



Lehetőségek a tumorspecifikus irányító peptidok hatékonyságának növelésére

Kiss Krisztina¹, Szabó Rita¹, Kovács-Biri Beáta¹, Orosz Ádám²,

Mező Gábor¹

¹MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport
¹SE-ÁOK Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Chemotaxis Workshop 2017

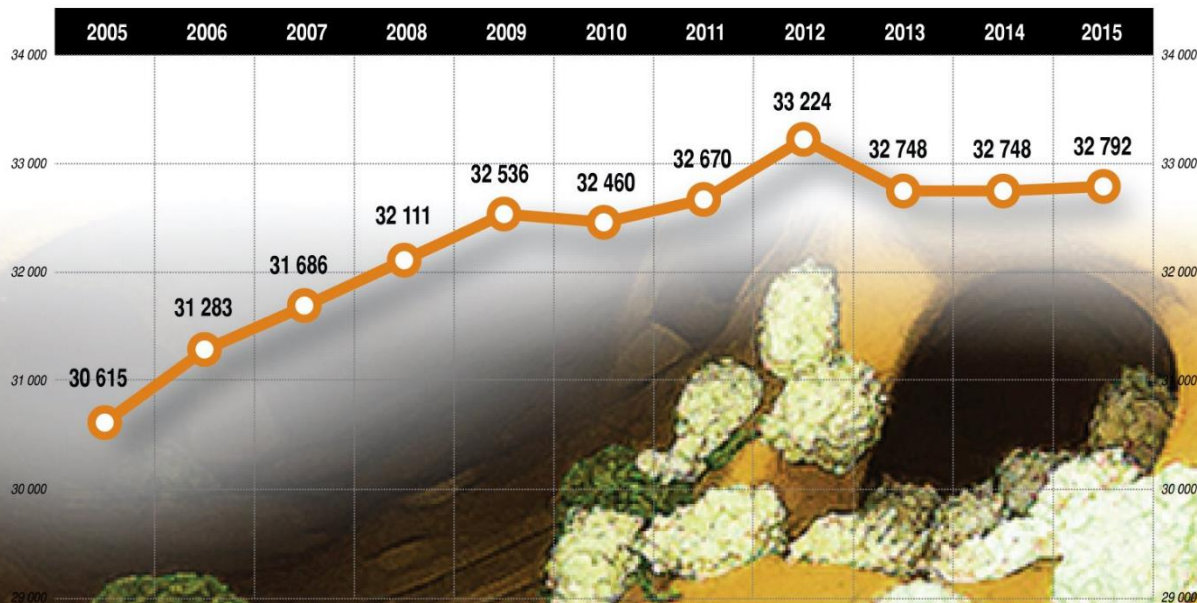
2017. 06. 06.

Budapest

Miért foglalkozunk a daganatos megbetegedésekkel?

Daganatos megbetegedések okozta halálozások Magyarországon (2005–2015)

Rosszindulatú daganatos megbetegedések által okozott halálozások száma összesen:



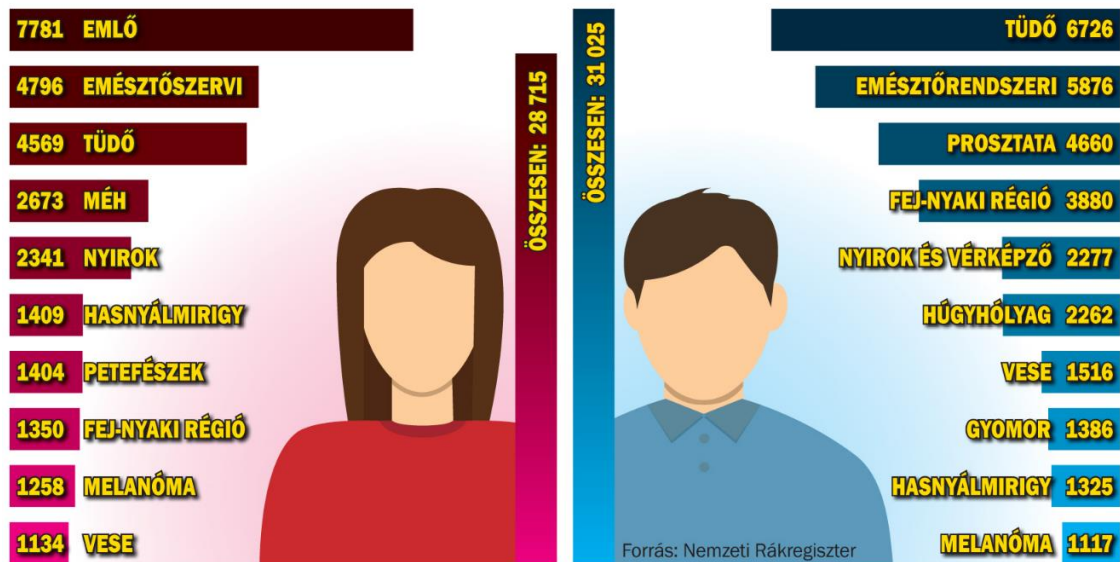
Halálokok:

1. Szív és érrendszeri megbetegedések
2. Daganatos megbetegedések

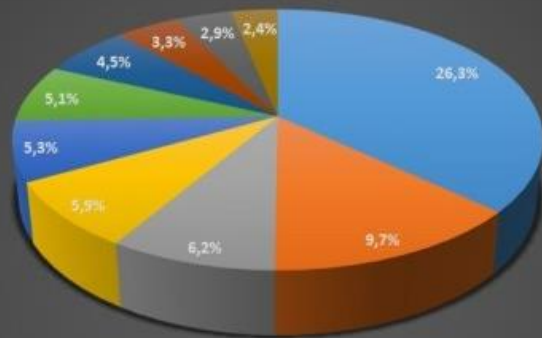
65 év alattiak között vezető halálok; az összes beteg 40%-a

A tíz leggyakoribb daganatos megbetegedés és leggyakoribb halált okozó rák típus

Top 10 daganatos megbetegedés Magyarországon (2013)



Tíz leggyakoribb halált okozó rák



- Légcső, hörgő, tüdő rosszindulatú daganata
- Női emlő rosszindulatú daganata
- Végbél, sigmabél, végbélnyílás rosszindulatú daganata
- Ajak, szájüreg, garat, rosszindulatú daganata
- A húgyhólyag rosszindulatú daganata
- Vastagbél rosszindulatú daganata
- Hasnyálmirigy rosszindulatú daganata
- Gyomor rosszindulatú daganata
- Prosztata rosszindulatú daganata
- Máj rosszindulatú daganata

Nagy esetszám – elég jól gyógyítható:

emlőrák (~66%-os túlélés)

Nagy esetszám – rosszul gyógyítható:

tüdőrák (~16%-os túlélés)

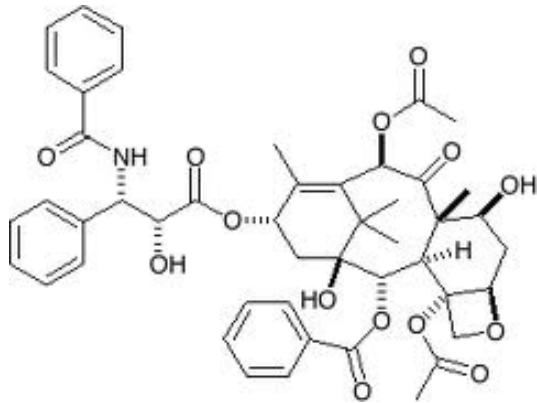
Nagy esetszám – viszonylag jól gyógyítható:

vastagbélrák (~47%-os túlélés)

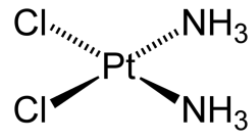
Kis esetszám – rosszul gyógyítható:

hasnyálmirigyrák (~5%-os túlélés)

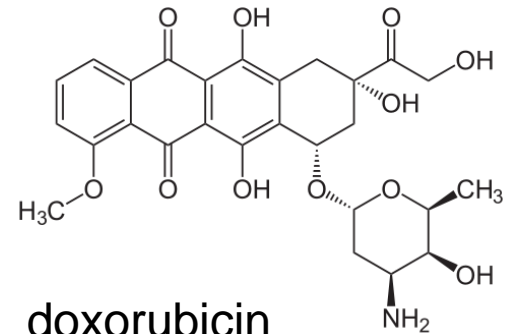
Kemoterápia



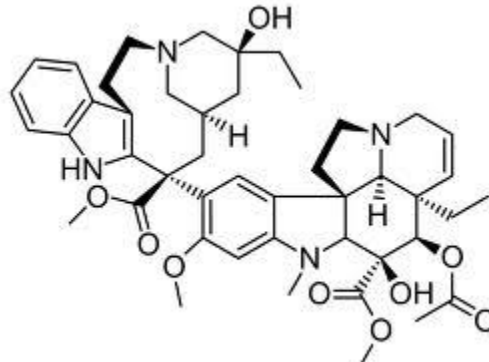
taxol



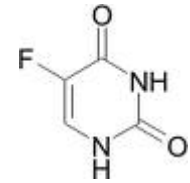
cisplatin



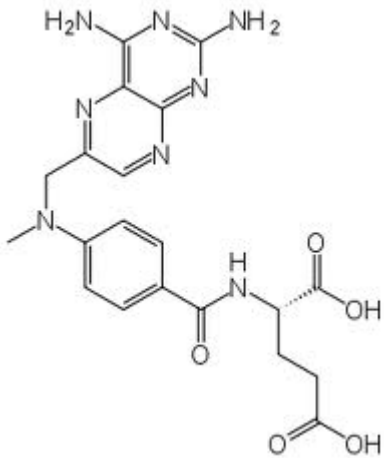
doxorubicin



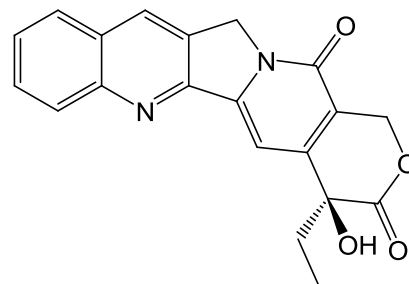
vinblasztin



5-fluoruracil



metotrexát



kamptotecin

A kemoterápia mellékhatásai

Kemoterápiás szerek:

- a gyorsan osztódó sejtekre hatnak (tumorsejtek)***
- de hatnak a normális körülmények között gyorsan osztódó sejtekre is és károsítják azokat***

*pl. csontvelő (vérképző szerv) sejtjei,
emésztőszervek
hajhagymákat tartalmazó tüsző*

A kemoterápia legáltalánosabb mellékhatásai:

- mieloszuppresszió (vérsejtek képződésének csökkenése)*
- immunszuppresszió (érzékenység fertőző betegségekre)*
- mukozitisz (bél és emésztő rendszer gyulladása, hányás)*
- alopecia (foltos hajhullás)*



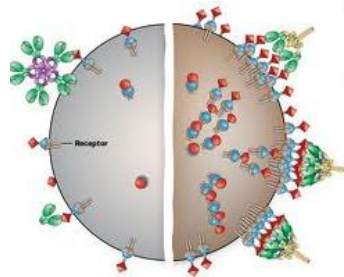
Egyedi toxikus hatások: kardiotoxicitás, veseelégtelenség, ödémásodás, májfunkció zavarai, terratogén (magzatkárosító) hatás

A terápia fokozott szelektívásának lehetősége az egészséges sejtek és a tumorsejtek különbségén alapul

Néhány különbség az egészséges és tumorsejtek, szövetek között:

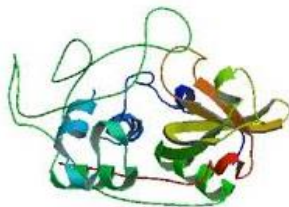
Sejtfelszíni (pl. tumorspecifikus vagy túltermelődött receptor)

egészséges sejt

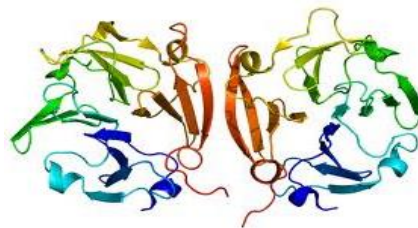


tumorsejt

Sejtbeni (pl. enzimek, egyéb fehérjék eltérő mennyiségben, minőségben)



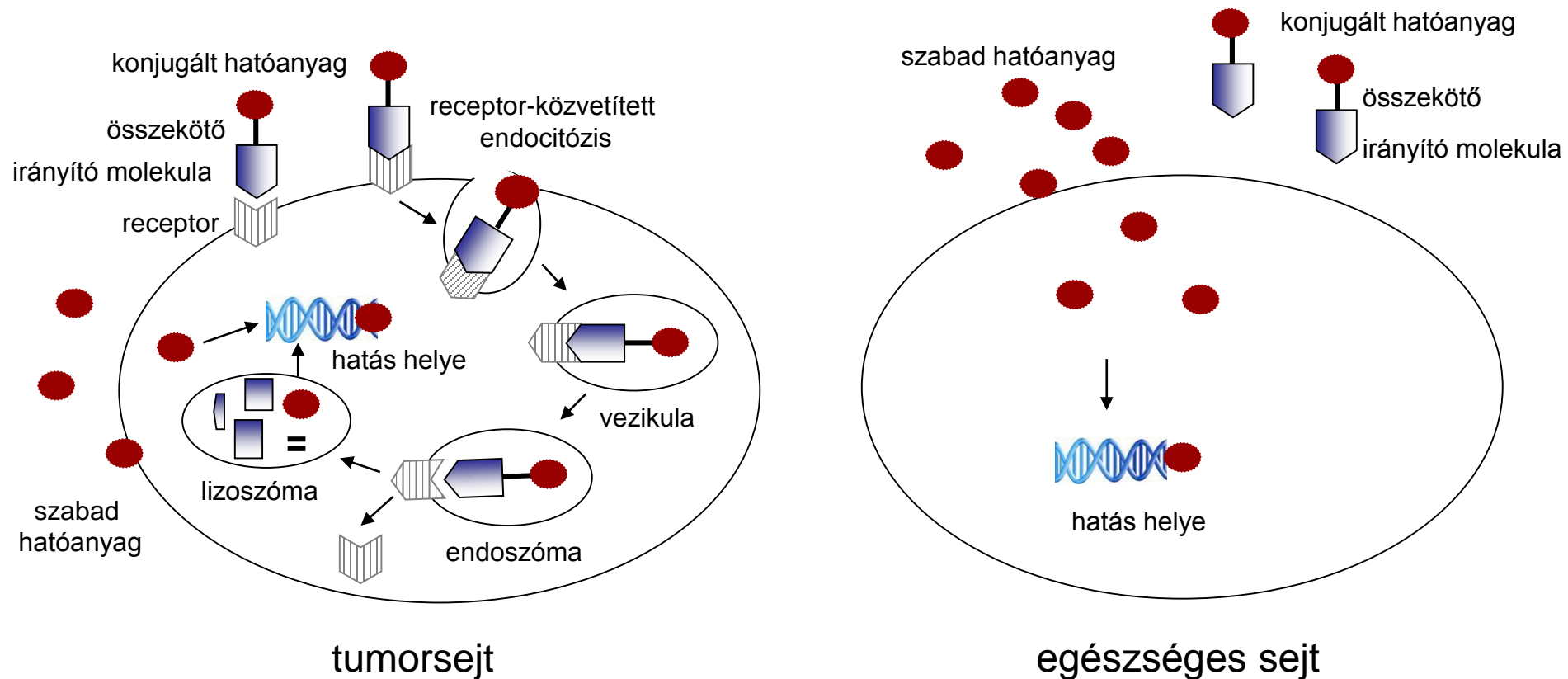
katepszin B



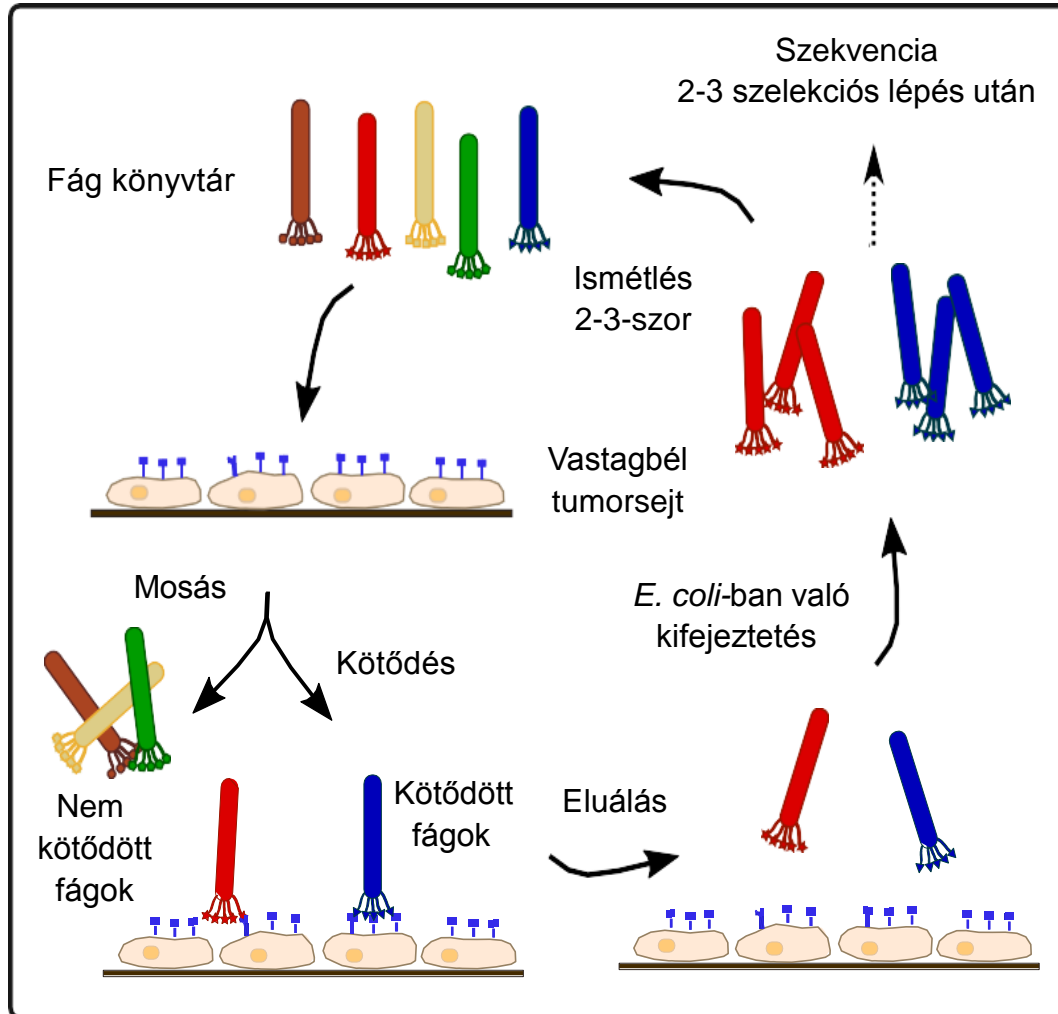
mátrix metallopeptidáz 9
(MMP9)

Lokalizálható „szilárd” tumorok (pl. újonnan kialakult vérerek)

Célzott tumorterápia: szelektív hatóanyag célba juttatás irányító molekulákkal



Vastagbél tumorsejthez (HT-29) 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: aminooxiacetil

GFLG, LRRY:

Katepszin B enzim

által hasítható szekvenciák

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

Tüdőrák terápiájára alkalmas irányító peptidek keresése

Fág-bemutató eljárással kiválasztott peptidszekvenciák (12 aminosav tagszámú), amelyek felismerik a NSCLC (nem kissejtes tüdő tumor) CL1-5 sejteket:

5-2	TDSILRSYDWTY	27/30
5-4	DMPKQLLAPWYY	3/30
4-1	TDSILRSYDWTY	20/24
4-5	DMPKQLLAPWYY	2/24
3-1	TDSILRSYDWTY	1/5

A TDSILRSYDWTY szekvencia gyakorisága a klónokban 20%-ról 90%-ra emelkedett A 3. illetve az 5. szelekciós ciklusból vett random mintavétel esetén.

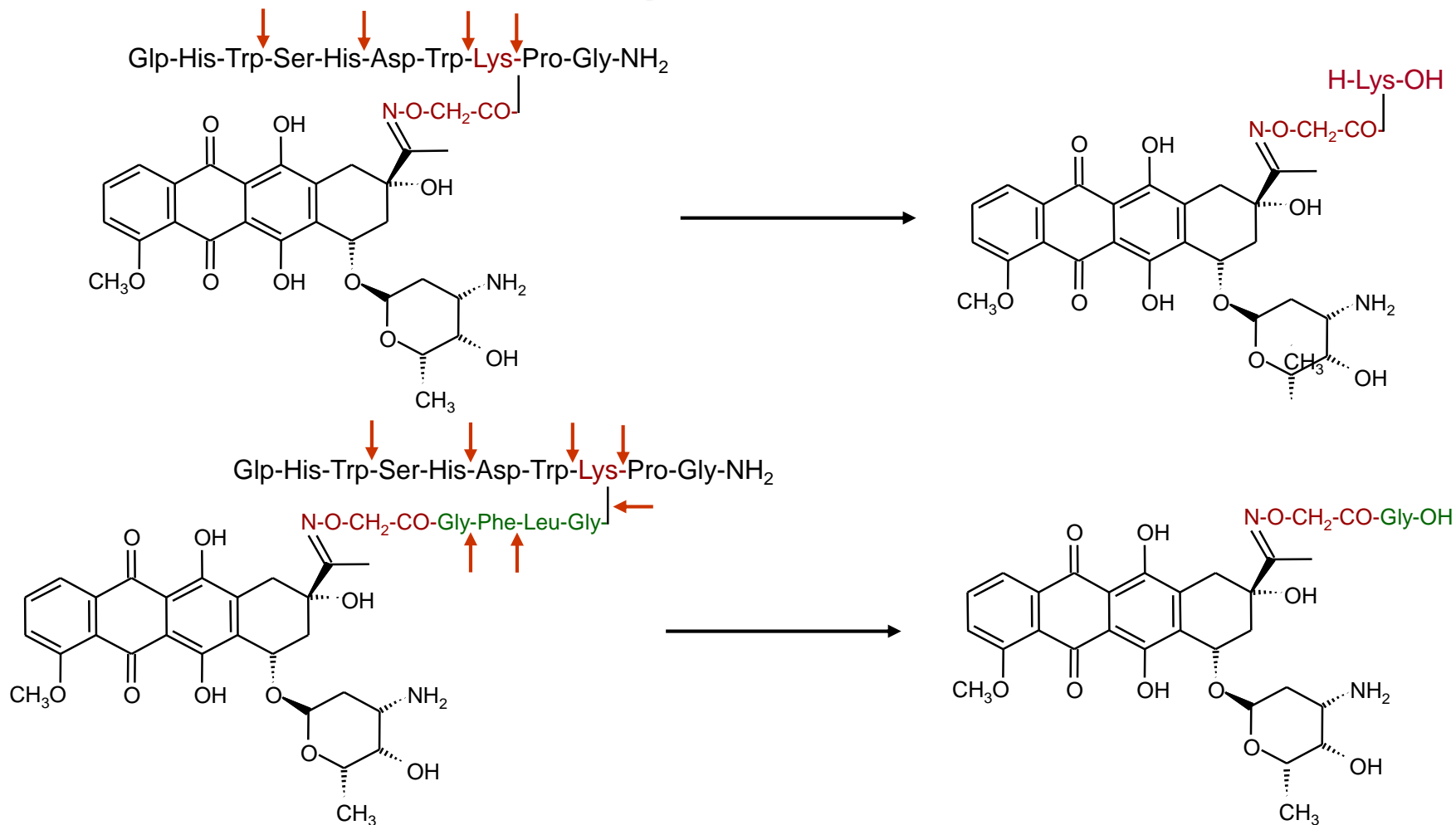
A peptid kötődik a tüdő tumorszövethez, de csak minimálisan az egészséges tüdő szövethez.

Hatékonyabb konjugátum kiválasztása Ala-szken segítségével



Kód	Konjugátum	Citosztázis (IC ₅₀ (μM)) (24 órás kezelés + 48 óra)
KK06/2	Dau=Aoa-LRRY-VHLAGYAT-NH ₂	50,5 ± 5,5
KK11	Dau=Aoa-LRRY-VHLAGYA-NH ₂	60,9 ± 3,1
KK12	Dau=Aoa-LRRY-VHLAGAAT-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-AHLAGYAT-NH ₂	> 100

Az oxim-kötést tartalmazó Dau-GnRH-III konjugátumok lebomlása Katepszin B enzim hatására



Citosztatikus hatás (IC₅₀ μM)

MCF-7 (humán emlő):

7,8 ± 2,1

MCF-7 (humán emlő):

3,9 ± 1,2

HT-29 (humán vastagbél):

17,9 ± 4,0

HT-29 (humán vastagbél):

22,5 ± 1,7

Daunorubicin és daunorubicint tartalmazó metabolitok kötődése csirke eritrocita DNS-hez

Anyag	K (x 10⁵) (M⁻¹)	n
Dau	11,70	2,5
Dau=Aoa-OH	2,21	3,8
H-Lys(Dau=Aoa)-OH	6,80	3,0
Dau=Aoa-Gly-OH	6,74	3,5
Dau=Aoa-Arg-OH	6,78	3,2
Dau=Aoa-Tyr-OH	4,40	3,5
Dau=Aoa-Leu-OH	3,23	3,6
GnRH-III(Dau=Aoa)	0,83	4,2

K: kötődési állandó; n: kizárési paraméter

Dau – COOH közelsége gátolja a kötődést

Bázisos aminosav (esetleg ikerionos szerkezet miatt) segíti a kötődést

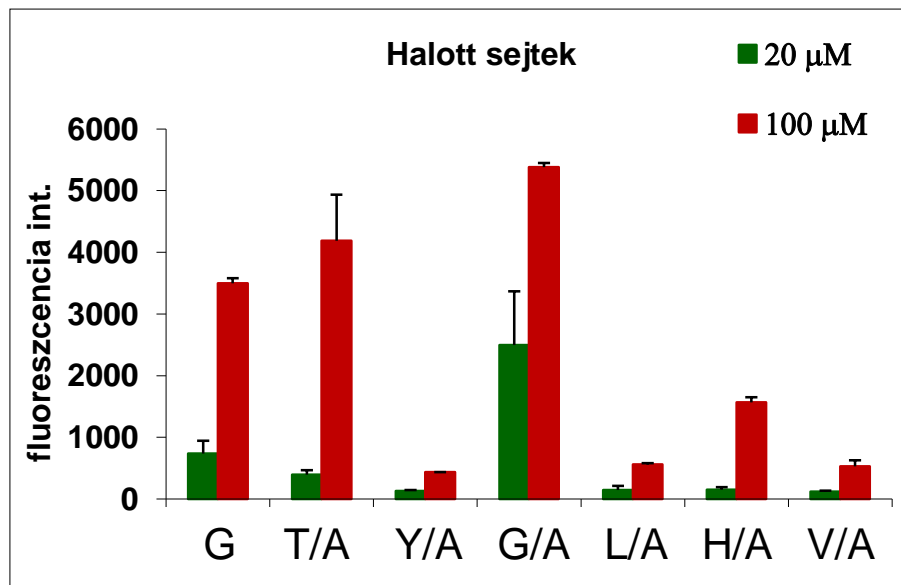
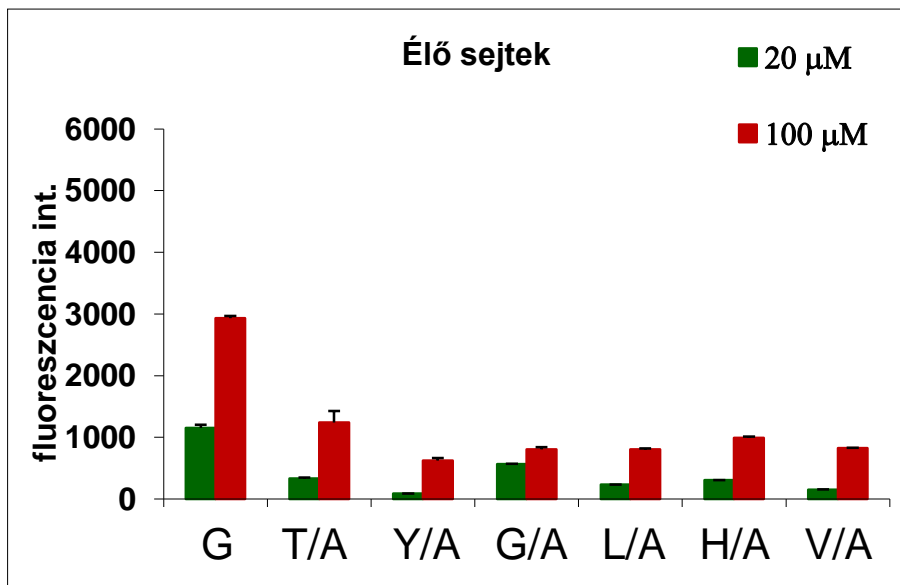
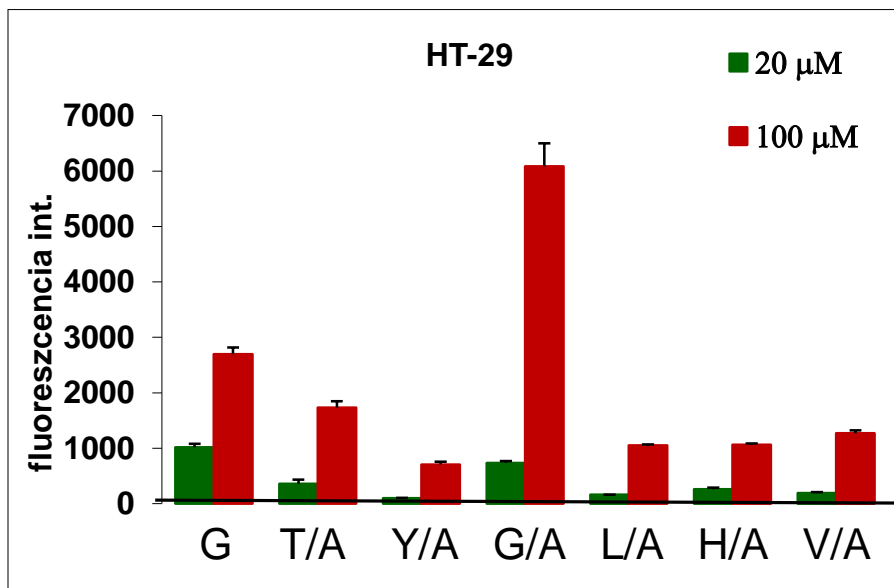
Nagy térkitöltésű oldalláncot tartalmazó aminosav gátolja a kötődést

Orbán E., et al. Amino Acids 41(2): 469-483 (2011)

Orbán E., et al. Bioconjugate Chemistry 22(10): 2154-2165 (2011)

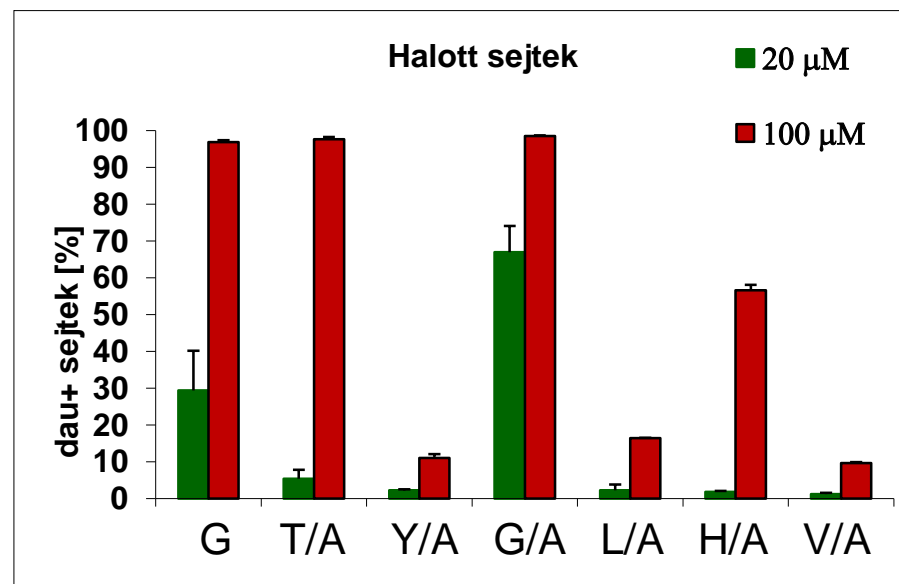
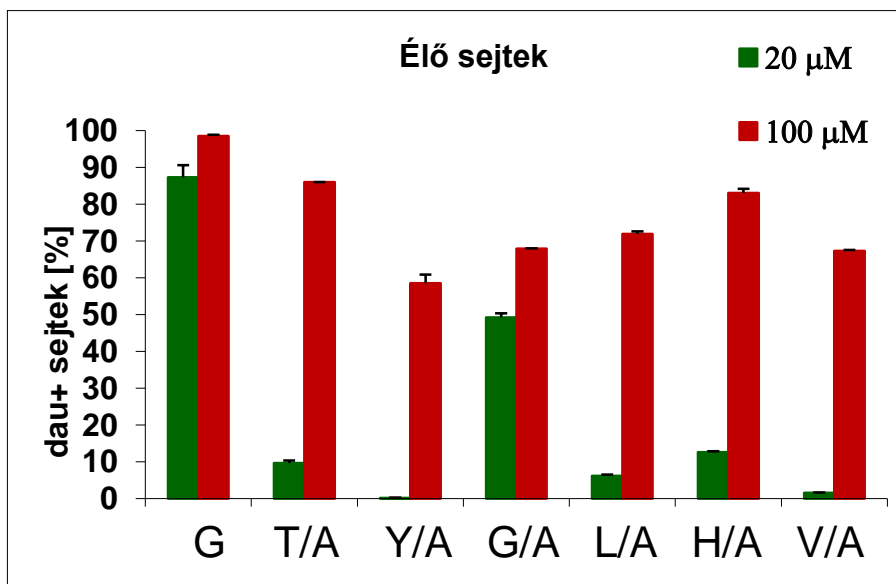
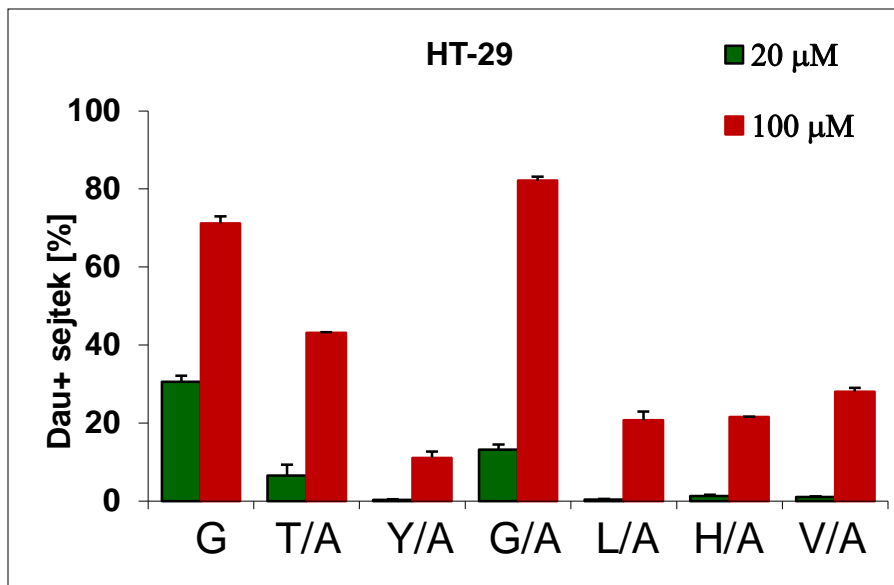
Konjugátumok sejtfelvételének tanulmányozása áramlási citométerrel

3 órás kezelés



Konjugátumok sejtfelvételének tanulmányozása áramlási citométerrel

3 órás kezelés



Konjugátumok sejt felvételének vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal

Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂

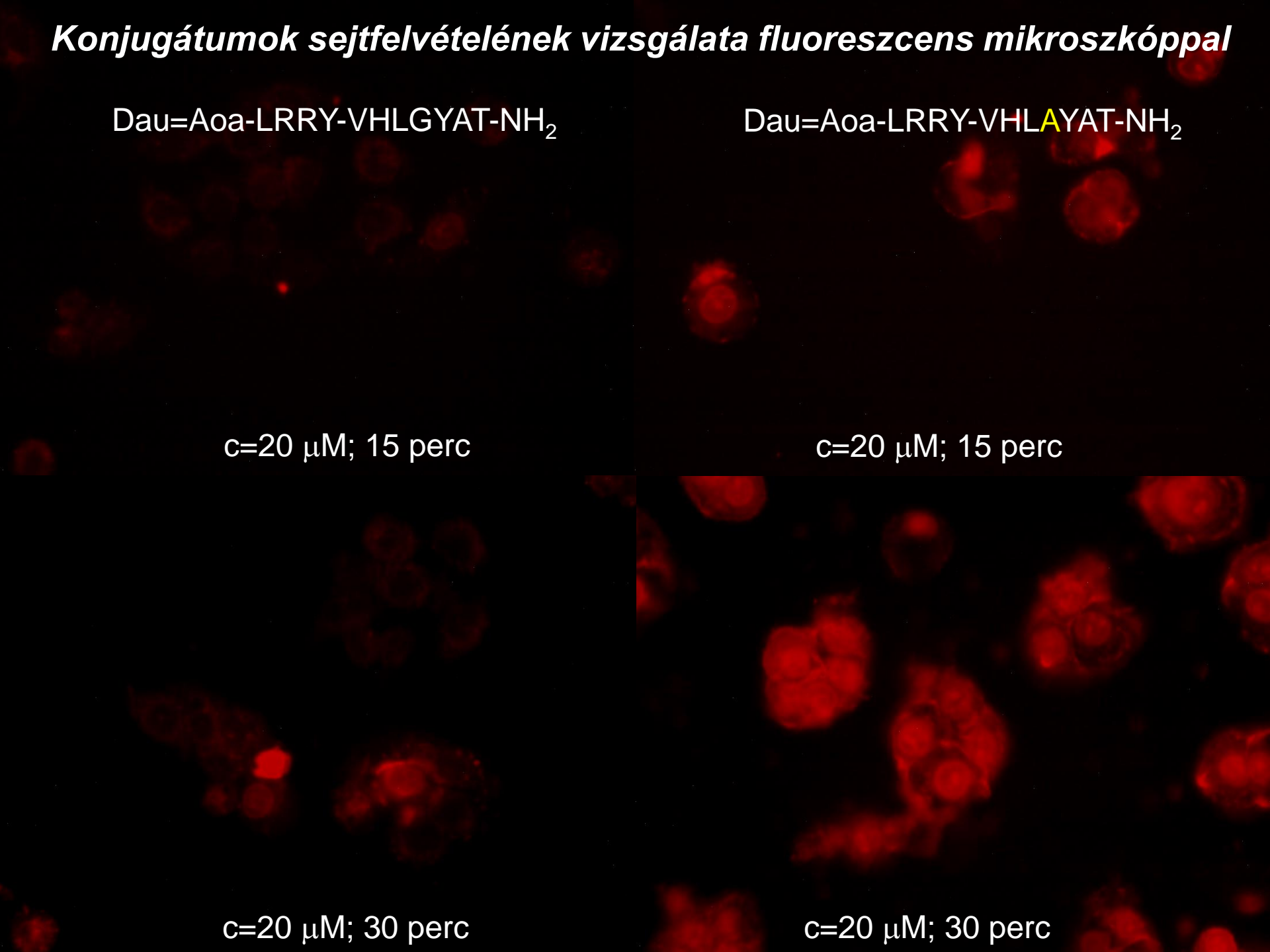
Dau=Aoa-LRRY-VHLYAT-NH₂

c=20 μM; 15 perc

c=20 μM; 15 perc

c=20 μM; 30 perc

c=20 μM; 30 perc

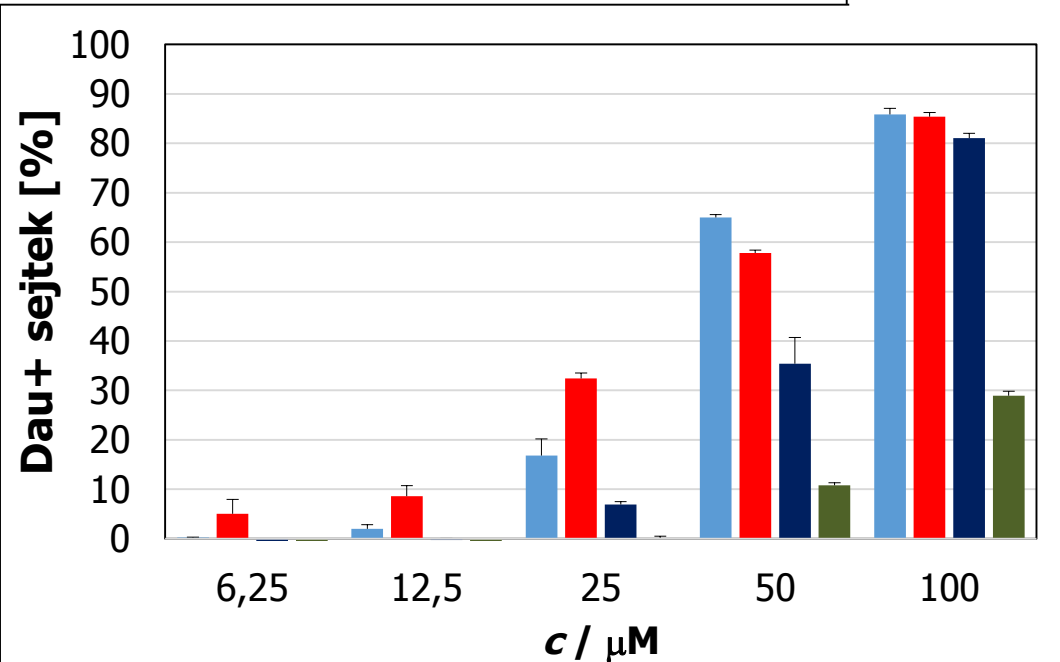
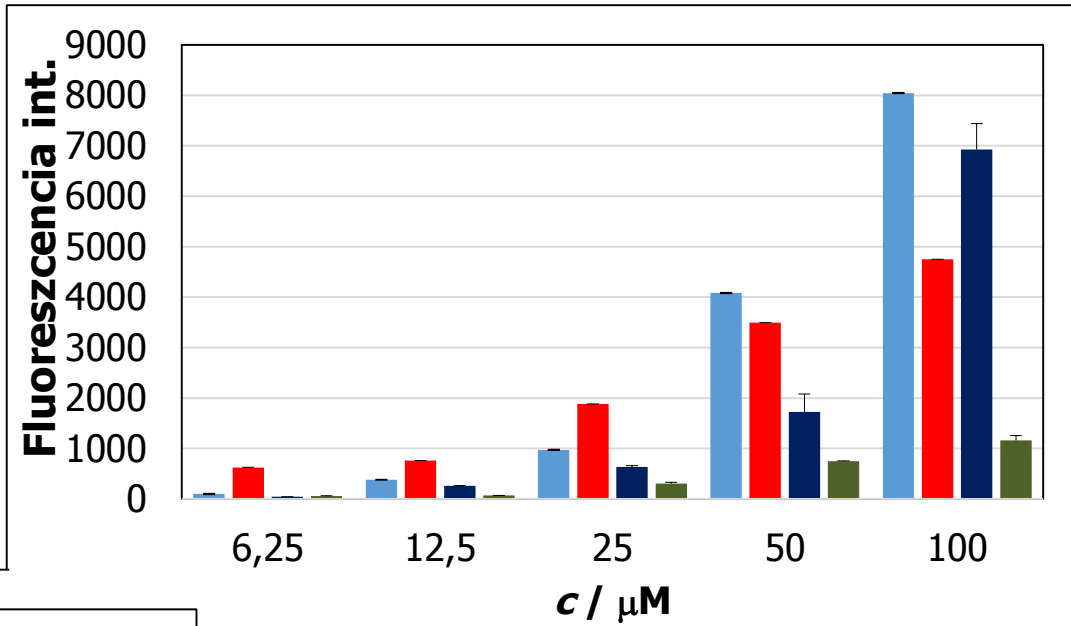


Hatékonyabb konjugátum kiválasztása Ala-szken majd pozíciós szkennelés segítségével

	V	H	L	G	Y	A	T	50,5 ± 5,5	<p>IC₅₀ értékek 24 + 48 óra kezelés MTT teszt</p>
	A	H	L	G	Y	A	T	>100	
	V	A	L	G	Y	A	T	26,8 ± 0,4	
	V	H	A	G	Y	A	T	>100	
Dau=Aoa-LRRY-	V	H	L	A	Y	A	T	14,0 ± 1,5	
	V	H	L	G	A	A	T	>100	
	V	H	L	G	Y	A	A	60,9 ± 3,1	
	V	H	L	A	Y	A	T	27,9 ± 6,4	
	V	H	L	K	Y	A	T	50,3 ± 3,0	
	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	6,6 ± 2,9	
	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	

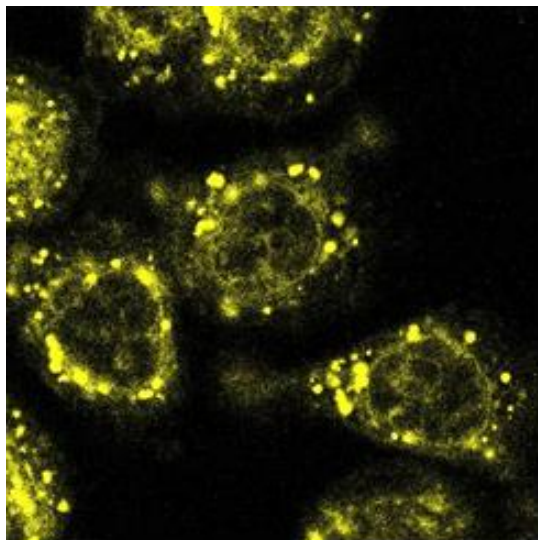
In vitro sejtbejutási vizsgálatok áramlási citométerrel

- Dau=Aoa-LRRY-VHLA_YAT-NH₂
- Dau=Aoa-LRRY-VHLY_FAT-NH₂
- Dau=Aoa-LRRY-VHLS_YAT-NH₂
- Dau=Aoa-LRRY-VHLP_YAT-NH₂

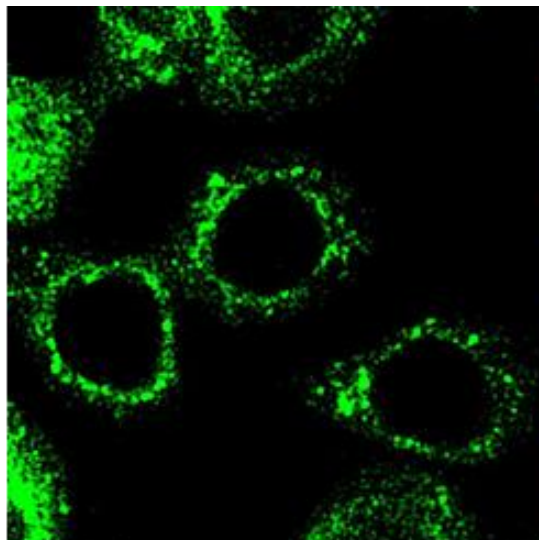


A daunomicin (Dau) sejtfelvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal (0,5 órás kezelés)

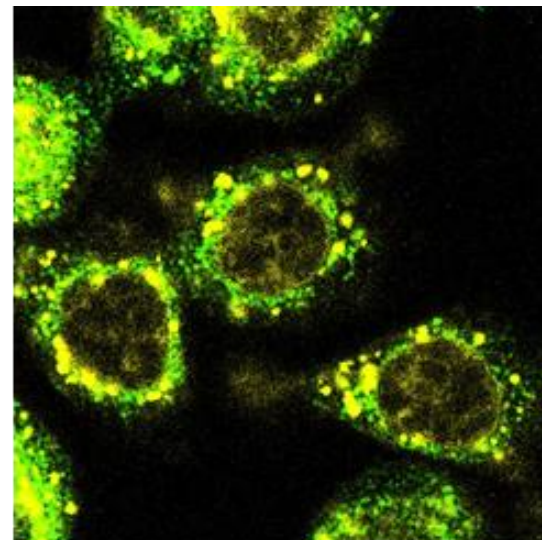
Dau



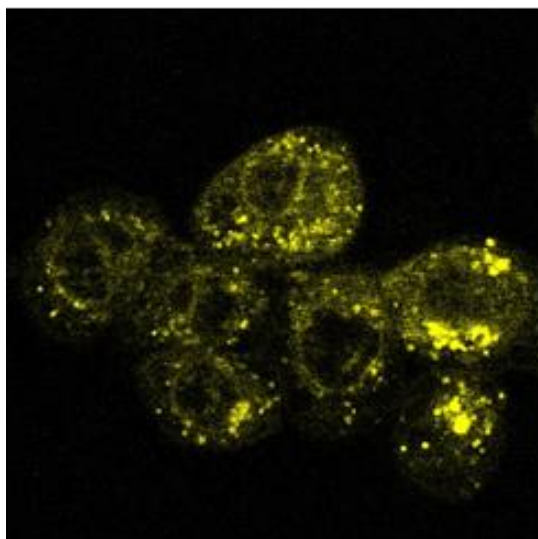
LysoTracker



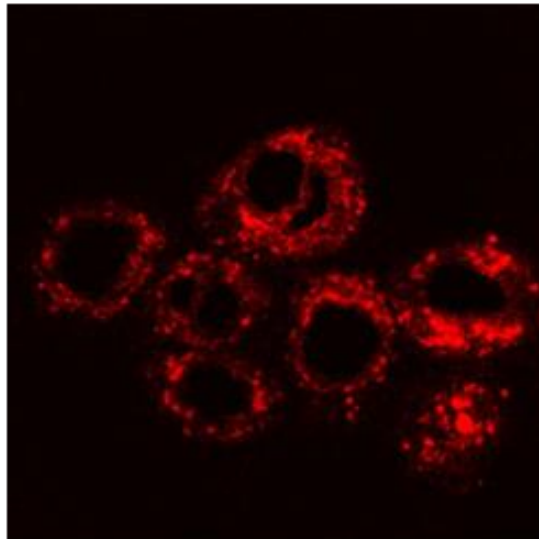
Dau + LysoTracker



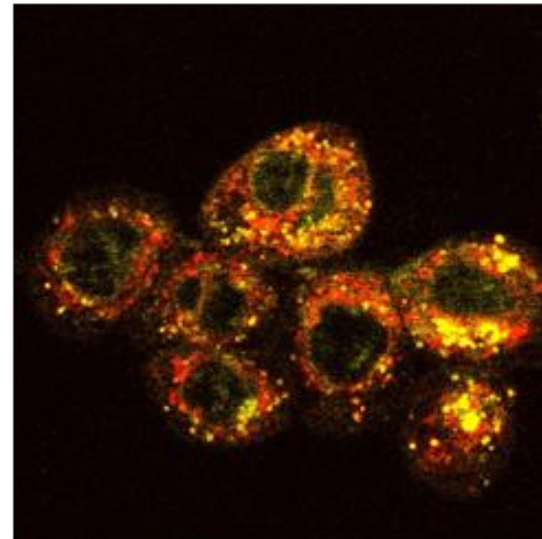
Dau



MitoTracker

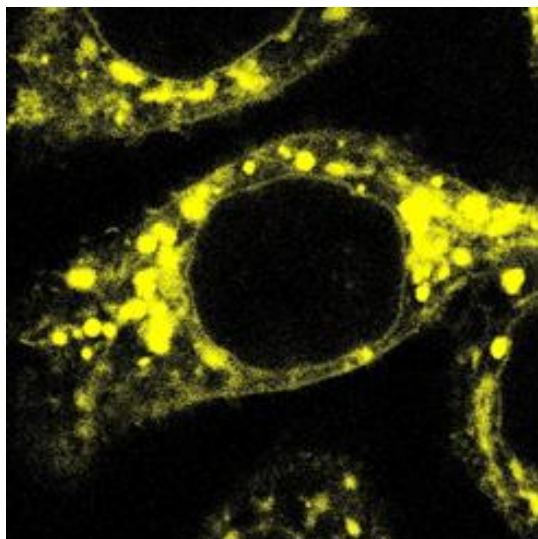


Dau + MitoTracker

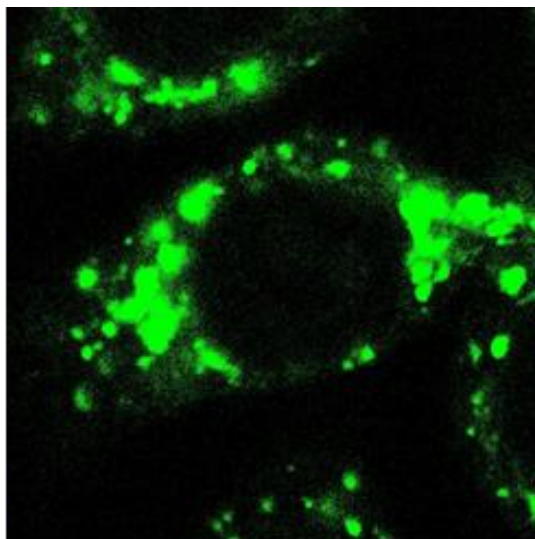


A *Dau=Aoa-Leu-OH* metabolit sejtfelvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal (0,5 órás kezelés)

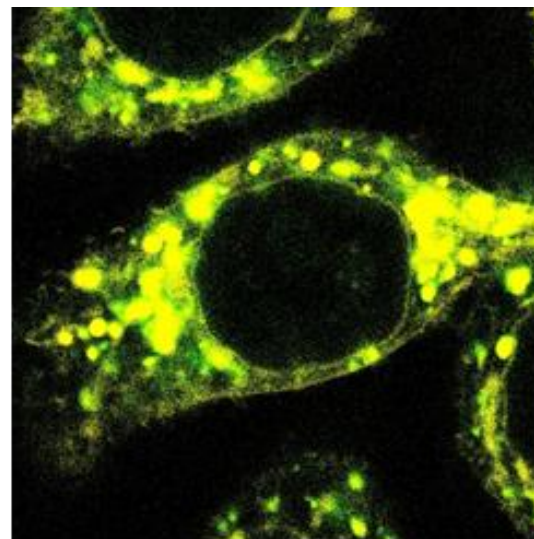
Dau



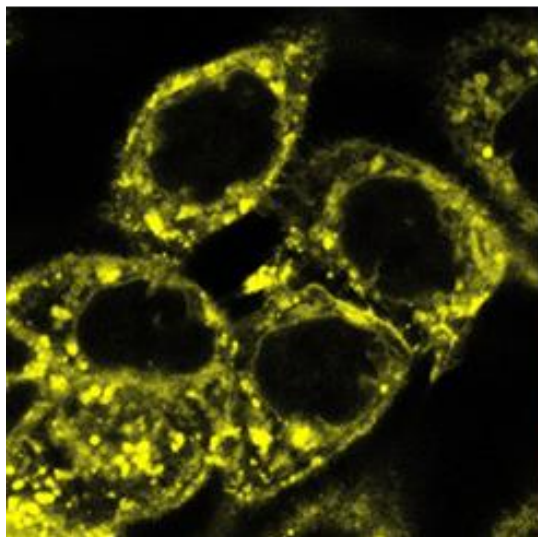
LysoTracker



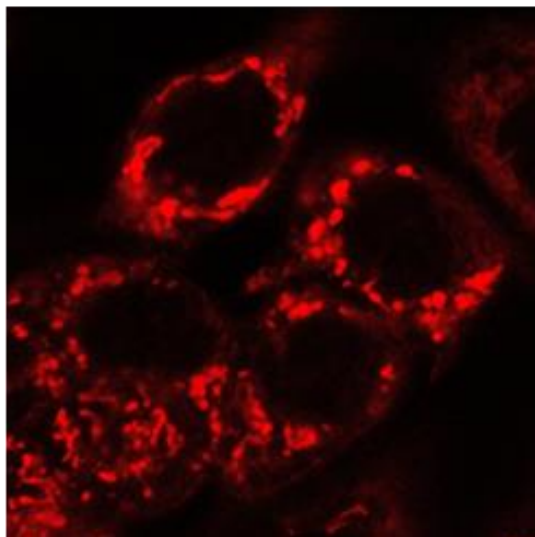
Dau + LysoTracker



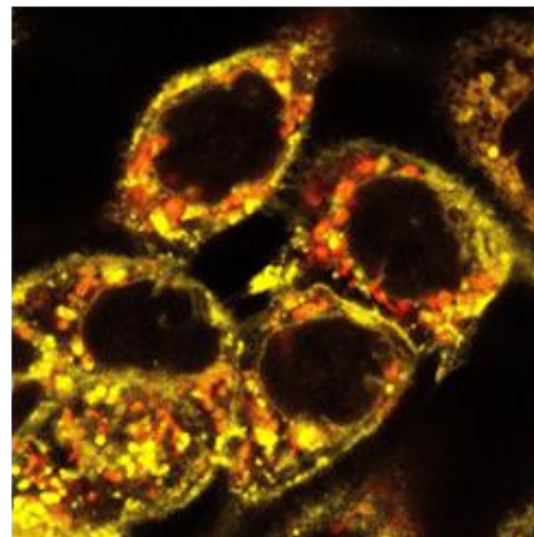
Dau



MitoTracker

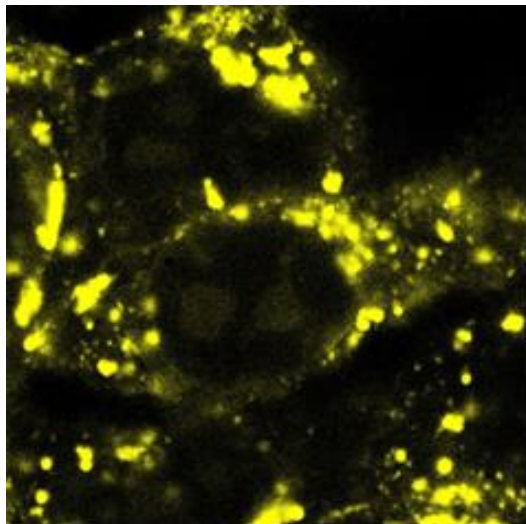


Dau + MitoTracker

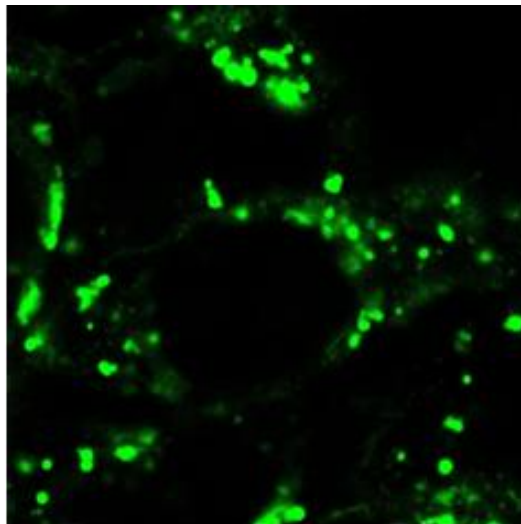


A Dau=Aoa-LRRY-VHLAYAT-NH₂ konjugátum sejtfelvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal (1,5 órás kezelés)

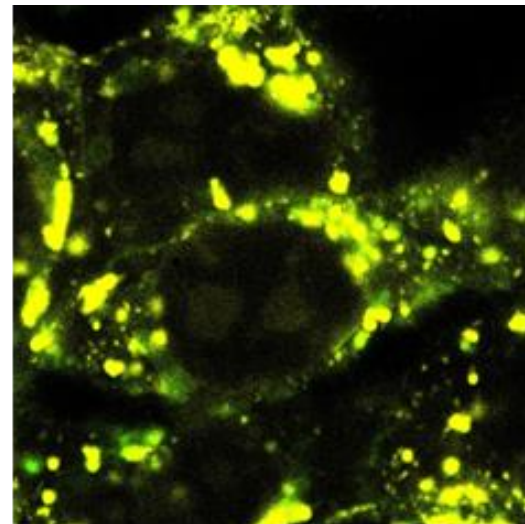
G/A



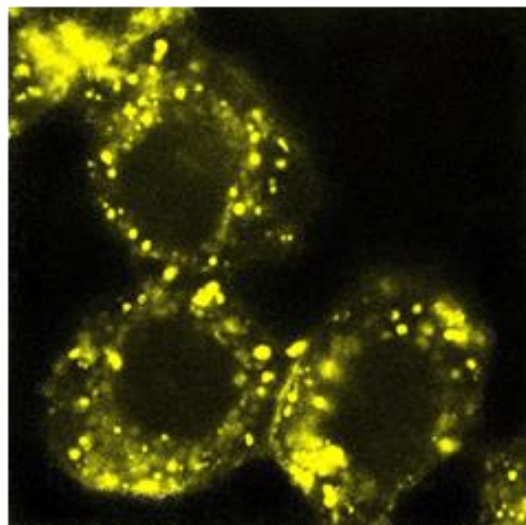
LysoTracker



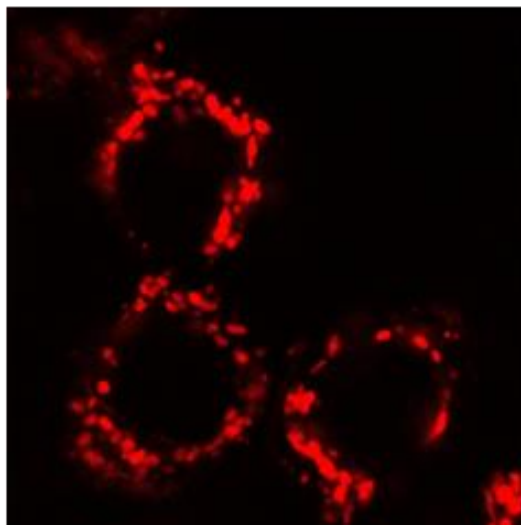
G/A + LysoTracker



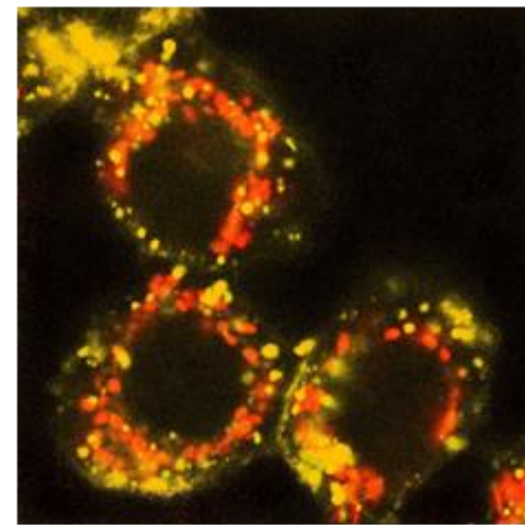
G/A



MitoTracker

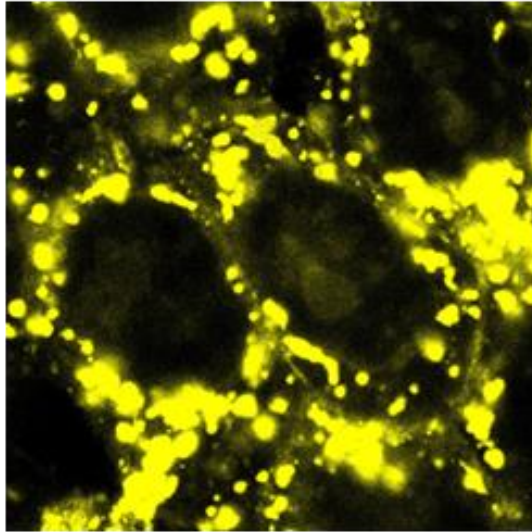


G/A + MitoTracker

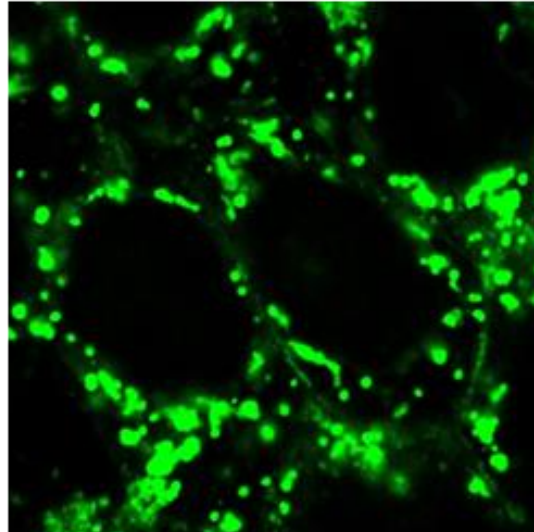


A Dau=Aoa-LRRY-VHLYAT-NH₂ konjugátum sejt felvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal (1,5 órás kezelés)

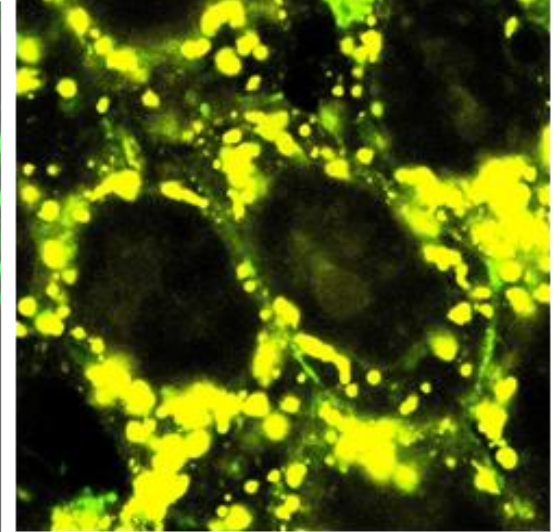
G/F



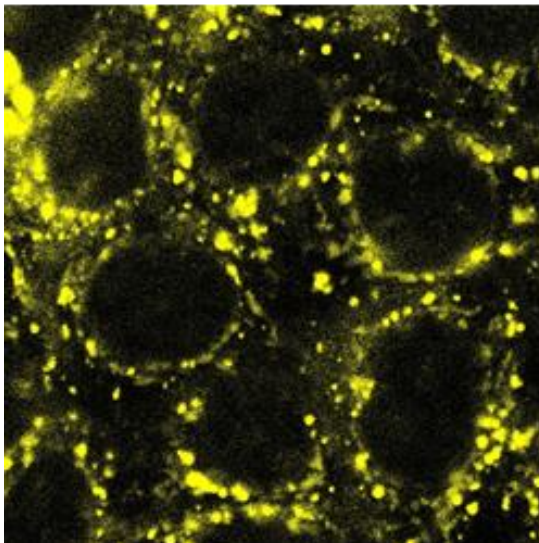
LysoTracker



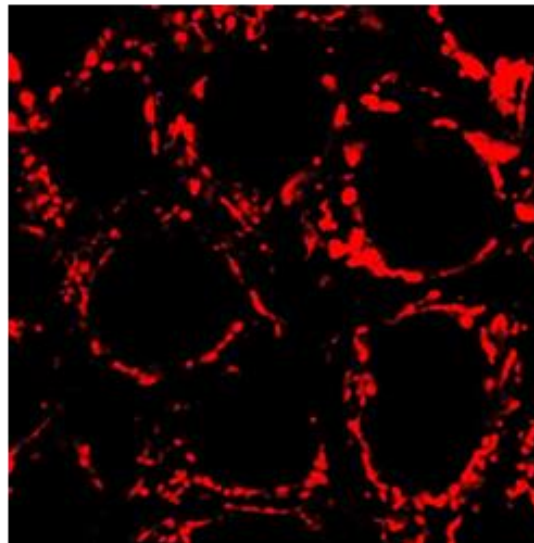
G/F + LysoTracker



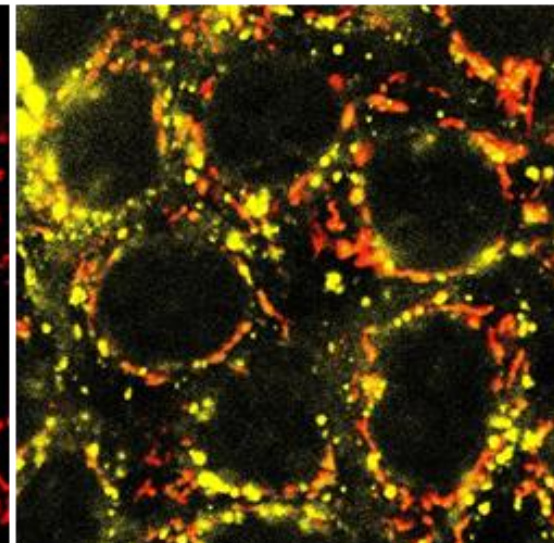
G/F



MitoTracker

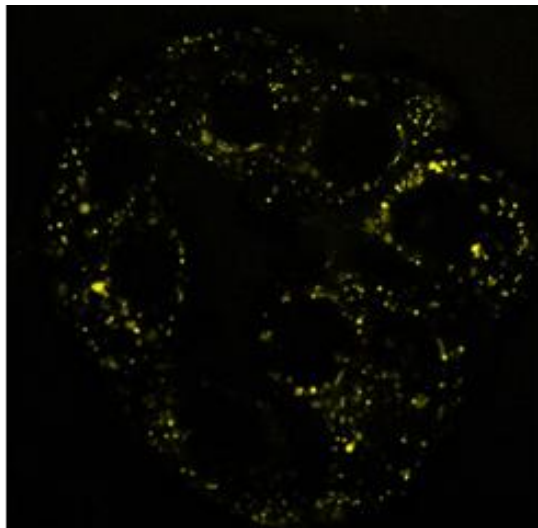


G/F + MitoTracker

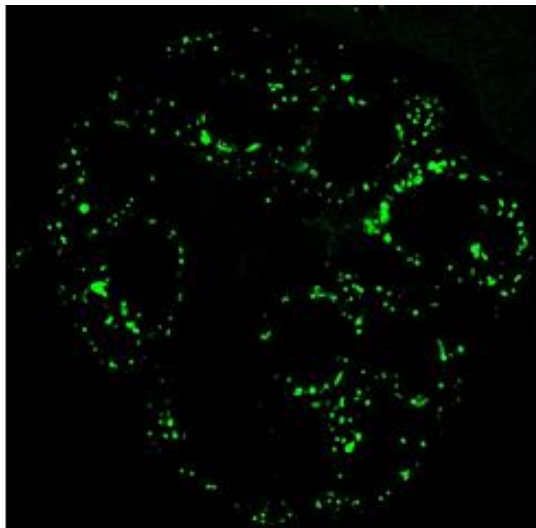


A Dau=Aoa-LRRY-VHLPYAT-NH₂ konjugátum sejt felvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal (1,5 órás kezelés)

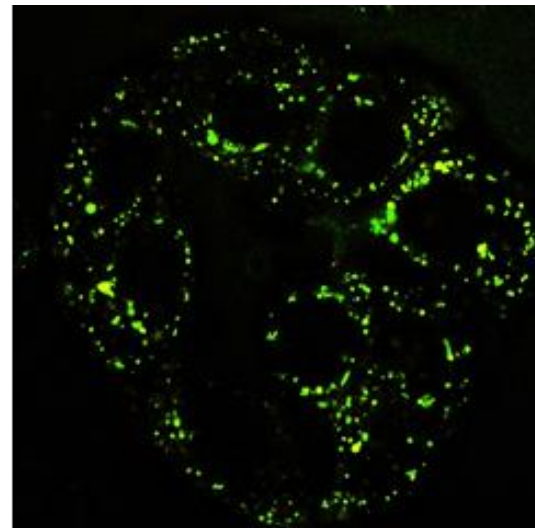
G/P



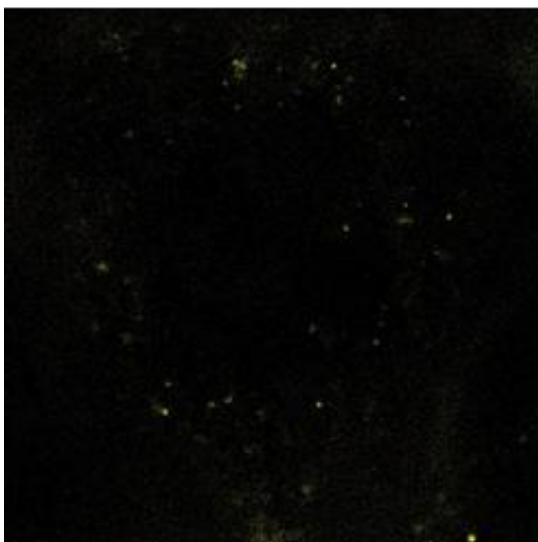
LysoTracker



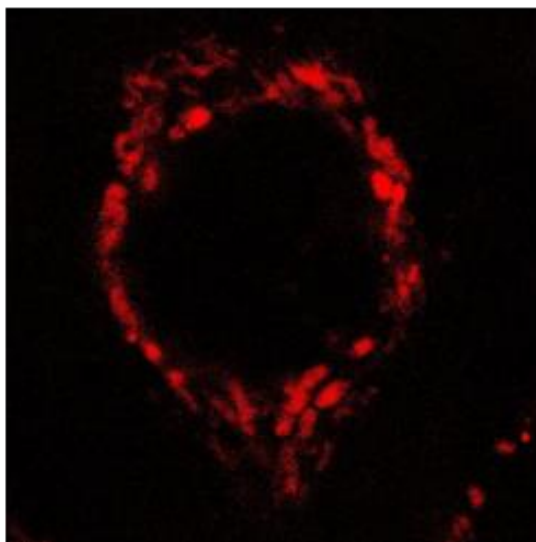
G/P + LysoTracker



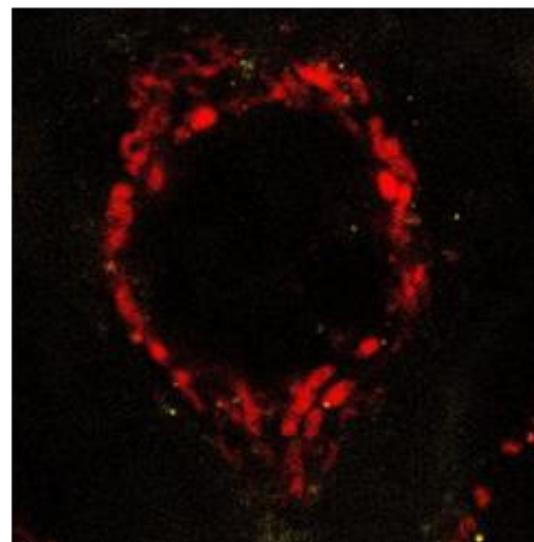
G/P



MitoTracker



G/P + MitoTracker



Összefoglalás

- A fág-bemutató technika alkalmas módszer hatékony tumorspecifikus irányító peptidek kiválasztására;
- A szelekciós lépések számának növelésével a kiválasztás hatékonysága javul;
- Azonban még így is lehetnek olyan komponensek, amelyek a populációból a vizsgálatra történő kiválasztáskor elvesznek, ezért a kapott szekvenciák módosításával az irányító peptidek receptor-felismerő képessége és kötődési erőssége növelhető;
- A változtatható helyek kiválasztására alkalmas módszer az Ala-szken, majd az alkalmas pozíciókban további aminosavak beépítésével a hatás fokozható;
- Lineáris peptidek esetén további módosítások szükségesek az szérum/enzim-stabilitás fokozása érdekében (ciklizálás, D- és/vagy nem természetes aminosavak beépítésével, retro-inverz szekvenciák (csupa D-aminosavból felépített fordított szekvenciájú peptid))
- Az oxim kötés kicserélése más linkerre, amelyből a szabad hatóanyag felszabadulhat

Támogatók



NK 77485

K 104045

K 119552



MSCA-ITN-2014-ETN:
Marie Skłodowska-Curie
Innovative Training Networks (ITN-ETN)



NVKP_16-1-2016-0036



MEDINPROT

Szinergia program
Műszer pályázat



Köszönöm a figyelmet!