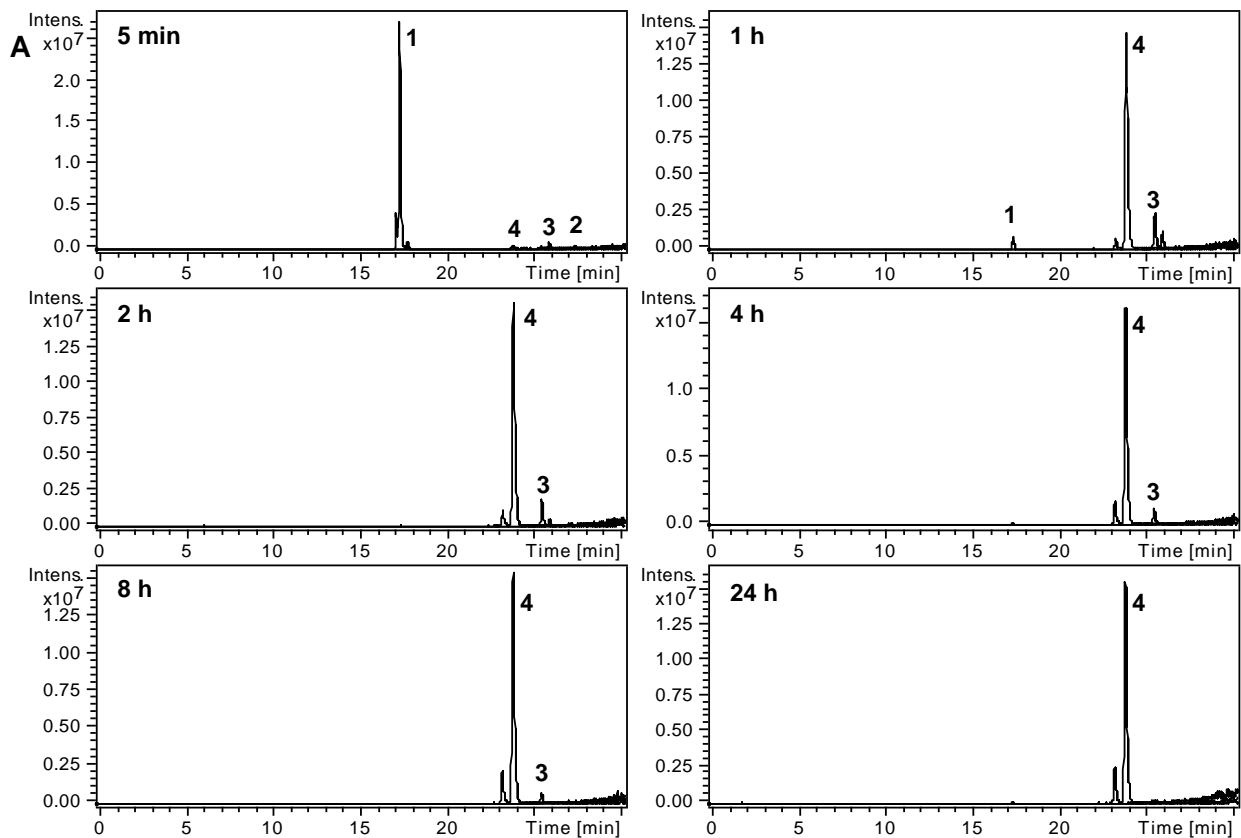


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-T5	459,0-460,2	14,8	916,3 / 916,3 (mo)
2	Sal8-Aoa-TKPK-OH	431,3-432,6	15,2	860,3 / 860,2 (mo)
3	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
4	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
5	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)

F41. ábra: A Sal8-Aoa-T5 degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-GFLG-T5 lizoszomális degradációja

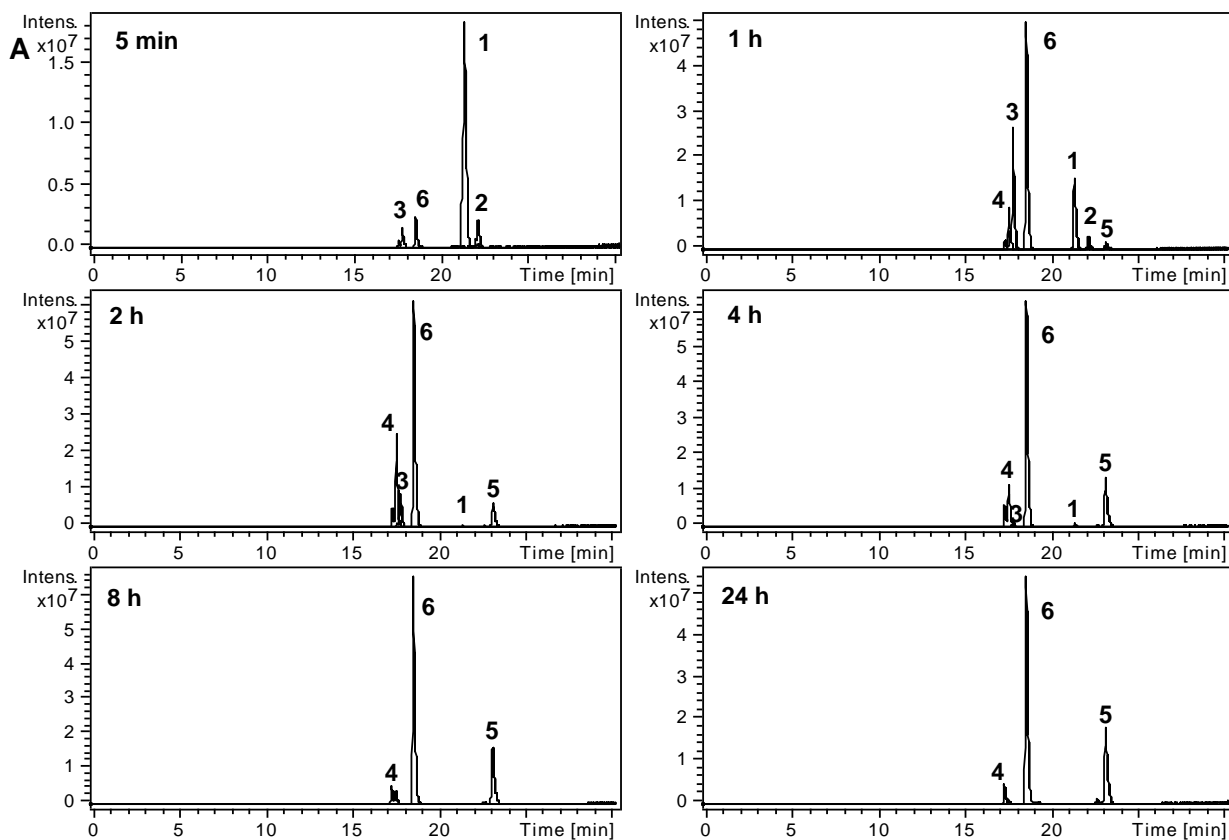


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-GFLG-T5	647,2	17,2	1292,3 / 1292,4 (av)
2	Sal8-Aoa-GFL-OH	724,2-727,0	27,1	723,2 / 723,1 (mo)
3	Sal8-Aoa-GF-OH	611,2-614,0	25,2, 25,6 (izomerek)	610,1 / 610,2 (mo)
4	Sal8-Aoa-Gly-OH	464,1-467,0	23,0, 23,6 (izomerek)	463,0 / 463,1 (mo)

F42. ábra: A Sal8-Aoa-GFLG-T5 degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-T5(4-dek) lizoszomális degradációja

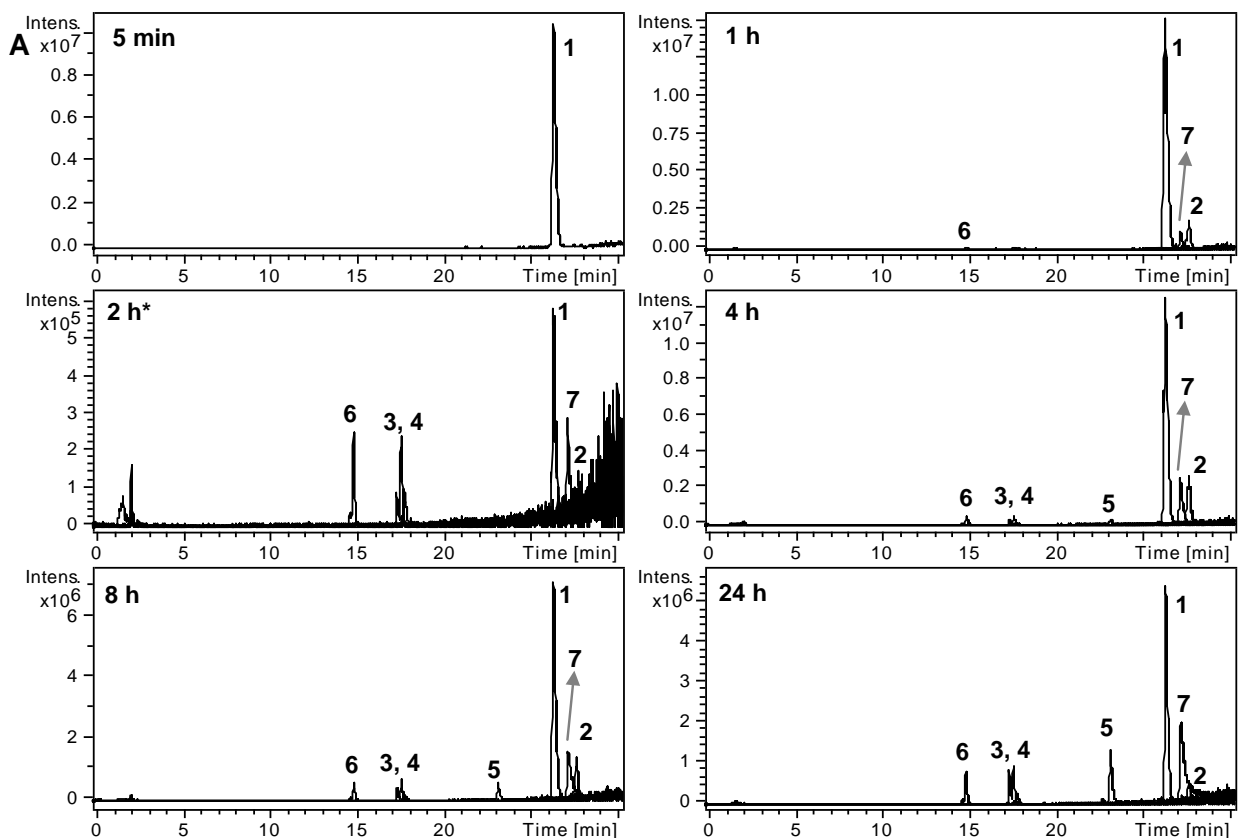


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-T5(4-dek)	536,5-538,0	21,2	1070,5 / 1070,5 (mo)
2	Sal8-Aoa-TKPK(dek)-OH	508,4-509,7	22,0	1014,4 / 1014,4 (mo)
3	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
4	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
5	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)
6	H-Lys(dek)-OH	301,3-302,3	18,4	300,2 / 300,3 (mo)

F43. ábra: A Sal8-Aoa-T5(4-dek) degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-T5(4-pal) lizoszomális degradációja



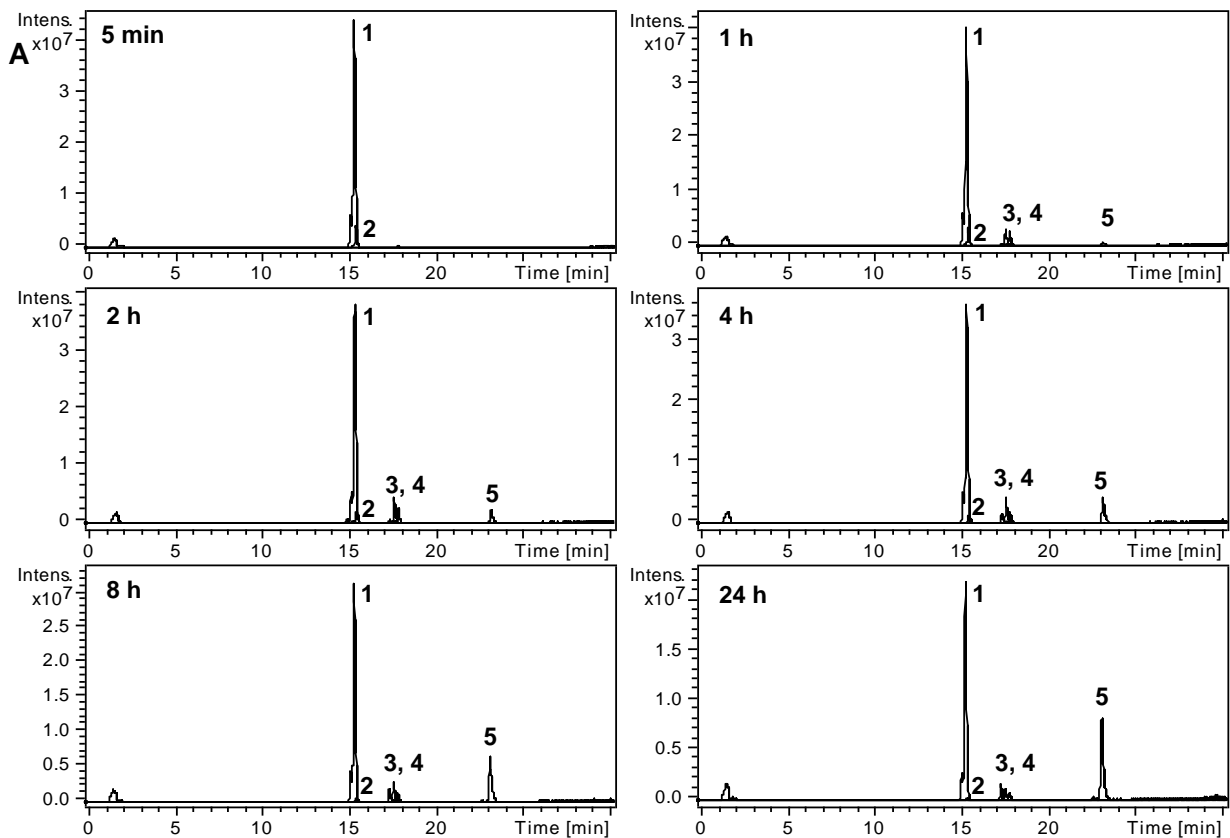
B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-T5(4-pal)	578,5-579,7	26,1	1154,6 / 1154,6 (mo)
2	Sal8-Aoa-TKPK(pal)-OH	550,4-551,8	27,4	1098,5 / 1098,5 (mo)
3	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
4	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
5	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)
6	Sal8-Aoa-T5	459,0-460,2	14,8	916,3 / 916,3 (mo)
7	H-Lys(pal)-OH	385,4-386,4	26,9	384,3 / 384,4 (mo)

F44. ábra: A Sal8-Aoa-T5(4-pal) degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

*alacsony intenzitású minta

A Sal8-Aoa-T5-OH lizoszomális degradációja

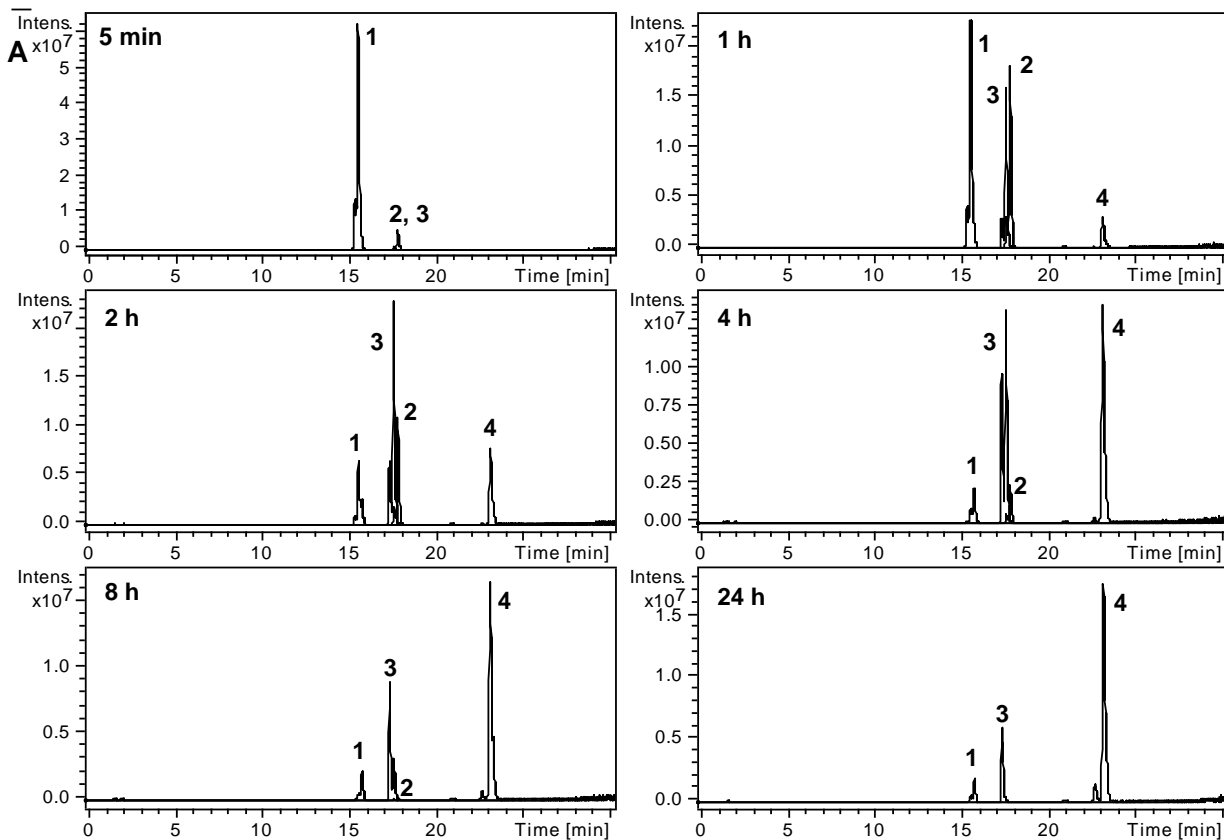


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-T5-OH	460,0-461,0	15,2	917,3 / 917,2 (mo)
2	Sal8-Aoa-TKPK-OH	431,3-432,6	15,2	860,3 / 860,2 (mo)
3	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
4	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
5	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)

F45. ábra: A Sal8-Aoa-T5-OH degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

A Sal8-Aoa-TKPR-OH lizoszomális degradációja

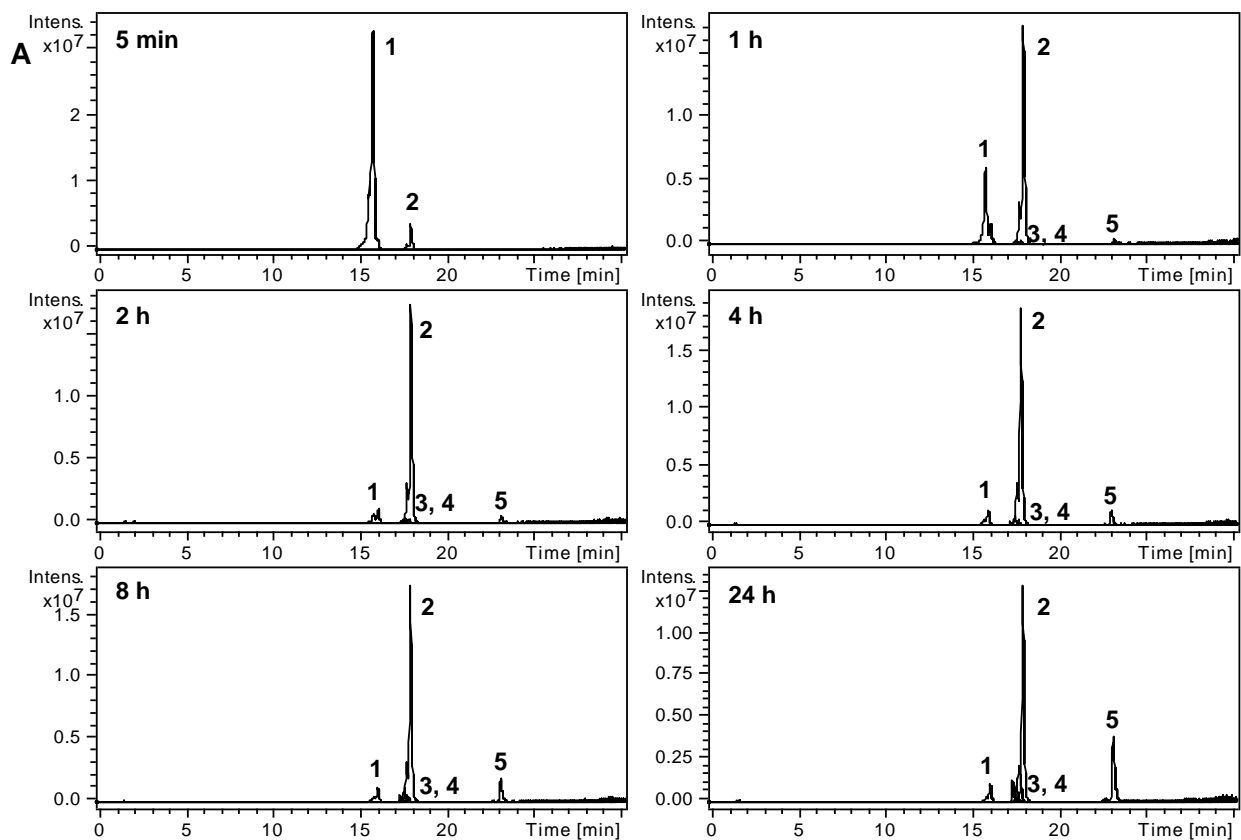


B

kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-TKPR-OH	445,4-447	15,3, 15,4 (izomerek)	883,0 / 883,0 (mo)
2	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
3	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
4	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)

F46. ábra: A Sal8-Aoa-TKPR-OH degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.

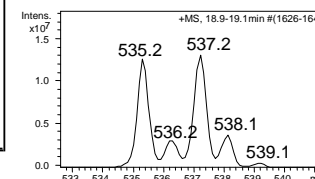
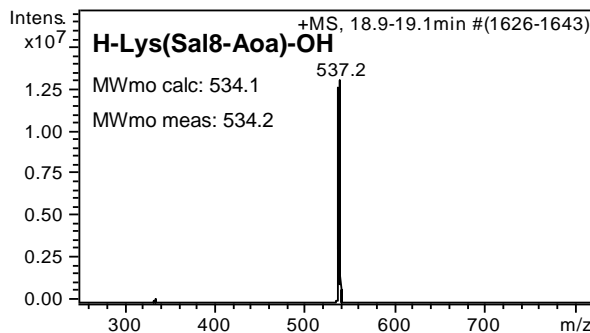
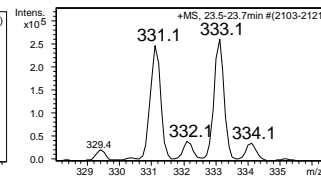
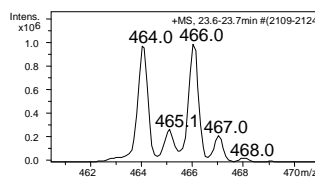
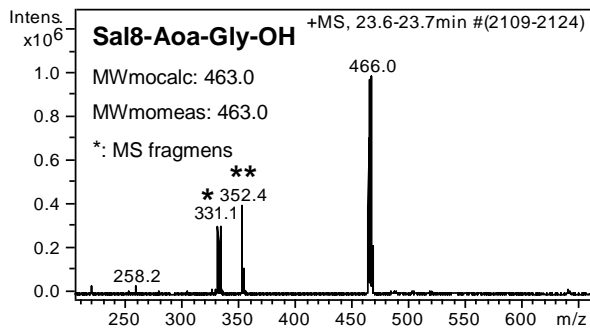
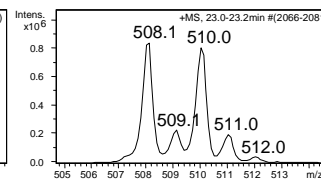
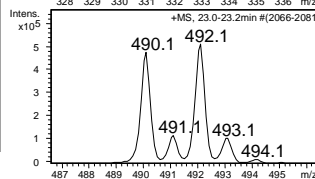
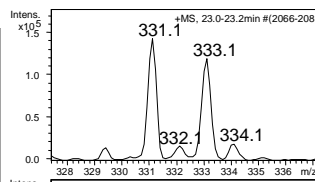
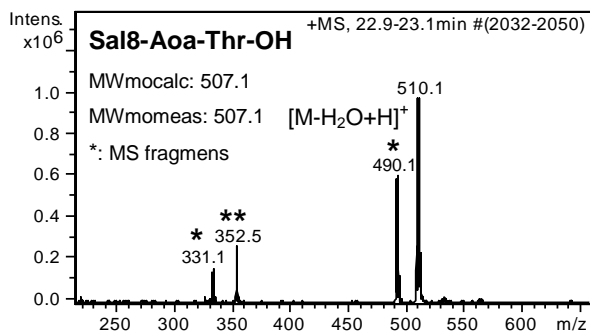
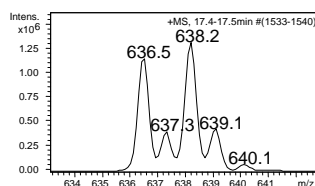
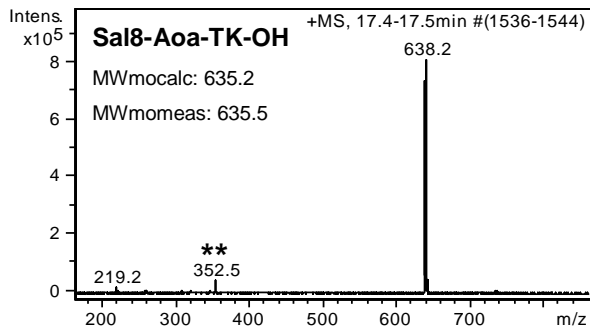
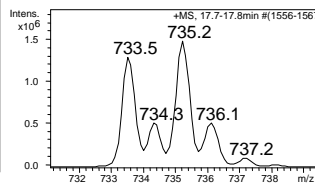
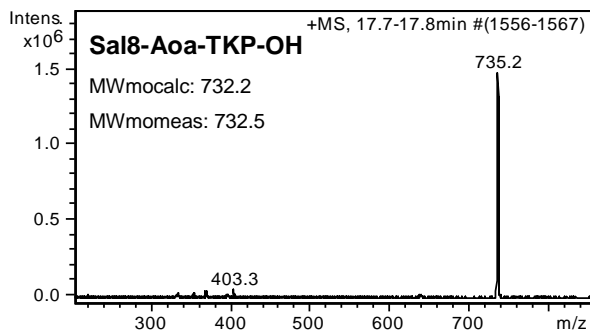
A Sal8-Aoa-TKPPR-OH lizoszomális degradációja



B

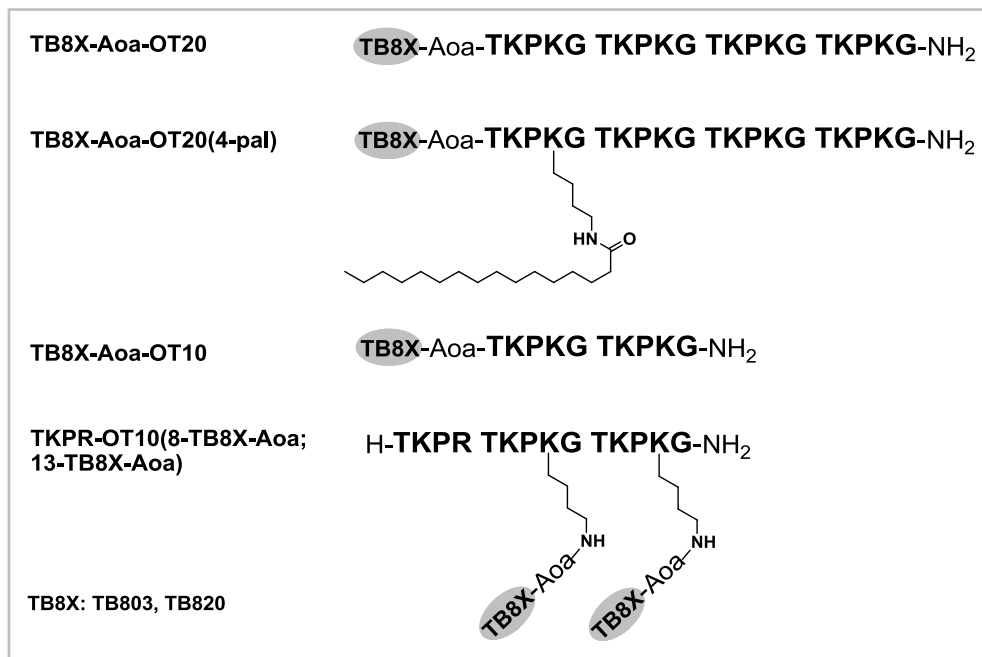
kód	fragmens	EIC / m/z	Rt / perc	M _{számolt} / M _{mért}
1	Sal8-Aoa-TKPPR-OH	494,0-495,0	15,7	985,4 / 985,3 (mo)
2	Sal8-Aoa-TKPP-OH	830,4-833,0	17,6, 17,8 (izomerek)	829,3 / 829,4 (mo)
3	Sal8-Aoa-TKP-OH	733,3-736,0	17,5, 17,7 (izomerek)	732,2 / 732,3 (mo)
4	Sal8-Aoa-TK-OH	636,3-639,0	17,2, 17,5 (izomerek)	635,2 / 635,3 (mo)
5	Sal8-Aoa-Thr-OH	508,0-511,0	22,6, 23,1 (izomerek)	507,1 / 507,1 (mo)

F47. ábra: A Sal8-Aoa-TKPPR-OH degradációja patkány máj lizoszóma preparátumban. (A) A fragmensekre jellemző ionkromatogramok (EIC) a különböző mintavételi időpontokban. (B) A detektált fragmensek jellemzése.



F48. ábra: A lizoszomális degradáció során keletkező legkisebb fragmensek tömegspektruma és izotópeloszlása (* MS-ben keletkező fragmens; ** háttérszűcs: 352,5 m/z)

F4. Piridopirimidin származékok peptidkonjugátumai



F49. ábra: A piridopirimidin származékok peptidkonjugátumainak sematikus rajza

F5. Kísérleti rész

A szintetikus munka során használt vegyszereket, eszközöket, műszereket bemutató táblázatok:

F1. táblázat: Aminosavszármazékok, gyanták

Név, kapacitás	Rövidítés	Gyártó cég
<i>tert</i> -butiloxikarbonil-aminosavszármazékok	Boc-aminosav	Nova Biochem (Läufelfingen, Svájc)
4-metilbenzhidrilamin-gyanta (1,2 mmol/g)	MBHA	
4-(2', 4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamidonorleucil-MBHA-gyanta (0,65-0,73 mmol/g)	Rink-Amid MBHA	Iris Biotech (Marktredwitz, Németország)
9-fluorenilmetiloxikarbonil-aminosavszármazékok	Fmoc-aminosav	
4-benziloxibenzilalkohol-polisztirol gyanta (0,94 mmol/g)	Wang gyanta	

F2. táblázat: Oldószerek, reagensek

Név	Rövidítés	Gyártó cég
trifluoecetsav	TFA	Reanal (Magyarország)
ninhidrin-és izatin teszt alkotói (ninhidrin, etanol, fenol, piridin, KCN, izatin)	-	
diklórmétán	DCM	Molar (Magyarország)
<i>N,N</i> -dimetilformamid	DMF	
<i>N</i> -metilpirrolidon	NMP	Merck (Magyarország)
<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid	DIC	Sigma-Aldrich (Magyarország, Csehország, Németország)
<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid	DCC	
1-hidroxibenzotriazol	HOBt	
<i>N,N</i> -diizopropiletilamin	DIEA	
5(6)-karboxifluorescein	Cf	
<i>p</i> -krezol	-	
hidrogén-fluorid	HF	
piperidin	-	
1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-én	DBU	
triizopropilszilán	TIS	
4-dimetilaminopiridin	DMAP	
1,2-etánditól	EDT	
ecetsavanhidrid	Ac ₂ O	
hidrazin monohidrát	NH ₂ NH ₂ .H ₂ O	
fenol	-	
vajsavanhidrid	-	
dekánsav	-	
palmitinsav	-	
acetonitril	AcN	
metanol	MeOH	
etanol	EtOH	

F2. táblázat: Oldószerek, reagensek – folytatás

Név	Rövidítés	Gyártó cég
klórbenzol	Ph-Cl	Sigma-Aldrich (Magyarország, Csehország, Németország)
2-metoxietanol	-	
etilacetát	EtOAc	
ecetsav	AcOH	
aceton	-	
dimetilszulfoxid	DMSO	
citromsav	-	
nátrium-acetát	NaOAc	
2-amino-2-hidroxi-metil-propán-1,3-diol	TRIS	
5-klórszalícilsav, 5-brómszalícilsav, 5-formilszalícilsav	-	
4-trifluorometilanilin, 3,4-diklóranilin, 4-benzoilanilin, 4-acetilanilin	-	
5-hidroxi-pirazin-2-karbonsav	-	
4-formilbenzoesav	-	
2-klóretil-izocianát, 3-klórpropil-izocianát, <i>n</i> -propil-izocianát	-	
foszfotriklorid	PCl3	
tionilklorid	SOCl2	
treietilamin	TEA	
poli(DL-tejsav / glikolsav)	PLGA50	
Pluronic F127	-	BASF Hungaria Kft. (Magyarország)

F3. táblázat: Műszerek

Elnevezés	Gyártó cég
Knauer RP-HPLC rendszer	Knauer (Bad Homburg, Németország)
Exformma HPLC rendszert	Exformma Technology (ASIA Co., Limited, Hong Kong, Kína)
Bruker Daltonics Esquire 3000+ tömegspektrométer	Bruker (Bremen, Németország)
Waters Quattro Micro API tömegspektrométer	Waters Corporation (Milford, MA, USA)
Waters Acquity UPLC rendszer	Waters Corporation (Milford, MA, USA)
Jasco LC-2000Plus HPLC rendszer	Jasco Europe (Cremella, Olaszország)
SYKAM 4300 automata aminosavanalizátor	SYKAM (Eresing, Németország)
SYRO-I Multiple Peptide Synthesizer, peptidszintetizátor	MultiSynTech (Witten, Németország)
VARIO EL III, automata elemanalizátor	Elementar Analysensysteme (Hanau, Németország)
Automatic Microanalyser CHNS-O CE elemanalizátor	FISONS EA 1110 (Milano, Italy)
Varian Cary Eclipse fluoreszcens spektrofotométer	Agilent Technologies Varian Inc. (Santa Clara, CA, USA)
HF teflonkészülék	Peninsula Laboratories, INC. (Belmont, CA, USA)
liofilizátor	Virtis (Warminster, PA, USA)
Büchi 545 olvadáspont mérő	Büchi Labortechnik (Flawil, Svájc)
Eppendorf 5702 centrifuga	Eppendorf (Ausztria)

F3. táblázat: Műszerek – folytatás

Elnevezés	Gyártó cég
MicroSYNTH MLS ETHOS 1600 URM mikrohullámú reaktor	Milestone Inc. (Shelton, CT, USA)
Varian Mercury-Vxbb 300, Varian VNMR S500 NMR készülékek	Varian Comp. (Palo Alto, CA, USA)
Nicolet 6700 FT-IR készülék	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PSIA XE-100 AFM készülék	PSIA Inc. (Dél-Korea)
KSV MiniMicro Langmuir-mérleg	KSV Instruments (Finnország)
QCM200 kvarckristály mikromérleg	Stanford Research Systems (Sunnyvale, CA, USA)
Brookhaven BI-200SM goniométer	Brookhaven Instruments Corporation (Holtsville, NY, USA)

F4. táblázat: RP-HPLC oszlopok, töltetek

Elnevezés	Jellemzők	Gyártó cég
Phenomenex Jupiter C18 félpreparatív	fordított fázisú, módosított szilika töltet (C18, 10 µm, 300 Å, 10 x 250 mm)	Phenomenex (Torrance, CA, USA)
Phenomenex Jupiter Proteo félpreparatív	fordított fázisú, módosított szilika töltet (C18, 10 µm, 90 Å, 10 x 250 mm)	
Phenomenex Jupiter C18 analitikai	fordított fázisú, módosított szilika töltet (C18, 5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm)	
Phenomnex Kinetex XB-C18 analitikai	fordított fázisú, módosított szilika töltet (C18, 2,6 µm, 100 Å, 2,1 x 100 mm)	
Nucleosil C18 analitikai	fordított fázisú, módosított szilika töltet (C18, 5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm)	
Agilent Zorbax SB-C18 analitikai	fordított fázisú, módosított szilika töltet (C18, 5 µm, 100 Å, 4,6 x 150 mm)	Agilent Technologies Varian Inc. (Santa Clara, CA, USA)
Agilent Zorbax SB-CN analitikai	fordított fázisú, módosított szilika töltet (CN, 5 µm, 80 Å, 4,6 x 150 mm)	
Supelco Ascentis C18 analitikai	fordított fázisú, módosított szilika töltet (C18, 3 µm, 100 Å, 2,1 x 150 mm)	Sigma-Aldrich (Magyarország)

Az *in vitro* kísérletek során használt vegyszereket, eszközöket, műszereket bemutató táblázatok:

F5. táblázat: Anyagok, vegyszerek

Elnevezés, összetétel	Rövidítés, jelzés	Gyártó cég
RPMI-1640 sejtenyészítő médium, pH 7,4	RPMI-1640 ICM	Sigma-Aldrich (Magyarország)
9 mM glükóz, 10 mM NaHCO ₃ , 119 mM NaCl, 9 mM HEPES (4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin-etánszulfonsav), 5 mM KCl, 0,85 mM MgCl ₂ , 0,053 mM CaCl ₂ , 5 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, pH 7,4	HPMI	
L-glutamin	Glu	
tripszin	-	
(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazolium)-bromid	MTT	
foszfát puffer (0,2 g KCl, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 8 g NaCl, 22 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, desztillált vízzel 1 literre kiegészítve, pH 7,4)	PBS	
izoniazid	INH	
gentamicin	GEN	
ciprofloxacín	CIPX	
nátrium-dodecil-szulfát	SDS	
propídium-jodid	PI	
FacsFlow folyadék	-	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
magzati borjú savó (foetal calf serum)	FCS	Gibco (Paisly, Anglia)

F6. táblázat: Eszközök

Elnevezés	Gyártó cég
25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² szövettenyészítő flaska	Sarstedt (Nümbrecht, Németország)
6, 24, 96 lyukú letapadó és szuszpenziós szövettenyészítő lemez	
1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml szerológiai pipetta	
10 ml, 50 ml centrifugacső	
5 ml áramlási citometriás cső	
Millex 0,22µm szűrő	Millipore (Cork, Írország)

F7. táblázat: Műszerek

Elnevezés	Gyártó cég
ESCO Labculture lamináris fülke (Class II) Esco	Esco (Hatboro, PA, USA)
áramlási citométer BD LSR II	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Multifuge 3 S-R centrifuga	Hereaeus (Hanau, Németország)
Hera Cell inkubátor	
Sedival fénymikroszkóp	Carl Zeiss (Jena, Németország)
Olympus CKX41 mikroszkóp	Olympus (Tokió, Japán)
ELISA Reader lemez leolvasó spektrofotométer	Labsystem (Helsinki, Finnország)

F8. táblázat: Az előállított tuftsinszarmazékok, az alkalmazott szintézismódszerek és a gyanták típusa

kód ^a	szekvencia	módszer	manuális / automata	gyanta			
Aoa-OT20	Aoa-TKPKG TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂	Fmoc/tBu	manuális	Rink-Amid MBHA			
Ac-OT20	Ac-TKPKG TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Cf-OT20	Cf-TKPKG TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Aoa-GFLG-OT20	Aoa-GFLG TKPKG TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Ac-GFLG-OT20	Ac-GFLG TKPKG TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Cf-GFLG-OT20	Cf-GFLG TKPKG TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Aoa-OT20(4-but)	Aoa-TKPK(but)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Ac-OT20(4-but)	Ac-TKPK(but)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Cf-OT20(4-but)	Cf-TKPK(but)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Aoa-OT20(4-dek)	Aoa-TKPK(dek)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Ac-OT20(4-dek)	Ac-TKPK(dek)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Cf-OT20(4-dek)	Cf-TKPK(dek)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Aoa-OT20(4-pal)	Aoa-TKPK(pal)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Ac-OT20(4-pal)	Ac-TKPK(pal)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Cf-OT20(4-pal)	Cf-TKPK(pal)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Aoa-OT20(14-pal)	Aoa-TKPKG TKPKG TKPK(pal)G TKPKG-NH ₂						
Ac-OT20(14-pal)	Ac-TKPKG TKPKG TKPK(pal)G TKPKG-NH ₂						
Cf-OT20(14-pal)	Cf-TKPKG TKPKG TKPK(pal)G TKPKG-NH ₂						
Aoa-OT20(4-Aoa)	Aoa-TKPK(Aoa)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Aoa-OT20(4-Cf)	Aoa-TKPK(Cf)G TKPKG TKPKG TKPKG-NH ₂						
Ac-OT20(14-Cf)	Ac-TKPKG TKPKG TKPK(Cf)G TKPKG-NH ₂						
Cf-OT20(14-Cf)	Cf-TKPKG TKPKG TKPK(Cf)G TKPKG-NH ₂						
Aoa-OT10	Aoa-TKPKG TKPKG-NH ₂				Boc/Bzl	automata	MBHA
Ac-OT10	Ac-TKPKG TKPKG-NH ₂						
Cf-OT10	Cf-TKPKG TKPKG-NH ₂						
Ac-OT10(9-but)	Ac-TKPKG TKPK(9-but)G-NH ₂						
Ac-OT10(9-dek)	Ac-TKPKG TKPK(9-dek)G-NH ₂						
Ac-OT10(9-pal)	Ac-TKPKG TKPK(9-pal)G-NH ₂						
TKPR-OT10(8-Aoa; 13-Aoa)	H-TKPR TKPK(Aoa)G TKPK(Aoa)G-NH ₂				Boc/Bzl	manuális	MBHA
TKPR-OT10	H-TKPR TKPKG TKPKG-NH ₂						
Cf-TKPR-OT10	Cf-TKPR TKPKG TKPKG-NH ₂						
Aoa-T5	Aoa-TKPKG-NH ₂				Fmoc/tBu	manuális	Rink-Amid MBHA
Ac-T5	Ac-TKPKG-NH ₂						
Cf-T5	Cf-TKPKG-NH ₂						
Aoa-GFLG-T5	Aoa-GFLG TKPKG-NH ₂						
Ac-GFLG-T5	Ac-GFLG TKPKG-NH ₂						
Cf-GFLG-T5	Cf-GFLG TKPKG-NH ₂						
Aoa-T5(4-dek)	Aoa-TKPK(dek)G-NH ₂						
Ac-T5(4-dek)	Ac-TKPK(dek)G-NH ₂						
Cf-T5(4-dek)	Cf-TKPK(dek)G-NH ₂						
Aoa-T5(4-pal)	Aoa-TKPK(pal)G-NH ₂						
Ac-T5(4-pal)	Ac-TKPK(pal)G-NH ₂						
Cf-T5(4-pal)	Cf-TKPK(pal)G-NH ₂						
Aoa-T5-OH	Aoa-TKPKG-OH						
Ac-T5-OH	Ac-TKPKG-OH						
Cf-T5-OH	Cf-TKPKG-OH						
Aoa-GFLG-T5-OH	Aoa-GFLG TKPKG-OH						
Ac-GFLG-T5-OH	Ac-GFLG TKPKG-OH						
Cf-GFLG-T5-OH	Cf-GFLG TKPKG-OH						
Aoa-TKPR-OH	Aoa-TKPR-OH	manuális, automata	Wang				
Ac-TKPR-OH	Ac-TKPR-OH						
Cf-TKPR-OH	Cf-TKPR-OH						
Aoa-GFLG-TKPR-OH	Aoa-GFLG-TKPR-OH						
Ac-GFLG-TKPR-OH	Ac-GFLG-TKPR-OH						
Cf-GFLG-TKPR-OH	Cf-GFLG-TKPR-OH						
Aoa-TKPPR-OH	Aoa-TKPPR-OH						
Ac-TKPPR-OH	Ac-TKPPR-OH						
Cf-TKPPR-OH	Cf-TKPPR-OH						
Aoa-GFLG-TKPPR-OH	Aoa-GFLG-TKPPR-OH						
Ac-GFLG-TKPPR-OH	Ac-GFLG-TKPPR-OH						
Cf-GFLG-TKPPR-OH	Cf-GFLG-TKPPR-OH						

^a Az amid C-terminálisú peptidek kódjában nem jelöltem az amid formát. A karboxil C-terminálisú peptidek kódjában '-OH'-val jelöltem a karboxil formát. Aoa = aminooxiacetil, Ac = acetil, Cf = 5(6)-carboxifluoreszcein.

F5.1. Egér csontvelői sejtek preparálása és differenciálása

Az egér csontvelői makrofágok (BMM Φ) preparálását Dr. Bősze Szilvia és Dr. Szabó Rita (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) végezte. Az engedély száma: XIV-I-001/2149-4/2012.

A 11 hetes Balb/c nőtény egerekből származó femur (combcsont) és tibia (sípcsont) csontokat 70%-os etanolban sterilizálták (0,5 perc), majd steril PBS pufferbe (pH 7,4) tették. A csontvégek levágása után a csontvelőt 27G-s tűvel átmosták (steril PBS), majd centrifugálás után (1000 rpm, 5 perc) a sejteket 5 ml R10/M-CSF fenolvörös nélküli médiumban vették fel. Az R10/M-CSF médium összetétele a következő volt: fenolvörös nélküli RPMI-1640; 10% FCS; 10 mM HEPES (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav); 0,16 μ mol/mL gentamicin; 2,5 μ g/mL rMu M-CSF (makrofág-kolóniasztimuláló faktor). A sejteket ezután 19G-s tű segítségével homogenizálták, majd steril Petri-csészékbe osztották. A sejteken 3 naponta cserélték a médiumot úgy, hogy a nemletapadó sejteket óvatosan a médiummal együtt eltávolították. A makrofág kolóniasztimuláló faktor (M-CSF) hatására a sejtek differenciálódtak, ami a mikroszkópos felvételeken látható. Két hét elteltével a differenciálódott sejteket szövettenyésztő lemezekre osztották és citotoxicitási és sejtbejutási vizsgálatokhoz.

Irodalomjegyzék

- [1] Nyitrai, J., Nagy, J., Útmutató a szerves vegyületek IUPAC-nevezéktanához (A IUPAC Szerves Kémiai Nomenklatura bizottságának 1993-as ajánlása alapján), Budapest, *Magyar Kémikusok Egyesülete*, 1998
- [2] Jones, J. H., A short guide to abbreviations and their use in peptide science, *J. Pept. Sci.*, 1999, 5, 465-471.
- [3] WHO Global tuberculosis report 2016, http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (2017.01.28.)
- [4] Nessar, R., Cambau, E., Reytrat, J. M., Murray, A., Gicquel, B., *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, 67, 810-818.
- [5] Lutsiak, M. E., Robinson, D. R., Coester, C., Kwon, G. S., Samuel, J., Analysis of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanosphere uptake by human dendritic cells and macrophages *in vitro*, *Pharm. Res.*, 2002, 19, 1480-1487.
- [6] Horváti, K., Mező, G., Szabó, N., Hudecz, F., Bősze, Sz., Peptide conjugates of therapeutically used antitubercular isoniazid – design, synthesis and antimycobacterial effect, *J. Pept. Sci.*, 2009, 15, 385-391.
- [7] Horváti, K., Bacsa, B., Szabó, N., Dávid, S., Mező, G., Grolmusz, V., Vértessy, B., Hudecz, F., Bősze, Sz., Enhanced cellular uptake of a new, *in silico* identified antitubercular candidate by peptide conjugation, *Bioconjug. Chem.*, 2012, 23, 900-907.
- [8] Koch, R., Die Aetiologie der Tuberculose, *Berliner Klinischen Wochenschrift*, 1882, 19, 221-230.
- [9] Ádám, É., Tóth, F. D., Emődy, L., Gergely, L., Gönczöl, É., Nagy, E., Pál, T., Pusztai, R., Rozgonyi, F., Szabó, B., Orvosi mikrobiológia, Alliter Kiadói és Oktatásfejlesztői Alapítvány, 2003
- [10] Horváth I., A pulmonológiai hálózat 2015. évi epidemiológiai adatai, TBC, *Korányi Bulletin*, 2016, 1, 5-16.
- [11] Tüdőgyógyászati Szakmai Kollégium, Tuberkulózis diagnosztikus és terápiás protokoll, Budapest, 2009
- [12] Dorman, S. E., New diagnostic tests for tuberculosis: bench, bedside, and beyond, *Clin. Infect. Dis.*, 2010, 50, S173-S177.
- [13] Butler, W. R., Guthertz, L. S., Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of mycobacterium species, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, 14, 704-726.
- [14] Brennan, P. J., Nikaido, H., The envelope of mycobacteria, *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64, 29-63.
- [15] Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C., The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis, *Rev. Sci. Tech.*, 2001, 20, 21-54.
- [16] Medjahed, H., Gaillard, J-L., Reytrat, J-M., *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field, *Trends Microbiol.*, 2010, 18, 117-123.
- [17] Gokhale, R. S., Saxena, P., Chopra, T., Mohanty, D., Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids, *Nat. Prod. Rep.*, 2007, 24, 267-277.
- [18] Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A., Netea, M. G., van Crevel, R., Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin. Dev. Immunol.*, 2011, Article ID 405310.
- [19] Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E. 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B. G., Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature*, 1998, 393, 537-544.
- [20] Camus, J. C., Pryor, M. J., Medigue, C., Cole, S. T., Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, *Microbiology*, 2002, 148, 2967- 2973.
- [21] Lew, J. M., Kapopoulou, A., Jones, L. M., Cole, S. T., TubercuList – 10 years after, *Tuberculosis (Edinb)*, 2011, 91, 1-7., <http://tuberculist.epfl.ch/> (2017.01.28.)

-
- [22] Sia, J. K., Georgieva, M., Rengarajan, J., Innate immune defenses in human tuberculosis: an overview of the interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and innate immune cells, *J. Immunol. Res.*, 2015, Article ID 747543.
- [23] Ernst, J. D., Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect. Immun.*, 1998, 66, 1277-1281.
- [24] van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., van der Meer, J. W., Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, 15, 294-309.
- [25] Cambier, C. J., Falkow, S., Ramakrishnan, L., Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*, *Cell*, 2014, 159, 1497-509.
- [26] Wayne, L. G., Hayes, L. G., An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence, *Infect. Immun.*, 1996, 64, 2062-2069.
- [27] Voskuil, M. I., Schnappinger, D., Visconti, K. C., Harrell, M. I., Dolganov, G. M., Sherman, D. R., Schoolnik, G. K., Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program, *J. Exp. Med.*, 2003, 198, 705-713.
- [28] Boon, C., Dick, T., How *Mycobacterium tuberculosis* goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later, *Future Microbiol.*, 2012, 7, 513-518.
- [29] Co, D. O., Hogan, L. H., Kim, S. I., Sándor, M., Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship, *Clin. Immunol.*, 2004, 113, 130-136.
- [30] Nunes-Alves, C., Booty, M. G., Carpenter, S. M., Jayaraman, P., Rothchild, A. C., Behar, S. M., In search of a new paradigm for protective immunity to TB, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, 12, 289-299.
- [31] Yuk, J-M., Jo, E-K., Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis, *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 2014, 3, 155-167.
- [32] Moore, M., Frerichs, J. B., An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp., *J. Invest. Dermatol.*, 1953, 20, 133-169.
- [33] Petrini, B., *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen, *APMIS*, 2006, 114, 319-328.
- [34] Maurer, F. P., Bruderer, V. L., Ritter, C., Castelberg, C., Bloemberg G. V., Böttger, E. C., Lack of antimicrobial bactericidal activity in *Mycobacterium abscessus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, 58, 3828-3836.
- [35] Lee, M-R., Sheng, W-H., Hung, C-C., Yu, C-J., Lee, L-N., Hsueh, P-R., *Mycobacterium abscessus* Complex infections in humans, *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, 21, 1638-1646.
- [36] Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M. F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., von Reyn, C. F., Wallace, R. J. Jr, Winthrop, K., An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2007, 175, 367-416.
- [37] Janin, Y. L., Antituberculosis drugs: Ten years of research, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 2479-2513.
- [38] Egerszegi, S., A tuberculosis kezelésének aktuális problémái, *Magyar Infektológiai Társaság tudományos és továbbképző folyóirata*, 1995, 2, 20-26.
- [39] Zhang, Y., The magic bullets and tuberculosis drug targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005, 45, 529-564.
- [40] Dartois, V., The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, 12, 159-167.
- [41] Arbex, M. A., Varella M. C., Siqueira, H. R., Mello, F. A., Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs, *J. Bras. Pneumol.*, 2010, 36, 626-640.
- [42] Gillespie, S. H., Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 267-274.

-
- [43] Nikaido, H., Multidrug resistance in bacteria, *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, 78, 119-146.
- [44] Schmalstieg, A. M., Srivastava, S., Belkaya, S., Deshpande, D., Meek, C., Leff, R., van Oers, N. S., Gumbo, T., The antibiotic resistance arrow of time: efflux pump induction is a general first step in the evolution of mycobacterial drug resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, 56, 4806-4815.
- [45] Pauk, K., Zdražilová, I., Imramovský, A., Vinšová, J., Pokorná, M., Masaříková, M., Cížek, A., Jampílek, J., New derivatives of salicylamides: preparation and antimicrobial activity against various bacterial species, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21, 6574-6581.
- [46] Vinšová, J., Kozic, J., Krátký, M., Stolaříková, J., Mandíková, J., Trejtnar, F., Buchta, V., Salicylanilide diethyl phosphates: synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, 22, 728-737.
- [47] Liu, Y., Donner, P. L., Pratt, J. K., Jiang, W. W., Ng, T., Gracias, V., Baumeister, S., Wiedeman, P. E., Traphagen, L., Warrior, U., Maring, C., Kati, W. M., Djuric, S. W., Molla, A., Identification of halosalicylamide derivatives as a novel class of allosteric inhibitors of HCV NS5B polymerase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, 18, 3173-3177.
- [48] Rajamuthiah, R., Fuchs, B. B., Conery, A. L., Kim, W., Jayamani, E., Kwon, B., Ausubel, F. M., Mylonakis, E., Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*, *PLoS One*, 2015, 10, e0124595.
- [49] Vinšová, J., Imramovský, A., Salicylanilides: still a potential antibacterially active group, *Ceska. Slov. Farm.*, 2004, 53, 294-299.
- [50] Zdražilová, I., Pospisilová, S., Masaříková, M., Imramovský, A., Ferriz J. M., Vinšová, J., Cížek, A., Jampílek, J., Salicylanilide carbamates: Promising antibacterial agents with high *in vitro* activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2015, 77, 197-207.
- [51] Waisser, K., Bures, O., Holy, P., Kunes, J., Oswald, R., Jirasková, L., Pour, M., Klimesová, V., Kubicová, L., Kaustová, J., Relationship between the structure and antimycobacterial activity of substituted salicylanilides, *Arch. Pharm.*, 2003, 336, 53-71.
- [52] Krátký, M., Vinšová, J., Buchta, V., Horváti, K., Bősze, Sz., Stolaříková, J. M., New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, 45, 6106-6113.
- [53] Krátký, M., Bősze, Sz., Baranyai, Zs., Szabó, I., Stolaříková, J., Paraskevopoulos, G., Vinšová, J., Synthesis and *in vitro* biological evaluation of 2-(phenylcarbamoyl)phenyl 4-substituted benzoates, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23, 868-875.
- [54] Brown, M. E., Fitzner, J.N., Stevens, T., Chin, W., Wright, C.D., Boyce, J.P., Salicylanilides: selective inhibitors of interleukin-12p40 production, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 8760-8764.
- [55] Boyce, J. P., Brown, M. E., Chin, W., Fitzner, J. N., Paxton, R. J., Shen, M., Stevens, T., Wolfson, M. F., Wright, C. D., Identification of 14-3-3zeta by chemical affinity with salicylanilide inhibitors of interleukin-12p40 production, *Bioconjug. Chem.*, 2008, 19, 1775-1784.
- [56] Lee, I. Y., Gruber, T. D., Samuels, A., Yun, M., Nam, B., Kang, M., Crowley, K., Winterroth, B., Boshoff, H. I., Barry, C. E., Structure-activity relationships of antitubercular salicylanilides consistent with disruption of the proton gradient via proton shuttling, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, 21, 114-126.
- [57] Hlasta, D. J., Demers, J. P., Foleno, B. D., Fraga-Spano, S. A., Guan, J., Hilliard, J. J., Macielag, M. J., Ohemeng, K. A., Sheppard, C. M., Sui, Z., Webb, G. C., Weidner-Wells, M. A., Werblood, H., Barrett, J. F., Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: pharmacophore identification based on the screening hit closantel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 1923-1928.
- [58] Dasgupta, N., Kapur, V., Singh, K. K., Das, T. K., Sachdeva, S., Jyothisri, K., Tyagi, J. S., Characterization of a two-component system, devR-devS, of *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuber. Lung. Dis.*, 2000, 80, 141-159.
- [59] Macielag, M. J., Demers, J. P., Fraga-Spano, S. A., Hlasta, D. J., Johnson, S. G., Kanojia, R. M., Russell, R. K., Sui, Z., Weidner-Wells, M. A., Werblood, H., Foleno, B. D., Goldschmidt, R. M., Loeloff, M. J., Webb, G. C., Barrett, J. F., Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria, *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 2939-2945.

-
- [60] Cheng, T. J., Wu, Y. T., Yang, S. T., Lo, K. H., Chen, S. K., Chen, Y. H., Huang, W. I., Yuan, C. H., Guo, C. W., Huang, L. Y., Chen, K. T., Shih, H. W., Cheng, Y. S., Cheng, W. C., Wong, C. H., High-throughput identification of antibacterials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the transglycosylase, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18, 8512-8529.
- [61] Triola, G., Wetzel, S., Ellinger, B., Koch, M. A., Hubel, K., Rauh, D., Waldmann, H., ATP competitive inhibitors of D-alanine-D-alanine ligase based on protein kinase inhibitor scaffolds, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17, 1079-1087.
- [62] Chenna, B. C., Shinkre, B. A., King, J. R., Lucius, A. L., Narayana, S. V., Velu, S. E., Identification of novel inhibitors of bacterial surface enzyme *Staphylococcus aureus* Sortase A, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, 18, 380-385.
- [63] Krátký, M., Vinšová, J., Novotná, E., Stolaříková, J., Salicylanilide pyrazinoates inhibit *in vitro* multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, atypical mycobacteria and isocitrate lyase, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2014, 53, 1-9.
- [64] Krátký, M., Volková, M., Novotná, E., Trejtnar, F., Stolaříková, J., Vinšová, J., Synthesis and biological activity of new salicylanilide N,N-disubstituted carbamates and thiocarbamates, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, 22, 4073-4082.
- [65] Krátký, M., Vinšová, J., Advances in Mycobacterial isocitrate lyase targeting and inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19, 6126-6137.
- [66] Krátký, M., Novotná, E., Saxena, S., Yogeewari, P., Sriram, D., Švarcová, M., Vinšová, J., Salicylanilide diethyl phosphates as potential inhibitors of some mycobacterial enzymes, *Sci. World J.*, 2014, article ID 703053.
- [67] Krátký, M., Vinšová, J., Novotná, E., Mandíková, J., Wsól, V., Trejtnar, F., Ulmann, V., Stolaříková, J., Fernandes, S., Bhat, S., Liu, J. O., Salicylanilide derivatives block *Mycobacterium tuberculosis* through inhibition of isocitrate lyase and methionine aminopeptidase, *Tuberculosis (Edinb)*, 2012, 92, 434-439.
- [68] Terada, H., Goto, S., Yamamoto, K., Takeuchi, I., Hamada, Y., Miyake, K. H., Structural requirements of salicylanilides for uncoupling activity in mitochondria: quantitative analysis of structure-uncoupling relationships, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1988, 936, 504-512.
- [69] Krátký, M., Vinšová, J., Salicylanilide ester prodrugs as potential antimicrobial agents – a review, *Curr. Pharm. Des.*, 2011, 17, 3494-3505.
- [70] Thorberg, S. O., Berg, S., Lundström, J., Pettersson, B., Wijkström, A., Sanchez, D., Lindberg, P., Nilsson, J. L., Carbamate ester derivatives as potential prodrugs of the presynaptic dopamine autoreceptor agonist (-)-3-(3-hydroxyphenyl)-N-propylpiperidine, *J. Med. Chem.*, 1987, 30, 2008-2012.
- [71] Férriz, J. M., Vávrová, K., Kunc, F., Imramovský, A., Stolaříková, J., Vavříková, E., Vinšová, J., Salicylanilide carbamates: antitubercular agents active against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18, 1054-1061.
- [72] Zhang, Y., Mitchison, D., The curious characteristics of pyrazinamide: a review, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2003, 7, 6-21.
- [73] Tarshis, M. S., Weed, W. A., Lack of significant *in vitro* sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide on 3 different solid media, *Am. Rev. Tuberc.*, 1953, 67, 391-395.
- [74] Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H., Sun, Z., Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, *J. Bacteriol.*, 1999, 181, 2044-2049.
- [75] Scorpio, A., Zhang, Y., Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus, *Nat. Med.*, 1996, 2, 662-667.
- [76] Zimhony, O., Vilcheze, C., Arai, M., Welch, J. T., Jacobs, W. R., Pyrazinoic acid and its N-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 752-754.

-
- [77] Zhang, Y., Wade, M. M., Scorpio, A., Zhang, H., Sun, Z., Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003, 52, 790-795.
- [78] Lu, P., Haagsma, A. C., Pham, H., Maaskant, J. J., Mol, S., Lill, H., Bald, D., Pyrazinoic acid decreases the proton motive force, respiratory ATP synthesis activity, and cellular ATP levels, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 5354-5357.
- [79] Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry, C. E., Wang, H., Zhang, W., Zhang, Y., Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, 2011, 1630-1632.
- [80] Dolezal, M., Vicik, R., Miletin, M., Kralova, K., Synthesis and antimycobacterial, antifungal, and photosynthesis-inhibiting evaluation of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids, *Chem. Pap.*, 2000, 54, 245-248.
- [81] Dolezal, M., Cmedlova, P., Palek, L., Vinšová, J., Kunes, J., Buchta, V., Jampilek, J., Kralova, K., Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides, *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, 43, 1105-1113.
- [82] Dolezal, M., Jampílek, J., Osicka, Z., Kunes, J., Buchta, V., Víchová, P., Substituted 5-arylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives: synthesis and biological activity, *Il Farmaco*, 2003, 58, 1105-1111.
- [83] Cynamon, M. H., Gimi, R., Gyenes, F., Sharpe, C. A., Bergmann, K. E., Han, H. J., Gregor, L. B., Rapolu, R., Luciano, G., Welch, J. T., Pyrazinoic acid-esters with broad-spectrum in vitro antimycobacterial activity, *J. Med. Chem.*, 1995, 38, 3902-3907.
- [84] Cynamon, M. H., Speirs, R. J., Welch, J.T., *In vitro* antimycobacterial activity of 5-chloropyrazinamide, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, 42, 462-463.
- [85] Ngo, S. C., Zimhony, O., Chung, W. J., Sayahi, H., Jacobs, W. R., Welch, J. T., Inhibition of isolated *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 2430-2435.
- [86] De Logu, A., Onnis, V., Saddi, B., Congiu, C., Schivo, M. L., Cocco, M. T., Activity of a new class of isonicotinoylhydrazones used alone and in combination with isoniazid, rifampicin, ethambutol, para-aminosalicylic acid and clofazimine against *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, 49, 275-282.
- [87] Imramovský, A., Polanc, S., Vinšová, J., Kocevar, M., Jampilek, J., Reckova, Z., Kaustova, J., A new modification of anti-tubercular active molecules, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 2551-2559.,
- [88] Vinšová, J., Imramovský, A., Jampilek, J., Monreal, J. F., Dolezal, M., Recent advances on isoniazide derivatives, *Antiinfect. Agents Med. Chem.*, 2008, 7, 12-31.
- [89] Lehár, J., Krueger, A. S., Avery, W., Heilbut, A. M., Johansen, L. M., Price, E. R., Rickles, R. J., Short, G. F., Staunton, J. E., Jin, X., Lee, M. S., Zimmermann, G. R., Borisy, A. A., Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity, *Nat. Biotechnol.*, 2009, 27, 659-666.
- [90] Irwin, J. J., Shoichet, B. K., ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening, *J. Chem. Inf. Model.*, 2005, 45, 177-182.
- [91] Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S., Coleman, R. G., ZINC: a free tool to discover chemistry for biology, *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, 52, 1757-1768.
- [92] Sterling, T., Irwin, J. J., ZINC 15 – Ligand discovery for everyone, *J. Chem. Inf. Model.*, 2015, 55, 2324-2337.
- [93] Scheich, C., Szabadka, Z., Vértessy, B., Pütter, V., Grolmusz, V., Schade, M., Discovery of novel MDR-*Mycobacterium tuberculosis* inhibitor by new FRIGATE computational screen, *PLoS One*, 2011, 6, e28428.
- [94] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2001, 46, 3-26.

-
- [95] Sassetti, C. M., Boyd, D. H., Rubin, E. J., Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis, *Mol. Microbiol.*, 2003, 48, 77-84.
- [96] Varga, B., Barabás, O., Takács, E., Nagy, N., Nagy, P., Vértessy, B., Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, 373, 8-13.
- [97] Vértessy, B., Tóth, J., Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases, *Acc. Chem. Res.*, 2009, 42, 97-106.
- [98] Varga, B., Barabás, O., Kovári, J., Tóth, J., Hunyadi-Gulyás, E., Klement, E., Medzihradzky, K. F., Tölgyesi, F., Fidy, J., Vértessy, B., Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase, *FEBS Lett.*, 2007, 581, 4783-4788.
- [99] Takács, E., Nagy, G., Leveles, I., Harmat, V., Lopata, A., Tóth, J., Vértessy, B., Direct contacts between conserved motifs of different subunits provide major contribution to active site organization in human and mycobacterial dUTPases, *FEBS Lett.*, 2010, 584, 3047-3054.
- [100] Horváti, K., Bacsá, B., Szabó, N., Fodor, K., Balka, G., Rusvai, M., Kiss, É., Mező, G., Grolmusz, V., Vértessy, B., Hudecz, F., Bősze, Sz., Antimycobacterial activity of peptide conjugate of pyridopyrimidine derivative against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of *in vitro* and *in vivo* models, *Tuberculosis (Edinb)*, 2015, 95, S207-S211.
- [101] Horváti, K., *Mycobacterium tuberculosis* immundomináns fehérjéiből származtatható mesterséges peptidantigének, valamint antituberkulotikum konjugátumok szintézise és *in vitro* aktivitásuk vizsgálata, Doktori Értekezés, ELTE, Kémia Doktori Iskola, Budapest, 2009
- [102] Ábrahám, Á., Baranyai, Zs., Gyulai, G., Pári, E., Horváti, K., Bősze, Sz., Kiss, É., Comparative analysis of new peptide conjugates of antitubercular drug candidates – model membrane and *in vitro* studies, *Colloid. Surface. B.*, 2016, 147, 106-115.
- [103] Camenisch, G., Folkers, G., van de Waterbeemd, H., Review of theoretical passive drug absorption models: Historical background, recent developments and limitations, *Pharm. Acta Helv.*, 1996, 71, 309-327.
- [104] Majumdar, S., Siahaan, T. J., Peptide-mediated targeted drug delivery, *Med. Res. Rev.*, 2012, 32, 637-658.
- [105] Mező, G., Manea, M., Jakab, A., Kapuvári, B., Bősze, Sz., Schlosser, G., Przybylski, M., Hudecz, F., Synthesis and structural characterization of bioactive peptide conjugates using thioether linkage approaches, *J. Pept. Sci.*, 2004, 10, 701-713.
- [106] Mindell, J. A., Lysosomal acidification mechanisms, *Annu. Rev. Physiol.*, 2012, 74, 69-86.
- [107] Barrett, A. J., Heath, M. F., Lysosomal enzymes, In: J.T. Dingle (Ed.). *Lysosomes: a laboratory handbook*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1972, 19-145.
- [108] Szabó, R., Peiser, L., Pluddemann, A., Bősze, Sz., Heinsbroek, S., Gordon, S., Hudecz, F., Uptake of branched polypeptides with poly[L-lys] backbone by bone-marrow culture derived murine macrophages: the role of the class A scavenger receptor, *Bioconjug. Chem.*, 2005, 16, 1442-1450.
- [109] Kóczán, Gy., Ghose, A. C., Mookerjee, A., Hudecz, F., Methotrexate conjugate with branched polypeptide influences *Leishmania donovani* infection *in vitro* and in experimental animals, *Bioconjug Chem.*, 2002, 13, 518-524.
- [110] Majumdar, S., Basu, S. K., Killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by receptor-mediated drug delivery, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, 35, 135-40.
- [111] Majumdar, S., Basu, S. K., Receptor-mediated delivery of p-aminosalicylic acid to maleylated serum albumin against *Mycobacterium tuberculosis* infection in guinea pigs, *Drug Deliv.*, 1995, 2, 144-149.
- [112] Vavríková, E., Mandíková, J., Trejtnar, F., Horváti, K., Bősze, Sz., Stolaríková, J., Vinšová, J., Cytotoxicity decreasing effect and antimycobacterial activity of chitosan conjugated with antituberculous drugs, *Carbohydr. Polym.*, 2011, 83, 1901-1907.
- [113] Amoscato, A. A., Davies, P. J., Babcock, G. F., Nishioka, K., Receptor-mediated internalization of tuftsin, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1983, 419, 114-134.

-
- [114] Gottlieb, P., Hazum, E., Tzeheval, E., Feldman, M., Segal, S., Fridkin, M., Receptor-mediated endocytosis of tuftsin by macrophage cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 119, 203-211.
- [115] Agrawal, A. K., Gupta, C. M., Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2000, 41, 135-146.
- [116] Barshavit, Z., Goldman, R., Stabinsky, Y., Fridkin, M., Tuftsin-macrophage interaction - specific binding and augmentation of phagocytosis, *J. Cell. Physiol.*, 1979, 100, 55-62.
- [117] Gottlieb, P., Stabinsky, Y., Hiller, Y., Beretz, A., Hazum, E., Tzeheval, E., Feldman, M., Segal, S., Zakuth, V., Spierer, Z., Fridkin, M., Tuftsin receptors, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1983, 419, 93-106.
- [118] Najjar, V. A., Nishioka, K., "Tuftsin": a natural phagocytosis stimulating peptide, *Nature*, 1970, 228, 672-673.
- [119] Bump, N. J., Lee, J., Wleklík, M., Reichler, J., Najjar, V. A., Isolation and subunit composition of tuftsin receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 7187-7191.
- [120] von Wronski, M. A., Raju, N., Pillai, R., Bogdan, N. J., Marinelli, E. R., Nanjappan, P., Ramalingam, K., Arunachalam, T., Eaton, S., Linder, K. E., Yan, F., Pochon, S., Tweedle, M. F., Nunn, A. D., Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor, *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 5702-5710.
- [121] Nissen, J. C., Selwood, D. L., Tsirka, S. E., Tuftsin signals through its receptor neuropilin-1 via the transforming growth factor beta pathway, *J. Neurochem.*, 2013, 127, 394-402.
- [122] Fridkin, M., Najjar, V. A., Tuftsin: its chemistry, biology, and clinical potential, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1989, 24, 1-40.
- [123] Nishioka, K., McMurray, J., Al Obeidi, F., Pettitt, B. M., Tuftsin and tuftsin analogs: Biology, synthesis and design theory, *Curr. Med. Chem.*, 1996, 3, 153-166.
- [124] Siemion, I. Z., Kluczyk, A., Tuftsin: On the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery, *Peptides*, 1999, 20, 645-674.
- [125] Babcock, G., Amoscato, A., Nishioka, K., Effect of tuftsin on the migration, chemotaxis, and differentiation of macrophages and granulocytes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1983, 419, 64-74.
- [126] Najjar, V. A., Biochemical aspects of tuftsin deficiency syndrome, *Med. Biol.*, 1981, 59, 134-138.
- [127] Najjar, V. A., Tuftsin, a natural activator of phagocyte cells: an overview, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1983, 419, 1-11.
- [128] Wagle, J. R., Ansevin, A. T., Dessens, S. E., Nishioka, K., Specific translocation of tuftsin (Thr-Lys-Pro-Arg), a natural immunomodulating peptide, into the nuclei of human monocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 159, 1147-1153.
- [129] Nishioka, K., Wagle, J. R., Minter, A. M., Rodriguez, T., Dessens, S. E., Tuftsin-enhanced thymidine incorporation by murine splenic monocytes, *Int. J. Immunopharmac.*, 1990, 12, 905-908.
- [130] Mező, G., Kalászi, A., Reményi, J., Mihala, N., Majer, Zs., Hilbert, Á., Láng, O., Kőhidai, L., Barna, K., Gaál, D., Synthesis of new carrier molecules based on repeated tuftsin sequences, *Peptides*, 2000, 253-254.
- [131] Mező, G., Kalászi, A., Reményi, J., Majer, Zs., Hilbert, Á., Láng, O., Kőhidai, L., Barna, K., Gaál, D., Hudecz, F., Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence, *Biopolymers*, 2004, 73, 645-656.
- [132] Mező, G., Láng, O., Jakab, A., Bai, K. B., Szabó, I., Schlosser, G., Láng, J., Kőhidai, L., Hudecz, F., Synthesis of oligotuftsin-based branched oligopeptide conjugates for chemotactic drug targeting, *J. Pept. Sci.*, 2006, 12, 328-336.
- [133] Bai, K. B., Láng, O., Orbán, E., Szabó, R., Kőhidai, L., Hudecz, F., Mező, G., Design, synthesis, and *in vitro* activity of novel drug delivery systems containing tuftsin derivatives and methotrexate, *Bioconjug. Chem.*, 2008, 19, 2260-2269.

-
- [134] Tzeheval, E., Segal, S., Stabinsky, Y., Fridkin, M., Spierer, Z., Feldman, M., Tuftsin (an Ig-associated tetrapeptide) triggers the immunogenic function of macrophages: Implications for activation of programmed cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 3400-3404.
- [135] Dutta, T., Garg, M., Jain, N. K., Targeting of efavirenz loaded tuftsin conjugated poly(propyleneimine) dendrimers to HIV infected macrophages *in vitro*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2008, 34, 181-189.
- [136] Gupta, C. M., Haq, W., Tuftsin-bearing liposomes as antibiotic carriers in treatment of macrophage infections, *Methods Enzymol.*, 2005, 391, 291-304.
- [137] Péntzes, Cs. B., Schnöller, D., Horváti, K., Bősze, Sz., Mező, G., Kiss, É., Membrane affinity of antituberculous drug conjugate using lipid monolayer containing mycolic acid, *Colloid. Surface. A*, 2012, 413, 142-148.
- [138] Kiss, É., Schnöller, D., Pribranská, K., Hill, K., Péntzes, Cs. B., Horváti, K., Bősze, Sz., Nanoencapsulation of antitubercular drug isoniazid and its lipopeptide conjugate, *J. Dispers. Sci. Technol.*, 2011, 32, 1728-1734.
- [139] Malina, A., Shai, Y., Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide, *Biochem. J.*, 2005, 390, 695-702.
- [140] Rabanal, F., Grau-Campistany, A., Vila-Farrés, X., Gonzalez-Linares, J., Borràs, M., Vila, J., Manresa, A., Cajal, Y. A bioinspired peptide scaffold with high antibiotic activity and low *in vivo* toxicity, *Sci. Rep.*, 2015, 5, Article number: 10558.
- [141] Allen, N. E., Hobbs, J. N., Alborn, W. E., Inhibition of peptidoglycan biosynthesis in gram-positive bacteria by LY146032, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, 31, 1093-1099.
- [142] Tally, F. P., DeBruin, M. F., Development of daptomycin for gram-positive infections, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000, 46, 523-526.
- [143] Okuyama, H., Kankura, T., Nojima, S., Positional distribution of fatty acids in phospholipids from mycobacteria, *J. Biochem.*, 1967, 61, 732-737.
- [144] Nigou, J., Gilleron, M., Puzo, G., Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis, *Biochimie*, 2003, 85, 153-166.
- [145] Horváti, K., Bacsa, B., Kiss, É., Gyulai, G., Fodor, K., Balka, G., Rusvai, M., Szabó, E., Hudecz, F., Bősze, Sz., Nanoparticle encapsulated lipopeptide conjugate of antitubercular drug isoniazid: *in vitro* intracellular activity and *in vivo* efficacy in a Guinea pig model of tuberculosis, *Bioconjug. Chem.*, 2014, 25, 2260-2268.
- [146] Soyez, H., Schacht, E., Vanderkerken, S., The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, 1996, 21, 81-106.
- [147] Mező, G., Szabó, I., Kertész, I., Hegedüs, R., Orbán, E., Leurs, U., Bősze, Sz., Halmos, G., Manea, M., Efficient synthesis of an (aminoxy)acetylated-somatostatin derivative using (aminoxy)acetic acid as a 'carbonyl capture' reagent, *J. Pept. Sci.*, 2011, 17, 39-46.
- [148] Shao, J., Tam, J. P., Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 3893-3899.
- [149] Rose, K., Zeng, W., Regamey, P. O., Chernushevich, I. V., Standing, K. G., Gaertner, H. F., Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkages, *Bioconjug. Chem.*, 1996, 7, 552-556.
- [150] Decostaire, I. P., Lelièvre, D., Zhang, H., Delmas, A. F., Controlling the outcome of overacylation of N-protected aminoxyacetic acid during the synthesis of an aminoxy-peptide for chemical ligation, *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, 7057-7060.
- [151] Duléry, V., Renaudet, O., Dumy, P., Ethoxyethylidene protecting group prevents N-overacylation in aminoxy peptide synthesis, *Tetrahedron*, 2007, 63, 11952-11958.
- [152] Canne, L. E., Ferré-D'Amaré, A. R., Burley, S. K., Kent, S. B. H., Total chemical synthesis of a unique transcription factor-related protein: cMyc-Max, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 2998-3007.

-
- [153] Orbán E, Mező, G., Schlage, P., Csík, G., Kulić, Z., Ansorge, P., Fellingner, E., Möller, H. M., Manea, M., *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.*, 2011, 41, 469-483.
- [154] Manea, M., Leurs, U., Orbán, E., Baranyai, Zs., Öhlschläger, P., Marquardt, A., Schulcz, Á., Tejada, M., Kapuvári, B., Tóvári, J., Mező, G., Enhanced enzymatic stability and antitumor activity of daunorubicin-GnRH-III bioconjugates modified in position 4, *Bioconjug. Chem.*, 2011, 22, 1320-1329.
- [155] Kopecek, J., Rejmanova, P., Strohalm, J., Ulrich, K., Rihova, B., Chytrý, V., Lloyd, J. B., Duncan, R., Synthetic polymeric drugs, 1991, US Patent 5,037,883
- [156] Kopecek, J., Kopecková, P., Minko, T., Lu, Z., HPMa copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000, 50, 61-81.
- [157] Szabó, I., Manea, M., Orbán, E., Csámpai, A., Bősze, Sz., Szabó, R., Tejada, M., Gaál, D., Kapuvári, B., Przybylski, M., Hudecz, F., Mező, G., Development of an oxime bond containing daunorubicin-gonadotropin-releasing hormone-III conjugate as a potential anticancer drug, *Bioconjug. Chem.*, 2009, 20, 656-665.
- [158] Mohanraj, V. J., Chen, Y., Nanoparticles – A Review, *Trop. J. Pharm. Res.*, 2006, 5, 561-573.
- [159] Pinheiro, M., Lúcio, M., Lima, J. L., Reis, S., Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB, *Nanomedicine (Lond)*, 2011, 6, 1413-1428.
- [160] Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., Schué, F., Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), *Pure Appl. Chem.*, 2012, 84, 377-410.
- [161] Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., Préat, V., PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *J. Control. Release*, 2012, 161, 505-522.
- [162] Gyulai, G., Péntzes, Cs. B., Mohai, M., Lohner, T., Petrik, P., Kurunczi, S., Kiss, É., Interfacial properties of hydrophilized poly(lactic-co-glycolic acid) layers with various thicknesses, *J. Colloid Interf. Sci.*, 2011, 362, 600-606.
- [163] Batrakova, E. V., Kabanov, A. V., Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers, *J. Control. Release*, 2008, 130, 98-106.
- [164] Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., Benita, S., Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.*, 1989, 55, R1-R4.
- [165] Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., Nagai, T., Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1999, 25, 471-476.
- [166] Sharma, A., Pandey, R., Sharma, S., Khuller, G. K., Chemotherapeutic efficacy of poly (dl-lactide-co-glycolide) nanoparticle encapsulated antitubercular drugs at sub-therapeutic dose against experimental tuberculosis, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2004, 24, 599-604.
- [167] Edagwa, B. J., Guo, D., Puligujja, P., Chen, H., McMillan, J., Liu, X., Gendelman, H. E., Narayanasamy, P., Long-acting antituberculous therapeutic nanoparticles target macrophage endosomes, *FASEB J.*, 2014, 28, 5071-5082.
- [168] Kiss, É., Gyulai, G., Péntzes, Cs. B., Idei, M., Horváti, K., Bacsá, B., Bősze, Sz., Tuneable surface modification of PLGA nanoparticles carrying new antitubercular drug candidate, *Colloid. Surface. A*, 2014, 458, 178-186.
- [169] Merrifield, R., Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, 2149-2154.
- [170] Barany, G., Kneib-Cordonier, N., Mullen, D. G., Solid-phase peptide synthesis: a silver anniversary report, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1987, 30, 705-739.
- [171] Grant, A. G., Principles and practice of solid-phase peptide synthesis, *Synthetic peptides – A User's Guide*, Oxford University Press, 1992, 88-96.
- [172] Carpino, L. A., Han, G. Y., The fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *J. Org. Chem.*, 1972, 37, 3404-3409.

-
- [173] König, W., Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen, *Chem. Ber.*, 1970, 103, 788-798.
- [174] Mojsov, S., Mitchell, A. R., Merrifield, R. B., A quantitative evaluation of methods for coupling asparagine, *J. Org. Chem.*, 1980, 45, 555-560.
- [175] Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase peptide synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, 1970, 34, 595-598.
- [176] Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Olser, D. B., Color test for terminal prolyl residues in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Chim. Acta*, 1980, 118, 149-151.
- [177] Mansour, H., Wang, D-S., Chen, C-S., Zografi, G., Comparison of bilayer and monolayer properties of phospholipid systems containing dipalmitoylphosphatidylglycerol and dipalmitoylphosphatidylinositol, *Langmuir*, 2001, 17, 6622-6632.
- [178] Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, 1917, 39, 1848-1906.
- [179] Maget-Dana, R., The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1462, 109-140.
- [180] Keszthelyi, T., Hill, K., Kiss, É., Interaction of phospholipid Langmuir monolayers with an antibiotic peptide conjugate, *J. Phys. Chem. B*, 2013, 117, 6969-6979.
- [181] Stefaniu, C., Brezesinski, G., Möhwald, H., Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2014, 208, 197-213.
- [182] Richter, R.P., Berat, R., Brisson, A. R., Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view, *Langmuir*, 2006, 22, 3497-3505.
- [183] Wang, K. F., Nagarajan, R., Mello, C. M., Camesano, T. A., Characterization of supported lipid bilayer disruption by chrysoepsin-3 using QCM-D, *J. Phys. Chem. B*, 2011, 115, 15228-15235.
- [184] El Kirat, K., Morandat, S., Dufrière, Y. F., Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1798, 750-765.
- [185] Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Fütterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmüller, G., Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes, *Int. J. Cancer*, 1988, 41, 456-461.
- [186] Friedland, J. S., Shattock, R. J., Griffin, G. E., Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or particulate stimuli by human monocytic cells induces equivalent Monocyte Chemoattractant Protein-1 gene expression, *Cytokine*, 1993, 5, 150-156.
- [187] Erl, W., Weber, C., Wardemann, C., Weber, P. C., Adhesion properties of Mono Mac 6, a monocytic cell line with characteristics of mature human monocytes, *Atherosclerosis*, 1995, 113, 99-107.
- [188] Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol Methods.*, 1983, 65, 55-63.
- [189] Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., Schubert, D., Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, *J. Neurochem.*, 1997, 69, 581-593.
- [190] Fotakis G., Timbrell, J. A., *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.*, 2006, 160, 171-177.
- [191] Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P., Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening, *Toxicol. In Vitro*, 2004, 18, 703-710.
- [192] Mueller, H., Kassack, M. U., Wiese, M., Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines, *J. Biomol. Screen.*, 2004, 9, 506-515.

-
- [193] Hawely, T. S., Hawely, R. G., *Methods in molecular biology – Flow cytometry protocols*, 2005, 2nd ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, Chapter 1, 1-33.
- [194] Mullins, J. M., *Overwiev of fluorochromes*, In: *Methods in molecular biology – Immunocytochemical methods and protocols*, 1999, 2nd ed., Edited by: L. C. Javois, Humana Press Inc., Totowa, NJ, Chapter 14, 97-105.
- [195] Baranyai, Zs., Krátký, M., Vinšová, J., Szabó, N., Senoner, Zs., Horváti, K., Stolaříková, J., Dávid, S., Bősze, Sz., *Combating highly resistant emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium tuberculosis* with novel salicylanilide esters and carbamates*, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, 101, 692-704.
- [196] Baranyai, Zs., Krátký, M., Vosátka, R., Szabó, N., Senoner, Zs., Dávid, S., Stolaříková, J., Vinšová, J., Bősze, Sz., *In vitro biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tuftsins conjugates*, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, közlésre elfogadva
- [197] Sato, N., Arai, S., *Studies on pyrazines. 7. The synthesis of 5-chloropyrazinecarboxylic acid*, *J. Heterocycl. Chem.*, 1982, 19, 407-408.
- [198] Vinogradova, S. V., Pankratov, V. A., Korshak, V. V., Komarova, L. I., *Investigation of the reaction of thionyl chloride with dimethylformamide*, *Russ. Chem. Bull.*, 1971, 20, 450-455.
- [199] Sula, L., *WHO cooperative studies on a simple culture techniques for the isolation of mycobacteria: 1. Preparation, lyophilization and reconstitution of a simple semisynthetic concentrated liquid medium; culture technique, growth pattern of different mycobacteria*, *Bull. World Health Organ.*, 1963, 29, 589-606.
- [200] Sula, L., *WHO cooperative studies on a simple culture techniques for the isolation of mycobacteria: 2. Comparison of the efficacy of lyophilized liquid medium with that of Lowenstein-Jensen (L-J) medium*, *Bull. World Health Organ.*, 1963, 29, 607-625.
- [201] Gyulai, G., *Polimer tartalmú felületi nanostruktúrák előállítás és jellemzése, valamint a gyógyszerhordozóként való alkalmazás lehetősége*, Doktori Értekezés, ELTE, Kémia Doktori Iskola, Budapest, 2014
- [202] Fischer, R., Mader, O., Jung, G., Brock, R., *Extending the applicability of carboxyfluorescein in solid-phase synthesis*, *Bioconjug. Chem.*, 2003, 14, 653-660.
- [203] Bar-Shavit, Z., Bursuker, I., Goldman, R. *Functional tuftsins binding sites on macrophage-like tumor line P388D1 and on bone marrow cells differentiated *in vitro* into mononuclear phagocytes*, *Mol. Cell. Biochem.*, 1980, 30, 151-155.
- [204] Chen, C., Chen, Q., Geng, Z., Li, B., Zheng, J., Wang, L., *Neuropilin-1 promotes HepG2 proliferation, invasion and migration through potentiating the activity of hepatic stellate cells*, *Chinese J. Experimental Surgery*, 2014, 10, 2105-2107.
- [205] Zhang, Y., Liu, P., Jiang, Y., Dou, X., Yan, J., Ma, C., Fan, Q., Wang, W., Su, F., Tang, H., Su, X., *High Expression of neuropilin-1 associates with unfavorable clinicopathological features in hepatocellular carcinoma*, *Pathol. Oncol. Res.*, 2016, 22, 367-375.
- [206] Riccardi, C. Nicoletti, I., *Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*, *Nat. Protoc.*, 2006, 1, 1458-1461.
- [207] Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*, *Nucleic. Acids. Res.*, 2004, 32, e103.
- [208] Sauerbrey, G., *Verwendung von schwingquarzen zur wung dner schichten und zur mikrowung*, *Z. Phys.*, 1959, 155, 206-222.
- [209] McFarland, J., *Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines*, *J. Amer. Med. Assoc.*, 1907, 14, 1176-1178.
- [210] Bollela, V. R., Sato, D. N., Fonseca, B. A., *McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool*, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999, 32, 1073-1076.

-
- [211] Löwenstein, E., Die Zachtung der Tuberkelbazillen aus dem stramenden Blute. *Zentralb. Bakteriolog. Parasitenkd. infektiönsk. hyg. Abt. I. orig.*, 1931, 120, 127.
- [212] Jensen, K. A., Rinzuchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillentamen. *Zentralb. Bakteriolog. Parasitenkd. infektiönsk. hyg. Abt. I. Orig.*, 1932, 125, 222.
- [213] Knowles, B. B., Howe, C. C., Aden, D. P., Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, *Science*, 1980, 209, 497-499.
- [214] Knowles, B. B., Aden, D. P., Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor, 1983, USA patent 4,393,133.

ADATLAP
a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Baranyai Zsuzsa

MTMT-azonosító: 10032723

A doktori értekezés címe és alcíme: Antimikobakteriális hatóanyagok és konjugátumok szintézise és biológiai aktivitásának vizsgálata

DOI-azonosító⁴⁶: 10.15476/ELTE.2017.003

A doktori iskola neve: ELTE TTK Kémia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Bősze Szilvia tudományos főmunkatárs

A témavezető munkahelye: MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (datum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2017. február 20.

Baranyai Zsuzsa

.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet