



Új GnRH-hatóanyag konjugátumok

**Sabine Sschuster, Biri-Kovács Beáta, Borbély Adina,
Norbert Sewald, Cesare Gennari, Ines Neundorf,
Halmos Gábor, Mező Gábor***

ELTE TTK, Kémiai Intézet
ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport

University of Bielefeld, University of Milan, University of Cologne, Debreceni Egyetem



Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés
Balatonszemes
2019, 05, 28,



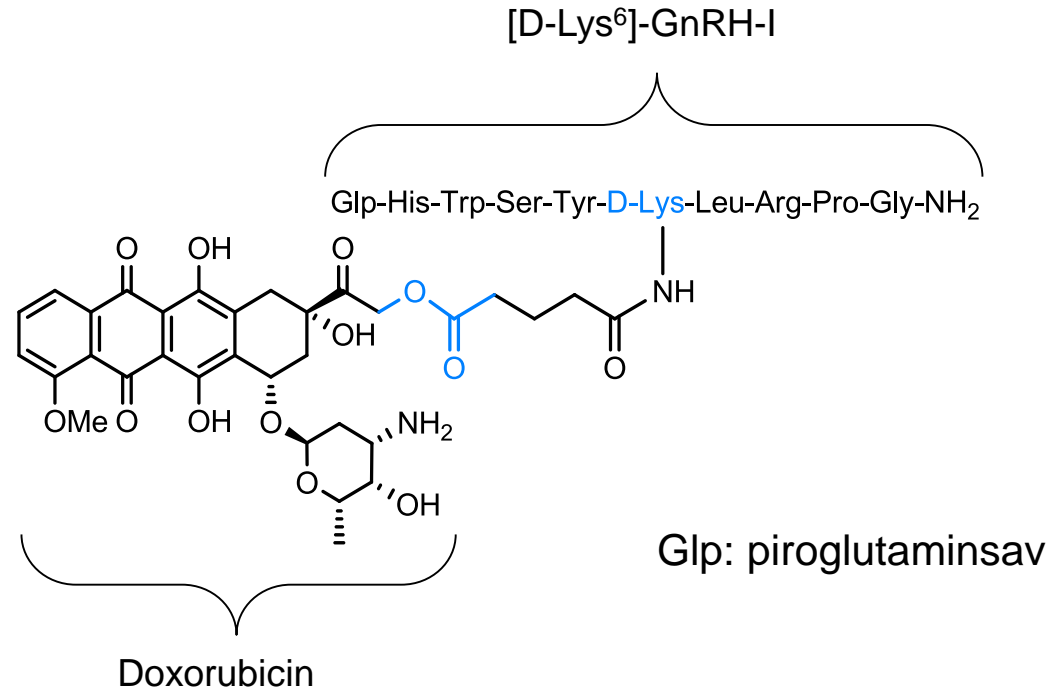
Doxorubicin-[D-Lys⁶]-GnRH-I (AEZS-108, AN-152)

Zoptarelin doxorubicin (AEterna Zentaris Inc,)



Andrew V, Schally

1977 Orvosi Nobel Díj



- [D-Lys⁶]-GnRH-I egy GnRH-I agonista analóg
- Észter-kötéssel kapcsolják a doxorubicinhez glutársav linkerén keresztül
- **Klinikai Fázis III-ben elbukott**
- **Észter-kötés gyors lebomlása humán szérumban ($t_{1/2} \sim 2$ óra) karboxil-észterázok hatására**

GnRH-III a nagy tengeri ingolából izolált GnRH analóg



GnRH-I: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

GnRH-III: Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

- *A GnRH receptor(ok)hoz kötődik a tumor sejteken*
- *500 – 1000-szor kisebb az endokrin hatása emlősökön, mint a humán GnRH-I*
- *Tumorelles hatását kimutatták emlő, prosztatata, méh, hasnyálmirigy, vastagbél daganat sejteken*

***GnRH-III: Hatásos szállító molekula lehet az irányított
tumorterápiában***

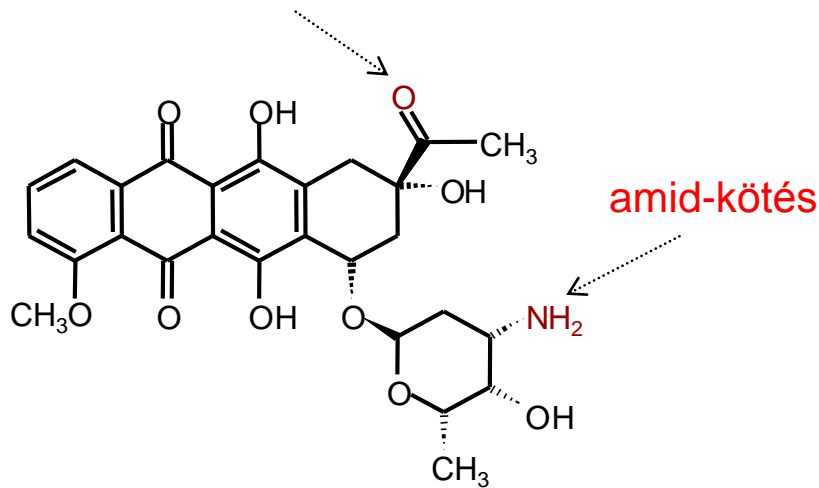
Daunomicin-GnRH-III konjugátumok tervezése



→ a Lys⁸ ε-aminocsoportja felhasználható konjugálásra

→ a Lys⁸ bázikus oldalláncának módosítása nem eredményezi a receptor kötődés és az antiproliferatív hatás elvesztését, de tovább csökken a hormon hatása

kemoszelektív ligáció:
oxim-, hidrazon-kötés



Toxikus mellékhatások:


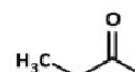
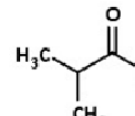
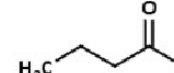
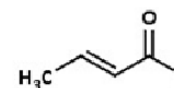
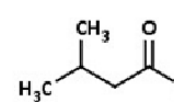
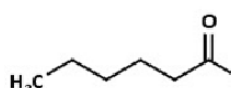
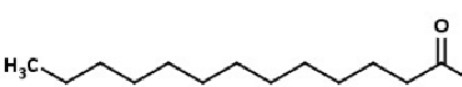
- emésztőrendszer, vese, máj, bőr toxicitás, stb,
- immunszupresszió, mieloszupresszió
- kardiotoxicitás

Daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok rövidszénláncú zsírsavakkal



Lizoszomális lebomlás:

H-Lys(Dau=Aoa)-OH legkisebb metabolit

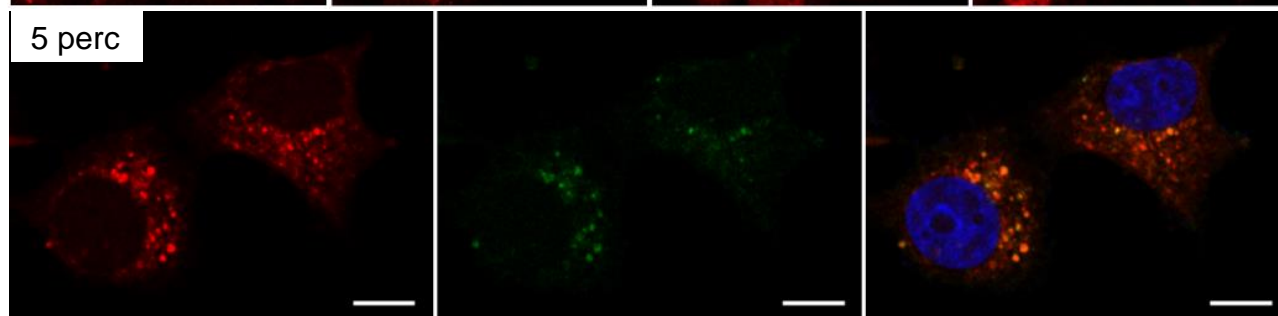
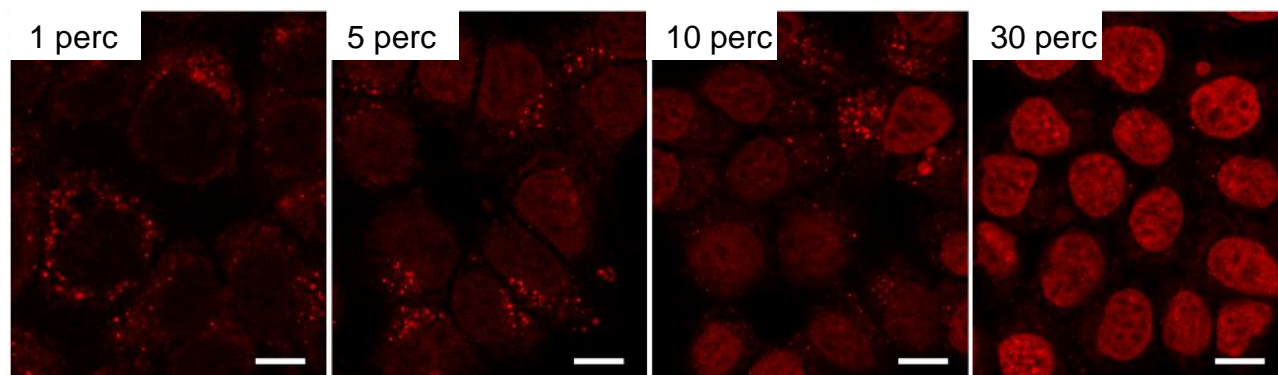
X=	Enzim stabilitás kimotripszin; 6 óra	Citosztázis (IC ₅₀)		
		MCF-7	HT-29	
 Ac acetil	44%	3,1±1,7	7,4 ±2,6	
 Pr propionil	55%	3,6±0,7	17,2±2,9	
kimagasló sejtfelvétel	 <i>i</i> Bu <i>izo</i> -butiril	10%	2,2±0,0	2,0±0,6
	 <i>n</i> Bu butiril	64%	0,7±0,2	2,2±0,6
 CA krotonil	50%	1,6±0,2	13,6±4,2	
 <i>i</i> VA <i>izo</i> -valeril	66%	2,5±0,5	16,4±4,5	
 Hex hexanoil	70%	1,5±0,4	20,1±4,2	
 Myr mirisztoil	n,a,	6,8±2,9	37,4±1,0	

A GnRH-III(⁴Lys(Bu),⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátum sejtbejutásának vizsgálata és gátlása

K2: Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂

Triptorelin: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (szuper agonista)

Konfokális mikroszkópos vizsgálat

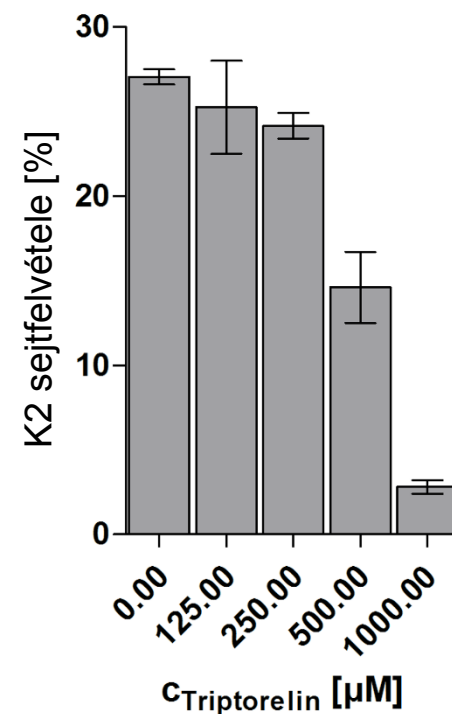


K2 konjugátum

lizoszóma festés

kolokalizáció
+ DAPI sejtmagfestés

Áramlási citometria

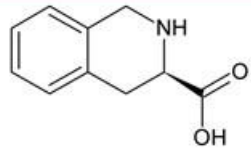


Célkitűzés

Új hatékonyabb GnRH-III – hatóanyag konjugátumok előállítása:

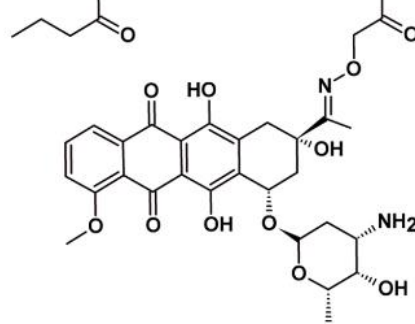
- A GnRH-III peptid szekvenciájának módosítása nem természetes aminosavak beépítésével
- Más típusú hatóanyagok konjugálása a legjobb GnRH-III analógokhoz
- Linkerek összehasonlítása a biológiai hatékonyság szempontjából

A régi és az új vezérmolekula sejtbejutásának és receptorkötődésének vizsgálata



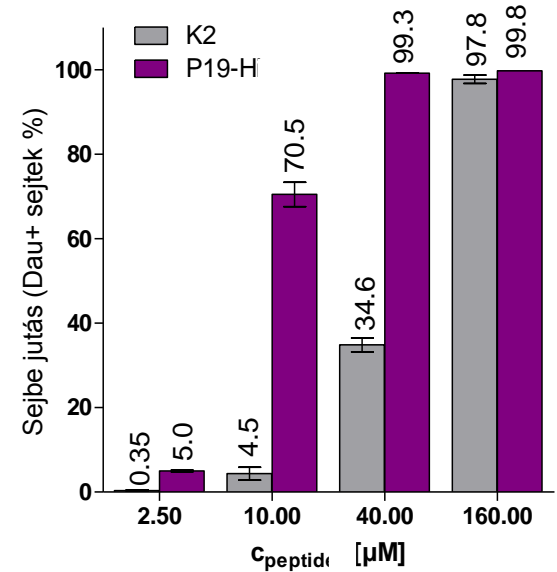
H-D-Tic-OH
(*R*)-1,2,3,4-tetrahidro
izokinolin-3-
karbonsav

Glp-His-Trp-Lys-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

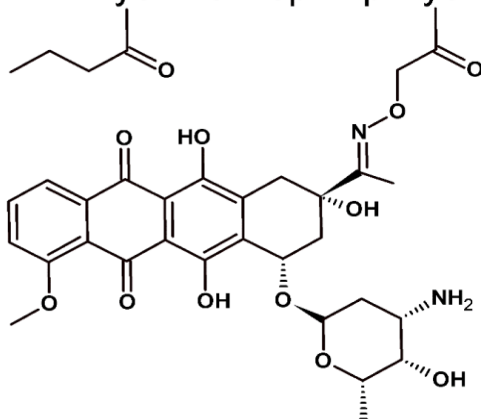


K2

MCF-7 emlő tumorsejteken



Glp-D-Tic-Lys-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



¹²⁵I-triptorelin leszorítási kísérlet

konjugátum	humán hipofízis	humán prosztata tumorszövet
K2	3,59±2,17	3,43±2,01
P19-H	3,53±0,96	2,79±1,24

az értékek nM-ban kifejezve

A konjugátumok hatása különböző tumorsejt típusokon

Tumor típus (sejtvonal)	Dau (IC ₅₀ ; nM)	K2 (IC ₅₀ ; µM)	K/2 / Dau	P19-H (IC ₅₀ ; µM)	P19-H/ Dau	K2 / P19-H
Petefészek (A2780)	10,4 ± 1,5	1,4 ± 1,1	132,0	2,1 ± 0,5	197,2	0,67
Melanoma (egér B16)	25,9 ± 8,0	3,2 ± 0,9	123,4	1,0 ± 0,2	39,0	3,20
Tüdő (H1975)	20,9 ± 2,7	4,1 ± 0,1	196,0	2,3 ± 0,7	109,2	1,41
Fej-nyaki (PE/CA PJ41)	45,6 ± 33,6	4,7 ± 0,8	104,0	1,7 ± 0,5	36,7	2,77
Prosztata (DU145)	16,3 ± 4,6	5,3 ± 0,5	325,3	2,0 ± 0,2	125,9	2,65
Petefészek (OVCAR-8)	185,6 ± 99,8	5,6 ± 0,8	30,4	9,4 ± 0,8	50,9	0,60
Emlő (MDA-MB-231)	54,6 ± 7,4	5,8 ± 0,8	106,8	1,9 ± 0,2	34,2	3,05
Prosztata (PC-3)	117,5 ± 8,6	6,3 ± 0,3	193,6	2,3 ± 0,6	71,8	2,74
Emlő (egér 4T1)	56,0 ± 14,7	6,3 ± 0,9	112,3	1,8 ± 0,1	31,3	3,50
Máj (HepG2)	22,9 ± 1,4	6,8 ± 0,3	296,2	2,2 ± 0,7	96,6	3,09
Fej-nyaki (PE/CA PJ15)	50,5 ± 38,7	7,4 ± 0,8	145,7	2,8 ± 0,6	56,3	2,64
Melanoma (A2058)	35,0 ± 14,9	8,4 ± 0,3	239,3	2,6 ± 0,5	73,3	3,23
Glioma (U87MG)	126,4 ± 53,7	9,0 ± 0,8	71,4	2,3 ± 0,1	18,2	3,91
Tüdő (A549)	69,3 ± 23,5	9,6 ± 0,6	138,8	4,3 ± 0,4	61,6	2,23
Tüdő (H1650)	50,3 ± 13,4	10,5 ± 1,1	208,5	4,0 ± 0,8	78,6	2,63
Vastagbél (egér C26)	117,5 ± 8,6	10,6 ± 0,2	89,8	2,6 ± 0,7	22,3	4,08
Melanoma (WM983b)	49,8 ± 22,9	12,6 ± 1,5	254,0	2,5 ± 0,6	51,0	5,04
Melanoma (M1/9)	27,5 ± 9,1	13,5 ± 1,1	491,5	2,9 ± 0,6	105,6	4,66
Vastagbél (HT-29)	52,6 ± 3,6	15,5 ± 1,7	294,5	7,3 ± 0,3	138,8	2,12
Melanoma (M24)	118,8 ± 25,0	16,1 ± 0,1	135,9	3,4 ± 0,7	28,9	4,74
Emlő (MCF-7)	63,8 ± 21,0	16,5 ± 1,3	257,7	3,9 ± 0,8	61,5	4,23
Petefészek (OVCAR-3)	404,0 ± 9,4	46,0 ± 1,3	113,8	8,2 ± 0,5	20,2	5,61
Hasnyálmirigy (PANC-1)	525,9 ± 24,7	> 100	>200	56,4 ± 4,5	107,3	>2
Fibroblaszt (MRC-5)	287,6 ± 35,1	41,9 ± 3,8	145,7	19,7 ± 1,2	68,4	2,13

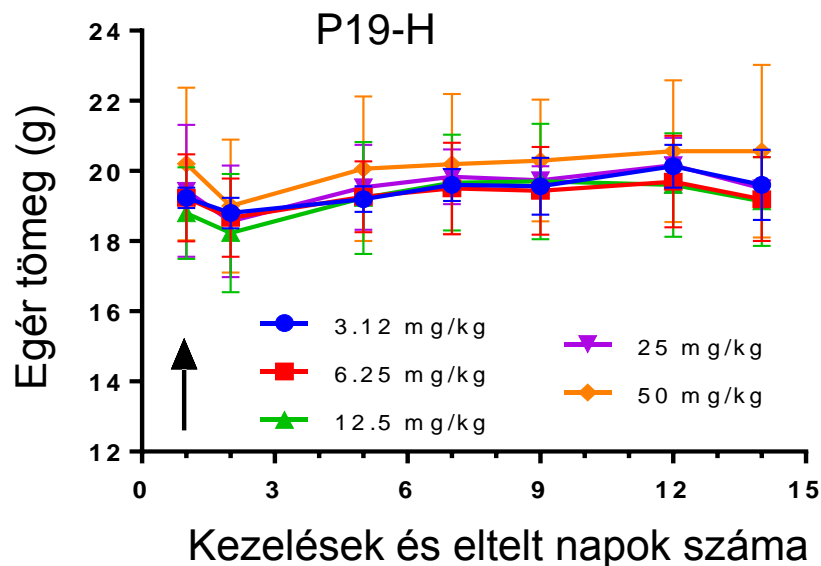
In vivo vizsgálatok a régi és az új vezérmolekulákkal

K2: Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂

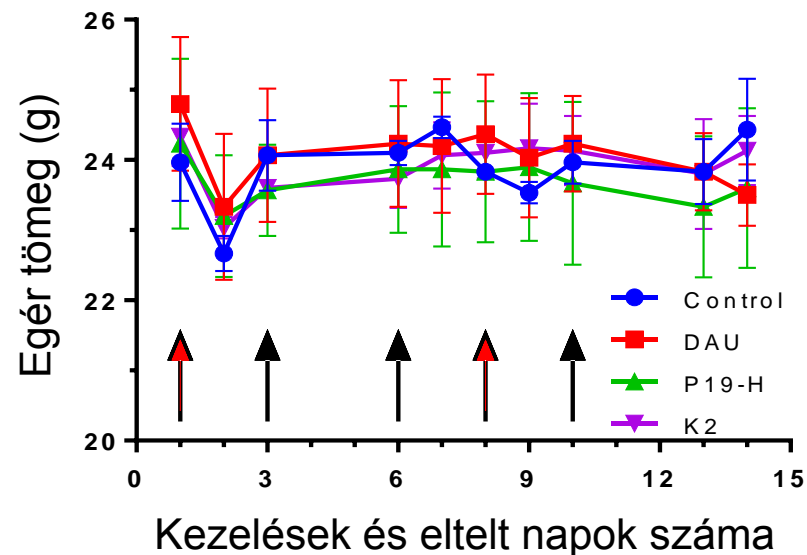
P19-H: Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂

Akut (A) és krónikus (B) toxicitási vizsgálatok (BALB/c nőstény egereken):

A)



B)

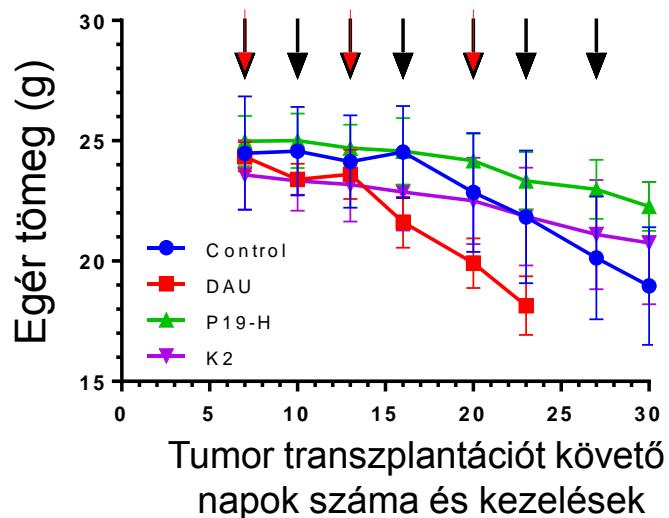


→ Kezelés konjugátummal
→ Kezelés daunomicinnel

Dau kezelés: 1mg/ttkg
Konjugátum: 15 mg/ttkg Dau tartalom

Tumornövekedés gátlása orthotopikus HT-29 vastagbél tumoron

(Immunhiányos SCID egerek)



→ Kezelés konjugátummal

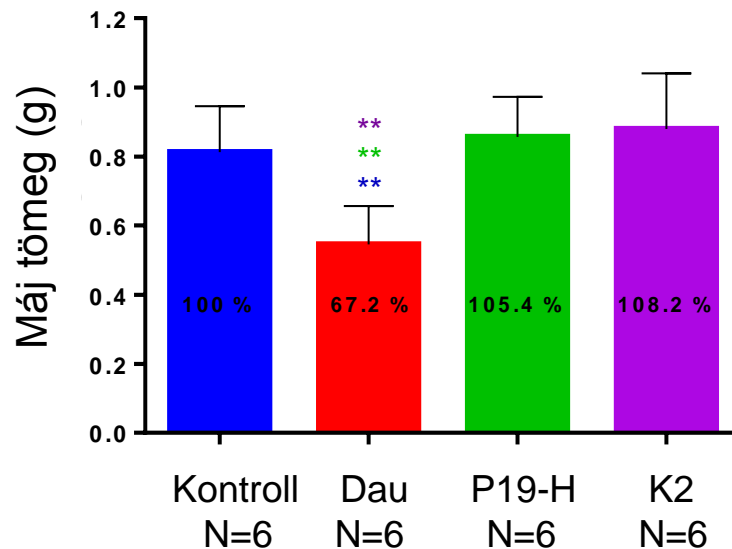
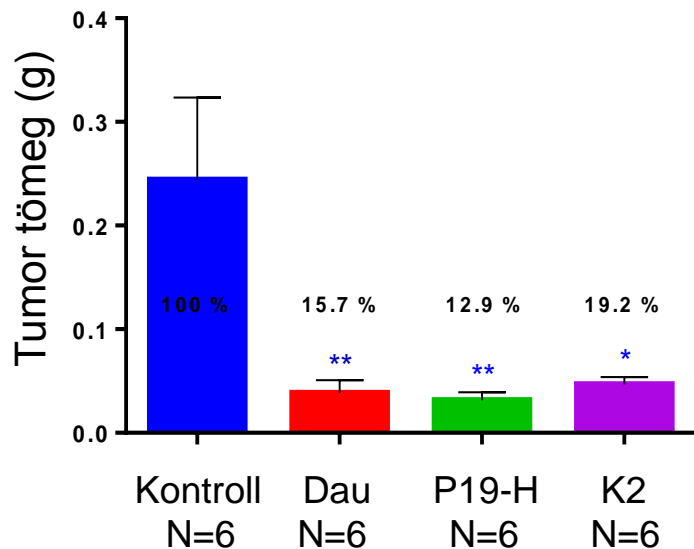
→ Kezelés daunomicinnel

Dau kezelés: 1mg/ttkg

Konjugátum: 15 mg/ttkg Dau tartalom

Terminálás: Dau (23, nap)

Konjugátumok (30, nap)



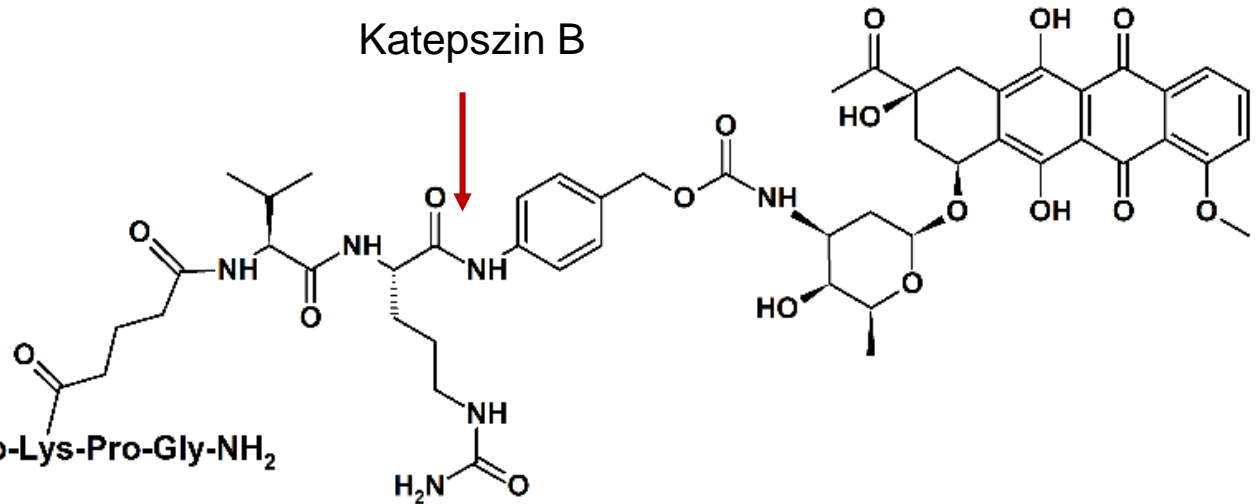
Val-Cit-PABC „self immolative” spacer tartalmazó GnRH-III származék – Dau konjugátumok

45

MW: 2399,57 Da
m = 3,9 mg (70%)

Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

Katepszin B

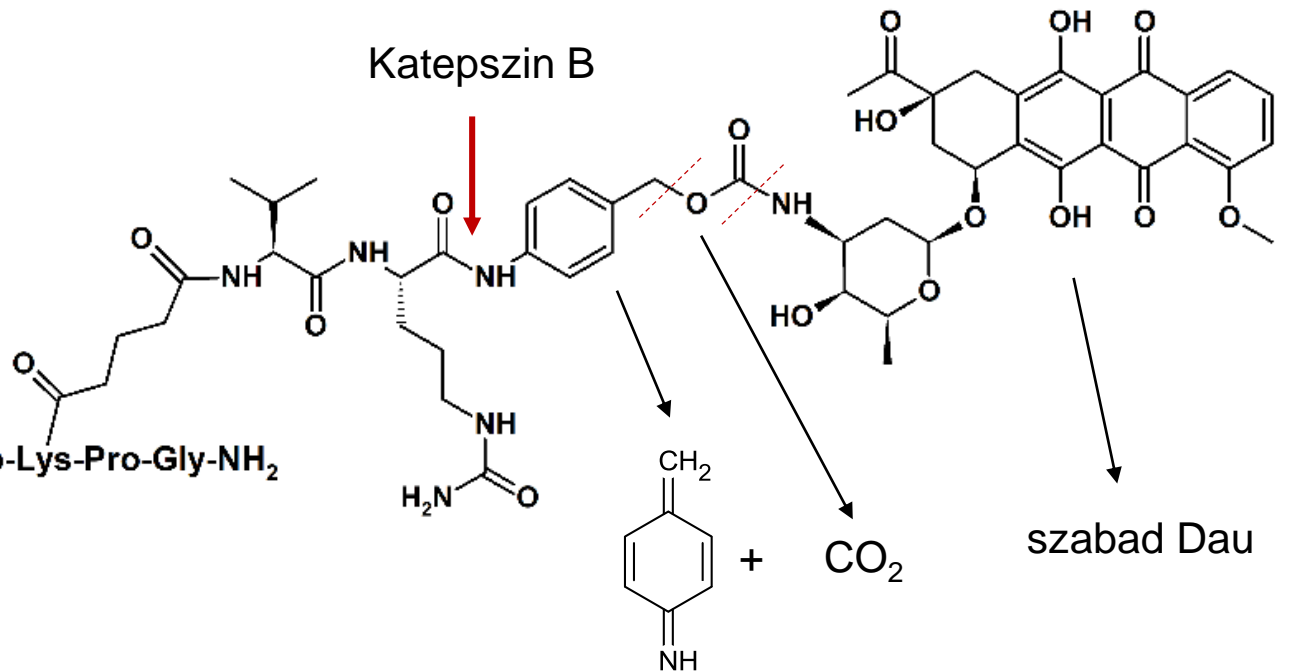


46

MW: 2235,40 Da
m = 6 mg (62%)

Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

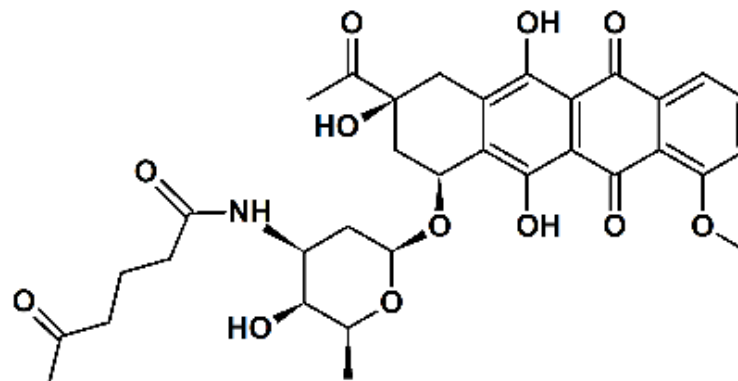
Katepszin B



Nem hasítható spacer tartalmazó GnRH-III származék – Dau konjugátum

57

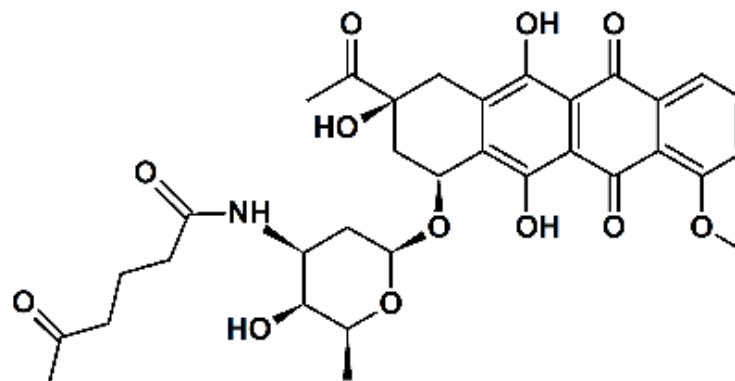
MW: 1994,1198 Da
m = 7,3 mg (52%)



Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

58

MW: 1829,9552 Da
m = 6,5 mg (50%)



Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

A konjugátumok tumorellenes hatása erősen GnRH-R pozitív (A2780) és gyengén pozitív (Panc-1) tumorsejteken

Kód	GnRH-III származék	Spacer	IC₅₀ [μM] A2780	IC₅₀ [μM] Panc-1
Dau			0,21 ± 0,01	2,43 ± 0,58
45	-His-Trp-Lys(Bu)-	-Val-Cit-PABC-	11,18 ± 0,38	85,57 ± 24,33
46	-D-Tic-Lys(Bu)-	-Val-Cit-PABC-	4,24 ± 1,09	> 100
47	-His-Trp-Lys(Bu)-	-Val-Ala-PABC-	7,48 ± 0,66	56,19 ± 17,28
48	-D-Tic-Lys(Bu)-	-Val-Ala-PABC-	2,85 ± 0,90	> 100
57	-His-Trp-Lys(Bu)-	glutársav	67,88 ± 25,36	> 100
58	-D-Tic-Lys(Bu)-	glutársav	48,14 ± 0,47	>100

A2780: humán petefészek tumor

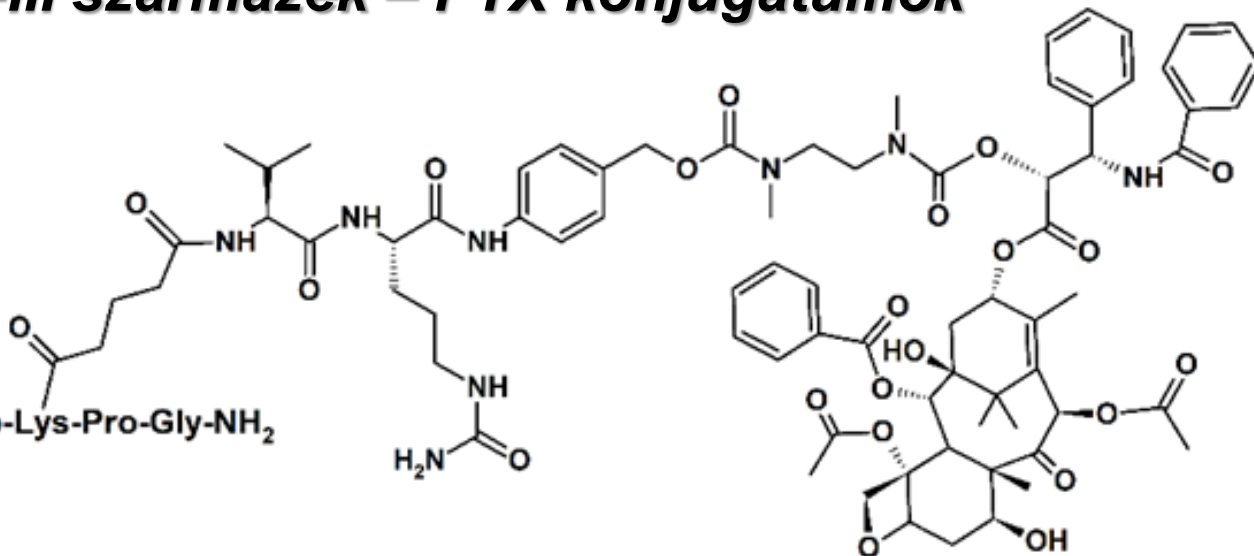
Panc-1: humán hasnyálmirigy tumor

Val-Cit-PABC „self immolative” spacer tartalmazó GnRH-III származék – PTX konjugátumok

49

MW: 2840,10 Da
m = 7,1 mg (84%)

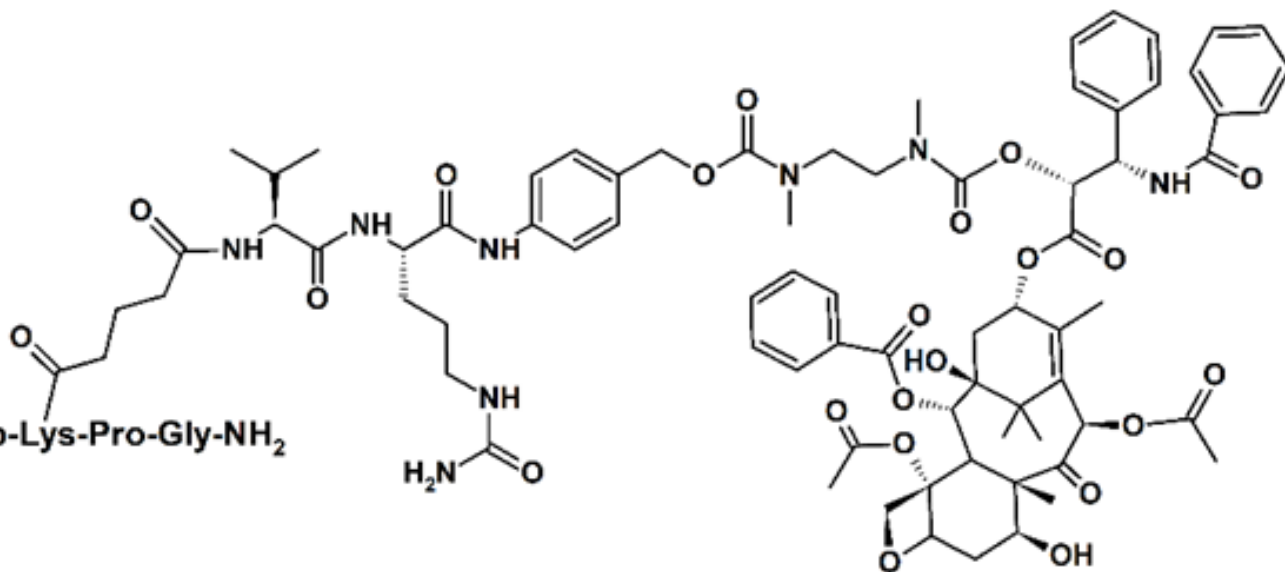
Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



50

MW: 2675,94 Da
m = 5,6 mg (77%)

Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

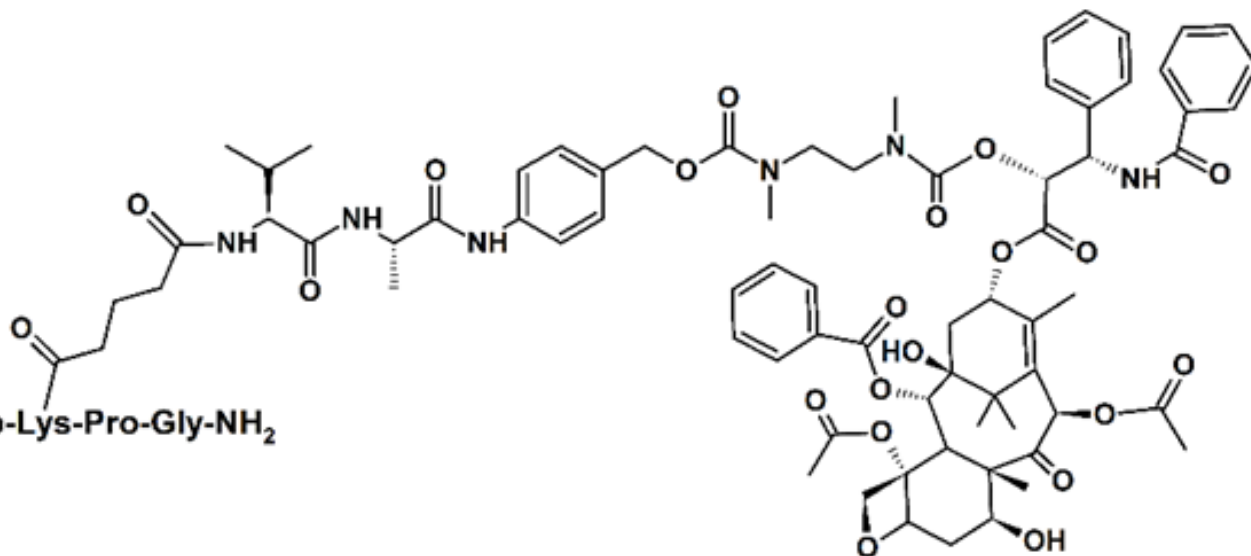


Val-Ala-PABC „self immolative” spacer tartalmazó GnRH-III származék – PTX konjugátumok

51

MW: 2754,01 Da
m = 4,7 mg (80%)

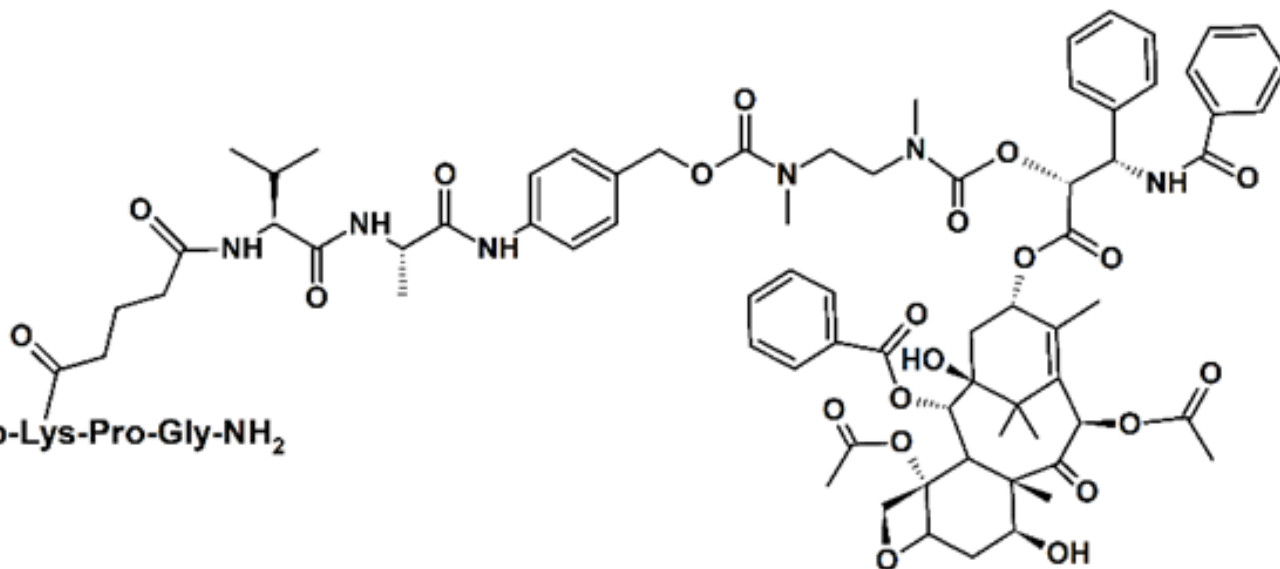
Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



52

MW: 2589,84 Da
m = 4,4 mg (56%)

Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

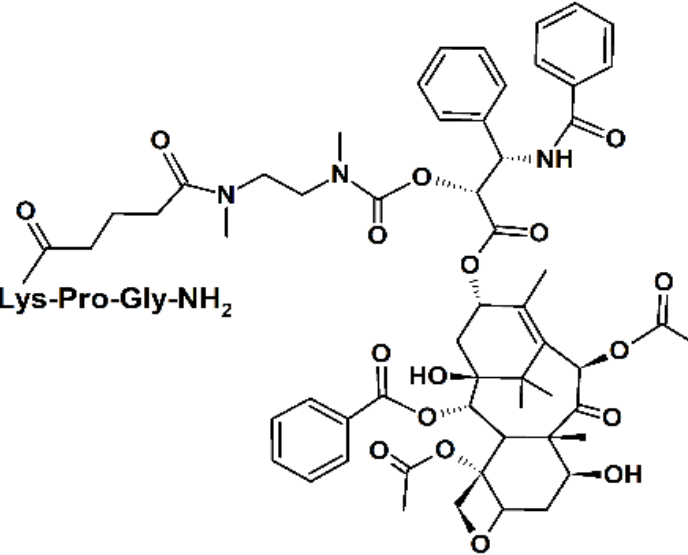


Nem hasítható spacer tartalmazó GnRH-III származék – PTX konjugátum

59

MW: 2434,6518 Da
m = 2,8 mg (53%)

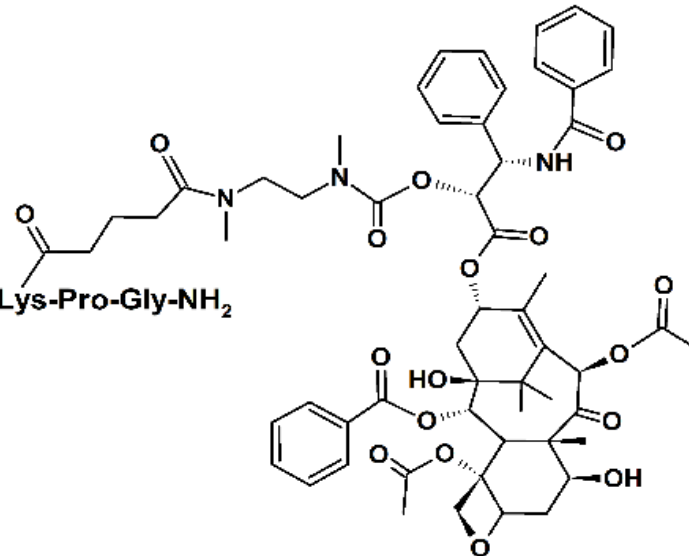
Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



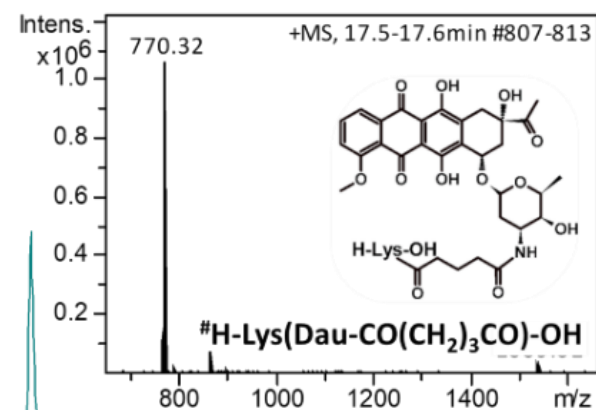
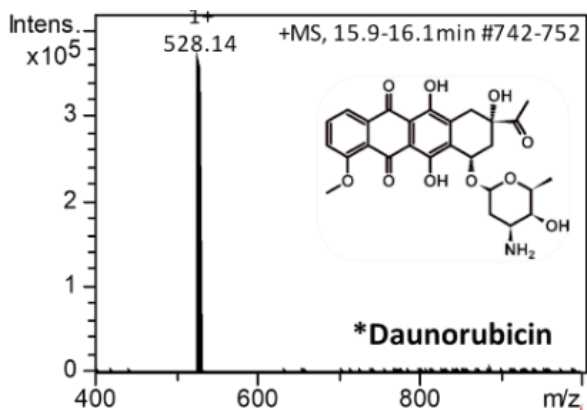
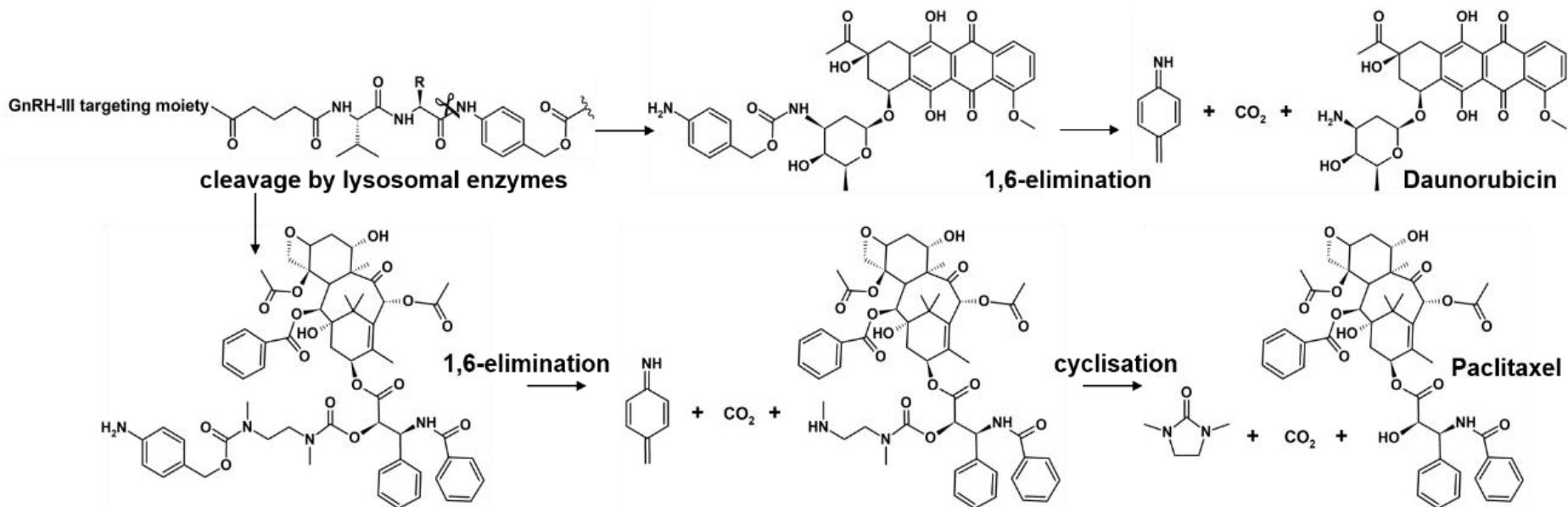
60

MW: 2270,4872 Da
m = 3,2 mg (65%)

Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



A konjugátumok lebomlásának mechanizmusa



cleavable linker:

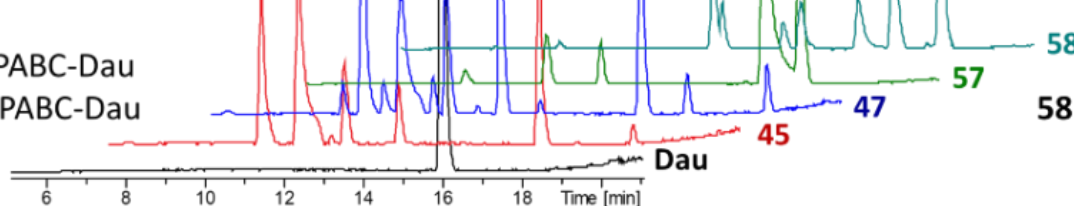
45 = His-Trp, Val-Cit-PABC-Dau

47 = His-Trp, Val-Ala-PABC-Dau

non-cleavable linker

57 = His-Trp, (CH₂)₃CO-Dau

58 = ΔHis-D-Tic, CO(CH₂)₃CO-Dau



A konjugátumok tumorellenes hatása erősen GnRH-R pozitív (A2780) és gyengén pozitív (Panc-1) tumorsejteken

Kód	GnRH-III származék	Spacer	IC₅₀ [μM] A2780	IC₅₀ [μM] Panc-1
PTX			0,02 ± 0,001	0,17 ± 0,01
49	-His-Trp-Lys(Bu)-	-Val-Cit-PABC-	0,67 ± 0,07	5,03 ± 1,91
50	-D-Tic-Lys(Bu)-	-Val-Cit-PABC-	0,51 ± 0,11	6,44 ± 1,22
51	-His-Trp-Lys(Bu)-	-Val-Ala-PABC-	0,66 ± 0,18	4,89 ± 1,08
52	-D-Tic-Lys(Bu)-	-Val-Ala-PABC-	0,77 ± 0,08	8,15 ± 3,22
59	-His-Trp-Lys(Bu)-	glutársav	41,52 ± 9,83	> 100
60	-D-Tic-Lys(Bu)-	glutársav	> 100	> 100

A2780: humán ovárium tumor

Panc-1: humán hasnyálmirigy tumor

Receptor kötődési vizsgálat [¹²⁵I][⁶D-Trp]-GnRH-I leszorítással

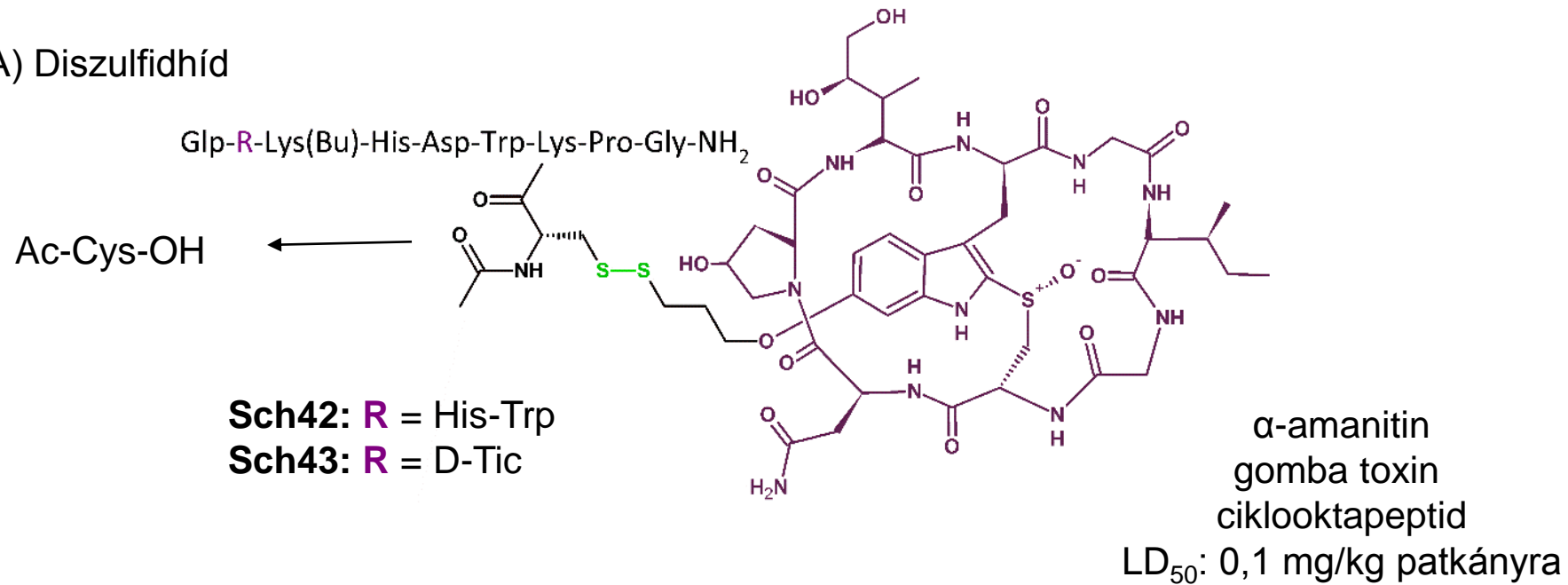
(Jód izotóppal jelzett triptorelin)

Kód	GnRH-III-[² ΔHis- ³ D-Tic- ⁴ Lys(Bu)- ⁸ Lys(linker-drog)]	IC ₅₀ [nM]	
		Hipofízis szövet	Prosztata tumor
P19-H	Dau=Aoa	3,53 ± 0,96	2,79 ± 1,24
48	-glutaril-Val-Ala-PABC-Dau	24,77 ± 2,1	20,54 ± 1,46
52	-glutaril-Val-Ala-PABC-diamin-PTX	10,82 ± 1,98	12,73 ± 2,23

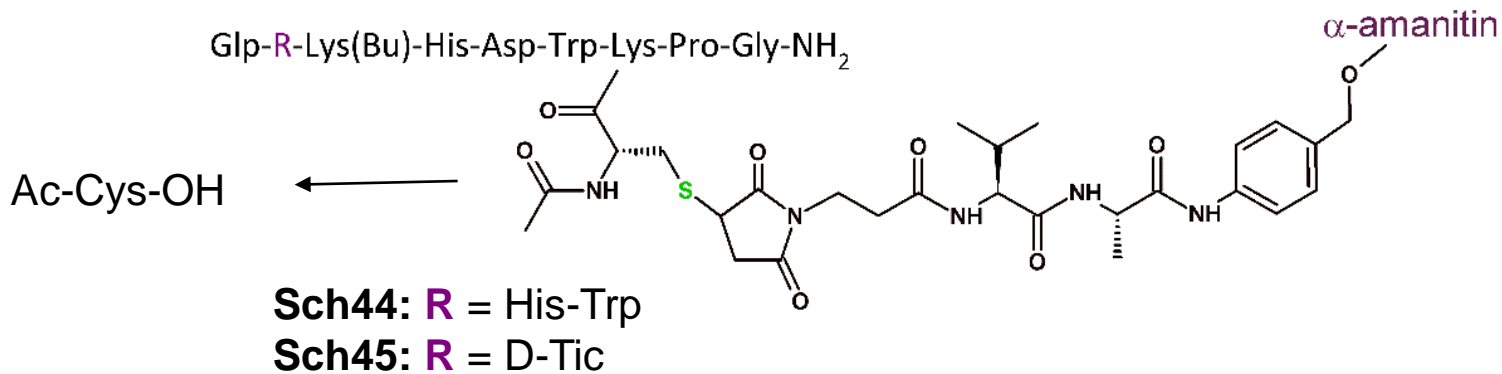
A „self immolative” spacer tartalmazó konjugátum nem mutatott jobb hatást, mint az oxim-kötést tartalmazó. A nagy spacer ronthatja a receptorkötődési képességet.

GnRH-III származék – α -amanitin konjugátumok

A) Diszulfidhíd



B) Self-immolative spacer 1.



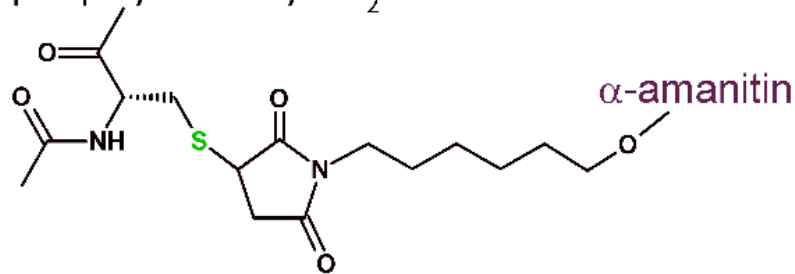
GnRH-III származék – α -amanitin konjugátumok

C) Nem hasítható 1.

Glp-R-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

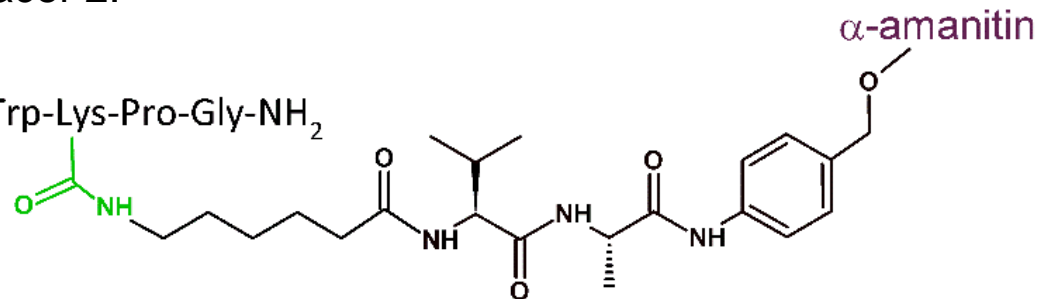
Sch46: R = His-Trp

Sch47: R = D-Tic



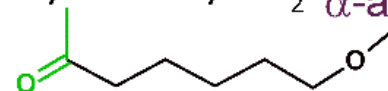
B) Self-immolative spacer 2.

Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



C) Nem hasítható 2.

Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂ α -amanitin



GnRH-III származék – α -amanitin konjugátumok citotoxicitása

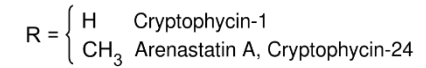
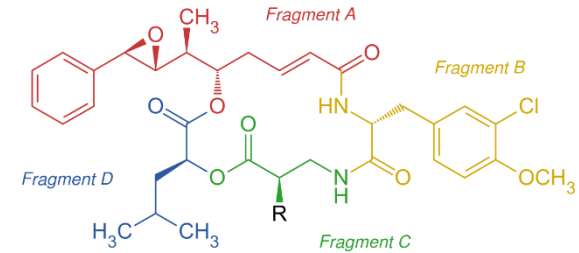
kód	R =	hasítási hely	IC ₅₀ [μM] MCF-7	IC ₅₀ [μM] HT-29	IC ₅₀ [μM] BxPc-3	IC ₅₀ [μM] MiaPaCa-2	IC ₅₀ [μM] OVCAR-3	IC ₅₀ [μM] SKOV-3
Sch42	His-Trp	-S-S-	1,52	n.a.	n.a.	n.a.	3,10	0,85
Sch43	D-Tic	-S-S-	0,58	n.a.	n.a.	n.a.	3,62	0,95
Sch44	His-Trp	-Val-Ala-	2,81	2,00	0,95	1,34	0,73	0,48
Sch45	D-Tic	-Val-Ala-	1,36	2,05	1,03	1,20	0,87	0,67
Sch46	His-Trp	nincs	2,85	2,86	3,13	10,1	2,58	2,43
Sch47	D-Tic	nincs	1,37	6,94	2,67	2,86	2,86	1,94
Sch48	His-Trp	-Val-Ala-	n.a.	1,04	0,40	1,07	0,54	0,39
Sch50	His-Trp	nincs	n.a.	10,8	3,90	4,80	3,41	5,28
α -amanitin			1,22	1,03	0,37	0,78	0,41	0,43

GnRH-R pozitív és negatív tumorsejt típusok:

- + **OVCAR-3** (petefészek)
- + **MCF-7** (emlő)
- + **HT-29** (vastagbél)
- + **BxPc-3** (hasnyálmirigy)
- + **MiaPaCa-2** (hasnyálmirigy)
- **SKOV-3** (petefészek)

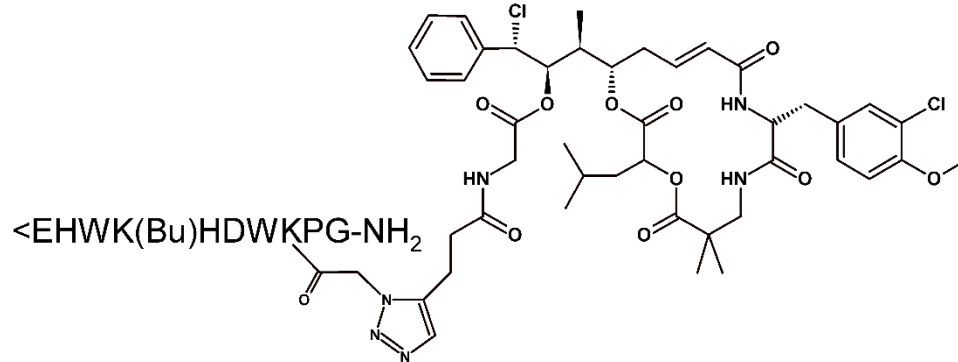
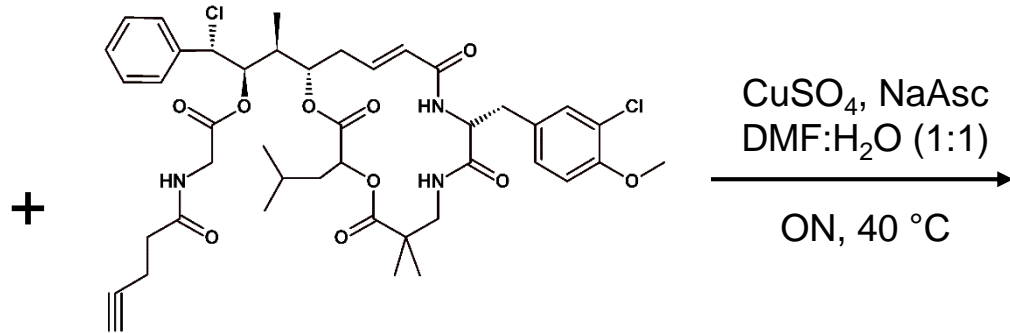
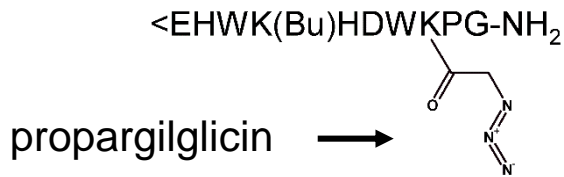
GnRH-III származék – cryptophycin konjugátumok

Cryptophycin: cianobaktériumokban fedezték fel
(rendkívül toxikus, antiproliferatív hatású)



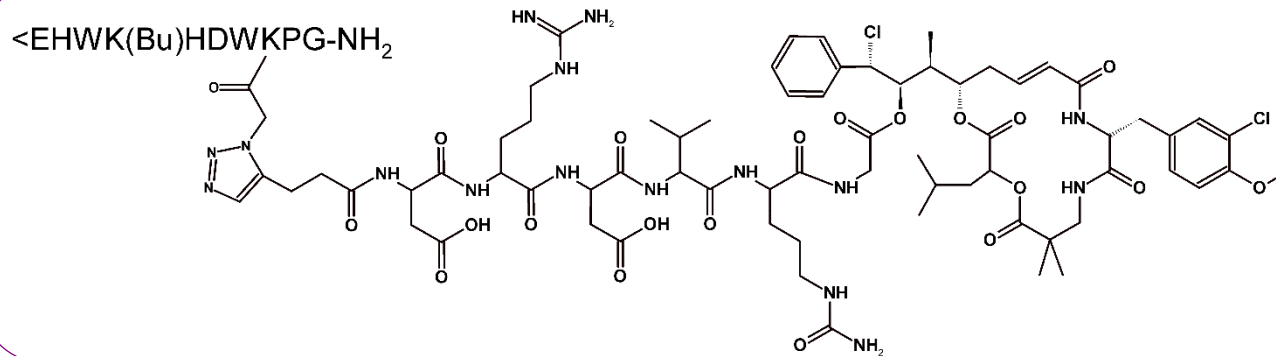
GnRH-III conjugates:

- non-cleavable linker

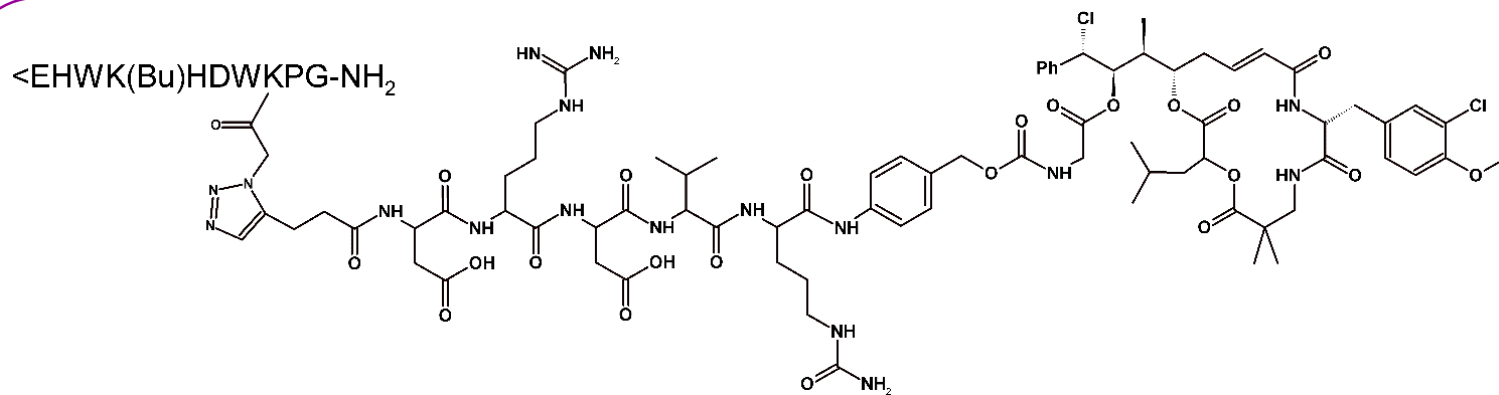


Cry-55-glycinate: IC₅₀ [nM] : 29,48 ± 1,64 (A2780 petefészek tumor)
10,70 ± 2,83 (receptorkötődés)

GnRH-III származék – cryptophycin konjugátumok



Asp-Arg-Asp-Val-Cit-Cry-55-glycinate: IC₅₀[nM]: **31,77 ± 12,26**
20,60 ± 3,01



Asp-Arg-Asp-Val-Cit-PABC-Cry-55-glycinate: IC₅₀[nM]: **41,71 ± 9,20**
16,50 ± 2,97

Összefoglalás

1. <EHWK(Bu)HDWK(Dau=Aoa)PG-NH₂ < <E-D-Tic-K(Bu)HDWK(Dau=Aoa)PG-NH₂
2. Dau konjugátumok: oxim-kötés ≥ self immolative spacer > nem hasítható kötés
3. Cryptophycin > PTX > Dau > α-amanitin (sejtfüggő)
4. Spacer jelenléte ronthatja az irányító peptid receptorkötődését
5. Minél hatékonyabb egy konjugátum annál kevésbé tűnik szelektívnek

Köszönetnyilvánítás

Bősze Szilvia (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport)

Schlosser Gitta (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport)

Tóvári József (Országos Onkológiai Intézet)

Ivan Randelovic (Országos Onkológiai Intézet)

Kapuvári Bence (Országos Onkológiai Intézet)

Andreas Pahl (Heidelberg Pharma)

Horst Thorsten (Heidelberg Pharma)

Luci Feni (University Cologne)

Támogatók



NVKP_16-1-2016-0036



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



K 104045, K 119552



VEKOP-2,3,3-15-2017-00020