



Irányító peptid szerkezet optimalása a célzott tumorterápiára alkalmas konjugátumok hatékonyságának növelése érdekében

Mező Gábor*^{1,2}, Kiss Krisztina^{1,2}, Szabó Rita², Orosz Ádám³, Schlosser Gitta¹, Ivan Randelovic⁴, Tóvári József⁴, Lajkó Eszter⁵, Kőhidai László⁵

¹ELTE TTK, Kémiai Intézet, ²MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport,

³SE, Biofizikai Tanszék, ⁴Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály,

⁵SE, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés

2018. 05. 29.

Balatonszemes

Peptide therapeutics: current status and future directions

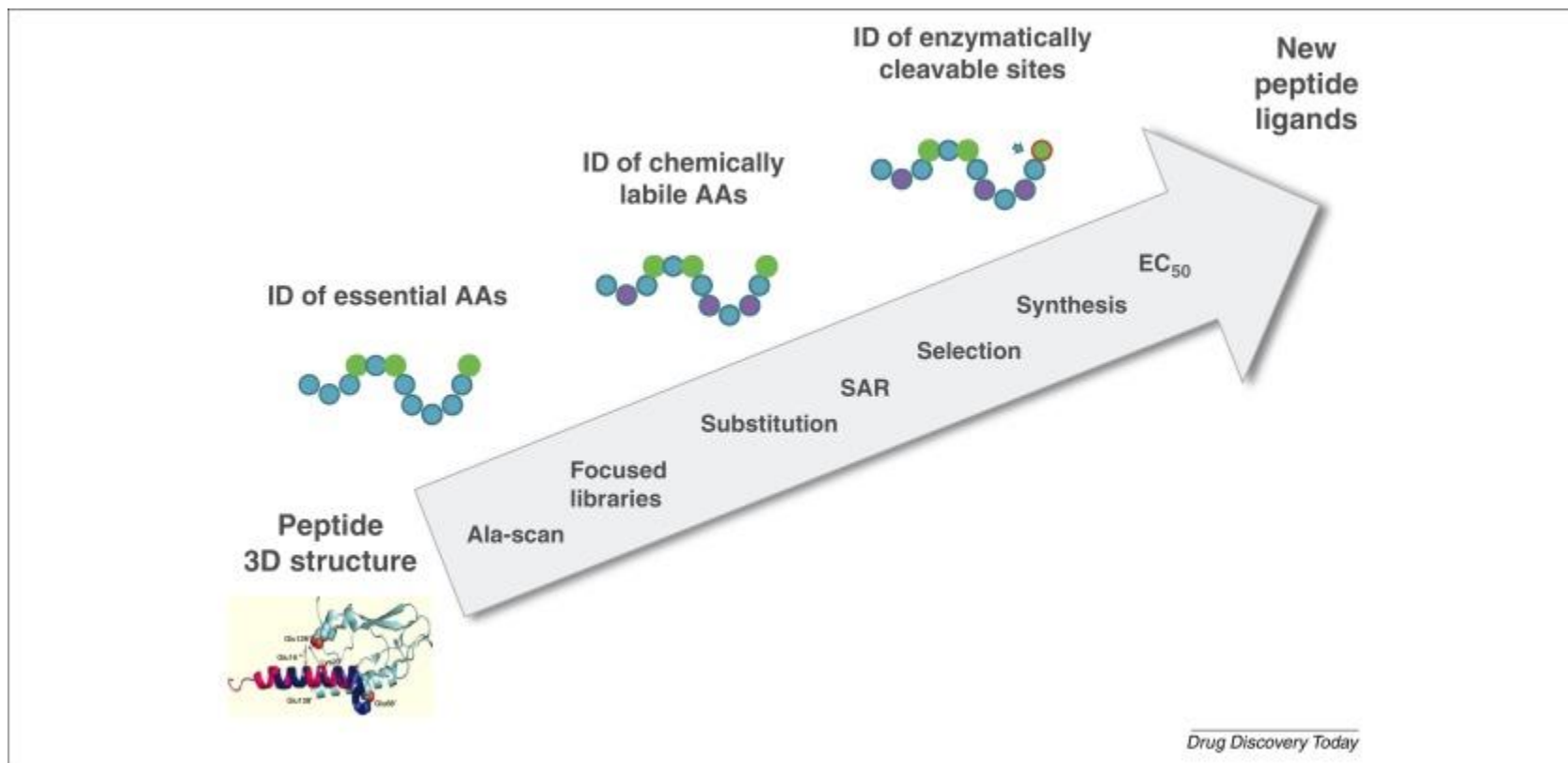
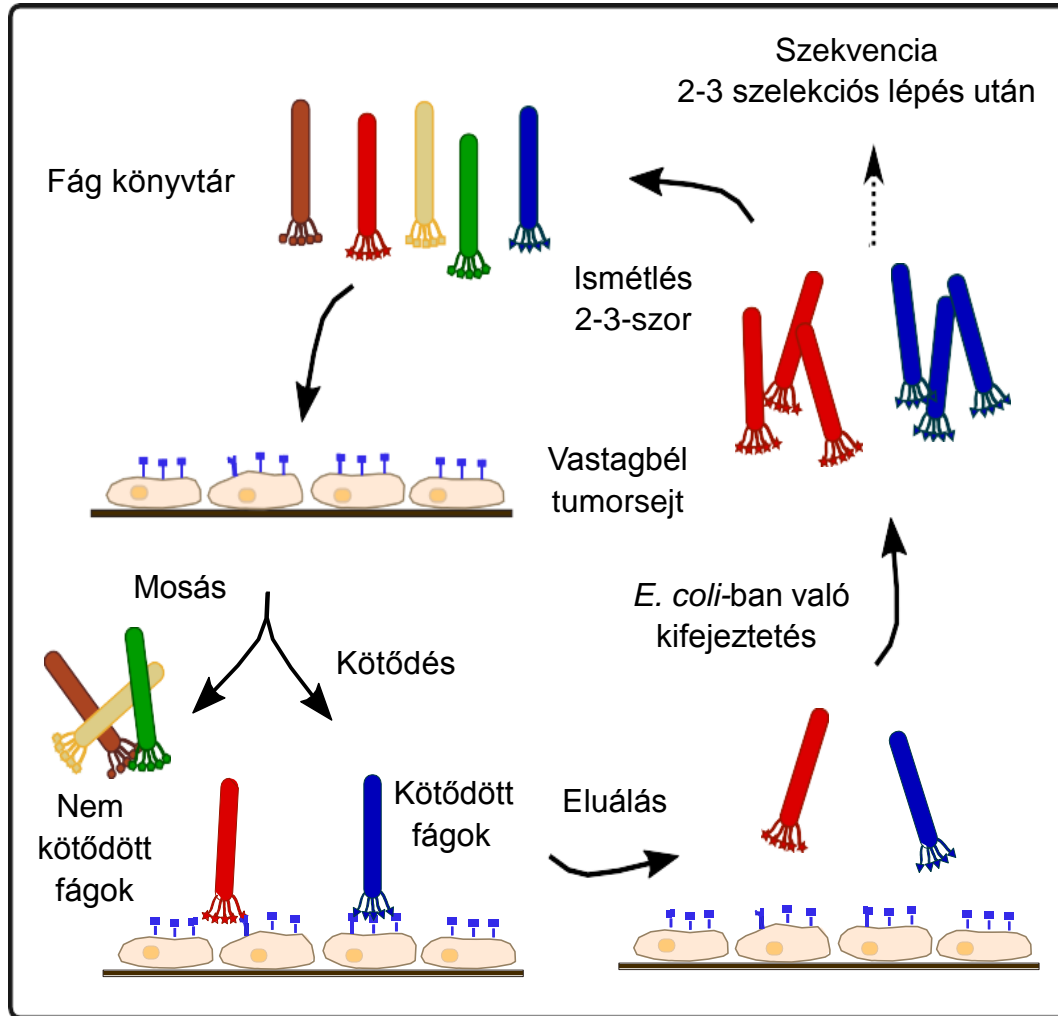


Figure 2. The traditional structure-based design strategies that are used in peptide drug discovery. This includes substitution of amino acids (AA), and the building of structure–activity relations (SAR) via elements such as an alanine (Ala) scan and estimation of EC₅₀ (half maximal effective concentration).

Vastagbél tumorsejthez kötődő peptidek kiválasztása fág-bemutató technikával



VHLGYAT

kiválasztott peptid

Dau=Aoa-VHLGYAT-NH₂

Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂

Dau=Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH₂

Dau: daunomicin

Aoa: aminosciacetil

GFLG, LRRY:

Katepszin B enzim

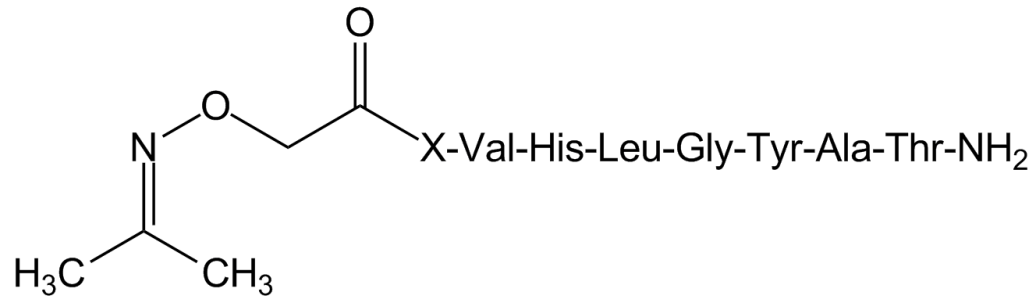
által hasítható szekvenciák

10¹¹ fág klón felhasználásával, 50 kiválasztott, amelyek kevés és csak dipeptid szakasz homológiát mutattak

Zhang Y., et al. (2007) *J. Biomol. Screen.* **12**, 429-435

Funkcionalizált lineáris peptid előállítása

Standard Fmoc-protokoll, Rink-Amid MBHA gyanta
Végén: >=Aoa-OH/DIC/HOBt



0,2M NaOAc (pH= 5,08; peptid koncentráció 10 mg/ml)
+ metoxilamin (1 M)
szobahőmérséklet, kevertetés, 1 óra

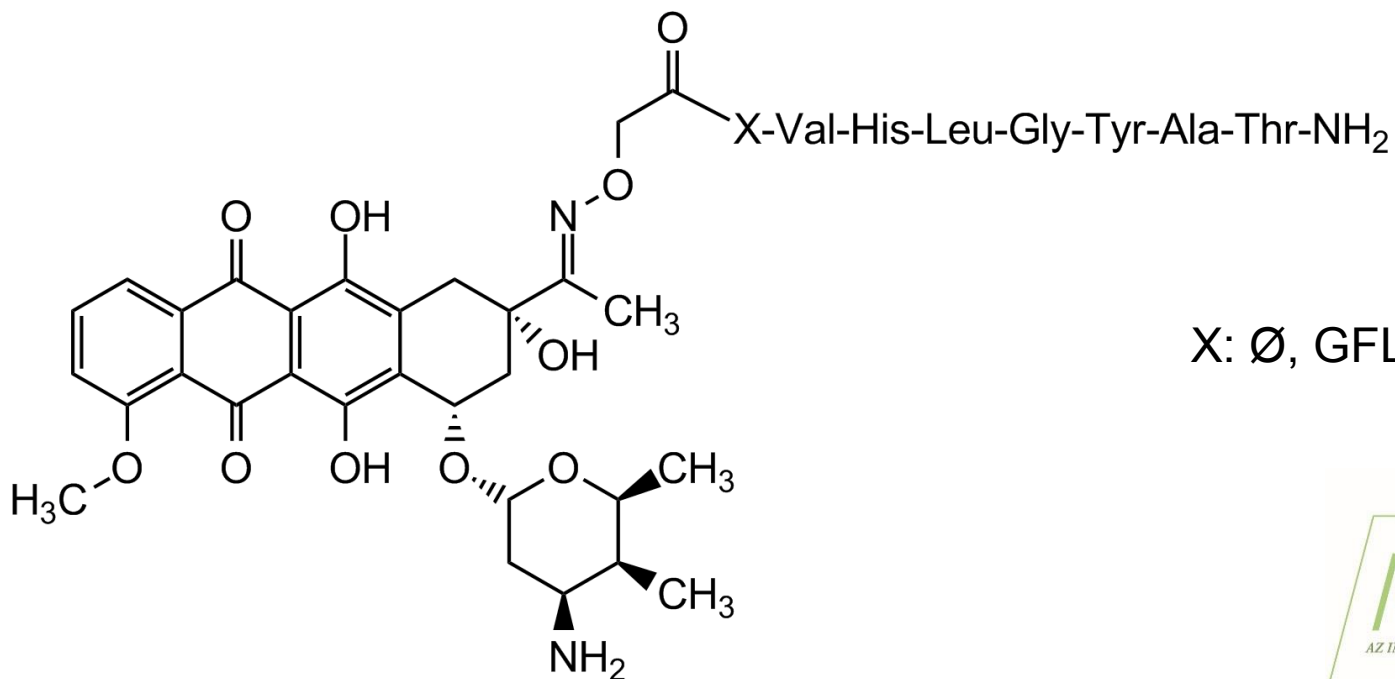


X: Ø, GFLG, LRRY

Peptid-daunomicin konjugátum előállítása

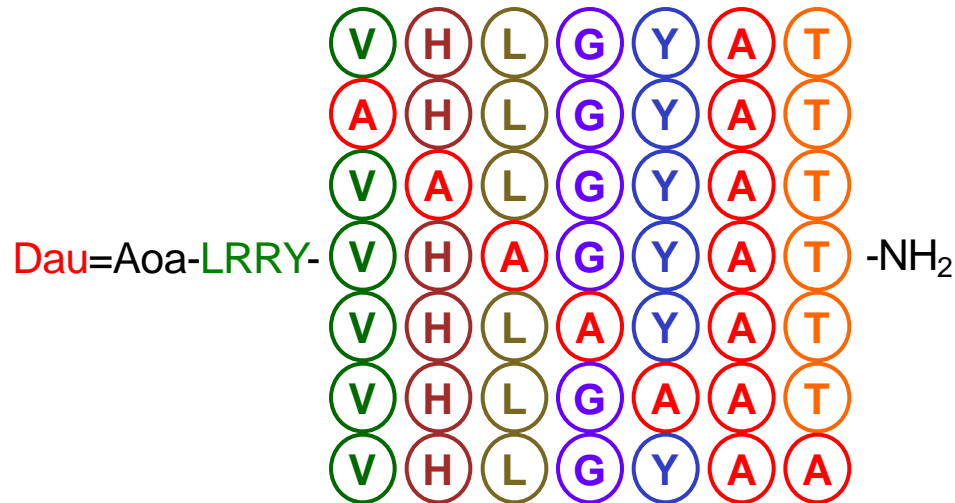


0,2M NaOAc (pH= 5,08; peptid koncentráció 10 mg/ml)
+2 ekv. daunomicin
szobahőmérséklet, kevertetés, 12 óra



X: Ø, GFLG, LRRY

Hatékonyabb konjugátum kiválasztása Ala-szken segítségével



Kód	Konjugátum	Citosztázis (IC ₅₀ (μM)) (24 órás kezelés + 48 óra)
KK06/2	Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH ₂	50,5 ± 5,5
KK11	Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAA-NH ₂	60,9 ± 3,1
KK12	Dau=Aoa-LRRY-VHLGAAT-NH ₂	> 100
KK13	Dau=Aoa-LRRY-VHLAYAT-NH ₂	14,0 ± 1,5
KK14	Dau=Aoa-LRRY-VHAGYAT-NH ₂	> 100
KK15	Dau=Aoa-LRRY-VALGYAT-NH ₂	26,8 ± 0,4
KK16	Dau=Aoa-LRRY-AHLGYAT-NH ₂	> 100

További módosítások a 4. pozícióban a hatás fokozása érdekében (folyamatban lévő kísérletek 2016-ban)



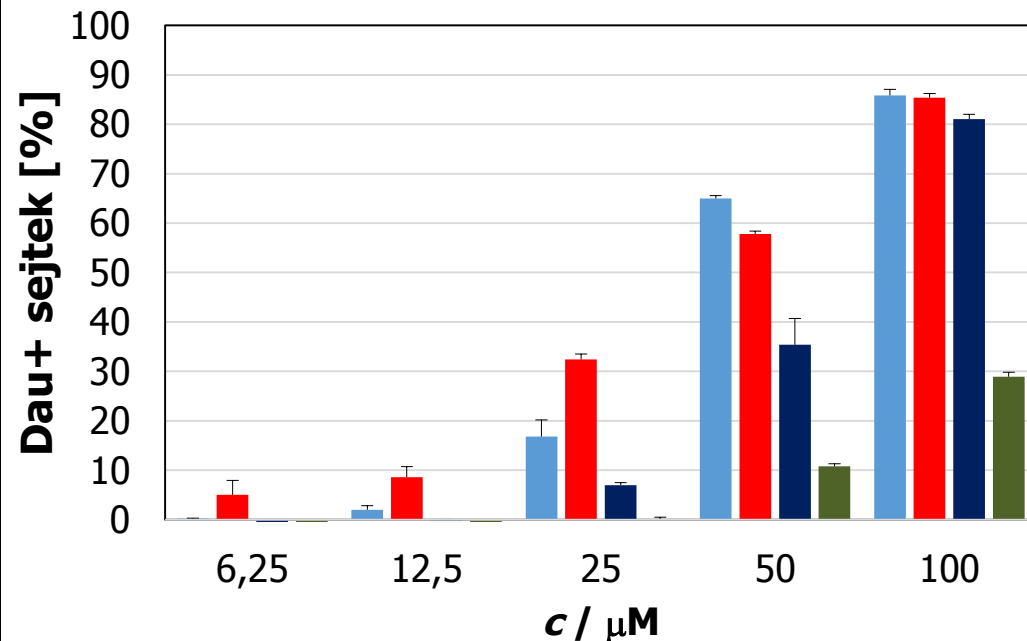
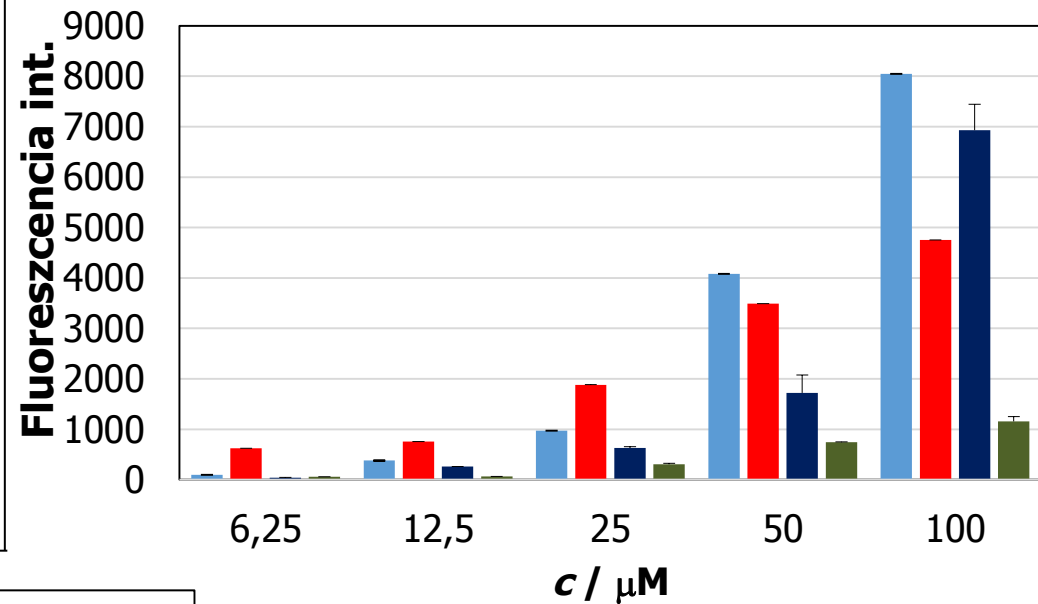
Fág-könyvtárból kiválasztott HT-29 humán vastagbél tumorsejtre szelektív peptidből készített daunomicin konjugátumok

	V H L G Y A T	50,5 ± 5,5	KK06/2
	A H L G Y A T	>100	
	V A L G Y A T	28,8 ± 0,4	
Dau=Aoa-LRRY-	V H A G Y A T -NH ₂	>100	
	V H L A Y A T	14,0 ± 1,5	MTT teszt HT-29 sejteken
	V H L G A A T	>100	
	V H L G Y A A	60,9 ± 3,1	IC ₅₀ értékek (μM)
	V H L A Y A T	27,9 ± 6,4	
	V H L K Y A T	50,3 ± 3,0	24 óra kezelés +48 óra inkubálás
	V H L E Y A T	29,5 ± 6,2	
	V H L L Y A T	7,5 ± 3,5	
Dau=Aoa-LRRY-	V H L F Y A T -NH ₂	6,6 ± 2,9	KK24
	V H L S Y A T	24,8 ± 7,4	
	V H L T Y A T	21,7 ± 6,5	
	V H L N Y A T	28,0 ± 19,4	
	V H L P Y A T	>50	

In vitro sejtbejutási vizsgálatok

(FACS mérések 3 óra inkubálás után (szérummentes médium); élő sejteket

- Dau=Aoa-LRRY-VHL^AYAT-NH₂
- Dau=Aoa-LRRY-VHL^FYAT-NH₂
- Dau=Aoa-LRRY-VHL^SYAT-NH₂
- Dau=Aoa-LRRY-VHL^PYAT-NH₂



A Dau=Aoa-LRRY-VHL^FYAT-NH₂ toxicitása miatt, a nagyobb koncentrációkban csökken az élő sejtek aránya

Sejtfelvételi vizsgálatok konfokális mikroszkóppal

Kezelési idő: 1,5 óra

KK25: időfüggés

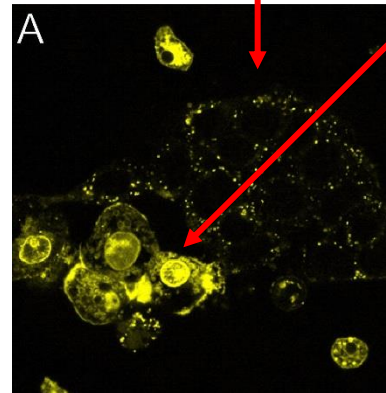
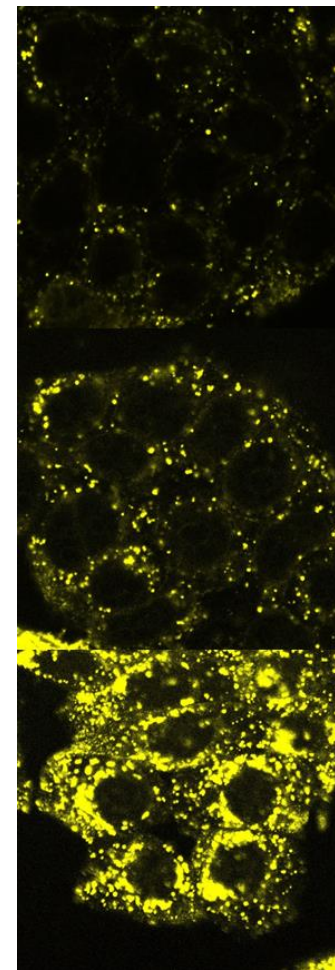
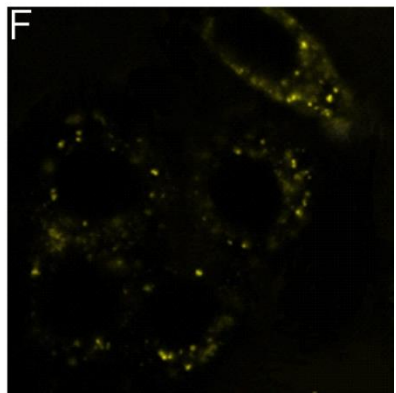
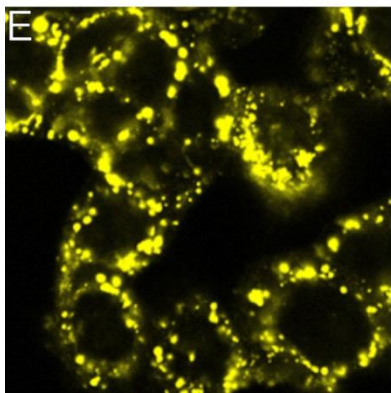
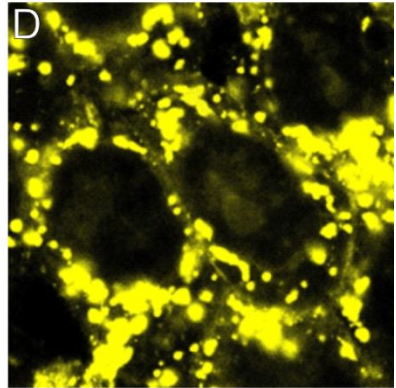
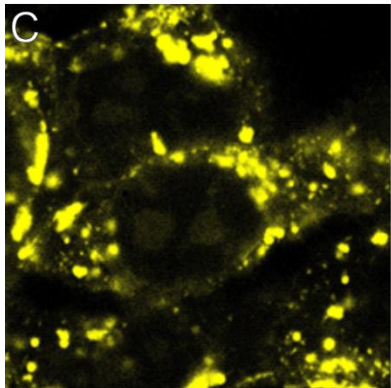
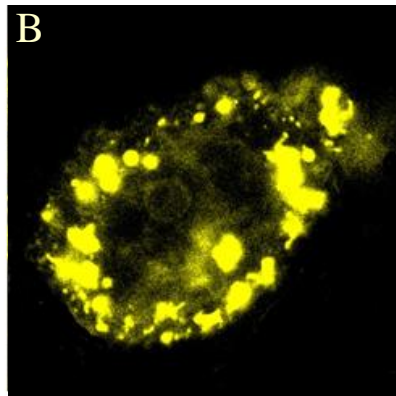
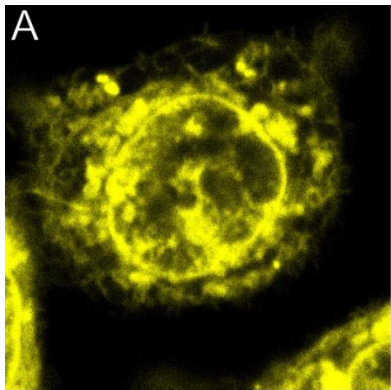
30 perc

3 óra

5 óra

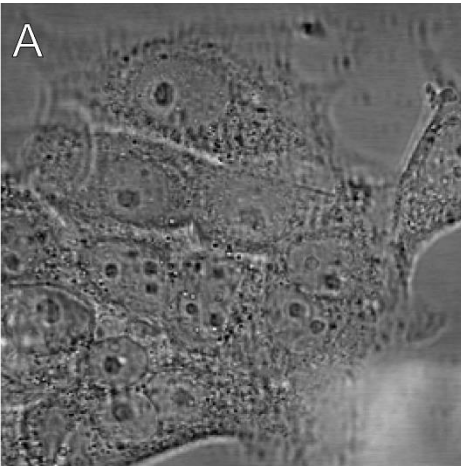
- A: Dau
- B: KK06/2 (Gly)
- C: KK13 (Ala)
- D: KK24 (Phe)
- E: KK25 (Ser)
- F: KK28 (Pro)

KK25: élő és halott sejtek

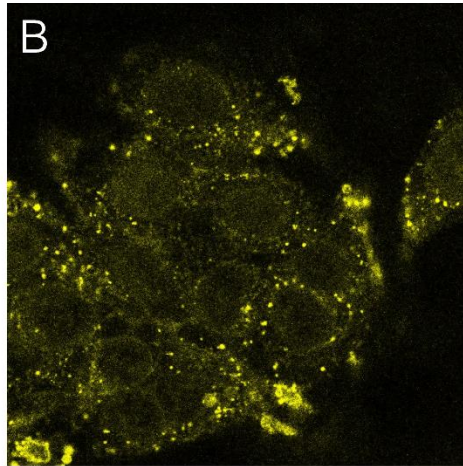


Daunomicinnel és a KK24 konjugátummal kezelt MCF-7 és PBMC sejtek vizsgálata konfokális mikroszkóppal

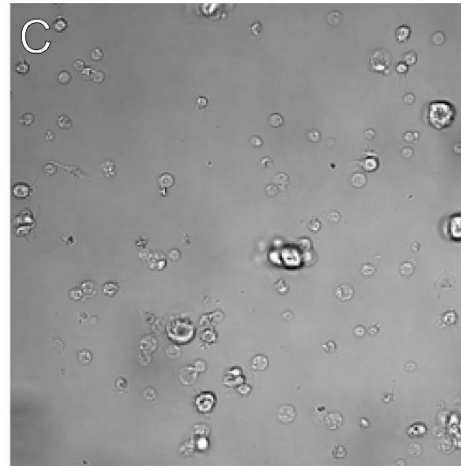
MCF-7 sejtek



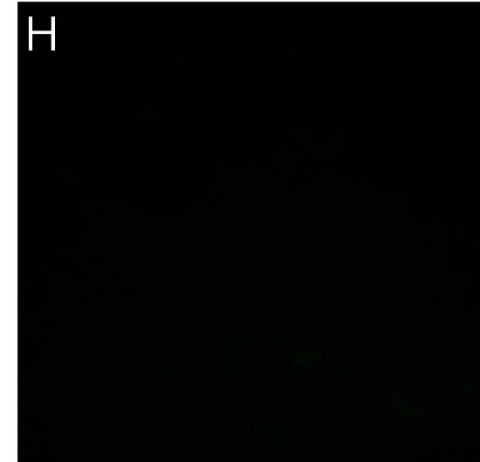
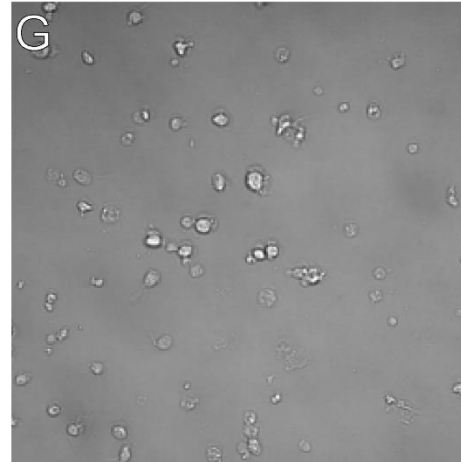
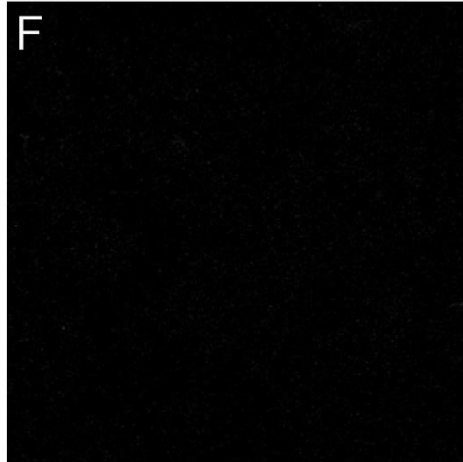
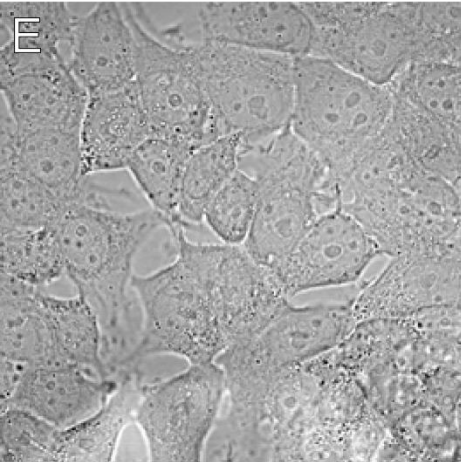
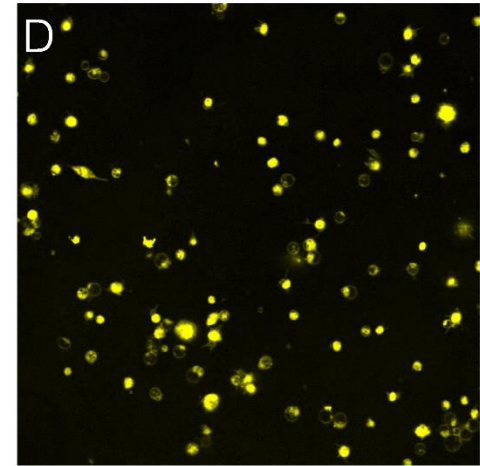
MCF-7 + Dau



PBMC sejtek



PBMC + Dau



MCF-7 sejtek

MCF-7 + KK24

PBMC sejtek

PBMC + KK24

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell (perifériás vér-eredetű mononukleáris sejt)

Koncentráció: 50 μ M; Kezelési idő: 1,5 óra

A KK06/2 és KK24 konjugátumok in vitro citosztatikus hatásának vizsgálata

Tumor típus (sejtvonal)	Dau (IC ₅₀ ; µM)	KK06/2 (IC ₅₀ ; µM)	KK06/2 / Dau	KK24 (IC ₅₀ ; µM)	KK24 / Dau	KK06/2 / KK24
Melanoma (egér B16)	0,0089 ± 0,0053	15,2 ± 3,0	1711,3	3,0 ± 0,5	335,4	5,07
Prosztata (DU145)	0,0245 ± 0,0053	6,1 ± 2,2	249,7	3,5 ± 0,5	142,3	1,74
Tüdő (H6509)	0,0475 ± 0,0016	4,4 ± 1,2	92,6	2,9 ± 0,6	60,1	1,52
Tüdő (H1975)	0,0133 ± 0,0047	19,3 ± 0,1	1458,7	3,7 ± 0,8	279,9	5,22
Melanoma (A2058)	0,0332 ± 0,0004	10,5 ± 5,8	316,8	3,5 ± 1,3	104,5	3,00
Fej-nyaki (PE/CA PJ41)	0,0258 ± 0,0054	9,4 ± 3,5	363,9	4,3 ± 0,1	165,7	2,19
Fej-nyaki (PE/CA PJ15)	0,0264 ± 0,0050	20,2 ± 4,6	759,3	7,4 ± 3,4	277,3	2,73
Máj (HepG2)	0,0213 ± 0,0009	22,4 ± 4,4	1052,6	4,7 ± 0,5	220,2	4,77
Melanoma (M24)	0,0936 ± 0,0258	15,4 ± 3,7	164,3	5,8 ± 0,9	61,7	2,66
Emlő (MDA-MB-231)	0,0529 ± 0,0103	6,3 ± 2,5	118,8	4,6 ± 0,8	86,6	1,37
Melanoma (WM983b)	0,0442 ± 0,0192	7,1 ± 2,5	159,8	5,1 ± 0,4	114,6	1,39
Glioma (U87MG)	0,0279 ± 0,0035	14,2 ± 3,5	510,3	6,6 ± 0,2	236,9	2,15
Tüdő (A549)	0,0681 ± 0,0227	25,9 ± 2,3	380,1	5,9 ± 1,5	86,1	4,39
Vastagbél (HT116)	0,1271 ± 0,0219	33,6 ± 4,4	264,1	7,2 ± 0,3	57,0	4,67
Prosztata (PC-3))	0,0260 ± 0,0071	20,5 ± 0,3	787,5	5,9 ± 1,6	226,7	3,48
Vastagbél (egér C26)	0,1260 ± 0,0468	15,8 ± 2,5	125,7	8,3 ± 1,0	66,0	1,90
Vastagbél (HT-29)	0,2029 ± 0,0010	30,1 ± 0,3	148,3	11,6 ± 0,1	57,1	2,60
Vastagbél (WIDR)	0,2401 ± 0,0363	34,1 ± 3,2	141,8	15,1 ± 2,9	62,8	2,26
Ovárium (OVCAR-3)	0,4729 ± 0,0636	13,8 ± 0,5	29,3	11,3 ± 2,6	24,0	1,22
Emlő (MCF-7)	0,2860 ± 0,0247	22,2 ± 9,2	77,6	11,1 ± 3,8	38,8	2,00
Emlő (egér 4T1)	0,0408 ± 0,0068	34,2 ± 0,4	837,4	11,6 ± 3,6	284,6	2,95
Vastagbél (HT-25)	0,1564 ± 0,0721	33,2 ± 3,5	212,4	15,4 ± 2,8	98,5	2,16
Hasnyálmirigy (PANC-1)	0,4667 ± 0,0366	31,7 ± 4,5	68,0	26,9 ± 8,1	57,7	1,18
Fibroblaszt (MRC-5)	0,2547 ± 0,0006	39,3 ± 24,6	154,2	52,1 ± 1,7	204,6	0,75

A kiválasztott KK06/2 és a KK24 vizsgálata különböző tumorsejt típusokon

GSI kód	Vegyületnév/Szekvencia	Viabilitás, 10 ⁻⁵ M-ban, 72 óra inkubáció elteltével			
		PANC-1	Colo-205	A2058	EBC-1
KK06/2	Dau=Aoa-LRRY-VHLYAT-NH ₂	125.9%	72.2%	87.8%	93.1%
KK24	Dau=Aoa-LRRY-VHLYAT-NH ₂	12.6%	42.1%	40.2%	71.3%

80% < viabilitás < 100%

50% < viabilitás < 80%

20% < viabilitás < 50%

viabilitás < 20%

PANC-1: hasnyálmirigy tumor (impedimetria)

Colo-205: vastagbél tumor (AlamarBlue)

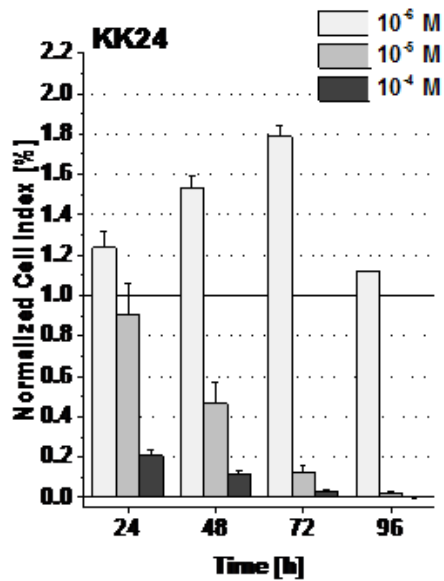
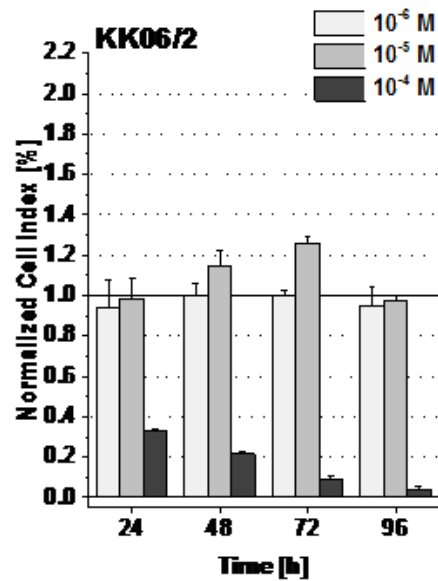
A2058: melanóma (AlamarBlue)

EBC-1: tüdő tumor (Alamar Blue)

Panc-1

Dau=Aoa-LRRY-VHLG^RYAT-NH₂

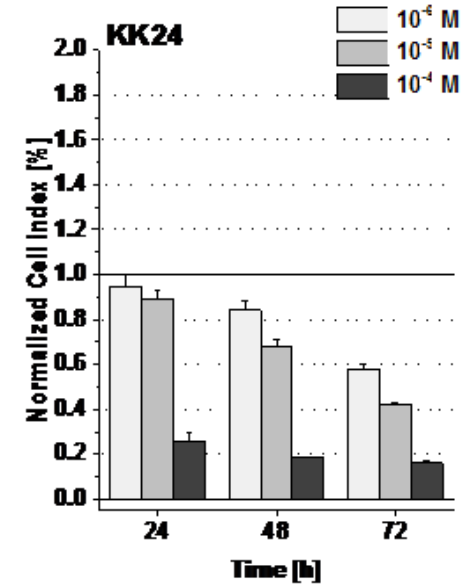
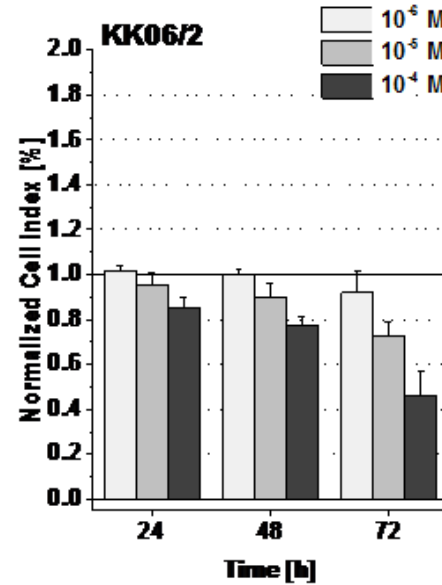
Dau=Aoa-LRRY-VHLF^RYAT-NH₂



Colo-205

Dau=Aoa-LRRY-VHLG^RYAT-NH₂

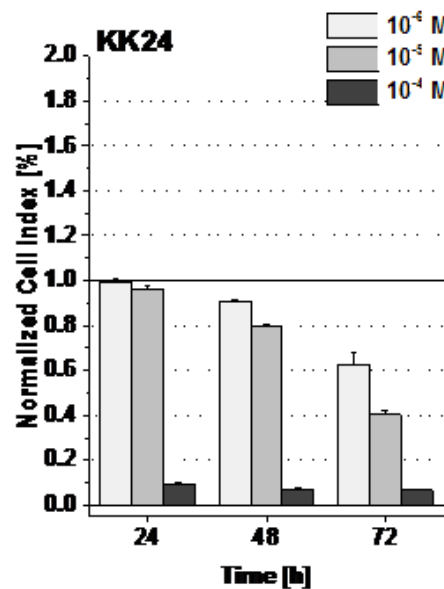
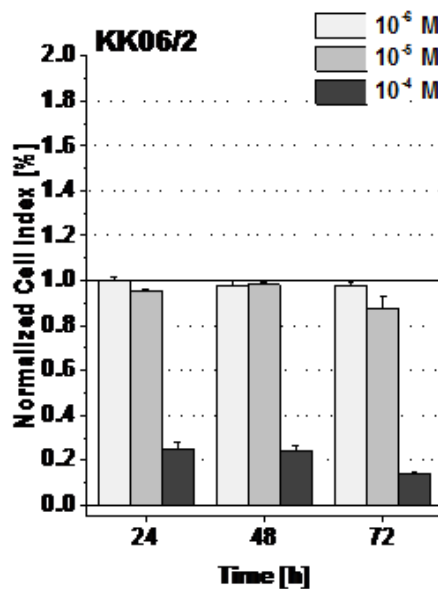
Dau=Aoa-LRRY-VHLF^RYAT-NH₂



A2058

Dau=Aoa-LRRY-VHLG^RYAT-NH₂

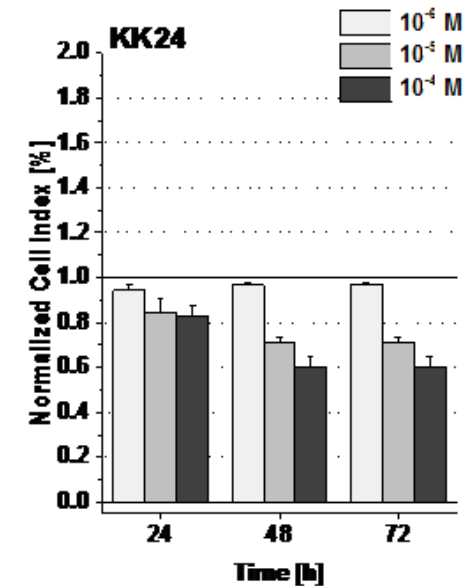
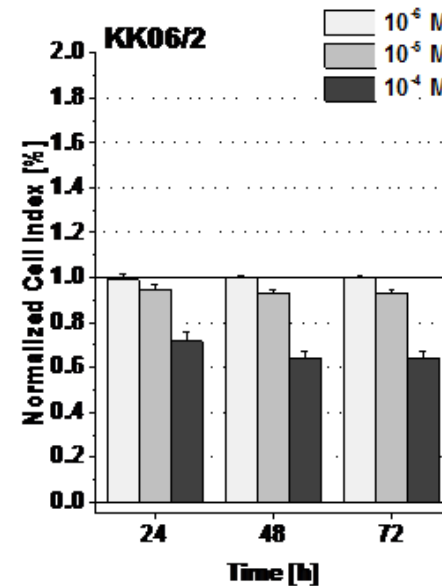
Dau=Aoa-LRRY-VHLF^RYAT-NH₂



EBC-1

Dau=Aoa-LRRY-VHLG^RYAT-NH₂

Dau=Aoa-LRRY-VHLF^RYAT-NH₂



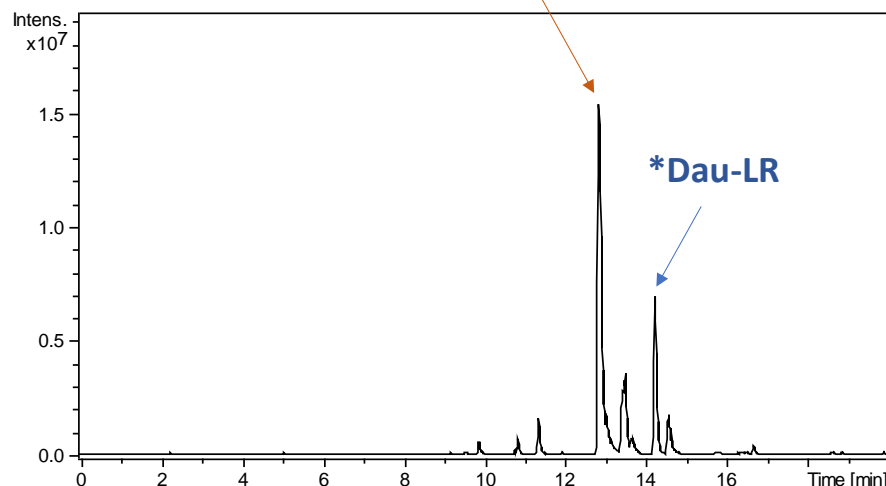
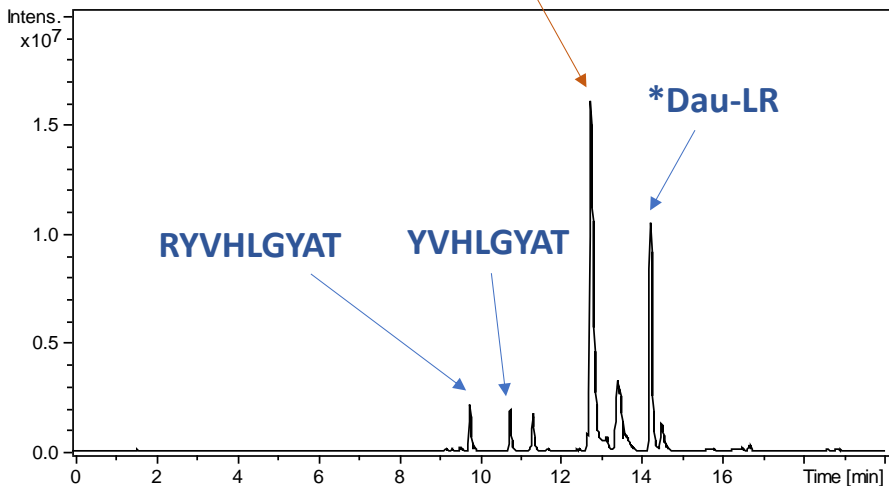
A konjugátumok stabilitásának vizsgálata szérumban tartalmú médiumban (HPLC-MS)

Dau=Aoa-LRRY-VH**L**GYAT-NH₂

Dau=Aoa-LRRY-VH**L**AYAT-NH₂

intakt

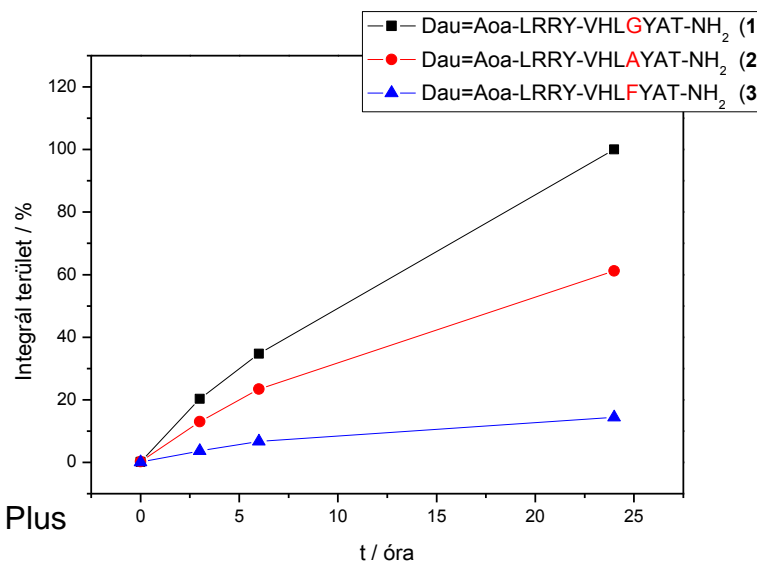
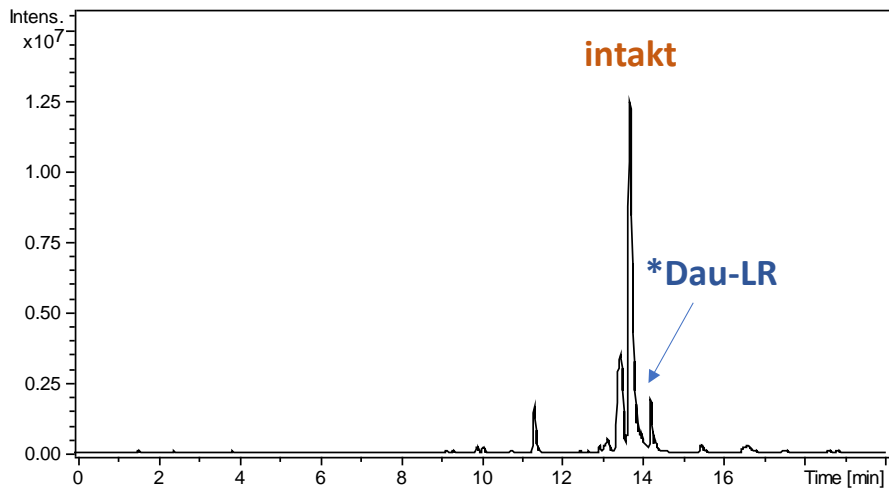
intakt



Dau=Aoa-LRRY-VH**L**FYAT-NH₂

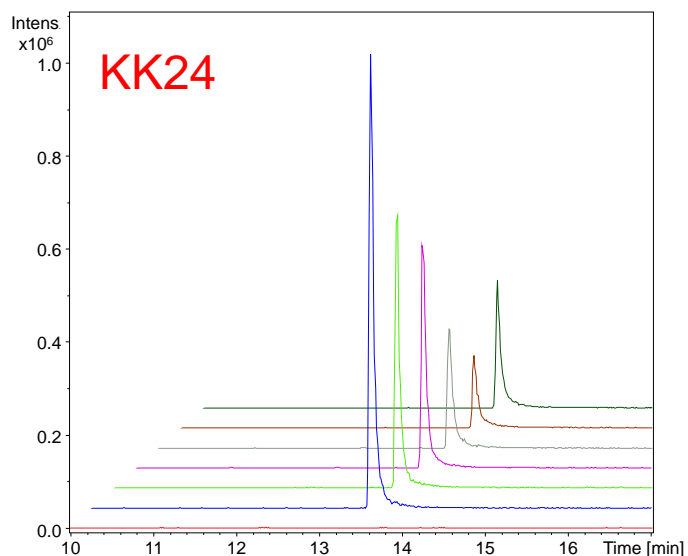
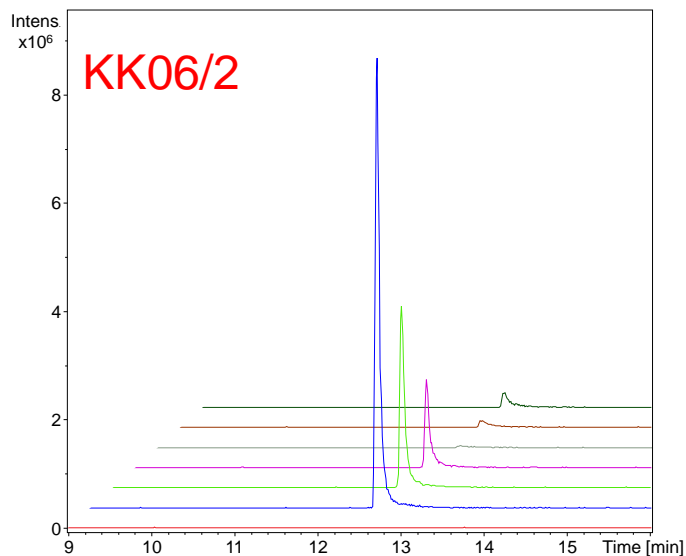
Dau*=Aoa-Leu-Arg-OH metabolit

intakt

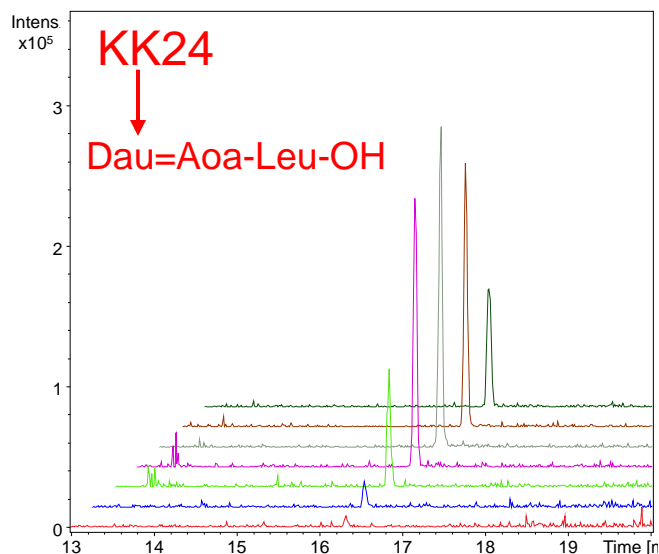
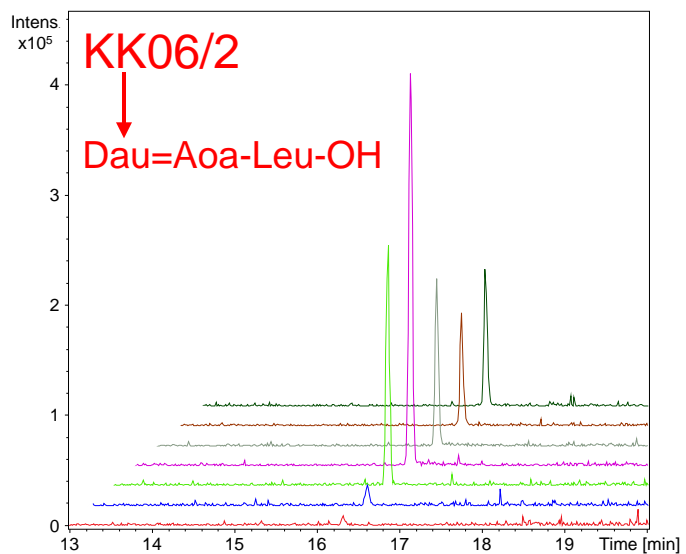


LC: Jasco LC-2000Plus HPLC; ESI-MS: Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus
Oszlop: Waters XBridge C18; 3,5 μ (150 × 2,1 mm), 200 μL/perc

A KK06/2 és a KK24 konjugátumok stabilitás vizsgálata in vivo körülményeket mimikáló rendszerben (90% humán plazma tartalmú oldat)

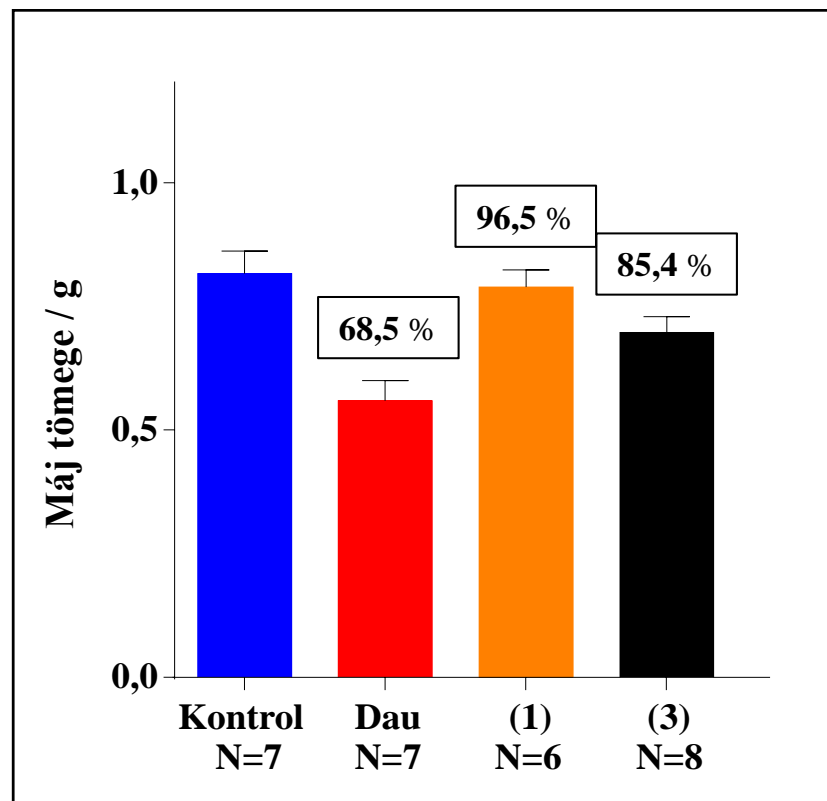
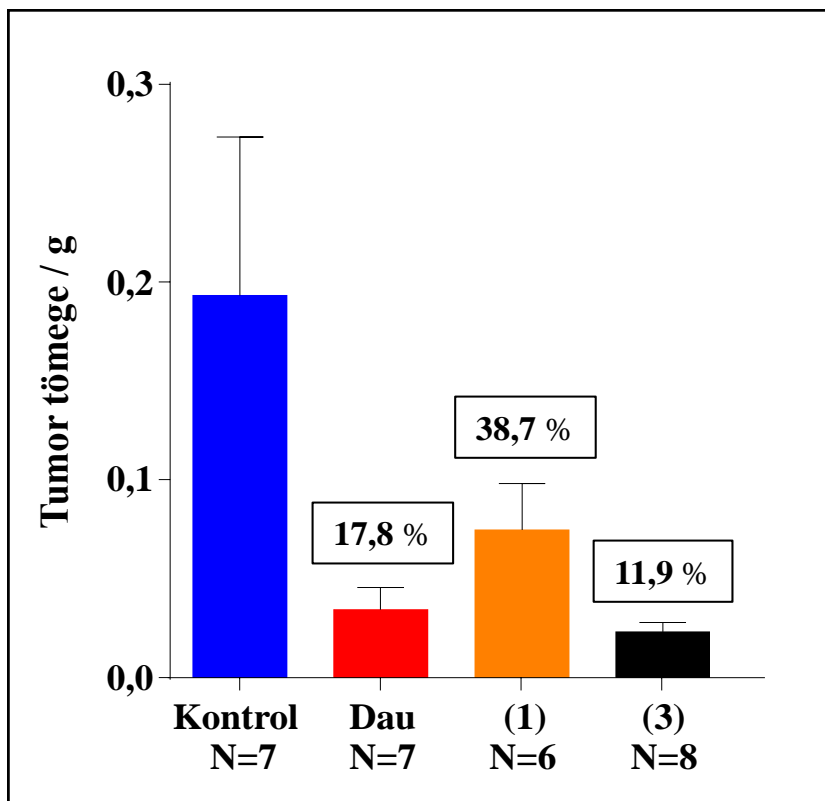


- Kontroll
- 5 perc
- 1 óra
- 2 óra
- 4 óra
- 6 óra
- 24 óra



In vivo tumornövekedés gátlás és májtoxicitás vizsgálata

SCID egerek *i.p.* kezelése (kezdés 10 nappal az ortotopikus tumor beültetés után:
Dau kezelés 1 mg/kg hetente 1-szer; konjugátummal kezelés 10 mg/kg első hét 3-szor,
második hét 2-szer.



- 1) KK06/2: Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂
- 3) KK24: Dau=Aoa-LRRY-VHLYAT-NH₂

N: kísérleti állatok száma

(kontroll, Dau kezelt 1-1, KK06/2 kezelt 2 állat elpusztult)

A peptidszekvencia további optimalálása

	V	H	L	F	Y	A	T	6,5 ± 0,3	(6,6 ± 2,9)
	V	H	L	Y	Y	A	T	38,4 ± 17,7	
	V	H	L	X	Y	A	T	3,6 ± 0,1	
	V	H	L	F	Y	E	T	54,3 ± 13,4	MTT teszt
Dau=Aoa-LRRY-	V	H	L	F	Y	S	T	17,7 ± 2,2	HT-29 sejteken
	V	H	L	F	Y	K	T	11,5 ± 1,7	IC ₅₀ értékek (µM)
	V	H	L	F	Y	L	T	3,2 ± 0,1	
	V	H	L	F	Y	P	T	10,9 ± 0,9	
	V	H	L	F	Y	N	T	15,4 ± 6,3	

X = *p*-klór-fenilalanin (Cpa)

Támogatások

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH):

K 119552

NVKP_16-1-2016-0036

Köszönöm a figyelmet!

