Szintetikus antigének és tumorellenes hatású biokonjugátumok szintézise és vizsgálata

Doktori értekezés

Jakab Annamária

Eötvös Loránd Tudományegyetem Kémia Doktori Iskola
Dr. Inzelt György
Doktori iskola vezető

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program
Dr. Horváth István Tamás
Programvezető

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport
Dr. Mező Gábor
Témavezető

Budapest, 2008

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés 7
2 Irodalmi áttekintés 9
2.1 A szilárd fázisú peptidszintézis 9
2.1.1 Az alkalmazott gyanták 11
2.1.2 A Boc és az Fmoc technika 13
2.1.3 Kapcsolási módszerek 15
2.1.4 Hasítás a hordozóról és az oldallánc-védőcsoportok eltávolítása 17
2.1.5 Ciklopeptidek, ciklizálás 20
2.1.6 Kémiai ligáció 22
2.2 Hordozók alkalmazása 23
2.2.1 Polilizin 26
2.2.2 Oligotuftsin 28
2.3 Szintetikus antigének 30
2.3.1 A Herpes simplex vírus biokémiája 30
2.3.2 A HSV epitópjának és konjugátumainak biológiai vizsgálata 32
2.4 Irányítómolekulák alkalmazása, gyógyszerszállító rendszerek a tumor terápiában 34
2.4.1 Kemotaxis 35
2.4.2 A GnRH biokémiai szerepe és alkalmazása tumorterápiában 36
3 Célkitűzések 39
4 Eredmények 42
4.1 Oligolizin standard sorozat előállítása és tömegspektrometriás vizsgálata 42
4.2 HSV epitóp ciklizált származékai és konjugátumai 48
4.2.1 Ciklopeptidek, dimerek és konjugátumok szintézise 48
A tisztított termékek analitikai adatait a 3. táblázat tartalmazza. 54
4.2.2 Kötődési vizsgálatok 54
4.2.3 Promiszkuis peptid alkalmazása oligotuftsin és herpesz epitóp konjugátumában, szerkezetvizsgálat 58
4.3 Kemotaktikus tulajdonságú hordozó fejlesztése 63

4.4 GnRH konjugátumok és dimerszármazékok szintézise és vizsgálata 69
4.4.1 A GnRH-III származékok szintézise 69
4.4.2 Sejtproliferáció gátlásának vizsgálata 73
5 Kísérleti rész 77
5.1 Anyagok és általános eljárások 77
5.2 Oligolizin sorozat előállítása 79
5.2.1 Pentalizin építőegység előállítása 79
5.2.2 Oligolizinek előállítása 81
5.2.3 Tömegspektrometriás kísérletek 82
5.3 HSV epitópok és konjugátumok előállítása 83
5.3.1 Lineáris prekurzor peptidek előállítása (**1a-4a**) 83
5.3.2 Elágazó láncú prekurzor peptidek szintézise (**5a, 6a**) 83
5.3.3 Ciklusos epitóp peptidek szintézise (**1-6**) 85
5.3.4 Ciklusos epitóp peptidek dimerizálása (**7-10**) 86
5.3.5 Dimerizált ciklikus epitóp peptidek redukálása (**11, 12**) 86
5.3.6 Ciklusos epitóp petidek konjugálása klóracetilezett tetratuftsin származékhoz (**13, 14**) 87
5.3.7 Oligotuftsin alapú hordozó molekulák szintézise 87
5.3.8 Ciklusos HSV epitópszármazék szintézise a **15** konjugátum előállításához 88
5.3.9 Lineáris HSV 9-22C epitópszármazék szintézise a **16** konjugátum előállításához 89
5.3.10 A **15** és **16** konjugátumok szintézise 89
5.4 Kemotaktikus peptidszármazékok tuftsin-konjugátumainak szintézise 90
5.5 GnRH-III peptidek előállítása 91
5.5.1 A T20-GnRH-III konjugátum felépítése totálszintézissel 92
5.5.2 A klóracetilezett tetratuftsin származék szintézise 92
5.5.3 GnRH-III származékok szintézise 93
5.5.4 Oxidációs vizsgálatok 94
5.5.5 A konjugátum szintézise 94
6 Összefoglalás 95

7 Irodalomjegyzék 98
Rövid összefoglaló 110
Abstract 111
Közlemények listája 112

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Mező Gábor témavezetőmnek, hogy néhány évnyi munkám során annyi mindent átadott sokévi tapasztalatából, tudásából, segített a nehéz időkben, és együtt örült velem a sikeres kísérleteknek, valamint Dr. Hudecz Ferenc egyetemi tanárnak, hogy doktori munkámat lehetővé tette a MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban.

Köszönöm az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért kuratóriumának a doktori disszertáció megírásának idejére nyújtott anyagi támogatás odaítélését.

Biológiai illetve műszeres mérésekért Dr. Vincze Borbálának, Dr. Kovács Magdolnának, Dr. Láng Orsolyának, Dr. Schlosser Gittának, Dr. Majer Zsuzsának és Dr. Sytske Welling-Westernek tartozom köszönettel.

A Kutatócsoport minden tagjának köszönöm azt a figyelmet, segítőkészséget, hibáim javítgatását és a támogatást, melyet kaptam tőlük a csoportmegbeszéléseken, személyes kommunikációban. Nem felejtem el soha a vidám perceket, melyet a laborban egy-egy késői órán vagy csoportbulikon éltünk meg együtt.

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. David Andreunak (Pompeu Fabra Egyetem, Barcelona, Spanyolország), akinek a laboratóriumában sok tapasztalatot gyűjthettem, hogy megteremtette számomra a lehetőséget, hogy egy évig nála dolgozhattam. Sok szeretettel köszönöm Beatriz García de la Torre-nak a törődést, kedvességet, a temérdek jó tanácsot és mosolyt, amit 2005 során kaptam tőle.

Végül, de nem utolsósorban szeretném családomnak megköszönni a türelmet, támogatást, és szeretetet, amivel kutatói szárnypróbálgatásaimat segítették.

Rövidítésjegyzék

Ac-	acetil-
Acm-	S-acetamidometil-
Ac_2O	ecetsavanhidrid
AcOH	ecetsav
AgOTf	ezüst(I)-trifluormetánszulfonát
Ahx	6-aminohexánsav
BOP	benzotriazol-1-il-oxi-trisz-dimetil-amino-foszfónium-hexafluoro-foszfát
Boc-	N^{α}-*terc*-butiloxikarbonil-
BrZ	2-bróm-benziloxikarbonil
Bzl-	benzil-
CCA	α-ciano-4-hidroxi-fahéjsav
CD	cirkuláris dikroizmus
ClZ	2-klór-benziloxikarbonil
ClAc-OPcp	klórecetsav pentaklórfenilészter
DCC	*N,N′*-diciklohexil-karbodiimid
DCM	diklórmetán
DCU	*N,N′*-diciklohexil-karbamid
DIU	*N,N′*-diizopropil-karbamid
DHB	2,5-dihidroxi-benzoesav
DIEA	*N*-etildiizopropilamin
DIC	*N,N′*-diizopropil-karbodiimid
DMF	*N,N*-dimetil-formamid
Dnp	2,5-dinitrofenil-
DTNB	5,5’-ditiobisz(2-nitrobenzoesav)
DTT	1,4-ditio-DL-treitol
EDT	1,2-etánditiol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
EtOH	etanol
Fmoc-	N^{α}-9-fluorenilmetiloxikarbonil-

fMLF	formil-metionil-leucil-fenilalanin
For	formil-
For-OTcp	hangyasav triklórfenilészter
Glp	piroglutaminsav (egybetűs rövidítése: <E)
GnRH	gonadotropin releasing hormon, gonadotropin felszabadulását serkentő hormon
HATU	7-aza-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametil-urónium-hexafluoro-foszfát
HBTU	*O*-(benztriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronium hexafluoro-foszfát
HOAt	1-hidroxi-7-aza-benzotriazol
HOBt	1-hidroxi-benzotriazol
HODhbt	hidroxi-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
HOSu	*N*-hidroxi-szukcinimid
HSV	Herpes simplex virus
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
MBHA	4-metil-benzhidrilamin (gyanta)
Meb-	4-metil-benzil-
MeCN	metil-cianid, acetonitril
MeOH	metanol
MHC	major histocompatibility complex, fő szövet-összeférhetőségi génkomplex
MS	tömegspektrometria
NCA	*N*-karboxianhidrid
NMM	*N*-metil-morfolin
-OBzl	-benzil-észter
-OcHex	-ciklohexil-észter
-O^{t}Bu	-*terc*-butil-észter
-Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-5-szulfonil-
PEG	polietilénglikol
PyBOP	benzotriazol-1-il-oxi-trisz-pirrolidino-foszfónium-hexafluoro-foszfát
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography,

	fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
SA	3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fahéjsav (szinapiksav)
TBTU	benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametil-urónium-tetrafluoro-borát
TEA	trietilamin
TFA	trifluorecetsav
TFE	trifluoretanol
TFMSA	trifluor-metán-szulfonsav
TIS	triizopropil-szilán
TMSBr	trimetil-szilil-bromid
TMSOTf	trimetil-szilil-trifluor-metán-szulfonát
Tos	tozil-; *p*-toluolszulfonil-
Tris	2-amino-3-hidroximetil-1,3-propándiol-hidroklorid
TT	tetanus toxoid
Z-	benziloxikarbonil-

Az aminosavak rövidítésére az irodalomban használt egy és három betűs rövidítéseket alkalmaztam [1].

Polimerek rövidítése

AK	poli-[Lys(DL-Ala$_m$] (ahol m ~ 3-5)
XAK	poli-[Lys(X$_i$-DL-Ala$_m$] (ahol i ≤ 1 és m ~ 3-5)
SAK	poli-[Lys(Ser$_i$-DL-Ala$_m$] (ahol i ≤ 1 és m ~ 3-5)
EAK	poli-[Lys(Glu$_i$-DL-Ala$_m$] (ahol i ≤ 1 és m ~ 3-5)
Ac-EAK	poli-[Lys(Ac-Glu$_i$-DL-Ala$_m$] (ahol i ≤ 1 és m ~ 3-5)
AXK	poli-[Lys(DL-Ala$_m$-X$_i$] (ahol i ≤ 1 és m ~ 3-5)

1 Bevezetés

Eleink is megfigyelték, hogy a fertőző betegségen átesett egyedek, amennyiben túlélték a kórt, a későbbiekben védetté váltak a kórokozóval szemben. Sajnos így is falvakat, városokat, országrészeket és kontinenseket tizedeltek a különböző járványok az évszázadok során.

Legelső sikeres immunizálásként tekinthetjük Edward Jenner himlő elleni védőoltását (1796), mely egy angol tehenész megfigyelésén alapult, miszerint a fejőlányok nem betegszenek meg feketehimlőben. (A vakcina kifejezés a latin *vacca* (tehén) szóból származik, Pastuer használta először.) A tehénhimlő antigénje enyhe fertőzést okozott, ami ellenanyagtermelést indukált a szervezetben, az antigénre emlékező sejteket is létrehozva, így a hasonló, ámde sokkal veszélyesebb feketehimlő-fertőzés esetén az immunrendszer gyorsan és hatékonyan tudott „emlékezetből" ellentámadást indítani. Majdnem 200 évvel később, 1979-ben a különböző egészségügyi szervezetek örömmel jelentették ki, hogy a himlő az egyetlen, a világról teljesen eltüntetett járványos betegség.

Sok időt fog még azonban felemészteni a himlőnél sokkal veszélyesebb és összetettebb szerkezetű kórokozók kiirtása, illetve a globalizáció hatására egyre jobban felgyorsuló járványterjedés megfékezése. Napjainkban a károsító környezeti hatások által legyengített immunrendszerünk kevésbé ellenálló, de a vírusok, baktériumok is egyre agresszívabbak, gyorsan mutálódnak, egyre több az olyan kórokozó, amelyek rezisztensek az ismert gyógyszerekre. A már kialakult fertőzés gyógyítását sok tényező nehezíti, többek között a gyógyszerek káros hatásai a szervezet egészére nézve, a komoly idő- és pénzráfordítás, valamint adott esetben csak a tüneti kezelésre szorítkozó gyógymód. Hatékonyabb védekezést jelenthetne a vírusos megbetegedések ellen a vakcinával történő immunizálás, mint például az influenzavírus esetében (itt azonban a mutáció példáját láthatjuk, minden új mutáns ellen új vakcinát kell kifejleszteni).

A XVII-XVIII. századi első kísérletek rámutattak a gyengített, vagy elölt kórokozókkal történő beoltás veszélyeire, így az érdeklődés homlokterébe

került a szintetikus antigének kutatása, ezek a kórokozók DNS-ét vagy RNS-ét nem tartalmazzák, így nem fertőzőképesek. Napjaink legsürgősebben megoldandó problémái közé tartozik, a *Human immunodeficiency virus* (HIV), a hepatitis, a *Herpes simplex virus* (HSV), különböző influenzavírusok elleni gyógyszerek illetve vakcinák kidolgozása.

A daganatos megbetegedések számának óriási növekedése is felhívja figyelmünket a környezeti hatások fontosságára. Természetesen az egyre pontosabb és korai stádiumban is megbízható diagnosztika is növeli a statisztikai adatokat, mégis jellemzően emelkedő tendenciát figyelhetünk meg. A fiatalkori megbetegedések gyakori oka az egyre súlyosodó környezetszennyezés, a megváltozott életmód. 2007-ben 7,9 millió ember halt meg rákban és a WHO (Egészségügyi Világszervezet) becslései szerint a következő 10 évben 84 millió ember halálát okozza majd rákos megbetegedés, amennyiben nem tesznek lépéseket ellene. Hazánk, a statisztikai adatokat alapul véve, az európai országok között az egyik legrosszabb képet mutatja. Ezért a magyar kutatók különösen is érdekeltek lehetnek a rákkutatásban. A daganat kialakulásának megelőzése, vagy a kialakult daganat növekedésének lassítása illetve megállítása lenne célszerű, mivel a műtéti beavatkozás az áttétképződést nem biztos, hogy megakadályozza. Ezen a téren számos kutatást végeznek világszerte, biológusok, orvosok, biokémikusok keresik a megoldást. Jelen pillanatban a génterápia mellett az irányított kemoterápiát tekintik a legperspektivikusabb megoldásnak, amelyek forradalmasíthatják a XXI. század rákgyógyítását.

2 Irodalmi áttekintés

A bevezetésben említett betegségek (HSV, dagantos megbetegedések) diagnosztikája és terápiás lehetőségei között a peptidek és fehérjék fontos szerepet játszanak. Kutatásaink során peptideket és peptidkonjugátumokat terveztünk és állítottunk elő, melyek segítségével talán közelebb kerülünk a betegségek megértéséhez és legyőzéséhez. Ezért először a vegyületek előállításában alkalmazott módszereket és eljárásokat foglalom röviden össze, ami csak nagyon szűk kitekintés a peptidkémiai szintézisek világába.

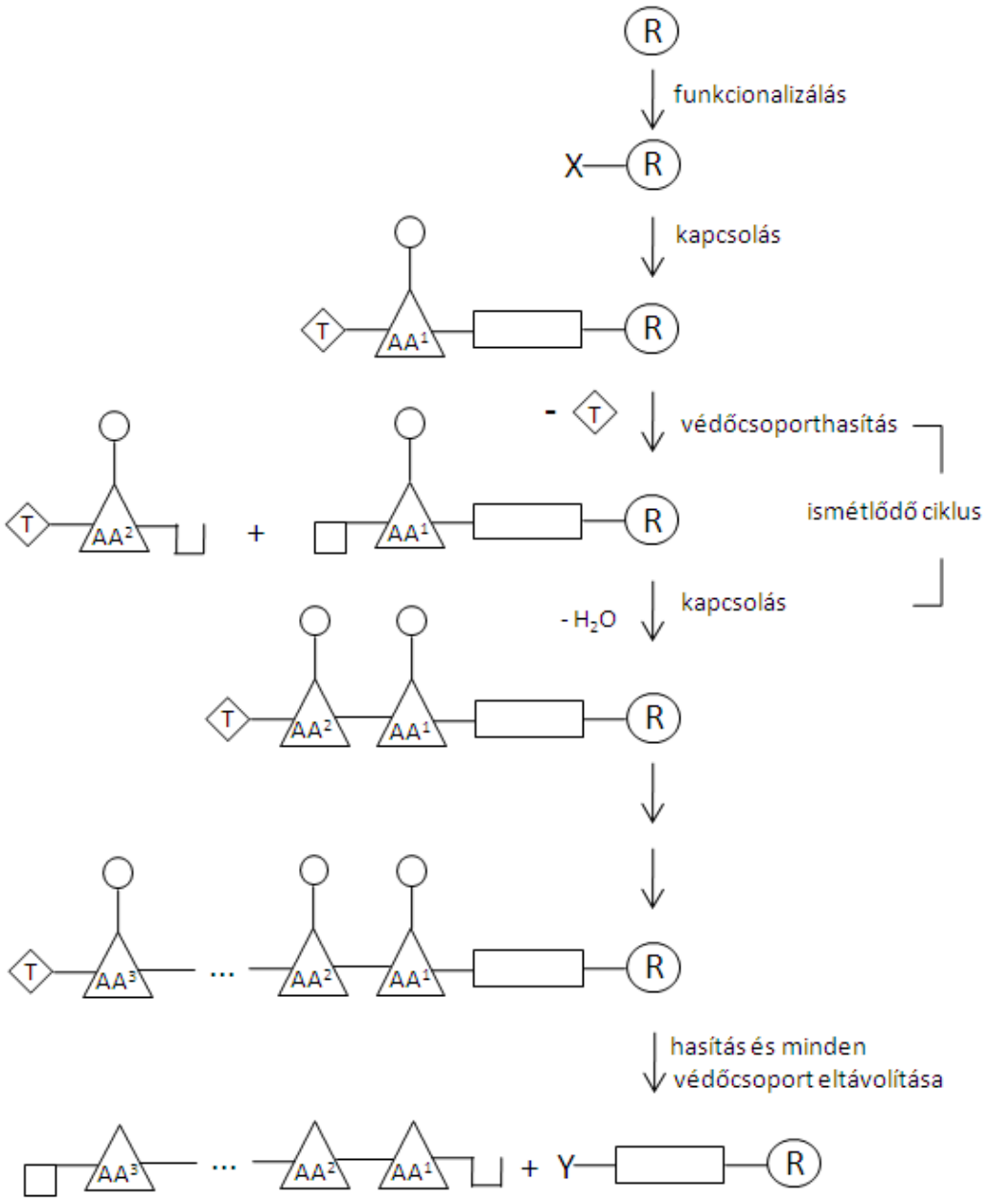
2.1 A szilárd fázisú peptidszintézis

A peptidkémia hosszú ideig a klasszikus szerves kémia lépéseit alkalmazta a különböző vegyületek elkészítésére. Ez hosszadalmas munka volt, a reagensek előállítását és sok tisztítási lépést is beleértve. R.B. Merrifield ért el jelentős áttörést a szilárd fázisú szintézis módszerének kidolgozásával az 1960-as években. A technika elnevezésének is alapot adó fázis, a gyanta, polisztirol és divinilbenzol (korábban 1,4-, manapság inkább az 1,2-divinilbenzol) térhálós kopolimerje, a funkciós csoportokat és a felület lefedettségét illetően sokféle változtatásra ad lehetőséget.

Merrifield 1963-ban publikálta az új módszert, melynek segítségével egy tetrapeptidet állított elő [2-4], majd néhány apróbb technikai fejlesztés után [5] a peptidkémikusok rutinszerűen alkalmazták az eljárást. Széles körben a HPLC technika fejlődésével és elterjedésével nyert teret a szilárd fázisú szintézis, mivel a nagyon hasonló fizikai-kémiai tulajdonságú anyagok elegyét a hagyományos tisztítási módszerekkel nem tudták megfelelően elválasztani.

A szilárd fázisú peptidszintézis elve igen egyszerű (1. ábra): az első aminosavat a szilárd hordozóhoz kötjük, ezt építjük tovább egymás utáni ciklusokban olyan körülmények között, hogy a szintézis során az épülő peptidlánc és a gyanta közötti kovalens kötés stabil maradjon. A reagens felesleget és a keletkező melléktermékeket többszöri mosással és egyszerű szűréssel távolíthatjuk el a gyantaszemekről. A reagensek könnyű

eltávolíthatósága miatt nagy feleslegben alkalmazhatók (3-10 ekvivalens), így az egyes reakciólépések kitermelése magas lehet (gyakran közel 100%), amely szükséges is jó minőségű nyers termék előállításához.



1. ábra: A szilárd fázisú peptidszintézis sémája

A kapcsolás sikerét gyors kvalitatív színreakciókkal becsülhetjük meg (pl. [6-8]), a kvantitatív mérések műszer- és időigényesebbek. Mivel a kapcsolási lépések során nagy felesleget alkalmazunk az acilező komponensekből, az

oldallánc funkciós csoportot tartalmazó aminosavakat az oldalláncukban is védeni kell az egyértelmű reakciók lejátszódása érdekében. A szintézis végén a kész terméket lehasítjuk a gyantáról. A hasítás körülményeit az alkalmazott gyanta és védőcsoportok, valamint a peptidláncban lévő aminosavak típusa szabja meg, továbbá az, hogy szabad vagy védett peptidszármazékot kívánunk-e előállítani. Az utóbbi esetben a védett peptid további szintetikus lépésekben alkalmazható. A peptid tisztítását már oldatban végezzük.
Az ismétlődő szintézislépések a módszer automatizálását is lehetővé tették, így Merrifield és kollegái már 1966-ban megépítették az első automata peptidszintetizátort [9].

2.1.1 Az alkalmazott gyanták

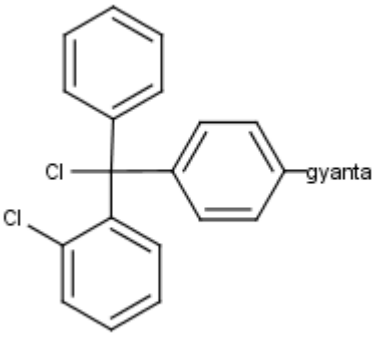
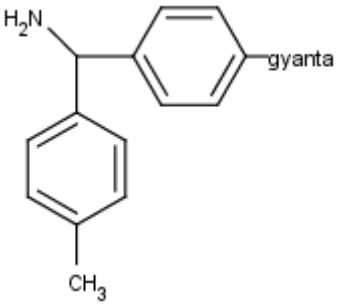
Merrifield első kísérleteihez polisztirol gyantát használt, melyet módosításokkal, de ma is használnak. Szerkezetét a polimerizáció során 1-2% divinil-benzol hozzáadásával stabilizálták, keresztkötéseket hozva létre az egyes polimerszálak között. Az ilyen gyanták erőteljesen duzzadnak apoláris oldószerekben, akár 6-8 ml/g oldószert is felvesznek. Polisztirol alapú gyantákon kívül a poláris poliamid gyanták kaptak nagyobb szerepet a peptidkémiában [10] valamint a polietilénglikollal (PEG) hidrofil karaktert nyerő gyanták [11].
A gyantákkal szembeni általános követelményeket Merrifield és Erickson fogalmazta meg [12]:

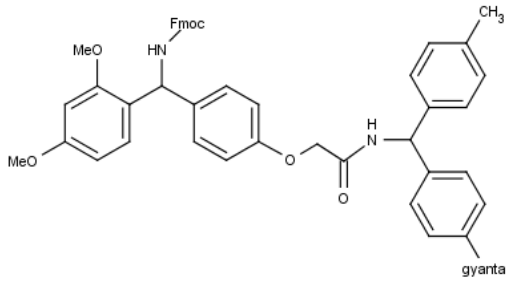
- olyan reaktív helyeket tartalmazzon, amihez a peptiláncot kapcsolni lehet;
- - elegendő mennyiségű kapcsolóhelynek kell lennie rajta, hogy a kitermelés
  elfogadható mértékű legyen;
- könnyen elválasztható legyen az oldatoktól;
- a reakciókörülmények között fizikailag és kémiailag stabil legyen;

- a növekvő peptidláncnak hozzáférhetőnek kell lennie a reagensek számára.

A gyantához kapcsolt linkerek kémiailag sokfélék lehetnek, hasíthatóságuk és a végtermék *C*-terminálisa (karboxil- vagy karboxamid csoport, amin keresztül a gyantához kapcsolódott) szerint választhatjuk ki a munkánkhoz a legalkalmasabbat.
Az 1. táblázatban a doktori munkám során alkalmazott gyantatípusokat mutatom be.

1. táblázat: Az alkalmazott gyantatípusok

Szerkezet	Név	Hasítás	*C*-terminális jellege
	4-klórmetil gyanta	erős sav	sav
	2-klórtritil-klorid	gyenge sav	sav
	MBHA	erős sav	amid

	Rink-Amid MBHA	gyenge sav	amid

2.1.2 A Boc és az Fmoc technika

A lineáris peptidek felépítésében a természetes aminosavak α-amino- és α-karboxilcsoportjai vesznek részt. A szilárd fázisú peptidszintézisben az acilező szerek és reagensek nagy feleslegét használjuk a tökéletes kapcsolás érdekében, ezért az oldalláncok funkciós csoportjait a mellékreakciók elkerülése miatt védeni kell. Mivel a peptidláncokat a *C*→*N*-terminális irányban építjük fel, a karboxilcsoport mindig szabad a beépítendő aminosavakban, de az α-aminocsoportot ún. ideiglenes, uretán típusú védőcsoporttal látjuk el, mert ezt az aminosav beépítése után lehasítjuk minden ciklusban. Az alkalmazott uretán típusú védőcsoportok (Boc, Fmoc) alkalmasak arra, hogy az aminosavszármazékok kapcsolásakor ne következzen be racemizáció. Az oldalláncok védőcsoportjait általában a peptid gyantáról történő lehasításával együtt távolítjuk el, de számtalan szelektíven hasítható védőcsoportot is használnak a peptidkémikusok.

A standard Merrifield módszer a N^{α}-*terc*-butiloxikarbonil (Boc) amino-védőcsoportot használja, mely szerves (pl. TFA) és szervetlen (pl. HCl) savakra hasad [13]. A Boc hasítás körülményeire nem érzékeny oldallánc-védőcsoport típusa főleg benzil- vagy ciklohexil-alkohol alapú éter, észter és uretán lehet, ezek csak erős savakkal hasíthatók (pl. hidrogénfluorid, trifluormetánszulfonsav, HBr/jégecet). Ezt a módszert azonban érzékenyebb aminosavaknál (pl. Trp, Met) illetve szekvenciáknál (pl. Asp-Pro) csak korlátozottan lehet alkalmazni, mivel a sorozatos savas kezelés mellékreakciókat okozhat (pl. alkileződés, oxidáció, lánchasadás). Ezért

Atherton és Sheppard kidolgozta a N^{α}-9-fluorenilmetiloxikarbonil (Fmoc) védőcsoporton alapuló technikát [14]. Az aminocsoport védelmére szolgáló Fmoc csoport szerves bázisokkal (elsősorban szekunder aminokkal) hasítható, az oldallánc-védőcsoportok *terc*-butanol alapú éterek, észterek és uretán-típusúak lehetnek. Több aminosav esetében a tritil-csoport nyújtja a legmegfelelőbb védelmet. A két technika összehasonlítását a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat: A Boc és az Fmoc technika összehasonlítása

	Boc technika	Fmoc technika
Időigény	semlegesítési lépés ciklusonként	nincs semlegesítés
Anyagigény	olcsóbb aminosavszármazékok	kevesebb oldószerigény
Eszközigény	speciális teflonkészülék HF hasításhoz	közönséges laboratóriumi edények
Alkalmazhatóság	aggregálódó peptidek	védett peptidek, oxidációra érzékeny aminosavak (Met, Trp)

Bizonyos szekvenciák épülő peptidláncainak aggregációra való hajlama miatt szükséges lehet a szintézis-stratégia megváltoztatása is, mivel az erős asszociáció miatt az *N*-terminális aminosav hozzáférhetetlen lesz a reagensek számára. Szintén, a hosszabb (>50 aminosav) peptidek felépítése esetén, sokszor nem ad kielégítő eredményt a lépésenkénti szintézis eljárása. A lépésenkénti szintézist ilyenkor szilárd fázisú fragmenskondenzációval lehet helyettesíteni (konvergens szilárd fázisú peptidszintézis) [15, 16]. Újabban azonban előtérbe kerültek az oldatban végezhető és nem védett prekurzor peptidekből kiinduló ligációs eljárások [17-21].

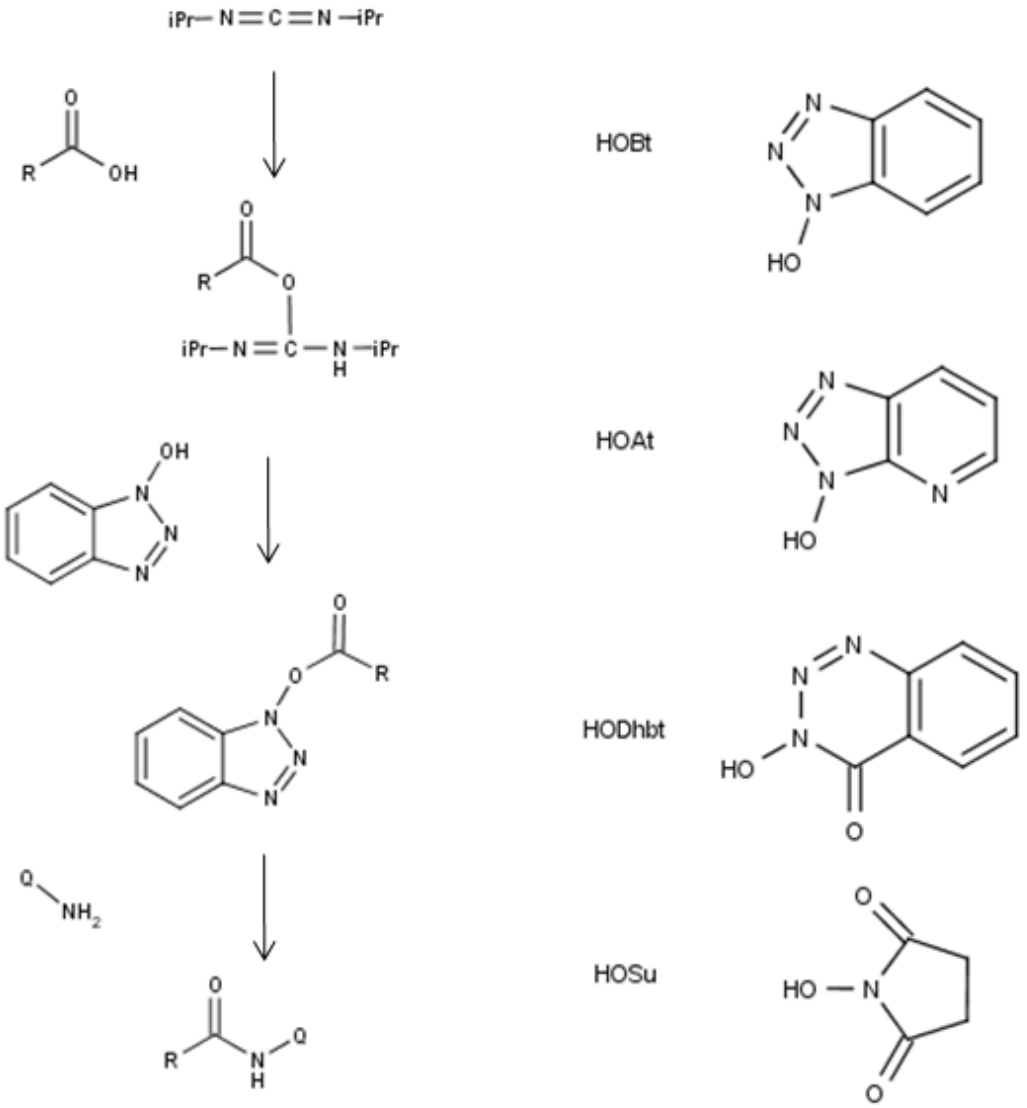
Boc és Fmoc technikák alapvető védőcsoportkombinációi mellett az oldallánc védőcsoportok megválasztásának további szempontjai: a szintézis melyik fázisában szeretnénk lehasítani, kell-e alkalmazni ortogonális védelmet, minden tervezett reakció körülményeivel szemben kellőképp ellenálló-e? Ciklopeptidek szintézisénél például a ciklizálási módszertől függően (gyantán, oldatban, védett vagy védőcsoport nélküli formában) döntünk, hogy milyen típusú védőcsoportokot kell választani.

2.1.3 Kapcsolási módszerek

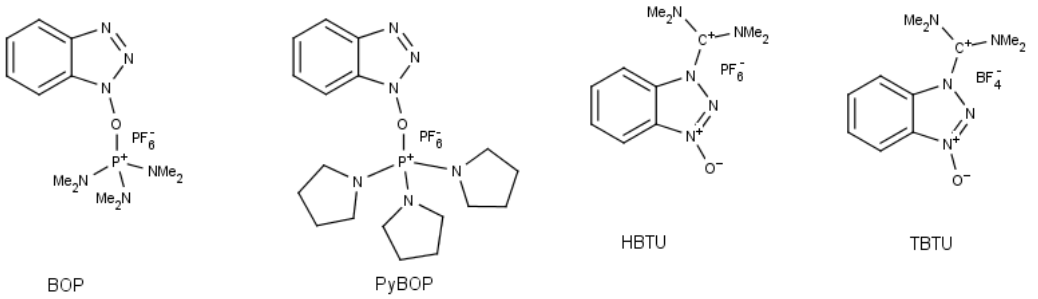
Ma a leggyakrabban használt módszer az *in situ* aktív észteres kapcsolás, mely lényege, hogy az aktivált molekula a reakcióelegyben, az aminosav-származék és a reagens(ek) reakciójában keletkezik. A képződő aktívészter származékot a reakcióelegyből nem izoláljuk. Aminosavak kapcsolásához vízelvonószerként karbodiimidet már az 1950-es évektől fogva használtak. Jelenleg a DCC [22] és a DIC [23] a legelterjedtebb, ezek a szilárd fázisú technikában is jól használhatók. A köztitermék izolálásával járó módszerekben a DCC jól használható, mert a keletkező karbamid-származéka az általánosan használt oldószerekben rosszul oldódik, tehát kiszűrhető az oldatból. A szilárd fázisú szintézisben a DCC-t a Boc-technikában használják; mivel a DCU savban jól oldódik, így a TFA-s hasítási lépésben eltávolítható. A DIC-et, mivel karbamid-származéka (DIU) DMF oldószerrel is könnyen eltávolítható, egyaránt alkalmazzák az Fmoc és a Boc technikában is. Amennyiben a karbodiimides kapcsolást ekvivalens mennyiségű R’R”NOH típusú vegyület (pl. HOBt, HOAt, HODhbt, HOSu) jelenlétében végezzük, az utóbbiaknak a védett acilező aminosavval alkotott észtereit kapjuk, melyek igen reaktívak és egyben csökkentik a racemizáció lehetőségét [24, 25].

In situ aktívészterek kialakítására alkalmas reagensek a HOXt származékok (2. ábra) mellett a HOBt és HOAt különböző foszfónium és urónium származékainak hexafluoro-foszfát vagy tetrafluoro-borát sói (3. ábra) [26, 27]. Ezek a reagensek tercier bázisok (DIEA, TEA, NMM) jelenlétében a

leghatékonyabbak [28]. Foszfónium származékok pl. a BOP [29] és a PyBOP [30] reagensek. A BOP igen hatékony kapcsolószer, de nagy hátránya, hogy a melléktermékként keletkező hexametil-foszfor-triamid karcinogén. A PyBOP rendelkezik a BOP minden előnyével, ugyanakkor acilezési melléktermék kevésbé mérgező hatású. A HOBt és a HOAt urónium típusú származékai a HBTU[31], a TBTU [26] és a HATU [32].



2. ábra: A DIC/HOBt kapcsolás mechanizmusa és a HOXt típusú kapcsolószerek



3. ábra: HOXt típusú vegyületek óniumszármazékai

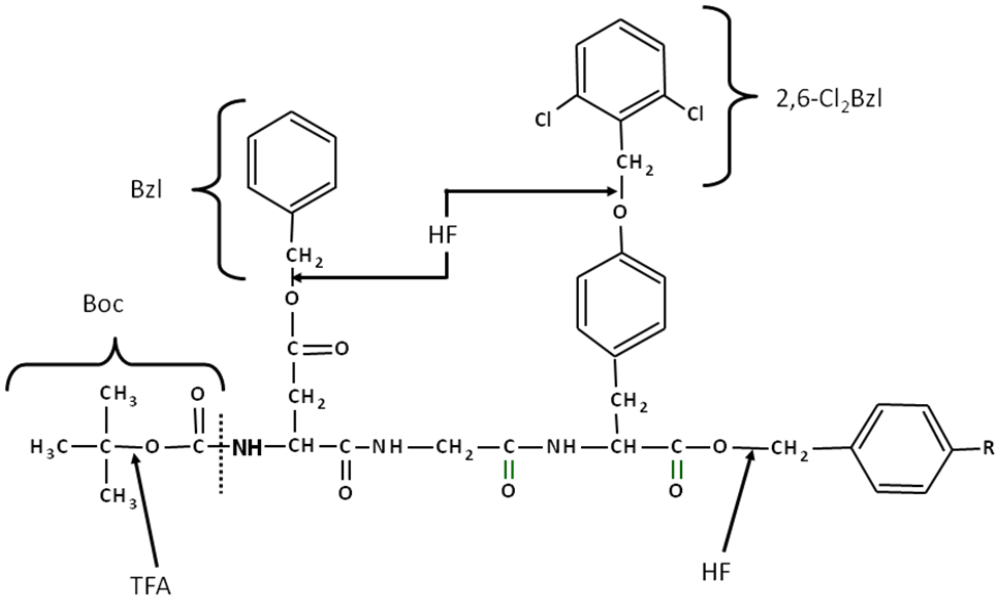
Az urónium típusú kapcsolószerek nagy hatékonyságuk ellenére vannak hátrányai is. Szemben a karbodiimid és foszfónium típusú kapcsolószerekkel, az urónium származékok a szokásos peptidszintetikus körülmények között maguk is képesek reakcióba lépni a szabad aminocsoportokkal tetrametil-guanidínium származékok keletkezése közben [33]. Mivel ez láncletörést eredményezne, az urónium típusú kapcsolószer nem kerülhet feleslegbe az acilező aminosav-származékhoz képest, ezért alkalmazásuk nem célszerű olyan reakciókban (ciklizálás, fragmenskondenzáció, konjugálás), ahol a kapcsolószereket az acilező aminosav mennyiségéhez képest is feleslegben alkalmazzuk. A mellékreakció elkerülése érdekében az acilező aminosav-származékkal együtt DMF-ban (esetleg DCM-ban) oldva kell előaktiválni. A foszfónium és urónium típusú reagensek másik hátránya, hogy Fmoc technikában a hosszabb reakcióidőt igénylő kapcsolások során a kapcsolószer hatékonyabb működését elősegítő tercier bázisok részlegesen hasíthatják az Fmoc-védőcsoportot.

2.1.4 Hasítás a hordozóról és az oldallánc-védőcsoportok eltávolítása

A peptidek védőcsoportjait célszerű úgy megválasztani, hogy az utolsó ideiglenes védőcsoport eltávolítása után egyetlen reakcióban lehessen őket

eltávolítani. A hasítási reakció során alkilezési, acilezési, oxidációs stb. mellékreakciók léphetnek fel, ezért a hasítási körülmények (reagensek, idő, hőmérséklet) optimalizálása igen fontos. A reakció során keletkező ionok miatt ún. gyökfogókat is alkalmaznunk kell, melyek a keletkező kationokkal reagálnak (a szaknyelv általánosságban az angol scavenger kifejezést gyökfogó névvel illeti, annak ellenére, hogy ebben az esetben karbokationokról van szó) [25].

A leggyakoribb hasítóelegyek erős szervetlen vagy szerves savakon alapulnak. A Boc/Bzl-technikában (4. ábra) elterjedt hidrogén-fluoridos hasítás [34] speciális eszközöket (teflon alapú készülék) és körültekintő munkát igényel, de a legtöbb általánosan használt oldalláncvédőcsoportot eltávolítja (kivéve His(Dnp), Trp(For)).

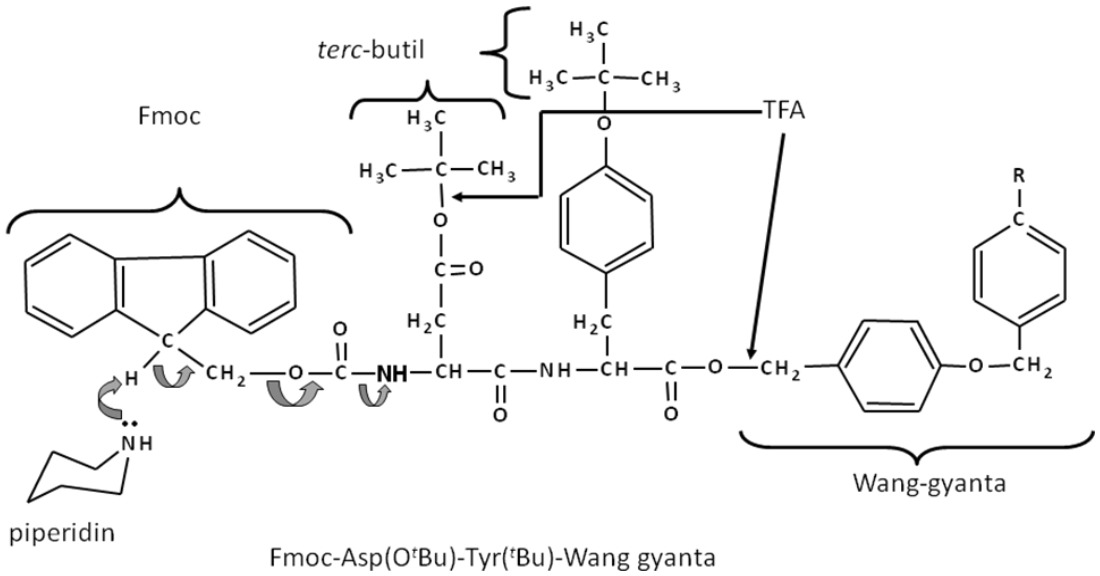


4. ábra: A Boc hasítás sémája

Az alkalmazott gyökfogók megválasztása a jelenlévő aminosavaktól illetve védőcsoportjaiktól függ: oxidációra nem érzékeny aminosavak esetén anizol, fenol, krezolok [9] használhatók, cisztein, triptofán illetve metionin esetén merkapto-etanol, EDT, tioanizol, DTT vagy dimetil-szulfid az ajánlott gyökfogó

az előzőekkel kombinálva. Ezen reagensek egyben reduktív közeget is biztosítanak az említett aminosavak oxidációjának megakadályozására. A peptidek hasíthatók a gyantákról (kivéve a benzhidrilamin gyantát) TFMSA, TMSOTf és TMSBr trifluorecetsavval hígított elegyével is, azonban egyes védőcsoportok (pl. Tos, OcHex, Meb) csak szobahőmérsékleten és hosszabb idő alatt hasadnak tökéletesen, ami több mellékreakciót okozhat. Ezért ezen védőcsoportok mellett alkalmazásuk korlátozott [35].

Az Fmoc-technikában (5. ábra) használt, bázisokkal szemben stabil oldalláncvédő csoportok és a peptid-gyanta kötés hasítására a közepesen erős trifluor-ecetsavat alkalmazzák.



5. ábra: Az Fmoc hasítás sémája

Az ilyenkor keletkező, erősen alkilező tulajdonságú *terc*-butilkationok befogására a legjobb adalék a víz. Azonban a hasítóelegy tartalmazhat további gyökfogókat (EDT, fenol, TIS, anizol, tioanizol) a peptidben lévő aminosavak és az alkalmazott oldallánc védőcsoportok típusától függően [36]. Bizonyos gyantákról még enyhébb körülmények között is lehasíthatók a peptidek. Így pl. a 2-klórtritil-klorid gyantáról már híg (10-20%) ecetsavval is eltávolítható a peptid, igaz, ilyenkor az oldallánc védőcsoportok sértetlenek maradnak, vagyis

védett peptidek előállítására nyílik mód [10]. A védett származékokat ciklizálhatjuk vagy fragmenskondenzációval kapcsolhatjuk más peptidekhez.

2.1.5 Ciklopeptidek, ciklizálás

A természetes eredetű ciklopeptid, a gramicidin S antibiotikum [37, 38] fél évszázaddal ezelőtti felfedezését számos más antibiotikum, hormon és toxin megismerése követte. Biológiai vizsgálatok kimutatták, hogy ezek a ciklikus struktúrák metabolikus stabilitást, nagy hatékonyságot, és receptor-szelektivitást nyernek a konformációs merevségükkel [39-41].

A ciklusban található kötéstípusok szerint megkülönböztetjük a homodetikus illetve a heterodetikus ciklopeptideket. Az előbbi csoport jellemzője, hogy csak amidkötés (laktám) alkotja a ciklust, míg az utóbbiban más funkciós csoportok is megtalálhatók. Ilyen összekötő egység lehet a diszulfidhíd, észter (lakton), éter vagy tioéter kötés, továbbá oxim, hidrazon és tiazolidin kötések.

A kapcsolódási pont elhelyezkedésétől függően a ciklopeptidek az alábbi típusúak lehetnek:

- head-to-tail (fej-farok)
- side chain-to-tail (oldallánc-farok)
- side chain-to-head (oldallánc-fej)
- side chain-to-side chain (oldallánc-oldallánc)
- branched (elágazó)

Homodetikus ciklopeptid esetén ortogonális (szelektíven eltávolítható) védőcsoportkombinációkra van szükség a ciklizációban résztvevő amino- és karboxilcsoportoknál. Diszulfidhíd létrehozásánál csak a több diszulfidhíd kialakításánál van szükség szelektív tiol oldallánc-védelemre, míg más típusú ciklizálásnál nem védett prekurzorral is dolgozhatunk.
Ciklizálási reakciót gyantán illetve oldatban is végezhetünk. Gyantán végzett ciklizálást segíti az ún. pszeudo-higítás, azaz alacsony kapacitású (0,2-0,3

mmol/g) gyantán dolgozva nagyobb a valószínűsége az intramolekuláris gyűrűzáródásnak, mint az intermolekuláris reakcióknak (ciklodimerizáció, oligomerizáció, polimerizáció), valamint a reagensek is könnyen eltávolíthatók (szűrés). Szimmetrikus dimerből álló ciklopeptid kialakításához azonban kedvezményezett módszer az oldatfázisú szintézis, mivel a töményebb oldat az intermolekuláris reakciót segíti. Az oldatban végzett ciklizálás esetén szintén igen híg (< 0,2 mg/ml) oldatokat célszerű alkalmazni a sikeres reakció érdekében.

A két tiolcsoportból oxidációval keletkező diszulfidhíd gyakran segíti a fehérjék harmadlagos illetve negyedleges szerkezetének kialakulását [42] és megőrzését, azonban ciklopeptidekben nem növeli jelentősen azok enzimekkel szembeni stabilitását összehasonlítva az amid- vagy a tioéter-kötésekkel [43]. Szintetikus szempontból a diszulfidhidat egyszerű kialakítani és számos módszer található az irodalomban [44] Ugyanakkor nem lehet elhanyagolni azt a tényt, hogy a nem természetes diszulfidhidak (pl. peptidek ciklusba zárására alkalmazva) sokszor nem stabilak és tiol szennyezők jelenlétében, vagy a biológiai környezetben felnyílhatnak és átrendeződhetnek.
Kémiai és biológiai stabilitást növeli, ha erős kovalens kötésű ciklusokat alakítunk ki. A változatos oldallánc funkciós csoportoknak köszönhetően számos módszert dolgoztak ki ciklizálási illetve ligációs eljárásokra. Kézenfekvő megoldásnak látszik a laktámgyűrű kialakítása, azonban szelektív oldallánc védelmet igényel a reakció, és csak nagy higításban végezhető el, hogy a polimerizációs mellékreakció ne érvényesüljön.
Gyakran alkalmazott megoldás a tioéter-kötés [45] létrehozása, ehhez egy megfelelően aktív haloacetil (általában klór vagy bróm) és egy tiolcsoport (pl. cisztein) jelenlétére van szükség. Különösen a klóracetil-csoport szelektív a tiolcsoportokkal lejátszódó reakcióban, ezért nem védett peptidekből a ciklizáció könnyen végrehajtható. A haloacetil-csoportok megfelelő gyökfogó kombináció mellett stabilak még HF-ra is, így szilárd hordozón is beépíthetők a peptidláncba.

Aldehid funkciós csoportok is használhatók ciklizálásban, egyik ilyen módszer az oxim-kötés létrehozása [46], mely egy aldehid és gyenge bázis között jön létre. Az eljárás nem igényel szelektív oldalláncvédelmet, és vizes oldatokban lejátszódik. Aldehid például szerin oldalláncából alakítható ki enyhe oxidációs eljárással ($NaIO_4$), majd ezt enyhe savas körülmények között reagáltatják aminooxiacetil-csoporttal, melyet aminocsoportra kapcsolnak (enyhén savas közegben minden bázikus oldallánc protonált, és nem reagál). Hasonlóan nem védett peptidprekurzorokat igényel az a ciklizálás, mely végeredménye tiazolidin-gyűrű [21] kialakulása. A szükséges funkciós csoportok egy *N*-terminális cisztein szabad amino- és tiolcsoportjai illetve egy 1,2-aminoalkohol vagy 1,2-diol (aldehidprekurzor). A tiolcsoport védelmének eltávolításával párhuzamosan zárható a ciklus, ha a védőcsoport hasítása lassú, akkor szelektíven a ciklizálás megy végbe, a mellékreakciók száma elhanyagolható.

2.1.6 Kémiai ligáció

Peptidek és fehérjék nagyobb láncainak kovalens kötéssel való kapcsolását nem védett peptidekből kiindulva kémiai ligációnak nevezzük. A ciklopeptideknél már említett néhány módszer természetesen itt is alkalmazható, mint kemoszelektív ligációs módszer: tioészter, tioéter tiazolidin, oxim, hidrazon keletkezik a reakció során. A kemoszelektív ligációs módszerek esetén a peptidkomponensek között nem amidkötés alakul ki. Az utóbbi időben egyre több olyan ligációs eljárást dolgoztak ki, amelyek alkalmazásával amidkötés alakítható ki, így közelítve a peptidek és fehérjék természetes állapotát (native chemical ligation [17-20]).

De novo nagytagszámú peptidek és peptidkonjugátumok előállítására a diszulfidhíd alkalmazásának korlátai a biológiai rendszerekben keresendők: a természetes redox enzimek határozzák meg a diszulfidhidak sorsát, ezért a hatóanyag-hordozó komplexek tervezésénél illetve a kísérleti eredmények értékelésénél figyelembe kell venni, hogy ezek a kötések hol és hogyan bomlanak fel [47]. Peptidek, illetve hatóanyagok és peptidek diszulfidhíddal

történő összekapcsolásánál mindig figyelembe kell venni, hogy az aszimmetrikus diszulfidhidak stabilitása sokszor kisebb mint a szimmetrikus vegyületeké. Ezért redukáló hatású szennyező molekulák jelenlétében vagy biológiai környezetben a vegyes diszulfidhidak felnyílhatnak és átalakulhatnak szimmetrikus dimerekké. Tehát az ilyen vegyületek stabilitását a biológiai vizsgálatok előtt célszerű vizsgálni a hatás megfelelő értékelése érdekében.

2.2 Hordozók alkalmazása

Munkám szintetikus antigének előállítására és irányított tumorterápiában alkalmazható konjugátumok szintézisére irányult. A két területet a biokonjugátumok szintézisére használt hordozómolekulák fejlesztése köti össze.

A szintetikus vakcináknak számos előnye van a gyengített vagy elölt kórokozókkal történő immunizáláshoz képest. Ezek a készítmények azt az antigéndeterminánst tartalmazzák, mely a kórokozóval szembeni védettség kialakulásában játszik szerepet. Ez a molekula leggyakrabban a kórokozó fehérjeburkából származik, és nem tartalmaz örökítőanyagot, ami fertőzést okozhatna. Ezek a rövid peptidszakaszok önmagukban nem mindig képesek az immunválaszt előidézni, ezért legtöbbször valamilyen makromolekulához kapcsolják megfelelő immunogén előállítása érdekében, hogy így váltsák ki az ellenanyagválaszt [48]. A hordozó kiválasztásának főbb szempontjai, hogy a szervezetben ne halmozódjon fel, ne legyen immunogén, azaz önmaga ne váltson ki olyan immunfolyamatokat, melyek például csökkentik a vakcina specifikus hatását, vagy allergiás hiperszenzitivitást okoznak.

A hordozók eredetük szerint lehetnek természetesek vagy mesterségesek. Ilyen természetes hordozók a fehérjék, nukleinsavak, szénhidrátok. Ezek a szervezetben maradéktalanul lebomlanak, esetleg jellegük folytán specifikusan felhalmozódnak például megnövekedett fehérjefelvételű sejtekben (albumin konjugátumok lokalizálódása [49]). A leggyakrabban alkalmazott hordozók a

marha szérum albumin (BSA), ovalbumin (OVA), illetve a tetanus toxoid (TT). Ezek alkalmazásakor azonban az immunizálás során jelentős mennyiségű ellenanyag termelődhet a hordozó ellen is. Többek között ez is oka annak, hogy ezek a hordozók nem alkalmazhatók a humán terápiában. A kutatásokban gyakran használnak az immunrendszer számára kevés valószínűséggel immunogén hatású fehérjéket, mint a KLH (keyhole limpet hemocianin), melyre nagyszámú hatóanyagmolekulát lehet kovalensen kötni [50], de ennek használata is kételyeket vethet fel. Ezért lehetnek alkalmasabbak az immunogenitást nem, vagy csak kis mértékben mutató szintetikus hordozók. A MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban többféle szintetikus poli- illetve oligopeptidhordozót fejlesztettek ki és vizsgáltak, szakdolgozatomban is ehhez kapcsolódó kutatási eredményeket ismertettem.

A fejlett világban egyre növekvő számban találkozunk tumoros megbetegedésekkel, ezen belül pedig nő a fiatalkorú érintettek száma is. A diagnosztikában és a terápiában is fejlődés figyelhető meg, azonban a várható élettartam és a betegek túlélési esélye sok tumor esetén még mindig igen alacsony. A rákos sejtek egy része eltávolítható sebészileg, illetve kemo- vagy radioterápiával kezelhetők, de nagyon nehéz minden beteg sejtet elpusztítani. A metasztázis kialakulása után pedig szinte lehetetlen minden új tumort megtalálni. A kemoterápia és a sugárkezelés az egészséges sejtekre is toxikus, ezért a rákellenes terápia fejlesztésében a rákos és a normál sejtek közötti különbségekre kell építkeznünk. A hagyományos rákellenes gyógyszerek komoly hátránya, hogy multidrog-rezisztenciát indukálhatnak rákos sejtekben, gyorsan kiürülnek, nagy dózisban kell őket alkalmazni, ami az egészséges szöveteket is terheli [51].

Daganatos megbetegedések kezelésére sejtbiológiai módszerekkel keresik a sejtciklus olyan szakaszait, ahol feltartóztatható a folyamat, illetve célozhatók olyan DNS javító folyamatok is, melyek „meghibásodása” okozza a tumort. Másik megközelítés pedig a hatóanyagot a tumorokhoz közvetlenül eljuttató molekulakomplexum létrehozása. A citotoxikus szer enzimatikus vagy más

úton (pl. pH érzékeny „spacer” alkalmazásával) a tumorsejt belsejében, vagy annak környezetében szabadul fel, és így diffúzióval a szomszédos sejtekbe is eljut.

A gyógyszermolekulák célbajuttatásának problémája sok kutatót foglalkoztat; orvosok, biokémikusok, vegyészek dolgoznak a nagy specifitású irányító molekulák kifejlesztésén. Kismolekulájú hidrofób vegyületek, gyógyszerhatóanyagok (parazitaellenes, tumorellenes szerek) diffúzóval jutnak át a sejtmembránon, azonban többségük nemcsak a beteg sejtekhez jut el, hanem a szervezet egyéb sejtjeire nézve is toxikusak lehetnek [52]. A hidrofil hatóanyagok esetében a membrándiffúzió gátolt, ezért ezek passzívan nem tudnak eljutni a hatás helyére [53]. Ilyen esetekben a makromolekuláris hordozó jelentheti a megoldást, mely endocitózissal képes a sejtekbe jutni. Mivel a tumorsejtek fokozott endocitózist mutatnak, ezért a makromolekulákhoz kapcsolt hatóanyag bizonyos szelektivitást mutat a rákos sejtekre. A konjugátumok alkalmazása csökkentheti a toxikus mellékhatásokat, így a szervezetbe juttatandó gyógyszermennyiséget növelni lehet. Tovább lehet fokozni a konjugátumok specifitását, ha azok célfelismerő egységgel (pl. receptor ligand) rendelkeznek, és így a tumorsejteken lévő specifikus vagy túltermelődött receptorokhoz kötődnek.

A hordozóval szemben támaszott főbb követelmények:

- funkciós csoportjaihoz egyéb molekulák egyszerű reakciókon keresztül kapcsolhatók legyenek;
- a hatóanyag hozzákapcsolása után is célspecifikus maradjon, ha rendelkezik felismerőegységgel;
- a hatóanyag biológiai aktivitását ne változtassa meg [52].

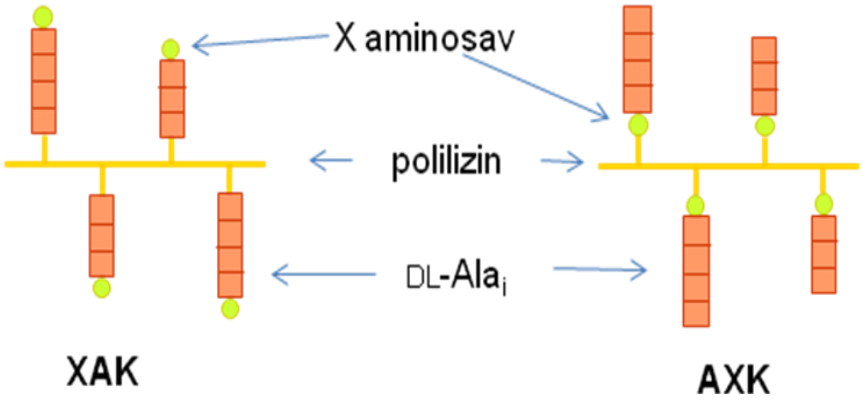
Daganatellenes szerek, melyeket konjugátumokban kipróbáltak: alkilezőszerek (pl. melfalan, ciklofoszfamid), antimetabolitok (pl. metotrexát, 5-fluorouracil), antimitotikumok (pl. taxol), protein-polimer konjugátumok (pl. enzimek), antitumor antibiotikumok (pl. doxorubicin, daunorubicin).

Kutatócsoportunkban metotrexáttal (Mtx) illetve daunorubicinnel (Dau) végeztek vizsgálatokat. A hatóanyagokat különböző oldalláncú elágazó polipeptidekhez kapcsolva hordozófüggő tumorellenes hatást figyeltek meg *in vitro* [54, 55].

2.2.1 Polilizin

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban régóta foglalkoznak elágazó láncú polimerek előállításával, illetve hordozóként történő alkalmazásukkal. Néhány esetben ilyen jellegű hordozót tartalmazó konjugátumokkal vírusneutralizáló ellenanyag termelését is sikerült kiváltani egerekben. Ezenkívül Mtx és Dau hatóanyagokat konjugáltak elágazó láncú polipeptidekhez, amelyek hatékony antiparazita illetve tumorellenes vegyületnek bizonyultak.

Az elágazó láncú polipeptidek gerincét polilizin lánc alkotja [56], az oldalláncok kialakítását pedig kétféle módon végezték (6. ábra). Az egyik esetben először a lizin ε-aminocsoportokon egy rövid DL-alanin oligomer láncot (kb. 3-5 DL-Ala) alakítottak ki, és ennek *N*-terminálisára kapcsoltak egy optikailag aktív aminosavat (XAK) [57]. A másik varinánsban a lizinek ε-aminocsoportjához közvetlenül kapcsolták az optikailag aktív aminosavat és ennek α-aminocsoportján alakították ki az oligo-DL-alanin láncot (AXK) [58]. Az optikailag aktív aminosavak helyzete és típusa jelentősen befolyásolja a polimer térszerkezetét és biológiai tulajdonságait, mint például a szervezetbeli eloszlást. Általában a polianionos és amfoter tulajdonságú polimerek hosszabb ideig maradnak a vérben. Azt tapasztalták, hogy a polikationos, de nagyszámú hidroxilcsoportot is tartalmazó vegyületek (pl. SAK) megközelítik az EAK és Ac-EAK tartózkodási idejét a vérben [59].

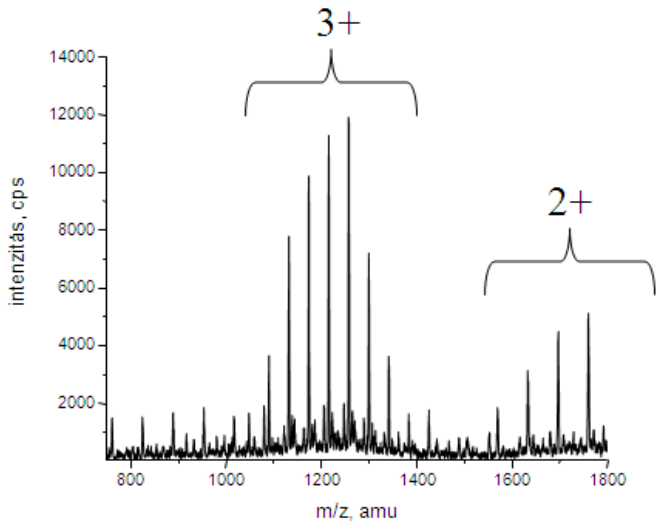


6. ábra: XAK és AXK típusú polimer hordozók felépítése

Mivel a szintetikus antigéneknek hosszabb ideig kell a vérben tartózkodniuk a megfelelő immunfolyamatok beindításához, ezért ezek a hordozók potenciális jelöltek lehetnek. Ezek a hordozók tartalmazhatnak olyan funkciós csoportot vagy csoportokat, amelyekhez közvetlenül (amino-, karboxilcsoportok) vagy módosítás után (pl. klóracetilezés) epitóp peptideket kapcsolhatunk. Az oldalláncokon egy reaktív funkciós csoportot tartalmazó SAK használatakor egyértelműbb reakcióval jobban jellemezhető termékhez juthatunk. A SAK polimer további előnye az EAK polimerrel szemben az igen jó vízoldékonysága. Meg kell azonban jegyezni, hogy az elágazó láncú polipeptidek összetétele nem homogén, és a polimerizációs reakciók (polilizin lánc és az oligo-DL-Ala lánc kiépítése) miatt reprodukálhatóságuk sem problémamentes. Éppen ezért, ha a jól definiált konjugátumokkal legalább azonos biológiai hatást lehet elérni, akkor azok alkalmazása a terápiában előnyt élvezhet. Ez utóbbiak gyógyszerré fejlesztése is jóval egyszerűbb.

A polilizin hordozó méretének, molekulatömegének meghatározását többféle módszerrel végezhetjük, ilyenek a szedimentációs analízis, a viszkozimetra, a gélkromatográfia, a fényszóródásmérés, illetve a tömegspektrometria. Ezek azonban egy anyagra nézve is különböző eredményeket adnak. Ennek elsődleges oka, hogy az alkalmazott standard molekulák (pl. PEG) tulajdonságai nagyban eltérnek a polikationos jellegű polilizinétől. Ezért megfelelő polilizin standardok nélkül a polilizinek átlagos polimerizációs foka, átlagos tömege és polidiszperzitása nem határozható meg elég pontosan. A 7. ábrán egy kereskedelmi forgalomban kapható polimer ESI tömegspektruma

látható. A gyártó által megadott adatok szerint az átlagos molekulatömeg 4000-15000, az átlagos polimerizációs fok pedig viszkozimetriával mérve 40, fényszórással pedig 70. A minta tömegspektrometriás mérésekor alacsony *m/z* tartományban jelentkező csúcsok 3000-4000 Da tartományba helyezték a minta átlagos molekulatömegét, a polimerizációs fok pedig 30-nak bizonyult. A tömegspektrometria alkalmasnak tűnik a tömegeloszlás mérésére, de gyakorlati problémák itt is fellépnek.

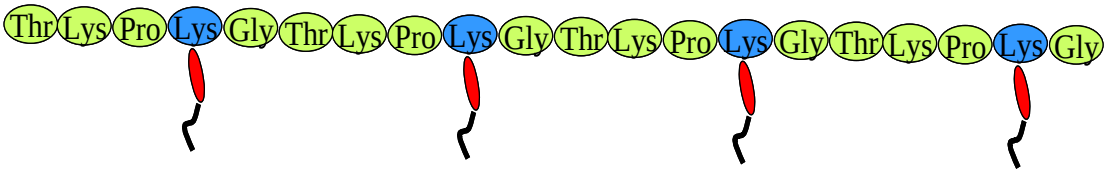


7. ábra: Polilizin minta tömegspektrometriás mérése

A kapott spektrum és a valóság összehasonlítását ezért olyan oligolizin sorozattal akartuk megvalósítani, mely ismert lizintagszámú polimerként fogható fel. A polimerek méreteloszlásának hatását a spektrum profiljára különböző tagszámú oligomerek keverékeivel lehet jellemezni. Gondosan értékelt mérések később is használható mérési sémát biztosíthatnak a polilizinek tömegeloszlásméréséhez.

2.2.2 Oligotuftsin

A Kutatócsoportban hordozóként kifejlesztett és használt oligotuftsin származék a natív tuftsin, a TKPR tetrapeptid kiegészített, és módosított változatának tetramerje (H-[TKPKG]$_4$-NH$_2$).



8. ábra: Oligotuftsin alapú konjugátum sematikus rajza

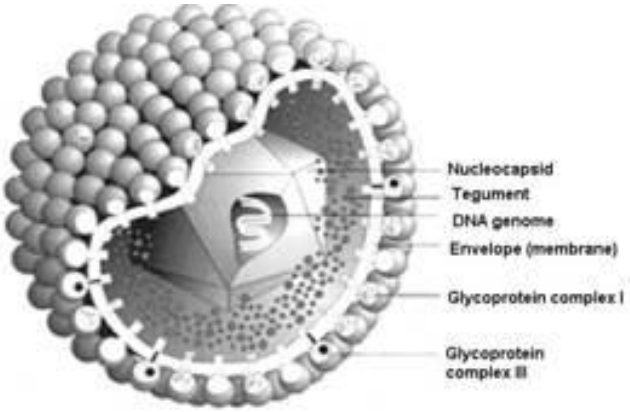
A natív humán tuftsin szekvencia az immunglobulinokban található meg, és enzimatikus hasítás után felszabadulva jelentős szerepet játszik az immunfolyamatokban. Korábbi vizsgálatok [60, 61] bizonyították, hogy ez az oligomer hatékonyabban stimulálja a birka vörösvértestek elleni immunválaszt egérben, mint a monomer. Konjugátumban történő alkalmazását az is indokolhatja, hogy önmaga nem immunogén. A kutyában megtalálható tuftsin annyiban különbözik a natív tuftsintól, hogy a *C*-terminálisán lizint tartalmaz arginin helyett. Ez a csere a biológiai tulajdonságait nem befolyásolja jelentősen. Így a monomerben 2 lizin van jelen, ami lehetővé teszi a több hatóanyag szelektív konjugálását. Ezenkívül a *C*-terminálisra egy glicint építettek be. Ennek magyarázata, hogy nagyobb hordozó lánc felépítése fragmenskondenzációval racemizációmentesen megoldható e szekvencia alkalmazásával. A Gly beépítése mellett szól az a megfigyelés is, hogy a TKPRG pentapeptid fagocitózist stimuláló hatása nagyobb, mint a tetrapeptidé. Ellentétben az általában használt többi olyan kisméretű peptid hordozóval (MAP, SOC), amelyek segítségével jól jellemezhető szerkezetű szintetikus anigéneket lehet előállítani, az oligotuftsin hordozó biológiai aktivitással is rendelkezik, és esetleg ezt a hatást a konjugátumban is megtarthatja. A SOC (sequential oligopeptide carrier) ismétlődő Lys-Aib-Gly szekvenciát tartalmaz és 3_{10}-hélixszerkezet mutat, míg a MAP (multiple antigenic protein) konstrukcióban egy lizin dendrimer szolgáltatja a szükséges számú aminocsoportot az epitópok kapcsolására. Ezekkel a hordozókkal készített konjugátumokat saját kísérleteinkben összehasonlítottuk az oligotuftsinnal, illetve elágazó láncú polipeptiddel készült konjugátumokkal. *In vitro* ellenanyagfelismerési vizsgálatokban nem tapasztaltunk szignifikáns hordozó függő különbségeket [62, 63].

2.3 Szintetikus antigének

Elölt vagy legyengített kórokozókkal történő immunizálás többféle veszélyt rejt magában: előállítási veszélyek, tárolási nehézségek, szennyezők jelenléte, legyengült immunrendszerű betegek megfertőzése, és mellékhatások a kórokozó nem tökéletes legyengítése következtében. Mesterséges vakcinák létrehozásában fontos szerepe van a vírus fehérjeburkának epitópszakaszainak, ezek azok a szekvenciák, melyek az immunválaszt kiváltják, így biztosítva a szervezet védettségét az esetleges fertőzés esetére. Munkám a *Herpes simplex vírus* elleni szintetikus vakcina előállítására irányuló kutatások része volt.

2.3.1 A Herpes simplex vírus biokémiája

A herpeszvírusoknak több, mint száz fajtája ismert, ezek közül nyolcat az emberi szervezetből is izoláltak és jellemeztek [64]. Az Alphaherpesvirinae csoportba tartozó Herpes simplex vírus (HSV) 1-es és 2-es szerotípusa általában enyhe, de zavaró tüneteket okoz (a HSV-1 főleg az arcon, a HSV-2 pedig a genitális szerveken okoz gyulladást [65]). Ezen túlmenően azonban komoly betegségek forrása is lehet: féloldali vakság, agyvelőgyulladás, agyhártyagyulladás. Csecsemők veleszületett fertőzése gyakran korai halált okoz. A HSV mindkét típusának sokféle célsejtje van, hatékonyan szaporodnak, a sejteket gyorsan elpusztítják és látens fertőzést okoznak. A látens fertőzés nem távolítható el a szervezetből, mivel a herpeszvírusok úgy védekeznek az immunrendszer ellen, hogy gátolják a MHC-1 (fő szövet-összeférhetőségi génkomplex) antigént prezentáló folyamatát [66].



9. ábra: A *Herpes simplex virus* felépítése (forrás: http://diaproph.com.ua)

Eddig 11 glikoproteint azonosítottak és legalább részben jellemezték őket. Ezek közül három elengedhetetlen a vírus szaporodásában (gB, gD, gH). Számos glikoprotein funkciója, hogy a vírust a célsejthez kapcsolja és a membrán átjárhatóságát előidézze. Ezek a proteinek felelősek az immunválasz kiváltásáért. Az egyik legjobban jellemzett vírusglikoprotein a D glikoprotein (gD). A gD egy transzmembrán glikoprotein, ennek megfelelően tartalmaz az *N*-terminálison egy szignálszekvenciát és egy hidrofób transzmembrán régiót, valamint a citoplazmában megjelenő *C*-terminálist. Ez a protein az Alphaherpesvirinae csoport összes tagjában megtalálható. A HSV-1 és HSV-2 gD-szekvenciája 86%-ban azonos. A HSV és a többi herpeszvírus glikoproteinjei között is nagy a hasonlóság, ezért egy megfelelő fehérjeszakaszokat tartalmazó szintetikus vakcina felhasználhatósága feltehetőleg nem korlátozódna a HSV említett szerotípusaira.

A gD-fehérjével végzett kutatások azt mutatják, hogy a protein a vírus-gazdasejt adszorpcióban, a vírus célsejtbe juttatásában és a sejtfúzióban játszik szerepet. Megfigyelték, hogy azok a sejtek, amelyek membránjában gD jelenik meg, ellenállónak mutatkozik a HSV-1 ill. HSV-2 fertőzéssel szemben. A gD protein jelentős immunválasz kiváltására képes, ezért a belőle származó megfelelő epitópok alkalmas elemei lehetnek szintetikus vakcináknak [67].

A két szerotípus 369 (HSV-1) és 368 (HSV-2) aminosavat tartalmazó gD fehérjéjében 3 szakasz kötődik specifikusan a gD lánc ellen termeltetett monoklonális ellenanyagokhoz. Ezek az epitópszakaszok a szekvencia 11-19,

268-287 és a 340-356 részleteire terjednek ki [68, 69]. Az antigéndeterminánsként viselkedő peptidszakaszokat szintetikus peptidek segítségével lehet azonosítani. A két szerotípus között a legnagyobb hasonlóságot mutató szekvencia az *N*-terminális (^{1}KYALADASLKMADPNRFRGKDLP^{23} a gD-1 fehérjében) része. Itt csak a 7-es és a 21-es pozícióban van eltérés: a gD-2 szekvenciájában a 7-es pozícióban Pro, a 21-esben pedig Asn található. Ezt az epitóp részt tanulmányozták a legalaposabban. Megállapították többek között, hogy a 9-21 (gD-1) szekvenciájú peptidet marha szérum albuminhoz (BSA) kapcsolva hatékony immunogént lehet előállítani, mellyel szemben vírusneutralizáló ellenanyag termelődik nyúlban. A hatást növelni tudták, ha a fenti poliklonális ellenanyagot a ^{267}ELAPEDPEDSALLED^{281}-BSA konjugátummal szemben termelt ellenanyaggal keverték, amely önmagában nem rendelkezett hatékony vírusneutralizáló hatással [70].

2.3.2 A HSV epitópjának és konjugátumainak biológiai vizsgálata

A D glikoprotein egyik leghatékonyabb antigénje az *N*-terminális 1-23 régiója, melynek az optimális epitópja a 9-21 régió, szekvenciája: ^{9}LKMADPNRFRGKD^{21} [71]. Meg kell jegyeznem, hogy a mi kíséleteinkben a 9-22 szekvenciát (^{22}L beépítésével) alkalmaztuk, hogy elkerüljük a *C*-terminális aszparaginsav-amid szukcinimid-gyűrűzáródását és a gyűrű felnyílását követően aszparaginná alaklulását. A peptid szabad vagy konjugált lineáris származéka antitestek számára felismerhető volt [62], azonban hatékony ciklizált változatot még nem sikerült elkészítenünk [72]. A ciklus stabilabbá teheti az epitóp peptidet az enzimatikus lebomlással szemben, valamint a megfelelő biológiailag aktív konformáció stabilizálásával segítheti az ellenanyagfelismerést. Korábbi kísérletek során úgy alakítottunk ki ciklust a peptidben, hogy a 11-es pozíciójú metionint homociszteinre cseréltük (mely oldalláncában a kénatom pozíciója megegyezett a metioninnal), és a 18-as arginint pedig lizinre, melynek ε-aminocsoportját klóracetilezéssel tettük alkalmassá a cikluszáráshoz. A két módosított aminosav között hoztuk létre a

ciklust tioéter-kötés kialakításával. Ezeknek a származékoknak a kötődése A16 monoklonális ellenanyaghoz három nagyságrenddel csökkent a lineáris peptidhez képest. További vizsgálatok azt mutatták, hogy a ciklus mérete (akár egy Hcy → Cys csere folytán is [72]) jelentősen befolyásolja a vegyület ellenanyag felismerését. A nem megfelelő konformáció kimerevítése a ciklopeptidekben teljesen elronthatja a biológiai hatást. A lineáris peptid különböző hordozókhoz (SAK, T20, SOC, MAP) kötve egy nagyságrenddel jobban kötődött az ellenanyaghoz, mint a nem konjugált lineáris peptid [62]. A diszulfidhíddal összekapcsolt dimerek (a $[Cys\text{-}9\text{-}22]_2$ és $[9\text{-}22\text{-}Cys]_2$) esetén pedig az epitóphoz képest nagyobb kötődés volt elérhető, körülbelül akkora, mint a tetratuftsin-konjugátummal. A kísérleti tapasztalatok alapján nagy tagszámú ciklopeptidek és ezek konjugátumai, dimerjei kecsegtethetnek jobb eredményekkel.

Immunválaszt erősítő promiszkuis peptidek

Az immunrendszer jellemzője a sejtes immunválasz (T-sejtek) és a humorális immunválasz (B-sejtek) együttműködése. Antigén-stimulációra a B-sejtek plazmasejtekké érnek, és glikoproteineket termelnek, ezek az antitestek. Minden B-sejt egyedi antitest molekulát termel, amelyek a sejt felszínén találhatók. Ha az antigén megjelenik a szövetekben, a B-sejt receptora felismeri, majd MHC (major histocompatibility complex, fő szövet-összeférhetőségi génkomplex) molekulák közvetítésével az antigén epitópot prezentálja a T-sejteknek, amelyek csak a prezentált epitópokról ismerik fel az antigént. A T-sejtek növekedési hormon szekrécióját serkenti ezután a B-sejtek osztódását, melyek nagy mennyiségű ellenanyag termelésével kezdik meg a kórokozó eltávolítását.

Szintetikus immunogének hatékonysága nagyban függ azok összetettségétől, például ha B-sejt epitópok és T-sejt epitópok is megtalálhatók egy hordozó molekulán, melyek összekötik a MHC-t a T-sejt receptorral, jobb immunogénnek bizonyultak [73, 74]. Így a genetikailag kontrollált B-sejt segítő T-sejteket (helper T-sejt) lehet közvetlenül aktiválni.

Mivel egy oligopeptid epitóp önmagában ritkán vált ki hatékony humorális immunválaszt, célszerű általános immunválaszt erősítő hatású anyagokkal kombinálni. Több kutató is megállapította, hogy a tetanus toxinból, a kanyaróvírusból stb. származó, ún. promiszkuis T-sejt epitópok általános immunogenitással rendelkeznek [75, 76].
A tetanus toxoid (TT) ^{593}YSYFPSV^{599} szekvenciáját kovalens kötéssel kapcsolták szekvenciális oligopeptid hordozóhoz (sequential oligopeptide carrier, SOC), és hatását vizsgálták nyulakban és egerekben [77, 78]. A kísérletek alátámasztották, hogy a promiszkuis peptidepitóp segít a T-sejtek közvetlen akiválásában.

2.4 Irányítómolekulák alkalmazása, gyógyszerszállító rendszerek a tumor terápiában

A célzott terápia lényege, hogy a hatóanyagot lehetőleg szelekíven a célsejthez/célsejtbe juttassuk. Ezt általában úgy oldják meg, hogy a hatóanyagot közvetlenül vagy egy hordozón keresztül irányítómolekulához kapcsolják. Ezek az irányító molekulák szelektíven kötődnek sejtfelszíni receptorokhoz. Ezután a hozzájuk kapcsolt gyógyszert receptor által közvetített endocitózissal bejuttatják a sejtbe ahol a lizoszomális enzimek hatására a konjugátum lebomlik és a felszabaduló hatóanyag kifejtheti hatását. Ilyen irányítómolekulák lehetnek pl. cukrok, lektinek, ellenanyagok, hormonok és egyéb receptorligandumok (pl. kemotaktikus peptidek). Hordozó molekulaként alkalmaznak PEG-et [79], oligo- és polipeptideket, de irányítómolekulával funkcionalizált liposzómákat is [80]. A konjugátum szerepei közé tartozhat, hogy javítsa a gyógyszer oldékonyságát, biodisztribúcióját, kontrollálja felszabadulását, és specifikussá tegye a beteg szövetekre nézve [81].

2.4.1 Kemotaxis

A kemotaxis alapvető sejtélettani folyamat, mely a célsejteknek egy ligand által kiváltott migrációs válasza. Kiváltásában többféle receptorcsalád is szerepet játszik, ezen receptorok között különlegesek az ún. kemokin receptorcsaládok, melyek számos fluid fázisban lévő, így mozgásra képes sejt felszínén megtalálhatók, és specifikus denzitásuk révén azok mozgását eltérő módon szabályozzák [82]. A folyamatokat azonban nemcsak a receptor-családok határozzák meg, hanem a rendelkezésre álló ligandokkal (pl. citokinek, kemokinek) egységben értelmezhető a kemotaxis szignalizációs háttere.

A ligand, hatásától függően lehet kemorepellens illetve kemoattraktáns. A ligand kemoattraktáns, ha hatására a sejtek a ligand felé mozdulnak el, kemorepellens akkor, ha a ligandtól eltávolodnak. A legalapvetőbb fiziológiai jelenségeknél megfigyelhető a ligand-receptor kölcsönhatások e típusai, például a megtermékenyítés, őssejtek vándorlása, érképződés esetén.

Patológiás folyamatokban is ugyanez a jelenség figyelhető meg (gyulladás, metasztázis képződés), ilyen esetekben fontos szerepet játszhatnak olyan szintetikus ligandok, melyek képesek visszaállítani a fiziológiás állapotokat lokálisan nem termelődő kemoattraktánsok esetében, vagy repellens tulajdonságuk révén a metasztatizáló sejtcsoportok terjedését gátolhatják [83].

Kemotaktikus ligandumok lehetnek peptidek is. Azok, amelyek bizonyos sejtekre attraktánsként hatnak, felhasználhatók olyan konjugátumok kifejlesztésésben, ahol a kemotaktikus peptid az irányító (targetáló) molekula. A gyógyszerhatóanyagot is tartalmazó molekula így specifikus sejtreceptorokhoz kötődő egységgel bővíthető ki, és a célbajuttatás sokkal szelektívebb lehet. Ilyenek például az *N*-formilmetionil tartalmú bakteriális metabolitpeptidek, melyek neutrofilek számára kemoattraktánsak [84, 85]. Ezek sztereospecifikus receptorának jelenlétét a célsejtek felületén igazolták is [86]. Az aktivitás megtartásához a formil-csoportra feltétlen szükség van, ám a *C*-terminális szabadon módosítható, így ez lehetőséget ad arra, hogy különböző vegyületekben alkalmazzuk őket [87, 88]. Az egyik legaktívabb

kemotaktikus peptid a formil-Met-Leu-Phe-OH. A metionin norleucinra történő cseréje, mely az oxidációra hajlamos oldallánc kiküszöbölését jelenti, sem okozza a kemotaktikus aktivitás szignifikáns csökkenését [89, 90].

Sejtfiziológiai és hormon-receptor vizsgálatok kedvelt modellje a *Tetrahymena pyriformis* csillós egysejtű, mivel felismerő és intracelluláris jeltovábbító rendszere sok tekintetben hasonlóságot mutat a törzsfejlődés magasabb szintjén álló élőlényekével. Számos kutatás igazolta, hogy képes felismerni gerincesek által termelt hormonokat is (inzulin, adenokortikotróp hormon, β-endorfin, stb.) [91-93]. A sejtek kemotaxisának célja általában a hasznosítható molekulák bekebelezése. Környezetében található különböző kémiai anyagok alacsony koncentrációban (10^{-12}-10^{-6}M) befolyásolják a gyors helyváltozatatásra képes sejt mozgásának irányát. Egyszerű vizsgálati módszerekkel könnyen értelmezhetjük a kemotaktikus anyagok hatását.

2.4.2 A GnRH biokémiai szerepe és alkalmazása tumorterápiában

A gonadotropin felszabadulását serkentő hormon (GnRH), vagy másként a luteinizáló hormont serkentő hormon (LHRH) a hipotalamuszban képződő dekapeptid. Gonadotrop hormonok (FSH, LH) szekrécióját szabályozza, melyek a növekedést, nemi érést és szaporodási folyamatokat szabályozzák [94]. Az emberi szervezetben kétféle GnRH peptid, a GnRH-I (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2) és a GnRH-II (Glp-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH_2) is megtalálható, szekvenciájuk 70%-ban megegyezik, de más gén kódolja azokat [95]. Az utóbbinak az agyban neurotranszmitter/neuromodulátor szerepet tulajdonítanak, de szerepe a perifériás szövetekben, ahol nagy mennyiségben fordul elő, még nem tisztázott.

Megfigyelték, hogy nagy dózisban a GnRH vagy agonista analógjai érzéketlenítik a gonádokat. Ezt a jelenséget széles körben alkalmazzák hormon-függő megbetegedések kezelése során, ugyanis ilyenkor leáll az LH és FSH szekréció, a petefészek-, és here funkciók (kémiai kasztráció), amelyek nem termelnek ezáltal szteroid hormonokat, és ennek eredményeként

a hormon-függő tumor növekedése csökken [95-97]. Hasonlóan indirekt tumorellenes hatást mutatnak azok a GnRH antagonista vegyületek, amelyek a hipofízisben a gonadotrop sejteken lévő GnRH receptorokhoz kötődve gátolják a természetes GnRH hatásának kifejtését, ezáltal szintén blokkolva az LH és FSH szekréciót. Azonban azt is kimutatták, hogy a GnRH származékok nem csak indirekt módon tudják gátolni a tumornövekedést, hanem közvetlenül a tumorsejteken található GnRH receptorokon keresztül direkt módon is. Így hatásosak lehetnek nem szteroid hormon-függő tumor fajtákon is. A GnRH-I receptorok lassan deszenzibilizálódnak és internalizálódnak, ezzel magyarázható, hogy a μmol-os koncentrációban adagolt GnRH analógok sokáig kapcsolódnak a receptorokhoz, és több szignáltranszdukciós útvonalon is érvényesítik sejtszaporodást gátló hatásukat [98]. Mivel a legtöbb egészséges szövet nem expresszál GnRH receptorokat (néhány szerv pedig - a prosztata, herék, petefészek - nagyon kis mértékben [99, 100]), ezt a különbséget jól felhasználhatjuk az irányított tumorterápiában.

Az elmúlt 30 évben több mint 3000 GnRH származékot állítottak elő, amelyek többsége GnRH-I agonista illetve antagonista származék. Számos vegyület bizonyult fontos klinikai eszköznek a nőgyógyászatban és az onkológiában. A tumorterápiában legáltalánosabban használt GnRH-I analógok a Triptorelin: [D-Trp^{6}]GnRH; Leuprolide, [D-Leu^{6} ,Pro^{9}-NHEt]GnRH; Buserelin: [D-Ser(^{t}Bu)^{6}, Pro^{9}-NHEt]GnRH (szuper agonistak) és Cetrorelix, Ganirelix, és az Abarelix (szuper antagonisták) [95].

Tumoros sejteken nagy koncentrációban expresszálódnak peptidhormon receptorok, például a szomatoszatin, bombezin és a GnRH [101, 102] receptorai. Ezek a receptorok citotoxikus anyagokhoz kötött peptidligandok célpontjai lehetnek, amelyek a specifikus kötődésük révén növelik a rákos sejteknél a gyógyszerkoncentrációt. Az irányított tumorterápia esetén azonban nem célszerű olyan peptideket alkalmazni, amelyeknek nagy endokrin hatása is van. Ezért az utóbbi időben olyan GnRH analógok irányába fordult a kutatók érdeklődése, amelyek alacsony endokrin hatás mellett jelentős tumorellenes hatást mutatnak [103-105]. A nagy tengeri ingolából (*Petromyzon marinus*)

származó GnRH–III (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH_2) az egyik alkalmas analóg, amely a GnRH receptorok I és II típusához is kötődik [106]. A humán GnRH-tól az 5-8 szakaszban tér el, és elhanyagolható endokrin hatása van emlősökben, a luteinizáló hormont serkentő hatása 500-1000-szer kisebb, mint a humán GnRH-é [107, 108]. Daganatos sejteket vizsgálva azt tapasztalták, hogy különböző humán (emlő-, prosztata-, vastagbél- és endometrikus) daganat esetén is jelentősen gátolta a sejtek szaporodását *in vitro* [109-111].

A GnRH-III további előnye a jelentős antitumor hatást mutató D-aminosavat tartalmazó GnRH származékokkal szemben, amelyek ödémásodást okozhatnak, hogy csak L-aminosavakat tartalmaz [112]. A 8-as pozíciójú lizin nem tölt be fontos szerepet a tumorellenes hatás szempontjából [105], ezért az oldallánc módosításával lehetőségünk nyílik hordozó vagy egyéb molekulához való kapcsolásra.

3 Célkitűzések

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban már a nyolcvanas évektől foglalkoznak polilizin gerincű elágazó láncú polipeptid hordozók és konjugátumaik előállításával, valamint kémiai és biológiai sajátságaik vizsgálatával. A csoportban kifejlesztett oligotuftsin hordozó alkalmazhatóságának kiterjesztéséhez kapcsolódó munkát a doktori iskola évei alatt folytattam. Ezen hordozók alkalmazása a kapcsolódási pont a munkámban megjelenő, olykor teljesen eltérő hatású biokonjugátumok tervezésében.

A tervezett konjugátumok hatására vonatkozó elméletet nem mindig igazolja a tapasztalat, ezért folyamatos visszacsatolással zajlik a konjugátumok fejlesztése, hatásosabbá tétele. Az *in vitro* kísérletek jelentik az egyik fontos lépést ebben a fejlesztésben, tehát a biológusokkal való szoros együttműködés kulcsfontosságú. A dolgozatom célkitűzéseiben is egy ilyen folyamatos visszacsatolásra épülő nagyobb és hosszabb távú kísérletsorozat részelemei fogalmazódnak meg.

A Kutatócsoportban gyakran használt elágazó láncú polipeptidek gerincét alkotó polilizin polimer pontos minőségi jellemzése nem megoldott, ezért célul tűztem ki, hogy szintetikus lizin oligomer standard sorozatot állítsak elő, és tömegspektrometriás vizsgálatával kidolgozzunk egy analitikai módszert a polilizinek átlagos molekulatömegének és tömegeloszlásának meghatározására.

A polimerek mellett, melyek szerkezete nem mindig jól definiálható illetve szintézisük nem jól reprodukálható, olyan oligopeptid hordozót is kívántam használni kísérleteimben, melyhez molekulák széles választékát kapcsolhatom. Munkámban a tetratuftsin hordozót választottam ki erre a célra.

Munkám fő célkitűzése az volt, hogy hatékony szintetikus antigént állítsak elő a Herpes simplex virus 1-es típusának D glikoprotein (HSV gD-1) epitóp szakaszából, amely alkalmas jelölt lehet a HSV elleni szintetikus vakcina előállításában.

Ciklikus epitóp peptidek előállításával kívántam stabilabb térszerkezetű, egyben a lineáris molekulákhoz képest enzimrezisztensebb vegyületet készíteni.

Mivel korábbi tapasztalataink alapján a lineáris epitópokkal készített dimerek jobb ellenanyagfelismeréssel rendelkeznek, mint a monomerek, ezért a ciklopeptidekből is terveztem dimer származékok előállítását.

Hasonlóan korábbi kísérleteinkhez, amelyekben a lineáris HSV epitópokat hordozókhoz kapcsoltuk, a ciklopeptid epitóp származékok oligotuftsin hordozóhoz történő kapcsolását és az előállított konjugátum vizsgálatát is terveztem.

A kapott biológiai eredmények alapján olyan lineáris és ciklikus HSV epitópot tartalmazó konjugátumok előállítását terveztem, amelyek a HSV epitóp mellett promiszkuis T-sejt epitópot is tartalmaznak a hatékonyabb immunválasz kiváltása érdekében.

Doktori munkám másik jelentős részét tette ki az irányított tumorterápiában hasznosítható biokonjugátumok előállítása. Ennek keretében olyan receptorfelismerő egységet tartalmazó konjugátumok szintézisét terveztem, amelyekben az oligotuftsin típusú hordozóhoz olyan peptideket kapcsolok, amely szelektív sejtbejuttatást eredményezhet.

Az egyik esetben kemotaktikus peptideket terveztem kapcsolni tetratuftsin származékra, illetve olyan modellvegyület előállítását terveztem, amely alkalmas lehet hatóanyag kemotaxison alapuló célbajuttatására.

A konjugátumok töltésviszonyainak hatását a kemotaxisra is vizsgálni kívántam.

Az előállított biokonjugátumok kemotaktikus hatását *Tetrahymena pyriformis* csillós egysejtűn és THP-1 tumoros monocita sejteken terveztem tanulmányozni.

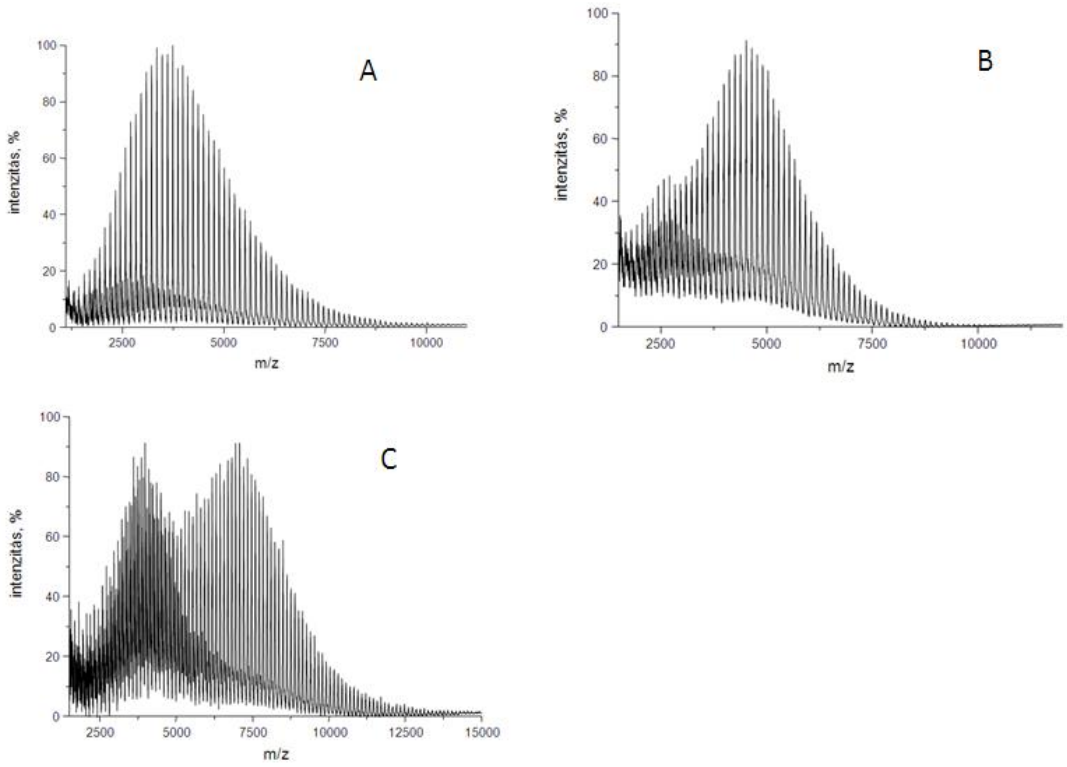
Egy másik kísérletsorozatban az önmagában is antiproliferatív hatással rendelkező GnRH-III hormonpeptidet kívántam kapcsolni a tetratuftsin származékhoz. Ezáltal egy olyan célbajuttató konstrukciót állíthatunk elő, amelynek önmagában is van tumorellenes hatása. Vizsgálni kívántam a konjugáció típusának hatását a vegyületek antiproliferatív hatására.

4 Eredmények

4.1 Oligolizin standard sorozat előállítása és tömegspektrometriás vizsgálata

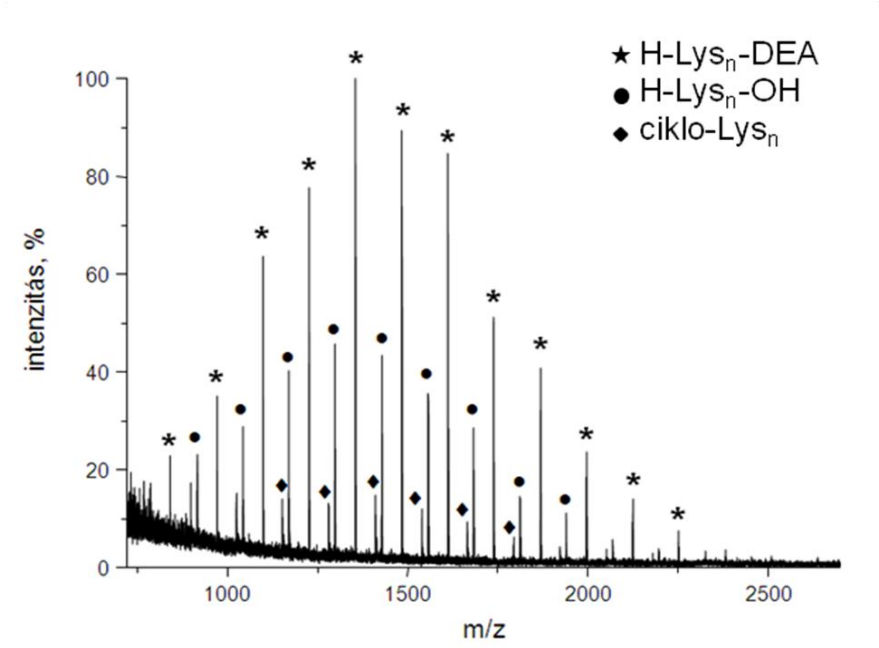
Jelen munkánk célja olyan oligolizin peptidek szintézise és tömegspektrometriás vizsgálata volt, amelyek a vizsgált tömegtartományban referenciaként alkalmazhatók poli-(L-lizin) polimerek analitikai jellemzésére. Vásárolt különböző átlagos molekulatömegű polilizinek segítségével először meghatároztuk azokat a tömegspektrometriás körülményeket, melyek alkalmasak a polimer polilizinek vizsgálatára. A poli-(L-lizin) polimer mintákat három különböző mátrixvegyület felhasználásával teszteltük: α-ciano-4-hidroxifahéjsav (CCA), 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fahéjsav (szinapiksav, SA) és 2,5-dihidroxi-benzoesav (DHB); ezek a vegyületek a leggyakrabban alkalmazott mátrix típusok peptidek és fehérjék MALDI-TOF analízisére, széles *m*/*z* tartományban. A DHB mátrix esetében a polimerek protonált molekulaionjai csak alacsony *m*/*z* tartományban detektálhatók, körülbelül *m*/*z* 2000-ig. SA mátrix használata esetén nem lehetett a polimernek megfeleltethető ionokat detektálni a spektrumokban. CCA mátrix alkalmazásakor azonban az intakt polilizin molekulák intenzív protonált molekulaion csúcsait kaptuk, jól definiált megoszlásban. A 10. ábra különböző tömegeloszlású polimerek CCA mátrixban mért spektrumait mutatja be.

A vártnak megfelelően magasabb átlagos molekulatömegű polimerek magasabb *m*/*z* értékeket adtak. Kétszeresen töltött molekulaionok jól elkülöníthető ioneloszlást mutattak alacsony *m*/*z* régióban. Relatív intenzitásuk az egyszeresen töltött ionokhoz képest növekszik a polilizin molekulatömegével. A polimerekből 15000-18000 *m*/*z* értékig kaptunk detektálható ionokat lineáris MALDI spektrum felvételekor. Alacsony molekulatömegű polilizinek esetén a detektált molekulatömeg eloszlás megfelelt a gyártó által megadott tartománynak, azonban növekvő molekulatömeg esetén a MALDI mérések jelentősen kisebb molekulatömegeket mutattak.



10. ábra: Különböző tömegeloszlású polimerek MALDI spektruma, átlagos molekulatömeg A: 5-10 kDa, B: 10-20 kDa, C: 20-30 kDa, koncentráció: 1 mg/ml, készülék: Voyager DE-Pro

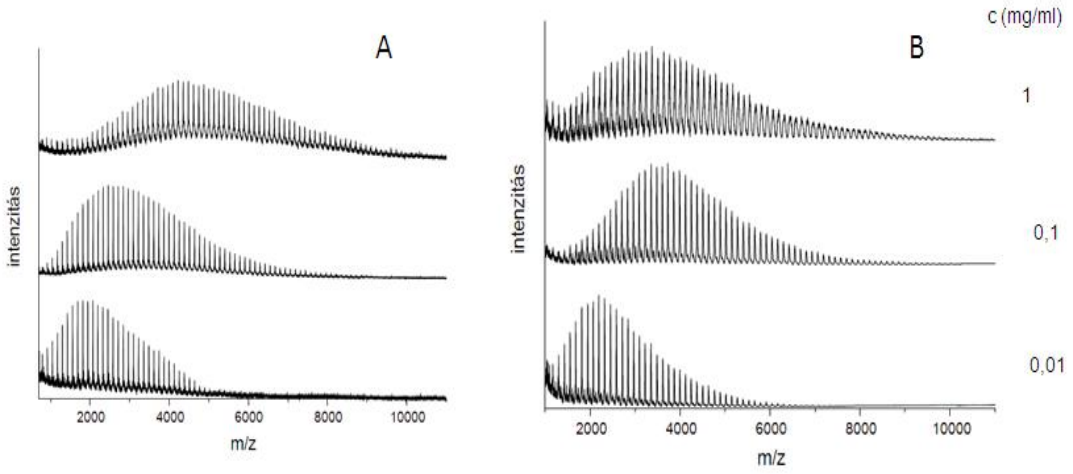
A kereskedelmi mintákon kívül saját laboratóriumunkban korábban előállított polilizin polimereket is vizsgáltunk, hogy azonosítsuk az esetleges melléktermékeket, és egy minőségellenőrző módszert dolgozzunk ki MALDI-TOF spektrométerre. A polimerek jól jellemzett *m*/*z* eloszlást mutattak, a protonált molekulaionok spektrumának felbontása megfelelő, a különböző típusú ionok a spektrumokban jól elkülönülnek lineáris üzemmódban is. A polipeptid ionok esetleges fragmentációját nem figyeltük meg. Reflektron tömeganalízis üzemmódban a mérések felbontása javult, és alapvonalig elváló izotópcsúcsokat is megfigyelhetünk. A mért molekulatömeg ismeretében az ismétlődő egységek mennyisége és végcsoportok típusa pontosan meghatározható. A 11. ábra alacsony molekulatömegű polilizin minta reflektron üzemmódban felvett MALDI-TOF spektrumát mutatja be.



11. ábra: Alacsony molekulatömegű polilizin minta spektruma, készülék: Voyager DE-Pro, reflektron üzemmód

Ebben az esetben háromféle protonált molekulaion független sorozatát detektáluk. Az első sorozathoz a *C*-terminálison dietilamidot tartalmazó polilizin molekulákat rendelhetjük hozzá (dietilamint használtunk a Lys(Z)-NCA polimerizációjának iniciálására). A másik két, alacsonyabb intenzitású sorozat a polimerizáció melléktermékeihez tartozik. A molekulatömeg alapján az első melléktermék a *C*-terminálisán szabad karboxilcsoportot tartalmazó polimer, amelynek jelenléte a polimerizációs elegyben nyomokban található víznek tulajdonítható, ami szintén iniciátorként viselkedik. A másik melléktermékcsoportot pedig egy molekula víz kilépésével keletkezett termék, valószínűleg ciklussá záródott polilizinek alkotják. Megfigyeltük azt is, hogy a spektrumok jeleloszlása a minta koncentrációjától is függ. A 12. ábrán mutatom be a polilizin minta három különböző koncentrációjú (0,01; 0,1 és 1 mg/ml, ~0,08-8 pmol/μl koncentráció tartomány) oldatának MALDI spektrumát. A molekulaionok tömegeloszlása jelentősen szélesebb tartományba húzódik szét, és magasabb *m*/*z* értékek felé tolódik el a minta koncentrációjának növekedésével. Alacsonyabb tömegeknél az ionintenzitás csökken, míg a magasabbak intenzitása jelentősen nő az oldat töménységének növelésével. Hasonló eredményeket kaptunk egy másik típusú MALDI-TOF

tömegspektrométer alkalmazásával is, de utóbbi esetben nem tolódott el annyira az eloszlási görbe maximuma. Az eredmények azt jelzik, hogy anomáliák erőteljesen befolyásolhatják a detektált tömegeloszlást. Az összes vizsgált polimerben hasonló jelenséget tapasztaltunk.

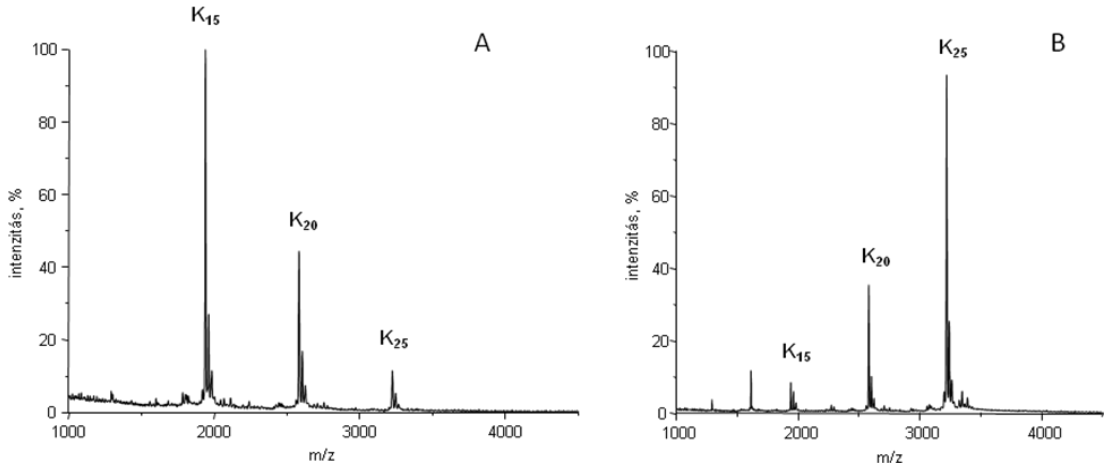


12. ábra: Különböző koncentrációjú polilizin-minták MALDI spektruma két különböző MALDI-TOF tömegspektromérrel mérve, A: Bruker Biflex, B: Voyager DE-Pro

A tömegspektrometriás mérési módszer kidolgozásához és optimalizálásához ismert összetételű polimerelegyet terveztünk, melynek összetevői oligolizin sorozat tagjai. A sorozat minden tagja 5 lizin egységgel nagyobb, mint a sorozat előző tagja. Az alapegységet, egy pentalizin származékot, szilárd fázisú lépésenkénti peptidszintézissel állítottam elő 2-klór-tritilklorid gyantán, az Fmoc technika szintézisprotokolljával. A peptideket Fmoc-Lys(Boc)-OH egységekből építettem fel. A 2-klórtritil-klorid gyantáról híg savas kezeléssel (AcOH-MeOH-DCM 2:2:6 V/V/V arányú elegyével) úgy lehet hasítani a pentalizin származékot, hogy mind az α- mind az ε-aminocsoportokon védett maradjon, míg a *C*-terminális szabad formában, karbonsavként álljon rendelkezésre. A védett pentapeptid fragmenst azután egy másik peptidgyanta részlethez kapcsoltam konvergens szilárd fázisú peptidszintézissel. Így egyszerre 5 lizinnel növeltem az épülő peptidlánc hosszát. A kapcsolást BOP és HOBt kapcsolószerekkel végeztem. A gyanta osztását és a pentalizin kapcsolását egymás után többször is elvégeztem, így 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 aminosav hosszúságú oligomereket állítva elő. A növekvő lánc oldhatósági

problémáit (nagy térigényű Fmoc- illetve Boc csoportok) a különböző oldószerek (DMF, DCM, EtOH) elegyének összetételével lehetett kezelni. Az elkészült peptidet az Fmoc-csoport piperidines hasítása után 95% TFA-val távolítottam el a gyantáról a Boc-csoportokkal együtt. A peptideket azután RP-HPLC-vel tisztítottam, C18 töltetű oszlopon. A mintában maradó TFA eltávolítására, mely jelentősen zavarja az MS méréseket, kétszer híg sósavból is liofilizáltam a termékeket.

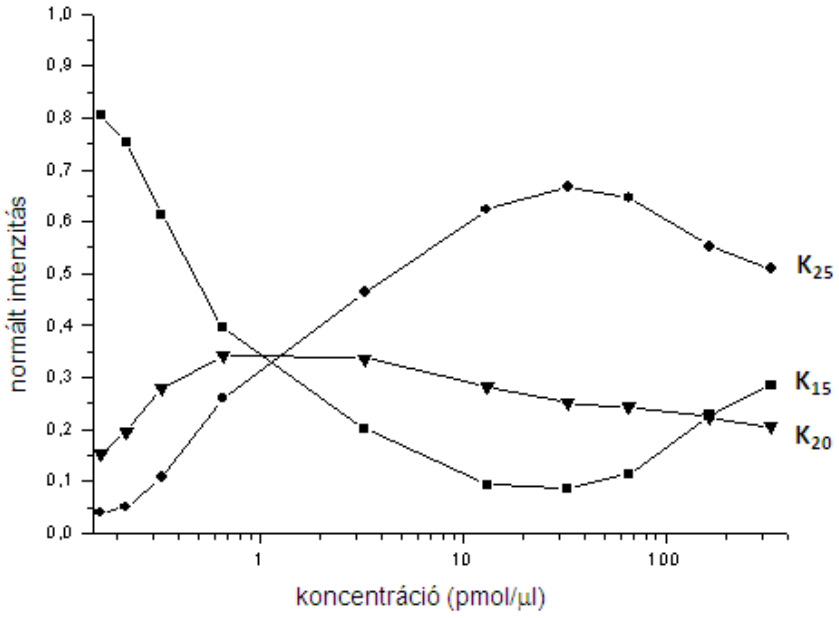
A tömegspektrometriás mérésekhez a különböző hosszúságú peptideket ekvimoláris mennyiségben kevertük össze, és az ebből készült különböző koncentrációjú oldatokat elemeztünk Bruker Biflex MALDI-TOF készülékkel, annak érdekében, hogy a molekulatömeg-eloszlás meghatározása során észlelt anomáliát tisztázni tudjuk. A 13. ábra két különböző koncentrációjú oligolizin-keverék spektruma (egy oligolizin hosszúságát a lizin egybetűs rövidítése (K) után írt szám jelzi).



13. ábra: K_{15}, K_{20} és K_{25} oligolizinek keverékének MALDI spektruma. A: c(peptid)=0,2 pmol/μl, B: c(peptid)=13 pmol/μl, készülék: Bruker Biflex

Az elegybe 15, 20 és 25 lizintagszámú oligomereket tettünk. A kísérleti körülmények között a peptidek relatív intenzitása nem felelt meg a valós molarányuknak, és a peptidek koncentrációjának változása drámai hatást okozott a protonált molekulaionok relatív intenzitásában. A legalacsonyabb vizsgált koncentrációjú minta esetén (0,2 pmol/μl az egyes komponensekre nézve) az alacsony molekulatömegű oligomernek nagyobb az intenzitása, a koncentráció növelésével azonban a magas molekulatömegű komponensek

intenzitása nagyobb mértékben nő. Bizonyos koncentráció fölött az oligomerek intenzitásaránya megfordul (14. ábra). Ez a jelenség mindkét általunk alkalmazott MALDI-TOF tömegspektrométer esetén megfigyelhető volt, bár az AB Voyager esetén a relatív intenzitások változása nem volt annyira szignifikáns, mint a másik készüléken. A relatív intenzitás változása a mintakoncentráció függvényében azonban független az oligolizin peptidek méretétől és az elegy komponenseinek számától. Fontos megemlítenünk még azt is, hogy a koncentráció hatása az intenzitásra különösen szignifikáns abban a koncentrációtartományban, amelyben a peptidek és fehérjék analízise rutinszerűen történik (0,1-10 pmol/μl) (14. ábra).



14. ábra: K_{15}, K_{20} és K_{25} oligolizinek normált intenzitása a koncentráció függvényében, készülék: Bruker Biflex

Az eredmények szerint a MALDI-TOF tömegspektrometria alkalmas a polilizin polimerek analitikájára. A polimerek összetétele (mérettartomány, polidiszperzitás) és szerkezete megállapítható, és a lehetséges melléktermékek is azonosíthatók. Azonban a koncentrációfüggés limitálhatja a MALDI-MS alkalmazhatóságát a molekulatömegeloszlás pontos meghatározására.

4.2 HSV epitóp ciklizált származékai és konjugátumai

4.2.1 Ciklopeptidek, dimerek és konjugátumok szintézise

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban elkezdett tudományos diákköri munkámat szakdolgozat követte, mindkettőben a *Herpes simplex virus* epitópjaihoz kapcsolódó kísérletekről számolhattam be. Ciklopeptidek és konjugátumok szintézise és térszerkezeti, biológiai vizsgálata vezetett el nagytagszámú ciklopeptidek tervezéséhez. A korábbi kísérletekben különböző hordozókhoz kötött HSV gD-1 9-22 epitóp ellenanyagfelismerését vizsgáltuk [62]. Bár nem tapasztaltunk szignifikáns hordozófüggő különbségeket a konjugátumok között, a további munkához az általunk kifejlesztett jól jellemezhető és immunstimuláló hatással rendelkező tetratuftsin-származékot választottuk. A munkámban nagytagszámú ciklopeptidek, ezek dimerjeinek illetve tetratuftsinszármazékkal képzett konjugátumainak szintézisét végeztem el. A kötődésvizsgálatokat holland partnerünk (Dr. Sytske Welling-Wester és munkatársai, Groningeni Egyetem) végezte el, röviden ezek eredményeit is ismertetem.

Az alábbi vegyületek előállítását valósítottam meg munkám során:

1a ClAc-LKMADPNRFRGKDLAhxC-NH_2

2a ClAc-AhxLKMADPNRFRGKDLAhxC-NH_2

3a ClAc-LKMADPNRFRGKDLAhxCAhxGFLGC(Acm)-NH_2

4a ClAc-LKNleADPNRFRGKDLAhxCAhxGFLGC(Acm)-NH_2

5a ClAc-LKMADPNRFRGKDLAhxKAhxC-NH_2
Ac-C(Acm)GFLG

6a ClAc-LKNleADPNRFRGKDLAhxKAhxC-NH_2
Ac-C(Acm)GFLG

1 CH_2CO-LKMADPNRFRGKDLAhxC-NH_2

2 CH_2CO-AhxKMADPNRFRGKDLAhxC-NH_2

3 CH_2CO-LKMADPNRFRGKDLAhxCAhxGFLGC(Acm)-NH_2

4 CH_2CO-LKNleADPNRFRGKDLAhxCAhxGFLGC(Acm)-NH_2

5 CH_2CO-LKMADPNRFRGKDLAhxKAhxC-NH_2
Ac-C(Acm)GFLG

6 CH_2CO-LKNleADPNRFRGKDLAhxKAhxC-NH_2
Ac-C(Acm)GFLG

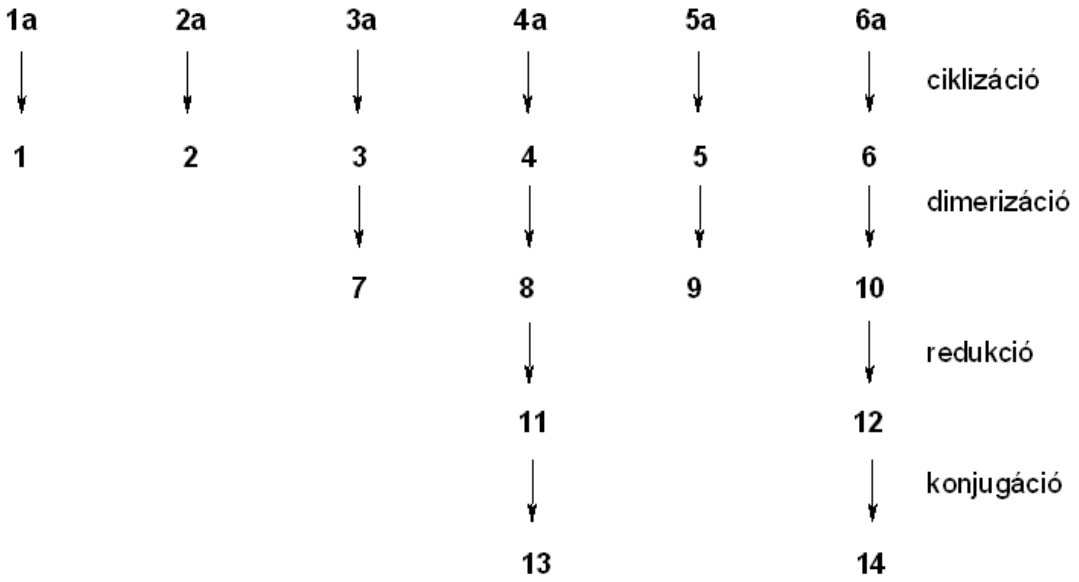
15. ábra: HSV gD-1 9-22 epitópjának származékai

Az **1a-6a** anyagok voltak az ún. lineáris prekurzormolekulák az **1-6** vegyületek előállításához. Ezeket a ciklopeptideket használtam fel utána dimerizációs és konjugálási reakciókban (**7-14** struktúrák). A promiszkuis peptiddel bővített konjugátum elkészítéséhez a **6** számú vegyületet vettem alapul.

A korábban vizsgált ciklopeptidekhez képest [72] az újonnan tervezett ciklusok jelentősen nagyobb méretűek. A 9-22 epitóp szakaszhoz egy (**1**, 55 atomos ciklus) vagy két 6-aminohexánsav (Ahx) (**2**, 62 atomos ciklus) egységet építettünk be az epitóp *C* illetve mindkét terminálisára. Noha a Met → Nle csere a korábbi vizsgálatokban megengedhetőnek bizonyult, terveztünk metionin és norleucin tartalmú ciklopeptideket is, hogy minden kétséget kizáróan bizonyítsuk az ellenanyagfelismerés megmaradását ilyen méretű konstrukciók esetén is. A tioéter-kötésű gyűrűt minden esetben a szekvencia *C*-terminálisára kapcsolt cisztein tiolcsoportja valamint az *N*-terminális klóracetil-csoport közötti reakcióval alakítottam ki (**1a-6a** → **1-6**). A ciklodimerek szintézisében ortogonális cisztein oldalláncvédelemre volt

szükség, hogy a dimerizációban résztvevő cisztein védett maradjon a ciklizálási reakció alatt. A Cys(Acm) aminosavszármazék a szintézis és hasítás körülményei között stabil, ugyanakkor a dimerizációs reakcióban az Acm csoport egyidejűleg lehasad. A dimerek és konjugátumok létrehozásához távolságtartó és az enzimatikus hasításnak helyt biztosító GFLG „spacer" szekvenciát vagy a főláncba (**3a, 4a**), vagy a 9-22 szekvenciát megtoldó lizin oldalláncába építettem be (**5a, 6a**). Ezen utóbbiak esetében egy Ahx-Lys-Ahx-Cys szekvenciát illesztettem az epitóp peptid *C*-terminálisára, ami tartalmazta az elágazáshoz szükséges funkciós csoportot (lizin) valamint a cikluszáráshoz szükséges tiolt (cisztein). Ezzel a 4 aminosavval meghosszabítva 65 atomszámú gyűrűt kaptunk. A lizin oldalláncán kiépített Ac-CGFLG szekvenciában található cisztein lett a dimerizáció illetve konjugáció résztvevője. A cisztein *N*-terminálisának acetilezését korábbi vizsgálataink [113] alapján ítéltük szükségesnek. E szerint az *N*-terminális szabad amino- és tiolcsoportot tartalmazó Cys-peptidek diszulfidhíd képzése olyan gyors, hogy nem alkalmazhatóak sikeresen konjugálási (tioéter kötés kialakítása) reakciókban.

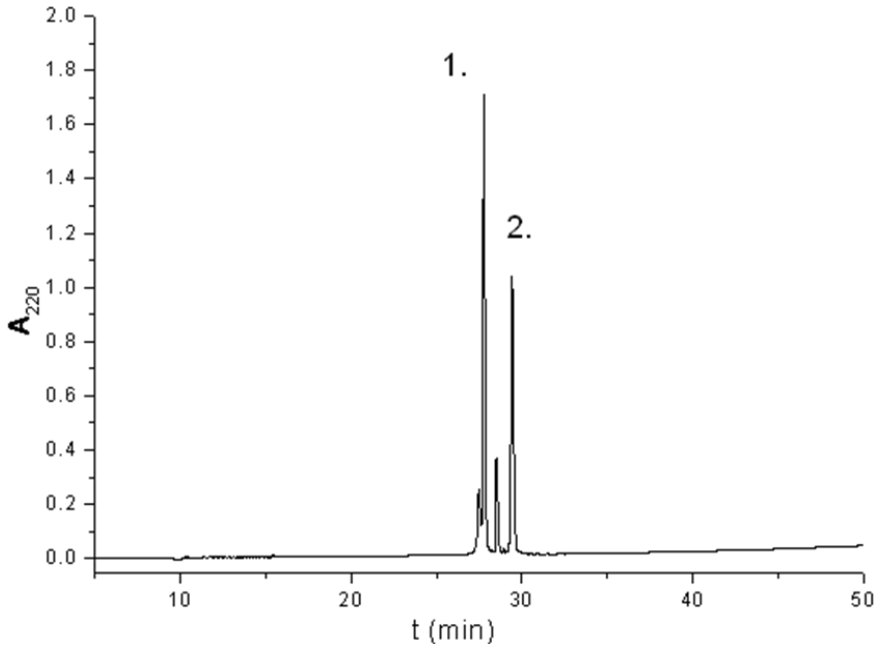
16. ábraA 16. ábrán a vegyületek közötti összefüggést, egymásba alakításukat vázoltam fel:



16. ábra: A vegyületek közötti összefüggés, szintézisséma

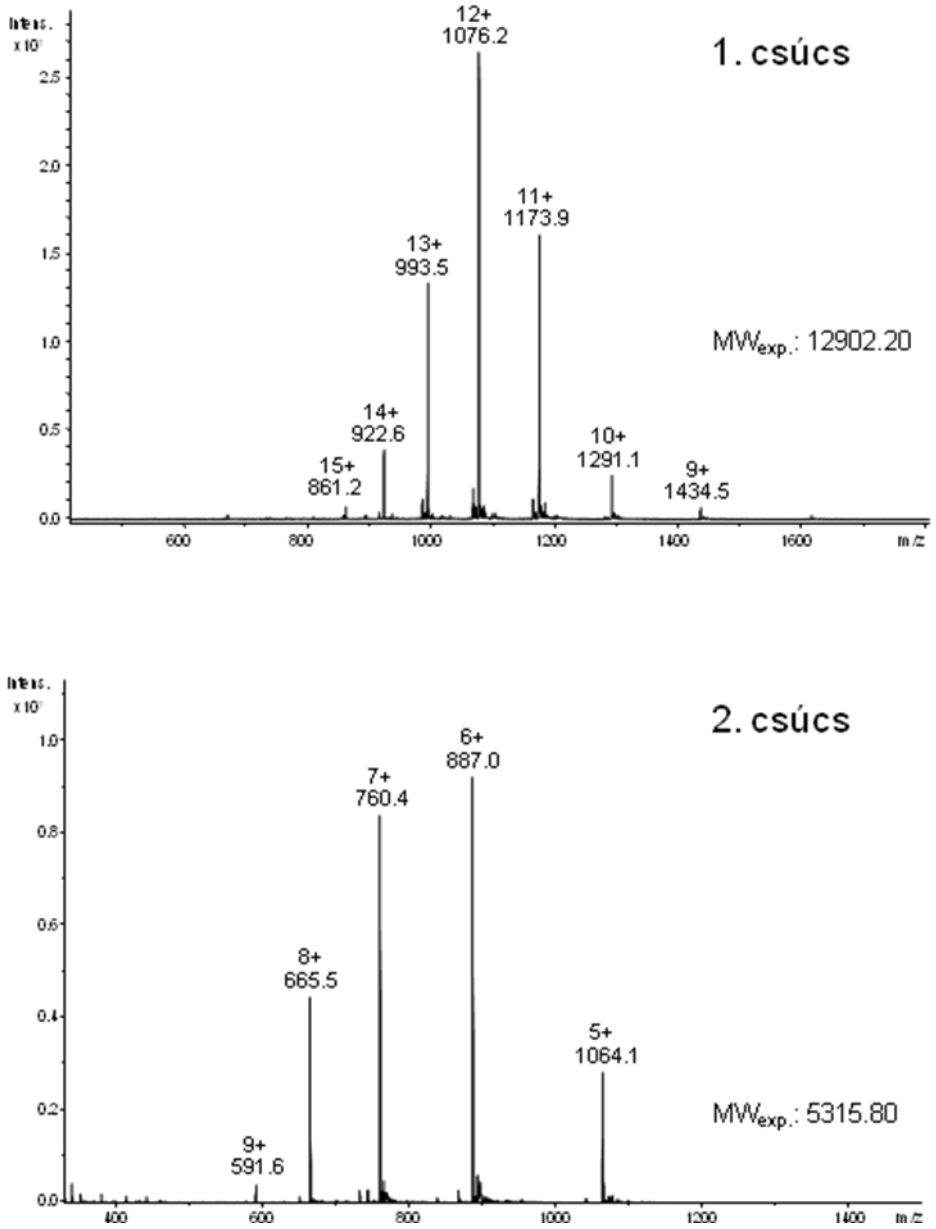
Az elágazást nem tartalmazó lineáris peptideket (**1a-4a**) Fmoc-technikával szintetizáltam, az elágazókat (**5a-6a**) pedig vegyes Boc- (a főláncban) és Fmoc-technikával (az oldalláncban). A klóraecetilezést ClAc-OPcp-vel végeztem, de a **3a** vegyület esetén a brómacetilezést is megpróbáltam, azonban a brómacetilcsoport nem eléggé szelektív a tiol nukleofilre, túl reaktívnak bizonyult, és már a nyers termékelegyben is sok melléktermék volt jelen. A ciklizálást enyhén bázisos (pH=8 körül) pufferban, HPLC-n tisztított lineáris peptidekkel valósítottam meg.

A **3-6** vegyületek dimerizációja a Cys(Acm) csoporton keresztül történt $Tl(tfa)_3$ TFA-s oldatával [114]. A dimerek (**7-10**) kötődése az A16 monoklonális ellenanyaghoz nem mutatott nagy eltérést a metionin illetve norleucin tartalmú peptiddimerek között, ezért a továbbiakban csak a jobban kezelhető (kevesebb mellékreakcióra hajlamos) norleucint tartalmazó ciklopeptidekből készítettem konjugátumot. Ehhez a dimerekből DTT-s redukcióval nyertem a szabad tiolcsoportú vegyületeket (**11, 12**), és ezeket konjugáltam klóracetilezett tetratuftsin hordozóhoz (**13, 14**), enyhén bázisos pufferban. A reakció előrehaladtát HPLC-vel követtem (példaként a **14** konjugátum HPLC kromatogramját a 17. ábra, a csúcsok tömegspektrumát pedig a 18. ábrán mutatom be). A ciszteint tartalmazó ciklikus epitóp peptid oxidálódott formáját a konjugálás végén HPLC-s tisztítással sikerült elválasztani a konjugátumtól, majd DTT-s redukcióval vissza lehetett nyerni a kiindulási anyag feleslegét.



17. ábra: HPLC kromatogram: a 12 jelű ciklopeptid konjugálása oligotuftsin hordozóhoz, 24 óra elteltével

A két főcsúcs közül az 1. számú a 4 epitóppeptidet tartalmazó konjugátum, a 2. pedig a dimerizálódott ciklopeptid, közöttük a kis intenzitású csúcs pedig az elreagálatlan ciklopeptid.



18. ábra: A konjugálási reakció termékelegyének két fő komponense: a konjugátum, és a ciklopeptid dimerje

A tisztított termékek analitikai adatait a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: HSV epitópszármazékok analitikai adatai

	ESI-MS (számolt)	ESI-MS (mért)	Retenciós idő (perc)
1	1914,99	1914,8	24,1
2	2028,08	2028,3	24,8
3	2578,12	2578,0	27,3
4	2560,08	2560,1	27,7
5	2748,33	2748,2	27,5
6	2730,29	2730,0	27,8
7	5012,07	5012,4	30,1
8	4976,00	4976,0	30,4
9	5352,50	5352,1	29,1
10	5316,42	5315,8	29,4
11	2489,05	2489,2	29,3
12	2659,22	2658,6	28,4
13	12222,25	12222,3	28,8
14	12902,52	12902,2	27,8

4.2.2 Kötődési vizsgálatok

Az ellenanyagkötődési vizsgálatokat a Groningeni Egyetem (Groningen, Hollandia) munkatársai végezték. Az eredményekből következtetve tudjuk fejleszteni a konjugátumokat, és szerkezetük módosítása révén jobb kötődésű anyagokat ellőállítani, ezért tartom fontosnak az eredmények részletes ismertetését.

A kötődési vizsgálatokat ún. ELISA módszerrel végezték (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**s**orbent **A**ssay, enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat), ez egy egyszerű színreakción alapuló módszer. A direkt ELISA mérés során a vizsgált

anyagot kitapasztják egy szilárd felületre (pl. 96 lyukú sejtenyésztő lemez), majd az antitesttel reagáltatják. A kötődött antitestet reagáltatjuk egy másik enzimet tartalmazó ellenanyaggal, legvégül az enzim szubsztrátját az oldathoz adva színreakció játszódik le, ennek abszorbanciáját mérve kapunk kötődési értékeket. A mi anyagaink azonban a szilárd felülethez nem adszorbeálódtak megfelelően, így a kompetíciós ELISA néven ismert módszerhez kellett folyamodnunk. A lineáris gD epitópot (^{11}Nle)-9-22) kitapasztják a lemezre, és az általunk vizsgált vegyületeket közvetlenül az A16 monoklonális antitesttel reagáltatjuk különböző koncentrációban alkalmazva a vizsgált anyagot. Végül az antitest maradék kötődési kapacitását mérjük mikrotitráló lapokon. Az eredményt pmol-ban adjuk meg, ez azt jelenti, hogy mennyi anyag szükséges az 1,0 értékű optikai sűrűség (optical density, OD) eléréséhez, λ=490 nm hullámhosszon mérve. A legalább három mérésből számolt eredményeket grafikusan értékeltük ki a koncentráció-OD_{490} függvényből.

4. táblázat: HSV 9-22 epitóp származékainak kötődése A16 monoklonális ellenanyaghoz (nt: nem tesztelt)

	Vegyület	Kompetitív ELISA (pmol)
A[§]	H-LKMADPNRFRGKDL-NH_2	4,2
B[§]	H-LKNleADPNRFRGKDL-NH_2	3,4[a]± 1,8
C[†]	H-LK[CADPNRFK(CH_2CO)]GKDL-NH_2	7900
D[†]	H-LK[HcyADPNRFK(CH_2CO)]GKDL-NH_2	2300
E[§]	H-[TKPK(H-LKNleADPNRFRGKDLC{CH_2CO}-NH_2)G]$_4$-NH_2	0,72
F[§]	{H-LKNleADPNRFRGKDLC-NH_2}$_2$	0,74
G[‡]	{H-CLKNleADPNRFRGKDL-NH_2}$_2$	0,66
1	c[CH_2CO-LKMADPNRFRGKDLAhxC]-NH_2	28,6
2	c[CH_2CO-AhxLKMADPNRFRGKDLAhxC]-NH_2	28,0
3	c[CH_2CO-LKMADPNRFRGKDLAhxC]AhxGFLGC(Acm)-NH_2	79,1
4	c[CH_2CO-LKNleADPNRFRGKDLAhxC]AhxGFLGC(Acm)-NH_2	75,6
5	c[CH_2CO-LKMADPNRFRGKDLAhxK(Ac-C(Acm)GFLG)AhxC]-NH_2	88,8
6	c[CH_2CO-LKNleADPNRFRGKDLAhxK(Ac-C(Acm)GFLG)AhxC]-NH_2	92,3
7	{c[CH_2CO-LKMADPNRFRGKDLAhxC]AhxGFLGC-NH_2}$_2$	11,8

8	{c[CH_2CO-LKNleADPNRFRGKDLAhxC]AhxGFLGC-NH_2}$_2$	11,1
9	{c[CH_2CO-LKMADPNRFRGKDLAhxK(Ac-CGFLG)AhxC]-NH_2}$_2$	57,7
10	{c[CH_2CO-LKNleADPNRFRGKDLAhxK(Ac-CGFLG)AhxC]-NH_2}$_2$	41,4
11	c[CH_2CO-LKNleADPNRFRGKDLAhxC]AhxGFLGC-NH_2	nt
12	c[CH_2CO-LKNleADPNRFRGKDLAhxK(Ac-CGFLG)AhxC]-NH_2	nt
13	Ac-[TKPK(**11**-CH_2CO)G]$_4$-NH_2	249,3
14	Ac-[TKPK(**12**-CH_2CO)G]$_4$-NH_2	7,2

Megjegyzések: az ***A-G*** vegyületek korábbi publikációkban jelentek meg, az összehasonlítás miatt tüntettem fel azokat a táblázatban (§ [62] ; † [72]; ‡ [115]). A ***B*** jelű (^{11}Nle)-9-22 származékot mindegyik ELISA tesztben használtuk referenciaként. A peptidből szükséges mennyiség az 1,0 értékű OD eléréséhez 3,4±1,8 pmol volt.

Az A16 monoklonális ellenanyagot használtuk a tesztek során, mely a natív gD szekvencia 9-22 szakaszát ismeri fel [116]. Az antitest és a vegyületek kötődését oldatban vizsgáltuk, mely ilyen módon több információt nyújt a peptidek kötődési tulajdonságairól.
Az eredményeket a vegyületek szerkezeti tulajdonságai alapján csoportosított összehasonlítással ismertetem, így a cikluszárás, a dimerizáció és a konjugáció ellenanyagkötődésre gyakorolt hatását írom le.

A ciklusok vizsgálatánál egyértelműen megállapítható, hogy a Met→Nle csere nem befolyásolja a kötődést (**3** és **4**, valamint **5** és **6** vegyületek). A ciklus méretének változtatása viszont annál inkább, a nagyobb, 16 aminosavat tartalmazó ciklus (**1**) kötődése sokkal nagyobb (28,6 pmol), mint a 8 tagú ciklusé (pl ***C*** és ***D****,* 7900 ill 2300 pmol), 276 illetve 80-szoros. Azonban a ciklus méretének további növelése, egy újabb 6-aminohexánsavval bővített ciklus (**2,** szemben az **1** vegyülettel) már nem növelte a kötődést szignifikánsan. A ciklushoz kapcsolódó „spacer” szakaszok függetlenül azok elhelyezkedésétől csökkentették az ellenanyaghoz való kötődést a kiindulási monomerhez képest (**4, 6:** 75,6 ill 92,3 pmol).

A dimerek képzése (**7-10**) minden esetben javított a kötődésen. Megállapítottuk, hogy a *C*-terminálison keresztüli diszulfidkötés (**7, 8**) minden esetben jobb ellenanyagfelismerést okozott (11,8 ill. 11,1 pmol), mint az elágazó peptidek oldalláncában levőké (**9, 10:** 57,5 ill. 41,4 pmol), még a GFLG „spacer”-t nem tartalmazó ciklusos monomereknél (**1, 2:** 28,6 ill. 28,0 pmol) is kétszer erősebben kötődtek az ellenanyaghoz.

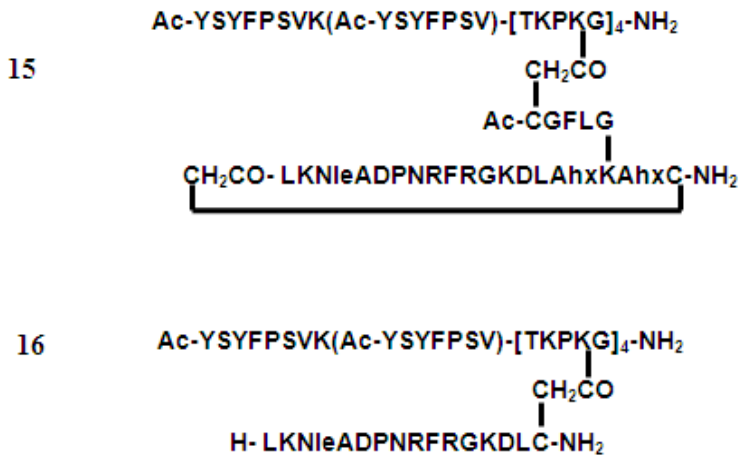
A konjugátumok esetében érdekes változásokat tapasztaltunk. A spacer szekvenciát és ciszteint a *C*-terminálison tartalmazó anyag esetén (**13,** 249,3 pmol) a kötődés jelentősen csökkent az azonos epitópszármazékot tartalmazó ciklopeptidhez vagy ciklodimerhez képest (**4, 8:** 75,6 ill. 11,1 pmol), azonban az oldalláncán keresztül konjugált ciklust tartalmazó vegyület (**14,** 7,2 pmol) sokkal jobb eredményt mutatott a szabad ciklopeptidhez képest (**6,** 92,3 pmol). Ez a kötődési érték összehasonlítható a lineáris epitópok kötődési értékeivel (***A*** és ***B,*** 4,2 ill. 3,4 pmol), de még mindig nem éri el a ***B*** lineáris származék dimerjeinek (***F, G,*** 0,74 ill 0,66 pmol) vagy tetratuftsinhoz konjugált származékának (***E,*** 0,72 pmol) kötődési erősségét.

Összegezve a tapasztaltakat, az oldallánc nélküli dimerek és egy, az oldalláncán oligotuftsinhez konjugált ciklopeptid mutatott erős kötődést az antitesthez, azonban ez nem éri el az egyszerű lineáris peptid konjugátumának kötéserősségét. Valószínűleg jobb kötődés eléréséhez a ciklopeptidek biológiailag aktív konformációjának pontosabb rögzítésére van szükség. A dimerek jobb kötődését valószínűleg az magyarázza, hogy az immunoglobulin (IgG) két kötőhelyére is kapcsolódhat vagy két ellenanyag molekulát is megköthet.
A 9-22 peptid ciklizálása nem vezetett jobb eredményre, azonban az enzimstabilitást növelő tényezőként vehető számításba, mint korábbi vizsgálatok mutatták [117, 118]. Ezért érdemes egy hatékony ciklopeptidet tartalmazó konjugátumot is kipróbálni immunizálási kísérletekben a leghatékonyabbnak bizonyult lineáris epitóp peptid konjugátuma mellett.

Szintén említést érdemel, hogy ezzel a munkával megvalósítottuk olyan ciklopeptid konjugátumok szintézisét ortogonális Cys védelemmel, amelyben mind a ciklus kialakításában, mind a konjugációban tioéter-kötést alkalmaztunk. Az előállított konjugátum, ami jól jellemezhető és molekulatömege megközelíti a 13 kDa-t, már egy mini fehérjének tekinthető, így alkalmas immunogén lehet.

4.2.3 Promiszkuis peptid alkalmazása oligotuftsin és herpesz epitóp konjugátumában, szerkezetvizsgálat

A promiszkuis T-sejt epitóp peptidek alkalmazása fokozott ellenanyagtermeléshez vezethet, ezért terveztünk olyan konjugátumokat létrehozni, melyben a tetanus toxoid egy T-sejt epitóp szakasza kapcsolódik a tetratuftsin hordozó *N*-terminálisához. A kezdeti immunizálási vizsgálatokhoz kétféle konjugátumot kívántunk előállítani, a lineáris 9-22 szakaszt illetve egy ciklusos epitópszármazékot tartalmazót. A kiválasztás alapja az ELISA mérések eredménye volt, a legjobb kötődésű lineáris peptid-konjugátumot (**E**) és ciklopeptid tartalmút (**14**) választottuk ki a kísérletekhez. A 19. ábrán látható a tervezett konjugátumok felépítése.



19. ábra: Tetanus toxoid epitópot tartalmazó konjugátumok

Az immunizálási kísérletek előtt egy szerkezetösszehasonlító vizsgálattal szerettük volna megbecsülni a kétféle konjugátum térbeli felépítését és esetleges különbségeit, ezért CD-spektroszkópiás méréseket végeztünk. Ebben Dr. Majer Zsuzsa (ELTE, Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék) volt segítségemre.

A hordozót *N*-terminálisán lizinnel hosszabbítottam, és mindkét aminocsoportjára felépítettem a tetanusz toxoid YSYFPSV szakaszát Boc/Bzl stratégiával, majd acetileztem ezek N^{α}-aminocsoportjait. A tetratuftsin oldalláncban Fmoc-csoporttal védett lizinjeiről eltávolítottam a védőcsoportot, majd klóracetileztem, így kialakítva a funkciós csoportot a konjugálás elvégzéséhez.

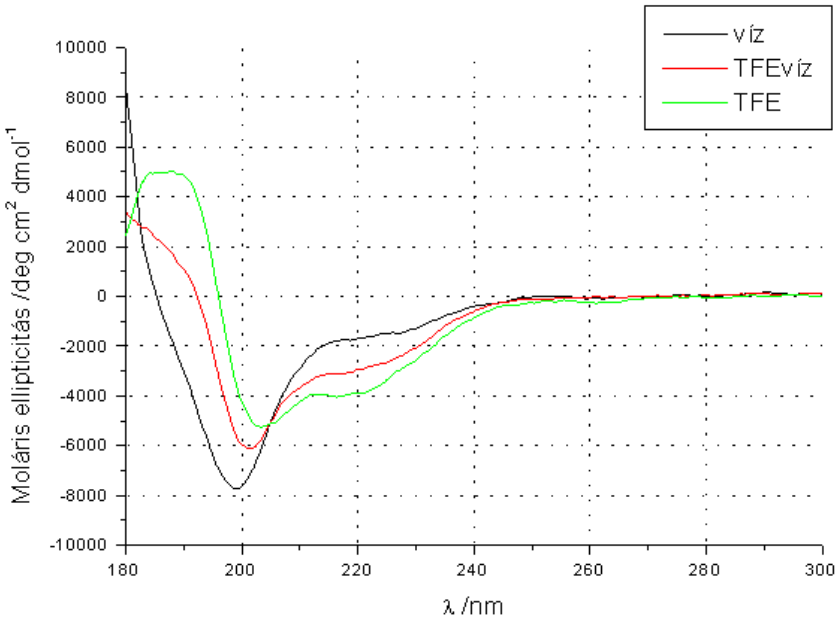
A konjugáláshoz használt ciklopeptidet a **6** jelű vegyületből a cisztein Acm védőcsoportjának eltávolításával nyertem. Ehhez egy másik módszert (ezüst trifluormetánszulfonát, AgOTf reagens) alkalmaztam [119], mert itt nem volt cél dimer előállítása. Az AgOTf a tiolcsoportok oxidációja nélkül hasítja az Acm-csoportokat, amelyet egy DTT-vel végzett kezelés követ az ezüst ionok megkötése érdekében. A szabad tiolt tartalmazó peptid HPLC tisztítással nyerhető ki a reakcióelegyből.

A konjugálást enyhén bázisos puffer-oldatban végeztem (pH=8,5), a reakciót HPLC-vel követtem. A termékeket analitikai HPLC és ESI-MS segítségével azonosítottam (5. táblázat)

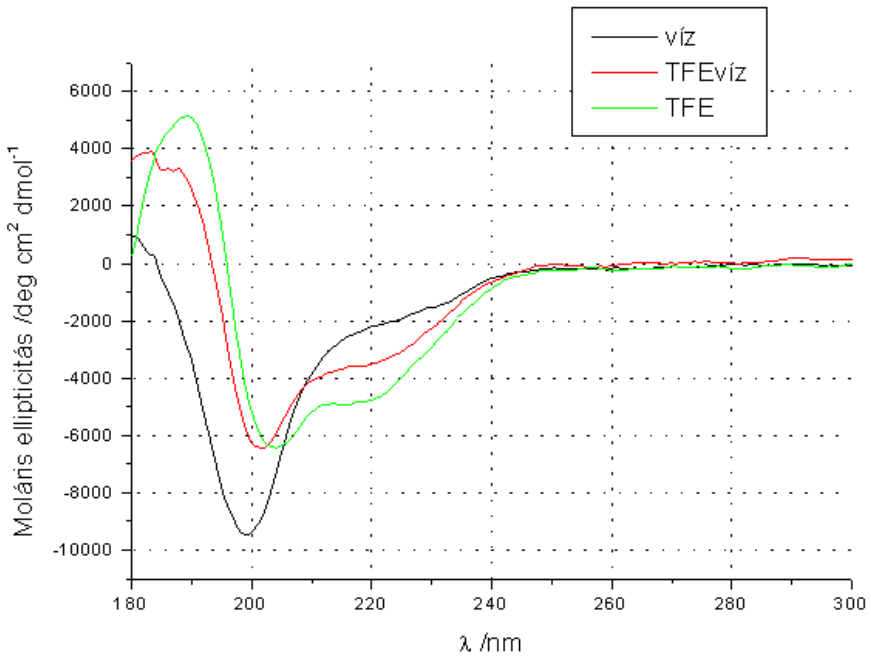
5. táblázat: Promiszkuis peptid epitópot tartalmazó konjugátumok analitikai adatai

	ESI-MS (számolt)	ESI-MS (mért)	Retenciós idő (perc)
15	14762,2	14761,9	18,3
16	11104,6	11105,0	15,2

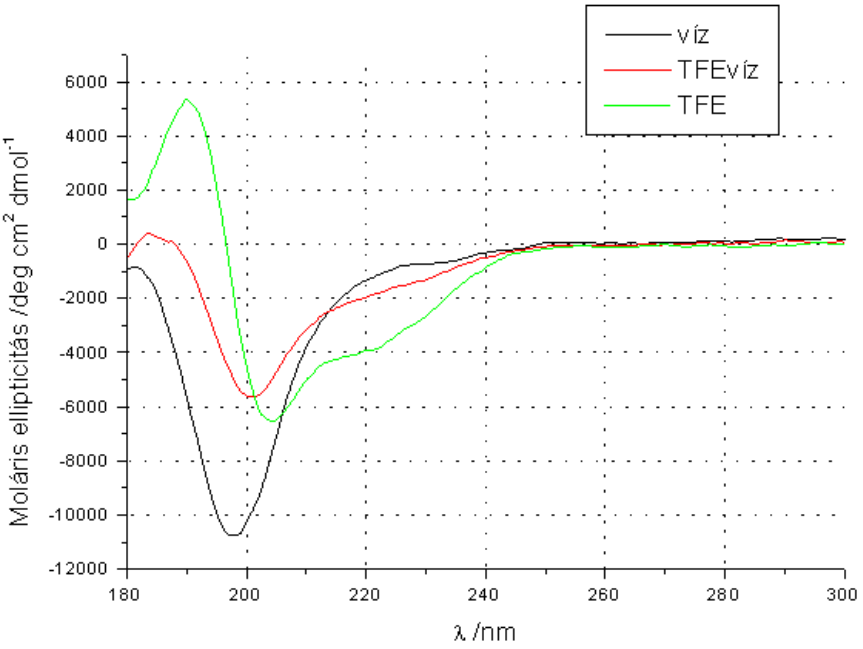
CD spektroszkópiával a két konjugátumon kívül a konjugálatlan 9-22C szekvenciát illetve ciklopeptidszármazékot is mértük.



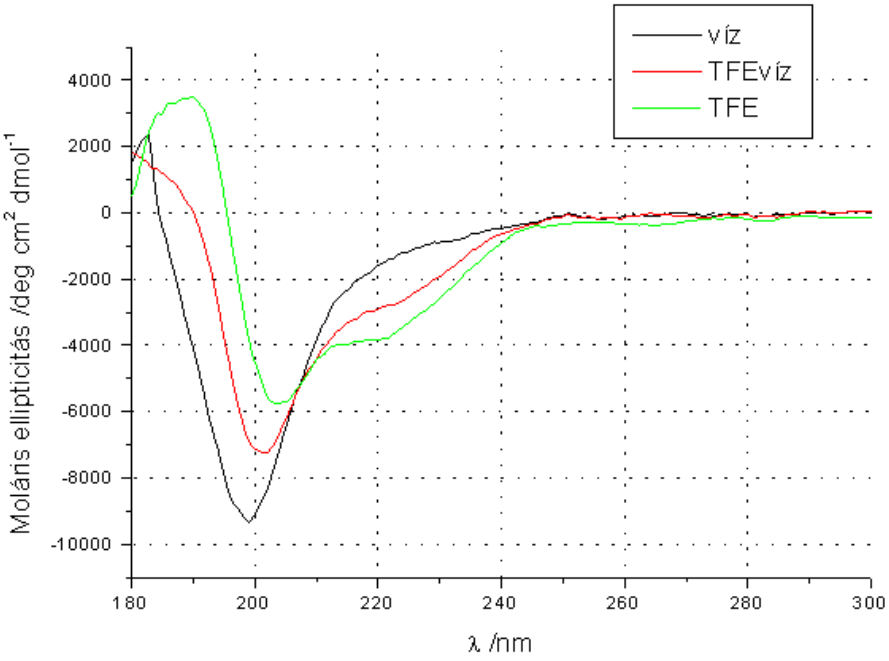
20. ábra: A 9-22Cys peptid CD spektrumai vízben, 1:1 TFE-vízben, és TFE-ben



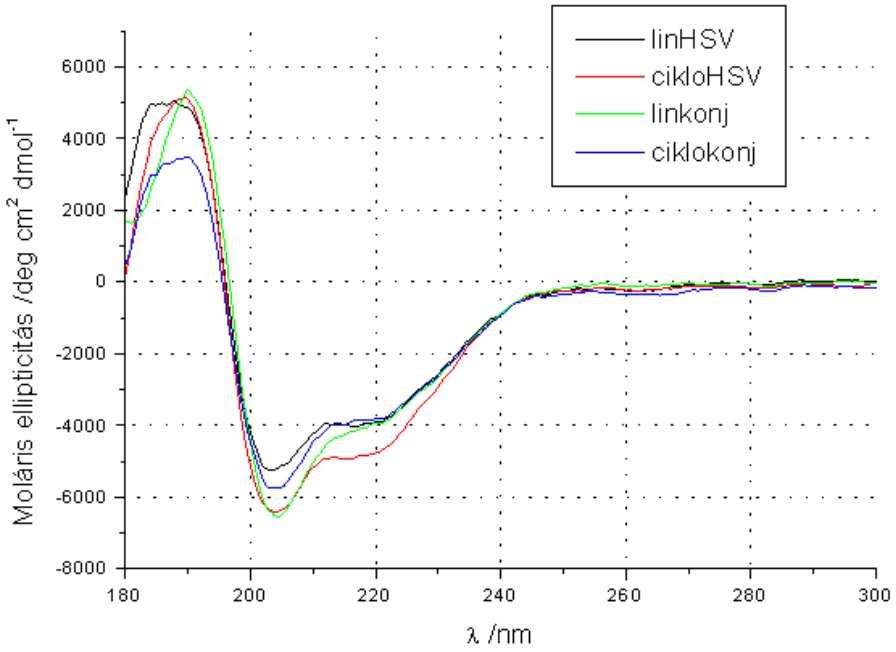
21. ábra: A ciklikus HSV epitóp CD spektrumai vízben, 1:1 TFE-vízben, és TFE-ben



22. ábra: A 15 jelű konjugátum CD spektrumai vízben, 1:1 TFE-vízben, és TFE-ben



23. ábra: A 16 jelű konjugátum CD spektrumai vízben, 1:1 TFE-vízben és TFE-ben



24. ábra: A két HSV epitópszármazék illetve konjugátumainak CD spektruma TFE-ben

A spektrumok egyértelműen azt jelzik, hogy a konjugátumban levő epitóp peptid szerkezete nem változik jelentősen a szabad formában levőhöz képest, és így feltehetően az ellenanyagfelismerése is megmarad. Ez összhangban van azon NMR mérésekkel, amelyet a lineáris 9-22-Cys T20 és SOC konjugátumaival végeztek [120]. Szintén elég jó hasonlóságot mutat a lineáris és a ciklikus epitópot tartalmazó konjugátumok CD spektruma, tehát a két epitóp hasonlóan rendezetlen térszerkezetet vesz fel vizes oldatban, míg jelentősebb rendezettség (α-hélix) figyelhető meg TFE oldószerben. A vizben és a TFE-ben mért spektrumok azt mutatják, hogy a ciklopeptid nem túl merev, így felveheti az ellenanyagfelismeréshez szükséges konformációt. A T20 hordozó még TFE oldatban is nagyfokú rendezetlenséget mutat [121].

Ezeket a konjugátumokat egerekben immunválasz kiváltására kívántuk felhasználni, ez a munka sajnos túlmutat doktori munkámon.

4.3 Kemotaktikus tulajdonságú hordozó fejlesztése

Az irányított tumorterápia lényege tumorellenes szerek szelektív célbajuttatása. Ehhez olyan konjugátumok szükségesek, melyek tartalmaznak olyan egységet, amely kötődik a célsejt sejtfelszíni receptoraihoz. Ezek az irányító molekulák kapcsolódhatnak közvetlenül a szállítandó gyógyszermolekulához, vagy hordozó segítségével köthetjük össze azokat. A kísérletek azon szakaszában, amelyben résztvettem, a célunk az volt, hogy oligotuftsin hordozómolekulához különböző receptorfelismerő peptideket kapcsoljunk. Egyik esetben kemotaktikus peptideket konjugáltam a tetratuftsin típusú hordozóhoz, a másik esetben pedig GnRH-III hormonpeptidet (4.4 fejezet).

Kemotaktikus tulajdonságú peptidekkel meg lehet célozni különböző sejteket vagy szövettípusokat, kihasználva azok eltérő affinitását bizonyos molekulákra. Kutatócsoportunkban oligotuftsin hordozókkal foglalkozunk, ennek kemotaktikus peptidekkel való módosítását terveztük, és különböző sejtekre való hatását vizsgáltuk. Formil-peptidek és a tuftsin hasonló kemotaktikus aktivitással rendelkeznek 10^{-9}-10^{-7}M koncentrációtartományban. Az előállított konjugátumokat *Tetrahymena pyriformis* csillós egysejtűn és THP-1 tumoros humán monocitasejteken kívántuk tesztelni.

Kiindulásként a For-Met-Leu-Phe peptidet vettük, melyet kemoattraktáns hatása miatt évtizedek óta alkalmaznak referencia anyagként kemotaxis vizsgálatokban (egybetűs kóddal rövidítve fMLF, az irodalomban azonban sokszor fMLP-nek rövidítik, főként a biológiai és orvosi publikációkban). Ennek a konjugátumnak a töltését illetve a formilezett tripeptidnek a szekvenciáját módosítottuk, és vizsgáltuk a változtatások kemotaxisra gyakorolt hatását. Ezenkívül terveztünk olyan spacer szakaszokkal hosszabbított hordozót, melyben egy, az oligotuftsin *N*-terminálisra beépített lizinnel elágazó láncot hoztunk létre, így kétszerezve a kapcsolási kapacitást a később beépítendő tumorellenes szer számára. A doktori munkám befejezése után ezen típusú vegyületek szintézise megvalósult, a metotrexát tartalmú konjugátumok citotoxicitást mutattak THP-1 monocitákon, tehát az ilyen szerkezetű

konjugátumok alkalmasak kemotaxison alapuló hatóanyag-célbajuttatásra (chemotactic drug targeting, CDT).

Hatféle konjugátumot készítettem, Ac-[TKPK(fMLF)G]$_4$-NH$_2$; Ac-[TK(For)PK(fMLF)G]$_4$-NH$_2$; Ac-[TK(Succ)PK(fMLF)G]$_4$-NH$_2$; Ac-[TKPK(fMMM)G]$_4$-NH$_2$; Ac-[TKPK(fNleLF)G]$_4$-NH$_2$, Ac-GFLGK(Ac-GFLG)-[TKPK(fMLF)G]$_4$-NH$_2$. Az oligotuftsin négy ismétlődő pentapeptidet tartalmaz, összesen nyolc lizin egységgel. A kemotaktikus peptideket minden második lizin oldalláncán alakítottam ki. A kapcsolási helyek megválasztását az indokolta, hogy a Lys-Pro kötés sokkal stabilabb enzimatikus behatásokra, mint a Lys-Gly. Ellenben ha itt elágazást alakítunk ki, növelhetjük a molekula stabilitását. Korábbi, elágazó láncú polipeptidekkel végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy a vegyületek töltésének (kationos, anionos, amfoter) jelentős hatása van a kemotaxisra. Ezek a vizsgálatok olyan szempontból is fontosak lehetnek, hogy lássuk, milyen módon változhat a konjugátumok kemotaktikus tulajdonsága, ha a tetratuftsin konjugátum maradék aminocsoportjait is szubsztituáljuk pl. hatóanyag molekulával. A metionin oxidációra és alkileződésre érzékeny aminosav, oldalláncán a szintézis során mellékreakciók játszódhatnak le. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a metionin → norleucin cserétől sok esetben sem a vegyület biológiai hatása, sem a térszerkezet nem változik meg, azonban így elkerülhető a melléktermékek képződése.

Az oligotuftsin vázat Boc-technikával készítettem el MBHA gyantán, majd eltávolítottam az Fmoc-csoportot minden második lizin ε-aminocsoportjáról, és ezen Fmoc-technikával építettem ki az oldalláncot, a metionin jelenléte miatt. A formilezést is gyantán végeztem el, hangyasav triklórfenilészterével (For-OTcp) [122].

A hatóanyag szállítására alkalmas konjugátum modellpeptidje esetén az N-terminálisra beépítettem egy, mind a két aminocsoportján azonosan védett lizinszármazékot (Boc-Lys(Boc)-OH), majd a Boc-csoportok lehasítása után a GFLG szekvenciát, melynek *N*-terminálisát acetileztem ecetsavanhidriddel. A fMLF oldalláncot ezután Fmoc-technikával kapcsoltam az oligotuftsin minden második lizinjéhez a fent említett módon.

A peptideket HF-dal távolítottam el a gyantáról, az oldalláncvédőcsoportok szimultán hasításával. A töltésviszonyok megváltoztatásához a szabad lizinoldalláncokat (2, 7,12, 17 pozícióban) formileztem illetve szukcinileztem oldatban, For-OTcp illetve borostyánkősavanhidrid segítségével. A tisztítást RP-HPLC-vel végeztem, a termékeket pedig analitikai RP-HPLC-vel és ESI-MS-sel jellemztem (6. táblázat).

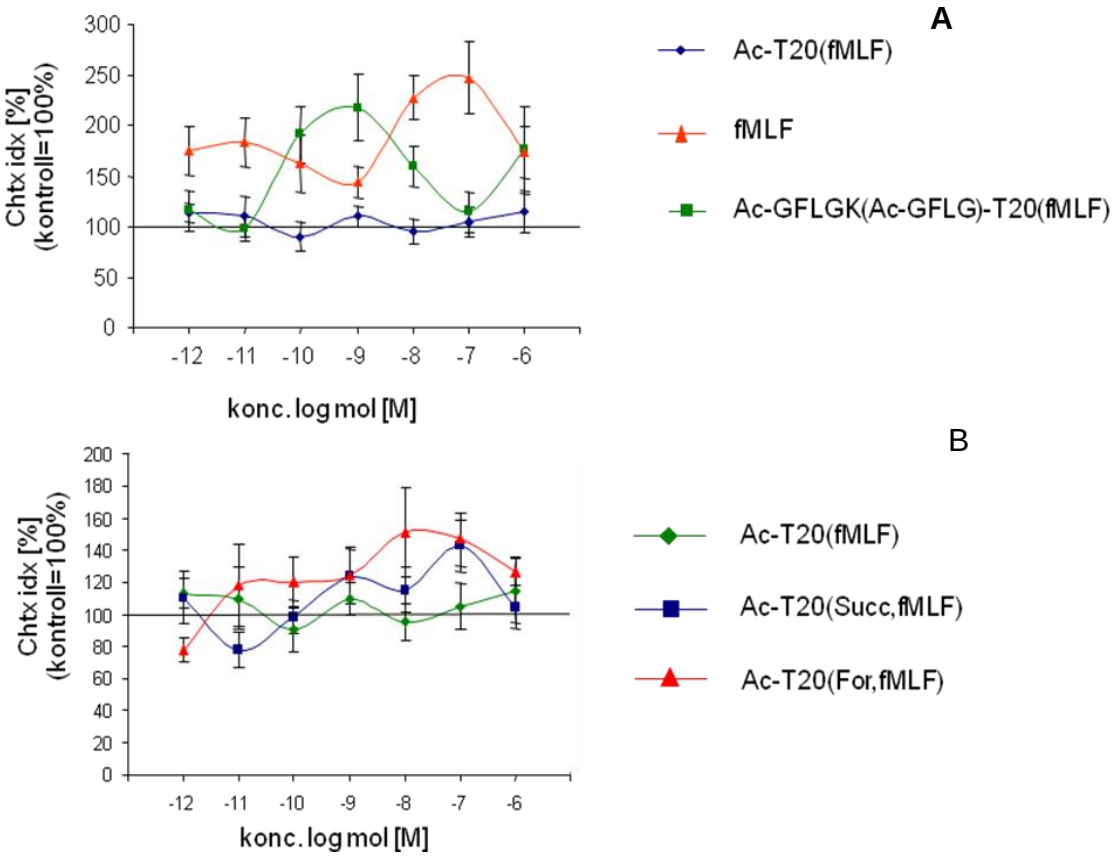
6. táblázat: Kemotaktikus peptidek konjugátumainak analitikai adatai

	Termelés (%)	Retenciós idő (p)	Számolt M	Mért M
Ac-[TKPK(fMLF)G]$_4$-NH_2	46	26,0	3783,7	3783,4
Ac-[TKPK(fMMM)G]$_4$-NH_2	29	22,2	3792,0	3791,8
Ac-[TKPK(fNleLF)G]$_4$-NH_2	59	27,2	3711,5	3711,3
Ac-[TK(For)PK(fMLF)G]$_4$-NH_2	75*	32,5	3895,8	3895,5
Ac-[TK(Succ)PK(fMLF)G]$_4$-NH_2	66*	34,1	4184,1	4183,6
Ac-GFLGK(Ac-GFLG)- -[TKPK(fMLF)G]$_4$-NH_2	70	29,4	4700,6	4699,7

***A formilezési, illetve szukcinilezési lépések kitermelései Ac-[TKPK(fMLF)G]$_4$-NH_2 peptidből kiindulva**

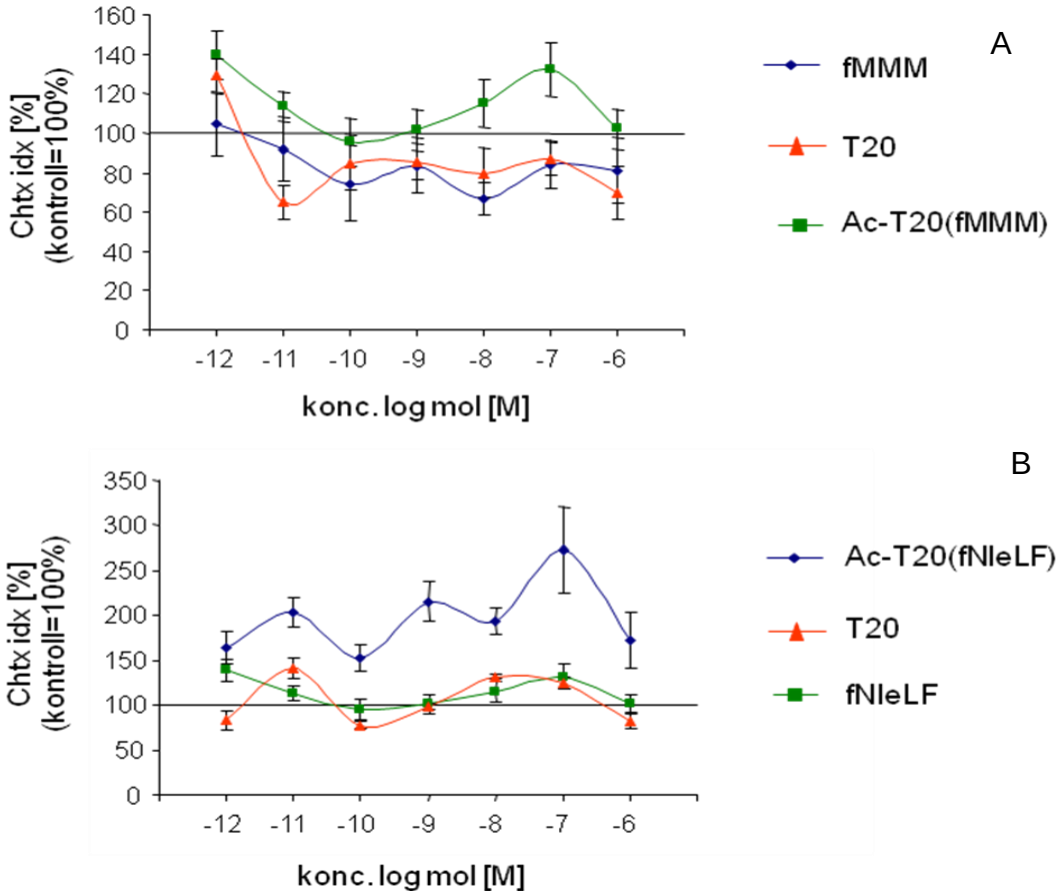
A kemotaxis vizsgálatokat Dr. Láng Orsolya végezte, a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében. Az alkalmazott módszer a kétkamrás kapilláris kemotaxis esszé [123] módosított változata [124] volt. A rendszer belső kamráját (kapillárist) a mérendő mintával megtöltött mikropipettahegyek jelentik, míg a külső kamra a sejtekkel töltött mikrotitrációs lemez. Az inkubációs idő 20 perc volt, mely idő alatt a kemotaktikus válasz jól detektálható, de a minták védettek a véletlenszerűen mozgó sejtek általi mérési hibáktól [125]. Kontrollként a sejtek médiumát alkalmazták. Az inkubációs időt követően a mintákat 4% formaldehid tartalmú PBS oldattal fixálták. A sejteket Neubauer sejtszámlálóval számolták meg. Minden mérési eredmény 10 párhuzamos mérés átlaga. A konjugátumok kemotaktikus

hatását 10^{-12}-10^{-6}M koncentrációtartományban vizsgáltuk. Az eredményeket kemotaxis index értékben fejeztük ki.



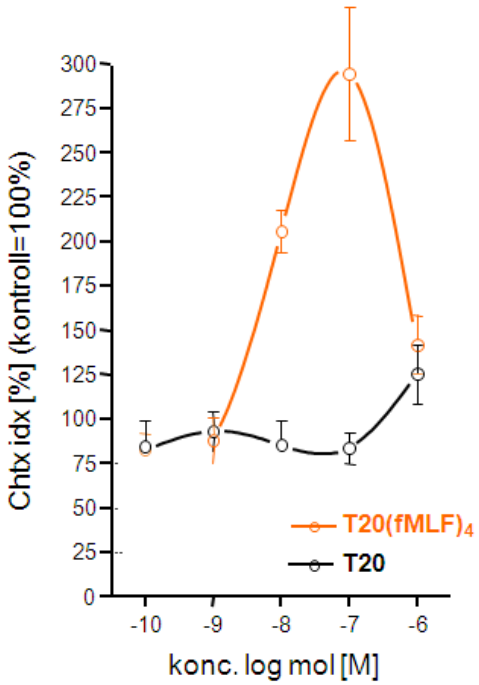
25. ábra: fMLF-konjugátumok kemotaxisa Tetrahymena pyriformis sejteken

A vizsgálatokban összehasonlítási alapként a formilezett tripeptidet (fMLF) is megmértük, hogy ismert kemoattraktáns hatásához viszonyítsuk konjugátumainak kemorepellens vagy kemoattraktáns jellegét. A 25. ábrán az fMLF tripeptid és konjugátumainak kemotaxisát mutatom be. A tripeptid kemoattraktáns jellege igen markáns, azonban konjugálás hatására ez a jelleg megváltozott (*A* grafikon). A csak a formilezett tripeptidet tartalmazó konjugátum az általános diffúziós eloszlást mutatta csak, a GFLG peptid beépítése azonban ismét a kemoattraktáns jelleget erősítette. A töltés megváltoztatásával (formilezés, szukcinilezés) a konjugátum némi kemoattraktáns jelleget nyert ismét (*B* grafikon). Külnösen a formilezésnek volt jótékony hatása a kemoattraktáns jelleg növekedésére.



26. ábra: Oldalláncban módosított konjugátumok kemotaxisa Tetrahymena pyriformis sejteken

A 26. ábraán az fMLF szekvenciában módosított vegyületek kemotaxisának az eredményét mutatom be. Az fMLF szekvencia L és F aminosavát metioninnal helyettesítve komoly kemorepellens hatást tapasztaltunk (*A* grafikon). Az oligotuftsin (T20) hordozó hasonló hatású anyag, azonban a kettő konjugátuma érdekes módon inkább kemoattraktáns hatású vegyület. A fMLF szekvenciában a metionint norleucinra cserélve az előbbi tapasztalat ismétlődött, azonban a konjugátum kemoattraktáns hatása jóval markánsabb.



27. ábra: Oligotuftsin és konjugátumának aktivitása THP-1 monocita sejteken

THP-1 monocita sejteken vizsgáltuk az fMLF szekvenciával bővített oligituftsin hordozót a módosítatlan hordozó mellett. Az eredmények szerint (27. ábra) a konjugátum erősen kemoattraktáns a monocita sejtekre nézve. Az egészséges sejtek tulajdonságait reprezentáló sejteken (*T. pyriformis*) nem volt jelentős kemoattraktáns hatás megfigyelhető (25. ábra), ezért jó eséllyel a beteg és egészséges sejtek közötti különbség élő szövetekben is fennáll, így létrehozva a szelektív gyógyszerszállítás lehetőségét.

Az erre irányuló kísérleteket egy éves külföldi tanulmány utam miatt már nem én fejeztem be, de érdemes megemlíteni ezeket az eredményeket is. A Nle tartalmú kemotaktikus peptiddel konjugált tetratuftsin hordozót választották citotoxicitási vizsgálatok alapjául. Ebben az esetben az oligolizin lánc *N*-terminálisa egy mindkét aminocsoportján klóracetilezett lizint tartalmazott. Ehhez kapcsolták tioéter-kötéssel az enzimlabilis „spacer”hez kapcsolt metotrexátot (Mtx-GFLGC-NH_2). Mivel a metotrexát egy glutaminsav részt tartalmaz, ennek mind az α- mind a γ-karboxilcsoportján keresztül

kapcsolódhat a „spacer” peptidhez. Az izomereket HPLC-n el lehetett választani, így mindkét izomer vegyületet konjugálták a kemotaktikus peptidet tartalmazó hordozóhoz ({Mtx$^{\gamma}$-GFLGC-NH_2}CH_2CO-K({Mtx$^{\gamma}$-GFLGC-NH_2}CH_2CO)-[TKPK(For-NleLF)G]$_4$-NH_2, {Mtx$^{\alpha}$-GFLGC-NH_2}CH_2CO-K({Mtx$^{\alpha}$-GFLGC-NH_2}CH_2CO)-[TKPK(For-NleLF)G]$_4$-NH_2) [126] Ezen vegyületek kemotaktikus vizsgálata jelezte, hogy a metotrexát is befolyásolja a kemotaxist. *T. pyriformis* sejteken vizsgálva megállapították, hogy 10^{-7}-10^{-6} M koncentrációtartományban a konjugátum a szabad metotrexáttal azonos, esetleg azt némileg meghaladó citotoxicitással rendelkezik. Később ezt THP-1 sejteken is igazolták [127]**.** Ez azt mutatja, hogy ezek a konjugátumok valóban alkalmasak kemotaxison alapuló hatóanyag célbajuttatására.

4.4 GnRH konjugátumok és dimerszármazékok szintézise és vizsgálata

4.4.1 A GnRH-III származékok szintézise

A Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH_2 (GnRH-III) pepidet emlő- és prosztatatumor sejteken *in vitro* tesztelve sejtproliferáció gátlást tapasztaltak [103]. A peptidet kopolimer poli(N-vinil-pirrolidon-ko-maleinsav)-hoz GFLG enzimlabilis tetrapeptid „spacer”-en keresztül kapcsolva a hatás növekedett [128]. Ezek alapján a peptid alkalmasnak mutatkozik arra, hogy gyógyszer-célbajuttató rendszerekben is kifejtse hatását. A Kutatócsoportban alkalmazott tetratuftsin hordozó több lehetőséget kínál a peptid kapcsolására.

A peptid kapcsolására terveztünk egy csak amidkötést tartalmazó konjugátumot, melyben a GnRH-t *C*-terminálisán egy “spacer” (távolságtartó) egységgel hosszabbítjuk meg. A tetratuftsin hordozó minden második lizinjének (hasonlóan a kemotaktikus peptid konjugátumokhoz) ε-aminocsoportján építettem fel oldalláncként a meghosszabbított GnRH-származékot. Azonban a GnRH-III *C*-terminálisának módosítása az antiproliferációs vizsgálatokban a hatás csökkenését eredményezte. A tapasztalatok azt mutatták, hogy a Lys oldalláncának módosítása nem

befolyásolta jelentősen a vegyület tumorelleneshatását [103, 128]. Ezért olyan vegyületeket is elkészítettem, ahol a GnRH-III molkula a ^{6}Lys oldalláncán keresztül kapcsolódik a hordozóhoz. A konjugálásra kemoszelektív ligációs eljárást alkalmaztam tioéterkötés kialakításával [45]. A tioéterkötés olyan kovalens kötés, mely irreverzíbilis reakcióban jön létre egy haloacil és egy tiol csoport között. Ehhez a peptidben csak egy ciszteinre van szükség, mely oldalláncán keresztül kapcsolható a haloacetilcsoportot tartalmazó hordozóhoz. Erre alkalmas a GnRH lizinjének ε-aminocsoportja, amihez egy ciszteint kapcsoltam. A tetratuftsin megfelelő lizinjeit GFLG spacer szekvenciával hosszabbítottam, majd a szabad aminocsoportot klórecetsav pentaklórfenilészterével funkcionalizáltam. A konjugálási reakciót gyengén bázisos (pH≈8) pufferban végeztem, részletekben adva az oldatba a védőcsoport nélküli, ciszteint tartalmazó, tisztított GnRH-származékot. Azonban nagy mennyiségben keletkezett a ciszteint tartalmazó GnRH dimerje, mely lehetetlenné tette a konjugálási reakció tökéletes lejátszódását. Az oligotuftsin hordozóhoz csak 1-2 GnRH peptid kapcsolódott a várt 4 helyett. Dimerizációs vizsgálataim szerint a peptid Tris pufferban (pH=8) oldása után (koncentráció: 0,5 mg/ml) 5 percen belül 31%-ban oxidálódik, és 2 órán belül a peptid teljes mennyisége diszulfid formában volt jelen. A lehető legkisebb változtatást tervezve acetileztem a cisztein aminocsoportját, mely drámai hatással volt a dimerizációs hajlamra: 1 óra alatt a mennyiség csak 15%-a oxidálódott, a szabad tiolt tartalmazó peptid pedig még egy nap után is detektálható volt a pufferoldatban. Az oxidációs vizsgálat eredményeit röviden a 7. táblázatban foglaltam össze.

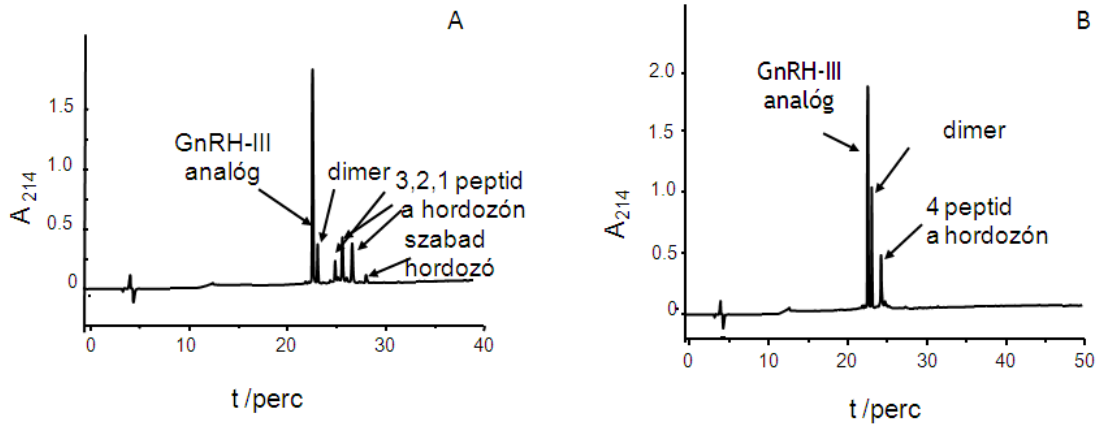
7. táblázat: GnRH ciszteines származékainak oxidációs vizsgálata

Idő	$[GnRH\text{-}III(Cys)]_2$	$[GnRH\text{-}III(Ac\text{-}Cys)]_2$
5 perc	31%	0%
1 óra	90%	15%
2 óra	98%	27%
4 óra	100%	41%
24 óra	100%	82%

A tetratuftsin hordozót szilárd fázisú peptidszintézissel Boc-technikával szintetizáltam MBHA-gyantán. Az ismétlődő egységekben a két lizint ortogonális védőcsoportokkal építettem be, az egyik Fmoc-csoportot, a másik pedig ClZ-csoportot tartalmazott az oldalláncban. A tetratuftsin teljes felépítése után az Fmoc-csoportokat piperidinnel eltávolítottam, eközben a többi védőcsoport, és a peptid-gyanta kötés nem sérül. A teljes amidkötésű konjugátumban ezután az oldalláncon Fmoc-technikával építettem hozzá a spacer és a GnRH-III peptidszakaszokat. A szintézis végén a peptidről 2 lépésben hasítottam a védőcsoportokat. Először TFA, víz, EDT elegyével hasítottam a GnRH-III peptidrészről a ^{t}Bu és Trt típusú védőcsoportokat, majd HF-dal (*p*-krezol és DTT jelenlétében) a tetratuftsin rész benziltípusú védőcsoportjait. Ebben a lépésben a peptid is lehasadt a gyantáról. RP-HPLC-vel tisztítottam és jellemeztem a terméket (8. táblázat).

A tioéterkötésű konjugátumhoz a tetratuftsint hasonlóan állítottam elő, majd az Fmoc-csoportok hasítása után az oldalláncban nem védett lizinekre Boc-technikával kapcsoltam a GFLG szekvenciát (szintén lépésenkénti szintézissel), végül a glicin aminoterminálisát klóracetileztem. A hasítást ezután a Boc-protokollnak megfelelően HF-dal végeztem el, majd HPLC-n tisztítottam a peptidet. A negatív tapasztalatok miatt a konjugáláshoz végül a Tris-pufferben dimerizációra kevésbé hajlamos acetilezett GnRH-III

származékot (GnRH-III(Ac-Cys)) használtam. A konjugálást Tris-pufferben, enyhén bázikus pH-n (pH=8) végeztem. A reakciót analitikai HPLC-vel követtem (28. ábra).



28. ábra: HPLC kromatogram GnRH-III(Ac-Cys) konjugálása tetratuftsin hordozóhoz A: 1óra, B: 3 óra reakcióidő után

A reakció előrehaladtával jól megfigyelhető a különböző számú GnRH peptidet tartalmazó konjugátumok keletkezése, majd továbbalakulása a négy kópiát tartalmazó végtermékké. A keletkező dimerszármazékot redukálva a GnRH peptid feleslege HPLC-s tisztítás után visszanyerhető. Mivel azonban a reakcióban a dimer GnRH-III származékok ($[GnRH\text{-}III(Cys)]_2$, $[GnRH\text{-}III(Cys)]_2$) is elég nagy mennyiségben keletkeztek, úgy határoztunk, hogy az antiproliferációs vizsgálatokba ezeket a vegyületeket is bevonjuk.

8. táblázat: Hordozók és GnRH-származékok analitikai adatai

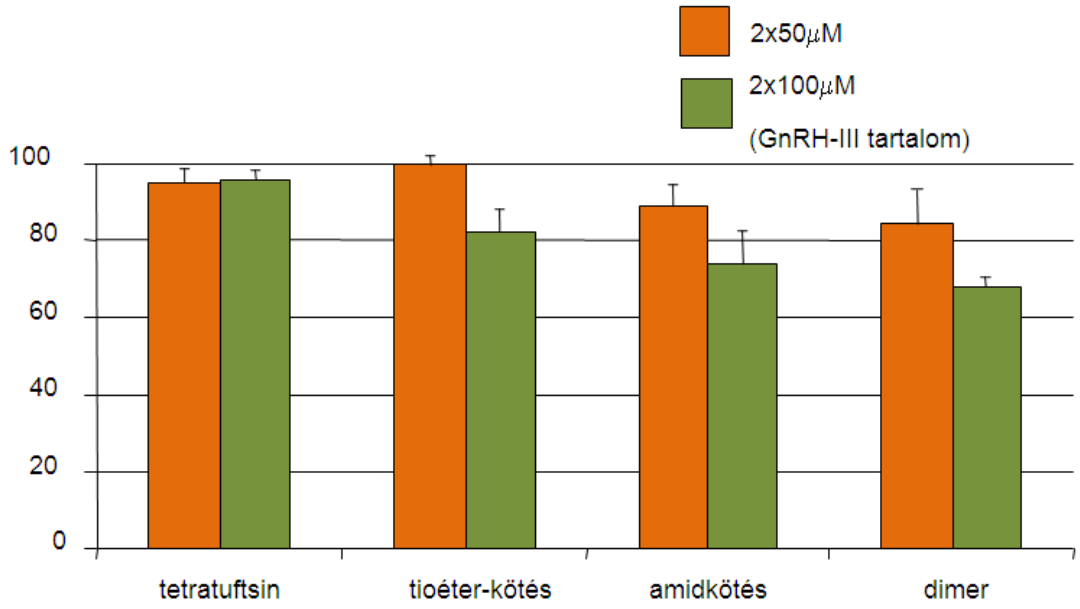
	R_t (p)	ESI-MS (számolt)	ESI-MS (mért)	kitermelés (%)
GGT20	24,4	8571,8	8572,2	15
T20(ClAc-GFLG)	27,8	3909,0	3908,6	62
GnRH-III	22,6	1261,1	1260,4	66
GnRH-III(Cys)	21,2	1361,4	1362,0	60
GnRH-III(Ac-Cys)	22,9	1403,0	1404,2	65

T20(CH_2CO-GFLG)-[GnRH(Ac-Cys)] $_{4\ 4}$	24,8	9357,0	9357,6	63*
$[GnRH\text{-}III(Cys)]_2$	23,4	2722,0	2722,1	89
$[GnRH\text{-}III(Ac\text{-}Cys)]_2$	24,5	2805,1	2806,2	78

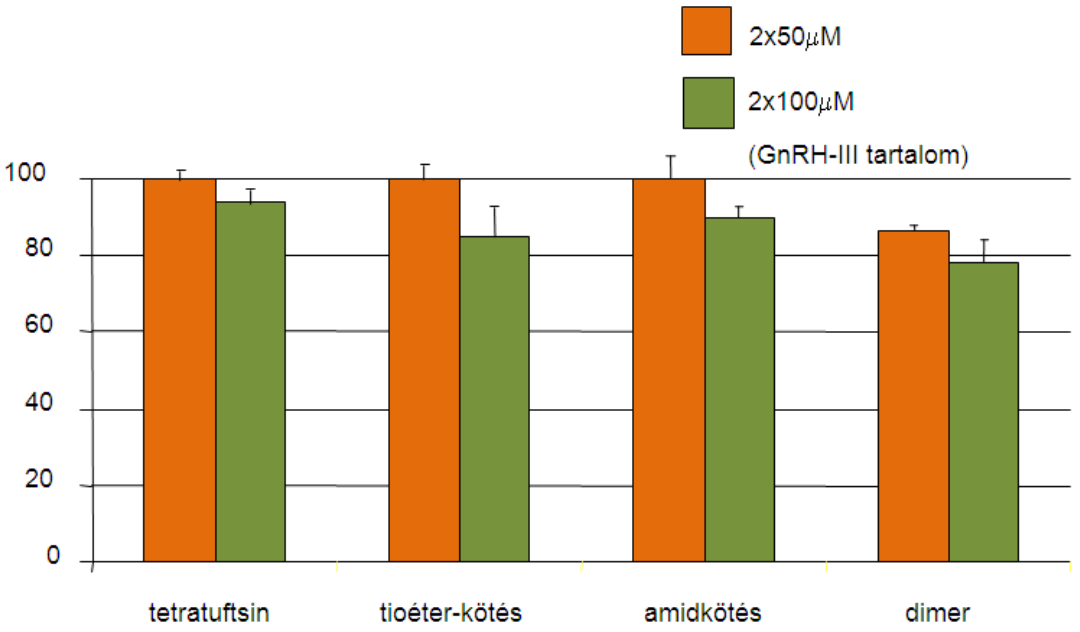
***A konjugálás illetve dimerizációs reakciók kitermelését jelenti.**

4.4.2 Sejtproliferáció gátlásának vizsgálata

A GnRH-III dimer származékának és konjugátumainak sejtproliferációt gátló hatását HT-29 vastagbél karcinóma sejteken és MDA-MB 231 emlőtumor sejteken végeztük. A sejtek kiültetését követő napon kezelték a sejteket az 50 μM illetve 100 μM peptidkoncentrációjú oldatokkal (GnRH-III tartalomra számolva). A kezelést a 3. napon megismételték, majd az 5. napon leállították a kísérletet és leszámolták a sejteket. A grafikon ordinátáján a kezeletlen tumorsejtek számához képest százalékosan ábrázoltuk a kezelt sejtpopuláció számát (29. ábra és 30. ábra). A konjugátumok csak 100 μM koncentrációban mutattak szignifikáns antiproliferációs hatást, és ez nagyobb volt a HT-29 sejtvonalon (18-25%). A dimer vegyület ($[GnRH\text{-}III(Cys)]_2$) már 50 μM esetén is mutatott ~15%-os gátlást mindkét tumor sejtvonalon. A nagyobb koncentrációban ez a hatás 32% (HT-29) és 22% (MDA-MB-231) volt.



29. ábra: Proliferációgátlás HT-29 vastagbél karcinóma sejteken

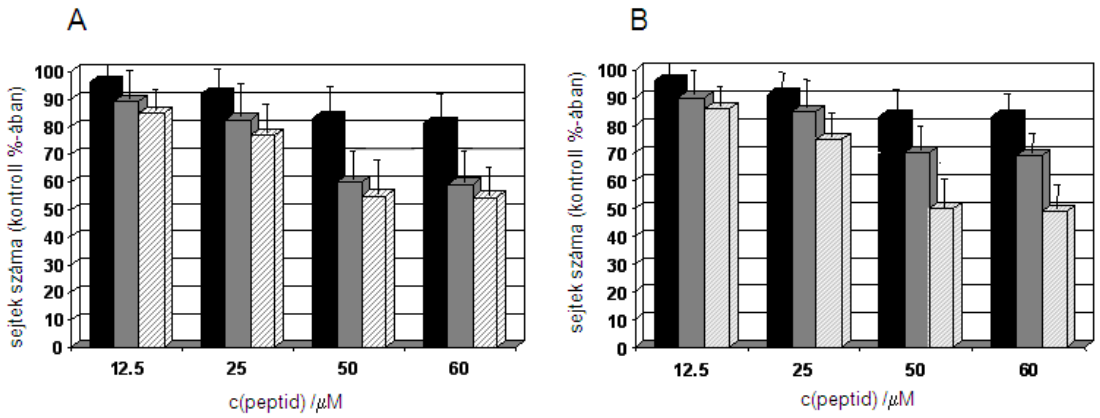


30. ábra: Proliferációgátlás MDA-MB 231 emlőtumor sejteken

Az első sejtproliferációgátlás vizsgálatok után a GnRH dimereket érdemesnek tartottuk vizsgálatokra. A két vizsgált dimer vegyületet, a $[GnRH\text{-}III(Ac\text{-}Cys)]_2$

(csíkozott hasáb) és a [GnRH-III(Cys)]$_2$ (szürke hasáb) peptideket összehasonlítottuk a monomer GnRH-III peptiddel (31. ábra). Szerkezeti és biológiai kísérletekben hasonlítottuk össze ezeket a vegyületeket a GnRH-III peptiddel. Ebben a kísérletsorozatban HT-29 humán vastagbéldaganat és MCF-7 humán emlőtumor sejtvonalakat alkalmaztunk, amelyeken kimutatható a GnRH receptorok jelenléte. A dimerek mindkét sejtvonalon jelentősebb proliferáció gátlást mutattak, mint a natív GnRH-III. A két dimer között nem volt szignifikáns különbség az MCF-7 sejteken (31. ábra A), míg a HT-29 sejteken az acetilezett ciszteint tartalmazó vegyület jelentősen nagyobb gátlást mutatott és elérte az 50%-os gátló hatást (31. ábra B).

A GnRH-dimerek endokrin hatását izolált patkány hipofízis sejteken vizsgáltuk (Dr. Kovács Magdolna, PTE). Az eredmények azt mutatták, hogy a dimer vegyület ([GnRH-III(Ac-Cys)]$_2$) LH-szekrécióra gyakorolt hatása sokkal alacsonyabb volt (136±12%), mint a természetes GnRH-III hormoné (405±18,9%) [129].



31. ábra: GnRH-III és származékainak proliferációgátló hatása MCF-7 (A grafikon) és HT-29 (B grafikon) sejtekre

Az eredményeket összesítve megállapíthatjuk, hogy a GnRH-dimerszármazékai nagyobb és szelektívebb tumorellenes hatással rendelkeznek, mint a természetes hormon molekula. A munkám befejezése óta a Kutatócsoportban igazolták, hogy az ilyen dimer GnRH-III származékok *in vivo* vizsgálatokban is jelentős tumorellenes hatást mutatnak.

Tehát a GnRH-III dimer vegyületek közvetlenül kapcsolva daganatellenes szerekhez hatékony konjugátumok lehetnek a célzott tumorterápiában. Hordozókon keresztül történő kombinálásuk azonban további szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatokat igényel.

5 Kísérleti rész

5.1 Anyagok és általános eljárások

Az aminosavszármazékok Senn Chemicals AG (Dielsdorf, Svájc), NovaBiochem (Läufelfingen, Svájc) vagy Reanal (Budapest, Magyarország) cégektől származnak. A poli(L-lizin) polimereket a Fluka (Buchs, Svájc) cégtől vásároltuk, a gyártó által megadott molekulatömegeloszlásuk: 5-10, 10-20, 20-30, 30-70 kDa.
A gyantákat a NovaBiochem cégtől vásároltuk. A gyökfogók, kapcsolószerek és hasítószerek Fluka, SDS (Peypin, Franciaország), NovaBiochem vagy Matrix Innovation (Montreal, Kanada) termékek voltak. Az oldószereket SDS, Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) vagy Reanal cégektől szereztük be.

A peptidek szintézisét különböző módon (peptidszintetizátoron, manuálisan) és eltérő protokollok szerint végeztem, ezért ezek leírását mindig az adott peptid előállítását bemutató részben adom meg.

Kapcsolások végbemenetelének ellenőrzése
A szilárd fázisú peptidszintézis során a kapcsolások sikerét Kaiser-teszttel [6] ellenőriztem. Az alábbi oldatokból 2-2 cseppet adtam a gyanta kis mintájához, és 5 percre 105°C hőmérsékletű block-therm-be helyeztem.
A oldat: 2 ml 0,01M KCN oldat 98 ml piridinnel higítva
B oldat: 5 g ninhidrin feloldva 100 ml etanolban
C oldat: 80 g fenol feloldva 20 ml etanolban

A negatív teszt eredményeként a gyantaszemcsék illetve az oldat színe sárga marad, míg pozitív teszt sötétkék színnel jelentkezik.

Prolin utáni aminosav kapcsolása esetén a Kaiser-teszt nem alkalmazható, ezért ekkor izatint adtam a tesztoldathoz. Az izatin tesztoldat elkészítése: 0,4 g

izatint szuszpendáltam 12 ml benzilalkoholban, és 2 órán át szobahámérsékleten kevertettem. A nem oldódott izatint kiszűrtem, majd az oldatban annak minden ml-ére 50 mg Boc-Phe-OH-t oldottam [7].
A kapcsolás után a lemosott gyantából kis mintát vettem, majd 2 cseppet adtam hozzá az izatin oldatból, ezután a Kaiser-teszt oldataiból adtam 2-2 cseppet, és 5 percre 105°C hőmérsékletű block-therm-be helyeztem. A negatív teszt eredménye narancssárga színű oldat és színtelen gyantaszemek, míg a pozitív teszt esetén vöröses-sötétbarnára színeződnek a gyantaszemcsék.

A cseppfolyós HF-os hasításokat a japán Peptide Institute által gyártott teflon készülékben végeztem.

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
A köztitermékek, és peptidek tisztaságának ellenőrzését Knauer (H. Knauer, Bad Homburg, Germany) analitikai HPLC segítségével végeztem el, Phenomenex Jupiter C18 (250x4,6 mm, 5μ szilika, 300Å pórusméret) vagy Phenomenex Max-RP C12 (250x4,6mm, 4μ, 80 Å) típusú oszlopon (Torrance, CA). A felhasznált eluensek: *A* eluens: 0,1% TFA/víz, *B* eluens: 0,1% TFA/MeCN-víz 80-20 V/V %. A gradiens: 0 perc 0% *B*, 5 perc 0% *B*, 50 perc 90% *B*. Alkalmazott áramlási sebesség 1 ml/perc. A detektálás UV fotométer segítségével történt, λ=220 nm hullámhosszon.

A termékek tisztítását szemipreparatív HPLC-vel végeztem, Phenomenex Jupiter C18 (250 x 10 mm, 10μm szilika, 300 Å pórusméret) oszlopon. A felhasznált eluensek: *A* eluens: 0,1%TFA/ víz, *B* eluens: 0,1% TFA/MeCN-víz 80-20 V/V %. Minden esetben lineáris gradiens elúciót használtam, 4 ml/perc áramlási sebességgel. A gradiens megválasztását a tisztítandó peptid határozta meg. A nyers peptid tisztaságától függően a peptidekből 5-20 mg mennyiséget tisztítottam egy-egy injektálással. A GnRH peptidek detektálását, azok Trp tartalma miatt 280 nm-nél, míg a többi peptidet 220 nm-en detektáltam.

Matrix assisted laser desorption-ionization (MALDI) tömegspektrometriás mérések Bruker Biflex tömegspektrométer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) illetve Voyager DE-Pro (Applied Biosystems, Framingham, MA) készüléken történtek (nitrogén lézer, λ=337 nm).

Electrospray ionizációs tömegspektrometriai felvételeket Bruker Daltonics Esquire 3000+ tömegspektrométerrel (Bremen, Germany) készítettük (folyamatos mintaadagolás 4 μl/min folyási sebességgel). A mintákat 50% acetonitril-víz elegyben oldottuk fel. A spektrumokat pozitív módban vettük fel a 200-1500 *m*/*z* tartományban.

Aminosavanalízis

Az aminosavanalíziseket Beckman (Fullerton, CA, USA) Model 6300 automata aminosav analizátoron készítettük. A mintákat 6M HCl oldattal hidrolizáltuk el 110°C-on. A hidrolízist 24 órán át, leforrasztott, evakuált csőben végeztük.

Cirkuláris dikroizmus (CD mérések)

A peptidek CD spektrumát Jobin Yvon Mark VI típusú dikrográfon vettük fel, 0,02 cm úthosszú kvarc küvettában a 185-280 nm hullámhossztartományban. Az oldószer trifluoretanol és kétszer desztillált víz volt.

5.2 Oligolizin sorozat előállítása

5.2.1 Pentalizin építőegység előállítása

A védett pentalizin készítéséhez 2-klórtritil-klorid gyantát alkalmaztam, melyről a peptid a védőcsoportok hasadása nélkül távolítható el, enyhe savas közegben. A peptid szintézisét Fmoc-stratégiával végeztem. Az alkalmazott aminosavszármazék: Fmoc-Lys(Boc)-OH.

Gyanta mennyisége: 1,5 g, névleges gyantakapacitás: 1,5 mmol/g

Az első aminosav felkapcsolása a gyantához: a DCM-ben duzzasztott gyantához 3,5 mmol (1,6 g) aminosavszármazék DCM-os oldatát és 14 mmol (2,4 ml) DIEA-t adtam. 1,5 óra múlva 1,2 ml MeOH-t adtam hozzá és 10 percig reagáltattam (capping). A gyantát ezt követően mostam DCM, iPrOH, MeOH oldószerekkel, végül dietiléterrel. A gyantakapacitás meghatározása előtt a gyantát exszikkátorban szárítottam.
A gyantakapacitás meghatározását az Fmoc-csoport hasításakor képződő dibenzofulvén-piperidin addukt spektrofotometriás meghatározásával végeztem [130, 131]. Ez alapján a tényleges gyantakapacitás 0,79 mmol/g-nak adódott.

A további négy lizin egység felkapcsolását Fmoc-protokol szerint végeztem:

Művelet	Felhasznált anyagok	Ismétlések száma x időtartam (perc)
Mosás	DMF	3x1
Hasítás	20% piperidin/DMF	1x2 + 1x20
Mosás	DMF	8x1
Kapcsolás	3 ekv. aminosavszármazék	1x60
	3 ekv. HOBt	
	3 ekv. DIC	
Mosás	DMF	2x1
	DCM	2x1

A kapcsolás sikerét Kaiser-teszttel ellenőriztem. Az utolsó aminosavról nem hasítottam le az Fmoc-védőcsoportot, hanem MeOH-os mosás után (3x1 perc) exszikkátorban szárítottam a gyantát. A védett peptidet a gyantáról 45 ml DCM:MeOH:AcOH 6:2:2 V/V/V elegyével hasítottam. A hasítási idő 2 óra volt. A gyantát leszűrtem, a hasítóeleggyel 2x átmostam, majd az oldatot bepároltam, majd kétszer hexánnal eldörzsöltem, és a hexánt eltávolítottam. Az ecetsavnyomokat, ami a kondenzációs reakciókban zavarhat, pH=7,5

$NaHCO_3$ vizes oldatával végzett eldörzsölésével távolítottam el, majd levegőn, végül exszikkátorban szárítottam a pentalizin származékot.

5.2.2 Oligolizinek előállítása

Az első 5 lizin felkapcsolása a fent leírt módon történt. A továbbiakban védett pentalizin egységeket kapcsoltam az épülő lizinlánchoz, és minden kapcsolás után kivettem a gyanta egy részét úgy, hogy megközelítőleg arányos mennyiségben állítsak elő 5n (n=3-9) tagszámú oligolizineket.
A fragmensek kapcsolását 1,5 ekv. pentalizin, 1,5 ekv. BOP, 1,5 ekv. HOBt, és 3 ekv. DIEA DMF-es oldatával végeztem 2 órán át. Az anyagmennyiséget a gyantaszétosztás arányaiból számoltam.
A pentalizin-egység kapcsolása, az Fmoc-védőcsoport eltávolítása és a gyanta szétosztása után a hasítandó mennyiséget DMF, DCM és MeOH mosások után exszikkátorban szárítottam. A hasítás 5 ml, 95% TFA, 5% víz elegyével történt, időtartama 2 óra volt. Az elegyet ezután hideg éterbe szűrtem, a gyantát 2x0,5ml TFA-val és 2x0,5ml DCM-nal mostam. A kicsapódott peptidet centrifugáltam (10 perc, 3000 rpm), majd dekantálás után friss, hideg éterrel mostam, ezt 4x ismételtem meg. A peptidet 10% AcOH-oldatban oldottam, és liofilizáltam.

A peptidek analízise analitikai HPLC-n készült, Phenomenex Max-RP oszlopon, az 5.1 fejezetben megadott gradiens elúcióval.
A peptideket szemipreparatív HPLC-vel tisztítottam (Phenomenex Jupiter C18), alkalmazott gradiens: 0 perc 0% *B*, 5 perc 0% *B*, 20 perc 10% *B*. Kitermelés: 15-25 % között.

A peptideket tömegspektrometriás mérésük előtt P_2O_5 fölött szárítottam, és peptidtartalmukat a minták nitrogéntartalmának mérésével határoztuk meg.

9. táblázat: Oligolizin sorozat retenciós ideje analitikai RP-HLPC-n

Peptid	Retenciós idő (perc)
K_{15}	12,3
K_{20}	12,8
K_{25}	12,8
K_{30}	15,3
K_{35}	15,2
K_{40}	15,1
K_{45}	15,4

5.2.3 Tömegspektrometriás kísérletek

A MALDI-TOF tömegspektrumokat kétféle műszeren vettük fel, Bruker Biflex tömegspektrométeren (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) és egy Voyager DE-Pro (Applied Biosystems, Framingham, MA) készüléken mindkettő nitrogén lézeres (λ = 337 nm). A mérések során α-ciano-4-hidroxi-fahéjsavat (CCA, α-cyano-4-hydroxycinnamic acid), 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fahéjsavat (SA, sinapinic acid) és 2,5-dihidroxibenzoesavat (DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid) használtunk. A mátrixanyagokat 10 mg/ml koncentrációban acetonitril-víz 1:1 V/V arányú elegyében oldottuk fel, mely tartalmazott 0,1% TFA-t is. A poli(*L*-lizin) és oligolizin mintákat a megfelelő koncetrációban vízben oldottuk fel. A lemez mérőhelyeire 0,5 μl mintát és 0,5 μl mátrixoldatot cseppentettünk fel, majd levegőn hagytuk megszáradni. A kalibrálás peptidkeverék standarddal történt. A minta felszínét véletlenszerű pásztáztuk, és legalább 500 spektrumot átlagoltunk egy minta kiértékeléséhez. Az összehasonlító vizsgálatokban a lézer energiaszintjét állandóra állítottuk. Szükség esetén a mintákat C18 szűrőanyagtartalmú ZipTippel (Millipore) sótalanítottuk, a gyártó használati útmutatását követve.

5.3 HSV epitópok és konjugátumok előállítása

5.3.1 Lineáris prekurzor peptidek előállítása (**1a-4a**)

A lineáris peptideket szilárd fázisú szintézissel állítottam elő, ABI 433A típusú peptidszintetizátoron, FAST-MOC protokollal. A szintézist Rink-Amid MBHA gyantán végeztem (156 mg, 0,64 mmol/g kapacitás). Nyolcszoros mólfelesleget alkalmaztam a reagensekből a kapcsolás során, így 0,8 mmol Fmoc-aminosavszármazékot kapcsoltam HBTU-HOBt-DIEA aktiválással. A szintézisekben Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(O^{t}Bu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH oldalláncban védett aminosavszármazékokat használtam fel. A ciklizálásban résztvevő cisztein oldalláncát Trt csoport védte. A **3a** és **4a** peptidekben a dimerizációs, vagy konjugációs reakcióhoz szükséges ciszteint Acm csoport védte. A szintézis végén eltávolítottam az *N*-terminális Fmoc-csoportot, az így szabaddá tett aminocsoportot klóracetileztem 5 ekvivalens ClAc-OPcp-vel, 3 óráig, szobahőmérsékleten. A megszárított gyantáról a peptideket TFA-TIS-víz elegyével hasítottam (95:2,5:2,5 V/V/V) szobahőmérsékleten 2 óra hosszat. A nyers terméket hideg, a TFA mennyiségére számot 10x térfogatú vízmentes éterben csaptam ki, majd a szilárd anyagot centrifugálással választottam el, majd további 2 hideg éteres mosás következett (30-30 ml). A terméket 15 ml 10% vizes ecetsavoldatban oldottam fel, majd liofilizáltam. Ciklizálás előtt a peptideket szemi-preparatív HPLC-vel tisztítottam (gradiens: 0 perc 15% *B*, 5 perc 15% *B*, 40 perc 70% *B*), és analitikai HPLC-vel és MS-sel jellemeztem minőségét az 5.1 fejezetben megadott módon. A tisztított prekurzor peptideket 50-65% kitermeléssel kaptam meg.

5.3.2 Elágazó láncú prekurzor peptidek szintézise (**5a, 6a**)

Az elágazó láncú peptideket szilárd fázison manuálisan szintetizáltam, vegyes Boc és Fmoc technikával, MBHA gyantán (0,62 mmol/g kapacitás). A lineáris,

11-es pozícióban Met-t vagy Nle-t tartalmazó, *C*-terminálisán Ahx-Lys-Ahx-Cys tetrapeptiddel hosszabbított 9-22 peptidet Boc kémiával állítottam elő. Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Lys(ClZ)-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH és Boc-Cys(Meb)-OH oldalláncban védett aminosavszármazékokat használtam. A *C*-terminális meghosszabbításában található lizin ε-aminocsoportját Fmoc csoport védte.

A Boc szintézis protokollja:

Művelet	Felhasznált anyagok	Ismétlések száma x időtartam (perc)
Mosás	DCM	3x1
Hasítás	33% TFA/DCM	1x2 + 1x20
Mosás	DCM	5x0,5
Semlegesítés	10% DIEA/DCM	4x1
Kapcsolás	3 ekv. aminosavszármazék	1x60
	3 ekv. HOBt	
	3 ekv. DIC	
Mosás	DMF	2x1
	DCM	2x0,5

A kapcsolás sikerét Kaiser vagy izatin-teszttel ellenőriztem. Az *N*-terminális Boc-csoportjának lehasítása előtt az oldalláncot készítettem el Fmoc-technikával. Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH és Fmoc-Cys(Acm)-OH aminosavakat lépésenként kapcsoltam.

Az Fmoc szintézis protokollja:

Művelet	Felhasznált anyagok	Ismétlések száma x időtartam (perc)
Mosás	DMF	3x1
Hasítás	2% piperidin+2% DBU/DMF	2x2 + 1x5 + 1x10
Mosás	DMF	8x0,5

Kapcsolás	3 ekv. aminosavszármazék	1x60
	3 ekv. HOBt	
	3 ekv. DIC	
Mosás	DMF	3x0,5
	DCM	2x0,5

A kapcsolás sikerességét Kaiser vagy izatin-teszttel ellenőriztem. Az Fmoc-csoport eltávolítása után az oldallánc *N*-terminálisát acetileztem Ac_2O:DIEA:DMF 1:1:3 V/V/V elegyével 30 percig. Végezetül a Boc-csoportot is eltávolítottam a gerinc peptid *N*-terminálisáról, és a szabad aminocsoportot 5 ekvivalens ClAc-OPcp DMF-es oldatával klóracetileztem (3 óra szobahőmérsékleten). Ezután a peptidgyantát mostam DMF, DCM és MeOH oldószerekkel, majd exszikkátorban, P_2O_5 fölött szárítottam. A peptidet a gyantáról illetve az oldallánc védőcsoportokat *m*-krezol és *p*-tiokrezol scavengerek jelenlétében folyékony HF-dal hasítottam (10 ml HF, 0,5 ml *m*-krezol, 0,5 g *p*-tiokrezol) 0°C-on, 1 órán át. A HF eltávolítása után a nyers peptidet hideg éterrel kicsaptam, majd a szilárd anyagot leszűrtem, és 3x hideg éterrel mostam. A terméket 10%-os vizes ecetsavoldatban oldottam, majd liofilizáltam. Ciklizálás előtt a peptideket szemi-preparatív HPLC-vel tisztítottam az 5.3.1 fejezetben megadott gradienssel, és analitikai HPLC-vel és ESI-MS-sel jellemeztem (ld. 5.1 fejezet). Az elágazó láncú prekurzor peptideket tisztítás után 47-58%-os kitermeléssel kaptam meg.

5.3.3 Ciklusos epitóp peptidek szintézise (**1-6**)

A klóracetilezett lineáris peptidek ciklizálását 0,1 M Tris-HCl pufferben (pH=8,0) végeztem. A liofilizált tiszta prekurzor 100 mg-ját adtam 20 ml pufferoldatba, több részletben, 1 óra leforgása alatt, annak érdekében, hogy a szabad tiolcsoportot tartalmazó peptid koncentrációja az oldatban folyamatosan alacsony legyen. A reakcióedényt lezárva még 3 órán át kevertettem az oldatot szobahőmérsékleten. A reakció lezajlását analitikai

HPLC-vel követtem. A reakciót 100 μl TFA hozzáadásával leállítottam, és közvetlenül szemipreparatív HPLC tisztításnak vetettem alá. A ciklizálás kitermelése minden esetben 90% fölötti volt. A termékeket analitikai HPLC-vel és ESI-MS-sel jellemeztem az 5.1 fejezetben megadottak szerint. Az eredményeket a 4.2.1 fejezetben összegeztem a 3. táblázatban.

5.3.4 Ciklusos epitóp peptidek dimerizálása (**7-10**)

Az intermolekuláris diszulfidhidak kialakítását $Tl(tfa)_3$ TFA-s oldatában végeztem el (0,6 ekvivalensnyit számolva egy mól peptidre), így a cisztein oldalláncát védő Acm csoport hasításával párhuzamosan a dimerizációs reakció is lezajlott. A $Tl(tfa)_3$-ot TFA-ban oldottam, melyhez 2% anizolt adtam. Az elegyet 0°C-ra hűtöttem, majd abban a ciklopeptidet 10 mg/ml koncentrációban feloldottam. A reakcióelegyet 90 percig 0°C-on kevertettem, majd háromszoros mennyiségű hideg, vízmentes éterrel kicsaptam a terméket. A kicsapott peptidet centrifugáltam, majd 3x tiszta, hideg éterrel mostam. A terméket 10% ecetsavoldatban feloldottam, és liofilizáltam. A nyers terméket szemipreparatív HPLC-vel tisztítottam a korábbiakkal azonos gradiens elúció alkalmazásával. A terméket analitikai HPLC és ESI-MS segítségével jellemeztem. Az eredményeket a 4.2.1 fejezetben összegeztem a 3. táblázatban. A metionin tartalmú ciklopeptid-dimer képződése 50-55%-os volt, a Nle-származék 58-65% volt.

5.3.5 Dimerizált ciklikus epitóp peptidek redukálása (**11, 12**)

Ehhez a reakcióhoz az előállított dimer ciklopeptidek egy részletét használtam fel. A ciklikus epitóp peptidek diszulfidhídjainak redukálásához a peptidet 0,1 M, pH=8,0 Tris-HCl pufferban oldottam fel, mely a peptidre számolt 20 ekvivalens DTT-t tartalmazott. A reakcióelegyet 2 órán át kevertettem lezárt edényben szobahőmérsékleten. A redukció végbementelét analitikai HPLC-vel követtem. A reakciót TFA-val megállítottam, majd szemipreparatív HPLC-vel

tisztítottam, a szokásos gradiens elúcióval (5.3.1 fejezet). A szabad tiolcsoportú monomer ciklopeptidet analitikai HPLC-vel és ESI-MS-sel jellemeztem. Az eredményeket a 4.2.1 fejezetben összegeztem a 3. táblázatban. A redukciós lépés kitermelése minden esetben 90% fölötti volt.

5.3.6 Ciklusos epitóp petidek konjugálása klóracetilezett tetratuftsin származékhoz (**13, 14**)

4 mg (1,67 μmol) klóracetilezett tetratuftsin hordozót oldottam 4 ml, 0,1M Tris-HCl pufferben (pH=8,2). A szabad tiolcsoportot tartalmazó peptidet lassan adagoltam az oldatba, 8-12 óra leforgása alatt. A klóracetil-csoportokra számítva 3-szoros feleslegben (20 μmol, 50 mg **11** és 54 mg **12**) kellett az epitóp peptidszármazékot adni a hordozóhoz, hogy az alkileződési reakció teljesen végbemenjen. A konjugálást analitikai HPLC-vel követtem. Amikor a 4 epitópot tartalmazó konjugátum volt csak megfigyelhető a ciklopeptid és dimerje mellett a kromatogramban, a reakciót az oldat savanyításával megállítottam. Ezután az elegyet szemipreparatív HPLC-vel tisztítottam a korábban megadott gradiens elúcióval. A konjugátumokat analitikai HPLC-vel és ESI-MS-sel jellemeztem az 5.1 fejezetben leírtak szerint. Az eredményeket a 4.2.1 fejezetben összegeztem a 3. táblázatban. A konjugálási reakciók kitermelése 70-75%-os volt.

5.3.7 Oligotuftsin alapú hordozó molekulák szintézise

Az oligotuftsint MBHA gyantán állítottam elő, Boc-technikával. Az alkalmazott aminosavak: Boc-Gly-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Lys(ClZ)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH. Azon lizin egységek esetén, ahol elágazást kívántam a peptidbe építeni, Fmoc volt az oldalláncvédőcsoport, a többi lizin esetében a ClZ védőcsoportot alkalmaztam. A kapcsolásokat az 5.3.2 fejezetben leírt Boc-protokoll szerint végeztem. Az utolsó aminosav beépítése után az N-terminális Boc-csoportot lehasítottam, majd a szabad aminocsoportot acetileztem Ac_2O-

DIEA-DMF (1:1:3 V/V/V) elegyével, fél óráig, szobahőmérsékleten. A szintézist korábban publikált eljárás alapján reprodukáltam [121].

A promiszkuis epitóppal hosszabbított hordozó (rövidítése: ppT20) esetén az utolsó Thr felkapcsolása után egy Boc-Lys(Boc)-OH aminosavszármazékot kapcsoltam a peptidlánchoz, majd TFA-s hasítás után a szintézist a Lys mindkét aminocsoportján is folytattam, a reagensek mennyiségét megkétszerezve. A T-sejt epitóp szekvencia felépítéséhez Boc-Tyr(BrZ)-OH, Boc-Ser(^{t}Bu)-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Val-OH és Boc-Phe-OH aminosavszármazékokat használtam. Az utolsó aminosavak α-aminocsoportjait acetileztem a fentiek szerint. Mindkét esetben a tetratuftsin rész Fmoc-csoporttal védett lizinjeiről lehasítottam az Fmoc-csoportot, és ClAc-OPcp alkalmazásával klóracetileztem a már ismeretett módon.

A hordozószármazékokat HF-dal hasítottam *p*-krezol jelenlétében (10 ml, 1 g), 1 órát 0°C hőmérsékleten. A nyersterméket hideg éterrel kicsaptam, majd szűrtem, 3 hideg éteres mosás után pedig 10% AcOH-ban oldottam és liofilizáltam. A terméket minden esetben RP-HPLC-vel tisztítottam (gradiens: 0 perc 20% *B*, 5 p 20% *B*, 45 perc 60% *B*) a konjugálási lépés előtt, és analitikai HPLC-vel illetve ESI-MS méréssel azonosítottam őket (klóracetilezett tetratuftsin: ESI-MS: számolt: 2409,1, mért [M+H$^+$] 2410,2, retenciós idő: 21,8 perc; promiszkuis peptiddel hosszabbított: ESI-MS számolt: 4269,0, mért [M+H$^+$] 4269,9, retenciós idő: 24,5 perc)

5.3.8 Ciklusos HSV epitópszármazék szintézise a **15** konjugátum előállításához

A ciklopeptid (**6**) Acm védőcsoportjának hasítását AgOTf-tal végeztem. A védett ciklopeptid 80 mg-ját (0,029 mmol) oldottam 50 ml TFA-ban (1% anizol jelenlétében), a tiolra számolt 100 ekvivalensnyi AgOTf-tal reagáltattam (750 mg, 2,9 mmol) 2 órán át, 4°C hőmérsékleten. A terméket 300 ml hideg éterrel kicsaptam. Centrifugálás után a tiolcsoportján ezüstöt kötő peptidet 25 ml 10% AcOH-ban oldva 150 mg (0,98 mmol) DTT hozzáadásával szabadítottam fel, majd az oldatból kiváló ezüstvegyület csapadékot centrifugálással távolítottam

el az oldott terméket tartalmazó elegyből. A peptidet szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam (az 5.3.2 fejezetben leírtak szerint), majd analitikai HPLC-vel és ESI-MS-sel azonosítottam (ESI-MS [$M+H^+$]: számolt 2659,3, mért 2659,7, retenciós idő 12,2 perc. Alkalmazott gradiens az analitikai méréshez: 0 perc 30% *B*, 2 perc 30% *B*, 25 perc 70% *B*).

5.3.9 Lineáris HSV 9-22C epitópszármazék szintézise a **16** konjugátum előállításához

A peptidet 1 g, 1,04 mmol/g kapacitású MBHA gyantán szintetizáltam, Boc-technika alkalmazásával. Az utolsó Boc-csoport eltávolítása után a gyantát mostam (5x5 ml DCM, 2x5ml MeOH), majd exszikkátorban szárítottam. A hasítást 10 ml HF-dal végeztem, 100 mg DTT és 1 g *p*-krezol jelenlétében (reakcióidő 1 óra, hőmérséklet 0°C). A nyersterméket hideg éter 50 ml-évél kicsaptam, majd centrifugáltam, és ezután háromszor 10 ml hideg éterrel mostam. A peptidet 20 ml 10% AcOH-ban oldottam, és liofilizáltam. Szemipreparatív HPLC-vel tisztítottam a terméket, végül analitikai HPLC-vel és ESI-MS-sel jellemeztem (Retenciós idő: 21,3 perc, ESI-MS számolt: 1743,7, mért [$M+H^+$] 1744,7).

5.3.10 A **15** és **16** konjugátumok szintézise

Két külön bemérésben 14-14 mg (2x3,5 μmol) ppT20 peptidet oldottam 20-20 ml 0,1 M Tris-pufferben (pH=8,5), és az oldatokhoz több részletben (10 óra leforgása alatt) adagoltam 75 mg (2,8 μmol, 2 ekv. ClAc-csoportonként) ciklopeptidet, illetve 100 mg (57 μmol, 4 ekv. ClAc-csoportonként) lineáris epitópszármazékot. A reakcióelegyeket 48 órán át állni hagytam (időnként megrázva a rekacióedényt), és analitikai HPLC-n követtem a reakció lefolyását. A tisztítást liofilizás nélkül, az oldatok TFA-val történő savanyítása (pH 2-3) után szemipreparatív HPLC-n a korábban megadott gradiens

elúcióval (5.3.2 rész) végeztem. Analitikai HPLC és ESI-MS segítségével jellemeztem a termékeket (lásd az 5. táblázatot, 4.2.3 fejezet).

5.4 Kemotaktikus peptidszármazékok tuftsin-konjugátumainak szintézise

A peptideket manuális szilárd fázisú peptidszintézissel állítottam elő MBHA gyantán (mennyisége 0,8 g, kapacitás: 0,62 mmol/g). Az oligotuftsin hordozót ($[TKPKG]_4$) Boc/Bzl technikával építettem fel (szintézisprotokollt lásd 5.3 fejezetben), az alkalmazott aminosavszármazékok Boc-Gly-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH (az ismétlődő szakaszok 4. pozíciója), Boc-Pro-OH, Boc-Lys(ClZ)-OH (az ismétlődő szakaszok 2. pozíciója), Boc-Thr(Bzl)-OH voltak. Ezután minden második lizin ε-aminocsoportjának Fmoc-védelmét eltávolítottam 2% piperidin és 2% DBU DMF-es oldatával (2+2+5+10 perc). A gyantát ezután négyfelé osztottam és az *N*-terminálison GFLG „spacer”-rel módosított konjugátum kivételével az oldallánc szintézisét Fmoc/^{t}Bu technikával folyattam, a metionin oldallánc oxidációjának elkerülésére. A felhasznált aminosavak: Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Nle-OH. Minden kapcsolásban 12 ekvivalens aminosavszármazékot, 12 ekvivalens HOBt-t és 12 ekvivalens DIC-t használtam, vagyis a funkciós csoportokra számítva 3-3 ekvivalensnyit. Az utolsó aminosav felkapcsolása után lehasítottam az Fmoc-csoportot, és az α-aminocsoportok formilezését 20 (4x5) ekvivalens DMF-ben oldott hangyasav triklórfenilészterével végeztem el. A reakcióidő 2 óra volt.

A GFLG tartalmú konjugátum esetén az oligotuftsin lánc *N*-terminálisára Boc-Lys(Boc)-OH aminosavszármazékot kapcsoltam, majd a Boc-csoportok hasítása után mindkét aminocsoportján folytattam a szintézist Boc-technikával, megkettőzve az anyagmennyiségeket, tehát 6 ekvivalenst alkalmazva a reagensekből. Az utolsó kapcsolás után a Boc-csoportokat lehasítottam, és az aminocsoportokat 5 ml ecetsavanhidrid:DIEA:DMF 1:1:3 V/V/V arányú eleggyel acetileztem. A „spacer” szekvencia beépítése után az fMLF oldalláncot a fent leírt módon építettem be.

A gyantákat hasítás előtt DMF-fel, DCM-mel, és etanollal mostam, levegőn majd exszikkátorban P_2O_5 fölött szárítottam. A gyanta-peptid kötést valamint a védőcsoportok hasítását HF-dal végeztem (10 ml), *p*-krezol (1 g) és DTT (0,1 g) jelenlétében (0°C, 1,5 óra). A nyers terméket a HF eltávolítása után hideg dietiléterrel csaptam ki, majd szűrtem, és kétszer hideg éterrel mostam, végül 10% ecetsavban oldottam, és liofilizáltam. A további módosításokat a peptidek RP-HPLC-s tisztítása után végeztem el.

Az Ac-[TKPK(fMLF)G]$_4$-NH_2 származék lizin oldalláncait oldatban formileztem 8 ekvivalens (4x2 ekv.) For-OTcp-vel DMF-ben, a peptid koncentrációja 10 mg/ml volt. A reakciót analitikai HPLC-vel követtem, 24 óra elteltével a reakcióelegy összetételében változást már nem tapasztaltam. A DMF-ot bepároltam, majd a terméket RP-HPLC-n tisztítottam Szukcinilcsoport beépítését 0,2 M-os NH_4HCO_3 pufferben végeztem (pH=6,5, a peptid koncentrációja: 10 mg/ml) 12 ekvivalens (4x3 ekv) borostyánkősavanhidriddel. A reakciót analitikai HPLC követtem, és lejátszódása után az elegyet közvetlenül RP-HPLC-vel tisztítottam. A termékeket analitikai HPLC-vel és ESI-MS méréssel jellemeztem Az adatok a kitermelési százalékokkal együtt a 6. táblázatban (4.3 fejezet) láthatók.

5.5 GnRH-III peptidek előállítása

Az előállított vegyületek szilárd fázisú peptidszintézissel:
Ac-[TKPK(<EHWSHDWKPGGFLG)G]$_4$-NH_2, GGT20
Ac-[TKPK(ClAc-GFLG)G]$_4$-NH_2, T20(ClAc-GFLG)
<EHWSHDWKPG-NH_2, GnRH-III
<EHWSHDWK(Cys)PG-NH_2, GnRH-III(Cys)
<EHWSHDWK(Ac-Cys)PG-NH_2, GnRH-III(AcCys)

Oldatban végzett reakciók termékei:

Ac-[TKPK(CH_2CO-GFLG)G]$_4$-NH_2
|

<EHWSHDWK(Ac-Cys)PG-NH_2 T20[GnRH(Ac-Cys)$_4$]

[<EHWSHDWK(Cys)PG-NH_2]$_2$, [GnRH-III(Cys)]$_2$

[<EHWSHDWK(Ac-Cys)PG-NH_2]$_2$, [GnRH-III(AcCys)]$_2$

5.5.1 A T20-GnRH-III konjugátum felépítése totálszintézissel

A GGT20 (**G**nRH-**G**FLG-**T20**) konjugátumot 1 g (0,67 mmol/g kapacitású) MBHA gyantán készítettem el. A tetratuftsin és az elágazás felépítését a fent ismeretett módon végeztem, azonban az oldallánc szintézisét az első triptofántól kezdve Fmoc-technikával folytattam, így csökkentve a savra érzékeny aminosavakon lejátszódó mellékreakciók lehetőségét.

A hasítást két lépésben végeztem el: először 10 ml TFA:víz:EDT (9,5 : 0,25 : 0,25 V/V/V) eleggyel hasítottam a Trt és ^{t}Bu oldalláncvédőcsoportokat (reakcióidő: 1,5 óra, szobahőmérsékleten). A gyantát ezután TFA-val mostam (3x5 ml), majd DCM-nal (5x5 ml), végül MeOH-lal. A gyantát P_2O_5 fölött szárítottam a HF-es hasítás előtt. A hasítást 20 ml HF-dal végeztem el, 2 g *p*-krezol és 200 mg DTT jelenlétében (reakcióidő: 1 óra, hőmérséklet: 0°C).

A terméket szemipreparatív HPLC-vel tisztítottam, jellemzését analitikai HPLC-vel és tömegspektrometriával végeztem. Az adatok a kitermelési értékekkel együtt a 4.4.1 részben a 8. táblázatban láthatók.

5.5.2 A klóracetilezett tetratuftsin származék szintézise

Az oligotuftsin hordozót a 5.4 fejezetben leírtak szerint készítettem el. A gyanta mennyisége 1g volt, kapacitása 0,67 mmol/g. Az Fmoc-csoporttal védett lizinek oldalláncáról eltávolítottam a védőcsoportot, majd Boc-technikával folytattam az oldallánc kiépítését. A GFLG szekvencia α-aminocsoportját ClAc-OPcp alkalmazásával klóracetileztem (5 ekvivalens 4 oldalláncra: összesen 20 ekv., 1,5 ml DMF-ben szuszpendálva, reakcióidő: 4 óra). A gyanta mosása (DMF,

DCM és MeOH) és szárítása után a hasítást 10 ml HF, 0,5 ml *m*-krezol és 0,5 g *p*-tiokrezol elegyével végeztem (reakcióidő: 1 óra, hőmérséklet: 0°C). A terméket szemipreparatív HPLC-vel tisztítottam, jellemzését analitikai HPLC-vel és tömegspektrometriával (ESI-MS) végeztem, az analitikai adatokat a 8. táblázat (4.4.1 fejezet) tartalmazza a kitermelésekkel együtt.

5.5.3 GnRH-III származékok szintézise

A GnRH-származékok elkészítéséhez 1,5 g MBHA gyantát (gyantakapacitás: 1,4 mmol/g) használtam fel. Mind a Boc, mind az Fmoc technikát alkalmaztam, protokolljukat lásd 5.3 fejezetben. A lizinig a három anyagot együtt szintetizáltam, majd a gyantát osztottam. A ciszteines származékok elkészítéséhez a gyanta 2/3-ára a lizint Fmoc-Lys(Boc)-OH származékával építettem be, a Boc csoport hasítása után Boc-Cys(Meb)-OH-t kapcsolva az ε-aminocsoporthoz. Ezután a gyantát osztottam, és az egyik részleten hasítottam a cisztein Boc-csoportját, és ecetsavanhidriddel acetileztem (1 ml Ac_2O, 1 ml DIEA, 3 ml DMF elegyével, 30 perc). A három peptidet ezután párhuzamosan szintetizáltam, Fmoc-technikával.

A GnRH szekvenciát tartalmazó vegyületek hasítását két lépésben végeztem: először 10 ml TFA-víz-EDT (9,5 : 0,25 : 0,25 V/V/V) elegyével hasítottam a ^{t}Bu és Trt csoportokat, majd a gyantát mostam TFA-val és egyszer DCM-nal, végül semlegesítettem 10 % DIEA/DCM eleggyel. Ezután DCM, EtOH oldószerekkel mostam a gyantát, és exszikkátorban szárítottam. A peptideket 10 ml HF, 1g *p*-krezol és 0,1g DTT elegyével hasítottam a gyantáról, ebben a lépésben a cisztein oldalláncvédőcsoportja is lehasadt. A nyerstermékeket a korábban leírt kicsapással izoláltam. Az anyagokat szemipreparatív RP-HPLC-n tiszítottam, liofilizáltam, majd analitikai HPLC-vel és tömegspektrométerrel ellenőriztem minőségüket. Az adatok a kitermelési értékekkel együtt a 4.4.1 részben a 8. táblázatban láthatók.

5.5.4 Oxidációs vizsgálatok

A ciszteint tartalmazó GnRH-III peptideket 0,1 M Tris-pufferban oldottam 0,5 μg/ml koncentrációban, a puffer pH-ja 8,2 volt. A reakcióedényt lezártam, és 25°C hőmérsékleten kevertettem 24 órán át. Az oldatból 50 μl mintát vettem 5 perc, 1 óra, 2 óra, 4 óra, és 24 óra elteltével, és analitikai RP-HPLC-vel vizsgáltam (az általánosan alkalmazott és az 5.1 fejezetben leírt körülmények között). A redukált és oxidált peptid relatív mennyiségét a csúcs alatti területből számoltam (7. táblázat).

Nagy mennyiségben a dimerizációs reakciót szintén Tris-pufferben végeztem (pH=8,5), 4 ml pufferben oldva 30-30 mg ciszteines származékot. A reakciókat analitikai HPLC-vel követtem, végül 0,5 ml TFA hozzáadásával állítottam meg. Az oldatokat közvetlenül a HPLC-re injektáltam és tisztítottam. Az előállított dimereket analitikai HPLC-vel és tömegspektrométerrel (ESI-MS) jellemeztem. Az adatok a kitermelési értékekkel együtt a 4.4.1 részben a 8. táblázatban láthatók.

5.5.5 A konjugátum szintézise

A konjugátum előllításához a klóracetilezett hordozó 16 mg-ját oldottam 20 ml 0,1M Tris-pufferben (pH=8,5), majd kevertetés közben 70 mg GnRH-III(Ac-Cys)-t adtam az oldathoz részletekben 8 óra leforgása alatt. A reakció lefolyását analitikai HPLC-vel követtem, végül a reakciót 0,5 ml TFA hozzáadásával állítottam meg. Az elegyet szemipreparatív HPLC-vel tisztítottam, alkalmazott gradiens: 0 perc 20% *B*, 5 perc 20% *B*, 30 perc 45% *B*.

A peptideket ESI-MS-sel és analitikai HPLC-vel jellemeztem. Az analitikai adatokat a 8. táblázatban (4.4.1 fejezet) tüntettem fel.

6 Összefoglalás

Doktori munkámmal az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjában folytatott kutatásokba kapcsolódtam be. A csoport kutatásainak egyik fő irányvonala a szintetikus antigének előállítása immunizálási illetve diagnosztikai céllal. A másik az irányított tumor terápiához kapcsolódik. Ezeket a kutatásokat közös pontként a hordozó kutatás kapcsolja össze. Korábban szinte kizárólag elágazó láncú polipeptideket alkalmaztak hordozóként, de ezen polimerek alapját képező polilizin lánc jellemzése nehézségekbe ütközött.

A polimerek jellemzésére bevezettük a tömegspektrometriás analízist. A vizsgálatokhoz egy 8 tagból álló standard oligolizin sorozatot készítettem (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 lizinegységből álló peptidek). A sorozat tagjainak segítségével igyekeztünk következtetéseket levonni, hogy a tömegspektrometria mennyire alkalmas polilizinek tömegeloszlásának és átlagos molekulatömegének meghatározására. A vizsgálatokból azt a megállapítást vontuk le, hogy a polimer elegyben lévő polilizinek lánchossza (minimum és maximum értékek) viszonylag jól detektálhatók, amiből közelítőleg lehet következtetni az átlagos molekulatömegre. Azonban pontos értéket kapni nehéz, mert a tömegeloszlást reprezentáló Gauss-görbe maximuma koncentrációfüggő módon változik. A módszer validálásához további mérések szükségesek.

A további kísérleteimben a Kutatócsoportban kifejlesztett, jól jellemezhető, vízoldékony és biodegradábilis tetratuftsin származékot használtam hordozóként. A molekula nem toxikus, nem immunogén és immunstimuláló hatása van, amely mind a szintetikus vakcinákban, mind tumorellenes hatású konjugátumokban hasznos lehet.

A második célkitűzésemnek megfelelően elkészítettem 6 nagyméretű ciklust tartalmazó ciklopeptidet a HSV gD-1 9-22 epitóp peptidjéből. Előállítottam 4 ciklusos peptid dimerjét és 2 vegyület (a 11-es pozícióban a Met helyett Nle-t tartalmazó analógok) tetratuftsinnal készült konjugátumait. Megállapítottam, hogy a metionin cseréje norleucinra nincs hatással a vegyület ellenanyag felismerésére. A ciklus „spacer” szakasszal történő módosítása, a „spacer”

helyzetétől függően csökkenti az ellenanyag kötődését a peptidhez. A ciklopeptidek dimerizálása ugyanakkor növeli az ellenanyag felismerést. A konjugátumok közül az, amelyben a ciklikus epitóp peptid elágazáson keresztül kötődik a hordozóhoz igen jó kötődést mutatott, amely már megközelítette a lineáris 9-22 epitóp peptid kötődését az ellenanyaghoz.

Újdonság ezen konjugátumok előállításában, hogy mind a ciklopeptid kialakításához, mind azok konjugálásához tioéter-kötést alkalmaztam ortogonális cisztein védelem segítségével. Az előállított, jól jellemezhető konjugátumok molekulatömege megközelítette a 15 kDa-t, ami már a kisebb fehérjék tartományába esik.

Immunizálási kísérletekhez a leghatékonyabb lineáris illetve ciklikus epitópot tartalmazó konjugátumot alapul véve, elkészítettem azok promiszkuis T-sejt epitópot is tartalmazó variánsait. CD-spektroszkópiával vizsgálva térszerkezetüket, azt állapítottuk meg, hogy a ciklikus és lineáris epitópot tartalmazó konjugátumok szerkezete minimálisan tér csak el egymástól. Ezeket a konjugátumokat kívánjuk felhasználni immunizálási kísérletekben.

Az irányított tumor terápiához kapcsolódó kísérleteimben az oligotuftsin hordozóhoz specifikus receptor ligand molekulák négy-négy kópiáját kapcsoltam. Az irányító molekulák egyik típusa, a kemotaktikus peptideket öleli fel. A formil-tripeptideket tartalmazó konjugátumok (H-[TKPK(For-MLF)G]$_4$-NH_2, H-[TKPK(For-NleLF)G]$_4$-NH_2, H-[TKPK(For-MMM)G]$_4$-NH_2) kemotaxisát vizsgáltuk *Tetrahymena pyriformis* csillós egysejtűn és tumoros THP-1 monocita sejteken. Előállítottam olyan vegyületeket is (H-[TK(For)PK(For-MLF)G]$_4$-NH_2, H-[TK(Succ)PK(For-MLF)G]$_4$-NH_2) amelyek segítségével a molekulák töltésviszonyainak hatását vizsgáltuk a fent említett sejtek kemotaxisára. A későbbiekben kialakított metotrexát tartalmú konjugátumok ({Mtx-GFLGC-NH_2}CH_2CO-K({Mtx-GFLGC-NH_2}CH_2CO)-[TKPK(For-MLF)G]$_4$-NH_2) toxikus hatása a THP-1 sejteken mutatta, hogy ezek a vegyületek alkalmas molekulák lehetnek a kemotaxison alapuló gyógyszer célbajuttatásra (chemotactic drug targeting, CDT).

A másik eljárásban GnRH-III molekulát konjugáltam oligotiftsin hordozó molekulához, abban a reményben, hogy a GnRH származék nem csak irányító

feladatokat lát el, hanem az önmagában antitumor hatású vegyület a konjugátumban is magtartja biológiai hatását.

A GnRH-III (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH_2) molekulát az egyik esetben a *C*-terminálisán keresztül egy GFLG enzimlabilis tetrapeptid „spacer" közbeiktatásával közvetlenül szintetizáltam a tetratuftsin származék oldalláncaira. A másik szintézisút során a Lys oldalláncára beépítettem egy ciszteint és ennek tiol csoportját alkalmazva kémiai ligációs módszerrel kötöttem a vegyületet egy klóracetilezett oligotuftsin származékhoz. Ebben a reakcióban melléktermékként jelentős mennyiségben keletkezett a GnRH-III(Cys) peptid diszulfid dimerje. Ezt a mellékreakciót vissza lehetett szorítani a Cys aminocsoportjának acetilezésével. Azonban a keletkezett dimereket is vizsgáltuk a konjugátumok mellett antiproliferációs tesztekben.

Megállapítottuk, hogy míg a konjugátumok kevéssé mutattak antiproliferatív hatást humán emlő (MDA-MB 231) és humán vastagbél karcinóma (HT-29) sejtvonalakon, addig a dimer hatása jelentősebb volt. A cisztein aminocsoportjának acetilezése tovább növelte a GnRH-III dimer *in vitro* tumorellenes hatását MCF-7 (humán emlő) és HT-29 sejteken. További előnye a dimereknek, hogy az endokrin hatásuk tovább csökkent az amúgy is alacsony endokrin hatással rendelkező GnRH-III molekulához képest. Így ezek a dimerek még szelektívebb tumorgátló hatással rendelkeznek. A dimerek potenciális jelöltek lehetnek hatóanyag irányított célbajuttatására.

7 Irodalomjegyzék

1. Jones, J.H., *A short guide to abbreviations and their use in peptide science.* J Pept Sci, 1999. **5**: p. 465-471.

2. Merrifield, R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide.* Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(14): p. 2149-2154.

3. Merrifield, R.B. in *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 1962.

4. Merrifield, R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis. II. The Synthesis of Bradykinin.* Journal of the American Chemical Society, 1964. **86**(2): p. 304-305.

5. Merrifield, R.B., *Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin.* Biochemistry, 1964. **3**(9): p. 1385-1390.

6. Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I., *Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides.* Analytical Biochemistry, 1970. **34**(2): p. 595-598.

7. Kaiser, E., Bossinger, C. D., Colescott, R. L., Olsen, D. B., *Color test for terminal prolyl residues in the solid-phase synthesis of peptides.* Analytica Chimica Acta, 1980. **118**(1): p. 149-151.

8. Vojkovsky, T., *Detection of secondary amines on solid phase.* Peptide Research, 1995. **8**: p. 236.

9. Grant, G.A., *Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis*, in *Synthetic Peptides: A User's Guide*, Grant, G.A., Editor. 1992, W.H. Freeman & Co.: New York.

10. Atherton, E., Sheppard, R.C., *Solid phase synthesis: a practical approach*. The practical approach, ed. Rickwood, R., Hames, B.D. 1989, Oxford: IRL Press.

11. Wright, P., Lloyd, D., Rapp, W., Andrus, A., *Large scale synthesis of oligonucleotides via phosphoramidite nucleosides and a high-loaded polystyrene support.* Tetrahedron Letters, 1993. **34**(21): p. 3373-3376.

12. Erickson, B.W., Merrifield, R.B., in *The Proteins*, H, N., Holl, R., Editors. 1979, Academic Press: New York. p. 255-527.

13. Bárány, G., Merrifield, R.B., eds. *Solid-phase peptide synthesis*. The peptides, ed. Gross, E., Meienhofer, J. Vol. 2. 1979, Academic Press: New York. 1-248.

14. Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D., Logan, C., Sheppard, R., Williams, B., *A mild procedure for solid phase peptide syntesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids.* J. Chem. Soc. Chem. Commun, 1978: p. 537-539.

15. Hendrix, J.C., Halverson, K.J., Landsbury, P.T., *A convergent synthesis of the amyloid protein of Alzheimer's disease.* J. Am. Chem. Soc., 1992. **114**: p. 7930-7931.

16. Lyle, T.A., Brady, S.F., Ciccarone, T.M., Colton, C.D., Paleveda, W.J., Veber, D.F., Nutt, R.F., *Chemical synthesis of rat natriuretic factor by fragment assembly on solid support.* J. Org. Chem., 1987. **52**: p. 3752-3759.

17. Nilsson, B.L., Kiessling, L.L., Raines, R.T., *High-yielding Staudinger ligation of a phosphinothioester and azide to form a peptide.* Org Lett, 2001. **3**(1): p. 9-12.

18. Low, D.W., Hill, M.G., Carrasco, M.R., Kent, S.B., Botti, P., *Total synthesis of cytochrome b562 by native chemical ligation using a removable auxiliary.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6554-9.

19. Botti, P., Carrasco, M.R., Kent, S.B.H., *Native chemical ligation using removable N[alpha]-(1-phenyl-2-mercaptoethyl) auxiliaries.* Tetrahedron Letters, 2001. **42**(10): p. 1831-1833.

20. Botti, P., Villain, M., Manganiello, S., Gaertner, H., *Native chemical ligation through in situ O to S acyl shift.* Org Lett, 2004. **6**(26): p. 4861-4.

21. Botti, P., Pallin, D.T., Tam, J.P., *Cyclic peptides from linear unprotected peptide precursors through thiazolidine formation.* J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**: p. 10018-10024.

22. Sheehan, J.C., Hess, G.P., *A new method forming peptide bonds.* J. Am. Chem. Soc., 1955. **77**: p. 1067-1068.

23. Sarantakis, D., Teichman, J., Lien, E.L., Fenichel, R.L., *A novel cyclic undercapeptide, WY-40, 770, with prolonged growth hormone release inhibiting activity.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976. **73**(2): p. 336-342.

24. König, W., Geiger, R., *Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen.* Chem. Ber., 1970. **103**: p. 788-798.

25. Lloyd-Williams, P., Albericio, F., Giralt, E., *Solid phase peptide synthesis*, in *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, Rees, C.W., Editor. 1997, CRC-Press: Boca Raton. p. 19-93.

26. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., Gillessen, D., *New Coupling Reagents in Peptide Chemistry.* Tetrahedron Lett., 1989. **30**: p. 1927-1930.

27. Carpino, L.A., El-Faham, A., Albericio, F., *Racemization Studies During Solid-Phase Peptide Synthesis Using Azabenzotriazole-Based Coupling Reagents.* Tetrahedron Lett., 1994. **35**: p. 2279-2282.

28. Carpino, L.A., El-Faham, A., *Effect of Tertiary Bases on O-Benzotriazolyluronium Salt-Induced Peptide Segment Coupling.* J. Org. Chem., 1994. **59**: p. 695-698.

29. Castro, B., Dormoy, J.R., Evin, G., Selve, C., *Reactions of Peptide Bond .4. Benzotriazonyl-N-Oxytridimelthylamino Phosphonium Hexafluorophosphate (Bop).* Tetrahedron Lett., 1975. **16**(14): p. 1219-1222.

30. Coste, J., Le-Nguyen, D., Castro, B., *PyBop - A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product.* Tetrahedron Lett., 1990. **31**(2): p. 205-208.

31. Fields, C.G., Lloyd, D.H., Macdonald, R.L., Otteson, K.M., Noble, R.L., *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis.* Pept. Res., 1991. **4**: p. 95-101.

32. Carpino, L.A., El-Faham, A., Minor, C.A., Albericio, F., *Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis.* J.Chem.Soc.Chem.Commun., 1994: p. 201-203.

33. Albericio , F., Bofill, J.M., El-Faham, A., Kates, S.A., *Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis.* J.Org.Chem., 1998. **63**: p. 9678-9683.

34. Sakakibara, S., Shimonishi, Y., Kishida, Y., Okada, M., Sugihara, H., *Use of anhydrous hydrogen fluoride in peptide synthesis. I. Behavior of various protective groups in anhydrous hydrogen fluoride.* Bull. Chem. Soc. Jpn., 1967. **40**: p. 2164-2167.

35. Grant, G.A., *Evaluation of the finished product*, in *Synthetic peptides A User's Guide*, Grant, G.A., Editor. 1992, W.H. Freeman & Co.: New York.

36. King, D.S., Fields, C.G., Fields, G.B., *A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis.* Int. J. Pept. Prot. Res., 1990. **36**: p. 255-266.

37. Consden, R., Gordon, A.H., Martin, A.J., *Gramicidin S: the sequence of the amino-acid residues.* Biochem J, 1947. **41**(4): p. 596-602.

38. Consden, R., Gordon, A.H., Martin, A.J., *The identification of lower peptides in complex mixtures.* Biochem J, 1947. **41**(4): p. 590-6.

39. Hruby, V.J., *Conformational restrictions of biologically active peptides via amino acid side chain groups.* Life Sci, 1982. **31**(3): p. 189-99.

40. Kates, S.A., Solé, N.A., Johnson, C.R., Hudson, D., Bárány, G., Albericio, F., *A novel, convenient, three-dimensional orthogonal strategy for solid-phase synthesis of cyclic peptides, ,.* Tetrahedron Letters, 1993. **34**(10): p. 1549-1552.

41. Yamazaki, T., Said-Nejad, O.E., Schiller, P.W., Goodman, M., *Conformational studies of stereoisomeric 14-membered cyclic enkephalin analogues containing 1-naphthylalanine at the fourth position: chirality effect of leucine at the fifth position on biological activity and receptor selectivity.* Biopolymers, 1991. **31**(7): p. 877-98.

42. Ryle, A.P., Sanger, F., Smith, L.F., Kitai, R., *The disulphide bonds of insulin.* Biochem J, 1955. **60**(4): p. 541-56.

43. Creighton, T.E., *Disulphide bonds and protein stability.* Bioessays, 1988. **8**(2): p. 57-63.

44. Andreu, D., Nicolas, E., *Disulfide formation on synthetic peptides and proteins: the state of the art*, in *Solid-phase synthesis: A practical guide*, Kates, S.A., Albericio, F., Editors. 2000, Marcel Dekker Inc.: New York. p. 365-375.

45. Lindner, W., Robey, F.A., *Automated synthesis and use of N-chloroacetyl-modified peptides for the preparation of synthetic peptide polymers and peptide-protein immunogens.* Int J Pept Protein Res, 1987. **30**(6): p. 794-800.

46. Pallin, D.T., Tam, J.P., *Cyclisation of totally unprotected peptides in aqueous solution by oxime formation.* J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1995(19): p. 2021-2022.

47. Saito, G., Swanson, J.A., Lee, K.D., *Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**: p. 199-215.

48. Plaue, S., Muller, S., Briand, J.P., Van Regenmortel, M.H., *Recent advances in solid-phase peptide synthesis and preparation of antibodies to synthetic peptides.* Biologicals, 1990. **18**(3): p. 147-157.

49. Stehle, G., Wunder, A., Schrenk, H.H., Hartung, G., Heene, D.L., Sinn, H., *Albumin-based drug carriers: comparison between serum albumins of different species on pharmacokinetics and tumor uptake of the conjugate.* Anticancer Drugs, 1999. **10**(8): p. 785-90.

50. Bartel, A., Campbell, D., *Some immunochemical differences between associated and dissociated hemocyanin.* Arch. Biochem. Biophys., 1959. **82**: p. 2332-2336.

51. Schally, A.V., Nagy, A., *Chemotherapy targeted to cancers through tumoral hormone receptors.* Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(7): p. 300-10.

52. Takakura, Y., Hashida, M., *Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs.* Critical Reviews in Oncology/Hematology, 1995. **18**(3): p. 207-231.

53. Tung, C.-H., Weissleder, R., *Arginine containing peptides as delivery vectors.* Advanced Drug Delivery Reviews. Bioconjugates for effective drug targeting, 2003. **55**(2): p. 281-294.

54. Hudecz, F., Clegg, J.A., Kajtár, J., Embleton, M.J., Pimm, M.V., Szekerke, M., Baldwin, R.W., *Influence of carrier on biodistribution and in vitro cytotoxicity of methotrexate-branched polypeptide conjugates.* Bioconjug Chem, 1993. **4**(1): p. 25-33.

55. Reményi, J., Csík, G., Kovács, P., Reig, F., Hudecz, F., *The effect of the structure of branched polypeptide carrier on intracellular delivery of daunomycin.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(3): p. 280-289.

56. Langbeheim, H., Arnon, R., Sela, M., *Antiviral effect on MS-2 coliphage obtained with a synthetic antigen.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(12): p. 4636-4640.

57. Hudecz, F., Szekerke, M., *Synthesis of New Branched Polypeptides with Poly(Lysine)Back Bone.* Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 1985. **50**(1): p. 103-113.

58. Mezo, G., Kajtar, J., Hudecz, F., Szekerke, M., *Carrier design: conformational studies of amino acid (X) and oligopeptide (X-DL-Alam) substituted poly (L-lysine).* Biopolymers, 1993. **33**(6): p. 873-85.

59. Hudecz, F., Pimm, M.V., Rajnavölgyi, E., Mezõ, G., Fabra, A., Gaál, D., Kovács, A.L., Horváth, A., Szekerke, M., *Carrier design: New generation of polycationic branched polypeptides containing OH groups with prolonged blood survival and diminished in vitro cytotoxicity.* Bioconjugate Chemistry, 1999. **10**(5): p. 781-790.

60. Pawan, K., Ivanov, B.B., Kabilan, L., Rao, D.N., *Construction of a synthetic immunogen: use of the natural immunomodulator polytuftsin in*

malaria vaccines against RESA antigen of Plasmodium falciparum. Vaccine, 1994. **12**(9): p. 819-24.

61. Gokulan, K., Khare, S., Rao, D.N., *Increase in the immunogenicity of HIV peptide antigens by chemical linkage to polytuftsin ($TKPR_{40}$).* DNA Cell Biol, 1999. **18**(8): p. 623-30.

62. Mezõ, G., de Oliveira, E., Krikorian, D., Feijlbrief, M., Jakab, A., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Welling-Wester, S., Andreu, D., Hudecz, F., *Synthesis and Comparison of Antibody Recognition of Conjugates Containing Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein D Epitope VII1.* Bioconjugate Chemistry, 2003. **14**(6): p. 1260-1269.

63. Manea, M., Mezõ, G., Hudecz, F., Przybylski, M., *Polypeptide conjugates comprising a beta-amyloid plaque-specific epitope as new vaccine structures against Alzheimer's disease.* Biopolymers, 2004. **76**(6): p. 503-11.

64. Whitley, R.J., *Herpes simplex viruses*, in *Virology*, Fields, B.N., Knipe, D.M., Editors. 1990, Raven Press: New York. p. 1843-1887.

65. Nahmias, A.J., Donnenborger, J., Wickliffe, C., Muther, J., *Clinical aspects of infection with herpes simplex viruses 1 and 2*, in *The human herpes viruses: an interdisciplinary perspective*, Nahmias, A.J., Dowdle, W.R., Schinazi, R.F., Editors. 1980, Elsevier: New York. p. 3-10.

66. Hill, A., Ploegh, H., *Getting the inside out: the transporter associated with antigen processing (TAP) and the presentation of viral antigen.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(2): p. 341-343.

67. Isola, V.J., Eisenberg, R.J., Siebert, G.R., Heilman, C.J., Wilcox, W.C., Cohen, G.H., *Fine mapping of antigenic site II of herpes simplex virus Glycoprotein D.* J. Virol., 1984. **63**: p. 2325-2334.

68. Wildy, P., *Herpes simplex viruses*, in *Synthetic Vaccines*, Arnon, R., Editor. 1987, CRC Press Inc.: Boca Raton, Florida. p. 93-109.

69. Hudecz, F., Hilbert, Á., Mezõ, G., Kajtár, J., Rajnavölgyi, É. *B-cell epitopes in Herpes simplex virus-1 (HSV-1) glycoprotein D (gD)*, in *Synthetic peptides in the search for B- and T-cell epitopes*, Rajnavölgyi, É. Editor. 1994, R.G. Landes Company: Austin.

70. Weijer, W.J., Drijfhout, J.W., Geerligs, H.J., Bloemhoff, J., Feijlbrief, M., Bos, C.A., Hoogerhaut, P., Kerling, K.T.E., Popken-Boer, T., Slopsema, K., Wilterdrink, J.B., Welling, G.W., Welling-Wester, S., *Antibodies against synthetic peptides of Herpes simplex virus type 1 glycoprotein D and their capability to neutralize viral infectivity in vitro.* J. Virol., 1988. **62**: p. 501-510.

71. Welling-Wester, S., Scheffer, A.J., Welling, G.W., *B and T cell epitopes of glycoprotein D of herpes simplex virus type 1.* FEMS Microbiology Letters, 1991. **76**(2): p. 59-68.

72. Schlosser, G., Mezõ, G., Kiss, R., Vass, E., Majer, Z., Feijlbrief, M., Perczel, A., Bõsze, S., Welling-Wester, S., Hudecz, F., *Synthesis, solution structure analysis and antibody binding of cyclic epitope peptides from glycoprotein D of Herpes simplex virus type I.* Biophys. Chem., 2003. **106**: p. 155-171.

73. Kaumaya, P.T., Berndt, K.D., Heidorn, D.B., Trewhella, J., Kezdy, F.J., Goldberg, E., *Synthesis and biophysical characterization of engineered topographic immunogenic determinants with alpha alpha topology.* Biochemistry, 1990. **29**: p. 13-23.

74. Kobs-Conrad, S., Lee, H., DiGeorge, A.M., Kaumaya, P.T., *Engineered topographic determinants with alpha beta, beta alpha beta, and beta alpha beta alpha topologies show high affinity binding to native protein antigen (lactate dehydrogenase-C4).* J. Biol. Chem., 1993. **268**: p. 25285-25295.

75. Kaumaya, P.T., Kobs-Conrad, S., Seo, Y.H., Lee, H., VanBuskirk, A.M., Feng, N., Sheridan, J., F. Stevens, V., *Peptide vaccines incorporating a 'promiscuous' T-cell epitope bypass certain haplotype restricted immune responses and provide broad spectrum immunogenicity.* J. Mol. Recognit., 1993. **6**: p. 81-94.

76. Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., Lanzavecchia, A., *Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells.* Eur. J. Immunol., 1989. **19**: p. 2237-2242.

77. Krikorian, D., Panou-Pomonis, E., Voitharou, C., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., *A Peptide Carrier with a Built-In Vaccine Adjuvant: Construction of Immunogenic Conjugates.* Bioconjug Chem, 2005. **16**: p. 812-819.

78. Ho, P.C., D.A., M., Winkel, K.D., Saul, A., Jones, J., Doran, T.J., Rzepczyk, C.M., *Identification of two promiscuous T-cell epitopes from tetanus toxin.* Eur. J. Immunol., 1990. **20**: p. 477-483.

79. Greenwald, R.B., Choe, Y.H., McGuire, J., Conover, C.D., *Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates.* Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(2): p. 217-50.

80. Dass, C.R., Choong, P.F., *Carrier-mediated delivery of peptidic drugs for cancer therapy.* Peptides, 2006. **27**(11): p. 3020-8.

81. Allen, T.M., Cullis, P.R., *Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream.* Science, 2004. **303**(5665): p. 1818-1822.

82. Premack, B., Schall, TJ., *Chemokine receptors: Gateways to inflammation and infection.* 1996. **2**(11): p. 1174-1178.

83. Sharpe, R., Byers, HR, Scott, CF, Bauer, SI, Maione, TE, *Growth Inhibition of Murine Melanoma and Human Colon Carcinoma by Recombinant Human Platelet Factor 4.* J. Natl. Cancer Inst., 1990. **82**(10): p. 848-853.

84. Schiffmann, E., Corcoran, B.A., Wahl, S.M., *N-formylmethionyl Peptides as Chemoattractants for Leucocytes.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1975. **72**(3): p. 1059-1062.

85. Showell, H., Freer, RJ, Zigmond, SH, Schiffmann, E, Aswanikumar, S, Corcoran, B, Becker, EL, *The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils.* J. Exp. Med., 1976. **143**(5): p. 1154-1169.

86. Becker, E., *The formylpeptide receptor of the neutrophil. A search and conserve operation.* The Americn Journal of Pathology, 1987. **129**(1): p. 15-24.

87. Freer, R.J., Day, A. R., Radding, J. A., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Showell, H. J., Becker, E. L., *Further studies on the structural requirements for synthetic peptide chemoattractants.* Biochemistry, 1980. **19**(11): p. 2404-10.

88. Toniolo, C., Crisma, M., Valle, G., Bonora, G. M., Polinelli, S., Becker, E. L., Freer, R. J., Sudhanand Rao, R. B., Balaram, P., *Conformationally restricted formyl methionyl tripeptide chemoattractants: a three-dimensional structure-activity study of analogs incorporating a C alpha,alpha-dialkylated glycine at position 2.* Pept Res, 1989. **2**(4): p. 275-81.

89. Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Venkatasubramanian, K., Corcoran, B.A., Pert, C.B., Brown, J., Gross, E., Day, A.R., Freer, R.J., Showell, A.H., Becker, E.L., *Some characteristics of the neutrophil receptor for chemotactic peptides.* FEBS Letters, 1980. **117**(1-2): p. 1-7.

90. Fruchtmann, R., Kreisfeld, K., Marowski, C., Opitz, W., *[Synthetic tripeptides as chemotaxins or chemotaxin antagonists (author's transl)].* Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1981. **362**(2): p. 163-74.

91. Kõhidai, L., *A kemotaxis biológiai és klinikai jelentõsége*. 2000: Semmelweis Egyetem.

92. Christopher, G.K., Sundermann, C.A., *Isolation and partial characterization of the insulin binding sites of Tetrahymena pyriformis.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **212**(2): p. 515-23.

93. Csaba, G., *Phylogeny and ontogeny of chemical signaling: origin and development of hormone receptors.* Int Rev Cytol, 1994. **155**: p. 1-48.

94. Fonyó, A., *Élettan gyógyszerészhallgatók részére*. 1998, Budapest: Medicina Könyvkiadó.

95. Limonta, P., Moretti, R.M., Marelli, M.M., Motta, M., *The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans.* Front Neuroendocrinol, 2003. **24**(4): p. 279-295.

96. Conn, P.M., McArdle, C.A., Andrews, W.V., Huckle, W.R., *The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope.* Biol Reprod, 1987. **36**(1): p. 17-35.

97. Schally, A.V., Comaru-Schally, A.M., Nagy, A., Kovács, M., Szepesházi, K., Plonowski, A., Varga, J.L., Halmos, G., *Hypothalamic hormones and cancer.* Front Neuroendocrinol, 2001. **22**(4): p. 248-291.

98. Krsmanovic, L.Z., Mores, N., Navarro, C.E., Arora, K.K., Catt, K.J., *An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2969-2974.

99. Tieva, A., Stattin, P., Wikstrom, P., Bergh, A., Damber, J.E., *Gonadotropin-releasing hormone receptor expression in the human prostate.* Prostate, 2001. **47**(4): p. 276-284.

100. Grundker, C., Volker, P., Griesinger, F., Ramaswamy, A., Nagy, A., Schally, A.V., Emons, G., *Antitumor effects of the cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog AN-152 on human endometrial and ovarian cancers xenografted into nude mice.* Am J Obstet Gynecol, 2002. **187**(3): p. 528-537.

101. Reubi, J.C., *Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy.* Endocr Rev, 2003. **24**(4): p. 389-427.

102. Schally, A.V., Nagy, A., *New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin.* Life Sci, 2003. **72**(21): p. 2305-20.

103. Mezõ, I., Lovas, S., Pályi, I., Vincze, B., Kálnay, A., Turi, G., Vadász, Z., Seprõdi, J., Idei, M., Tóth, G., Gulyás, E., Ötvös, F., Mák, M., Horváth, J.E., Teplán, I., Murphy, R.F., *Synthesis of gonadotropin-releasing hormone III analogs. Structure-antitumor activity relationships.* J Med Chem, 1997. **40**(21): p. 3353-8.

104. Pályi, I., Vincze, B., Kálnay, A., Turi, G., Mezõ, I., Teplán, I., Seprõdi, J., Pató, J., Móra, M., *Effect of gonadotropin-releasing hormone analogs and their conjugates on gonadotropin-releasing hormone receptor--*

positive human cancer cell lines. Cancer Detect Prev, 1996. **20**(2): p. 146-52.

105. Pályi, I., Vincze, B., Lovas, S., Mezõ, I., Pató, J., Kálnay, A., Turi, G., Gaál, D., Mihalik, R., Péter, I., Teplán, I., Murphy, R.F., *Gonadotropin-releasing hormone analogue conjugates with strong selective antitumor activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2361-6.

106. Millar, R.P., *GnRH II and type II GnRH receptors.* Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(1): p. 35-43.

107. Kovacs, M., Koppan, M., Mezo, I., Teplan, I., Flerko, B., *Antiovulatory doses of antagonists of LH-RH inhibit LH and progesterone but not FSH and estradiol release.* J Neuroendocrinol, 1993. **5**(6): p. 603-8.

108. Lovas, S., Pályi, I., Vincze, B., Horváth, J., Kovács, M., Mezõ, I., Tóth, G., Teplán, I., Murphy, R.F., *Direct anticancer activity of gonadotropin-releasing hormone-III.* J Pept Res, 1998. **52**(5): p. 384-9.

109. Kalnay, A., Palyi, I., Vincze, B., Mihalik, R., Mezo, I., Pato, J., Seprodi, J., Lovas, S., Murphy, R.F., *Influence on antiproliferative activity of structural modification and conjugation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues.* Cell Prolif, 2000. **33**(5): p. 275-85.

110. Heredi-Szabo, K., Murphy, R.F., Lovas, S., *Is lGnRH-III the most potent GnRH analog containing only natural amino acids that specifically inhibits the growth of human breast cancer cells?* J Pept Sci, 2006. **12**(11): p. 714-20.

111. Heredi-Szabo, K., Lubke, J., Toth, G., Murphy, R.F., Lovas, S., *Importance of the central region of lamprey gonadotropin-releasing hormone III in the inhibition of breast cancer cell growth.* Peptides, 2005. **26**(3): p. 419-22.

112. Pinski, J., Schally, A.V., Yano, T., Groot, K., Srkalovic, G., Serfõzõ, P., Reissmann, T., Bernd, M., Deger, W., Kutscher, B., Engel, J., *Evaluation of the in vitro and in vivo activity of the L-, D,L- and D-Cit6 forms of the LH-RH antagonist Cetrorelix (SB-75).* Int J Pept Protein Res, 1995. **45**(5): p. 410-417.

113. Mezõ, G., Manea, M., Jakab, A., Kapuvári, B., Bõsze, S., Schlosser, G., Przybylski, M., Hudecz, F., *Synthesis and structural characterization of bioactive peptide conjugates using thioether linkage approaches.* J Pept Sci, 2004. **10**(12): p. 701-13.

114. Fujii, N., Otaka, A., Funakoshi, S., Bessho, K., Watanabe, T., Akaji, K., Yajima, H., *Studies on Peptides .151. Syntheses of Cystine-Peptides by Oxidation of S-Protected Cysteine-Peptides with Thallium(Iii) Trifluoroacetate.* Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1987. **35**(6): p. 2339-2347.

115. Mezõ, G., Jakab, A., Schlosser, G., Feijlbrief, M., Welling-Wester, S., Vila-Perello, M., Andreu, D., Hudecz, F. *Synthesis and characterization of cyclic epitope peptide dimers, conjugates from glycoprotein D of herpes simplex virus type 1*. in *42nd Japanese Peptide Symposium*. 2005. Osaka, Japan.

116. Van der Ploeg, J.R., Drijfhout, J.W., Feijlbrief, M., Bloemhoff, W., Welling, G.W., Welling-Wester, S., *Immunological properties of multiple repeats of a linear epitope of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D.* Journal of Immunological Methods, 1989. **124**(2): p. 211-217.

117. Tugyi, R., Mezo, G., Fellinger, E., Andreu, D., Hudecz, F., *The effect of cyclization on the enzymatic degradation of herpes simplex virus glycoprotein D derived epitope peptide.* Journal of Peptide Science, 2005. **11**(10): p. 642-649.

118. Tugyi, R., Mezo, G., Schlosser, G., Fellinger, E., Andreu, D., Hudecz, F., *Effect of conjugation with polypeptide carrier on the enzymatic degradation of Herpes simplex virus glycoprotein D derived epitope peptide.* Bioconjugate Chemistry, 2008. **19**(8): p. 1652-1659.

119. Tamamura, H., Otaka, A., Nakamura, J., Okubo, K., Koide, T., Ikeda, K., Fujii, N., *Disulfide Bond Formation in S-Acetamidomethyl Cysteine-Containing Peptides by the Combination of Silver Trifluoromethanesulfonate and Dimethylsulfoxide-Aqueous Hcl.* Tetrahedron Letters, 1993. **34**(31): p. 4931-4934.

120. Krikorian, D., Stavrakoudis, A., Biris, N., Sakarellos, C., Andreu, D., de Oliveira, E., Mezo, G., Majer, Z., Hudecz, F., Welling-Wester, S., Cung, M.T., Tsikaris, V., *Influence of sequential oligopeptide carriers on the bioactive structure of conjugated epitopes: comparative study of the conformation of a Herpes simplex virus glycoprotein gD-1 epitope in the free and conjugated form, and protein "built-in" crystal structure.* Biopolymers, 2006. **84**(4): p. 383-99.

121. Mezõ, G., Kalászi, A., Reményi, J., Majer, Z., Hilbert, A., Láng, O., Kõhidai, L., Barna, K., Gaál, D., Hudecz, F., *Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence.* Biopolymers, 2004. **73**(6): p. 645-56.

122. Martinez, J., Laur, J., *Active esters of formic acid as useful formylating agents: improvements in the synthesis of formyl-amino acid esters, N-α-formyl-Met-Leu-Phe-OH, and formyl-Met-Lys-Pro-Arg, a phagocytosis stimulating peptide.* Synthesis, 1982(11): p. 979-981.

123. Leick, V., Helle, J., *A quantitative assay for ciliate chemotaxis.* Anal Biochem, 1983. **135**(2): p. 466-9.

124. Kõhidai, L., Lemberkovics, E., Csaba, G., *Molecule dependent chemotactic responses of Tetrahymena pyriformis elicited by volatile oils.* Acta Protozool., 1995. **34**: p. 181-185.

125. Kõhidai, L., Schiess, N., Csaba, G., *Chemotactic selection of Tetrahymena pyriformis GL induced with histamine, di-iodotyrosine or insulin.* Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2000. **126**(1): p. 1-9.

126. Mezõ, G., Láng, O., Jakab, A., Bai, B.K., Szabó, I., Schlosser, G., Láng, J., Kõhidai, L., Hudecz, F., *Synthesis of oligotuftsin-based branched oligopeptide conjugates for chemotactic drug targeting.* J Pept Sci, 2006. **12**: p. 328-336.

127. Láng, O., Mezõ, G., Hudecz, F., Kõhidai, L., *Effect of tuftsin and oligotuftsins on chemotaxis and chemotactic selection in Tetrahymena pyriformis.* Cell Biology International, 2006. **30**(7): p. 603-609.

128. Pályi, I., Vincze, B., Mezõ, I., Pató, J., Kálnay, A., Gaál, D., Seprõdi, J., Hudecz, F., Mezõ, G., Lovas, S., Murphy, R.F., *GnRH analog conjugates with high anticancer selectivity.* Drug of Future, 2001. **26**: p. 51-59.

129. Mezõ, G., Czajlik, A., Manea, M., Jakab, A., Farkas, V., Majer, Z., Vass, E., Bodor, A., Kapuvári, B., Boldizsár, M., Vincze, B., Csuka, O., Kovács, M., Przybylski, M., Perczel, A., Hudecz, F., *Structure, enzymatic stability and antitumor activity of sea lamprey GnRH-III and its dimer derivatives.* Peptides, 2007. **28**(4): p. 806-20.

130. Gude, M., Ryf, J., White, P.D., *An accurate method for the quantification of Fmoc- derivatived solid phase supports.* Int. J. Pept. Res. Theur., 2002. **9**: p. 203-206.

131. Meienhofer, J., Waki, M., Heimer, E.P., Lambros, T.J., Makofske, R.C., Chang, C.-D., *Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids.* Int. J. Pept. Prot. Res., 1979. **13**: p. 35-42.

Rövid összefoglaló

Doktori munkámban szintetikus antigének és tumorellenes hatású biokonjugátumok szintézisével és vizsgálatukkal foglalkoztam. A két témakört a hordozók alkalmazása kapcsolja össze. Kutatócsoportunkban korábban polilizin gerincű elágazó láncú polipeptideket használtak erre a célra. Azonban a vegyületek méretének és tömegeloszlásának meghatározása nem egyértelmű. Az analízisek pontosítása érdekében tömegspektometriás módszer kidolgozására tettünk kísérletet, amelyhez oligolizin (Lys_{5n}, n=3-9) peptidsorozatot készítettem. Segítségükkel megállapítottuk a tömegspektrometria korlátait a polilizinek tömegeloszlásának meghatározásában.

Munkám következő szakaszában a Herpes simplex virus gD-1 9-22 epitóp peptid ciklikus származékainak szintézisével, és ellenanyagfelismerésük vizsgálataival foglalkoztam. Ortogonális cisztein védelem segítségével megoldottam, hogy a tioéter-kötés kialakításával készült ciklopeptidet diszulfidhídon keresztül dimerizáljam vagy egy újabb tioéter-kötésen át tetratuftsin hordozóhoz konjugáljam. A legjobb ellenanyagfelismerést mutató konjugátumok immunogenitásának fokozása érdekében elkészítettem olyan származékokat, amelyekben a tetratuftsin *N*-terminálisára a Tetanus toxoidból származó promiszkuis T-sejt epitóp peptidet építettem. Így egy közel 15 kDa méretű, jól jellemezhető “mini” fehérjét állítottam elő, amely alkalmas lehet virus neutralizáló ellenanyag termelődés kiváltására.

Kutatásaim harmadik része az irányított tumorterápiával kapcsolatos alapkutatások tették ki. Ez a terápia típus nagy reményekkel kecsegtet a rák elleni küzdelemben. Az irányított tumor terápiában alkalmazható gyógyszerszállító konjugátumok előállításához kemotaktikus hatású formil-tripeptidet (fMLF) és különböző változatait valamint GnRH-III hormonpeptid származékokat kapcsoltam tetratuftsin hordozóhoz. Kemotaxis vizsgálatokat *Tetrahymena pyriformis* és THP-1 tumoros monocita sejteken végeztünk, mely eredményeképp kiválasztottuk a fNleLF peptidet tartalmazó konjugátumot a kemotaxison alapuló hatóanyagszállító rendszer továbbfejlesztésére.

GnRH-III-tetratuftsin konjugátumokat szintetizáltam, majd ezeket és a konjugáció során melléktermékként keletkező GnRH-III dimer vegyületeket humán tumoros sejteken (emlő- illetve vastagbél) proliferációgátlás-kísérletekben vizsgáltuk. A különböző konjugátumok és a dimerek különböző mértékben gátolták a sejtek szaporodását. Különösen a dimer vegyületek voltak aktívak, így ezek a legjobb jelöltek a további hatóanyagszállító rendszerek fejlesztésre.

Abstract

Synthesis and studies of synthetic antigens and bioconjugates with antitumor effect

The main topics of my PhD work were the synthesis, chemical and biological characterization of bioconjugates as synthetic antigens or for tumor therapy. The connection between the topics is the application of carrier molecules. Branched chain polypeptides with polylysine backbone have been used for this purpose in our research group. However, the determination of the average molecular weight and polydispersity of the polymers has some difficulties. To overcome these drawbacks we have made efforts to develop a method using mass spectrometry for the characterization of polylysine polymers. I prepared a series of oligolysines (Lys_{5n}, n=3-9) as standards and it was demonstrated by the aid of these compounds that MS has also some limitation for the identification of the size distribution of polylysines.

The next part of my work was the synthesis and study of the antibody recognition of cyclic epitope peptide derivatives derived from the 9-22 region of HSV gD-1. Orthogonally protected Cys derivatives in the peptides provided possibility for cyclization of the epitopes *via* thioether bond followed by dimerization of cyclic peptides through disulfide bond or by conjugation to tetratuftsin carrier. To increase the immunogenic property of the conjugates showing the best antibody recognition, promiscuous T-cell epitope peptide from Tetanus toxoid was attached to the *N*-terminus of the tetratuftsin carrier. The well defined peptide conjugate with ~15 kDa molecular weight as a miniprotein might be efficient for the production of virus neutralizing antibodies after immunization.

The third part of my research focused on the development of conjugates for targeted tumor therapy. This type of therapy is very promising and it is believed that it can cause a breakthrough in cancer treatment. To prepare drug delivery systems (DDS) for targeted therapy chemotactic formyl-tripeptides or GnRH-III with own antitumor activity as targeting moieties were attached to tetratuftsin carrier. Chemotaxis of the conjugates was studied on *Tetrahymena pyriformis* and THP-1 tumorous monocytes. The conjugate containing the fNleLF chemotactic peptide was selected for further development as drug delivery system. GnRH-III-tetratuftsin conjugates were also prepared. The antiproliferative effect of conjugates and dimers produced as by-products during conjugation was studied on human breast and colon cancer cell lines. The dimer derivatives of GnRH-III gave the best antiproliferative effect. They can be good candidates for drug delivery in the targeted tumor therapy.

Közlemények listája

Referált folyóiratban megjelent cikkek

Mező, G., de Oliveira, E., Krikorian, D., Feijlbrief, M., **Jakab, A.,** Tsikaris, V., Sakarellos, C., Welling-Wester, S., Andreu, D., Hudecz, F.: Synthesis and comparison of antibody recognition of conjugates containing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D epitope VII. *Bioconjugate Chemistry* **14,** 1260-1269 (2003)

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*. **10,** 701-713 (2004)

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.* **12**, 328-336 (2006)

Mező, G., Czajlik, A., Manea, M., **Jakab, A.,** Farkas, V., Majer, Z., Vass, E., Bodor, A., Kapuvári, B., Boldizsár, M., Vincze, B., Csuka, O., Kovács, M., Przybylski, M., Perczel, A., Hudecz, F.: Structure, enzymatic stability and antitumor activity of sea lamprey GnRH-III and its dimer derivatives. *Peptides* **28**, 806-820 (2007)

Jakab A., Schlosser G., Feijlbrief M., Welling-Wester S., Manea M., Vila-Perelló M., Andreu D., Hudecz F., Mező G.: Synthesis and antibody recognition of cyclic epitope peptides together with their dimer and conjugated derivatives based on residues 9-22 of Herpes simplex virus type I glycoprotein D, Bioconjugate Chemistry, közlésre elfogadva

A dolgozat témájához közvetlenül nem kapcsolódó publikáció:
de la Torre, B.G., **Jakab, A.,** Andreu, D.: Polyethyleneglycol-Based Resins as Solid Supports for the Synthesis of Difficult or Long Peptides, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **13**, 265-270 (2007)

Rövid kivonatok referált folyóiratban:

Tugyi, R., Mező, G., Uray, K., **Jakab, A.**, Bősze, Sz., Medzihradszky-Schweiger, H., Hudecz, F.: Stability of modified linear and cyclic epitope peptides in human serum and toward lysosomal enzymes. *J. Pept. Sci., 8(S), 131 (2002)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Schlosser, G., Bősze, Sz., Hudecz, F.: Preparation of synthetic antigens and bioconjugates containing oligo-tuftsin carrier molecule. *J. Pept. Sci., 8(S), 158 (2002)*

Jakab, A., Mező, G., Láng, O., Török, K., Kőhidai, L., Hudecz, F.: Synthesis and chemotactic activity of conjugates containing For-Met-Leu-Phe chemotactic peptide. *J. Pept. Sci., 10(S), 163 (2004)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Czajlik, A., Perczel, A., Farkas, V., Majer, Zs., Kapuvári, B., Vincze, B., Csuka, O., Hudecz, F.: Synthesis, structure and antitumour activity of GnRH-III derivatives. *J. Pept. Sci., 10(S), 255 (2004)*

Mező, G., Czajlik, A., **Jakab, A.**, Bodor, A., Farkas, V., Vass, E., Majer, Z., Kapuvári, B., Vincze, B., Csuka, O., Kovács, M., Perczel, A., Hudecz, F.: Structure-biological activity relationship of GnRH-III and its dimer derivatives. *FEBS Letters, 272(S1) 526 (2005)*

De la Torre, B.G., **Jakab, A.**, Andreu, D.: An evaluation of PEG-based solid supports for the synthesis of difficult and/or large peptides. *J. Pept. Sci., 12 (S) 100 (2006)*

Jakab, A., Mező, G., Feijlbrief, M., Welling-Wester, S., Andreu, D., Erdei, A. Majer, Zs., Hudecz, F.: Synthesis and antibody recognition of cyclic constructs of epitope peptide 9-22 of herpes simplex virus gD. *J. Pept. Sci., 12(S), 224 (2006)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Szabó, I., Bősze, Sz., Szabó, R., Bai, K.B., Kapuvári, B., Boldizsár, M., Vincze, B., Csuka, O., Hudecz, F.: Drug delivery based on GnRH-III as targeting moiety. *J. Pept. Sci., 12(S),* 98 *(2006)*

Könyv és könyvrészletek

Tugyi, R., Mező, G., Uray, K., **Jakab, A.**, Bősze, Sz., Medzihradszky-Schweiger, H., Hudecz, F.: Stability of modified linear and cyclic epitope peptides in human serum and toward lysosomal enzymes. *Peptides 2002 (Eds.: E. Benedetti, C. Pedone) Eddizione Ziino, Napoli, Italy, pp. 418-419 (2003)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Schlosser, G., Bősze, Sz., Hudecz, F.: Preparation of synthetic antigens and bioconjugates containing oligo-tuftsin carrier molecule. *Peptides 2002 (Eds.: E. Benedetti, C. Pedone) Eddizione Ziino, Napoli, Italy, pp. 562-563 (2003)*

Hudecz, F., Krikorian, D., de Oliveira, E., Feilbrief, M., Mező, G., Tsikaris, V., Andreu, D., **Jakab, A.**, Sakarellos, C., Welling-Wester, S.: Comparision of antibody recognition of Herpes simplex virus D glycoprotein epitope VII conjugates containing polypeptide or protein carrier. *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries, 2002 (Ed. Epton, R.) Mayflower Worldwide Ltd, Kingswinford, UK pp. 149-152 (2003)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Czajlik, A., Perczel, A., Farkas, V., Majer, Zs., Kapuvári, B., Vincze B., Csuka, O., Hudecz, F.: Synthesis, structure and antitumour activity of GNRH-III derivatives. *Peptides 2004, Proceedings of 3rd International and 28th European Peptide Symposium, (Eds.: Flegel, M., Fridkin, M., Gilon, C., Slaninova, J.), KENES International, Israel, pp 906-907 (2005)*

Jakab, A., Mező, G., Láng, O., Török, K., Kőhidai, L., Hudecz, F.: Synthesis and chemotactic activity of conjugates containing for-Met-Leu-Phe chemotactic peptide. *Peptides 2004, Proceedings of 3rd International and 28th European Peptide Symposium, (Eds.: Flegel, M., Fridkin, M., Gilon, C., Slaninova, J.), KENES International, Israel, pp. 429-430 (2005)*

Bánóczi, Z., Miklán, Z., Mihala, N., **Jakab, A.**, Szabó, R., Reményi, J., Rivas, L., Andreu, D., Mező, G., Hudecz, F.: Synthesis and in vitro activity of Arg oligopeptide conjugates with antitumor and antimicrobial drugs. *Peptides 2004, Proceedings of 3rd International and 28th European Peptide Symposium, (Eds.: Flegel, M., Fridkin, M., Gilon, C., Slaninova, J.), KENES International, Israel, pp. 547-548 (2005)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Schlosser, G., Feijlbrief, M., Welling-Wester, S., Vila-Perello, M., Andreu, D., Hudecz, F.: Synthesis and characterization of cyclic epitope peptide dimers, and conjugates from glycoprotein D of herpes simplex virus type 1. *Peptide Science 2005. Proceedings of the 42nd Symposium on Japanese Peptide Society (Ed: Wakamiya T) The Japanese Peptide Society, Japan, pp 502-506 (2006)*

Előadások, poszterek

Mező, G., Schlosser, G., **Jakab, A.**, Welling-Wester, S., Welling, G., Andreu, D., Hudecz, F.: Lineáris és ciklusos Herpes simplex virus gD-1 peptidek és

konjugátumaik ellenanyag felismerése. *Magyar Immunológiai Társaság XXX. Vándorgyűlése, Budapest, Magyarország (2000)*

Hudecz, F., Feijlbrief, M., Mező, G., de Oliveira, E., Krikorian, D., **Jakab, A.**, Tsikaris, V., Sakarellos, C., Andreu, D., Welling-Wester, S.: Fehérje vagy szintetikus hordozó hatása HSV gD peptidepitóp-konjugátum ellenanyag felismerésére. *Magyar Immunológiai Társaság XXXI. Kongresszusa, Eger, Magyarország (2001)*

Hudecz, F., Feijlbrief, M., Mező, G., de Oliveira, E., Krikorian, D., Jakab, A., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Andreu, D., Welling-Wester, S.: Comparison of antibody recognition of HSV gD epitope VII conjugates containing polypeptide or protein carrier. *7th International Symposium on Solid Phase Synthesis and Combinatorial Libraries, Southampton, UK (2001)*

Jakab, A., Mező, G., Bősze, Sz., Welling-Wester, S., Feijlbrief, M., Hudecz, F.: Lineáris és ciklopeptidek, valamint peptidkonjugátumok alkalmazása HSV specifikus monoklonális ellenanyag optimális epitópfelismerésére. *Magyar Immunológiai Társaság XXXI. Kongresszusa, Eger, Magyarország (2001)*

Mező, G., Schlosser, G., Bősze, Sz., **Jakab, A.**, Kalászi, A., Hudecz, F.: Tioéter kötést tartalmazó konjugátumok előállítása szintetikus antigének kialakítása céljából. *MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, Magyarország (2001)*

Jakab, A., Mező, G., Welling-Wester, S., Feijlbrief, M., Bősze, Sz., Medzihradszky-Schweiger, H., Skribanek, Zs., Hudecz, F.: A DL-6 HSV-ellenes monoklonális ellenanyag epitópfelismerésének tanulmányozása lineáris és ciklopeptidekkel. *MTA Peptidkémiai Munkabizottság, Balatonszemes, Magyarország (2001)*

Mező, G., Schlosser, G., **Jakab, A.**, Kalászi, A., Mák, M., Hudecz, F.: A HSV-1 D glikoproteinből származó epitop peptidek konjugálása oligotuftsin hordozó molekulához. *MTA Peptidkémiai Munkabizottság, Balatonszemes, Magyarország (2001)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Schlosser, G., Bősze, Sz., Hudecz, F.: Preparation of synthetic antigens and bioconjugates containing oligo-tuftsin carrier molecule. *27th European Peptide Symposium, Sorrento, Italy (2002)*

Tugyi, R., Mező, G., Uray, K., **Jakab, A.**, Bősze, Sz., Medzihradszky-Schweiger, H., Hudecz, F.: Stability of modified linear and cyclic epitope peptides in human serum and towards lysosomal enzymes. *27th European Peptide Symposium, Sorrento, Italy (2002)*

Jakab, A., Mező, G., Andreu, D., Oliveira, E., Welling-Wester, S., Feijlbrief, M., Tsikaris, V., Hudecz, F.: Hordozó molekulák hatása epitóp peptid ellenanyagfelismerésére. *MTA Peptidkémiai Munkabizottság, Balatonszemes, Magyarország (2002)*

Bősze, Sz., Mező, G., Schlosser, G., **Jakab, A.**, Bánóczi, Z., Hudecz, F.: Tioéterkötést tartalmazó konjugátumok és ciklopeptidek analízise. *MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, Magyarország (2003)*

Jakab, A., Schlosser, G., Mező, G., Vékey, K., Hudecz, F.: Oligolizin peptidek előállítása polilizin polimerek méretének tömegspektrometriás meghatározásához. *MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, Magyarország (2003)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Kapuvári, B., Schlosser, G., Bősze, Sz., Vincze, B., Csuka, O., Hudecz, F.: Synthesis and anti-proliferative effect of GnRH-III-oligo-tuftsin conjugates. *Cellular Transport Strategies for Targeting Epitopes, Drugs and Reporter Molecules, EU-Workshop, Budapest, Hungary (2003)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Kapuvári, B., Vincze, B., Csuka, O., Kremmer, T., Kovács, M., Hudecz, F. GnRH-III tartalmú konjugátumok szintézise, antitumor aktivitásuk és LH szekrécióra gyakorolt hatásuk. *MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, Magyarország (2003)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Bősze, Sz., Horváti, K., Hudecz, F. Kemotaktikus peptideket tartalmazó konjugátumok szintézise. *MTA Peptidkémiai Munkabizottság, Balatonszemes, Magyarország (2003)*

Bősze, Sz., Caccamo, N., Mező, G., **Jakab, A.**, Krikorian, D., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Andreu, D., Dieli, F., Hudecz, F. Peptide conjugates as immune recognition based diagnostics. *9th Naples Workshop on Bioactive Peptides. Peptides, as therapeutics, diagnostics and vaccines, Anacapri, Italy (2004)*

Hudecz, F., Bánóczi, Z., Tugyi, R., Miklán, Zs., **Jakab, A.**, Reményi, J., Uray, K., Bősze, Sz., Mező, G., Dieli, F., Andreu, D.: Structural modification of drugs/peptide epitopes for improved biological activity*. 1st Asia-Pacific International Peptide Symposium 41st Japanese Peptide Symposium, Fukuoka, Japan (2004)*

Hudecz, F., **Jakab, A.**, Bánóczi, Z., Miklán, Zs., Mihala, N., Kóczán, Gy., Reményi, J., Szabó, R., Mező, G*.:* Tumorellenes szerek célbajuttatása peptidekkel. *III. Medichem Konferencia, Budapest, Magyarország (2004)*

Jakab, A., Mező, G., Láng, O., Török, K., Kőhidai, L., Hudecz, F.: Synthesis and chemotactic activity of conjugates containing for-Met-Leu-Phe chemotactic peptide. *3rd International/28th European Peptide Symposium, Prague, Czech Republic (2004)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Czajlik, A., Perczel, A., Farkas, V., Majer, Zs., Kapuvári, B., Vincze B., Csuka, O., Hudecz, F.: Synthesis, structure and antitumour

activity of GNRH-III derivatives. *3rd International/28th European Peptide Symposium, Prague, Czech Republic (2004)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Schlosser, G., Hudecz, F.: Synthesis of drug-conjugates for „active targeting" of tumour cells. 9th Naples Workshop on Bioactive Peptides. Peptides as therapeutics, diagnostics and vaccines., Anacapri, Italy (2004)

Jakab, A., Mező, G., Hudecz, F.: GnRH-III-dimerszármazékok szintézise. *MTA Peptidkémiai Munkabizottság, Balatonszemes, Magyarország (2004)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Láng, O., Kőhidai, L., Hudecz, F.: Kemotaktikus peptideket tartalmazó konjugátumok szintézise. *MTA Peptidkémiai Munkabizottság, Balatonszemes, Magyarország (2004)*

Hudecz, F., Bánóczi, Z., Miklán, Zs., Szabó, R., Reményi, J., Tugyi, R., Bősze, Sz., Magyar, A., Ligeti, M., Mező, G., **Jakab, A.**: Intracelluláris és membrán receptor célpont ellen irányuló hatóanyag-peptid konjugátumok: hatás és mechanizmus. *Medichem2 Konferencia, Budapest, Magyarország (2005)*

Hudecz, F., Tugyi, R., Uray, K., Horváti, K., Iván, D., **Jakab, A.**, Bősze, Sz., Mező, G., Dieli, F., Andreu, D., Welling-Wester, S.: Protein epitope based peptide antigens for diagnosis and therapy. *18th Polish Peptide Symposium, Wroclaw, Poland (2005)*

Mező, G., Czajlik, A., **Jakab, A.**, Bodor, A., Farkas, V., Vass, E., Majer, Z., Kapuvári, B., Vincze, B., Csuka, O., Kovács, M., Perczel, A., Hudecz, F.: Structure-biological activity relationship of GnRH-III and its dimer derivatives. *30th FEBS Meeting and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary (2005)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Schlosser, G., Feijlbrief, M., Welling-Wester, S., Vila-Perello, M., Andreu, D., Hudecz, F.: Synthesis and characterization of cyclic

epitope peptide dimers, and conjugates from glycoprotein D of herpes simplex virus type 1. *42nd Japanese Peptide Symposium, Osaka, Japan (2005)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Feijlbrief, M., Welling-Wester, S., Andreu, D., Hudecz, F.: A HSV gD-1 9-22 epitóp szekvenciát tartalmazó ciklopeptidek szintézise és ellenanyagkötő képességük vizsgálata. *MTA Peptidkémiai Munkabizottság, Balatonszemes, Magyarország (2005)*

Bősze, Sz., Caccamo, N., Mező, G., **Jakab, A.**, Krikorian, D., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Andreu, D., Dieli, F., Hudecz, F.: Synthetic peptide conjugates for enhancing early diagnosis of M. tuberculosis*. 1st International Environmental Forum, „A New Strategy for Developing Communities and Environment", Tanta, Egypt (2006)*

de la Torre, B.G., **Jakab, A.**, Andreu, D.: An evaluation of PEG-based solid supports for the synthesis of difficult and/or large peptides. *29th European Peptide Symposium, Gdansk, Poland (2006)*

Jakab, A., Mező, G., Feijlbrief, M., Welling-Wester, S., Andreu, D., Erdei, A., Majer, Zs., Hudecz, F.: Synthesis and antibody recognition of cyclic constructs of epitope peptide 9-22 of herpes simplex virus gD. *29th European Peptide Symposium, Gdansk, Poland (2006)*

Mező, G., **Jakab, A.**, Szabó, I., Bősze, Sz., Szabó, R., Bai, K.B., Kapuvári, B., Boldizsár, M., Vincze, B., Csuka, O., Hudecz, F.: Drug delivery based on GnRH-III as targeting moiety. *29th European Peptide Symposium, Gdansk, Poland (2006)*

Jakab, A., Mező, G., Feijlbrief, M., Welling-Wester, S., Andreu, D., Majer, Zs., Hudecz, F.: Ciklusos HSV epitóp peptidet tartalmazó dimer származékok szintézise és ellenanyag-kötődése. *Peptidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonszemes, Magyarország (2006)*

Hudecz, F., **Jakab, A.**, Mező, G., Horváti , K., Bősze, Sz., Caccamo, N., Dieli, F., Feijlbrief, M., Welling-Wester, S., Krikorian, D., Tsikaris, V., Vila-Perello, M., Andreu, D.: Synthesis and application of peptide epitope conjugates for diagnosis/therapy of infectious diseases. *9th International Symposium, Solid phase synthesis, complementary solution methods & combinatorial libraries, Norwich, UK (2007)*

Nogueira, L., Iobagiu, C., Sebbag, M., Magyar, A., **Jakab, A.**, Hudecz, F., Serre, G.: Rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. Development of diagnostic and therapeutic tools. *Hungarian-French Scientific Meeting, Genomics, Biotechnology, Biology, Environment & Health, Budapest, Hungary (2008)*

Iobagiu, C., Magyar, A., Nogueira, L., **Jakab, A.**, Sebbag, M., Hudecz, F., Serre, G.: Anti-citrullinated protein autoantibodies have a very restricted diversity of recognition of citrullinated fibrin: they target only three immunodominant epitopes. 28th European Workshop for Rheumathology Research, *Warszawa, Poland (2009)*