



# CÉLZOTT TUMORTERÁPIÁRA ALKALMAS KONJUGÁTUMOK TERVEZÉSE ÉS SZINTÉZISE

**Mező Gábor**

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Vegyészkonferencia

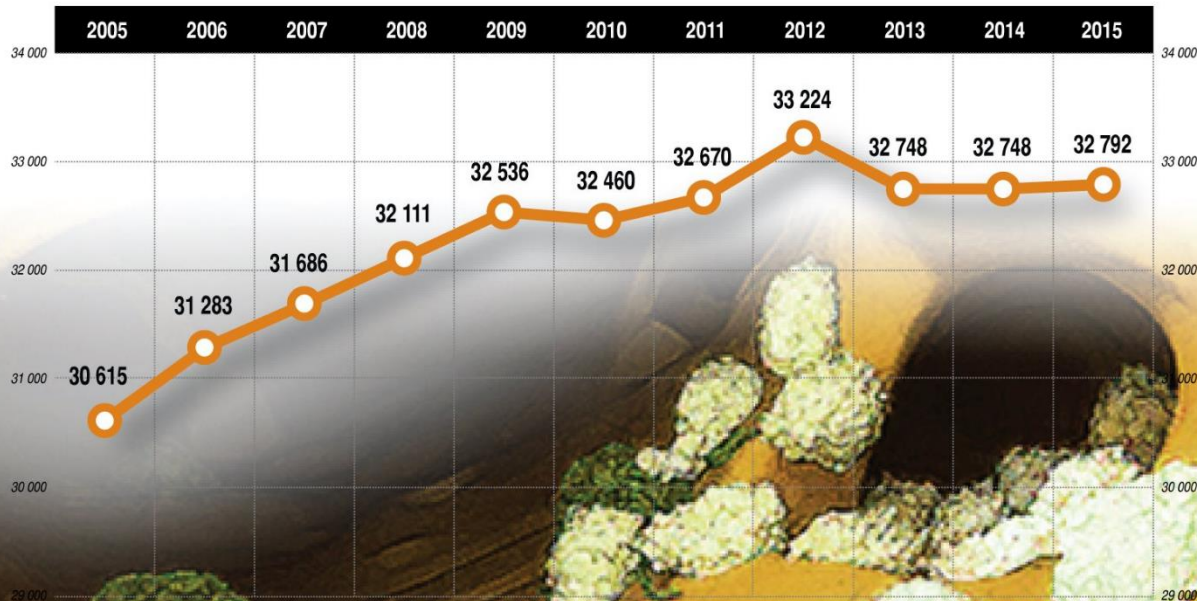
2017. 06. 20.

Hajdúszoboszló

# Miért foglalkozunk a daganatos megbetegedésekkel?

## Daganatos megbetegedések okozta halálozások Magyarországon (2005–2015)

Rosszindulatú daganatos megbetegedések által okozott halálozások száma összesen:



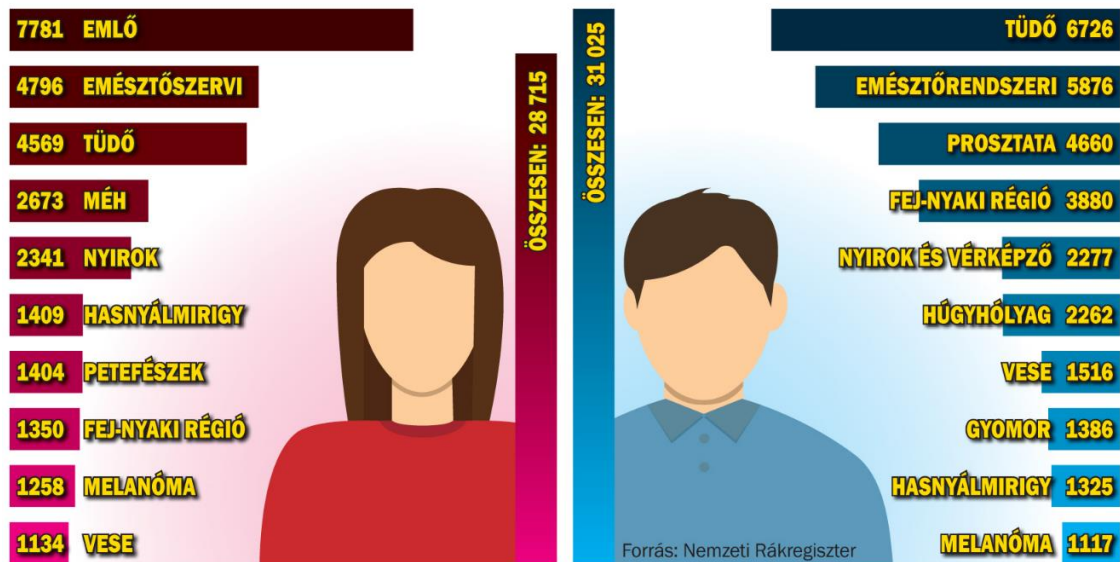
Halálokok:

1. Szív és érrendszeri megbetegedések
2. Daganatos megbetegedések

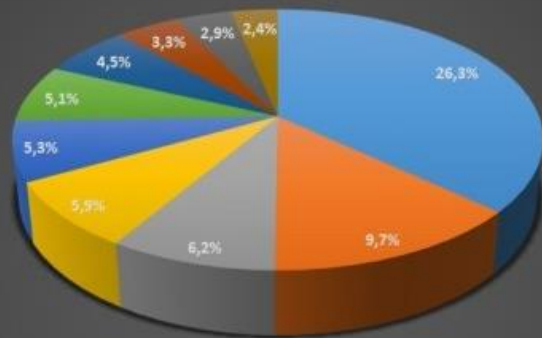
65 év alattiak között vezető halálok; az összes beteg 40%-a

# 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)

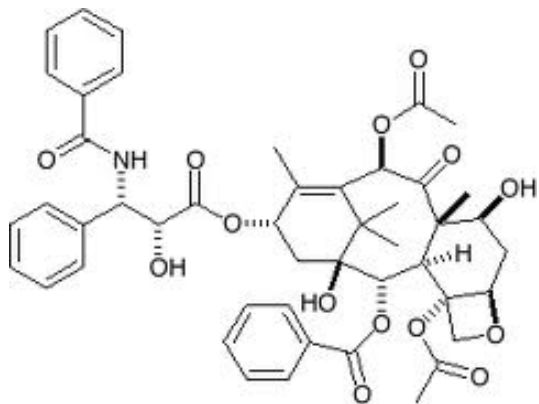
Nagy esetszám – viszonylag jól gyógyítható:

vastagbélrák (~47%-os túlélés)

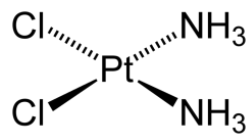
Kis esetszám – rosszul gyógyítható:

hasnyálmirigyrák (~5%-os túlélés)

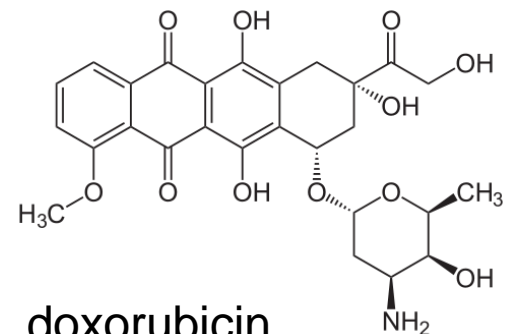
# Kemoterápia



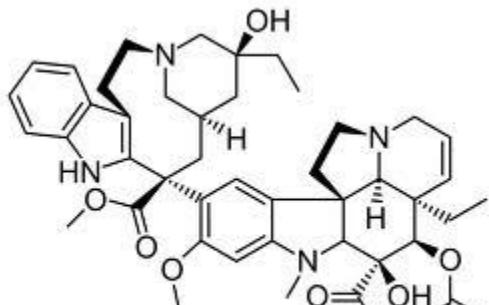
taxol



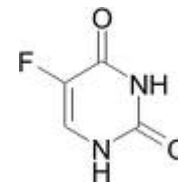
cisplatin



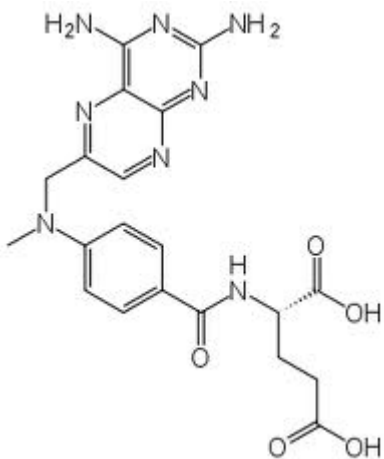
doxorubicin



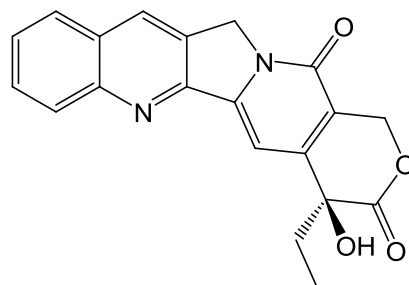
vinblasztin



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)



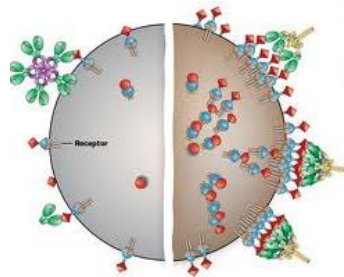
**Egyedi toxikus hatások:** kardiotoxicitás, veseelégtelenség, ödémásodás, májfunkció zavarai, terratogén (magzatkárosító) hatás

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

Néhány különbség az egészséges és tumorsejtek, szövetek között:

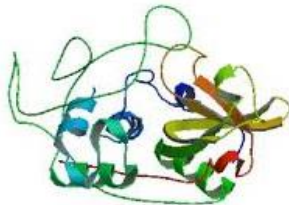
Sejtfelszíni (pl. tumorspecifikus vagy túltermelődött receptor)

egészséges sejt

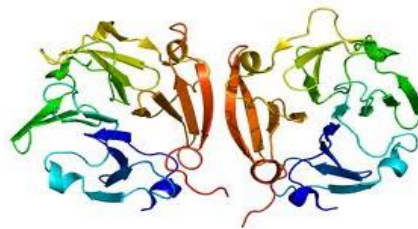


tumorsejt

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



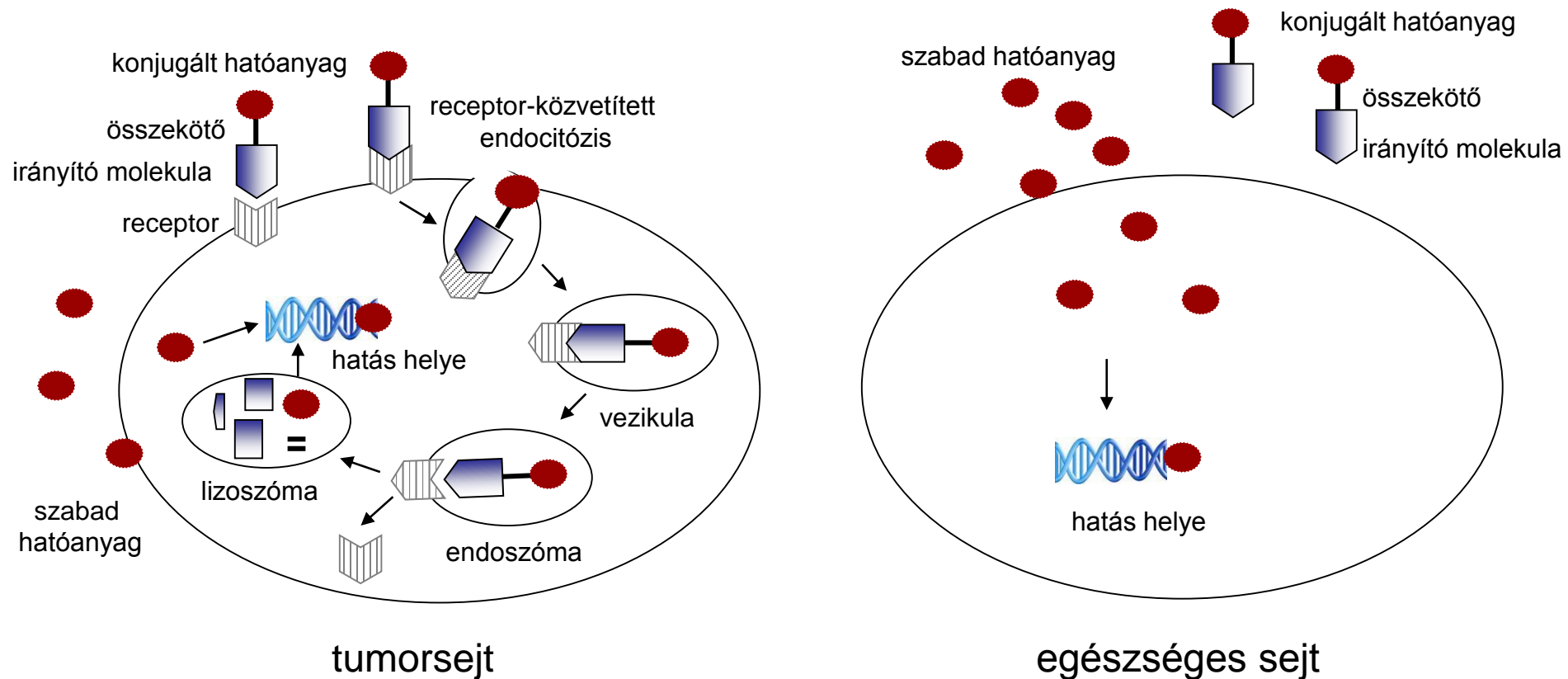
katepszin B



mátrix metallopeptidáz 9  
(MMP9)

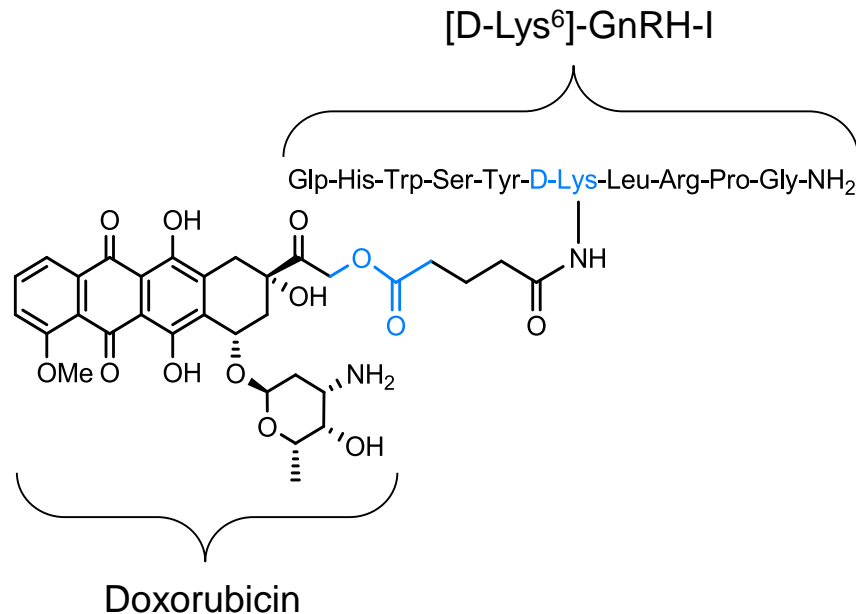
Lokalizálható „szilárd” tumorok (pl. újonnan kialakult vérerek)

# Célzott tumorterápia: szelektív hatóanyag célba juttatás irányító molekulákkal



# Doxorubicin-[D-Lys<sup>6</sup>]-GnRH-I (AEZS-108, AN-152)

Zoptarelin doxorubicin (AEterna Zentaris Inc.)



- [D-Lys<sup>6</sup>]-GnRH-I egy GnRH-I agonist analog
- Észter-kötéssel kapcsolják a Doxorubicinhez
- **Klinikai Fázis III-ben vizsgálják, emlő, petefészek és méh daganatokra**
- **Észter-kötés gyors lebomlása humán szérumban ( $t_{1/2} \sim 2$  óra) karboxil-észterázok hatására**



# ***GnRH-III a nagy tengeri ingolából izolált GnRH analog***



***GnRH-I: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>***

***GnRH-III: Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>***

- *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*

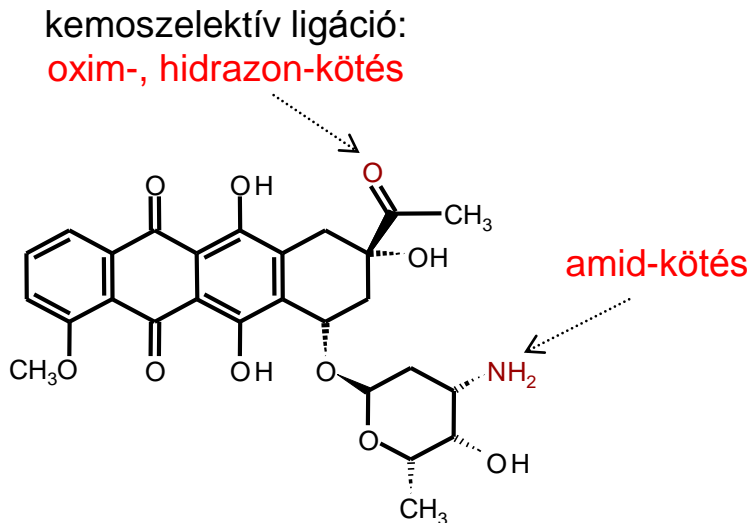
***GnRH-III: Hatásos szállító molekula lehet az irányított  
tumorterápiában***

# Daunorubicin-GnRH-III konjugátumok tervezése



→ a Lys<sup>8</sup> ε-aminocsoportja felhasználható konjugálásra

→ a Lys<sup>8</sup> bázikus oldalláncának módosítása nem eredményezi a receptor kötődés és az antiproliferatív hatás elvesztését, de tovább csökken a hormon hatása



## Daunorubicin (Daunomicin)

- antraciklin antibiotikum, a rák gyógyításában alkalmazott szer (e.g., leukémia, neuroblastoma)
- DNA interkaláció; topoizomeráz II inhibitor

## Toxikus mellékhatások:

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

Kovács M., et al. (2007) *Peptides* **28**, 821-829



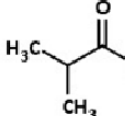
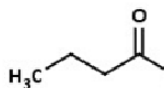
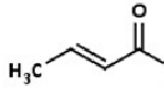
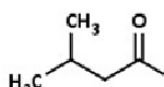
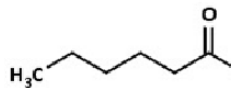
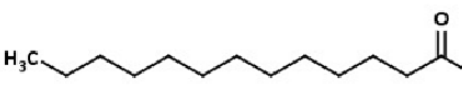
Mező, G., Manea M.: (2013) *Prot. Pept. Lett.* **24**, 479-488

# Daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok rövidszénláncú zsírsavakkal



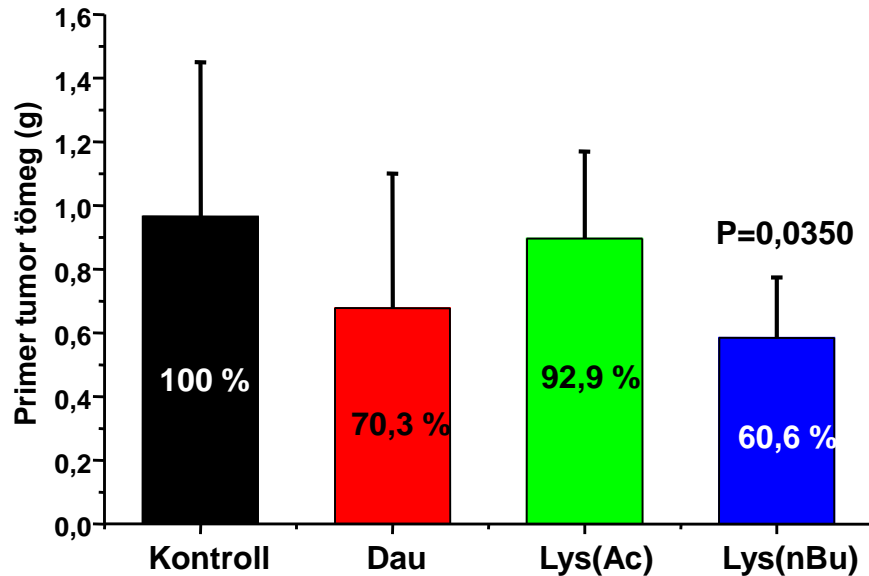
Lizoszomális lebomlás:

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

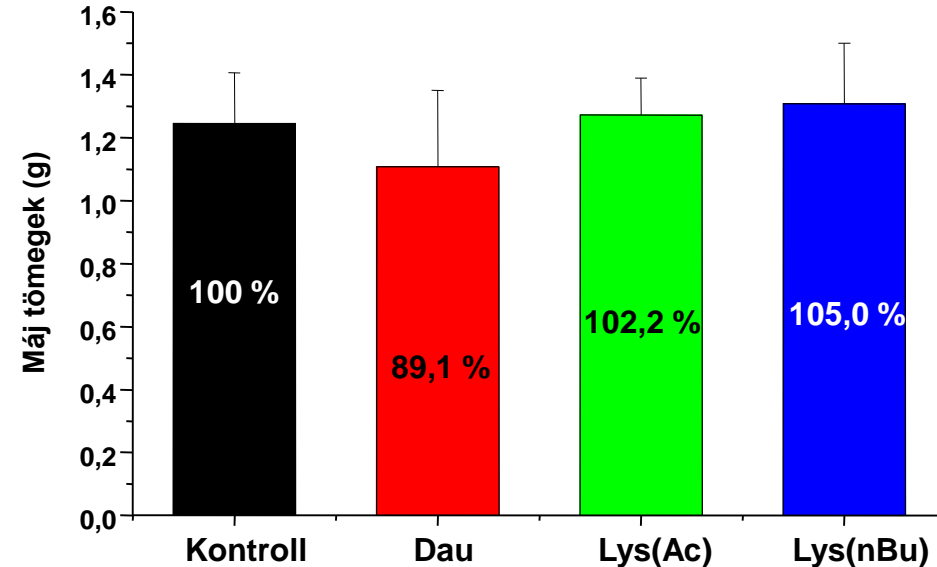
X=	Chemical structure	Abbreviation	Name	Enzim stabilitás kimotripszin; 6 óra	Citosztázis (IC <sub>50</sub> )	
					MCF-7	HT-29
		Ac	acetil	44%	3,1±1,7	7,4 ±2,6
		Pr	propionil	55%	3,6±0,7	17,2±2,9
kimagasló sejtfelvétel		iBu	izo-butiril	10%	2,2±0,0	2,0±0,6
		nBu	butiril	64%	0,7±0,2	2,2±0,6
		CA	krotonil	50%	1,6±0,2	13,6±4,2
		iVA	izo-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

# Dau-GnRH-III konjugátumok antitumor hatása orthotopikus HT-29 vastagbél modellen

Tumorok tömege a terminálás napján (50. nap)



Máj tömegek a terminálás napján (50. nap)



Daunorubicin: heti egy alkalommal (7x1 mg/ttkg)

Konjugátumok: heti két alkalommal (5x15 mg Dau-tartalom/ttkg, 8x 7,5 mg/ttkg)

**Proliferációs index: konjugátumok (15%-kal csökken), Dau (nincs változás)**

**Vaszkuarizáció: konjugátumok (30-40%-kal csökken), Dau (12%-kal nő)**

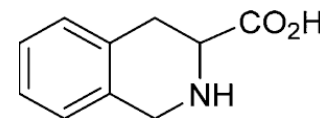
**Metasztázis gátlás: nincs**

Kapuváry B., et al. (2016) *Invest New Drugs* 34, 416-423

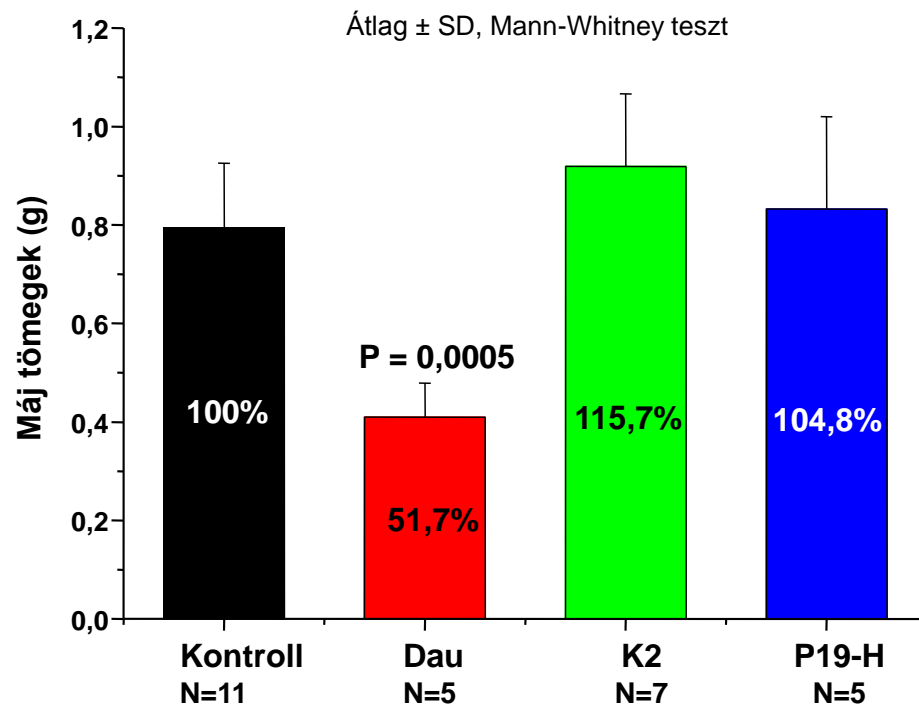
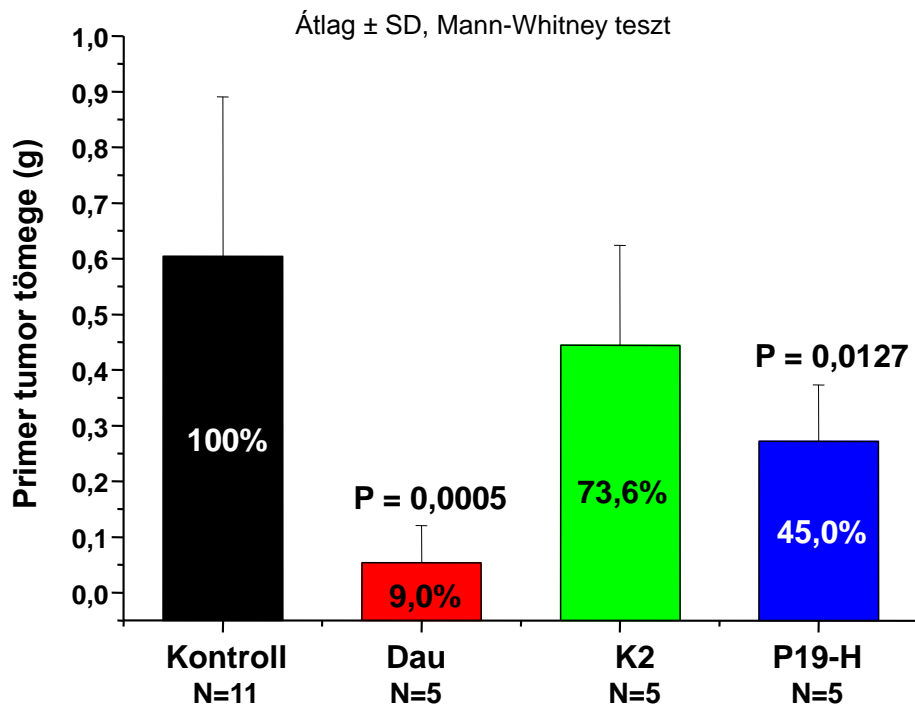
# Új hatékonyabb GnRH-III – daunomicin konjugátum

K2: Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P19-H: Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>



1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-3-karbonsav (Tic)



Terminálás a tumor transzplantációt követő 34. napon

A Dau csoportot előbb - a 30. napon - kellett terminálni



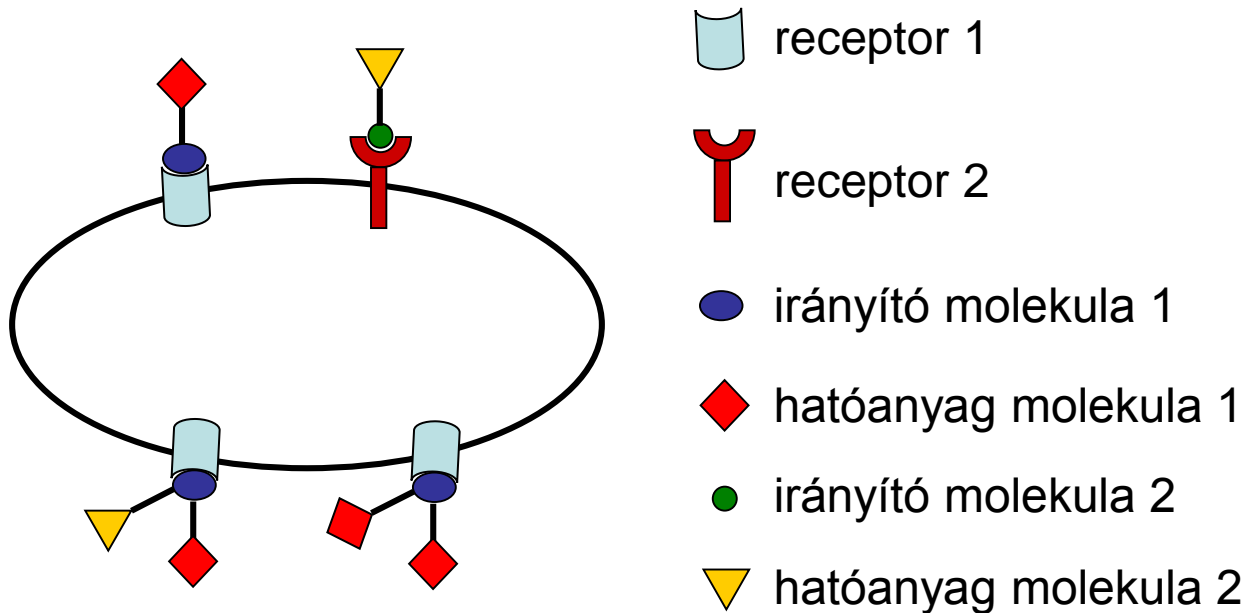
# Hogyan növelhető a hatóanyag – peptid konjugátumok hatása?

## **Korlátok:**

- A receptorok száma a tumorsejteken limitált.
- Ezért a biokonjugátumok mennyiségének növelése önmagában nem megoldás.

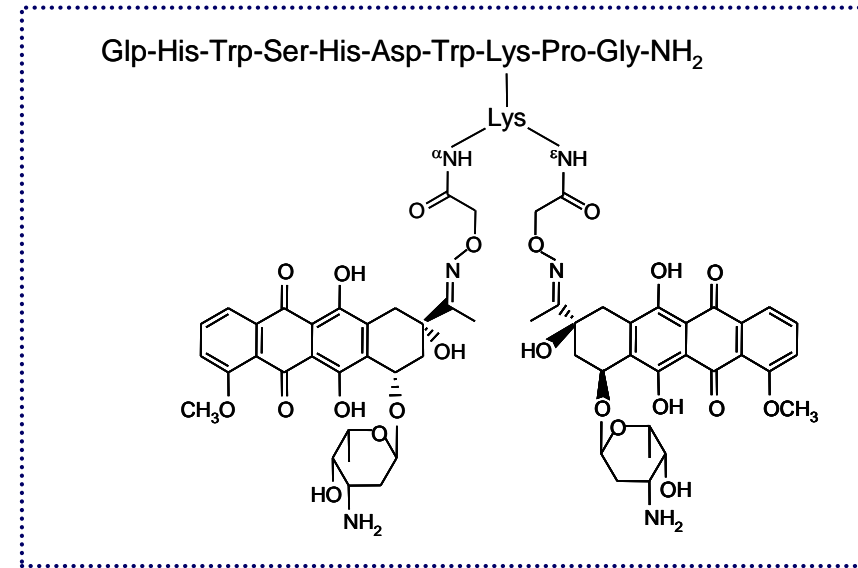
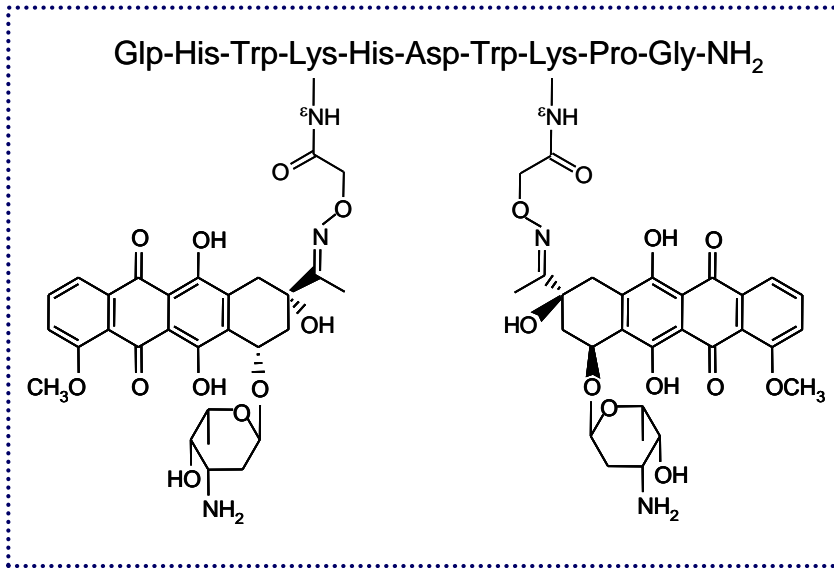
## **Lehetséges megoldások:**

- Azonos vagy különböző hatóanyagok kapcsolása egy irányító molekulához.
- Több különböző receptoron keresztül történő sejtbe juttatás két vagy több hatóanyag – irányító molekula konstrukcióval.



# Biokonjugátum tervezés

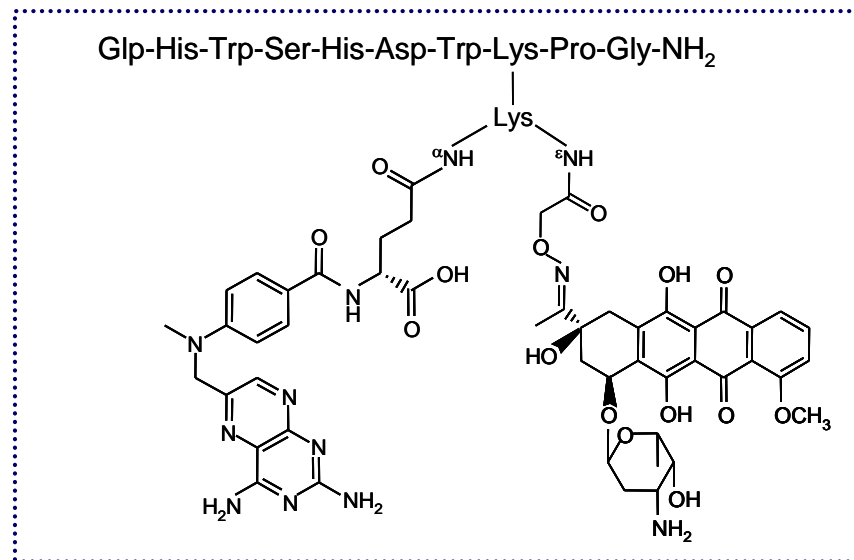
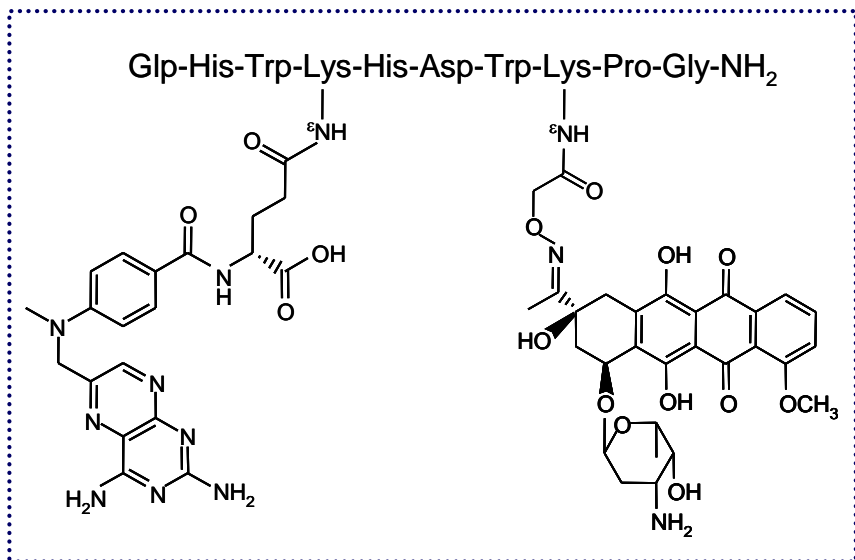
➔ biokonjugátumok két azonos tumorellenes hatóanyaggal



Anyagok	MCF-7 IC <sub>50</sub> [μM]	HT-29 IC <sub>50</sub> [μM]	LNCaP IC <sub>50</sub> [μM]
Daunorubicin	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1
GnRH-III[ <sup>4,8</sup> Lys(Dau=Aoa)]	2,9 ± 0,9	6,8 ± 1,0	4,9 ± 0,3
GnRH-III[ <sup>8</sup> Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))]	3,0 ± 0,4	5,6 ± 2,0	3,8 ± 1,6
GnRH-III[ <sup>8</sup> Lys(Dau=Aoa)]	6,7 ± 1,9	29,9 ± 0,6	15,2 ± 2,4

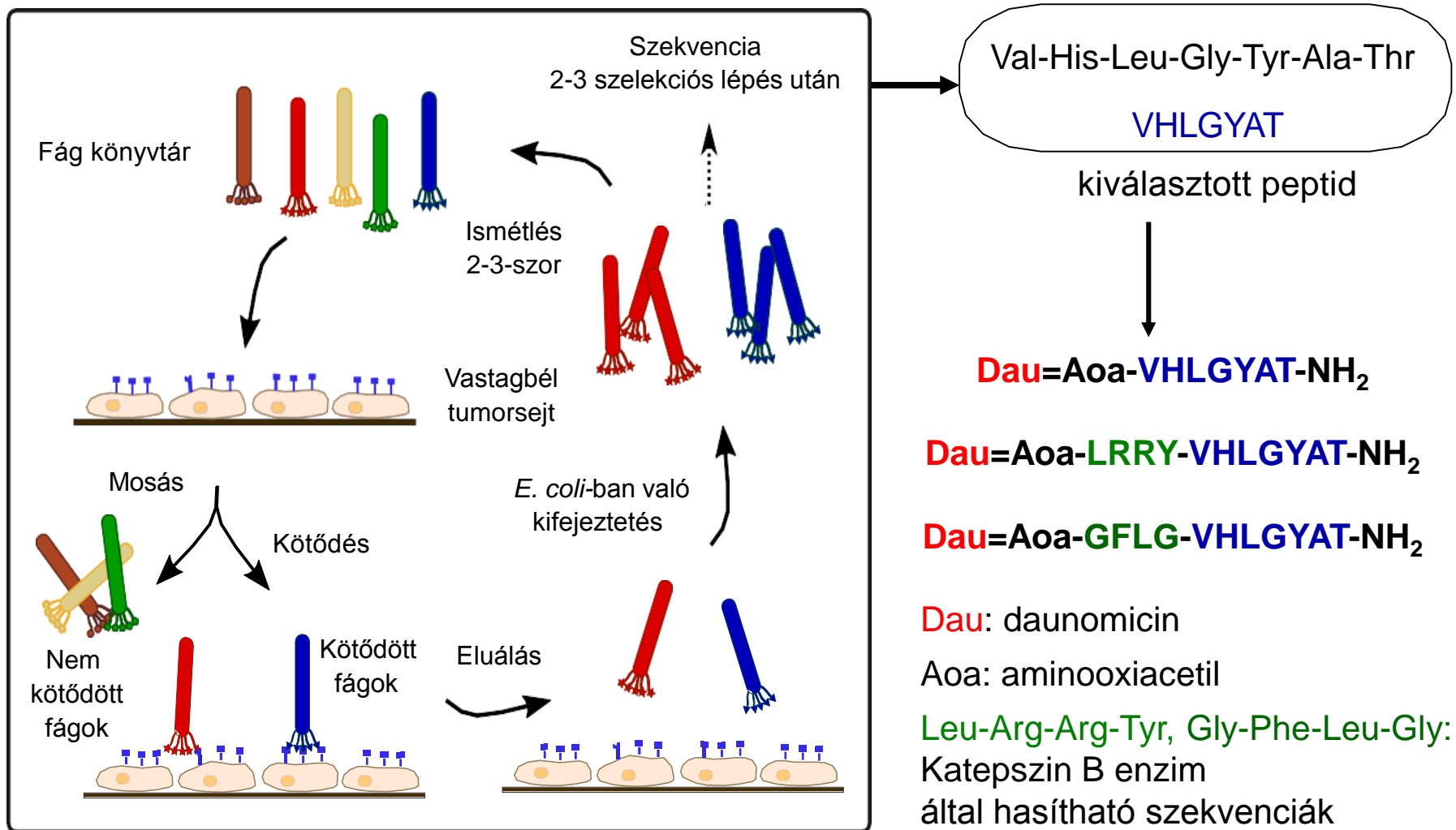
# Biokonjugátum tervezés

➔ biokonjugátumok két különböző tumorellenes hatóanyaggal



Anyagok	MCF-7 IC <sub>50</sub> [μM]	LNCaP IC <sub>50</sub> [μM]	HT-29 IC <sub>50</sub> [μM]
Daunorubicin	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2
Methotrexate	n,d,	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,6
GnRH-III[ <sup>4</sup> Lys(MTX), <sup>8</sup> Lys(Ac)]	> 50	> 50	> 50
GnRH-III[ <sup>4</sup> Lys(MTX), <sup>8</sup> Lys(Dau=Aoa)]	5,8 ± 1,1	28,8 ± 4,7	3,6 ± 1,5
GnRH-III[ <sup>8</sup> Lys(MTX-Lys(Dau=Aoa))]	5,4 ± 0,7	11,3 ± 0,5	5,6 ± 3,0
GnRH-III[ <sup>8</sup> Lys(Dau=Aoa)]	6,7 ± 1,9	15,2 ± 2,4	29,9 ± 0,6

# Vastagbél tumorsejthez (HT-29) kötődő peptidek kiválasztása fág-bemutató technikával



10<sup>11</sup> fág klón felhasználásával, 50 kiválasztott, amelyek kevés és csak dipeptid szakasz homológiát mutattak

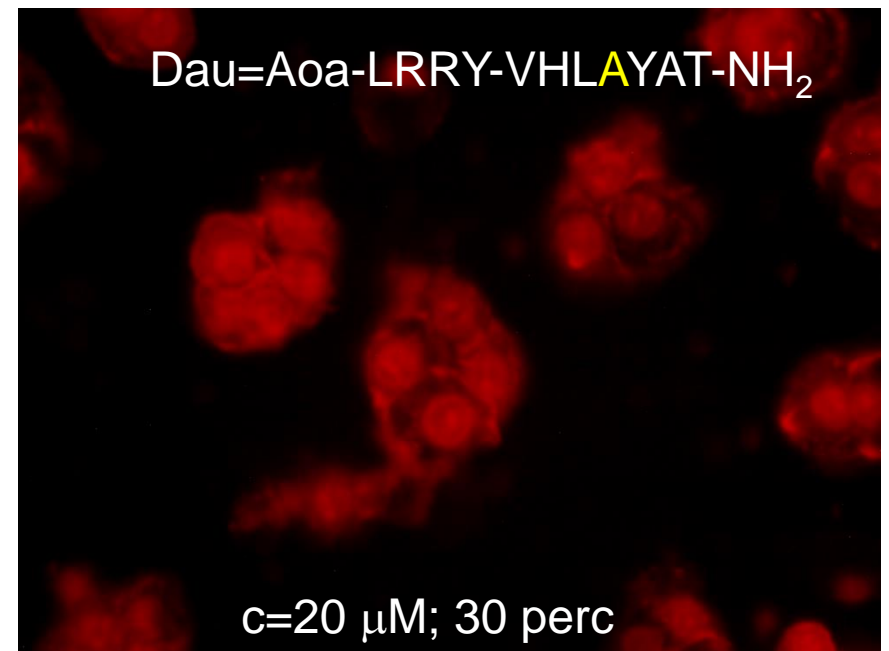
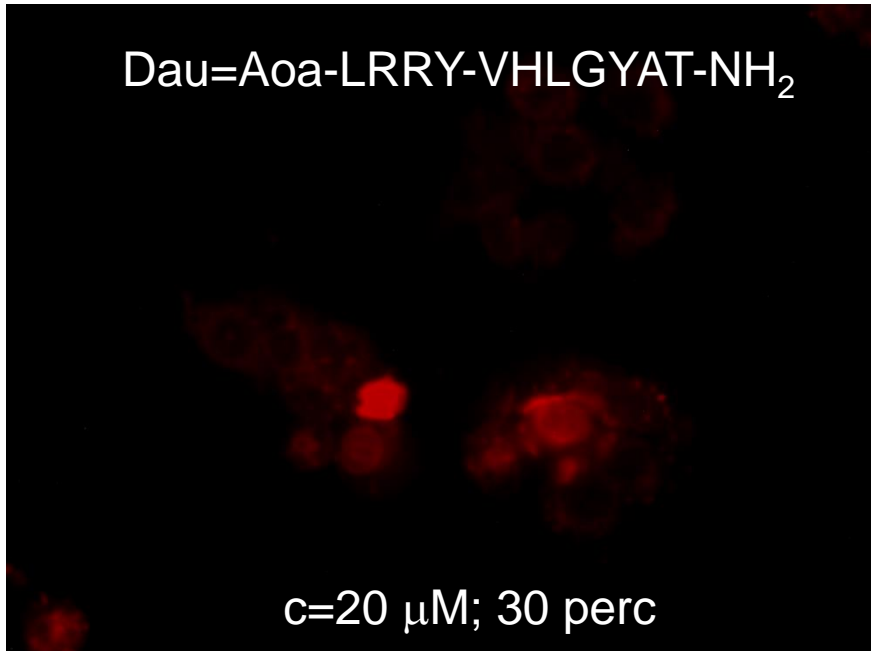
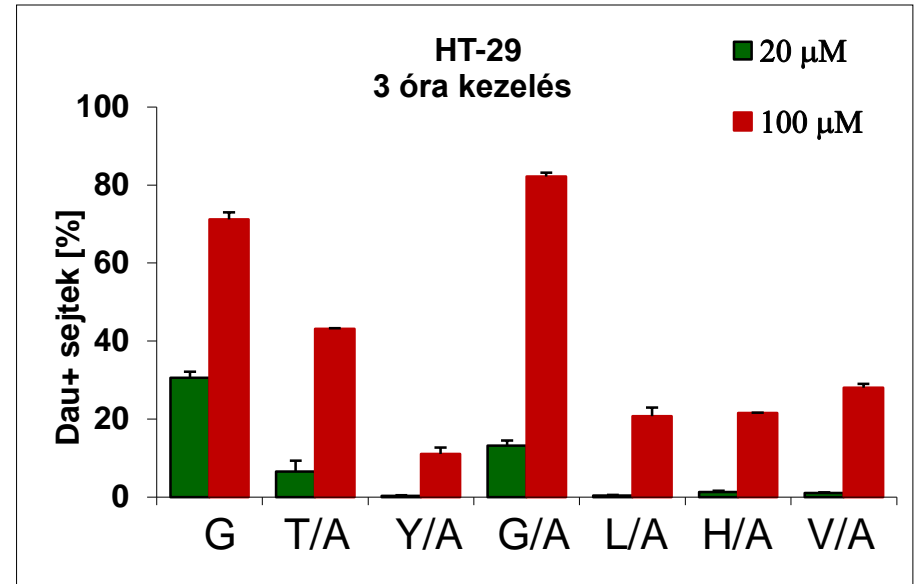
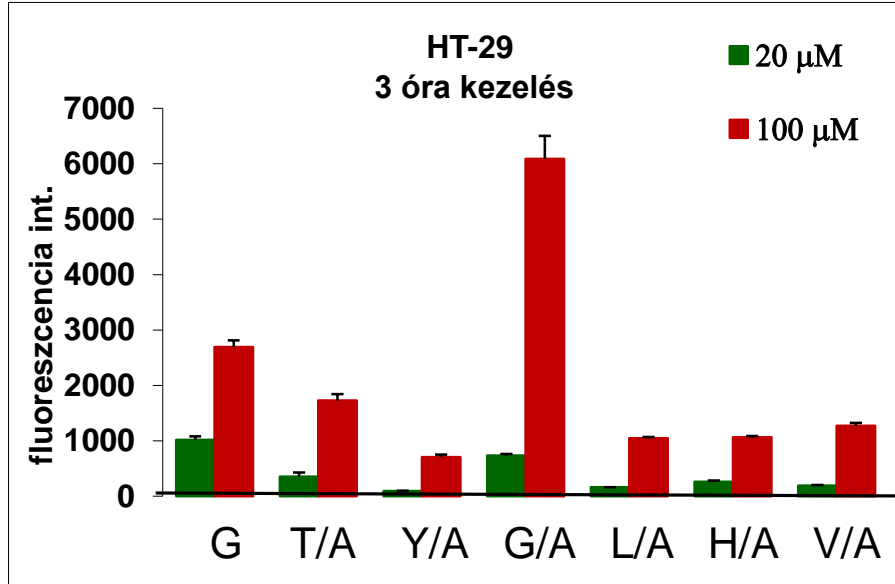
# Hatékonyabb konjugátum kiválasztása Ala-szken segítségével



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



# Konjugátumok sejtfelvételének tanulmányozása áramlási citométerrel és fluoreszcens mikroszkóppal



# Hatékonyabb konjugátum kiválasztása Ala-szken majd pozíciós szkennelés segítségével

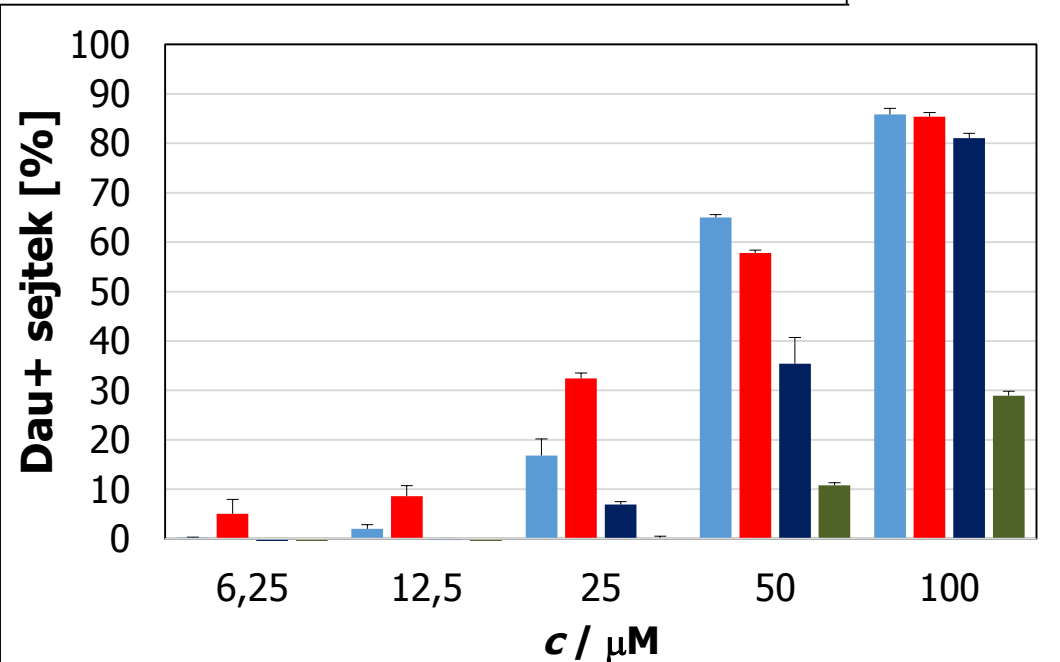
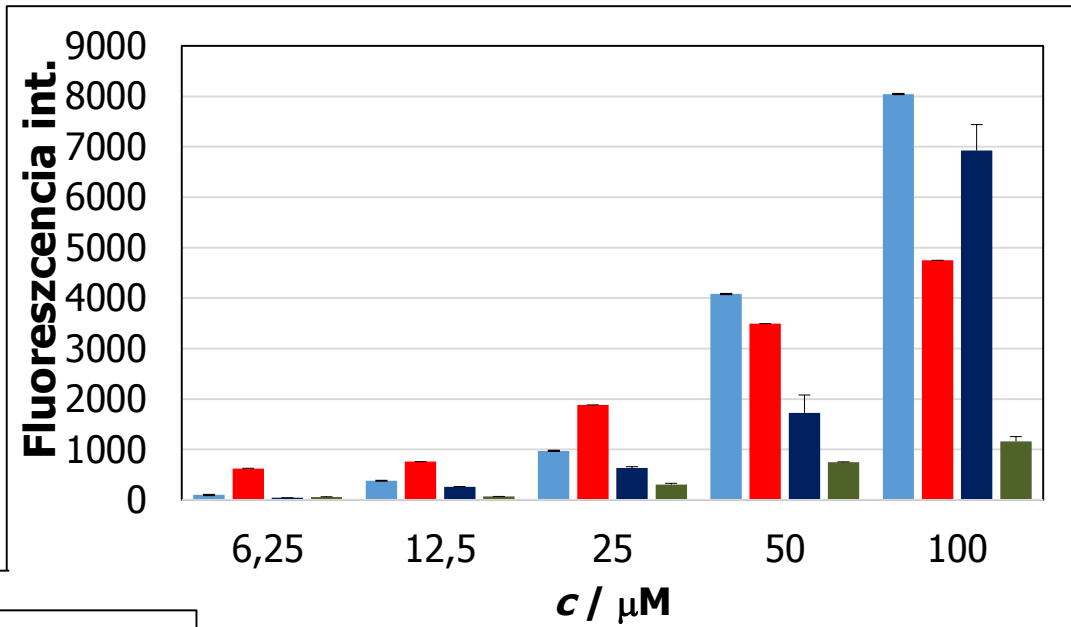
	V	H	L	G	Y	A	T	50,5 ± 5,5
	A	H	L	G	Y	A	T	>100
	V	A	L	G	Y	A	T	26,8 ± 0,4
	V	H	A	G	Y	A	T	>100
<b>Dau=Aoa-LRRY-</b>	V	H	L	A	Y	A	T	<b>14,0 ± 1,5</b>
	V	H	L	G	A	A	T	>100
	V	H	L	G	Y	A	A	60,9 ± 3,1
	V	H	L	A	Y	A	T	27,9 ± 6,4
	V	H	L	K	Y	A	T	50,3 ± 3,0
	V	H	L	E	Y	A	T	29,5 ± 6,2
	V	H	L	L	Y	A	T	7,5 ± 3,5
<b>Dau=Aoa-LRRY-</b>	V	H	L	F	Y	A	T	<b>6,6 ± 2,9</b>
	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

IC<sub>50</sub> értékek  
24 + 48 óra  
kezelés  
MTT teszt



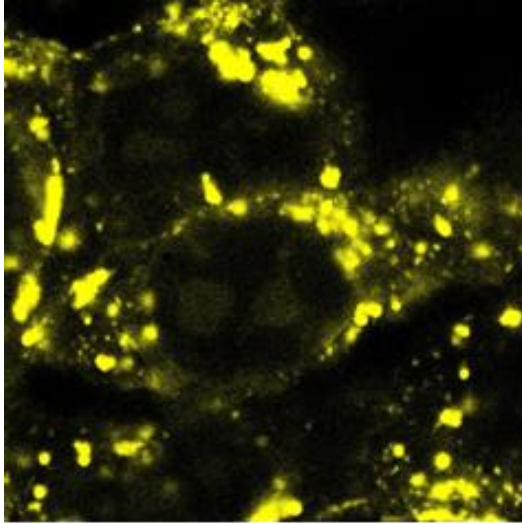
# *In vitro* sejtbejutási vizsgálatok áramlási citométerrel

- Dau=Aoa-LRRY-VHLA<sub>Y</sub>AT-NH<sub>2</sub>
- Dau=Aoa-LRRY-VHLY<sub>F</sub>AT-NH<sub>2</sub>
- Dau=Aoa-LRRY-VHLS<sub>Y</sub>AT-NH<sub>2</sub>
- Dau=Aoa-LRRY-VHLP<sub>Y</sub>AT-NH<sub>2</sub>

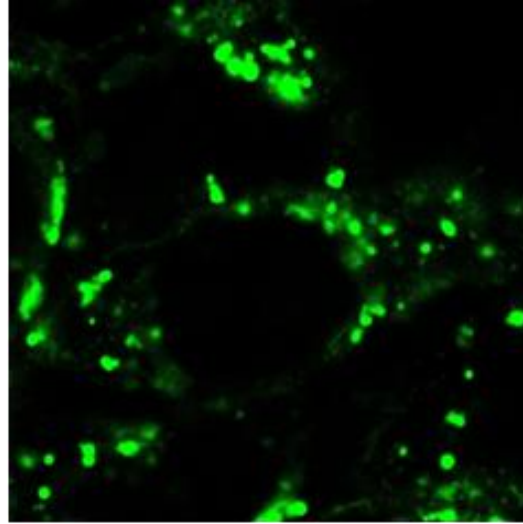


# A *Dau=Aoa-LRRY-VHLXYAT-NH<sub>2</sub>* konjugátumok sejt felvételének vizsgálata konfokális mikroszkóppal (1,5 órás kezelés)

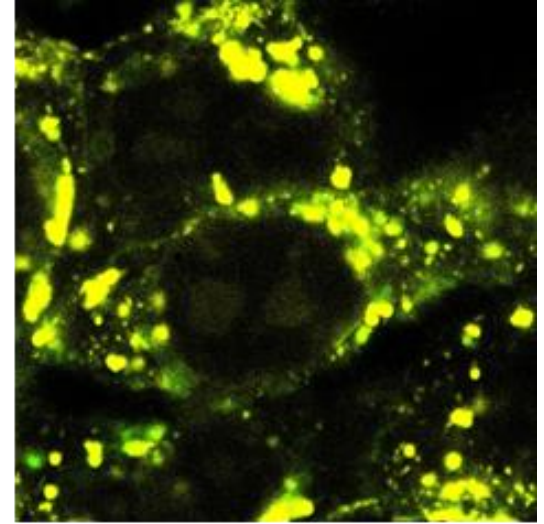
X=A



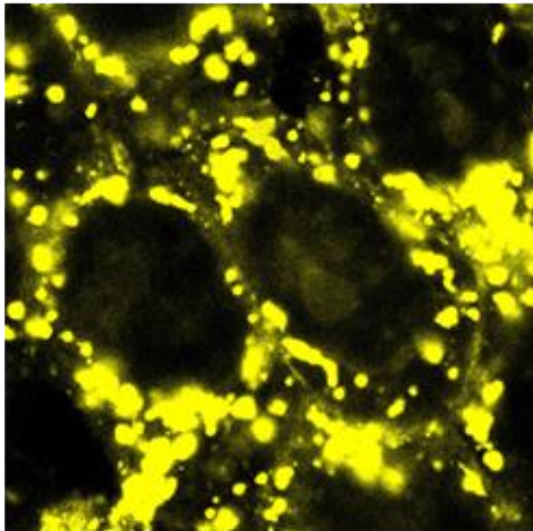
LysoTracker



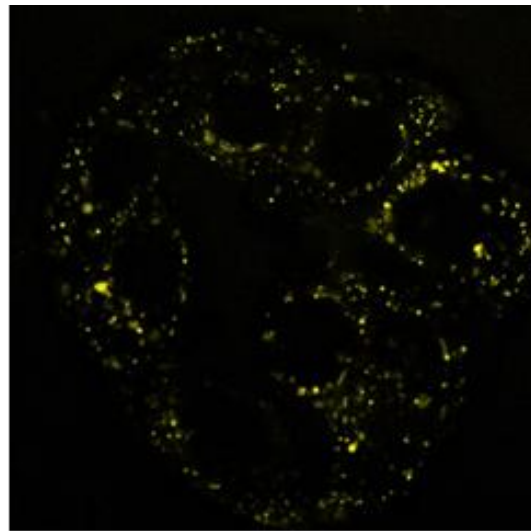
X=A + LysoTracker



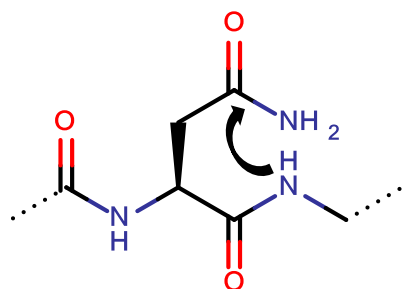
X=F



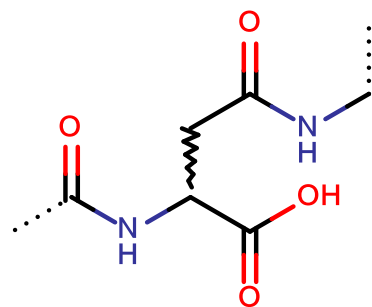
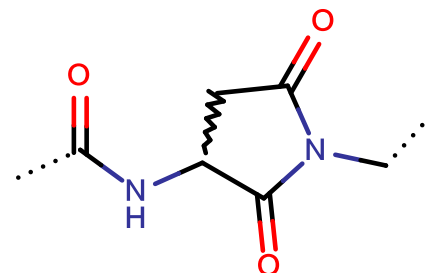
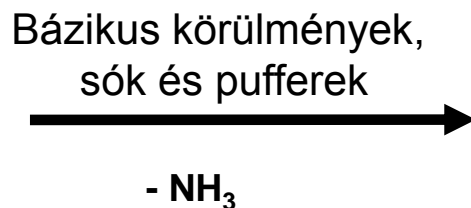
X=P



# A természet nyújtotta lehetőség (NGR peptidek)



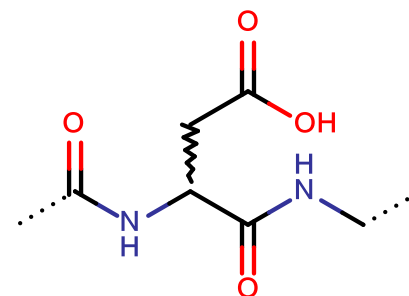
**NGR peptid**  
biológiailag aktív  
(CD13 receptorokhoz kötődik)



**$\beta$ -Asp-peptid (izoAsp)**  
~70%

biológiailag aktív  
(RGD integrin receptorokhoz kötődik)

$+ \text{H}_2\text{O}$

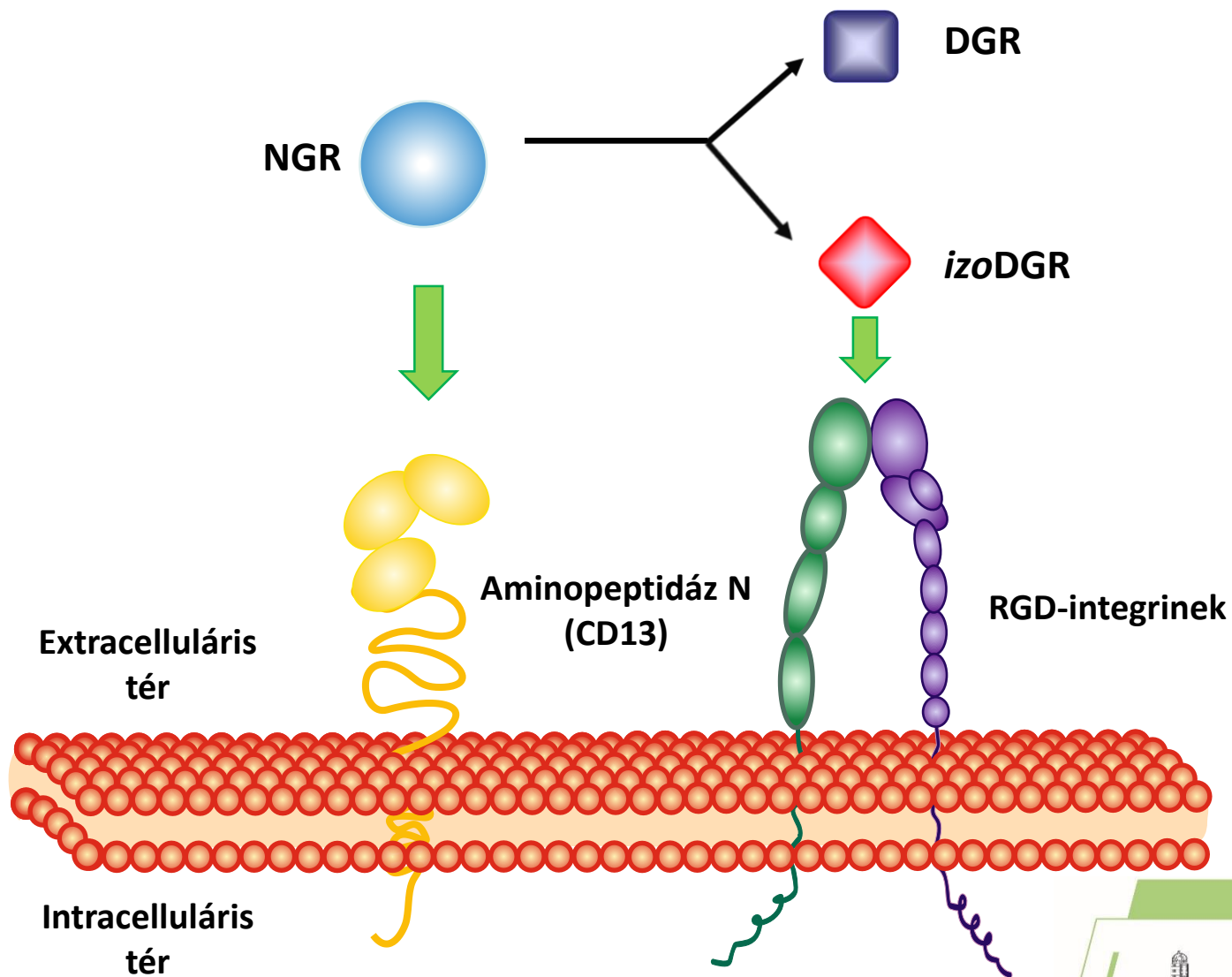


**$\alpha$ -Asp-peptid**  
~30%

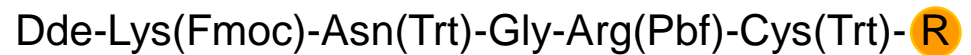
Mindkét receptor típus a neovaszkularizációban, sejt adhézióban, sejt motilitásában, így a metasztázisban játszanak fontos szerepet



# Egy vegyület két célpont (az NGR peptidek lehetséges célpontjai)

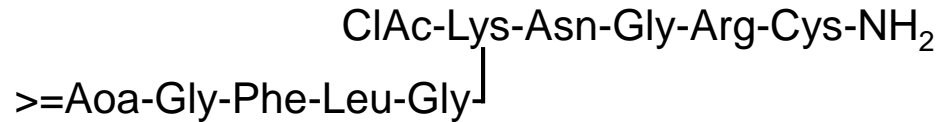
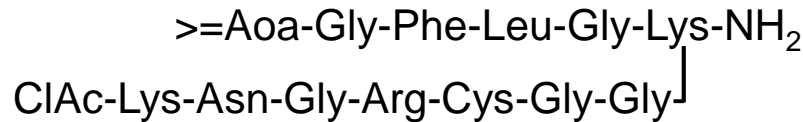


# Ciklikus NGR peptid – daunomicin konjugátumok szintézise



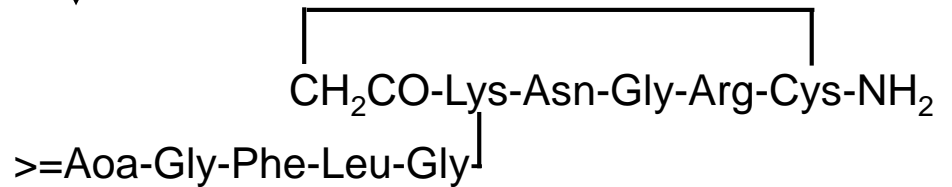
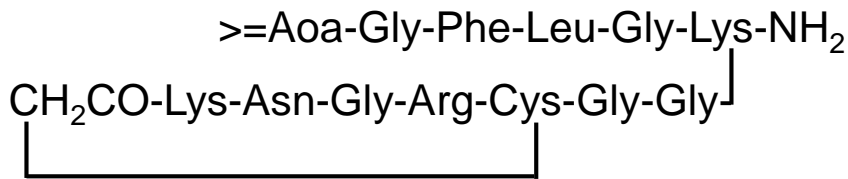
1. *Dde* hasítás: 2%  $\text{NH}_2\text{-NH}_2/\text{DMF}$
2. *Kapcsolás*: Fmoc-Aaa(X)-OH-DIC-HOBt/DMF
3. *Klóracetilezés*: ClAc-OPcp/DMF
4. *Hasítás*: 95% TFA – 2,5% TIS – 2,5%  $\text{H}_2\text{O}$

1. *Fmoc* hasítás: 2% DBU – 2% piperidin/DMF
2. *Kapcsolás*: Fmoc-Aaa(X)-OH -DIC-HOBt/DMF
3. *Védett Aoa beépítés*:  $\geq$ Aoa-OH-DIC-HOBt/DMF
3. *Dde* hasítás: 2%  $\text{NH}_2\text{-NH}_2/\text{DMF}$
4. *Klóracetilezés*: ClAc-OPcp/DMF
5. *Hasítás*: 95% TFA – 2,5% TIS – 2,5%  $\text{H}_2\text{O}$

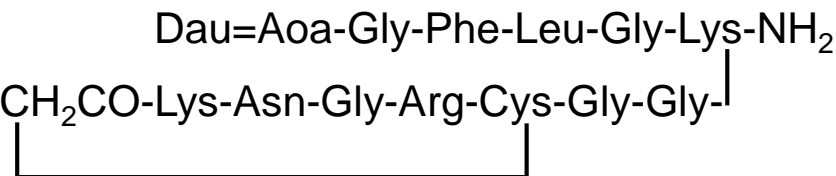
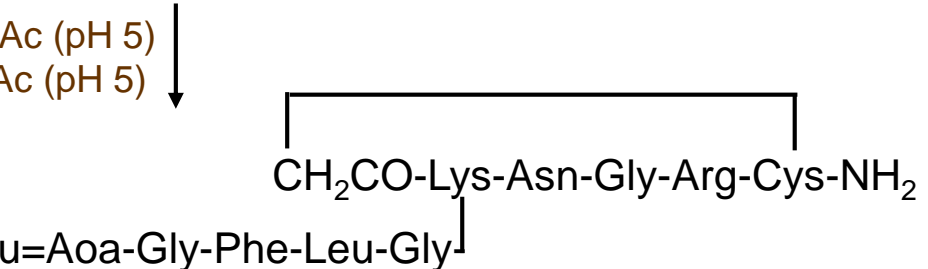


Ciklizálás: 0,1 M Tris puffer (pH 8,1), 1h

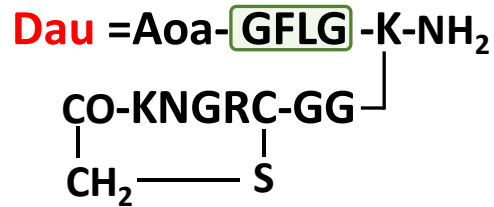
Ciklizálás: 0,1 M Tris puffer (pH 8,1), 1h



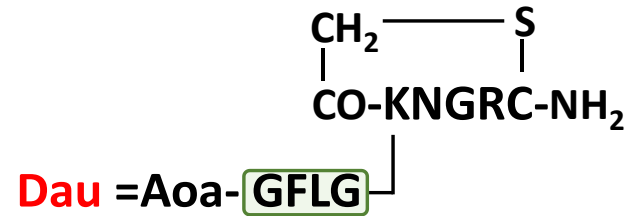
*Izopropilidén hasítás*: 1M  $\text{NH}_2\text{-O-CH}_3/0,2\text{M NH}_4\text{OAc}$  (pH 5)  
*Daunomicin konjugálás*: 1,1 ekv Dau/0,2M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 5)



# ***Ciklikus NGR peptid – daunomicin konjugátumok in vitro citotoxikus hatása HT-1080 (CD13 +) fibroszarkoma és HT-29 (CD13 -) vastagbél tumorsejteken***



3,3 ± 0,6 μM (HT-1080)  
5,7 ± 0,9 μM (HT-29)



14,5 ± 2,0 μM (HT-1080)  
>>50 μM (HT-29)



1,4 ± 0,1 μM (HT-1080)  
3,0 ± 0,6 μM (HT-29)



15,8 ± 4,4 μM (HT-1080)  
>>50 μM (HT-29)

**kettős (CD13 és integrin) hatású**

**CD13 specifikus**

# PÁLYÁZATI FELHÍVÁS

## NEMZETI VERSENYKÉPESSÉGI ÉS KIVÁLÓSÁGI PROGRAM

**KÓDSZÁM: NVKP\_16**

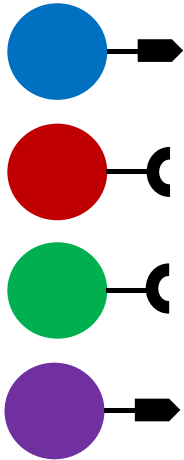
„A” alprogram (Kiemelkedő halálozási kockázattal járó betegségek gyógyításának eredményességét lényegesen javító nemzeti program)

„B” alprogram (Anyagtudományi, technológia nemzeti program)

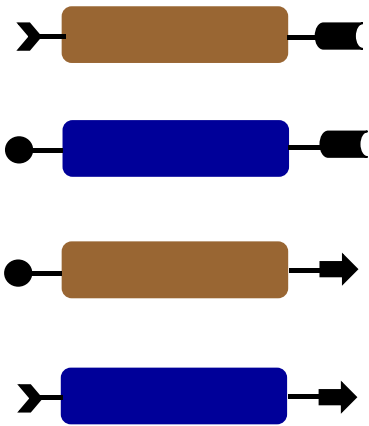
„C” alprogram (Víz-egészség-élelmiszer nemzeti program)

# A projekt célja

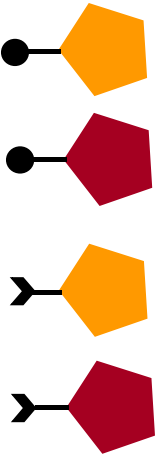
hatóanyag könyvtár



linker könyvtár



irányító molekula könyvtár

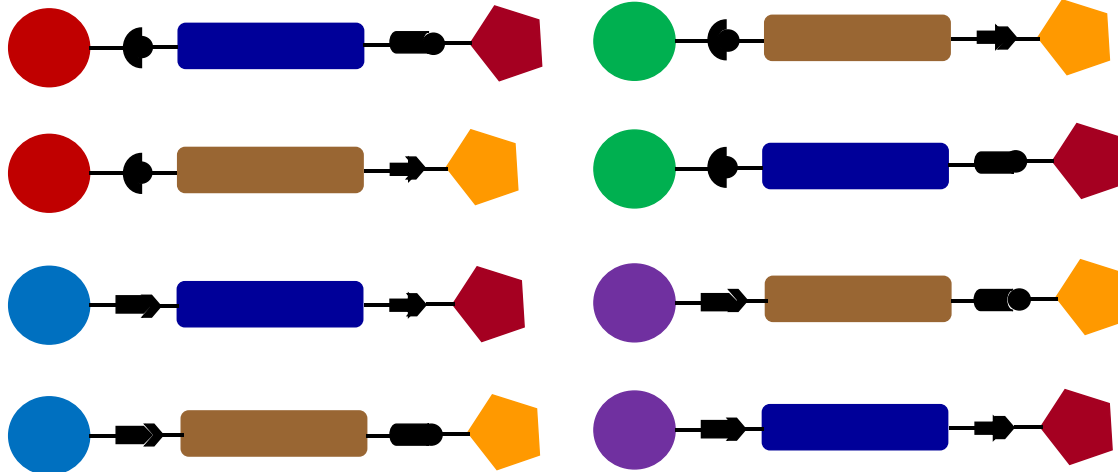


## 3 vegyülettár:

- hatóanyag könyvtár
- bifunkciós linker könyvtár
- irányító molekula könyvtár

A könyvtárak elemeinek nagyszámú kombinációjával személyre szabott terápiára alkalmas konjugátumok kialakítása.

Hatóanyag – irányító molekula konjugátumok





# Összefoglalás

- A személyre szabott irányított tumorterápiára alkalmas konjugátumok fontos elemei:
  - hatóanyag
  - bifunkciós linker
  - irányító molekula
- Hatóanyag:
  - jelenleg alkalmazott (funkciós csoport beépítése)
  - új hatóanyagok
- Bifunkciós linker:
  - irányító molekula – linker kötés stabil lehet
  - hatóanyag – linker kötés (szabad hatóanyag, vagy aktív metabolit felszabadulását eredményezze)
- Irányító molekula:
  - ismert peptidligandumok illetve módosított analógjaik
  - nem ismert receptorokra ligandum keresés (fág-bemutató eljárással szelektált peptid és analógjai)
- Konjugátumok:
  - lehetőleg egyszerű reakcióban (egy üst reakció) könnyen kialakítható kötése kialakításával



# Támogatók



NK 77485

K 104045

K 119552



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



NVKP\_16-1-2016-0036



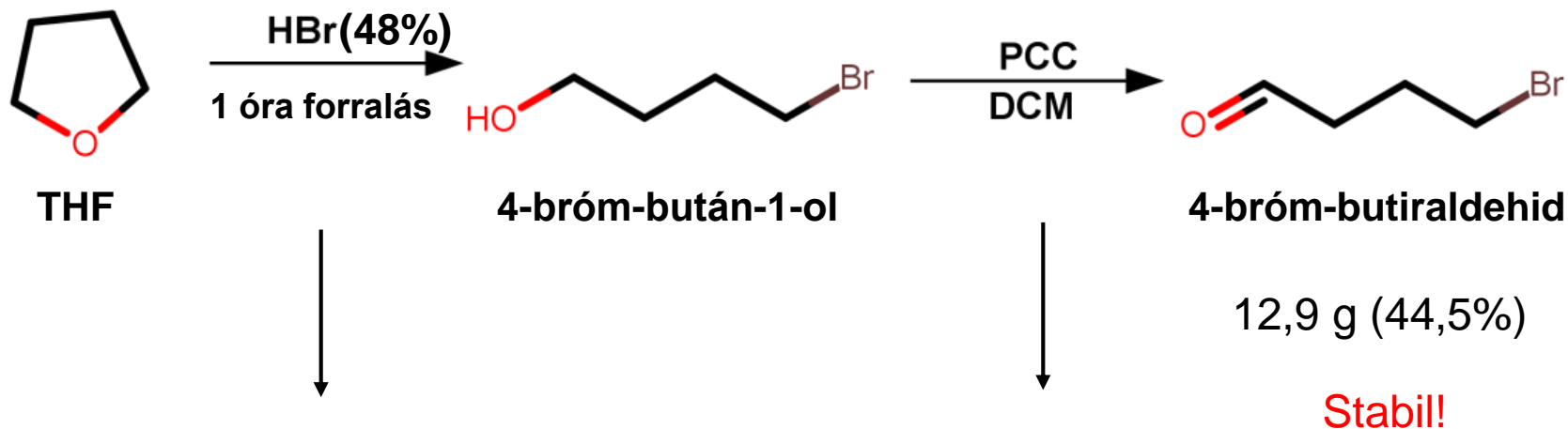
**MEDINPROT**

Szinergia program  
Műszer pályázat



***Köszönöm a figyelmet!***

## 4-Bróm-butiraldehid szintézise



- ✓ lehűtés
- ✓  $\text{KHCO}_3$ (sz.) semlegesítés
- ✓ extrakció
- ✓ szárítás
- ✓ bepárlás

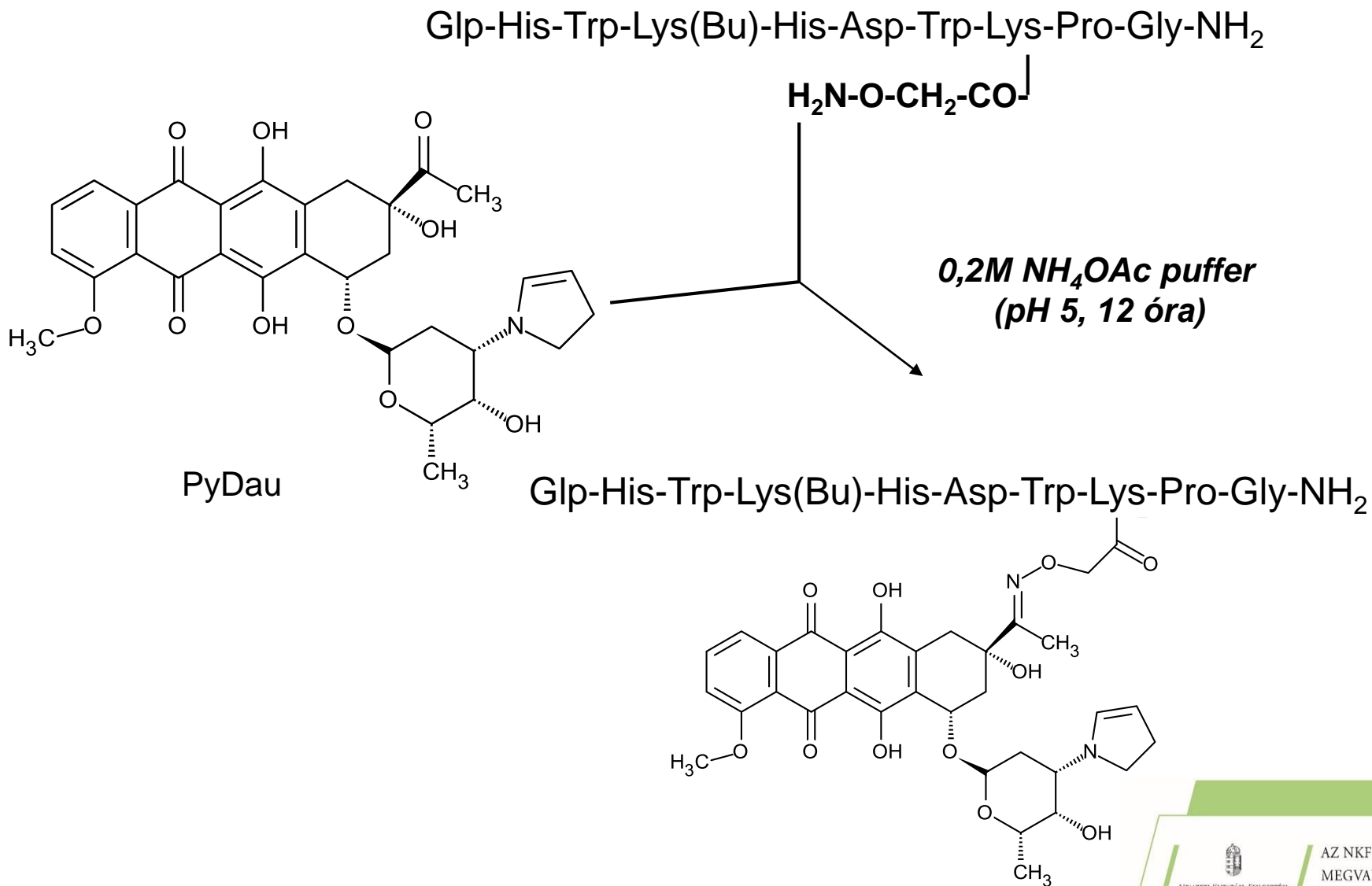
- ✓ hűtés mellet a beadagolás
- ✓ + 2 óra kevertetés (Ar alatt)
- ✓ *n*-hexánnal hígítva Celieten szűrés
- ✓ bepárlás

PCC: piridínium-klórkromát (~ 130 Ft/g; 60 g 7800 Ft)

Alkalmas kevés mellékterméket eredményező reakcióban a 2-pirrolino-daunorubicin előállítására!



# 2-Pirrolino-daunorubicin-[Lys<sup>4</sup>(Bu)]-GnRH-III konjugátum szintézise



# ***A szabad daunorubicin és 2-pirrolino-daunorubicin valamint [Lys<sup>4</sup>(Bu)]-GnRH-III konjugátumaik in vitro citosztatikus hatása***

Anyag	Citosztázis (MCF-7) IC <sub>50</sub> (µM)	Citosztázis (HT-29) IC <sub>50</sub> (µM)
Dau	0,10 ± 0,00	0,20 ± 0,05
PyDau	0,0002 ± 0,0001	0,0002 ± 0,0001
GnRH-III( <sup>4</sup> Lys(nBu) <sup>8</sup> Lys(Dau=Aoa))	0,70 ± 0,2	2,2 ± 0.6
GnRH-III( <sup>4</sup> Lys(nBu) <sup>8</sup> Lys(PyDau=Aoa))	0,046 ± 0,003	0,124 ± 0,080

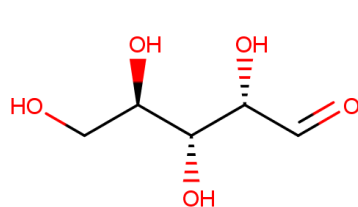
*In vitro* citosztatikus hatás (IC<sub>50</sub> érték) meghatározása MMT teszttel.

MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

MCF-7: humán emlő adenokarcinóma

HT-29: humán vastagbél adenokarcinóma

# Nemorubicin szintézise



2,3,4,5-tetrahidroxipentanal

