

OTKA (NK 77485) zárójelentés

Témavezető:
Dr. Mező Gábor
(ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport)

OTKA pályázatunk célja az volt, hogy olyan többfunkciós hatóanyag szállító rendszereket állítsunk elő, amelyek a tumor növekedését gátló hatóanyagokat szelektíven juttatják a tumorsejtbe, illetve a sejt működését különböző támadási pontokon keresztül (pl. receptorok, jelátvivő rendszerek, sejtciklus, DNS replikáció) befolyásolják. Munkánk az előzmények alapján, két fő területre koncentrált; az egyik, hormon peptidek, elsősorban gonadotropin-releasing hormon (GnRH) analógok alkalmazása irányító molekulaként, a másik, oligotuftsin alapú hordozók alkalmazása ugyanezen célból.

Az összefoglalót nem a munka időrendben történt elvégzése alapján, hanem a tartalmi összefüggések szerint csoportosítva készítettük el.

1. Új GnRH analóg – hatóanyag konjugátumok kifejlesztése és vizsgálatuk

1.1. A pályázat megkezdése előtt előállított konjugátumok vizsgálata

Két korábban előállított oxim-kötést tartalmazó daunomicin – GnRH-III konjugátumot (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂; GnRH-III(Dau=Aoa) és Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly)-Pro-Gly-NH₂; GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG), ahol az Aoa = aminooxiacetil és Glp = piroglutaminsav) vizsgáltunk *in vivo* C26 egér és HT-29 humán vastagbél tumoros egereken. A tumorokat *sc.* ültettük be az egerekbe, míg a kezelések *ip.* történtek. A konjugátumok, amelyek 30 mg/testtömeg kg daunomicin tartalom mellett sem voltak toxikusak az egereken, kb. 40-50%-os tumornövekedés gátlást mutattak az alkalmazott mennyiségtől, a kezelések számától és a kezelés kezdetének időpontjától függően. A szabad daunomicinnel kezelt egerek minden esetben hamarabb elpusztultak a tumoros kontrollcsoporthoz képest, míg a konjugátummal kezelt állatok esetén hosszabb túlélést tapasztaltunk (Szabó I. és mtsai. *Bioconjug. Chem.* 20: 656-665 (2009)).

Először vizsgálni kívántuk a konjugátumok stabilitását humán szérumban és a béltraktus lebontó enzimjeinek (tripszin, kimotripszin, pepszin) jelenlétében, illetve metabolizmusát patkány máj lizoszóma hatására, és egy lizoszómális enzim, a Katepszin B jelenlétében. A Katepszin B a tumorsejtekben túltermelő enzim, így fontos szerepet játszik a sejtbe juttatott

konjugátumok lebontásában. A fenti két vegyület mellett a kísérletekbe bevontunk egy új konjugátumot is, amelyben egy általunk tervezett Katepszin B-re labilis Tyr-Arg-Arg-Leu (YRRL) spacer építettünk be a GFLG spacer helyett (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu)-Pro-Gly-NH₂; GnRH-III(Dau=Aoa-YRRL)). Ez a spacer nagyon labilisan bizonyult humán szérumban, míg a GFLG spacer tartalmazó, illetve a spacer nem tartalmazó konjugátum stabil volt nem csak humán szérumban, hanem tripszin és pepszin jelenlétében is. Kimotripszin hatására egy kiemelt hasítási helyet figyelhettünk meg a molekulákban; a ³Trp-⁴Ser közötti kötés hasadt az enzim hatására. Ez a kötés egyébként több más enzimnek, így pl. az ACE hasítási helye is, így ennek a kötésnek a stabilitás-növelésével hatékonyabb, esetleg orálisan is alkalmazható konjugátumok állíthatók elő. A konjugátumok a lizoszóma preparátumban és a Katepszin B hatására nagyjából azonos módon metabolizálódtak. Megállapítottuk, hogy szabad daunomicin nem szabadul fel az oxim-kötésből. A legkisebb daunomicint tartalmazó metabolit a daunomicint, az oxim-kötést kialakító aminooxiacetil részt és az ehhez kapcsolódó aminosavat magába foglaló egység volt (Dau=Aoa-Gly-OH, Dau=Aoa-Tyr-OH és H-Lys(Dau=Aoa)-OH). Mivel a konjugátumok mind *in vitro*, mind *in vivo* antitumor hatást mutattak, megvizsgáltuk, hogy ezek a metabolitok kötődnek-e a DNS-hez, ami a daunomicin aktivitásának feltétele. Ezért előállítottuk a szükséges daunomicint tartalmazó metabolitokat és vizsgáltuk kötődésüket DNS-hez. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a metabolitok nem érik el a daunomicinnél tapasztalt kötődési erősséget ($K = 11,70 \cdot 10^{-5} \text{M}$), de hatékonyan kötődnek a DNS-hez (H-Lys(Dau=Aoa)-OH ($K = 6,80 \cdot 10^{-5} \text{M}$), Dau=Aoa-Gly-OH ($K = 6,74 \cdot 10^{-5} \text{M}$), Dau=Aoa-Tyr-OH ($K = 4,40 \cdot 10^{-5} \text{M}$)). A gyengébb kötődés eredményezheti a konjugátumok relatíve kisebb citosztatikus hatását a szabad daunomicinhez képest (Orbán E és mtsai. Amino Acids 41: 469-483 (2011)). Az említett publikációban NMR mérésekkel bizonyítottuk azt is, hogy a Dau=Aoa oxim-kötés csak *E*-izomer formában fordul elő. Az YRRL spacer nagyfokú labilitást mutatott humán szérumban és a legalacsonyabb DNS kötődési képességű metabolitot szolgáltatta a lizoszómális lebontás során, ezért a későbbiekben ezt a konstrukciót nem alkalmaztuk.

1.2. Az aminooxiacetilezett peptidek előállítási hatékonyságának javítása

Az oxim-kötés kialakítása kemoselektív ligációs módszerrel egy gyors, kíméletes és hatékony módszer, amely kevés mellékreakcióval jár. Azonban a ligációhoz szükséges aminooxiacetilezett peptidek előállítása a funkciós csoport nagy reaktivitása miatt sokszor problémát jelent. Az aminooxiacetil-csoport nagyon érzékeny acetone-ra illetve a

műanyagcszökökből kioldódó aldehideket tartalmazó lágyítókra (pl. műanyag kannában szállított HPLC-s acetonitril). Mivel a savérzékeny hatóanyag molekulákat (pl. daunomicin) nem lehet a peptid gyantáról történő hasítása előtt a peptidhez kapcsolni, így az aminosavacetilezett peptidet kell a gyantáról hasítani, majd feldolgozni. Ez peptidtől is függően több-kevesebb oximot tartalmazó mellékterméket eredményez. Kísérleteinkben ez elsősorban az aminosavacetilezett szomatosztatin analógok esetén mutatkozott drámainak. Ennek elkerülése érdekében bevezettük a hasítóelegybe tett szabad aminosav vagy hidroxilamin adalékokat, mint karbonil-befogó reagenseket. Az első vált be igazán, mivel az enyhén bázikus karakterű hidroxilamin rontotta a hasítóelegy savas karakterét, így bizonyos védőcsoportok hasadása a peptidről nem volt megfelelő. Azonban az aminosav adalékkal sikeresen előállítottuk a kritikus peptidszekvenciákat jó kitermeléssel. Meg kell jegyezni, hogy a hidroxilamin kiválóan megfelel a ligációs eljárás során elreagálatlan daunomicin megkötésére, és kromatográfiás tulajdonságainak megváltoztatására. Ez bizonyos esetekben segített a konjugátum és az elreagálatlan daunomicin HPLC-s elválasztásában (Mező G. és mtsai. *J. Pept. Sci.* 17: 39-46 (2011)).

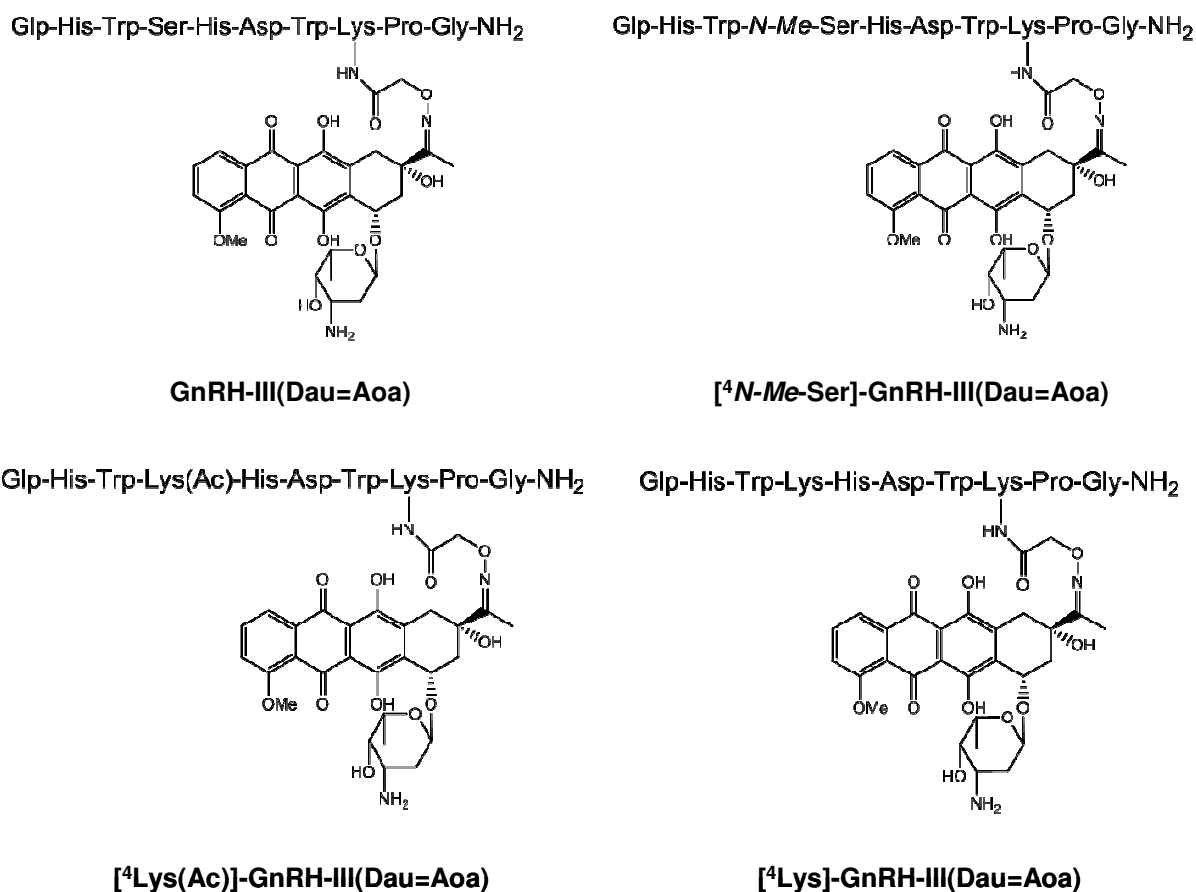
1.3. A GnRH-III – hatóanyag konjugátumok tumorelles hatásának növelése

A munkánk további céljaként a konjugátumok hatékonyságának növelését tűztük ki. Ezt háromféle módosítással kívántuk elérni: (a) a GnRH-III szekvenciájának módosításával, (b) a hatóanyag és a peptid hormon közötti kötés változtatásával, (c) több azonos vagy különböző hatóanyagok az irányító molekulához való kapcsolásával.

1.3.1. GnRH-III szekvenciájának 4-es pozíciójában végrehajtott módosítással előállított konjugátumok

Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy a GnRH-III szekvenciájában viszonylag kevés módosítás alkalmazható a biológiai hatás elvesztése nélkül. Az egyik lehetséges módosítás a 4-es pozícióban lévő Ser cseréje Lys vagy Lys(Ac) aminosavakra. Ez némileg szembemegy azzal a dogmával, amely értelmében mind a GnRH agonista, mind az antagonisták származékokban a ⁴Ser aminosavat érintetlenül hagyják (Mező G., Manea M. *Expert Opin. Ther. Pat.* 19:1771-1785 (2009) és *Expert Opin. Drug Deliv.* 7: 79-96 (2010)). Korábban említettem, hogy a ³Trp-⁴Ser kötés több enzim hasítási pontja is a molekulában. Ezért olyan analógokat kívántunk előállítani, amelyek nem csak a konjugátumok tumorelles hatását, hanem azok enzimstabilitását is növelik. Első körben 3 új analógot állítottunk elő. Ezekben a szerint lizinre, az oldalláncában acetilezett lizinre illetve N-metil-szerinre cseréltük ([⁴Lys]-

GnRH-III(Dau=Aoa), (4 Lys(Ac))-GnRH-III(Dau=Aoa), (4 N-Me-Ser)-GnRH-III(Dau=Aoa)) (1. ábra). CD spektroszkópiai mérések alapján a módosítások nem változtatták meg szignifikánsan a molekula térszerkezetét, de a konjugátumok sejt felvétele jelentősen megváltozott. A Lys(Ac) és az N-Me-Ser módosítások jelentősen növelték az anyagok sejtbejutását, míg az oldalláncban szabad Lys beépítése csökkentette azt (áramlási citometria módszerét alkalmazva). Ez összefügghet a 4-es pozícióban lévő aminosav(származék) polaritásával. Ugyanakkor az *in vitro* tumorelles hatás nem korrelált a sejtbejutás mértékével. A 4 Lys(Ac) és 4 Lys-tartalmú konjugátumok esetében növekedett a citosztatikus hatás (MTT-teszt alapján) mindhárom vizsgált tumorsejtvonalon (MCF-7 (humán emlő), HT-29 (humán vastagbél), LNCaP (humán prosztata), míg az N-Me-Ser szubsztitúció csökkentette azt (1. táblázat).



1. ábra: A 4-es helyzetben módosított GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátumok szerkezete

Kimotripszin jelenlétében vizsgálva az új konjugátumokat megállapítható volt, hogy mind a Lys(Ac) mind az N-Me-Ser szubsztitúció növelte a konjugátum enzimstabilitását. Míg a GnRH-III(Dau=Aoa) 6 óra alatt teljesen elbomlott, addig a [4 Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátum kb. 43%-a intakt volt (24 óra után már nem volt kiindulási termék). Az (4 N-Me-

Ser]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátum alig 10%-a bomlott el 6 óra alatt és még 24 óra elteltével is a konjugátum több mint 60%-a nem bomlott. A méréseket HPLC-MS segítségével végeztük. Ebbe a munkába bekapcsolódott Dr. Marilena Manea (Konstanz-i Egyetem, Németország), aki friss post.doc-ként új kutatócsoportja mentorának kért fel, és kutatásaival csatlakozni kívánt a projektünkhöz (Manea M. és mtsai. *Bioconjug. Chem.* 22: 1320-1329 (2011)).

1. táblázat

4-es pozícióban szubsztituált GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátumok citosztatikus hatása

Konjugátum	Citosztázis (MCF-7) IC ₅₀ (µM)	Citosztázis (HT-29) IC ₅₀ (µM)	Citosztázis (LNCaP) IC ₅₀ (µM)
GnRH-III(Dau=Aoa)	6,5 ± 1,8	27,8 ± 4,2	6,1 ± 2,1
[N-Me- ⁴ Ser]-GnRH-III(Dau=Aoa)	10,6 ± 2,1	> 50	14,1 ± 1,3
[⁴ Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa)	3,1 ± 1,7	7,4 ± 2,6	3,6 ± 1,9
[⁴ Lys]-GnRH-III(Dau=Aoa)	2,6 ± 0,8	8,1 ± 2,6	5,1 ± 0,4

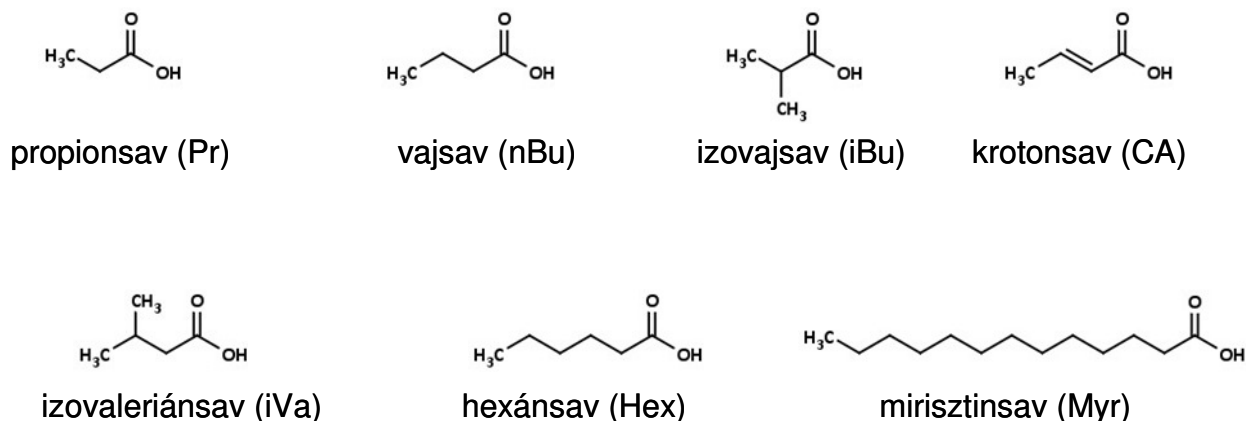
Az elért eredmények alapján a [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátumot választottuk ki *in vivo* vizsgálatokhoz (ld. később).

1.3.2. A GnRH-III 4-es pozícióban rövid láncú zsírsavakat tartalmazó konjugátumok

A [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátum hatékonysága arra ösztönzött bennünket, hogy kipróbáljunk más zsírsav láncokat is a 4-es helyzetbe beépített lizin oldalláncának acilezésére. Ezek többnyire lineáris és elágazó rövid szénláncú zsírsav molekulák voltak (propionsav, vajsav, izovajsav, izovaleriánsav, krotionsav, kapronsav és mirisztinsav). A szénlánc hosszának növelésével a konjugátumok stabilitásának és sejtfelvételének növekedését vártuk. Továbbá a rövid szénláncú zsírsavaknak élettani funkciói is vannak, így például a rostos ételek emésztőrendszeri tumorok elleni hatásossága a belőlük felszabaduló rövidszénláncú zsírsavak apoptózist befolyásoló hatására vezethető vissza. A 4-es helyzetben acilezett lizint tartalmazó konjugátumok előállításához ortogonális védőcsoport kombinációt alkalmaztunk a szilárdfázisú peptidszintézis során. A peptidlánc felépítésekor a ⁴Lys oldalláncának védelmére Dde-csoportot alkalmaztunk, ami 2% hidrazin/DMF oldattal eltávolítható, míg a ⁸Lys védelmére Mtt-csoportot vezettünk be, ami 2% TFA/DCM oldattal hasítható. Így a védett lineáris peptid gerinc felépítése után a Dde-csoportot hasítottuk, majd a szabad ε-aminocsoportot acileztük a megfelelő zsírsavszármazékkal (klorid, anhidrid). Ezután hasítottuk az Mtt-csoportot és aminoszalicil-csoporttal módosítottuk a ⁸Lys oldalláncát. A

funkcionalizált peptidet hasítottuk a gyantáról és a daunomicint oldatban kémiai ligációs módszerrel oxim-kötés kialakításával kapcsoltuk a GnRH-III származékokhoz (2. ábra). (Hegedüs R. és mtsai. Eur. J. Med. Chem. 56: 155-165 (2012))

Glp-His-Trp-Lys(X)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂



2. ábra: A [⁴Lys(X)]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátumok szerkezete az X acilcsoportot szolgáltató zsírsavak szerkezetével.

Az új vegyületekben a zsírsavláncok mindegyike, kivéve az izovajsav, növelték a konjugátumok kimotripsinnel szembeni stabilitását, ami a lánchossz növekedésével emelkedett. Így a [⁴Lys(nBu)]-GnRH-III(Dau=Aoa) 65%-a volt intakt 6 óra elteltével, míg a [⁴Lys(iBu)]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátumnak 90%-a elbomlott ennyi idő alatt. A konjugátumok sejtbejutása és a zsírsavak szénláncának hossza között nem volt ilyen összefüggés. MCF-7 és HT-29 sejteken vizsgálva a konjugátumokat a vajsavat és az izovajsavat tartalmazó konjugátumok jutottak be leghatékonyabban a sejtekbe. Sejtbejutási képességük (áramlási citometriával, illetve konfokális és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva) elérte a [D-Lys⁶(Dau=Aoa)]-GnRH-I konjugátumét, ami azért jelentős, mivel a GnRH-I lényegesen hatékonyabban kötődik a GnRH receptorokhoz, mint a GnRH-III analógok. Ez utóbbiaknak az előnye a kisebb hormonhatásban rejlik, ami a kezelés endokrin mellékhatását csökkenti. A konjugátumok citosztatikus hatása korrelált a sejtbejutással, így a két leghatékonyabb anyag a vajsavas és izovajsavas konjugátum volt (2. táblázat).

Vizsgáltuk a zsírsav oldalláncot tartalmazó konjugátumok kölcsönhatását modell membránokkal. A konjugátumok inkább hidrofil karakterűnek mutatkoztak egyedül a leghosszabb szénláncú mirisztinsavat tartalmazó konjugátum mutatott fokozottabb kölcsönhatást a modell membránnal. Tehát a fokozottabb sejtbejutás feltehetőleg nem a

membrán permeabilitás növekedésével magyarázható. Ezért vizsgáltuk néhány kiválasztott anyag receptorkötődését hipofízis preparátumon és izolált prosztata tumoron radioizotópos technikával. Radiojódozott triptorelin ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]\text{-GnRH-I}$) leszorítását vizsgáltuk konjugátumainkkal (3. táblázat).

Az alábbi két táblázatból jó látszik, hogy bár a GnRH-I konjugátum sokkal jobban kötődik a receptorhoz, azonban kisebb citosztatikus hatást mutat. Ez azzal magyarázható, hogy más a metabolizmusa a konjugátumnak. Mivel a D-Lys körüli kötések stabilak enzimekkel szemben, így a hatásos metabolit (D-Lys(Dau=Aoa)) nem tud felszabadulni. Tehát a konjugátumok tervezésénél fontos, hogy ne csak a receptorkötődése legyen jó, hanem a hatóanyag vagy annak hatékony származéka fel tudjon szabadulni a konjugátumból a sejtben.

2. táblázat: Különböző zsírsav oldalláncokat tartalmazó $[^4\text{Lys(X)}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$ konjugátumok citosztatikus hatása

Konjugátum	Citosztázis (MCF-7) IC ₅₀ (μM)	Citosztázis (HT-29) IC ₅₀ (μM)
$[^4\text{Lys(Pr)}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$	3,6 ± 0,7	17,2 ± 2,9
$[^4\text{Lys(iBu)}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$	2,2 ± 0,0	2,0 ± 0,6
$[^4\text{Lys(nBu)}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$	0,7 ± 0,2	2,2 ± 0,6
$[^4\text{Lys(CA)}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$	1,6 ± 0,2	13,6 ± 4,2
$[^4\text{Lys(iVA)}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$	2,5 ± 0,5	16,4 ± 4,5
$[^4\text{Lys(Hex)}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$	1,5 ± 0,4	20,1 ± 4,2
$[^4\text{Lys(Myr)}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$	6,8 ± 2,9	37,4 ± 1,0
GnRH-III($^8\text{Lys(Dau=Aoa)}$)	6,5 ± 1,8	27,8 ± 4,2
$[^4\text{Lys(Ac)}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$	3,1 ± 1,7	7,4 ± 2,6
$[^4\text{Lys}]\text{-GnRH-III(Dau=Aoa)}$	2,6 ± 0,8	8,1 ± 2,6
$[\text{D-Lys}^6(\text{Dau=Aoa})]\text{-GnRH-I}$	4,1 ± 0,4	20,2 ± 5,0

3, táblázat: [¹²⁵I][D-Trp⁶]GnRH-I kötődésének gátlása

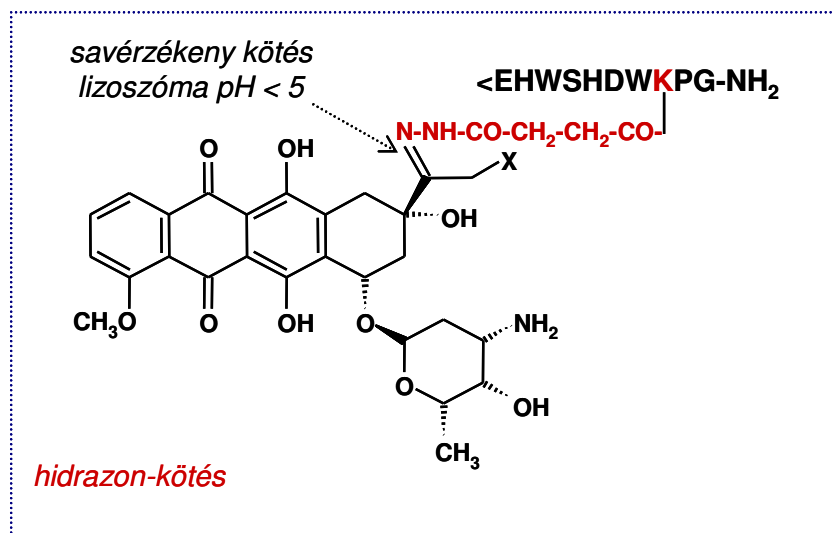
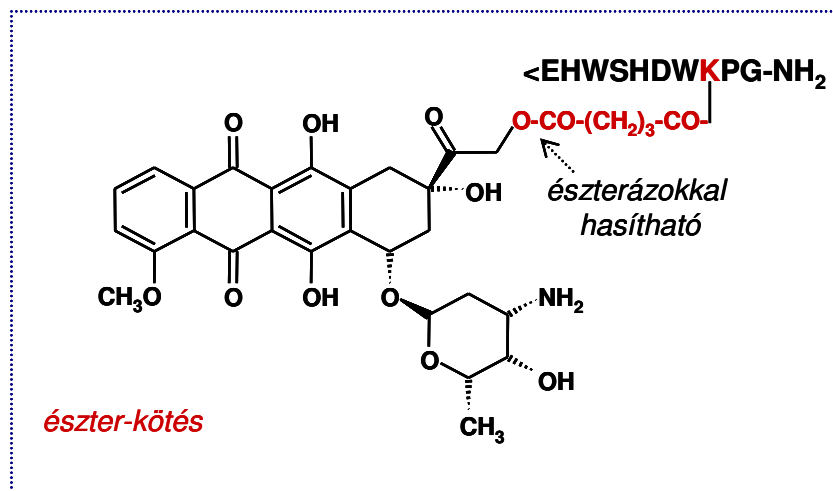
Konjugátum	IC ₅₀ (nM)	
	humán hipofízis	humán prosztata tumor
[D-Lys ⁶ (Dau=Aoa)]-GnRH-I	1,62 ± 0,32	0,89 ± 0,09
[D-Lys ⁶ (Dau=Aoa)]-GnRH-II	4,24 ± 0,81	2,11 ± 0,27
GnRH-III(Dau=Aoa)	22,87 ± 1,14	16,51 ± 1,08
[⁴ Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa)	18,86 ± 1,75	15,73 ± 1,24
[⁴ Lys(nBu)]-GnRH-III(Dau=Aoa)	9,03 ± 0,78	7,41 ± 0,55

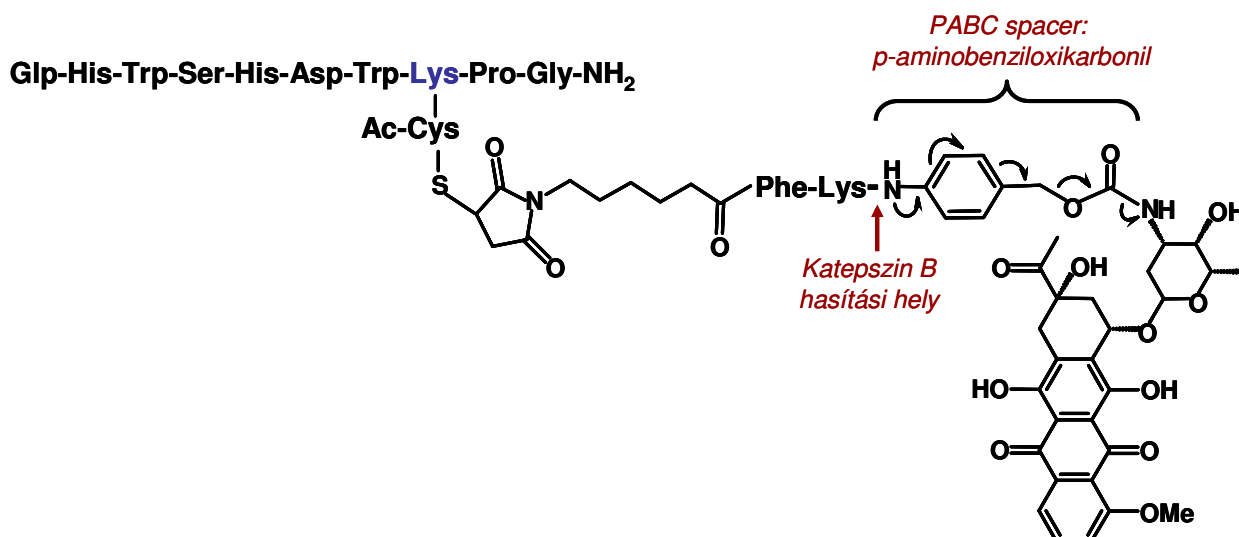
Mivel a zsírsavláncokat tartalmazó GnRH-III konjugátumok megtartották receptorkötődési képességüket, olyan származékot is előállítottunk, amelyekben a 4-es pozícióban lévő lizin oldalláncához palmitinsav kapcsolódik (hatóanyagot nem tartalmazó vegyület). Ezzel a származékkal az a célunk, hogy beépítsük lizoszómába, és így egy irányító molekulával módosított liposzómához jussun, amelybe hatóanyagot tudunk zárni. Az irányított liposzómáknak nagy jelentősége lehet a célzott tumorterápiában. Annak érdekében, hogy vizsgáljuk a palmitinsav helyének a kötődési képességre gyakorolt hatását, előállítottuk a 8-as helyzetben lévő lizin oldalláncában palmitinsavat tartalmazó analógot is. A liposzómák kialakítása jelenleg folyamatban van.

1.3.3. A hatóanyag és a peptid hormon közötti kötés változtatása a hatékonyság növelése céljából

Mivel az oxim-kötéssel kapcsolt daunomicin nem szabadul fel szabad formában a konjugátumból, ezért hatása kisebb, mint a szabad hatóanyagé. A kísérleteink egy következő fázisában tehát előállítottunk olyan konjugátumokat, amelyekből a hatóanyag szabad formában felszabadulhat. A daunomicin ellentétben a doxorubicinnel nem kapcsolható észterkötéssel peptidekhez, mert nincs erre alkalmas primer hidroxilcsoportja. Jelenleg Klinika II fázisban van egy doxorubicin – GnRH konjugátum, amelyben a doxorubicin egy észterkötésen keresztül kapcsolódik egy, a D-Lys oldalláncán glutársavval módosított [D-Lys⁶]-

GnRH-I peptidhez (AN-152). A vegyület igen hatékony mind *in vitro*, mind *in vivo* tesztekben. Az észter-kötés könnyen hasad karboxil-észterázok hatására, amikor is a szabad doxorubicin szabadul fel. A fő probléma az, hogy a szérumban található karboxil-észterázok gyorsan bontják a konjugátumot, így annak fél életideje kb, 2 óra emberben. Ennek ellenére kísérleteinkhez előállítottuk az AN-152 konjugátumot, továbbá ennek GnRH-III analógját is (3. ábra). Ebben az esetben a GnRH-III 8-as pozíciójában lévő lizin oldalláncát módosítottuk glutársavanhidriddel. A daunomicin kapcsolására hidrazon-kötés kialakítását választottuk, illetve egy „self-immolative” *p*-amino-benziloxikarbonil spacert (PABC) alakítottunk ki a hatóanyag és a GnRH-III között (3. ábra). A hidrazon-kötés savlabilis, így a lizoszómákban uralkodó enyhén savas (pH ~ 5) körülmények között a szabad hatóanyag felszabadul. A PABC spacert pedig egy maleimidokaproil-Phe-Lys egységen keresztül kapcsoltuk a lizin oldalláncán ciszteinnel módosított peptidhez. A lizoszómákban a Lys-PABC kötés elhasad, és ezt követően kötés átrendeződések útján *p*-amino-benzilalkohol és CO₂ kilépése után felszabadul a szabad daunomicin.





3. ábra: Az észter- és hidrazon-kötést tartalmazó konjugátumok valamint a PABC spacer tartalmazó konjugátum szerkezete.

Meg kell említeni, hogy valamennyi anyag előállítása komplikáltabb, lényegesen kisebb hozamú, mint az oxim-kötést tartalmazó analógok szintézise. A hidrazon savlabilitása megnehezíti a HPLC-s tisztítást. Az észter-kötések kialakításakor pedig O-N acilvándorlást tapasztaltunk a doxorubicin agglikon részén lévő primer hidroxilcsoport és a cukorrész aminocsoportja között. Ezt MS fragmentumok analízisével sikerült igazolni. (Schlage P. és mtsai J. *Controlled Release* 156: 170-178 (2011))

Az összehasonlító vizsgálatokban felhasználtuk a GnRH-III(Dau=Aoa) és az újonnan előállított GnRH-III(Dox=Aoa) oxim-kötést tartalmazó vegyületeket is. A stabilitási és lebomlási vizsgálatok azt mutatták, hogy a hidrazon-kötést tartalmazó konjugátum pH 5-ös pufferben és lizoszómában gyorsan lebomlik, ugyanakkor nem teljesen stabil semleges oldatban és humán szérumban sem. A félélet ideje a konjugátumnak 70 perc az enyhén savas oldatban, míg 48 h semleges oldatban. Az észter-kötéssel doxorubicint tartalmazó konjugátumokból hatékonyan felszabadult a doxorubicin a lizoszóma preparátumban, de félélet idejük szérumban is csak 1-2 óra volt. A PABC spacer tartalmazó konjugátumból is hatékonyan felszabadult a szabad daunomicin a lizoszóma preparátumban. Ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy viszonylag rövid idő elteltével a konjugátum nem mutatható ki a szérumban MS segítségével. Azonban bomlás termékeket sem tudtunk kimutatni. Ezért feltételezzük, hogy a konjugátum szérumfehérjékhez (pl HSA) aggregálódhatott, aminek lehet pozitív biológiai hozadéka. Ennek vizsgálatára további mérések szükségesek.

A sejtfelvételi vizsgálatok azt mutatták, hogy legintenzívebben az észter-kötést tartalmazó konjugátumok jutottak be a sejtekbe, majd a PABC spacer tartalmazó, míg

legkevésbé az oxim-kötésű vegyületek. Érdekes módon, a Dox-GnRH-III esetén több Dox pozitív sejt volt megfigyelhető, mint az Dox-GnRH-I analóg (AN-152) esetén. Ezeknél az anyagoknál a sejtbejutás mértéke szintén korrelált a mért citosztázis eredményekkel. MCF-7 sejteken az észter- és hidrazon-kötést, valamint a PABC spacer tartalmazó konjugátumok hatása közel azonos volt a szabad hatóanyagok hatásával, míg HT-29 sejteken a legjobb konjugátumok is egy nagyságrenddel kisebb citosztatikus hatást mutattak, mint a szabad hatóanyagok (4. táblázat).

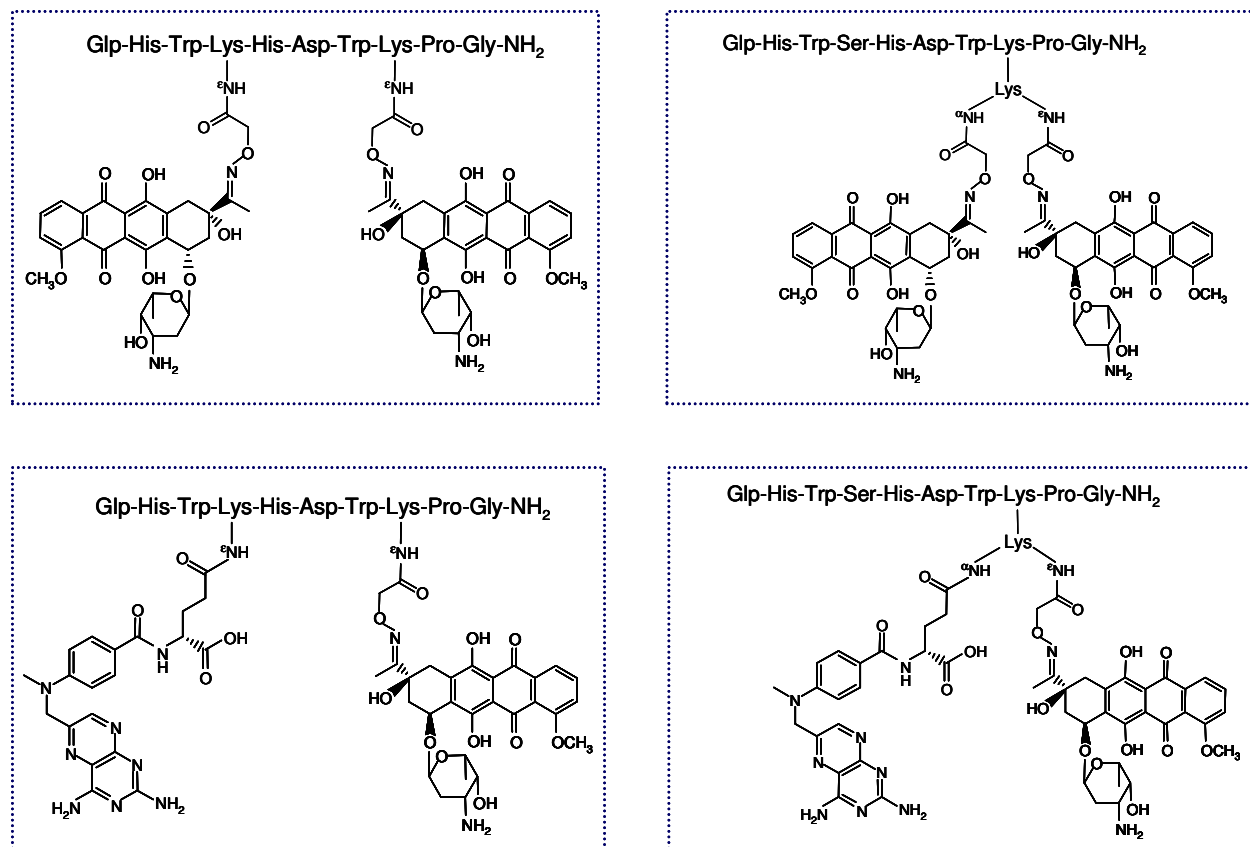
A hidrazon-kötést illetve a PABC spacer tartalmazó konjugátumok szintézisének optimalizálása szükséges ahhoz, hogy *in vivo* vizsgálatokhoz szükséges mennyiséget költséghatékony módon tudjunk előállítani. Nagyobb mennyiségű doxorubicint tartalmazó konjugátumok előállítása az utóbbi időben megtörtént, így ezeket hamarosan tudjuk használni az oxim-kötést tartalmazó konjugátumokkal végzett összehasonlító *in vivo* vizsgálatokra.

4. táblázat Különböző kötést tartalmazó GnRH konjugátumok citosztatikus hatása

Konjugátum	Citosztázis (MCF-7) IC ₅₀ (μM)	Citosztázis (HT-29) IC ₅₀ (μM)
[D- ⁶ Lys(Dox-Glut)]-GnRH-I (észter)	0,2 ± 0,1	1,9 ± 0,3
GnRH-III(Dox-Glut) (észter)	0,1 ± 0,1	2,4 ± 0,2
GnRH-III(Dau-PABC)	0,4 ± 0,0	1,7 ± 0,2
GnRH-III(Dau=NHNH) (hidrazon)	0,5 ± 0,2	2,4 ± 0,5
GnRH-III(Dau=Aoa) (oxim)	7,8 ± 2,1	17,9 ± 4,0
GnRH-III(Dox=Aoa) (oxim)	> 50	> 50
Daunomicin	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2
Doxorubicin	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0

1.3.4. Több azonos vagy különböző hatóanyagnak az irányító molekulához való kapcsolása

Ahhoz, hogy két hatóanyagot tudjunk a GnRH-III peptidhez kapcsolni, két konjugációs helyre van szükség a molekulában. Ezt kétféle módon valósítottuk meg. Egyrészt alkalmaztuk a korábban bevált Ser – Lys cserét a 4-es pozícióban. Így mind a ⁴Lys, mind a ⁸Lys oldalláncához kapcsolható hatóanyag. Amennyiben a két hatóanyag különböző (methotrexát és daunomicin), akkor itt is ortogonális védőcsoport kombinációt kellett alkalmazni a két lizinre a szintézis során. A methotrexátot amidkötéssel a 4-es, míg a daunomicint a szokásos módon (oxim-kötés) a 8-as pozícióba kapcsoltuk. Amennyiben mindkét lizinhez daunomicint kapcsolunk, akkor mindkét lizint aminoxiacetyl-csoporttal módosítottuk és oxim kötések alakítottunk ki. Másik megoldásként a natív GnRH-III peptidből indultunk ki. Ebben az esetben a ⁸Lys oldalláncára egy újabb lizint kapcsolunk, és vagy mindkét aminocsoporthoz (α - és ϵ -aminocsoportok) daunomicint kötöttünk oxim-kötéssel, vagy az α -aminocsoporthoz methotrexátot és az ϵ -aminocsoporthoz daunomicint kapcsolunk a fent említett módszerekkel (4. ábra). (Leurs U. és mtsai Biopolymers Pept. Sci. 98: 1-10 (2012) és Leurs U., Lajkó E., és mtsaik. Eur. J. Med. Chem. 52: 173-183 (2012)).



4. ábra: A két hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok szerkezete.

Két daunomicint tartalmazó konjugátumok esetén azt tapasztaltuk, hogy abban az esetben, ha a két daunomocin különböző lizinekhez (4-es és 8-as pozíció) kapcsolódott, akkor növekedett a konjugátumok sejtfelvétele az egy hatóanyagot tartalmazó konjugátumhoz képest, míg ha a 4-es pozícióban meghagytuk a szerint és a két daunomicint a ⁸Lys-hez kapcsolt extra lizinhez kötöttük, akkor a sejtfelvétel csökkent. Ennek ellenére a két hatóanyagot tartalmazó konjugátumok hatékonyabbak voltak, mint az egy Dau-t tartalmazó és nem volt közöttük szignifikáns különbség (5. táblázat). A methotrexátot (Mtx) és daunomicint (Dau) is tartalmazó konjugátumok csak a HT-29 (humán vastagbél karcinoma) sejtvonalon mutatott szignifikáns hatásnövekedést. Ez utóbbi konjugátumoknál kimutattuk, hogy a különböző hatóanyagok megőrizték biológiai funkciójukat. Bizonyítottuk, hogy lizoszómában keletkeznek a DNS kötődéshez szükséges metabolitok, és a Mtx-ra jellemző dihidrofolátreduktáz enzim gátló hatást is detektáltunk, bár ez kisebb volt, mint a szabad methotrexát esetén. A csak methotrexátot tartalmazó konjugátum nem mutatott citosztatikus hatást a vizsgált tartományban.

5. táblázat Több hatóanyagot tartalmazó GnRH konjugátumok citosztatikus hatása

Konjugátum	Citosztázis (MCF-7) IC ₅₀ (µM)	Citosztázis (HT-29) IC ₅₀ (µM)	Citosztázis (LNCaP) IC ₅₀ (µM)
GnRH-III(Dau=Aoa)	6,7 ± 1,2	29,9 ± 0,6	15,2 ± 1,4
GnRH.III(^{4,8} Lys(Dau=Aoa))	2,9 ± 0,9	6,8 ± 1,0	4,9 ± 0,3
GnRH.III(⁸ Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa)))	3,0 ± 0,4	5,6 ± 2,0	3,8 ± 1,6
GnRH.III(⁴ Lys(Mtx)· ⁸ Lys(Dau=Aoa))	5,8 ± 1,1	3,6 ± 1,5	28,8 ± 4,7
GnRH.III(⁸ Lys(Mtx-Lys(Dau=Aoa)))	5,4 ± 0,7	5,6 ± 3,0	11,3 ± 0,5
GnRH.III(⁴ Lys(Mtx)· ⁸ Lys(Ac))	> 50	> 50	> 50

Vizsgáltuk a GnRH.III(^{4,8}Lys(Dau=Aoa)) receptorkötődését hipofízis preparátumon és izolált prosztatata tumoron radioizotópos technikával (ld. korábban). Összehasonlítva a konjugátum [¹²⁵I][D-Trp⁶]GnRH-I kötődésére gyakorolt hatását a GnRH-III(Dau=Aoa) és a [⁴Lys(nBu)]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátumokkal kiváltott gátlással a következőket tapasztaltuk. A két hatóanyagot tartalmazó konjugátum kötődése erősebb volt, mint az egy

hatóanyagot tartalmazó, de nem érte el a 4-es pozícióban nBu-csoportot tartalmazó konjugátum kötődésének erősségét. A mért IC₅₀ értékek a következők:

GnRH-III(Dau=Aoa): 22,87±1,14 (hipofízis) és 16,51±1,08 (prostatata tumor szöveten);

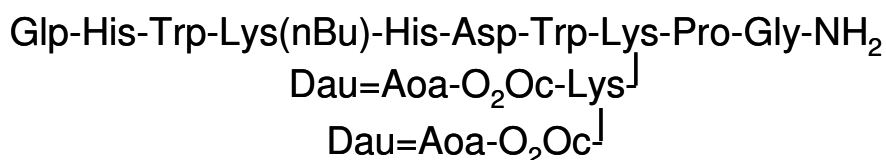
GnRH-III(^{4,8}Lys(Dau=Aoa)): 14,75±1,02 és 9,55±0,88;

[⁴Lys(nBu)]-GnRH-III(Dau=Aoa): 9,03±0,78 és 7,41 ± 0,55).

Ezek az eredmények is azt mutatják, hogy a GnRH-III 4-es pozíciójában egy szubsztituált lizinszármazék növelheti a receptorkötődést és a konjugátum tumorelles hatását.

1.3.5. A konjugátumok hatékonyságot növelő szerkezeti elemeinek kombinálása

A továbbiakban kombinálni kívántuk a rövid zsírsavat tartalmazó származékok és a több hatóanyagot tartalmazó konjugátumok előnyös biológiai hatását. A zsírsav kapcsolása a 4-es pozícióba beépített lizinhez azt eredményezi, hogy a két hatóanyagot a 8-as lizin oldalláncára beépített extra lizinhez köthetjük. Ennek megfelelően elkészítettük a GnRH-III[⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))] konjugátumot és a hatóanyag és a peptid között GFLG spacer tartalmazó variánst is. GnRH-III[⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-GFLG-Lys(Dau=Aoa-GFLG))]. Az előállított variánsok vízben ugyan viszonylag jól oldódtak, de a sejtes vizsgálatokhoz használt médiumból kicsapódtak, így *in vitro* tumorelles hatásuk mérése eléggé megbízhatatlan volt. Az oldhatóság növelése érdekében beépítettünk a molekulákba egy vízdékonyságot növelő [aminoetoxi]etoxiecetsav (-NH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CO- (O₂Oc)) linkert is (GnRH-III[⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-O₂Oc-Lys(Dau=Aoa-O₂Oc))] és (GnRH-III[⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-GFLG-O₂Oc-Lys(Dau=Aoa-GFLG-O₂Oc))] (5. ábra). A linker beépítése kismértékben növelte a konjugátumok vízdékonyságát és jelentősebben a médiumban való oldékonyságukat. A citosztázis vizsgálatok azt mutatták, hogy ezzel a kombinációval tovább lehetett növelni az antitumor hatást a korábbi vegyületekhez képest (6. táblázat). A GFLG spacer beépítése nem fokozta a hatást. Az eddig előállított oxim-kötést tartalmazó konjugátumok közül a (GnRH-III[⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-O₂Oc-Lys(Dau=Aoa-O₂Oc))] vegyület bizonyult a leghatékonyabbnak. Ráadásul az *in vitro* tumorelles hatása már megegyezett vagy jobb is volt, mint a sokkal körülményesebben előállítható észter- illetve hidrazon-kötést, valamint a PABC spacer tartalmazó analógoké. (Hegedüs R. és mtsai. Publikáció előkészületben)



O₂Oc ([aminoetoxi]etoxiacetil): -NH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CO-

5. ábra: Az [aminoetoxi]etoxiacetil linkert és két hatóanyagot tartalmazó [⁴Lys(nBu)]-GnRH-III konjugátum szerkezete.

6. táblázat A GnRH-III[⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-O₂Oc-Lys(Dau=Aoa-O₂Oc))] konjugátum citosztatikus hatásának vizsgálata

Konjugátum	Citosztázis (MCF-7) IC ₅₀ (μM)	Citosztázis (HT-29) IC ₅₀ (μM)
GnRH-III[⁸ Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))]	3,0 ± 0,4	5,6 ± 2,0
GnRH-III[⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)]	0,7 ± 0,2	2,2 ± 0,6
GnRH-III[⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-O ₂ Oc))]	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2

Érdemes megjegyezni, hogy a vegyületek rossz oldékonysága nem minden esetben jelent kizáró okot az *in vivo* alkalmazás szempontjából. Számos GnRH antagonistá vegyület kicsapódik *sc.* vagy *ip.* injekció után és depót képez. Innen történik egy folyamatos beoldódás és a hosszan tartó hatás kifejtése.

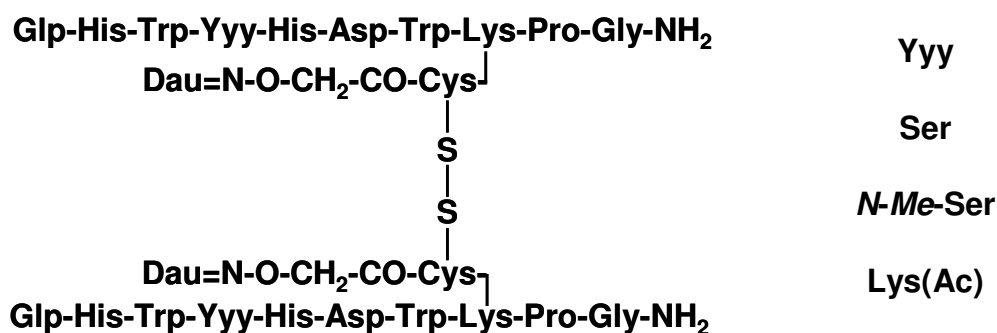
2. Dimer GnRH-származékok szintézise és vizsgálatuk

Korábbi kísérleteink bizonyították, hogy amennyiben a GnRH-III molekulát a 8-as pozícióban lévő lizin oldalláncához kapcsolt cisztein segítségével diszulfid dimerré alakítjuk, akkor nemcsak a molekula enzimekkel szembeni stabilitása nő, hanem fokozódik a tumorelles hatása, és egyidejűleg csökken az endokrin aktivitása. Így még szelektívebb antitumor hatású GnRH vegyületekhez jutottunk (Mező G. és mtsai. Peptides 28: 806-820 (2007)). Negyven napon át folyamatosan adagolva a dimer vegyületeket kb. 40-50%-os tumornövekedés gátlást lehetett elérni. Ezek a vegyületek voltak az első olyan GnRH

analógok, amelyek csak L-aminosavakat tartalmaztak, és szignifikáns *in vivo* tumornövekedést gátló hatást mutattak (Mező G. és mtsai *Curr. Med. Chem.* 15: 2366-2379 (2008)). Ezek az eredmények arra ösztönöztek bennünket, hogy a dimer típusú GnRH vegyületeket is kipróbáljuk hatóanyagok hordozójaként. A dimerek a fent említett előnyök mellett alkalmas lehet több hatóanyag molekula célba juttatására.

2.1. GnRH-III h hatóanyag konjugátumok dimer változatainak szintézise és vizsgálata

Munkánk során a GnRH-III-ból és két 4-es pozícióban módosított analógiából (⁴Lys(Ac) és ⁴*N-Me-Ser* származékok) készítettünk daunomicint tartalmazó dimer vegyületeket. A szintézisek során még a gyantán beépítettük a ⁸Lys oldalláncára a Cys aminosavszármazékot, majd ennek aminocsoportját aminooxiacetileztük. A peptid gyantáról történt hasítása után enyhén savas puffer oldatban reagáltattuk a daunomicinnel. Az oxim-kötésű hatóanyag – peptid konjugátumot ezután enyhén bázikus pufferben dimerizáltuk (6. ábra). Az előállított dimer vegyületek sokkal stabilabbak voltak kimotripszines emésztéssel szemben. Lizoszóma preparátumban a vegyületek bomlottak és a legkisebb, hatóanyagot tartalmazó metabolitok dimer egységek voltak ([H-Lys(Dau=Aoa-Cys)]₂). Tehát ebben az esetben sem tapasztaltunk szabad hatóanyag felszabadulást. Azonban a dimerek kb. kétszer olyan hatásosak voltak az citosztázis kísérletekben, mint a monomer vegyületek (7. táblázat).



6. ábra: A 4-es pozícióban szubsztituált GnRH-III – daunomicin konjugátumok dimer származékainak szerkezete.

Tehát a két molekula daunomicin additív hatása, hasonlóan a két hatóanyagot tartalmazó monomerekhez, itt is érvényesült. A három dimer konjugátum hatékonysági sorrendje megegyezett a monomer konjugátumokkal tapasztaltakkal. Az *in vitro* vizsgálatokat a dimerek esetében is némileg gátolja a dimerek gyengébb oldhatósága a vizsgálatokhoz használt médiumokban. (Schreier VN. és mtsai. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.01.114). Jelenleg folyamatban van a még hatékonyabb monomer

származékok dimer formáinak előállítására (pl. *n*-vajsavat tartalmazó származék), amelyek még hatékonyabb tumorellenes hatást mutathatnak.

7. táblázat Dimer GnRH-III –hatóanyag konjugátumok citosztatikus hatása

Konjugátum	Citosztázis (MCF-7) IC ₅₀ (μM)
{GnRH-III(⁸ Lys(Dau=Aoa-Cys))} ₂	4,1 ± 0,8
{[⁴ N-Me-Ser]-GnRH-III(⁸ Lys(Dau=Aoa-Cys))} ₂	6,2 ± 1,5
{[⁴ Lys(Ac)]-GnRH-III(⁸ Lys(Dau=Aoa-Cys))} ₂	1,9 ± 0,7

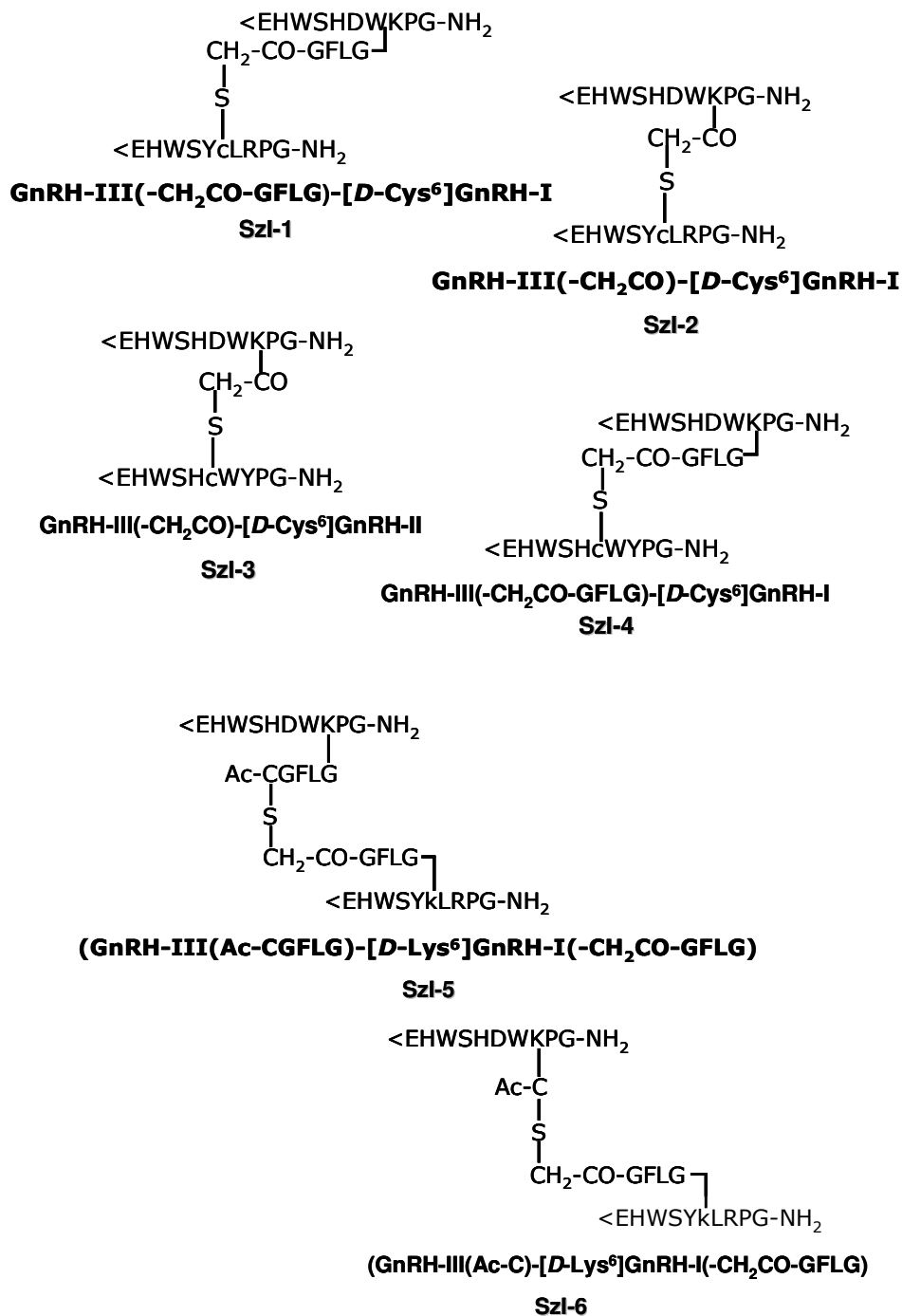
2.2. GnRH analógok vegyes dimerjeinek előállítása és vizsgálata

Az irodalomban leírtak szerint a GnRH-III kevésbé kötődik a GnRH-I receptorhoz, mint maga a GnRH-I, illetve a GnRH-II. Ezt tapasztaltuk a hatóanyagot tartalmazó konjugátumok esetében is (3. táblázat). Ezért előállítottunk és vizsgáltunk, olyan dimer GnRH-származékokat, ahol egy GnRH-III egy GnRH-I vagy GnRH-II származékkal kapcsolódik össze. A GnRH-III antiproliferatív hatásának növelése érdekében előállított vegyes dimer molekulákat azonban nem diszulfidhíd kialakításával készítettük, mivel a vegyes diszulfid-kötést tartalmazó vegyületek sokszor nem elég stabilak, és könnyen átalakulnak szimmetrikus dimerekké. Ezért a két komponenst a sokkal stabilabb tioéter-kötés segítségével kapcsoltuk össze. Két különböző típusú konstrukciót állítottunk elő. Az első esetben a GnRH-III 8-as pozíciójában lévő lizin oldalláncát közvetlenül vagy egy GFLG Katepszin B-re érzékeny tetrapeptid távtartó közbeiktatásával klóracetileztük, és ezt reagáltattuk a 6-os pozícióban D-Cys-t tartalmazó GnRH-I illetve GnRH-II agonista analógokkal. A másik konstrukcióban a [D-Lys⁶]-GnRH-I D-Lys oldalláncához egy klóracetilezett GFLG spaceret kapcsolunk és ezt reagáltattuk a GnRH-III származékokkal, amelyek vagy a ⁸Lys oldalláncához közvetlenül vagy GFLG spaceren keresztül kapcsolva tartalmaztak acetilezett ciszteint (7 ábra). (Szabó I. és mtsai. Közlemény előkészítés alatt).

Az előállított aszimmetrikus dimer származékok LH-szekrécióna gyakorolt hatását vizsgáltuk patkány hipofízis sejtszuperfúzióban. Az aszimmetrikus dimerek már 10 nM koncentrációban jelentős LH-szekrécióna váltottak ki szemben a korábban előállított GnRH-III szimmetrikus dimer származékokkal, amelyek nem mutattak LH-szekrécióna serkentő hatást

ebben a koncentrációban. A GnRH-III dimerek csak μM -os koncentrációban mutatnak elhanyagolható mértékű endokrin aktivitást.

A $[D\text{-Cys}^6]$ -GnRH-I molekulát tartalmazó aszimmetrikus dimerek esetén a 0,1 nM-os koncentrációban kaptunk fokozottabb LH-szekréciót (Szi-1: $154 \pm 7,5\%$, Szi-2: $150 \pm 8,5\%$, a százalékos értékek a kontrollként használt GnRH-I monomer hatására vonatkoznak). A monomer 1 nM-os koncentrációban már hatékonyabb volt, mint a dimer.



7. ábra: GnRH-III és GnRH-I vagy GnRH-II analógokat tartalmazó vegyes dimerek szerkezete.

Ezzel szemben a [*D*-Cys⁶]-GnRH-II molekulát tartalmazó aszimmetrikus dimereknél 0,1 nM-os koncentráció esetén nem tapasztaltunk LH-szekréció változást, viszont 1 nM-nál szignifikáns endokrin hatás figyelhető meg (Szi-3: 36±6,0%, Szi-4: 110±8,5%, a kontrollként használt GnRH-II monomerre vonatkoztatva).

A szuperagonista [*D*-Lys⁶]-GnRH-I molekulát tartalmazó aszimmetrikus dimerek esetén mind 0,1 nM, mind pedig 1 nM-os koncentrációban jelentős endokrin hatásváltozás figyelhető meg a kontrollra vonatkoztatva (Szi-5: 101±7,0%, illetve 191±17,5%; Szi-6: 246±7,5%, illetve 135±19,5%).

Az endokrin hatás szempontjából az aszimmetrikus dimerek (a *D*-ciszteint tartalmazó GnRH-II származékok kivételével) még 0,1 nM-os koncentrációban is jelentős LH-felszabadító képességgel bírnak. Mivel a GnRH-III dimerek nem rendelkeznek jelentős LH-felszabadító hatással és a GnRH-III is elhanyagolható endokrin hatású 10nM alatti koncentrációban, így elmondható, hogy az aszimmetrikus dimerek endokrin hatását a molekulában lévő másik komponens határozza meg. Az Szi-6 dimer, amely a szuperagonista [*D*-Lys⁶]-GnRH-I molekulát tartalmazza, bizonyult a legmagasabb endokrin hatással rendelkező vegyületnek.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a GnRH-III és GnRH-I illetve GnRH-II származékok aszimmetrikus dimerjei szuperagonista tulajdonságuknál fogva indirekt tumorellenes hatású molekulák alapjául szolgálhatnak a tumorterápiában (hormonterápia). A fokozott hormonhatás miatt szelektív, mellékhatásoktól mentes hatóanyag célba juttatásra kevésbé megfelelő. Ezért a vegyes dimerekből hatóanyagot tartalmazó konjugátumokat nem készítettünk.

3. Proapoptotikus peptidet tartalmazó GnRH konjugátumok

Daganatos megbetegedésekben fontos probléma a tumoros sejtek apoptotikus folyamatainak felbomlása. Ugyanis az apoptotikus fehérjék egyensúlya daganatos megbetegedésben eltolódik az antiapoptotikus fehérjék javára. Ez két módon alakulhat ki: az antiapoptotikus fehérjék túltermelődnék, vagy a proapoptotikus fehérjék mennyisége csökken. Mindkét eset a daganatos megbetegedés kezelésével szembeni rezisztencia kialakulását fogja eredményezni.

Ha egy daganatsejtet apoptózisra szeretnénk kényszeríteni, akkor vagy a proapoptotikus fehérjék termelődését kell fokoznunk (genetikai beavatkozás), vagy pedig a proapoptotikus fehérjéket kell specifikusan a tumorsejtbe juttassuk, ugyanis ezek a fehérjék nem képesek átjutni a sejtmembránokon. Az irodalomban már közöltek olyan eredményeket,

ahol GnRH peptidet alkalmaztak proapoptotikus peptid célbajuttatására, A kísérletben a Bak fehérje BH3 doménjének aktív régióját (H-MGQVGRQLAIIGDDINRR-NH₂) kapcsolták GnRH peptidhez (<EHWSYGLRPG-NH₂). Azt találták, hogy a peptidek önmagukban nem voltak citotoxikusak, de a konjugátumuk (<EHWSYGLRPGMGQVGRQLAIIGDDINRR-NH₂) annak bizonyult GnRH-I receptort hordozó humán emlő- (MCF-7), prosztatata- (PC-3), illetve ovárium (A2780) tumorsejtvonalakon. A GnRH-proapoptotikuspeptid konjugátummal kiváltott apoptózis mértéke azonban jelentősen függött a vizsgált sejteken lévő GnRH receptorok mennyiségétől (A2780> PC-3> MCF-7).

A fent említett munkát alapul véve különböző GnRH-proapoptotikus peptidet tartalmazó konjugátumokat állítottunk elő és vizsgáltuk azok *in vitro* citotoxikus hatását. Célbajuttató molekulaként a [D-⁶Lys]-GnRH-II (Glp-His-Trp-Ser-His-D-Lys-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂) molekula szolgált, melynek *in vitro* tumorelles és apoptózist indukáló hatása az irodalomban leírt. Mivel a GnRH-II analógok hatásukat a GnRH-I receptoron keresztül fejtik ki, így minden olyan sejt, mely rendelkezik ezzel a receptorral, potenciális célpontja lehet az általunk tervezett és előállított konjugátumoknak. Tehát ezek a konjugátumok direkt módon fejtik ki tumorelles hatásukat.

Konjugátumainkban a proapoptotikus peptideket úgy választottuk ki, hogy azok a proapoptotikus fehérjék különböző alcsaládjába tartozó fehérjékből származzanak (a Bax alcsaládból a Bak fehérjét (H-MGQVGRQLAIIGDDINRR-NH₂), míg a csak BH3 domént tartalmazó alcsaládból a Puma fehérjét (H-IGAQLRRMADDLNAQ-NH₂) választottuk ki). Így össze tudtuk hasonlítani az egyes proapoptotikus fehérjéknek az apoptotikus folyamatban betöltött közvetett szerepét.

A szintetikus előállított és analitikailag jellemzett proapoptotikus peptidkonjugátumok *in vitro* citotoxicitását határoztuk meg GnRH-I receptort kifejező MCF-7 és SK-BR-3 humán emlő-, valamint HT-29 humán vastagbél tumorsejtvonalakon. Az egyes sejteken mért IC₅₀ értékeket az alábbiakban foglaljuk össze.

8. táblázat: Proapoptotikus peptid konjugátumok és komponenseik citotoxicitása

Peptid	MCF-7	SK-BR-3	HT-29
[D- ⁶ Lys]-GnRH-II	37,4	78,0	56,8
Bak	35,5	62,4	62,5
Puma	34,0	60,9	67,2
[D- ⁶ Lys]-GnRH-II-Bak	33,1	55,8	69,7
[D-Lys ⁶]-GnRH-II-Puma	60,0	76,4	65,8
[D- ⁶ Lys (Dau=Aoa)]-GnRH-II	4,1	3,9	1,4

IC₅₀ értékek μM koncentrációban kifejezve

A proapoptotikus peptidek hatását összehasonlítva elmondhatjuk, hogy minden esetben a Bak peptidet tartalmazó konjugátumok voltak hatásosabbak a Puma peptidet tartalmazó konjugátumokkal szemben. Így feltehetőleg az általunk vizsgált sejttípusokban azon apoptotikus fehérjék határozzák meg az apoptózis kimenetelét, amelyek a Bax alcsaládba tartozó Bak fehérjével képesek kölcsönhatásba lépni. Ezekre a sejtekre valószínűleg a Bak proapoptotikus fehérje alacsony expressziója jellemző. További munkánkban a hatóanyagot és proapoptotikus peptidet együtt tartalmazó GnRH konjugátumokat tervezünk elkészíteni és vizsgálni.

4. Sejt adhéziós és kemotaxis vizsgálatok

A tumorsejtek szóródása a daganatprogresszió folyamatának fontos mozzanata, amely többek között a célzott terápia sikerességét is befolyásolhatja. Az áttétképzés során az egyik első meghatározó lépés a daganatsejtek adhéziós kapcsolatainak meggyengülése, és ezzel párhuzamosan a migrációs aktivitásuk fokozódása. A célzott tumorterápiában ígéretes lehetőségnek számít olyan hatóanyag-szállító GnRH-III konjugátumok alkalmazása, amelyek egyidejűleg képesek gátolni a tumorsejtek növekedését és áttétképzését is. A tumorelles hatáserért a szállított citotoxikus hatóanyag felelős, míg az antimetasztatikus aktivitása a konjugátumnak az adhézióra és a kemotaxisra kifejtett hatásaiból következik.

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a targetáló GnRH-III származékok önmagukban, valamint a hatóanyag-tartalmú konjugátumaik rendelkeznek-e (i) adhéziót befolyásoló és (ii) kemotaktikus hatással, amely a metasztázisképzés folyamatára kifejtett hatásuk szempontjából alapvető. A konjugátumok (iii) antiproliferatív/citotoxikus aktivitásának mérésével azt is elemeztük, hogy a gyógyszer-tartalmú származékok ténylegesen kifejtik-e a szabad hatóanyagra jellemző biológiai hatást. Célunk volt, hogy a fenti eredmények alapján, az egyes pontokon eltérő molekuláris szerkezetekről gyűjtött adatok birtokában kiindulási adataink legyenek új tumorelles molekulajelöltek preklinikai teszteléséhez.

4.1. Anyag és módszer

Vizsgált GnRH-III származékok és konjugátumaik

Munkánk során a következő irányító hatású GnRH-III származékok hatását elemeztük: (i) természetes hormonok (GnRH-I, GnRH-II, GnRH-III), (ii) N-terminális felől rövidített GnRH-III fragmensek (Ac-HWSHDWKPG-NH₂, Ac-WSHDWKPG-NH₂, Ac-SHDWKPG-NH₂), (iii) elágazó láncú GnRH-III monomerek (GnRH-III(Ac-C), (GnRH-III(Ac-CGFLG)))

és (iv) szimmetrikus dimerszármazékaik ([GnRH-III(C)]₂, [GnRH-III(Ac-C)]₂, [GnRH-III(CGFLG)]₂, [GnRH-III(Ac-CGFLG)]₂).

Vizsgálatainkban felhasznált hatóanyagot tartalmazó konjugátumok irányító egységei különböző GnRH-III származékok (GnRH-III, [⁴N-Me-Ser]-GnRH-III, [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III, [GnRH-III(C)]₂, [GnRH-III(YRRLC)]₂) voltak. A hatóanyagok (daunomicin – Dau, doxorubicin – Dox, metotrexát – Mtx) különböző kémiai kötések (észter, amid, oxim) kialakítva közvetlenül vagy távtartó szekvencián (GFLG, YRRL) keresztül lettek kapcsolva az irányító egységekhez (ld a korábbi részeket).

Modell-sejt

A GnRH-III származékok és konjugátumaik hatását akut mieloid leukémia eredetű Mono Mac 6 (MM6), humán monocita sejtvonalon vizsgáltuk 10⁻¹²-10⁻⁶ M koncentrációtartományban.

Impedimetrián alapuló adhézió mérőmódszer

A GnRH-III származékok és konjugátumaik sejtadhézióra kifejtett hatásának mérésére az impedancia valós idejű regisztrálásán alapuló xCELLigence készüléket használtuk. A rendszer jellemzője, hogy a sejtek, szigetelő tulajdonságú sejtmembránjuknak köszönhetően, az alkalmazott elektródok felszínére történő kitapadásuk során impedancia emelkedést okoznak, amely arányos a kitapadt sejtek számával és az adhézió mértékével.

Kemotaxis mérőmódszer

A MM6 sejtek kemotaktikus válaszkészségének mérése NeuroProbe[®] kamra felhasználásával történt. A kemotaktikus reakciót mutató sejtek számát MTT-teszttel határoztuk meg.

Proliferáció és citotoxicitás vizsgálat

A hatóanyag-tartalmú GnRH-III konjugátumok direkt tumorelles aktivitását, 24, 48, 72 órás inkubációt követően a vegyületek antiproliferatív és citotoxikus hatásának vizsgálatával kívántuk igazolni MM6 sejteken. A sejtszámváltozások követésére az impedimetria elvén működő CASY TT sejtszámláló készüléket használtuk, amely lehetőséget adott a sejtszám és sejtméret eloszlás meghatározására, valamint az élő-halott sejtek elkülönítésére is.

4.2. Eredmények

Irányító hatású GnRH-III származékok

A korábbi *in vitro* (internalizáció, citotoxicitás) vizsgálatok alapján, a GnRH-III és dimer származékai mellett az N-terminális felől rövidített GnRH-III fragmensek is ígéretes tumor targetáló egységei lehetnek a hatóanyag-szállító rendszereknek.

Összesen 12 irányító hatással rendelkező GnRH-III származék adhéziós és kemotaktikus aktivitását vizsgálatuk annak érdekében, hogy olyan származékokat találjunk, amelyek alkalmasak egy adott hatóanyag szelektív célbajuttatására, és képesek megakadályozni a tumorsejtek szóródását.

A daganatsejtek szóródásának hatékony gátlásához elengedhetetlen, hogy a GnRH-III származékok rendelkezzenek adhéziót fokozó és kemorepellens hatással. Egy kivételtől (Ac-SHDWKPG-NH₂) eltekintve mindegyik vizsgált peptid fokozta a MM6 sejtek kitapadását, bár a hatások mértékében és koncentrációfüggésében mutatkozott kisebb különbség. Ezzel szemben MM6 modell-sejtünk kemotaktikus aktivitása érzékenyebben követte az egyes szerkezeti változásokat. A GnRH-III fragmensek MM6 sejteken mutatott kemotaktikus hatása – hasonlóan a korábbi, Tetrahymena modell-sejten végzett vizsgálatokban tapasztalt szerkezet-hatás összefüggésekhez – az N-terminálison lévő aminosav fiziko-kémiai karakterének fontosságára hívta fel a figyelmet. A GnRH-III⁸Lys oldalláncának módosítása a GnRH-III(Ac-C) monomer esetén intenzív kemorepellens (46,2-23,9%) hatást mutatott, míg a belőle felépülő [GnRH-III(C)]₂ dimer kemorepellens jellege (67,3-26,2%) csak alacsony koncentrációkra korlátozódott. A 'GFLG' távtartót tartalmazó peptidok ellenkező kemotaktikus választ indukáltak, mint a rövid oldalláncot/linker régiót hordozó származékok. A [GnRH-III(C)]₂ és [GnRH-III(Ac-C)]₂ dimerek kemotaktikus hatásában mutatkozó, a GnRH-III hormon aktivitásához hasonló bifázisos (alacsony koncentráción repellens, magas koncentráción attraktáns) jelleg arra enged következtetni, hogy maga a GnRH-III hormonrész lehet felelős a dimerek receptorkötéséért és kemotaktikus viselkedéséért.

Összegezve az eredményeket, az irányító egységnek számító GnRH-III származékok esetén az adhéziót fokozó és kemorepellens hatás az alacsonyabb koncentrációkra volt jellemző. Ez arra enged következtetni, hogy ezek a peptidok önmagukban, vagy egy gyógyszer-szállító rendszer részeként a primer tumor szintjén hatva a tumorsejtek helyben tartását segíthetik elő. Az antimetasztatikus hatás tekintetében a GnRH-III monomer és dimer származékai hatékonyabbak voltak, mint maga a natív hormon. A csoportból kiemelendő, a két monomer forma (GnRH-III(Ac-C), GnRH-III(Ac-CGFLG)) mellett, egyes dimer vegyületek is ([GnRH-III(C)]₂ és [GnRH-III(Ac-CGFLG)]₂), amelyek kedvező

hatásprofiljuknak köszönhetően ideális jelöltek lehetnek az irányított tumorterápiában történő felhasználásra, mint a hatóanyag-szállító rendszerek targetáló egységei.

Hatóanyag-tartalmú GnRH-III konjugátumok

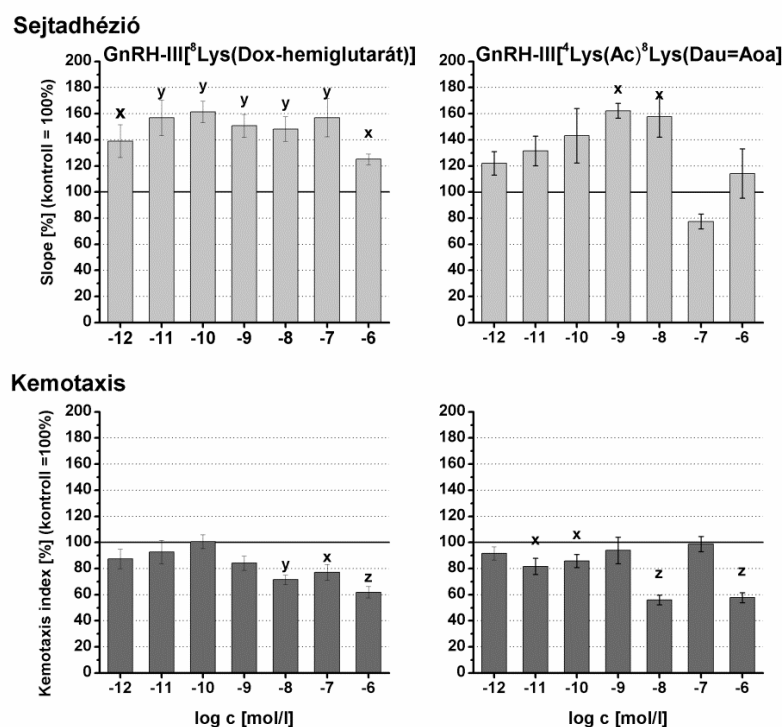
A gyógyszer-célbajuttatásra tervezett konjugátumokkal szemben támasztott egyik legfontosabb követelmény, hogy rendelkezzenek a szabad hatóanyagra jellemző tumorellenes hatással. Az antimetasztatikus hatásuk szempontjából a konjugátumok adhéziót fokozó és ezzel egyidejű kemorepellens aktivitása a kedvező. Így egy ideális konjugátum, a fenti hatások (antiproliferatív, adhéziót fokozó, kemorepellens) birtokában képes lehet a primer daganatok növekedésének és szóródásának gátlására.

Összesen 15 hatóanyag-tartalmú GnRH-III származék vizsgálatával a különböző szerkezeti és konjugálási módosítások – (i) különböző hatóanyag, valamint több hatóanyag együttes jelenléte, (ii) enzimlabilis távtartó szekvencia megléte, (iii) a GnRH-III alapvázat érintő szubsztitúció, (iv) dimerré kapcsolás – adhéziót befolyásoló, kemotaktikus, antiproliferatív/citotoxikus hatását elemeztük. A GnRH-III alapú konjugátumok aktivitását a szabad hatóanyagok, valamint az irodalomból ismert AN-152 hatásával hasonlítottuk össze. A referencia konjugátumnak tekinthető AN-152 esetén a hatóanyag egy észter-kötésen keresztül kapcsolódik a GnRH-I agonista származékához ([D-⁶Lys]-GnRH-I).

A tumorellenes és antimetasztatikus hatás tekintetében az egyik leghatékonyabb GnRH-III konjugátum a doxorubicint észter-kötésben tartalmazó GnRH-III(Dox-Glut)] volt. Az adhéziót fokozó hatása (125,1-161,4%) mellett kemorepellens hatásának (10^{-8} - 10^{-6} M: 71,4-61,9%) bizonyult (8. ábra), valamint citotoxikus hatása (élő sejtszám a kontrollhoz képest: 10^{-7} - 10^{-6} M: 21,0-8,6%) 72 óra elteltével lényegesen nem tért el az AN-152 (10^{-7} - 10^{-6} M: 26,3-13,1%) és a szabad doxorubicin hatásától (10^{-8} - 10^{-6} M: 27,1-9,6%) (9. ábra). Az észter-kötés azonban kevésbé stabil, észterázok hatására könnyen bomlik, ami mellékhatások kialakulásához vezethet. Ennek kiküszöbölésére stabilabb kötést (amid és oxim) tartalmazó konjugátumokat is vizsgáltunk. Ezekben a konjugátumokban a hatóanyag megfelelő felszabadulása érdekében a drug és a GnRH-III közé lizoszómális enzimre érzékeny távtartó szekvencia (GFLG, YRRL) került beépítésre. Az amidkötés jóvoltából viszonylag stabilabb GnRH-III(Dox-GFLG) konjugátum is rendelkezett a tumorellenes és az antimetasztatikus hatás szempontjából kedvező hatáskombinációval. A GnRH-III(Dox-GFLG) hatékonyan fokozta a sejtek adhézióját (153,9-140,0%), 72 órás kezelést követően a szabad hatóanyaghoz hasonló

mértékű sejtpusztulást okozott (10^{-7} - 10^{-6} M: 36,7-12,7%), azonban a kemorepellens (10^{-6} M: 73,3%) hatása elmaradt a GnRH-III(Dox-Glut)] aktivitásától.

A daunomicint oxim-kötésben tartalmazó GnRH-III(Dau=Aoa) és spacer tartalmazó származékai (GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG), GnRH-III(Dau=Aoa-YRRL)) konjugátumok azonban nem rendelkeztek hasonló aktivitással. Így eltérő felépítésű, daunomicin-tartalmú monomer és dimer alapú konjugátumok vizsgálata vált szükségessé. Korábbi vizsgálatokban kimutattuk, hogy 4. pozícióban módosított irányító egységek – [N-Me-⁴Ser]-GnRH-III, [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III – alkalmazásával fokozni lehetett a konjugátum stabilitását, és internalizációját is. A ⁴Lys(Ac) beépítése a molekulába javította a konjugátum citotoxikus (9. ábra) és repellens hatását (8. ábra), továbbá a [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa) rendelkezett a legjelentősebb adhéziót fokozó hatással (131,5-157,6%) is (8.). Ezzel szemben a [N-Me-⁴Ser]-GnRH-III(Dau=Aoa) nem bizonyult ennyire hatékonynak, bár kismértékben fokozta a MM6 sejtek adhézióját, de 72 óra elteltével sem mutatott sejtszétválást gátló hatást.

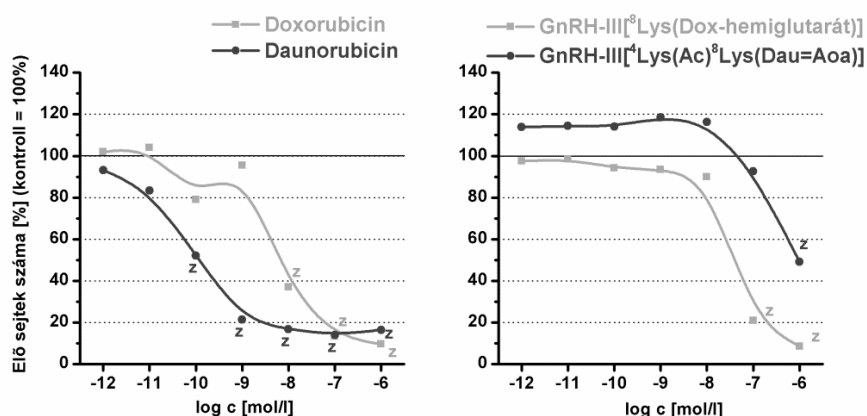


8. ábra: Hatóanyag-tartalmú GnRH-III konjugátumok sejtdhézióra és kemotaxisra kifejtett hatása Mono Mac 6 modell-sejten.

A 'Slope' a sejtdhézió mértékére jellemző mutatószám, amit a kontroll százalékában fejeztünk ki. A kontrollra normalizált 'Kemotaxis index' a kemotaktikus aktivitás jellemzésére szolgál. Az ábrákon szereplő adatok párhuzamos mérések (3-5) átlagát \pm SD jelentik. A statisztikai kiértékelést ANOVA teszttel végeztük. A szignifikancia szintek következő módon jelöltük: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$; z – $p < 0,001$.

A GnRH-III alapú gyógyszer-célbajuttatás hatékonyságát a tumor sejtek GnRH receptor expressziója és a receptorok deszenzitizálódása nagymértékben befolyásolja. E tényezők

kiküszöbölésére két hatóanyagot (daunorubicint és metotrexatot) hordozó, ú.n. bifunkciós konjugátumok kidolgozására és vizsgálatára került sor. A [⁴Lys]-GnRH-III hordozó alkalmazásával előállított, a 4. és 8. pozícióban is egy-egy hatóanyagot tartalmazó GnRH-III[^{4,8}Lys(Dau=Aoa)] és GnRH-III[⁴Lys(Mtx),⁸Lys(Dau=Aoa)] konjugátumok mutattak kedvezőbb hatásprofil, mind a tumorelles, mind az antimetasztatikus (adhéziót fokozó, kemorepellens) hatás szempontjából, összehasonlítva azokkal, ahol a hatóanyagok egy lizin aminosav közbeiktatásával a ⁸Lys oldalláncához voltak kapcsolva (GnRH-III[⁸Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))] GnRH-III[⁸Lys(Mtx-Lys(Dau=Aoa))]). A citotoxikus hatás tekintetében ezek a bifunkciós konjugátumok nem eredményeztek egyértelmű hatásjavulást. A 4-es pozícióban is daunomicint tartalmazó GnRH-III[^{4,8}Lys(Dau=Aoa)] esetén fokozódott a citotoxikus aktivitás (30,3%), míg az ugyanitt metotrexátot hordozó GnRH-III[⁴Lys(Mtx),⁸Lys(Dau=Aoa)] kisebb hatást fejtett ki (76,0%) még az egyszeresen konjugált [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa)] származékhoz (49,1%) képest is. A fenti aktivitásbeli eltérések oka a hatóanyagok hozzáférhetőségében, a konjugátumok sejtfelvételében, a lizoszómális emésztés során keletkező fragmensek minőségében vagy a fragmensek által közvetített hatás mechanizmusában keresendő.



9. ábra: Hatóanyagok és GnRH-III konjugátumok antiproliferatív/citotoxikus hatása Mono Mac 6 modell-sejten.

Az élő sejtek számát a kontroll százalékában határoztuk meg. Az ábrákon szereplő adatok párhuzamos mérések (3-5) átlagát jelentik. A statisztikai kiértékelést Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük. A szignifikancia szintek jelölése a következő módon történt: z – p < 0,001.

Mint azt előbbieken bemutattuk az egyes GnRH-III dimerek is (pl. [GnRH-III(C)]₂), mint irányító hatású hordozók alkalmasak lehetnek egy kérdéses hatóanyag célbajuttatására. Így munkánk során vizsgáltunk dimer alapú konjugátumokat is, amelyek monomer egységenként egy-egy hatóanyagot tartalmaztak. Ezek a hatóanyag-tartalmú dimerek a monomer konjugátumokhoz képest, a vártnak megfelelően, legalább kétszer nagyobb citotoxikus aktivitással rendelkeztek. A spacer szekvenciát tartalmazó [GnRH-III(Dau=Aoa-

YRRL)]₂ konjugátum nagyobb mértékű citotoxikus hatással (42,4%) rendelkezett a távtartó nélküli [GnRH-III(Dau=Aoa)]₂ formához képest (66,4%). Ez többek között abból adódhat, hogy a távtartó elősegítheti, hogy a monomer alegységek képesek legyenek külön-külön kötődni egy-egy receptorhoz, és így javulhat magának a konjugátumnak internalizációja is. A dimer-hatóanyag konjugátumok a citotoxikus hatásuk szempontjából releváns koncentráción (10⁻⁶M) jelentkező kemorepellens és adhéziót fokozó hatásuknak köszönhetően a daganatsejtek leválását és szóródását is eredményesen gátolhatják.

Összefoglalásként elmondható, hogy a gyógyszer-célbajuttatásra tervezett hatóanyag-tartalmú GnRH-III konjugátumok többsége rendelkezett a szabad hatóanyagra jellemző tumorelles hatással, valamint a sejtadhézióra és kemotaxisra kifejtett hatásuk is igazolható volt leukémia (MM6) modellen. A doxorubicin-tartalmú konjugátumok (pl. GnRH-III(Dox-hemiglutarát)) a daunorubicin-tartalmúakkal (pl. GnRH-III(Dau=Aoa)) összehasonlítva hatékonyabbnak bizonyultak. A daunorubicin-kapcsolt konjugátumok profilját a [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III hordozó alkalmazása és a dimerképzés javította szignifikánsan.

A hatóanyag-GnRH-III konjugátumok antiproliferatív/citotoxikus hatása alapján feltételezhetjük, hogy a célzó egységként szolgáló GnRH-III származékok képesek biztosítani a hatóanyag célsejthez jutását és tumorelles aktivitását. A konjugátumokra jellemző adhéziót fokozó és kemorepellens hatás azt valószínűsíti, hogy a primer tumor szintjén hatva, képesek lehetnek csökkenteni a tumorsejtek leválását és egyben a távoli áttétek kialakulásának esélyét. Mindezek alapján pl. a GnRH-III(Dox-hemiglutarát), GnRH-III(Dox-amid-GFLG)], valamint daunorubicin-tartalmú dimer és [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III konjugátumok alkalmas jelöltek lehetnek a célzott daganatterápiában történő felhasználásra, mint tumorelles és antimetasztatikus hatású terapeutikumok.

5. Kemotaxis chip tervezése és megvalósítása

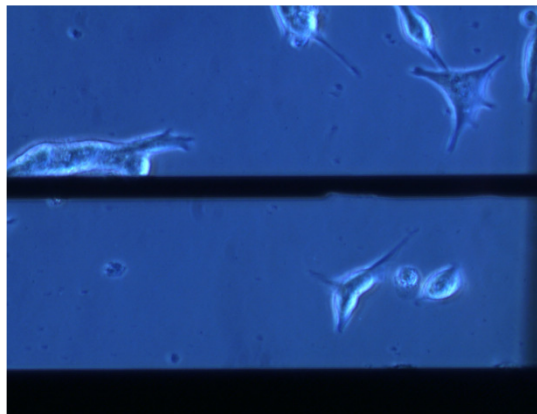
A kutatás kezdeti szakaszában az impedimetriai kiértékelési technikán nyugvó, egycsatornás, ún. "I-chip" kidolgozását végeztük el. Ez 4-4 mérő, illetve referencia elektródpar alkalmazásával, ECIS 1600 berendezésben képes a kialakított kapilláris terében kialakuló koncentráció gradiens mentén elmozduló sejtek/sejttömegek migrációját monitorozni.

Ezt követően - a kezdeti bemérések adatainak figyelembe vételével - az alábbi feladatok elvégzésére került sor:

(i) rendszer anyagi összetevőinek optimalizálása

- (ii) elektród felszínek sejt-detektálási paramétereinek optimalizálása
- (iii) a chip statikus és dinamikus rendszerben történő alkalmazásokra történő bemérése
- (iv) az alap chip-konfiguráció tovább fejlesztése
- (v) referencia konjugátumokkal történő tesztek

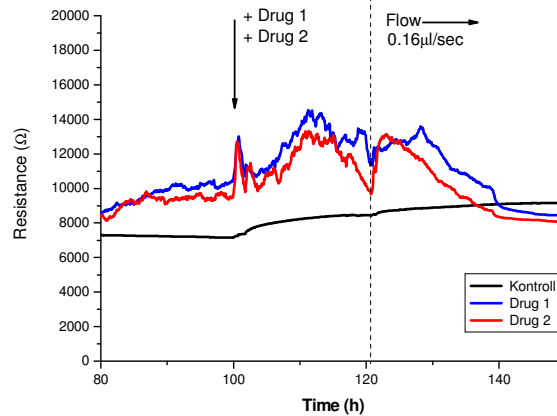
(i) A kezdeti chip-konfiguráció kialakítását és bemérését követően törekedtünk arra, hogy a chip felépítésére a mérések során alkalmazni kívánt – fizikai szempontból és a biológiai objektumoknak is legmegfelelőbb - anyagokat válasszuk ki. E munka keretében az elektródokat hordozó felszín cseréjére, borofloát üveg, illetve SU-8 alkalmazására került sor. Teszteltük a csatornák kialakításához használt polydimethylsiloxane (PDMS) hatását a tenyésztett sejtekre. Eredményeink azt mutatják, hogy sem az alkalmazott PDMS mint felszín, sem az abból kioldódó anyagok nem befolyásolják a vizsgált sejtek (pl. MM6 monocyta, HaCaT keratinocyta) adhézióját, migrációját. Az üveg alapú chipre történő áttérés nagyban segíti munkánkat azért is mivel így a chip mikroszkópos követésére és azonnali kiértékelésére is módunk van (10. ábra)



10. ábra: Migráló sejtek “I-chip” csatornájában. (A kép közepén látható vékony vonal a mérő-elektrod, míg a kép alapján látható vastag fekete csík a referencia elektród.)

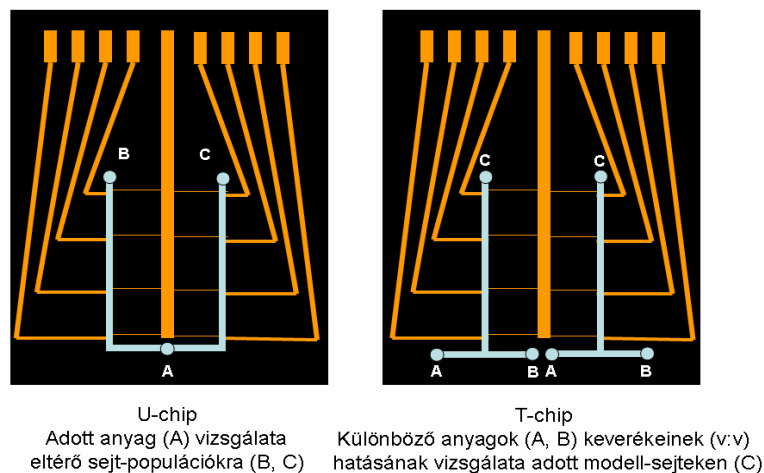
- (ii) A vizsgálatok során észleltük, hogy a kezdetben alkalmazott mérő-elektrod felszín jelentős mértékben csökkenti a chip mérési érzékenységét, ezért bizonyos arányokban történő kitakarását tartjuk célszerűnek – e változtatások és a kapcsolódó bemérések jelenleg is folynak.
- (iii) A fiziológiás állapotok jobb modellezése érdekében összehasonlító vizsgálatokat végeztünk statikus és a rendszerben folyamatos áramlást fenntartó (PicoPlus Syringe Pump – kdScientific) berendezéssel. Eredményeink azt mutatják, hogy az áramlás az elektródot fedő

sejtréteg aktív válaszát – ellapulását - váltja ki, mely a mérhető ellenállás csökkenésében is megnyilvánul. Ez a hatás azonban csak átmenetinek bizonyul, kb. 1-3 óra alatt erős rebound jelentkezik.



11. ábra: Dinamikus áramlási rendszer alkalmazása “U-chip” esetében.

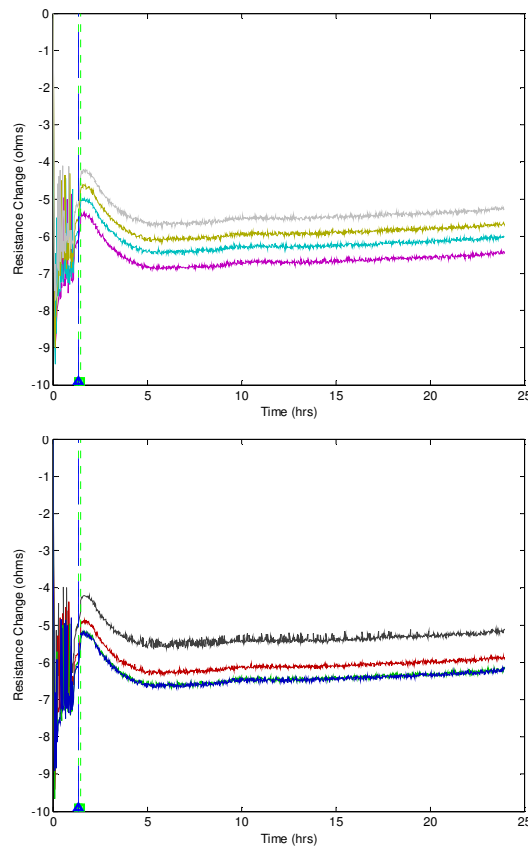
(iv) A korábbiakban kialakított “I-chip” konfiguráció mellett két további forma - “U-chip” és “T-chip” került elkészítésre. Ezek csatorna-rendszere további vizsgálati lehetőségeket nyújtanak, pl. eltérő sejtpopulációk szinkron vizsgálatát ugyanazon anyag esetében (“U-chip”) vagy különböző anyagok keverékeinek chipben történő kialakítását és ennek vizsgálatát egy vagy két sejtpopulációra szintén egyidőben (“T-chip”). (12. ábra)



12. ábra: U- és T-chip sémás rajza, illetve az elektródelsztás csatornákhöz és betöltő nyílásokhoz kapcsolása

(v) Az “I-chip” optimalizálását követően megkezdjük az egyes konjugátumok vizsgálatát is. Oligotuftsin (OT20), valamint annak methotrexattal alkotott konjugátumának (OT20-Mtx)

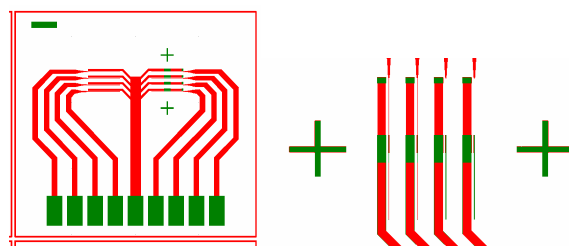
pilot vizsgálati kezdeti eredményei azt mutatják, hogy a hordozó druggal történő konjugálása nem eredményez a sejtek kitapadásában és migrációjában lényeges változást. (13. ábra)



13. ábra: HaCaT keratinocita modell-sejtek kitapadásának és migrációjának (felül - OT20; alul - OT20-Mtx) vizsgálata I-chipben.

(A chipok tervezésében és kivitelezésében Dr. Fűrjes Péter és Fekete Zoltán az MTA MFA KI MEMS Laboratórium kutatói vettek részt.)

A fent ismertetett kísérleti eredmények, melyek szerint az előállított cellákban az élő sejtek csak viszonylag gyenge elektromos jelet generálnak indokolták a pályázati ciklus utolsó évében az elektróda aktív felszínének csökkentésére irányuló törekvéseinket, mely alapján már lényegesen jobb eredmények várhatók (14. ábra).



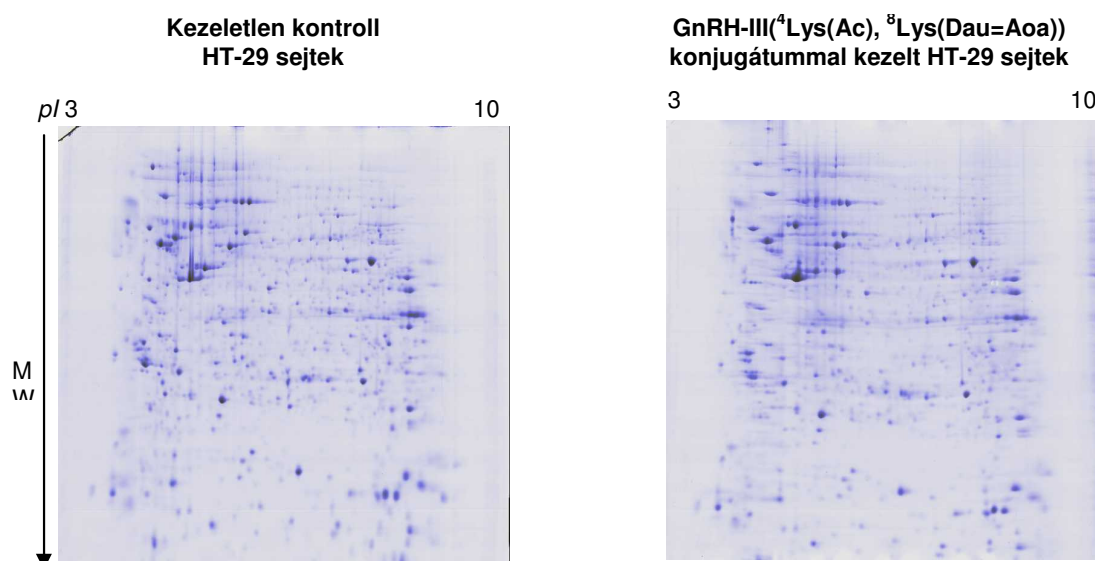
14. ábra: Az elektródok aktív felszínének passziválással történő csökkentése (zöld szín) fotoreziszt vagy oxid (vörös) alkalmazásával.

Az így kialakított szerkezetek pontos, sejtfiziológiai paraméterekhez történő illesztését teszi lehetővé egy nem az OTKA forrásból származó új beruházás (impedancia spektroszkóp) alkalmazása, mely segítségével a jövőben már az alkalmazott sejtdenzitástól, illetve a sejtek eltérő összetételű tápfolyadékainak elektromos jellegéből adódó sajátosságok is lényegesen jobban figyelembe vehetők lesznek, s ezáltal az elektródok kialakítása, optimalizálása is könnyebbé válik.

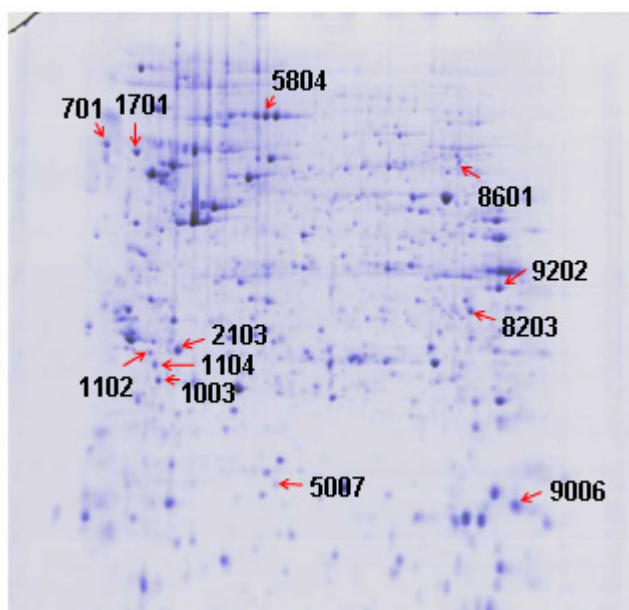
6. Sejszintű változások tanulmányozása proteomikai módszerekkel

Kezeletlen és [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátummal kezelt HT-29 humán vastagbél karcinóma sejteket lizáltunk és a centrifugálás után kapott szupernatáns frakciók fehérje összetételének különbségét vizsgáltuk. A fehérjéket 2D elektroforézissel választottuk el (15. ábra). A fehérje expressziós profilokat PDQuest 8.0 software segítségével analizáltuk, majd a két mintában szignifikáns intenzitás különbséggel rendelkező fehérjék foltjait kivágtuk. Gélben végzett tripszines emésztés után a fragmenseket MALDI-TOF-MS és nano HPLC-MS segítségével analizáltuk. A kapott értékeket Swiss-Prot adatbázis segítségével értékeltük és meghatároztuk a feltételezett fehérjéket, amelyek a kezelés során változást mutattak.

Az adatok azt mutatták, hogy azok a fehérjék, amelyek mennyisége a kezelt és kezeletlen kontroll sejtekben jelentősen eltért és beazonosításuk sikerült, a következő osztályokba sorolhatók: metabolizmusban résztvevő fehérjék, sapon fehérjék, citoskeletális fehérjék, szignál útvonalban szerepet játszó fehérjék, stressz fehérjék, amelyek mind befolyásolhatják a tumornövekedést (8. táblázat).



A foltok intenzitásbeli különbségének jelölése



15. ábra: Kezeletlen és kezelt HT-29 vastagbél tumor sejtek fehérje profiljának 2D elektroforetogramjai. Az intenzitásbeli különbségek kiemelése.

8. táblázat: A különbségeket mutatott fehérjék azonosítása

Identified protein	Spot number	Average level in Bioconjugate -treated	Average level in Control	MW (kDa)	pI	Function
L-lactate dehydrogenase A chain	9202	52.3	143.1	36.7	8.27	(S)-lactate + NAD ⁺ = pyruvate + NADH
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	5804	44.8	200.4	70.0	5.66	Hsp70s stabilize preexistent proteins against aggregation and mediate the folding of newly translated polypeptides
Guanine nucleotide-binding protein sub unit beta-2-like 1	8203	30.4	85.8	35.1	7.69	Involved in the recruitment, assembly and/or regulation of a variety of signaling molecules, involved in translational repression
Nucleoside diphosphate kinase B	9006	87.4	168.4	17.3	8.41	Major role in the synthesis of nucleoside triphosphates
Protein disulfide-isomerase	1701	175.9	115.3	57.1	4.87	Catalyzes the formation, breakage and rearrangement of disulfide bonds
Calpain small subunit 1	1102	-	30.6	28.3	5.20	Subunit of the calcium-regulated non-lysosomal thiol-protease; proteolysis of substrates involved in cytoskeletal remodeling and signal transduction
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	1104	23.5	53.3	23.2	5.11	Regulates the GDP/GTP exchange reaction of the Rho proteins
UDP-glucose 6-dehydrogenase	8601	20.8	5.8	55.0	7.12	Involved in the biosynthesis of glycosaminoglycans; hyaluronan, chondroitin sulfate, and heparan sulfate

7. Gén expressziós vizsgálatok

Négy, eltérő szteroid és HER2 receptor státuszú humán emlőkarcinóma sejtvonalon kvantitatív RT-PCR (Roche, LightCycler, SybrGreen technika) módszerrel a GnRHR-IR, GnRH-IIR, IGF-1R és IGF-2R gének expressziós profilját vizsgáltuk. A vizsgálatokhoz a GnRH és IGF receptorok esetében az alábbi primereket alkalmaztuk:

GnRH-IR

Forward primer: 5'-GATCCGAGTGACGGTTACTTTC-3'

Reverse primer: 5'-AGTCTCCAACAGGTTGGCTAAG-3'

GnRH-IIR

Forward primer: 5'-TAGGTCAGTAGAGGCCTGAAGC-3'

Reverse primer: 5'-CTTTTCAGGATCTGGAGCTGAT-3'

IGF-1R

Forward primer: 5'-CGAGATGACCAATCTCAAGGAT-3'

Reverse primer: 5'-TGTAGTTATTGGACACCGCATC-3'

IGF-2R

Forward primer: 5'-ACGACTTGAAGACACGCACTTA-3'

Reverse primer: 5'-CTGCTCTGGACTCTGTGATTTG-3'

A tumoros sejtvonalak kiválasztása szteroid és HER2 receptor státuszuk alapján történt, melyet az alábbi táblázat foglal össze:

	GnRH-IR	HER2R	ER/PR	EGFR	IGF-1R/2R
T47D	+	-	+/+	+	+/+
MDA MB 231	+	-	-/-	+	+/+
MDA MB 453	+	+	-/-	-	+/+
MCF-7	+	-	+/+	-	+/+

A receptorok mellett a hormonok termelődésének vizsgálatához az alábbi primereket használtuk:

GnRH-I hormon:

Forward primer: 5'-ATGAAGAATCCAAGAGCCAGAA-3'

Reverse primer: 5'-AGGAAACCAGCAGACCTATCAA-3'

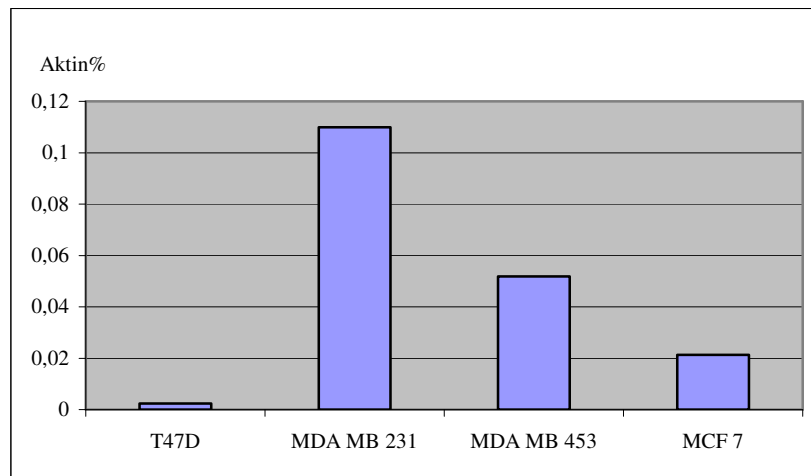
GnRH-II hormon:

Forward primer: 5'- GATCCCCAGAATGCCCTTAG-3'

Reverse primer: 5'- CTCCTGTGAAGGGACCACT -3

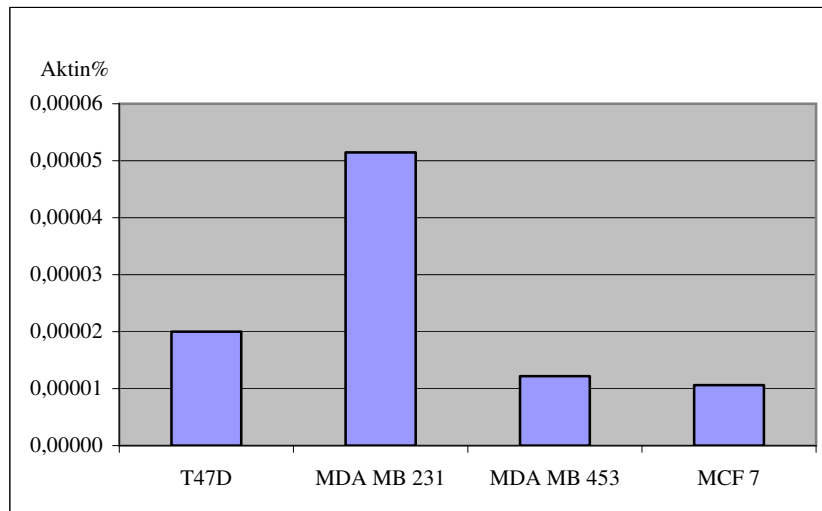
Eredményeink:

A tumoros sejtekben a vizsgált gének alapszintjében eltérő mRNS expressziót tapasztaltuk. A GnRH-IR az MDA MB-231 sejtekben fejeződik ki leginkább, ezt követi csökkenő sorrendben az MDA-MB-453, MCF-7 és T47D sejt vonal. A legmagasabb és legalacsonyabb expressziós szint aránya közel 50-szeres.



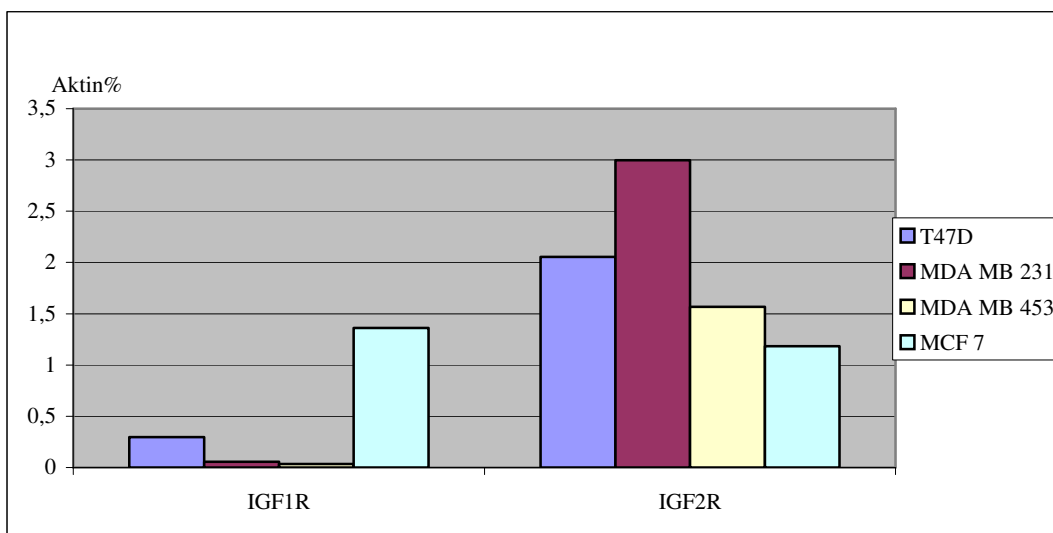
16. ábra: GnRH-I receptor mRNS szintje a belső standard százalékában a négy vizsgált sejt vonal esetében.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy emberben a GnRH-IIR gén átíródása gátolt (stop codont tartalmaz), ezért a GnRH-IIR fehérje nem fejeződik ki. Vizsgálataink során a várakozásokkal ellentétben a GnRH-IIR mRNS szintje kimutatható volt és a GnRH-IR ezred részének bizonyult. A GnRH-IIR a GnRH-IR-hez hasonló tendenciát mutatva, eltérő mértékben fejeződik ki a különböző emlőtumoros sejtekben (MD-MBA-231 > T47D > MD-MBA- 453 > MCF-7).



17. ábra: GnRH-II receptor mRNS szintje a belső standard százalékában a négy vizsgált sejtvonal esetében.

Összehasonlítva az IGF-1R és IGF-2R expresszióját, azt tapasztaltuk, hogy az IGF-2R sokkal nagyobb mértékben fejeződik ki, mint az IGF-1R. A sejtvonalakon belüli eltérő mRNS szintek az IGF-1R gén kifejeződése esetén egy MCF-7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-453 csökkenő sorrend figyelhető meg. Az IGF-2R mRNS szintje követi a GnRH-II-receptor-nél tapasztaltakat, az IGF-2R leginkább az MDA-MB-231 sejtekben expresszálódik, majd a T47D, MDA-MB-453 végül pedig az MCF-7 sejtekben.



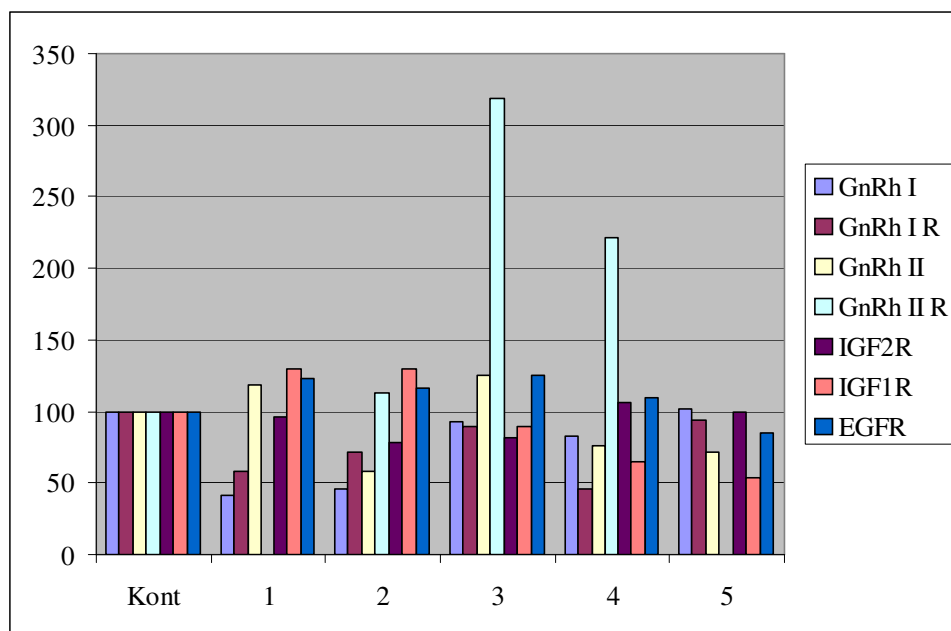
18. ábra: IGF receptorok mRNS szintje a belső standard százalékában a négy vizsgált sejtvonal esetében.

Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a kialakított modellrendszer megfelelő az újonnan szintetizált GnRH analógok mRNS szintű hatásának, továbbá a különböző szignálútvonalakra

gyakorolt hatásuk tanulmányozására, mivel a négy sejtvonal változatos receptor mintázata alkalmas bármely előidézett változás kimutatására.

A modell rendszer optimalizálásának céljából megvizsgáltuk, hogy a tápfolyadék csökkentett szérum tartalma milyen hatást gyakorol a kezetlen sejtekre. 5% és 10% borjú szérum (CFS) tartalom mellett összehasonlítottuk a vizsgálandó gének mRNS expresszióját. A kisebb szérum tartalomnál a sejtek mRNS termelése átlagosan harmadára esett vissza, ezért a kísérleteinket 10% CFS tartalmú tápfolyadékkal végeztük.

A legmagasabb receptor mRNS szintekkel rendelkező MDA-MB-231 sejtvonalat választottuk a vizsgálatokhoz. A sejtvonalban megmértük a hormonok mRNS szintjeit is az aktin belső standardra vonatkoztatva. A GnRH-I hormon mRNS szintje közel 20-szorosa a GnRH-II hormon értékének, míg a receptoroknál ez az arány megközelítőleg 300-szoros. Öt különböző hatóanyaggal történt kezelés során mértük a GnRH-I, -II hormonok és GnRH-I, II receptorok, valamint az IGF-1,2 receptorok és az EGFR gének mRNS mennyiségét.

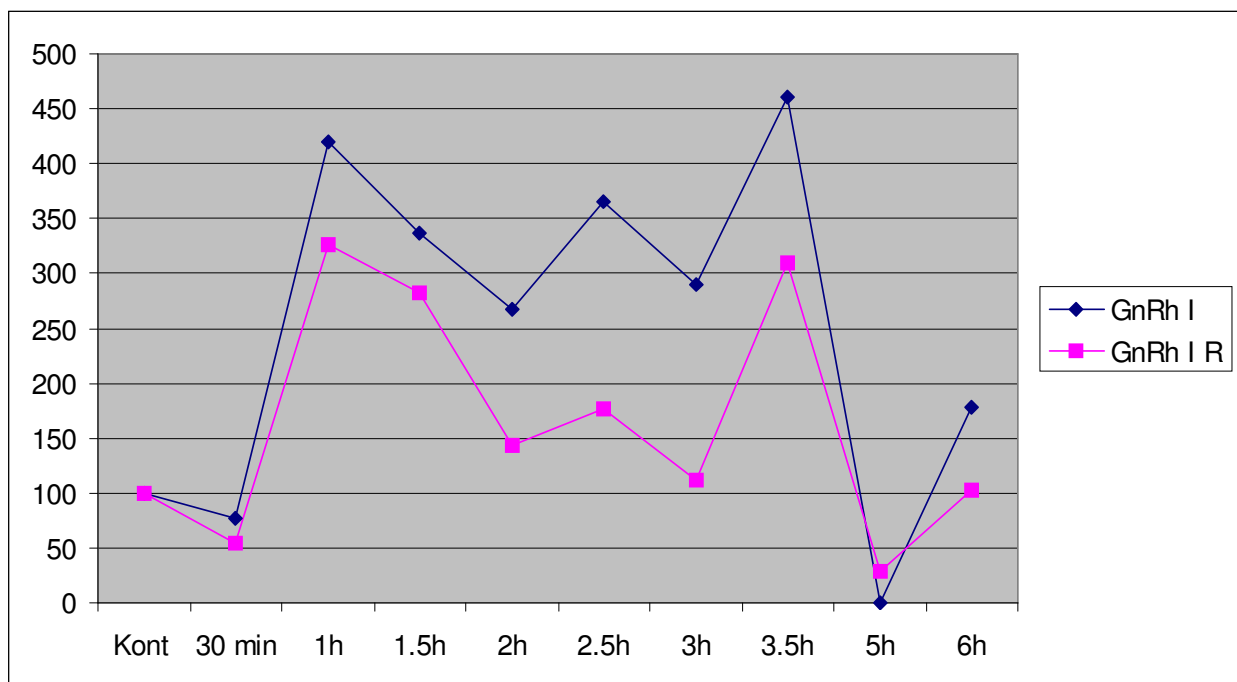


19. ábra: Öt szer hatásának vizsgálata MDA-MB 231 sejtvonalon 100 μ M-os koncentrációval 6 órán keresztül.

A kísérleti anyagok hatását a kontroll százalékában ábrázoltuk.

- Vegyületek:
1. [GnRH-III(Ac-CGFLG)]₂ (dimer)
 2. [GnRH-III(Ac-C)]₂ (dimer)
 3. N-MeSer⁴-GnRH-III monomer frakció: 2.
 4. MG-1013: [N-MeSer⁴-GnRH-III(AcCGFLG)]₂ dimer
 5. GnRH-III

Eredményeink alapján a $[\text{GnRH-III}(\text{Ac-CGFLG})]_2$ és a $[\text{GnRH-III}(\text{Ac-C})]_2$ dimer származékok csökkentették legjobban a GnRH rendszer elemeinek mRNS szintjét (~50%), ezért a további vizsgálatokat a fenti két vegyülettel végeztük. Az MDA-MB-231 sejteket kezeltük a két dimer származék 100 μM -os koncentrációjával, majd ezt követően 30 perc, 1, 2, 4, és 6 óra múlva mértük a minták mRNS szint változását. Tapasztalataink szerint a spacer tartalmú dimer ($[\text{GnRH-III}(\text{Ac-CGFLG})]_2$) vegyülettel történő rövid idejű inkubálás esetében a vizsgált gének expressziója csökkent, míg a spacer nem tartalmazó származék esetén a változás nem volt egyértelmű. Mindkét esetben azt találtunk, hogy a GnRH-I hormon és a GnRH-I receptor mRNS szintjeinek változása szorosan követi egymást.



20. ábra: Kezelési idő vizsgálata MDA-MB 231 sejt vonalon $[\text{GnRH-III}(\text{Ac-CGFLG})]_2$ vegyülettel 100 μM -os koncentrációval.

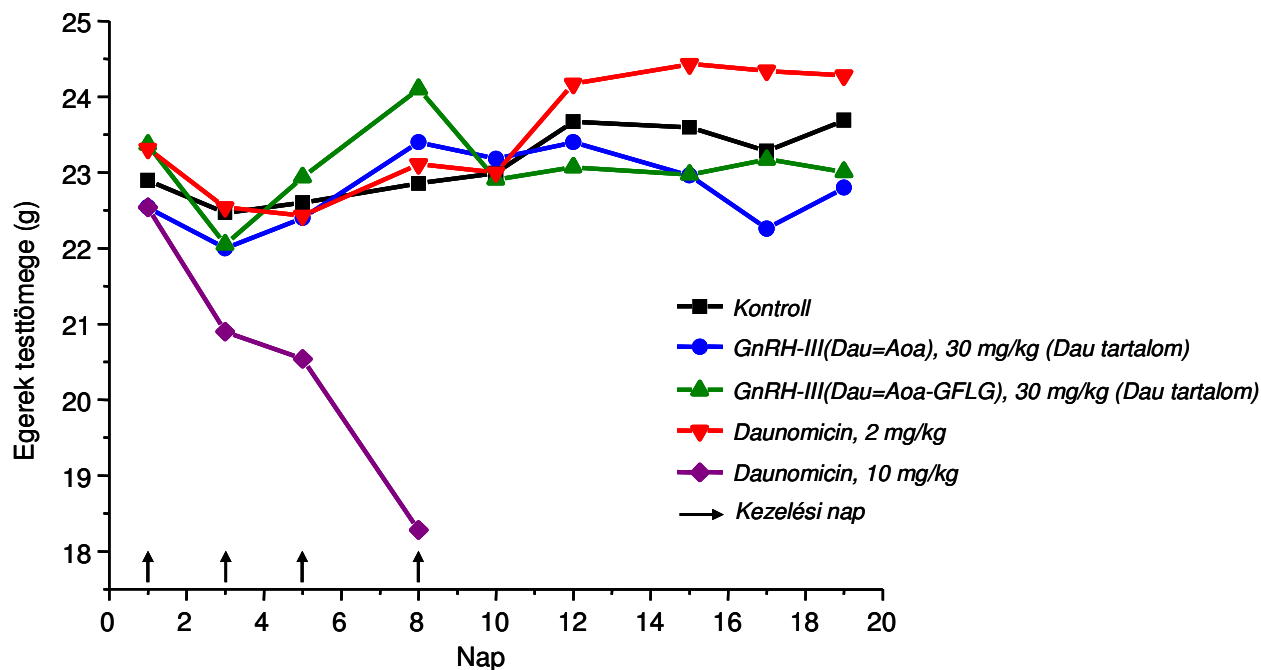
A kísérleti anyagok hatását a kontroll százalékában ábrázoltuk.

A $[\text{GnRH-III}(\text{Ac-CGFLG})]_2$ vegyülettel történt kezelés esetén a GnRH-I hormon és receptor mRNS szintek változása nagyfokú szinkronitást mutatott a 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 5, és 6 óránál végrehajtott mintavételezéskor. Az ismételt vizsgálatok során a GnRH hormon és receptor mRNS mennyisége viszonylag széles tartományban mozgott. A kezelést követő 30. percben és az 5. órában az mRNS szintek csökkenése, míg a 3,5-4 órás tartományban növekedése volt megfigyelhető. Eredményeink alapján tervezzük valamennyi hatóanyag koncentrációfüggésének vizsgálatát, 30 perces és 4, 5 órás kezelést követően mérni kívánjuk a hormonok és receptorok mRNS és fehérje expresszióját.

8. *In vivo* tumorelles hatás vizsgálata

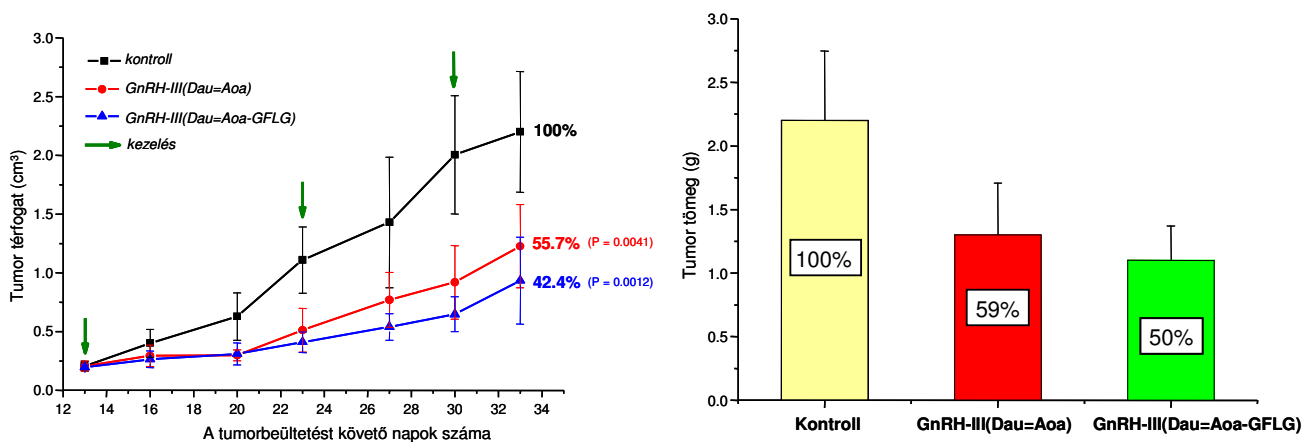
Az előállított GnRH-III – hatóanyag konjugátumok közül többnek megvizsgáltuk az akut toxicitását BDF-1 nőtény egészséges egereken, továbbá *in vivo* antitumor aktivitásukat C26 egér és/vagy HT-29 humán vastagbél tumort hordozó egereken. A tumorokat *sc.* ültettük be az egerekbe, illetve kialakítottunk orthotopikus modelleket, amikor a bélre varrtuk a tumor szövetet. A kezeléseket *ip.* végeztük.

Az első toxicitási kísérletben BDF-1 egereknek 15 mg/kg daunomicint adtunk, illetve ezzel ekvivalens mennyiségű (26,6 μ mol) daunomicint tartalmazó GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátumot. Azok az egerek, akik a szabad hatóanyagot kapták, az egyszeri kezelés után rohamosan vesztek súlyukból, és a kezelést követő 10-12 nap között elpusztultak. A konjugátummal kezelt egerek súlygyarapodása megegyezett a kezeletlen kontroll állatokéval és elhullás nem következett be. (Szabó I. mtsai. *Bioconj. Chem.* 20: 656-665 (2009)). A második kísérletben négyszeri kezelést alkalmaztunk (1., 3., 5., 8. napokon). Azok az egerek, akik daunomicinből 10 mg/kg dózist kaptak, a 8. napra elpusztultak. Ellenben annak a csoportnak tagjai, amelyeket csak 2 mg/kg dózissal kezeltünk, jól tolerálták a kezelést. A két konjugátummal kezelt csoportnál (GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG), GnRH-III(Dau=Aoa) még 30 mg/kg Dau tartalom mellett sem mutatkoztak toxikus mellékhatások (Manea M. és mtsai. *Anticancer Drugs* 23: 90-97 (2012)). Tehát az oxim-kötést tartalmazó GnRH-Dau konjugátumok toxicitása sokszorosán kisebb, mint a szabad hatóanyagé (21. ábra).



21. ábra: A konjugátumok és a szabad daunomicin *in vivo* toxicitása

Az anyagok *in vivo* antitumor aktivitásának gyors teszteléséhez C26 egér vastagbél tumort használtunk, mert ez egy agresszív, gyorsan növekvő tumor típus. Ha 2 mg/kg daunomicinnel kezeltük a tumoros egereket (Balb/c) a tumor beültetést követő 7. napon, 23%-os tumornövekedés gátlást tudtunk detektálni a kísérlet végét jelentő 16. napon. A nagyobb dózis (5 mg/kg) alkalmazása esetén valamennyi állat elpusztult a kezelést követő hét napon belül. A GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátummal kezelt állatok esetén, ha 1x15 mg Dau/kg dózist alkalmaztunk 22%-os gátlást figyeltünk meg, míg 5x5 mg Dau/kg (kétnaponta adás) csak 16%-os volt a gátlás. Ha a 15 mg Dau-nak megfelelő dózist adtuk a konjugátumból akkor, ha a kezeléseket a 4. és 7. napon végeztük a tumor beültetést követően, akkor a gátlás mértéke 46% volt, míg a 7. és 10. napon történt kezelés esetén csak 32%. Hatóanyag nélkül a GnRH-III(GFLG) hordozónak a tumornövekedést gátló hatása 18%-os volt a kezeletlen kontrollhoz képest. A legjobb kezelési kombinációval 11 napos (37%) túlélés hosszabbodást lehetett elérni az egereken (kontroll 30 nap az 50%-os túlélés, míg a konjugátummal kezelt állatoknál 41 nap). A szabad hatóanyaggal kezelt állatok minden esetben a kezeletlen kontrollok előtt elpusztultak (16-22 nap dózistól függően). Később igazoltuk, hogy a GFLG spacer nem tartalmazó GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátum ugyan azt a gátló hatást mutatja C26 tumoros egereken, mint a spacer tartalmazó. Ugyanakkor HT-29 humán vastagbél tumoros egereken (SCID, immunhiányos) 3 kezelés után (13., 21. és 30. nap, a tumor lassabban nő, mint a C26) a tumornövekedés gátlás tumor térfogat ill. tömeg alapján 68 és 50%-os volt a spacer, míg 55 és 41%-os a spacer nem tartalmazó konjugátum esetén (22. ábra). A szabad daunomicinnel kezelt állatok mindegyike elpusztult a még a második kezelés előtt (2 mg/kg dózis esetén a kezelést követő 6 napon belül, míg 5 mg/kg dózissal 2 napon belül).



22.ábra: A kezelt és kezeletlen kontroll állatok tumor térfogata illetve tumor tömege (35. nap)

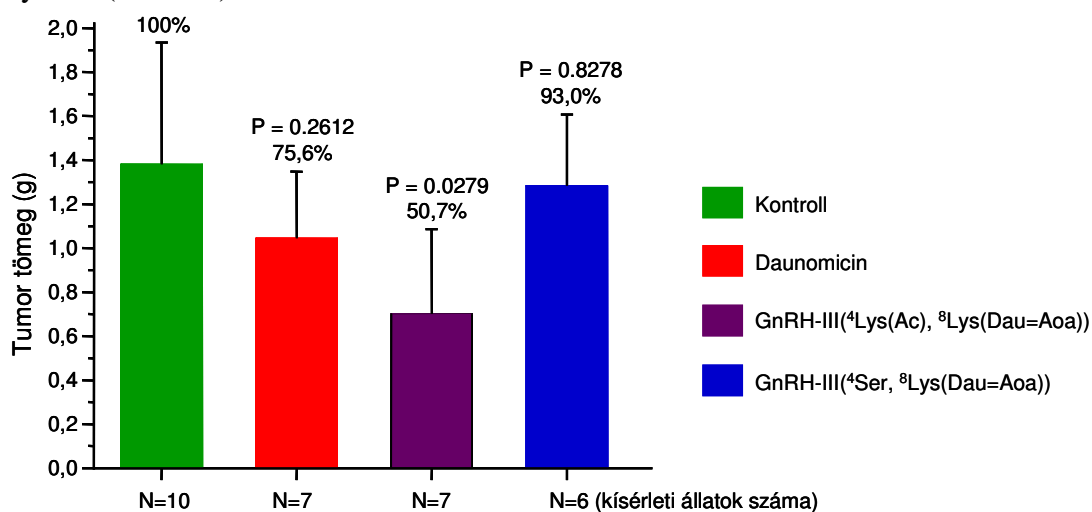
Ebben az esetben a nagyobb hatás azzal magyarázható, hogy a spaceres konjugátummal kezelt állatok esetén a tumorokban sokkal kevesebb új érképződés volt megfigyelhető (9. táblázat). Továbbá nagyobb mennyiségben láttunk limfocita beszűrődéseket a tumorszövetben. A limfocita beszűrődéses területeken nem láttunk élő tumorsejteket. Ez igen érdekes megfigyelés, hisz immunhiányos egereket használtunk a kísérletekhez. Ugyanakkor a még élő tumorsejtek proliferációra való hajlama nem csökkent a kezeletlen kontroll állatok szövetszövetmintáihoz képest (BrdU teszt) (9. táblázat). Ez felveti a konjugátumok fokozott immunstimuláló hatását, amit a továbbiakban vizsgálni kívánunk.

9. táblázat: A tumorok immunhisztokémiai vizsgálatának eredménye

	BrdU index			CD3-pozitív erek száma		
	Kontroll	Konjugátum 1	Konjugátum 2	Kontroll	Konjugátum 1	Konjugátum 2
érték ± SD	34,6 ± 6,7	34,1 ± 7,1	35,6 ± 8,9	26,3 ± 7,9	22,0 ± 8,9	12,3 ± 6,5
P érték		0,879	0,768		0,304	0,001

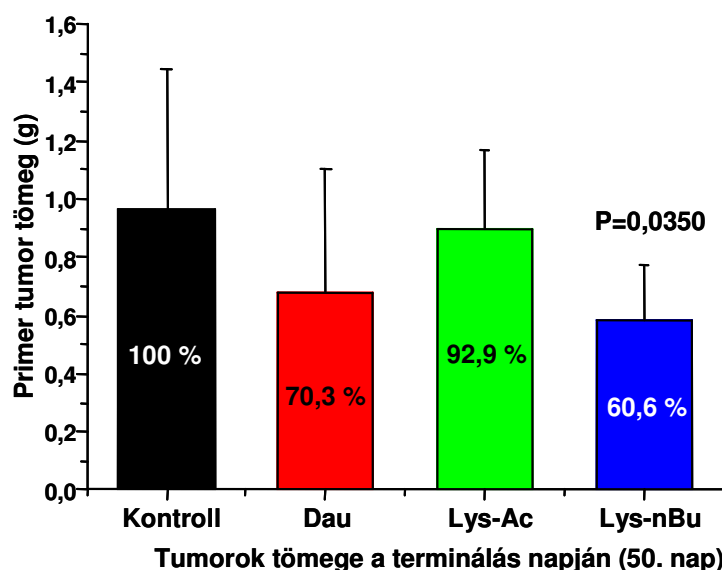
Konjugátum 1: **GnRH-III(Dau=Aoa)**; Konjugátum 2: **GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)**

A következő kísérletek azonban felhívják a figyelmet arra, hogy a kísérleti körülmények jelentősen befolyásolják az eredményeket. Az esetek többségében *sc.* beültetett tumoron nézik az anyagok hatását. Ezen a viszonylag izolált tumor modellen nagyobb hatások mérhetőek, mint az orthotopikus (szervre varrt) tumor modellen, ami jobban megközelíti a természetes tumoros állapotot. A módszer elég időigényes és nagy gyakorlatot igényel. Balb/c egereken orthotopikusan beültetett C26 tumoron vizsgálva a GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátum alig mutatkozott hatékonynak (7%-os gátlás, a tumor beültetést követő 4. és 7. napon végezve a kezeléseket). Ugyanakkor a [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa) 49%-os gátlást eredményezett (2x15 mg Dau/kg). A szabad hatóanyag (2x2 mg/kg) 24%-os tumornövekedés gátlást eredményezett (23. ábra).



23. ábra: A konjugátumok antitumor hatása orthotopikusan beültetett C26 tumorokon

Az orthotopikusan beültetett HT-29 humán vastagbél tumoros egereken nemrég fejeződtek be a kísérletek. Mivel a HT-29 egy lassan növő tumor, hosszabb kezelési protokollt terveztünk. A tumor beültetése után 50 napig végeztük a kezeléseket. A szabad daunomicinből 1mg/kg dózist alkalmaztunk és hetente egyszer végeztük a kezelést. A [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa) és a [⁴Lys(nBu)]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátumokkal hetente kétszer kezeltük az állatokat. Az első 5 kezeléskor 15 mg Dau-tartalom/kg dózist adtunk, majd további 7 alkalommal 7,5 mg/kg dózissal fenntartó kezelést alkalmaztunk. Az eredmények azt mutatják, hogy a [⁴Lys(Ac)]-GnRH-III(Dau=Aoa) konjugátum ebben az esetben kevésbé hatott (7%-os gátlás), de a nBu származék jó hatásúnak bizonyult (40%-os gátlás). A szabad daunomicin 30%-os gátlást eredményezett (24. ábra). Meg kell jegyezni, hogy a szabad daunomicinnel kezelt egerek májának tömege 10%-kal csökkent a terminálás idejére, míg a konjugátumok esetén minimális, de nem szignifikáns tömegnövekedést (2-5%) regisztráltunk.



24. ábra: A konjugátumok antitumor hatása orthotopikusan beültetett HT29 tumorokon

A többi szerv morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálata folyamatban van. Előzetesen azt lehet mondani, hogy se a szabad hatóanyaggal, se a konjugátumokkal kezelt állatokban nem láttunk szignifikáns metasztázis gátlást. Tehát a későbbiekben (ez már az új OTKA pályázat témája) olyan vegyületekkel érdemes a konjugátumainkat kombinálni, amelyeknek metasztázis gátló hatása (is) van.

Mivel a daunomicin autofluoreszcenciája alkalmas a szervekben történő kimutatásukra, ezért a szervek vizsgálata során képet alkothatunk az anyagok biodisztribúciójára is. A

szervekből a metszetek készítése, azok vizsgálata és a következtetések levonása folyamatban van.

Más potenciálisan hatékony konjugátumok esetén jelenleg a szintézis hatékonyságának javításán dolgozunk, hogy az *in vivo* kísérletekhez megfelelő mennyiségű konjugátumot tudjunk előállítani.

9. GnRH antagonistá peptidekonjugátumok szintézise

Ezekben a kísérletekben egy korábban igen aktív tumorelleses hatással rendelkező és immunstimuláló hatású GnRH antagonistá peptidet alkalmaztunk peptide (MI-1892: Ac-D-Trp-D-Cpa-D-Trp-Ser-D-Lys-Asp(Leu-Gln-Pro-D-Ala-NH₂)-DEA (MI-1892), ahol Cpa: p-klórfenilalanin, DEA: dietilamid (az Asp α -karboxilcsoportján), és az LQPa-NH₂ szekvencia az Asp β -karboxilcsoportjához kapcsolódik). A GnRH analógból dimer és hatóanyagtartalmú konjugátumokat készítettünk.

9.1. GnRH antagonistá MI-1892 dimer származékai

A molekula 5-ös pozíciójában lévő D-Lys ϵ -aminocsoportjára ciszteint kapcsoltunk, majd az –SH csoportok oxidációjával diszulfidhidat alakítottunk ki két molekula között.

Az így keresztkötött dimer sajnos a sejtes kísérletek során alkalmazott alacsony koncentráció tartományokban is teljesen oldhatatlan volt. Megpróbáltuk a konjugátumok vízoldékonyságát úgy növelni, hogy 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamint (Ttd) építettünk be a peptide D-Lys oldallánca és a cisztein közé. Az így előállított dimer származéknak némileg javult az oldékonysága, de még így sem felelt meg arra, hogy *in vitro* biológiai vizsgálatokat végezzünk. Nem segített az oldékonyság növelésében a már korábban is említett lizoszómális enzimre érzékeny távtartó szekvencia (YRRL) közbe iktatása sem. Így ezt a kutatási irányt abbahagytuk.

9.2. MI-1892 alapú biokonjugátumok

9.2.1. MI-1892(Dau=Aoa), MI-1892[⁵Lys](Dau=Aoa), MI-1892(Dau=Aoa-YRRL)

MI-1892(Dau=Aoa) szintézise során az MI-1892 molekula 5-ös pozíciójában lévő D-Lys ϵ -aminocsoportjára aminooxiacetsavat kapcsoltunk, majd oxim kötés kialakításával, konjugáltuk a daunomicint. Az MI-1892[⁵Lys](Dau=Aoa) konjugátum esetében az MI-1892 molekula 5-ös pozíciójában lévő D-Lys-t L-Lys-re cseréltük. Az MI-1892(Dau=Aoa-YRRL) konjugátum szintézisének a D-⁵Lys ϵ -aminocsoportja és az aminooxiacetyl-csoport közé a már korábban is említett lizoszómális enzimre érzékeny távtartó YRRL szekvenciát tettük.

A biokonjugátumok *in vitro* tumorelles hatását MTT teszttel vizsgáltuk. Az MI-1892[⁵Lys](Dau=Aoa) és MI-1892(Dau=Aoa) IC₅₀ értékei MCF-7 és HT-29 sejtvonalakon 1,0 ill. 7,4 μM és 3,8 ill. 16,1 μM volt. A távtartóval ellátott MI-1892(Dau=Aoa-YRRL) a D-Lys-t tartalmazó MI-1892(Dau=Aoa)-hoz hasonló értékeket adott (10. táblázat)

A D-lizin L-lizin csere növelte az MI-1892[⁵Lys](Dau=Aoa) készítmény direkt antiproliferációs hatását *in vitro*, mely különböző térszerkezeteikkel hozható összefüggésbe. További NMR vizsgálatok szükségesek.

10. táblázat: MI-1892 alapú konjugátumok citosztatikus hatása

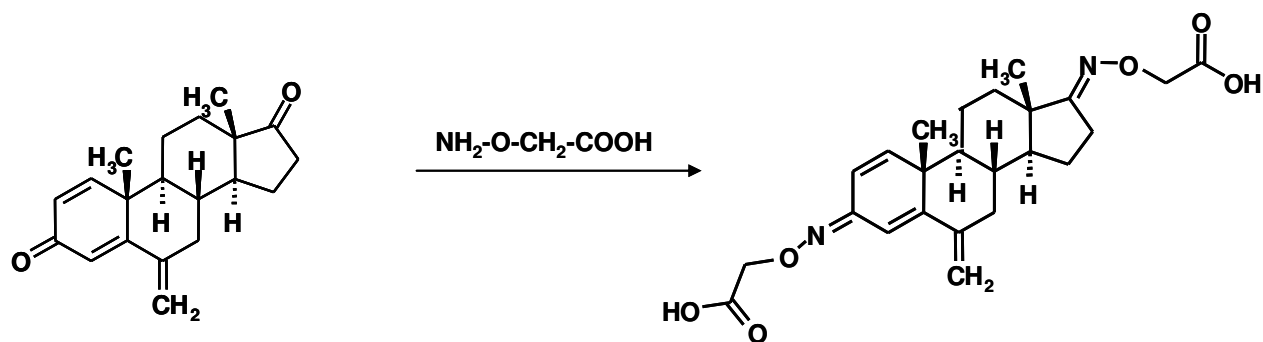
Konjugátumok	Citosztázis (MCF-7) (IC ₅₀ /μM)	Citosztázis (HT-29) (IC ₅₀ /μM)
Daunomicin	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,11
GnRH-III	>100	>100
MI-1892	>100	>100
MI-1892(Dau=Aoa)	7,4 ± 0,5	16,1 ± 1,9
MI-1892[⁵ Lys](Dau=Aoa)	1,0 ± 0,3	3,8 ± 0,1
MI-1892(Dau=Aoa-YRRL)	6,9 ± 1,5	16,2 ± 2,0

Az MI-1892(Dau=Aoa) and MI-1892[⁵Lys](Dau=Aoa) konjugátumok stabilitását vizsgáltuk patkány máj lizoszóma homogenátumban (24 órás inkubálás) és szérummentes médiumban (6 órás inkubálás az MTT teszteknek megfelelően). A konjugátumok nem degradálódtak sem a szérummentes médiumban, sem a patkány máj lizoszóma homogenátumban. Az eredmény némileg meglepő, hisz a viszonylag jó citosztázis adatok a vegyületek hatékonyságát mutatják. Tehát a hatás kifejtéséhez vagy nem szükséges az anyagok degradációja, vagy a sejtekben másféle lebomlási folyamatok is szerepet játszhatnak, amelyek aktív metabolitot eredményeznek. Ennek vizsgálata további kísérleteket igényel.

9.2.2. Exemesztán – GnRH antagonist konjugátum kialakítása

Az Exemesztán (Aromasin) egy aromataz-gátló szer, amely gátolja az ösztadiol szintézist, és így hormonfüggő tumorok növekedésének gátlására alkalmazzák. A szteránvázis vegyület nem tartalmaz konjugálásra alkalmas funkciós csoportot, de két oxocsoportja átalakítható oximvegyületté, így akár konjugálásra alkalmas funkciós csoport is

bevihető a molekulába. Ennek kipróbálására az exemesztánt megfelelő körülmények között reagáltattuk aminosavval, és így kétszeresen oximált anyagot kaptunk (25. ábra). Az NMR vizsgálatok ebben az esetben nem mutatták egyik vagy másik izomer preferenciáját, szemben a daunomicin-oxim vegyületekkel, ahol az E-izomer szelektíven keletkezett.



25. ábra: Az exemesztán átalakítása dioxim-származékká

A vegyület önmagában eléggé rosszul oldódik vizes (neutrális közeg) oldatban. Ezért hordozó peptidhez kívántuk kapcsolni. Ebben a kísérletekben egy GnRH antagonistá peptidet használtunk (Ac-D-Trp-D-Cpa-D-Trp-Ser-D-Lys-Asp(Leu-Gln-Pro-D-Ala-NH₂)-DEA (MI-1892), ahol Cpa: p-klórfenilalanin, DEA: dietilamid (az Asp α-karboxilcsoportján), és az LQPa-NH₂ szekvencia az Asp β-karboxilcsoportjához kapcsolódik). Az exemesztánba oximkötéssel beépített két karboxilcsoport segítségével két MI-1892 molekulát kapcsolunk össze, azok 6-os pozíciójában lévő D-Lys oldalláncain keresztül. Az exemesztánnal keresztkötött dimer konjugátum teljesen oldhatatlan lett. Megpróbáltuk a konjugátumok vízoldékonyságát úgy növelni, hogy 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamint (Ttd) építettünk be a peptid D-Lys oldalláncára. Az így előállított konjugátumnak némileg javult az oldékonysága, de még így sem felelt meg arra, hogy *in vitro* biológiai vizsgálatokat (aromatáz aktivitás, tumorellenes hatás) végezzünk. Így ezt a kutatási irányt abbahagytuk. Ugyanakkor nemrég elkészítettük az exemesztán-dioxim tuftsinnal (TKPR) készült konjugátumát. Ez a származék az oldékonysága miatt alkalmas lehet a biológiai vizsgálatokra, amelyeket a közeljövőben kezdünk el.

10. Tuftsinn konjugátumok

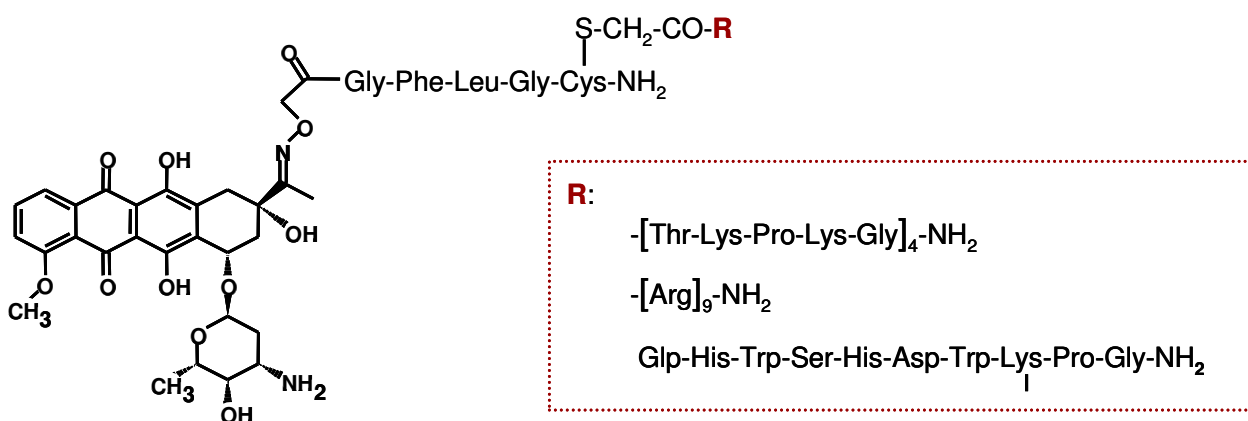
Irányított kemoterápiára alkalmazható tuftsinn-alapú hordozó molekulákat is előállítottunk. Ennek alapja az, hogy monocitákon és makrofágokon jelentős számban fordulnak elő tuftsinn receptorok, amelyek target molekulái lehetnek tuftsinszármazékkal konjugált hatóanyag konjugátumoknak. Továbbá megállapították, hogy a Neuropilin-1

receptor, amely koreceptora a VEGF-receptornak, szintén köti a tuftsint (TKPR természetes tetrapeptid). A Neuropilin-1-hez kötődő tuftsint gátolja a VEGF (vascular endothel growth factor) kötődését, és így a tumornövekedést. Az is ismert, hogy a TKPPR antagonistá tuftsint analóg kb. 5-ször jobban kötődik a tuftsint kötő receptorokhoz. A kutyákban előforduló tuftsint TKPK, csak a C-terminális aminosavban tér el a humán tuftsintól, de mindkettő bázikus aminosavat tartalmaz ebben a pozícióban. Ha a tuftsint a C-terminálisán glicinnel hosszabbítjuk, akkor növekszik az immunstimuláló hatása, ami a tumorterápiában is hasznosítható. Szintén azt tapasztalták, hogy egy kutya és egy humán tuftsint által alkotott dimernek (TKPKTKPR) jelentős tumorelles hatása van. Mindezen tapasztalatok alapján két oligotuftsint származékot terveztünk hatóanyag célbajuttatásra. Az egyik Ac-[TKPKG]₄-NH₂ 20 aminosavból álló tetramer, míg a másik az antagonistá származék tetramerje Ac-[TKPPR]₄-NH₂.

10.1. Hordozó molekula hatása a sejtbe juttatásban

Munkánk során három különböző célbajuttató egység hatását vizsgáltuk a kapcsolt daunomicin tumorelles aktivitására. A három hordozó a GnRH-III, egy tetratuftsint származék és a nonaarginin volt. Ez utóbbi sejtpenetráló tulajdonságú vegyület feltehetőleg mikropinocitózissal jut be a sejtekbe, míg az tetratuftsint származék a tuftsint illetve neuropilin-1 receptorokon keresztül, vagy a sejtek fagocitózisának serkentése által. (A sejtbejutások pontos mechanizmusának vizsgálata folyamatban van). Tehát ezen hordozókat tartalmazó konjugátumok, hasonlóan a GnRH konjugátumok receptor közvetített felvételéhez bekerülhetnek a lizoszómába, ahol lebomlanak és a szabad hatóanyag, vagy egy aktív metabolit szabadulhat fel. Annak érdekében, hogy mindhárom konjugátum esetében ugyanaz a metabolit képződjön, és ezért kiküszöböljük a különböző metabolitok eltérő hatásából eredő különbségeket, minden esetben Dau=Aoa-GFLGC-NH₂ spacerhez kötött hatóanyagot kapcsoltunk a klóracetilezett hordozókhoz tioéterkötéssel (26. ábra). Így valamennyi konjugátumból Dau=Aoa-Gly-OH metabolit keletkezik lizoszómában.

Vizsgáltuk a konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását különböző tumorsejt vonalakon (MCF-7 humán emlő, HT-29 humán vastagbél, HEPG-2 humán hepatoma, HL-60 humán leukemia). A kapott eredményeket a 11. táblázat mutatja.



26. ábra: Különböző hordozót tartalmazó daunomicin konjugátumok szerkezete

11. táblázat: Különböző hordozót tartalmazó daunomicin konjugátumok citosztikus hatása

	MCF-7	HT-29	HEPG-2	HL-60
Dau	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0
Dau-Arg₉	9,6 ± 5,9	15,1 ± 1,9	17,1 ± 1,5	2,1 ± 1,1
GnRH-III(Dau)	14,2 ± 5,2	94,6 ± 2,8	85,1 ± 8,7	14,2 ± 1,4
Dau-OT20	73,4 ± 5,4	>100	94,8 ± 5,2	13,1 ± 2,9

IC₅₀ értékek µM-os koncentrációban megadva

Az eredményekből látszik, hogy a sejtpenetráló hatású oligoarginin hordozót tartalmazó konjugátum volt a leghatásosabb konjugátum minden sejten. Ugyan akkor ez a konjugátum nem mutatott jelentősebb sejtspecifitást. A GnRH-III irányító molekula esetén a legjobb hatást az MCF-7 és HL-60 sejteken figyeltük meg. Ezek a hatások többé-kevésbé összefüggnek a sejteken lévő GnRH-receptorok számával. Az látható, hogy a tioéterkötés kedvezőtlen hatással van a konjugátum citosztikus hatására összehasonlítva az azonos körülmények között mért adatokkal a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) eredményekkel (MCF-7: 3,9 ± 1,2; HT-29: 19,4 ± 3,1). A tetratuftsín-származékot tartalmazó konjugátum esetén egyedül a HL-60 monocita sejten tapasztaltunk jelentősebb aktivitást. Tehát, ahogy várható volt a tuftsín receptorokat tartalmazó monocita típusú sejten hatott a konjugátum. A mért citosztázis értékek korreláltak a sejtfelvételi adatokkal. Az oligoarginint tartalmazó konjugátum minden sejt típusba bejutott már 4 µM-os koncentrációban (HL-60 sejtekbe már 0,8 µM-os koncentrációban is). Ezzel szemben az oligotuftsín hordozót tartalmazó konjugátum csak a HL-60 sejtekbe jutott be 4 µM-os koncentrációnál. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a GnRH- és az oligotuftsín-alapú konjugátumok alkalmasak lehetnek

szelektív hatóanyag célbajuttatásra, míg az oligoarginin egy nem szelektív hordozó. Alkalmazása akkor lehet indokolt, ha olyan intracelluláris target molekulákhoz akarjuk a hatóanyagot irányítani, amely csak a tumorsejtben fordul elő (pl. bizonyos enzim inhibitorok szállítása).

Vizsgáltuk a konjugátumok és a Dau=Aoa-Gly-OH metabolit *in vitro* antitumor aktivitásának időfüggését MonoMac 6 humán leukemiás monocita sejteken impedancia mérés segítségével (XCELLigence készülék, Roche). Az eredmények azt mutatták, hogy a daunomicin mellett egyedül az oligotuftsín-alapú konjugátum mutatott citotoxikus hatást a sejteken 1 μM -os koncentrációban, míg a metabolit csak enyhe citosztatikus hatást mutatott. A másik két konjugátum hatástalan volt ebben a koncentrációban, és csak 10 μM -os koncentrációban hatottak. Hasonló összefüggéseket tapasztaltunk A2058 humán melanóma sejteken is. Itt már 0,1 μM -os koncentrációban is hatásos volt a Dau-OT20 konjugátum.

10.2 Elágazó láncú tuftsín-alapú hordozó molekulához kapcsolt hatóanyag konjugátumok

A továbbiakban olyan konjugátumokat állítottunk elő, amelyek az oligotuftsín láncon elágazásként további tuftsín származékokat tartalmaztak. Az ismétlődő TKPKG szekvencia részletek 4. pozíciójában lévő lizinek oldalláncán építettük ki az elágazásokat. Ezzel gátoltuk a Lys-Gly kötés enzimátikus hasadását, ami a hordozó enzimes lebontással szembeni legérzékenyebb kötése (Manea M és mtsai J Pept Sci. 13: 227-236 (2007)). Oldalláncként négy szekvenciát építettünk ki (TKPKG, Ac-TKPKG, TKPR és For-TKPR). Az oligo tuftsín gerinc N-terminálisára egy további lizint kapcsoltunk, amelynek aminocsoportkait klóracetileztük és ezeken keresztül kapcsoltuk az X-GFLGC-NH₂ hatóanyagot (daunomicin, vagy metotrexát) illetve karboxifluoreszcein jelző anyagot tartalmazó konjugátumot. A GFLG spacer egy lizoszomális enzim a Katepszin B által hasítható spacer, míg a cisztein a tioéter kötés kialakítására szolgál (27. ábra). Mivel az N-terminális lizin mindkét aminocsoportjára kapcsolunk hatóanyagot tartalmazó spacert, így ebben a konstrukcióban két hatóanyagot tartalmazó konjugátumokat állítottunk elő.

A karboxifluoreszceinnel (CF) jelölt konjugátumok segítségével már korábban vizsgáltuk a vegyületek sejtfelvételét MonoMac 6 humán leukémiás monocita sejteken. Megállapítottuk, hogy alacsonyabb koncentrációban ($c = 10^{-7}$ - 10^{-6} M) a konjugátumok sejtbejutása fokozatosan növekszik (feltehetőleg receptor közvetített sejtfelvétel történik), míg nagyobb koncentrációk esetén a sejtekben a fluoreszcencia intenzitás ugrásszerűen megnő,

ami nem magyarázható receptor mediált anyagfelvétellel. Mivel a tuftsin stimulálja a monocita sejtek fagocitózisát, így feltehetőleg a fokozott sejtbejutás a megnövekedett fagocitózissal magyarázható. Ezeknek a sejtfelvételi mechanizmusoknak a további tanulmányozása még szükséges. Az anyagok közül a legjobban a For-TKPR oldalláncot tartalmazó konjugátum jutott be a sejtekbe, majd az Ac-TKPKG oldalláncú variáns. A metotrexátot tartalmazó konjugátumok kemoattraktáns hatása, sejtfelvétele és in vitro tumorelles hatása között nem lehetett egyértelmű összefüggéseket megfigyelni. Katepszin B hatására a legkisebb hatóanyagot tartalmazó metabolitnak a Mtx-Gly-OH egység bizonyult (Bai KB. és mtsai Bioconj. Chem. 19: 2260-2269 (2008)).



27. ábra: Elágazó láncú tuftsin-alapú hordozót tartalmazó konjugátumok szerkezete

A fenti, a pályázatot megelőző eredmények alapján készítettük el a daunomicint tartalmazó variánsokat is. A hordozó peptidben különböző pozíciókban számos lizin egység található. Ezért a szintézis egy elég bonyolult védőcsoport kombinációt igényelt. Három vegyületet sikerült megfelelő hatékonysággal előállítani a biológiai vizsgálatokhoz. Ezek közül a For-TKPR oldalláncokat tartalmazó konjugátum bizonyult a leghatékonyabb tumorelles hatásúnak MonoMac 6 leukemiás monocita sejteken. Hatása megközelítette a

szabad daunomicin hatását ezen a sejtvonalon (12. táblázat). Ez összefügghet a For-TKPR oldalláncokat tartalmazó konjugátumok kiemelkedő sejtbejutási képességével.

12 táblázat: Elágazó láncú tuftsin-alapú hordozót tartalmazó konjugátumok citosztatikus hatása

Anyag	IC ₅₀ (μM)
daunomicin	1,63 ± 0,25
(Dau=Aoa-GFLGC) ₂ -K-[TKPK(For-TKPR)G] ₄ -NH ₂	3,42 ± 0,12
(Dau=Aoa-GFLGC) ₂ -K-[TKPK(H-TKPKG)G] ₄ -NH ₂	18,30 ± 0,14
(Dau=Aoa-GFLGC) ₂ -K-[TKPK(Ac-TKPKG)G] ₄ -NH ₂	17,71 ± 0,20

10.3. Tuftsin antagonisták szekvencián alapuló konjugátumok vizsgálata

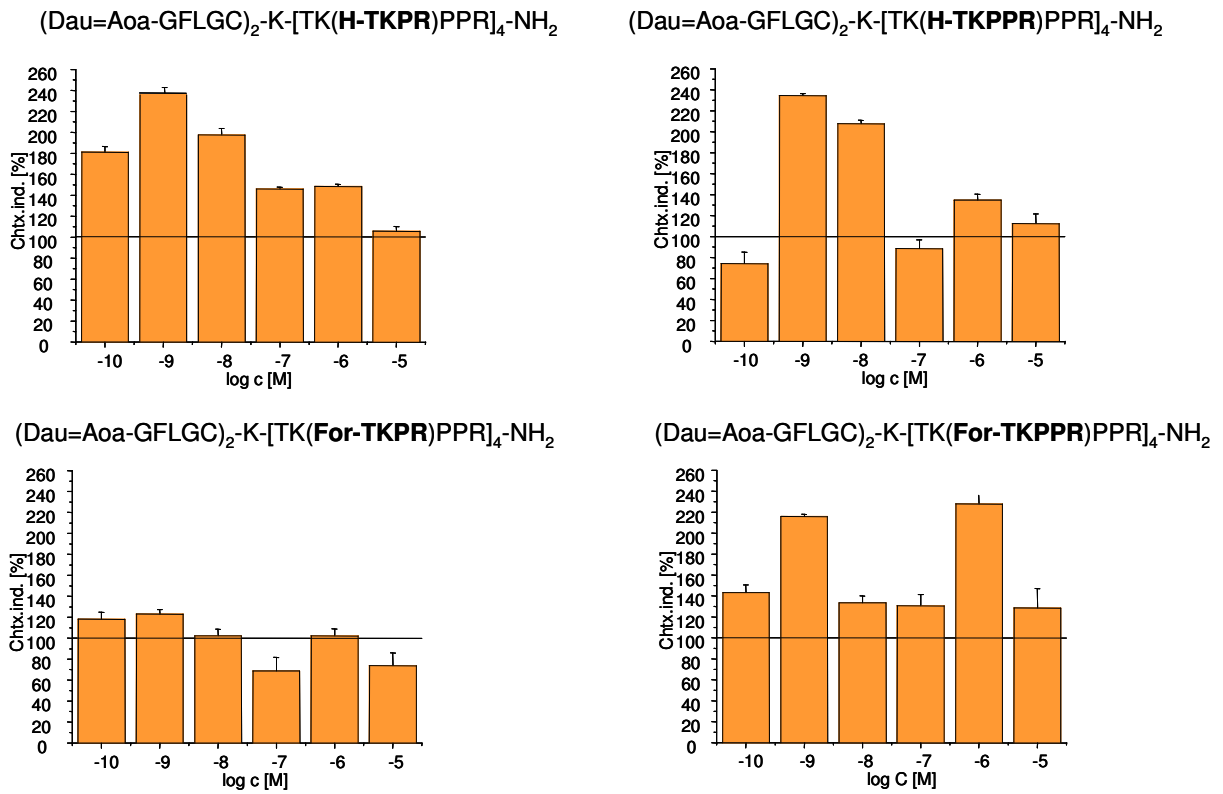
A kísérletek egy további fázisában előállítottunk olyan oligotuftsin származékokat, amelyek a gerincben TKPPR antagonisták szekvenciát tartalmaztak és oldalláncként vagy tuftsin agonista vagy tuftsin antagonisták peptideket. A hatóanyag tartalmú peptideket (28. ábra) azonos módon készítettük el, mint az előző konjugátumok esetében.



28. ábra: Tuftsin antagonisták hordozót tartalmazó konjugátumok szerkezete

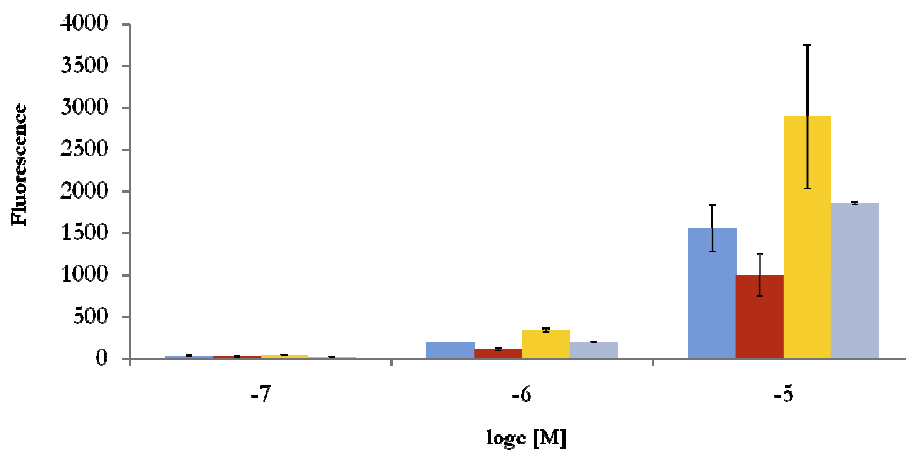
A kemotaxis vizsgálatok során a For-TKPR oldalláncokat tartalmazó konjugátumok neutrális hatást mutatottak illetve nagyobb koncentrációban kemorepellensként viselkedtek, míg a többi konjugátum inkább kemoattraktánsként viselkedett (29. ábra).

Érdeemes megjegyezni, hogy a kemorepellens hatás a metasztatizálás gátlásában lehet fontos, ugyanakkor a kemoattraktáns hatásnak a már vándorló tumorsejtek hatékonyabb célzásában lehet szerepe.



29. ábra: Tuftsin antagonista hordozót tartalmazó konjugátumok kemotaxisa

A sejtfelvételi vizsgálatok itt is azt mutatták, hogy a For-TKPR oldalláncokat tartalmazó konjugátumokat veszik fel leghatékonyabban a MonoMac 6 monocita sejtek (30. ábra).



30. ábra: Tuftsin antagonista hordozót tartalmazó konjugátumok sejtfelvétele MM6 sejteken

A konjugátumok citosztatikus hatását is vizsgáltuk MonoMac 6 sejteken. Az eredmények azt mutatták, hogy a legerősebb tumorellenes hatással a For-TKPR oldalláncokat tartalmazó konjugátum volt, és aktivitása felülmúlta a szabad hatóanyag aktivitását. A többi konjugátum esetében nem tapasztaltunk összefüggést a sejtfelvétel és a citosztatikus hatás között (13. táblázat).

13. táblázat: Tuftsin antagonistá hordozót tartalmazó konjugátumok citosztatikus hatása

Anyag	IC50 (µM)
daunomicin	2,50 ± 0,33
(Dau=Aoa-GFLGC) ₂ -K-[TK(For-TKPR)PPR] ₄ -NH ₂	1,05 ± 0,25
(Dau=Aoa-GFLGC) ₂ -K-[TK (H-TKPR)PPR] ₄ -NH ₂	2,83 ± 0,48
(Dau=Aoa-GFLGC) ₂ -K-[TK(For-TKPPR)PPR] ₄ -NH ₂	8,55 ± 0,89
(Dau=Aoa-GFLGC) ₂ -K-[TK(H-TKPPR)PPR] ₄ -NH ₂	1,92 ± 0,34

Összefoglalva megállapítható, hogy a tuftsin-alapú hatóanyag – peptid konjugátumok hatásosságát alapvetően a peptidgerincen elágazásként található peptidek szekvenciája határozza meg. A leghatékonyabb variánsnak a For-TKPR szekvencia bizonyult. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy az oligo-TKPPR peptidgerincet tartalmazó konjugátum némileg hatékonyabb volt, mint az azonos oldalláncot tartalmazó oligo-TKPKG peptidgerincet tartalmazó konjugátumok. További összehasonlító vizsgálatok folyamatban vannak és igyekszünk kiválasztani egy megfelelő *in vivo* modellt állatkísérletekhez.

10.4. Az oligo-TKPPR peptidek további előnyös tulajdonságai

A pályázathoz közvetlenül nem tartozó területen is kipróbáltuk az oligo-TKPPR (tuftsin antagonistá peptid lineáris oligomerje) különböző lánchosszúságú származékait. A különböző hosszúságú oligo-TKPPR szekvenciákat az aminosav számmal jelölve következőképpen rövidítjük: Tp10, Tp15, Tp20, stb. Amiért itt érdemes megemlíteni az az, kutatásainkat nem izoláltan végezzük, és igyekszünk az általunk előállított vegyületeket széleskörben vizsgálni. Mivel az itt bemutatásra kerülő eredmények nagy érdeklődésre tartanak számot a fogászati gyógyítások területén, így azt mondhatjuk, hogy OTKA pályázatunk új projektek indulásában is szerepet játszott.

Munkánk során gingivitisben, illetve parodontitisben termelt kóros/gyulladásos crevicularis folyadék (CF) sejtjeinek adhézióját, illetve az adhézióra esetlegesen ható, mesterségesen előállított, peptid típusú anyagok hatását vizsgáltuk. Ebben a kísérletsorozatban a különböző eredetű gingivitisekben szenvedő betegeket egy csoportba soroltuk, hasonlóképpen a különböző háttérű parodontitises betegekhez. Vizsgálatainkban az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A Tp20 oligotuftsín típusú kemotaktikus drug targeting ligand rendelkezik-e a CF-sejtek adhézióját befolyásoló hatással?
2. Hatás esetén, tapasztalható-e különbség a betegcsoportok mintáira jellemző adhéziós válaszok között?
3. Található-e összefüggés a mért adhézió és a betegcsoportokra jellemző CD-markerekkel jelölt sejtcsoport megoszlások között?

Vizsgálataink során a crevicularis folyadék (CF) sejtek sejtadhéziós képességeinek impedimetriai alapú, real-time vizsgálatát (xCELLigence SP) végeztük el. Ehhez kapcsolódott a sejtes minta válaszkésztségének sejttípus függéséről információt nyújtó, az egyes betegcsoportokból származó minták CD-markereinek alapján történő immuncitokémiai karakterizálása, flow citometriai kiértékeléssel.

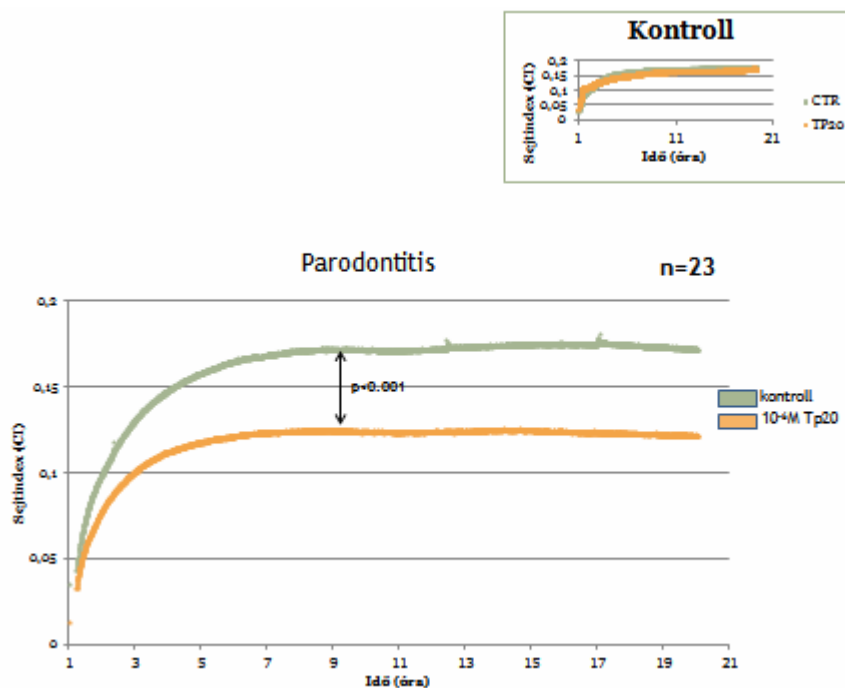
Az első előkísérlet során MonoMac 6 monocita sejtvonalat vizsgáltunk. Ebben az esetben azt tapasztaltuk, hogy a Tp20 ligand hatására nem mutatható ki jelentős különbség a kontroll csoport, valamint 10^{-6} M, illetve 10^{-9} M koncentrációjú liganddal kezelt sejtek adhéziója között. Evvel ellentétben, THP-1 humán leukémiás monocita sejtvonalon a peptid 10^{-11} M-os koncentrációban jelentős adhéziónövelő hatást fejtett ki, 10^{-6} M-os koncentrációban való alkalmazása során kifejtett hatása nem tért el a kontroll sejtek adhéziós választól. Fentiek alapján, arra a megállapításra jutottunk, hogy a ligand hatása a sejtek adhéziójára nem ad egyértelmű választ, ugyanazon sejttípus eltérő formái más-más érzékenységet mutathatnak a Tp20 ligand esetében.

10.4.1. Crevicularis folyadék (CF) sejtek adhéziója

Sejtadhéziós méréseinket elsőként a kontroll csoport CF-sejtmintáin végeztük el. E sejtek esetében nem volt szignifikáns eltérés tapasztalható a kontroll és a Tp20 kezelt sejtek

adhéziójában. A mért adhéziós válasz viszonyítási alapként szolgált a későbbi mérésekhez, ezért a betegcsoportonkénti értékelések mellett, minden esetben feltüntettük a kontrollcsoport eredményeit is.

Az egyik legnagyobb mintaszámú kísérleti csoportunk volt a parodontitises betegekből származó CF mintacsoport volt. Mérési eredményeink azt mutatják, hogy a Tp20-ligand hatására, rögtön a ligand hozzáadásakor jelentős adhézió csökkenés következik be, mely a mérés 7. órája körül éri el maximumát. A kontroll sejtek és a ligand által gátolt sejtek adhéziós válasza közötti különbség az idő múlásával sem változik. (31. ábra)



31. ábra: Tp20 hatása parodontitises mintából származó sejtek adhéziójára

Gingivitis CF-sejteken végzett méréseink eredményeképpen szintén adhéziócsökkenésről számolhatunk be. A hatás ebben az esetben időben eltolva jelentkezik, kb. 3 óra elteltével, majd egyre kifejezettebbé válik, jóllehet nem olyan szignifikáns mértékben, mint azt a parodontitis CF-minták esetében tapasztaltuk. Fogkő jelenlétében gyűjtött CF-sejtminták esetében is nagybiztonsággal megállapítható a Tp20 ligand hatására bekövetkező letapadás csökkenés. A carieses fogak mellől származó CF-sejtminták adhéziós képességének alakulásának mérése azért lényeges mivel az azt okozó mikroorganizmusok biofilmet képeznek a fog felszínén, mely caries esetén a sulcusban lévő CF-kal egybefüggő

rendszeret alkothat. A korábbi kórállapotokhoz hasonlóan a Tp20 ligand itt is adhéziócsökkentő hatást vált ki, mely időben előrehaladva egyre kifejezettebb.

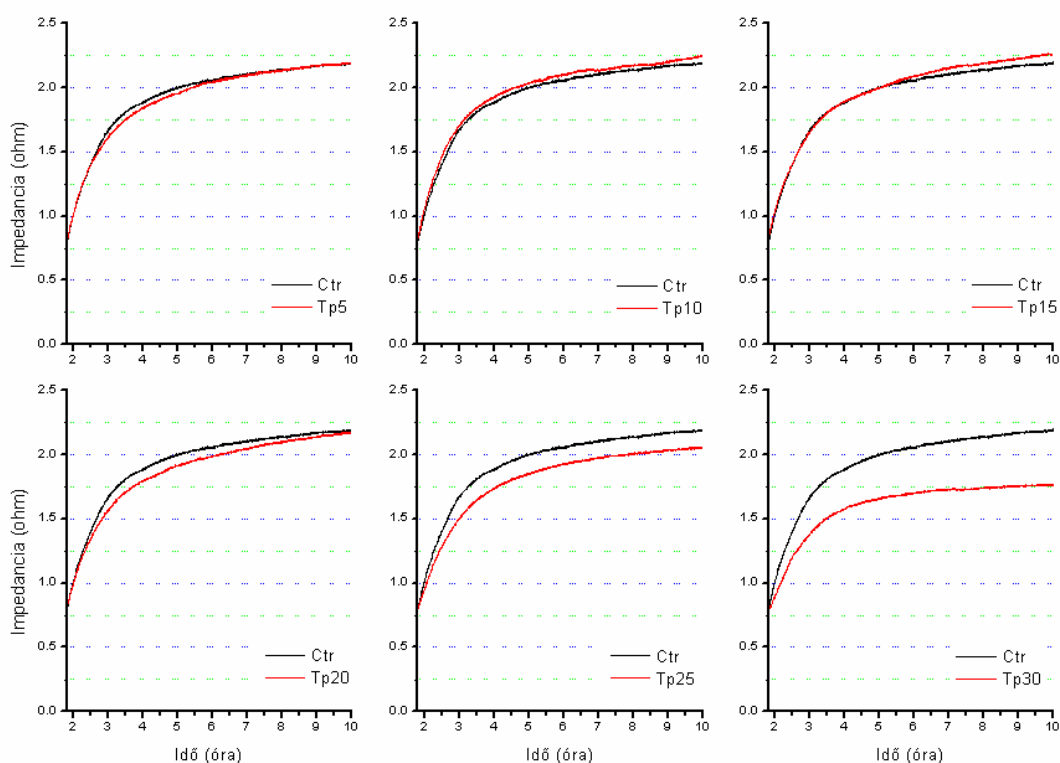
A dohányzás, mint életviteli tényező, játszik jelentős szerepet a parodontális megbetegedések gyors progressziójában és igen rossz gyógyulási hajlamában, ezért szükségesnek tartottuk külön csoportban való kiértékelésüket. Ennek fényében dohányzók csoportját vizsgálva megállapítottuk, hogy a Tp20 ligand ebben – a korábbiaktól patomechanizmusában alapjaiban eltérő mechanizmusú -, esetben is időben előrehaladva egyre kifejezettebb adhéziócsökkentő hatást képes kifejteni. Meg kell említenünk, hogy ez a hatás talán az összes vizsgált minta közül a legkésőbb, az inkubációt követően mintegy 5 óra múlva kezd csak kialakulni, bár ezt követően szignifikáns eredményt mutat.

Végül, fontosnak tartottuk daganatos betegekből vett CF-sejtminták vizsgálatát is. Jóllehet egyelőre a vizsgálat kis betegszámmal (n=5) történt, azonban több szájüregi daganatos beteg is volt a vizsgált csoportban, ezért elvégeztük a méréseket kiértékelését külön e betegcsoportban is. Daganatos betegek CF-sejtjeit vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a ligand hatására ebben az esetben is csökken az adhézió. Kiemelendő, hogy itt tapasztaltuk a legrapidabb hatást, a betegek sejtjei igen érzékenyen – szinte azonnal - reagáltak az alkalmazott Tp20 derivátumra, mely a betegség számos sejtpopulációt és fluid fázisokat is érintő generalizált hatásaira enged következtetni

10.4.2. Creviculáris folyadék (CF) sejtek adhéziója - Tp5-Tp30 peptidcsalád tagjainak hatása

Sejtadhéziós méréseinket kiegészítettük a tuftsin molekula különböző derivátumainak sejtadhézióra való hatását vizsgáló kísérletsorozattal.

A mérések kiértékelése során megállapítottuk, hogy a Tp peptidek méretének növelésével egyre fokozódik a korábban Tp20-ra leírt, adhéziót gátló hatás. A hatás azonban csak a nagyobb méretű peptidek (Tp20, Tp25, Tp30) esetében mérhető, az ennél kisebb peptidek nem bizonyulnak hatásosnak. A legerősebb hatást Tp30 alkalmazása esetén figyelhetjük meg (32. ábra).



32. ábra A sejtadhéziós válasz a különböző használt konjugátumok hatására

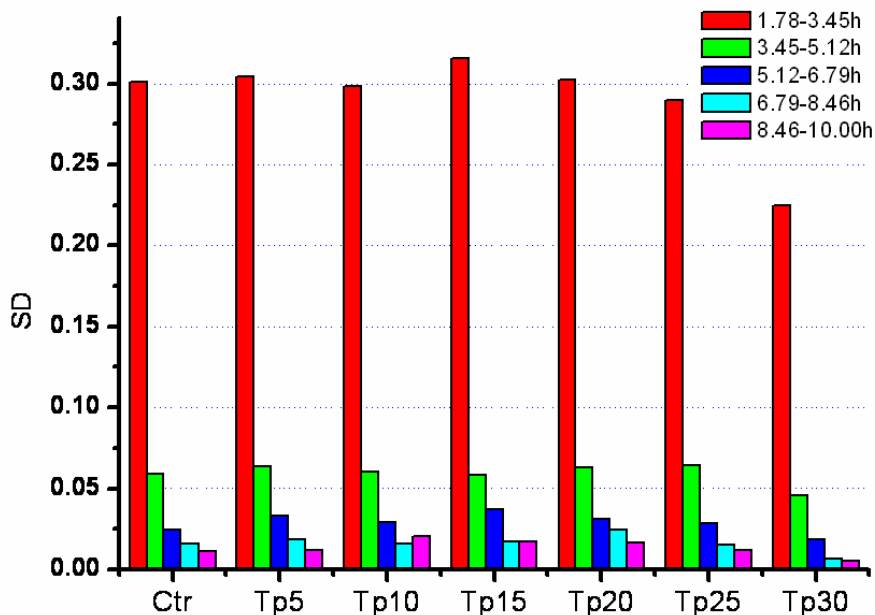
10.4.3. CF-minták sejtpopulációi - CD-markeranalízis

A minták sejtprofiljának feltérképezését célzó vizsgálatainkat csoportonként értékeltük, különvéve a kontroll csoportot, a gingivitiszes, parodontitiszes betegek csoportját, a fogkő jelenlétében vett CF-sejtminákat, valamint a carieses betegcsoportot (3. táblázat). A kontroll csoport esetében vegyes sejtpopulációt találtunk neutrophil granulocytákkal, lymphocytákkal. Caries esetében a CD11c, CD14, CD16, valamint a CD62L markerek jelenléte szintén vegyes sejtpopulációt mutat. Gingivitiszes mintáinkat elemezve azt találtuk, hogy a kontroll csoporthoz képest kissé emelkedett a lymphocyták száma. Parodontitiszes mintából származó sejteknél kifejezett volt a CD62L és CD11b markerek expressziója, melyből jelentős lymphocyta túlsúlyra következtettünk. Fogkő esetében a vizsgált markerek közül szinte mindegyik expresszálódott, így a CD11b, CD11c, CD16, CD18, CD49d, valamint a CD62L jelenléte egy vegyes sejtpopuláció jelenlétére utal.

10.4.4. Creviculáris folyadék (CF) sejtek migrációja

Eredményeink kiértékelése során megvizsgáltuk az alkalmazott konjugátumok sejtmozgásra kifejtett hatását az idő függvényében. Mivel a vizsgálati rendszerben koncentráció gradiens nem alakulhat ki, csupán nem vektoriális kemokinetikus hatások, illetve a sejtek pozicionáló, „micromotion”-nak nevezett mozgásjelenségei mérhetők. Ezekre a mért impedancia értékek rövid időn belüli változásait, statisztikusan a vizsgált görbeszakaszok értékeinek SD-jét szokták megadni, mi is ezt a jellemzőt számítottuk ki.

A Tp peptidek egyértelműen az inkubáció első 1-3 órájában hatnak a sejtmozgásra/micromotion-ra serkentően. Ebben a hatásban egyedül a Tp30 képez kivételt, a konjugátum már ekkor is gátlóan hat mind a mozgásra, mind a sejtadhézióra. A 3. órát követően erősen csökken a micromotion, ettől kezdve nincs a peptidek hatása között szignifikáns különbség, mint ahogyan az egész 10 órás időtartamra számított érték sem mutat különbséget, csupán a kb. 1.7 órás idősávokra bontott feldolgozás. (33. ábra)



33. ábra: A sejtmozgás alakulása a különböző peptidek hatására, az idő függvényében

A creviculáris folyadék (CF) sejt mintáinak impedimetriai úton történő műszeres vizsgálata, valamint a sejtek immuncitotékiai CD-marker-analízise alapján megállapítottuk, hogy

- a vezető fogászati betegségekben szenvedő betegek mintái esetében generalizáltan kimutatható az egyes sejtpopulációk Tp20 oligotuftsin iránti fokozott érzékenysége, mely a sejtadhézió csökkenésében nyilvánult meg
- az egyes betegcsoportok összehasonlítása azt mutatja, hogy a fenti adhézió-csökkenés legerősebben a paodontitisben és tumoros kórképekben valamint fogkő betegségekben szenvedőknél volt kimutatható, melyek mintáiban a lymphocytá túlsúly volt domináló
- a kísérleti eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy oligotuftsin és további derivátumai – a sejtadhézió gátlása révén - hatásos prevenációs vagy terápiás anyagok legyenek fogászati kórképek esetében
- felvetődik annak lehetősége, hogy az impedimetriai alapú műszeres adhézió mérését a CF mintáiból javasoljuk a fogorvosi műszeres diagnosztika új, non-invazív elemeként.

Mivel látszik, hogy az oligomer lánc hosszának növelésével nő a biológiai aktivitás, elkészítettünk hosszabb láncokat is, egészen 65 aminosavat tartalmazó lánchozzig. Ezen peptidláncokat lépésenkénti szilárdfázisú peptidszintézissel, Fmoc/tBu technikát alkalmazva építettük fel. A sikeres szintézishez ChemMatrix gyantát kellett alkalmaznunk. Az új, hosszabb peptidláncot tartalmazó analógokkal jelenleg folynak a kísérletek. Sikeres kísérletek esetén a vegyületcsalád a hasznosítását tervezzük.

10.5. Az oldalláncban nem tuftsin szekvenciát tartalmazó oligotuftsin-gerincű konjugátumok

A primer tumorok áttétképzése soklépcsős folyamat, amelynek legfontosabb lépései a tumor sejtek leszakadása, bekerülése az érpályába, megtapadása majd kilépése a környező szövetekbe és kolonizációja. A daganatos sejtek primer tumorról való leszakadása bekövetkezhet a sebészeti úton történő tumor eltávolítás során is. Az áttétképzés megakadályozására klinikai szempontból a folyamat első lépésének, a tumorsejtek leszakadásának gátlása a legelőnyösebb, amely a sejtek adhéziójának fokozásával és migrációs képességük csökkentésével valósítható meg.

A jelen munka célja a citokin receptorok extracelluláris doménjében megtalálható W-S-EWS peptidek, valamint ezek oligotuftsinhoz (OT20) konjugált formáinak, mint a potenciális tumorsejtszóródást csökkentő molekuláknak vizsgálata volt.

Kísérleteink során a vizsgált molekulák i) sejt migrációra és ii) adhézióra kifejtett hatását vizsgáltuk 10^{-12} M – 10^{-6} M koncentrációtartományban egy egér (J774.2) és két humán (MonoMac6 és THP-1) monocitás leukémia sejtvonalon. A sejt migrációt kétkamrás rendszerben (NeuroProbe[®]), az adhéziót impedimetriás módszerrel (xCELLigence, Roche) mértük. Az OT20-szal konjugált formák 1, 5, 10, 15, 30, ill. 60 perces inkubációt követő internalizációját karboxifluoreszceines jelölés segítségével, áramlási citometriával vizsgáltuk.

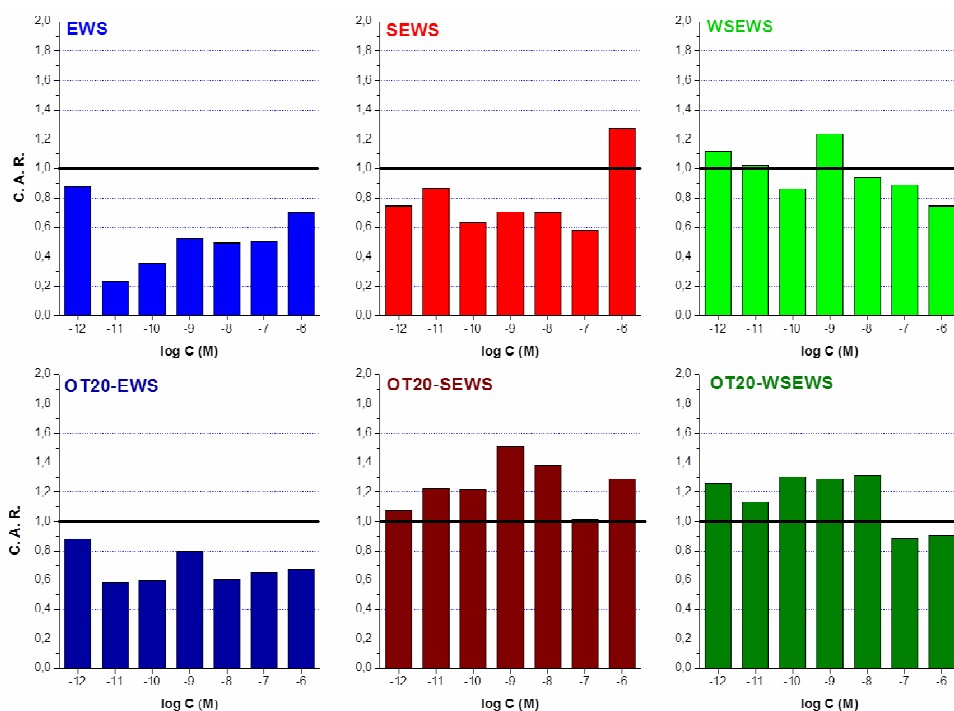
Mind a peptidek, mind a konjugátumok szignifikánsan befolyásolták valamennyi sejtvonal migrációját, míg az adhéziót csak az SEWS tetrapeptid befolyásolta jelentősen: MonoMac6 sejteken 10^{-12} - 10^{-6} M csökkentette, 10^{-7} M növelte. Szignifikánsan csökkent migrációs választ indukáltak J774.2 sejteken az EWS, OT20-EWS és az SEWS; illetve a THP-1 sejtek esetében a WSEWS és az OT20-WSEWS.

A migrációs képességet a J774.2 sejteknél az OT20-SEWS, míg a THP-1 sejteknél az SEWS és az OT20-SEWS fokozta jelentősen. A MonoMac6 sejtek migrációját mind a 6 vizsgált molekula fokozta.

A konjugátumok internalizációja 10^{-6} M-os koncentráció és 60 perces inkubáció mellett volt megfigyelhető (kontrollhoz viszonyított átlagos fluoreszcencia: 125-160%).

A korábban bemutatott adhézió és kemotaxis eredményes sejt fiziológiai értékelése szempontjából értékes információt nyújt az ún. CAR (Chemotaxis-Adhesion-Ratio), mely a sejtek adhéziója és szilárd felszínen történő elmozdulása közti dinamikus ellentmondás (az adhézió fokozott volta a sejtek elmozdulását gátolja; annak bizonyos fokú megléte szükséges az eredményes migrációhoz) feloldását és egyben a komplex folyamat értékelését teszi lehetővé. Mivel a metasztatizáló sejtek esetében az adhézió átmeneti csökkenésére majd újbóli fokozódására van szükség a CAR érték számításával a sejtek és egyes sejt adhézióját és migrációját indukáló/gátló ligandumok hatásának kiértékelése válik lehetővé.

Esetünkben a CAR érték J774.2 sejteknél, OT-EWS esetében jelzi e peptidek potenciális áttétgátló hatását (34. ábra).



34. ábra: J774.2 monocita sejtek W-S-EWS és OT-W-S-EWS peptidek vizsgálata során nyert CAR értékei

Összegezve elmondhatjuk, hogy a három leukémia modell-sejt közül csupán a J774.2 sejteken volt tapasztalható olyan jelentős migrációscsökkentő és enyhe adhéziófokozó hatás, melynek révén a konjugátum (OT20-EWS) potenciálisan optimális tumorszóródást csökkentő molekula lehet. Ennek egérben történő *in vivo* vizsgálatát munkánk következő fázisában kívánjuk megvalósítani.

Elkészítettük az oligotufzsin oldalláncaiban ciklikus RGD peptidet tartalmazó variánst is ($\text{Ac}-(\text{TKPK}[\text{c}(\text{RGDfC}(\text{CH}_2\text{CO}))\text{G}]_4-\text{NH}_2)$). A vegyületben az oligotufzsin minden második lizinjének e-aminocsoportját klóracetileztük és tioéter kötés kialakításával konjugáltuk a cisztein tartalmu RGD ciklopeptidet. Ezek sejtadhézióra gyakorolt hatásának vizsgálata folyamatban van.

11. Metabolizmus vizsgálatra alkalmas FRET rendszerek kialakítása

A Förster-féle rezonáns energiaátadás (rövidítve: FRET, az angol Förster resonance energy transfer után; szó szerint 'Förster-típusú rezonancia-energiatranszfer') olyan mechanizmus, amely leírja a kromoforok közötti energiaátvitelt. Egy donor kromofor, a kezdeti gerjesztett elektronikus állapotában, energiát adhat át a fogadó/vevő (akceptor)

kromofornak a nem sugárzó dipól-dipól-csatoláson keresztül (a két kromofor tipikusan 10 nm távolságra van egymástól). Ebből adódik, hogy a FRET rendszerek nagyon alkalmasak vegyületek enzimátikus lebomlásának (molekularészek elválásának) tanulmányozásában. Korábban kidolgoztunk egy olyan FRET rendszert, amely alkalmas spacer szakaszok enzimek hatására történő hasadásának/lebomlásának tanulmányozására. A módszer külön érdekessége a két, egymás mellett szelektíven végrehajtható "click"-kapcsolás megvalósítása (Kele P., és mtsai *Angewandte Chemie Int. Ed.* 48: 344-347 (2009)).

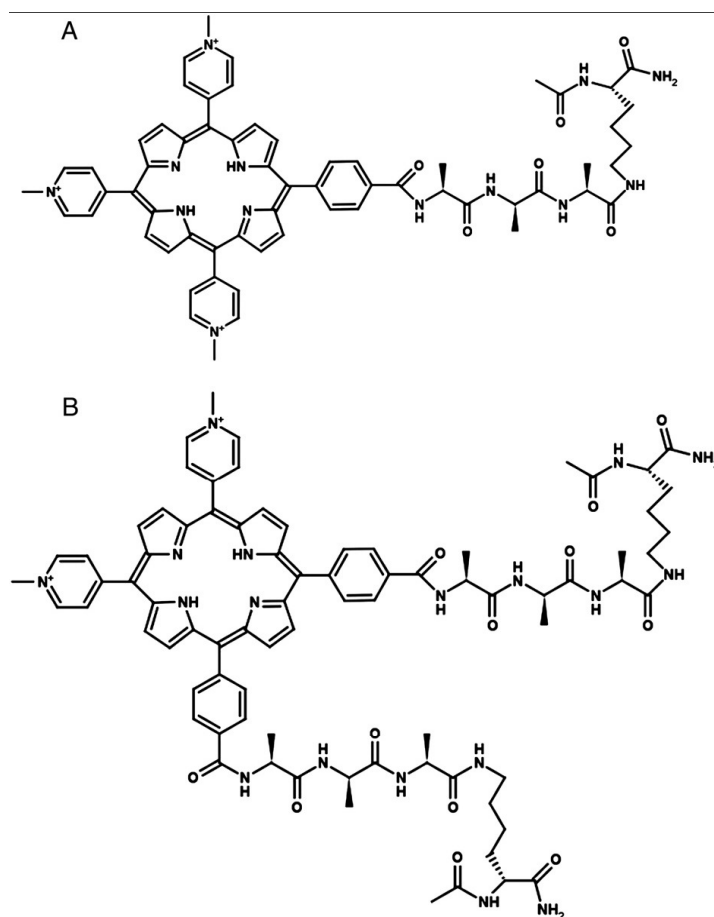
A pályázat során a módszer alkalmazhatóságát és annak nanorészecskékre történő kiterjeszhetőségét vizsgáltuk és igazoltuk mátrix metalloproteináz 2 (MMP-2) enzim peptidszubsztrátján (Achatz DE és mtsai *ChemBioChem* 10: 2316-2320 (2009)).

Mivel lizoszóma preparátumban nem tapasztaltuk az oxim-kötött daunomicin felszabadulását, vizsgálni kívántuk, hogy a sejtekben történik-e további olyan lebomlási lépés, amely szabad daunomicint eredményez. Ezért olyan FRET rendszer kidolgozását tűztük ki célként, amelyben a daunomicin akceptor kromoforként szerepel egy lepidium-alapú festék mellett, amely donorként szerepel a rendszerben. A festéket alkin-azid cikloaddícióval kapcsoltuk egy Tyr-Arg-Arg-Leu enzimplabilis spacerhez, mivel az irodalmi tapasztalatok alapján a kialakuló triazol-gyűrű stabil a biológiai rendszerekben, ennek felbomlása nem várható. A peptidlánc C-terminálisát pedig amidkötéssel kapcsoltuk a daunomicin cukorrészének aminocsoportjához. A Katepszin B hatására (spacer hasadása) bekövetkező fluoreszcencia tulajdonság változása bizonyította, hogy egy ilyen FRET rendszer alkalmas lehet daunomicin tartalmú konjugátumok metabolizmusának vizsgálatára (Cserép G. és mtsai *Chemistry Asian Journal* 8: 494-502 (2013)). Jelenleg folyamatban vannak olyan vegyületek előállítása és vizsgálata, amelyben a daunomicin oximkötéssel kapcsolódik a modellvegyülethez (a modellvegyület nem tartalmaz enzim hatására hasadó peptidkötést).

12. Porfirin-származékok konjugátumai

A porfirin származékokat gyakran alkalmazzák az ún. fotodinamikus terápiában. A porfirinszármazékok DNS-hez kötődését szintén széles körben vizsgálták. Megállapították, hogy a porfirinek tudnak interkallálódni a DNS szálak közé, illetve kívülről is tudnak kötődni a DNS szálhoz. Ugyanakkor peptidekhez kötött porfirinek kvantitatív és kvalitatív DNS kötődését még nem nagyon tanulmányozták. Mivel a porfirin vegyületeknek jelentőségük lehet a tumorterápiában, ezért célul tűztük ki porfirinszármazékok peptid konjugátumainak előállítását és a konjugátumok DNS kötődésének tanulmányozását. Az első kísérletben az általunk hordozóként gyakran használt polilizin gerincű elágazóláncú polipeptidek

alapegységét szimbolizáló Ac-Lys(Ala-D-Ala-Ala)-NH₂ választottuk. A peptidet egy trikationos meso-tri(4-N-metilpiridil)-mono-(4-karboxifenil)porfirinhez (egy peptid kapcsolására alkalmas) és egy bikationos meso-5,10-bis(4-N-metilpiridil)-15,20-di-(4-karboxifenil)porfirinhez kapcsoltuk (két peptid kapcsolására alkalmas) (35. ábra).



35. ábra: A porfirin-származékok peptidkonjugátumainak szerkezete

Érdekes módon a két vegyület hatékony előállításához más-más szintézisutat kellett választani. Az első konjugátum előállításához BOP reagens volt a megfelelő kapcsolószer, míg a második esetben vízóldékony karbodiimid (EDC) szolgáltatott jó megoldást. A spektroszkópai módszerekkel követett DNS kötődési vizsgálatok azt mutatták, hogy a karboxilcsoportok peptidekkel történt blokkolása a porfirinszármazékokon növelte a vegyület DNS-hez kötődését és a pozitív töltések számának növekedése szintén ebbe az irányba mutatott. Tapasztalataink jó alapot szolgáltatnak porfirinek DNS-hez targetálásához alkalmazható konjugátumok tervezéséhez (Mező G., és mtsai *Biophys. Chem.* 155: 36-44 (2011)).

13. Az OTKA pályázat által indukált új pályázatok

1. OTKA K81596 (2010-2014): Rosszindulatú daganatokban expresszázó luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok mint új molekuláris célpontok a pozitron emissziós tomográfia számára. (Témavezető: Halmos Gábor, DE)
2. OTKA K 104045 (2012-2016): Tumorellenes hatóanyag - peptid konjugátumok kifejlesztése kombinált célzott tumorterápia céljára. (Témavezető: Mező Gábor, MTA-ELTE)
3. OTKA K 104275 (2012-2016): Látens Mycobacterium tuberculosis fertőzöttség kimutatása és antituberkulotikus hatású vegyületek gazdasejt specifikus célbajuttatása. (Témavezető: Bősze Szilvia, MTA-ELTE)
4. OTKA PD104012 (2013-2015): Irányított tumorterápia GnRH-II analógokkal (Témavezető: Szabó Ildikó)
5. MÖB-DAAD projekt (2012-13): DNS-interkaláló hatóanyagok peptid-konjugátumai? Kölcsönhatásuk DNS-sel és a kölcsönhatás szerkezeti következményei.(p.sz. 29225) (Témavezető: Csík Gabriella, SE és Tóth Katalin DKFZ, Heidelberg, Németország)
6. AFF (Committee on Research) and Young Scholar Fund, University of Konstanz (2009-2010): Drug delivery systems for targeted chemotherapy based on gonadotropin-releasing hormone-III. (Témavezető: Marilena Manea, University of Konstanz, Németország)
7. AFF (Committee on Research) and Young Scholar Fund, University of Konstanz (2011-2012): Tumor targeting with gonadotropin-releasing hormone-III derivatives. (Témavezető: Marilena Manea, University of Konstanz, Németország)
8. FP7-PEOPLE-2013-ITN Marie Curie Initial Training Networks (ITN) (benyújtva): HOPEDRUG (HOMing-PEptide DRUG conjugates). (Témavezető: Norbert Sewald, University of Bielefeld, Németország)
9. KTIA_AIK_12 (benyújtva): Biokonjugátumok - gyógyszerhatóanyagok specifikus célbajuttatása, immunodiagnosztikai reagensek fejlesztése. (Témavezető: Hudecz Ferenc)

A pályázattal kapcsolatban több kollega, főleg PhD hallgató kapott támogatást a következő támogatóktól: Richter Centenáriumi Alapítvány (predoktori pályázat), Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért (PhD kiegészítő ösztöndíj), AESCULAP Alapítvány predoktori pályázat, Rácz István Alapítvány pályázata, az ELTE és a SE Doktori Iskolája.